



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY
MATERIAL RESEARCH CENTRE

MIKROBIÁLNÍ PRODUKCE EXTRACELULÁRNÍCH POLYMERŮ A JEJICH ZAPOJENÍ DO STRESOVÉ ODPOVĚDI

MIKROBIAL PRODUCTION OF EXTRACELLULAR POLYMERS AND THEIR INVOLVEMENT
IN STRESS RESPONSE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

LUCIE MÜLLEROVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. STANISLAV OBRUČA, Ph.D.

BRNO 2014



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0803/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	Lucie Müllerová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Pavla Benešová	

Název bakalářské práce:

Mikrobiální produkce extracelulárních polymerů a jejich zapojení do stresové odpovědi

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše na téma extracelulární polymery produkované mikroorganismem *Aureobasidium pullulans*
2. Studium produkce extracelulárních polymerů mikroorganismem *Aureobasidium pullulans*
3. Experimentální ověření vlivu přítomnosti extracelulárních polymerů na odolnost buněk *A. pullulans* vůči vybraným stresovým faktorům.

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

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.

Lucie Müllerová
Student(ka)

Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá produkcí extracelulárního polysacharidu pullulanu mikroorganismem *Aureobasidium pullulans*, purifikací pullulanu a jeho možným využitím jako kryoprotektantu. Jako součást práce byla zpracována literární rešerše charakterizující *A. pullulans*, samotný pullulan a stresové faktory se zaměřením na teplotní stres. V rámci experimentální části byla stanovena růstová charakteristika mikroorganismu *A. pullulans* (byl použit kmen CCM 8182) a produkce pullulanu v ideálních podmínkách. Nejvyšší růst biomasy nastal při použití fruktosy jako zdroje uhlíku (3,580 g/l u kmene CCM 8182), nejvyšší produkce pullulanu při použití sacharosy jako zdroje uhlíku (10,300 g/l u F 148). Jako nejlepší precipitační činidlo z trojice ethanol, aceton, isopropylalkohol byl vybrán ethanol v poměru 1:2 (médium:ethanol). Stanovení čistoty pullulanu bylo provedeno pomocí HPLC. Dále byly zkoumány kryoprotektivní vlastnosti pullulanu a to při teplotách – 72° C, -18° C, 4° C a 60°C. Pullulan působil spíše negativně při teplotách – 72° C a 60° C. Naopak při teplotách – 18°C a 4° C byla potvrzena ochranná funkce polysacharidu.

Klíčová slova: *Aureobasidium pullulans*, pullulan, teplotní stres

Abstract

Bachelor's thesis is focused on the production of extracellular polysaccharide pullulan by microorganism *Aureobasidium pullulans*, purification of pullulan and its possible use as a cryoprotectant. As a part of this work a description of *A. pullulans*, pullulan and an overview of involvement in its stress response were provided. In the experimental part growth characteristics of *A. pullulans* (the strain CCM 8182 was used) and pullulan production during growth in optimal conditions was analyzed. Biomass production was the highest with fructose as a carbon source (3,580 g/l CCM 8182), the highest pullulan production occurred when using sucrose as a carbon source (10,300 g/l F 148). Among three organic solvents used for pullulan precipitation – ethanol, acetone, isopropylalcohol, ethanol was selected as the best for further experiments in ratio 1:2 (fermentation broth:ethanol). Pullulan purity was characterized by HPLC. As a further part of this work, cryoprotectant properties of pullulan at temperatures – 72° C, -18° C, 4° C and 60°C were studied. The presence of pullulan at temperatures – 72° C and 60° C was found to be detrimental to cell viability. At temperatures – 18° C and 4° C the cryoprotectant activity of the polysaccharide was confirmed.

Keywords: *Aureobasidium pullulans*, pullulan, thermal stress

MÜLLEROVÁ, L. *Mikrobiální produkce extracelulárních polymerů a jejich zapojení do stresové odpovědi*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. XY 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 vedoucímu mé bakalářské práce, Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D., za odborné vedení a všestrannou pomoc při řešení problémů. Dále bych ráda poděkovala Ing. Pavle Benešové za cenné rady, ochotu a celkovou pomoc při zpracování této práce.

OBSAH

1.	ÚVOD.....	7
2.	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1.	Mikroorganismy a stresová odpověď.....	8
2.2.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	8
2.2.1.	Morfologie	8
2.2.2.	Způsob rozmnožování.....	9
2.2.3.	Výskyt v chladném prostředí	10
2.2.4.	Využití <i>Aureobasidium pullulans</i>	11
2.2.4.1.	Produkce enzymů	11
2.2.4.2.	Produkce extracelulárních polymerů.....	11
2.2.4.3.	Posklizňová kontrola ovoce a zeleniny	11
3.	Pullulan.....	11
3.1.	Chemická struktura	12
3.1.1.	Způsob produkce pullulanu	13
3.1.2.	Biologická funkce	13
3.1.3.	Purifikace pullulanu	13
3.1.3.1.	Precipitace alkoholu	13
3.1.3.2.	Dialýza.....	14
3.1.3.3.	Odstranění melaninu.....	14
3.1.4.	Využití v průmyslu	14
3.2.	Kultivace mikroorganismů.....	15
3.2.1.	Živná média	15
3.2.2.	Rozdělení živných médií	15
3.2.3.	Růstová křivka	16
3.2.4.	Metody stanovení biomasy	17
3.2.4.1.	Přímé stanovení počtu buněk.....	17
3.2.4.2.	Nepřímé stanovení počtu buněk	17
3.2.4.3.	Turbidimetrické stanovení.....	17
3.2.4.4.	Gravimetrické stanovení.....	17
3.3.	Stres.....	17
3.3.1.	Teplotní stres.....	18
3.3.2.	Extracelulární polysacharidy jako obrana ve stresových podmínkách.....	19
3.4.	Průtoková cytometrie	19
3.5.	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie - HPLC	20
4.	CÍL PRÁCE	23
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
5.1.	Pracovní přístroje, chemikálie a mikroorganismy	24
5.1.1.	Použité přístroje	24
5.1.2.	Chemikálie	24
5.1.3.	Použité kmeny.....	25
5.2.	Kultivace	25
5.2.1.	Tuhé médium	25
5.2.2.	Inokulum.....	26
5.2.3.	Produkční médium.....	26
5.2.4.	Optimalizace kultivačních podmínek	26
5.2.4.1.	Použité sacharidy.....	26

5.2.5.	Stanovení biomasy	26
5.2.6.	Spektrofotometrická stanovení	27
5.2.6.1.	Stanovení obsahu celkových sacharidů dle Duboise.....	27
5.2.6.2.	Stanovení redukujících sacharidů dle Somogyi-Nelsona.....	27
5.2.6.3.	Stanovení obsahu bílkovin dle Hartree-Lowryho.....	27
5.2.7.	Stanovení obsahu extracelulárních polysacharidů.....	28
5.2.7.1.	Precipitace a gravimetrické stanovení	28
5.2.7.2.	Stanovení ECP pomocí HPLC.....	28
5.3.	Růstová křivka	28
5.3.1.	Inokulum.....	28
5.3.2.	Produkční médium.....	28
5.3.3.	Stanovení růstové křivky	28
5.3.4.	Stanovení pullulanu	28
5.4.	Purifikace pullulanu	28
5.4.1.	Purifikace alkoholem	29
5.4.2.	Dialýza	29
5.5.	Zkoumání kryoprotektivních vlastností pullulanu	29
6.	Výsledky a diskuse	30
6.1.	Vliv různých zdrojů sacharidů kultivačního média na koncentraci sušiny a pullulanu	30
6.1.1.	Vliv různých zdrojů uhlíku na růst biomasy.....	30
6.1.2.	Vliv na produkci pullulanu	31
6.2.	Stanovení zbytkových redukujících sacharidů dle Somogyi-Nelsona.....	32
6.3.	Stanovení obsahu celkových sacharidů dle Duboise	33
6.4.	Růstová křivka	35
6.5.	Purifikace pullulanu	36
6.5.1.	Výběr precipitačního činidla.....	37
6.5.2.	Optimalizace poměru precipitačního činidla	37
6.5.3.	Spektrofotometrické stanovení sacharidů a bílkovin.....	39
6.5.3.1.	Stanovení obsahu bílkovin dle Hartree-Lowryho.....	39
6.5.3.2.	Výsledky spektrofotometrického stanovení	40
6.6.	Kryoprotektivní účinky pullulanu	40
7.	ZÁVĚR	45
8.	LITERATURA	47
9.	SEZNAM ZKRATEK	51

1. ÚVOD

Polymorfní mikroorganismus *Aureobasidium pullulans* je široce rozšířen v okolním prostředí. Průmyslově významný je díky produkci řady metabolitů, jako jsou hydrolytické enzymy a extracelulární polymery. Mezi tyto polymery patří i polysacharid pullulan skládající se z α -maltotriosových jednotek. Pullulan nachází své uplatnění v řadě oborů jako je farmaceutický nebo potravinářský průmysl. Velkou výhodou tohoto polysacharidu je netoxičnost a biodegradabilita, tedy vlastností, jichž se dá využít v medicínských aplikacích.

Předpokládá se, že funkce pullulanu je ochrana buňky před vnějšími stresovými faktory. V této práci byly zkoumány kryoprotektivní vlastnosti pullulanu. Byly připraveny roztoky pullulanu o určených koncentracích, které byly přidávány k suspenzi buněk *A. pullulans*. Po několikahodinovém vystavení mrazu byla zkoumána viabilita těchto buněk.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Mikroorganismy a stresová odpověď

Mikroorganismy jsou neustále v kontaktu se svým životním prostředím, a proto byly nuceny se přizpůsobit tak, aby byly schopny v tomto prostředí existovat a rozmnožovat se. Díky tomu, že jsou neustále podrobena různým změnám, ať už je to teplota, změna pH, nedostatek živin, mluvíme o určitých stresových faktorech působících na tyto mikroorganismy, evolučně se naučily na tyto změny odpovídat. Jednotlivé druhy si dokázaly vyvinout jiné odpovědi na stejné podněty, záleží jak na dlouhodobých klimatických a geografických podmínkách, ve kterých se nachází, tak i na momentální situaci v okolí, dá se tedy mluvit o komplexním systému stresové odpovědi, který je každému mikroorganismu vlastní a nikdy nelze očekávat, že na stejný stresový podnět bude ten samý mikroorganismus odpovídat stejně.

2.2. *Aureobasidium pullulans*

Díky své toleranci k vysokým koncentracím cukrů a neutrálních solí ve svém okolí, vysokým dávkám ultrafialového záření, široké škále pH, ve kterých může existovat, se vyskytuje v různorodých prostředích. Často se vyskytuje v mírném pásu, ale není vzácné ani v tropickém nebo polárním pásu. Nejčastěji se vyskytuje ve vodním prostředí a to jak v prostředí s kolísavou vodní hladinou, např. fylosféra, ale i v osmoticky stresovém prostředí jako jsou solivary. [1]

Díky hydrolytickým enzymům, které je schopné produkovat, má schopnost rozkladu celulosy, hemicelulosy, xylanu, ligninu, škrobu apod. Mimo jiné má schopnost rozkládat barvy a rozrušovat elektrické kabely. [1]

2.2.1. Morfologie

Kolonie jsou hladké a lesklé, zbarvení mladých kolonií bývá bílé nebo narůžovělé, stárnutím přechází přes hnědou až na černou barvu a to díky přítomnosti pigmentů.

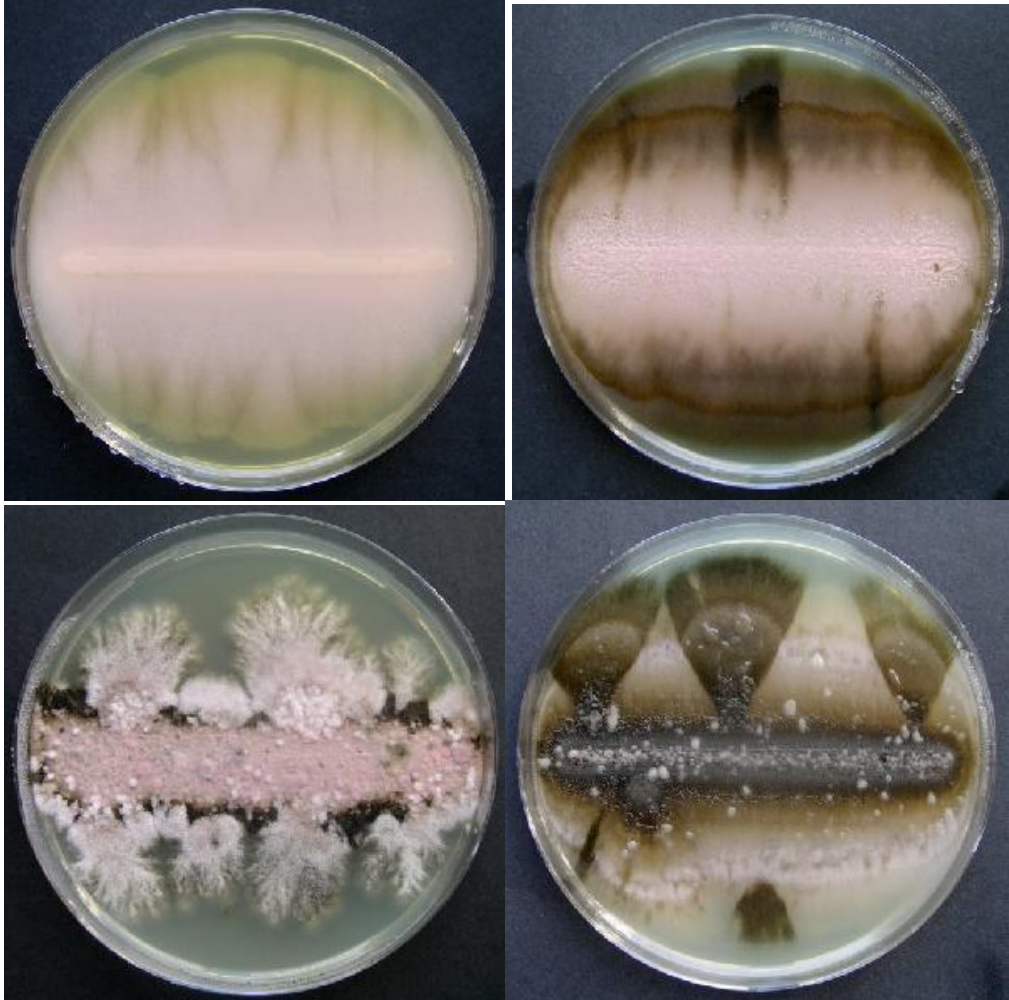
Aureobasidium pullulans je polymorfní organismus, existuje tedy ve více než jedné formě, přesněji v kvasinkové formě a ve formě plísně, záleží na vnějších podmínkách.

Dělí se na čtyři varianty:

Aureobasidium pullulans var. *melanogenum*, jež je četně pigmentována. Hojně produkuje tmavé, elipsoidní konidie, které se vytváří z arthrokonidií. Tato varianta se nachází v prostředí s nízkou hladinou živin, např. na vlhkých površích skla, kovu, v koupelnách, fontánách nebo mořské vodě. Také toleruje vyšší teplotu než varianta druhá, *A. pullulans* var. *pullulans*. Kolonie jsou narůžovělé, rychle rostoucí, někdy se mohou barvit do hněda a to díky lokálnímu výskytu tlustostěnných pigmentovaných hýf. Tato varianta se vyskytuje v prostředí s malou vodní aktivitou. [2, 3]

A. pullulans var. *subglaciale* byla izolována z prostředí arktických ledovců, tedy ze samotného ledu a z mořské vody v jeho bezprostřední blízkosti. [4]

A. pullulans var. *namibiae* byla izolována z mramoru z Namibie, Afriky. Teplotní rozmezí, ve kterém je tato varianta schopna růstu, je nejužší ze všech dosud popsanych. [5]

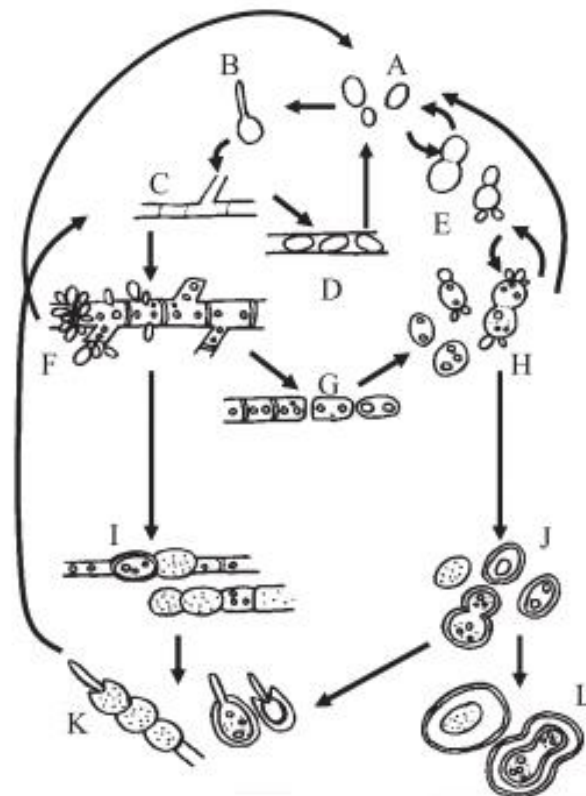


Obrázek 1 - Po směru hodinových ručiček zleva - var. *pullulans* [3], var. *melanogenum* [2], var. *sublaciae* [4], var. *namibiae* [5]

Při kultivaci v tekutých médiích je pH jedním z faktorů ovlivňujících morfologii *Aureobasidia*, při pH 2-2,5 se jedná o formu plísně, naopak kvasinková forma je hlavně při pH 6-8. Z tohoto údaje se dá vysledovat trend, že čím nižší pH, tím více se v médiu nachází plísňových buněk, naopak čím vyšší pH, *Aureobasidium* spíše upřednostňuje formu kvasinky. [7, 8]

2.2.2. Způsob rozmnožování

A. Pullulans se rozmnožuje vegetativně a to pomocí blastokonidií, které pučí po stranách hýf, a následuje další pučení, tentokrát v sekundární konidii, jež je menší než původní blastokonidie. V případě starších hýf může docházet k jejich rozpadání se v arthrospory. Zralé chlamydostry uvolňují buňku, která následně vyklíčí. Střídání těchto dvou forem rozmnožování je cyklické. [2, 9]



Obrázek 2 - Životní cyklus *Aureobasidium pullulans*.

A – konidie, B – konidie klíčící v hýfě, C – hýfy, D – endokonidie, E – sekundární konidie, F – buňky plísňové formy, G – oddělování jednotlivých plísňových buněk, H – pučení a oddělování buněk, I – chlamydozoospory (forma plísně), J – chlamydozoospory (forma kvasinky), K – klíčící chlamydozoospory, L – chlamydozoospory s ochrannou vrstvou pullulanu [22]

2.2.3. Výskyt v chladném prostředí

Jak již bylo zmíněno, *Aureobasidium* lze najít téměř ve všech typech prostředí, ty s teplotou pod bodem mrazu nevyjímaje.

První zprávy o výskytu *A. pullulans* v chladném severském prostředí přinesli Abyzov v roce 1993 [10] a objev potvrdili Babjeva a Reshetova v roce 1998 [11]. Ačkoli koncentrace této kvasinky ve vzorcích odebraných ze Sibiřského permafrostu a Antarktických půd nebyla příliš výrazná, podařilo se zde najít dostatečný důkaz o výskytu tohoto mikroorganismu i v těchto nepříznivých podmínkách.

Zalar a jeho tým odebírali vzorky arktických ledovců a ledovcových jeskyní v letech 2001 – 2003 z oblasti Svalbardu (Spitsbergen, Norsko) a potvrdili hojný výskyt této kvasinky. Byly odebírány vzorky jak čistého ledu, tak i samotné půdy, průměrná celoroční teplota v této oblasti je -5°C . [12]

Benedetta a Brana provedli další studii týkající se výskytu *A. pullulans* se vzorky z Alpínského ledovce Calderone, Apeniny, Itálie, v letech 2006 - 2008. Společně s *A. pullulans* bylo izolováno dalších 29 druhů plísňových mikroorganismů. Z celkových 100 % zaujímalo *A. pullulans* 3,5 %, což z něj dělalo 8. nejčastěji se vyskytující mikroorganismus. [13]

2.2.4. Využití *Aureobasidium pullulans*

2.2.4.1. Produkce enzymů

Všeobecně se dá říci, že různé kmeny *A. pullulans* produkují amylázy, lipázy, celulózy, proteázy, xylanázy apod., jež mají široké uplatnění v průmyslu.

Fruktooligosacharidy, používány jako probiotika, jsou převáděny ze sacharosy pomocí fruktofuranosidáz získaných z *A. pullulans*. [14]

2.2.4.2. Produkce extracelulárních polymerů

Nejvýznamnějším polymerem je pullulan, více informací viz kapitola 2.2. Dalším polysacharidem produkovaným *A. pullulans* je nerozpustný β -glukan, viz obrázek 2.

Dále je mikroorganismus schopen produkce β -poly-L-jablečné kyseliny. Jedná se o nevětvený čtyřuhlíkatý polyester složený z L-malátových monomerů. Lze jí využít jako transportní systém pro léčiva vzhledem k výjimečným vlastnostem kyseliny, které jsou podporovány její plnou biodegradabilitou a biokompatibilitou. [15]

2.2.4.3. Posklizňová kontrola ovoce a zeleniny

Alternativou ošetření ovoce a zeleniny fungicidními prostředky po sklizni je použití běžně se vyskytujících mikroorganismů. K tomuto kroku bylo přistoupeno po zvážení následků, které může mít takto chemicky ošetřené ovoce či zelenina na lidské zdraví a životní prostředí. Zároveň může postupem času docházet k získání rezistance patogenů k těmto fungicidům. Několik kvasinek, bakterií a filamentárních hub se ukázalo jako účinná náhrada fungicidních prostředků. Ovšem takto využívané mikroorganismy musí splňovat několik kritérií. Jedním z těchto kritérií je odolnost vůči nízké hladině živin v okolí a to kvůli skutečnosti, že jsou často používány těsně před sklizní samotného ovoce nebo zeleniny. [16, 17]

Některé kmeny *A. pullulans* jsou schopny zamezit rozvoji mikroorganismů způsobujících hnilobu ovoce i zeleniny. Pokusy probíhaly na ovoci rozděleného do dvou skupin – jedna skupina byla namáčena v suspenzi buněk *A. pullulans* o koncentraci 10^7 /ml, druhá, kontrolní, v destilované vodě. Hniloba v první skupině byla snížena o 10 – 100 %, záleželo na použitém kmenu. [16]

A. pullulans je využíváno jako obrana proti *Botrytis cinerea* a *Penicillium expansum*, které způsobují hnilobu jablek [16]. Podobně bylo *A. pullulans* studováno při ochraně třešní a hroznového vína, a to opět proti *B. cinerea* a *P. expansum*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger* [17] a *Monilinia laxa* [16].

3. Pullulan

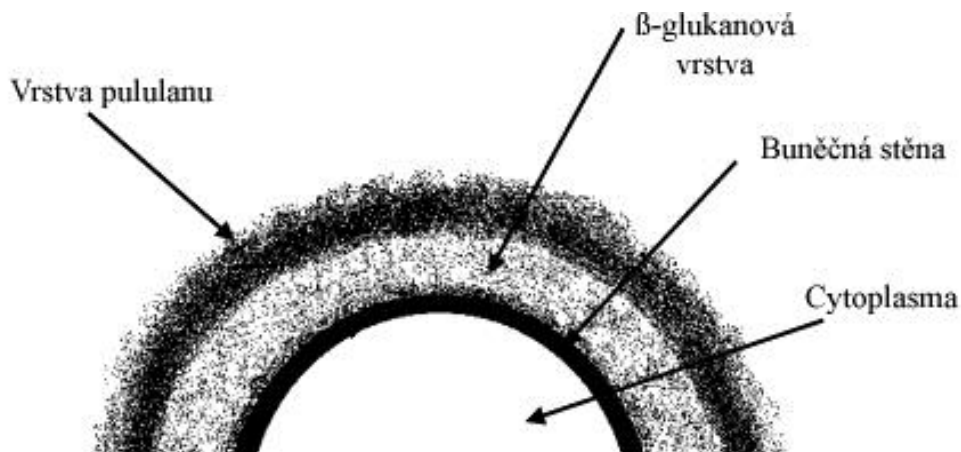
V roce 1938 Bauer poprvé zaznamenal produkci extracelulárního polysacharidu kvasinky *Aureobasidium pullulans*, ale tento exopolysacharid, pullulan, byl poprvé izolován Bernierem až roku 1958 a o rok později začala i jeho důkladná analýza. V roce 1961 byl objeven enzym pullulanáza, který specificky štěpí α -1,6 vazby.

Samotná biosyntéza kvasinkou je dosud ne zcela objasněna. Je jasné, že k syntéze je potřeba UDP-glukozy (uracil difosfát glukóza) a ATP, samotný pullulan se syntetizuje přes lipidové intermediáty, ale přesný mechanismus nebyl objasněn. [19]

Catley a Kelley [21] dokázali, že k syntéze pullulanu jsou využívány uhlíkaté prekurzory uložené v buňce, např. panosa nebo isopanos. Tyto prekurzory pochází ze sacharidů naakumulovaných v dřívějších stádiích životního cyklu. V podstatě buňka

nejprve naakumuluje jednoduché sacharidy ze svého okolí a poté z nich tvoří pullulan. Simon a kol. [20] tuto skutečnost potvrdili a to pokusem, při kterém byla monitorována koncentrace sacharidů v živném médiu, intracelulární glykogen a množství pullulanu buňkami vyprodukovaného.

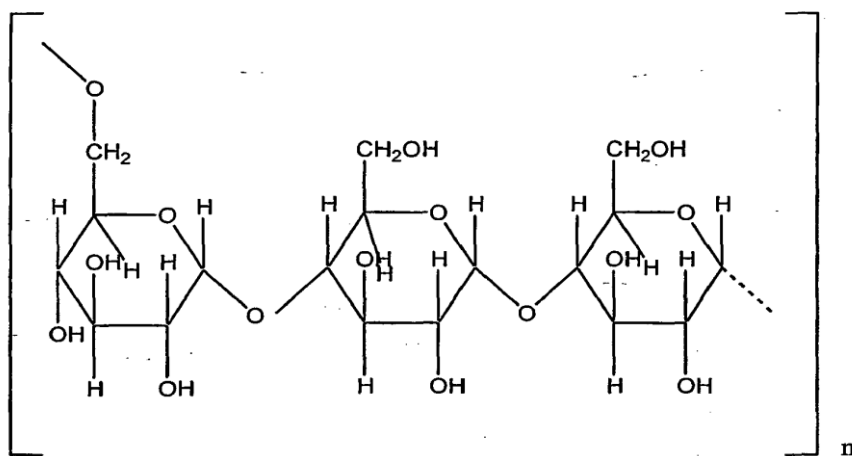
Na obrázku 2 je schematické znázornění umístění dvou exopolysacharidů produkovaných *A. pullulans*, nejzvnějšší vrstvu tvoří samotný pullulanu a druhou, pod pullulanem umístěnou vrstvu nerozpustný β -glukan. [31]



Obrázek 3 - Schematické zobrazení lokalizace pullulanové vrstvy a nerozpustného β -glukanu [31]

3.1. Chemická struktura

Jedná se o lineární homopolysacharid složený z maltosotriosových jednotek. V jedné takové jednotce se nachází vazby α -1,4, jednotlivé jednotky jsou pospojované α -1,6 vazbami. Jedná se o netoxický, jedlý, biodegradabilní polysacharid, ve vodě rozpustný, naopak v organických rozpouštědlech je zcela nerozpustný. Roztoky jsou viskózní, viskozita závisí na molekulové hmotnosti, ale není významně závislá na fyzikálních podmínkách jako je pH nebo teplota [22]. Řetězec pullulanu může obsahovat i náhodně zařazené maltotetrosové jednotky, ovšem toto procento je zcela minoritní [19].



Obrázek 4 - Struktura pullulanu [19]

3.1.1. Způsob produkce pullulanu

Při sledování vztahu mezi životním cyklem *Aureobasidia* a produkcí pullulanu bylo zjištěno, že nejvyšší produkce nastává při produkci blastospor, což je nepohlavní výtrus vzniklý pučením. Nově vzniklé buňky jsou hlavním producentem pullulanu. Dále bylo zjištěno, že kvasinková forma *Aureobasidia* produkuje pullulan, naopak u formy plísně se tato produkce téměř nevyskytuje [23].

Je zajímavé, že ačkoli bylo Catleym [23] řečeno, že hlavním producentem polysacharidu je kvasinková forma, tedy by se dalo předpokládat, že optimální pH při produkci pullulanu je v rozmezí 6-8 (viz. kapitola 2.1.1), bylo zjištěno, že optimální pH pro produkci pullulanu a biomasy je hodnota 4,5, tedy kdy se v médiu obsahující *Aureobasidium* nachází 50 % buněk ve formě kvasinek a 50 % ve formě plísně. Produkce pullulanu se ze zvyšujícím pH prudce snižuje, při hodnotách nižších než 2,5 se biosyntéza zcela zastavuje. [8, 21]

Při zkoumání vlivu koncentrace kyslíku na produkci pullulanu byl závěr takový, že při zvýšené koncentraci byla zvýšená koncentrace hýf a pullulan nemohl být dále syntetizován [24].

3.1.2. Biologická funkce

Jak je zřejmé z obrázku 2, pullulan je nejzevnější vrstva obalující buňky *A. pullulans*, z čehož lze usoudit, že pro samotný mikroorganismus plní tento polysacharid funkci ochrannou. Další vlivy nebo využití buňkou není známo.

Díky biokompatibilitě a biodegradabilitě je snaha o využití pullulanu v potravinářském, farmaceutickém a medicínském průmyslu. [19]

3.1.3. Purifikace pullulanu

Díky obsahu pigmentů je třeba pullulan odbarvit, např. použitím aktivního uhlí, popř. několikanásobnou precipitací v alkoholu. Obvykle začíná produkce melaninu dva dny po zaočkování, ale samozřejmě záleží na složení média a druhu *A. pullulans*. Bylo dokázáno, že redukce koncentrace draslíku a KH_2PO_4 v médiu snižuje výsledný obsah melaninu [25].

3.1.3.1. Precipitace alkoholy

Existuje několik metod purifikace pullulanu, mezi nejpoužívanější patří několikanásobné vysrážení pullulanu z média. K tomuto účelu bývají používány alkoholy. Nejprve je médium zbaveno buněk a to centrifugací, poté se k získanému supernatantu přidává vybraný alkohol, a to v určitém poměru.

Co se týče druhu alkoholu, za nejvhodnější jsou považovány ty s malou hydrofilitou, třemi a více uhlíky, např. izopropanol, propanol; estery se třemi a více uhlíky, např. methyl acetát; ethery se třemi a více uhlíky, např. tetrahydrofuran. [26]

Choudhury a spol. si vybrali čtyři alkoholy – ethanol, aceton, THF a isopropanol, sedm různých koncentrací v rozmezí 1:1 až 1:7, a pokoušeli se najít ideální bilanci mezi druhem alkoholu a poměrem supernatant : precipitátor. Z jejich výzkumu vyplývá, že při poměru 1:5 byla nejvyšší výnosnost vysrážených sacharidů, po navýšení tohoto poměru na 1:6 hmotnost pullulanu zůstala konstantní, proto se poměr 1:5 dá považovat za optimum. Jako nejideálnější alkohol se jevil THF následovaný acetonem a isopropanolem. [27]

3.1.3.2. Dialýza

Dialýza je purifikační metoda, levná a nenáročná, při které se lze zbavit molekul např. solí, jejichž velikost je < 1 nm, tvoří tedy s námi purifikovanou složkou pravý roztok. Koloidní částice, rozmezí 1 – 1000 nm, v roztoku jsou v tomto případě tvořeny molekulami pullulanu.

Vzorek se umístí do dialyzačního střívka, které má určitý průměr pórů. Toto střívko, ať už přírodního (pergamén) nebo umělého (celofán, koloidové filtry) původu, je poté umístěno do minimálně 10x většího objemu rozpouštědla. Na rozhraní membrány vzniká koncentrační gradient a ten je hnací silou dialýzy. Póry prochází molekuly menší než je jejich průměr, koloidní částice nemohou procházet. [28]

3.1.3.3. Odstranění melaninu

Nežádoucí zabarvení pullulanu způsobuje barvivo melanin, které lze odstranit peroxidem vodíku. Mishra [26] vyzkoušel různé koncentrace H_2O_2 a to v rozmezí 1 – 12 %, které byly přidány k supernatantu. Jako ideální se jevila koncentrace 10 %, po překročení této hranice se nezvyšovalo procento odstraněného melaninu. Ke zkontrolování množství odstraněného melaninu byla použita UV-VIS spektroskopie při 320 nm.

Samotný pullulan byl poté vysrážen alkoholem, Mishra použil isopropanol. [29]

3.1.4. Využití v průmyslu

Pullulan splňuje podmínku netoxičnosti a biodegradability, lze jej tedy využít v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, i jiných, příbuzných oborech. Své využití v průmyslu nachází pullulan už téměř 30 let. Vysoká cena za čistý pullulan je ovlivněna obtížemi při jeho purifikaci, kde největší problém je s odstraněním pigmentů, především černých, hnědých a zelených, které *Aureobasidium* produkuje. Proto je snaha o produkci *Aureobasidia*, které je bezbarvé, tudíž nedochází ke znečištění produkovaného pullulanu [30].

Pullulan lze využít jako potahový obal pro léčiva, potraviny, hnojiva, papír, tabák apod., a to díky schopnosti nepropouštět kyslík a odolnosti proti tukům. Díky odolnosti proti vzdušnému kyslíku může být pullulan využit nejen jako potahový obal, ale i přímo jako obalový materiál, kdy bude zabraňovat oxidaci materiálu uvnitř [31].

Rozpustnost ve vodě může být snížena, a to esterifikací nebo etherifikací pullulanu. Hydrogenace vede ke zvýšení tepelné stability a karbonylace zvyšuje rozpustnost ve studené vodě. Pokud se na řetězec naváží mastné kyseliny či cholesterol, takto upraveného pullulanu se dá využít při zvýšení stability emulzí typu olej ve vodě. [19]

Další využití pullulan nachází jako zahušťovadlo a to díky vlastnosti značně zvyšovat viskozitu roztoků již v malých koncentracích (viz. kapitola 2.2.1), obecně tedy můžeme upravovat texturu roztoků, do kterých je tento polysacharid přidáván. Kromě zahušťovadla se přidává jako zvyšovač kalorické hodnoty potravin. [31]

Byla snaha vytvoření plasma-substituentů založených na pullulanu. V Japonsku bylo v rámci tohoto cíle zkoumáno intravenózní podání pullulanu s rozdílnou molekulovou hmotností. Pullulan s M_w menší než 15 kDa nebyl účinný, pouze zatěžoval ledviny, naopak při M_w větší než 150 kDa se prudce zvýšil tlak a bylo zatěžováno srdce a celý kardiovaskulární systém. Další pokusy ukázaly, že jako ideální se jeví pullulan s M_w okolo 62 kDa, největší problém ovšem představuje skutečnost, že při koncentraci už

0,6 g/l zvyšuje pullulan hustotu krve na dvojnásobek. Pullulan dále vykazuje zvýšenou afinitu k játrům. [21]

3.2. Kultivace mikroorganismů

3.2.1. Živná média

Mikroorganismy potřebují ke svému růstu a množení správnou výživu, kterou přijímají ze svého okolí. V laboratorních podmínkách se tímto okolí stává živné médium, jehož složení je zvoleno tak, aby obsahem látek simulovalo přirozené prostředí daného mikroorganismu. Za základní složky živného média jsou brány voda, zdroj uhlíku, dusíku, minerálních látek, voda, kyslík, fosfor, vitamíny. Pro různé mikroorganismy jsou poměry těchto látek odlišné. [32, 33]

Voda, jako pro všechny živé organismy, je nejdůležitější součástí média. V ní jsou rozpuštěny všechny látky, probíhá v ní růst, množení, komunikace mezi buňkami. Zároveň je v ní rozpuštěn kyslík, který kvasinky nejsou schopny přijímat ze vzduchu. Proto je důležité mít třepací přístroj, který úměrnou rychlostí bude míchat médium, tedy i napomáhat rozpuštění kyslíku. [32, 33]

Jako zdroj uhlíku lze použít jednoduché sacharidy jako např. glukosu, sacharosu, fruktosu nebo i polysacharidy. Sacharidy jsou využívány oxidačním způsobem a kromě zdroje uhlíku jsou využívány i jako zdroj vodíku a kyslíku. [32]

Jako zdroj dusíku lze použít dusičnany, dusitany, amonné soli nebo lze využít dusík přímo ze vzduchu. Z organických zdrojů lze využít nativní bílkoviny, peptony, peptidy nebo kvasniční autolyzát. [32]

V přítomnosti nadbytku amonných kationtů v médiu se výsledná morfologie *A. pullulans* lišila od situace, kdy byly použity soli dusičnanu. V případě amonných kationtů bylo možno identifikovat mycelium i unicelulární formu. V přítomnosti dusičnanových solí vznikaly téměř výlučně buňky kvasinkovité formy. [32]

Důležitý pro přenos energie díky reakcím zprostředkovaných ATP (adenin trifosfátem) je fosfor. Pokud by v médiu zcela chyběl, mikroorganismus by neměl dostatek energie na růst a množení. Používá se fosfor vázaný v solích kyseliny fosforečné a to zejména draselných a amonných. [32, 33]

Dalšími důležitými minerály jsou draslík, hořčík, chlor, které jsou přidávány ve formě solí. Minerální látky jsou důležitými podpůrci růstu. Jejich koncentrace v médiu by měla být mnohokrát méně než ostatních látek a byla zjištěna experimentálně. Pokud by koncentrace byla příliš vysoká, tak tyto látky mohou působit toxicky a vést k zastavení růstu, popř. usmrcení mikroorganismu. [32, 33]

3.2.2. Rozdělení živných médií

Živná média lze rozdělit podle různých charakteristik:

- Podle použití:
 - univerzální neboli základní: svým složením vyhovují velkému záběru mikroorganismů
 - selektivní: svým složením odpovídají potřebám pouze jednoho druhu mikroorganismu. Díky obsahu určitého inhibitoru (např. antibiotika) potlačují růst jiné mikroflóry

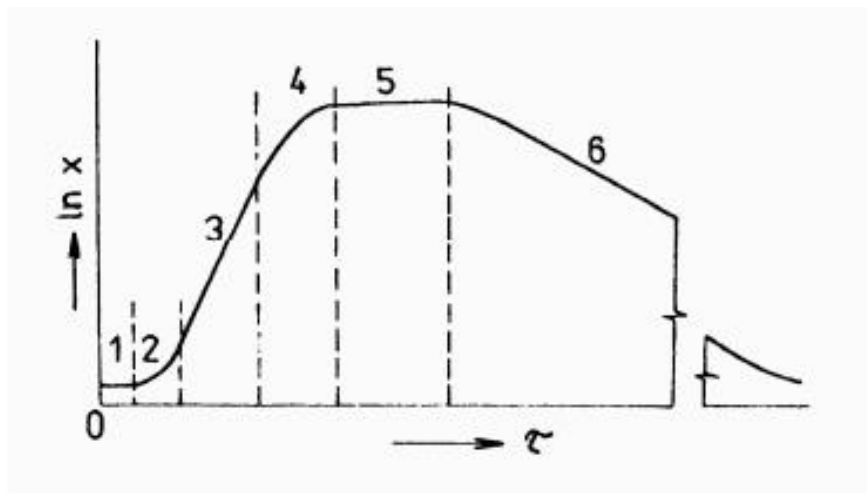
- selektivně-diagnostická: na těchto médiích roste jen malá skupina mikroorganismů. Svým složením potlačují růst jiných mikroorganismů [33]
- Podle původu a složení:
 - přirozená: jedná se o přirozené substráty jako je např. mléko, chleba. Jsou vhodné na krátkodobou kultivaci. Lze využít i odpadních substrátů
 - polosyntetická: jako zdroj dusíku a uhlíku jsou používány proteiny a peptidy ve formě extraktů, autolyzátů nebo peptonů
 - syntetická: vyznačují se přesným chemickým složením. Jako zdroj uhlíku bývá obvykle glukosa, ale může být nahrazena i jiným jednoduchým sacharidem. Jako zdroj dusíku jsou voleny amonné soli [33]
- Podle konzistence:
 - tekutá neboli kapalná: neobsahují žádné ztužovací látky
 - polotekutá: ztužovacích látek obsahují malé procento
 - pevná: jako ztužovací látku obsahují např. agar nebo želatinu [33]

3.2.3. Růstová křivka

Rozmnožování mikroorganismů probíhá velmi rychle, za optimálních podmínek dokážou např. půdní bakterie zdvojnásobit svůj počet za 20 minut. Tento přírůstek je ale omezen a závisí na koncentraci živin a také je zpomalován hromaděním metabolitů v okolí.

Růstová křivka, tedy grafické znázornění přírůstku biomasy, charakterizuje růst mikroorganismů, kdy na ose x je čas kultivace, na ose y logaritmus počtu živých buněk. Křivka má několik růstových fází:

1. Lag-fáze, neboli přípravná, adaptační fáze. Zde ještě nedochází k rozmnožování buněk, ale k jejich zvětšování a aktivování enzymového systému. V této fázi záleží na druhu mikroorganismu, pro který je křivka stanovována, protože délka se různí u jednotlivých mikrobů. Dalšími faktory, na které je důležité brát ohled, jsou fyziologický stav buněk a koncentrace inokula.
2. Fáze zrychleného růstu, tedy fáze akcelerační. V této části jsou buňky nejcitlivější a zároveň mají největší objem, rychlost jejich růstu převyšuje rychlost množení.
3. Fáze exponenciální, logaritmická. V této fázi je metabolismus velmi aktivní, buňky se množí téměř geometrickou řadou, protože systém ještě není limitován nedostatkem živin.
4. Fáze zpomaleného růstu. Metabolismus a množení se zpomaluje, počet odumírajících buněk se zvyšuje. Živiny jsou vyčerpávány a dochází k hromaděním metabolitů.
5. Fáze stacionární. V této fázi je počet živých a mrtvých buněk vyrovnán a množení buněk dosáhlo maxima. Nejvíce limitující faktor je koncentrace živin v okolí buněk.
6. Fáze zrychleného odumírání. Úbytek buněk převyšuje jejich přírůstek. Díky kritickému snížení živin se snižuje i metabolismus, zásobní látky se odbourávají. [35]



Obrázek 5 - Růstová křivka [35]

3.2.4. Metody stanovení biomasy

3.2.4.1. Přímé stanovení počtu buněk

Při metodě přímého stanovení se pracuje s určitým objemem. Buňky se počítají jednotlivě pod mikroskopem a to za použití komůrek, které jsou pro tento účel speciálně určeny. Nejvíce používaná je komůrka Bürkerova. [35]

3.2.4.2. Nepřímé stanovení počtu buněk

Základní předpoklad je ten, že z jedné buňky schopné se rozmnožovat vyrůstá jedna kolonie. Tyto kolonie vyrůstají na agarových plotnách a při nepřímém stanovení se počítají právě tyto kolonie. [35]

3.2.4.3. Turbidimetrické stanovení

Tato metoda je založena na zvyšujícím se zákalu média se zvyšujícím se počtem buněk. Nejčastěji je využíváno spektrofotometrické měření s vlnovými délkami v rozmezí 550 nm – 650 nm. Při této metodě záleží na tvaru a velikosti buněk, např. tato metoda je vhodná pro koky a tyčinkovité mikroorganismy, ale pro mikroorganismy vytvářející řetězce nedává přesné výsledky. [35]

3.2.4.4. Gravimetrické stanovení

Biomasa je vysušena při 105° C, poté zchlazena na laboratorní teplotu v exsikátoru. Po vychladnutí je sušina zvážena na analytických vahách. [35]

3.3. Stres

Růst i rozmnožování mikroorganismů jsou závislé na prostředí, ve kterém se nachází. Každý MO má své ideální podmínky, ve kterých může existovat. Jakmile jsou tyto podmínky pozměněny a k buňkám se nedostává potřebné množství živin, popř. samotné parametry prostředí jsou pozměněny, lze mluvit o stresu.

Jako základní parametry prostředí jsou brány teplota, hydrostatický tlak, pH, vodní aktivita a oxidačně-redukční potenciál. [36]

Může nastat i změna povrchového napětí, v této situaci se povrchově aktivní látky hromadí na rozhraní dvou různých fází, v tomto případě se jedná o rozhraní prostředí-povrch buňky.

Zároveň i některé chemické látky vyskytující se v prostředí mikroorganismu mohou zahájit stresovou odpověď. Jedná se např. o ethanol, těžké kovy, Na⁺, oxidanty jako jsou peroxid vodíku, superoxidový a hydroxylový radikál. [36]

Důležitým pojmem je stresová odezva, tedy odpověď samotného mikroorganismu na tyto změny, jinými slovy je to forma obrany proti poškození. U každého typu mikroorganismu je tato odezva jiná, ale lze předpokládat, že při této stresové odpovědi dochází k syntéze obranných proteinů, které chrání buňku nejen v tom určitém momentu, kdy stres nastal, ale mohou sloužit jako štít i při případných budoucích změnách ať už stejných nebo podobných té iniciační. [37]

3.3.1. Teplotní stres

Změnou teploty prostředí lze lehce ovlivnit životní cyklus mikroorganismů, potažmo jejich viabilitu. V tomto případě jsou ovlivňovány intracelulární makromolekuly, jako jsou teplotně citlivé enzymy, ale nejenom ony, dochází i k poškození buněčné membrány. Při teplotním šoku, kdy ale teplota nedosáhne kritické hodnoty, která by mohla ovlivňovat samotnou existenci buněk, dochází k rychlé syntéze ochranných proteinů. [38]

Každý organismus má určité teplotní rozmezí, které je pro jeho existenci ideální. V tomto rozmezí jsou zásadní tři teplotní body – minimální, optimální a maximální růstová teplota. Minimální teplota je taková, kdy je mikroorganismus schopen se rozmnožovat rychlostí ještě zjistitelnou, ovšem při jejím snížení dochází k zastavení jak rozmnožování a růstu, ale může být ohrožen i život organismu.

V bodě optimální teploty je rychlost růstu a rozmnožování maximální, a v případě posledního bodu se jedná o nejvyšší teplotu, při které je ještě zachována schopnost rozmnožování, její zvýšení má za následek zástavu růstu a dělení buněk. Ovšem doba, po kterou jsou organismy schopny přežít teplotu pod minimálním bodem je delší, než kdyby byl stejný mikroorganismus vystaven teplotám vyšším, než je teplota maximální. Zároveň optimální teplota pro existenci buňky se nemusí nutně překrývat s optimální teplotou některých metabolických procesů.

V teplotním rozmezí minimální a optimální teploty se postupně zvyšuje rychlost procesů v buňce, při překročení optimální teploty ale dochází k prudkému poklesu této rychlosti. [39]

Organismy můžeme rozdělit do třech skupin podle vztahu k teplotě, a to na psychrofilní, mezofilní a termofilní. Organismy náležící do první skupiny jsou schopny růst při teplotách nižších, než je bod mrazu, optimální růstová teplota spadá povětšinou pod 16° C. Generační doba je okolo 48 hodin. [39]

Mezofilní organismy mají nastavenou minimální teplotu nad 5° C, optimální pod 45°C a do této skupiny patří většina známých organismů. Bakterie z této kategorie mají např. optimální teplotu okolo 37° C, kvasinky a plísňe okolo 30° C. Poslední, tedy termofilní skupina mikroorganismů snáší vyšší teploty, optimální teplota je vyšší než 45°C, většinou se jedná o interval mezi 50 – 60° C, ale výjimkou nejsou ani organismy mající optimum okolo 80° C. [39]

V případě *A. pullulans* je minimální teplota 2° C, optimální 25° C a maximální 35° C [40].

3.3.2. Extracelulární polysacharidy jako obrana ve stresových podmínkách

Extracelulární polysacharidy produkované mikroorganismy se nachází na rozhraní buněčná stěna mikroorganismu – prostředí, tudíž se dá předpokládat, že tyto metabolity hrají určitou roli jako obrana daného mikroorganismu.

Když se podíváme do světa půdních mikroorganismů, důvodů proč jsou extracelulární polysacharidy produkovány se nabízí celá řada. Vodní aktivita v půdě značně kolísá, a jakmile mikroorganismus nemá dostatek vody, tak umírá. Polysacharidy schopné vázat do své struktury vodu se tak nabízí jako jasné řešení pro případné období sucha. [41]

Neutrální polysacharidy nebo ty ve formě aniontů jsou schopny se vázat na jílovité povrchy. Interakce mezi půdními minerály nebo jinými půdními částicemi a extracelulárními polysacharidy zlepšují agregaci půdy, tyto interakce jsou možné díky adhezivním a gel-tvořícím schopnostem polysacharidu. [41]

Biofilmy, které jsou tvořeny nahuštěnými mikroorganismy ve vzájemné blízkosti drženými pohromadě právě díky extracelulárním polysacharidům, jsou viděny jako ideální prostředek pro přežívání mikroorganismů. V těchto biofilmech je možná rychlá komunikace mezi jednotlivci a tudíž i možnost rychlejší odezvy na případné nebezpečí smrti. [42]

Knowles a Castenholz ve své studii zkoumali vztah mezi viabilitou buněk při ztrátě vody – vysoušení a mráz, a přítomností extracelulárních polysacharidů konkrétně u cyanobakterie *Chroococcidiopsis*, která byla vybrána jako modelový mikroorganismus. V případě vysoušení bakterie byly jasné rozdíly mezi výsledky s přítomným polysacharidem a bez jeho přítomnosti, kdy v případě nepřítomnosti polysacharidu jasně převyšovalo procento buněk mrtvých. V případě teplotního stresu tato mez nebyla tolik jasná, ale byl jasné sledován trend většího procenta přeživších buněk bakterie při přidání polysacharidu. [43]

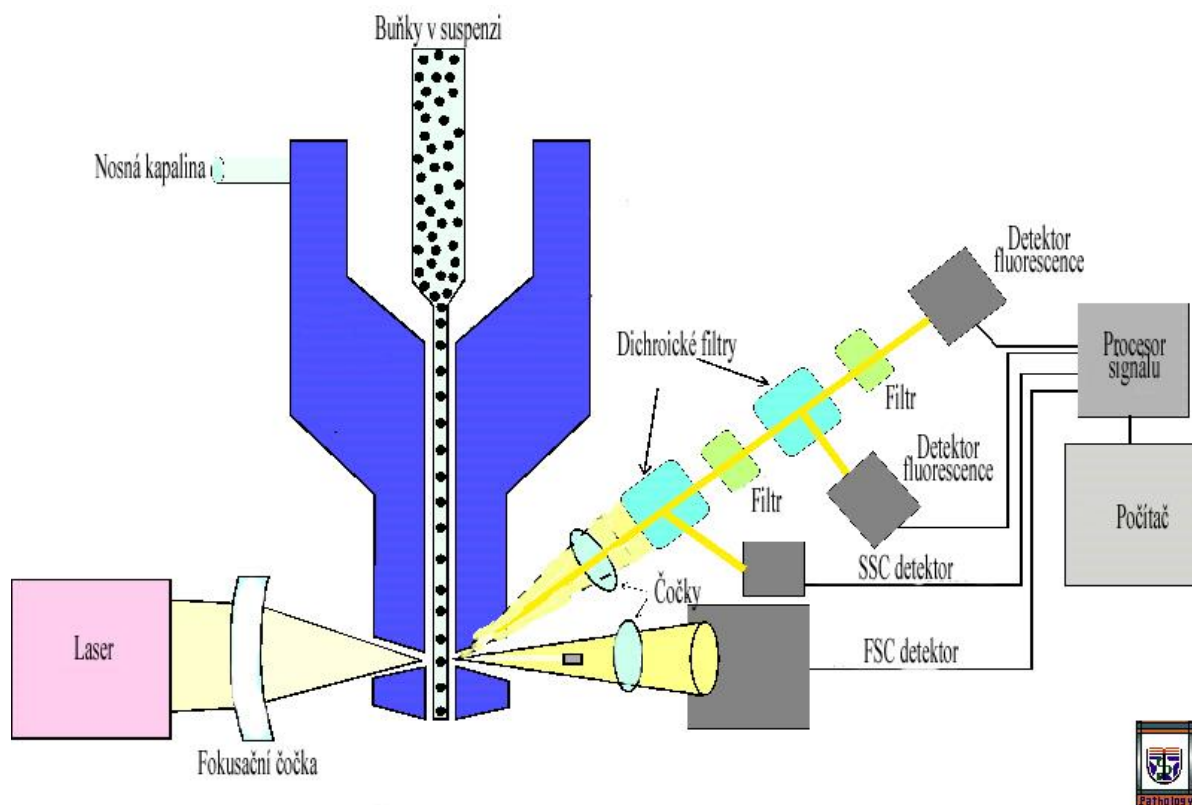
3.4. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je technika, která měří a poté i vyhodnocuje fyzikální charakteristiky částic (ve většině případů buněk) jako jsou relativní velikost, granulovitost a intenzita fluorescence. Cytometr lze rozdělit na tři hlavní části: fluidika, optika, elektronika. [44]

Fluidní systém unáší částice ve formě suspenze laminárním tokem do měřicí cely. Pro měření je důležité, aby byly částice řazeny jednotlivě za sebou, tzn., aby v určitém čase byla měřena vždy pouze jedna částice, a aby se částice pohybovaly konstantní rychlostí.

Optická část je vybavena lasery (obvykle dvěma nebo třemi), které ozařují částice, a optickými filtry, zrcadly a čočkami, tedy sběrnou optickou částí, díky které je světelný signál přenášen do detektorů.

Světlo dopadající na částice z laserů je rozptýleno, míra rozptýlení závisí na velikosti částice a její vnitřní struktuře. Rozptýlené světlo je poté detekováno ve dvou směrech – ve směru přímém a bočním. FSC detektor (FSC – Forward-scattered channel), který je umístěn v rovinně světelného paprsku zachycuje světlo přímo difraktované, které je úměrné velikosti částic. SSC detektor (SSC – Side-scattered channel) je umístěn kolmo na první zmíněný detektor, zachycuje světlo částicí odražené. Tento detektor tedy zachycuje signál mající výpovědní hodnotu o granulovitosti částice, popř. její vnitřní struktuře. [44, 45]



Obrázek 6 - Schéma průtokového cytometru [48]

Dalším měřeným parametrem je intenzita fluorescence. Fluorescenční barviva jsou volena podle schopnosti se specificky vázat na určitou část buňky. Jsou barviva schopná specifické vazby např. na DNA (nejčastěji využívané), lipidy, buněčnou stěnu. Tato barviva, tzv. fluorofory, jsou schopny absorbovat světlo určité vlnové délky a poté vyzařovat světlo o jiné určité vlnové délce, která je ale vyšší než ta absorbovaná. Barvivo je voleno také podle laseru cytometru, často využívané jsou: modrý laser - excitace obvykle při 448 nm, červený laser - excitace okolo 633 nm, zelený laser - excitace v rozmezí 532 – 561 nm [46]. V poslední době jsou často tyto barviva kombinována, většinou jsou využity dva fluorofory na analýzu dvou parametrů zároveň. Kombinace tří a více barviv není obvykle využívána pro složitost interpretace dat [47].

Elektronika převádí přijatý světelný signál na signál elektronický, který je poté zpracován počítačem. V této části tedy probíhá analýza a interpretace získaných dat [43, 44].

Své využití nachází průtoková cytometrie v řadě vědních oborů jako je např. medicína, mikrobiologie, biochemie, biotechnologie apod. V medicíně má své místo při diagnostice rakoviny nebo je široce využívána v imunologii např. při diagnostice viru HIV. V mikrobiologii je cytometrie nejčastěji využívána při stanovování viability buněk, obsahu nukleových kyselin, stanovování aktivity enzymů apod. [44]

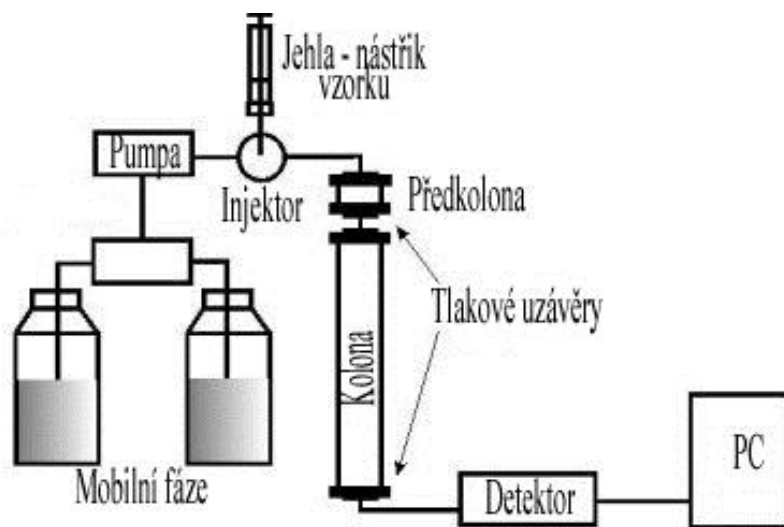
3.5. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie - HPLC

Chromatografie obecně je separační metoda, při které dochází k separaci jednotlivých složek vzorku. Kontinuální separace probíhá mezi stacionární a mobilní fází. Je založena na neustálém vytváření rovnováhy mezi těmito dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. [50]

Hnací silou mobilní fáze je síla tlaková vytvářená pumpou. Díky navýšenému tlaku, až 50 MPa, se zvyšuje i rychlost chromatografické analýzy. Vysoký tlak je potřeba k pohybu vzorku přes sorbent. Částice, které jej tvoří, bývají velmi malých rozměrů, a tedy kladou kapalině větší odpor. Malý rozměr částic stacionární fáze znamená větší plochu, na které mohou probíhat interakce mezi analytem a sorbentem. [50, 51]

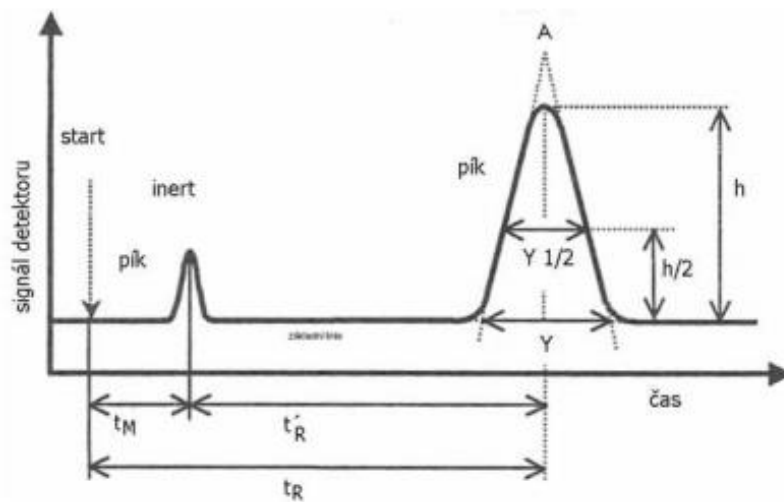
Dělení vzorku probíhá v chromatografických kolonách naplněných stacionární fází, které mají povětšinou délku 10 – 30 cm. Vzorek je umístěn na začátek stacionární fáze, poté probíhá unášení vzorku přes stacionární fázi – sorbent, mobilní fází. Díky rozdílné interakci mezi jednotlivými složkami vzorku a sorbentem dochází k separaci vzorku. Větší zdržení mají ty složky, jejichž interakce se sorbentem je silnější. [50]

Detektor je vybírán dle původu detekované látky. Asi nejvíce používaný je UV-VIS detektor, který měří absorbanci povětšinou v rozmezí vlnových délek 180 – 800 nm. Pro detekci polycyklických aromatických uhlovodíků je možno použít fluorescenční detektor. Refraktometrickou detekci je možno použít v případě detekce látek, které neabsorbují a nefluoreskují, např. cukry, lipidy, polymery. Další možnosti detekce jsou např. elektrochemickým detektorem, který měří proud vznikající při průchodu oxidovatelné nebo redukovatelné látky měrnou celou. Jeho výhodou je vysoká citlivost. Vodivostní detektor měří proud mezi dvěma elektrodami v průtokové cele a využívá střídavého napětí. Velmi využívaný je hmotnostně–spektrometrický detektor, který detekuje ionty vznikající ionizací analytů. [51]



Obrázek 7 - Schéma HPLC [49]

Grafickým záznamem je chromatogram. Jedná se o časovou závislost signálu detektoru. Počátek chromatogramu představuje okamžik nástřiku vzorku. Jeden tzv. pík – eluční vlna – odpovídá jedné složce vzorku. Ideálně má tato vlna tvar Gaussovy křivky. Vrchol se nazývá retenční čas, t_R , a představuje dobu, za kterou analyzovaná látka projde kolonou a je zaznamenána detektorem. Tento čas lze rozdělit na dobu, kterou látka strávila v mobilní fázi - mrtvý retenční čas, t_m , a dobu, kterou procházela kolonou – redukovaný retenční čas, t'_R . Retenční čas podává informaci o druhu analytu, plocha píku, A , o množství analyzované látky. [52]



Obrázek 8 - Ukázka chromatogramu [52]

4. CÍL PRÁCE

- Rešerše na téma extracelulární polymery produkované mikroorganismem *Aureobasidium pullulans*
- Studium produkce extracelulárních polymerů mikroorganismem *Aureobasidium pullulans*
- Experimentální ověření vlivu přítomnosti extracelulárních polymerů na odolnost buněk *A. pullulans* vůči vybraným stresovým faktorům

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Pracovní přístroje, chemikálie a mikroorganismy

5.1.1. Použité přístroje

- Očkovací box Aura Mini (Bioair Instruments, UK)
- Třepačka LT 2 (Sklárny Kavalier, ČR)
- Spektrofotometr UV-VIS, Helios γ (Unicam, UK)
- Cytometr, Apogee Flow Systém
- Sušárna LS – 35 (ČR)
- Vortex – Genius 3, IKA Vortex (Německo)
- Centrifuga U-32-R, Boeco (Německo)
- Centrifuga Sigma 3-15 (Německo)
- Mikrocentrifuga Mikro 200, Hettlich Zentrifugen
- Analytické váhy Boeco (Německo)
- Mikroskop Intra mirro (ČR)

Sestava HPLC-RI

- Vysokotlaká pumpa Ecom (ČR)
- Dávkovací analytický ventil smyčkový C R54157, Ecom (ČR)
- Termostat kolon LCO 101
- Refraktometrický detektor RIDK 102
- Kolona Rezex ROA (300 x 7.8 mm), Phenomenex

5.1.2. Chemikálie

Standardy

- D-glukosa monohydrát, p.a., Lach-Ner, ČR
- Fruktosa, p.a., Lach-Ner, ČR
- Laktosa, p.a., Lach-Ner, ČR
- Sacharosa, p.a., Lach-Ner, ČR

Chemikálie ke kultivaci

- Dusičnan sodný
- Dihydrogenfosforečnan draselný
- Chlorid draselný
- Heptahydrát síranu hořečnatého, p.a., Lachema
- Dusičnan amonný
- Síran amonný

Chemikálie ke stanovení celkových sacharidů dle Duboise

- Kyselina sírová 96%
- Fenol
- D-glukosa

Chemikálie ke stanovení redukujících sacharidů dle Somogyi-Nelsona

- D-glukosa

- Uhličitan sodný
- Hydrogenuhlíčan sodný
- Seignettova sůl
- Síran sodný
- Pentahydrát síranu měďnatého
- Molybdenan amonný
- Kyselina sírová
- Hydrogenarseničnan disodný

Chemikálie ke stanovení obsahu bílkovin dle Harthee-Lowryho

- Tetrahydrát vinanu sodno-draselného
- Uhličitan sodný
- Hydroxid sodný
- Pentahydrát síranu měďnatého
- Činidlo Folin-Ciocalteu, Penta, ČR

Alkoholy

- Ethanol 96 %
- Isopropylalkohol
- Aceton

5.1.3. Použité kmeny

K produkci pullulanu byly použity dva kmeny *A. pullulans* a to CCM 8182 a F 148 získané z České sbírky mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy University v Brně.

5.2. Kultivace

5.2.1. Tuhé médium

Tuhé médium slouží k dlouhodobějšímu uchování kvasinkového kmene, v tomto případě dvou kmenů CCM8182 a F148.

Byla připravena dvě tuhá média a to minerální a obohacené (viz. tabulka 1), do 100 ml Erlenmayerových baněk. Sterilizace probíhala po dobu 15 min při 121° C. Zaočkované kultury byly uchovávány na miskách při konstantní teplotě 30° C. Dlouhodobě byly misky uchovávány při teplotě 4° C. Přeočkování bylo prováděno v intervalu 30 dní.

Tabulka 1 - Složení minerálního a obohaceného média

Minerální médium		Obohacené médium	
Složka	Množství [g/l]	Složka	Množství [g/l]
Glukosa	80,0	Glukosa	20,0
NaNO ₃	2,0	Pepton	20,0
KH ₂ PO ₄	0,1	Yeast ex.	10,0
KCl	0,5	Agar	20,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2		
Agar	10,0		

5.2.2. Inokulum

Do Erlenmayerovy baňky o objemu 250 ml bylo připraveno médium, viz tabulka 2. Sterilizace probíhala při 121° C po dobu 15 minut. Do tekutého média byly převedeny tři kličky. Připravené inokulum bylo kultivováno při teplotě 30° C, 160 rpm po dobu 24 hodin.

Tabulka 2 - Složení inokula

Složka	Množství [g/l]
Glukosa	80,0
NH ₄ NO ₃	2,0
KH ₂ PO ₄	0,1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1
KCl	0,1
Yeast	5,0
Pepton	5,0

5.2.3. Produkční médium

Tekutá média byla připravena do 1 000 ml Erlenmayerových baněk, objem média byl 300 ml. Sterilizace probíhala 15 minut při 121° C. Kultivace probíhala při 30° C, 160 rpm po dobu 168 hodin.

Tabulka 3 - Složení minerálního a obohaceného média

Médium minerální – Médium 1		Médium obohacené – Médium 2	
Složka	Množství [g/l]	Složka	Množství [g/l]
Glukosa	80,0	Glukosa	80,0
NaNO ₃	2,0	(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0
KH ₂ PO ₄	0,1	KH ₂ PO ₄	5,0
KCl	0,5	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,34
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1	Yeast auto.	7,0

5.2.4. Optimalizace kultivačních podmínek

Pro optimalizaci podmínek růstu *A. pullulans* a produkce pullulanu byl vybrán nejvhodnější uhlíkový substrát.

Byl sledován růst biomasy a produkce pullulanu v závislosti na použití rozdílných zdrojů sacharidů a to jak v inokulu, tak i v kultivačním médiu.

5.2.4.1. Použité sacharidy

Glukosa, laktosa, fruktosa a sacharosa byly vybrány pro optimalizaci zdroje uhlíku pro produkci pullulanu. Všechny uvedené sacharidy byly přítomny v koncentraci 80 g/l, médium bylo připraveno dle složení uvedeného v Tabulce 1 – Médium obohacené.

5.2.5. Stanovení biomasy

Růst *A. pullulans* byl sledován metodou gravimetrického stanovení obsahu sušiny. Z média bylo odebráno 10 ml do centrifugačních kyvet. Centrifugace probíhala 5 minut při 8000 rpm. Buňky byly promyty destilovanou vodou a centrifugovány. Biomasa byla sušena při teplotě 80° C do konstantní hmotnosti. Poté následovalo zvážení na analytických vahách.

5.2.6. Spektrofotometrická stanovení

5.2.6.1. Stanovení obsahu celkových sacharidů dle Duboise

Sacharidy jsou zde dehydratovány koncentrovanou kyselinou sírovou a následně dochází ke kondenzaci furfuralu s fenolem. Tyto kondenzáty absorbují v UV-VIS, lze je tedy změřit pomocí spektrofotometru a to při vlnové délce 490 nm.

Pro sestavení kalibrační křivky byl použit zásobní roztok glukosy o koncentraci 100 µg/ml. Kalibrační řada byla měřena v rozmezí koncentrací 0 – 100 µg/ml.

Jako vzorek byl použit supernatant z fermentačního média.

K 1 ml vzorku byl přidán předem připravený 5% roztok fenolu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Zkumavky byly důkladně promíchány a temperovány po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byla změřena absorbance při 490 nm. Pro přípravu blanku byl 1 ml supernatantu nahrazen destilovanou vodou. Každý vzorek byl proměřen třikrát a poté byla vypočtena průměrná hodnota.

Koncentrace sacharidů byla vypočtena dosazením do rovnice kalibrační křivky.

5.2.6.2. Stanovení redukujících sacharidů dle Somogyi-Nelsona

Metoda je založena na redukci měďnaté soli a následovněm vzniku modro-zeleného komplexu, jeho koncentrace se určí pomocí měření absorbance při vlnové délce 720 nm.

Pro sestavení kalibrační křivky byl použit zásobní roztok glukosy o koncentraci 50 µg/ml. Kalibrační řada byla připravena v rozmezí koncentrací 5 – 50 µg/ml.

K 1 ml supernatantu bylo přidáno 0,5 ml roztoku Somogyi-Nelson I (obsah – 24 g Na₂CO₃, 16 g NaHCO₃, 144 g Na₂SO₄, 12 g vinanu sodno-draselného, 800 ml destilované vody) a 0,5 ml roztoku Somogyi-Nelson II (4 g CuSO₄ · 5 H₂O, 24 g Na₂SO₄, 200 ml destilované vody). Zkumavky byly promíchány a po dobu 10 minut vařeny při teplotě 100° C. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 0,5 ml roztoku Somogyi-Nelson III (25 g (NH₄)₂MoO₄ ve 450 ml destilované vody, 21 ml konc. H₂SO₄, 3 g Na₂HAsO₄ · 7H₂O). Obsah zkumavek byl důkladně promíchán na vortexu, po rozpuštění sraženiny byly zkumavky doplněny na obsah 10 ml destilovanou vodou, opět promíchány a byla měřena absorbance při 720 nm proti slepému vzorku. Slepý vzorek byl připraven nahrazením 1 ml supernatantu destilovanou vodou.

Každý vzorek byl proměřen třikrát a byla vypočítána průměrná hodnota. Koncentrace sacharidů byla vypočtena dosazením do kalibrační křivky.

5.2.6.3. Stanovení obsahu bílkovin dle Hartree-Lowryho

K 1 ml supernatantu zředěného dle potřeby bylo přidáno 0,9 ml roztoku A (složení: 2 g tetrahydrátu vinanu sodno-draselného, 100 g Na₂CO₃, 500 ml 1M NaOH, doplněno destilovanou vodou na objem 1 litr). Zkumavky byly inkubovány po dobu 10 minut při teplotě 50° C. Po uplynutí této doby následovalo ochlazení na laboratorní teplotu a přidání 0,1 ml roztoku B (složení: 2g tetrahydrátu vinanu sodno-draselného, 1 g CuSO₄·5H₂O, 90 ml H₂O, 10 ml 1M NaOH). Po promíchání byly zkumavky temperovány 10 minut při laboratorní teplotě. Do zkumavky byly přidány 3 ml roztoku C (Folin- Ciocalteu činidlo bylo naředěno s vodou v poměru 1:15). Poté byly zkumavky promíchány a temperovány 10 minut při teplotě 50° C. Po následném ochlazení na laboratorní teplotu a důkladném promíchání byla měřena absorbance při 650 nm proti slepému vzorku (vzorek nahrazen destilovanou vodou).

Každý vzorek byl proměřen třikrát a výsledná koncentrace byla vypočtena dosazením do rovnice kalibrační křivky.

5.2.7. Stanovení obsahu extracelulárních polysacharidů

5.2.7.1. Precipitace a gravimetrické stanovení

Precipitace pullulanu ze supernatantu byla prováděna s 96% roztokem ethanolu v poměru 1:2. Roztok byl promíchán a uchován při teplotě 4° C po dobu 20 minut. Po centrifugaci 10 minut při 5000 rpm byl pullulan rozpuštěn v malém množství vody. Precipitace byla celkem prováděna dvakrát.

Výsledný obsah pullulanu v médiu byl stanoven gravimetricky.

5.2.7.2. Stanovení ECP pomocí HPLC

Analýza obsahu pullulanu probíhala také pomocí HPLC a to proměřením vzorku před a po hydrolýze glykosidických vazeb mezi jednotlivými molekulami monomerů.

Pro hydrolýzu glykosidických vazeb byla zvolena metoda kyselý hydrolýzy a to za použití 2 M H₂SO₄. Do 4 ml vialek byl napipetován 1 ml 2M H₂SO₄ a 1 ml vzorku. Hydrolýza probíhala 12 hodin při teplotě 95° C.

5.3. Růstová křivka

5.3.1. Inokulum

Jako produkční kmen byl zvolen *Aureobasidium pullulans* CCM 8182. Jako médium bylo použito obohacené médium – složení viz tabulka 3. Kultivace probíhala po dobu 24 hodin při 30° C, 160 rpm. Toto inokulum bylo použito k zaočkování produkčního média.

5.3.2. Produkční médium

Bylo připraveno 300 ml minerálního média (složení viz. kapitola 3.2.3) do 500 ml Erlenmayerovy baňky, následovala sterilizace při 121° C po dobu 15 minut. Médium bylo připraveno 5 % obj. Další kultivace probíhala po dobu 168 hodin při 30 °, 160 rpm.

5.3.3. Stanovení růstové křivky

Odběry byly prováděny v intervalu 4 hodin. Vždy bylo odebráno 10 ml média, následovalo stanovení hmotnosti sušiny a vysráženého pullulanu. Centrifugace probíhala po dobu 10 minut při 8 000 rpm. Supernatant byl precipitován ethanolem, který byl přidán v dvojnásobném množství. Usazená biomasa byla rozsuspendována v 5 ml vody a opět byla stočena, supernatant odlit a následovalo vysušení do konstantní hmotnosti při 80° C.

5.3.4. Stanovení pullulanu

Vysrážený pullulan byl stočen po dobu 10 minut, 8000 rpm. Supernatant byl poté odlit, usazený pullulan rozpuštěn v cca 1 ml vody, ještě jednou vysrážen ethanolem, následovalo stočení a usazený polysacharid byl sušen do konstantní hmotnosti při teplotě 80° C.

5.4. Purifikace pullulanu

Pullulan určený k purifikaci byl naprodukovaný *A. pullulans* CCM 8182. Kultivace probíhala na minerálním médiu (složení viz. 3.2.3).

5.4.1. Purifikace alkoholem

V tomto kroku byl použit 96% ethanol, poměr alkohol:médium byl zvolen 2:1. Po smíchání supernatantu s alkoholem v baňkách byl roztok uchován při teplotě 4° C po dobu 30 minut. Získaný precipitát byl centrifugován 10 minut, 8000 rpm a rozpuštěn v 5 ml destilované vody. Rozpuštěný precipitát byl podroben dialýze.

5.4.2. Dialýza

Dialýza probíhala po dobu 24 hodin, jako vnější kapalina byla použita demineralizovaná voda v objemu 5 litrů. Po celou dobu byl obsah dialyzační nádoby míchán, výměna vnější kapaliny proběhla dvakrát.

Ve vzorku odebraném před a po dialýze byly stanoveny sacharidy celkové, redukující a bílkoviny (postup viz. kapitola 3.2.6).

Poté byly stejné vzorky podrobeny hydrolýze glykosidických vazeb a ve všech vzorcích byl pomocí metody HPLC stanoven obsah glukosy (postup viz. kapitola 3.2.7.2).

5.5. Zkoumání kryoprotektivních vlastností pullulanu

Byla zkoumána viabilita buněk, potažmo kryoprotektivní vlastnosti pullulanu, a to pomocí průtokové cytometrie. Jako modelový mikroorganismus byl vybrán *Aureobasidium pullulans* CCM 8182. Buňky byly odebírány z inokula, které bylo připraveno 24 hodin předem do 100 ml Erlenmayerovy baňky,

Bylo pracováno s roztoky pullulanu o koncentracích 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 %, fyziologickým roztokem a destilovanou vodou. Vzorky byly připraveny 10 x zředěním suspenze buněk těmito roztoky.

Zředěné roztoky byly vystaveny působení teplot 60° C, 4° C, -18° C, -72° C. Měření probíhala v určitých časových intervalech, viz. tabulka 4.

Tabulka 4 - Přehled vybraných teplot a doby působení těchto teplot na vzorky

Teplota [°C]	Doba působení teploty [h]
60	1
4	120
-18	1, 24, 120
-72	1, 24, 120

Jako barvivo pro stanovení viability buněk průtokovou cytometrií byl použit propidiumjodid o koncentraci 5 mg.ml⁻¹. Po obarvení vzorku následovala inkubace v temnu po dobu 15 minut. Nástřík vzorku byl 19 µl.min⁻¹ a dávkováno bylo 150 µl.

Scattegram SALS/LALS byl použit pro výběr buněčné populace, která byla dále analyzována a pro kterou byl sestaven histogram. Využito bylo červeného fluorescenčního kanálu, vlnová délka 600 – 635 nm, počet živých a mrtvých buněk byl odečten z histogramu.

6. Výsledky a diskuse

6.1. Vliv různých zdrojů sacharidů kultivačního média na koncentraci sušiny a pullulanu

Byl sledován vliv čtyř vybraných zdrojů uhlíků – sacharidů a to glukosy, laktosy, fruktosy a sacharosy, koncentrace v médiu byla 80 g/l. Porovnávána byla produkce biomasy a pullulanu v závislosti na použitém sacharidu. Zároveň byla porovnávána i produkce obou kmenů *A. pullulans* - F 148 a CCM 8182.

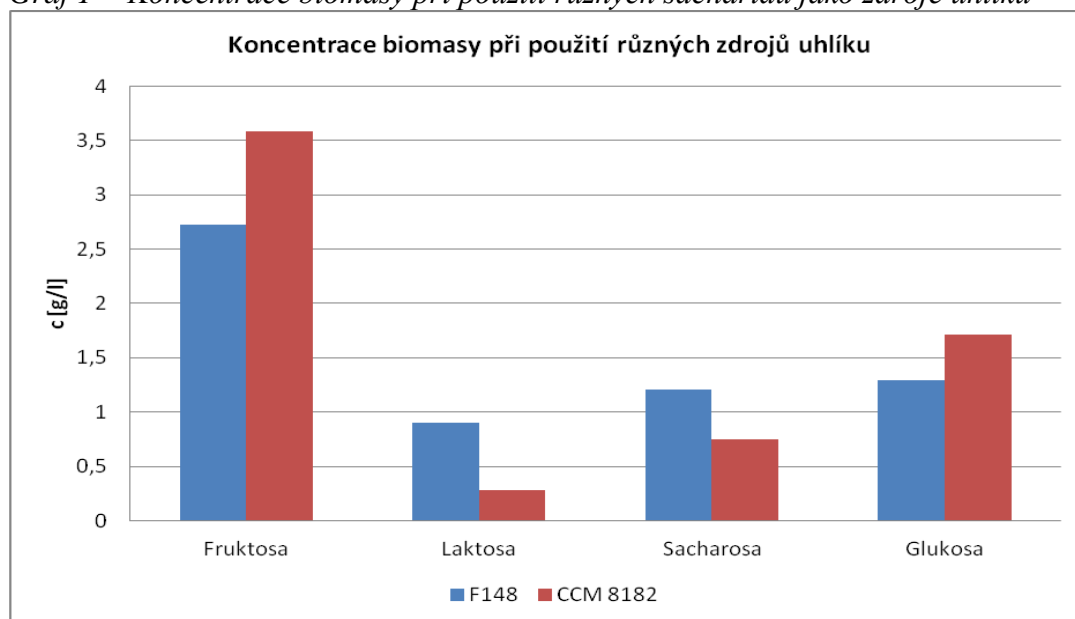
6.1.1. Vliv různých zdrojů uhlíku na růst biomasy

Pro porovnání vlivu jednotlivých zdrojů uhlíku na růst biomasy byla zvolena gravimetrická metoda, jejíž postup byl popsán v kapitole 4.2.5. Hodnota pH byla měřena dvakrát, v tabulce je uvedena průměrná hodnota.

Tabulka 5 - Vliv různých zdrojů sacharidu na růst biomasy

Kmen	Sacharid	Konečné pH	Sušina c [g/l]
F148	Fruktosa	3,31	2,720
	Laktosa	6,53	0,900
	Sacharosa	3,98	1,210
	Glukosa	3,71	1,290
CCM 8182	Fruktosa	3,31	3,580
	Laktosa	6,67	0,285
	Sacharosa	3,63	0,745
	Glukosa	3,88	1,710

Graf 1 - Koncentrace biomasy při použití různých sacharidů jako zdroje uhlíku



Největší koncentrace biomasy byla u obou kmenů při použití fruktosy jakožto zdroje uhlíku (2,720 g/l u F 148; 3, 580 g/l u CCM 8182), naopak nejmenší produkce nastala

při použití laktosy (0,900 g/l u F 148; 0,285 u CCM). Sacharidy by se tedy daly seřadit dle nevhodnějšího po nejméně vhodný pro růst biomasy následovně: fruktosa, glukosa, sacharosa a laktosa. Toto pořadí je u obou kmenů stejné. Hodnoty koncentrace jsou uvedeny v tabulce 6, grafické znázornění je v grafu 2.

Hodnota pH je jedním z faktorů ovlivňující růst *A. pullulans* a produkci pullulanu. Počáteční hodnota pH se pohybovala okolo 6. Ke změně původní hodnoty došlo vlivem metabolické přeměny.

Jak lze vidět v tabulce 6, při použití laktosy jako zdroje uhlíku došlo k minimálnímu nárůstu biomasy - 0,9 g/l u F148 a 0,285 g/l u CCM 8182 a stejně tak došlo k minimálnímu poklesu pH média. Naopak u kultur, kde došlo k výraznému růstu biomasy se hodnoty pH pohybují v rozmezí 3,0 – 4,0, což je pravděpodobně způsobeno produkcí „kyselých metabolitů“ v průběhu růstu. *A. pullulans* není pravděpodobně schopen využívat laktosu jako zdroj uhlíku.

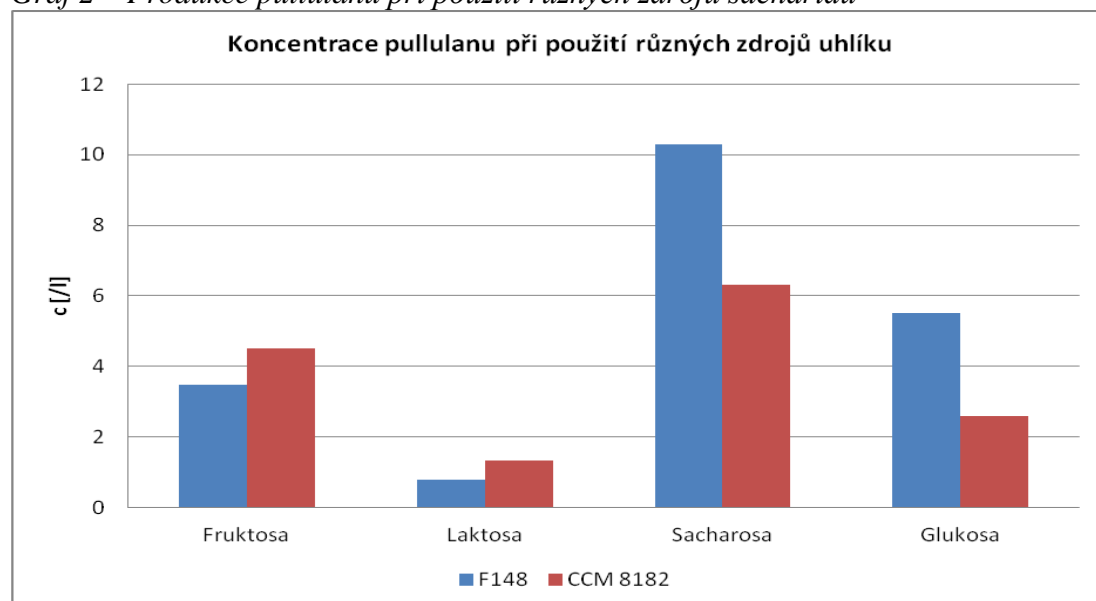
6.1.2. Vliv na produkci pullulanu

Pro porovnání produkce pullulanu v jednotlivých produkčních médiích obsahující různé zdroje sacharidů byla použita metoda gravimetrického stanovení obsahu pullulanu, která byla popsána v kapitole 4.2.7.1.

Tabulka 6 - Vliv různých zdrojů sacharidu na produkci pullulanu

Kmen	Sacharid	Pullulan c [g/l]
F148	Fruktosa	3,480
	Laktosa	0,780
	Sacharosa	10,300
	Glukosa	5,500
CCM 8182	Fruktosa	4,520
	Laktosa	1,320
	Sacharosa	6,300
	Glukosa	2,600

Graf 2 – Produkce pullulanu při použití různých zdrojů sacharidů



V grafu 3 lze vidět, že nejvyšší produkce pullulanu bylo dosaženo při použití sacharosy jako substrátu (10,300 g/l u F 148; 6,300 u CCM 8182), naopak nejmenší výtěžnost nastala při použití laktosy (0,780 g/l u F 148; 1,320 g/l u CCM 8182). Tato skutečnost byla identická u obou kmenů *A. pullulans*.

Pořadí nevhodnějších sacharidů se ale u jednotlivých kmenů liší, u F 148 to je: sacharosa, glukosa, fruktosa, laktosa. U CCM 8182 sacharosa, fruktosa, glukosa, laktosa.

Koncentrace jsou uvedeny v tabulce 8, grafické znázornění je v grafu 3.

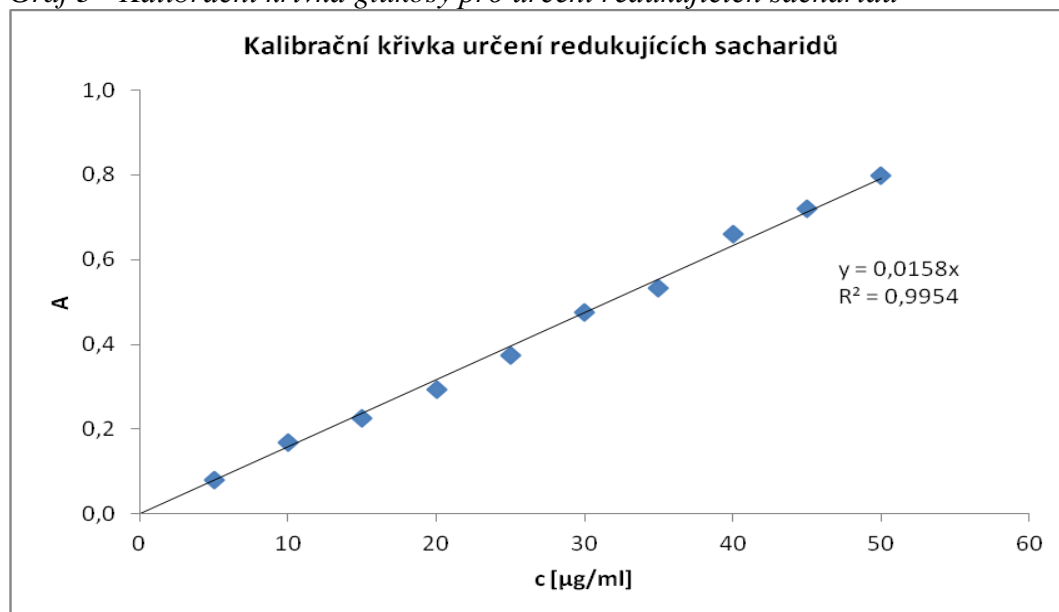
6.2. Stanovení zbytkových redukcí sacharidů dle Somogyi-Nelsona

Pro stanovení redukcí sacharidů v kultivačním médiu po ukončení kultivace bylo použito metody dle Somogyi-Nelsona. Postup určení sacharidů je uveden v kapitole 4.2.6.2. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 10, grafické znázornění kalibrační křivky je v grafu 6. Měření absorbance proběhlo vždy třikrát, v tabulce je uvedena průměrná hodnota.

Tabulka 7 – Data pro kalibrační křivku metody dle Somogyi-Nelsona

Glukosa c [µg/ml]	Absorbance A	Směrodatná odchylka
5	0,079	0,005
10	0,168	0,005
15	0,227	0,004
20	0,294	0,003
25	0,374	0,009
30	0,476	0,009
35	0,534	0,007
40	0,661	0,008
45	0,719	0,003
50	0,798	0,035

Graf 3 - Kalibrační křivka glukosy pro určení redukcí sacharidů

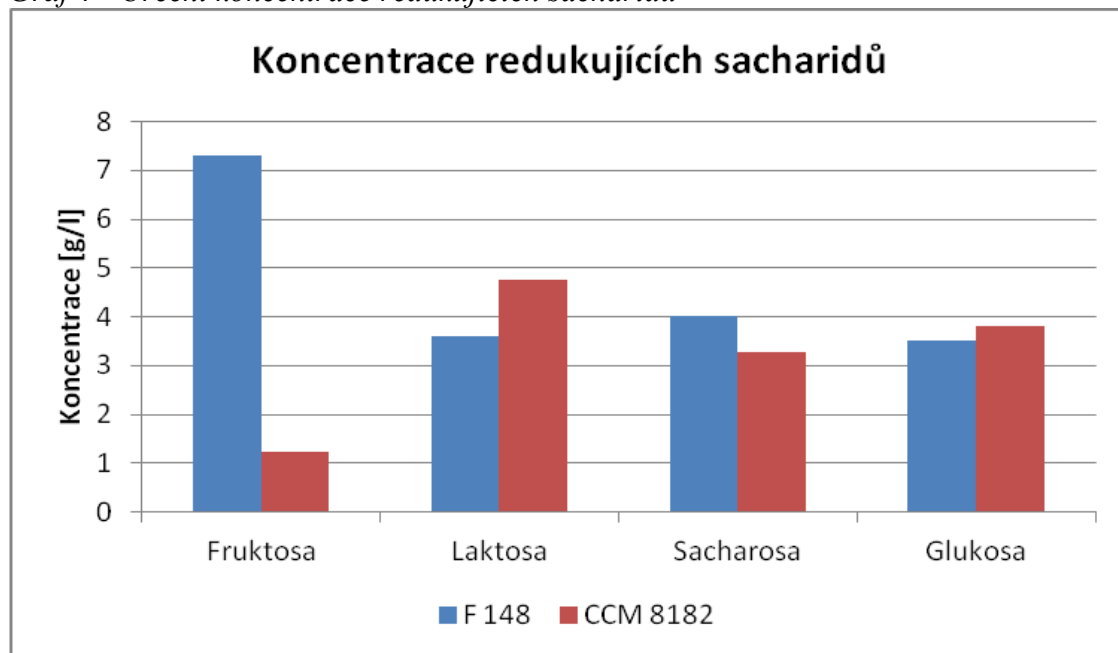


Při použití různých zdrojů uhlíků u kmenů F 148 a 8182 byla stanovena koncentrace redukujících sacharidů. Výsledky jsou v tabulce 11, grafické znázornění v grafu 7.

Tabulka 8 - Koncentrace redukujících sacharidů při použití různých sacharidů jako zdrojů uhlíku

Kmen	Sacharid	c [g/l]
F148	Fruktosa	7,299
	Laktosa	3,608
	Sacharosa	4,008
	Glukosa	3,502
Kmen	Sacharid	c [g/l]
8182	Fruktosa	1,224
	Laktosa	4,747
	Sacharosa	3,270
	Glukosa	3,819

Graf 4 - Určení koncentrace redukujících sacharidů



Při použití laktosy, sacharosy nebo glukosy jsou koncentrace redukujících sacharidů v intervalu 3,0 – 5,0 g/l. Při použití fruktosy koncentrace liší, u kmene F 148 je nejvyšší a to 7,3 g/l. Naopak u kmene CCM 8182 při použití stejného sacharidů je tato koncentrace značně nižší a to 1,2 g/l.

6.3. Stanovení obsahu celkových sacharidů dle Duboise

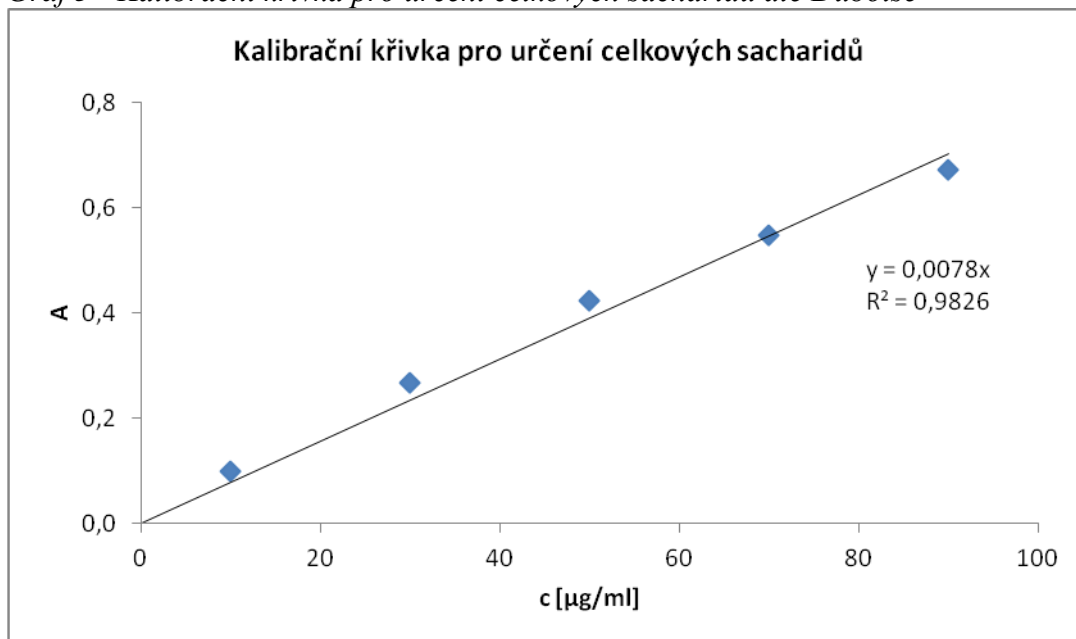
Celkovými sacharidy se rozumí součet mono a polysacharidů, v tomto případě tedy pullulan a zbytkové sacharidy z média.

Pro stanovení celkových sacharidů byla použita metoda dle Duboise. Postup je uveden v kapitole 4.2.6.1. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9. Absorbance byla měřena vždy třikrát, v tabulce je uvedena průměrná hodnota.

Tabulka 9 – Data pro kalibrační křivku metody dle Duboise

Glukosa c [µg/ml]	Absorbance A	Směrodatná odchylka
10	0,098	0,005
30	0,267	0,031
50	0,423	0,021
70	0,548	0,001
90	0,671	0,007

Graf 5 - Kalibrační křivka pro určení celkových sacharidů dle Duboise

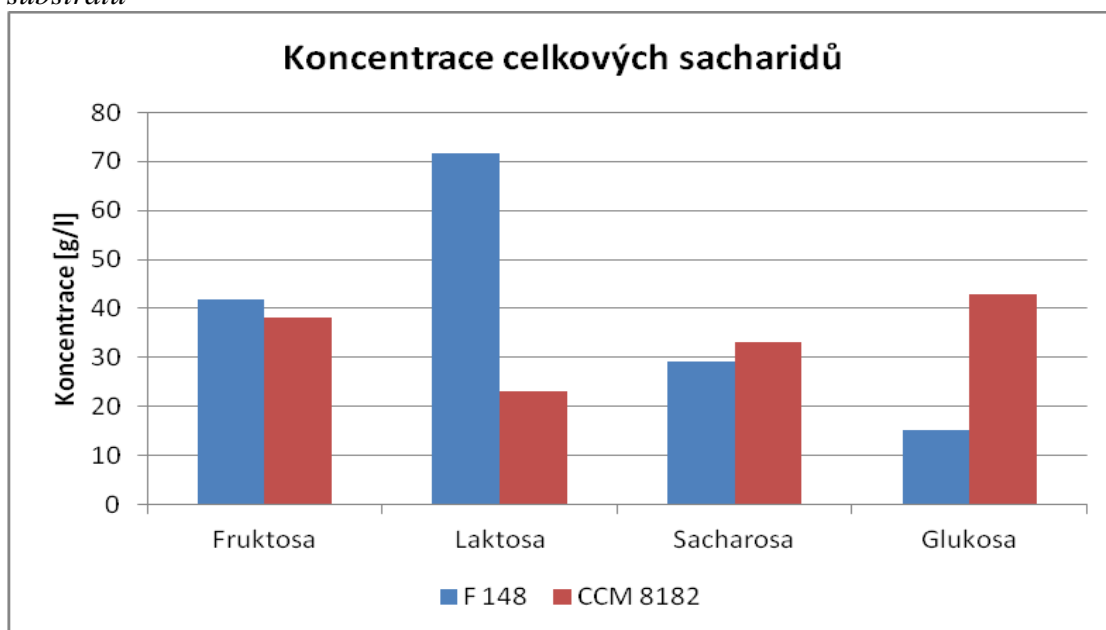


Celkově sacharidy byly stanoveny v médiích kmenů F 148 a CCM 8182 a to při použití různých sacharidů jako zdroje uhlíku. Data koncentrací celkových sacharidů jsou uvedena v tabulce 9, grafické znázornění v grafu 5.

Tabulka 10 - Koncentrace celkových sacharidů při použití různých zdrojů uhlíku

Kmen	Sacharid	c [g/l]
F148	Fruktosa	41,838
	Laktosa	71,581
	Sacharosa	29,103
	Glukosa	15,171
8182	Fruktosa	38,034
	Laktosa	23,034
	Sacharosa	33,120
	Glukosa	42,906

Graf 6 - Grafické znázornění koncentrace celkových sacharidů v závislosti na použitém substrátu



Nejvyšší koncentrace celkových sacharidů byla zjištěna u kmene F 148 při použití laktosy jako substrátu (71,581 g/l), naopak nejnižší hodnota byla opět u kmene F 148 a to při použití glukosy (15,171 g/l). Kmen CCM 8182 při použití glukosy jako zdroje uhlíku naopak vykazoval nejvyšší koncentraci celkových sacharidů.

Při použití laktosy byla u kmene CCM 8182 naměřena menší koncentrace celkových sacharidů (F 148 – 71,581 g/l; CCM 8182 – 23,034), ale produkce pullulanu byla vyšší než v případě kmene F 148 (F148 – 0,780 g/l; CCM 8182 – 1,320 g/l). Dá se tedy předpokládat částečné zpracování laktosy. Tato závislost se opakuje u obou kmenů při použití jakéhokoli zdroje uhlíku. Dá se tedy předpokládat, že při zvyšování produkce pullulanu se bude změnšovat obsah celkových sacharidů.

Jako celkové sacharidy se bere suma pullulanu a redukujících sacharidů, což v tomto případě nesedí. Při gravimetrickém stanovení pullulanu došlo k určitým ztrátám a při určování redukujících sacharidů lze tvrdit, že námi vypočítaná koncentrace je menší než jaká ve vzorku ve skutečnosti je. Kalibrační křivka byla sestrojena pro glukosu, což ovšem představuje problém při určování obsahu disacharidů v médiu. Dále nejsou v této sumě zahrnuty fruktooligosacharidy vznikající při kultivaci na fruktosy, které nemohly být ethanolem vysráženy.

6.4. Růstová křivka

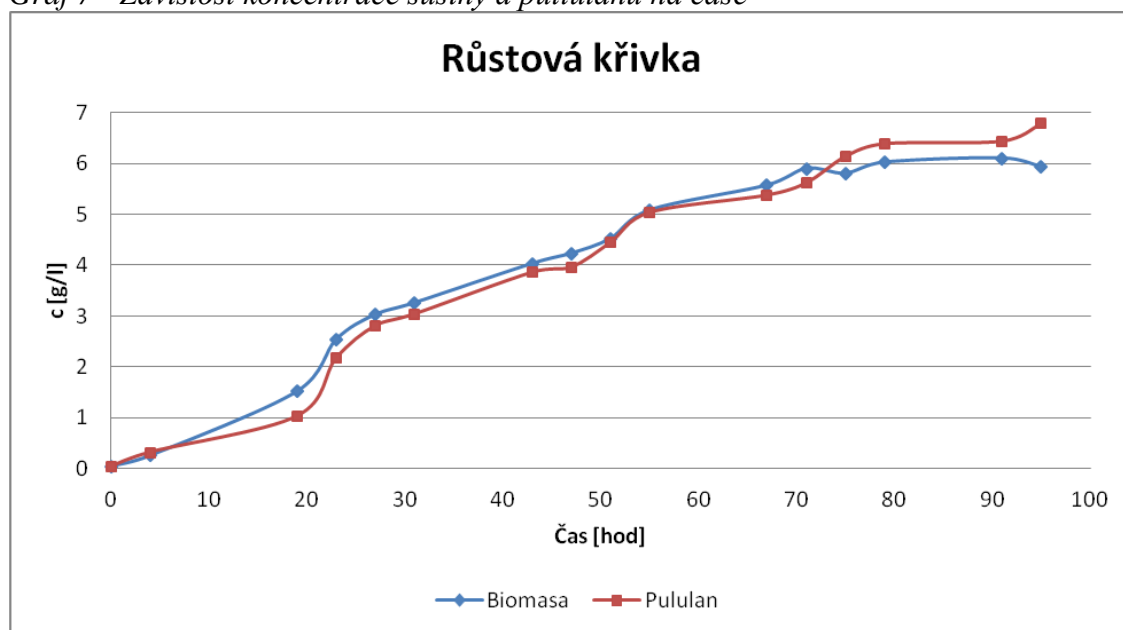
Byl sledován růst *A. pullulans* CCM 8182 v Erlenmayerově baňce za optimálních podmínek.

Sušina byla stanovována gravimetricky (postup viz. kapitola 4.3.3). Zároveň byla sledována produkce pullulanu a to opět metodou gravimetrického stanovení obsahu pullulanu v médiu (postup viz. kapitola 4.3.4). Do grafu byly vyneseny závislosti koncentrace biomasy a pullulanu na čase.

Tabulka 11- Data pro sestavení růstové křivky

Čas [h]	Sušina c [g/l]	Pullulan c [g/l]	Čas [h]	Sušina c [g/l]	Pullulan c [g/l]
0	0,05	0,04	51	4,52	4,45
4	0,26	0,32	55	5,08	5,10
19	1,52	1,03	67	5,57	5,28
23	2,54	2,17	71	5,9	5,62
27	3,03	2,81	75	5,8	6,19
31	3,26	3,04	79	6,02	6,59
43	4,03	3,86	91	6,1	6,44
47	4,23	3,96	95	5,93	6,78

Graf 7 - Závislost koncentrace sušiny a pullulanu na čase



Lze usuzovat, že na začátku měření, v prvních dvaceti hodinách probíhala lag-fáze. Fáze zrychleného růstu nastala okolo 20. hodiny, kdy lze vidět v grafu 1 prudký nárůst biomasy. Stacionární fáze nastala okolo 80. hodiny, koncentrace v tuto dobu dosahuje svého maxima. Po 95. hodině se koncentrace biomasy začala snižovat, nastala tedy fáze postupného odumírání.

Koncentrace pullulanu měla stejný průběh do stacionární fáze, ale poté došlo k jejímu zvyšování, tedy opačnému jevu než u biomasy. Nejvyšší hodnota pullulanu byla zjištěna v 95. hodině.

6.5. Purifikace pullulanu

Pullulan použitý pro purifikaci byl vyprodukován kmenem F 148, jako zdroj uhlíku byla použita glukosa. Pro purifikaci byly zvoleny následující metody: několikanásobná precipitace organickými rozpouštědly a dialýza.

Cílem této části práce bylo zjistit, jak účinné jsou jednotlivé vybrané metody, a jaké je znečištění precipitovaného pullulanu zbytkovými sacharidy z média.

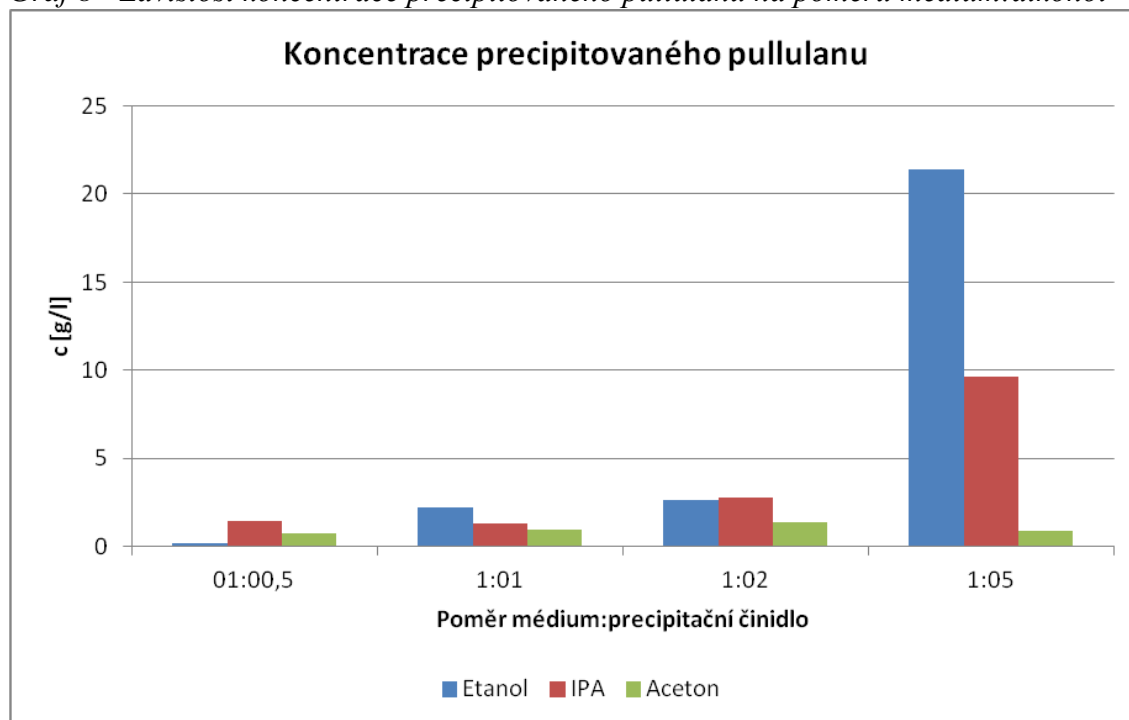
6.5.1. Výběr precipitačního činidla

Pro precipitaci pullulanu byla vybrána následující činidla: ethanol, isopropylalkohol a aceton. Tyto alkoholy byly v různých poměrech přidávány k médiu a byla sledována hmotnost vysráženého pullulanu (viz tabulka 13).

Tabulka 12 - Koncentrace vysráženého pullulanu při použití vybraných alkoholů

Poměr médium:alkohol	Ethanol	Isopropylalkohol	Aceton
	c [g/l]	c [g/l]	c [g/l]
1:0,5	0,21	1,43	0,77
1:1	2,25	1,32	0,93
1:2	2,61	2,79	1,40
1:5	21,36	9,67	0,92

Graf 8 - Závislost koncentrace precipitovaného pullulanu na poměru médium:alkohol



Z výsledků lze usoudit, že při použití ethanolu je dosaženo nejvyšší koncentrace vysráženého pullulanu. Při zvyšujícím se podílu alkoholu ve směsi s médiem tato koncentrace stoupá. Nejvyšší koncentrace byla při použití ethanolu v poměru s 1:5 (médium:ethanol) a to 21,36 g/l. Při stejném poměru a použití isopropylalkoholu byla druhá nejvyšší koncentrace – 9,67 g/l. Při použití acetonu byl nejvyšší výtěžek pullulanu při poměru 1:2 (médium:aceton), a to 1,4 g/l.

Obecně se dá říct, čím vyšší podíl alkoholu se nachází ve směsi s médiem, tím vyšší je výtěžek precipitovaných sacharidů.

V dalších měřeních bylo pracováno výlučně s ethanolem.

6.5.2. Optimalizace poměru precipitačního činidla

V této části bylo pracováno s vybranými poměry médium:ethanol. Předpoklad byl následující: ethanol vysráží nejen samotný pullulan, ale částečně i zbytkové sacharidy,

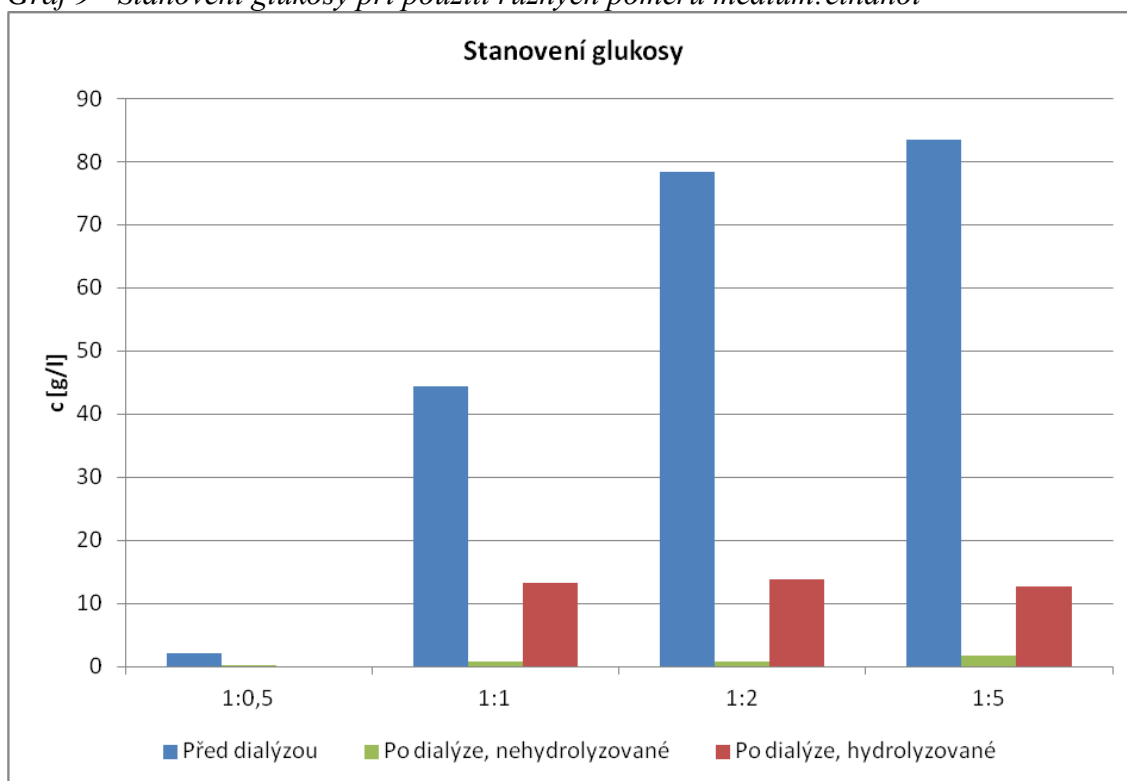
případně další komponenty z média. Díky dialýze se lze těchto nežádoucích nízkomolekulárních příměsí zbavit. Další precipitací získáme čistý pullulan.

Byla určována koncentrace glukosy. Metoda zvolená pro analýzu byla HPLC. Koncentrace glukosy bylo stanovovaná ve vzorku před dialýzou, po dialýze v nehydrolyzovaném a hydrolyzovaném vzorku. Ve vzorku po hydrolyze byla zjištěna koncentrace glukosy z pullulanu.

Tabulka 13 - Obsah glukosy v precipitátu před a po dialýze v nehydrolyzovaném a hydrolyzovaném vzorku.

Poměr médium:ethanol	Před dialýzou c [g/l]	Po dialýze, nehydrol. c [g/l]	Po dialýze, hydrol. c [g/l]	Odstraněná glukosa [%]
1:0,5	2,050	0,245	0,000	99,880
1:1	44,400	0,847	13,224	99,981
1:2	78,450	0,858	13,840	99,989
1:5	83,400	1,777	12,770	99,979

Graf 9 - Stanovení glukosy při použití různých poměrů médium:ethanol



Před dialýzou koncentrace glukosy stoupá společně se stoupajícím množstvím ethanolu použitým na precipitaci. Použitím ethanolu mohlo dojít k vysrážení nejen pullulanu, ale také glukosy, která nebyla metabolizována a zůstala v médiu volně.

Dialýzou se podařilo odstranit vždy okolo 99,9 % volné glukosy z média. Lze tedy předpokládat minimální znečištění rozpuštěného pullulanu. Ten byl dále hydrolyzován na glukosu. Při použití nejnižšího poměru média a ethanolu (1:0,5) byla koncentrace glukosy, potažmo pullulanu nulová. Naopak při použití poměru 1:2 byla koncentrace

glukosy z pullulanu nejvyšší (13,840 g/l). Tento poměr byl zvolen jako ideální pro další práci.

6.5.3. Spektrofotometrické stanovení sacharidů a bílkovin

Byly stanoveny celkové, redukující sacharidy a bílkoviny ve vzorcích před dialýzou a po dialýze. Vzorek získaný pro tuto část práce byl precipitován ethanolom v poměru 1:2 (médium:ethanol)

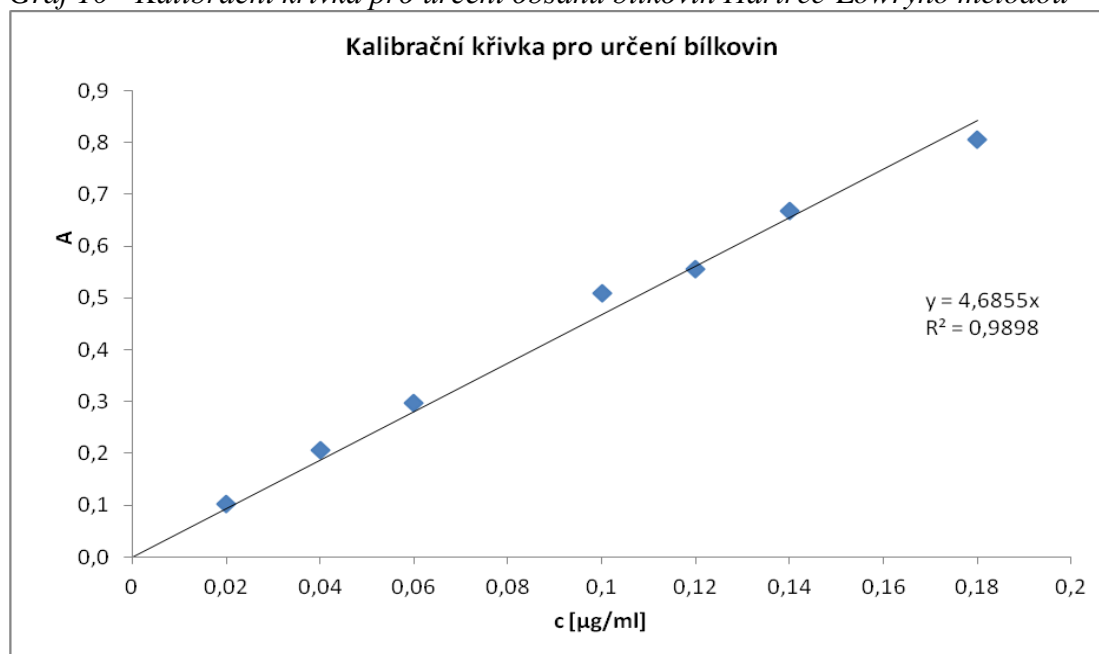
6.5.3.1. Stanovení obsahu bílkovin dle Hartree-Lowryho

Pro stanovení bílkovin byla použita metoda Hartree-Lowryho. Postup je uveden v kapitole 4.2.6.3. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 12, grafické znázornění kalibrační křivky je v grafu 8. Bílkoviny byly stanovovány ve vzorcích určených pro výběr precipitačního činidla a purifikaci pullulanu – viz. kapitola 6.6.3 – Spektrofotometrické stanovení sacharidů a bílkovin.

Tabulka 14 - Data pro kalibrační křivku metody Hartree-Lowry

c [μg/ml]	Absorbance A	Sm. odchylka
0,02	0,103	0,000
0,04	0,206	0,010
0,06	0,297	0,002
0,1	0,509	0,004
0,12	0,556	0,002
0,14	0,668	0,006
0,18	0,805	0,002

Graf 10 - Kalibrační křivka pro určení obsahu bílkovin Hartree-Lowryho metodou



6.5.3.2. Výsledky spektrofotrického stanovení

Tabulka 15 - Přehled koncentrací sacharidů a bílkovin ve vzorku před a po dialýze

	Celkové sacharidy c [g/l]	Redukující sacharidy c [g/l]	Bílkoviny c [mg/l]
Před dialýzou	25,8547	1,8924	0,8254
Po dialýze	29,3162	0,0850	0,8829

Z tabulky lze vyčíst, že koncentrace redukujících sacharidů se snížila o dva řády. Bílkoviny nebylo možno ze vzorku dialýzou odstranit díky velikosti molekul. Koncentrace bílkovin se zvýšila, ale tuto odchylku lze považovat za chybu metody díky velmi malé koncentraci bílkovin.

6.6. Kryoprotektivní účinky pullulanu

V další části byla studována viabilita buněk v roztoku pullulanu o určitých koncentracích při teplotním stresu (-72, -18, 4 a 60° C). Roztoky pullulanu měly hodnotu koncentrací: 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5%. Jako kontrolní roztoky byla použita destilovaná voda a fyziologický roztok. Průtoková cytometrie byla použita pro zkoumání viability buněk. Naměřená data jsou uvedena v tabulkách 16 a 17. Ukázka grafického výstupu z cytometru je uvedena na obrázku 9.

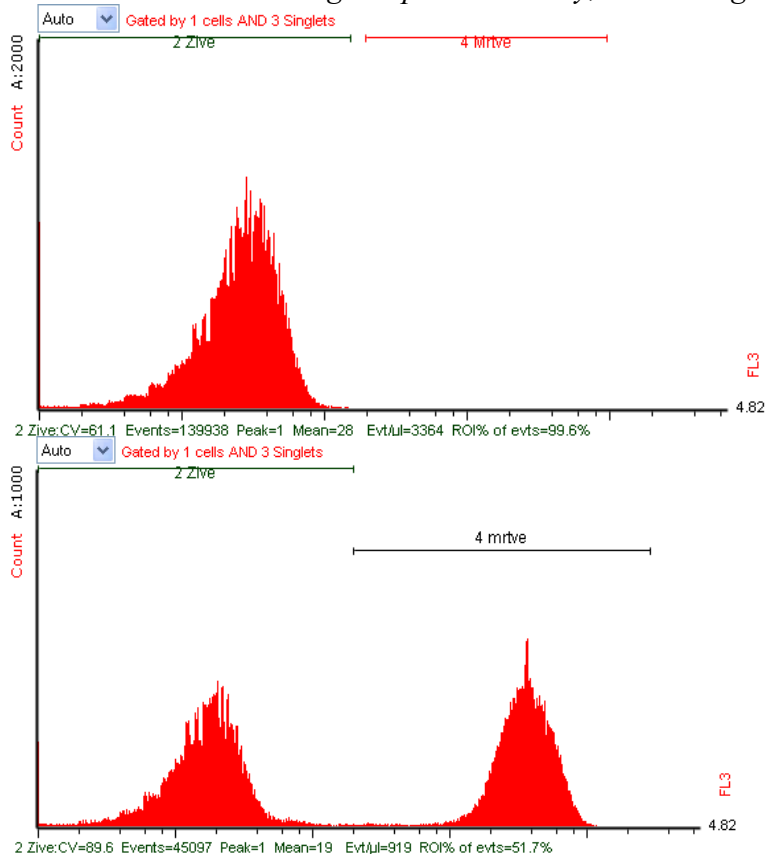
Tabulka 16 - Vliv různé koncentrace pullulanu na viabilitu buněk

		Roztok pullulanu [%]							
		0,1		0,5		1		5	
Teplota [°C]	Čas [h]	Živé [%]	Mrtvé [%]	Živé [%]	Mrtvé [%]	Živé [%]	Mrtvé [%]	Živé [%]	Mrtvé [%]
-72	24	63,65	36,36	56,98	43,03	48,29	51,73	56,77	43,03
	72	36,11	63,91	28,33	71,34	36,70	63,32	31,35	68,41
-18	1	89,97	9,75	90,48	8,86	89,16	10,70	91,16	8,81
	24	45,61	53,51	73,05	26,54	76,32	22,45	79,30	20,12
	72	35,48	64,49	51,66	48,35	71,38	28,62	72,80	27,20
4	72	89,33	8,58	94,27	5,74	95,37	4,64	96,46	3,54
60	0,25	0,15	99,85	0,24	99,72	0,32	99,65	0,54	99,46

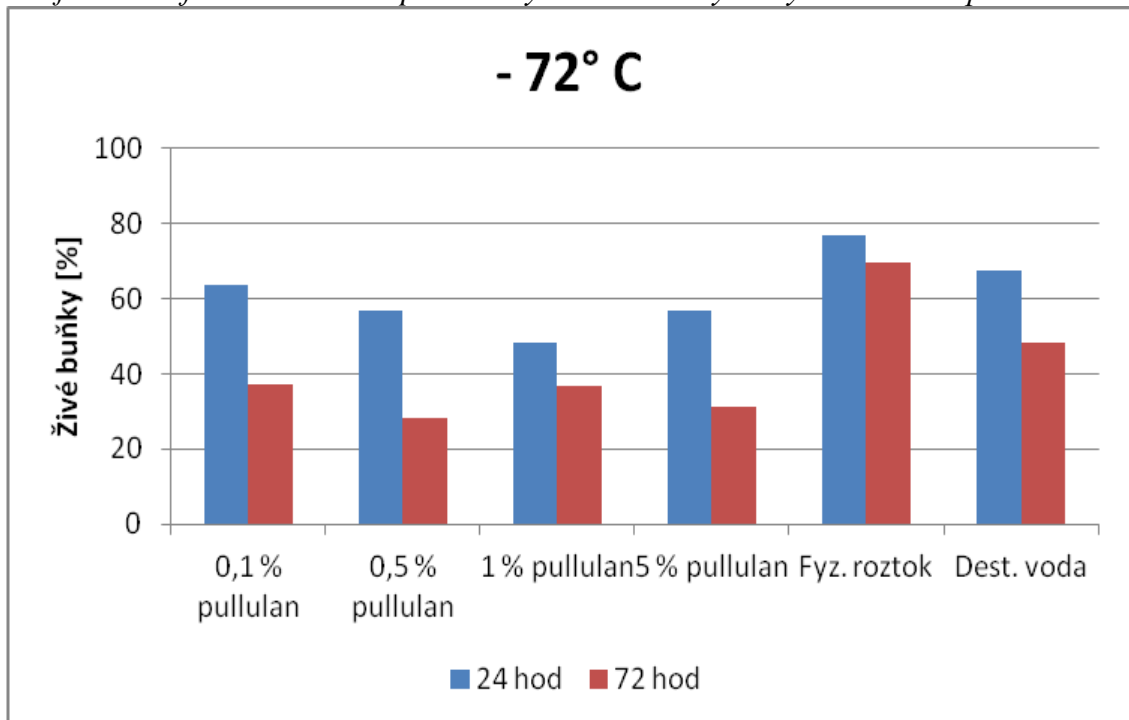
Tabulka 17 - Viabilita buněk ve fyziologickém roztoku a destilované vodě

		Fyziologický roztok		Destilovaná voda	
Teplota [°C]	Čas [h]	Živé [%]	Mrtvé é [%]	Živé [%]	Mrtvé é [%]
-72	24	76,83	17,24	67,59	31,80
	72	69,58	30,43	48,2	51,81
-18	1	99,55	0,37	89,03	10,61
	24	95,77	2,41	59,49	40,11
	72	88,66	11,35	53,66	46,35
4	72	98,94	1,07	94,12	5,88
60	0,25	4,08	95,63	1,06	98,89

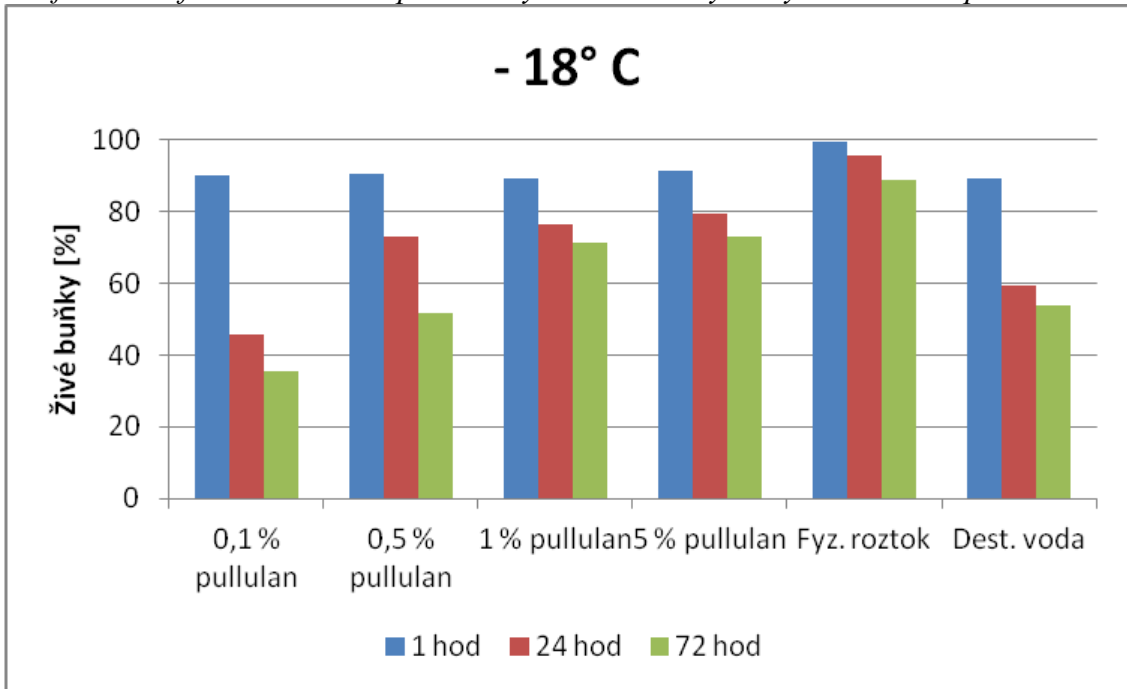
Obrázek 9- Nahoře histogram pro živé buňky, dole histogram živých a mrtvých buněk



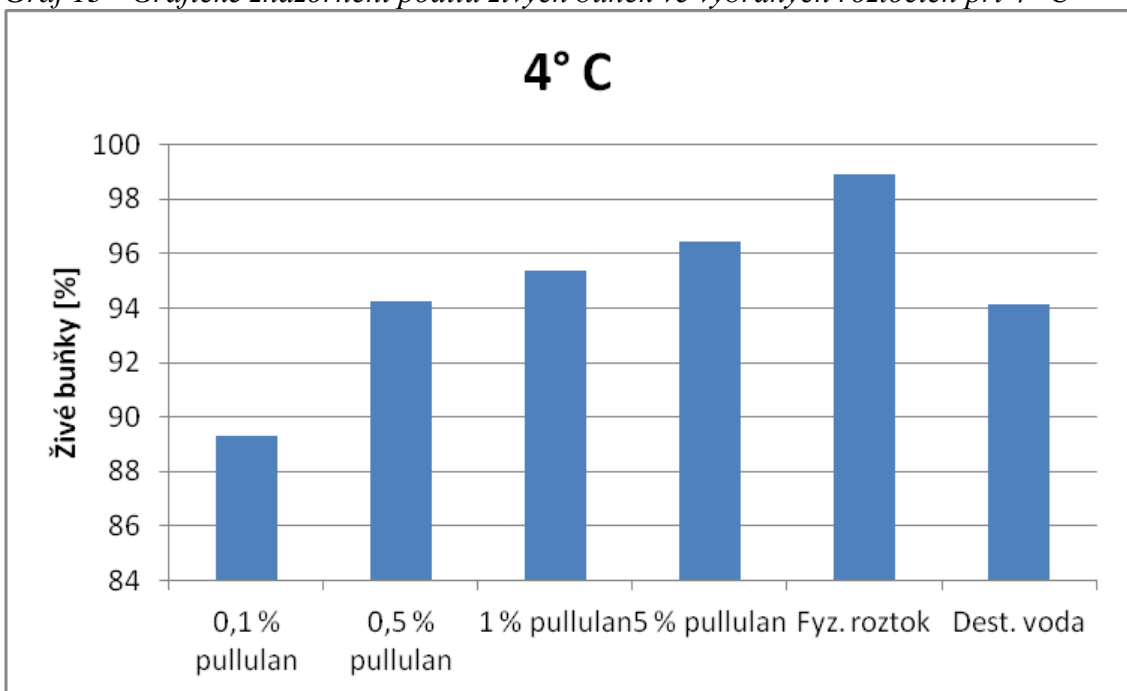
Graf 11 - Grafické znázornění podílu živých buněk ve vybraných roztocích při - 72° C



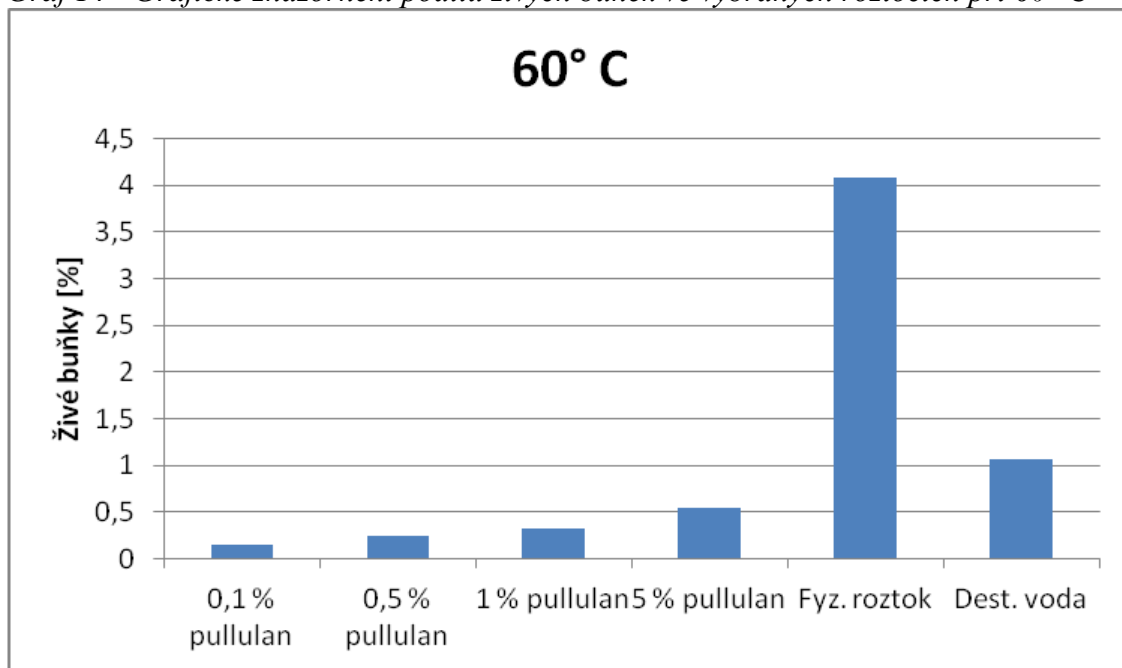
Graf 12 - Grafické znázornění podílu živých buněk ve vybraných roztocích při -18° C



Graf 13 - Grafické znázornění podílu živých buněk ve vybraných roztocích při 4° C



Graf 14 - Grafické znázornění podílu živých buněk ve vybraných roztocích při 60° C



Při působení teploty – 72° C se s prodlužujícím se časem vystavení buněk mrazu snižoval podíl živých buněk. Kromě doby, po kterou byly buňky vystaveny teplotě mělo na viabilitu vliv i rozmrazování a zpětné mražení. Měření jak po 24 hodinách, tak i po 72 hodinách ukázalo, že nejvyšší procento živých buněk se nachází ve fyziologickém roztoku: 76,83 % a 69,58 % respektive.

Po 24 hodinách byla nejnižší hodnota živých buněk při použití 1% roztoku pullulanu, a to 48, 29 %. Po 72 hodinách byla tato hodnota 36,77 %. Nejmenší hodnota byla zjištěna při použití 0,5% roztoku a to 28,33 %.

Všechny hodnoty zjištěné při použití pullulanu byly vždy menší než v případě použití fyziologického roztoku či vody. Lze předpokládat, že pullulan v roztoku buňkám při takto nízké teplotě spíše škodí.

V případě působení teploty – 18° C bylo provedeno měření viability každého roztoku třikrát – po 1, 24 a 72 hodinách. Ve všech případech bylo největší procento živých buněk při použití fyziologického roztoku – 99,55 %, 95,77 % a 88,66 %.

Po první hodině se procento živých buněk pohyboval ve všech roztocích pullulanu kolem 90 % (nejnižší hodnota naměřena v roztoku 1 % pullulanu - 89,16 %, nejvyšší v roztoku 5% - 91,16).

V případě měření po 24 a 72 hodinách lze vysledovat tento trend: čím koncentrovanější roztok pullulanu, tím je větší procento buněk přeživších.. Je možné tedy tvrdit, že při teplotě – 18° C plní pullulan ochrannou funkci.

Při působení teploty 4° C bylo procento živých buněk ve všech případech vyšší než 80 %. Největší procento bylo při přidání buněk do fyziologického roztoku – 98,94 %. Podíl přeživších buněk v roztocích pullulanu se zvyšoval společně se zvyšujícím se obsahem pullulanu: v 0,1 % roztoku to bylo 89,33 %; v 0,5 % 94,27 %; v 1% 95,37 %; u 5 % roztoku 96,46 %. V destilované vodě bylo živých buněk 94,12 %, což je podobné

jako při použití 0,1 % roztoku pullulanu. V případě působení teploty 4° C se dá tvrdit, že pullulan má ochranné vlastnosti.

Protektivní účinky pullulanu při působení teploty 60° C nebyly prokázány. Spíše se zdá, že pullulan v tomto případě působí negativně na viabilitu buněk. Nejvyšší procento buněk přežilo při použití fyziologického roztoku – 4,08 %. Při použití jakékoli koncentrace pullulanu bylo procento živých buněk menší než 0,54 % (5 % roztok pullulanu), což je i méně než při použití čisté destilované vody – 1,06 %.

7. ZÁVĚR

- V rámci teoretické části byla zpracována rešerše zabývající se mikroorganismem *A. pullulans*, extracelulárním polysacharidem pullulanem, stresovými faktory se zaměřením na teplotní stres.
- Byl sledován růst dvou kmenů *A. pullulans* – F 148 a CCM 8182, a jejich produkce pullulanu při použití různých zdrojů uhlíku – glukosy, laktosy, sacharosy a fruktosy. Bylo zjištěno, že nejvhodnějším zdrojem pro růst biomasy je fruktosa. Koncentrace biomasy byla 2,720 g/l u F 148; 3,580 g/l u CCM 8182. Pro produkci pullulanu byla jako nejlepší zdroj uhlíku zvolena sacharosa, hodnoty výtěžků byly 10,3 g/l u F 148; 6,3 u CCM 8182.
- V průběhu kultivace *A. pullulans* CCM 8182 byl stanoven průběh růstové křivky a produkce pullulanu. Fáze zrychleného růstu nastoupila ve 20. hodině a stacionární fáze bylo dosaženo okolo 80. hodiny. Koncentrace pullulanu měla stejný průběh jako koncentrace biomasy, a to až do 95. hodiny, kdy produkce pullulanu stále stoupala, ale hodnota koncentrace biomasy klesala.
- Další část byla vybrání precipitačního činidla a optimalizace poměru médium:činidlo. Byly zkoumány tři organická rozpouštědla – ethanol, izopropylalkohol a aceton. Při použití ethanolu bylo dosaženo nejvyšší koncentrace vysráženého pullulanu a to 21,36 g/l při použití poměru 1:5 (médium:alkohol). Z hlediska čistoty pullulanu byl jako nevhodnější poměr zvolen 1:2 (médium:ethanol). Při tomto poměru byla v precipitátu zjištěna nejvyšší koncentrace glukosy – 13,84 g/l.
- V rámci purifikace pullulanu byla zjišťována koncentrace celkových a redukujících sacharidů a bílkovin a to před a po dialýze. Redukující sacharidy byly po dialýze přítomny v menší koncentraci a to o 1,8074 g/l. Hodnota bílkovin se po dialýze zvýšila o 0,0575 mg/l, ale tato hodnota spadá do chyby měření.
- Byly měřeny kryoprotektivní vlastnosti pullulanu v suspenzi buněk *A. pullulans*. Při teplotě – 72° C měly buňky v roztocích pullulanu větší úmrtnost než ve fyziologickém roztoku a to při obou měření: po 27 a 72 hodinách. Po 24 hodinách bylo procento živých buněk nejvyšší u fyziologického roztoku – 76,86 % a po 76 hodinách 59,58 %. U roztoků pullulanu byla nejvyšší hodnota po 24 hodinách 63,65 % při použití 0,1 % roztoku. Po 72 hodinách bylo největší procento živých buněk 36,77 % v případě použití 1 % roztoku. V případě -72° C se ukázal pullulan spíše jako negativně působící na buňky.
- Použití různých roztoků pullulanu při – 18° C ukázalo tento trend: čím vyšší je koncentrace pullulanu, tím vyšší je procento přeživších buněk. Kryoprotektivní účinek pullulanu tedy rostl s jeho rostoucí koncentrací v roztoku. Nejvyšší hodnoty celkově byly naměřeny ve fyziologickém roztoku: 99,55 %, 95,77 % a 88,66 % (měření po 1, 24 a 72 hodinách). Při použití 5 % roztoku pullulanu byly tyto hodnoty 91,16 %, 79,30 %, 72,80 %. Při použití samotné vody bylo procento

živých buněk: 89,03 %, 59,49 % a 53,66 %. Lze tedy říci, že pullulan lze použít jako kryoprotektant při teplotě – 18° C.

- Protektivní účinky pullulanu se potvrdily i při teplotě 4° C. Nejvyšší hodnota počtu živých buněk byla naměřena ve fyziologickém roztoku a to 98,94 %. Buňky v roztocích pullulanu o koncentracích 0,5 %, 1 % a 5 % vykazovaly vyšší procento živých buněk, než tomu bylo u buněk v destilované vodě.
- V případě působení teploty 60° C se účinky pullulanu ukázaly spíše jako negativní – procento živých buněk (0,1% roztok: 0,15 %, 0,5% roztok: 0,24 %, 1% roztok: 0,32 %, 5% roztok: 0,54 %) bylo výrazně menší než u vody (1,06 %) nebo fyziologického roztoku (4,08 %).

8. LITERATURA

- [1] ZALAR, P., C. GOSTINCAR, G.S. DE HOOG, V. URSIC, M. SUDHADHAM a N. GUNDE-CIMERMAN. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*. 2008-12-26, roč. 61, č. 1. DOI: 10.3114/sim.2008.61.02. Dostupné z: <http://www.studiesinmycology.org/cgi/doi/10.3114/sim.2008.61.02>
- [2] MIYAWAKI, Kaori, Keigo TERAO a Shinichi YAMAKITA. Relationship between the functional β -glucan polysaccharide-production and the cell morphologies of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Biotechnology*. 2010, č. 12.
- [3] *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*. GRIGORIEV, Igor V., Henrik NORDBERG a Igor SHABALOV. *The Genome Portal of the Department of Energy Joint Genome Institute* [online]. 2011. Dostupné z: http://genome.jgi-psf.org/Aurpu_var_mel1/Aurpu_var_mel1.home.html
- [4] *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans*. GRIGORIEV, Igor V., Henrik NORDBERG a Igor SHABALOV. *The Genome Portal of the Department of Energy Joint Genome Institute* [online]. 2011. Dostupné z: http://genome.jgi-psf.org/Aurpu_var_pul1/Aurpu_var_pul1.home.html
- [5] *Aureobasidium pullulans* var. *subglaciae*. GRIGORIEV, Igor V., Henrik NORDBERG a Igor SHABALOV. *The Genome Portal of the Department of Energy Joint Genome Institute* [online]. 2011. Dostupné z: http://genome.jgi-psf.org/Aurpu_var_sub1/Aurpu_var_sub1.home.html
- [6] *Aureobasidium pullulans* var. *namibiae*. GRIGORIEV, Igor V., Henrik NORDBERG a Igor SHABALOV. *The Genome Portal of the Department of Energy Joint Genome Institute* [online]. 2011. Dostupné z: http://genome.jgi-psf.org/Aurpu_var_nam1/Aurpu_var_nam1.home.html
- [7] LEE, Ji-Hyun, Jeong-Hwa KIM, Il-Hui ZHU, Xiao-Bei ZHAN, Jin-Woo LEE, Dong-Hoon SHIN a Sung-Koo KIM. *Biotechnology Letters*. roč. 23, č. 10. DOI: 10.1023/A:1010365706691. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1010365706691>
- [8] MCNEIL, B., B. KRISTIANSEN a R. J. SEVIOUR. Polysaccharide Production and Morphology of *Aureobasidium pullulans* in Continuous Culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004, roč. 33, č. 9. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.260330918/pdf>
- [9] <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/aureob.htm>
- [10] Abyzov, SS. Microorganisms in the Antarctic Ice. *Antarctic Microbiology*. Willey-Liss Inc., New York, s. 265-295, 4
- [11] Babjeva I, Reshetova I (1998). Yeast resources in natural habitats at polar circle latitude. *Food Technology and Biotechnology*. Vol. 36. s. 1–5.
- [12] ZALAR, P., C. GOSTINCAR, G.S. DE HOOG, V. URSIC, M. SUDHADHAM a N. GUNDE-CIMERMAN. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*. 2008-12-26, roč. 61, č. 1. DOI: 10.3114/sim.2008.61.02. Dostupné z: <http://www.studiesinmycology.org/cgi/doi/10.3114/sim.2008.61.02>

- [13] BRANDA, Eva, Benedetta TURCHETTI, Guglielmina DIOLAIUTI, Massimo PECCI, Claudio SMIRAGLIA a Pietro BUZZINI. Yeast and yeast-like diversity in the southernmost glacier of Europe (Calderone Glacier, Apennines, Italy). *FEMS Microbiology Ecology*. 2010, roč. 72, č. 3, s. 354-369. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2010.00864.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6941.2010.00864.x>
- [14] GANAIE, M.A., L.K. PATHAK a U.S. GUPTA. Production of Fructoligosaccharides by *Aureobasidium Pullulans* Using Immobilization Technique. *Journal of Food Technology*. 2011-3-1, roč. 9, č. 3, s. 91-94. DOI: 10.3923/jftech.2011.91.94. Dostupné z: <http://www.medwelljournals.com/abstract/?doi=jftech.2011.91.94>
- [15] MANITCHOPISIT, Pennapa, Christopher D. SKORY, Stephen W. PETERSON, Neil P. J. PRICE, Karl E. VERMILLION a Timothy D. LEATHERS. Poly(β -L-malic acid) production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Industrial microbiology* [online]. 2012, roč. 39, č. 1, s. 125-132. ISSN 1367-5435. DOI: 10.1007/s10295-011-1007-7. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-011-1007-7>
- [16] SCHENA, Leonardo, Franco NIGRO, Isabella PENTIMONE, Angela LIGORIO a Antonio IPPOLITO. Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*. 2003, roč. 30, č. 3, s. 209-220. DOI: 10.1016/S0925-5214(03)00111-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092552140300111X>
- [17] CASTORIA, R., F. DE CURTIS, G. LIMA, L. CAPUTO, S. PACIFICO a V. DE CICCIO. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology*. 2001, roč. 22, č. 1, s. 7-17. DOI: 10.1016/S0925-5214(00)00186-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925521400001861>
- [18] IPPOLITO, Antonio, Ahmed EL GHAOUTH, Charles L. WILSON a Michael WISNIEWSKI. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology*. 2000, roč. 19, č. 3, s. 265-272. DOI: 10.1016/S0925-5214(00)00104-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925521400001046>
- [19] LEATHERS, T. D. Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003-10-1, roč. 62, s. 5-6. DOI: 10.1007/s00253-003-1386-4. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-003-1386-4>
- [20] L. Simon, B. Bouehet, K. Bremond, D.J. Gallant, M. Bouchonneau, *Studies on pullulan extracellular production and glycogen intracellular content in Aureobasidium pullulans*, *Can. J. Microbiol.*, 44 (1998), s. 1193–1199
- [21] B.J. Catley, P.J. Kelly, *Biochem. Soc. Trans.*, 3 (1975), s. 1079–1085
- [22] WEST, Thomas P. Pullulan Production by *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253 Cells Adsorbed onto Cellulose Anion and Cation Exchangers. *ISRN Microbiology* [online]. 2012, č. 2012. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/isrn/microbiology/2012/140951/>

- [23] CATLEY, B. J. The Extracellular Polysaccharide, Pullulan, Produced by *Aureobasidium pullulans*: A Relationship between Elaboration Rate and Morphology. *Microbiology*. 1980-09-01, roč.. 120, č. 1, s. 265-268. DOI: 10.1099/00221287-120-1-265. Dostupné z: <http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/00221287-120-1-265>
- [24] SIMON, L., C. CAYE-VAUGIEN a M. BOUCHONNEAU. Relation between pullulan production, morphological state and growth conditions in *Aureobasidium pullulans*: new observations. *Journal of General Microbiology*. 1993-05-01, roč. 139, č. 5, s. 979-985. DOI: 10.1099/00221287-139-5-979. Dostupné z: <http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/00221287-139-5-979>
- [25] OLLER, Anna R. Nutrient limitation promotes pigment production in *Aureobasidium pullulans*. *Transactions of the Missouri Academy of Science* [online]. 2004, Jan . Dostupné z: <http://www.thefreelibrary.com/Nutrient+limitation+promotes+pigment+production+in+Aureobasidium...-a0130216118>
- [26] KATO, Koso a Tatsuo NOMURA. *Method for purifying pullulan* [patent]. US4004977 A. Uděleno 31. 1. 1994.
- [27] CHOUDHURY, Anirban Roy, Paramita BHATTACHARJEE, Gandham S. PRASAD a Dwayne ELIAS. Development of Suitable Solvent System for Downstream Processing of Biopolymer Pullulan Using Response Surface Methodology. *PLoS ONE*. 2013-10-15, roč. 8, č. 10, s. 77-71. DOI: 10.1371/journal.pone.0077071. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0077071>
- [28] ARTI NIGAM, Archana Ayyagari. *Lab manual in biochemistry, immunology and biotechnology*. New Delhi: Tata McGraw-Hill Pub, 2007. ISBN 978-007-0617-674.
- [29] *A Study on Downstream Processing for the production of Pullulan by Aureobasidium pullulans-SB-01 from the Fermentation broth* [online]. 2013 [cit. 2014-04-25]. ISSN 2277-2502. Dostupné z: http://www.isca.in/tjrs/archive/special_issue2012/4.ISCA-ISC-2012-03BS-46.pdf
- [30] MA, Jinlong, Guobin JIANG a Shanjing YAO. Studies on the optimal culture conditions of *Aureobasidium pullulans* to produce exopolysaccharides. *Journal of Biomedical Science and Engineering*. 2012, č. 5.
- [31] DEKKER, M. *Polysaccharides in medicinal applications*. New York, 1996, s. 794. ISBN 08-247-9540-7.
- [32] KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1982. 483 s
- [33] VESELÁ, M. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 3. vyd. VUT Bno, 2004, ISBN 80-214-2567-9
- [34] SINGH, Ranjan. Production of pullulan by a thermotolerant *Aureobasidium pullulans* strain in non-stirred fed batch fermentation process. *Braz J Microbiol*. 2012, Jul-Sep. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768891/#!po=70.0000>
- [35] Němec M., Horáková D.: *Základy mikrobiologie*, MU Brno, 1999

- [36] Šilhánková L.: Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology, Victoria Publishing Praha, 1995
- [37] Kočí R.: Disertační práce, Fakulta chemická, VUT Brno, 2004
- [38] MANAGBANAG, Jim Ray a Albert P. TORZILI. An analysis of trehalose, glycerol, and mannitol accumulation during heat and salt stress in a salt marsh isolate of *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia*. 2014, roč. 94, č. 3.
- [39] Morita R.Y. (1975): Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39: s. 144-167
- [40] [http://www.mycology.adelaide.edu.au/FungalDescriptions/Hyphomycets \(dematiaceous\)/Aureobasidium/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/FungalDescriptions/Hyphomycets(dematiaceous)/Aureobasidium/)
- [41] HUANG, P. *Environmental impact of soil component interactions*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995. ISBN 08-737-1914-X.
- [42] WINGENDER, Jost, Thomas R NEU a Hans-C FLEMMING. *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure, and function*. New York: Springer, 1999, s. 258. ISBN 35-406-5720-7.
- [43] KNOWLES, Emily J. a Richard W. CASTENHOLZ. Effect of exogenous extracellular polysaccharides on the desiccation and freezing tolerance of rock-inhabiting phototrophic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology*. 2008, roč. 66, č. 2, s. 261-270. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00568.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6941.2008.00568.x>
- [44] BD BIOSCIENCES. *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide*. San Jose, 2000.
- [45] ORMEROD, Michael. DE NOVO. *Flow cytometry: A basic introduction* [online]. Dostupné z: http://flowbook.denovosoftware.com/Flow_Book
- [46] Fluorescent Dyes for Flow Cytometric Analysis. EBIOSCIENCE. *Affymetrix eBioscience* [online]. Dostupné z: <http://www.ebioscience.com/knowledge-center/application/flow-cytometry/flow-cytometry-fluorophores.htm>
- [47] HAUGHLAND, RP. Spectra of fluorescent dyes used in flow cytometry. *PubMed* [online]. 1994. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7533258>
- [48] Flow cytometer, diagram. In: *Univesidad Autónoma de Zacatecas* [online]. Dostupné z: http://www.uaz.edu.mx/histo/pathology/ed/ch_4/c4_flow.htm
- [49] <http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=62>
- [50] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s., ISBN 80-86369-07-2.
- [51] <http://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20HPLC%20DETEKTORY%20092007.pdf>
- [52] SOMMER, L., et al. *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. VUT Brno, 2000, 347 s., ISBN 80-214-1742-0.

9. SEZNAM ZKRATEK

A	Absorbance
ATP	Adenosintrifosfát
C	Koncentrace
ECP	Extracelulární polymery
HPLC	High performance liquid chromatography, Vysokoučinná kapalinová Chromatografie
IPA	Isopropylalkohol
kDA	kilodalton, jednotka molekulové hmotnosti proteinů
MO	Mikroorganismus
RI	Refraktometrický detektor
rpm	Revolution per minute, otáčky za minutu
SALS	Small Angle Light Scatter, malý úhel rozptylu světla
UV	Ultrafialové záření
VIS	Viditelné záření