

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM PRODUKCE HYDROLYTICKÝCH ENZYMŮ PRO ZPRACOVÁNÍ CELULOSOVÉHO ODPADU

THE STUDY OF PRODUCTION OF HYDROLYTIC ENZYMES FOR CELLULOSE WASTES
TREATMENT

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. BARBORA ŘEZÁČOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. JIŘINA OMELKOVÁ, CSc.

BRNO 2011



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

Zadání diplomové práce

| | | |
|------------------------|--|----------------------------------|
| Číslo diplomové práce: | FCH-DIP0529/2010 | Akademický rok: 2010/2011 |
| Ústav: | Ústav chemie potravin a biotechnologií | |
| Student(ka): | Bc. Barbora Řezáčová | |
| Studijní program: | Chemie a technologie potravin (N2901) | |
| Studijní obor: | Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010) | |
| Vedoucí práce | doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc. | |
| Konzultanti: | | |

Název diplomové práce:

Studium produkce hydrolytických enzymů pro zpracování celulosového odpadu

Zadání diplomové práce:

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

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

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

Bc. Barbora Řezáčová
Student(ka)

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Studium produkce hydrolytických enzymů bylo zaměřeno na produkci celulasy a polygalakturonasy pomocí dvou mikrobiálních kmenů – *Aspergillus niger* a *Aureobasidium pullulans*. Enzymy byly produkovány za podmínek procesu „solid-state fermentation“. Jako substrát byla zvolena mletá pšeničná sláma a řepné výlisky zvlhčené vodou, bezuhlíkatým médiem nebo glukosovým médiem. Během kultivace byl sledován vliv bezuhlíkatého media a glukosy na produkci daných enzymů. Nejvyšší produkce polygalakturonasy bylo dosaženo při kultivaci *Aspergillus niger* na řepných výliscích zvlhčených bezuhlíkatým médiem. Nejvyšší produkce celulasy bylo dosaženo při kultivaci *Aspergillus niger* na mleté pšeničné slámě zvlhčené glukosovým médiem.

KLÍČOVÁ SLOVA

Aspergillus niger, *Aureobasidium pullulans*, celulasa, polygalakturonasa, solid-state fermentation

ABSTRACT

The study of production of hydrolytic enzymes dealt with the production of cellulase and polygalacturonase by two microbial strains - *Aspergillus niger* and *Aureobasidium pullulans*. The enzymes were produced in solid-state fermentation system. The wheat straw and sugar beet pulp were used as a substrate. The substrates were moistened by water, mineral solution or by medium with glucose. The effect of mineral solution and glucose on production of these enzymes were monitored during cultivation. The highest production of polygalacturonase was achieved by *Aspergillus niger* during cultivation on sugar beet pulp moistened by mineral solution. The highest production of cellulase was achieved by *Aspergillus niger* during cultivation on wheat straw moistened by medium with glucose.

KEYWORDS

Aspergillus niger, *Aureobasidium pullulans*, cellulase, polygalacturonase, solid-state fermentation

ŘEZÁČOVÁ, B. Studium produkce hydrolytických enzymů pro zpracování celulosového odpadu. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 73 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc. za odborné konzultace, čas, který mi věnovala a cenné rady, kterými přispěla k vypracování mé diplomové práce.

OBSAH

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | ÚVOD | 7 |
| 2 | CÍL PRÁCE | 8 |
| 3 | TEORETICKÁ ČÁST | 9 |
| 3.1 | Biologicky rozložitelný odpad | 9 |
| 3.1.1 | Zemědělské odpady | 10 |
| 3.1.1.1 | Pšeničná sláma | 10 |
| 3.1.2 | Odpady z potravinářského průmyslu | 10 |
| 3.1.2.1 | Řepné řízky | 10 |
| 3.1.3 | Papírové obaly a odpadní papír | 11 |
| 3.2 | Struktura odpadů rostlinného původu | 11 |
| 3.2.1 | Celulosa | 11 |
| 3.2.2 | Hemicelulosa | 12 |
| 3.2.3 | Lignin | 13 |
| 3.2.4 | Pektiny | 14 |
| 3.3 | Enzymy degradující rostlinnou biomasu | 14 |
| 3.3.1 | Celulolytické enzymy | 15 |
| 3.3.1.1 | Mikrobiální zdroje | 16 |
| 3.3.1.2 | Substráty | 16 |
| 3.3.1.3 | Biotechnologické aplikace | 16 |
| 3.3.2 | Pektolytické enzymy | 17 |
| 3.3.2.1 | Mikrobiální zdroje | 18 |
| 3.3.2.2 | Substráty | 18 |
| 3.3.2.3 | Biotechnologické aplikace | 18 |
| 3.4 | Produkční mikroorganismy | 19 |
| 3.4.1 | <i>Aspergillus niger</i> | 19 |
| 3.4.2 | <i>Aureobasidium pullulans</i> | 20 |
| 3.5 | Způsoby produkce mikrobiálních enzymů | 20 |
| 3.5.1 | Solid-state fermentation | 21 |
| 3.5.1.1 | Mikrobiální kultury | 21 |
| 3.5.1.2 | Substrát | 22 |
| 3.5.1.3 | Vodní aktivita | 24 |
| 3.5.1.4 | Teplota | 24 |
| 3.5.1.5 | Hodnota pH | 24 |
| 3.5.2 | Srovnání procesu „solid-state fermentation“ se submerzní fermentací | 24 |
| 3.5.2.1 | Produkce celulolytických enzymů | 25 |
| 3.5.2.2 | Produkce pektolytických enzymů | 26 |
| 3.6 | Stanovení katalytické aktivity enzymů | 27 |
| 3.6.1 | Vyjadřování katalytické aktivity | 28 |
| 3.6.2 | Metody stanovení katalytické aktivity enzymů | 28 |
| 3.6.2.1 | Optické metody | 29 |
| 3.6.2.2 | Stanovení bílkovin | 29 |
| 4 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 31 |
| 4.1 | Použité přístroje | 31 |
| 4.2 | Použité chemikálie | 31 |
| 4.3 | Použité substráty | 32 |
| 4.4 | Použitý odpadní materiál na kultivaci | 32 |
| 4.5 | Použité mikroorganismy | 32 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.6 | Příprava roztoků | 33 |
| 4.6.1 | Příprava Somogyiho činidel | 33 |
| 4.6.2 | Příprava roztoků na stanovení bílkovin Lowryho metodou | 33 |
| 4.6.3 | Příprava 0,2 M roztoku octanu sodného..... | 33 |
| 4.6.4 | Příprava 0,5% roztoku pektanu sodného v 0,1 M octanovém pufru o pH 4,2 | 33 |
| 4.6.5 | Příprava 1% roztoku karboxymethylcelulosity v 0,1 M octanovém pufru o pH 5,4 | 34 |
| 4.6.6 | Příprava bezuhlíkatého media | 34 |
| 4.6.7 | Příprava základního roztoku glukosy o koncentraci 1 $\mu\text{mol.ml}^{-1}$ | 34 |
| 4.6.8 | Příprava základního roztoku kyseliny D-galaktopyranuronové o koncentraci 1 $\mu\text{mol.ml}^{-1}$ | 34 |
| 4.6.9 | Příprava základního roztoku albuminu o koncentraci 1 mg.ml^{-1} | 34 |
| 4.7 | Pracovní postupy | 35 |
| 4.7.1 | Sestrojení kalibračních křivek | 36 |
| 4.7.1.1 | Sestrojení kalibrační křivky glukosy..... | 36 |
| 4.7.1.2 | Sestrojení kalibrační křivky D-galaktopyranuronové kyseliny..... | 37 |
| 4.7.1.3 | Sestrojení kalibrační křivky albuminu | 38 |
| 4.7.2 | Stanovení celulolytické aktivity | 39 |
| 4.7.3 | Stanovení polygalakturonasové aktivity | 39 |
| 4.7.4 | Stanovení redukujících látek | 40 |
| 4.7.5 | Stanovení extracelulárních bílkovin..... | 40 |
| 5 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 41 |
| 5.1 | Kultivace <i>A. niger</i> a <i>A. pullulans</i> na řepných výliscích | 41 |
| 5.1.1 | Produkce celulolytické a polygalakturonasové aktivity pomocí <i>A. niger</i> na řepných výliscích zvlhčených vodou | 41 |
| 5.1.2 | Produkce celulolytické a polygalakturonasové aktivity pomocí <i>A. niger</i> na řepných výliscích zvlhčených bezuhlíkatým mediem | 44 |
| 5.1.3 | Produkce celulolytické a polygalakturonasové aktivity pomocí <i>A. pullulans</i> na řepných výliscích zvlhčených vodou | 46 |
| 5.1.4 | Produkce celulolytické a polygalakturonasové aktivity pomocí <i>A. pullulans</i> na řepných výliscích zvlhčených bezuhlíkatým mediem | 48 |
| 5.2 | Kultivace <i>A. niger</i> a <i>A. pullulans</i> na mleté pšeničné slámě | 50 |
| 5.2.1 | Produkce celulolytické a polygalakturonasové aktivity pomocí <i>A. niger</i> na mleté pšeničné slámě zvlhčené vodou | 50 |
| 5.2.2 | Produkce celulolytické a polygalakturonasové aktivity pomocí <i>A. niger</i> na mleté pšeničné slámě zvlhčené bezuhlíkatým mediem | 52 |
| 5.2.3 | Produkce celulolytické a polygalakturonasové aktivity pomocí <i>A. niger</i> na mleté pšeničné slámě zvlhčené glukosovým mediem | 54 |
| 5.2.4 | Produkce celulolytické a polygalakturonasové aktivity pomocí <i>A. pullulans</i> na mleté pšeničné slámě zvlhčené vodou | 56 |
| 5.2.5 | Produkce celulolytické a polygalakturonasové aktivity pomocí <i>A. pullulans</i> na mleté pšeničné slámě zvlhčené bezuhlíkatým mediem | 58 |
| 5.2.6 | Produkce celulolytické a polygalakturonasové aktivity pomocí <i>A. pullulans</i> na mleté pšeničné slámě zvlhčené glukosovým mediem | 60 |
| 5.3 | Shrnutí výsledků..... | 62 |
| 6 | ZÁVĚR | 66 |
| 7 | SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ | 67 |
| 8 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ | 73 |

1 ÚVOD

Celulosa je nejrozšířenější biopolymer na zemi. Společně s hemicelulosou, pektinem a ligninem je řazena mezi strukturní polysacharidy rostlin. Tato tzv. lignocelulosa je hlavní součástí biologicky rozložitelného odpadu, který je možné efektivně přetvářet na dále využitelné produkty. Rostlinná biomasa se využívá pro různé účely jako např. k produkci biopaliv: bioethanolu, který se vyrábí z obilí, případně z kukuřice nebo methylesterů vyšších mastných kyselin získávaných z řepkového oleje; bioplynu; ke kompostování nebo ke zkrmování hospodářskými zvířaty. Využitelnost fytomasy je mnohdy podmíněna degradací strukturních polysacharidů na jednodušší látky, které podléhají dalším přeměnám [1, 2, 3].

Celulosa může být štěpena enzymaticky tj. komplexem celulolytických enzymů. Na degradaci pektinu se podílí pektolytické enzymy. Celulolytické i pektolytické enzymy jsou řazeny mezi tzv. hydrolytické enzymy a mohou být produkovány mikrobiálně. Mezi významné producenty celulolytických enzymů patří aerobní plísně jako je *Trichoderma viride* nebo *Aspergillus niger*. K produkci pektolytických enzymů se využívá např. kmen *Aspergillus niger* nebo *Aureobasidium pullulans*. Mikrobiální produkce daných enzymů je založena na submerzní fermentaci nebo na procesu „solid-state fermentation“. Přestože je k průmyslové produkci hydrolytických enzymů využívána zejména submerzní fermentace, nedosahuje takových výtěžků jako „solid-state fermentation“ a navíc se jedná o finančně náročný proces. Výhodou procesu „solid-state fermentation“ je využití agro-industriálního odpadu jako substrátu pro produkci daných enzymů. Nejčastěji používanými odpadními materiály jsou např. řízky cukrové řepy nebo pšeničná sláma [4, 5, 6].

Hydrolytické enzymy mají široké průmyslové uplatnění. Pektolytické enzymy se využívají v potravinářském průmyslu při výrobě ovocných šťáv a při fermentaci čaje a kávy nebo při výrobě krmiv. Celulolytické enzymy se uplatňují v potravinářském, textilním, papírenském nebo farmaceutickém průmyslu a významnou roli hrají i v odpadovém hospodářství [7, 8].

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo na základě sledovaných parametrů zhodnotit možnosti využití vybraných odpadních materiálů pro produkci celulolytických a pektolytických enzymů. Jako produkční mikroorganismy byly použity *Aspergillus niger* (CCM-F 8189) pocházející z České sbírky mikroorganismů Masarykovy Univerzity v Brně a *Aureobasidium pullulans* (CCY 27-1-115), který pochází ze Zbierky kultur kvasiniek Chemického ústavu SAV v Bratislavě.

Byly sledovány následující parametry:

- produkce hydrolytických enzymů (celulasy, polygalakturonasy), redukujících látek a extracelulárních proteinů;
- volba nejvhodnějšího odpadního materiálu pro produkci daných enzymů;
- srovnání produkce enzymů u vybraných mikroorganismů a volba nejvhodnějšího mikroorganismu;
- vliv glukosy na produkci daných enzymů.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Biologicky rozložitelný odpad

Vstupem České republiky do Evropské unie se zásadně změnil přístup státu k požadavkům na zlepšení životního prostředí. Jednou z oblastí, která byla významně ovlivněna, je odpadové hospodářství (OH). Z oblasti OH se vyčleňuje část týkající se nakládání s biologicky rozložitelnými odpady, které je možné efektivně přetvářet na dále využitelné produkty [9].

Biologicky rozložitelný odpad (BRO) je dle Zákona č. 185/2001 Sb. o odpadech a o změně některých dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů (31/2011 Sb.), jakýkoli odpad, který podléhá aerobnímu nebo anaerobnímu rozkladu. Při aerobním rozkladu jsou sacharidy, bílkoviny a lipidy obsažené v odpadech přeměněny pomocí mikroorganismů na mikrobiální biomasu a CO₂. Při anaerobním rozkladu jsou dané složky odpadů převedeny pomocí methanogenních bakterií na bioplyn (methan) nebo na organické kyseliny případně pomocí kvasinek na ethanol [10, 11].

Biologicky rozložitelný odpad tvoří odpady zemědělské, lesnické, odpady z potravinářského průmyslu, papírensko-celulózařského průmyslu, ze zpracování dřeva, kůží, textilního průmyslu, papírové a dřevěné obaly, čistírenské a vodárenské kaly a biologicky rozložitelné komunální odpady (BRKO). Tato skupina odpadů představuje v České republice podle statistických výkazů 7 mil. tun biologicky rozložitelného odpadu. Produkci a nakládání s biodegradabilními odpady v roce 2003 uvádí tabulka 1 [9, 12].

Tabulka 1 Produkce, využití a odstraňování BRO v roce 2003 (v kg) [12]

| Druh odpadu | Produkce odpadu celkem | Využití celkem | Odstraňování celkem |
|--|------------------------|----------------|---------------------|
| 020101 - Kal z praní a čištění | 27 004 410 | 17 570 550 | 7 943 390 |
| 020102 - Živočišná tkáň | 19 108 829 | 0 | 21 130 |
| 020103 - Rostlinná tkáň | 232 355 061 | 157 924 441 | 32 354 113 |
| 020107 - Odpady z lesnictví | 37 185 511 | 8 788 510 | 16 847 250 |
| 020203 - Surovina nevhodná ke spotřebě | 13 283 894 | 1 394 | 0 |
| 020204 - Kal z čištění odpadních vod | 10 551 864 | 106 735 | 0 |
| 020299 - Odpady jinak blíže neurčené | 6 847 803 | 14 000 | 1 200 |
| 020401 - Zemina z čištění řepy | 75 556 730 | 1 052 300 | 111 000 |
| 030101 - Kůra a/nebo korek | 57 394 057 | 19 402 060 | 1 371 500 |
| 030307 - Výmět z odpadního papíru | 17 341 768 | 0 | 5 902 824 |
| 030308 - Odpad ze třídění papíru | 44 414 306 | 2 385 | 0 |
| 030310 - Výmětová vlákna | 46 544 205 | 1 787 580 | 295 220 |
| 040221 - Odpad z nezprac. vláken | 168 378 100 | 4 200 | 3 000 |
| 040222 - Odpad ze zprac. vláken | 22 574 596 | 1 942 | 22 900 |

3.1.1 Zemědělské odpady

Zemědělské odpady zahrnují odpady rostlinného a živočišného původu. Odpady rostlinného původu tvoří kukuřičná a pšeničná sláma, bramborová nať, řepný chrást nebo znehodnocená krmiva (zelená píče, seno, siláže, senáže). Tyto odpady mohou být využity ke zkrmování hospodářskými zvířaty, silážování, k přímému hnojení zemědělských plodin (zaorání) nebo ke kompostování [13].

Mezi odpady živočišného původu patří chlévský hnůj, močůvka, kejda a hnojůvka. Jsou zdrojem látek pro tvorbu půdního humusu a zvyšování zásoby živin v půdě, čímž se významně podílí na úrodnosti půdy [13].

3.1.1.1 Pšeničná sláma

Pšeničná sláma vzniká jako odpad při sklizni pšenice. V ČR přichází na mlýnské zpracování přibližně 1/3 vyprodukované pšenice. Zbylá část se využívá pro krmné účely, jako osivo a pro průmyslové zpracování. Roční produkce slámy dosahuje 6,5 mil. tun. Sláma představuje jednu z nejdůležitějších surovin pro výrobu energie z obnovitelných zdrojů spalováním. Obilná sláma se používá také ve stavebnictví. Lisováním jejich vláken vzniká tzv. Ekopanel. Pšeničná sláma obsahuje v průměru 30 % celulosy, 50 % hemicelulosy a 15 % ligninu. Celulosa ze slámy může být použita při výrobě papíru (např. jemný tiskový a dopisní papír, vlnitý karton) jako náhrada celulosy z tvrdého dřeva [14, 15, 16].

3.1.2 Odpady z potravinářského průmyslu

Potravinářský průmysl produkuje převážně kapalné odpady obsahující organické látky, které jsou biologicky rozložitelné. Část odpadů tvoří potravinářské výrobky, které nesplňují normy na hygienické požadavky [13].

Další část tvoří odpady ze zpracování obilovin (otruby), ovoce, zeleniny a jedlých olejů, odpady z výroby alkoholických a nealkoholických nápojů, z cukrovarského průmyslu (vyslazené řízky, melasa), z mlékárenského průmyslu (syrovátka), z produkce a zpracování masa, ryb a z ostatních potravin živočišného původu (krev, kosti, rohovina). Odpady z potravinářského průmyslu se nejčastěji využívají ke krmení nebo hnojení [11].

3.1.2.1 Řepné řízky

Vyslazené řepné řízky představují důležitý odpad při zpracování cukrovky. Kořen cukrovky (bulva) má sušinu 23 – 25 %, z toho 5 % tvoří nerozpustný podíl nazývaný se dřeň. Dřeň je složena z celulosy, pentosanů, ligninu a pektinových látek. Zbytek sušiny tvoří rozpustné látky řepné šťávy, mezi nimiž převládá sacharosa (16 – 18 %). Zbývajících 2,5 % připadá na rozpustné „necukry“, mezi které se řadí monosacharidy – glukosa, fruktosa; oligosacharidy – rafinosa; organické kyseliny atd. Zpracováním cukrovky v cukrovaru se získá 5,5 % sušených

řízků, které průměrně obsahují 0,4 % sacharidů a další látky. Řízky lze lisovat na sušinu 14 – 18 %. Řepné řízky jsou důležitým sacharidovým krmivem, které je možno zkrmovat přímo nebo konzervované silážováním či sušením. Další využití řepných řízků je např. při produkci bioethanolu nebo bioplynu [11, 14, 16].

3.1.3 Papírové obaly a odpadní papír

Papírový odpad tvoří 22 % z celkového množství domovního odpadu. Podíl papíru na odpadech se neustále zvyšuje v důsledku rozvoje obalové techniky a obalů. Separovaný sběr od obyvatelstva zahrnuje sběr papíru a lepenky všeho druhu (např. časopisy, noviny, obaly a balící materiály, knihy, sešity atd.). Kromě papíru získaného sběrem od obyvatelstva vzniká papírový odpad také v rámci jednotlivých obchodních sítí prodejen a supermarketů, u drobných živnostníků a v průmyslových podnicích [17].

3.2 Struktura odpadů rostlinného původu

Významnou složkou odpadů rostlinného původu jsou polysacharidy. Většina rostlinných polysacharidů je ve formě lignocelulosity, kterou tvoří celulóza, hemicelulóza, pektin a lignin. Lignocelulóza se obecně nachází např. ve stoncích, listech, slupkách a luscích rostlin nebo v listech, větvích a dřevě stromů. Lignocelulosovými materiály mohou být zemědělské odpady, odpady z lesního hospodářství, komunální odpad nebo odpadní papír. Zastoupení strukturních polysacharidů v odpadech rostlinného původu je uvedeno v tabulce 2 [2, 18].

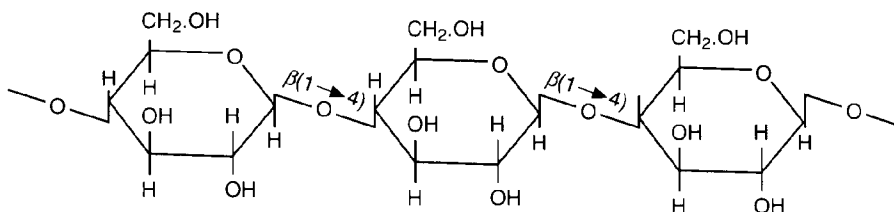
Tabulka 2 Zastoupení strukturních polysacharidů v odpadech na bázi lignocelulosity [19]

| Lignocelulosový materiál | Celulóza (%) | Hemicelulózy (%) | Lignin (%) |
|--------------------------|--------------|------------------|------------|
| štěpky z tvrdého dřeva | 40 - 55 | 24 - 40 | 18 - 25 |
| štěpky z měkkého dřeva | 45 - 50 | 25 - 35 | 25 - 35 |
| kukuřičný klas | 45 | 35 | 15 |
| tráva | 25 - 40 | 35 - 50 | 10 - 30 |
| papír | 85 - 99 | 0 | 0 - 15 |
| pšeničná sláma | 30 | 50 | 15 |
| listí | 15 - 20 | 80 - 85 | 0 |
| novinový papír | 40 - 55 | 25 - 40 | 24 - 29 |

3.2.1 Celulóza

Celulóza je nejrozšířenější organickou sloučeninou biosféry. Na molekulární úrovni je celulóza lineární polymer D-glukosových jednotek vázaných glykosidovými vazbami β -(1→4). Stupeň polymerace je 250 až 15000. V polymeru se nachází krystalické i amorfni oblasti. Celulóza tvoří 40 – 50 % dřevní hmoty, 80 % lněných a 90 % bavlněných vláken.

Celulosa je nerozpustná ve vodě, zředěných kyselinách, zásadách a ve většině rozpouštědel. Rozpouští se v koncentrovaných kyselinách, kdy dochází k hydrolyze na rozpustné fragmenty s kratším řetězcem, disacharid celobiosu, případně až na D-glukosu. Primární struktura celulosy je na obrázku 1 [1, 20].



Obrázek 1 Primární struktura celulosy [21]

V přírodě jsou celulosové materiály rozkládány mikrobiální činností. Bakterie, aktinomycety i plísňe využívají celulosu jako zdroj uhlíku a energie. Specifický typ vazby a biologické složení celulosových materiálů je důsledkem pevnosti a tvrdosti buněčných stěn rostlin. Díky těmto vlastnostem jsou rostliny odolnější vůči mikrobiálnímu ataku, a tím je rozklad celulosových materiálů v přírodě pomalejší. Rozklad celulosových materiálů se uskutečňuje prostřednictvím celulolytických enzymů, které jsou součástí enzymatického vybavení některých mikroorganismů. Celulosa může být degradována až na glukosu, která je mikroorganismy dále využívána. Produkty mikrobiálních fermentací jsou např. ethanol nebo jiné průmyslově významné chemické sloučeniny, jako je butanol, aceton, kyselina citronová, mléčná atd. Mezi aerobní bakterie rozkládající celulosu patří zejména *Cellulomonas*, *Nocardia*, *Polyangium*, *Streptomyces* nebo *Vibrio* a plísňe rodu *Aspergillus*, *Fusarium* a *Trichoderma* [2, 22, 23].

3.2.2 Hemicelulosy

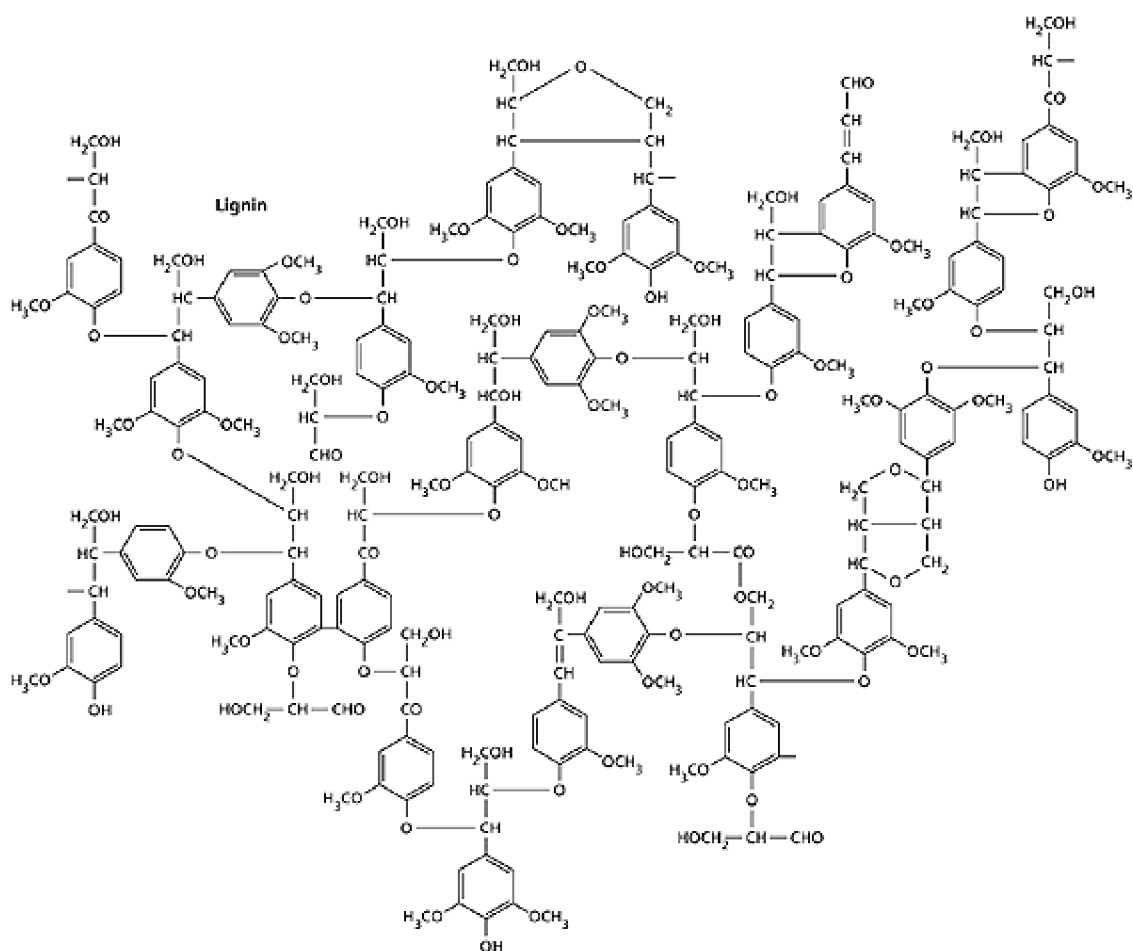
Hemicelulosy jsou strukturní necelulosové polysacharidy buněčných stěn rostlin, jež doprovází celulosu a pektin. Hemicelulosy jsou rozvětvené polysacharidy, které obsahují nejméně dva monosacharidy. Jejich hlavní řetězec tvoří často D-xyloza, D-mannosa a D-galaktosa. Postranní řetězce jsou obvykle tvořeny L-arabinosou a D-galaktosou nebo uronovými kyselinami. Bohatým zdrojem hemicelulos jsou vedlejší potravinářské produkty, jako jsou např. pšeničné otruby a řepné řízky [24].

Mezi hemicelulosy se řadí dvě hlavní skupiny polysacharidů – heteroglukany a heteroxylany. Mezi heteroglukany patří xyloglukany a β -glukany. Xyloglukany jsou dominantními hemicelulosami ovoce, zeleniny, okopanin a luštěnin. V menším množství se nachází také v obilovinách. β -glukany se nachází v buněčných stěnách vyšších rostlin a ve větším množství v semenech některých obilovin [1].

Heteroxylany jsou významnými polysacharidy primárních buněčných stěn jednoděložných rostlin. Jsou zastoupeny v lodyhách rostlin, v kukuřičných klasech (20 – 30 %) a dřevní hmotě (20 – 30 % sušiny) [1].

3.2.3 Lignin

Lignin je spolu s celulosou nejrozšířenějším polymerem v přírodě. Vyztučuje a zpevňuje buněčné stěny rostlin, zodpovídá za jejich nepropustnost, odolnost vůči mikrobiálnímu ataku a oxidačnímu stresu. Strukturálně je lignin amorfni heteropolymer nerozpustný ve vodě a je opticky inaktivní. Lignin je kopolymerem fenylypropanových jednotek odvozených od koniferylalkoholu, *p*-kumarylalkoholu a sinapylalkoholu. Tyto fenylypropanové jednotky jsou nepravidelně vázány do trojrozměrných struktur etherovými vazbami (C-O-C) nebo vazbami mezi dvěma atomy uhlíku (C-C). Základní struktura ligninu je na obrázku 2 [1, 25].



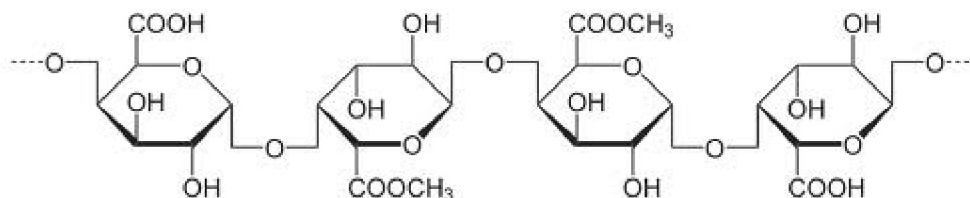
Obrázek 2 Základní struktura ligninu [26]

Lignin je jednou z hlavních komponent dřevní hmoty, kde tvoří asi 25 % biomasy. Základní jednotkou měkkého dřeva je koniferylalkohol. Tvrdé dřevo se skládá z koniferylalkoholu a sinapylalkoholu. Ligniny travin obsahují koniferyl-, sinapyl- i *p*-kumarylalkohol. Vysoký obsah je ve stěnách lignifikovaných sekundárních buněk, jako jsou aleuronové a subaleuronové buňky obilovin (otruby), které obsahují kolem 8 % ligninu. V menším množství je lignin součástí vlákniny ovoce, zelenin a obilovin [1, 27].

3.2.4 Pektiny

Pektiny jsou skupinou značně polydisperzních polysacharidů o proměnném složení. Pektiny jsou jedny z nejsložitějších biomakromolekul v přírodě. Mohou být složeny až ze 17 různých monosacharidů. Pektiny jsou obecně rozpustné ve vodě a nerozpustné ve většině organických rozpouštědel [4].

Základní struktura pektinů je tvořena lineárním řetězcem 25 – 100 jednotek D-galakturonové kyseliny spojených vazbami α -(1→4), která se nazývá polygalakturonová kyselina. Jednotky galakturonové kyseliny mohou být v poloze C-6 esterifikovány methanolem a některé z hydroxylových skupin v poloze C-2 nebo C-3 mohou být acetylovány. Lineární sekvence jednotek α -D-galakturonové kyseliny jsou ukončeny jednotkou α -L-rhamnopyranosy vázané glykosidovou vazbou α -(1 → 2). Primární struktura pektinů je na obrázku 3 [1].



Obrázek 3 Základní struktura pektinů [28]

Termínem pektinové látky se označují polygalakturonáty s větším počtem methylových skupin, tzv. pektinové kyseliny a jejich soli pektinany nebo neesterifikované polygalakturonáty, tzv. pektové kyseliny a jejich soli pektáty a také doprovodné neutrální polysacharidy (arabinany a arabinogalaktany). Protopektiny jsou nerozpustné nativní pektiny buněčných stěn asociované s celulosou [1].

Pektiny se nachází v pletivech vyšších rostlin jako součást stěn primárních buněk a mezibuněčných prostor. Podílí se na integritě a pevnosti rostlinných pletiv. Nachází se ve všech druzích ovoce a zeleniny. Vyšší obsah pektinu je např. v cukrové řepě. U řepného pektinu jsou na hlavní řetězec navázány postranní řetězce arabinosy, xylosy a galaktosy. V pravidelných úsecích se vyskytuje L-rhamnosa. Řepný pektin navíc obsahuje kyselinu ferulovou [24].

3.3 Enzymy degradující rostlinnou biomasu

Enzymy jsou bílkovinné makromolekuly, které se podílí na řízení souboru biologických reakcí a s ním spojených energetických změn. Jsou účinnými biokatalyzátory, které urychlují chemické přeměny. Enzymy jsou složeny z jednoho nebo několika peptidů prostorově uspořádaných do terciární struktury [5].

Enzymy vykazují vysokou substrátovou specifitu a účinnost. Účinnost enzymatické aktivity je měřena rychlostí přeměny substrátu. Enzymatické reakce probíhají v úzkém teplotním rozmezí a při optimální hodnotě pH. Jakákoliv změna teploty nebo pH může vést k narušení strukturní integrity, což může být příčinou snížení nebo ztráty enzymatické aktivity [5].

Enzymy se dělí do šesti hlavních tříd podle typu katalyzované reakce:

- **Oxidoreduktasy**, které katalyzují intermolekulové oxidačně-redukční přeměny. Oxidoredukční děje realizují buď přenosem atomů vodíku nebo elektronů, případně vestavěním atomu kyslíku do substrátu.
- **Transferasy**, které realizují přenos skupin ($-\text{CH}_3$, $-\text{NH}_2$, zbytek glukosy apod.).
- **Hydrolasy**, které štěpí hydrolyticky vazby, které vznikly kondenzací, např. peptidové (a jiné amidové), glykosidové, esterové.
- **Lyasy**, které katalyzují nehydrolytické štěpení a vznik, pokud není energeticky náročný, vazeb C-C, C-O, C-N.
- **Isomerasy**, které realizují vnitromolekulové přesuny atomů a jejich skupin, tedy vzájemné přeměny isomerů.
- **Ligasy**, které katalyzují vznik energeticky náročných vazeb za současného rozkladu látky uvolňující energii, např. ATP.

Enzymy, které degradují rostlinnou biomasu se řadí do třídy hydrolas a lyas. Hydrolasy štěpící glykosidovou vazbu se nazývají glykosidasy. Glykosidasy reprezentují širokou skupinu enzymů podílejících se na odbourávání homo- i heteroglykosidů. Katalyzují hydrolysu glykosidových vazeb mezi cukernými jednotkami i mezi sacharidy a aglykony. Mezi glykosidasy se řadí amylasy, invertasa, β -galaktosidasa, celulasy, endo- a exopolygalakturonasy. Hydrolasy katalyzující hydrolysu esterových vazeb se nazývají esterasy. Esterasy katalyzují hydrolysu esterů na kyselinu a alkohol. Mezi esterasy se řadí např. pektinesterasy [7, 20].

Lyasy katalyzují nehydrolytické štěpení a vznik vazeb C-C, C-O, C-N. Odštěpují ze substrátu nebo do něj vnáší malé molekuly (např. H_2O , CO_2 , NH_3) bez pomoci dalšího reaktantu. Na podtřídy se rozdělují podle typu štěpených nebo syntetizovaných vazeb. Mezi lyasy se řadí např. pektátlyasy a pektinlyasy [7].

3.3.1 Celulolytické enzymy

Celulolytické enzymy se řadí mezi glykosidasy. Katalyzují hydrolysu nativní celulosy. Celulolytické enzymy tvoří komplex čtyř enzymů složený z endo-1,4- β -D-glukanasy, exo-1,4- β -D-glukanas a β -glukosidasy, které působí synergicky. Celulasa neboli endo-1,4- β -D-glukanasa je endoenzym náhodně štěpící β -(1 \rightarrow 4)-D-glykosidové vazby uvnitř molekuly celulosy za vzniku glukooligosacharidů a celobiosy. Celobiohydrolasa neboli exo-1,4- β -D-glukanasa je exogenní enzym, který odštěpuje celobiosu z redukujícího nebo neredukujícího konce řetězce. Exoglukanasa neboli exo-1,4- β -D-glukanasa odštěpuje glukosu z neredukujícího konce řetězce. Posledním enzymem celulolytického komplexu je celobiasa neboli β -glukosidasa, štěpící celobiosu a glukooligosacharidy na β -D-glukosu [1].

3.3.1.1 Mikrobiální zdroje

Intenzivní výzkum v oblasti mikrobiální produkce enzymů vedl k identifikaci a izolaci různých mikroorganismů schopných produkce celulólytických enzymů zahrnující aktinomyceety, eubakterie a plísňe. Mikrobiálně produkované celulólytické enzymy tvoří směs různých enzymů se specifickou funkcí. Většina bakterií není schopná degradace krystalické celulósy, protože jejich celulasový systém není kompletní. Celulasový systém produkovaný plísněmi zahrnuje všechny 4 typy enzymů a je velmi užitečný v procesu sacharifikace celulosových materiálů [2].

Nejvíce studií bylo provedeno na celulasových systémech pocházejících z aerobních plísní jako *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium solani*, *Penicillium pinophilum* a *Aspergillus niger*. Z termofilních aerobních plísní produkujících celulasu lze zmínit např. *Sporotrichum thermophile*, *Chaetomium thermophile*, *Humicola insolens* nebo *Talaromyces emersonii* [5].

Mezi mezofilní a termofilní aerobní bakterie produkující celulasu patří např. rod *Bacillus sp.*, *Cellulomonas fimi*, *Cellvibrio sp.* a *Pseudomonas fluorescens*. Z mezofilních a termofilních anaerobních bakterií produkuje celulasu např. *Bacteroides cellulosolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Clostridium thermocellum* nebo *Rumminococcus albus* [29].

Vysoce aktivní celulasový a hemicelulasový systém produkují aktinomyceety jako např. *Microbispora bispora*, *Streptomyces flavogriseus*, *Thermomonospora fusca* a hypertermofilní mikroorganismy jako *Thermotoga maritima*, *T. neapolitana*, *Pyrococcus furiosus* a *Anaerocellum thermophilum*, které rostou při teplotách od 85 °C do 110 °C [5].

3.3.1.2 Substráty

Pro produkci celulólytických enzymů se obecně používá agro-industriální odpad, mezi který se řadí sláma, rýžové a pšeničné otruby, rýžová a pšeničná sláma nebo vylisovaná cukrová třtina. Dále je možné využít průmyslové zbytky sojových bobů, zbytky kukuřičných klasů, odpad papírenského průmyslu atd. [30].

3.3.1.3 Biotechnologické aplikace

Celulasu jsou průmyslově významné enzymy, které se používají např. při izolaci škrobu z kukuřice a sladkých brambor, při produkci krmiv, alkoholové fermentaci obilí, ve sladovníctví a pivovarství. Dále se aplikují při extrakci ovocných a zeleninových šťáv, v papírenském a textilním průmyslu, v odpadovém hospodářství nebo farmaceutickém průmyslu. Jejich činnost spočívá ve zvýšení extrahovatelnosti a rozpustnosti materiálu a modifikaci konzistence [7].

V potravinářském průmyslu se celulasy používají při extrakci ovocných šťáv a oleje ze semen olejnatých rostlin, pro odstranění vnější slupky sojového bobu při produkci sojové omáčky a fermentované sojové pasty *miso*, při izolaci proteinů ze sojového bobu, kokosového ořechu nebo při extrakci agaru z mořských řas. Celulasy mohou být také použity pro zlepšení nutriční hodnoty fermentovaných potravin či zlepšení rehydratace sušených zeleninových a polévkových směsí a pro produkci oligosacharidů a glukosy z celulosového odpadu [29, 31].

V pivovarství se používají během sladování ječmene, fermentace a filtrace piva. Ve vinařství zlepšují maceraci hroznů, filtraci, extrakci barviv a aroma vína. Celkově přispívají k vyšší kvalitě a stabilitě těchto nápojů. V textilním průmyslu mají uplatnění při modifikaci celulosových vláken a při odstranění nadbytečného indigo barviva během výroby džín [29, 32].

3.3.2 Pektolytické enzymy

Na degradaci pektinových látek se podílí tři skupiny enzymů – protopektinasy, esterasy a depolymerasy. Protopektinasy degradují nerozpustný protopektin, čímž vzniká vysoce polymerovaný rozpustný pektin. Další skupinu tvoří esterasy, které katalyzují deesterifikaci pektinu odstraněním methylesterů a poslední skupinu představují depolymerasy, které katalyzují hydrolytické štěpení α -(1→4)-glykosidových vazeb D-galakturonové kyseliny [4].

Protopektinasy jsou na základě jejich reakčního mechanismu klasifikovány do dvou typů: A-typ protopektinasy reaguje endo-mechanismem, tj. v místě polygalakturonové kyseliny protopektinu. B-typ reaguje exo-mechanismem, tj. v místě rhamnogalakturonanu a na neutrálních sacharidových řetězcích. B-typ protopektinasy je považován za glykandepolymerasu [4].

Pektinesterasy neboli pektinmethylesterasy katalyzují hydrolýzu methylesterů na nízkoesterifikované pektiny (pektové kyseliny). Působení pektinesteras se liší podle jejich původu. Pektinesterasy plísní působí multiřetězcovým mechanismem odstraňujícím methylové skupiny namátkově, na rozdíl od rostlinných pektinesteras, které působí buď na neredukující konec nebo v blízkosti volné karboxylové skupiny a postupují podél molekuly jednořetězcovým mechanismem [1, 33].

Mezi pektindepolymerasy patří glykosidasy a lyasy. Glykosidasy neboli polygalakturonasy hydrolyzují α -(1→4) glykosidovou vazbu. Rozlišují se podle místa, kde atakují molekulu pektinu. Exopolygalakturonasa odštěpuje monomery od konce řetězce a exopolygalakturonan-digalakturonohydrolasa odštěpuje dimery. Endopolygalakturonasa působí uvnitř řetězce a produktem jsou oligomery s různě dlouhým řetězcem. Polymethylgalakturonasy štěpí vysokoesterifikované pektiny. Polygalakturonasy štěpí pektiny úplně nebo téměř úplně deesterifikované [1, 4].

Pektátlyasy a pektinlyasy štěpí glykosidové vazby pektátu nebo pektinu přenosem vodíku (β -eliminací) z polohy C-4 do polohy C-5 aglykonové části substrátu. Pektátlyasy degradují esterifikované nebo neesterifikované pektiny β -eliminací. Pektinlyasy štěpí β -eliminací glykosidové vazby mezi esterifikovanými galakturonovými kyselinami. Pektátlyasy jsou typické bakteriální enzymy. Pektinlyasy jsou produkovány pouze plísněmi [1, 7].

3.3.2.1 Mikrobiální zdroje

Většina komerčně dostupných pektolytických preparátů je produkována pomocí plísní. Běžně používanými kmeny pro průmyslovou produkci pektolytických enzymů jsou *Aspergillus niger*, *A. carbonarius*, *A. sojae* a druhy *Rhizopus sp.* [7].

A-typ protopektinasy je produkován kvasinkami a kvasinkovitými mikroorganismy. Byl izolován z *Kluyveromyces fragilis*, *Galactomyces reesei* a *Trichosporon penicillatum*. B-typ produkuje *Bacillus subtilis* a *Trametes sp.* [4].

Pektinesterasy se nachází v rostlinách, rostlinných patogenních bakteriích a plísních. Jsou produkovány zejména druhy *Rhodotorula sp.* a kmeny *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Phytophthora infestans*, *Pseudomonas solanacearum* atd. [34].

Endopolygalakturonasy se nachází u plísní, bakterií, kvasinek a u vyšších rostlin. Produkují je *Aureobasidium pullulans*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus sp.*, *Thermomyces lanuginosus* atd. Exopolygalakturonasy se vyskytují méně často. Byly detekovány u *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacteroides thetaiotamicron*, *Alternaria mali*, *Fusarium oxysporum* a *Bacillus sp.* [4, 35].

Pektátlyasy jsou produkovány mnoha bakteriemi a některými patogenními plísněmi. Byly izolovány z kmene *Erwinia carotovora*, *Amucala sp.*, *Colletotrichum magna*, *Bacillus sp.* atd. Pektinlyasy byly zaznamenány u *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Pichia pinus*, *Thermoascus auratniacus*, *Pythium splendens* aj. [4].

3.3.2.2 Substráty

Pro produkci mikrobiálních pektolytických enzymů se využívá agro-industriální odpad, který je široce dostupný a z ekonomického hlediska považovaný za levnou surovinu. Mezi nejčastěji používané odpadní materiály patří řízky cukrové řepy, vylisované citrusové plody (pomerančové výlisky), jablečné a hroznové výlisky, pšeničné otruby, kávové slupky a dužina atd. [30].

3.3.2.3 Biotechnologické aplikace

Pektolytické enzymy mají široké průmyslové uplatnění. Významnou roli hrají při zpracování ovoce a zeleniny. Používají se při číření ovocných šťáv a při produkci ovocných a zeleninových protlaků. Další použití je při úpravě odpadních vod, v textilním průmyslu, při extrakci oleje, fermentaci čaje a kávy atd. [8].

Největší průmyslová aplikace pektinasy je při extrakci a číření ovocných šťáv. Ve směsi s amylasami snižují dobu filtrace až o 50 %. V kombinaci s celulasami, arabinasami a xylanasami zvyšují účinnost lisování ovoce při extrakci šťáv. Další použití je při výrobě krmiv, kde snižují viskozitu krmiva a umožňují tak vyšší vstřebávání živin [4, 36].

Pektinasy se uplatňují také při fermentaci čaje a kávy. Urychlují fermentaci a odstraňují pěnotvorné látky granulovaného instantního čaje degradací pektinů. V procesu fermentace kávy odstraňují slizovitý obal kávového zrna. Další uplatnění pektinas je při vylepšení barvy a stability červeného vína. Pektolytické enzymy přidané k macerovanému ovoci, před přidávkem vinných kvasinek, při výrobě červeného vína zlepšují jeho vzhled (barvu, zákal) [4].

3.4 Produkční mikroorganismy

Mnoho mikroorganismů jako bakterie, kvasinky a plísně, produkuje různé enzymy. Počet a diverzita enzymů je úměrná počtu a diverzitě mikroorganismů. Obecně jsou hydrolytické enzymy tj. celulasý, xylanasy, pektinasy atd., produkovány především plísněmi [37].

Nejvíce prozkoumané a v praxi používané mikroorganismy pro produkci enzymů na degradaci rostlinné biomasy jsou vláknité houby rodu *Trichoderma* a *Aspergillus*. Celulasový komplex produkovaný *T. reesei* má ale nedostatečnou aktivitu β -glukosidasy, což vede k neúplné hydrolyse celobiosy. Účinnost enzymatické hydrolýzy ovlivňuje několik faktorů jako volba vhodného substrátu, optimální hodnota pH, teplota nebo volba produkčního mikroorganismu. Cílem je najít takové produkční mikroorganismy, které nemají příliš náročné podmínky na kultivaci, disponují účinným enzymatickým systémem a jsou vysoce produktivní. Mezi nově izolované kmeny s účinnou celulasovou aktivitou patří např. plíseň *Agaricus arvensis* nebo bakterie *Acinetobacter junii* F6-02. V oblasti zvýšení účinnosti enzymatické hydrolýsy se uplatňují také techniky rekombinantní DNA, které umožňují modifikaci enzymů známých mikrobiálních kmenů [38, 39, 40, 41].

3.4.1 *Aspergillus niger*

Aspergillus niger se řadí mezi vláknité houby třídy *Ascomycetes*. Pro optimální růst vyžaduje aerobní podmínky a organický materiál jako substrát. V přírodě se nachází v půdě, humusu, kompostu a na odumřelém rostlinném materiálu. Svůj název dostal podle tmavě až černě zbarvených kolonií. Je schopen růst v širokém teplotním rozmezí 6 - 47 °C, přičemž jeho teplotní optimum se pohybuje okolo 35 – 37 °C. Hodnota vodní aktivity limitující růst je 0,88; což je ve srovnání s ostatními druhy rodu *Aspergillus* poměrně vysoká hodnota. Zároveň je schopen růst v širokém rozmezí pH 1,9 – 9,8 [42].

A. niger má značný biotechnologický význam. Používá se při výrobě kyseliny citronové, gallové, glukonové, fumarové a šťavelové. Produkuje také extracelulární enzymy – amylolytické, proteolytické, lipolytické, pektolytické a celulytické [22].

A. niger se stal průmyslově využívaným organismem již v roce 1919, kdy byla poprvé pomocí fermentace vyprodukována kyselina citronová. Kyselina citronová má široké uplatnění v potravinářském průmyslu jako látka upravující kyselost. Přidává se do ovocných džusů, dezertů, džemů, želé, cukrovinek a vína [42].

Pektolytické enzymy produkované pomocí *A. niger* se využívají při výrobě vína a ovocných džusů ke snížení jejich viskozity a pro zlepšení čiření. Hemicelulasy získané z *A. niger* zlepšují reologické vlastnosti těsta, zvětšují objem bochníku a vylepšují strukturu střídky chleba. Glukosaoxidasa a katalasa z *A. niger* slouží ke stanovení glukosy hlavně v diagnostických enzymových kitech. Používají se pro odstranění glukosy nebo kyslíku z potravin a nápojů a pro produkci kyseliny glukonové z glukosy [42].

3.4.2 *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans je taxonomicky zařazen do třídy *Basidiomycetes*. Jedná se o tzv. černý kvasinkový mikroorganismus. V roce 1866 byl tento rod popsán H. D. Barym jako *Dematium pullulans* saprofytující na povrchu vyšších rostlin. *A. pullulans* bylo známé i pod dalšími jmény jako *Pullularia pullulans*, *Aureobasidium vitis*, *Torula schoenii*, *Pullularia fermentans*, *Dematoideum nigrescens*, *Candida malicola*, *Hormonema pullulans*, *Hormonema oleae* nebo *Podium pullulans*. *A. pullulans* roste při teplotách mezi 2 – 35 °C a jeho teplotní optimum je 25 °C. Některé druhy snáší teplotu kolem -5 °C. Optimální hodnota pH pro jeho růst je 5,5 [22, 43, 44].

A. pullulans produkuje polysacharid pullulan, který je polymerem α -D-glukanu. Pullulan se komerčně využívá v potravinářském průmyslu a medicíně. Vytváří tenký film, který je transparentní a nepropustný pro kyslík. Proto se používá jako obalový materiál nebo k potahování tablet doplňků stravy [45].

A. pullulans produkuje také extracelulární enzymy. Mezi nejvíce prostudované enzymy patří fruktofuranosidasa neboli invertasa, xylanasa a glukoamylasa. Invertasa se používá při výrobě invertního cukru pro konzervářské a cukrovinkářské účely. Glukoamylasa se využívá při zpracování škrobu na škrobové sirupy. Dále produkuje pektolytické enzymy, celulasy a lakasu. Celulasy se používají v konzervářství při zpracování ovoce a zeleniny, jsou součástí pracích prostředků a přidávají se do krmných směsí. Lakasa slouží k biodegradaci ligninu a využívá se v papírenském a textilním průmyslu [7, 45, 46].

A. pullulans slouží jako modelový mikroorganismus pro testování toxických účinků různých kovů. Jeho odolnost vůči daným toxickým látkám se vysvětluje detoxikací. Rozkládá barvy a rozrušuje elektrické kabely. Při získávání biomasy často překáží černé barvivo melanin nebo je nežádoucí nadprodukce pullulanového slizu [44].

3.5 Způsoby produkce mikrobiálních enzymů

Produkce mikrobiálních enzymů se provádí pomocí procesu submerzní fermentace (SmF) nebo procesu „solid-state fermentation“ (SSF). Přibližně 90 % všech industriálních enzymů je produkováno pomocí SmF, často používající speciálně optimalizované, geneticky modifikované mikroorganismy. Z tohoto hlediska nabízí SmF velké výhody oproti SSF [47].

Většina enzymů produkovaných submerzní fermentací může být produkována i za podmínek procesu SSF, který využívá divoké kmeny mikroorganismů. Srovnávací studie SSF a SmF prokázaly, že vyšších enzymových výtěžků lze dosáhnout pomocí SSF. Takto vyprodukované enzymy jsou stabilní v širokém rozmezí teplot i pH. Naopak při submerzní fermentaci se dosahuje vyššího konečného nárůstu buněčné biomasy. Přítomné mikroorganismy efektivněji využívají dostupné živiny a mohou se intenzivněji množit. Proto se SmF průmyslově využívá k získávání většího množství biomasy při výrobě krmného droždí nebo k produkci užitečných metabolitů, např. antibiotik [21, 48].

3.5.1 Solid-state fermentation

Historie procesu SSF sahá až do starověku. Poprvé byl použit v Asii při výrobě sýra pomocí plísně *Penicillium roqueforti*. Pomocí plísně rodu *Rhizopus* byl SSF proces aplikován při výrobě fermentovaných potravin jako např. sojové omáčky, sojového sýra *tempeh* nebo pasty *miso*. V 19. století se začal SSF proces využívat při nakládání s odpady a počátkem 20. století byl poprvé použit pro produkci enzymů a organických kyselin. Další uplatnění tohoto procesu se objevilo s rozvojem bioproců bioremediace a biodegradace rizikových sloučenin, při biologické detoxikaci agro-industriálních zbytků, biotransformaci plodin a zbytků plodin pro obohacení výživy, biopasírování a při produkci biologicky aktivních sekundárních metabolitů např. antibiotik, alkaloidů, rostlinných růstových faktorů, biopesticidů, biopaliv, aromatických sloučenin atd. [49, 50].

Proces „solid-state fermentation“ je definován jako růst mikroorganismů na zvlhčeném pevném materiálu za nepřítomnosti volné vody. U fermentačních procesů tohoto typu množství vody nepřevyšuje saturační kapacitu pevného substrátu, na kterém mikroorganismy rostou. Voda je pro mikrobiální růst nezbytná a v procesu SSF je přítomna pouze uvnitř substrátu [51].

Hlavní faktory, které ovlivňují mikrobiální růst a aktivitu v procesu SSF, zahrnují výběr vhodného mikroorganismu a substrátu, jeho předúpravu, velikost částic substrátu, vodní aktivitu, relativní vlhkost a množství inokula. Dalšími faktory jsou teplota fermentačního procesu, potřeba odstranění metabolického tepla generovaného během respirace, doba kultivace nebo rychlost spotřeby kyslíku a produkce oxidu uhličitého [50].

3.5.1.1 Mikrobiální kultury

Veškeré faktory v procesu SSF závisí na množství vody přítomné v substrátu. Z důvodu nedostatku volné vody jsou ve většině SSF procesů upřednostňovány plísně. Bakterie se účastní procesů, jako je kompostování nebo silážování, kvasinky se používají pro produkci ethanolu a krmiv nebo pro potravinářské využití. Kvasinky rostou na pevných substrátech jen zřídka. Např. *Saccharomyces cerevisiae* byla použita při kultivaci na cukrové řepě nebo na hroznových výliscích. Z bakteriálních rodů lze zmínit *Lactobacillus sp.*, který se používají pro silážování, při kompostování převládají termofilní bakterie. *Bacillus subtilis* se uplatňuje při produkci japonské fermentované sóji *Natto* [47].

Dominantní skupinou mikroorganismů, která je obecně využívána v procesu SSF jsou vláknité houby. Mezi nejvíce používané plísně patří rod *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Monilia*, *Mucor*, *Trichoderma* a některé druhy *Penicillium*. Vláknité houby jsou schopné účelně pokrýt celý povrch substrátu a proniknout dovnitř. Výhodou jejich použití je syntéza mycelia a produkce velkého množství extracelulárních hydrolytických enzymů. Mezi významné producenty mikrobiálních enzymů patří rod *Aspergillus*, který produkuje až 21 různých enzymů (viz tabulka 3) [47].

Tabulka 3 Enzymy získané z kmene *Aspergillus niger* [50]

| Název enzymu | |
|-------------------|----------------------|
| α -Amylasa | Xylanasa |
| β -Amylasa | Polygalakturonasa |
| Glukoamylasa | Pektinesterasa |
| Lakasa | Celulasa |
| Katalasa | Glukosaoxidasa |
| Proteasa | Glukosadehydrogenasa |
| Trehalasa | Ureasa |
| Tannasa | Inulinasa |
| Melibasa | Amidasa |
| Lipasa | Zymasa |
| Fosfolipasa | |

3.5.1.2 Substrát

Substráty používané v procesu SSF jsou nerozpustné ve vodě. Ve skutečnosti je voda absorbována na částicích substrátu a tak může být mikroorganismy využita pro růst a činnost metabolismu. Substráty lze rozdělit na škrobnaté, celulosové nebo lignocelulosové a substráty s jednoduchými cukry. Mezi škrobnaté substráty se řadí rýže, kasava, pšeničné otruby, rýžové otruby, semena pohanky, kukuřičná mouka, odpad ze sladkých brambor a banánová mouka. Lignocelulosové substráty zahrnují pšeničnou slámu, kukuřici, pšeničné otruby, vylisovanou cukrovou řepu, odpad z ananasu a odpad z výroby kávy. Substráty obsahující jednoduché cukry jsou např. hroznové výlisky, odpad z ananasu, cukrová řepa nebo odpad z výroby kávy. Mikroorganismy a přírodní substráty používané k produkci enzymů jsou uvedeny v tabulce 4 [47, 49, 52].

Přírodní substráty jsou snadno dostupné a levnější než syntetické. Pro lepší dostupnost živin a penetraci mycelia je nutná jejich předúprava. Na stimulaci růstu, indukci syntézy enzymů nebo prodloužení produkce sekundárních metabolitů se aplikuje přídavek 0,5 % glukosy nebo celobiosy; 0,5 % peptonu, asparaginu nebo kvasničného extraktu [47].

Tabulka 4 Mikroorganismy a substráty používané k produkci enzymů v SSF [52]

| Substrát | Mikroorganismus | Enzym |
|-------------------------------|--|--------------------------------|
| pšeničné otruby | <i>A. niger</i> | celulasa, polygalakturonasa, |
| celulosa, škrob | <i>T. viride</i> , <i>A. niger</i> | celulasa, amylasa |
| celulosa | <i>T. reesei</i> | celulasa |
| agro-odpady | <i>A. niger</i> | celulasa, β -glukosidasa |
| agro-odpady | <i>T. reesei</i> | celulasa |
| vylisovaná cukrová třtina | <i>Polyporus sp.</i> | celulasa, ligninasa |
| pšeničná sláma | <i>Neurospora crassa</i> | CMCasa, β -glukosidasa |
| pšeničné a rýžové otruby | <i>Aspergillus sp.</i> | celulasa, β -glukosidasa |
| lignino-celulosoové substráty | <i>Streptomyces sp.</i> | celulasa |
| hroznové výlisky | <i>C. unicolor</i> | celulasy, xylanasa, lakasa |
| čirok | <i>Gliocladium sp.</i> | celulasy, xylanasa |
| pšeničná sláma | <i>T. reesei</i> | celulasy |
| vylisovaná cukrová třtina | <i>A. fumigatus</i> | celulasa, β -glukosidasa |
| pšeničné otruby | <i>Bacillus licheniformis</i> | xylanasa |
| pšeničné otruby | <i>P. chrysosporium</i> | xylanasa, β -glukosidasa |
| odpad z výroby kávy | <i>A. niger</i> | polygalakturonasa |
| citrusový odpad | <i>A. foetidus</i> | polygalakturonasa |
| jablečné výlisky | <i>A. foetidus</i> | polygalakturonasa |
| pšeničné otruby | <i>A. niger</i> | polygalakturonasa |
| pšeničné otruby | <i>Humicola sp.</i> | xylanasa |
| vylisovaná cukrová třtina | <i>T. reesei</i> , <i>A. niger</i> | xylanasa |
| dřevěné piliny | <i>P. chrysosporium</i> | lakasa |
| rýžová sláma | <i>T. reesei</i> | celulasy |
| čirok | <i>T. reesei</i> , <i>A. niger</i> | celulasy, xylanasa |
| rýžová sláma | <i>Botritis sp.</i> | β -glukosidasa, xylanasa |
| celulosoové odpady | <i>A. oryzae</i> | celulasa, β -glukosidasa |
| agro-odpady | <i>Pestalotiopsis versicolor</i> | celulasa |
| pšeničná sláma | <i>Lentinus edodis</i> | celulasy |
| předupravená vrba | <i>T. reesei</i> | celulasy |
| odpad z kasavy | <i>T. harzianum</i> | celulasy, xylanasa |
| agro-odpady | <i>Spiecellum roseum</i> | CMCasa |
| pšeničná sláma | <i>Phlebia radiata</i> , <i>P. eryngii</i> | xylanasa, lakasa |

Na využití substrátu mikroorganismy má vliv velikost jeho částic. Malé částice substrátu poskytují větší povrchovou plochu pro mikrobiální atak, což je žádoucím faktorem. Naopak příliš malé částice mají za následek shlukování substrátu, které ovlivňuje mikrobiální respiraci resp. aeraci a vede ke špatnému růstu buněk. Velké částice umožňují efektivní respiraci resp. aeraci, ale poskytují menší povrch pro mikrobiální atak. Běžně se používají částice o velikosti 1 mm až 1 cm. Nejvyšší produktivity se dosahuje s částicemi o velikosti od 180 μ m do 1,4 mm [50, 53].

3.5.1.3 Vodní aktivita

Vlhkost substrátu a vodní aktivita (a_w) jsou významnými faktory v procesu SSF. Mikroorganismy jsou voleny podle hodnot vodní aktivity, optimálních pro jejich růst. Bakterie rostou při vyšších hodnotách vodní aktivity, zatímco vláknité houby a některé druhy kvasinek mohou růst již při relativně nízkých hodnotách a_w (0,6 – 0,7). Vlivem nízkého obsahu vody v substrátu jsou jako producenti mikrobiálních enzymů upřednostňovány vláknité houby. Vysoká vodní aktivita vede u plísní ke sporulaci, naopak nízká vodní aktivita má za následek klíčení spor a nárůst mycelia. Vodní aktivita má vliv na samotné utváření produktu i na spektrum konečných produktů [53, 54].

3.5.1.4 Teplota

Mikrobiální růst a produkce žádoucích metabolitů probíhá v úzkém teplotním rozmezí. Teplota limitující průběh biologických procesů se pohybuje v rozmezí 60 – 80 °C, u některých kmenů až 120 °C. Vyšší teploty mají vliv na denaturaci proteinů, inhibici enzymů, stimulaci nebo inhibici tvorby specifického produktu a mohou mít i letální účinky na mikroorganismus. Podle vztahu k teplotě rozdělujeme mikroorganismy na psychrofilní, jejichž optimální teplota je nižší než 20 °C a poměrně intenzivně rostou při teplotě 0 °C až 5 °C. Další skupinu tvoří mezofilní mikroorganismy, které mají optimální teplotu pro růst nižší než 45 °C a minimální teplotu vyšší než 5 °C. U bakterií se optimální teplota pohybuje kolem 37 °C, u kvasinek a plísní kolem 30 °C. Poslední skupinu tvoří termofilní mikroorganismy, rostoucí při teplotě 45 °C a vyšší. Pro většinu z nich se optimální teplota pohybuje v rozmezí od 50 do 60 °C. Některé druhy mohou růst při teplotě 80 °C. Extrémní termofily z archaeobakterií rostou i při teplotách nad 100 °C. V procesech SSF se ve většině případů využívají mezofilní mikroorganismy [50, 55].

3.5.1.5 Hodnota pH

Na růst mikroorganismů má vliv pH prostředí, ve kterém se nachází. Během SSF procesu se hodnota pH substrátu mění. Vlivem produkce kyselin při neúplné oxidaci substrátu nebo zvýšením obsahu amonných iontů se pH snižuje, zatímco amoniak uvolněný při deaminaci močoviny nebo jiné aminy hodnotu pH zvyšují. Vzhledem k tomu, že nelze v procesu SSF monitorovat pH, je samotná kontrola optimální hodnoty pH obtížná. Proto je vhodné používat mikroorganismy, které jsou schopny růst v širokém rozmezí pH. Vláknité houby jsou schopné růst při hodnotách pH mezi 2 – 9, kvasinky v rozmezí 2,5 – 8,5. Zároveň nižší hodnota pH má příznivý vliv na minimalizaci bakteriální kontaminace [53, 54].

3.5.2 Srovnání procesu „solid-state fermentation“ se submerzní fermentací

Submerzní fermentace je proces, který se v průmyslovém měřítku využívá k produkci různých mikrobiálních metabolitů, včetně enzymů. Z technického hlediska je SmF snazší proces než SSF a její rozvoj nastal v důsledku potřeby průmyslové produkce antibiotik již v roce 1940.

Přestože je submerzní fermentace průmyslově využívána k produkci enzymů, nedosahuje takových enzymových výtěžků jako „solid-state fermentation“. SSF je rovněž výhodnější z ekonomického hlediska [6].

Hlavní rozdíl mezi SSF a SmF je v nárocích na vodu a živiny, v zajištění teplotního gradientu, ve sporulačních mechanismech a v produkci sekundárních metabolitů. SSF proces je méně finančně náročný ve srovnání se SmF, vzhledem k možnosti využití odpadních materiálů ze zemědělství jako substrátů pro mikrobiální produkci požadovaných metabolitů. Napodobuje životní podmínky vláknitých hub a využívá jednoduchá kultivační média, kdy jsou substráty použity přímo nebo jsou obohaceny o určité nutrienty. Výsledný produkt, který je předmětem kultivace, je koncentrovaný, což usnadňuje jeho purifikaci. V procesu SSF se aplikuje přirozená mikroflóra substrátů - využívají se jejich spory nebo buňky. Nižší obsah vlhkosti a použitá mikroflóra snižuje možnost mikrobiální kontaminace [6, 48].

Další pozitiva SSF jsou nižší nároky na sterilitu, energii a nižší množství vyprodukovaného odpadu. Submerzní fermentace vyžaduje objemné fermentační tanky, systémy zajišťující míchání a aeraci a chladicí systémy pro odstranění reakčního tepla. V procesu „solid-state fermentation“ se neaplikují chemické látky proti pění tak jako u submerzní fermentace a enzymy vyprodukované pomocí SSF jsou méně citlivé ke katabolické represi [51, 56].

Nevýhodou procesu „solid-state fermentation“ je užší výběr produkčního kmene, který je limitován schopností mikroorganismu růst při nízkém stupni vlhkosti. Sledování parametrů jako vlhkost, pH, volný kyslík a oxid uhličitý je v procesu SSF obtížné. Velkotonážní produkce enzymů pomocí SSF zatím není dostatečně prostudována a představuje určitá omezení [51].

3.5.2.1 *Produkce celulolytických enzymů*

Celulasy jsou komerčně produkovány pomocí submerzní fermentace. Technologie produkce závisí na účelu použití celulolytických preparátů. Pro textilní a papírenský průmysl a pro některé aplikace v potravinářském průmyslu jsou vyžadovány částečně nebo vysoce purifikované celulasy nebo specifické komponenty celulolytických enzymových komplexů. Pro agro-biotechnologické aplikace jsou vhodné surové enzymové komplexy obsahující celulasy, hemicelulasy, ligninasy a pektinasy [5].

Produkce celulas submerzní fermentací je výrazně ovlivněna několika parametry zahrnující druh celulosového substrátu, hodnotu pH média, dostupnost živin, obohacení o induktor, teplotní režim fermentace atd. Složení fermentačního média má vliv na optimální růst mikroorganismů a produkci enzymů. Používaná média jsou složitá a většinou specifická pro daný produkční mikroorganismus. Mikrobiální celulasy podléhají mechanismu indukce a represe a za jediný ekonomicky přijatelný induktor v průmyslové fermentaci je většinou považována laktosa. Nejčastějším režimem SmF je vsádková (batch) fermentace, která je vhodná pro vysoce viskózní lignocelulosové materiály, dále se využívá přítoková (fed-batch) fermentace, která zvyšuje výtěžek a produktivitu oproti vsádkové fermentaci anebo kontinuální způsob

fermentace, který pravděpodobně potlačuje katabolickou represi způsobenou hromaděním redukujících cukrů. Celulasy jsou nejčastěji reprimovány glukosou nebo celobiosou [5, 57].

Výhodou procesu SmF je relativně vysoký výtěžek enzymů a zkušenosti s používanými bioreaktory. Kontrola procesu je srovnatelná s farmaceutickým průmyslem. Produkce celulo-lytických enzymů a jejich biosyntéza může být řízena a regulována, což vede k vylepšení požadovaných enzymových komponent. Nevýhodou je jejich vysoká produkční cena a obtížné nastavení produkce optimálního multienzymového komplexu, který by degradoval specifický substrát [5].

„Solid-state fermentation“ je jednoduchá technologie a z ekonomického hlediska výhodná pro produkci surových enzymových komplexů. SSF proces je alternativou k SmF, jehož enzymový produkt může být přímo použit pro biokonverzi přírodního substrátu např. při produkci biopaliv a obohacování krmiv. Zvýšený zájem o SSF proces je dán vysokou výtěžností enzymů. Chahal [58] zaznamenal vyšší výtěžek celulas z *T. reesei* v procesu SSF než při submerzní fermentaci. Tengerdy [59] srovnáním produkce celulas pomocí SSF a SmF zjistil, že při použití „solid-state fermentation“ se sníží produkční cena asi desetkrát. Nigam a Singh [60] zhodnotili použití agro-industriálního odpadu jako substrátu pro produkci celulo-lytických enzymů a domnívají se, že náležitá technologie, zlepšení konstrukce bioreaktorů a kontrolní činnosti, umožní SSF procesu stát se konkurenční metodou pro komerční produkci celulas [57].

Pandey a kol. [52] popsali aplikaci SSF technologie na produkci celulo-lytických enzymů. SSF je považována za technologii budoucnosti z hlediska komerční produkce celulas vzhledem k nízké vstupní ceně a schopnosti využívat přirozeně dostupné zdroje celulosových substrátů. Jelikož při biokonverzi není striktně požadována čistota enzymových preparátů, je SSF proces efektivní technologií pro produkci těchto preparátů. Mezi výhody SSF procesu ve srovnání se SmF patří také vyšší objemová produktivita a vyšší koncentrace produktu, nižší tvorba odpadu a nižší katabolická represe [57].

Srovnáním výhod a nevýhod procesu SmF a SSF při produkci celulo-lytických enzymů vyplývá, že SmF je preferována při procesech, které vyžadují purifikované enzymy nebo specifické enzymové komponenty a v případech, kdy požadovaný proces není závislý na ceně enzymů. SSF je na druhou stranu upřednostňována při přímých fermentačních procesech jako je silážování, produkce biopaliv atd. [57].

3.5.2.2 Produkce pektolytických enzymů

Průmyslová produkce pektolytických enzymů se provádí především pomocí submerzní fermentace. Submerzní fermentace probíhá v bioreaktorech za aerobních podmínek a s využitím „batch“ nebo „fed-batch“ fermentačního režimu. Z důvodu vysoké finanční a energetické náročnosti není submerzní fermentace příliš praktická, a proto se také využívají techniky „solid-state fermentation“ [5, 61].

Několik studií prokázalo, že produkce pektinas je mnohem vyšší u SSF než u SmF. Pektinasy jsou průmyslově produkovány pomocí *A. niger*, který je schopen růst a produkovat pektolytické enzymy za podmínek SSF i SmF. Acuna-Arguelles a kol. [62] zaznamenali nejvyšší produktivitu endo- a exopektinasy a pektinlyasy z *A. niger* za podmínek SSF. Kinetika a fyzikálně-chemické vlastnosti těchto enzymů byly ovlivněny fermentační technikou. Při použití SSF byly enzymy stabilní i při extrémních hodnotách pH a teploty. Pomocí procesu SSF byly také získány vyšší výtěžky pektinesteras, navíc za kratší fermentační dobu [63].

Na produkci pektolytických enzymů má vliv hodnota vodní aktivity, pH a zdroj uhlíku. Vodní aktivita a pH se řadí mezi kritické faktory u obou fermentačních procesů. Ovlivňují mikrobiální růst, sporulaci, produkci i stabilitu enzymů. Produkce pektátlyasy z *Erwinia chrysanthemi* se v podmínkách SmF zvýšila, když aktivita vody přidavkem NaCl poklesla z hodnoty 0,998 na hodnotu 0,990. Naopak snížení aktivity vody z hodnoty 0,98 na 0,90 pomocí ethylenglykolu mělo za následek snížení aktivity exopektinasy z *A. niger*, stejně tak aktivity polygalakturonasy z *Geotrichum candidum* nebo *Trichoderma viride* [63].

Většina pektinas se řadí mezi indukovatelné enzymy, které pro biosyntézu vyžadují přítomnost induktora. Přírodním induktorem pro produkci pektolytických enzymů je pektin. Při použití pektinu jako jediného zdroje uhlíku byla v procesu SSF zjištěna šestkrát vyšší produkce polygalakturonasy než u SmF. Přídavek sacharosu v SmF vyvolal katabolickou represi polygalakturonasy, zatímco v SSF bylo po přidavku sacharosu pozorováno více než desetinásobné zvýšení produkce [5, 64].

Solis-Pereira a kol. [65] zjistili, že přídavek glukosy do fermentačního media v podmínkách SSF stimuluje produkci pektinas, zatímco v procesu SmF je produkce inhibována, pravděpodobně katabolickou represí. Vliv glukosy na produkci pektolytických enzymů pozorovali také Maldonado a Strasser [66], kteří zjistili, že přídavek glukosy o koncentraci 10 g. l⁻¹ zvyšuje produkci pektolytických enzymů v procesu SSF o 30 %, zatímco v procesu SmF došlo následkem přidavku glukosy ke snížení produkce. Pro minimalizaci katabolické represe způsobené glukosou nebo produkty degradace pektinu se využívá „fed-batch“ kultivace nebo proces „solid-state fermentation“.

Ačkoliv je většina pektinas řazena mezi indukovatelné enzymy, Aguilar a Huitrón [67] se zabývali také studiem konstitutivních exopektinas produkováných pomocí *Aspergillus sp. CH-Y-1043*, který roste na glukose, sacharose, fruktose, glycerolu atd.

3.6 Stanovení katalytické aktivity enzymů

Z hlediska kinetiky jsou enzymy biokatalyzátory, které zvyšují rychlost přeměny substrátu na produkt. Jelikož je reakční rychlost bez přidavku enzymu zanedbatelná, je stanovení enzymatické aktivity založeno na měření reakční rychlosti [5].

3.6.1 Vyjadřování katalytické aktivity

V posledních desetiletích se několikrát měnily způsoby vyjadřování katalytické aktivity enzymů. V roce 1961 navrhla enzymová komise IUB standardní (mezinárodní) jednotku aktivity, kdy 1 U představuje množství enzymu katalyzujícího za standardních podmínek (30 °C a optimální hodnota pH) při saturaci substrátem, přeměnu 1 μmol substrátu za minutu. Po zavedení jednotek SI byla v roce 1972 definována nová jednotka pro katalytickou aktivitu (katal): 1 kat představuje množství katalyzátoru, které přemění za standardních podmínek za 1 sekundu 1 mol substrátu. Vztah staré (U) a nové jednotky (kat) je: 1 U = 16,67 nkat [20].

V roce 1981 zavedl IUPAC pro katalytickou aktivitu vyjádřenou v katalech název - rychlost přeměny substrátu. V praxi, např. při fotometrických stanoveních enzymatických aktivit, je obvykle měřena změna koncentrace v čase (reakční rychlost). Má-li být výsledek vyjádřen jako rychlost přeměny substrátu, je nutné naměřenou hodnotu vztáhnout na celkový objem. Používají se i další veličiny. Seznam veličin používaných v enzymové kinetice je uveden v tabulce 5 [20].

Tabulka 5 Seznam veličin používaných v enzymové kinetice [7]

| Veličina | Jednotky |
|---|---------------------------------------|
| Rychlost přeměny substrátu (katalytická aktivita) | mol.s ⁻¹ (kat) |
| Reakční rychlost | mol.dm ⁻³ .s ⁻¹ |
| Koncentrace katalytické aktivity | kat.dm ⁻³ |
| Specifická katalytická aktivita (aktivita vztážená na kg enzymu) | kat.kg ⁻¹ |
| Molární katalytická aktivita (aktivita vztážená na mol enzymu) | kat.mol ⁻¹ |

3.6.2 Metody stanovení katalytické aktivity enzymů

Metody stanovení katalytické aktivity enzymů se dělí podle principu detekce substrátu nebo produktu na:

- **optické** (spektrofotometrie, fluorimetrie, polarimetrie, luminiscence);
- **manometrické**;
- **elektrochemické** (potenciometrie, ampérometrie, polarografie, konduktometrie);
- **radiometrické**;
- **ostatní** (viskosimetrie, mikrokolorimetrie, titrace, technologické testy).

[7]

3.6.2.1 Optické metody

Nejrozšířenějšími metodami stanovení katalytické aktivity enzymů jsou fotometrické metody. Jsou založeny na skutečnosti, že změna koncentrace substrátu nebo produktu za časovou jednotku je přímo úměrná změně absorbance za daný časový interval. Tato podmínka je splněna za předpokladu, že platí Lambertův-Beerův zákon. Změnu koncentrace substrátu nebo produktu lze sledovat přímo, vykazuje-li absorbanci ve viditelné nebo ultrafialové části spektra. Jestliže substrát nebo produkt enzymové reakce neabsorbuje elektromagnetické záření, je možné využít chemické reakce, která jej pozmění natolik, že výsledný produkt bude barevný nebo bude absorbovat v ultrafialové části spektra. Vztah absorbance a stanovované koncentrace je definován Lambertovým-Beerovým zákonem [7]:

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

kde A je absorbance, ε molární absorpční koeficient ($\text{cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$), c koncentrace ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a d tloušťka absorbující vrstvy (cm) [5, 7].

Reakční rychlost je vyjádřena časovou změnou absorbance $\Delta A/\Delta t$. Vlastní měření aktivity enzymu je zahájeno přidávkem substrátu. Úbytek nebo přírůstek absorbance se měří v určitých časových intervalech, obvykle v intervalu 5, 10 nebo 20 minut. Zjednodušené měření se provádí pouze jediným měřením a to po dosažení určitého fixního času [7].

Ke sledování enzymatické hydrolýzy oligo- nebo polysacharidů se v praxi používají metody založené na měření přírůstku redukujících skupin sacharidů. Mezi spektrometrické metody založené na redukčních vlastnostech sacharidů patří metoda Nelson-Somogyiho nebo metoda s kyselinou 3,5-dinitrosalicylovou. Kyselina 3,5-dinitrosalicylová je v zásaditém prostředí redukována na kyselinu 3-amino-5-nitrosalicylovou, která vytváří oranžově žluté zbarvení. Metoda Nelson-Somogyiho využívá schopnosti vyredukovatého Cu_2O vytvářet modrozelenou komplexní sloučeninu s arsenmolybdenovým činidlem, jejíž absorpční maximum je při 500 nm. K oxido-redukční reakci se používá směs Somogyiho roztoků I a II. Barevná reakce je pak vyvolána smícháním reakčního roztoku s Nelsonovým činidlem. Koncentrace redukujících skupin se zjišťuje odečtením z kalibrační přímky, která je připravena s příslušným standardem [24].

3.6.2.2 Stanovení bílkovin

Stanovení bílkovin, resp. analytické koncentrace enzymů v reakční směsi je potřebné k výpočtu specifické a molární katalytické aktivity enzymu. Nejvíce používanými metodami stanovení bílkovin jsou spektrofotometrické metody. Přímé měření nezakalených roztoků bílkovin se provádí v ultrafialové části spektra. Vhodná absorpční maxima jsou při 275 – 280 nm. Při měření v UV oblasti jsou možné interference nukleových kyselin. Ve viditelné oblasti spektra se používá Biuretová metoda, založená na reakci peptidové vazby s měďnatými ionty v alkalickém prostředí v přítomnosti vinanu. Metoda je vhodná pro koncentrace bílkovin $0,2 - 2,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ [7].

Nejpoužívanější metodou stanovení bílkovin je Lowryho metoda, která kombinuje biuretovou reakci s redukcí fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny (Folin- Ciocalteuova činidla) působením Tyr a Trp zbytků peptidového řetězce. Citlivost stanovení se tak zvýší na 10 – 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Redukované Folin-Ciocalteuovo činidlo má modré zabarvení a je detekovatelné spektrofotometrem v rozmezí vlnových délek od 500 do 750 nm. Biuretova reakce sama o sobě není velmi citlivá. Použitím Folin-Ciocalteuova činidla pro detekci mědi se citlivost Lowryho metody až stonásobně zvýší oproti Biuretové. Lowryho metoda je relativně citlivá, ale ve srovnání s jinými metodami je mnohem náchylnější k interferujícím sloučeninám. Mezi sloučeniny, které při Lowryho metodě interferují patří např. detergenty, sacharidy, glycerol, Tricine, EDTA, guanin, xanthin, hořčík, vápník atd. [68].

Oblíbenou metodou stanovení bílkovin je Bradfordova metoda, která je založena na principu přímé vazby barviva Coomassie brilliant blue G-250 na Arg, Trp, Tyr, His, Phe zbytky proteinů. Absorpční maximum je při 595 nm. Metoda je jednoduchá, rychlá, levná a citlivá [68].

Společným nedostatkem výše uvedených metod je, že neumožňují stanovit určitou bílkovinu (enzym) ve směsi s jinými. Pro vysokou specifitu stanovení se využívají imunochemické metody, které umožňují stanovit bílkoviny v koncentracích řádu $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ [7].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje

- Analytické váhy: AND GR-202-EC; Japonsko
- Očkovací box: BIOAIR EuroClone; Itálie
- pH metr: inoLab pH 720, Merci s.r.o.; Brno
- Spektrofotometr: UV/VIS Helios Delta; Velká Británie
- Termostat: BINDER, USA
- Termostat: LTE Scientific LTD IP 100-U, Velká Británie
- Třepačka: KS 130 B-IKA; Německo
- Váhy: Scaltec SAS 50; USA
- Vařič: ETA; Milovice nad Bečvou
- Vodní lázeň: Polystat cc1, Merci s.r.o.; Brno
- Wortex: Heidolph, REAX top; Německo

4.2 Použité chemikálie

- Agar: HiMedia; Indie
- Albumin: Serva; Německo
- Destilovaná voda: H₂O - Fakulta chemická VUT; Brno
- Ethanol: C₂H₅OH - Merci, s.r.o.; Brno
- Folin-Ciocalteuovo činidlo: fa RNDr. Jan Kulich; Hradec Králové
- Glukosa: C₆H₁₂O₆ - Lachema; Brno
- Hydrogenarseničnan sodný heptahydrát: Na₂HAsO₄ · 7 H₂O - Lachema; Brno
- Hydrogenfosforečnan draselný: K₂HPO₄ - Lachema; Brno
- Hydrogenuhlíčitán sodný: NaHCO₃ - Lachema; Brno
- Hydroxid sodný: NaOH - Lach-Ner, s.r.o.; Neratovice
- Karboxymethylcelulosa: Serva; Německo
- Kyselina D-galaktopyranuronová: C₆H₁₀Na₂O₁₀S₁ - Fluka; Švýcarsko
- Kyselina octová: CH₃COOH - Penta; Chrudim
- Kyselina sírová: H₂SO₄ - Merci, s.r.o.; Brno
- Molybdenan amonný tetrahydrát: (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O - Lachema; Brno

- Octan sodný: $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ - Lachema; Brno
- Pivovarská sladina: pivovar Starobruno
- Síran amonný: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Lachema; Brno
- Síran hořečnatý heptahydrát: $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - Lach-Ner, s.r.o.; Neratovice
- Síran měďnatý pentahydrát: $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ - ML chemica; Troubsko
- Síran sodný: Na_2SO_4 - Lachema; Brno
- Síran železnatý heptahydrát: $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - Lachema; Brno
- Uhličitan sodný: Na_2CO_3 - Lachema; Brno
- Vinan draselno-sodný tetrahydrát: $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ - Lachema; Brno

4.3 Použité substráty

- 1% roztok karboxymethylcelulosy v 0,1 M octanovém pufru o pH 5,4
- 0,5% roztok pektanu sodného v 0,1 M octanovém pufru o pH 4,2

4.4 Použitý odpadní materiál na kultivaci

- Pšeničná sláma mletá (velikost částic: 0,3 – 0,5 mm): SAV, Chemický ústav; Bratislava
- Řepné výlisky (velikost částic < 4 mm): SAV, Chemický ústav; Bratislava

4.5 Použité mikroorganismy

Aspergillus niger (CCM-F 8189)

Vybraný kmen pochází z České sbírky mikroorganismů Masarykovy Univerzity v Brně. Příprava inokula byla provedena na šikmých sladivých agarech. Mikroorganismus se inkuboval 3 dny v termostatu při 37 °C. Poté byl uchováván v lednici.

Aureobasidium pullulans (CCY 27-1-115)

Vybraný kmen pochází ze Zbierky kultur kvasiniek Chemického ústavu SAV v Bratislavě. Příprava inokula byla provedena na šikmých sladivých agarech. Mikroorganismus se inkuboval 5 dní v termostatu při 26 °C. Poté byl uchováván v lednici.

4.6 Příprava roztoků

4.6.1 Příprava Somogyiho činidel

Somogyi I: 12 g $C_4H_4O_6KNa \cdot 4 H_2O$, 16 g $NaHCO_3$ a 18 g Na_2CO_3 bylo rozpuštěno v 200 ml destilované vody. Poté bylo za stálého míchání a zahřívání rozpuštěno 144 g Na_2SO_4 v 600 ml destilované vody. Následně byly oba připravené roztoky smíchány.

Somogyi II: 4 g $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ a 36 g Na_2SO_4 bylo rozpuštěno v 200 ml destilované vody.

Nelson: 25 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$ bylo rozpuštěno v 450 ml destilované vody. Poté bylo pozvolna přidáno 21 ml koncentrované H_2SO_4 . 3 g $Na_2HAsO_4 \cdot 7 H_2O$ byly rozpuštěny v 25 ml destilované vody. Oba roztoky byly následně smíchány. Výsledný roztok byl poté umístěn na 48 hodin do termostatu při teplotě 37 °C.

4.6.2 Příprava roztoků na stanovení bílkovin Lowryho metodou

Roztok A byl připraven rozpuštěním 20 g Na_2CO_3 ; 0,5 g $C_4H_4O_6KNa \cdot 4 H_2O$ a 4 g $NaOH$ v 1000 ml destilované vody.

Roztok B byl připraven rozpuštěním 1g $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ v 1000 ml destilované vody.

Roztok C byl připraven smícháním 45 ml roztoku A s 5 ml roztoku B.

Roztok D byl připraven smícháním 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla (směs fosfowolframové a fosfomolybdenové kyseliny) s 1,6 ml vody.

4.6.3 Příprava 0,2 M roztoku octanu sodného

Roztok byl připraven rozpuštěním 2,72 g $CH_3COONa \cdot 3 H_2O$ v destilované vodě. Takto připravený roztok byl v odměrné baňce doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml.

4.6.4 Příprava 0,5% roztoku pektanu sodného v 0,1 M octanovém pufru o pH 4,2

Roztok byl připraven postupným rozpuštěním 0,25 g polygalakturonové kyseliny za intenzivního míchání v 25 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 6,6 ml 0,2 M roztoku octanu sodného a pH bylo upraveno 99% kyselinou octovou na hodnotu 4,2. Takto připravený roztok byl v odměrné baňce doplněn destilovanou vodou na objem 50 ml.

4.6.5 Příprava 1% roztoku karboxymethylcelulosity v 0,1 M octanovém pufru o pH 5,4

Roztok byl připraven postupným rozpuštěním 0,5 g karboxymethylcelulosity za intenzivního míchání v 20 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 20,6 ml 0,2 M roztoku octanu sodného a pH bylo upraveno 99% kyselinou octovou na hodnotu 5,4. Takto připravený roztok byl v odměrné baňce doplněn destilovanou vodou na objem 50 ml.

4.6.6 Příprava bezuhlíkatého media

Roztok byl připraven rozpuštěním 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ a 0,005 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ v 250 ml destilované vody.

4.6.7 Příprava základního roztoku glukosy o koncentraci $1 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$

Roztok byl připraven rozpuštěním 0,018 g $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ v destilované vodě. Získaný roztok byl v odměrné baňce doplněn na objem 100 ml.

4.6.8 Příprava základního roztoku kyseliny D-galaktopyranuronové o koncentraci $1 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$

Roztok byl připraven rozpuštěním 0,002 g $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{Na}_2\text{O}_{10}\text{S}_1$ v destilované vodě. Získaný roztok byl v odměrné baňce doplněn na objem 10 ml.

4.6.9 Příprava základního roztoku albuminu o koncentraci $1 \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

Roztok byl připraven rozpuštěním 0,01 g albuminu v destilované vodě. Získaný roztok byl v odměrné baňce doplněn na objem 10 ml.

4.7 Pracovní postupy

Ke kultivaci mikroorganismů *Aspergillus niger* a *Aureobasidium pullulans* byla zvolena metoda „solid-state fermentation“. Jako odpadní materiály byly ke kultivaci použity řepné výlisky a mletá pšeničná sláma. Pro zvlhčení materiálů byla nejprve použita voda. Následně byly provedeny 2 optimalizační kroky – zvlhčení bezuhlíkatým médiem a zvlhčení glukosovým médiem. Zastoupení minerálních látek v glukosovém mediu bylo identické s bezuhlíkatým médiem a koncentrace glukosy byla 20 g.l⁻¹.

Do 250 ml Erlenmeyerovy baňky byly naváženy 2 g řepných výlisků. Materiál byl zvlhčen 20 ml vody nebo 20 ml bezuhlíkatého media (1. optimalizační krok). Takto připravený substrát byl vysterilizován. Po vysterilizování bylo provedeno zaočkování 2 ml suspenze daného mikroorganismu (*A. niger* nebo *A. pullulans*). Kultivace probíhala stacionárně v termostatu při 37 °C (*A. niger*) nebo při 26 °C (*A. pullulans*).

Do 250 ml Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 1,5 g mleté pšeničné slámy. Materiál byl zvlhčen 15 ml vody, 15 ml bezuhlíkatého media (1. optimalizační krok) nebo 15 ml glukosového media (2. optimalizační krok). Takto připravený substrát byl vysterilizován. Po vysterilizování bylo provedeno zaočkování 2 ml suspenze daného mikroorganismu (*A. niger* nebo *A. pullulans*). Kultivace probíhala stacionárně v termostatu při 37 °C (*A. niger*) nebo při 26 °C (*A. pullulans*).

Celkově bylo provedeno 10 kultivací:

- sedmidenní kultivace *A. niger* na řepných výliscích zvlhčených vodou;
- sedmidenní kultivace *A. niger* na řepných výliscích zvlhčených bezuhlíkatým m.;
- šestidenní kultivace *A. niger* na mleté pšeničné slámě zvlhčené vodou;
- šestidenní kultivace *A. niger* na mleté pšeničné slámě zvlhčené bezuhlíkatým m.;
- čtrnáctidenní kultivace *A. niger* na mleté pšeničné slámě zvlhčené glukosovým m.;
- šestidenní kultivace *A. pullulans* na řepných výliscích zvlhčených vodou;
- šestidenní kultivace *A. pullulans* na řepných výliscích zvlhčených bezuhlíkatým m.;
- šestidenní kultivace *A. pullulans* na mleté pšeničné slámě zvlhčené vodou;
- šestidenní kultivace *A. pullulans* na mleté pšeničné slámě zvlhčené bezuhlíkatým m.;
- čtrnáctidenní kultivace *A. pullulans* na mleté pšeničné slámě zvlhčené glukosovým m.

Kultivace probíhala po dobu šesti (sedmi) nebo čtrnácti dní. Analýza redukujících látek, bílkovin, polygalakturonasové a celulytické aktivity byla prováděna v pravidelných 24h (48h) intervalech od počátečního zaočkování mikroorganismem. Před samotnou analýzou byla provedena extrakce 20 ml vody na třepačce při 80 rpm po dobu 2 hodin. Po skončení extrakce byla kultivační suspenze přefiltrována a extrakt byl použit k analýze.

4.7.1 Sestrojení kalibračních křivek

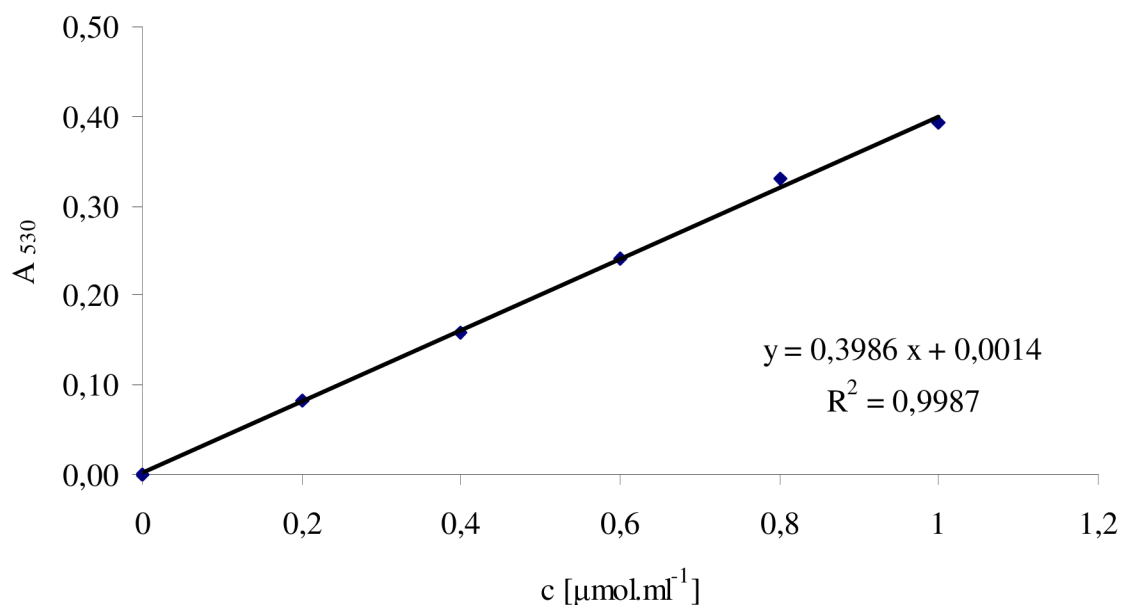
4.7.1.1 Sestrojení kalibrační křivky glukosy

K sestrojení kalibrační křivky byl použit základní roztok glukosy o koncentraci $1 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ze základního roztoku byla připravena kalibrační řada o koncentraci 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a $1 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Následně byl do každé zkumavky přidán 1 ml Somogyiho činidla (I + II smíchaný v poměru 4:1). Zkumavky byly 10 minut povařeny na vodní lázni. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl přidán 1 ml Nelsonova činidla a 7 ml destilované vody. Obsah zkumavek byl promíchán a poté byla na spektrofotometru změřena absorbance při vlnové délce 530 nm proti blanku, který místo základního roztoku obsahoval 1 ml destilované vody. Přehled jednotlivých objemů pipetovaných do zkumavek je uveden v tabulce 6 [69].

Tabulka 6 Kalibrační křivka glukosy

| Koncentrace glukosy [$\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$] | 0 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1 |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| objem glukosy [ml] | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1,0 |
| objem vody [ml] | 1,0 | 0,8 | 0,6 | 0,4 | 0,2 | 0,0 |
| objem Somogyiho činidla [ml] | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| objem Nelsonova činidla [ml] | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| objem vody [ml] | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 |

Graf 1 Kalibrační křivka glukosy



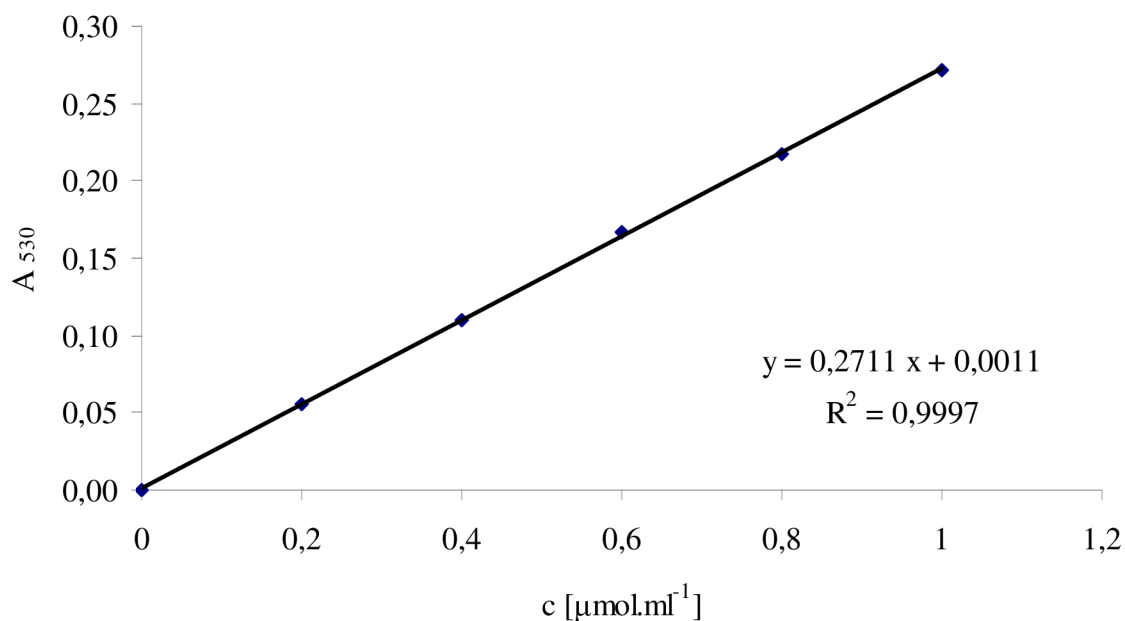
4.7.1.2 Sestrojení kalibrační křivky D-galaktopyranuronové kyseliny

K sestavení kalibrační křivky byl použit základní roztok D-galaktopyranuronové kyseliny o koncentraci $1 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ze základního roztoku byla připravena kalibrační řada o koncentraci 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a $1 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Následně byl do každé zkumavky přidán 1 ml Somogyiho činidla (I + II smíchány v poměru 4:1). Zkumavky byly 10 minut povařeny na vodní lázni. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl přidán 1 ml Nelsonova činidla a 7 ml destilované vody. Obsah zkumavek byl promíchán a poté byla na spektrofotometru změřena absorbance při vlnové délce 530 nm proti blanku, který místo základního roztoku obsahoval 1 ml destilované vody. Přehled jednotlivých objemů pipetovaných do zkumavek je uveden v tabulce 7 [69].

Tabulka 7 Kalibrační křivka D-galaktopyranuronové kyseliny

| Koncentrace D-galaktopyranuronové kyseliny [$\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$] | 0 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1 |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| objem D-galakt. kys. [ml] | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1,0 |
| objem vody [ml] | 1,0 | 0,8 | 0,6 | 0,4 | 0,2 | 0,0 |
| objem Somogyiho činidla [ml] | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| objem Nelsonova činidla [ml] | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| objem vody [ml] | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 |

Graf 2 Kalibrační křivka D-galaktopyranuronové kyseliny



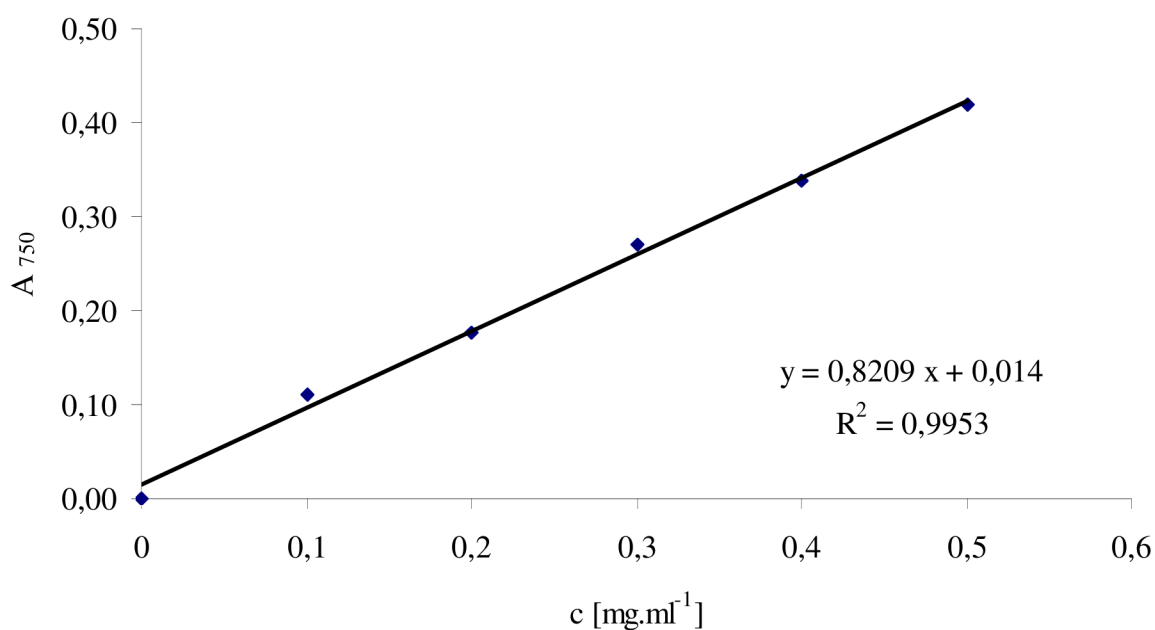
4.7.1.3 Sestrojení kalibrační křivky albuminu

K sestavení kalibrační křivky byl použit základní roztok albuminu o koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Základní roztok byl naředěn v poměru 1:1 destilovanou vodou a poté byla připravena kalibrační řada o koncentraci 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Následně bylo do každé zkumavky přidáno 2,5 ml roztoku C. Obsah zkumavek se nechal stát při laboratorní teplotě 10 min. Poté bylo přidáno 250 μl roztoku D, obsah zkumavek byl promíchán a nechal se inkubovat při laboratorní teplotě 30 min. Po uplynutí dané doby byla na spektrofotometru změřena absorbance při vlnové délce 750 nm proti blanku, který místo roztoku albuminu obsahoval 500 μl destilované vody. Přehled jednotlivých objemů pipetovaných do zkumavek je uveden v tabulce 8 [68].

Tabulka 8 Kalibrační křivka albuminu

| Koncentrace albuminu [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$] | 0 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 |
|--|------|------|------|------|------|------|
| objem albuminu [ml] | 0,00 | 0,10 | 0,20 | 0,30 | 0,40 | 0,50 |
| objem vody [ml] | 0,50 | 0,40 | 0,30 | 0,20 | 0,10 | 0,00 |
| objem roztoku C [ml] | 2,50 | 2,50 | 2,50 | 2,50 | 2,50 | 2,50 |
| objem roztoku D [ml] | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |

Graf 3 Kalibrační křivka albuminu



4.7.2 Stanovení celulolytické aktivity

Ke stanovení celulolytické aktivity byla použita metoda Nelson-Somogyiho, což je metoda stanovení přírůstku redukujících skupin v průběhu enzymové degradace substrátu, založená na vzniku barevného arzeničnano-měďnatého komplexu.

Do zkumavek umístěných ve vodní lázni vytemperované na 50 °C byl napipetován 1 ml 1% roztoku karboxymethylcelulosity, poté byl přidán 1 ml extraktu z kultivační suspenze. Ihned po promíchání bylo z dané směsi odpipetováno 500 µl do předem připravených zkumavek s 500 µl Somogyiho činidla (I + II smíchány v poměru 4:1). Takto připravené vzorky byly při stanovení použity jako slepý vzorek. Zbytek reakční směsi byl ponechán 30 minut ve vodní lázni. Poté z ní bylo odpipetováno 500 µl do předem připravených zkumavek s 500 µl Somogyiho činidla (I + II smíchány v poměru 4:1). Všechny zkumavky byly 10 minut povařeny na vodní lázni. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 500 µl Nelsonova činidla a 3,5 ml destilované vody. Obsah zkumavek byl promíchán a poté byla na spektrofotometru změřena absorbance při vlnové délce 530 nm proti blanku [69].

Aktivita enzymu byla vypočtena ze vztahu:

$$a = \frac{A_{530} \cdot f}{t \cdot V}, \quad (2)$$

kde a je aktivita enzymu, A_{530} naměřená absorbance, f přepočítávací faktor koncentrace redukujících skupin pro $A_{530} = 1$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$), t čas (min) a V objem odebraný z reakce (ml).

Přepočítávací faktor mezi absorbancí a koncentrací redukujících skupin (f) byl vypočten z rovnice regresní přímky kalibrační křivky glukosy: $y = 0,3986 \cdot x + 0,0014$ (viz graf 1), kde $y=1$. Vypočtená hodnota celulolytické aktivity v extraktu byla vztažena na 1 g substrátu.

4.7.3 Stanovení polygalakturonasové aktivity

Ke stanovení polygalakturonasové aktivity byla použita metoda Nelson-Somogyiho.

Do zkumavek byl napipetován 1 ml 0,5% roztoku pektanu sodného, poté byl přidán 1 ml extraktu z kultivační suspenze. Ihned po promíchání bylo z dané směsi odpipetováno 500 µl do předem připravených zkumavek s 500 µl Somogyiho činidla (I + II smíchány v poměru 4:1). Takto připravené vzorky byly při stanovení použity jako slepý vzorek. Zbytek reakční směsi se ponechal stát 20 minut při laboratorní teplotě. Poté z ní bylo odpipetováno 500 µl do předem připravených zkumavek s 500 µl Somogyiho činidla (I + II smíchány v poměru 4:1). Všechny zkumavky byly 10 minut povařeny na vodní lázni. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 500 µl Nelsonova činidla a 3,5 ml destilované vody. Obsah zkumavek byl promíchán a poté byla na spektrofotometru změřena absorbance při vlnové délce 530 nm proti blanku [69].

Aktivita enzymu byla vypočtena ze vztahu:

$$a = \frac{A_{530} \cdot f}{t \cdot V}, \quad (2)$$

kde a je aktivita enzymu, A_{530} naměřená absorbance, f přepočítávací faktor koncentrace redukujících skupin pro $A_{530} = 1$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$), t čas (min) a V objem odebraný z reakce (ml).

Přepočítávací faktor mezi absorbancí a koncentrací redukujících skupin (f) byl vypočten z rovnice regresní přímky kalibrační křivky D-galaktopyranuronové kyseliny: $y = 0,2711x + 0,0011$ (viz graf 2), kde $y=1$. Vypočtená hodnota polygalakturonasové aktivity v extraktu byla vztažena na 1 g substrátu.

4.7.4 Stanovení redukujících látek

Ke stanovení redukujících látek byla použita metoda Nelson-Somogyiho.

Do zkumavek s 500 μl Somogyiho činidla (I + II smíchaný v poměru 4:1) bylo přidáno 500 μl extraktu z kultivační suspenze. Zkumavky byly 10 minut povařeny na vodní lázni. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 500 μl Nelsonova činidla a 3,5 ml destilované vody. Obsah zkumavek byl promíchán a poté byla na spektrofotometru změřena absorbance při vlnové délce 530 nm proti blanku, který místo extraktu z kultivační suspenze obsahoval 1 ml destilované vody [69].

Množství redukujících látek bylo vypočteno z rovnice regresní přímky kalibrační křivky glukosy: $y = 0,3986x + 0,0014$ (viz graf 1). Vypočtená hodnota množství redukujících látek byla vztažena na 1 g substrátu.

4.7.5 Stanovení extracelulárních bílkovin

Ke stanovení extracelulárních bílkovin byla použita Lowryho metoda. Folin-Ciocalteuovo činidlo poskytuje v alkalickém prostředí v přítomnosti Cu^{2+} s bílkovinami modře zbarvený produkt. Činidlo reaguje se zbytky aromatických aminokyselin (Tyr nebo Trp).

Do zkumavek bylo napipetováno 500 μl extraktu z kultivační suspenze. Následně bylo do každé zkumavky přidáno 2,5 ml roztoku C. Obsah zkumavek se nechal stát při laboratorní teplotě 10 min. Poté bylo přidáno 250 μl roztoku D, obsah zkumavek byl promíchán a nechal se inkubovat při laboratorní teplotě 30 min. Po uplynutí dané doby byla na spektrofotometru změřena absorbance při vlnové délce 750 nm proti blanku, který místo extraktu z kultivační suspenze obsahoval 500 μl destilované vody [68].

Množství extracelulárních bílkovin bylo vypočteno z rovnice regresní přímky kalibrační křivky albuminu: $y = 0,8209x + 0,014$ (viz graf 3). Vypočtená hodnota množství extracelulárních bílkovin byla vztažena na 1 g substrátu.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Ke studiu produkce hydrolytických enzymů byly použity dva produkční mikroorganismy, a to kmen *Aspergillus niger* (CCM-F 8189) třídy *Ascomycetes* a kmen *Aureobasidium pullulans* (CCY 27-1-115) třídy *Basidiomycetes* známé produkcí celulytických a pektolytických enzymů. Jako substráty byly použity řepné výlisky nebo mletá pšeničná sláma. Ke kultivaci byla zvolena metoda „solid-state fermentation“. SSF dosahuje vyšších enzymových výtěžků ve srovnání se submerzní fermentací, neklade zvýšené nároky na sterilitu a energii a modeluje životní podmínky vláknitých hub [51].

Kultivace probíhala v Erlenmeyerových baňkách v termostatu při 37 °C (u kultivace *A. niger*) nebo při 26 °C (u kultivace *A. pullulans*) po dobu šesti (sedmi) nebo čtrnácti dní. Jednotlivé vzorky byly zpracovávány v pravidelných 24h (48h) intervalech od počátečního zaočkování mikroorganismem. V extraktech bylo stanoveno množství redukujících látek a extracelulárních bílkovin a byla sledována polygalakturonasová a celulytická aktivita.

5.1 Kultivace *A. niger* a *A. pullulans* na řepných výliscích

Sušina cukrové řepy obsahuje celulosu, pentosany, lignin, pektinové látky, monosacharidy - glukosu, fruktosu a oligosacharidy – sacharosu, rafinosu nebo organické kyseliny. Celulytické i pektolytické enzymy jsou převážně indukovatelné enzymy, proto byly řepné výlisky obsahující celulosu a pektin zvoleny jako substrát ke kultivaci. Navíc obsahují určitý podíl sacharosy a glukosy, které mohou mít příznivý vliv na růst mikrobiální biomasy a produkci extracelulárních enzymů [14, 66].

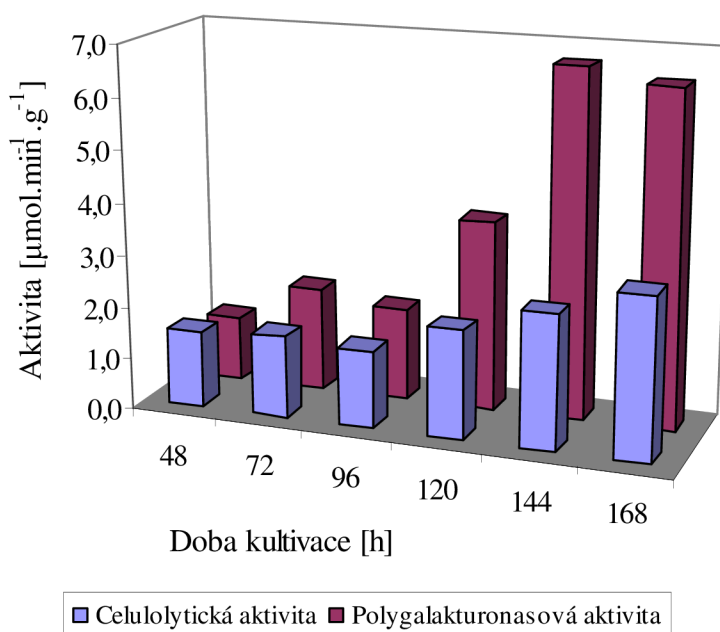
Kultivace *A. niger* resp. *A. pullulans* na řepných výliscích probíhala po dobu sedmi (šesti) dní. V první fázi experimentu byl daný substrát zvlhčen vodou. V druhé fázi byla provedena optimalizace metody zvlhčením substrátu bezuhlíkatým médiem. Z literatury je známo [70], že zejména $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ přítomný v bezuhlíkatém médiu jako zdroj dusíku má příznivý vliv na produkci enzymů.

5.1.1 Produkce celulytické a polygalakturonasové aktivity pomocí *A. niger* na řepných výliscích zvlhčených vodou

Životní činnost mikroorganismů závisí na dostatečném množství látek potřebných pro syntézu buněčné hmoty a na množství zdroje využitelné energie. Živné prostředí musí obsahovat také dostatečné množství vody, protože veškeré chemické reakce v živé buňce probíhají pouze ve vodném prostředí [55].

V průběhu sedmidenní kultivace byl sledován vliv podmínek vnějšího prostředí (tj. látek obsažených v řepných výliscích a vody) na produkci celulolytické a polygalakturonasové aktivity. Získané výsledky jsou uvedeny v grafu 4.

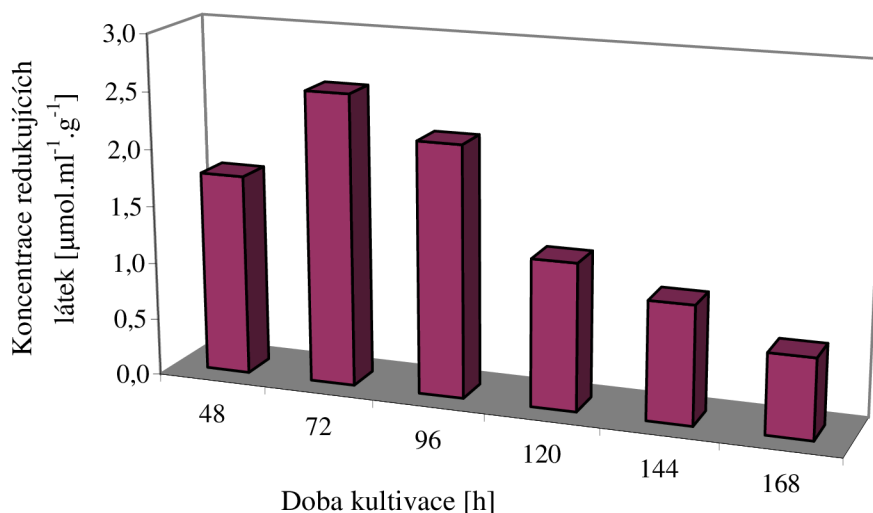
Graf 4 Závislost produkce celulolytické a polygalakturonasové aktivity na době kultivace *A. niger*



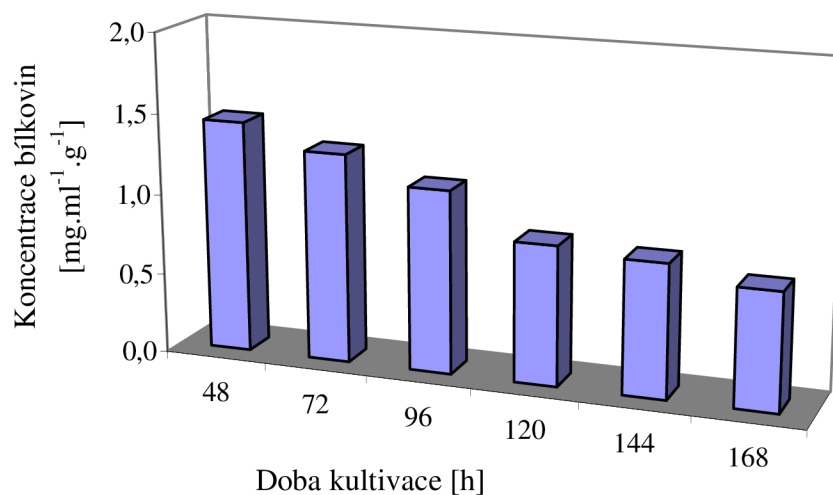
Z grafu 4 vyplývá, že vyšších hodnot polygalakturonasové aktivity bylo dosaženo v druhé polovině kultivačního období. Celulolytická aktivita se objevila již po 48 h kultivace a nejvyšší hodnoty dosáhla po 168 h kultivace ($a = 3,118 \pm 0,047 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Polygalakturonasová aktivita se také objevila po 48 h kultivace a maxima dosáhla po 168 h kultivace ($a = 6,436 \pm 0,151 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Po 96 h kultivace bylo ke zbylým vzorkům přidáno 5 ml vody, aby se zabránilo vysychání substrátu. Voda je pro průběh veškerých chemických reakcí nezbytná a proto přídavek vody mohl ovlivnit produkci daných enzymů.

Koncentrace redukujících látek v extraktech je uvedena v grafu 5. Z uvedeného grafu vyplývá, že koncentrace redukujících látek byla vyšší v první polovině kultivačního období. Celulolytická i polygalakturonasová aktivita uvedená v grafu 4 dosahovala vyšších hodnot až v druhé polovině kultivace, z čehož vyplývá, že mikroorganismus z počátku produkoval i jiné než sledované enzymy, které se podílely na degradaci rostlinné biomasy. Vyšší hodnoty redukujících látek v první polovině kultivace mohou také souviset s obsahem jednoduchých sacharidů v substrátu, které mikroorganismus mohl přednostně využívat.

Graf 5 Závislost koncentrace redukujících látek na době kultivace *A. niger*



Graf 6 Závislost koncentrace extracelulárních bílkovin na době kultivace *A. niger*



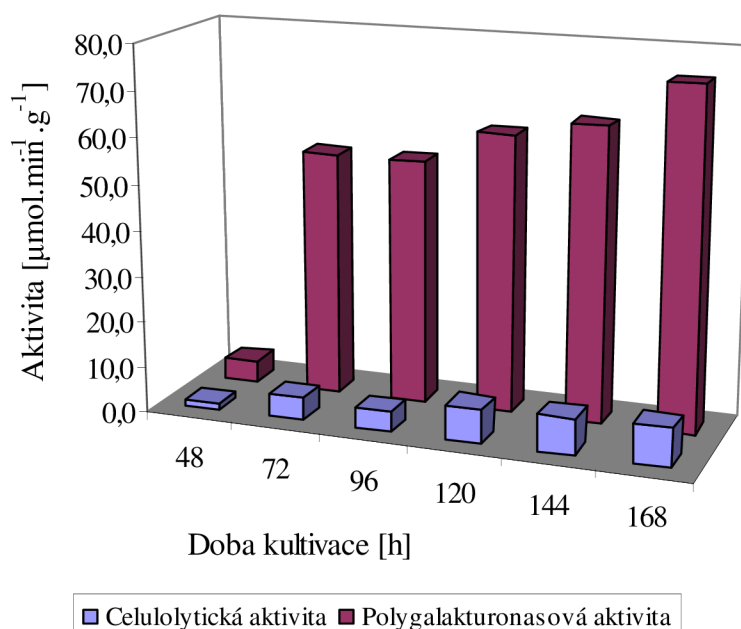
Koncentrace extracelulárních bílkovin je uvedena v grafu 6. V průběhu degradace rostlinného materiálu mohou být kromě celulasy a polygalakturonasy produkovány i jiné enzymy, které se podílí na degradaci rostlinných pletiv. Proto množství extracelulárních bílkovin nemusí vždy odpovídat jen danému enzymu, jehož aktivita byla sledována. Z grafu 6 vyplývá, že vyšší koncentrace extracelulárních bílkovin byla zaznamenána v první polovině kultivačního období. Celulolytická a polygalakturonasová aktivita (viz graf 4) dosahovala vyšších hodnot až v druhé polovině kultivace, z čehož lze usoudit, že mikroorganismus zřejmě z počátku produkoval i jiné než sledované enzymy [71].

5.1.2 Produkce celulytické a polygalakturonasové aktivity pomocí *A. niger* na řepných výliscích zvlhčených bezuhlíkatým médiem

Mikroorganismy vyžadují ke svému růstu a produkci požadovaných metabolitů nejen zdroj uhlíku a dusíku, ale i další prvky ve formě organických nebo anorganických sloučenin. Z literatury je známo [70], že síran amonný přítomný v bezuhlíkatém médiu jako zdroj dusíku příznivě ovlivňuje produkci enzymů.

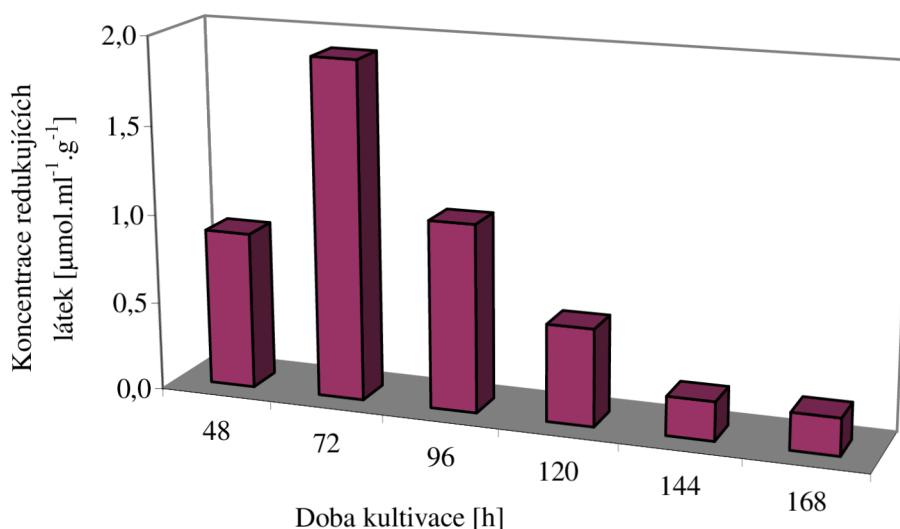
V průběhu sedmidenní kultivace byla sledována celulytická a polygalakturonasová aktivita. Naměřené a vypočtené hodnoty jsou uvedeny v grafu 7. Z grafu 7 vyplývá, že celulytická i polygalakturonasová aktivita nabývala vyšších hodnot po 120 h kultivace. Celulytická aktivita se objevila již po 48 h kultivace a nejvyšší hodnoty dosáhla po 168 h kultivace ($a = 8,523 \pm 0,125 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$). Maxima bylo dosaženo ve stejném časovém úseku jako u předešlé kultivace s tím rozdílem, že aktivita enzymu byla téměř 3krát vyšší než při kultivaci na řepných výliscích zvlhčených vodou (viz graf 4). Polygalakturonasová aktivita se objevila již po 48 h kultivace a maxima dosáhla po 168 h kultivace ($a = 74,182 \pm 2,383 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), což je řádově vyšší hodnota ve srovnání s kultivací na řepných výliscích zvlhčených vodou (viz graf 4). Z uvedených hodnot vyplývá, že zvlhčení bezuhlíkatým médiem pozitivně ovlivnilo produkci celulasu i polygalakturonasy.

Graf 7 Závislost produkce celulytické a polygalakturonasové aktivity na době kultivace *A. niger*

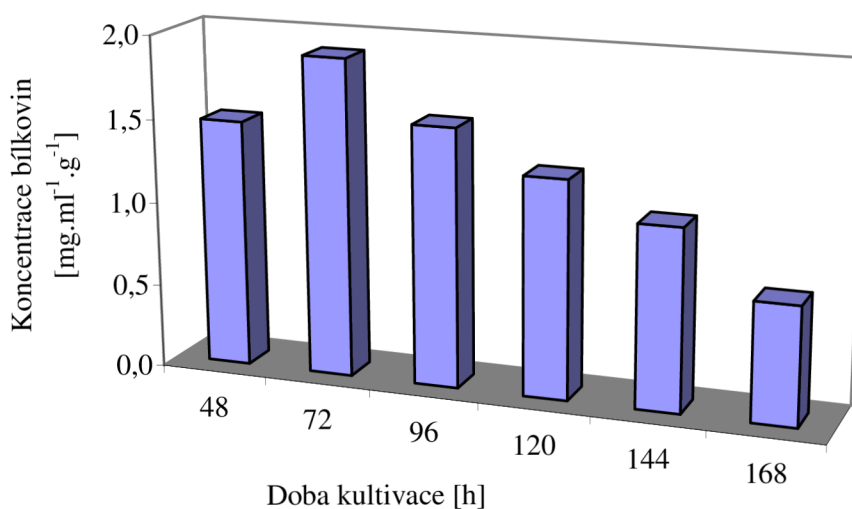


Koncentrace redukujících látek uvedená v grafu 8 byla vyšší v první polovině kultivačního období a poté se snižovala. Vyšší koncentrace redukujících látek by mohla souviset s produkcí jiných než sledovaných enzymů, které se také podílely na degradaci rostlinné biomasy. V druhé polovině kultivace mikroorganismus zřejmě začal využívat jako zdroj uhlíku jednoduché sacharidy, což mělo za následek pokles koncentrace redukujících látek. Trend koncentrace redukujících látek byl podobný jako u předešlé kultivace (viz graf 5).

Graf 8 Závislost koncentrace redukujících látek na době kultivace *A. niger*



Graf 9 Závislost koncentrace extracelulárních bílkovin na době kultivace *A. niger*

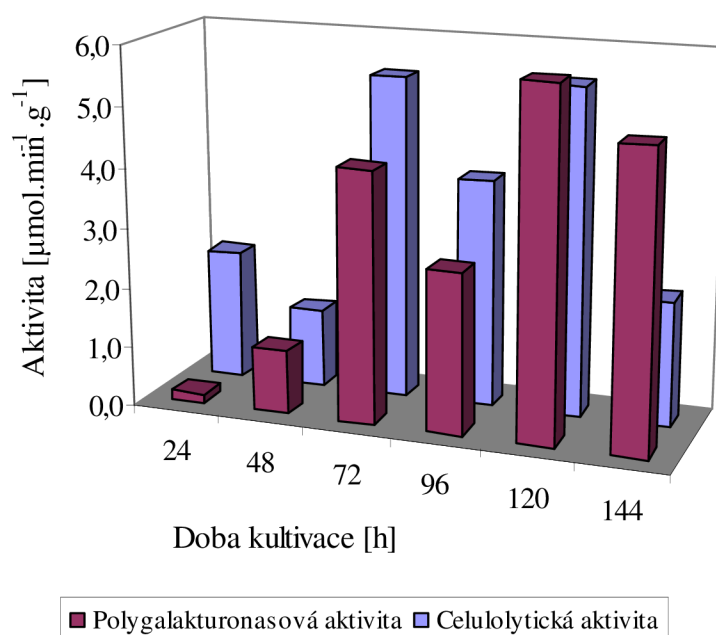


Koncentrace extracelulárních bílkovin je uvedena v grafu 9. Z uvedeného grafu vyplývá, že vyšší koncentrace bílkovin byla zaznamenána v první polovině kultivačního období, což by mohlo souviset s produkcí jiných než sledovaných enzymů. Hodnoty koncentrace bílkovin se příliš nelišily od hodnot stanovených při kultivaci na řepných výliscích zvlhčených vodou (viz graf 6).

5.1.3 Produkce celulólytické a polygalakturonasové aktivity pomocí *A. pullulans* na řepných výliscích zvlhčených vodou

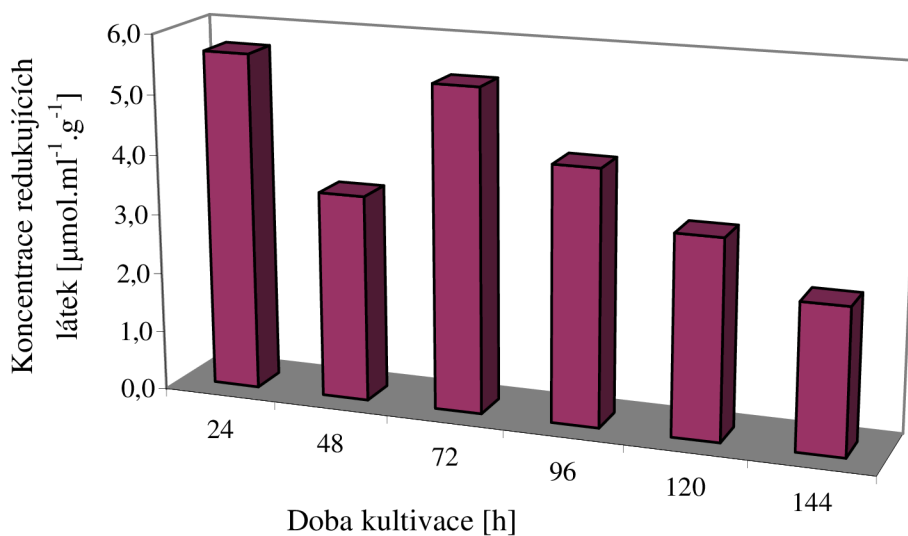
Vypočtené hodnoty celulólytické a polygalakturonasové aktivity ze šestidenní kultivace jsou uvedeny v grafu 10. Z grafu 10 vyplývá, že celulólytická i polygalakturonasová aktivita se v průběhu kultivace střídavě zvyšovala a snižovala. Kolísavý trend aktivity enzymů zřejmě souvisí s nestabilitou produkovaných enzymů. Souběžně s měřením celulólytické a polygalakturonasové aktivity byly v laboratoři provedeny stabilitní testy pro polygalakturonasu, které prokázaly pokles aktivity daného enzymu ve velmi krátkém časovém úseku. Celulólytická aktivita se objevila již po 24 h kultivace a nejvyšší hodnoty dosáhla po 120 h kultivace ($a = 5,448 \pm 0,843 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Polygalakturonasová aktivita se objevila také po 24 h kultivace a maxima dosáhla po 120 h kultivace ($a = 5,778 \pm 0,381 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Produkce polygalakturonasy se výrazně nelišila od produkce celulasy. Výrazný rozdíl v produkci daných enzymů nebyl pozorován ani ve srovnání s kultivací *A. niger* na řepných výliscích zvlhčených vodou (viz graf 4). Po 48 h kultivace bylo ke zbylým vzorkům přidáno 5 ml vody. Přídavek vody mohl ovlivnit produkci daných enzymů.

Graf 10 Závislost produkce celulólytické a polygalakturonasové aktivity na době kultivace *A. pullulans*

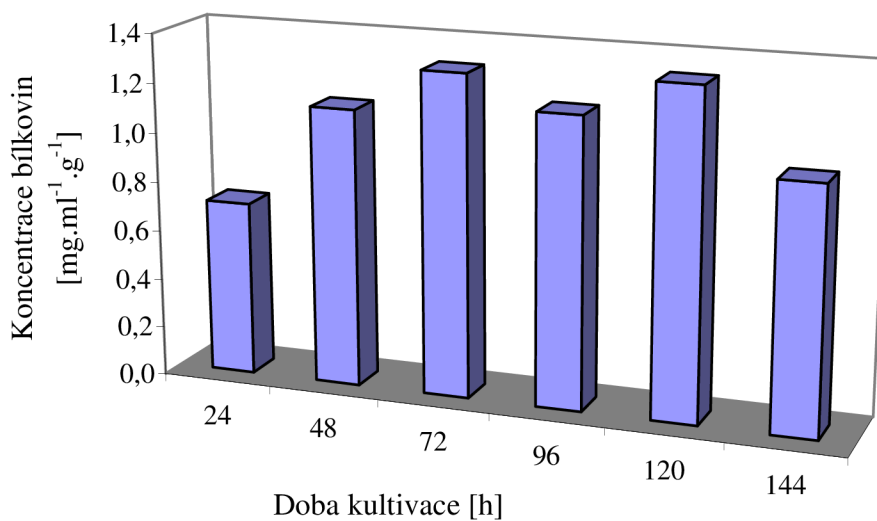


Koncentrace redukujících látek v extraktech je uvedena v grafu 11. Z grafu 11 vyplývá, že koncentrace redukujících látek se v průběhu kultivace snižovala, tak jak tomu bylo u předchozích kultivací (viz graf 5 a graf 8). Koncentrace redukujících látek nabývala vyšších hodnot než při kultivaci *A. niger* na daném substrátu. *A. pullulans* zřejmě tolik nevyužíval volně dostupné sacharidy jako zdroj uhlíku.

Graf 11 Závislost koncentrace redukujících látek na době kultivace *A. pullulans*



Graf 12 Závislost koncentrace extracelulárních bílkovin na době kultivace *A. pullulans*

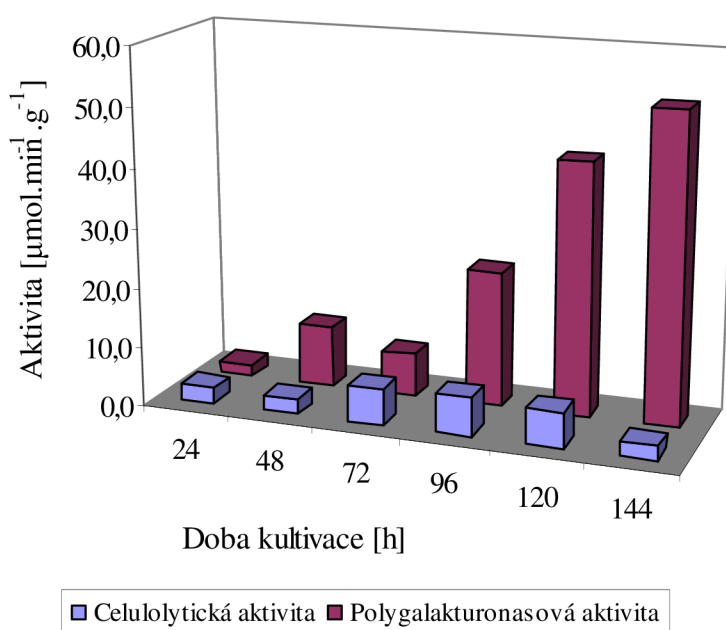


Koncentrace extracelulárních bílkovin je uvedena v grafu 12. Množství bílkovin se nelišilo od hodnot dosažených u předešlých kultivací (viz graf 6 a graf 9). Celulolytická a polygalakturonasová aktivita (viz graf 10) nabývala vyšších hodnot po 72 h a 120 h kultivace, čemuž by odpovídala i zvýšená koncentrace bílkovin.

5.1.4 Produkce celulolytické a polygalakturonasové aktivity pomocí *A. pullulans* na řepných výliscích zvlhčených bezuhlíkatým médiem

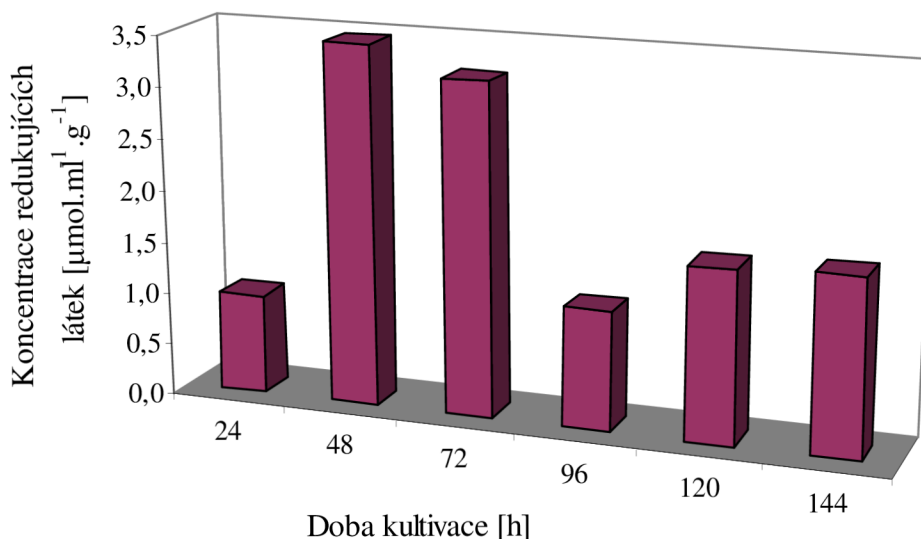
V průběhu šestidenní kultivace byla sledována celulolytická a polygalakturonasová aktivita. Naměřené a vypočtené hodnoty aktivity enzymů jsou uvedeny v grafu 13. Z grafu 13 vyplývá, že vyšších hodnot polygalakturonasové aktivity bylo dosaženo v druhé polovině kultivace. Celulolytická aktivita se objevila již po 24 h kultivace a maxima dosáhla po 96 h kultivace ($a = 6,689 \pm 0,347 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Polygalakturonasová aktivita se objevila také po 24 h kultivace a nejvyšší hodnoty dosáhla po 144 h kultivace ($a = 51,899 \pm 2,553 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Po 48 h kultivace bylo ke zbylým vzorkům přidáno 5 ml bezuhlíkatého média, aby se zabránilo vysychání substrátu. Přídavek média mohl ovlivnit produkci daných enzymů. Zvlhčení bezuhlíkatým médiem mělo výrazný vliv na produkci polygalakturonasy, jejíž maximum bylo řádově vyšší než při kultivaci na substrátu zvlhčeném vodou (viz graf 10). Maximální hodnota celulolytické aktivity se příliš nelišila od maxima dosaženého při kultivaci na řepných výliscích zvlhčených vodou. Podobný vliv bezuhlíkatého média na produkci daných enzymů byl zaznamenán i při kultivaci *A. niger* (viz graf 7). Bezuhlíkaté medium pravděpodobně ovlivnilo i stabilitu enzymů.

Graf 13 Závislost produkce celulolytické a polygalakturonasové aktivity na době kultivace *A. pullulans*

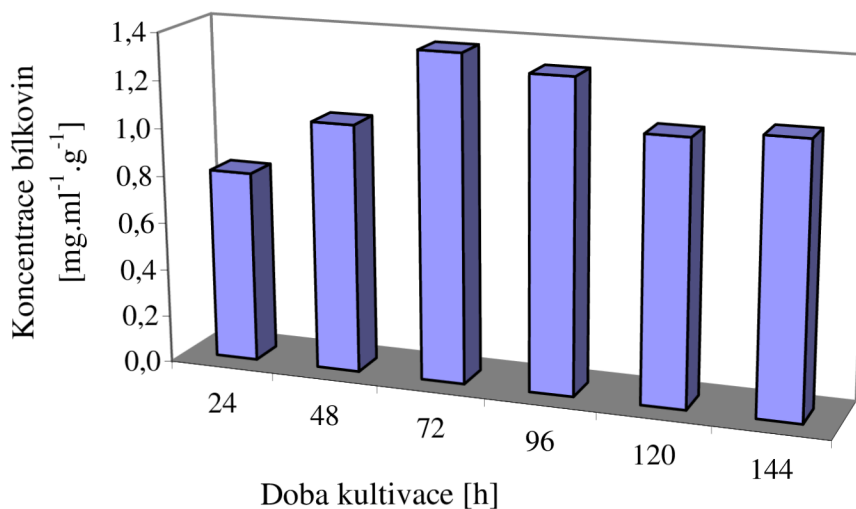


Z grafu 14 vyplývá, že koncentrace redukujících látek byla vyšší v první polovině kulturačního období. Mikroorganismus zřejmě z počátku produkoval i jiné enzymy. Uvedené hodnoty jsou nižší než hodnoty dosažené při kultivaci na daném substrátu zvlhčeném vodou (viz graf 11). Nižší koncentrace redukujících látek by mohla souviset se spotřebou jednoduchých sacharidů mikroorganismem.

Graf 14 Závislost koncentrace redukujících látek na době kultivace *A. pullulans*



Graf 15 Závislost koncentrace extracelulárních bílkovin na době kultivace *A. pullulans*



Koncentrace extracelulárních bílkovin (viz graf 15) se v průběhu kultivace výrazně neměnila a měla podobný trend jako u předešlé kultivace (viz graf 12).

5.2 Kultivace *A. niger* a *A. pullulans* na mleté pšeničné slámě

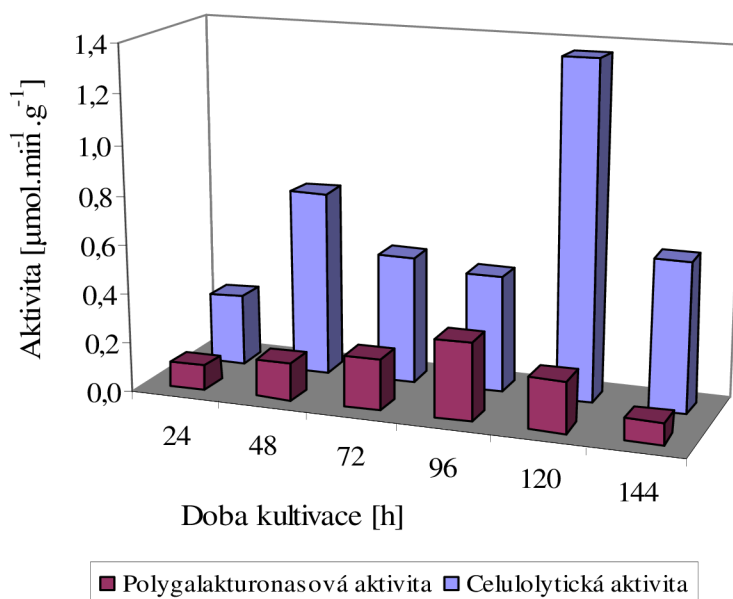
Pšeničná sláma obsahuje v průměru 30 % celulosy, 50 % hemicelulosy a 15 % ligninu. Celulolytické enzymy jsou převážně indukovatelné enzymy, proto byla pšeničná sláma obsahující celulosu zvolena jako substrát ke kultivaci. Kromě celulolytické aktivity byla sledována také polygalakturonasová aktivita [19].

Kultivace *A. niger* resp. *A. pullulans* na mleté pšeničné slámě probíhala obdobným způsobem jako kultivace daných mikroorganismů na řepných výliscích. Kromě zvlhčení bezuhlíkatým médiem byl proveden další optimalizační krok - zvlhčení substrátu glukosovým médiem. Z literatury je známo [66], že přídavek glukosy stimuluje růst biomasy především u kmene *A. niger* a má příznivý vliv na produkci polygalakturonasy. Kultivace mikroorganismů na mleté pšeničné slámě zvlhčené glukosovým médiem probíhala po dobu čtrnácti dní. V průběhu kultivace byl testován vliv glukosy na produkci polygalakturonasové a celulolytické aktivity.

5.2.1 Produkce celulolytické a polygalakturonasové aktivity pomocí *A. niger* na mleté pšeničné slámě zvlhčené vodou

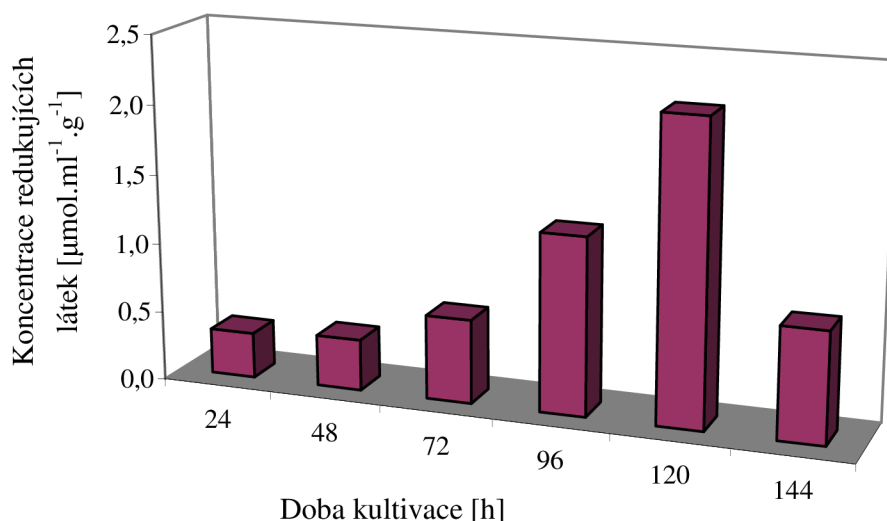
Během šestidenní kultivace byla sledována celulolytická a polygalakturonasová aktivita. Naměřené a vypočtené hodnoty aktivit enzymů jsou uvedeny v grafu 16.

Graf 16 Závislost produkce celulolytické a polygalakturonasové aktivity na době kultivace *A. niger*



Kolísavý trend celulolytické aktivity zaznamenaný v grafu 16 může souviset s nestabilitou enzymu v daném prostředí. Celulolytická aktivita se objevila již po 24 h kultivace a maxima dosáhla po 120 h kultivace ($a = 1,361 \pm 0,129 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Polygalakturonasová aktivita se také objevila po 24 h kultivace a nejvyšší hodnoty dosáhla po 96 h kultivace ($a = 0,316 \pm 0,046 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Po 96 h kultivace byly ke zbylým vzorkům přidány 2 ml vody. Přídavek vody mohl mít vliv na produkci daných enzymů. Při kultivaci na řepných výliscích (viz graf 4) byla vzhledem k obsahu pektinu vyšší polygalakturonasová aktivita, zatímco při dané kultivaci na pšeničné slámě, která je bohatá na celulosu, dosáhla vyšší hodnoty celulolytická aktivita. Hodnoty celulolytické i polygalakturonasové aktivity byly nižší ve srovnání s kultivací na řepných výliscích (viz graf 4).

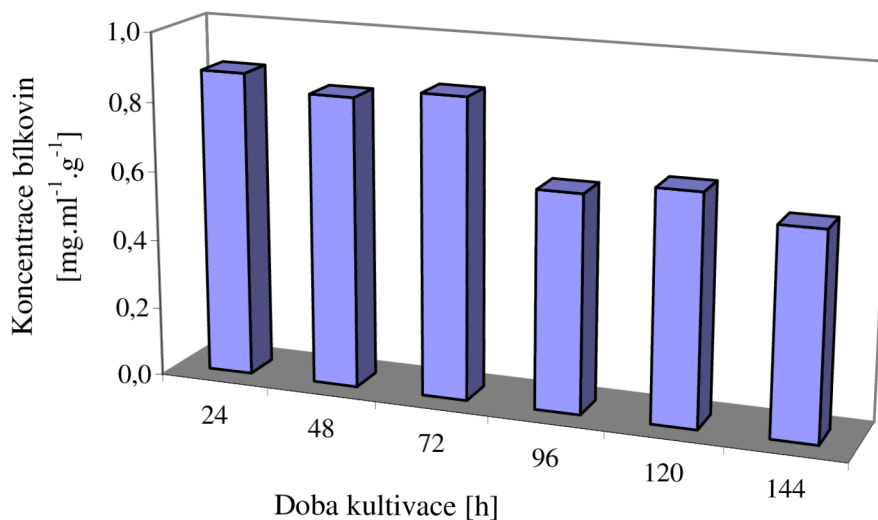
Graf 17 Závislost koncentrace redukcujících látek na době kultivace *A. niger*



Koncentrace redukcujících látek v extraktech je uvedena v grafu 17. Vyšší koncentrace redukcujících látek byla zaznamenána až v druhé polovině kultivačního období. Pšeničná sláma neobsahuje volně dostupné sacharidy, které by mohl mikroorganismus přednostně využívat, tak jak tomu bylo při kultivacích na řepných výliscích. Vyšší koncentrace redukcujících látek by mohly souviset s hydrolytickou činností sledovaných enzymů.

Koncentrace extracelulárních bílkovin je uvedena v grafu 18. Z uvedeného grafu vyplývá, že vyšší koncentrace extracelulárních bílkovin byla zaznamenána v první polovině kultivačního období, z čehož lze usoudit, že mikroorganismus mohl produkovat také jiné enzymy podílející se na degradaci rostlinné biomasy nebo produkoval požadované enzymy, které nebyly tak aktivní.

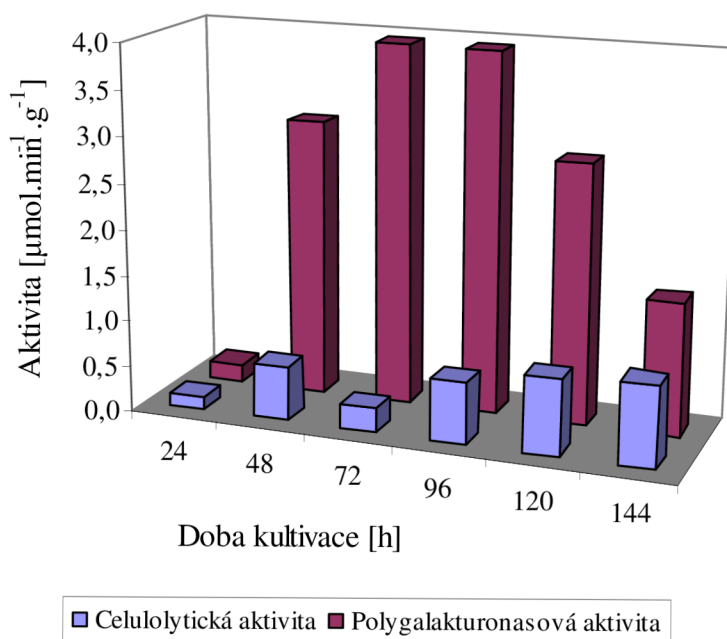
Graf 18 Závislost koncentrace extracelulárních bílkovin na době kultivace *A. niger*



5.2.2 Produkce celulytické a polygalakturonasové aktivity pomocí *A. niger* na mleté pšeničné slámě zvlhčené bezuhlíkatým médiem

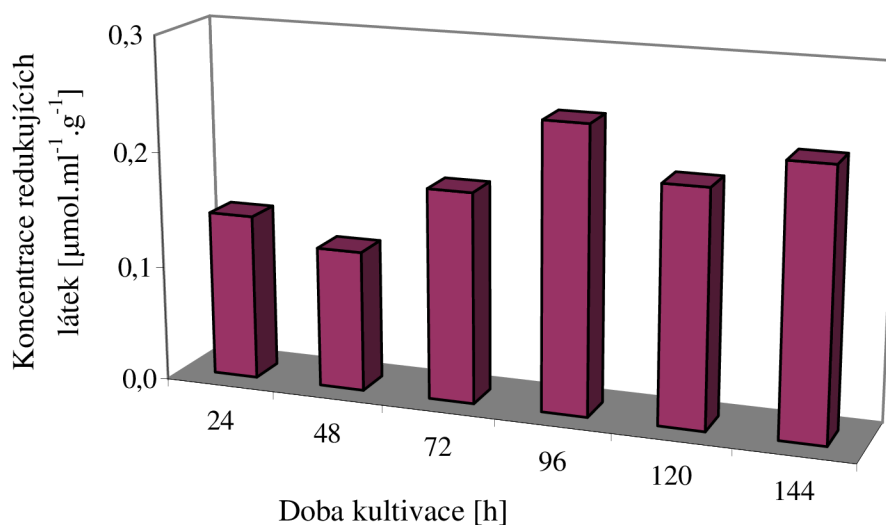
V průběhu šestidenní kultivace byla sledována celulytická a polygalakturonasová aktivita. Vypočtené hodnoty aktivit enzymů jsou uvedeny v grafu 19.

Graf 19 Závislost produkce celulytické a polygalakturonasové aktivity na době kultivace *A. niger*



Polygalakturonasová aktivita uvedená v grafu 19 nabývala vyšších hodnot v první polovině kultivačního období. Celulolytická aktivita se objevila již po 24 h kultivace a maxima dosáhla po 144 h kultivace ($a = 0,895 \pm 0,054 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Polygalakturonasová aktivita se objevila také po 24 h kultivace a nejvyšší hodnota byla zaznamenána po 96 h kultivace ($a = 3,943 \pm 0,089 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Po 96 h kultivace byly ke zbylým vzorkům přidány 2 ml bezuhlíkatého media. Přídavek bezuhlíkatého media mohl mít vliv na produkci daných enzymů. Bezuhlíkaté medium stimulovalo produkci polygalakturonasy (viz graf 19). Celulasa i polygalakturonasa produkovaná na daném substrátu vykazovala nižší aktivitu než tomu bylo u kultivace na řepných výliscích (viz graf 7).

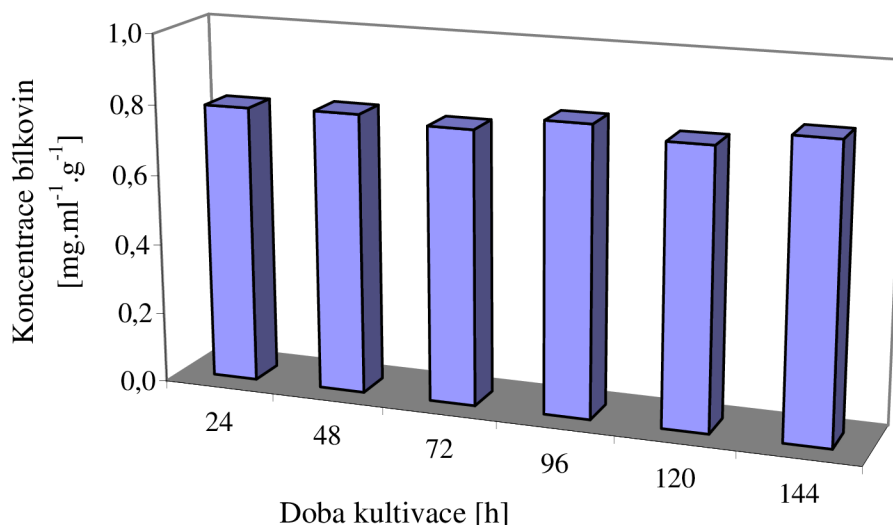
Graf 20 Závislost koncentrace redukcujících látek na době kultivace *A. niger*



Koncentrace redukcujících látek (viz graf 20) nedosahovala vysokých hodnot ve srovnání s ostatními kultivacemi, zřejmě v důsledku složení pšeničné slámy [10].

Koncentrace extracelulárních bílkovin je uvedena v grafu 21. Z grafu 21 vyplývá, že koncentrace bílkovin se v průběhu kultivace neměnila. Neměnná koncentrace bílkovin v porovnání s hodnotami enzymatické aktivity (viz graf 19) svědčí o produkci méně aktivních enzymů nebo souběžné produkci také jiných než sledovaných enzymů.

Graf 21 Závislost koncentrace extracelulárních bílkovin na době kultivace *A. niger*

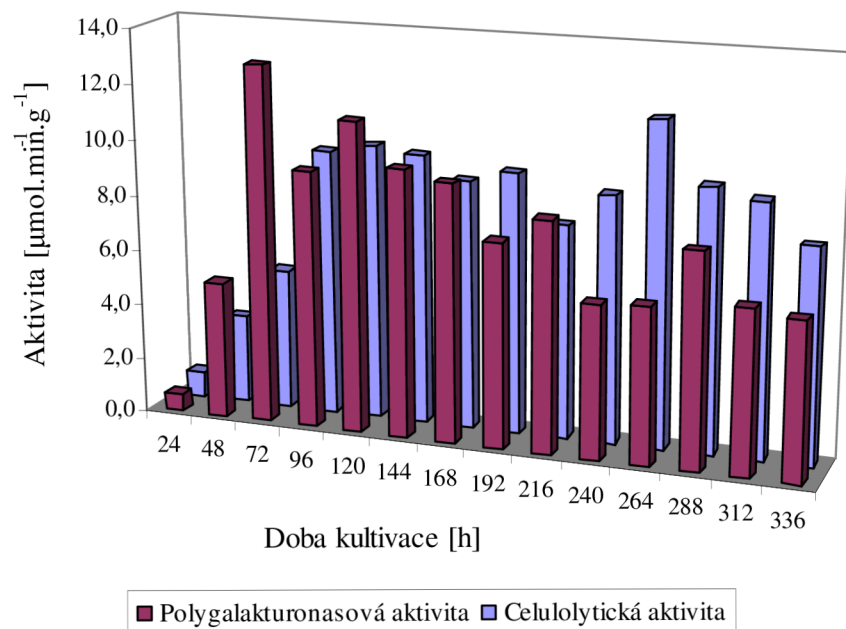


5.2.3 Produkce celulytické a polygalakturonasové aktivity pomocí *A. niger* na mleté pšeničné slámě zvlhčené glukosovým médiem

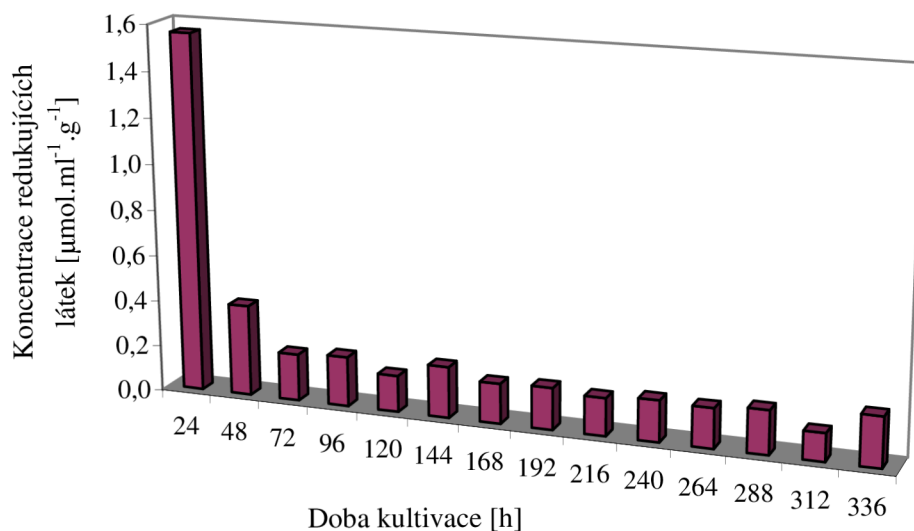
Z literatury je známo [66], že přidavek glukosy stimuluje růst biomasy především u *A. niger* a má příznivý vliv i na produkci pektolytických enzymů. Samotná pšeničná sláma volně dostupnou glukosu neobsahuje, proto byla zvlhčena glukosovým médiem. V průběhu čtrnáctidenní kultivace byla sledována celulytická i polygalakturonasová aktivita a byl testován vliv glukosy na produkci daných enzymů. Naměřené a vypočtené hodnoty aktivit enzymů jsou uvedeny v grafu 22.

Z grafu 22 vyplývá, že celulytická aktivita dosahovala vyšších hodnot až v druhé polovině kultivace, zatímco polygalakturonasová již v první polovině. Celulytická aktivita se objevila po 24 h kultivace a nejvyšší hodnoty dosáhla po 264 h kultivace ($a = 11,625 \pm 0,783 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Polygalakturonasová aktivita se objevila také po 24 h kultivace a maximum bylo zaznamenáno po 72 h kultivace ($a = 12,921 \pm 0,363 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Po 240 h kultivace byly ke zbylým vzorkům přidány 3 ml vody. Přídavek vody mohl ovlivnit produkci daných enzymů. Celulytická i polygalakturonasová aktivita se řádově zvýšila oproti kultivaci na pšeničné slámě zvlhčené bezuhlíkatým médiem (viz graf 19). Hodnoty celulytické aktivity byly dokonce vyšší než u kultivace na řepných výliscích (viz graf 7).

Graf 22 Závislost produkce celulolytické a polygalakturonasové aktivity na době kultivace *A. niger*



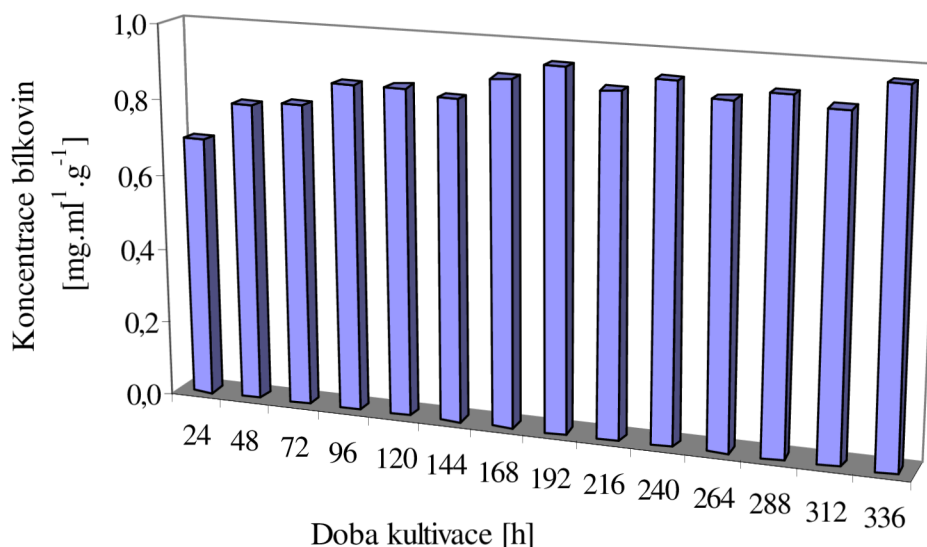
Graf 23 Závislost koncentrace redukcujících látek na době kultivace *A. niger*



Koncentrace redukcujících látek je uvedena v grafu 23. Z uvedených výsledků vyplývá, že po 24 h a 48 h kultivace bylo v extraktech přítomno ještě velké množství přidané glukosy, proto byly hodnoty redukcujících skupin tak vysoké. Od 72 h kultivace zřejmě mikroorganismus začal produkovat sledované enzymy a proto by hodnoty koncentrace redukcujících látek relativně mohly odpovídat redukcujícím látkám vzniklým hydrolytickou činností daných enzymů.

Koncentrace extracelulárních bílkovin je uvedena v grafu 24. Z grafu 24 vyplývá, že koncentrace bílkovin se v průběhu kultivace výrazně neměnila a nabývala podobných hodnot jako u předešlých kultivací.

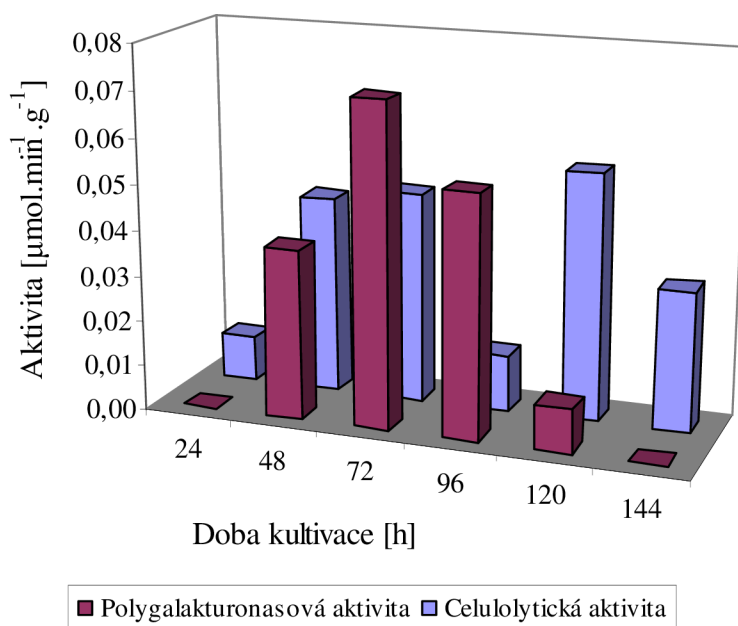
Graf 24 Závislost koncentrace extracelulárních bílkovin na době kultivace *A. niger*



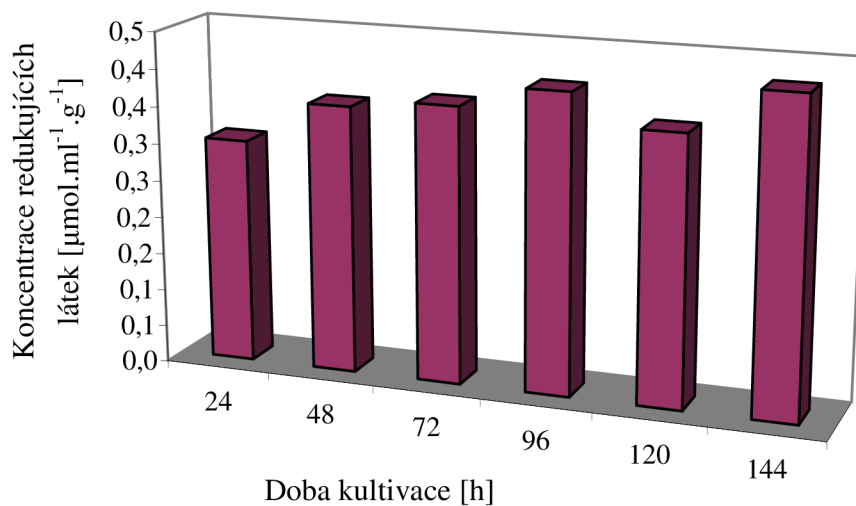
5.2.4 Produkce celulolytické a polygalakturonasové aktivity pomocí *A. pullulans* na mleté pšeničné slámě zvlhčené vodou

V průběhu šestidenní kultivace byla sledována celulolytická a polygalakturonasová aktivita. Naměřené a vypočtené hodnoty aktivit enzymů jsou uvedeny v Grafu 25. Polygalakturonasová aktivita se pohybovala v intervalu od 0,01 do 0,07 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ nebo nebyla zaznamenána vůbec. Celulolytická aktivita se pohybovala v rozmezí od 0,01 do 0,05 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. V porovnání s kultivací daného mikroorganismu na řepných výliscích nebyl na substrátu vizuálně pozorován nárůst biomasy. Polygalakturonasová i celulolytická aktivita dosahovala ve srovnání s předešlými kultivacemi velmi nízkých hodnot, z čehož vyplývá, že kultivace mikroorganismu za daných podmínek není příliš vhodná k produkci sledovaných enzymů.

Graf 25 Závislost produkce celulytické a polygalakturonasové aktivity na době kultivace *A. pullulans*



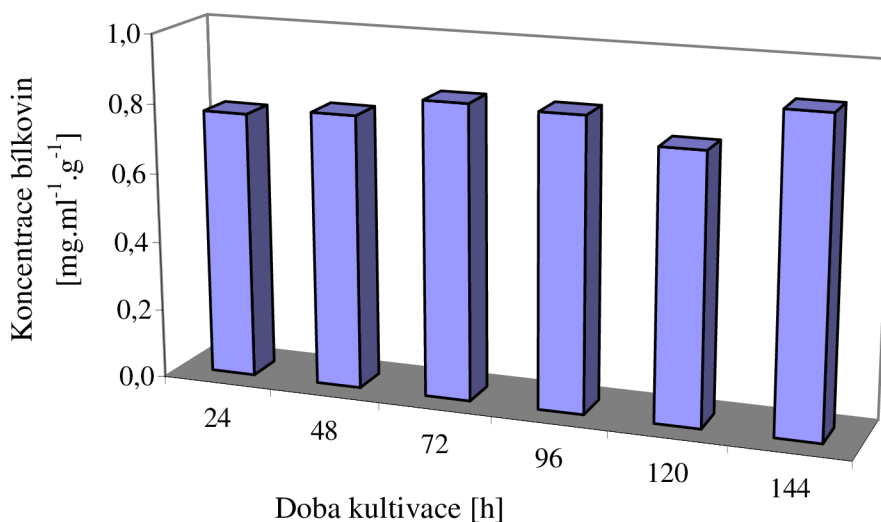
Graf 26 Závislost koncentrace redukujících látek na době kultivace *A. pullulans*



Koncentrace redukujících látek v extraktech uvedená v grafu 26 nedosahovala vysokých hodnot ve srovnání s ostatními kultivacemi. Velmi nízká celulytická i polygalakturonasová aktivita (viz graf 25) svědčí o tom, že mikroorganismus zřejmě produkoval i jiné enzymy podílející se na degradaci rostlinné biomasy.

Koncentrace extracelulárních bílkovin (viz graf 27) dosahovala podobných hodnot jako u předešlých kultivací. Z uvedených výsledků lze usoudit, že kromě sledovaných enzymů, které vykazovaly velmi nízkou aktivitu, byly produkovány také jiné enzymy podílející se na degradaci rostlinné biomasy.

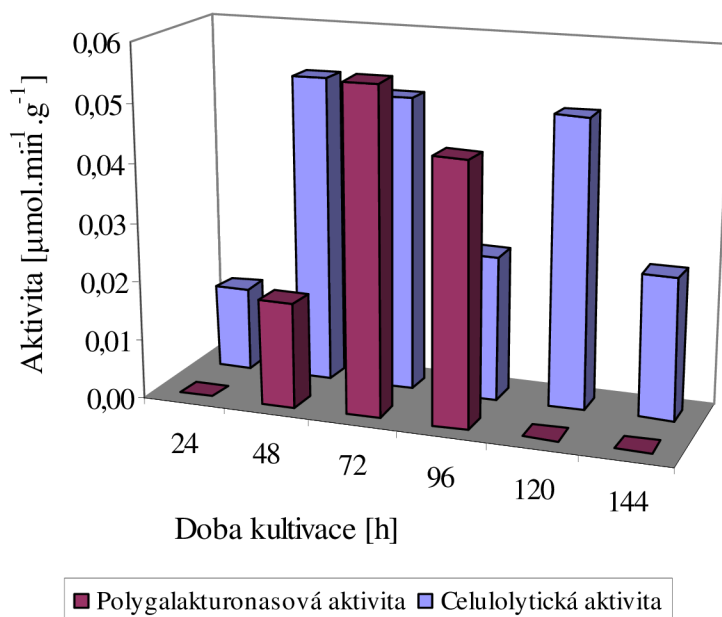
Graf 27 Závislost koncentrace extracelulárních bílkovin na době kultivace *A. pullulans*



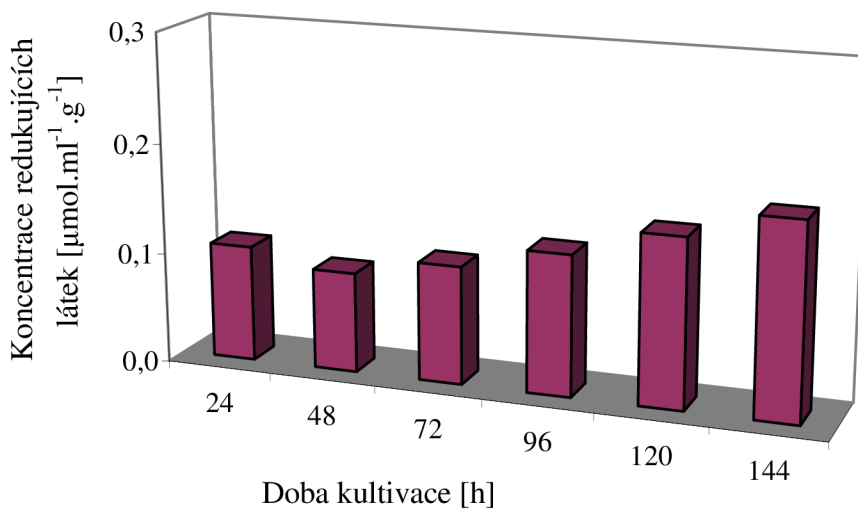
5.2.5 Produkce celulytické a polygalakturonasové aktivity pomocí *A. pullulans* na mleté pšeničné slámě zvlhčené bezuhlíkatým médiem

V průběhu šestidenní kultivace byla sledována celulytická a polygalakturonasová aktivita. Naměřené a vypočtené hodnoty aktivit enzymů jsou uvedeny v grafu 28. Z uvedeného grafu vyplývá, že polygalakturonasová i celulytická dosahovala velmi nízkých hodnot. Bezuhlíkaté medium nemělo vliv na produkci daných enzymů. Polygalakturonasová aktivita se pohybovala v rozmezí od 0,02 do 0,06 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ nebo nebyla zaznamenána vůbec. Celulytická aktivita se pohybovala v intervalu od 0,01 do 0,05 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. V porovnání s kultivací daného mikroorganismu na řepných výliscích nebyl na substrátu vizuálně pozorován nárůst biomasy. Polygalakturonasová i celulytická aktivita dosahovala velmi nízkých hodnot, srovnatelných s předešlou kultivací (viz graf 25). Kultivace mikroorganismu za daných podmínek není příliš vhodná pro produkci sledovaných enzymů.

Graf 28 Závislost produkce celulytické a polygalakturonasové aktivity na době kultivace *A. pullulans*



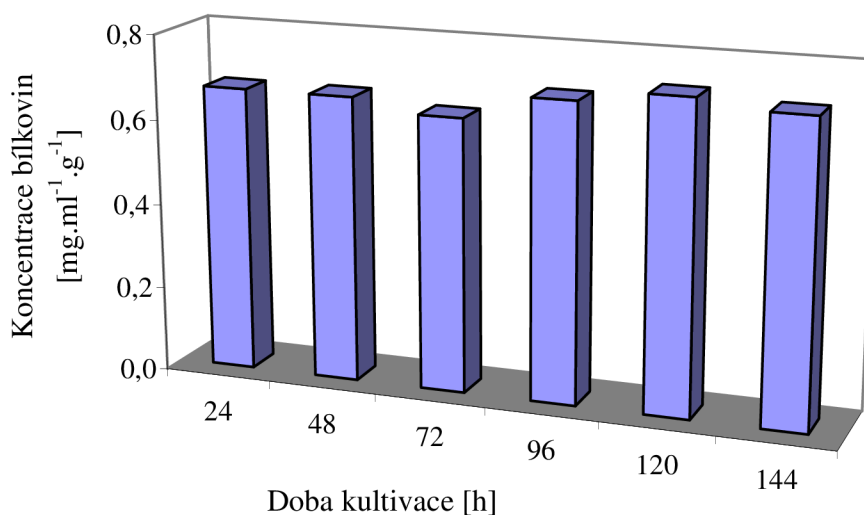
Graf 29 Závislost koncentrace redukujících látek na době kultivace *A. pullulans*



Koncentrace redukujících látek uvedená v grafu 29 se v průběhu kultivace téměř neměnila a dosahovala nejnižších hodnot ve srovnání s ostatními kultivacemi.

Koncentrace extracelulárních bílkovin je uvedena v grafu 30. Z uvedeného grafu vyplývá, že koncentrace bílkovin se v průběhu kultivace neměnila. Z výsledků lze usoudit, že kromě sledovaných enzymů, které vykazovaly velmi nízkou aktivitu, byly produkovány také jiné enzymy podílející se na degradaci rostlinné biomasy.

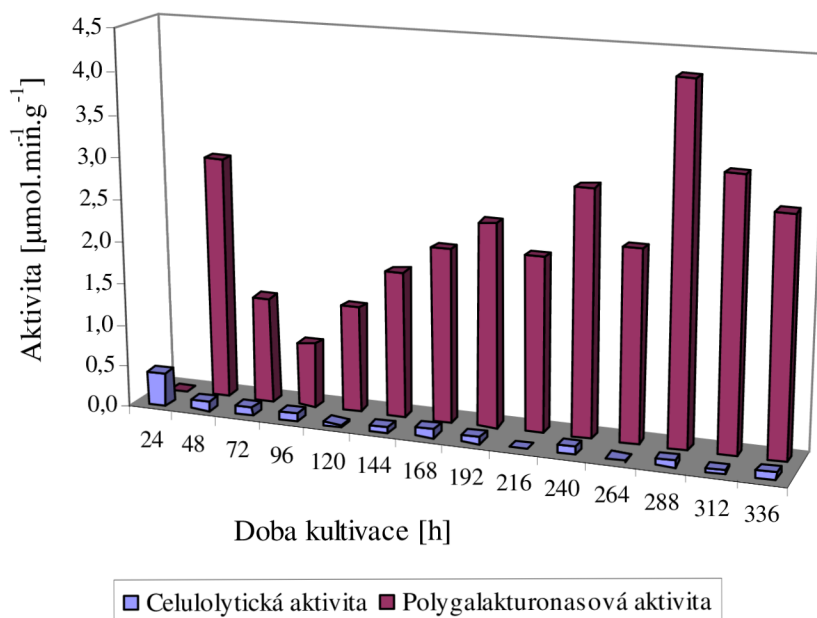
Graf 30 Závislost koncentrace extracelulárních bílkovin na době kultivace *A. pullulans*



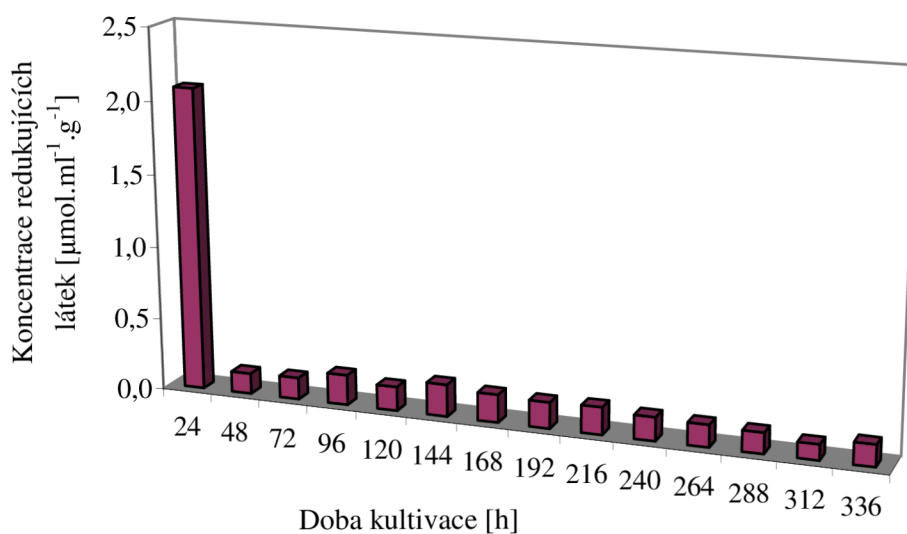
5.2.6 Produkce celulólytické a polygalakturonasové aktivity pomocí *A. pullulans* na mleté pšeničné slámě zvlhčené glukosovým médiem

V průběhu čtrnáctidenní kultivace byla sledována celulólytická a polygalakturonasová aktivita. Naměřené a vypočtené hodnoty aktivit enzymů jsou uvedeny v grafu 31. Celulólytická aktivita se v průběhu kultivace výrazně neměnila. Nejvyšší hodnota byla zaznamenána již po 24 h ($a = 0,396 \pm 0,145 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Polygalakturonasová aktivita se objevila po 48 h kultivace a vyšších hodnot dosahovala v druhé polovině kultivačního období. Maximální hodnota polygalakturonasové aktivity byla zaznamenána po 288 h kultivace ($a = 4,218 \pm 0,104 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Po 120 h a následně po 264 h kultivace byly ke zbylým vzorkům přidány 2 ml vody. Přídavek vody mohl mít vliv na produkci daných enzymů. Zvlhčení glukosovým médiem stimulovalo produkci sledovaných enzymů. Výrazný vliv glukosy byl pozorován u produkce polygalakturonasové aktivity, která oproti kultivaci na daném substrátu zvlhčeném vodou nebo bezuhlíkatým médiem vzrostla až několikanásobně.

Graf 31 Závislost produkce celulytické a polygalakturonasové aktivity na době kultivace *A. pullulans*

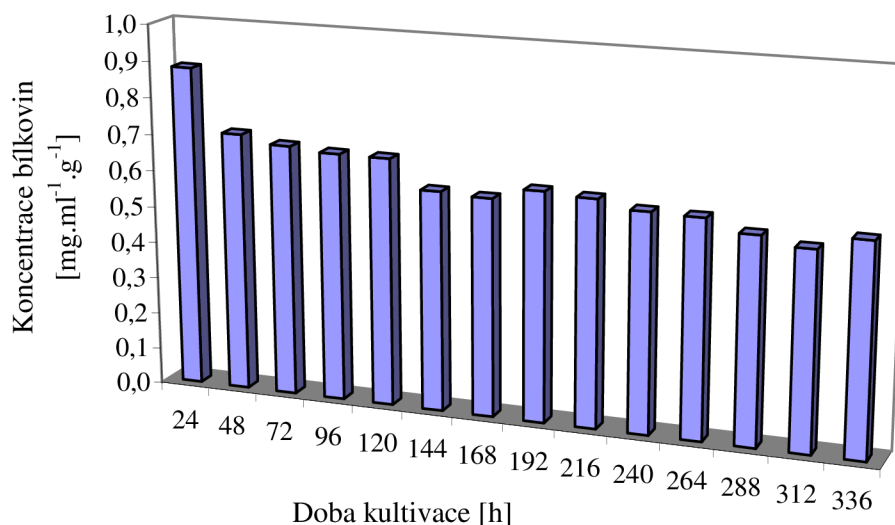


Graf 32 Závislost koncentrace redukujících látek na době kultivace *A. pullulans*



Koncentrace redukujících látek v extraktech je uvedena v grafu 32. Z uvedených výsledků vyplývá, že po 24 h kultivace bylo v extraktu přítomno ještě velké množství přidané glukosy, proto byla koncentrace redukujících skupin tak vysoká. Od 48 h kultivace do 336 h kultivace se koncentrace výrazně neměnila a nabývala podobných hodnot jako při kultivaci *A. niger* za stejných podmínek (viz graf 23).

Graf 33 Závislost koncentrace extracelulárních bílkovin na době kultivace *A. pullulans*



Koncentrace extracelulárních bílkovin je uvedena v grafu 33. Koncentrace bílkovin nabývala podobných hodnot jako u kultivace *A. niger* za daných podmínek (viz graf 24). Z počátku kultivace mohl mikroorganismus produkovat i jiné než sledované enzymy.

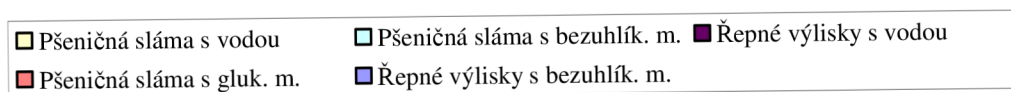
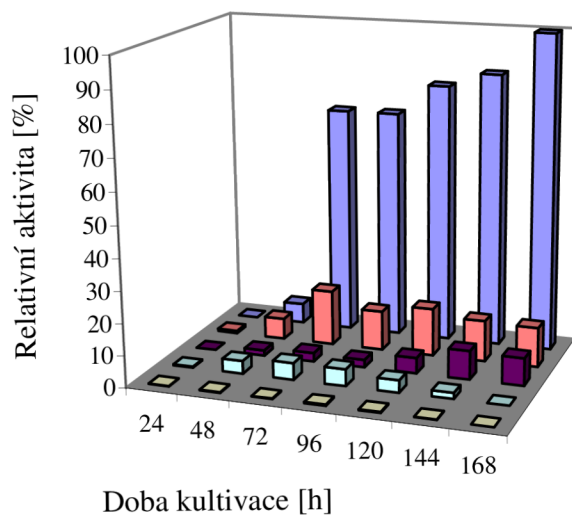
5.3 Shrnutí výsledků

Aspergillus niger patří mezi významné mikroorganismy používané v biotechnologii. Je schopen růst v širokém rozmezí teplot a hodnot pH. Nevyžaduje náročné podmínky ke kultivaci, a proto je využíván pro průmyslovou produkci celulolytických a pektolytických enzymů. Pro průmyslové aplikace se používá také *Aureobasidium pullulans*, který kromě polysacharidu pullulanu produkuje potravinářsky významné extracelulární enzymy. Oba mikroorganismy je možné kultivovat za podmínek submerzní fermentace i „solid-state fermentation“. Z hlediska vyšších enzymových výtěžků je upřednostňován proces SSF. Literatura uvádí kultivace daných mikroorganismů za podmínek SSF na různých odpadních materiálech [42, 43, 52].

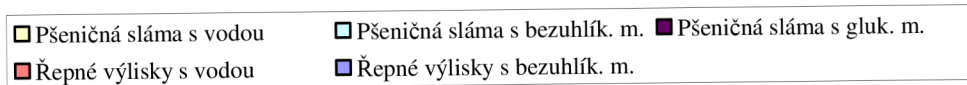
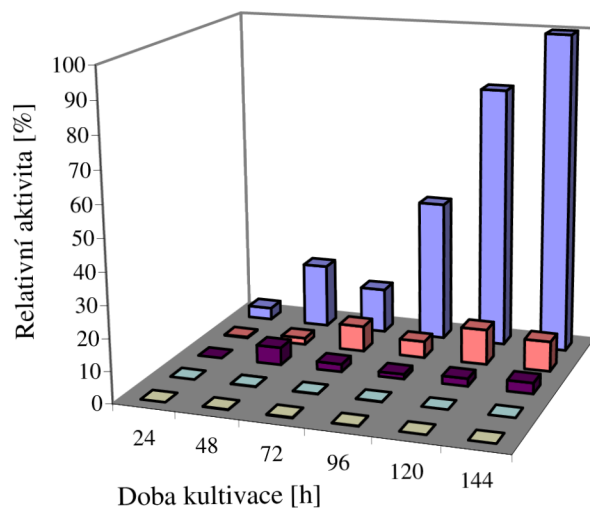
Pro studium produkce hydrolytických enzymů byly z odpadních materiálů vybrány řepné výlisky a mletá pšeničná sláma. U řepných výlisků se z hlediska obsahu pektinu předpokládala vyšší produkce pektolytických enzymů, zatímco u pšeničné slámy obsahující značný podíl celulosy byla předpokládána vyšší produkce celulolytických enzymů.

Pro srovnání jednotlivých kultivací byly použity hodnoty aktivit enzymů v intervalu od 24 h do 144 h (168 h) kultivace.

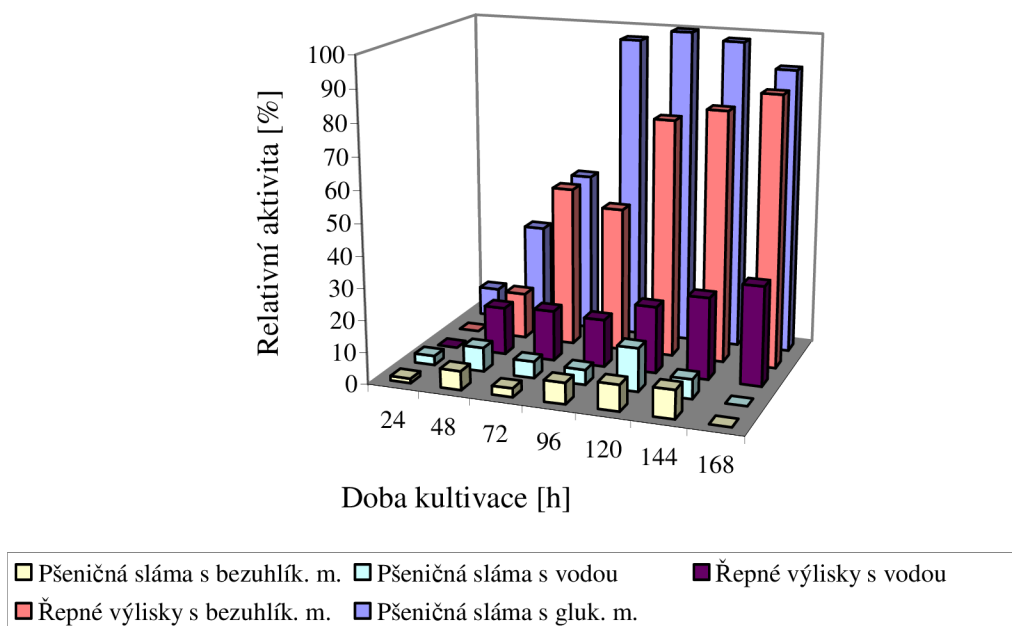
Graf 34 Závislost relativní polygalakturonasové aktivity na době kultivace *A. niger*



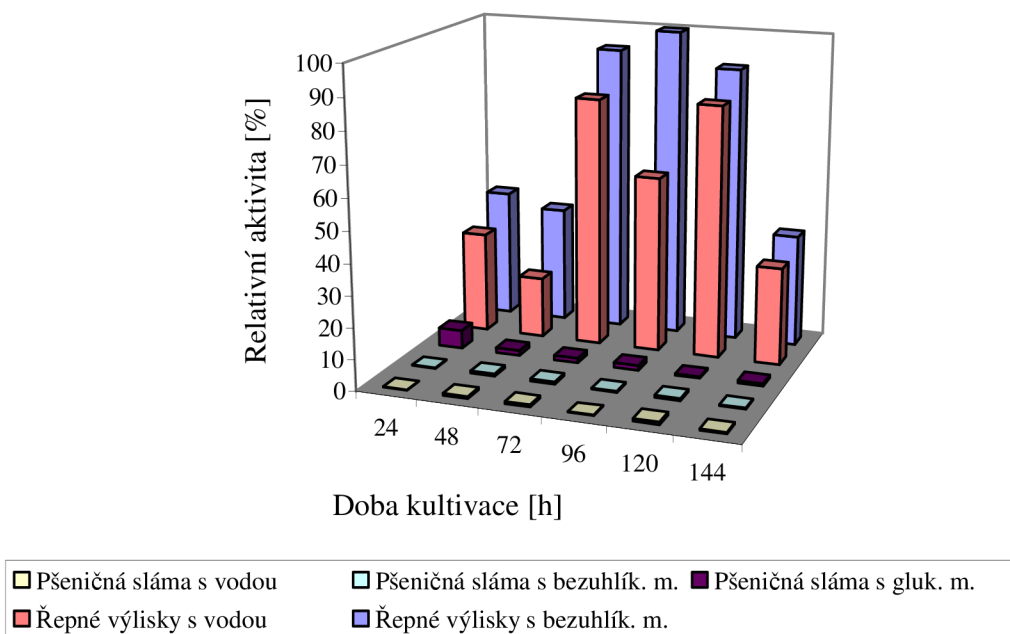
Graf 35 Závislost relativní polygalakturonasové aktivity na době kultivace *A. pullulans*



Graf 36 Závislost relativní celulytické aktivity na době kultivace *A. niger*



Graf 37 Závislost relativní celulytické aktivity na době kultivace *A. pullulans*



Polygalakturonasová aktivita produkovaná pomocí *A. niger* za různých podmínek je uvedena v grafu 34. Relativní polygalakturonasová aktivita se snižovala v závislosti na použitém substrátu v tomto pořadí: řepné výlisky zvlhčené bezuhlíkatým m. > pšeničná sláma zvlhčená glukosovým m. > řepné výlisky zvlhčené vodou > pšeničná sláma zvlhčená bezuhlíkatým m. > pšeničná sláma zvlhčená vodou. Nejvyšší polygalakturonasová aktivita $a = 74,182 \pm 2,383 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ byla zaznamenána po 168 h kultivace na řepných výliscích zvlhčených bezuhlíkatým médiem a odpovídá relativní aktivitě 100 %.

Polygalakturonasová aktivita produkovaná pomocí *A. pullulans* za různých podmínek je uvedena v grafu 35. Relativní polygalakturonasová aktivita se snižovala v závislosti na použitém substrátu v tomto pořadí: řepné výlisky zvlhčené bezuhlíkatým m. > řepné výlisky zvlhčené vodou > pšeničná sláma zvlhčená glukosovým m. > pšeničná sláma zvlhčená bezuhlíkatým m. > pšeničná sláma zvlhčená vodou. Nejvyšší polygalakturonasová aktivita $a = 51,899 \pm 2,553 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ byla zaznamenána po 144 h kultivace na řepných výliscích zvlhčených bezuhlíkatým médiem a odpovídá relativní aktivitě 100 %.

Celulolytická aktivita produkovaná pomocí *A. niger* za různých podmínek je uvedena v grafu 36. Relativní celulolytická aktivita se snižovala v závislosti na použitém substrátu v tomto pořadí: pšeničná sláma zvlhčená glukosovým m. > řepné výlisky zvlhčené bezuhlíkatým m. > řepné výlisky zvlhčené vodou > pšeničná sláma zvlhčená vodou > pšeničné sláma zvlhčená bezuhlíkatým m. Maximální hodnota celulolytické aktivity $a = 9,933 \pm 0,432 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ byla zaznamenána po 120 h kultivace na pšeničné slámě zvlhčené glukosovým médiem a odpovídá relativní aktivitě 100 %.

Celulolytická aktivita produkovaná pomocí *A. pullulans* za různých podmínek je uvedena v grafu 37. Relativní celulolytická aktivita se snižovala v závislosti na použitém substrátu v tomto pořadí: řepné výlisky zvlhčené bezuhlíkatým m. > řepné výlisky zvlhčené vodou > pšeničná sláma zvlhčená glukosovým m. > pšeničná sláma zvlhčená bezuhlíkatým m. > pšeničná sláma zvlhčená vodou. Nejvyšší celulolytická aktivita $a = 6,689 \pm 0,347 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ byla zaznamenána po 96 h kultivace na řepných výliscích zvlhčených bezuhlíkatým médiem a odpovídá relativní aktivitě 100 %.

Z výše uvedených hodnot vyplývá, že nejvyšší polygalakturonasová i celulolytická aktivita byla zaznamenána při kultivaci *A. niger*, čímž se potvrdilo tvrzení Leite a kol. [72], že růstové podmínky v procesu SSF vyhovují spíše vláknitým houbám než kvasinkám. Vhodnějším substrátem ke kultivaci daného mikroorganismu a produkci polygalakturonasové aktivity byly vzhledem k obsahu pektinu řepné výlisky. Vhodným substrátem k produkci celulolytické aktivity byla vzhledem k obsahu celulosy pšeničná sláma. Při kultivaci *A. niger* a *A. pullulans* na daných substrátech byl potvrzen pozitivní vliv bezuhlíkatého media na produkci celulasu i polygalakturonasy. Stimulační efekt na produkci daných enzymů vykazovala také glukosa přidaná do media při kultivaci mikroorganismů na pšeničné slámě zvlhčené glukosovým médiem [65, 66, 70].

6 ZÁVĚR

Cílem práce bylo ověřit produkci celulasy a polygalakturonasy na zvolených odpadních materiálech, porovnat produkci enzymů u vybraných mikroorganismů a zvolit nejvhodnější substrát a mikroorganismus k produkci požadovaných enzymů. Při kultivaci na pšeničné slámě byl otestován vliv přídavku glukosy na produkci celulasy a polygalakturonasy.

Mikroorganismy byly kultivovány na řepných výliscích a pšeničné slámě za různých podmínek. Při kultivaci *A. niger* bylo nejvyšší celulolytické aktivity ($a = 11,625 \pm 0,783 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) dosaženo na pšeničné slámě zvlhčené glukosovým médiem. Nejvyšší polygalakturonasové aktivity ($a = 74,182 \pm 2,383 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) bylo dosaženo při kultivaci daného mikroorganismu na řepných výliscích zvlhčených bezuhlíkatým médiem. Při kultivaci *A. pullulans* bylo nejvyšší celulolytické aktivity ($a = 6,689 \pm 0,347 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) dosaženo na řepných výliscích zvlhčených bezuhlíkatým médiem. Nejvyšší polygalakturonasové aktivity ($a = 51,899 \pm 2,553 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) bylo dosaženo při kultivaci daného mikroorganismu také na řepných výliscích zvlhčených bezuhlíkatým médiem.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že nejvyšší hodnoty polygalakturonasové aktivity ($a = 74,182 \pm 2,383 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) bylo dosaženo při kultivaci *Aspergillus niger* na řepných výliscích zvlhčených bezuhlíkatým médiem. Jako zdroj uhlíku sloužil při dané kultivaci pektin a malý podíl glukosy nebo sacharosy obsažený v řepných výliscích. Maximální hodnota polygalakturonasové aktivity byla řádově vyšší ve srovnání s kultivací na řepných výliscích zvlhčených vodou. Nejvyšší hodnoty celulolytické aktivity ($a = 11,625 \pm 0,783 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) bylo dosaženo při kultivaci *Aspergillus niger* na pšeničné slámě zvlhčené glukosovým médiem. Jako zdroj uhlíku sloužila při dané kultivaci celulosa a glukosa. Maximální hodnota celulolytické aktivity byla řádově vyšší v porovnání s kultivací na pšeničné slámě zvlhčené bezuhlíkatým médiem.

Pozitivní vliv bezuhlíkatého media na produkci celulasy i polygalakturonasy byl pozorován téměř u všech kultivací. Minerální látky obsažené v bezuhlíkatém mediu jsou proto nezbytné pro růst mikroorganismu a produkci daných enzymů. Vliv přídavku glukosy na produkci celulasy a polygalakturonasy byl pozorován při kultivaci *A. niger* resp. *A. pullulans* na pšeničné slámě zvlhčené glukosovým médiem. Celulolytická i polygalakturonasová aktivita se u obou mikroorganismů řádově zvýšila oproti kultivaci na pšeničné slámě zvlhčené bezuhlíkatým médiem. Tím se potvrdilo tvrzení autorů Maldonado a Strasser [66], že přídavek glukosy ($c = 20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) do media v procesu SSF má za následek rychlejší a větší nárůst biomasy a stimuluje především produkci polygalakturonasy.

Z dosažených výsledků vyplývá, že produkce celulasy a polygalakturonasy závisí na volbě vhodného mikroorganismu, substrátu a kultivačních podmínek. Významnou roli hraje také zdroj uhlíku a přítomnost minerálních látek nezbytných pro růst mikroorganismu a produkci požadovaných metabolitů.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 1*. Tábor: OSSIS, 1999. 328 s. ISBN 80-902391-3-7.
- [2] TOLAN, S. J.; FOODY, B.; CEN, P.; XIA, L. *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 1999. ISBN 3-540-65577-8.
- [3] PAULOVÁ, L.; PAVLOVÁ, E.; OLŠAN, V.; JAISAMUT, K.; LIPOVSKÝ, J.; RYCHTERA, M.; MELZUCH, K. *Biom.cz* [online]. 2010-11-24 [cit. 2011-04-26]. Využití odpadních materiálů na bázi lignocelulózy jako suroviny pro výrobu bioetanolu. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/vyuziti-odpadnich-materialu-na-bazi-lignocelulozy-jako-suroviny-pro-vyrobu-bioetanolu>>.
- [4] JAYANI, S. R.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*. 2005, 14, pp. 2931-2944.
- [5] PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, R. C.; LARROCHE, CH. *Enzyme Technology*. Springer Science + Business Media. 2006. ISBN 0-387-29294-2.
- [6] PEDROLI, B. D.; MONTEIRO, C. A.; GOMES, E.; CARMONA, C. E. Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. *The Open Biotechnology Journal*. 2009, 3, pp. 9-18.
- [7] VODRÁŽKA, Z. *Enzymologie*. 3. vyd. Praha: VŠCHT, 1998. 171 s. ISBN 80-7080-330-4.
- [8] FAWOLE, B. O.; ODUNFA, A. S. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2003, 52, pp. 223-227.
- [9] HŘEBÍČEK, J. *Biom.cz* [online]. 2009-05-13 [cit. 2011-04-24]. Prognóza nakládání s biodegradabilním odpadem v ČR do roku 2020. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/prognoza-nakladani-s-biodegradabilnim-odpadem-v-cr-do-roku-2020>>.
- [10] *Portal.gov.cz* [online]. 2003 [cit. 2011-04-24]. Vyhledávání v předpisech ze Sbírky zákonů. Dostupné z WWW: <http://portal.gov.cz/wps/portal/_s.155/701/.cmd/ad/.c/313/.ce/10821/.p/8411/_s.155/701?PC_8411_number1=185/2001&PC_8411_p=33a&PC_8411_l=185/2001&PC_8411_ps=10#10821>.
- [11] MAREK, M.; VOLDŘICH, M. *Odpady z potravinářských výrob v životním prostředí* [online]. Praha 6: VŠCHT, 2006 [cit. 2011-04-24]. Dostupné z WWW: <http://www.phytosanitary.org/projekty/2005/VVF_07_2005.pdf>.

- [12] Biologicky rozložitelný odpad . *Odpadové fórum* [online]. 2006, 3, [cit. 2011-04-24]. Dostupný z WWW: <<http://www.odpadoveforum.cz/2006/3.pdf>>.
- [13] ZEMÁNEK, P. a kol. *Biologicky rozložitelné odpady a kompostování* [online]. 1. vyd. Praha: VÚZT, v.v.i., 2010 [cit. 2011-04-24]. Dostupné z WWW: <<http://212.71.135.254/vuzt/poraden/prirucky/2010-1.pdf?menuid=674>>.
- [14] KADLEC, P. a kol. *Technologie sacharidů*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2000. 138 s. ISBN 80-7080-400-9.
- [15] KONVALINA, P. *Biom.cz* [online]. 2007-08-02 [cit. 2011-04-24]. Sláma nejen na ozdobu. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/legislativa/fyto-legislativa/slama-nejen-na-ozdobu>>.
- [16] FILIP, J. *Odpadové hospodářství*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2002. 118 s. ISBN 80-7157-608-5.
- [17] Nakládání s odpady. *EKO-KOMUNIKACE* [online]. 2006, 3, [cit. 2011-04-24]. Dostupný z WWW: <http://www.ekokom.cz/assets/Klienti/zpravodaj_3_06.pdf>.
- [18] BIN KASSEBULLAH, M. N. *Production of cellulase enzymes from Aspergillus terreus SUK-1 using sugar cane waste: The effect of substrate concentration and assay temperature*. Faculty of Chemical Engineering and Natural Resources, 2006. Bachelor's Thesis. Kolej Universiti Kejuruteraan dan Teknologi Malaysia.
- [19] SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresource Technology*. 2002, 83, pp. 1-11.
- [20] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2. vyd., opravené. Praha 1: Academia, 2002. 508 s. ISBN 978-80-200-0600-4.
- [21] *Emeraldinsight.com* [online]. 1994 [cit. 2011-04-24]. Chemistry in the Kitchen - Fruit and Vegetables 1. Dostupné z WWW: <http://www.emeraldinsight.com/content_images/fig/0170940506005.png>.
- [22] KLAZAN, V. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Praha 5: Galén, 2005. 654 s. ISBN 80-7262-341-9.
- [23] NIKOLOV, T.; BAKALOVA, N.; PETROVA, S.; BENADOVA, R.; SPASOV, S.; KOLEV, D. An effective method for bioconversion of delignified waste-cellulose fibers from the paper industry with a cellulase complex. *Bioresource Technology*. 2000, 71, pp. 1-4.
- [24] ČOPÍKOVÁ, J. *Chemie a analytika sacharidů*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1997. 104 s. ISBN 80-7080-306-1.

- [25] JEFFRIES, W. T. Biodegradation of lignin and hemicelluloses. *Biochemistry of Microbial Degradation*. 1994, pp. 233-277.
- [26] *Plant Physiology* [online]. 2006 [cit. 2011-04-24]. Detailed Chemical Structure of a Portion of a Lignin Molecule. Dostupné z WWW: <<http://4e.plantphys.net/image.php?id=130>>.
- [27] PÉREZ, J.; MUNOZ-DORADO, J.; RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelulose and lignin: an overview. *Int Microbiol*. 2002, 5, pp. 53-63.
- [28] *Wikimedia Commons* [online]. 2008-04-20 [cit. 2011-04-24]. Pektin2. Dostupné z WWW: <<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/archive/6/66/20080420095945!Pektin2.svg>>.
- [29] BHAT, K. M.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*. 1997, vol. 15, pp. 583-620.
- [30] NIGAM, P.S.; PANDEY, A. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization*. Springer Science + Business Media B.V. 2009. ISBN 978-1-4020-9942-7.
- [31] ABO-STATE, M. A. M.; HAMMAD, I. A.; SWELIM, M.; GRANNAM, B. R. Enhanced Production of Cellulase(S) By *Aspergillus spp.* Isolated From Agriculture Wastes by Solid State Fermentation. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*. 2010, 8 (4), pp. 402-410.
- [32] CHERRY, R. J.; FIDANTSEF, L. A. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*. 2003, 14, pp. 438-443.
- [33] MARTIN, N.; SOUZA, R. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase Production by Fungal Strains in Solid-State Fermentation Using Agro-Industrial Bioproduct. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2004, vol. 47, n. 5, pp. 813-819.
- [34] BIELY, P.; HEINRICHOVÁ, K.; ABZIKOVÁ, K. M. Induction and Inducers of the Pectolytic System in *Aureobasidium pullulans*. *Current Microbiology*. 1995, vol. 33, n. 1, pp. 6-10.
- [35] TASKIN, E.; STRATILOVÁ, E. Polygalacturonases Produced Under Solid State and Submerged Fermentation Conditions by Two Strains of *Aspergillus foetidus*. *Turkish Journal of Biochemistry*. 2008, 33 (4), pp. 190-196.
- [36] ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, J. M.; SERRA, L. J. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*. 1998, vol. 33, n. 1, pp. 21-28.

- [37] BANERJEE, G.; SCOTT-CRAIG, S. J.; WALTON, D. J. Improving Enzymes for Biomass Conversion: A Basic Research Perspective. *Bioenerg. Res.* 2010, 3, pp. 82-92.
- [38] RATLEDGE, C.; KRISTIENSEN, B. *Basic Biotechnology*. 2nd edition. Cambridge University Press. 2001. ISBN 0 521 77074 2.
- [39] JEYA, M.; NGUYEN, T. P. N.; MOON, J. H.; KIM, H. S.; LEE, K. J. Conversion of woody biomass into fermentable sugars by cellulase from *Agaricus arvensis*. *Biore-source Technology*. 2010, 101, pp. 8742-8749.
- [40] LO, CH. I.; LU, CH. W.; CHEN, Y. CH.; CHEN, M. W.; CHANG, S. J. Characterization and high-level production of xylanase from an indigenous cellulolytic bacterium *Acinetobacter junii* F6-02 from southern Taiwan soil. *Biochemical Engineering Journal*. 2010, 53, pp. 77-84.
- [41] OLEMPKA-BEER, S. Z.; MERKER, I. R.; DITTO, D. M.; DINOVI, J. M. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms – a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2006, 45, pp. 144-158.
- [42] SCHUSTER, E.; COLEMAN-DUNN, N.; FRISVAD, C. J.; DIJCK, M. W. P. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, 59, pp. 426-435.
- [43] MYCOTA [online]. [cit. 2011-04-24]. *Aureobasidium pullulans*. Dostupné z WWW: <<http://mycota-crcm.mnhn.fr/site/specie.php?idE=99#ancre13>>.
- [44] CHUMCHALOVÁ, J., a kol. *Miniatlas mikroorganismů* [online]. [cit. 2011-04-24]. *Aureobasidium pullulans* Viala et Boyer. Dostupné z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/aureob.htm>>.
- [45] DESHPANDE, S. M.; RALE, B. V.; LYNCH, M. J. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: A status report. *Enzyme Microb. Technol.* 1992, vol. 14, July.
- [46] KODÍČEK, M. *Studijní materiály z enzymologie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2003. 126 s. ISBN 80-7080-523-4.
- [47] MANPREET, S.; SAWRAJ, S.; SACHIN, D.; PANKAJ, S.; BANERJEE, U. C. Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*. 2005, vol. 1 (2), pp. 1-9.
- [48] HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 64, pp. 175-186.

- [49] COUTO, R. S.; SANROMÁN, A. M. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*. 2005, 22, pp. 211-219.
- [50] PANDEY, A.; SOCCOL, R. C.; LARROCHE, CH. *Current Developments in Solid-State Fermentation*. India: Springer Science + Business Media, LLC. 2008. ISBN 978-0-387-75213-6.
- [51] AGUILAR, N. C.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; BARRAGÁN, A. P.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; MARTÍNEZ-HERNANDEZ, L. J.; CONTRERAS-ESQUIVEL, C. J. Perspectives of Solid State Fermentation for Production of Food Enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 2008, 4 (4), pp. 354-366.
- [52] PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P; SOCCOL, R. C.; NIGAM, P.S. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.* 1999, 77, pp. 149-62.
- [53] SCHEPER, T. *New Products and New Areas of Bioprocess Engineering*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 2000. ISBN 0724-6145.
- [54] KHACHATOURIANS, G. G.; ARORA, K. D. *Applied Mycology and Biotechnology*. Netherlands: Elsevier Science B.V. 2001. ISBN 0 444 50657 8.
- [55] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. 3. vyd., opravené a doplněné. Praha: Academia, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [56] SHIERHOLT, J. Fermentation Processes for the Production of Citric Acid. *Process Biochemistry*. 1978, July.
- [57] SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, K. R.; PATEL, K. A.; LARROCHE, CH.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*. 2010, 46, pp. 541-549.
- [58] CHAHAL, D. S. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985, 49, pp. 205-10.
- [59] TENDERDY, R. P. Cellulase production by solid substrate fermentation. *J. Sci. Ind. Res.* 1996, 55, pp. 313-6.
- [60] NIGAM, P.; SINGH, D. Processing of agricultural wastes in solid-state fermentation for cellulolytic enzyme production. *J. Sc.i Ind. Res.* 1996, 55, pp. 457-67.
- [61] BALI, R. *Isolation of extracellular fungal pectinolytic enzymes and extraction of pectin using kinnow waste as substrate*. Department of Biotechnology & Env. Science, Thapar Institute of Engineering and Technology, 2003. India.

- [62] ACUNA-ARGUELLES, M.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZALES, G.; GUTIERREZ-ROJAS, M. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *A. niger* in submerged and solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995, 43, pp. 1-6.
- [63] TARAGANO, M. V.; PILOSOFF, R. M. A. Application of Doehlert designs for water activity, pH and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology.* 1999, 25, pp. 411-419.
- [64] FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZALES, G.; VOLKE-SEPÚLVEDA, T. Production of Hydrolytic Depolymerising Pectinases. *Food Technol. Biotechnol.* 2006, 44 (2), pp. 221-227.
- [65] SOLIS-PEREIRA, E. S.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZALES, G.; GUTIERREZ-ROJAS, M. Effect of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* CH4 in submerged and solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993, 39, pp. 36-41.
- [66] MALDONADO, C. M.; STRASSER de SAAD, M. A. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 1998, 20, pp. 34-38.
- [67] AGUILAR, G.; HUITRÓN, C. Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon sources. *Bitech. Letters.* 1990, 12 (9), pp. 655-660.
- [68] OLSON, C. S. J. B.; MARKWELL, J. Assays for Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Protein Science.* 2007.
- [69] HABÁNÍKOVÁ, K. *Využití odpadů rostlinného původu.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 65 s. a 12 s. příloh.
- [70] STEWART, C. J.; PARRY, B. J. Factors Influencing the Production of Cellulase by *Aspergillus fumigatus* (Fresenius). *Journal of General Microbiology.* 1981, 125, pp. 33-39.
- [71] BOTELLA, C.; de ORY, I.; WEBB, C.; CANTERO, D.; BLANDINO, A. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal.* 2005, 26, pp. 100-106.
- [72] LEITE, R. S. R.; BOCCHINI, A. D.; MARTINS, S. E.; SILVA, D.; GOMES, E.; SILVA, R. Production of Cellulolytic and Hemicellulolytic Enzymes From *Aureobasidium pullulans* on Solid State Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2007, vol. 136-140.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|-------|---|
| a | aktivita |
| Arg | arginin |
| a_w | aktivita vody |
| BRKO | biologicky rozložitelný komunální odpad |
| BRO | biologicky rozložitelný odpad |
| c | koncentrace |
| EDTA | ethylendiamintetraoctová kyselina |
| glu | glukosa |
| His | histidin |
| IUB | International Union of Biochemistry – mezinárodní biochemická unie |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry – Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii |
| kat | jednotka katalytické aktivity |
| Phe | fenylalanin |
| rpm | revolutions per minute – otáčky za minutu |
| SI | Le Système international d'unités – mezinárodní soustava jednotek |
| SmF | submerzní fermentace |
| SSF | solid-state fermentation |
| Trp | tryptofan |
| Tyr | tyrosin |
| U | standardní jednotka aktivity |
| UV | ultrafialová část spektra |