



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**ŘÍZENÍ MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI KYSELINY
HYALURONOVÉ (HA) NASTAVENÍM SPECIFICKÉ
RYCHLOSTI RŮSTU KULTURY STREPTOCOCCUS
EQUI SUBSP. ZOOEPIDEMICUS**

CONTROL THE MOLECULAR WEIGHT OF HYALURONIC ACID (HA) BY ADJUSTING THE SPECIFIC
GROWTH RATE OF CULTURE STREPTOCOCCUS EQUI SUBSP. ZOOEPIDEMICUS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Jana Osičková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Lukáš Franke, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1053/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Jana Osičková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Lukáš Franke, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Řízení molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové (HA) nastavením specifické rychlosti růstu kultury *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

Zadání diplomové práce:

Cílem diplomové práce bude nastavením kultivačních podmínek docílit změny specifické růstové rychlosti kultury a sledovat závislost Mw na těchto změnách. Cílovým stavem by mělo být nastavení kultivačních podmínek pro produkci nízkomolekulární/vysokomolekulární HA.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

Bc. Jana Osičková
student(ka)

Ing. Lukáš Franke, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

V Brně dne 31.1.2017

Abstrakt

Diplomová práce se zaměřuje na vliv kultivačních parametrů na syntézu kyseliny hyaluronové při její biotechnologické produkci. Sledovanými kultivačními parametry byly teplota kultivace, vzdušnění, míchání, zdroj uhlíku a přidavek fosfatidylcholinu. Sledovaly se změny molekulové hmotnosti a výtěžků kyseliny hyaluronové, růstu biomasy a viskozity média po fermentaci.

Ze získaných dat bylo zjištěno, že specifická růstová rychlost kultury významně ovlivňuje finální vlastnosti kyseliny hyaluronové. Při suboptimálních teplotách vznikal vysokomolekulární polymer se srovnatelnými výtěžky jako u kontrolní kultivace. Vysoké teploty (40 °C) způsobovaly pokles molekulové hmotnosti.

Dalšími sledovanými kultivačními parametry byly intenzita míchání a vzdušnění. Nejvyšších molekulových hmotností bylo dosaženo při nejvyšších otáčkách a za intenzivnějšího vzdušnění, tedy s parametry 1 vvm/800 rpm a 2 vvm/800 rpm. Větší vliv na molekulovou hmotnost mělo míchání než vzdušnění. Při změně zdroje uhlíku ze sacharózy na glukosu se dosáhlo nejnižších hodnot molekulové hmotnosti i výtěžku. Přidavek fosfatidylcholinu o koncentraci 160 mg/l měl pozitivní efekt na kultivaci, kdy se navýšila molekulová hmotnost a došlo k větší tvorbě biomasy.

Abstract

This master thesis focuses on the effect of cultivation parameters on hyaluronic acid synthesis during its biotechnological production. The cultivation parameters were temperature of the cultivation, aeration, agitation, carbon source and addition of phosphatidylcholine. Changes in molecular weight and yield of hyaluronic acid, growth of biomass and medium viscosity were observed.

From the obtained data we learned, that the specific growth rate greatly impacts final characteristics of hyaluronic acid. Under suboptimal temperatures a high molecular weight polymer was synthesised along with comparable yields from the control cultivation. High temperatures (40 °C) caused a dip in molecular weight.

The next cultivation parameters were aeration and agitation. The highest molecular weights were obtained in cultivations with high agitation rates and intensive aeration, specifically 1 vvm/800 rpm and 2 vvm/800 rpm. Agitation had a bigger influence on molecular weight than aeration. When the carbon source was changed from sucrose to glucose, the lowest molecular

weight and yield were obtained. Addition of phosphatidylcholine with concentration 160 mg/l had a positive effect on the cultivation, where the molecular weight grew and biomass growth was higher.

Klíčová slova

Kyselina hyaluronová, molekulová hmotnost, *Streptococcus zooepidemicus*

Keywords

Hyaluronic acid, molecular weight, *Streptococcus zooepidemicus*

OSIČKOVÁ, J. *Řízení molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové (HA) nastavením specifické rychlosti růstu kultury Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 55 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Lukáš Franke, Ph.D.

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 studentky

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu za všechny poskytnuté rady, pomoc a velmi pozitivní přístup a také všem laborantkám, které mi vždy poradily a pomohly. Také chci poděkovat společnosti Contipro, která mi umožnila vypracovat tuto diplomovou práci v jejich laboratoři a za využití jejich prostředků. V neposlední řadě chci poděkovat své rodině, která mě po celou dobu podporovala a pomáhala mi.

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1 Kyselina hyaluronová (výskyt, vlastnosti)	9
2.2 Streptococcus equi subsp. zooepidemicus	12
2.2.1 Výživové nároky	13
2.3 Metabolismus kyseliny hyaluronové	14
2.4 Způsoby kultivace kyseliny hyaluronové	16
2.5 Vliv fermentačních parametrů na molekulovou hmotnost kyseliny hyaluronové.....	18
2.5.1 Vliv pH.....	18
2.5.2 Vliv kyslíku.....	18
2.5.3 Vliv počáteční koncentrace glukosy	21
2.5.4 Vliv teploty	22
2.6 Látky ovlivňující molekulovou hmotnost kyseliny hyaluronové	22
2.7 Využití kyseliny hyaluronové.....	24
3. Experimentální část	28
3.1 Chemikálie.....	28
3.2 Experimentální vybavení	28
3.3 Příprava média	28
3.4 Příprava inokula.....	29
3.5 Přídavek fosfatidylcholinu.....	29
3.6 Příprava roztoku glukosy	29
3.7 Měření optické denzity	29
3.8 Měření viskozity	30
3.9 Stanovení výtěžku HA	30
3.10 Měření cukrů.....	30

3.11 Měření molekulové hmotnosti HA	31
3.12 Výpočet specifické růstové rychlosti	31
4. Výsledky a diskuze.....	32
4.1 Vliv specifické růstové rychlosti	32
4.2 Vliv míchání a vzdušnění	38
4.3 Vliv změny zdroje uhlíku	43
4.4 Vliv přídavku fosfatidylcholinu.....	46
5. Závěr.....	49
6. Seznam použitých zdrojů	50
7. Seznam použitých zkratk.....	55

1. Úvod

V roce 1934 byl popsán nový polysacharid Karl Meyerem a Johnem Palmerem. Tento polysacharid byl izolován z hovězího sklivce. Pojmenovali jej „hyaluoronová kyselina“ podle hyaloid (sklovitý) a uronové kyseliny.¹

Polymery kyseliny hyaluronové mají obrovský rozsah využití a často opačných biologických funkcí závislých na velikosti řetězce. Vysokomolekulární HA je anti-angiogenní, imunosupresivní a používá se v biomedicínských aplikacích. HA se střední molekulovou hmotností je prozánětlivá, imunostimulativní a vysoce angiogenní. Menší molekulové hmotnosti jsou anti-apoptotické a fungují jako endogenní signály nebezpečí.²

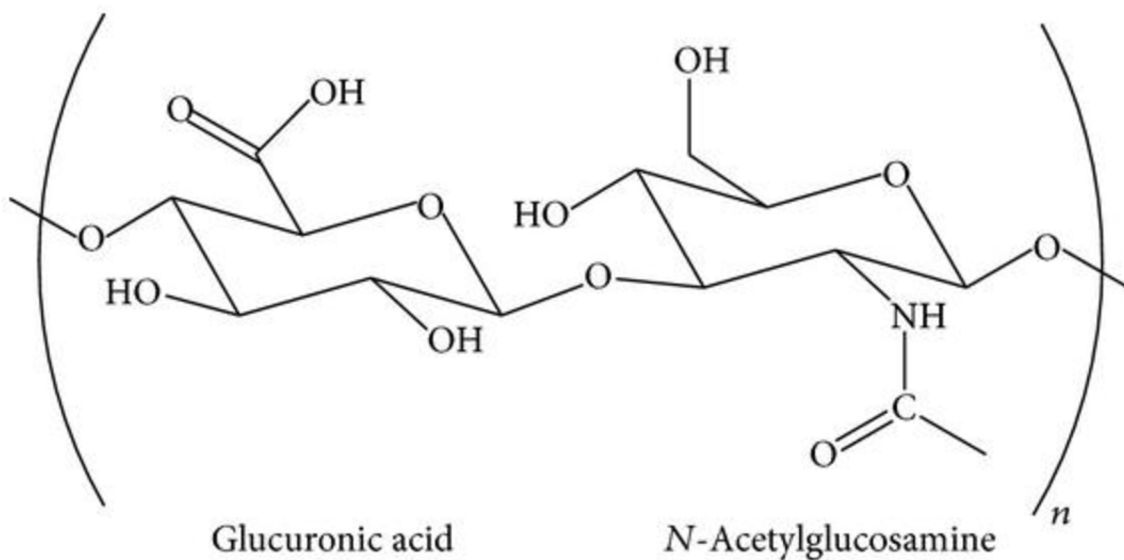
Jelikož se možnosti využití kyseliny hyaluronové rapidně rozšiřují, biotechnologické firmy se zaměřují na způsoby výroby, které by jim umožnily upravit parametry tak, aby bylo možné vyrobit kyselinu hyaluronovou s požadovanou molekulární hmotností. Takto připravená HA by pak mohla být využita pro specifické aplikace.

Tato práce se zaměřuje na vliv kultivačních parametrů na produkci kyseliny hyaluronové a jejich efekty na molekulovou hmotnost a výtěžky. Mezi tyto parametry patří specifická růstová rychlost, vzdušnění, míchání, zdroj uhlíku a přídavek fosfatidylcholinu.

2. Teoretická část

2.1 Kyselina hyaluronová (výskyt, vlastnosti)

Kyselina hyaluronová (HA – hyaluronic acid) je polysacharid patřící do skupiny glykosaminglykanů. Do této skupiny patří také chondroitin sulfát, keratan sulfát a heparin sulfát. Kyselina hyaluronová jako jediná neobsahuje sulfátovou skupinu a neváže se kovalentně na proteoglykanový komplex. Skládá se z glukuronové kyseliny a N-acetylglukosaminu, které jsou spojeny $\beta(1-3)$ glykosidovou vazbou a jejíž disacharidy jsou spojeny $\beta(1-4)$ glykosidovou vazbou (Obr. 1).³



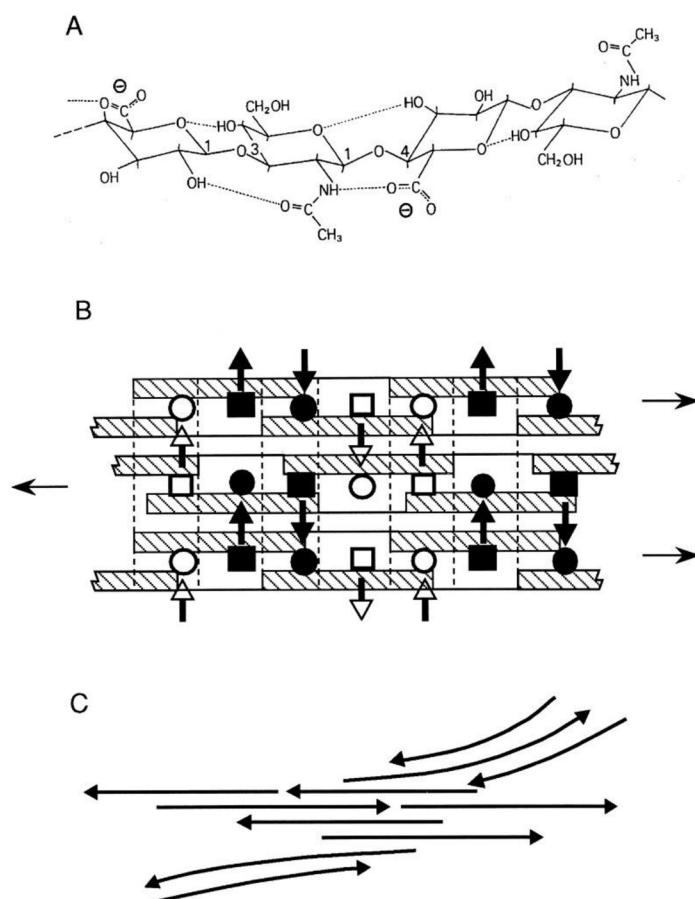
Obr. 1: Struktura kyseliny hyaluronové³

V živých organismech se HA produkuje enzymy, které se označují jako hyaluronan synthasy. Tyto enzymy vytváří dlouhé a lineární polymery postupným připojováním aktivovaných nukleotidových cukrů UDP-glukuronové kyseliny a UDP-N-acetylglukosaminu.

HA se vyskytuje u všech obratlovců. Vysoké koncentrace se nachází především v kloubní synoviální tekutině, v kůži, očním sklivci a pupeční šňůře.⁴

Molekulová hmotnost HA, která je klíčová pro určení její využitelnosti, se v živých organismech liší na základě druhu tkáně. V pupeční šňůře dosahuje molekulové hmotnosti v rozpětí 3–4 milion Da, naopak v synoviální tekutině má až 6 milionu Da. Hovězí sklivec naopak obsahuje HA o velikosti nižší než 1 milion Da.⁵ Molekulová hmotnost HA produkovaná bakteriemi se pohybuje v rozmezí 10^4 – 10^7 Da, může tedy dosáhnout hodnot jako ta, která se vyskytuje v lidském těle. HA vykazuje jistou míru polydisperzity, avšak určení polydisperzity molekulové hmotnosti závisí na použité metodě extrakce, proto nejsou výsledky jednotlivých metod srovnatelné.³

U sekundární struktury HA se projevují hydrofobní vlastnosti, které jsou tvořeny axiálními vodíkovými atomy osmi -CH skupin na opačných stranách molekuly, které podporují molekulární agregaci do terciární struktury β skládaného listu. (Obr. 2). Přesto je HA vysoce hydrofilní látka, která při navázání vysokého množství vody vytvoří gelovou substanci s vysokou viskoelasticitou. Terciární struktura je stabilizována intermolekulárními vodíkovými vazbami. Všechny tyto vlastnosti umožňují agregaci velkého množství molekul a formaci molekulárních sítí.⁶



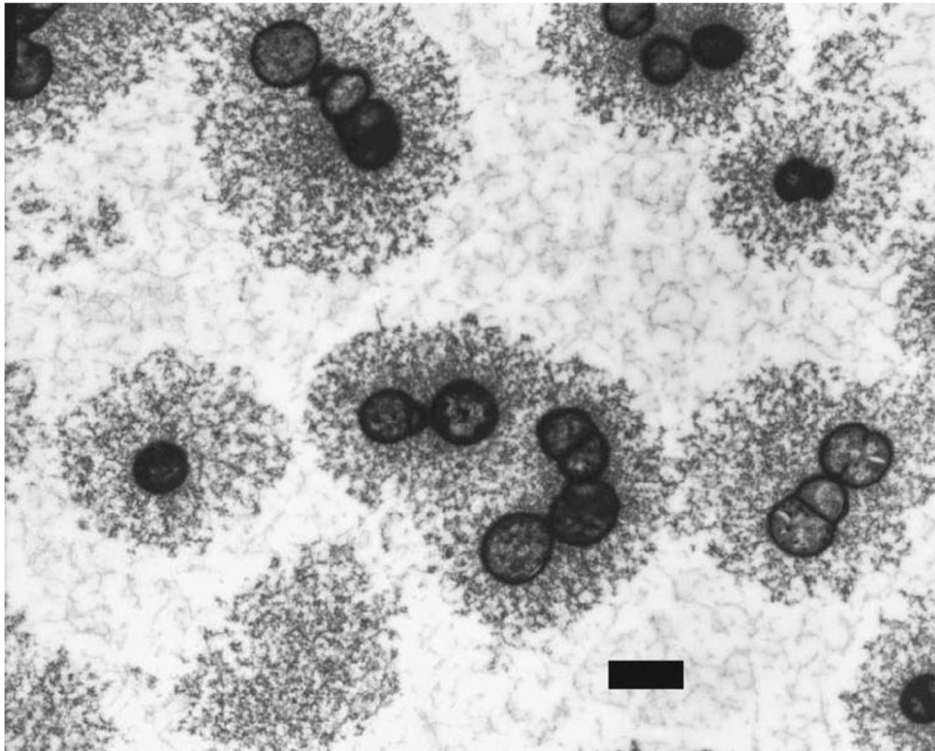
Obr. 2: A) Primární struktura, B) Sekundární struktura, C) Terciární struktura kyseliny hyaluronové⁷

Řetězce HA jsou propletené, což má za výsledek vysokou viskozitu jejího roztoku. Viscoelasticita HA je silně závislá na pH vodného roztoku a je ovlivněna iontovou silou prostředí. Změna pH ovlivní ionizaci řetězců HA a změní se intermolekulární interakce mezi jednotlivými molekulami HA, což vede ke změně reologických vlastností roztoku.⁶ Díky svým fyzikálně chemickým vlastnostem může HA regulovat rovnováhu vstřebávání vody, může fungovat jako lubrikant a stabilizátor struktur.^{8,9}

V počátcích výroby se HA získávala z živočišných tkání, avšak kvůli riziku bakteriální kontaminace, omezených zdrojů a vysoké ceny výroby probíhá v poslední době produkce HA převážně fermentační cestou s využitím vybraných bakterií. Mezi ně patří streptokoky ze skupiny A a C (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus equi* aj.) nebo *Pasteurella multocida*. Jelikož je HA produkovaná bakteriemi identická s živočišnou HA, při její aplikaci u člověka nedochází k imunitní reakci v těle.³ Samotná FDA (Food and Drug Administration) vytvořila oficiální prohlášení, že neživočišné, syntetické nebo rostlinné zdroje jsou preferovanější pro terapeutika. I z těchto důvodů se přesunuje způsob výroby z živočišné na bakteriální.¹⁰

2.2 *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) je beta-hemolytická streptokoková bakterie skupiny C dle klasifikace Lancefieldové.



Obr. 3: Elektronový mikroskop S. zooepidemicus⁹

Je to kmenzální organismus vyskytující se převážně u koní jako patogen v horních dýchacích cestách. Infekce se projevuje vznikem abscesů, neonatální septikémií a celkovým narušením rozmnožovacího systému. Také se projevuje závažnými dýchacími obtížemi vedoucími až k vykašlávání krve. Tato bakterie je patogenní u několika dalších druhů zvířat, mezi něž patří psi, prasata nebo i opice. Objevily se také případy přenosu na člověka, kdy nakažené osoby byly v přímém styku s koňmi. U lidí bývá průběh nemoci mnohem dramatičtější, avšak množství nakažených jedinců je minimální.^{11,12}

S. zooepidemicus při nákaze využívá své možnosti produkovat kyselinu hyaluronovou, která vytvoří kolem buněk protektivní bariéru. Bakterie jsou chráněny před působením protilátek a fagocytů, jelikož produkovaná kyselina hyaluronová strukturně odpovídá té, která je běžně přítomná u živočichů, tudíž se neprojeví žádná imunitní reakce. Tato bariéra významně zvyšuje patogenitu *S. zooepidemicus*. Přestože je produkce HA velkou výhodou pro tuto bakterii, jednou z nevýhod je potřeba UDP-N-acetylglukosaminu pro syntézu HA, což odebírá potřebný prekurzor také pro stavbu buněčné stěny. Proto je produkce HA velkou metabolickou zátěží pro *S. zooepidemicus*, jelikož by uhlíkové zdroje mohly být využity pro růst buněk.¹³

2.2.1 Výživové nároky

Streptokokové bakterie jsou výživově náročné se specifickými požadavky na růstové médium. Z pohledu výživy to jsou chemoorganotrofní a fakultativně anaerobní bakterie. Z důvodu nepřítomnosti cyklu trikarboxylových kyselin a prekurzorů pro syntézu většiny aminokyselin a nukleotidů, vyžaduje *S. zooepidemicus* komplexní médium obsahující vitamíny, puriny a aminokyseliny.¹⁴

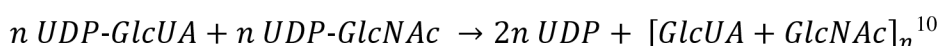
Pro správný růst *S. zooepidemicus* je nezbytná přítomnost 11 esenciálních aminokyselin v médiu. V případě jejich nedostatku dochází ke snížení intenzity růstu buněk až o 60 %. Kromě nepřítomnosti tryptofanu se výtěžek biomasy u ostatních aminokyselin snižuje dokonce až pod 50 %. U 9 neesenciálních aminokyselin (včetně ornithinu) dojde k 15 % snížení tvorby biomasy.¹⁵

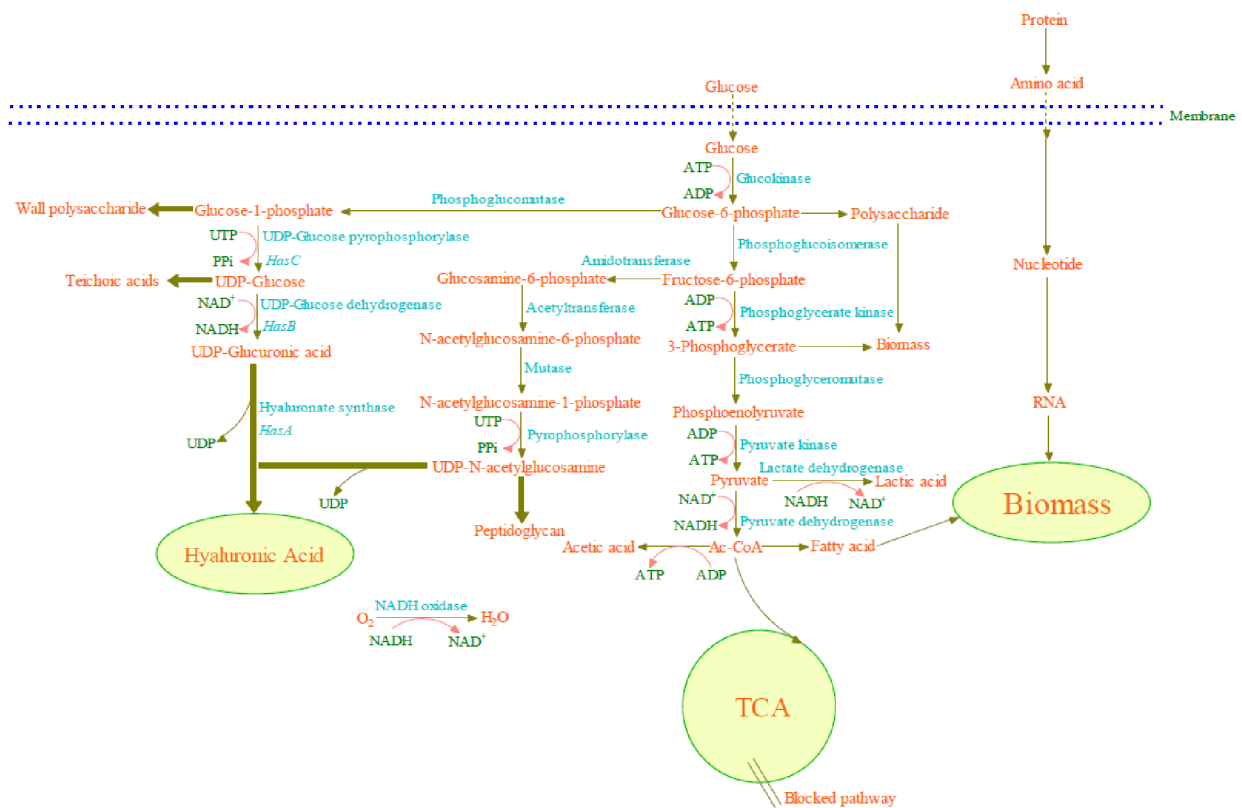
Jako zdroj uhlíku je *S. zooepidemicus* schopen ke svému růstu využít různé sacharidy, jak jednoduché, tak i komplexní. Nejčastějším zdrojem uhlíku při kultivaci je glukosa. Jednoduché zdroje uhlíku mohou být i fruktóza, maltóza, laktóza, sacharóza nebo maltodextrin.¹⁶ Komplexní zdroje mohou být vedlejší produkty ze zemědělství, např. melasa, která také obsahuje vitamíny a minerály¹⁷, nebo šťáva z kešu jablek.¹⁸ Využití těchto zdrojů je podporováno z hlediska velké dostupnosti těchto surovin, které jsou generovány z velkovýrob, a také z hlediska ekonomického. Glukosa je dále zpracovaná v Embden-Meyerhofově dráze (EMP), která je centrální metabolickou dráhou pro *S. zooepidemicus* a je zdrojem energie pro tvorbu biomasy. Z prekurzorů EMP se také syntetizuje kyselina mléčná nebo kyselina octová.¹⁴

S. zooepidemicus je schopen při nedostatku zdrojů uhlíku získávat energii také ze zdroje dusíku, tento stav však nepodporuje produkci HA a při kontinuální kultivaci dochází k převaze generace bakterií, které již nemají schopnost syntetizovat HA.¹⁹ Při kultivaci je potřebné mít vyvážený poměr uhlíku a dusíku pro efektivní produkci kyseliny hyaluronové. Mezi běžné zdroje dusíku pro kultivaci *S. zooepidemicus* patří např. sójový pepton, kvasničný autolyzát, kaseinový hydrolyzát nebo masový extrakt.^{16,20} I v případě zdroje dusíku jsou snahy využít vedlejší produkty ze zemědělství, mezi které patří rybí peptony²¹, kukuřičný výluh^{17,18} nebo syrovátka.²² Při využití těchto vedlejších produktů se dosáhlo srovnatelných výsledků syntézy HA jako při použití konvenčních zdrojů dusíku.

2.3 Metabolismus kyseliny hyaluronové

Primárním záměrem metabolismu *S. zooepidemicus* je využití glukosy pro tvorbu buněčných membrán (Obr. 4). Pouze za energeticky výhodnějších podmínek se přesune zdroj uhlíku směrem k produkci HA. Syntéza HA za běžných podmínek je provedena z 5-10 % metabolizovaného uhlíku. Aktivované nukleotidové cukerné jednotky jsou deriváty glukosy-6-fosfát a fruktosy-6-fosfát. Převod těchto dvou sloučenin v glukuronovou kyselinu a N-Acetylglukosamin generuje 2 moly redukovaných ekvivalentů. HA je produkována z aktivovaných cukerných prekurzorů UDP-glukuronové kyseliny a UDP-N-Acetylglukosaminu. Ty se navazují na redukující konec řetězce a zbavují se UDP zbytků.³





Obr. 4: Metabolismus kyseliny hyaluronové v *Streptococcus zooepidemicus*⁸

Množství vytvořeného ATP může být zvýšeno při omezení zdrojů uhlíku. Vedlejším účinkem však může být nižší molekulová hmotnost HA.²³

Produkce HA by nebyla možná bez glykosyltransferasového enzymu hyaluronan synthasa. Hyaluronan synthasa je multifunkční membránový enzym, který sestavuje polymer z UDP cukerných prekurzorů uvnitř plasmatické membrány a propouští jej ven. *S. zooepidemicus* obsahuje has operon s 5 geny, což je více než *S. uberis* nebo *S. pyogenes*, které obsahují pouze 1 nebo 2 geny. Z toho důvodu je schopen *S. zooepidemicus* využít vyšší množství metabolizovaného uhlíku pro syntézu HA oproti jiným bakteriím.²⁴ Has operon obsahuje HA syntasou, UDP-glukosa dehydrogenasu, UDP-glukosa pyrofosforylasu a paralog kódující duálně funkční enzym acetyltransferasy.²⁵ Při vypuštění kyseliny hyaluronové mimo plasmatickou membránu se může navázat na membránové receptory na povrchu buňky, tudíž vytvoří ochrannou vrstvu kolem buňky nebo je interkalována v proteoglykanovém komplexu.³

Znalost metabolismu *S. zooepidemicus* je klíčová pro výrobu kyseliny hyaluronové, jelikož se mohou nastavit kultivační podmínky na základě rovnovážné distribuce glukosy mezi produkcí HA a výstavbou buněčných membrán.²⁶

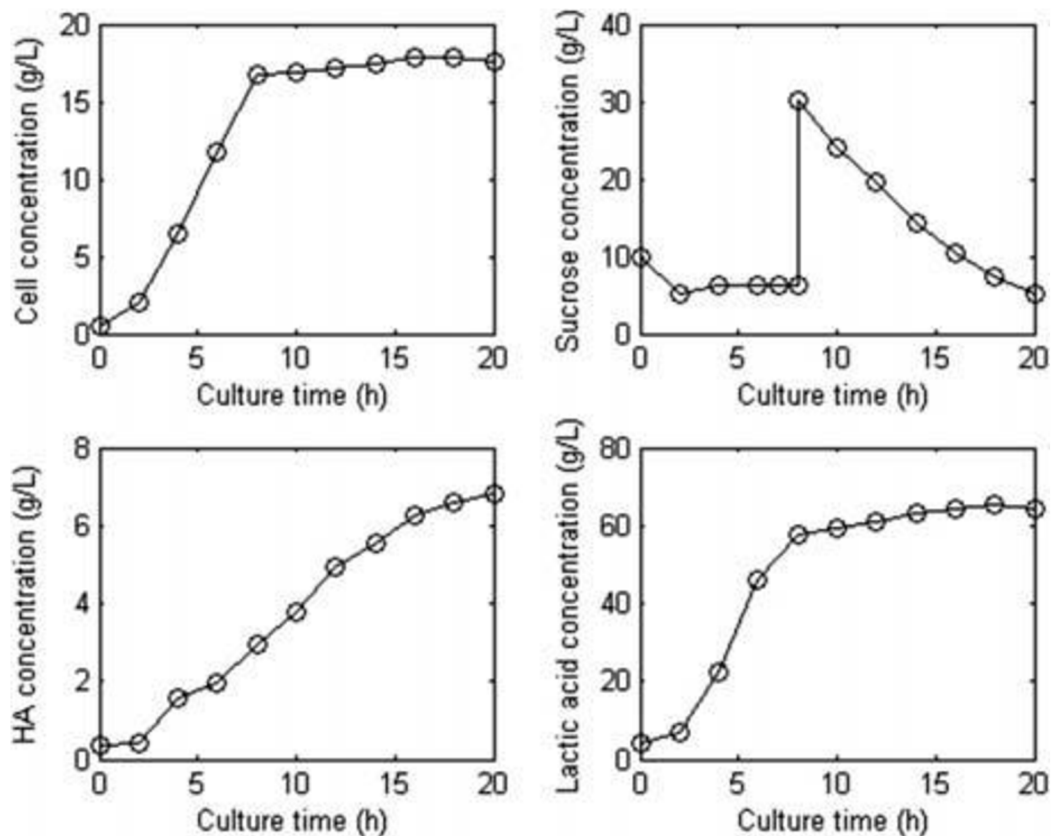
2.4 Způsoby kultivace kyseliny hyaluronové

V industriálním měřítku se dříve kyselina hyaluronová extrahovala převážně z živočišných produktů. Tento postup se však setkává s určitými překážkami. Při extrakci dochází k degradaci kyseliny hyaluronové endogenní hyaluronidasou, která se vyskytuje v živočišných tkáních a polymer se rozkládá enzymatickou hydrolýzou. Navíc tento postup nezaručuje vysoké výtěžky.³ Průmysl se začíná soustřeďovat na kvalitu oproti kvantitě produkce a na dva klíčové kvalitativní parametry – molekulární hmotnost a čistotu.⁹ Výtěžky jsou taktéž důležité, přičemž při bakteriální fermentaci mohou dosahovat hodnot 6–7 g/l.³

Kultivace *S. zooepidemicus* probíhá převážně při vsádkové kultivaci. Tato metoda má však své nevýhody, např. předčasné ukončení produkce kyseliny hyaluronové z důvodu tvorby vysokých koncentrací inhibitorů vyskytujících se v médiu nebo vyčerpání zdrojů pro výživu buněk *S. zooepidemicus*.

Fed-batch kultivace probíhají buď kontinuálním nebo sekvenčním přidavkem substrátu bez odběru fermentačního média. Tento způsob kultivace je výhodný v případě potřeby změny koncentrace živiny, aby byl ovlivněn finální produkt nebo růst biomasy. Při srovnání několika druhů fed-batch kultivace (FBC), exponenciální FBC nejvíce podporuje růst buněk, ale naopak má velmi nízkou produkci HA. Při experimentu (Obr. 5), kdy se zkombinovala exponenciální FBC a poté vsádková kultivace, se dosáhlo navýšení produkce HA o 36-37 %.²⁷

Liu et al. navázali na toto zjištění a provedli znovu dvoufázovou kultivaci sestávající z vsádkové a fed-batch kultivace. Při první fázi, tedy při vsádkové kultivaci, dosáhla koncentrace buněk hodnoty 13,5 g/l. Poté navázala druhá fáze, tedy fed-batch kultivace, kdy produkce HA byla zvýšená na 6,6 g/l oproti kontrolnímu vzorku, kde byla koncentrace HA 5,0 g/l. Zároveň se zvýšila i výtěžnost HA na gram sacharózy o 23 %.²⁸ Pro tento dvoustupňový kultivační postup existuje velmi dobré využití v průmyslu do budoucnosti.



Obr. 5: Průběh dvou krokové exponenciální fed-batch kultivace a vsádkové kultivace *S. zooepidemicus*²⁷

Kultivace HA kontinuální fermentací je jednou z možností, jak udržet bakterie v exponenciální fázi a předejít stacionární fázi, při které se tvoří HA. Nakultivuje se tedy obrovské množství bakterií pro následnou produkci HA. Další výhodou může být dosažení nižší specifické růstové rychlosti, což může mít za výsledek HA o vyšší molekulové hmotnosti. Po provedení opakované vsádkové kultivace je možné udržet koncentraci bakterií pouze na dva cykly, poté se postupně množství buněk snižuje. Podobně se vytváří HA, při třetím cyklu však ostře klesá produkce a při šestém cyklu produkce HA přestane kompletně. Vysvětlení ukončení tvorby HA je to, že se rozšířila v médiu zmutovaná bakterie, která polymer neprodukovala a vytěsnila původní HA produkující bakterii. Zajímavé je, že tato zmutovaná bakterie se objevila už při 3. cyklu fermentace.²⁹ Kontinuální vsádková fermentace by byla proveditelná pouze v případě omezených počtů cyklů nebo v případě kontroly mutací *S. zooepidemicus*.

2.5 Vliv fermentačních parametrů na molekulovou hmotnost kyseliny hyaluronové

2.5.1 Vliv pH

Pro buňky *S. zooepidemicus* je ideální pH 7. Z důvodu produkce organických kyselin, převážně kyseliny mléčné, dochází při kultivacích *S. zooepidemicus* k postupnému snižování pH. Proto se musí při kultivacích udržovat konstantní pH nejčastěji pomocí roztoku hydroxidu sodného. Efekt pH v rozmezí 6,3 – 8,0 na polydisperzitu a molekulovou hmotnost HA je prakticky nulový. Při hodnotě 5,5 už se projeví inhibiční efekt nízkého pH na růst buněk a produkci HA.³⁰

Naopak bylo zjištěno, že vystavení *S. zooepidemicus* krátkodobému alkalickému stresu podporuje vysokou molekulovou hmotnost. Z počátku kultivace se ponechá pH na hodnotě 7,0 pro podporu růstu buněk, poté se během exponenciální fáze růstu na určité časové úseky mění pH na 8,0 a poté se opět sníží na pH 7,0 až do konce fermentace. Tím se sníží produkce kyseliny mléčné, která inhibuje produkci HA a většina glukosy je převedena na produkci HA místo na růst buněk. Zvýšení produkce HA je způsobené tím, že se *S. zooepidemicus* chrání větší vrstvou HA kolem buněk před působením vysokého pH.³¹

2.5.2 Vliv kyslíku

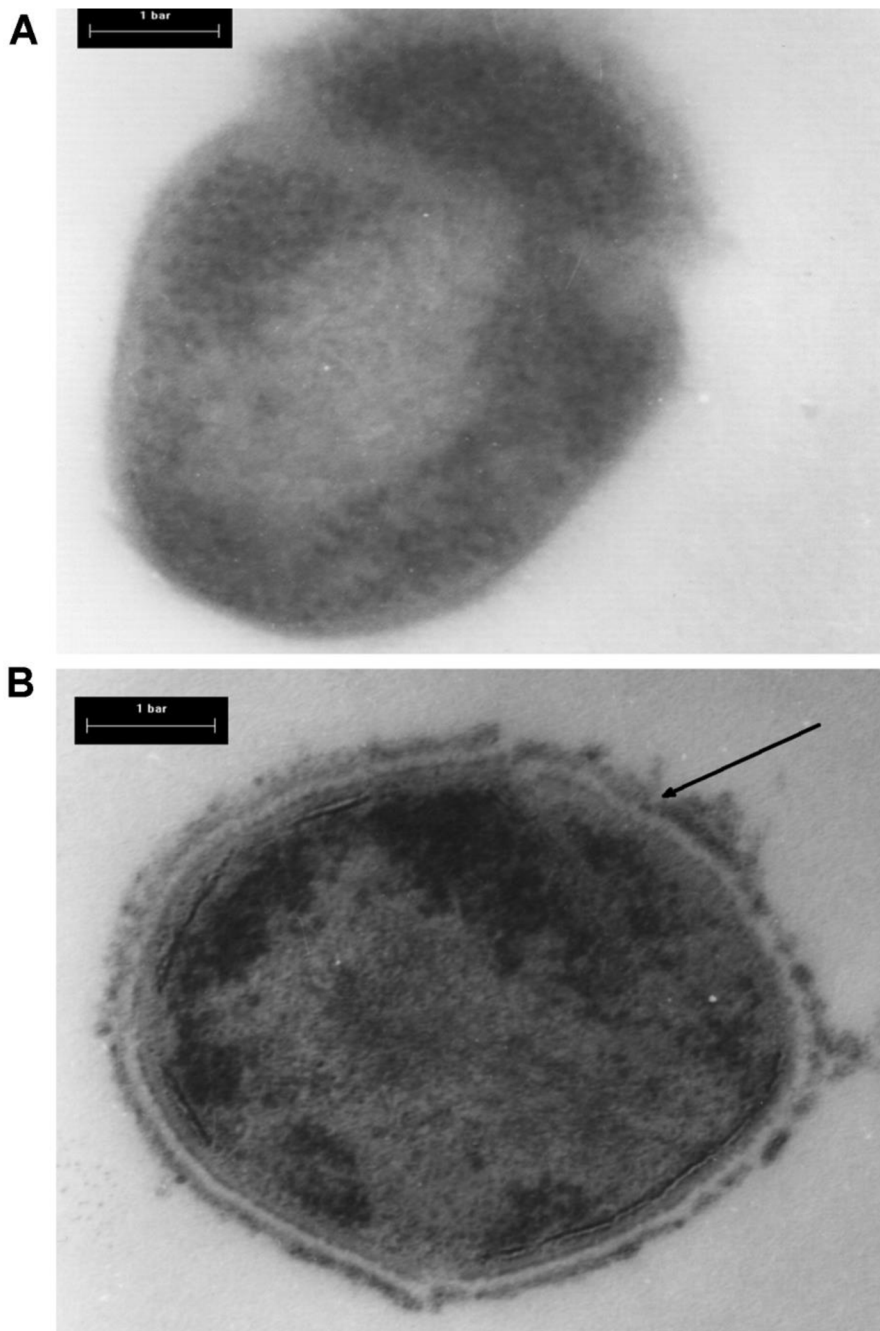
Syntéza kyseliny hyaluronové za anaerobních podmínek je velmi nízká, proto je při kultivaci *S. zooepidemicus* potřebný přístup kyslíku. Za pomoci promíchávání se zvyšuje přestup kyslíku do média, což kromě intenzity vzdušnění dále zvyšuje dostupnost kyslíku bakteriím. Mnoho studií se zaměřuje na vliv kyslíku na produkci HA, přesto jsou výsledky často protichůdné.

Huang et al. potvrdili, že aerobní podmínky podporují vyšší výtěžky HA oproti anaerobním podmínkám. Při kultivacích za udržování konstantních hodnot rozpuštěného kyslíku zjistili, že výtěžky stoupaly se stoupající hodnotou kyslíku, přičemž výtěžky dosáhly svého maxima při překročení 5 % rozpuštěného kyslíku. U experimentu, kdy se při kultivaci zvyšovaly otáčky a zároveň byla hodnota kyslíku konstantní, se na výtěžcích neprojeví žádné změny. Naopak když nebyla udržována hodnota rozpuštěného kyslíku, tak při 400 rpm dosáhla hodnota rozpuštěného kyslíku v médiu 40 % a výtěžnost byla 0,74 g HA/g buňky. Dle výsledků tedy konstatovali, že je potřebné dosáhnout více než 5 % rozpuštěného kyslíku v médiu, aby kultivace poskytla vysoké hodnoty výtěžků HA. Důležitým parametrem bylo také promíchávání.³²

Armstrong et al. neobjevili korelaci mezi zvýšenými otáčkami a vyšší produkcí HA. Pravděpodobně to bude i dané sestaveným experimentem, který neudržoval konstantní otáčky po celou dobu kultivace. Při zvýšení otáček po 12 hodinách na 1000 rpm, kdy už byly buňky *S. zooepidemicus* ve stacionární fázi, nepozorovali změnu v molekulové hmotnosti HA. Při zkoumání vlivu aerace byly hodnoty kultivace nastaveny na 0,2 a 1 vvm s otáčkami 600 rpm. Zde již upozorovali vliv na molekulovou hmotnost, kdy oproti HA syntetizované při anaerobní kultivaci bylo dosaženo za podmínek 1vvm/600 rpm nárůstu molekulové hmotnosti o 21 % na hodnotu 2,65 MDa.³⁰

Zhang et al. zkoušeli vliv otáček v rozpětí 150-1000 rpm na molekulovou hmotnost HA při konstantní hodnotě 50 % rozpuštěného kyslíku. Při 450 rpm dosáhli nejvyšší molekulové hmotnosti, tedy 2,01 MDa, naopak při 700 a 1000 rpm již molekulová hmotnost výrazně klesla. Pokles molekulové hmotnosti přiznali tvorbě kyslíkových radikálů za vysokých otáček, jelikož kyslíkové radikály působí degradačně na řetězce HA. Při vysokých otáčkách se tvořily volné kyslíkové radikály až 9-18x více, než při 450 rpm, stejně tak se zvýšila produkce NADH oxidázy, která produkuje volné kyslíkové radikály. Tato tvorba však převažovala pouze během exponenciální fáze, při stacionární fázi došlo ke snížení produkce kyslíkových radikálů.³³

Duan et al. taktéž potvrdili, že za anaerobních podmínek se vytvoří velmi malé množství HA s nízkou výtěžností, což také znázornili na elektronovém mikroskopu buněk *S. zooepidemicus* (Obr. 6). Na obrázku B je patrná vrstva HA kolem buňky oproti obrázku A, kde není viditelná žádná vrstva. Rozpětí 2-80 % rozpuštěného kyslíku v médiu nemělo zásadní vliv na naměřené hodnoty výtěžků HA. Toto zjištění si tedy mírně odporuje se zjištěním Huang et al., kteří tvrdí, že pro vysoké výtěžky HA je potřeba dosáhnout 5 % rozpuštěného kyslíku v médiu.³² Je možné, že požadované množství kyslíku pro tvorbu HA může být ještě nižší. Při navyšování kyslíku v médiu se zvyšovala molekulární hmotnost, kdy při 50 % dosáhla maxima a při 80 % se hodnota mírně snížila.³³ Při navýšení otáček, kdy zkoušeli nastavení rozpětí 150-1000 rpm, dosáhli nejvyšší molekulové hmotnosti při 450 rpm, podobně jako Zhang et al.³³ Otáčky naopak neměly žádný významný vliv na výtěžnost kultivace. Prozkoumali také hypotézu, že vysoké otáčky napomáhají uvolňování HA z buněk. Při jednotlivých otáčkách nebyly patrné rozdíly mezi hodnotami volné HA během exponenciální fáze, tudíž vyvodili závěr, že vyšší otáčky nenapomáhají uvolňování HA z buněk *S. zooepidemicus*.³⁴



Obr. 6: Elektronový mikrograf sekci *S. zooepidemicus* pořízených během exponenciální fáze (7. hodina), A – anaerobní podmínky, B – aerobní podmínky s 50 % rozpuštěného kyslíku³⁴

Liu et al. zkoušeli efekt třístupeňového navýšování otáček při kultivaci *S. zooepidemicus*. Při tomto postupu byly prvních 8 hodin nastaveny otáčky na 200 rpm, poté na 4 hodiny 400 rpm a na dalších 8 hodin 600 rpm. Výtěžek HA za těchto podmínek se zvýšil o 9 %. Dále se zaměřili na dvoustupňové udržování hodnoty rozpuštěného kyslíku, kdy do 8 hodiny kultivace byla hodnota nastavena na 10 % a poté do konce kultivace 5 %. Překvapivě se snížila koncentrace buněk o 10 % a zvýšil se výtěžek HA o 21 %.³⁵

Pro navýšení hodnoty rozpuštěného kyslíku v médiu bez použití intenzivnějšího míchání se dá využít kyslíkových vektorů. Lai et al. vyzkoušeli efekt vektorů n-dodekan a n-hexadekan. Za použití 1 % (v/v) n-dodekanu se molekulová hmotnost HA skoro dvojnásobně zvýšila a při použití 0,05 % (v/v) n-hexadekanu se molekulová hmotnost ztrojnásobila. Je to tedy velmi efektivní způsob, jak navýšit molekulovou hmotnost HA, musí se však přesně nastavit koncentrace použitého vektoru, jelikož nadbytek může působit inhibičně na buňky *S. zooepidemicus*. Při velkém nadbytku vektoru může také docházet ke špatnému rozptýlení v médiu.³⁶ Liu et al. využili perfluorouhlíků pro navýšení přenosu kyslíku do média, přičemž se zvýšila koncentrace buněk z 13,4 g/l na 14,2 g/l a výtěžnost HA se zvýšila z 5 g/l na 6,6 g/l.³⁵

V případě potřeby výroby kyseliny hyaluronové o menší molekulové hmotnosti je možné využít hyaluronidasy, které štěpí dlouhé řetězce HA. Při zvyšující se viskozitě média ke konci exponenciální fáze se znemožňuje přístup kyslíku do média. Při přidavku hyaluronidasy v 8. hodině kultivace se HA řetězce naštěpily a umožnil se prostup kyslíku do média. Tím se zvýšil výtěžek z 5 g/l na 6 g/l a molekulová hmotnost se snížila na 21 kDa.³⁷

2.5.3 Vliv počáteční koncentrace glukosy

Pro produkci HA a růst buněk je využito 5-10 % zdroje uhlíku. Přibližně 80-85 % zdrojů uhlíku je využito pro produkci kyseliny mléčné a kyseliny octové, o zbývající zdroje dále musí soutěžit růst buněk a produkce HA, přičemž kyselina mléčná pravděpodobně inhibuje produkci HA.³⁸ Proto je důležité nastavit vhodnou počáteční koncentraci glukosy v médiu.

Armstrong et al. zkoumali rozpětí koncentrací 20-60 g/l. Při 40 g/l se dosáhlo nejvyšší molekulové hmotnosti, při zvýšení koncentrace na 60 g/l se hodnoty nijak nepozměnily. Avšak objevili, že při vyšších koncentracích nebyla konverze glukosy na HA dostatečně účinná jako při nižších koncentracích.³⁰

Pires et al. potvrdili, že nejúčinnější konverze glukosy na HA byla při koncentraci glukosy 25 g/l. Při ostatních koncentracích (rozpětí bylo 0-45 g/l) byla glukosa přednostně využita pro tvorbu buněčných membrán. Molekulová hmotnost HA postupně stoupala až do koncentrace glukosy 25 g/l, poté začala mírně klesat. Tyto výsledky tedy příliš neodpovídají výsledkům Armstrong et al.³⁹

Naopak výsledky Armstrong et al. podporuje studie Jagannath et al., kde při koncentraci 60 g/l dosáhli 29 % zlepšení výtěžku HA a 8 % navýšení molekulové hmotnosti. Při analýze distribuce glukosy v metabolismu objevili, že se zvýšila tvorba HA a ATP a došlo ke snížení produkce kyseliny mléčné a biomasy.⁴⁰

2.5.4 Vliv teploty

Teplota je důležitým parametrem u všech kultivací, jelikož udržování konstantní teploty je pro mikroorganismy velmi energeticky náročné. Jak již bylo řečeno, ideální teplotou pro *S. zooepidemicus* je 37 °C.

Armstrong et al. zjistili, že suboptimální teploty (35-32 °C) podporují syntézu vysokomolekulární HA, kdy při 32 °C bylo dosaženo molekulární hmotnosti 2,4 MDa. Naopak při teplotách 40 °C a výše molekulová hmotnost razantně klesá, stejně tak jako výtěžky HA.³⁰

Podobných výsledků dosáhli i Jagannath et al., kdy při 27 °C byla syntetizována HA o molekulové hmotnosti 3,0 MDa. Od 37 °C k 27 °C postupně molekulová hmotnost rostla. Naopak při 35 °C se dosáhlo nevyšších výtěžků HA. U ostatních teplot byly výtěžky HA velmi podobné.⁴⁰

2.6 Látky ovlivňující molekulovou hmotnost kyseliny hyaluronové

Počet kultivačních parametrů je omezený, i v případě ideálně nastavených podmínek se mohou objevit nedostatky při kultivaci.

Přestože intenzita míchání podporuje syntézu vysokomolekulární HA, dochází k tvorbě volných kyslíkových radikálů, které řetězce HA degradují. Zhang et al. využili antioxidačních vlastností kyseliny salicylové při kultivaci s otáčkami 1000 rpm. Koncentrace 0,1 g/l kyseliny salicylové markantně zvýšila molekulovou hmotnost HA z 1,59 MDa na 2,12 MDa, tedy o 25 %. Bohužel došlo k poklesu výtěžku HA. Už při přidavku kyseliny salicylové v koncentraci 0,3 g/l se výtěžek snížil o 35 %, přičemž molekulová hmotnost byla podobná jako při koncentraci 0,1 g/l.³³ Shah et al. nepozorovali při jejich experimentu navýšení molekulové hmotnosti s přidavkem kyseliny salicylové, naopak s přidavkem kyseliny tříslivé se zvýšila molekulová hmotnost z 2,4 MDa na 2,9 MDa.²⁶

Jelikož existuje mezi syntézou HA a syntézou buněčné stěny velká kompetice, může se využít látek, které inhibují glykolýzu, čímž dojde ke snížení spotřeby prekurzorů pro tvorbu biomasy nebo kyseliny mléčné. Jodoacetát byl použit ve studii Shah et al. při velmi nízkých koncentracích, jelikož inhibiční efekt této látky se projevuje již při 25 μM . Výrazně se snížila produkce kyseliny mléčné a při stoupajících koncentracích jodoacetátu se zvyšovala i molekulová hmotnost HA. Při koncentraci 25 μM se dosáhlo molekulové hmotnosti 3,2 MDa, výtěžek HA však zůstal nezměněný. Tryptofan mírně inhibuje pyruvátkinasu, proto se vyzkoušel efekt na syntézu HA. Podobně jako u jodoacetátu se nezměnil výtěžek HA, ale při přidavku 5 g/l tryptofanu se zvýšila molekulová hmotnost HA o 25 %. Jako poslední inhibitor glykolytických enzymů se použil pyruvát o koncentraci 10 g/l, který také zvýšil molekulovou hmotnost HA při dosaženém výtěžku 2,5 g/l na 3,1 MDa. Glutamin, který je součástí tvorby N-acetylglukosaminu, zvýšil výtěžek HA, neměl však žádný efekt na molekulovou hmotnost. Při přidavku glutaminu vznikalo méně kyseliny mléčné, což indikuje redistribuci glukosy více k tvorbě biomasy.²⁶

Ukazuje se, že přidavky prekurzorů k médiu mohou už z počátku kultivace podpořit syntézu vysokomolekulární HA. Chen et al. prokázali, že při nadměrné expresi genu regulujícího produkci UDP-N-acetylglukosaminu se významně zvýšila molekulová hmotnost syntetizované HA, přičemž aby se dosáhlo vysoké molekulové hmotnosti, bylo zapotřebí mít optimální poměr UDP-N-acetylglukosaminu a UDP-glukuronové kyseliny.²⁵ Chen et al. navázali na tyto výsledky a do média přidávali látky, které mohly ovlivnit produkci prekurzorů pro tvorbu HA. Při přidavku glukosaminu se zvýšil obsah UDP-glukuronové kyseliny, což mělo ale za následek pokles molekulové hmotnosti HA. Příčinou byl, jak již sami předtím zmínili v předchozí studii, nevhodný poměr UDP cukerných prekurzorů a velký nadbytek jednoho z nich. Tuto dysbalanci se pokusili napravit suplementací uhlíkových zdrojů, které vedou ke tvorbě obou UDP cukerných prekurzorů. Do média přidali glukosu a N-acetylglukosamin, což mělo za následek vyrovnaní poměrů UDP cukerných prekurzorů na 1:1, ale i tak se neprojevíly žádné změny na finální HA.⁴¹ Badle et al. se zaměřili na tvrzení, že je potřebný ideální poměr UDP cukerných prekurzorů a experimentálně jej potvrdili. Při jejich experimentu se se zvyšujícím se množstvím UDP cukerných prekurzorů zvyšovala i molekulová hmotnost HA. Také potvrdili, že při dysbalanci poměru, a tedy velké převaze jednoho z prekurzorů by naopak došlo k syntéze HA s nízkým výtěžkem i molekulovou hmotností.⁴²

Jako jedna z dalších látek, co má potenciál zvýšit výtěžek i molekulovou hmotnost HA je fosfatidylcholin. Ve studii Sun et al. prokázali, že při koncentraci 80 mg/l se zvýšil výtěžek o 17,4 % a molekulová hmotnost se zvýšila o 67,1 %. V metabolismu *S. zooepidemicus* došlo k přesunu glukosy směrem k syntéze UDP cukerných prekurzorů a snížila se produkce prekurzorů pro glykolýzu a tvorbu biomasy.⁴³

Co se týče jednoduché suplementace živné půdy minerály, na molekulovou hmotnost HA mají vliv převážně kationty sodíku, které mohou zvýšit molekulovou hmotnost až o 20 %. Naopak jiné kationty mají opačný efekt, u hořčíku dochází k inhibici produkce HA, u dalších kationtů nejsou pozorované významné změny. Přestože minerální suplementace nijak pozorovatelně neovlivní produkci HA, může mít pozitivní efekt na růst biomasy.⁴⁴

V případě potřeby produkce nízkomolekulární HA, je možnost využít peroxidu nebo kyseliny askorbové. Tyto látky vyzkoušeli Liu et al., kdy koncentrace 1,0 mmol/g HA peroxidu podobně jako 0,5 mmol/g HA kyseliny askorbové zredukovalo délku řetězce HA z 1,3 MDa na 20 kDa. Když se koncentrace obou látek zvýšila, neprojevíly se významné změny. Díky snížení molekulové hmotnosti se i snížila viskozita média, čímž se umožnil větší prostup kyslíku do média. Výtěžek HA se tím zvýšila z 5,0 g/l na 6,5 g/l.⁴⁵

2.7 Využití kyseliny hyaluronové

Lékařské využití HA v dnešní době převážně vyžaduje vysokou molekulovou hmotnost. Avšak začínají se objevovat velmi důležitá využití taktéž u nízkomolekulární HA.

Roztoky na základě HA jsou používány v oftalmologii pro zákroky na šedý zákal, intraokulární implantát čočky, transplantaci rohovky, filtraci zeleného zákalu a operace sítnice. Přípravky s HA chrání jemnou oční tkáň a vytváří prostor pro manipulaci při chirurgických zákrocích. Jejich hlavní využití je však při náhradě ztracené tekutiny ze sklivce. Dále se používá HA jako viskoelastická ochrana při transplantaci rohovky.²

Při léčbě osteoartritidy je také potřebná HA o vysoké molekulové hmotnosti. Je to z toho důvodu, že HA, která se vyskytuje v synoviální tekutině kolem kloubů v čase degraduje a není schopná rovnoměrně rozprostřít tlak na kloub. Vysokomolekulární HA v synoviální tekutině poskytuje dostatečnou lubrikaci kloubu a pohlcuje nárazy, čímž omezuje opotřebenost kloubu a snižuje tření pohybujících se kostí. Při použití nízkomolekulární HA by nebyl účinek dlouhotrvající a pacienti by museli častěji chodit na injekční podání HA, což by pacienty odrazovalo od zákroku. Pacienti s artritidovým onemocněním přesto musí docházet na aplikaci HA častěji, jelikož je HA degradovaná reaktivními kyslíkovými radikály, které se vyskytují u zánětů.^{2,46} Kloubní výživu nevyužívají pouze lidé, často i chovatelé potřebují poskytnout domácím mazlíčkům doplňkové krmivo pro zlepšení kloubů, šlach nebo pro rekonvalescenci. Příkladem je přípravek Geloren, který se používá jako doplňkové krmivo pro koně (Obr. 7) nebo pro psy.⁴⁷



Obr. 7: Kloubní výživa Geloren^{HA} od společnosti Contipro⁴⁷

HA je používána čím dál více v dermatologii a plastické chirurgii jako výplň vrásek a propadlých jizev nebo pro augmentaci (Obr. 8). Úspěch HA je založen na větší efektivitě udržení úpravy než doposud používané kolagenové produkty. Na rozdíl od nich je HA velmi elastická a má dlouhodobější efekt.² Navíc v případě chybné aplikace se může HA jednoduše odbourat pomocí aplikace hyaluronidasy bez vedlejších účinků.⁴⁸ HA je na druhé straně velmi strukturně citlivá, proto se často využívá metody crosslinking, kdy se propojí HA s jinou látkou, která zvýší stabilitu polymeru. Crosslinking však vede k větší tuhosti polymeru, což může ztížit aplikaci látky, ale zároveň by byla zaručená celková výdrž polymeru.⁴⁹



Obr. 8: Žena věku 66 let, která byla ošetřena 24 mg/ml HA gelovou výplní v laterální a mediální tváři pro obnovení plnosti; nalevo: předtím, napravo: potom⁴⁹

HA s kratšími řetězci se využívá u dalších důležitých biologických funkcí i přesto, že nemá rheologické vlastnosti vysokomolekulární HA. Tato HA má vliv při komplexních buněčných signálních kaskádách u embryogeneze, imunitních odpovědí pro opravu tkání nebo při oplodňování.⁴⁶

Již se objevily studie na využití HA jako nanočástic. Tyto konjugáty s hydrofilní vnější vrstvou a hydrofobní vnitřní vrstvou se můžou používat pro detekci nádorů s vysokou specifitou.⁵⁰

HA podporuje přenos léčivých látek přes kůži. Tento způsob aplikace léčiv představuje mnoho výhod, léčivé látky se vyhnou metabolizaci játry, použití je pro pacienty mnohem snazší a jsou

minimalizované nežádoucí účinky. HA přenáší léčivou látku do epidermis ve dvojnásobném množství v porovnání s kontrolním vodným roztokem.⁶ HA by mohla být také dobrým přenašečem léčiv na rakovinu. Nádory se projevují nadměrnou expresí biomarkerů a receptorů, na které se může navázat látka, která není cytotoxická. Mnoho nádorů vytváří receptory, na které se může navázat HA. Afinita HA k receptorům je ovlivněna velikostí oligomerů, kdy větší oligomery mají větší vaznou afinitu k receptorům. Při navázání léčivé látky na HA s krátkým řetězcem se může zvýšit pravděpodobnost přenosu léčiva k nádoru.⁵¹

Hydrogely vytvořené z HA se už dnes hojně využívají pro regeneraci akutních a chronických ran a popálenin. HA podporuje proliferaci a organizaci tkáně, zatímco udržuje hydrataci kůže a vytváří bariéru mezi ránou a okolím.⁵² Roztok HA spolu s jodovým komplexem (Obr. 9) se také používá pro hojení akutních i chronických ran.⁵³



Obr. 9: Hyiodine pro hojení ran od společnosti Contipro⁵⁴

3. Experimentální část

3.1 Chemikálie

Pro následující experimenty se použil hydroxid sodný (Sigma Aldrich), lauryl síran sodný (SDS, Lach-Ner), enzymatický kaseinový hydrolyzát, kvasničný autolyzát, hydrogenfosforečnan disodný (Sigma Aldrich), glutamát sodný (Brenntag CR s.r.o.), sacharóza (Tereos ttd a.s.), heptahydrát síranu hořečnatého (Lach-Ner), tetrahydrát chloridu manganatého (Sigma Aldrich), glukosa (Barentz spol. s.r.o.), L Glukóza (GOD-POD) (BioVendor), Chelaton III (Lach-Ner), fosfatidylcholin (Sigma Aldrich), isopropylalkohol (Contipro a.s.), kyselina octová (98%, Lach-Ner), Struktol SB2020 (Schill + Seilacher), invertasa (Sigma Aldrich) a chlorid sodný (Salinen Austria).

3.2 Experimentální vybavení

Pro experimenty se použil fermentační systém MULTIFORS (Infors HT), odstředivka miniSpin (Eppendorf), spektrofotometr Helios Epsilon (Thermo Scientific), viskozimetr Viskolead PRO L s PPR vřeteny (Fungilab), hřidelová míchačka (IKA), autokláv Fedegari, sušící váha Radwag, laboratorní váha Ohaus, magnetická míchačka (IKA), pH metr (VTW), dispergační zařízení ultraturax (IKA) a sušárna Ecocell 111 (BMT).

3.3 Příprava média

Standardní složení živné půdy bylo shodné pro přípravu inokul i produkční fermentace:

- EKH (enzymatický kaseinový hydrolyzát) – 10 g/l
- Kvasničný autolyzát – 2,5 g/l
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ – 4 g/l
- Glutamát sodný, monohydrát – 2 g/l
- Sacharóza – 40 g/l
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,4 g/l
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ – 0,04 g/l

Připravená živná půda se sterilizovala v Erlenmeyerových baňkách nebo ve fermentorech v autoklávu při 120 °C po dobu 20 minut. Po sterilizaci byla fermentační nádoba o objemu 1 litr připojena k řídicí jednotce. Nastavily se následující parametry: teplota, míchání, pH, průtok, gas mix a pO_2 . Po ustálení všech fermentačních parametrů se zkontrolovaly hodnoty a poté se

k médiu přidalo inokulum v množství 4 % celkového média ve fermentoru. Fermentace pro specifickou růstovou rychlost probíhala 24 hodin, pro ostatní měřené parametry probíhala 16 hodin.

3.4 Příprava inokula

Inokulum se připravovalo den před provedením fermentace. Připravila se Erlenmeyerova baňka o objemu 400 ml s médiem, která byla předtím vysterilizovaná v autoklávu. Poté se médium zaočkovalo kulturou *S. zooepidemicus* z předtím připravené Petriho misky. Naočkovaná baňka se nechala kultivovat při 37 °C na třepačce přes noc.

3.5 Přídavek fosfatidylcholinu

Baňky se 100 ml média se sterilizovaly v autoklávu při 120 °C po dobu 20 minut. Do baněk se poté sterilně přidal objem fosfatidylcholinu tak, aby finální koncentrace ve fermentoru byla 160 mg/l a 80 mg/l. Fosfatidylcholin se do fermentorů přidával ve 4. a 6. hodině fermentace. Baňky se napojily na fermentory a po uplynutí nastavené doby se automaticky nadávkoval objem baněk do fermentorů.

3.6 Příprava roztoku glukosy

Pro přídavek glukosy k médiu se připravilo 100 ml roztoku glukosy o koncentraci 40 g/l do láhve typu Duran. Baňky s roztokem glukosy se autoklávovaly po dobu 20 minut při 120 °C. Roztok glukosy se přidal do fermentorů odděleně, aby se předešlo nežádoucím interakcím s médiem při autoklávování. Po zapojení fermentorů se roztok glukosy sterilně nadávkoval do média. Až poté se jednotlivé fermentory zaočkovaly inokulem.

3.7 Měření optické denzity

Z fermentoru se pro stanovování růstové křivky odebíralo v pravidelných hodinových intervalech 5 ml média pro stanovení optické denzity. Spektrofotometricky se změřila optická denzita při vlnové délce 640 nm. Nejprve se změřilo médium nezředěné a poté médium 10x zředěné. Odběry se prováděly do doby, než hodnoty vykazovaly ukončení exponenciální fáze růstu buněk. Další měření optické denzity bylo provedeno po ukončení fermentací.

3.8 Měření viskozity

Po ukončení fermentace se měřila viskozita média na viskozimetru. Do kádinky se odměřilo 150 ml média. Teplota média v kádince se upravila na 28 °C. Do média se vložilo po rysku vřeteno a odečetla se výsledná viskozita v mPa.s.

3.9 Stanovení výtěžku HA

Po ukončení fermentace se médium z fermentoru převedlo do kádinky. Ke vzorku se přidal zásobní roztok SDS/Chelaton (koncentrace SDS 3 g/l a chelatonu 8 g/l), aby odpovídal objemově 1 % celkového množství vzorku. Směs se nechala odstát po dobu 30 minut. Po uplynulé době se navážilo 250 g směsi a naředila se destilovanou vodou do 1 litru. Tato směs se zfiltrovala přes deskový filtr do kádinky s 15 g NaCl. V roztoku se sůl rozmíchala, upravila se hodnota pH na 5 a pokračovalo se srážením kyseliny hyaluronové. Při míchání o 450 1/min se ke směsi přidával nejprve postupně 86% isopropylalkohol do objemu 2500 ml a do objemu 3 l byla sraženina doplněna 100% isopropylalkoholem. Roztok se nechal odstát do té doby, než se kyselina hyaluronová usadila na dně kádinky. Směs se po usazení dekantovala a pokračovalo se dvojnásobným promýváním 86% isopropylalkoholem, přičemž se sraženina při každém přidavku dispergovala a dvakrát promývala 100% isopropylalkoholem. Při posledním promývání se směs dekantovala a kyselina hyaluronová se převedla do Petriho misky. Ta se vložila do sušárny s nastavenou teplotou 60 °C a sraženina se sušila přes noc. Příští den se množství kyseliny hyaluronové zvažilo a změřilo se procento sušiny na rychlosušících váhách.

3.10 Měření cukrů

Na konci fermentace se z fermentorů odebral vzorek pro měření obsahu cukrů. V eppendorfkách se 3x naředil vzorek média demineralizovanou vodou a poté se při 13400 rpm nechal odstředit po dobu 20 minut. Následně se přelil supernatant do čisté eppendorfky a vzorek se dal zamrazit.

Pro analýzu se nechaly vzorky rozmrazit. Do eppendorfek se nejprve napipetovaly 2 µl invertázy. Poté se přidalo 100 µl vzorku. Takto připravená směs se po zamíchání dala inkubovat do třepačky při 37 °C po dobu 90 minut.

Následně se ze vzorků odebralo 10 µl do nové eppendorfky. K tomuto objemu se přidal 1 ml „L-Glukosy GOD-POD“. Podobně se připravily vzorky pro sestavení kalibrační křivky, kdy se do eppendorfek napipetovaly objemy předem připraveného roztoku glukosy. Takto připravené vzorky se opět vložily do třepačky na 10 minut při 37 °C. Po vyjmutí se měřila absorbance vzorků na spektrofotometru při 500 nm.

3.11 Měření molekulové hmotnosti HA

Molekulová hmotnost se stanovovala pomocí chromatografické separace vzorků. Jako kolony se použily PLaquagel – OH mixed nebo PLaquagel – OH mixed s PLaquagel – OH 60 při průtoku 0,8 ml/min v prostředí NaH₂PO₄ · H₂O za pH 7,5 a s 0,05% azidem sodným. Detekce byla provedena pomocí DAWN EOS laserového fotometru zapojeného v sérii s Optilab rEX refraktometrem. Vzorky HA se rozpustily v mobilní fázi a poté se filtrovaly přes 0,2 µm filtry. Jako referenční vzorek se použila komerční kyselina hyaluronová. Molekulová hmotnost se pro každý vzorek měřila 3x.

3.12 Výpočet specifické růstové rychlosti

Pro výpočet specifické růstové rychlosti se využilo následujícího vzorce:

$$\mu = \frac{(\ln X - \ln X_0)}{t - t_0}$$

Za hodnoty X a X₀ se dosadily naměřené optické denzity na konci a začátku exponenciální fáze.

Za hodnoty t a t₀ se dosadily časy (hodiny), při kterých exponenciální fáze skončila a začala.

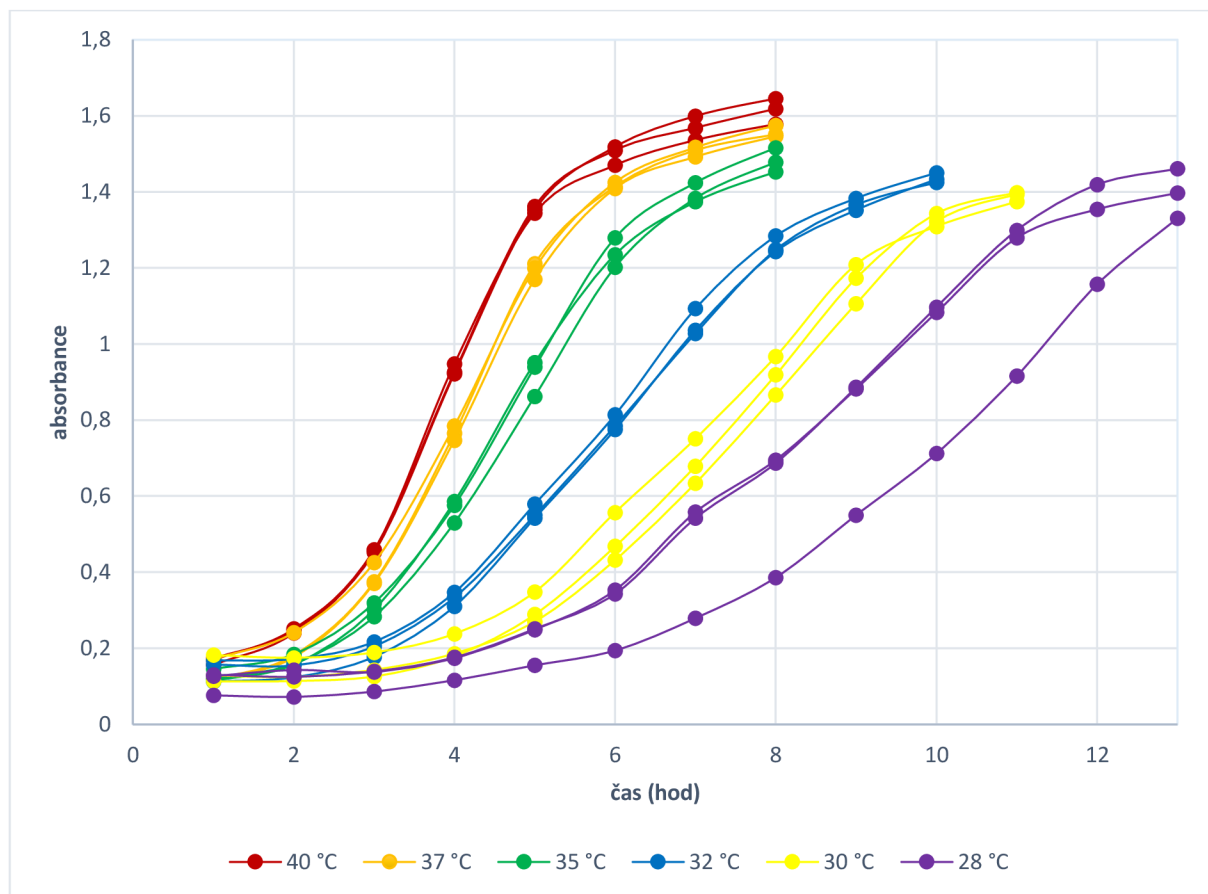
4. Výsledky a diskuze

4.1 Vliv specifické růstové rychlosti

Jeden ze základních kultivačních parametrů při biotechnologických výrobách je teplota. Stanovená optimální teplota *S. zooepidemicus* je 37 °C, jelikož se nejčastěji vyskytuje jako patogenní bakterie způsobující onemocnění koní.¹¹ Změnou nastavené teploty jsme chtěli docílit rozdílných růstových rychlostí kultury.

Při nastavení vhodné specifické růstové rychlosti by mělo být možné do určité míry regulovat požadovanou molekulovou hmotnost HA.^{30,40} Z tohoto důvodu jsme sledovali vliv specifické růstové rychlosti na kultivaci HA. Pro pokusy jsme zvolili hodnoty teplot v rozmezí 40-28 °C.

Každý pokus byl prováděn ve 3 opakováních. Nejrychlejší nárůst nastal u teploty 40 °C (Graf 1), růstová křivka se však nějak významně neodlišoval od teploty 37 °C. Od teplot 35 °C a níže dochází k pomalejšímu růstu *S. zooepidemicus*. Při teplotě 32 °C docházelo k oddálení začátku exponenciální fáze o hodinu oproti teplotám 35 °C a výše, kdy exponenciální fáze začínala po 4 hodinách. Nejpomalejší a nejpozvolnější růst *S. zooepidemicus* byl za teploty 28 °C. Při této teplotě byl pozorován největší rozptyl naměřených hodnot růstových křivek. U ostatních teplot byla opakovatelnost měření růstových křivek odpovídající.



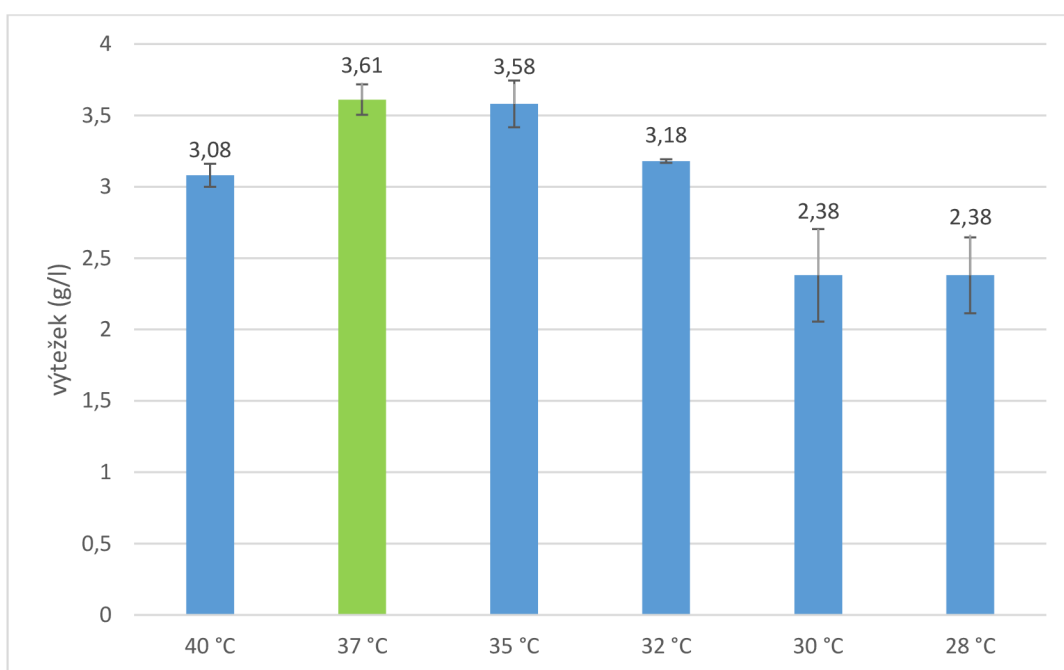
Graf 1: Srovnání růstových křivek *S. zooepidemicus* při teplotách 28, 30, 32, 35, 37, 40 °C

Specifická růstová rychlost stoupala s narůstající teplotou (Tab. 1). Nejvyšších hodnot bylo dosaženo při 40 °C, tato hodnota je tedy optimální pro maximální růst buněk. Při této specifické růstové rychlosti však bylo dosaženo výrazně nižší molekulové hmotnosti (Tab. 2). Naopak ideální hodnota specifické růstové rychlosti je při 32 °C, kdy se syntetizovala vysokomolekulární HA.

Tab. 1: Specifická růstová rychlost buněk *S. zooepidemicus* za různých teplot

Teplota (°C)	Specifická růstová rychlost (h ⁻¹)
40	0,544 ± 0,004
37	0,430 ± 0,019
35	0,383 ± 0,010
32	0,335 ± 0,009
30	0,297 ± 0,023
28	0,253 ± 0,032

Výtěžky HA při jednotlivých kultivacích se značně lišily (Graf 2). Jak se předpokládalo, při 37 °C byly nejvyšší výtěžky, srovnatelný výsledek byl i v případě teploty 35 °C, kdy z vyhodnocení t-testu vidíme, že 2°C rozdíl nezpůsobil razantní změnu ve výtěžku. Snížené výtěžky kolem 3 g/l nastaly u teplot 40 a 32 °C a nižší výtěžky se získaly při teplotě 30 a 28 °C. Ve studii Armstrong et al. dosáhli nejvyšších výtěžků HA u teplot 32 a 35 °C, naopak výtěžky klesly za teplot nad 40 °C, což nastalo i v našem případě. U této studie však nedosáhli vysokých hodnot výtěžků, naše hodnoty byly prakticky dvojnásobné. Nízké výtěžky mohou být způsobené tím, že jejich médium obsahovalo 20 g/l glukosy, což je nižší oproti koncentraci 40 g/l sacharózy v našem médiu. Nebyl také prozkoumán vliv nižších teplot pod 32 °C, kdy dochází ke snížení výtěžků.³⁰ Důvod snížení výtěžků HA za nízkých teplot je asi dáno zpomalenějším růstem buněk *S. zooepidemicus*, který tudíž tolik nespotřebovával substráty a nesyntetizoval velké množství HA.



Graf 2: Srovnání výtěžků kyseliny hyaluronové při kultivacích za různých teplot

U molekulové hmotnosti pro jednotlivé teploty se ukázaly větší rozdíly pouze u dvou teplot. Při 40 °C klesla molekulová hmotnost na 1,673 MDa, snížila se tedy o 14 % (Tab. 1). Tady se nejspíš projevila vyšší zátěž teploty na produkci HA a celkově na buňky *S. zooepidemicus*. Je možné, že vyšší teploty mohly působit na HA degradačně, případně vysoká teplota urychlila metabolismus *S. zooepidemicus* natolik, že nezadržovala řetězce HA uvnitř buněk a propouštěla polysacharid dříve skrz membránu a proto se snížila molekulová hmotnost. Naopak překvapením je vyšší molekulová hmotnost HA při teplotě 32 °C, která se zvýšila o 12 %.

Při ostatních teplotách se udržovaly molekulové hmotnosti na stálých hodnotách kolem 2 MDa. Je tedy statisticky rozdílná molekulová hmotnost mezi teplotami 32 a 40 °C. Optimální růstová rychlost pro vysokomolekulární HA by mohla být 0,335 h⁻¹ a nejvyšší, tudíž nejhorší růstová rychlost pro vysokomolekulární HA by byla 0,544 h⁻¹.

Podobné výsledky vlivu teploty na molekulovou hmotnost byly prokázány ve studii Armstrong et al. Nejvyšší molekulové hmotnosti dosáhli za teploty 32 °C, výrazně hodnoty klesly při teplotách vyšších než 40 °C.³⁰ Stejně tak u studie Jagannath et al. se molekulová hmotnost výrazně zvýšila u nižší teploty, v jejich případě při 30 °C a 27 °C. Při provedení flux analýzy zjistili, že proudilo více jak dvojnásobné množství glukosy směrem k výrobě HA při 30 °C oproti 37 °C. Přesto i při těchto teplotách byl nižší výtěžek HA, u teploty 30 °C byl výtěžek 2,15 g/l a u teploty 27 °C hodnota 2,12 g/l.⁴⁰

Tab. 2: Molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové za různých teplot

Teplota (°C)	Molekulová hmotnost HA (MDa)	t-test (krit. hodnota 2,306)
40	1,673 ± 0,029	5,211
37	1,945 ± 0,144	-
35	1,954 ± 0,086	0,167
32	2,208 ± 0,086	4,437
30	2,031 ± 0,114	1,324
28	2,054 ± 0,029	0,656

Teplota neměla výrazný vliv na optickou denzitu média, nejvyšší hodnoty se dosáhlo při 35 °C. (Tab. 3).

Tab. 3: Optická denzita a specifická růstová rychlost *S. zooepidemicus* za různých teplot

Teplota (°C)	OD
40	1,586
37	1,635
35	1,662
32	1,556
30	1,586
28	1,556

Viskozita média již při zpracování HA může napovědět, jestli při kultivaci byl vysoký výtěžek HA nebo se produkovala HA o vysoké molekulové hmotnosti. Při teplotě 40 °C byla velmi nízká viskozita, což odpovídá nižšímu výtěžku, a hlavně nízké molekulové hmotnosti HA

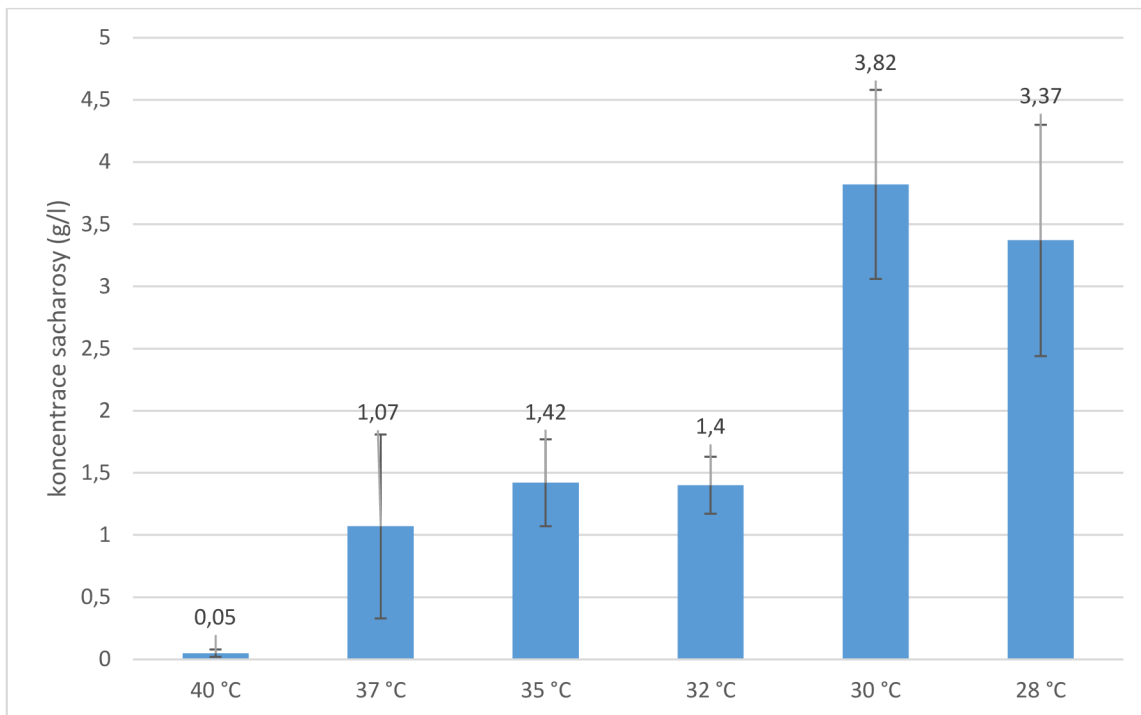
(Tab. 4). Rozmezí teplot 37-32 °C mělo vysokou viskozitu, opět odpovídající vysoké molekulové hmotnosti a vysokému výtěžku. Za nižších teplot 30-28 °C byla viskozita nižší ne kvůli molekulové hmotnosti, která byla 2 MDa, naopak při kultivaci za těchto teplot byl výtěžek velmi nízký. Můžeme tedy říct, že molekulová hmotnost a koncentrace HA v médiu má přímý vliv na viskozitu.

Tab. 4: Viskozita média za různých teplot

Teplota (°C)	Viskozita (mPa.s)
40	139 ± 28
37	448 ± 43
35	596 ± 61
32	500 ± 27
30	212 ± 81
28	170 ± 173

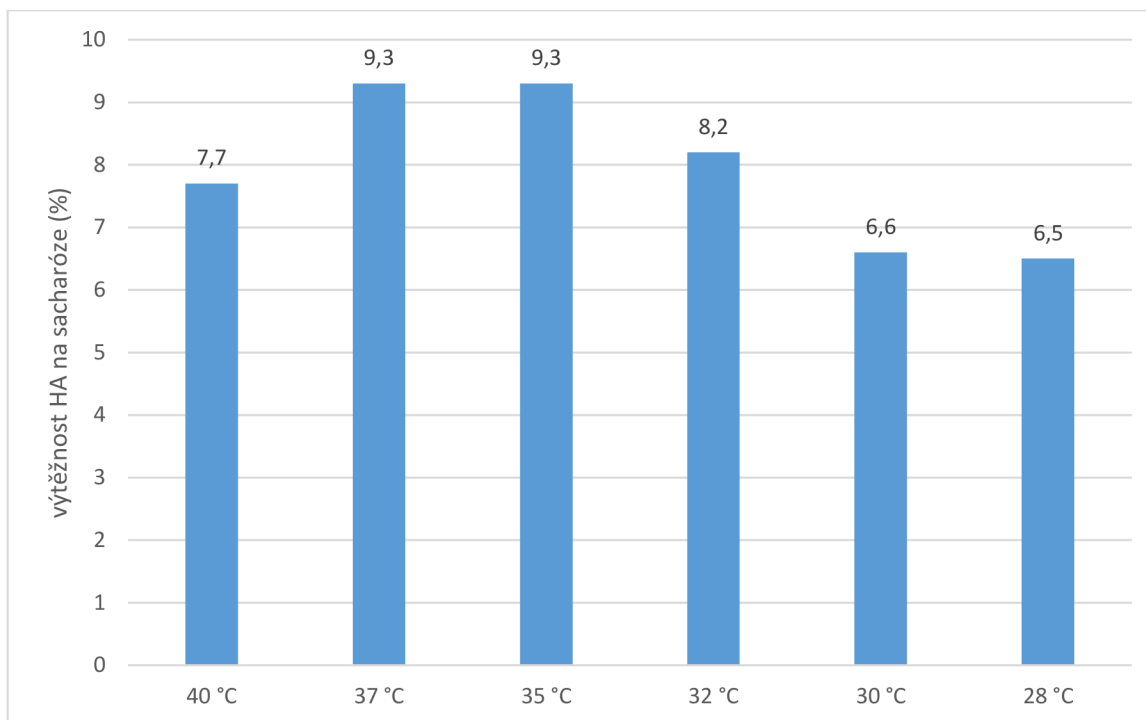
Dále jsme zkoumali vliv specifické růstové rychlosti na výtěžnost HA na sacharóze na konci kultivace, tedy po 24 hodinách. Na začátku každé kultivace byla koncentrace sacharózy v médiu 40 g/l. Nejvyšší spotřeba sacharózy nastala za teploty 40 °C (Graf 3). Konečná koncentrace 0,05 g/l vypovídá o náročnosti vysoké teploty na *S. zooepidemicus*. Mohlo zde dojít k již zmíněnému zrychlení metabolismu buněk, tudíž se substráty spotřebovaly rychleji, než při nižších teplotách a tedy se během krátké doby mohla spotřebovat veškerá sacharóza v médiu. Je možné, že se ve větší míře také v médiu tvořily organické kyseliny, jelikož byla maximálně spotřebovaná sacharóza v médiu, která nebyla více převedena na HA nebo na biomasu.

U dalších teplot byla pozorována nižší spotřeba sacharózy, přičemž u teplot 30 °C a 28 °C byla koncentrace sacharózy v médiu cca 3,5 g/l. To by odpovídalo nižším výtěžkům u těchto teplot. Tudíž se zřejmě plně nevyužila sacharóza na výrobu HA. Případně došlo k přesunu využití sacharózy směrem k tvorbě organických kyselin, když bychom přihlédl i k hodnotám viskozity konečného média (Tab. 4).



Graf 3: Srovnání koncentrace sacharózy v médiu po 24 hodinách kultivace za různých teplot

Z výsledků produkce HA a spotřeby sacharózy během fermentace byla spočítána výtěžnost kyseliny hyaluronové na 1 gram sacharózy. Tato hodnota byla nejvyšší u teplot 37 °C a 35 °C, což odpovídá našim předpokladům (Graf 4). Nejnižších hodnot se dosáhlo opět u teplot 30 °C a 28 °C. Jelikož se hodnoty optické denzity u těchto teplot pouze mírně snížily, nedá se předpokládat, že sacharóza byla využita na tvorbu buněčné stěny. Je možné, že když při nízkých teplotách rostly buňky pomaleji, využily také sacharózu pro udržení funkce metabolismu.



Graf 4: Srovnání výtěžnosti kyseliny hyaluronové na sacharóze za různých teplot

Dle výsledků můžeme shrnout, že teplota a z ní odvozená specifická růstová rychlost může mít vliv na molekulovou hmotnost HA. Za nižších teplot můžeme dosáhnout vyšší molekulové hmotnosti.

Teploty vyšší než 37 °C nejsou pro kultivaci *S. zooepidemicus* a výrobu HA výhodné, pouze možná se záměrem výroby HA s nižší molekulovou hmotností, v tomto případě se však musí počítat s poklesem výtěžku HA.

Při kultivacích s nastavenou teplotou 30 °C a 28 °C bylo dosaženo srovnatelných molekulových hmotností jako u standardní fermentace s 37 °C, ale došlo k poklesu výtěžku HA.

4.2 Vliv míchání a vzdušnění

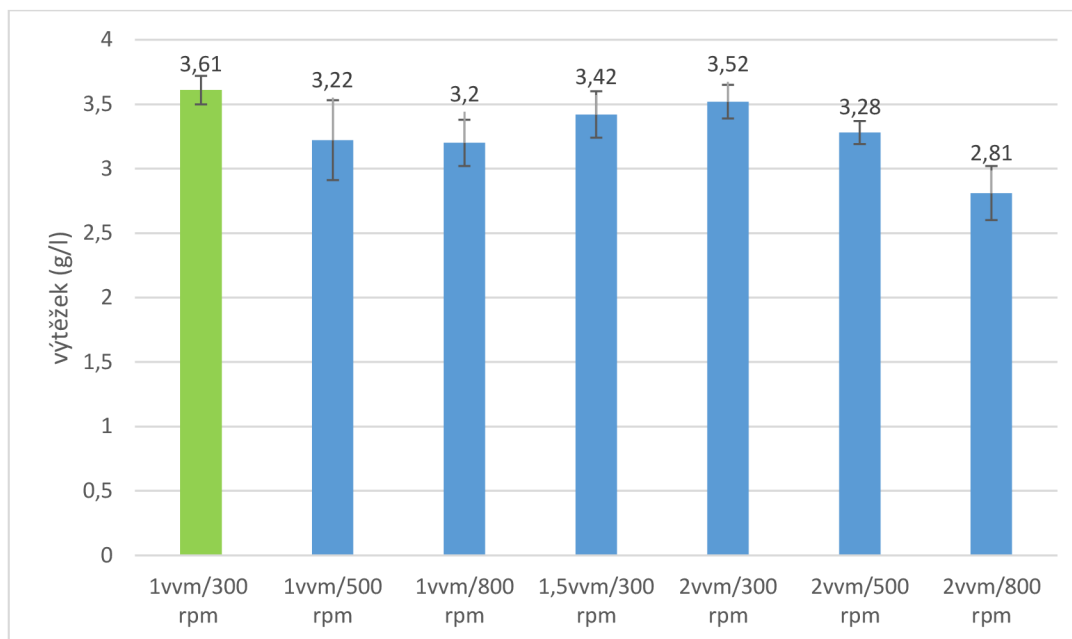
Mnoho studií na výrobu HA se soustředilo na vliv vzdušnění a míchání.³²⁻³⁶ Vliv těchto dvou parametrů není úplně objasněn, často i z důvodu odlišných výsledků jednotlivých experimentů.

Vzdušnění je pro produkci HA klíčový parametr, naopak na růst biomasy nemá kyslík významný vliv. Bez přístupu kyslíku je dosahováno velmi nízké produkce HA na úkor produkce organických kyselin.⁹ Při biotechnologické výrobě se zvyšuje viskozita média, čímž dochází k horšímu přestupu kyslíku do média. V tomto případě napomáhá promíchávání média. Intenzita míchání nesmí ale přesáhnout určitou hodnotu, jinak může dojít ke snížení molekulové

hmotnosti vyrobené kyseliny hyaluronové a přílišnému stresu na buňky *S. zooepidemicus*. Zaměřili jsme se na vzájemné působení míchání a vzdušnění a jejich vlivu na produkci kyseliny hyaluronové.

Změny v míchání a vzdušnění nijak významně neovlivnily výtěžky většiny kultur (Graf 5). Pouze u vzorku s nejvyššími hodnotami míchání a vzdušnění, tedy 800 rpm/2 vvm, se výtěžek snížil o 22 %. Zde se mohl projevit vliv předimenzovaných otáček, který vyvolal nadměrný mechanický stres na buňky *S. zooepidemicus* nebo mohlo také dojít k přílišnému stresu způsobenému vyšším množstvím kyslíku. Mírnější pokles výtěžků byl pozorován také u vzorku s vysokými otáčkami, tedy 800 rpm/1 vvm. Dle výsledků se však dá usoudit, že optimálním nastavením otáček pro vysoké výtěžky je hodnota 300 rpm.

Pokud hodnota rozpuštěného kyslíku v médiu přesáhne určitou koncentraci, působí degradačně na vytvořenou HA. Kombinace dvou stresových faktorů, tedy působení mechanického stresu a nadměrného množství rozpuštěného kyslíku v médiu, velmi ovlivňuje výtěžky HA. U studie Armstrong et al. a Duan et al. nemělo míchání efekt na výtěžky HA, ani za vysokých otáček 1000 rpm. V případě experimentu Armstrong et al. byly podmínky kultivace nastaveny tak, že prvních 12 hodin byly otáčky nastaveny na 300 rpm a poté na 1000 rpm po dobu 6 hodin. Vysoké otáčky byly nastaveny pravděpodobně až během stacionární fáze kultivace, zatímco během našeho experimentu byly hodnoty míchání udržovány konstantní po celou dobu kultivace.³⁰ U studie Duan et al. byla za různých hodnot míchání udržována stejná úroveň rozpuštěného kyslíku na 50 %, což u našeho experimentu byla hodnota vzdušnění konstantní.³⁴ Huang et al. zjistili, že výtěžky HA stouply při navýšení otáček z 200 rpm na 400 rpm, jelikož se takto zvýšila hodnota rozpuštěného kyslíku v médiu. V tomto experimentu neudržovali konstantní množství rozpuštěného kyslíku v médiu. Naopak při udržování konstantní hodnoty rozpuštěného kyslíku a navýšení otáček z 200 rpm na 400 rpm se výtěžky HA nijak nezměnily.³²



Graf 5: Srovnání výtěžků kyseliny hyaluronové při kultivacích za různých míchání/vzdušnění

Na rozdíl od výtěžku HA se zvýšení intenzity míchání a vzdušnění výrazně podepsalo na molekulové hmotnosti. Kromě nastavených podmínek 1,5 vvm/300 rpm došlo k výraznému nárůstu molekulové hmotnosti HA u všech provedených experimentů.

Z Tab. 5 je patrný pozvolný nárůst molekulové hmotnosti při zvyšování počtu otáček na 800 rpm. K nárůstu molekulové hmotnosti došlo i při zvýšení vzdušnění z 1 vvm na 2 vvm. Při zvýšení vzdušnění o 0,5 vvm však nedošlo k statisticky významnému navýšení molekulové hmotnosti.

U vzorku 1 vvm/800 rpm se dosáhlo nejvyšší molekulové hmotnosti, kde byl pozorován nárůst o 22 % oproti kontrolnímu vzorku. Při srovnání molekulových hmotností u těchto dvou vzorků by se předpokládalo, že při intenzivnějším vzdušnění se molekulová hmotnost ještě navýší, naopak hodnota klesla. I přesto vznikla kyselina hyaluronová s o 19 % vyšší molekulovou hmotností v porovnání se standardem.

Dle výsledků můžeme usoudit, že na molekulovou hmotnost má větší vliv míchání než vzdušnění. Má to pravděpodobně spojitost s rozpuštěným kyslíkem v médiu, který podporuje produkci vysokomolekulární HA. Čím více se promíchává velmi viskózní roztok, tím intenzivněji do něj může přestupovat kyslík. Samotné vzdušnění nemá tak markantní efekt.

Přesto však nelze úplně zavrhnout vliv vzdušnění na molekulovou hmotnost i při nízkých otáčkách. Při srovnání vzorků 1 vvm/300 rpm a 2 vvm/300 rpm došlo k statisticky významnému nárůstu molekulové hmotnosti.

Tab. 5: Molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové za různých míchání/vzdušnění

Míchání/vzdušnění	Molekulová hmotnost HA (MDa)	t-test (krit. hodnota 2,306)
1 vvm/300 rpm (kontrolní)	1,945 ± 0,144	-
1 vvm/500 rpm	2,103 ± 0,035	3,023
1 vvm/800 rpm	2,481 ± 0,033	10,246
1,5 vvm/300 rpm	2,019 ± 0,049	1,388
2 vvm/300 rpm	2,101 ± 0,103	2,501
2 vvm/500 rpm	2,251 ± 0,112	4,747
2 vvm/800 rpm	2,388 ± 0,037	8,416

U studie Armstrong et al. nemělo míchání žádný efekt na molekulovou hmotnost. Poté prováděli experiment s nastavenými parametry 0,2 vvm/600 rpm a 1 vvm/600 rpm u kultivací, kdy dosáhli vysokých molekulových hmotností (2,3 a 2,65 MDa). Nelze však s těmito výsledky úplně srovnávat, jelikož mají omezenější rozpětí nastavených parametrů.³⁰

Naopak Duan et al. dosáhli vysokomolekulární HA s navyšující se úrovní rozpuštěného kyslíku. U míchání došli k nejvyšší molekulární hmotnosti při nastavení 450 rpm, hodnoty 700 a 1000 rpm již znamenaly pokles molekulární hmotnosti o 8 a 23 %.³⁴

Tab. 6: Optická densita *S. zooepidemicus* po 24 hodinách za různého míchání/vzdušnění

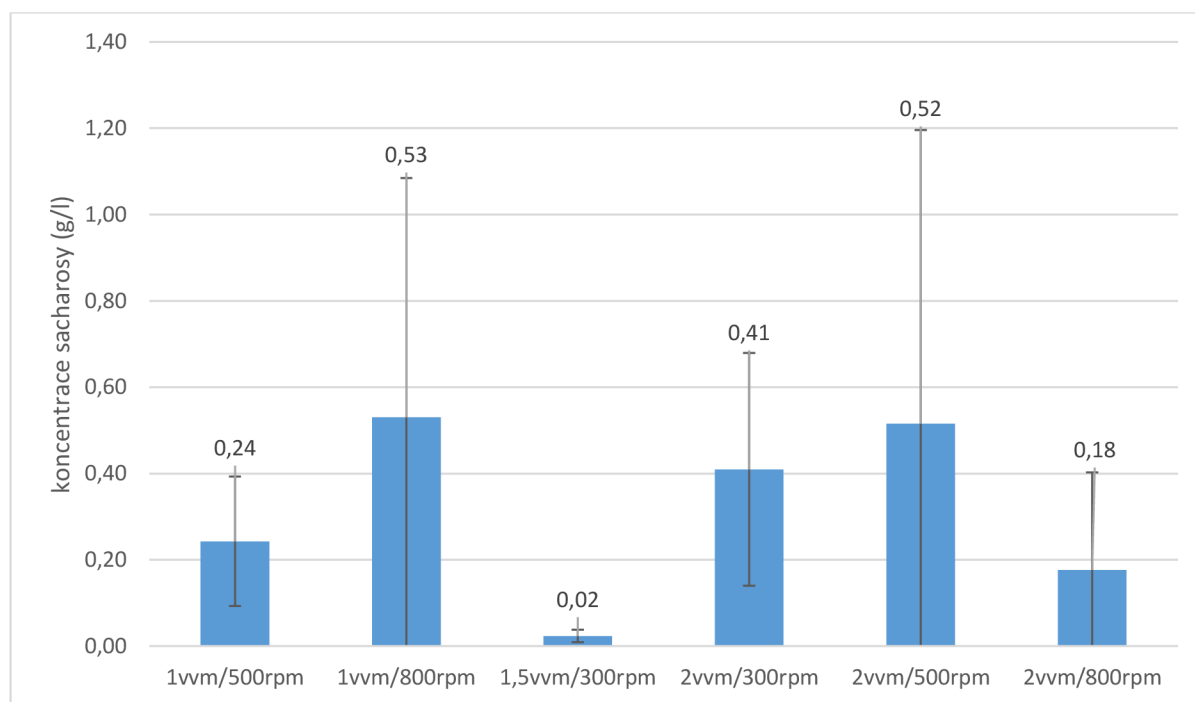
Míchání/vzdušnění	OD
1 vvm/300 rpm (kontrolní)	1,635
1 vvm/500 rpm	1,651
1 vvm/800 rpm	1,664
1,5 vvm/300 rpm	1,697
2 vvm/300 rpm	1,704
2 vvm/500 rpm	1,657
2 vvm/800 rpm	1,649

Optická densita se příliš nelišila u jednotlivých vzorků, pouze například u vzorku 2 vvm/300 rpm byla mírně zvýšená optická densita (Tab. 6). Míchání a vzdušnění nemá vliv na růst *S. zooepidemicus*, který je fakultativně anaerobní organismus. Tyto parametry spíše ovlivňují tvorbu kyseliny hyaluronové.

Tab. 7: Viskozita média za různého míchání/vzdušnění

Míchání/vzdušnění	Viskozita (mPa.s)
1 vvm/300 rpm	448 ± 43
1 vvm/500 rpm	344 ± 126
1 vvm/800 rpm	483 ± 110
1,5 vvm/300 rpm	416 ± 112
2 vvm/300 rpm	550 ± 141
2 vvm/500 rpm	446 ± 89
2 vvm/800 rpm	264 ± 43

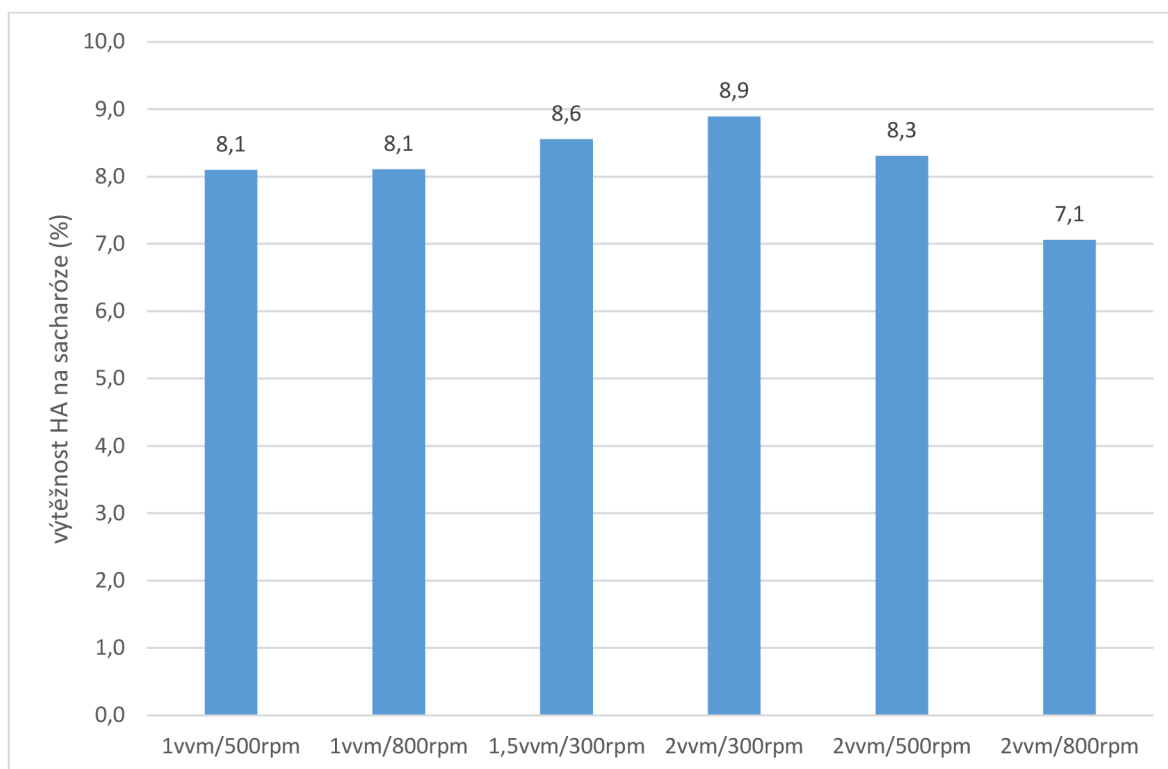
Viskozita jednotlivých kultivací opět odpovídá finálním molekulovým hmotnostem i výtěžkům. U vzorku 2 vvm/800 rpm sice byla vysokomolekulová HA, ale z důvodu nízkého výtěžku se snížila také viskozita média (Tab. 7). U těchto vzorků byla i vyšší variabilita viskozit, což je patrné ze směrodatných odchylek.



Graf 6: Srovnání koncentrace sacharózy v médiu po 24 hodinách kultivace za různého míchání/vzdušnění

Konečná koncentrace sacharózy v médiu po 24 hodinách kultivace (Graf 6) byla velmi podobná pro všechny parametry. Při výpočtu výtěžnosti kyseliny hyaluronové na gram sacharózy se však projevilo u kultivace 2 vvm/800 rpm snížení výtěžnosti (Graf 7). Přestože za těchto podmínek se vytvořila HA s vysokou molekulovou hmotností, dosáhlo se nízké výtěžnosti. Naddimenzované podmínky kultivace pravděpodobně nenapomáhaly efektivnímu převodu

glukosu na HA, tudíž byla glukosa využita pro tvorbu organických kyselin, čemuž napovídá snížená viskozita konečného média (Tab. 6). Glukosa nebyla pravděpodobně využita pro tvorbu biomasy, jelikož se nijak nelišila optická denzita vzorku ve srovnání s ostatními vzorky (Tab. 6).



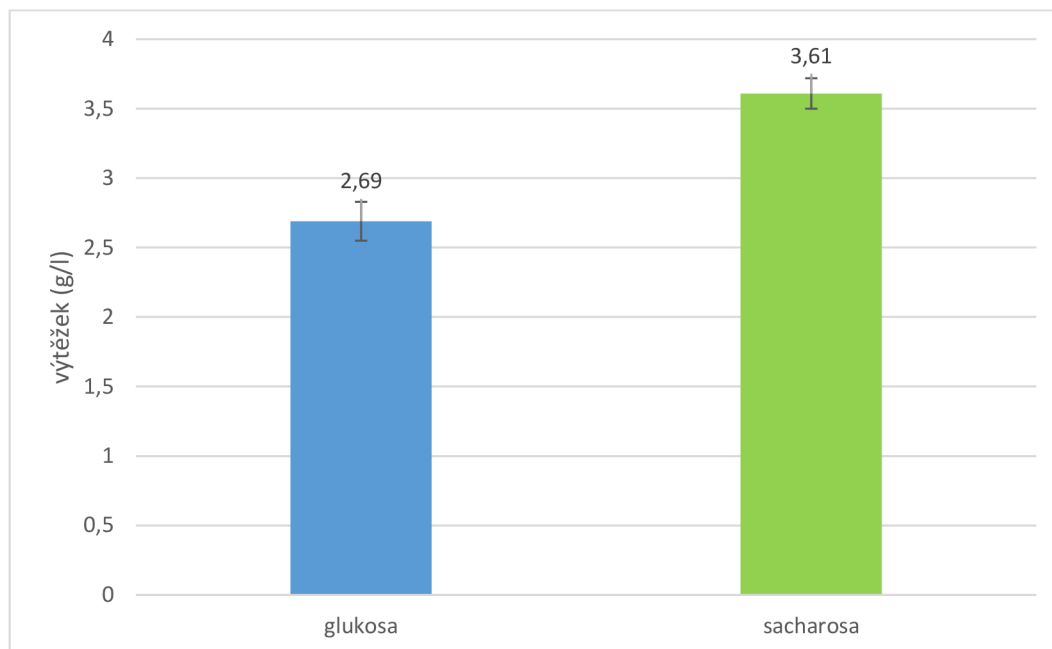
Graf 7: Srovnání výtěžnosti kyseliny hyaluronové na 1 gram sacharózy za různého míchání/vzdušnění

Míchání a vzdušnění nemělo výrazný vliv na výtěžky jednotlivých kultivací, pouze při nejvyšších otáčkách, tedy 800 rpm, došlo k poklesu výtěžku. Dle výsledků lze konstatovat, že vyšší otáčky a vzdušnění podporují produkci vysokomolekulární kyseliny hyaluronové. Významnější je však vliv míchání než vzdušnění.

4.3 Vliv změny zdroje uhlíku

S. zooepidemicus pro růst vyžaduje zdroj uhlíku. U metabolismu *S. zooepidemicus* se glukosa zpracovává na glukosa-6-fosfát nebo na fruktosa-6-fosfát, ze kterých se vytváří prekurzory pro vznik kyseliny hyaluronové. Glukosa je prekurzorem pro tvorbu jak kyseliny hyaluronové, tak i buněčné stěny. Na základě kultivačních parametrů se však mění rozložení substrátu mezi tyto dva procesy.

Při našich experimentech byla sacharóza zdrojem uhlíku pro buňky *S. zooepidemicus*. U mnoha kultivací se však používá pro kultivaci glukosa. Chtěli jsme proto vyzkoušet, jaký bude mít efekt glukosa na molekulovou hmotnost a výtěžky HA za našich kultivačních podmínek.



Graf 8: Srovnání výtěžků kyseliny hyaluronové při kultivacích za změny zdroje uhlíku

Jak lze vidět z Grafu 8, výtěžky kultivace poklesly o 25 %. Molekulová hmotnost taktéž klesla, o 19 % oproti kontrolnímu vzorku. (Tab. 8). Ze všech kultivací bylo právě zde dosaženo nejnižších hodnot jak u výtěžků, tak i molekulové hmotnosti.

Nízká molekulová hmotnost za použití glukosy neodpovídá výsledkům většiny studií. U Armstrong et al. došlo k navýšení jak výtěžků, tak i molekulové hmotnosti při použití koncentrací 40 g/l a 60 g/l glukosy.⁹ Mírnější nárůst molekulové hmotnosti i výtěžků HA byl pozorován u studie Jagannath et al. Ti také pozorovali nárůst tvorby kyseliny mléčné, která může mít inhibiční efekt na tvorbu HA.⁴⁰

Také by mohlo být zajímavé vyzkoušet vliv snížení nebo zvýšení koncentrace glukosy v médiu na molekulovou hmotnost nebo výtěžek HA, jelikož koncentrace 40 g/l nebyla v našem případě optimální pro tvorbu vysokomolekulární HA.

Tab. 8: Molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové za změny zdroje uhlíku

Zdroj uhlíku	Molekulová hmotnost HA (MDa)	t-test (krit. hodnota 2,306)
Glukosa	1,569 ± 0,172	4,727
Sacharóza (kontrolní)	1,945 ± 0,144	-

Glukosa neměla vliv na optickou denzitu, která se nijak nelišila od kontrolního vzorku (Tab. 9). Je možné, že tato koncentrace glukosy již mohla vykazovat inhibiční vlastnosti na tvorbu HA, přičemž u studie Pires et al se při koncentraci 25 g/l dosáhlo nejúčinnější konverze glukosy na HA, u koncentrace 45 g/l byla hodnota konverze o polovinu nižší. V této studii také potvrdili, že při koncentraci 25 g/l pozorovali nevyšší výtěžky HA.³⁹

Tab. 9: Optická denzita *S. zooepidemicus* po 24 hodinách za změny zdroje uhlíku

Zdroj uhlíku	OD
Glukosa	1,634
Sacharóza	1,645

Velmi nízká viskozita média odpovídá hodnotě výtěžku, který klesl o 25 % a molekulové hmotnosti, která klesla o 19 % (Tab. 10).

Tab. 10: Viskozita média za změny zdroje uhlíku

Zdroj uhlíku	Viskozita (mPa.s)
Glukosa	87 ± 14

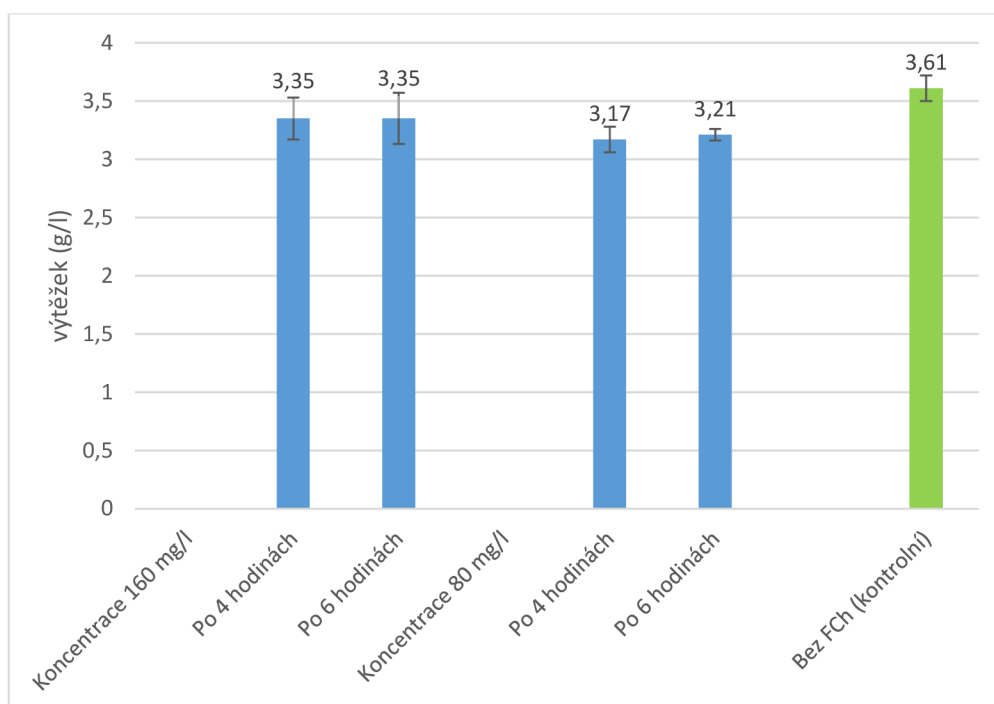
Substituce sacharózy glukosou o koncentraci 40 g/l nepodporuje syntézu vysokomolekulární HA s vysokými výtěžky, jelikož je pravděpodobné, že optimální koncentrace glukosy pro tvorbu HA je 20-25 g/l.³⁹ Je možné provést za našich podmínek kultivaci s glukosou jako hlavním zdrojem uhlíku pouze v případě navýšení nebo snížení koncentrace glukosy v médiu, ale i přesto není zaručené, že by glukosa podporovala vyšší produkci. Také by vysoké koncentrace glukosy použité pro kultivaci nebyly příliš ekonomické v rámci velké biotechnologické výroby.

4.4 Vliv přidavku fosfatidylcholinu

Glycerolfosfolipidy jsou membránové lipidy, které se skládají z fosfát-alkoholu a dvou mastných kyselin navázaných esterovou vazbou na glycerol. Mezi ně patří fosfatidylcholin.⁵⁵

V biotechnologické výrobě se fosfolipidy běžně používají jako přídavek při kultivacích pro zvýšení výtěžků.⁴³

Na základě výsledků studie Sun et al. jsme se rozhodli ověřit možný vliv přidavku fosfatidylcholinu na výtěžek a molekulovou hmotnost HA.



Graf 9: Srovnání výtěžků kyseliny hyaluronové při kultivacích za přidavku fosfatidylcholinu

V tomto experimentu byly vyzkoušeny přídavky fosfatidylcholinu při koncentraci 80 mg/l a 160 mg/l v průběhu exponenciální fáze po 4 a 6 hodinách od začátku kultivace.

Při koncentraci 80 mg/l fosfatidylcholinu výtěžky mírně klesly. Ve srovnání s koncentrací 160 mg/l se výtěžky HA mírně navýšily (Graf 9). Doba přidavku však neměla žádný vliv na výtěžky HA. Výsledky studie Sun et al. byly úplně opačné. Při stoupající koncentraci 20-80 mg/l postupně stoupaly výtěžky, ale při překročení koncentrace 80 mg/l výtěžky HA prudce klesly.⁴³ V našem případě přídavek fosfatidylcholinu o koncentraci 80 g/l snížil výtěžek HA oproti kontrolnímu vzorku, ale naopak při dvojnásobné koncentraci se výtěžek mírně navýšil, což se dle výsledků Sun et al. nepředpokládalo.

Tab. 11: Molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové za přidavku fosfatidylcholinu

Koncentrace 160 mg/l	Molekulová hmotnost HA (MDa)	t-test (krit. hodnota 2,306)
Po 4 hodinách	2,126 ± 0,090	3,020
Po 6 hodinách	2,129 ± 0,055	3,378
Koncentrace 80 mg/l		
Po 4 hodinách	1,733 ± 0,074	3,686
Po 6 hodinách	1,573 ± 0,314	3,038
Bez FCh (kontrolní)	1,945 ± 0,144	-

Co se týče molekulové hmotnosti, při koncentraci 160 mg/l se hodnota zvýšila o 9 % oproti kontrolnímu vzorku (Tab. 11). Při koncentraci 80 mg/l fosfatidylcholinu naopak molekulová hmotnost klesla o 11 % při přidavku po 4 hodinách a o 19 % při přidavku po 6 hodinách. Výsledky studie Sun et al. ukázaly, že při přidavku fosfatidylcholinu o koncentraci 80 mg/l se zvýšila molekulová hmotnost HA o 40 %, vyšší koncentrace fosfatidylcholinu nezkoušeli.⁴³

Vliv načasování přidavku je patrnější u koncentrace 80 mg/l, při koncentraci 160 mg/l není žádný rozdíl v hodnotách. Fosfatidylcholin by však měl být přidán do média během exponenciální fáze.

Důvod navýšení molekulové hmotnosti dle Sun et al. jsou následující: při přítomnosti fosfatidylcholinu v médiu se změnilo složení buněčných membrán *S. zooepidemicus*, nedošlo tak k vyšší spotřebě energie při uvolňování HA z membrány. Zároveň při prozkoumání rozdělení glukosy v metabolismu *S. zooepidemicus* za přidavku fosfatidylcholinu se použitá glukosa o koncentraci 20 g/l přerozdělila v jiných poměrech do různých metabolických drah. Navýšilo se množství glukosy proudící do syntézy HA, tedy k prekurzorům UDP-N-acetylglukosamin a UDP-glukuronová kyselina a navýšilo se množství ATP. Více ATP je zapříčiněno pravděpodobně vyšší produkcí kyseliny octové, která generuje 1 mol ATP navíc oproti produkci kyseliny mléčné.⁴³

Tab. 12: Optická denzita *S. zooepidemicus* po 24 hodinách za přidavku fosfatidylcholinu

Koncentrace 160 mg/l	OD
Po 4 hodinách	1,776
Po 6 hodinách	1,726
Koncentrace 80 mg/l	
Po 4 hodinách	1,720
Po 6 hodinách	1,692
Bez FCh (kontrolní)	1,635

Ve srovnání s kontrolním vzorkem se navýšila optická denzita vzorků (Tab. 12), což se při změnách jiných parametrů nestalo. Tento nárůst se může vysvětlit na základě vyšší dostupnosti energie, a tedy vyšší podpoře růstu biomasy. Viskozita také celkem odpovídala množství a molekulové hmotnosti produkované kyseliny hyaluronové, jelikož výtěžky všech kultivací byly velmi podobné, pouze u koncentrace 80 mg/l klesla viskozita média v souvislosti s nízkou molekulovou hmotností (Tab. 13).

Tab. 13: Viskozita média za přidavku fosfatidylcholinu

Koncentrace 160 mg/l	Viskozita (mPa.s)
Po 4 hodinách	373 ± 76
Po 6 hodinách	352 ± 96
Koncentrace 80 mg/l	
Po 4 hodinách	366 ± 41
Po 6 hodinách	358 ± 20

Koncentrace 80 mg/l fosfatidylcholinu nepodpořila produkci vysokomolekulární kyseliny hyaluronové. Koncentrace 160 mg/l fosfatidylcholinu vyvolala produkci vysokomolekulární HA se srovnatelnými hodnotami výtěžků u kontrolního vzorku. Při vyšších koncentracích může být fosfatidylcholin využíván jako látka podporující produkci vysokomolekulární kyseliny hyaluronové.

5. Závěr

Cílem této práce bylo zjistit, jaký vliv mají jednotlivé kultivační parametry na molekulovou hmotnost a výtěžky kyseliny hyaluronové.

Specifická růstová rychlost jako jeden z klíčových parametrů kultivace měla významný vliv na produkci kyseliny hyaluronové. Nejvyšších výtěžků bylo dosaženo při teplotách 37-35 °C, u teplot pod 30 °C a nad 40 °C prudce klesala produkce HA. Vysokomolekulární HA byla produkována za suboptimální teploty 32 °C při specifické růstové rychlosti 0,335 h⁻¹. Při teplotě 40 °C a specifické růstové rychlosti 0,544 h⁻¹ se tvořila kyselina hyaluronová s molekulární hmotností 1,673 MDa, čímž se pravděpodobně projevil efekt nadměrného stresu vysoké teploty.

Parametry míchání a vzdušnění jsou velmi těsně propojené, jelikož se jejich vzájemné efekty při kultivacích doplňují. Při experimentech nebylo pozorováno zvýšení výtěžků kultivací za intenzivnějšího míchání a vzdušnění, pouze u vzorků míchaných za 800 rpm došlo ke snížení výtěžků HA o 11-22 %. Molekulová hmotnost kyseliny hyaluronové se při kultivaci za vyšších otáček významně zvýšila. Nejvyšší hodnoty, tedy 2,481 MDa, bylo dosaženo při 1 vvm/800 rpm a druhé nejvyšší hodnoty, tedy 2,388 MDa při 2 vvm/800 rpm. Vyšší otáčky tedy zlepšily propustnost kyslíku do média a tím se podpořila produkce vysokomolekulární kyseliny hyaluronové. Vzdušnění mělo menší efekt během kultivací, jelikož bez míchání by byla propustnost do média minimální. Přesto se molekulová hmotnost zvýšila při navýšení vzdušnění z hodnoty 1 vvm na 2 vmm.

Při substituci sacharózy glukosou došlo k výraznému poklesu molekulové hmotnosti o 19 % a také klesly výtěžky o 25 %. Důvodem je pravděpodobně nevhodně nastavená koncentrace glukosy, která mohla působit inhibičně na produkci HA. Je možné, že nižší koncentrace glukosy by podpořily tvorbu vysokomolekulární HA.

Fosfatidylcholin se při koncentraci 160 mg/l projevil jako látka, která podporuje produkci vysokomolekulární kyseliny hyaluronové. Při nižší koncentraci 80 mg/l měl opačný efekt, kdy se molekulová hmotnost snížila o 11-19 %. Existuje zde ještě prostor pro prozkoumání efektu přidavku fosfatidylcholinu s vyššími koncentracemi nad 160 mg/l.

6. Seznam použitých zdrojů

1. Meyer, K; Palmer JW: The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem*, 1934, 107, 629-634
2. Kogan, G; Šoltés, L; Stern, R; Gemeiner, P; Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett*, 2007, 29, 17-25
3. Boeriu, CG; Springer, J; Kooy, FK; van den Broek, LAM; Eggink, G: Production Methods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2013, article ID 624967, p.14
4. Meyer, K: The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiological Reviews*, Jul 1947, 27, 3, 335-359
5. Shiedlin, A; Bigelow, R; Christopher, W; Arbabi, S; Yang, L; Maier, RV; Wainwright, N; Childs, A; Miller, RJ. Evaluation of Hyaluronan from Different Sources: Streptococcus zooepidemicus, Rooster Comb, Bovine Vitreous, and Human Umbilical Cord. *Biomacromolecules*, 2004, 5, 2122-2127
6. Brown, MD; Jones SA. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *JEADV*, 2005, 19, 308-318
7. Scott, JE; Heatley, F: Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a C-13 NMR study. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96, 4850-4855
8. Liu, L; Liu, Y; Li, J; Du, G; Chen, J; Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10, 99
9. Chong, FB; Blank, LM; Mclaughlin, R; Nielsen, LK: Microbial hyaluronic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 66, 341-351
10. DeAngelis, PL: Glycosaminoglycan polysaccharide biosynthesis and production: today and tomorrow. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 94, 295-305
11. Priestnall, S; Erles, K: Streptococcus zooepidemicus: An emerging canine pathogen. *The Veterinary Journal*, 2011, 188, 142-148
12. Pelkonen, S; Lindahl, SB; Suomala, P; Karhukopi, J; Vuorinen, S; Koivula, I; Väisänen, T; Pentikäinen, J; Autio, T; Tuuminen, T. Transmission of Streptococcus equi Subspecies zooepidemicus Infection from Horses to Humans. *Emerging Infectious Diseases*, Jul 2013, 7, 19, 1041-1048
13. Weigel, PH: Functional Characteristics and Catalytic Mechanisms of the Bacterial Hyaluronan Synthases. *IUBMB Life*, 2002, 54, 201-211

14. Gao, HJ; Du, GC; Chen, J: Analysis of metabolic fluxes for hyaluronic acid (HA) production by *Streptococcus zooepidemicus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2006, 22, 399-408
15. Armstrong, DC; Cooney, MJ; Johns MR: Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 47, 309-312
16. Aroskar, VJ; Kamat, SD; Kamat, DV: Effect of Various Nutritional Supplements on Hyaluronic Acid Production. *HIOAB Letters*, 2012, 2, 16-24
17. Amado, IR; Vázquez, JA; Pastrana, L; Teixeira, JA: Microbial production of hyaluronic acid from agro-industrial by-products: Molasses and corn steep liquor. *Biochemical Engineering Journal*, 2017, 117, 181-187
18. Pires, AMB; Macedo, AC; Eguchi, SY; Santana, MHA: Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Bioresource Technology*, 2010, 101, 6506-6509
19. Blank, LM; McLaughlin, RL; Nielsen, LK: Stable Production of Hyaluronic Acid in *Streptococcus zooepidemicus* Chemostats Operated at High Dilution Rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 6, 90, 685-693
20. Benedini, LJ; Santana, MHA: Effects of soy peptone on the inoculum preparation of *Streptococcus zooepidemicus* for production of hyaluronic acid. *Bioresource Technology*, 2013, 130, 798-800
21. Vázquez, JA; Montemayor, MI; Fraguas, J; Murado, MA: High production of hyaluronic and lactic acids by *Streptococcus zooepidemicus* in fed-batch culture using commercial and marine peptones from fishing by-products. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 44, 125-130
22. Amado, IR; Vázquez, JA; Pastrana, L; Teixeira, JA: Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chemistry*, 2016, 198, 54-61
23. Chong, BF; Nielsen, LK: Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, 16, 153-162
24. Blank, LM; Hugenholtz, P; Nielsen, LK: Evolution of the Hyaluronic Acid Synthesis (has) Operon in *Streptococcus zooepidemicus* and Other Pathogenic Streptococci. *J Mol Evol*, 2008, 67, 13-22

25. Chen, WY; Marcellin, E; Hung, J; Nielsen, LK: Hyaluronan Molecular Weight Is Controlled by UDP-N-acetylglucosamine Concentration in *Streptococcus zooepidemicus*. *Journal of Biotechnological Chemistry*, 2009, 284, 27, 18007-18014
26. Shah, MV; Badle, SS; Ramachandran, KB: Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 80, 53-60
27. Liu, L; Du, G; Chen, J; Wang, M; Sun, J: Influence of Culture Modes on the Microbial Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2008, 13, 269-273
28. Liu, L; Du, G; Chen, J; Wang, M; Sun, J: Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioresource Technology*, 2008, 99, 8532-8536
29. Huang, WC; Chen, SJ; Chen, TL: Production of hyaluronic acid by repeated batch fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 40, 460-464
30. Armstrong, DC; Johns, MR: Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl Environ Microbiol*, Jul 1997, 63, 7, 2759-2764
31. Liu, L; Wang, M; Du, G; Chen, J: Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 46, 383-388
32. Huang, WC; Chen, SJ; Chen, TL: The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 2006, 32, 239-243
33. Zhang, X; Duan, XJ; Tan, WS: Mechanism for the effect of agitation on the molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chemistry*, 2010, 119, 1643-1646
34. Duan, XJ; Yang, L; Zhang, X; Tan, WS: Effect of Oxygen and Shear Stress on Molecular Weight of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18, 4, 718-724
35. Liu, L; Du, G; Chen, J; Wang, M; Sun, J: Comparative study on the influence of dissolved oxygen control approaches on the microbial hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2009, 32, 755-763
36. Lai, ZW; Rahim, RA; Ariff, AB; Mohamad, R: Biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* using oxygen vector and optimum impeller tip speed. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 114, 3, 286-291

37. Liu, L; Du, G; Chen, J; Wang, M; Sun, J: Influence of hyaluronidase addition on the production of hyaluronic acid by batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chemistry*, 2008, 110, 923-926
38. Chong, BF; Nielsen, LK: Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. *Journal of Biotechnology*, 2003, 100, 33-41
39. Pires, AMB; Santana, MHA: Metabolic Effects of the Initial Glucose Concentration on Microbial Production of Hyaluronic Acid. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 162, 1751-1761
40. Jagannath, S; Ramachandran, KB: Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 48, 148-158
41. Chen, WY; Marcellin, E; Steen, JA; Nielsen, LK: The Role of Hyaluronic Acid Precursor Concentrations in Molecular Weight Control in *Streptococcus zooepidemicus*. *Mol Biotech*, 2014, 56, 147-156
42. Badle, SS; Jayaraman, G; Ramachandran, KB: Ratio of intracellular precursors concentration and their flux influences hyaluronic acid molecular weight in *Streptococcus zooepidemicus* and recombinant *Lactococcus lactis*. *Bioresource Technology*, 2014, 163, 222-227
43. Sun, J; Wang, M; Chen, Y; Shang, F; Ye, H; Tan, T: Understanding the Influence of Phosphatidylcholine on the Molecular Weight of Hyaluronic Acid Synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 168, 47-57
44. Pires, AMB; Eguchi, SY; Santana, MHA: The Influence of Mineral Ions on the Microbial Production and Molecular Weight of Hyaluronic Acid. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 162, 2125-2135
45. Liu, L; Du, G; Chen, J; Zhu, Y; Wang, M; Sun, J: Microbial production of low molecular weight hyaluronic acid by adding hydrogen peroxide and ascorbate in batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioresource Technology*, 2009, 100, 362-367
46. Marcellin, E; Steen, JA; Nielsen, LK: Insight into hyaluronic acid molecular weight control. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98, 6947-6956
47. Aktivní zvíře (online), (citace 9.4.2017), dostupné z [www: <http://www.aktivnizvire.cz/vyziva-kloubu-kone>](http://www.aktivnizvire.cz/vyziva-kloubu-kone)
48. Hirsch RJ, Brody HJ, Carruthers JDA. Hyaluronidase in the office: a necessity for every dermatologist that injects hyaluronic acid. *J Cosmet Laser Ther*, 2007, 9, 182-185.

49. Gold, M: The science and art of hyaluronic acid dermal filler use in esthetic applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2009, 8, 301-307
50. Choi, KI; Chung, H; Min, KH; Yoon, HY; Kim, K; Park, JH; Kwon, IC; Jeong, SY: Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting. *Biomaterials*, 2010, 31, 106-114
51. Jaracz, S; Chen, J; Kuznetsova, LV; Ojima, I: Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005, 13, 5043-5054
52. Slaughter, BV; Khurshid, SS; Fisher, OZ; Khademhosseini, A; Peppas, NA: Hydrogels in Regenerative Medicine. *Advanced Materials*, 2009, 21, 3307-3329
53. Hyiodine (online), (citace 9.4.2017), dostupné z www: <<https://www.hyiodine.cz/o-hyiodine>>
54. Hyiodine (online), (citace 9.4.2017), dostupné z www: <<https://www.hyiodine.com/patients-about-hyiodine>>
55. Nelson, DL; Cox, MM: Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition. W. H. Freeman, 2004, 1100 pages, ISBN: 978-0716743392

7. Seznam použitých zkratek

ATP	adenosintrifosfát
EMP	Embden-Meyerhofova dráha
FBC	fed-batch kultivace
HA	hyaluronic acid (kyselina hyaluronová)
Has	hyaluronan syntáza
UDP	uridindifosfát