

Studium produkce dextranu kulturou *Leuconostoc garlicum* PR

Jan Salač

Bakalářská práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jan SALAČ**
Osobní číslo: **T09814**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Studium produkce dextranu kulturou *Leuconostoc garlicum* PR**

Zásady pro vypracování:

1. Odkoušejte kultivaci uvedené kultury v tekutém médiu se sacharosou.
2. Provedte sérii kultivací této kultury a zaznamenávejte viskozitu média v průběhu kultivace, izolujte produkovaný dextran a sledujte jeho množství vytvářené v průběhu kultivace.
3. Získané dávky dextranu přechistěte a připravte jeho vzorky pro další speciální analýzy.
4. Získané výsledky zpracujte přehlednou formou a odevzdejte v řádném termínu v tištěné i elektronické podobě.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Odborná literatura věnovaná produkci dextranu u rodu *Leuconostoc* a dále zejména práce Hlavoňová E.: Studium produkce a vlastností vybraných bakteriálních exopolymerů, Doktorská práce, FT UTB ve Zlíně, 2011.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

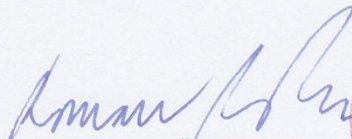
Datum zadání bakalářské práce:

8. února 2013

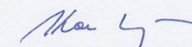
Termín odevzdání bakalářské práce:

24. května 2013

Ve Zlíně dne 8. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Jan Salač

Obor: Inženýrství ochrany životního prostředí

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 24. 5. 2013


.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit závislost mezi viskozitou tekutého média a množstvím produkovaného extracelulárního polysacharidu (dextranu) při kultivaci kultury *Leuconostoc garlicum* PR. Dalším cílem byla spolupráce s laboratoří fyzikální chemie na FT UTB ve Zlíně, kde byly vzorky získaného dextranu podrobeny sérii speciálních analýz.

Klíčová slova:

Bakterie, polysacharid, dextran, viskozita, hmotnost, kultivace

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis was to find out the dependence between viscosity of the liquid medium and the amount of produced extracellular polysaccharide (dextran) during cultivation of the *Leuconostoc garlicum* strain PR. In collaboration with the laboratory of physical chemistry at FT UTB in Zlin, the gained dextran samples were put to the series of special analysis.

Keywords:

Bacteria, polysaccharide, dextran, viscosity, weight, cultivation

Rád bych poděkoval doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za možnost spolupráce, odborné vedení při mé bakalářské práci, cenné rady a za předání zkušeností z oblasti mikrobiologie.

Dále bych poděkoval Lence Machálkové a Věře Zbrankové za výpomoc v laboratořích.

A závěrem děkuji panu ing. Daliboru Skoupilovi a Jakubu Barcuchovi za pomoc při překladu odporných textů.

„Učenec v laboratoři není jen odborník, je to dítě, které hledí na vědu jako na pohádku. Vidí ve vědě krásu.“

Marie Curie-Sklodovská

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem na celé závěrečné práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval.

Souhlasím s tím, že s výsledky mé práce může být naloženo podle uvážení vedoucího závěrečné práce a vedoucího ústavu. V případě publikace budu uveden jako spoluautor.

Ve Zlíně dne 24. 5. 2013

.....

Salač Jan

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 EXTRACELULÁRNÍ POLYMERY.....	12
1.1 MECHANISMUS PRODUKCE ECP BAKTERIEMI	12
1.2 FUNKCE.....	12
1.3 DĚLENÍ VRSTEV.....	13
1.3.1 Makrokapsule.....	13
1.3.2 Mikrokapsule.....	13
1.3.3 Slizy.....	13
1.4 STRUKTURA EXTRACELULÁRNÍCH POLYSACHARIDŮ	13
1.4.1 Homopolysacharidy	13
1.4.2 Heteropolysacharidy	14
2 DEXTRAN	15
2.1 HISTORIE.....	15
2.2 VLASTNOSTI.....	15
2.3 VÝROBA.....	15
2.4 POUŽITÍ	16
2.4.1 Medicína.....	16
2.4.2 Fotografie	16
2.4.3 Potravinářství a kosmetika	16
3 LEUCONOSTOC GARLICUM PR.....	17
3.1 KULTIVACE	17
3.2 VÝSLEDKY GRAMOVA BARVENÍ.....	17
3.3 VÝSLEDKY TESTŮ NA AGAROVÝCH PŮDÁCH	17
3.3.1 Agarové půdy	17
3.3.2 Koncentrace NaCl	17
3.3.3 VL agar.....	18
3.3.4 Vyhodnocení	18
3.4 VÝSLEDKY TESTŮ V TEKUTÝCH MEDIÍCH	18
3.4.1 Kultivace v Trypton kvasničném médiu s rozdílnou koncentrací sacharosy	18
3.4.2 Kultivace v Trypton kvasničném médiu (TYM) s různou koncentrací živin.....	18
3.4.3 Kultivace kultury PR s různým objemem vzdušné fáze v kultivačních lahvích	19
3.4.4 Závislost růstu kultury PR a produkce ECP na pufraci živného media	19
3.4.5 Závislost růstu bakterie PR a produkce ECP na typu sacharidového substrátu	21
3.4.6 Test na růst PR a produkci polysacharidu za použití různého substrátu.....	23
3.4.7 Celkové zhodnocení výsledků v tekutých médiích.....	24
3.5 IDENTIFIKACE.....	24
II PRAKTICKÁ ČÁST	25
4 PŘÍPRAVA DEXTRANU U KULTURY <i>LEUCONOSTOC GARLICUM PR</i>.....	26

4.1	CÍLE PRÁCE	26
4.2	PRACOVNÍ POSTUPY	26
4.2.1	Příprava fosfátového pufru.....	26
4.2.2	Příprava živného média.....	27
4.2.3	Příprava, zaočkování a kultivace kultury <i>Leuconostoc garlicum PR</i>	28
4.2.4	Postup měření viskozity na vibračním viskozimetru Japan SV – 10.....	28
4.2.5	Postup pro získání a přečištění exopolysacharidu kultury PR	28
4.2.6	Použitá technika a chemikálie	29
4.3	VÝSLEDKY	29
4.3.1	Ověření měřitelnosti dextranu GPC	29
4.3.2	Výsledky vzorků o vyšší a nižší molekulové hmotnosti	30
4.3.3	Dextran připravovaný v září 2011 (první velký pokus)	30
4.3.4	Dextran připravovaný v říjnu 2012 – druhý velký pokus	33
4.3.5	Srovnání stanovené sušiny z prvního a druhého velkého pokusu.....	38
4.3.6	Dextran připravovaný v březnu 2013 – vzorky s krátkou dobou kultivace	39
	ZÁVĚR	42
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	43
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	46
	SEZNAM OBRÁZKŮ	47
	SEZNAM TABULEK.....	48
	PŘÍLOHY	49

ÚVOD

V dobách dávno minulých nebyl člověk až tak vyspělý, proto bylo zcela běžné, že lidé využívali přírodní materiály, ať šlo o kámen či dřevo ve stavebnictví nebo kořínky a bylinky v medicíně. Čím se lidé více a více zdokonalovali ve zpracování materiálu a stávali se vyspělou civilizací, začali si i látky sami synteticky připravovat, ať se jednalo o léky nebo polymery, které jsou dodnes denně využívány.

Ale je to skutečně vyspělost, když kvůli tomu dochází k drancování naší malé krásné planety? Některé syntetické látky jsou však ve vnějším prostředí těžce rozložitelné nebo jsou toxické a mělo by tedy být snahou je postupně omezovat či nepoužívat.

Naštěstí je i snaha hledat alternativní řešení, které by přírodu poškozovalo minimálně nebo vůbec – jde o to, poznávat co nejvíce přírodních sloučenin, které jsou použitelné pro nej-různější průmyslové či zdravotnické účely. Takovými sloučeninami jsou i dextransy, které jsou produkovány bakteriálními kulturami rodu *Leuconostoc*. A můžeme jen doufat, že další vývoj lidstva bude pokračovat směrem k využívání více látek přírodních za cenu co nejmenšího ničení přírody a bude spíše docházet k její větší ochraně.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 EXTRACELULÁRNÍ POLYMERY

Mikrobiální polymery se dělí na dvě velké skupiny – intracelulární a extracelulární polymery. Zásadním rozdílem mezi těmito skupinami je ten, že intracelulární polymery jsou vytvářeny uvnitř bakteriálních buněk a tam také plní funkci svou fyziologickou roli (nejčastěji v cytoplazmě), za to extracelulární polymery (ECP) jsou vylučovány mimo buňky do vnějšího prostředí.^{1,2}

Extracelulární polymery je skupina biopolymerů, která se nachází na povrchu buněk některých bakteriálních druhů a spolu s dalšími látkami vytváří ochrannou vrstvu, tzv. pouzdro nebo sliz. Můžeme mezi ně zařadit polysacharidy, proteiny, lipidy, hyaluronovou kyselinu, glykolipidy, glykoproteiny a také DNA.^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8}

1.1 Mechanismus produkce ECP bakteriemi

Mechanismy produkce exopolysacharidů můžeme rozdělit na 2 skupiny

První skupina je závislá na konkrétním substrátu (nejčastěji na sacharose) a tvoří ji 4 homopolysacharidy – dextran, mutan, alternan a levan. K produkci dochází pomocí enzymu glykosyl transferasy (např. dextran sacharasa) extracelulárně. Enzym hydrolyticky štěpí sacharosu na monomery. Fruktosu buňky dále využívají jako zdroj uhlíku a energie a druhou monomerní jednotku, tj. glukosu, bakterie využívají k syntéze uvedených expolysacharidů na povrchu svých buněk, jakož to ECP.

Do druhé skupiny patří zbylé homopolysacharidy a veškeré heteropolysacharidy. Do reakce vstupuje několik enzymů, které se podílejí na tvorbě těchto polymerů v cytoplazmě a navylučování polymeru z buňky.^{9, 10, 11}

1.2 Funkce

Kapsulární polysacharidy vytvářejí u bakterií vrstvu, která plní několik funkcí. Chrání buňku před negativními vnějšími vlivy, brání buňce před vysycháním, slouží jako zásobárna živin a udržuje bakterie na podkladu.

1.3 Dělení vrstev

Povrchové vrstvy se dělí podle síly a konzistence na makrokapsule, mikrokapsule a sliz.

1.3.1 Makrokapsule

Makrokapsule má určitou ultrastrukturu a ostře ohraničený okraj, který je dobře mikroskopicky pozorovatelný. Tyto makrokapsule jsou vázané kovalentní vazbou na povrch buněčné stěny. Vyskytují se např. u rodu *Streptococcus*.

1.3.2 Mikrokapsule

Mikrokapsule je tenká vrstva nad buněčnou stěnou. Existence mikrokapsuly nelze rozeznat většinou obvyklých mikroskopických metod (ani elektronovým mikroskopem), ale lze je dokázat specifickou imunologickou metodou.

1.3.3 Slizy

Sliz je volně vylučován do prostředí, nemá ohraničený okraj a je lehce od buněk oddělitelný. Vyskytuje se například u druhu *Leuconostoc mesenteroides*.^{1, 2, 9, 11, 13}

1.4 Struktura extracelulárních polysacharidů

Extracelulární polysacharidy dělíme na 2 základní skupiny – homopolysacharidy a heteropolysacharidy

1.4.1 Homopolysacharidy

Homopolysacharidy jsou tvořeny z jednoho typu monosacharidu. Můžeme je rozdělit na 4 podskupiny

α -D-glukany – Do této skupiny patří např. dextran. α -D-glukany jsou tvořeny z glukosy, které jsou spojené vazbou α -1,6.

β -D-glukany – hlavním charakteristickým znakem této podskupiny je spojení glukos vazbou β -1,3 a v boční řetězci β -1,2.

Fruktany – mezi fruktany patří např. levan. Monomerem je D-fruktosa, jednotky jsou spojené vazbou β -2,6

Ostatní – do této skupiny patří polysacharidy (např. galaktiny), u kterých se liší typ opakujících se monomerů a také rozdílností glykosidických vazeb.^{9, 11, 14}

1.4.2 Heteropolysacharidy

Heteropolysachary jsou složeny z několika typů monomerů od disacharidů po oktasacharidy. Složení těchto sacharidů většinou obsahuje 2-4 různé druhy monosacharidů nejčastěji D-glukosu, D-galaktosu a L-ramnosu^{9, 11}

Heterosacharidy vytvářejí řetězce o různé velikosti, od $4 \cdot 10^4$ do $6 \cdot 10^6$ Da.¹⁴ Ačkoliv se může na první pohled jevit, že se jedná o velké molekuly, tak nedosahují takových hodnot jako homopolysacharidy, které dosahují molekulové velikosti až $5 \cdot 10^9$ (např. dextran).

2 DEXTRAN

2.1 Historie

Dextran byl poprvé objeven v roce 1874 Schleiblerem. Ten zjistil, že za určitých okolností dochází k neznámému houstnutí třtinového a řepného cukru, které bylo způsobeno uhlohydráty $C_6H_{10}O_6$ a zároveň mající pozitivní optickou rotaci.¹⁵ V roce 1861 Pasteur dokázal, že tyto slizy jsou způsobovány mikrobiálně¹⁶ a Van Tieghem pojmenoval bakterii, která vytváří onen exopolysacharid, *Leuconostoc mesenteroides*. Později se ukázalo, že se nejedná a přesně definovanou substancí se specifickými vlastnostmi, ale že může být složena poněkud rozdílně, je-li vytvářena různými bakteriálními kulturami.¹⁷

2.2 Vlastnosti

Dextrany jsou nyní klasifikovány jako homopolysacharidy složené z glukosových jednotek, které jsou spojeny v hlavním řetězci vazbou $\alpha(1,6)$ - a to z více než 50% veškerých vazeb. Další vazby se také vyskytují u bočních řetězců a jsou to $\alpha(1,3)$ -, $\alpha(1,4)$ - a $\alpha(1,2)$ -. Ovšem přesné složení každého typu dextranu závisí na specifických podmínkách při produkci těmi druhy mikroorganismů, které tento exopolysacharid vytváří z toho tedy vyplývá, že i každý typ dextranu je něčím specifický.¹⁸

2.3 Výroba

Komerční výroba dextranu se momentálně provádí kultivací bakterie *Leuconostoc mesenteroids* v sacharosovém živném mediu, které je bohatým zdrojem dusíku, fosfátů, minerálů a stopových prvků. Bakterie rodu *Leuconostoc* jsou fakultativně anaerobní, avšak fermentační výroba probíhá anaerobně. Pro kultivaci bakterie jsou ideální podmínky při koncentraci sacharosy 2%, pH 6,7 - 7,2 a při cca 25°C.¹⁸ Během prvních 20 - ti hodin kultivace vlivem složení produkovaných organických kyselin pH klesne na cca 5,0, což vytváří optimální prostředí pro enzym dextransucrasu.¹⁹ Pro získání dextranu po skončení kultivace je pak nutné odstranit buňky centrifugací a supernatant vysrážet alkoholem. Pro vyšší čistotu dextranu je nutno jej po odstranění alkoholu opětovně rozpustit ve vodě a následně znovu srazit alkoholem.²⁰

2.4 Použití

Dextrany jsou komerčně důležité polysacharidy. Používají se čistě přírodní, degradované i deriváty dextranů. O použití dextranu byla napsána spousta článků^{18, 21, 22}.

2.4.1 Medicína

Medicínsky využívané dextrany mají ideální molekulovou hmotnost mezi 40 000 – 100 000 Da. Podle molekulové hmotnosti 70 000, 60 000 a 40 000 Da je můžeme dělit s označením 70, 60 a 40. Tyto dextrany jsou využívány jako náhrada krevní plazmy hlavně při hromadných nehodách, což byl původní podnět k tomu, aby se začaly dextrany komerčně vyrábět. Přírodní dextrany o molekulové hmotnosti $5 \cdot 10^8$ Da, jsou nevhodné jako náhrady krevní plazmy²³.

Dextrany s menší molekulovou hmotností než je 40 000 Da se rychle rozpustí v krevním oběhu a jsou vyloučeny ledvinami v moči. Látka s příliš vysokou molekulovou hmotností může mít za následek špatnou srážlivost krve^{20, 22, 24}.

Pokud dextran obsahuje vysokou molekulovou hmotnost nebo má větší podíl vazby α -(1,6) může způsobit alergickou reakci²².

Použití dextranu v medicíně je ovšem velmi omezující, neboť přibližně 20% populace trpí anafylaktickým šokem, a právě proto se nedoporučuje použití dextranu jako náhrada krevní plazmy. Ovšem pokud dojde k hromadnému neštěstí a není dostatek krve je k záchraně života možno použít klinický dextran²³.

Sulfát dextranu se může využívat jako prostředek proti HIV. Dále se se tento dextran používal 20 let v Japonsku proti arteriosklerose bez nežádoucích vedlejších účinků^{25, 26}.

2.4.2 Fotografie

Velké fotografické společnosti mají patenty na využití dextranu ve fotografických emulzích. To umožní nepoužívat větší množství stříbra a fotografie tím neztrácí kvalitu v podobně zrnění^{20, 27}.

2.4.3 Potravinářství a kosmetika

Dextrany mají v kosmetice řadu výhod, hlavně v péči o pokožku a oči.

Při použití v potravinářství, převážně v pečivu zlepšují jeho jemnost a zvyšují objem²⁸. Také se používá jako plnivo do sladkostí či zmrzlin²⁹.

3 LEUCONOSTOC GARLICUM PR

Bakterie *Leuconostoc garlicum* PR byla izolována ing. Evou Hlavoňovou v rámci její disertační práce v roce 2008 z aktivovaného kalu z ČOV Babice, kde se zpracovávají převážně odpadní vody z potravinářského průmyslu³⁰.

3.1 Kultivace

Prvotní testy prokázaly, že tato kultura dobře roste na Trypton kvasničných agarových půdách (TYA), obohacených buď o 2% glukosy anebo 2% sacharosy. Při těchto několika denních kultivacích bylo patrné, že bakterie tvoří velké kopulovité kolonie s výraznou produkcí polymeru. Při kultivaci na samotném TYA agaru bakterie produkovala pouze menší kolonie bez produkce polymeru³⁰.

3.2 Výsledky Gramova barvení

Gramovo barvení ukázalo, že se jedná o grampozitivní drobnou tyčinkovou bakterii o velikosti buněk 0,2-0,4 μm x 0,5-1,3 μm se zakulacenými konci. Jednotlivé buňky tvořily buď řetízky, nebo se společně shlukovaly³⁰.

3.3 Výsledky testů na agarových půdách

3.3.1 Agarové půdy

Jelikož na Trypton kvasničném agaru rostla kultura PR slabě, byla provedena série pokusů s dalšími živnými půdami a při různých teplotách. Z testů vyplynulo, že nejvhodnější pro růst kultury je tzv. VL agar, při teplotě 25°C a také TYA s 2% sacharosy při 37°C. Druhá zmíněná půda také prokázala největší produkci exopolymeru při 25 a 30°C. Na obou agaroch kultura rostla jak za aerobních tak i anaerobních podmínek bez omezení. Na základu pro krevní agar a na minerálním agaru s 2% glukosy však neprokázala žádný růst³⁰.

3.3.2 Koncentrace NaCl

Z testování růstu kultury na VL agarech při různých koncentracích NaCl vyplynula schopnost růstu kultury při koncentraci až 4,0%, nejvhodnější prostředím se však jevílo prostředí s koncentrací NaCl 0,5%, a to tak jak anaerobní, tak mikroaerobní³⁰.

3.3.3 VL agar

Testy kultury PR na VL agaru při různých teplotách ukázaly, že bakterie nejlépe roste v rozmezí teplot 30 – 35°C³⁰.

3.3.4 Vyhodnocení

Z porovnání veškerých morfologických i biochemických vlastností a z provedené molekulárně biologické identifikace vyplynulo, že se jedná o bakterii *Leuconostoc garlicum*. Potvrdily to i růstové testy na agarových půdách, kdy výše zmíněná bakterie rostla v rozmezí teplot 5 – 45°C, s optimem 25°C. Zajímavostí byla právě schopnost růstu nad 40°C, neboť tohoto nejsou ostatní druhy rodu *Leuconostoc* schopny³⁰.

3.4 Výsledky testů v tekutých médiích

Cílem těchto testů bylo zjistit, v jakém kultivačním prostředí je kultura *Leuconostoc garlicum* schopna produkovat exopolysacharid, neboť v průmyslu se pro produkci bakteriálních metabolitů nejvíce využívá právě tekutých medií³⁰.

3.4.1 Kultivace v Trypton kvasničném médiu s rozdílnou koncentrací sacharosy

Jelikož testy na agarových půdách ukázaly, že kultura nejlépe produkuje dextran na TYA agaru s 2 % sacharosy, proto bylo zvoleno medium o stejném složení (s vyloučením agaru). Pro pokus byly použity tři různé koncentrace sacharosy - 2%, 5% a 10% při 25°C, při kultivaci 6 dní na kruhové i vratné třepačce. Při použití 10% sacharosy kultura PR prokázala největší nárůst viskozity media, a to na vratné třepačce ($145,0 \pm 0,8$ mPa.s), o něco méně na kruhové třepačce ($108,7 \pm 0,5$ mPa.s). Při porovnání výsledků u dalších koncentrací se proto ukázalo, že vratná třepačka je pro kultivaci vhodnější nežli třepačka kruhová³⁰.

3.4.2 Kultivace v Trypton kvasničném médiu (TYM) s různou koncentrací živin

Cílem tohoto testu bylo zjistit míru zahuštění média při dvojnásobné koncentraci jedné ze dvou nebo i zároveň obou základních živin – tryptonu a kvasničného autolyzátu. Pro tento účel byla připravena média s 10% sacharosy, kde jedno bylo s běžným množstvím tryptonu a kvasničného autolyzátu, další s dvojnásobnou koncentrací obou složek a dále média s dvojnásobným množstvím tryptonu resp. kvasničného autolyzátu, a také médiem s polovičním obsahem obou látek³⁰.

Test byl proveden opět na obou typech třepaček při 25°C, a v průběhu kultivace byly době 0, 3, 5, 6 a 10 dnů odebrány vzorky. Z výsledků bylo zjištěno, že dvojnásobná koncentrace základních živin, při použití vratné třepačky, má na následek zkrácení kultivační doby na polovinu.

Druhý test na různé koncentrace jednotlivých živin byl již prováděn jen na vratné třepačce, po kultivační dobu několika dní. Kultura PR byla schopna růst při všech možných koncentracích živin, avšak nejrychlejší nástup produkce exopolysacharidu (detekovaný jako míra zahuštění médií) byl zaznamenán u vzorku s dvojnásobkem kvasničného autolyzátu, nejpomalejší nástup byl zaznamenán u polovičního množství obou složek.

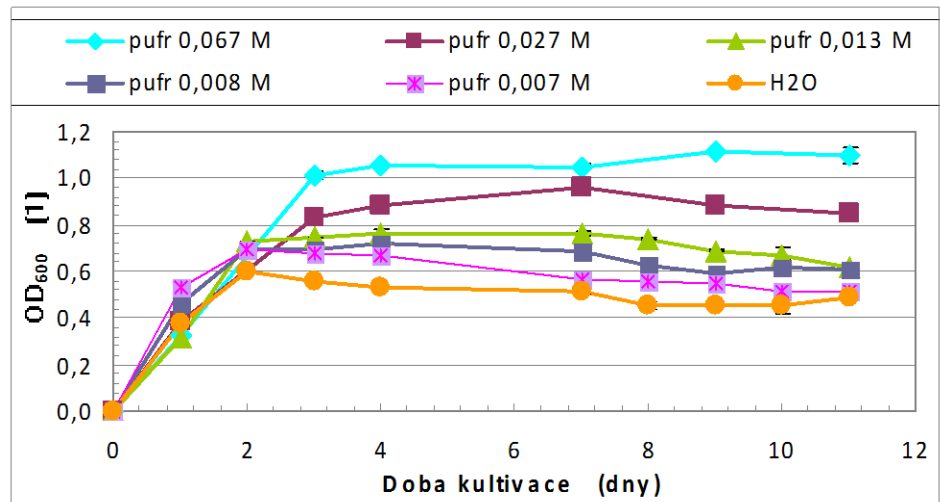
Maximální viskozita média se projevila u dvojnásobné koncentrace kvasničného autolyzátu, kdy hodnota dosahovala až 260,0 mPa.s. Minimální viskozita byla naměřena při použití polovičních množství obou složek, a to 77 mPa.s³⁰.

3.4.3 Kultivace kultury PR s různým objemem vzdušné fáze v kultivačních lahvích

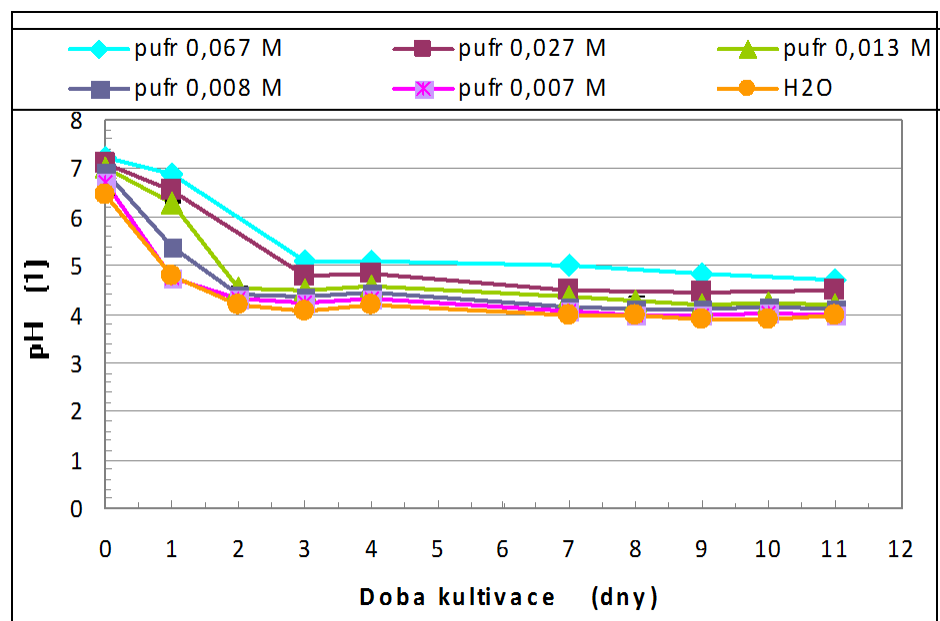
Protože testy na agarových půdách ukázaly, že kultura roste s produkcí extracelulárního polymeru jak v anaerobních, tak i mikroaerobních podmínkách, byla ověřena míra naplnění kultivačních lahví médiem. Pro tento test byly připraveny různé kultivační láhve, s rozdílným podílem vzdušné fáze k fázi kapalné, a to v poměrech 4:1, 1:1 a 0:1. Kultivace probíhala na vratné třepačce při 25°C \pm 2°C po dobu 7 dní. Kultura PR prokázala největší produkci ECP při 4 násobném objemu plynné fáze oproti tekutému médiu, kdy bylo dosaženo viskozity 200,5 \pm 26,2 mPa.s. Nejmenší zahuštění média bylo zaznamenáno při poměru 0:1, tedy při úplném naplnění kultivačních lahví³⁰.

3.4.4 Závislost růstu kultury PR a produkce ECP na pufraci živného media

Pokus měl ukázat na význam pufrace živného média, a proto byla vytvořena sada trypton kvasničných médií (TYM) rozpuštěných jak v destilované vodě, tak i v různě ředěných fosfátových pufrách, od 66,7 mmol/l – 6,7 mmol/l, vše při pH 7,5. V průběhu kultivace byl růst biomasy sledován měřením zákalu suspenze (OD₆₀₀), dále byly sledovány, pH a viskozita médií. Po prvních třech dnech kultivace pH výrazně pokleslo a následně se postupně mírně snižovalo až do ukončení kultivace, v závislosti na použitém pufru v rozmezí hodnot 3,9 - 4,7, kde se pokles ustálil³⁰.

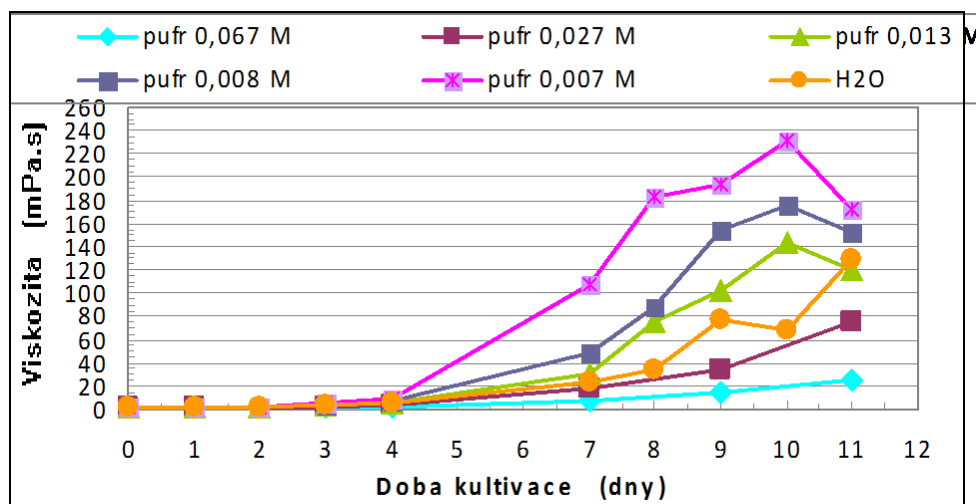


Obr. 1 Závislost růstu kultury PR na době kultivace v různě pufovaných Trypton kvasničných mediích s 10% sacharosy



Obr. 2 Závislost pH pufovaných medií na době kultivace

Pro růst bakterií se jako nejvhodnější se ukázalo použití neředěného pufru o koncentraci 66,7 mmol/l, u kterého byl zaznamenán největší nárůst biomasy bakterií a jako nejméně vhodná se projevila destilovaná voda.



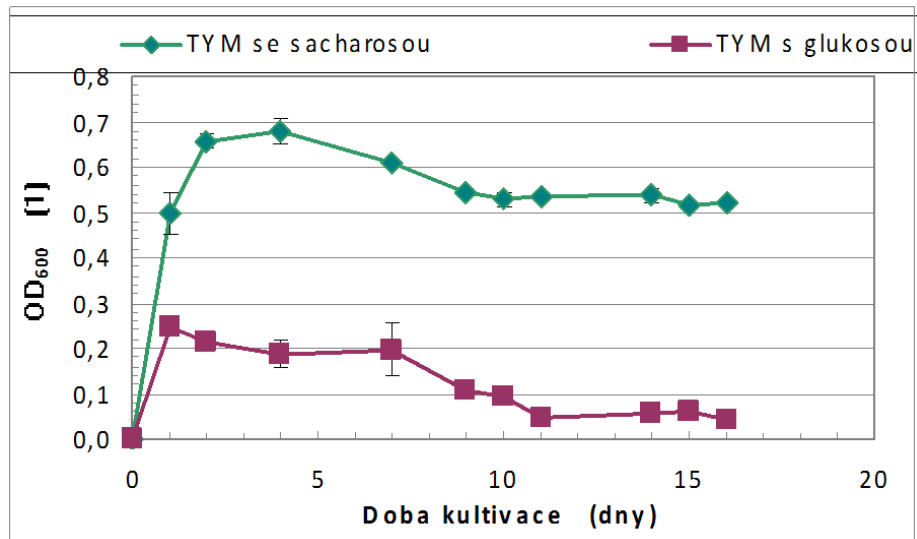
Obr. 3 Závislost viskozity pufrovaných medií na době kultivace

Nejvíce viskózní médium však bylo zjištěno s použitím pufru 6,7 mmol/l a to 230,0 mPa.s v 10. den kultivace. Nejméně viskózní médium bylo naměřeno při použití neředěného fosfátového pufru 66,7 mmol/l, u kterého bylo maximum jen 24,4 mPa.s. Destilovaná voda se projevila jako podprůměrná, kde byla maximální hodnota viskozity 129,5 mPa.s.

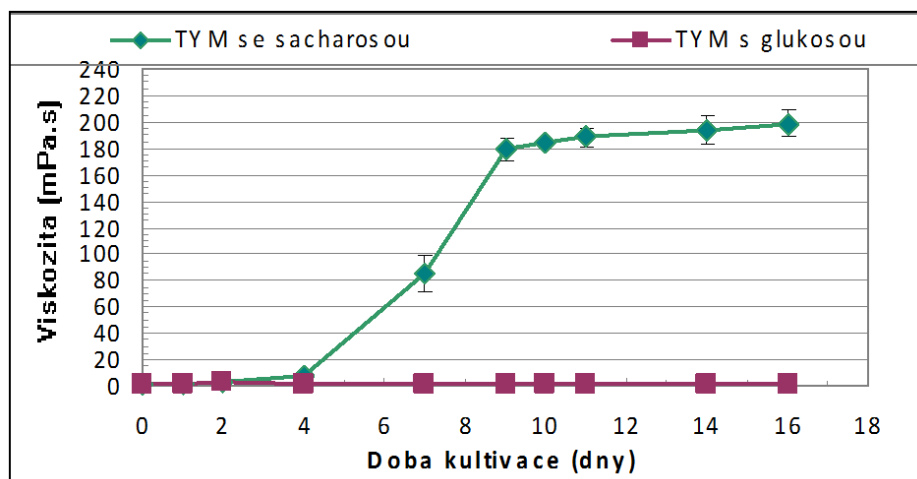
Z výsledků vyplynulo, že kultura PR kultura projevuje v neředěném pufru maximální růst, ale nízkou produkci ECP. V pufru 6,7 mmol/l bakterie prokázala růst, ale s výraznou produkcí ECP³⁰.

3.4.5 Závislost růstu bakterie PR a produkce ECP na typu sacharidového substrátu

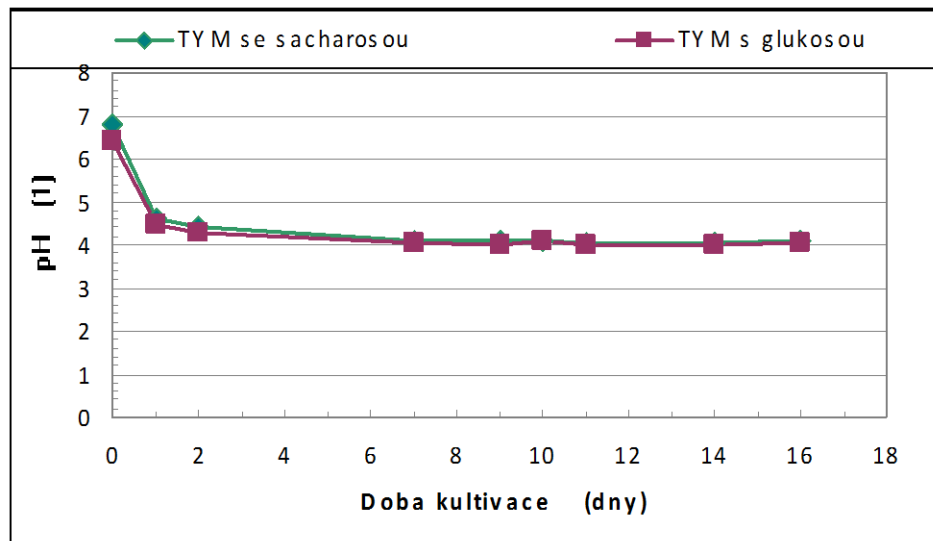
V předchozích testech na pevných půdách bylo prokázáno, že sacharosa a glukosa jsou jediné sacharidy, při kterých byla bakterie PR schopna vytvářet exopolymer. Proto byly tyto dva polysacharidy testovány v pufrovaném TYM médiu, v koncentraci 100 g/l. Z výsledků však vyplynulo, že za použití sacharosy biomasa roste velmi rychle a tvoří polymer, kdežto s glukosou exopolysacharid nevytváří. Hodnota pH obou vzorků byla srovnatelná, nejprve došlo k prudkému poklesu z 6,8 na 4,3 a poté k pozvolnému ustálení na 4,1. Viskozita za použití sacharosy vzrostla až na hodnotu 200 mPa.s, kdežto v médiu s glukosou dosahovala viskozita od začátku kultivace až po její konec hodnoty jen kolem 1 mPa.s³⁰.



Obr. 4 Závislost růstu kultury PR v TYM s 10% sacharosy, resp. s 10% glukosy na době kultivace



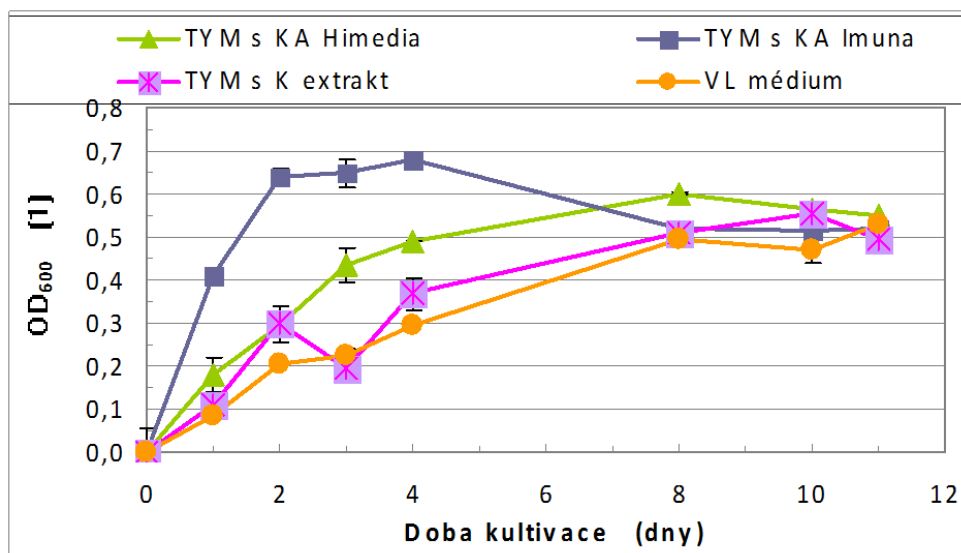
Obr. 5 Závislost viskozity TYM s 10 % sacharosy, resp. s 10% glukosy na době kultivace



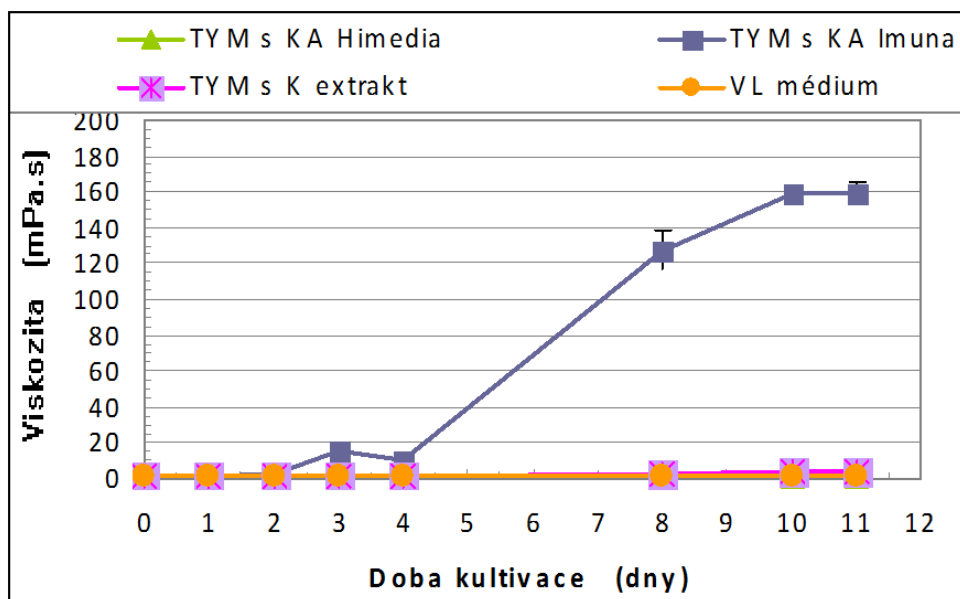
Obr. 6 Závislost pH TYM s 10% sacharosou, resp. s 10% glukosou na době kultivace

3.4.6 Test na růst PR a produkci polysacharidu za použití různého substrátu

V posledním testu v tekutých médiích byly použity 3 rozdílné dusíkaté substráty. Kvasniční autolyzát IMUNA a HIMEDIA, kvasniční extrakt HIMEDIA a také bylo ověřeno tekuté VL médium. Jelikož u čistého VL média na pevných půdách nedošlo k produkci dextranu, bylo toto médium obohaceno o 10% sacharosy³⁰.



Obr. 7 Závislost růstu kultury PR za použití různých substrátů na době kultivace



Obr. 8 Závislost viskozity za použití různých substrátů na době kultivace

Výsledky pH u tohoto testu bylo podobné jako v testech předešlých.

Jako nejvhodnější médium pro produkci ECP se ukázal TYM s kvasničným autolyzátem od firmy IMUNA. Ostatní substráty neprokázaly vhodné výsledky v rámci produkce polymeru³⁰.

3.4.7 Celkové zhodnocení výsledků v tekutých médiích

Z výše uvedených testů v tekutých médiích bylo možné vyvodit, že nejvhodnější složení živného média pro kultivaci kultury PR je 12 g/l tryptonu, 6 g/l kvasničného autolyzátu IMUNA, 100 g/l sacharosu, při použití zředěného fosfátového pufru o koncentraci 6,7 mmol/l coby rozpouštědla.

Mezi ideální kultivační podmínky patří poměr živného média k vzdušné fázi 1:4, použití vratné třepačky a kultivace ve tmě při 25°C³⁰.

3.5 Identifikace

Identifikaci kultury PR provedla Laboratoř molekulárních metod Státního veterinárního ústavu v Praze metodou zjištění nukleotidových sekvencí 16S rDNA. Výsledky byly porovnány s databází GenBank pomocí programu BLAST. Ty ukázaly, že kultura PR patří s 99% shodou k bakterii *Leuconostoc garlicum*³⁰, která se řadí do domény Bacteria, kmenu Firmicutes a čeledi Leuconostocaceae³¹.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 PŘÍPRAVA DEXRANU U KULTURY *LEUCONOSTOC GARLICUM* PR

4.1 Cíle práce

V rámci mé bakalářské práce bylo provedeno několik sérií pokusů. První dva pokusy, které byly prováděny, byly zaměřeny na přípravu vzorků dextransu pro zjištění, zdali bude vůbec tento polymer měřitelný pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) v laboratoři fyzikální chemie FT. Zároveň tyto pokusy sloužily k seznámení s mikrobiologickou a technologickou laboratoří, s postupy a s vybavením, které bylo potřebné během následujících testů. V září 2011, v listopadu 2012 a v dubnu 2013 byly poté provedeny 2 velké série testů a 1 menší, u kterých bylo cílem zaznamenat viskozitu živného média a hmotnost produkováného polysacharidu během kultivace trvajících od 1 do 13 dnů a najít mezi těmito veličinami závislost. Dalším cílem práce bylo poskytnout vzorky dextransu ke zjištění molekulové hmotnosti laboratoři fyzikální chemie FT UTB ve Zlíně. Pracovní potup měřitelnosti pomocí GPC a měření s výsledky limitního viskozitního čísla uvádím v přílohách I a II.

4.2 Pracovní postupy

4.2.1 Příprava fosfátového pufru

Fosfátový pufr se skládá ze dvou roztoků. Roztok A z 9,07 g KH_2PO_4 a roztok B z 23,90 g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Navážky byly jednotlivě rozpuštěny v destilované vodě a doplněny do 1000 ml.

Pro přípravu 200 ml fosfátového pufru bylo odpipetováno 4 ml roztoku A a 16 ml roztoku B. Tento roztok byl doplněn do 200 ml destilovanou vodou.

Pro přípravu 1250 ml fosfátového pufru bylo odměřeno 25 ml roztoku A a 100 ml roztoku B. Tento roztok byl doplněn do 1250 destilovanou vodou.

Pro přípravu 700 ml fosfátového pufru bylo odpipetováno 14 ml roztoku A a odměřeno 56 ml roztoku B. Roztok byl doplněn do 700 ml destilovanou vodou.

4.2.2 Příprava živného média

Pokus ověření měřitelnosti dextranu gelově permeační chromatografií

Ve 200 ml připraveného fosfátového pufru bylo rozpuštěno 0,6 g kvasničného autolyzátu IMUNA, 1,2 g tryptonu a 20 g sacharosy. Po dokonalém rozpuštění bylo toto živné médium rozplněno po 50 ml do 4 kultivačních lahví (o objemu 250 ml) a sterilizováno při 122°C po dobu 25 minut. Po zaočkování byly láhve kultivovány 7 dní při 25°C (viz 4.2.3).

Pokus získání vzorků dextranů o nižší a vyšší molekulové hmotnosti

Pracovní postup pro přípravu živného média u tohoto pokusu byl identický jako v předcházející části. Kultivace proběhla po dobu 5, 7 a 9 dní ve tmě, při 25°C na vratné třepačce s trvalým pohybem.

Příprava vzorků dextranu v září 2011 – první velký pokus

Bylo naváženo 3,75 g kvasničného autolyzátu IMUNA, 7,5 g tryptonu a 125 g sacharosy. Po dokonalém rozpuštění v 1250 ml fosfátovém pufru bylo médium rozplněno po 50 ml do 25 lahví (o objemu 250 ml). Láhve s živným médiem byly sterilizovány při 122 °C po dobu 25 minut a po zchlazení zaočkovány jednotlivě 50 µl suspence (viz 4.2.3). Kultivace probíhala po dobu 2 – 13 dní.

Příprava vzorků dextranu v říjnu 2012 – druhý velký pokus

Navážky přísad pro živné médium je shodné jako v kap. 4.1.2.3. Živné médium bylo sterilizováno při 122°C po dobu 25 minut. Po sterilizaci byl celý objem živného média v aseptickém boxu zaočkován suspenzí kultury *Leuconostoc garlicum* PR. Po dokonalém promíchání bylo zaočkované médium přesně rozplněno do kultivačních lahví po 50 ml. Kultivace probíhala po dobu 2 – 13 dní.

Příprava vzorků dextranu v březnu 2013 – získání dextranů krátkodobou kultivací

V 700 ml fosfátového pufru bylo rozpuštěno 2,1 g kvasničného autolyzátu IMUNA, 4,2 g tryptonu a 70 g sacharosy. Živné médium bylo sterilizováno při 125°C po dobu 25 minut. Po zaočkování živného média suspenzí kultury *Leuconostoc garlicum* PR bylo médium rozplněno po 50 ml do kultivačních lahví (o objemu 250 ml). Kultivace probíhala po dobu 24, 30, 36 a 48 hodin.

4.2.3 Příprava, zaočkování a kultivace kultury *Leuconostoc garlicum* PR

Suspense bakterie *Leuconostoc garlicum* PR byla připravována klíčkou ve fyziologickém roztoku, v aseptickém boxu, a s pomocí tzv. zákalového standardu (2. Stupně McFarlandovy stupnice) obsahujícího 0,2 ml 1%tního roztoku BaCl₂ a 9,8 ml 1%tního roztoku H₂SO₄. Suspense byla připravována tak, aby se zakalení suspense bakterií shodovalo se zakalením standardu.

Živné médium bylo zaočkováno dávkovačem v aseptickém boxu v poměru 1 µl suspense kultury *Leuconostoc garlicum* PR na 1 ml živného média.

Kultivace probíhala při 25 °C ve tmě, na vratné třepačce, při počtu otáček 100/min, po dobu uvedenou výše u jednotlivých pokusů.

4.2.4 Postup měření viskozity na vibračním viskozimetru Japan SV – 10

Viskozimetr byl kalibrován na destilovanou vodu. Poté bylo odměřeno 10ml vzorku média do odměrné nádoby. Pomocí termostatu byl vzorek temperován na 25,0°C. Po vytemperování byla zaznamenána hodnota viskozity do tabulky a následně do grafu.

4.2.5 Postup pro získání a přečištění exopolysacharidu kultury PR

Po ukončení kultivace proběhla centrifugace pro odstranění buněk, a to při 20 000 g, 10 °C a po dobu 30 minut. Supernatant byl vysrážen ledově vychlazeným acetonem v pětinasobném přebytku. Vzniklá sraženina stále ponořená v acetonu byla uchována v klidu přes noc v lednici. Sraženina byla poté pečlivě vybrána z láhve a nechala se vysušit přes noc v digestoři.

Pro větší čistotu dextranu bylo použito jeho přečištění rozpuštěním vysráženého vzorku v 50 ml destilované vody na třepačce. V případech malého množství vyprodukovaného dextranu bylo použito jen 20 – 25 ml destilované vody. Po dokonalém rozpuštění byla homogenní směs opět sražena pětinasobným přebytkem ledově vychlazeného acetonu a opět byla sraženina uchována přes noc v lednici. Takto podruhé vysrážený dextran byl z acetonu vybrán a byl vysušen v digestoři a posléze v exsikátoru nad P₂O₅.

Po uvedeném vysušení byl každý vzorek polysacharidu zvážen na analytických vahách a u každého vzorku dextranu získaných v rámci velkých pokusů byla také stanovena sušina pomocí vysušení části vzorku při 105°C po dobu 3 hodin.

4.2.6 Použitá technika a chemikálie

Centrifuga – JOUAN MR23i

Třepačka – laboratorní vratná GLFU

Aseptický box – Telstar BIO – II - A

Viskozimetr: Japan SV – 10

Biologický termostat

Pěti místné analytické váhy

Běžné laboratorní pomůcky a chemikálie

Chemikálie byly čistoty p. a.

4.3 Výsledky

4.3.1 Ověření měřitelnosti dextransu GPC

Cílem tohoto pokusu bylo seznámení s laboratorním vybavením, které jsem měl následně používat při hlavních testech mé bakalářské práce. Kultura *Leuconostoc garlicum* PR byla kultivována v tekutém médiu a po 7 dnech byl polysacharid vysrážen a přečištěn. Bylo důležité zjistit, zda bude takto připravený vzorek dextransu měřitelný GPC v laboratoři fyzikální chemie na FT UTB ve Zlíně.

Čistý vzorek dextransu byl předán ing. V. Halabalové Ph.D., která provedla první test měřitelnosti dextransu pomocí GPC.

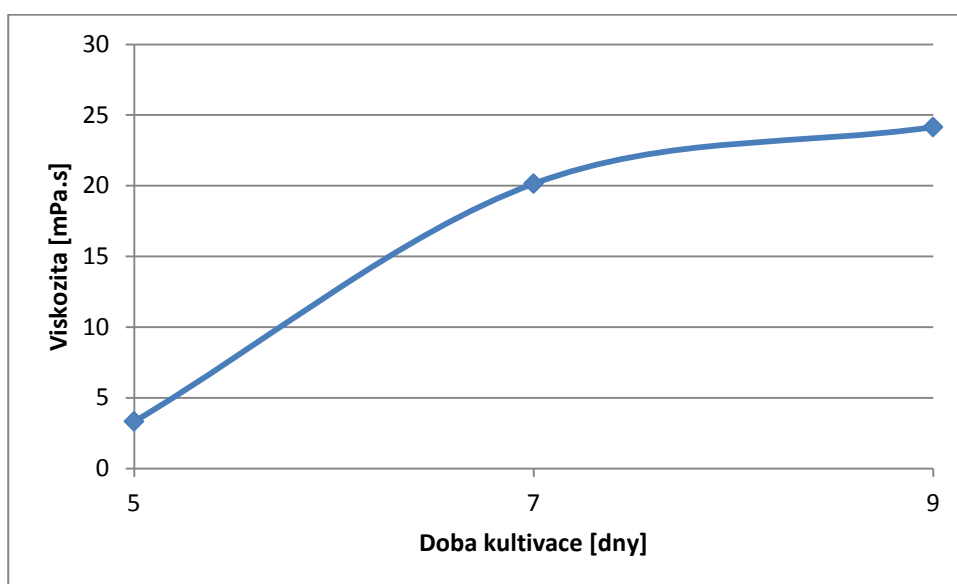
Měření ukázalo, že stanovení pomocí GPC je možné a rovněž se ukázalo, že molekulová hmotnost tohoto vzorku je kolem 400 000 Da. Index polydisperzity tohoto dextransu byl roven 1,3.

4.3.2 Výsledky vzorků o vyšší a nižší molekulové hmotnosti

Cílem tohoto pokusu byla snaha získat vzorky dextransu s vyšší a nižší molekulovou hmotností než v předcházejícím pokusu. Proto byla v tomto případě kultivace provedena po dobu 5, 7 a 9 dnů. Výsledky viskozity živného média jsou uvedeny v **tab. 1**.

Tab. 1 Výsledky měření viskozity média s různou dobou kultivace

Doba kultivace [dny]	Vzorek	Viskozita [mPa.s]	
5	A	3,45	3,33
	B	3,20	
7	A	15,30	20,15
	B	25,00	
9	A	24,17	24,15
	B	24,13	



Obr. 9 Graf závislosti viskozity na době kultivace

Z grafu zobrazeného v **obr. 9** je patrné, že viskozita tekutého média s dobou kultivace rostla.

4.3.3 Dextran připravovaný v září 2011 (první velký pokus)

V tomto pokusu bylo připraveno celkem 26 vzorků dextransu. Kultivovalo se v rozmezí 2-13 dní. Každý den byly odebrány 2 vzorky, v době kultivace 3 dny byly odebrány vzorky 4. Během tohoto pokusu byla měřena viskozita tekutého média (před odstranění buněk

centrifugací) na vibračním viskozimetru a byla stanovena sušina všech získaných vzorků dextranu. Výsledky jsou uvedeny v **tab. 2**.

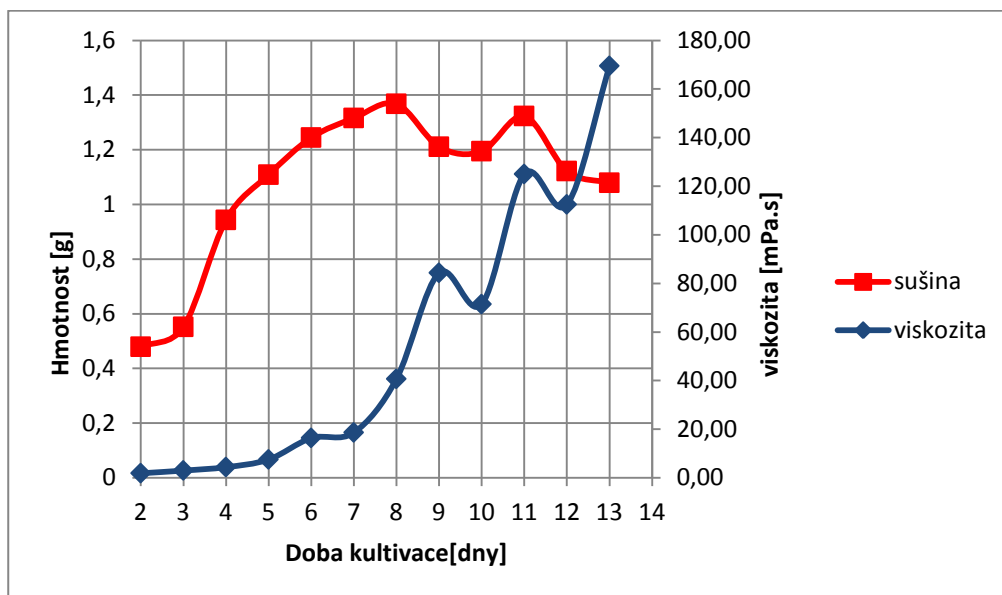
Tab. 2 Stanovení viskozit média v průběhu kultivace a sušin získaných vzorků dextranu - první velký pokus

Č. láhve	Doba kultivace	Viskozita média před centrifugací při 25°C		Hmotnost vzorku vysušeného nad P ₂ O ₅		Sušina z části vzorku	Sušina celého vzorku	
	dny	[mPa.s]		[g]			[g]	
1	2	1,95	1,89	0,62	0,495	96,77%	0,59999	0,47933
2		1,82		0,37		96,94%	0,35867	
3	3	2,55	3,01	---	0,575	---	---	0,55213
4		2,77		---		---		
25		3,62		0,81		96,21%	0,77929	
26		3,1		0,34		95,58%	0,32496	
5	4	4,2	4,41	0,92	0,97	97,11%	0,89346	0,94332
6		4,61		1,02		97,37%	0,99317	
7	5	6,99	7,55	1,1	1,14	97,34%	1,07070	1,10878
8		8,1		1,18		97,19%	1,14685	
9	6	12,1	16,40	1,09	1,275	97,51%	1,06289	1,24460
10		20,7		1,46		97,69%	1,42630	
11	7	16,7	18,65	1,48	1,35	97,41%	1,44168	1,31614
12		20,6		1,22		97,59%	1,19060	
13	8	30,1	40,70	1,36	1,4	98,02%	1,33302	1,36805
14		51,3		1,44		97,44%	1,40307	
15	9	86	84,35	1,38	1,25	96,38%	1,33010	1,21094
16		82,7		1,12		97,48%	1,09178	
17	10	86,3	71,45	1,29	1,22	97,73%	1,26072	1,19478
18		56,6		1,15		98,16%	1,12885	
19	11	---	125,00	---	1,35	---	---	1,32340
20		125		1,35		98,03%	1,32340	
21	12	116	112,50	1,1	1,15	98,02%	1,07818	1,12207
22		109		1,2		97,16%	1,16595	
23	13	136	169,50	1,05	1,105	97,58%	1,02458	1,07917
24		203		1,16		97,74%	1,13376	

Ve výše uvedené tabulce chybí údaje z lahví 3, 4 a 19. Důvodem vyloučení vzorků 3 a 4 ze třetího dne kultivace byla nízká produkce polysacharidu a při přečištění 50 ml destilované vody a následným pokusem o vysrážení dextranu dopadlo negativně a proto byl třetí den kultivace připraven znovu, s použitím poloviční dávky destilované vody při rozpouštění

získaného polysacharidu. Vzorek č. 19 byl vyloučen ihned po kultivaci, neboť došlo nejspíše k jeho kontaminaci a u této láhve se projevilo nežádoucí kvašení.

Pro lepší čitelnost dat byly hodnoty viskozity médií a sušin získaných dextransů z celého vzorku zaneseny do grafického znázornění **obr. 10**.



Obr. 10 Grafické znázornění závislosti viskozity média a hmotnosti produkovaného dextransu na době kultivace – první velký pokus

Z grafu je patrné, že hmotnost dextransu rostla do 8. dne (1,35805 g). Poté došlo k poklesu produkce polysacharidu. Zato viskozita tekutého média z počátku kultivace rostla pozvolna a poté nastal strmý nárůst. Z tohoto grafu se dá vyčíst, že viskozita by mohla být přibližným ukazatelem množství polysacharidu v médiu do 8. dne kultivace.

Pozorování

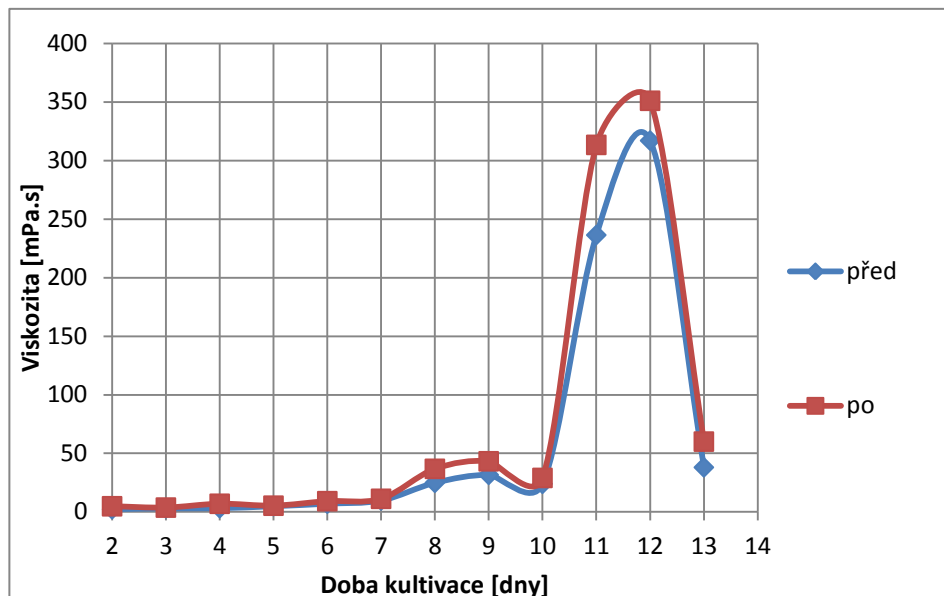
Během přečištění vzorku bylo zajímavé také sledovat lepivost dextransu na stěně nádoby. Nejvyšší lepivost vykazovaly vzorky v době kultivace od 2 do zhruba 5 dní. U vzorků kultivovaných 2 dny byla lepivost tak vysoká, že nešlo ani polysacharid vyjmout z nádoby a musel se nechat sušit v láhvi. Lepivost byla nižší u vzorků, které se kultivovaly déle jak 5 dní.

4.3.4 Dextran připravovaný v říjnu 2012 – druhý velký pokus

Druhý velký pokus byl proveden pro získání nových vzorků dextranu, pro ověření výsledků získaných v prvním velkém pokusu. Jediná odlišnost spočívala v rozdílném způsobu očkování – zde byl zaočkován celý objem použitého média a ten pak rozplněn do jednotlivých kultivačních láhví. Důvodem byl poněkud rozkolísané výsledky limitních viskozitních čísel dextranů z prvního velkého pokusu, získané v laboratoři fyzikální chemie FT UTB, které naznačovaly jistou nehomogenost očkování. Během druhého velkého pokusu bylo celkem připraveno 35 vzorků média. Kultivace probíhala stejně jako v kap. 4.2.3 v rozmezí od 2 do 13 dní. Během tohoto testu byla měřena viskozita média před i po centrifugaci. Výsledky viskozit jsou uvedeny v **tab. 3** a grafické znázornění v **obr. 11**.

Tab. 3 Naměřené hodnoty viskozit tekutého média před a po centrifugaci

Doba kultivace	Č. láhve	Viskozita tekutého média			
		Před centrifugací		Po centrifugaci	
[dnů]		[m.Pas]			
2	22	2,14	2,23	4,90	4,75
	23	2,31		4,60	
3	1	3,30	2,99	3,95	3,61
	2	2,67		3,27	
4	3	3,08	3,13	9,93	6,87
	4	3,18		3,80	
5	5	3,99	4,79	4,15	5,24
	6	5,59		6,33	
6	7	7,89	6,95	9,03	9,07
	8	6,00		9,10	
7	9	10,80	9,69	13,2	11,11
	10	8,57		9,02	
8	24	14,6	24,8	22,0	36,7
	25	24,8		36,7	
9	26	28,00	31,6	36,3	43,15
	27	35,20		50,0	
10	11	21,50	23,9	28,4	28,95
	12	26,30		29,5	
11	13 A	21,30	21,3	31,5	39,75
	19 B	21,30		48,0	
	31 C	257	236	307	313
	32 D	162		307	
	33 E	290		326	
12	34	314	317	362	351
	35	320		340	
13	17	35,4	37,95	50,8	59,95
	18	40,5		69,1	



Obr. 11 Grafická závislost viskozity média před a po centrifugaci na době kultivace – druhý velký pokus

Z grafu je patrné, že viskozita média před centrifugací je o něco málo menší než viskozita média po centrifugaci: to mohlo být nejspíše způsobeno oddělením bakterií od polysacharidu.

V průběhu pokusu byly získány vzorky dextranu stejným postupem jako v prvním velkém pokusu – hmotnosti získaných dextranů vysušených v digestoři a nad P_2O_5 jsou uvedeny v **tab. 4**

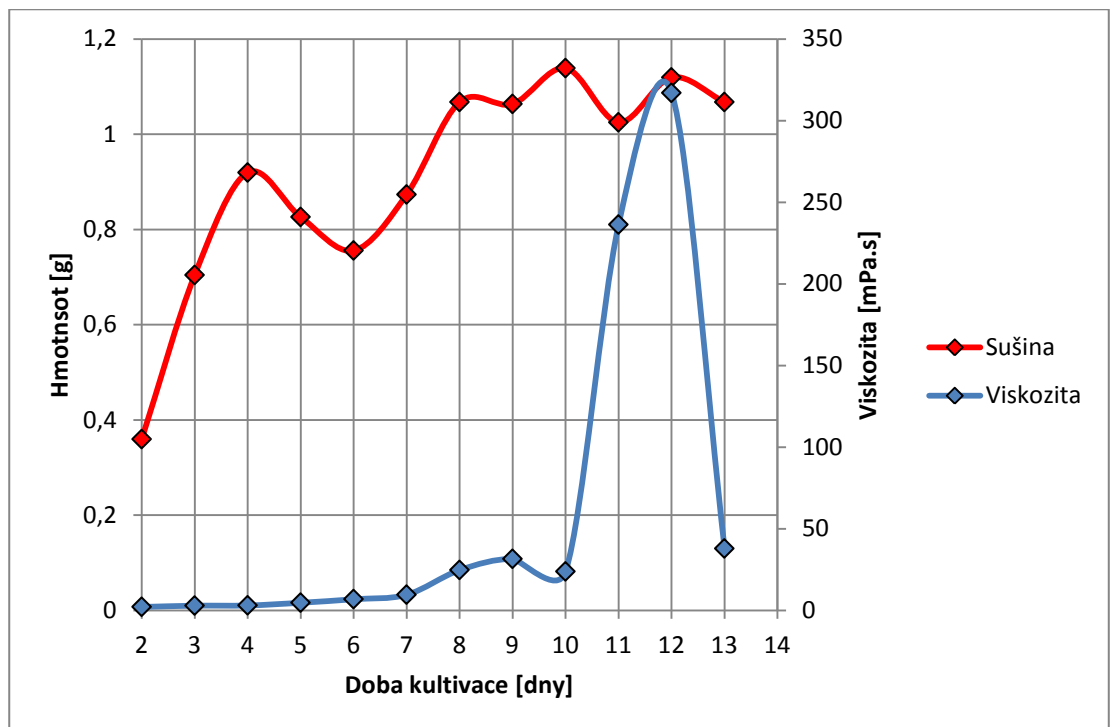
Tab. 4 Stanovení sušiny dextranu – druhý velký pokus

Doba kultivace	Č. láhve	Hmotnost z části odebraného vzorku před vysušením	Hmotnost z části vzorku po vysušení	Hmotnost odpařené vody z části vzorku	Sušina z části vzorku dextranu	Sušina z celého vzorku dextranu	
[dnů]		[g]				[g]	
2	22	0,12022	0,11662	0,00360	97,01%	0,39093	0,35972
	23	0,10708	0,10392	0,00316	97,05%	0,32851	
3	1	0,11954	0,11765	0,00189	98,42%	0,95309	0,70433
	2	0,10134	0,09867	0,00267	97,37%	0,45557	
4	3	0,16288	0,15854	0,00434	97,34%	0,94863	0,91949
	4	0,1554	0,15118	0,00422	97,28%	0,89035	
5	5	0,10247	0,09999	0,00248	97,58%	0,71477	0,82629
	6	0,23168	0,22515	0,00653	97,18%	0,93780	
6	7	0,11051	0,10799	0,00252	97,72%	0,72176	0,75589
	8	0,10919	0,10684	0,00235	97,85%	0,79002	
7	9	0,13599	0,13170	0,00429	96,85%	0,88798	0,87340
	10	0,11213	0,10890	0,00323	97,12%	0,85883	
8	24	0,18311	0,17857	0,00454	97,52%	0,47844	1,20756
	25	0,14226	0,13796	0,00430	96,98%	1,20756	
9	26	0,20055	0,19422	0,00633	96,84%	1,14072	1,06358
	27	0,12077	0,11793	0,00284	97,65%	0,98644	
10	11	0,10788	0,10495	0,00293	97,28%	1,05835	1,13880
	12	0,23188	0,22549	0,00639	97,24%	1,21925	
11	13 A	0,40371	0,39550	0,00821	97,97%	1,26161	1,41919
	19 B	0,2204	0,21533	0,00507	97,70%	1,57677	
	31 C	0,22155	0,21674	0,00481	97,83%	1,13100	1,02496
	32 D	0,19268	0,18652	0,00616	96,80%	0,94063	
	33 E	0,27913	0,27212	0,00701	97,49%	1,00326	
12	34	0,1901	0,18528	0,00482	97,46%	1,12922	1,1195
	35	0,15473	0,15097	0,00376	97,57%	1,10927	
13	17	0,17918	0,17358	0,00560	96,87%	1,01854	1,06757
	18	0,25083	0,24429	0,00654	97,39%	1,11661	

Z výše dvou uvedených tabulek 3 a 4 je červeně vyznačen vzorek 24. Tato hodnota nebyla zahrnuta do výpočtu průměru. Důvodem byla přibližně třetinová hmotnost vyprodukovaného dextranu oproti paralelnímu vzorku téhož dne kultivace.

Dále jsou také znázorněny červeně body v 11. dnu kultivace, přesněji vzorky 13 A a 19 B. Tyto vzorky byly sice zpracovány, ale nebylo s nimi dále pracováno, neboť došlo k jejich kontaminaci během přečištění dextranu.

Vzorky ve 12tý den kultivace byly kontaminovány již v průběhu kultivace, a proto byly ihned vyřazeny a nahrazeny vzorky novými.



Obr. 12 Grafické znázornění závislosti viskozity tekutého média a hmotností produkovaného dextransu – druhý velký pokus

Ve výše uvedeném grafu je zanesena závislost viskozity tekutého média před centrifugací a hmotnost produkovaného ECP na době kultivace. Oproti grafu vyobrazenému na **Obr. 10** zde nejprve dochází k nárůstu hmotnosti polysacharidu do 4. dne kultivace, poté 2 dny docházelo k jeho úbytku a následně opět růstu až do 8. dne kultivace, poté již hmotnost produkovaného dextransu nemá stabilní tendenci růstu. V 10. den kultivace se nalézá maximum 1,1388 g.

Nejvíce zajímavý je ovšem 11tý den kultivace. Zde můžeme vidět velký nárůst viskozity (236,33 mPa.s), ale zato pokles produkce dextransu. Tento údaj ukazuje, že viskozita není přený ukazatel hmotnosti produkovaného dextransu.

Pozorování

V předchozím pokusu jsem pozoroval lepivost dextransu na stěnách láhve. U tohoto pokusu se lepivost od předchozího testu velice neměnila. Dále jsem zkoušel, jaký vliv má míchání acetonu. Zdali je lepší aceton míchat kruhovým pohybem nebo spíše pohybem třepacím.

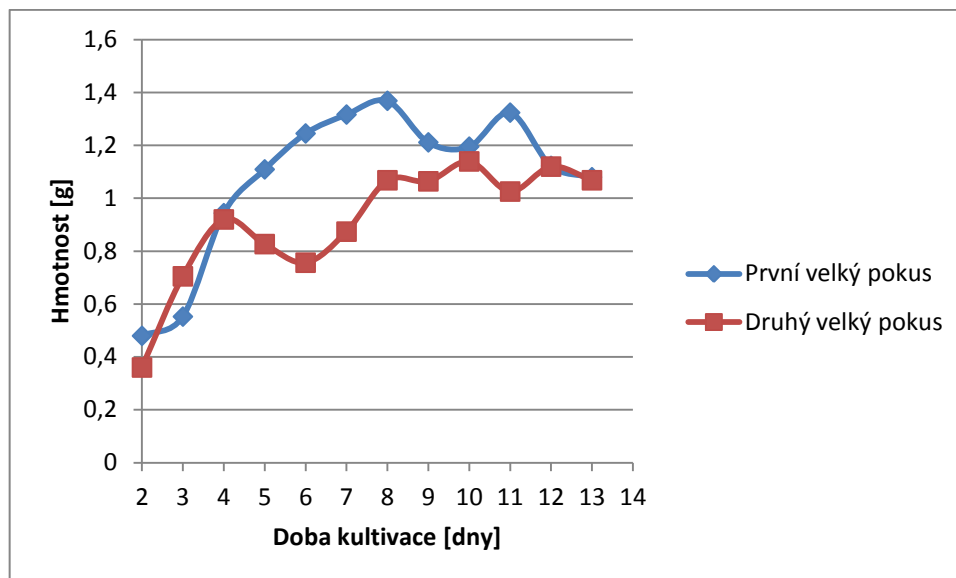
Na výsledném produktu se míchání nijak neprojevovalo, ale za to při snaze vzorek dostat z láhve ven se ukázalo míchání kruhové jako vhodnější, neboť se vzorek shlukoval do většího celku a bylo snadnější ho z láhve vyjmout.

4.3.5 Srovnání stanovené sušiny z prvního a druhého velkého pokusu

V **obr. 13** uvádím srovnávací grafické znázornění stanovených sušin u prvního a druhého velkého pokusu a naměřené hodnoty byly zapsány do **tab. 5**.

Tab. 5 Srovnávací hodnoty stanovených sušin dextransu z prvního a druhého velkého pokusu

Kultivace	První velký pokus	Druhý velký pokus	Rozdíl
[dny]	[g]		[mg]
2	0,47933	0,35972	119,61
3	0,55213	0,70433	152,20
4	0,94332	0,91949	23,83
5	1,10878	0,82629	282,49
6	1,24460	0,75589	488,71
7	1,31614	0,87340	442,74
8	1,36805	1,06757	300,48
9	1,21094	1,06358	147,36
10	1,19478	1,1388	55,98
11	1,32340	1,02496	298,44
12	1,12207	1,11925	2,82
13	1,07917	1,06757	11,60



Obr. 13 Grafické znázornění produkovaného dextranu za dobu kultivace – první a druhý velký pokus

Ze srovnávacího grafu vyobrazeného v obr. 13 je vidět průběh produkovaného dextranu z prvního a druhého velkého pokusu. Mezi 2. až 4. den kultivace jde vidět nárůst u obou křivek, ale z následujících dní kultivace má každá křivka produkovaného dextranu má zcela jiný průběh, důvodem může být zřejmě rozdílné zaočkování živných médií u jednotlivých pokusů. Ze 4. dne kultivace jde vyčíst téměř totožné hmotnosti vyprodukovaného dextranu. Rozdíl u těchto dvou vzorků je jen 23,83 mg. V 13. den kultivace, kde je rozdíl obou hodnot dokonce 11,60 mg. Ovšem nejmenší rozdíl se nalézá v 12. den kultivace a to pouhé 2,82 mg.

4.3.6 Dextran připravovaný v březnu 2013 – vzorky s krátkou dobou kultivace

Cílem tohoto pokusu bylo připravit sérii vzorků dextranu při době kultivace 24, 30, 36 a 48 hodin. Celkem bylo připraveno 12 lahví tekutého média, 8 z nich bylo použito a zbylé byly použity jako záložní. Naměřené hodnoty viskozit tekutého média před centrifugací jsou uvedeny v **tab. 5.**, naměřené hmotnosti získaného dextranu jsou uvedeny v **tab. 6** a grafické znázornění závislosti viskozity tekutého média a hmotnosti dextranu je uvedeno v **obr. 14.**

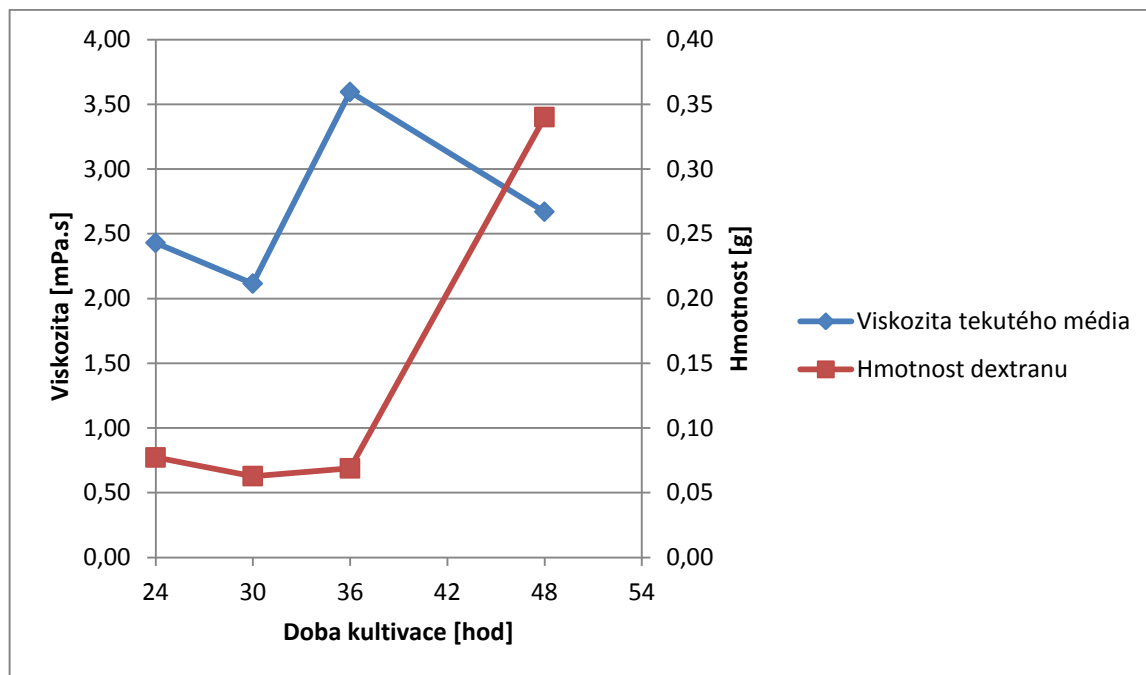
Tab. 6 Naměřené hodnoty viskozit média – krátkodobá kultivace

Č. láhve	Kultivace	Viskozita média před centrifugací	
	[hod]	[mPa.s]	
1	24	2,70	2,43
2		2,16	
3	30	2,32	2,12
4		1,91	
5	36	3,20	3,60
6		3,99	
7	48	3,05	2,67
8		2,29	

Tab. 7 Naměřené hodnoty hmotnosti vzorků dextranu – krátkodobá kultivace

Č. láhve	Kultivace	Hmotnost						
		Miska	Vzorek vysušený v digestoři + miska	Vzorek vysušení nad P ₂ O ₅ + miska	Hmotnost vzorku vysušeného v digestoři		Hmotnost vzorku vysušeného nad P ₂ O ₅	
		[g]	[g]	[g]	[g]		[g]	
1	24	18,2965	18,3685	18,3645	0,0720	0,0831	0,0680	0,0772
2		18,4176	18,5118	18,5040	0,0942		0,0864	
3	30	17,8314	17,8933	17,8901	0,0619	0,0674	0,0587	0,0628
4		18,4017	18,4746	18,4686	0,0729		0,0669	
5	36	17,3772	17,4705	18,4643	0,0933	0,0735	0,0871	0,0688
6		23,7493	23,8030	23,7998	0,0537		0,0505	
7	48	19,2422	19,5980	19,5828	0,3558	0,3580	0,3406	0,3401
8		18,3826	18,7429	18,7222	0,3603		0,3396	

Původní domněnky byly, že viskozita tekutého média po 24 hodinách kultivace bude kolem hodnoty 1 mPa.s. To by i jeden z důvodů, proč se v předchozích testech pracovalo se vzorky kultivovanými až po 48 hodinách, nynější měření ovšem ukázalo, že viskozita tekutého média už i po 24 hodinách je podobná té po 2 dnech kultivace. Výsledky hmotností získaných polysacharidů ukázali, že produkce dextranu začíná významně narůstat mezi 36. a 48. hodinou kultivace.



Obr. 14 Grafické znázornění závislosti viskozity tekutého média před centrifugací a hmotnosti produkovaného polysacharidu na době kultivace – krátkodobá kultivace

Jak je z grafu patrné, tak křivka viskozity i křivka hmotností v době kultivace mezi 24 a 30 hodinami zůstávají na obdobných hodnotách. Mezi 30. a 36. hodinou kultivace je vidět, že dochází k nárůstu viskozity tekutého média, ale k produkci dextransu dochází až mezi 36. a 48. hodinou kultivace. Je však nutno brát v úvahu, že přesnost stanovení množství získaného dextransu mohla být ovlivněna velmi nízkým množstvím vyprodukovaného polysacharidu při době kultivace od 24 do 36 hodin.

ZÁVĚR

Cílem mé bakalářské práce bylo najít případnou závislost mezi viskozitou tekutého média a hmotností produkovaného polysacharidu dextransu, při kultivaci bakterie *Leuconostoc garlicum* PR. Pro nalezení této závislosti byly provedeny 2 velké série pokusů, u kterých byla kultura PR kultivována v po dobu od 2 do 13 dnů.

Z výsledků prvního velkého pokusu je vidět, že viskozita média společně s hmotností produkovaného dextransu roste do zhruba 8. dne kultivace. Po této době dochází k poklesu hmotnosti produkce polysacharidu, avšak viskozita tekutého média má stále tendenci růst.

U druhého velkého pokusu má křivka hmotnosti dextransu spíše nepravidelný průběh. Nejdříve dochází ke strmému nárůstu mezi 2. a 3. dnem kultivace, poté k určitému poklesu a následně, po 6. dni, opět k nárůstu. V 11. den kultivace dochází k vysokému nárůstu viskozity tekutého média, ale k poklesu produkce dextransu. Díky tomuto jevu by se dalo říci, že viskozita není přesným ukazatelem produkovaného dextransu.

Ze srovnávacího grafu produkovaného dextransu z prvního a druhého velkého pokusu jsou zřejmé rozdíly. Důvodem rozdílných průběhů křivek může být zřejmě rozdílné zaočkování živného média. Nejvíce jsou si shodné výsledky ze 4., 10., 12. a 13. dne kultivace. U 13. dne kultivace je rozdíl pouhých 2,83 mg.

Poslední test, u kterého probíhala kultivace od 24 do 48 hodin, ukázal, že k nárůstu produkovaného dextransu dochází až po 36. hodině kultivace.

Závěrem by se dalo říci, že viskozita tekutého média nemůže být použita jako ukazatel produkovaného polysacharidu a pro zjištění hmotnosti dextransu je nutno provést vázkové stanovení.

Samotná bakterie *Leuconostoc garlicum* PR se ukázala během testů jako opravdu zajímavá kultura, neboť i když byl proveden stejný postup přípravy a kultivace, tak bakterie vykazovala poněkud odlišné naměřené hodnoty viskozit, viz druhý velký pokus. A proto by bylo dobré tuto kulturu podrobit dalším testům a zkoumáním.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SALEHIZEDEH, H., SHOJAOSADATI, S. A. Extracellular biopolymeric flocculants. Recent trends and biotechnological importants. *Biotechnology Advances*. 2011, roč. 19, č. 5, s. 371-385
- [2] BAROŠOVÁ, Eva *Vybrané bakteriální polymery a jejich význam pro čištění odpadních vod*. Bakalářská práce. Zlín: UTB ve Zlíně, 2006. 37s.
- [3] DESVAUX, M., DUMAS, E., CHASFEY, I. and HÉBRAUD, M., Protein cell surface display in Gram-positiv bacteria: from single protein to macromolucular protein structure. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, roč. 256, č. 1, s 1 – 15
- [4] KOSTER, M. BITTER, W., TOMMASSEN, J., Protein sexretion mechanisms in Gram - negative bakteria. *Internacional Journal of Medical Microbiology*. 2000, roč. 290, č. 4-5, s. 325-331
- [5] STEINBERGER, R. E. and HOLDEN, P. A. Extracellular DNA in single- and multiplespecies unsaturated biofilms. *Applied and Enviromental Microbiology*. 2005, roč. 71, č. 9, s. 5404-5410
- [6] SPONZA, D. T. Investigation of extracellular polyme substances (EPS) and phys-ocpchemical properities of different activated slugde flocs under steadystate conditions. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003, roč. 32. Č. 3-4, s. 375-385
- [7] FLEMING, H. C., WINGENDER, J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and technology*. 2001, roč. 43, č. 6, s. 1-8
- [8] RUFFING, A. and CHEN, R. R. Metabolic engineering of microbes for oligosaccharide and polysaccharide synthesis. *Microbial Cell Factories*. 2006, roč. 5, č. 25.
- [9] DE VUYST, L., DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bakteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1999, roč. 23, č. 2, s. 153-177
- [10] DE VUYST, L., DE VIN, F., VANINGELGEM, F., DEGEEST, B. recent developmentst in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bakteria. *International Dairy Journal*. 2001, roč. 11, č. 9, s. 687-707
- [11] SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from gram-negative bakteria. *Internacional Dairy Journal*. 2001. Roč. 11, č. 9, s. 663-674.

- [12] ROSYPAL, Stanislav. *Obecná bakteriologie*. 1. vyd. Praha: SPN, 1981. S. 71.
- [13] FUSCONI, R., GODINHO, M. J. L., HERNÁNDEZ, I. L. C., BOSSLAN, N. R. S. *Gordonia polyisoprenivorans* from groundwater contaminated with landfill leachate in subtropical area: characterization of the isolate and exopolysaccharide production. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006, roč. 37, č. 2, s. 168-174.
- [14] CERNING, J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1990, roč. 87, č. 1-2, s. 113 – 130.
- [15] SCHEIBLER, C., Investigation on the nature of the galatinous excretion (so-called frog's spawn) which is observed in production of beet-sugar juices. *Z Dtsch Zucker-Int* 24:309-335 (1874)
- [16] PASTEUR, L., On the viscous fermentation and the butyrous fermentation. *Bull Soc Chim Fr* 30-31 (1861)
- [17] VAN TIEGHEM, P., On sugar-mill gum. *Ann Sci Nature Bot Biol Veg* 7:180-203 (1878)
- [18] Leathers TD, Dextran, in *Biopolymers. Vol. 5. Polysaccharides I: Polysaccharides from Prokaryotes*, ed by Vandamme EJ, De Baets S and Steinbüchel A. Wiley-VCH, Weinheim, pp 299-321 (2002)
- [19] SABATIE, J., CHOPLIN, L., MOAN, M., DOUBLIER, JL., PAUL, F., and MONSAR, P., The effect of synthesis temperature on the structure of dextran NRRL B512F. *Carbohydr Polym* 9:87-101 (1988)
- [20] ALSOP, RM., Industrial production of dextran, in *Microbial Polysaccharides*, ed by Bushell ME. Elsevier, Amsterdam, pp 1-44 (1983)
- [21] Reamaud – Siemeon M, Willemot RM, Sarcabal P, de Montalk GP And Monsan P, Glucanases: molecular engineering and oligosaccharide synthesis. *F Mol Catal B* 10:117-128 (2000)
- [22] De Belder AN, Medical application of dextran and its derivatives, in *Polysaccharides in Medical Application*, ed by Munitiu S. Marcel Dekker, New York, pp 505-523 (1996)
- [23] Robyt JF, Dextran, in *Encyclopedia of Polymer Science*, Vol 4, ed by Kroschwitz JI. Wiley – VCH, New York, pp 753-767 (1985)

- [24] Guggenheim and Schroeder HE, Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharides produced by cariogenic streptococci. *Hlev Odontol Acta* 11:131-152
- [25] Ueno R and Kuno S, Anti-HIV synerism between dextran sulfate and zidovudine. *Lancet* 3:796-797 (1987)
- [26] James JS, Dextran sulfate: new promising antiviral. *AIDS Treat News (electronic journal)* 50: (1988)
- [27] Anonymous, Dextran: 50 years – still going strong. *Agro-Food-industry Hi-Tech* March/April: 10-11 (1997)
- [28] Vandamme EJ, Renard CEF, Arnaut ERJ, Vekemans NMF and Tossut PPA, Process for obtaining improved structure build-up of baked products. US Patent 6 399 119 (2002)
- [29] Food SCO, *Oponion of the Scientific Committee an Food on a Saccharomyces cerevisiae Lactobacillus spp, as a Novel Food Ingredient in Bakery Products*. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Brusel (2000)
- [30] HLAVOŇOVÁ, EVA, *Studium produkce a vlastností vybraných bakteriálních exopolymerů*. Disertační práce. UTB ve Zlíně, 2001, s. 51-72
- [31] SEDLÁČEK, IVO, *Taxonomie prokaryot*, Masarykova Univerzita, Brno, 2007, s. 249 - 250

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ECP	Extracelulární polymer
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ČOV	Čistírna odpadních vod
TYA	Trypton kvasničný agar
TYM	Trypton kvasničné médium
GPC	Gelová permeační chromatografie
OD ₆₀₀	Metoda měření zákalu při vlnové délce 600 nm
FT	Fakulta technologická
UTB	Univerzita Tomáše Bati

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Závislost růstu kultury PR na době kultivace v různě pufrovaných Trypton kvasničných mediích s 10% sacharosy	20
Obr. 2 Závislost pH pufrovaných medií na době kultivace	20
Obr. 3 Závislost viskozity pufrovaných medií na době kultivace	21
Obr. 4 Závislost růstu kultury PR v TYM s 10% sacharosy, resp. s 10% glukosy na době kultivace.....	22
Obr. 5 Závislost viskozity TYM s 10 % sacharosy, resp. s 10% glukosy na době kultivace	22
Obr. 6 Závislost pH TYM s 10% sacharosy, resp. s 10% glukosy na době kultivace	23
Obr. 7 Závislost růstu kultury PR za použití různých substrátů na době kultivace	23
Obr. 8 Závislost viskozity za použití různých substrátů na době kultivace.....	24
Obr. 9 Graf závislosti viskozity na době kultivace	30
Obr. 10 Grafické znázornění závislosti viskozity média a hmotnosti produkovaného dextranu na době kultivace – první velký pokus	32
Obr. 11 Grafická závislost viskozity média před a po centrifugaci na době kultivace – druhý velký pokus.....	35
Obr. 12 Grafické znázornění závislosti viskozity tekutého média a hmotností produkovaného dextranu – druhý velký pokus	37
Obr. 13 Grafické znázornění produkovaného dextranu za dobu kultivace – první a druhý velký pokus	39
Obr. 14 Grafické znázornění závislosti viskozity tekutého média před centrifugací a hmotnosti produkovaného polysacharidu na době kultivace – krátkodobá kultivace	41

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Výsledky měření viskozity média s různou dobou kultivace	30
Tab. 2 Stanovení viskozit média v průběhu kultivace a sušin získaných vzorků dextranu -první velký pokus.....	31
Tab. 3 Naměřené hodnoty viskozit tekutého média před a po centrifugaci.....	34
Tab. 4 Stanovení sušiny dextranu – druhý velký pokus.....	36
Tab. 5 Srovnávací hodnoty stanovených sušin dextranu z prvního a druhého velkého pokusu	38
Tab. 6 Naměřené hodnoty viskozit média – krátkodobá kultivace	40
Tab. 7 Naměřené hodnoty hmotnosti vzorků dextranu – krátkodobá kultivace	40

PŘÍLOHY

PI: Stanovení molární hmotnosti a jejich distribuce metodou GPC

Příprava vzorků

Pro stanovení molární hmotnosti byly předem připravené vzorky dextransu rozpuštěny v mobilní fázi o koncentraci 1,5 – 3,5 mg/l. Rozpuštění bylo prováděno třepáním při laboratorní teplotě. Roztoky byly rozplněny do 5 ml odměrných baněk. Vzorky byly filtrovány přes stříkačkový filtr Chromafil PP/PET (o velikosti pórů 0,45 μm).

Měření:

Přístroj: PL – GPC 50 s viskozitní a refraktometrickou detekcí (*Polymer Laboratories, Church Stretton, Velká Británie*)

Kolony: TSK GMPWXL (*Tosoh Bioscience, Stuttgart, Německo*) a Ultrahydrogel 250 (*Waters, Milfort MA*) zapojeny do série

Teplota: 30°C

Nástříková smyčka: 100 μl

Průtoková rychlost: 0,8 ml/min

Mobilní fáze: vodný roztok 0.2% NaN_3

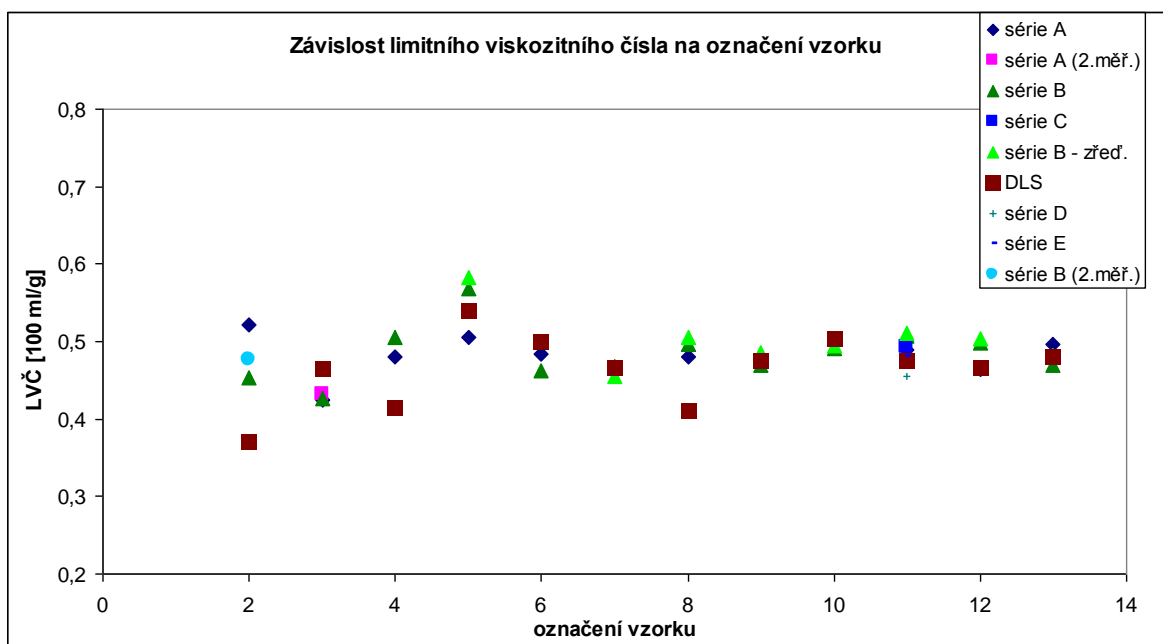
Run time: 30 minut

Zpracování dat pomocí SW: Cirrus GPC Multi Detector Software (*Polymer Laboratories, Church Stretton, Velká Británie*)

Kalibrace kolony: univerzální kalibrace za použití pullulanových standardů (polysacharidů) s úzkou distribucí molární hmotnosti v rozmezí 180 – 788000 g/mol (*Polymer Laboratories, Church Stretton, Velká Británie*) a dextransových standardů $M_p = 1,6, 2,3$ a 6,3 MDa (*Watrex, Praha, ČR*).

PII: Stanovení limitního viskozitního čísla

Vzorky pro viskozimetrické hodnocení byly připraveny v koncentraci přibližně 1 hm.% ve vodě. Rozpouštění probíhalo při teplotě 70°C po dobu 5 hodin s občasným promícháním na třepačce a pak do druhého dne při laboratorní teplotě. Následně byly vzorky přefiltrovány přes fritu S2. K měření, které probíhalo při teplotě 30°C, byl použit Ubbelohdeho zředovací viskozimetr o průměru kapiláry 0,44 mm. Z průtokových dob vzorků a rozpouštědla (vody) byly vypočteny relativní, specifické, redukované viskozity a limitní viskozitní čísla.



Obr. Závislost limitního viskozitního čísla na době kultivace