

Možnosti izolace a charakterizace bakteriálních polysacharidů

Bc. Hana Pištěková

Diplomová práce
2007



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí
akademický rok: 2006/2007

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Hana PÍŠŤEKOVÁ**
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Téma práce: **Možnosti izolace a charakterizace bakteriálních polysacharidů**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši na zadané téma s využitím dostupných databází (Web of Science, PubMed), Current Content) a dalších dostupných materiálů. 2. Experimentální práci zaměřte na zjištění vhodných podmínek produkce bakteriálního polysacharidu. 3. Navrhněte výhodný způsob izolace a případného přečištění polysacharidu. 4. Využijte dostupných technik pro stanovení účinnosti produkce a charakterizaci získaného produktu. 5. Veškerá naměřená data zpracujte přehledně písemnou formou, výsledky s výhodou znázorněte pomocí tabulek a grafů s využitím počítače a dostupného programového vybavení.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

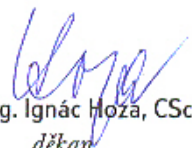
Datum zadání diplomové práce:

5. února 2007

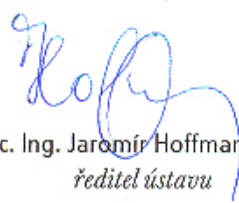
Termín odevzdání diplomové práce:

25. května 2007

Ve Zlíně dne 1. února 2007


prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan




doc. Ing. Jaromír Hoffmann, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Bakteriální polysacharidy jsou díky svým vlastnostem stále častěji uplatňovány v nejrůznějších průmyslových odvětvích. Diplomová práce obsahuje poznatky získané při kultivaci *Agrobacterium tumefaciens*, který je producentem extracelulárních polysacharidů a které bylo v naší laboratoři dříve izolováno. Podařilo se zavést metody stavení bílkovin celkových polysacharidů a kyselých polysacharidů, které byly aplikovány na sledování produkce EPS během kultivace. Dále byl vyvinut postup izolace EPS. Výtěžek EPS při provedené kultivaci byl 7 g na litr kultivačního média. Bylo zjištěno, že k produkci EPS dochází především ve stacionární fázi kultivace. Získaný EPS byl charakterizován pomocí FT-IR, spektrum se nápadně podobá spektru xanthanu, ve struktuře jsou zřejmě přítomny kyselé, pravděpodobně karboxylové skupiny. EPS se vyznačoval širokou distribuční křivkou molekulové hmotnosti v oblasti 1-3 milionů Da. Dosažené výsledky ukazují na zajímavé vlastnosti produkovaného EPS, jakož i na relativně vysokou produkční schopnost zkoumaného bakteriálního kmene a možné praktické uplatnění.

Klíčová slova: extracelulární polysacharidy, *Agrobacterium tumefaciens*, fenol-sulfátová metoda, alcianová modř, BCA metoda, izolace

ABSTRACT

Bacterial exopolysaccharides are due to its unique properties still more and more used in different domain of industry. Presented master thesis contains experiences gained during cultivation experiments with *Agrobacterium tumefaciens*, earlier isolated in our laboratory. This bacterium is the producer of extracellular polysaccharides (EPS). Spectrophotometric methods for protein, total polysaccharides and acidic polysaccharides determination were adopted and employed in monitoring of EPS production during cultivation experiments. Further, the thesis discusses problems of isolation and purification of bacterial EPS. The maximal EPS yield achieved was 7 g per liter of cultivation medium. Our investigations show that EPS is produced particularly in the stationary phase of the culture growth. EPS isolated was characterized by FT-IR, the spectrum recorded resembles the spectrum of Xanthan; presence of acidic, probably carboxylic, groups can be expected in the structure of EPS. The distribution curve of the isolated polysaccharide was very broad spanning the region from 1 to 3 millions of Daltons. Obtained results reveal interesting properties of the investigated EPS as well as relatively high production capacity of the employed bacterial strain and a possibility of practical applications.

Keywords: exopolysaccharides, *Agrobacterium tumefaciens*, phenol-sulphuric method, alcian blue, BCA method, isolation

Chtěla bych velmi poděkovat Doc. Mgr. Marku Koutnému PhD. za odborné vedení, čas, trpělivost, rady i připomínky, které věnoval mé diplomové práci.

Mé poděkování patří také Mgr. Robertu Víchovi PhD., Ing. Věře Kašpárkové PhD. a pracovníkům Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí, kteří se na vzniku diplomové práce podíleli, za všestrannou pomoc a cenné informace.

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

Prohlašuji, že jsem na celé diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala.

Ve Zlíně dne

.....

OBSAH

ÚVOD	8
I LITERÁRNÍ REŠERŠE	9
1 EXTRACELULÁRNÍ POLYSACHARIDY	10
1.1 VÝSKYT EXTRACELULÁRNÍCH POLYSACHARIDŮ	10
1.1.1 Syntéza extracelulárních polysacharidů	10
1.2 STRUKTURA EXTRACELULÁRNÍCH POLYSACHARIDŮ	11
1.2.1 Struktura extracelulárních polysacharidů Rhizobií	11
1.2.2 Struktura extracelulárních polysacharidů bakterií mléčného kvašení	12
1.3 VLASTNOSTI EXTRACELULÁRNÍCH POLYSACHARIDŮ	12
1.4 VLIV PODMÍNEK KULTIVACE NA TVORBU A VLASTNOSTI EPS	13
1.5 UPLATNĚNÍ EXTRACELULÁRNÍCH POLYSACHARIDŮ V PRŮMYSLU	14
1.5.1 Extracelulární polysacharidy v potravinářském průmyslu	15
1.5.2 Úloha extracelulárních polymerů při čištění odpadních vod	15
1.5.3 Význam extracelulárních polysacharidů při bioremediacích	15
1.5.4 Některé komerčně využívané bakteriální polysacharidy	16
2 IZOLACE EXTRACELULÁRNÍCH POLYSACHARIDŮ	20
2.1 IZOLACE XANTHANU	20
2.2 PŘÍKLADY PŘESNÝCH POSTUPŮ IZOLACE EPS	21
2.2.1 Izolace EPS dle S. Velasca a kol. [8]	21
2.2.2 Izolace dle Ch. Garniera a kol. [10]	21
2.2.3 Izolace dle Vermani M. V. a kol. [21].....	21
3 METODY STANOVENÍ EXTRACELULÁRNÍCH POLYSACHARIDŮ	22
3.1 KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ EXTRACELULÁRNÍCH POLYSACHARIDŮ	22
3.1.1 Kolorimetrické metody stanovení	22
3.1.2 Chromatografické metody	23
3.1.3 Stanovení pomocí IČ spektroskopie	23
3.2 KVALITATIVNÍ STANOVENÍ EXTRACELULÁRNÍCH POLYSACHARIDŮ	23
3.2.1 Analýza struktury extracelulárního polysacharidu	23
II METODICKÁ ČÁST	25
4 ŽIVNÁ MÉDIA, KULTIVACE BAKTERIÍ A IZOLACI EPS	26
4.1 ŽIVNÁ MÉDIA A ROZTOKY POTŘEBNÉ K JEJICH PŘÍPRAVĚ	26
4.2 KULTIVACE BAKTERIÍ	28
4.3 POSTUP PŘI PŘEČIŠTĚNÍ A IZOLACI EPS	29
4.3.1 Přečištění EPS u Testů I-III	29
4.3.2 Izolace EPS.....	29
4.4 POPIS POUŽÍVANÝCH MIKROBIÁLNÍCH KULTUR.....	30
5 ANALYTICKÁ STANOVENÍ A PŘÍPRAVA CHEMIKÁLIÍ	31
5.1 ANALYTICKÉ STANOVENÍ BÍLKOVIN	31
5.2 ANALYTICKÉ STANOVENÍ EXTRACELULÁRNÍCH POLYSACHARIDŮ	34
5.2.1 Fenol-sulfátová metoda	34
5.2.2 Stanovení polysacharidů kyselého charakteru pomocí alciánové modři	36
5.2.3 Stanovení dynamické viskozity	38

5.3	KVALITATIVNÍ ANALÝZA EXTRACELULÁRNÍCH POLYSACHARIDŮ	38
5.3.1	FT-IR spektroskopie.....	38
5.3.2	GC/MS analýza	39
5.3.3	Gelová chromatografie	40
5.4	POSTUP PŘI ANALÝZE IZOLOVANÉHO VZORKU	40
5.5	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	42
5.6	OSTATNÍ LABORATORNÍ POMŮCKY	42
III	VÝSLEDKY A DISKUSE	43
6	PŘÍPRAVNÉ TESTY	44
6.1	OPTIMALIZACE KULTIVAČNÍCH PODMÍNEK.....	44
6.1.1	Vliv různých druhů sacharidického substrátu a množství O ₂ na produkci polysacharidu	44
6.1.2	Vliv množství kvasničného autolysátu na produkci polysacharidu – Kultivační test III.....	45
6.1.3	Vliv fosfátového pufru na EPS - Kultivační test IV	46
6.2	VOLBA VHODNÉHO ČINIDLA K VYSRÁŽENÍ POLYSACHARIDŮ	47
6.3	PODMÍNKY CENTRIFUGACE PŘI SEPARACI BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK	48
6.4	RUŠÍCÍ VLIVY PŘI ANALYTICKÉM STANOVENÍ	50
6.4.1	Fenol-sulfátová metoda	50
6.4.2	Polysacharidy kyselého charakteru stanovené pomocí alciánové modři.....	51
7	KŘIVKY RŮSTU BUNĚK A PRODUKCE EPS	52
7.1.1	Test I.....	52
7.1.2	Test II	57
7.1.3	Test III	62
7.1.4	Test IV	67
7.1.5	Shrnutí testů.....	71
8	CHARAKTERIZACE IZOLOVANÉHO POLYSACHARIDU	80
8.1	STANOVENÍ MNOŽSTVÍ POLYSACHARIDŮ A BÍLKOVIN V EPM.....	80
8.2	INFRAČERVENÁ SPEKTRA EXTRACELULÁRNÍCH POLYMERŮ	82
8.3	VÝSLEDKY GC-MS ANALÝZY	85
8.4	VÝSLEDKY GELOVÉ CHROMATOGRAFIE	87
	ZÁVĚR.....	88
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	91
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	94
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	95
	SEZNAM TABULEK	97

ÚVOD

Bakteriální polysacharidy se vyskytují v přírodě v nepřeberném množství. Vzájemně se od sebe liší chemickým složením, prostorovou strukturou, ale i svými funkcemi, ke kterým je tyto mikroorganismy využívají.

Bakterie vytváří v příznivých podmínkách zásobní polysacharidy, které zužitkovávají, pokud tyto příznivé podmínky skončí. Strukturní polysacharidy mají stavební funkci a tvoří spolu s dalšími látkami buněčný povrch. Extracelulární polysacharidy produkují pouze některé bakteriální druhy a jejich syntéza probíhá také jen za určitých podmínek. Posledně zmiňované skupině je věnována stále větší pozornost a její možné aplikace jsou stále předmětem výzkumů.

Tyto polysacharidy jsou stále častěji uplatňovány v nejrůznějších průmyslových odvětvích. Neboť se ve většině případů jedná o ekonomicky výhodný a současně obnovitelný zdroj, který nezatěžuje životní prostředí, neboť nevnaší do okolí cizorodé látky, které by měly tendenci přetrvávat v okolí. Zároveň se tyto polysacharidy účastní biologických procesů, které lze při správném pochopení jejich funkce potlačit anebo podpořit jejich tvorbu, podle role, kterou v těchto procesech sehrávají. Jedná se především se na jedné straně o patogení bakteriální druhy, kterým dodávají extracelulární polysacharidy zvýšenou rezistenci. Na druhé straně sehrávají tyto polysacharidy klíčovou roli při čistírenských procesech odpadních vod.

Komerční využití bakteriálních polysacharidů sebou nese zvýšené nároky na syntetizované množství a stálou jakost u těchto látek. Proto jsou předmětem zkoumání vybrané bakteriální druhy a optimální podmínky kultivace, které přináší produkty neměnných fyzikálních vlastností. Neméně důležitý je správný postup izolace a následná analýza.

Výše zmíněným tématům se věnuje tato diplomová práce. Jejím cílem je optimalizovat kultivační podmínky tak, aby pokud možno bylo dosaženo maximálních výtěžků extracelulárního polysacharidu. Dále je našim cílem vyprodukovaný polymer izolovat, přechistit a dostupnými technikami jej analyzovat.

I. LITERÁRNÍ REŠERŠE

1 EXTRACELULÁRNÍ POLYSACHARIDY

1.1 Výskyt extracelulárních polysacharidů

Schopnost produkovat polysacharidy je mezi mikroorganismy hojně rozšířená. Mikroorganismy běžně vytváří zásobní a strukturální polysacharidy. Ale kromě toho mají některé z nich pozoruhodnou schopnost produkovat extracelulární polysacharidy. Týká se to převážně specifických rodů bakterií, ale také v menší míře kvasinek a některých druhů hub [1,2].

Bakterie vylučují extracelulární polysacharidy (EPS) s malým množstvím glykoproteinů do prostředí ve formě slizu anebo jsou tyto extracelulární polymery v tenké vrstvě upevněny kohezními silami na vnější stranu buněčné stěny [1].

Extracelulární polysacharidy slouží bakteriím v celé řadě situací. Mezi základní funkce patří uchycení se na pevný povrch či tvorba biofilmů. Dále jsou tyto mikroorganismy v prostředí vystaveny velkému množství nepříznivých vlivů a extracelulární polymery pro ně představují ochranu před bakteriofágy, suchem či toxickými látkami. U patogenních bakterií, jako je *Streptococcus pneumoniae* a *Streptococcus agalactiae* způsobují kapsulární polysacharidy současně s O-antigenem lipopolysacharidů rezistenci vůči antibiotikům [2,3].

Pro některé druhy mikroorganismů slouží EPS jako zásobárna růstových prvků, avšak většina bakterií nedokáže rozložit EPS, které si samy vytvoří a využít je tak jako zdroj výživy [2].

1.1.1 Syntéza extracelulárních polysacharidů

U mikroorganismů, které jsou schopny za určitých podmínek produkovat extracelulární polymery můžeme pozorovat dva odlišné mechanismy jejich syntézy, které do jisté míry závisí na stavbě buněčné stěny. Extracelulárně probíhá syntéza u některých homopolysacharidů Gram-pozitivních bakterií. Tyto homopolysacharidy (dextran, alternan, levan, atd.) jsou syntetizovány pouze v případě, kdy je přítomen specifický substrát, který spouští tvorbu specifických enzymů nezbytných při polymerační reakci. Např. přítomnost sacharosy spustí u dextranu tvorbu enzymu dextran sacharáza, který katalyzuje polymerační reakci. Energie potřebná k reakci je získávána z hydrolýzy sacharosy. Syntéza dextranu může proběhnout v přítomnosti bakteriálních buněk nebo bez jejich účasti pomocí (imobilizovaných) enzymových preparátů [2,4].

Gram-negativní druhy syntetizují homopolysacharidy a heteropolysacharidy intracelulárně. Nukleotidy (nukleotidy difosfáty) poskytují aktivované formy monosacharidů a rovněž umožní bakteriální buňce vzájemnou přeměnu různých monosacharidů přes epimerizační, dehydrogenační a dekarboxylační reakce [4].

Počáteční proces biosyntézy se skládá z několika odlišných kroků. Nejdříve dochází k aktivaci nukleotidů v průběhu jejich formování, dále následuje kompletace opakujících

se jednotek polymeru postupným přidáváním jednotlivých monomerů na specifický nosič a současně s tímto procesem probíhá připojení acylových skupin (pokud jsou přítomny). Poté co proběhne polymerizace jednotek monosacharidů je polysacharid vyloučen skrz komplex membrán a buněčnou stěnu do vnějšího prostředí [4].

1.2 Struktura extracelulárních polysacharidů

Struktura většiny bakteriálních polysacharidů je jednoduchá. Podle chemického složení je můžeme rozdělit na homopolysacharidy, které obsahují pouze jeden typ monosacharidu a heteropolysacharidy. Ty bývají složeny z opakujících se jednotek dvou až čtyř typů různých monosacharidů (v rozsahu di- až oktosacharidy). Ve většině případů polysacharidy obsahují acylové substituenty, nejčastěji to jsou estery acetátů, pyruvátové kyseliny a sukcinylové estery [1].

Výsledkem přítomnosti ketylů nebo uronových kyselin je lineární makromolekula kyselého charakteru. Bakteriální polysacharidy mají většinou pravidelnou strukturu, výjimku představují algináty. V těchto polymerech se D-mannuronosylové a L-guluronosylové zbytky nacházejí v náhodně uspořádaných sekvencích [1, 4].

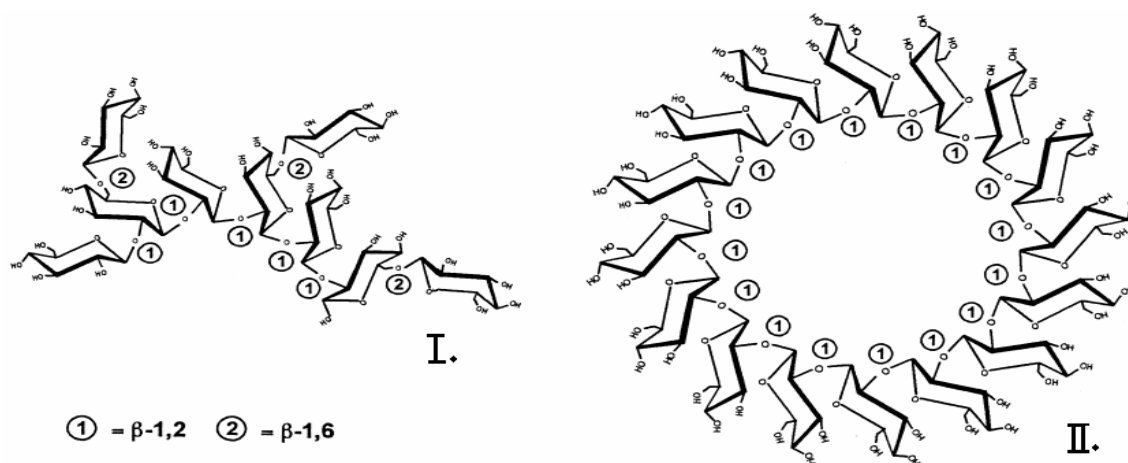
1.2.1 Struktura extracelulárních polysacharidů Rhizobií

Jako Rhozibia jsou označovány půdní bakterie patřící mezi rody *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* atd. Polysacharidy Rhizobií se skládají převážně ze dvou typů polysacharidů volně přichycených na povrchu buněčné stěny bakterie: Kyselé EPS a cyklické β -glukany [3].

Cyklickým β -glukanům nebyla v dřívějších výzkumech věnována velká pozornost, neboť se převážně nachází v periplasmatickém prostoru a jsou vylučovány do prostředí pouze za určitých podmínek. Jejich koncentrace se mění v závislosti ze změnami osmotického tlaku v okolí. Jejich výskyt byl poprvé pozorován u bakterie *Escherichia coli* [3,5].

Struktura cyklickým β -glukanům se liší u jednotlivých druhů bakterií. Například u již zmíněné bakterie *Escherichia coli* tvoří hlavní kostru homopolymer neutrálního charakteru, který se skládá z β -1,2-spojených glukánů, jež jsou do kruhové struktury upevněny pomocí β -1,6 vazeb [3,5].

Periplasmatické glukany u *Agrobacterii tumefaciens* jsou složeny z β -1,2-glukanů, jejich kostra je tvořena ze 17-25 glukosových jednotek, mohou být substituovány fosfoglycerolem, sukcinátem nebo methylmalonátem [3, 6].



Obr. 1. Struktura cyklických β -glukanů *Escherichia coli* a *Agrobacterium tumefaciens* [5].

Kyselé EPS jsou vysokomolekulární komplex heteropolysacharidů s pravidelně se opakujícími sedmi až devíti hexosovými zbytky. U jejich glykosidické vazby těchto heteropolysacharidů nepřevažuje žádný trend. Strukturní uspořádání může mít tedy charakter α , β lineární nebo s postranými řetězci. Většinou obsahují nesacharidové substituenty jako je sukcinát, pyruvát nebo acetát. Jejich kyselý charakter je dán především přítomností uronových kyselin, pyruvátových ketylů a sukcinátů [3].

1.2.2 Struktura extracelulárních polysacharidů bakterií mléčného kvašení

Homopolysacharidy bakterií mléčného kvašení jsou složeny buď z glukosy (dextran, mutan, alternan, β -glukany) nebo z fruktosy (levan, inulin) [1].

U bakterií mléčného kvašení bývají opakující se jednotky heteropolysacharidů v rozsahu od tri- do oktosacharidů a nejčastěji obsahují kombinaci D-glukosy, D-galaktosy a L-rhamnosy. Méně častý je výskyt N-acetylglukosaminu, N-acetylgalaktosaminu, fukosy, glukuronových kyselin a nesacharidových substituentů (fosfát, acetyl a glycerol) [1].

1.3 Vlastnosti extracelulárních polysacharidů

Chemické složení, délka řetězce, dále pak typ, množství a poloha substituentů společně s molární hmotností a úhlem větvení molekuly určují fyzikální vlastnosti extracelulárního polysacharidu. S fyzikálními vlastnostmi souvisí zahušťovací schopnosti a ty jsou úzce spjaty s konformací makromolekuly (konkrétně s uspořádáním terciální a kvartérní struktury). Sekundární a terciální struktura silně závisí na primární struktuře polysacharidu. Relativně malá změna v primární struktuře může zcela změnit konformaci makromolekuly a tím také vlastnosti EPS [1,2].

Molární hmotnost extracelulárního polysacharidu může být stanovena gelovou permeační chromatografií s refraktometrickým detektorem. Získané retenční časy jsou srovnány se standardy dextranu [1].

Výše uvedené parametry charakterizující jednotlivé polysacharidy se významně liší především podle bakteriálních druhů, které je produkují. Svůj vliv na strukturu molekuly mají i podmínky kultivace, ve kterých probíhá syntéza extracelulárních polysacharidů [1].

Molární hmotnost u homopolysacharidů je vyšší než u heteropolysacharidů. U bakterií mléčného kvašení se pohybuje od $2,7 \cdot 10^6$ Da do $22 \cdot 10^6$ Da. Heteropolysacharidy mohou nabývat molární hmotnost od $4 \cdot 10^4$ Da do $9 \cdot 10^6$ Da. Molární hmotnost xanthanu, produkováného *Xanthomonas campestris* se pohybuje $2 \cdot 10^6$ - $20 \cdot 10^6$ Da [1]. Extracelulární polysacharidy s vysokou molekulovou hmotností produkují i některé sinice. Maximální hodnoty se pohybují mezi $1,4 \cdot 10^6$ Da – $2,8 \cdot 10^6$ Da. [7]

1.4 Vliv podmínek kultivace na tvorbu a vlastnosti EPS

Rostoucí poptávka a komerční využití extracelulárních polysacharidů zvýšilo úsilí pro dosažení maximálního výnosu. Nejvýznamnější vliv na druh, vlastnosti a výtěžek bakteriálního polysacharidu má samozřejmě bakteriální druh. Ovšem nelze ani pominout složení živného média a jiné kultivační podmínky. Mezi rozhodující okolnosti patří i čas izolace, neboť některé extracelulární polymery jsou syntetizovány v průběhu celého cyklu bakteriálního růstu, zatímco jiné jsou produkovány pouze během pozdní logaritmické nebo stacionární fáze [1, 4].

Vhodný poměr složek v živném médiu, jež obsahuje vedle zdroje uhlíku také minerální soli, aminokyseliny, vitamíny atd., je klíčový pro růst bakterií a tvorbu extracelulárních polysacharidů. Nesprávné složení má přímý vliv nejen na množství vytvořeného polysacharidu, ale i na jeho fyzikální vlastnosti. Popř. lze správným poměrem složek upřednostnit syntézu jednoho druhu polysacharidu před ostatními, neboť řada bakteriálních druhů produkuje směs extracelulárních polysacharidů [1, 2, 4, 8].

Optimální složení živného média se liší podle jednotlivých bakteriálních druhů. Nicméně pro tvorbu většiny těchto polymerů je důležitá nevyváženost výživových a růstových prvků (především C:N), důležité je především zvýšené množství uhlíku, které umožní bakteriím vytvářet polysacharidy a omezí jejich množení. Vyrůstající koncentrace uhlíkatého substrátu má tedy pozitivní vliv na tvorbu extracelulárních polysacharidů, avšak příliš vysoká koncentrace substrátu sníží tvorbu biomasy. Většina bakteriálních druhů preferuje coby zdroj energie glukosu, popř. kombinaci cukerných složek [1, 2, 4, 8].

Nezanedbatelný vliv na výtěžek EPS má rovněž teplota, pH a množství kyslíku. I zde platí, stejně jako u předchozích parametrů, že konkrétní hodnoty jednotlivých veličin se liší poměrně výrazně u různých bakteriálních druhů. Některé zdroje uvádí, že nízká teplota jistých druhů mezofilních bakterií značně povzbudí tvorbu slizu. Tento efekt je vysvětlen u Gram-negativních bakterií následujícím způsobem. Při nižší teplotě je snížena rychlost růstu bakteriálních buněk a současně i syntéza polymerů v buněčné stěně, následkem toho je více specifických nosičů dostupných pro syntézu EPS. Naproti tomu je dokázáno, že vyšší teplota kultivace u bakterií mléčného kvašení znamená vyšší výtěžek EPS (optimální

teplota kultivace u LAB bakterií je stanovena na 42 °C). U xanthanu se vhodné teplotní podmínky pro kultivaci pohybují v rozmezí 25-34 °C, přičemž za optimum se považuje 25-30 °C. Vyšší teplota kultivace (33 °C) zvedá sice výtěžek, ale snižuje podíl pyruvátů v EPS [2,9].

Za optimální pH pro bakterie mléčného kvašení se považuje hodnota pH 6. Van den Berg a kol. stanovili postulát, že při pH 5,8 je vyšší přeměna substrátu na EPS, zatímco pH 6,2 znamená efektivnější přeměnu substrátu na biomasu. Některé zdroje uvádí, že při udržování vyššího pH po celou dobu kultivace LAB bakterií znamená zvýšení produkce EPS, což se děje v důsledku prodloužení doby, po kterou bude daná kultura setrvávat v exponenciální fázi růstu. Hodnota pH se v průběhu kultivace mění. V pozdní stacionární fázi růstové křivky dochází k růstu pH následkem poklesu syntézy peptidoglykanu a teikových kyselin, což opět vede ke zvýšení produkce EPS. Přesto je úprava pH v průběhu kultivace velmi důležitá, některé studie uvádí, že je účinnější než doplňování nutrientů.. U LAB bakterií bylo prokázáno, že když jsou růstové podmínky sledovány v průběhu kultivace, je produkce EPS vyšší než u vsádkových kultivací [2].

Poněkud odlišná situace je u xanthanu, u kterého se většina zdrojů shoduje, že optimální pH je neutrální. V průběhu kultivace pH klesá z neutrálního přibližně na hodnotu pH 5, díky přítomnosti kyselých skupin ve struktuře xanthanu. Někteří autoři se domnívají, že kontrola a úprava pH je nezbytná k dosažení vyššího výtěžku EPS. Studie však dokazují, že kontrola pH vede ke zvýšenému růstu buněk, který nemá výrazný efekt na produkci xanthanu. Když je pH upravováno, produkce xanthanu se zastaví, jakmile je dosažena stacionární fáze růstu. Pokud pH není kontrolováno, produkce EPS pokračuje i během stacionární fáze růstové křivky [9].

Zvýšený přísun kyslíku u LAB bakterií nevede ke zvýšení produkce EPS, jde ve většině případů o fakultativně anaerobní mikroorganismy, proto se aerace neprovádí. Naproti tomu u produkce xanthanu má množství kyslíku během růstu přímý vliv na výtěžek xanthanu, proto jeho kultivace probíhá v reaktorech, kde je přímo vháněn vzduch a obsah reaktoru je promícháván [2,9].

1.5 Uplatnění extracelulárních polysacharidů v průmyslu

Mikroorganismů syntetizujících extracelulární polysacharidy a různých druhů bakteriálních polysacharidů je relativně velké množství, ale jen malá část z nich je komerčně využívána. Širšímu uplatnění bakteriálních polysacharidů brání nejrůznější překážky. Ať už jsou to vysoké náklady spojené s kultivací mikroorganismů a následnou izolací polysacharidů, kolísavá jakost získaného produktu či patogenní charakter jiných bakteriálních rodů. Přesto si některé bakteriální polysacharidy našly uplatnění a jsou využívány v různých průmyslových odvětvích a to hned z několika důvodů [4].

Některé z nich jsou biologicky totožné s eukaryotickými polymery získávaných původně z rostlinných polysacharidů (celulosa, pektin a škrob) a mořských řas (alginát a karagén).

Jiné vynikají jako zahušťovací nebo suspendující činidla a zároveň vykazují odolnosti vůči kyselinám a zásadám a vysokou teplotní stálost. V posledních letech budí velkou pozornost mikrobiální homopolymery skládající se z (1-3) β -D-glukanů, které mají pozitivní vliv na stimulaci imunitního systému organismu, snižují hladinu cholesterolu a také omezují riziko vzniku vředů a nádorů zažívacího traktu [2, 4].

1.5.1 Extracelulární polysacharidy v potravinářském průmyslu

V tomto odvětví jsou hojně využívány extracelulární polysacharidy bakterií mléčného kvašení, ale i dalších druhů. Obecně lze říci, že tyto polysacharidy upravují viskozitní vlastnosti a zlepšují vzhled výrobků. Například xanthan, acetan a gellan tyto tři polysacharidy jsou syntetizovány gram-negativními bakteriemi a přidávají se do potravin jako aditivum. Bakterie mléčného kvašení vytváří extracelulární polysacharidy přímo ve výrobcích během mléčné fermentace (např. jogurt, Skandinávské kysané mléko „villi“, atd.). Mezi bakterie mléčného kvašení patří *Leuconostoc mesenteroides* – producent dextranu [1].

Z Gram negativních bakterií mají pouze xanthan a gellan rozšířené legislativní povolení pro přímé využití v potravinách na území Evropy a Severní Ameriky. V Japonsku se používá jako přísada v potravinách curdlan, tento polysacharid však není povolen ani v Severní Americe ani v Evropě [4].

1.5.2 Úloha extracelulárních polymerů při čištění odpadních vod

Odpadní vody pocházející z městských nebo převážně většiny průmyslových zdrojů bývají bohaté na přítomnost organických látek. Proto se zde s výhodou využívá čištění pomocí aktivovaného kalu. Ten bývá přítomen ve vločkách a po odstranění přítomných organických látek sedimentuje. Mikroorganismy, které produkují extracelulární polymery tvoří spolupůsobící konsorcium. Jsou to právě extracelulární polymery složené z převážné části z polysacharidů a bílkovin, které poskytují pojivo pro vznik vloček. Nedostatečná tvorba extracelulárních polymerů způsobuje chabou bioflokulaci, což má velmi nepříznivý vliv na výslednou čistotu vody. Proto se množství polymeru ve vločkách sleduje. K tomuto účelu mohou být například využívány chromatografické techniky [10].

1.5.3 Význam extracelulárních polysacharidů při bioremediacích

Zajímavou biotechnologickou aplikaci nabízejí extracelulární sacharidy při bioremediacích.

Různá průmyslová odvětví, mezi které patří mimo jiné důlní těžba, galvanizace kovů, klenotnictví, vypouštějí odpadní vody kontaminované těžkými kovy. Těžké kovy mají tendenci přetrvávat v okolí a významným způsobem tak zatěžují životní prostředí.

Současný postup pro úpravu takto znečištěných odpadních průmyslových vod je značně složitý a nákladný (může zahrnovat například chemické srážení, extrakci, dialýzu, elektro-

lytickou extrakci, reversní osmózu, odpařování, absorpci a ředění). Proto byl v minulých letech hledán nový mechanismus k odstranění těžkých kovů z vod. Pozornost byla soustředěna využití bakterií coby „biosorbentů“ těžkých kovů. Polysacharidy přítomné v extracelulárních polymerech specifických druhů bakterií mají schopnost vázat kovy do komplexů ve vodném prostředí, ale i mimo něj. Toxické kovy jako jsou kadmium a olovo je vázáno v biopolymeru, což umožní zakoncentrování a následnou separaci těžkých kovů [11].

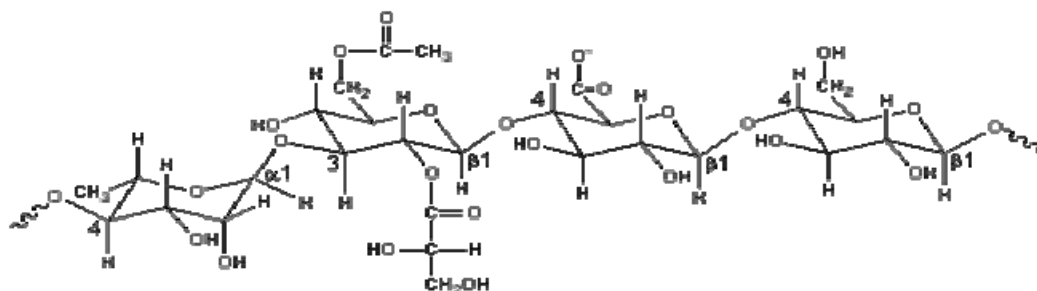
V tomto směru byl výzkum zaměřen na bakterie kmene *Proteobacteria*, konkrétně je to *Pseudomonas putida*. Klíčovou roli pravděpodobně hraje negativní náboj glukuronových kyselin přítomných v EPS tohoto mikroorganismu, ale svůj význam má i zvýšená přítomnost acetylových substituentů a terciární struktura lineárního polymeru. Přesné chemické složení extracelulárních polysacharidů není známo, ale bylo prokázáno, že obsahují glukózu, ribosu a rhamosu [11].

1.5.4 Některé komerčně využívané bakteriální polysacharidy

Xanthan je produkován rostlinným patogenem *Xanthomonas campestris*. Nejvýhodnější zdroj výživy pro syntézu daného polysacharidu je glukosa nebo sacharosa. Při optimálních kultivačních podmínkách dokáže tato bakterie přeměnit cca 70 % uhlíkatého substrátu na polysacharid, výtěžek xanthanu z živného média se pohybuje v rozmezí 30-50 g.l⁻¹. Ačkoliv se nabízí myšlenka, že xanthan může být syntetizován z dalších odpadních látek potravinářského průmyslu, ukázalo se, že jiné typy substrátů nejsou tak výhodné a mohou ovlivnit fyzikální vlastnosti výsledného produktu (především molekulovou hmotnost) [4].

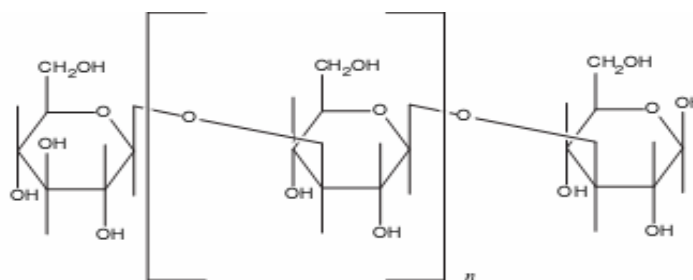
Xanthan je vynikající suspendační a zahušťující činidlo, jež odolává nejen teplotním výkyvům, ale i kyselinám a zásadám. Poměrně dobře vytváří směsi s různými potravinovými doplňky, solemi, minerály a dalšími chemikáliemi. Našel využití v různorodých oblastech v potravinářském průmyslu a bývá přítomen v široké škále potravin, nejčastěji však v salátových dresincích a omáčkách. Zde jsou žádány především jeho pseudoplastické vlastnosti, tzn. že je stabilní a viskózní, ale není tuhý a těžký. Stabilizační účinky jsou využity i v tiskařství, textilním průmyslu (impregnační potisky), farmaceutickém průmyslu, kosmetice, při výrobě plastických trhavin. Nezanedbatelné množství je používáno v ropném průmyslu, jako zahušťovadlo při vrtném výplachu, kdy zahuštěná tekutina unáší pevné částice zpět na povrch. Vedle dlouhodobě využívaného xanthanu, byly vyvinuty jeho modifikace. První z nich se vyznačuje zkrácením postranních řetězců, což vyvolává změny fyzikálních vlastností, především viskozity. Tato varianta není dosud komerčně využívána a je stále předmětem výzkumu. Druhá varianta postrádá acetylové skupiny a tím se zvýšila interakce s galaktomannany a rostlinnými glykomannany. Nové aplikace těchto směsí mají široký potenciál ve farmaceutickém průmyslu [4,9].

Gellan syntetizovaný *Sphingomonas elodea*. V roztocích se nachází ve formě nepravidelně uspořádané šroubovice, při zvýšení teploty jeho konformace přechází na strukturu dvojité šroubovice. Pokud se v prostředí nachází kationty, nastává změna konformace doprovázená sesíťováním struktury a dochází k tvorbě velmi pevného gelu. Tento gel je transparentní, odolává zvýšeným teplotám a kyselinám, a proto je hojně používán v potravinářství a biotechnologiích, jako náhrada tradičně používaného agaru. Komerčně využívaným produktem gelanu je nízkoacylový gelan, který je získáván deacylací nativního gelanu, za alkalických podmínek. Takto upravený gel se vyznačuje zvýšenou pevností a odolností vůči teplotním gradientům [4,13].



Obr. 5. Struktura gelanu syntetizovaného *Sphingomonas elodea* [13].

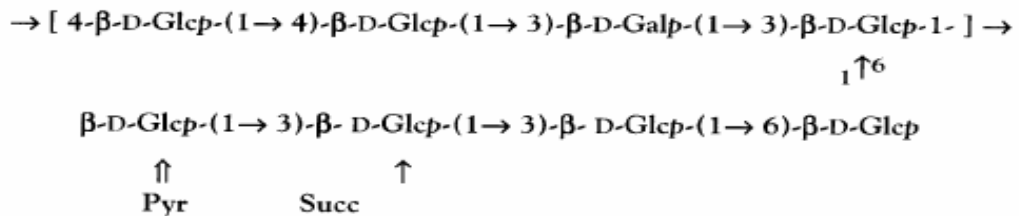
Curdlan syntetizovaný půdní bakterií *Alcaligenes faecalis* var. 10C3K nebo spolu se Sukcinoglykanem bakterií rodu *Agrobacterium radiobacter*. Má lineární strukturu, kterou tvoří (1-3) β -D glykosidické vazby, díky tomu má curdlan pozitivní vliv na stimulaci imunity a možné protirakovinotvorné účinky. Uvedené vlastnosti nabízejí široký potenciál v kosmetice a medicíně. Tento neutrální polysacharid není rozpustný za laboratorní teploty ve vodě, ale pouze v alkalickém prostředí a polárních rozpouštědlech. Využívá se především v potravinářství [4, 14].



Obr. 6. Struktura kurdlanu syntetizovaného *Alcaligenes faecalis* var. 10C3K [15].

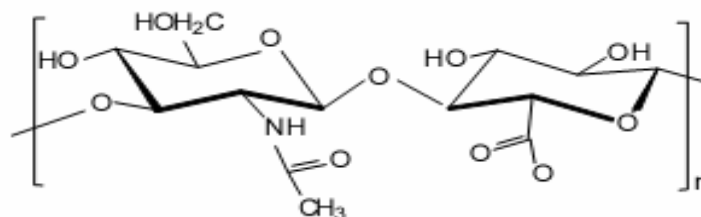
Sukcinoglykan syntetizuje *Agrobacterium tumefaciens* a *Rhizibium meliloti*. Z 80 % je tvořen glukosou, z 10% galaktosou, z 5 % pyrohroznovými kyselinami a z menšího podílu se na jeho stavbě podílí jantarová a octová kyselina. Je ve vodě rozpustný, jeho možné komerční využití je předmětem výzkumu [16].

Oba druhy bakterií *Agrobacterium tumefaciens* i *Rhizobium meliloti* patří mezi půdní bakterie, které vyskytují se v tzv. rhizosféře a žijí v symbióze s kořený rostlin. Sukcinoglykan společně s galaktoglukanem, který je rovněž produkován těmito bakteriemi. EPS hraje hlavní roli především v první fázi kolonizace kořenů rostlin bakteriálními buňkami, které *Rhizobia* využívají ke své adhezi na jejich povrch [16,17,18].



Obr. 7. Struktura succinoglycanu syntetizovaného druhu *Agrobacterium spp.* a *Rhizobium meliloti* [4]

Hyaluronová kyselina je polymer složený z opakujících se disaccharidických jednotek N-acetylglukosaminu a glukuronových kyselin. Přirozeně se nachází u všech obratlovců v kloubním vazivu, chrupavkách, očním sklivci, pupeční šňůře, mezibuněčných prostorách pokožky apod. Současně je syntetizován jako „biofilm“ bakterií *Streptococcus equi*. Hyaluronová kyselina (HA) má specifické fyzikální a biochemické vlastnosti. Při styku s vodnými roztoky dochází mezi vodíkovými vazbami a sousedními karboxylovými a N-acetylovými skupinami k interakci. To znamená, že se nerozpouští, ale zachovává si pevný charakter a zadržuje vodu ve svém objemu. Jeden gram HA dokáže pojmout až šest litrů vody. Díky svým fyzikálním vlastnostem plní funkci plniva, lubrikantu a nárazuvzdorných matric. HA nedráždí pokožku, nevyvolává alergie, ale naopak vykazuje hojivé schopnosti. Proto je často využívána v medicíně, farmacii a kosmetice [19,20].



Obr. 8. Struktura hyaluronové kyseliny syntetizované kulturou *Streptococcus equi* [18].

2 IZOLACE EXTRACELULÁRNÍCH POLYSACHARIDŮ

Obecně lze říci, že souhrn metod používaných pro izolaci a čištění EPS závisí na složení kultivačního média, neboť živné médium je kontaminováno uhlíkatým zdrojem, aminokyselinami, vitamíny, bázemi nukleových kyselin, minerálními solemi a dalšími sloučeninami, které mohou ovlivnit následnou chemickou analýzu [1].

Nejjednodušší postup zahrnuje odcentrifugování bakteriálních buněk, dialýzu kultivačního média použitého pro produkci EPS a následnou lyofylizaci. Tato technika se většinou uplatňuje při izolaci EPS bakterií mléčného kvašení. Pokud se polymer (xanthan) používá jako přísada v potravinářství, bývá někdy tento postup zahájen pasterizací či sterilizací, které nejprve usmrtí bakteriální buňky. Pasterizace se musí provádět za specifických podmínek (80-100 °C; 10-20 min, pH 6.3-6.9), aby nedošlo k degradaci polymeru, ale pouze ke snížení viskozity, která umožní lepší odstranění bakteriálních buněk filtrací či centrifugací [1,9].

Nejčastější postup izolace EPS z tekutého kultivačního média spočívá ve vysrážení přítomných proteinů trichloroctovou kyselinou, následuje centrifugace, kdy se oddělí z média proteiny spolu s bakteriálními buňkami. Poté přidáním ethanolu dojde k vysrážení samotného EPS vlivem snížení polarit prostředí. Tato metodika zahrnuje řadu obměn. Někdy mohou být proteiny odstraněny až po vysrážení polysacharidů, anebo může být ethanol k vysrážení EPS nahrazen acetonem. Nezávisle na odstranění bílkovin z média a vysrážení EPS mohou být využity další metody k přečištění frakcí EPS – dialýza, ultrafiltrace a další. Filtrace přes syntetickou membránu umožní separaci polysacharidových makromolekul od nízkomolekulárních složek přítomných v živném médiu [1].

2.1 Izolace xanthanu

Při izolaci xanthanu závisí především na jeho dalším použití, neboť jeho uplatnění se pohybuje v široké škále odvětví (1.5.4). Xanthan určený pro těžařský průmysl musí být zbaven především mikrobiálních buněk. Nejvyšší nároky na čistotu suroviny klade potravinářský průmysl, xanthan musí být oproštěn od biomasy a všech činidel, které získal v průběhu izolace. Naopak méně přísné požadavky na čistotu jsou kladeny v textilním průmyslu. Po dokončení kultivace živné médium zpravidla 10-30 g.l⁻¹ xanthanu, 1-10 g.l⁻¹ bakteriálních buněk a 3-10 g.l⁻¹ zbytkových nutrientů a dalších metabolitů. Bakteriální buňky se odstraňují jako první (filtrací nebo centrifugací), jejich odstranění komplikuje především vysoká viskozita kultivačního média, která může být snížena zvýšením teploty nebo smícháním kultivačního média s vodou či alkoholem. Další krok spočívá v přidání rozpouštědel (izopropanol, ethanol, aceton), které vysráží polymer a činidel upravujících pH. Množství srážecích činidel se opět odvíjí od úrovně viskozity média. Legislativa vyžaduje, aby xanthan pro potravinářské účely byl vysrážen izopropanolem. Z vysráženého polymeru je mechanicky odstraněna voda a poté je vysušen, rozemlet a balen do nádob, které nepropouští vlhkost. Celý proces musí proběhnout tak, aby nedošlo k znehodnocení polymeru.

Např. zvýšení pH následkem přidání srážecích činidel může odstranit pyruvátové skupiny z xanthanu [9].

2.2 Příklady přesných postupů izolace EPS

2.2.1 Izolace EPS dle S. Velasca a kol. [8]

Pro izolaci EPS s živného média byl použit následující postup: Jako první byly vysráženy proteiny přidáním 1/3 objemu 40 % (v/v) trichloroctové kyseliny a následně došlo k jejich oddělení centrifugací při 23000 g po dobu 20 min při 4°C. K výslednému supernatantu byl přidán stejný objem ledově vychlazeného acetonu. Po protřepání byla směs ponechána přes noc při 4°C. Sraženina EPS byla vytažena na skleněné tyčince a umístěna do ependorfky. Supernatant vzorků byl centrifugován při 23000 g po dobu 20 min. Supernatant byl slit a pevný podíl byl rozpuštěn v 6 ml foťátového pufru za současného protřepávání po dobu 1 h. Tato suspenze byla smíchána s 6 ml ledově vychlazeného acetonu a ponechána 4 h při 4°C. Vysrážený EPS byl odstraněn pomocí skleněné tyčinky, umístěn do ependorfky a vysušen ve vakuové odparce při 65°C po dobu 30 min [8].

2.2.2 Izolace dle Ch. Garniera a kol. [10]

Izolace extracelulárního polysacharidu pro chromatografickou analýzu.

Odpadní voda byla nejprve čtyřikrát zahuštěna: nejprve dekantací, získaný usazený kal byl poté centrifugován při 2000 g po dobu 15 min. Supernatant byl slit, pevný podíl byl rozpuštěn v $5 \cdot 10^{-3}$ M roztoku chloridu sodného a sorbován na katex. Suspenze pevného podílu kalu, pryskyřice a roztoku chloridu sodného byla míchána po dobu 4 hodin při 4°C. Pro oddělení extracelulárních polymerů od vloček byla provedena centrifugace při 12000 g po dobu 30 min. Supernatant, ve kterém byla obsažen extracelulární polymer byl filtrován přes filtr s otvory o průměru 0,22 mm [10].

Extrakce extracelulárního polysacharidu z bakteriálních buněk

Tekuté živné médium s rostoucí bakteriální kulturou bylo centrifugováno při 2000 g po dobu 15 min, čímž bylo dosaženo odstranění čistého živného média. Pevný podíl byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku (pro promytí). Následovala opět centrifugace při 2000 g po dobu 15 min, pevný podíl byl rozpuštěn v $5 \cdot 10^{-3}$ M roztoku chloridu sodného. Extrakce EPS probíhala po dobu 4 hodin 4°C (60 g pryskyřice/100 ml) [10].

2.2.3 Izolace dle Vermani M. V. a kol. [21]

Mikrobiální buňky byly odděleny centrifugací při 12000 g, po dobu 15 min. Extracelulární polymer byl ze vzorku vysrážen přidáním dvojnásobného množství vychlazeného acetonu. Polymer byl z roztoku oddělen filtrací přes předem zvážený filtrační papír. Takto izolovaný vzorek byl vysušen ve vakuu při laboratorní teplotě do konstantní hmotnosti [21].

3 METODY STANOVENÍ EXTRACELULÁRNÍCH POLYSACHARIDŮ

Volba metody a následné výsledky zvolené chemické analýzy jsou silně ovlivněny čistotou extracelulárního polymeru [1].

3.1 Kvantitativní stanovení extracelulárních polysacharidů

3.1.1 Kolorimetrické metody stanovení

Kolorimetrické metody vynikají svou jednoduchostí, nevýhodou je vysoká náročnost na čistotu EPS [1].

Fenol-sulfátová metoda

Pomocí fenol-sulfátové metody se stanovuje množství polysacharidů, oligosacharidů, monosacharidů a jejich methylových derivátů. Princip metody spočívá v hydrolýze glykosidických vazeb koncentrovanou kyselinou sírovou. Přidaný fenol reaguje s monosacharidickými komponenty za vzniku žlutooranžového zbarvení, které je v čase poměrně stálé. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství přítomných sacharidů a stanovuje se spektrofotometricky [1,22,23]

Tato metoda je hojně používaná pro stanovení výtěžku EPS u různých postupů izolace. Avšak výtěžek stanovený fenol-sulfátovou metodou může být ovlivněn přítomností nízkomolekulárních sacharidů, které zde mohou být přítomny v případě nedokonalého přečištění EPS. Proto se tato metoda často zpřesňuje odečtením podílu, který zaujímá redukující cukerná složka, od celkového výtěžku stanoveného touto metodou [1].

Metoda DNSA

Touto metodou lze stanovit celkové množství redukujících cukrů ve vodných vzorcích. Princip je založen na reakci redukujících cukrů s 3,5-dinitrosalicylovou kyselinou (DNSA) v alkalickém prostředí, při teplotě 80°C. Následnou redukcí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny vzniká kyselina glukonová a 3,5 diaminosalicylová kyselina, která je měřena spektrofotometricky [24].

Stanovení polysacharidů kyselého charakteru pomocí alciánové modři

V literatuře bývá označována též jako Ramusova metoda. V extracelulárních polysacharidech bývají často přítomny kyselé funkční skupiny, jejich množství lze stanovit pomocí alciánové modři. Měďnatý kationt ftalokyninového barviva tvoří komplex s karboxylovým aniontem a esterosulfátovou skupinou kyselých polysacharidu. Tento komplex tvoří nerozpustnou sraženinu, která se z roztoku odstraní vhodnou metodou. To znamená, že nejméně koncentrovaný roztok bude mít nejintenzivnější zbarvení, což je přesný opak např. fenol-sulfátové metody [16,23]. Tato metoda není citlivá na čistotu extracelulárních polysacharidů tak jako fenol-sulfátová, protože zde neruší monosacharidy [16].

3.1.2 Chromatografické metody

Ačkoliv jsou chromatografické metody ve srovnání s kolorimetrickými metodami mnohem nákladnější a časově náročnější, jejich nespornou výhodou je nesrovnatelně vyšší přesnost vzhledem k prvně jmenovaným. Chromatografie patří mezi separační metody a umožňuje kvalitativní i kvantitativní stanovení. Vzorek je zde separován mezi pevnou (stacionární) fází a pohyblivou (mobilní) fází, která jej unáší soustavou. Podle různé afinity ke stacionární fázi dochází k opoždování tím také k separaci jednotlivých složek vzorku. Na konci systému se jednotlivé složky identifikují vhodným detektorem. Pro kvantitativní stanovení polysacharidů se nejčastěji využívá gelová permeační chromatografie. Polysacharidy lze registrovat pomocí refraktometrického detektoru. Pokud je sledována i přítomnost proteinů ve vzorku, lze pro jejich stanovení současně použít spektrofotometrický detektor v UV oblasti spektra [1].

3.1.3 Stanovení pomocí IČ spektroskopie

V poledních letech byla vyvinuta metoda, kdy pomocí blízké infračervené spektroskopie lze stanovovat množství extracelulárního polysacharidu a jiných složek přímo v kultivačním médiu. Toho se s výhodou využívá např. při kultivaci bakterií mléčného kvašení, neboť je často potřebné sledovat nejen množství extracelulárního polysacharidu, ale i množství mléčných kyselin a laktózy. Výsledky dosažené touto metodou vykazují nejen vysokou přesnost, ale i analýza je velmi rychlá [1].

Infračervený spektrometr používá místo monochromátoru interferometr a získané údaje zpracuje do podoby infračerveného spektra na základě matematického postupu, který je známý jako Fourierova transformace. Touto metodou získáme prakticky bez úpravy vzorku jeho IČ spektrum, které obsahuje absorpční pásy, jež náleží jednotlivým vazbám, či skupinám atomů. Neznámou sloučeninu je možno identifikovat srovnáním referenčních spekter známých sloučenin, jež byly naměřeny při stejných podmínkách, v oblasti otisků prstů [25]. Pomocí FT-IR lze tedy provádět jak kvalitativní tak kvantitativní analýzu.

3.2 Kvalitativní stanovení extracelulárních polysacharidů

3.2.1 Analýza struktury extracelulárního polysacharidu

Primární struktura EPS molekuly je dána složením monomeru, sekvencí jednotlivých měrů, umístěním glykosidických vazeb a typem a lokací necukerných substituentů. Žádná dostupná technika není sama o sobě schopná charakterizovat složitou strukturu extracelulárních polysacharidů. Proto je tedy v praxi nezbytné kombinovat několik měřících technik současně [1].

Přípravná fáze

Pro určení struktury bakteriálních polysacharidů je nezbytná jejich úprava. Je pro všechny techniky stejná a zahrnuje depolymeraci. Děje se tak pomocí úplné nebo částečné kyselá

hydrolyzy s kyselinou trifluoroctovou, kyselinou chlorovodíkovou nebo kyselinou sírovou při teplotě 100 - 120°C po dobu 2 až 8 hodin [1].

Metody analýzy primární struktury

V minulosti bylo kvalitativní složení monosacharidu analyzováno pomocí tenkovrstvé chromatografie. Tato metoda má však nízkou rozlišovací schopnost a je velkou měrou nahrazována mnohem spolehlivější kapalinovou a plynovou chromatografií [1].

Kvantitativní a kvalitativní stanovení EPS monosacharidů se provádí pomocí vysokorozlišovací kapalinové chromatografie s refraktometrickým detektorem, která umožňuje separaci jednotlivých monosacharidů pomocí aniontově výměnné kolony. Retenční mechanismus je založen na tvorbě slabých komplexů mezi monosacharidy a ionty. Vyšší afinita ukotvených iontů v koloně k některým složkám vzorku způsobí různé retenční časy. Hlavní nevýhoda tohoto systému spočívá v neselektivnosti a nízké citlivosti refraktometrického detektoru. Další technika dostupná pro identifikaci a stanovení množství monosacharidů a oligosacharidů ve vzorku je vysoce účinná chromatografie na aneksu s pulsní amperometrickou detekcí. Tento systém je vybaven kolonou s polymerní maticí, která je charakterizována vysokou chemickou stabilitou a selektivitou (jež je určena použitou mobilní fází). Separace probíhá za vysokého pH se silně zásaditými rozpouštědly. Detekce se provádí sledováním změny elektrického proudu, která nastává vlivem oxidace sacharidů na povrchu zlaté pracovní elektrody umístěné v pulsním amperometrickém detektoru. Tento postup je velmi citlivý a selektivní pro analýzu cukerných složek v jejich přirozeném stavu.

Nejčastěji používanou technologií pro analýzu složení EPS je plynová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií. Jednotlivé složky EPS jsou separovány, určovány po kyselé hydrolyze a silanizaci polárních skupin monosacharidů. Nosný plyn, kolona a teplotní program se volí dle konkrétních stanovovaných polysacharidů. Identifikace a kvantifikace monosacharidů může být uskutečněna plamenovým ionizačním detektorem nebo hmotnostním spektrometrem. Analýza vazebných míst jednotlivých cukerných jednotek se stanovuje metylací EPS, následnou redukční hydrolyzou s tetradeuteroboritanem sodným, výsledné monomery jsou derivatizovány na trimethylsilylované glykosidy. Výsledný produkt může být identifikován plynovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem [1].

Metody analýzy prostorového uspořádání makromolekuly

Jako poslední se určuje prostorová struktura polysacharidové molekuly, která zahrnuje vzájemnou orientaci sousedních monosacharidů a polohu substituentů v prostoru. Pro rozbor konformace molekuly se nejčastěji používá nukleární magnetická rezonance. Tato technika umožňuje objasnit přesný typ a umístění glykosidických vazeb a strukturu jednotlivých jednotek, které tvoří celek molekuly. Před vlastní analýzou pomocí nukleární magnetické rezonance musí být vzorek dokonale zbaven vody lyofilizací [1].

II. METODICKÁ ČÁST

4 ŽIVNÁ MÉDIA, KULTIVACE BAKTERIÍ A IZOLACI EPS

4.1 Živná média a roztoky potřebné k jejich přípravě

Při laboratorních pokusech byly použity chemikálie čistoty p.a. od firem Lachema a.s., Fluka, Supelco, Himedia, Sigma

Roztok stopových prvků

Na přípravu 1000 ml roztoku stopových prvků bylo použito:

MnSO ₄ .5 H ₂ O	0,043 g
H ₃ BO ₃	0,057 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,043 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O.....	0,037 g
Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O.....	0,025 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O.....	0,040 g

Navážená množství látek byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody a směs byla důkladně promíchána.

Fosfátový pufr

Je složen ze zásobního roztoku A, který vznikne rozpuštěním 9,0788 g KH₂PO₄ v 1 l destilované vody a zásobního roztoku B, připraveného rozpuštěním 23,9032 g Na₂HPO₄.12H₂O rovněž v 1 l destilované vody. Pro kultivaci bylo použito minerální médium se 100 ml fosfátového pufru, který vznikne smíšením 20 ml roztoku A, 80 ml roztoku B s 900 ml destilované vody. Dále minerální médium s trojnásobnou koncentrací fosfátového pufru (60 ml roztoku A, 240 ml roztoku B, 700 ml destilované H₂O), sedminásobnou koncentrací fosfátového pufru (140 ml roztoku A, 560 ml roztoku B, 300 ml destilované H₂O) a s desetinásobnou koncentrací fosfátového pufru (200 ml roztoku A, 800 ml roztoku B).

Minerální médium K

Nejprve byly naváženy jednotlivé pevné složky minerálního média, poté napipetován příslušný objem roztoku stopových prvků a odměřen fosfátový pufr a destilovaná voda pomocí odměrného válce. Složení minerálního živného média o objemu 1000 ml:

K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
CaSO ₄	0,1 g
NaCl	0,2 g
NH ₄ Cl	0,3 g
Kvasniční autolyzát.....	3 g

Substrát (manitol nebo sacharosa).....	20 g
Roztok stopových prvků.....	2 ml
Fosfátový pufr.....	100 ml
Destilovaná voda.....	100 ml

Roztok byl v láhvi důkladně promíchán, dán do autoklávu a sterilizován po dobu 20 min při 120°C.

Minerální médium L

Příprava proběhla stejným způsobem jako u předchozího minerálního média. Složení minerálního živného média o objemu 1000 ml:

K ₂ HPO ₄	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,1 g
NaCl	0,2 g
Citrát železitý.....	stopy
CaCO ₃	0,1 g
DL-Lysin.....	1,5 g
Manitol.....	20 g
Roztok stopových prvků.....	2 ml
Fosfátový pufr.....	100 ml
Destilovaná voda.....	100 ml

Roztok byl v láhvi důkladně promíchán, dán do autoklávu a sterilizován po dobu 20 min při 120°C.

TYA agar

Nejprve byly naváženy jednotlivé složky živného média a poté byla přidána destilovaná voda.

TYA agar.....	2,1 g
Substrát (manitol nebo sacharosa).....	20 g
Destilovaná voda.....	100 ml

Všechny komponenty byly dobře promíchány v uzavřené lahvi, dány do autoklávu sterilizovat při 120°C na 20 minut. Po vyjmutí z autoklávu byl obsah láhve promíchán krouživým pohybem, ochlazen cca na 60°C. Agar byl v boxu rozlit do misek a ponechán ztuhnout.

Fysiologický roztok

Fysiologický roztok byl připraven rozpuštěním 8,5 g NaCl v 1 l destilované vody.

4.2 Kultivace bakterií

Kultura FR 5 byla z ependorfy uchované v mrazícím boxu při teplotě 80°C aseptickým způsobem přeočkována na misku s TYA agarem pomocí kličky a kultivována po dobu tří dnů. Před zahájením každého testu byla kultura přeočkována pomocí kličky na misku s TYA agarem obohaceným o stejný typ substrátu, který byl použit u následujícího kultivačního testu.

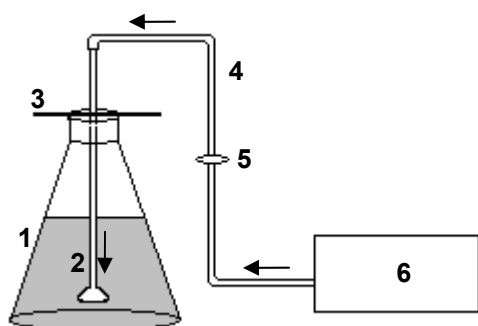
Kultivace u přípravných testů (Kultivační testy I-IV)

Tekuté minerální médium bylo připraveno a vysterilizováno. Dle rozpisu a postupu (4.1.) byla připravena suspenze kultury ve sterilním fyziologickém roztoku, která odpovídala hustotě 2. stupně McFarlandovy stupnice (t.j. 0,2 ml roztoku BaCl₂ smíchano s 9,8 ml roztoku H₂SO₄) Minerální médium bylo zchlazeno na laboratorní teplotu, zaočkováno 200 µl suspenze kultury (Kultivační test III a IV), dáno na třepačku a kultivováno při 25 °C.

Kultivace u Testů I-IV

Tekuté minerální médium bylo připraveno dle rozpisu (4.1.) do erlenmayerovy nádoby, která byla uzavřena hliníkovou fólií a sterilizována v autoklávu společně s fritou (upravenou dle Obr. 9 a obalenou hliníkovou fólií), po dobu 20 minut při 120 °C. Po ochlazení obsahu nádoby na laboratorní teplotu bylo odebráno 13 ml sterilní čistého živného média pipetou a minerální médium bylo zaočkováno 1 ml bakteriální suspenze připravené stejným způsobem jako u přípravných testů. Dále byly jednotlivé komponenty aparatury (1-5) sestaveny dle (Obr. 9) v laminárním boxu za aseptických podmínek. Hrdlo láhve bylo společně se skleněnou tyčinkou obaleno hliníkovou fólií. Na konec skleněné frity byla upevněna silikonová hadička, která byla přes sterilní filtr (MILLEX GP, Ø 22µm) připojena k membránovému čerpadlu a kultivace probíhala po dobu 14 dnů při 25°C.

← Směr proudění vzduchu



- 1.) Erlenmayerova nádoba o objemu 1500 ml
- 2.) Skleněná frita
- 3.) Skleněná tyčinka připevněná k fritě pomocí silikonové gumičky
- 4.) Silikonová hadička s vnitřním průměrem 5 mm
- 5.) Sterilní filtr s póry o průměru 22 µm
- 6.) Membránové čerpadlo

Obr. 9. Schéma aparatury použité pro kultivaci u Testů I-IV

Ve stanovených dnech bylo odebráno 13 ml kultivačního média pomocí jednorázové sterilní pipety. Vzorek byl centrifugován při 12500 g po dobu 15 minut, poté byl slit superna-

tant s obsahem EPS a stanovena jeho dynamická viskozita na viskozimetru třikrát vedle sebe dle níže popsaného postupu (5.2.3). Po ukončení měření byl vzorek obsahující EPS slit do zkumavky a zamražen. Sedimentované bakteriální buňky byly „rozsuspendovány“ v 5 ml fyziologického roztoku a centrifugovány při 12500 g po dobu 15 minut. Supernatant byl odstraněn a bakteriální buňky byly rozsuspendovány v 5 ml fyziologického roztoku a zamrazeny do následné analýzy. Zpravidla po 14 dnech byla kultivace ukončena a EPS z živného média byl vyizolován.

4.3 Postup při přečištění a izolaci EPS

Zde jsou uvedeny kroky, které následují po kultivaci bakterií. Postup při následné analýze izolovaného extracelulárního polysacharidu je uveden v kapitole (5.4.).

4.3.1 Přečištění EPS u Testů I-III

Po rozmražení vzorku je ze zkumavky odebráno 5 ml supernatantu obsahujícího EPS napipetováno do zkumavky o objemu 20 ml, pomocí odměrného válce bylo ke vzorku přidáno 10 ml ledově vychlazeného acetonu. Zkumavky byly ručně protřepány a ponechány ve stojanu 60 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byla sraženina odstraněna filtrací na vývěvě. Části sraženého polymeru, které ulpěly na stěnách zkumavky byly odstraněny skleněnou tyčinkou. Celá zkumavka byla propláchnuta malým množstvím acetonu. Filtrační papír s přítomným polymerem byl vysušen v digestoři, ponořen do 5 ml destilované vody ve zkumavce. Zkumavky byly umístěny na třepačku v poloze, kdy svíraly s podložkou úhel 45°. Extracelulární polymer byl rozpouštěn po dobu 25 hodin, při 25°C. Na třepačce bylo nastaveno 350 otáček a režim 15 minut protřepávání a 15 minut pauza. Tímto způsobem byl rozpuštěn extracelulární polysacharid v destilované vodě. Zkumavky obsahující tento roztok byly až do následné analýzy (5.4.) uchovávány v ledničce při 4°C.

4.3.2 Izolace EPS

Zpravidla po 14 dnech byla kultivace ukončena. Samotná izolace se skládala z několika vzájemně navazujících kroků:

Separace bakteriálních buněk. Směs živného média, bakteriálních buněk a polymeru byla rozlita do kyvet po cca. 35 ml. Kyvety byly vyváženy tak, že mezi dvojicemi byl rozdíl hmotnosti menší než 0,05 g a centrifugovány po dobu 30 minut při 16 000 g. Poté byl supernatant slit do kádinky.

Srážení a separace proteinů z extracelulárního polymeru. K supernatantu byla přidána trichloroctová kyselina v množství odpovídající 3,5 g kyseliny na 100 ml supernatantu a Chelaton 3 v množství odpovídajícímu 0,05 g na 100 ml supernatantu. Vysrážené proteiny byly odstraněny při stejných podmínkách jako separované buňky. Kyvety naplněny cca. 35 ml směsí, vyváženy a centrifugovány po dobu 30 minut při 16 000 g.

Srážení a separace extracelulárního polysacharidu - pomocí acetonu: K množství supernatantu vyššímu než 100 ml, jehož viskozita byla vyšší než 50 mPa.s byl pomocí od-

měrného válce přidán trojnásobný objem ledově vychlazeného acetonu. (K vysrážení EPS ze supernatantu s nižšími parametry postačí dvojnásobný objem acetonu.) Obsah kádinky byl promíchán skleněnou tyčinkou, uzavřen pomocí tří vrstev polyethylenové fólie a ponechán při 4°C v lednici pře noc. Postupem času se vysrážený polymer rozseparoval na dvě frakce, se kterými bylo dále pracováno odděleně. Následující den byly větší části pevného podílu polysacharidu vytaženy na skleněné tyčince a kapalný podíl obsahující malé částčky polymeru byl zfiltrován na vývěvě, přes filtrační papír (modrá páska), který prošel varem. Vysrážený EPS byl vysušen v digestoři přes noc na petriho misce.

- **pomocí ethanolu:** K množství supernatantu vyššímu než 100 ml, jehož viskozita převyšuje 50 mPa.s byl pomocí odměrného válce přidán pětinasobný objem ledově vychlazeného ethanolu. (U nižšího objemu supernatantu či nižší viskozity byl odměřen čtyřnasobný objem.) Obsah kádinky byl promíchán skleněnou tyčinkou, uzavřen pomocí tří vrstev polyethylenové fólie a ponechán při 4°C v ledničce přes noc. Následující den byla směs přemístěna do kyvet po cca. 30 ml. Kyvety byly vyváženy tak, že mezi dvojicemi byl rozdíl hmotnosti menší než 0,05 g a centrifugovány po dobu 35 minut při 20 000 g. Vysrážený EPS byl vysušen v digestoři přes noc na petriho misce.

Přečištění a vysušení EPS. Polymer vysušený v digestoři byl rozpuštěn v minimálním množství destilované vody, jejíž objem odpovídal množství polymeru (např. cca. 1 g EPS lze rozpustit v 50 ml destilované vody). Rozpouštění probíhalo po dobu 5 hodin ve vodní lázni s teplotou vody cca. 45°C, za občasného promíchání skleněnou tyčinkou. EPS byl přesrážen stejným činidlem a stejným způsobem jako v předchozím kroku, tzn. trojnásobným objemem acetonu nebo pětinasobným objemem ethanolu. Následující procedury shodné s výše popsány u jednotlivých rozpouštědel.

Po odpaření rozpouštědla a přebytečné vlhkosti v digestoři (pokud možno přes noc) byl polymer sušen na předem zvážené petriho misce v exsikátoru nad oxidem fosforečným do konstantní hmotnosti. Následuje analýza izolovaného polysacharidu (5.4.).

4.4 Popis používaných mikrobiálních kultur

Kultura FR 5

V experimentální části diplomové práce bylo pracováno pouze s kulturou označena jako FR 5, která byla izolována v rámci studentské vědecké činnosti Bc. Evou Barošovou [26]. Jde o gram negativní půdní bakterií – *Agrobacterium tumefaciens*, která patří mezi Rhizobia a způsobuje nádorové onemocnění u rostlin [18].

5 ANALYTICKÁ STANOVENÍ A PŘÍPRAVA CHEMIKÁLIÍ

5.1 Analytické stanovení bílkovin

Princip metody je založen na redukci Cu^{2+} kationtu v silně alkalickém prostředí a v přítomnosti bílkovin. Vzniklý Cu^+ tvoří fialově zbarvený komplex s dodanou bicincholinovou kyselinou (BCA). Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství bílkovin, které jsou obsaženy v roztoku. Citlivost metody je oproti jiným standardním metodám asi o jeden řád vyšší [27].

Příprava pracovního činidla a standardu

Roztok A: Navážka 8 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 1,6 g vinanu sodného byla rozpuštěna ve 100 ml destilované vody.

Roztok B: 0,4 g bicinchoninové kyseliny bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody.

Roztok C: 0,4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody.

Pracovní činidlo se připraví smícháním 1 dílu roztoku **C** s 25 díly roztoku **B**, nakonec se ke směsi přidá 26 dílů roztoku **A**.

Standard bílkoviny: 1 mg lyofilizovaného Albuminu byl rozpuštěn v 10 ml destilované vody.

Pracovní činidlo, roztok B i standard bílkoviny byly připravovány čerstvé před každým stanovením.

Postup při stanovení bílkovin

Kalibrační křivka byla získána zpracováním kalibračních roztoků standardu bílkoviny v rozmezí koncentrace 1– 120 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Zásobní roztok standardu bílkoviny o koncentraci 120 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ byl pipetován třikrát vedle sebe do mikrotitrační destičky o objemu dle (Tab. 1). Doplněním destilované vody na 100 μl byla dosažena sada kalibračních koncentrací, ze kterých byla sestavena kalibrační křivka (Obr. 11).

Tab. 1. Objem pipetovaného standardu bílkoviny do mikrotitrační destičky

Standard [ml]	0	1	10	20	40	60	70	80	100
Voda [ml]	0	99	90	80	60	40	30	20	0
c [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	0	1,2	12	24	48	72	84	96	120

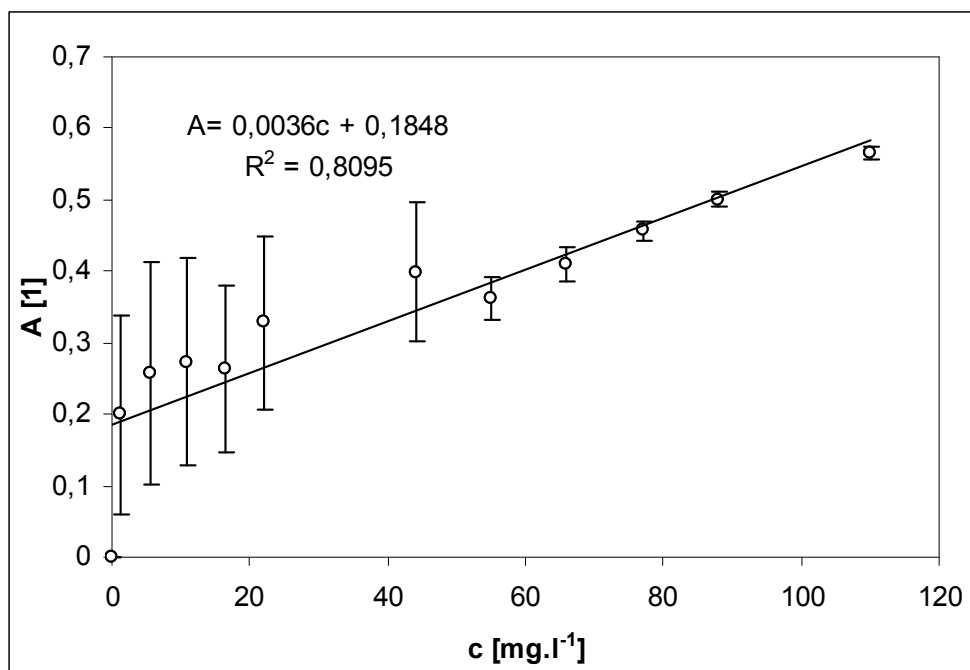
Při stanovení bílkovin pomocí bicincholinové kyseliny na mikrotitrační destičce se nejprve změří absorbance prázdné destičky na spektrofotometru Tecan při vlnové délce 562 nm. Do jamek byl dávkován vzorek vždy třikrát. Ke vzorku o objemu 100 μl bylo přidáno 100 μl pracovního činidla. Obsah destičky byl promíchán na třepačce po dobu 3 minut při 320 otáčkách. Poté byla destička vložena do polyetylenové krabičky s víkem o rozměrech 15x20x5 cm a inkubována 60 minut při 65°C v inkubátoru. Po uplynutí doby se ponechá

mikrotitrační destička chladnout 10 minut při laboratorní teplotě a pak je měřena absorbance při vlnové délce 562 nm (Obr.10).

Tab. 2. Absorbance v závislosti na koncentraci bílkoviny [28] - příprava

c [mg.l ⁻¹]	A ₁ [1]	A ₂ [1]	A ₃ [1]	A ₀ [1]	\bar{x}	σ
0	0	0	0	0	0	0
1,1	0,001	0,156	0,191	0,200	0,217	0,270
5,5	0,029	0,278	0,310	0,258	0,233	0,241
11	0,029	0,278	0,310	0,273	0,193	0,292
16,5	0,029	0,278	0,310	0,264	0,217	0,233
22	0,029	0,278	0,310	0,328	0,270	0,241
44	0,029	0,278	0,310	0,399	0,325	0,194
55	0,029	0,278	0,310	0,362	0,371	0,059
66	0,029	0,278	0,310	0,410	0,429	0,048
77	0,029	0,278	0,310	0,456	0,464	0,024
88	0,029	0,278	0,310	0,501	0,503	0,020
110	0,029	0,278	0,310	0,566	0,560	0,020

c, koncentrace bílkoviny [mg.l⁻¹]; A₁₋₃, absorbance naměřená na mikrotitrační destičce; A₀, průměr ze tří naměřených absorbancí A₁₋₃; \bar{x} , medián; σ , směrodatná odchylka tří nezávislých hodnot koncentrací stanovených z naměřených absorbancí A₁₋₃.



Obr. 10. Kalibrační závislost standardu bílkoviny-příprava.

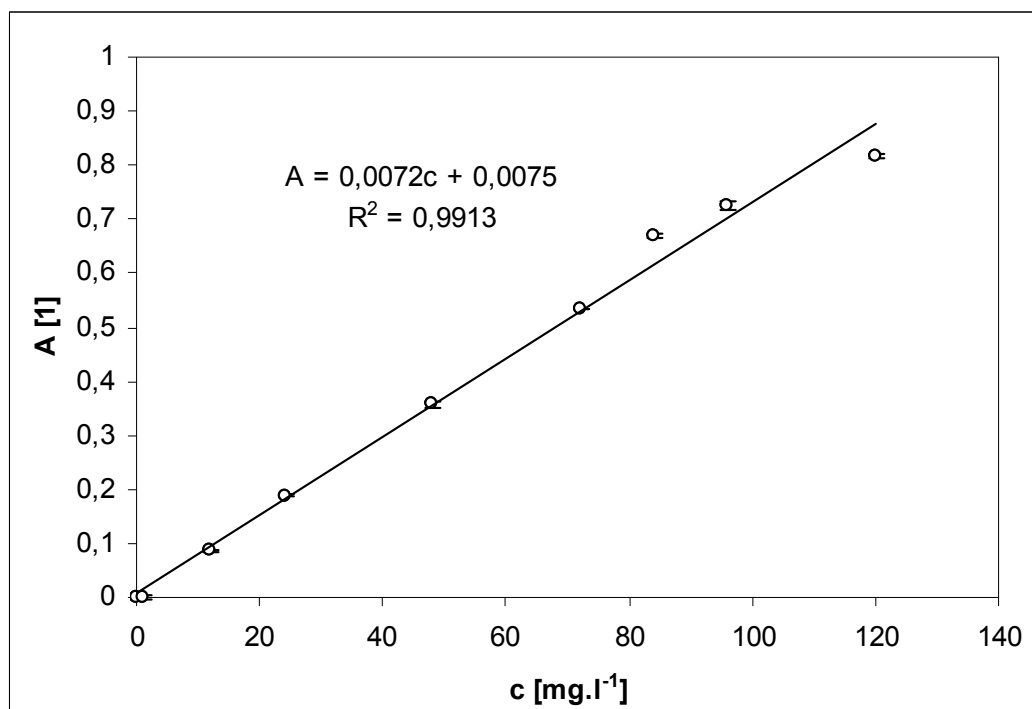
Chybové úsečky odpovídají hodnotě $\pm \sigma$, každý bod je průměrem tří měření.

Tato metoda nebyla v předchozích diplomových pracích použita. Vzhledem k získané kalibrační závislosti (Obr.10) bylo třeba postup upravit. Zejména u nižších koncentrací byl

výrazný rozdíl v naměřenou absorbanci mezi paralelními stanoveními (Tab.2). S největší pravděpodobností nebyly dodrženy na všech místech destičky stejné podmínky při 60 minutové kultivaci, pozorovali jsme, že z krajních jamek je vyšší odpar. Proto byl výše uvedený postup upraven a to tak, že do krajních řad jamek bylo napipetováno 220 μl destilované vody po celém obvodu mikrotitrační destičky. Zároveň byl dán navlhčený hadřík vedle mikrotitrační destičky do plastové krabičky po celou dobu inkubace. Metoda je velmi citlivá na čistotu mikrotitrační destičky. Kalibrační hodnoty jsou zaznamenány v tabulce (Tab.3).

Tab. 3. Absorbance v závislosti na koncentraci bílkoviny – modifikovaný postup

c [mg.l ⁻¹]	A ₁ [1]	A ₂ [1]	A ₃ [1]	A _o [1]	\bar{x}	σ
0	0	0	0	0	0	0
1	0,007	-0,009	0,005	0,001	0,005	0,009
12	0,092	0,085	0,084	0,087	0,085	0,004
24	0,192	0,186	0,188	0,189	0,188	0,003
48	0,346	0,361	0,366	0,358	0,361	0,010
72	0,758	0,535	0,532	0,534	0,534	0,002
84	0,662	0,671	0,673	0,669	0,671	0,006
96	0,738	0,708	0,734	0,727	0,734	0,016
120	0,817	0,810	0,827	0,818	0,817	0,009



Obr. 11. Kalibrační závislost standardu bílkoviny- modifikovaný postup. Chybové úsečky odpovídají hodnotě $\pm \sigma$, každý bod je průměrem tří měření.

Výpočet koncentrace bílkoviny

Výsledné zbarvení se poměrně rychle mění v závislosti na čase, proto je nutné provádět kalibraci při každém měření.

Na každé mikrotitrační destičce byla provedena čtyřbodová kalibrace (Tab. 4.). Koncentrace vzorku se vypočítá dosazením příslušné absorbance do rovnice kalibrační přímky.

Tab. 4. Objem pipetovaného standardu bílkoviny při získání kalibrační rovnice.

Standard [ml]	0	20	80	100
Voda [ml]	0	80	20	0
c [mg.l⁻¹]	0	24	96	120

5.2 Analytické stanovení extracelulárních polysacharidů

5.2.1 Fenol-sulfátová metoda

Princip metody byl popsán v literární rešerši (3.1.1).

Příprava zásobních roztoků a standardu

Zásobní roztok 5 % fenolu: 5 g fenolu bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody odměřené pomocí odměrného válce. Zásobní roztok byl uchováván v lednici.

Zásobní roztok xanthanu: 20,5 mg xanthanu bylo rozpuštěno zahříváním ve vodní lázni při 60 °C a doplněno v odměrné baňce na 100 ml.

Postup při stanovení celkového množství sacharidů fenol-sulfátovou metodou

Nejdříve se změří absorbance prázdné mikrotitrační destičky s víkem na spektrofotometru Tecan při vlnové délce 490 nm.

Kalibrační křivka byla získána zpracováním kalibračních roztoků xanthanu v rozmezí koncentrace 21 – 205 mg.l⁻¹. Zásobní roztok xanthanu o koncentraci 205 mg.l⁻¹ byl pipetován třikrát vedle sebe do mikrotitrační destičky o objemu dle (Tab. 5). Doplněním destilované vody na 30 μ l byla dosažena sada kalibračních koncentrací.

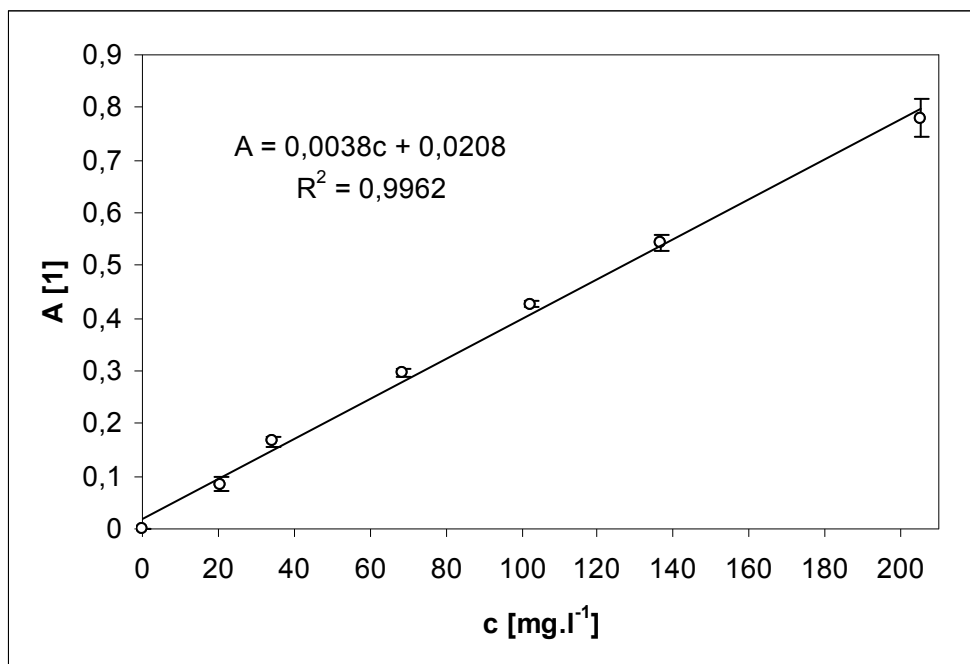
Tab. 5. Objem pipetovaného standardu xanthanu do mikrotitrační destičky – FS metoda

V_{st} [ml]	0	3	5	10	15	20	30
V_v [ml]	30	27	25	20	15	10	0
c [mg.l⁻¹]	0	21	34	68	103	137	205

Do vzorku o objemu 30 μl se napipetuje 30 μl 5% fenolu. Co nejrychleji se přidá 150 μl koncentrované kyseliny sírové. Obsah jamky se ihned důkladně promíchá a to takovým způsobem, že se celý objem jamky nasaje zpět do dávkovače a opět se vytlačí ven (pro manipulaci byl vyšleněn jeden dávkovač, který bylo možno po práci rozebrat a dokonale vymýt od případné kontaminace agresivním roztokem). Tento postup se opakuje pětkrát za sebou. Každý vzorek byl dávkován třikrát vedle sebe. Mikrotitrační destička se ponechá přikrytá víkem po dobu 60 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby se měří absorbance na spektrofotometru Tecan při vlnové délce 490 nm. Kalibrační křivka byla získána zpracováním kalibračních roztoků xanthanu v rozsahu koncentrací 20 – 205 mg.l^{-1} [22]. Získané hodnoty kalibrační závislosti jsou uvedeny v tabulce (Tab.6). Podle těchto hodnot byla sestrojena kalibrační přímka (Obr.12).

Tab. 6. Absorbance v závislosti na koncentraci xanthanu-kalibrace FS metody

c [mg.l^{-1}]	A ₁ [1]	A ₂ [1]	A ₃ [1]	A _o [1]	\bar{x}	σ
0	0	0	0	0	0	0
21	0,077	0,113	0,064	0,085	0,077	0,025
34	0,164	0,186	0,147	0,166	0,164	0,020
68	0,280	0,306	0,303	0,296	0,303	0,014
103	0,436	0,412	0,430	0,426	0,430	0,012
137	0,519	0,567	0,543	0,543	0,543	0,034
205	0,712	0,853	0,776	0,780	0,776	0,071



Obr. 12. Kalibrační závislost pro výpočet celkového množství sacharidů. Chybové úsečky odpovídají hodnotě $\pm \sigma$, každý bod je průměrem tří měření.

Výpočet koncentrace celkového množství polysacharidů

Výsledná koncentrace je vypočtena z rovnice kalibrační křivky.

$$A = 0,0038 c + 0,0208$$

Rovnice 1

5.2.2 Stanovení polysacharidů kyselého charakteru pomocí alciánové modři

Princip metody byl popsán v literární rešerši (3.1.1).

Příprava zásobních roztoků a standardu

Zásobní roztok 7 % kyseliny octové: 17,5 ml 100% kyseliny octové bylo pomocí odměrného válce přelito do odměrné baňky a doplněno na 250 ml destilovanou vodou. Zásobní roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

Zásobní roztok alciánové modři: 0,015 g barviva bylo naváženo do odměrné baňky a doplněno na 100 ml 7 % kyselinou octovou. Do roztoku byl míchán na magnetické míchačce po dobu 1 minuty, zahříván na cca. 45 °C po dobu 5 minut a míchán 2 hodiny na magnetické míchačce bez dalšího zahřívání. Poté byl zásobní roztok filtrován přes filtrační papír [16].

Zásobní roztok xanthanu: 20,5 mg xanthanu bylo rozpuštěno zahříváním ve vodní lázni při 60 °C a doplněno v odměrné baňce na 100 ml.

Postup při stanovení množství polysacharidu kyselého charakteru

Kalibrační křivka byla získána zpracováním kalibračních roztoků xanthanu v rozmezí koncentrace 10 – 205 mg.l⁻¹. Zásobní roztok xanthanu o koncentraci 205 mg.l⁻¹ byl pipetován třikrát vedle sebe do předem připravených ependorfeček o objemu dle (Tab. 7). Doplněním destilované vody na 200 µl byla dosažena sada kalibračních koncentrací [16].

Tab. 7. Objem pipetovaného standardu xanthanu do mikrotitrační destičky – R metoda.

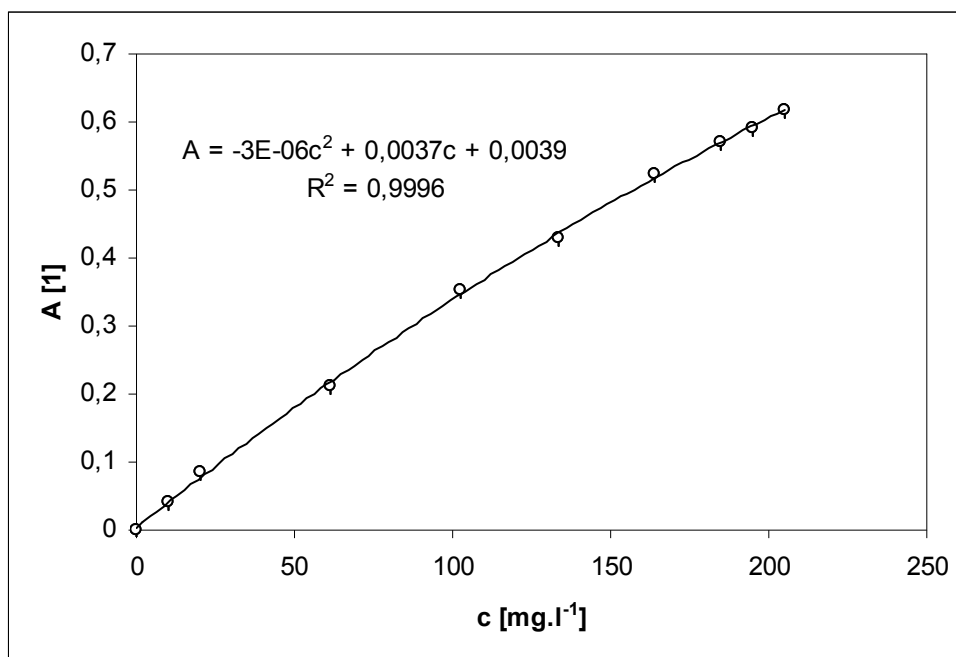
Standard [ml]	0	10	20	60	100	130	160	180	190	200
Voda [ml]	200	190	180	140	100	70	40	20	10	0
c [mg.l⁻¹]	0	10	21	62	103	133	164	185	195	205

Do ependorfeček se napipetuje 200 µl testované látky, 400 µl 7% kyseliny octové a nakonec se přidá 400 µl roztoku barviva. Ependorfečky se uzavřou, ručně promíchají a ponechají 30 minut při laboratorní teplotě. Poté jsou centrifugovány při 12500 g po dobu 5 minut. Změří se absorbance prázdné mikrotitrační destičky na spektrofotometru Tecan při vlnové délce 600 nm. Po opatrném vyjmutí ependorfeček z centrifugy je dávkována směs o objemu 200 µl vždy třikrát vedle sebe. Při odebrání stanoveného objemu z ependorfy je třeba dbát zvýšené pozornosti, aby nebyla se vzorkem natažena sraženina. Po uplynutí doby se měří

absorbance (Tab.8) na spektrofotometru Tecan [16]. Byla získána kalibrační závislost (Obr.13).

Tab. 8. Absorbance v závislosti na koncentraci xanthanu – kalibrace R metody

c [mg.l ⁻¹]	A ₁ [1]	A ₂ [1]	A ₃ [1]	A ₀ [1]	\bar{x}	σ
0	0	0	0	0	0	0
10	0,026	0,037	0,064	0,042	0,037	0,020
21	0,078	0,079	0,097	0,085	0,079	0,011
62	0,21	0,202	0,223	0,212	0,21	0,011
103	0,335	0,357	0,368	0,353	0,357	0,017
133	0,425	0,422	0,438	0,428	0,425	0,009
164	0,512	0,524	0,531	0,522	0,524	0,010
185	0,565	0,568	0,577	0,570	0,568	0,006
195	0,589	0,589	0,599	0,592	0,589	0,006
205	0,615	0,611	0,628	0,618	0,615	0,009



Obr. 13. Kalibrační závislost pro výpočet polysacharidů kyselého charakteru
Chybové úsečky odpovídají hodnotě $\pm \sigma$, každý bod je průměrem tří měření

Výpočet koncentrace polysacharidu kyselého charakteru

Specifikum metody vyplývající z jejího principu je, že u roztoku s nejvyšší koncentrací byla naměřena nejnižší absorbance. Proto bylo počítáno s absolutní hodnotou absorbance po odečtení roztoku s nulovou koncentrací polysacharidu (A_0).

$$|A| = A_{\varphi} - A_0 \quad \text{Rovnice 2}$$

Výsledná koncentrace je vypočtena z rovnice kalibrační křivky (Obr.13).

$$|A| = -3 \cdot 10^{-6} c^2 + 0,0037 c + 0,0039 \quad \text{Rovnice 3}$$

5.2.3 Stanovení dynamické viskozity

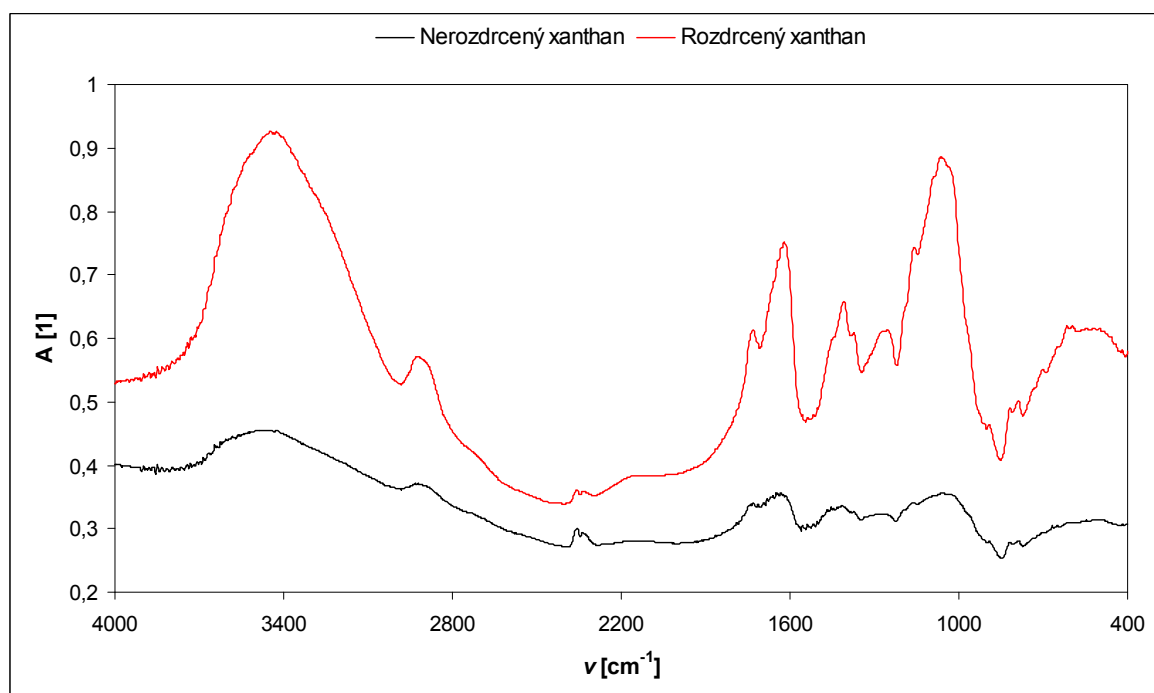
Viskozita je měřena na viskozimetru při teplotě 25 °C, s tolerancí ± 0,2 °C, která byla zajišťována pomocí termostatu. Hodnota dynamické viskozity byla odečtena přímo displeje přístroje.

5.3 Kvalitativní analýza extracelulárních polysacharidů

5.3.1 FT-IR spektroskopie

Vzorek látky je nutné nejprve rozetřít na skleněné třecí misce. Poté se ke 2 mg vzorku ve formě jemného prášku přidá 200 mg bromidu draselného. Obě složky se rozetrou a dobře promíchají na achátové třecí misce. Směs se přemístí do duté formy s nasazeným dnem. Do otvoru se vloží píst a poté je tableta vylisována působením tlaku cca. 6,5 MPa po dobu několika vteřin. Infračervené spektrum bylo měřeno proti vzduchu na přístroji Matson 3000, v rozsahu 400 – 4000 cm^{-1} .

Měřená látka musí být rozetřena na jemný prášek. Na obrázku je srovnání výsledného IČ spektra xanthanu. V prvním případě nebyl vzorek před smícháním s bromidem draselným rozetřen, ve druhém případě byl vzorek xanthanu upraven dle výše uvedeného postupu (Obr.14).



Obr. 14. Srovnání IČ spekter xanthanu v přirozené formě a po úpravě na třetí misce

5.3.2 GC/MS analýza

Vysoušení

Před samotnou hydrolyzou se vzorek se suší pod vakuem (2,5 kPa) dosažené pomocí membránové vývěvy v olejové lázni při 50°C po dobu 24 hodin. Ohřev byl proveden kontaktním způsobem pomocí elektromagnetické míchačky a regulován kontaktním teploměrem.

Hydrolyza

Množství vysušeného vzorku odpovídající 100-500 µg se naváží do polyetylenových kryo-zkumavek. Přidá se 0,5 ml 3M methanolické kyseliny chlorovodíkové, obsah uzavřené zkumavky se krouživým pohybem promíchá a umístí do sušárny. Hydrolyza probíhá při 80°C po dobu 16 hodin, za občasného promíchání obsahu zkumavky [29].

Silanizace

Po vyjmutí ze sušárny se zkumavka zchladí na 40°C v olejové lázni. Pak následuje stripování, kdy se do zkumavky vhání argon tak dlouho, až se odstraní veškeré rozpouštědlo. Do zkumavky se napipetuje 0,3 ml N,O-BIS-Trimethyltrisilu, zkumavka se naplní argonem, uzavře, promíchá a přemístí do sušárny. (Po otevření láhve se silanizačním činidlem je nezbytné nepřetržitě dovnitř vhnět argon.) Silanizace probíhá 20 minut při 80°C. Opět následuje ochlazení na 40°C v olejové lázni a vystripování přebytečného činidla pomocí argonu. Na závěr je přidáno 0,5 ml hexanu, obsah zkumavky se promíchá a přefiltruje přes skelnou vatu [29].

Modifikace postupu

Po vyhodnocení chromatogramu, bylo zjištěno, že píky charakterizující jednotlivé monosacharidy mají stejnou odezvu na detektoru jako píky pocházející z chemikálií nutných k přípravě vzorku a případných nečistot použitých chemikálií (tzv. pozadí). Pro zvýšení intenzity pík pocházejících ze vzorku byla zvýšena stonásobně navážka vzorku. Porovnáním látkového množství glukosy a methanolické kyseliny chlorovodíkové jsme zvýšili objem kyseliny na 1 ml z původních 0,5 ml. (V literatuře je použita 0,5 M Me/HCl, my jsme měli k dispozici 3 N Me/HCl, po přepočtu na látkové množství byl zachován přebytek kyseliny o tři řády.) Dle literatury by jsme měli rovněž zvýšit objem trisilu z 0,3 ml na 30 ml, což v reálných podmínkách není optimální. Proto byl třikrát za sebou pipetován 1 ml činidla, obsah zkumavky byl silanizován v sušárně (20 minut; 80°C), ochlazen na 40°C v olejové lázni a přebytečné činidlo se vystripovalo pomocí argonu. Po třetím vystripování se byl pipetován do zkumavky 1 ml hexanu.

GC/MS analýza

Připravený vzorek byl analyzován pomocí GC-MS Shimadzu QP2010 na Ústavu chemie Mgr. Robertem Víchou PhD. za následujících podmínek:

Teplota injektoru: 250°C

Kolona: Supelco SLB-5 MS 30 m x 0,25 mm. **Teplotní podmínky v koloně:** 80°C 3 min⁻¹; 20°C min⁻¹; 140 °C 0 min⁻¹; 5 °C min⁻¹; 250°C 17 min⁻¹, **Teplota interface:** 250°C **Iontový zdroj:** 200°C; 70 eV (ionizace EI)

5.3.3 Gelová chromatografie

Příprava vzorků

Postup 1: Množství vzorku odpovídající 0,5 mg bylo rozpouštěno v 1 ml mobilní fáze (roztok 0,1 M NaNO₃; 0,02 % NaN₃) po dobu 4 hodin, při laboratorní teplotě, za občasného ručního protřepávání. Rozpuštěný vzorek byl přefiltrován přes filtr Chromafil PET-45/15 MS 0,45 µm.

Postup 2: Množství vzorku odpovídající 0,5 mg bylo rozpouštěno v 1 ml mobilní fáze (roztok 0,1 M NaNO₃; 0,02 % NaN₃) po dobu 18 hodin, při laboratorní teplotě. Rozpuštěný vzorek byl přefiltrován přes filtr Chromafil PET-45/15 MS 0,45 µm. Vzorek byl příliš viskózní, proto byl jeho alikvotní podíl zředěn 1:1 mobilní fází.

Analýza

Připravený vzorek byl analyzován pomocí gelové chromatografie na Ústavu inženýrství a chemie potravin Ing. Věrou Kašpárkovou PhD. za následujících podmínek:

Přístroj: PLGPC-50 s refraktometrický detektorem; **Kolona:** lineární TSK gelová kolona (GMPW_XL); **Mobilní fáze:** roztok 0,1 M NaNO₃; 0,02 % NaN₃; **Objem nástřiku:** 100 µl; **Rychlost toku mobilní fáze:** 0,8 ml.min⁻¹; **Kalibrační standardy:** Pullulan standards, Polymer Laboratories Ltd., (molární hmotnost 180-788000 Da)

5.4 Postup při analýze izolovaného vzorku

Při analýze jsou využity postupy u výše popsanych metod v kapitolách(5.1.; 5.2.; 5.3.)

Analýza u Testů I-IV

Navazuje na kroky uvedené v závěru kapitoly (4.2), u Testů I-III na kapitolu o přečištění polysacharidu (4.3.1). Test IV nebylo třeba čistit, jednotlivé zkumavky byly pouze rozmrazeny ponecháním ve vlažné vodě po dobu 15 minut.

Analýza celkového množství sacharidů a množství polysacharidu kyselého charakteru byla v jednotlivých vzorcích provedena dle postupů uvedených v kapitole (5.2.1; 5.2.2.), koncentrace polysacharidů byla vypočtena z naměřené absorpance po odečtení pozadí dle rovnice (Rovnice 1; Rovnice 3).

Bílkoviny obsažené v bakteriální biomase byly analyzovány dle postupu uvedeného v kapitole (5.1). Na každé mikrotitrační destičce byla provedena čtyřbodová kalibrace (Tab. 4), ze získané rovnice kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace jednotlivých vzorků. Jelikož bylo odebráno 13 ml živného média a zcentrifugované buňky se rozsuspendovaly

v 5 ml fyziologického bylo provedena přepočtení na použité ředění vynásobením získané koncentrace konstantou $\frac{5}{13}$.

Výsledné křivky stanovené podle popsaného postupu jsou uvedeny v kapitole (7.).

Analýza izolovaného polysacharidu

Izolovaný a vysušený EPS (4.3.2.) byl zvážen s přesností na čtyři desetinné místa, odečtením hmotnosti prázdné misky získáme hmotnost izolovaného polysacharidu (m_i). Výtěžek extracelulárního polymeru (c_{PS}) z 1 litru živného média byl vypočten dosazením do vzorce.

$$c_{PS} = \frac{m_i}{V_{\text{ŽM}}} \quad \text{Rovnice 4}$$

c_{PS} , koncentrace extracelulárního polymeru v g na 1 litr živného média [g.l^{-1}]; m_i , hmotnost izolovaného polysacharidu [g]; $V_{\text{ŽM}}$, objem živného média s přítomným extracelulárním polymerem [l];

Vysušený EPS byl rozdrcen na skleněné třecí misce na prášek, poté byl 1 mg rozetřeného vzorku (m_{EPS}) rozpuštěn v 1 ml destilované vody, za občasných důkladných ručních protřepávání během dne. (Tento způsob se zdá být vhodnější, než míchání na Vortexu, protože případné větší částičky polymeru ulpívají na stěně ependorfské.) Ependorfská byla nechána v lednici přes noc a před analýzou znovu důkladně ručně protřepána. byly stanoveny dle výše uvedených metodik (5.1;5.2). Množství bílkovin, celkové množství sacharidů a množství polysacharidů kyselého charakteru bylo vypočítáno ze získaných koncentrací podle (Rovnice 5).

$$m_{B,CS,KP} = c_{B,CS,KP} \cdot \frac{1}{m_{\text{EPS}}} \cdot \frac{1}{V} \quad [\text{g}] \quad \text{Rovnice 5}$$

$m_{B,CS,KP}$, hmotnost bílkoviny (popř. celkových sacharidů, kyselých polysacharidů) v navážce polymeru; $c_{B,CS,KP}$, koncentrace bílkoviny (popř. celkových sacharidů, kyselých polysacharidů) získaná dle postupů uvedených v kapitolách (5.1;5.2); m_{EPS} , navážka polymeru [g]; V , objem destilované vody [l].

Procentuelní podíl jednotlivých komponent v navážce polymeru (m_{EPS}) byl vypočítán dle (Rovnice 6).

$$B,CS,KP = \frac{m_{B,CS,KP}}{m_{\text{EPS}}} \cdot 100 \quad [\%] \quad \text{Rovnice 6}$$

Izolovaný polymer byl dále podroben analýze na infračervené spektroskopii (5.3.1.), plynové chromatografii s hmotnostní spektroskopií (5.3.2.) a gelové chromatografii (5.3.3.).

Veškeré naměřené a vypočtené parametry jsou uvedeny v kapitole (8.).

Měření průtoku vzduchu u aparatury (Obr. 9)

Erlenmayerova láhev byla uzavřena pryžovou zátkou s dvěma otvory. Jedním otvorem procházela skleněná frit, druhým silikonová hadička vedoucí k bublinkovému průtokoměru (diferenčnímu kapilárního plynoměru). Všechny otvory v zátce byly utěsněny parafílem tak, aby nedocházelo k průniku vzduchu. Poté bylo zapnuto membránové čerpadlo, kterým byl do erlenmayerovy láhve vháněn vzduch přes fritu, nahromaděný přebytečný plyn unikal z prostředí přes průtokoměr, kde byl zaznamenán jeho průtok. U Testu II byl nastaven průtok $0,13 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$, který byl změřen pomocí bublinkového průtokoměru. Průtok vzduchu u Testu I $1,35 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$, resp. Testu III $0,57 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ byl změřen pomocí diferenčního kapilárního plynoměru. Oba průtokoměry mají omezenou škálu měření.

5.5 Přístrojové vybavení

Viskozimetr SV10.....	AD company, Japonsko
Ultratermostat U2C.....	Medingen
Chlazená centrifuga MR23i.....	Jouan, Francie
Elektromagnetická míchačka MM 2A.....	Laboratorní přístroje, ČR
Analytické váhy KERN 770.....	SRN
Předvážky KERN 440-47.....	SRN
Předvážky KERN EW.....	SRN
Chladnička s mrazákem.....	Ardo, ČR
Třepačka Titramax 100.....	Heidolph
Třepačka LT2.....	ČR
Třepačka 3018 GFL.....	SRN
Elektrická sušárna.....	MORA, ČR
Membránové čerpadlo.....	MP1 Chemoproject
Laboratorní autokláv.....	Sanoclav, St-MCS-203, SRN
Spektrofotometr TECAN, pro mikrotitrační destičky.....	Sunrise, USA
Aseptický laminární box.....	Telstar, Španělsko
Inkubační box na $60 \text{ }^\circ\text{C}$	Memmert
Termobox na $25 \text{ }^\circ\text{C}$	ÚIOŽP, FT

5.6 Ostatní laboratorní pomůcky

Standardní 96-jamková mikrodestička.....	Gama, Česká Republika
Sterilní filtr pro jedno použití – $0,22 \text{ } \mu\text{m}$	Sartorius, Německo
Mikrodávkoč ($2\text{-}20 \text{ } \mu\text{l}$, $1\text{-}5 \text{ ml}$, $20\text{-}200 \text{ } \mu\text{l}$, $100\text{-}1000 \text{ } \mu\text{l}$).....	Biohit, Finsko
Mikrodávkoč ($10 \text{ } \mu\text{l}$, $20 \text{ } \mu\text{l}$, $50 \text{ } \mu\text{l}$, $200 \text{ } \mu\text{l}$).....	Plastomed, Polsko
Běžné laboratorní sklo a vybavení	

III. VÝSLEDKY A DISKUSE

6 PŘÍPRAVNÉ TESTY

6.1 Optimalizace kultivačních podmínek

Cílem provedených testů bylo zjištění příhodných kultivačních podmínek pro maximální produkci extracelulárních polysacharidů dané kultury. Tvorba polysacharidu byla sledována pomocí vzrůstající viskozity.

6.1.1 Vliv různých druhů sacharidického substrátu a množství O₂ na produkci polysacharidu

Podle poznatků získaných z různých pramenů odborné literatury jsme zjistili, že stěžejní parametry ovlivňující tvorbu EPS je substrát přítomný v živném médiu a konkrétně u *Agrobacterium sp.* je významná přítomnost kyslíku [1]. Mění se podmínky kultivace u Kultivačních testů I-IV byly vždy připraveny a sledovány v jedné láhvi.

Kultivační test I

Živné médium bylo připraveno do 8 láhví o objemu 500 ml. Ve 4 láhvích bylo živného média obohaceno o sacharosu a ve zbylých 4 láhvích o manitol. U každého typu substrátu byly vždy 2 lahve naplněny živným médiem a objemu 50 ml a ve druhých 2 byl objem živného média 100 ml. Polovina láhví (každé s jinými podmínkami) byla umístěna na třepačku, kde byl pohyb ve dvou směrech při vyšších otáčkách, druhá polovina láhví byla umístěna na třepačku, která konala kruhový pohyb, při nižších otáčkách. Přesné údaje jsou v kapitolách (4.1. a 4.2.). Aby mohla být sledována produkce EPS, měřili jsme dynamickou viskozitu 2. a 4. den kultivace (5.2.3). Režim obou třepaček byl 15 min pohyb, 15 min pauza. Kultivační testy I a II byly zaočkovány pomocí kličky.

Tab. 9. Vliv různých kultivačních podmínek na viskozitu – Kultivační test I

Kultivační podmínky	Viskozita [mPa.s]							
	rychlá třepačka				pomalá třepačka			
Substrát	Sacharosa		Manitol		Sacharosa		Manitol	
Objem živného média[ml]	50	100	50	100	50	100	50	100
Doba kultivace – 2 dny	14,2	4,86	24,5	7,04	6,09	2,79	6,36	3,29
Doba kultivace – 4 dny	20,7	5,34	30,1	7,15	20,2	3,69	18	4,22

Z naměřených výsledků (Tab. 9.) vyplývá, že *Agrobacterium* vytváří více EPS pokud je použit jako substrát manitol. EPS je současně produkován rychleji při intenzivnějším protřepávání tekutého živného média, které usnadňuje pronikání O₂ do média. Po 4 dnech je viskozita u rychlé a pomalé třepačky vyrovnaná u sacharosu, u manitolu je však poloviční. Ze všeho největší vliv na tvorbu EPS má různý objem živného média a s tím související

množství kyslíku v 500 ml láhvi. Výsledky získané v Kultivačním testu I, byly doplněny Kultivačním testem II.

Kultivační test II

Účelem bylo určit vhodný způsob kultivace, která zajistí dostatečné množství EPS pro další analýzy. Neboť z 50 ml živného média nelze odebrat dost vzorků, aby bylo možno sledovat průběh růstové křivky a stoupající produkci EPS. Aby bylo možno zvýšit objem živného média a současně dosáhnout dostatečného množství kyslíku, provedli jsme kultivaci v láhvi o objemu 1000 ml s obsahem 150 ml živného média se sacharosou. Doba kultivace byla prodloužena a proto se upravil i režim třepání na „rychlé“ třepače (15 min pohyb, 45 min pauza). Výsledky jsou uvedeny v (Tab. 10).

Tab. 10. Sledování viskozity v závislosti na čase – Kultivační test II

Doba kultivace [d]	2	3	7	9	11
Doba kultivace [h]	45	67	165	216	265
η_1 [mPa.s]	3,52	9,43	10,5	10,4	9,84
η_2 [mPa.s]	3,50	9,45	10,5	10,4	9,85
η_3 [mPa.s]	3,50	9,45	10,4	10,3	9,85
η [mPa.s]	3,50	9,45	10,5	10,4	9,85
\tilde{x}	3,52	9,45	10,5	10,4	9,85
σ	0,02	0,02	0,06	0,058	0,021

η_{1-3} , jednotlivá měření viskozity; η , dynamická viskozita, u které byla odečtena viskozita živného média (0,95), \tilde{x} , medián tří paralelních hodnot η_{1-3} ; σ , směrodatná odchylka tří paralelních hodnot η_{1-3} ;

V průběhu testu nedošlo k očekávanému nárůstu viskozity (Tab. 10). Objem živného média se ukázal natolik velký, že nedocházelo k jeho dostatečnému promíchávání a tím byla omezena možnost prostupu kyslíku do živného média.

Současně s tímto pokusem bylo 500 ml živného média se sacharosou v 1000 ml láhvi provzdušňováno membránovým čerpadlem. Viskozita byla měřena pouze jednou a to po **11 dnech** kultivace. Její hodnota se rovná **45,9 mPa.s**. Tento postup se ukázal jako slibný a následující Testy I-IV byly provedeny na jeho principu. Přesné provedení je upřesněno v kapitole (4.2.).

6.1.2 Vliv množství kvasničného autolysátu na produkci polysacharidu – Kultivační test III

Zjistili jsme, že množství kvasničného autolysátu 3 g.l⁻¹ obsažené v Minerálním médiu K (4.1.) ruší následné chemické analýzy, kterými stanovujeme polysacharidy a bílkoviny. Proto byl podniknut následující Kultivační test III.

Současně byla zjištěna nedostatečná pufrací schopnost použitého fosfátového tlumivého roztoku v živném médiu u paralelně probíhající diplomové práce. Vlivem tohoto nedostat-

ku docházelo postupem času ke snižování pH, což negativně ovlivňovalo tvorbu EPS. Proto jsme láhve č. 2 zachovali naprosto stejné podmínky jako u láhve č. 1, pouze byla zvýšena síla fosfátového pufru na desetinásobek (4.1.). V dalších lahvích se mění pouze koncentrace kvasničního autolysátu (KA) oproti první láhvi.

Kultivace byla ukončena po 4 dnech (92 h). Vliv kvasničního autolysátu (KA) a fosfátového pufru na produkci EPS byl sledován pomocí naměřené viskozity (5.2.3.).

Parametry kultivace byly zvoleny s ohledem na výsledky v Kultivačním testu I. Objem Minerálního média K s manitolem (4.1.) v 500 ml infuzních láhvích odpovídal 50 ml. Režim rychlé třepačky: 15 min pohyb, 15 min pauza. Výsledky jsou uvedeny v (Tab. 11).

Tab. 11. Dynamická viskozita v závislosti na různé koncentraci KA – Kultivační test III

Číslo vzorku	1	2	3	4	5	6
Fosfátový pufr [%]	1x	10x	1x	1x	1x	1x
Koncentrace KA [g.l ⁻¹]	3	3	0,3	0,2	0,1	0,05
η_1 [mPa.s]	18,1	26,7	12,7	10,7	7,8	12,4
η_2 [mPa.s]	18,0	26,7	12,6	10,6	7,8	12,4
η_3 [mPa.s]	18,0	26,7	12,7	10,8	7,8	12,4
η [mPa.s]	18,0	26,7	12,7	10,7	7,8	12,4
\bar{x}	18	26,7	12,7	10,7	7,8	12,4
σ	0,06	0	0,06	0,10	0	0

Čtvrtý den kultivace je patrný negativní vliv nižšího množství kvasničního autolysátu oproti standardnímu složení živného média u prvního vzorku (Tab. 11). Přičemž není rozhodující, zda je množství sníženo o jeden nebo dva řády. Získané výsledky odpovídají poznatkům z odborné literatury, kde byl prokázán významný vliv kvasničního autolysátu na produkci EPS [30]. Přesto ale došlo ve všech vzorcích k množení buněk a produkci polysacharidu, což se projevilo nárůstem viskozity. O jednu třetinu vyšší viskozitu vedle standardu vykázal druhý vzorek, kde byl zvýšen fosfátový pufr na desetinásobek.

6.1.3 Vliv fosfátového pufru na EPS - Kultivační test IV

V Kultivačním testu III byla potvrzena nedostatečná tlumivá schopnost používaného pufru, proto jsme v Kultivačním testu IV chtěli zjistit, při jaké síle fosfátového tlumivého roztoku budou bakterie produkovat nejvyšší množství EPS. Současně jsme zde poprvé vyzkoušeli Minerální médium L obohacené o manitol (4.1.), které neruší spektrofotometrické analýzy.

Parametry kultivace byly shodné s Kultivačním testem III. S tím rozdílem, že bylo použito Minerální médium L a sledovaným parametrem byla měnící se síla fosfátového tlumivého roztoku. Výsledky kultivačního testu IV jsou shrnuty v (Tab. 12).

Tab. 12. Sledování viskozity v závislosti na různé síle pufru

Číslo vzorku	1	2	3	4
Fosfátový pufr [%]	1x	3x	7x	10x
η_1 [mPa.s]	17,6	28,6	24,2	21,5
η_2 [mPa.s]	17,6	28,6	24,2	21,5
η_3 [mPa.s]	17,6	28,6	24,2	21,4
η [mPa.s]	17,6	28,6	24,2	21,5
\bar{x}	17,6	28,6	24,2	21,5
σ	0,00	0,00	0,00	0,06

Naměřené hodnoty potvrzují zjištěné závěry, neboť u používaného pufru byla naměřena nejnižší viskozita. Naopak viskozita dosáhla nejvyšších hodnot u trojnásobné koncentrace pufru, u sedminásobného a desetinásobného objemu pufru pak klesá. Což může být způsobeno příliš vysokou koncentrací solí v živném médiu. Závěry vyvozené z tohoto testu byly využity při přípravě Minerálního média L (4.1.) pro Test IV (7.1.4.).

6.2 Volba vhodného činidla k vysrážení polysacharidů

Cílem testu bylo vyzkoušet různou srážecí schopnost dostupných rozpouštědel u extracelulárních polysacharidů, které jsou běžně používány např. při izolaci xanthanu [9].

Pozorování bylo provedeno ve zkumavkách, kdy ze živného média byly odstraněny bakteriální buňky a k 1ml živného média, které obsahovalo EPM byl přidáván po částech adekvátní objem rozpouštědla. Viskozita roztoku činila 20,2 mPa.s.

Tab. 13. Vzhled roztoku ve zkumavce po přidavku různých činidel

Vol.	Aceton	Isopropanol	Ethanol
1x	sytě bílá gelovitá sraženina, zaujímá polovinu objemu zkumavky	téměř čirá gelová sraženina, zaujímá skoro celý objem roztoku	řídký gel s velkým množstvím bublinek v celém objemu
2x	zmenšení objemu sraženiny, která padá na dno zkumavky	zbělení sraženiny, jsou jasně patrné okraje	průhledná gelová sraženina v celém objemu zkumavky
3x	bez patrné změny	zhutnění sraženiny	lehké zbělení gelovité sraženiny
4x	-	bez patrné změny	lehce mléčně zakalená sraženina, zaujímá převážnou část roztoku

Podle (Tab. 13) se zdá být nejlepším srážedlem pro EPS aceton. Již po přidání dvojnásobného objemu došlo k oddělení sraženiny od roztoku a podstatnému zmenšení jejího objemu. O něco horší výsledky vykazuje isopropanol, kdy po přidavku trojnásobného množství srážedla dochází ke zmenšení objemu a zhutnění sraženiny, tak že ji lze vytáhnout na skle-

něné tyčince. U Ethanolu nedošlo ani po čtyřnásobném přidavku tohoto srážedla k podstatnému zmenšení objemu sraženiny, ta také jeví menší pevnost než u předchozích činidel.

Při prvních pokusech o izolaci EPS z Kultivačních testů I-III, byla snaha používat ethanol navzdory zjištěným údajům, neboť jde o relativně levnou chemikálii, která neznamena zvýšenou zátěž pro životní prostředí. Při větším objemu živného média jsme však byli nuceni zvolit aceton, protože vysrážet polymer čtyřnásobným objemem ethanolu např. ze 400 ml živného média se ukázalo být značně nepraktické. Zároveň jsme postupem času zjistili, že se zvyšujícím se množstvím EPS se srážecí schopnost činidla snižuje. Aceton je mnohem účinnější než ethanol, protože k dosažení kompaktní sraženiny stačí dvojnásobný objem, přesto i zde se projevilo zhoršení srážecí schopnosti u vyššího množství EPS. Proto u roztoků s vyšším objemem než 100 ml obsahujícího EPS o viskozitě cca. 60 mPa.s bylo použito trojnásobného přebytku činidla. Stejný postup byl zvolen u přesrážení EPS, kdy byl cca 1 g EPS rozpuštěn v 50 ml destilované vody.

6.3 Podmínky centrifugace při separaci bakteriálních buněk

Zvolit optimální podmínky centrifugace tak, aby došlo k oddělení bakteriálních buněk bez sedimentace polymeru, je velmi obtížné. Viskozita, která komplikuje tento krok, se pohybuje během Testů v širokém rozmezí (1- 63 mPa.s). V průběhu přípravných testů jsme zkoušeli různé varianty dle odborné literatury. Zde se však liší jednotlivé postupy izolace většinou právě v tomto bodu. V rámci Kultivačních testů jsme provedli několik zkoušek a vizuálním hodnocením množství sedimentovaných buněk byly zvoleny podmínky centrifugace 16000 g po dobu 20 min.

Centrifugace živného média o viskozitě 29 mPa.s

U Testů I-IV byl centrifugován menší objem živného média (13 ml), a proto byly tyto podmínky změněny na 15 000 g; 20 min. Poté jsme v průběhu Testu I odebrali 4 vzorky z živného média o viskozitě **29 mPa.s** (tato hodnota by měla odpovídat středu škály, ve kterém se pohybuje viskozita během kultivace), centrifugovali při různých podmínkách, separované buňky jsme rozsuspendovali v 5 ml fyziologickém roztoku a znovu centrifugovali při 10 000 g po dobu 20 min. Poté jsme analyzovali přítomné množství buněčné bílkoviny pomocí bicincholinové kyseliny (BCA).

Z výsledků v (Tab. 14) vyplývá, že koncentrace buněčné bílkoviny se liší v závislosti na změně parametrů centrifugace jen nepatrně, kromě nejčastěji uváděných podmínek v literatuře (5000 g; 10 min). Na základě těchto výsledků jsme změnil u Testů (II-IV) režim centrifugace na 12500 g po dobu 15 minut. U režimu 16000 g po dobu 30 minut při viskozitě živného média 29 mPa.s dochází k částečné sedimentaci polymeru, a proto jsou pro centrifugaci kultivačního média s nižší viskozitou nevhodné. Naopak jsou využívány

při centrifugaci živného média s viskozitou cca 60 mPa.s a objemem 30 ml média v kyvetě. Zjistili jsme, že při takto naplněných kyvetách sedimentuje polymer při 16000 g až po 45 minutách.

Tab. 14. Koncentrace buněčné bílkoviny u různých podmínek centrifugace ($\eta = 29$ mPa.s)

Přetížení [g]	5000	10000	12500	16000
t [min]	10	20	15	30
A ₁ [1]	0,154	0,316	0,325	0,306
A ₂ [1]	0,168	0,336	0,326	0,314
A ₃ [1]	0,145	0,302	0,319	0,341
A ₀ [1]	0,156	0,318	0,323	0,320
ředění	20	20	20	20
c [mg.l ⁻¹]	238	492	501	497
\bar{x}	207	489	446	431
σ	16	27	6	26

Centrifugace živného média o viskozitě 56 mPa.s

Během vyhodnocování růstových křivek u Testů I a III jsme si povšimli, že koncentrace buněčné bílkoviny v posledních dnech kultivace, je nízká. Chtěli jsme tedy zda, jaký vliv by na tuto skutečnost mohly mít podmínky centrifugace. Proto bylo u Testu IV odebráno čtyřikrát 13 ml kultivačního média, to bylo centrifugováno podle parametrů uvedených v (Tab. 15), supernatant byl slit, sedimentované buňky se rozsuspendovaly ve 20 ml fyziologického roztoku a byly centrifugovány při 10000 g po dobu 10 minut (tento postup se opakoval 2x) s tím, že při poslední centrifugaci byly buňky rozsuspendovány v 5 ml fyziologického roztoku. Poté byla provedena analýza BCA metodou. Výsledky jsou uvedeny v (Tab. 15).

Tab. 15. Koncentrace buněčné bílkoviny u různých parametrů centrifugace ($\eta = 60$ mPa.s)

Přetížení [g]	5000	12500	12500	16000
t [min]	10	15	20	30
A ₁ [1]	0,111	0,329	0,342	0,520
A ₂ [1]	0,095	0,302	0,305	0,493
A ₃ [1]	0,104	0,325	0,324	0,516
A ₀ [1]	0,103	0,319	0,324	0,510
ředění	13	13	13	13
c [mg.l ⁻¹]	78	283	294	420
\bar{x}	86	279	278	426
σ	7	13	16	30

Ze závěrů uvedených v (Tab. 15) vyplývá, že koncentrace buněčné bílkoviny, při podmínkách centrifugace, které byly použity u Testů II-IV (druhý sloupec) je o čtvrtinu nižší, než koncentrace buněčné bílkoviny při podmínkách, které jsou uvedeny ve čtvrtém sloupci. Z toho vyplývá, že pravděpodobně u všech Testů, kde se blížila viskozita hodnotě 60

mPa.s nedošlo k sedimentaci všech bakteriálních buněk. Tento problém jsme zjistili až v závěru experimentální části, proto jsme již neměli možnost optimalizovat podmínky centrifugace a současně to nebylo cílem naší práce, přestože tyto výsledky pravděpodobně výrazně ovlivňují naměřené hodnoty především u Růstových křivek vynesných ze stanovení buněčných proteinů. Bylo by žádoucí, aby bylo na těchto parametrech dále pracováno.

6.4 Rušící vlivy při analytickém stanovení

Provedli jsme stanovení některých polysacharidů a látek, které jsou součástí živného média a mohly by zkreslovat výsledky analýz polysacharidů.

Metoda pro stanovení bílkovin pomocí bicincholinové kyseliny testována tímto způsobem nebyla, protože buněčná bílkovina se stanovuje v promytých buňkách, kde by tedy nemělo docházet k ovlivňování analýzy složkami přítomnými v živném médiu. V průběhu experimentální práce jsme chtěli rozšířit tuto analýzu i na stanovení bílkovinné části extracelulárního polymeru v průběhu kultivace u Testů I-IV. Tehdy jsme zjistili, že tuto analýzu ruší kvasniční autolysát natolik, že i po přečištění polysacharidu (4.3.1.) je třeba vzorek třicetkrát zředit, aby se vešel do kalibrace, proto jsme od tohoto úmyslu upustili a podíl bílkovin stanovili pouze u izolovaného a přesráženého extracelulárního polymeru.

6.4.1 Fenol-sulfátová metoda

Pomocí fenol-sulfátové metody (5.2.1.) se stanovuje množství všech sacharidických složek. Byla tedy připravena sada vzorků různých chemických individuí, mezi které patřily polysacharidy (xanthan, gellan, dextran). Dva typy substrátu, kterými jsme chtěli obohatit minerální médium (sacharosa, manitol). Dále kvasničný autolysát přítomný v Minerálním médiu K (4.1.), který obsahuje sacharidické komponenty. Všechny chemikálie byly připraveny dle postupu uvedeném v kapitole (5.2.1.) o stejné koncentraci, abychom mohli porovnat výslednou absorbanci jednotlivých chemikálií.

Tab. 16. Srovnání absorbance u různých chemikálií o shodné koncentraci – FS metoda

vzorek	c [mg.l ⁻¹]	A ₁ [1]	A ₂ [1]	A ₃ [1]	A ₀ [1]	\bar{x}	σ
xanthan	205	0,712	0,853	0,776	0,780	0,776	0,071
gellan	205	0,731	0,788	0,771	0,763	0,771	0,0293
dextran	205	0,962	0,865	0,954	0,927	0,954	0,0538
sacharosa	205	0,805	0,727	0,850	0,794	0,805	0,062
manitol	205	0,001	0	0	0	0	0
kvasniční autolysát	205	0,385	0,367	0,368	0,373	0,368	0,010

Nejvyšší absorbanci při stejné koncentraci vykazuje dextran (Tab.16). Sacharosa má přibližně stejně vysokou absorbanci jako xanthan a gellan. Je tedy jasné, že by výrazně rušila

stanovení polysacharidů. Kvasniční autolysát má sice poloviční odezvu ve srovnání s předchozími, ale i on bude mít negativní vliv na stanovení. Manitol je alkohol a nedává žádnou odezvu, neboť tato metoda reaguje jen na sacharidy (a pravděpodobně vyžaduje, aby látka byla ve své cyklické formě) [22]. Jako substrát, je tedy manitol výhodnější než sacharosa.

6.4.2 Polysacharidy kyselého charakteru stanovené pomocí alciánové modři

Stejným způsobem, jako v předchozí kapitole (6.4.1.) jsme sledovali u stejných chemikálií absorbanci, stanovenou metodou pomocí alciánové modři (R metoda), jejíž přesný postup je popsán v kapitole (5.2.2.).

Tab. 17. Srovnání absorbance u různých chemikálií o shodné koncentraci – R metoda

Vzorek	c [mg.l ⁻¹]	A ₁ [1]	A ₂ [1]	A ₃ [1]	A ₆ [1]	\bar{x}	σ
Xanthan	205	0,615	0,611	0,628	0,618	0,615	0,009
Gellan	205	0,229	0,222	0,219	0,223	0,222	0,005
Dextran	205	0,022	0,023	0,026	0,023	0,023	0,002
Sacharosa	205	0,025	0,018	0,015	0,019	0,018	0,005
Manitol	205	0,044	0,032	0,044	0,040	0,044	0,007
Kvasniční autolysát	205	0,049	0,043	0,050	0,049	0,008	0,049

Absorbance sacharosy, manitolu a kvasničního autolysátu má řádově nižší absorbanci než jakou vykazuje xanthan (Tab.17). Můžeme tedy říct, že tyto látky nebudou významně narušovat stanovení polysacharidů. Ve struktuře gellanu jsou přítomné kyselé funkční skupiny, a proto u něj byla změřeny vyšší absorbance, ve srovnání s xanthanem jde o hodnoty o dvě třetiny nižší.

7 KŘIVKY RŮSTU BUNĚK A PRODUKCE EPS

Cílem testů bylo sledovat růst buněk a tvorbu extracelulárního polymeru v závislosti na čase. Sledovali jsme množství EPS pomocí nárůstu viskozity živného média, analýzou celkového množství EPS a podíl polysacharidu kyselého charakteru. Nárůst buněk byl stanoven pomocí analýzy jejich bílkovinné části. Z přípravné fáze (6.1) jsme získali optimální kultivační podmínky, které zde byly uplatněny.

Zjistili jsme, že nejvyšší produkce EPS nastává při provzdušňování živného média pomocí peristaltického čerpadla, proto byla sestavena aparatura, pomocí které se vhání vzduch přes fritu přímo do kultivačního média (Obr. 9.). Byly použity 2 typy živného média – Minerální médium K (Test I-III) a Minerální médium L (Test IV) (4.1.), obě s manitolem. Všechny testy byly provedeny stejným způsobem, který je podrobně popsán v kapitole (4.2). Měnily se pouze dva parametry a to průtok vzduchu a složení živného média.

Všechny čtyři testy byly provedeny z technických důvodů pouze v jedné láhvi a nebyly opakovány, protože u všech níže popsaných Testů došlo k množení mikroorganismů a produkci extracelulárního polymeru.

V grafech, kde je znázorněna jedna nebo dvě křivky jsou uvedeny chybové úsečky, které vyjadřují směrodatnou odchylku ze tří paralelních stanovení. V grafech, které obsahují více než 2 křivky nejsou tyto chybové úsečky uvedeny, protože by výrazným způsobem snižovaly přehlednost jednotlivých grafů.

7.1.1 Test I

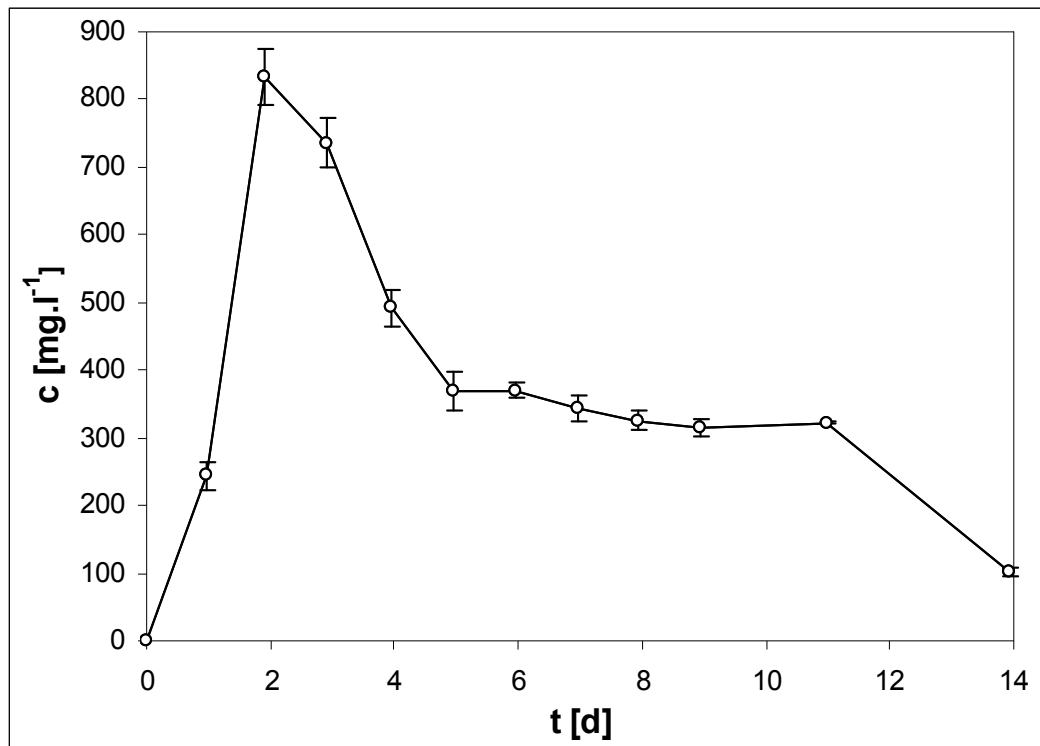
U prvního testu byly použity „základní kultivační podmínky“ (4.2), které by podle poznatků z Kultivačních testů měly vést k maximální produkci EPS v našich podmínkách. Průtok vzduchu vháněného přes fritu do živného média $1,35 \text{ dm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ byl dán kapacitou čerpadla.

Koncentrace buněčné bílkoviny v jednotlivých kultivačních dnech Testu I

Byla analyzována koncentrace buněčné bílkoviny pomocí bicincholinové kyseliny (5.1.), z průměru tří zaznamenaných absorbancí byla vypočtena koncentrace buněčné bílkoviny ve stanovených dnech kultivace. Analýza byla provedena u bakteriálních buněk, které byly separovány z odebraného živného média ve stanovených kultivačních dnech, promyty a uchovávány do následné analýzy při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ (4.2). Bakteriální buňky byly centrifugovány při 10000 g po dobu 20 minut (tyto podmínky se vyskytují pouze u Testu I).

Tab. 18. Koncentrace buněčné bílkoviny v kultivačních dnech - Test I

t [h]	t [d]	A ₂ [1]	A ₂ [1]	A ₂ [1]	A ₀ [1]	ředění	c [mg/l]	\bar{x}	σ
0	0	0	0	0	0	-	0	0	0
23	1	0,163	0,171	0,145	0,159	20	244	249	21
46	2	0,557	0,542	0,505	0,534	20	833	844	42
70	3	0,483	0,489	0,447	0,473	20	736	751	36
95	4	0,316	0,336	0,302	0,318	20	492	489	27
119	5	0,248	0,219	0,251	0,239	20	369	383	28
143	6	0,232	0,241	0,247	0,240	20	370	372	12
167	7	0,214	0,218	0,237	0,223	20	343	335	19
191	8	0,204	0,209	0,222	0,211	20	326	321	15
215	9	0,205	0,197	0,212	0,204	20	315	315	12
264	11	0,211	0,210	0,208	0,209	20	322	323	2
334	14	0,073	0,067	0,065	0,068	20	101	98	7



Obr. 15. Koncentrace buněčné bílkoviny v závislosti na čase kultivace – Test I.
Chybové úsečky odpovídají hodnotě $\pm \sigma$, každý bod je průměrem tří měření

U prvního testu byl vzorek odebrán až po 23 h (nejpozději ze všech testů) (Tab.18), možná proto není na růstové křivce zaznamenána lagová fáze (Obr.15). Zdá se, že růstová křivka

přechází po prvním dnu do fáze zrychleného růstu, poté následuje fáze logaritmická (druhý den je taky naměřena maximální koncentrace buněčné bílkoviny u tohoto testu t.j. 833 mg.l⁻¹). Pro přesné určení jednotlivých fází nemáme naměřených dostatek hodnot v prvních fázích kultivační křivky, kdy množení bakterií probíhá nejintenzivněji. Následuje fáze stacionární, ve které (v našich podmínkách) množství buněčné bílkoviny klesá nejprve poměrně rychle (třetí až pátý den kultivace). Od pátého až po jedenáctý den klesá růstová křivka jen pozvolně. Čtrnáctý den byla naměřena o 220 mg.l⁻¹ nižší koncentrace buněčné bílkoviny (Tab. 19). Mohlo by se stát, že z živného média byly již odčerpány téměř všechny živiny a nahromadilo se zde příliš mnoho toxických metabolitů, které omezují množení buněk a růstová křivka se dostala do fáze odumírání. Ale mnohem pravděpodobnější vysvětlení je, že vzrostla viskozita živného média natolik, že nedošlo k separaci všech bakteriálních buněk.

Celkové množství polysacharidu a polysacharid kyselého charakteru – Test I

Stanovili jsme koncentraci veškerých sacharidických složek v živném médiu pomocí fenol-sulfátové metody. V jednotlivých dnech jsme odebírali vzorek živného média, ze kterého byly odstraněny bakteriální buňky, poté bylo živné médium s obsahem EPS zamraženo, po ukončení testu přečištěno a následně analyzováno (4.3.1,5.4).

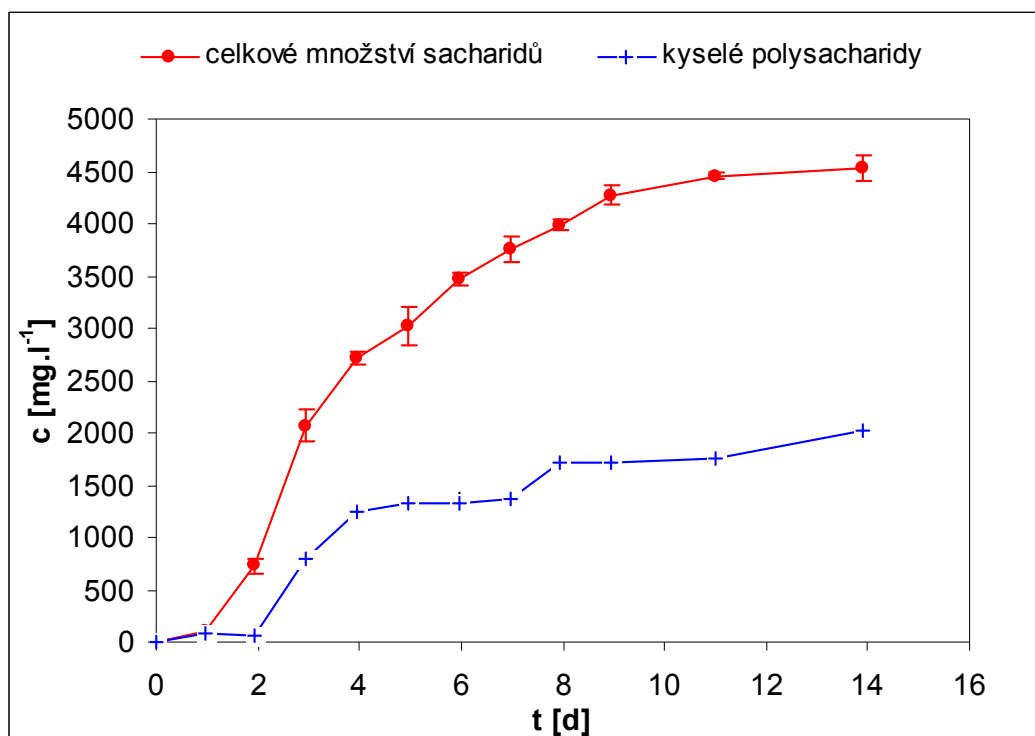
Tab. 19. Celkové množství polysacharidu měřeno fenol-sulfátovou metodou – Test I

t [h]	t [d]	A ₂ [1]	A ₂ [1]	A ₂ [1]	A _Ø [1]	ředění	c [mg.l ⁻¹]	\bar{x}	σ
0	0	0	0	0	0	-	0	0	0
23	1	0,458	0,668	0,426	0,517	2	92	65	61
46	2	0,678	0,693	0,507	0,626	6	725	748	144
70	3	0,552	0,431	0,445	0,476	20	2066	1981	308
95	4	0,645	0,612	0,593	0,617	20	2720	2698	122
119	5	0,731	0,591	0,725	0,682	20	3025	3224	368
143	6	0,311	0,300	0,321	0,311	50	3464	3468	122
167	7	0,345	0,313	0,349	0,336	50	3755	3863	229
191	8	0,362	0,359	0,345	0,355	50	3983	4026	106
215	9	0,368	0,373	0,399	0,380	50	4270	4189	194
264	11	0,391	0,395	0,402	0,396	50	4456	4445	65
334	14	0,412	0,379	0,416	0,402	50	4530	4642	236

Stanovili jsme koncentraci kyselých polysacharidů pomocí alciánové modři v živném médiu. Alikvotní podíl pro analýzu byl odebírán ze stejného vzorku, jako u fenol-sulfátové metody.

Tab. 20. Polysacharid kyselého charakteru stanovený pomocí alciánové modři – Test I

t [h]	t [d]	A ₁ [1]	A ₂ [1]	A ₃ [1]	A _σ [1]	ředění	c [mg.l ⁻¹]	\bar{x}	σ
0	0	0,959	0,962	0,973	0,965	-	0	0	0
23	1	0,703	0,729	0,742	0,725	-	73	68	6
46	2	0,735	0,752	0,739	0,742	-	67	75	3
70	3	0,703	0,698	0,698	0,700	10	804	812	9
95	4	0,660	0,660	0,662	0,661	13	1236	123	5
119	5	0,643	0,642	0,632	0,639	13	1328	1352	26
143	6	0,714	0,708	0,739	0,720	18	1332	1352	91
167	7	0,739	0,740	0,738	0,739	20	1366	1370	6
191	8	0,685	0,682	0,681	0,683	20	1714	1703	13
215	9	0,680	0,685	0,683	0,683	20	1714	1722	15
264	11	0,672	0,677	0,680	0,676	20	1754	1763	25
334	14	0,628	0,638	0,635	0,634	20	2026	2032	33



Obr. 16. Množství polysacharidu vyprodukované danou kulturou v čase-Test I. Chybové úsečky odpovídají hodnotě $\pm \sigma$, každý bod je průměrem tří měření.

Již druhý den kultivace byla zaznamenána vyšší koncentrace sacharidů stanovených pomocí fenol-sulfátové metody (Tab.19). Nejrychlejší růst celkového množství sacharidů byl zaznamenán v prvních dnech kultivace (4.den; $c = 2720 \text{ mg.l}^{-1}$), od pátého dne se snižuje tempo růstu, ale koncentrace i nadále roste. Po devátém dne až do konce testu je nárůst sacharidů jen nepatrný (koncentrace je do konce testu zvýšena pouze o 260 mg.l^{-1}) (Tab. 20). Poslední den testu byla naměřena nejvyšší koncentrace sacharidů ve vzorku, jejíž hodnota je 4530 mg.l^{-1} .

Výraznější nárůst polysacharidů kyselého charakteru nastává až třetí den kultivace, po čtvrtém dne se tempo růstu zastavuje až do sedmého dne, kde je zaznamenán skokový nárůst koncentrace. Protože se podobný zlom nevyskytuje u křivky získané fenol-sulfátovou metodou, jedná se patrně o experimentální chybu. Od osmého dne kultivace roste koncentrace „kyselých polysacharidů“ jen mírně. Poslední den kultivace byla naměřena koncentrace 2026 mg.l^{-1} , která nedosahuje ani poloviny hodnoty stanovené u celkového množství sacharidů ve vzorku na konci testu.

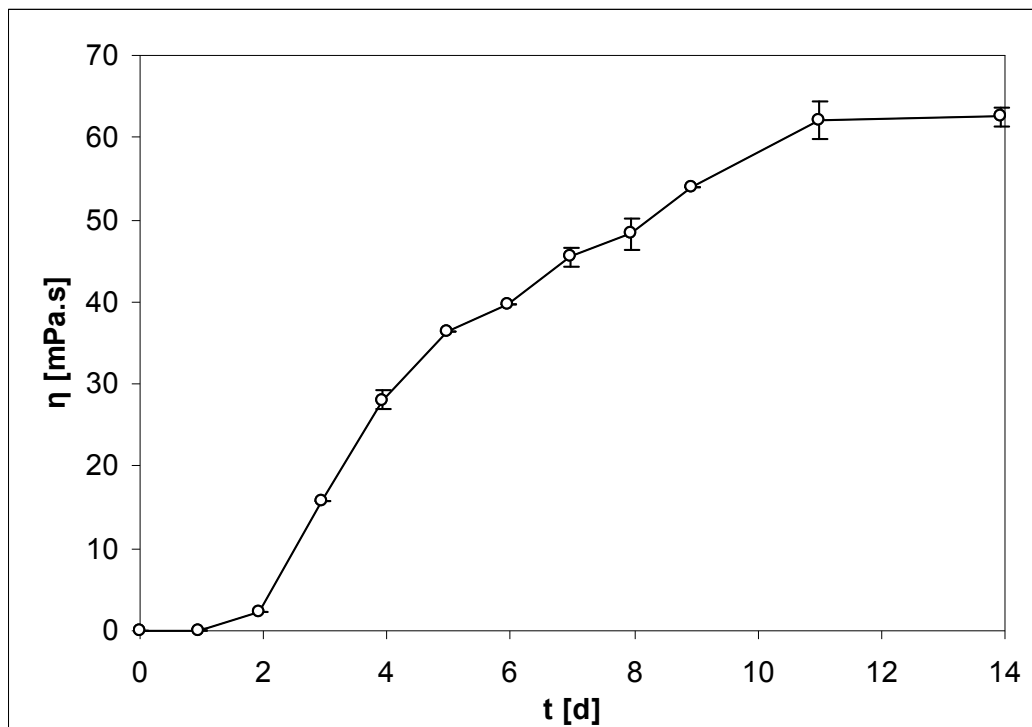
Chybové úsečky jsou u obou metod zobrazeny a počítány stejným způsobem, avšak analýzou pomocí alciánové modři byla získána natolik nízká směrodatná odchylka (σ), že chybové úsečky nejsou na křivce patrné (Obr.16).

Stanovení dynamické viskozity – Test I

Zvýšení koncentrace EPS přítomných v živném médiu vyvolá i nárůst viskozity v tomto médiu. Ihned po odebrání vzorku a centrifugaci jsme měřili viskozitu živného média s přítomným EPS. Tímto rychlým způsobem se dalo dobře odhadnout, jakým způsobem se vyvíjí produkce extracelulárních polysacharidů (Tab.21).

Tab. 21. Stanovené hodnoty dynamické viskozity v čase – Test I

t[h]	0	23	46	70	95	119	143	167	191	215	264	334
t[d]	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	14
η_1 [mPa.s]	0,95	1,04	3,35	16,80	29,10	37,40	40,60	46,40	49,10	55,00	63,20	63,50
η_2 [mPa.s]	0,95	1,03	3,35	16,80	29,10	37,40	40,60	46,50	49,20	55,00	63,20	63,60
η_3 [mPa.s]	0,95	1,02	3,35	16,80	29,00	37,40	40,60	46,50	49,30	55,00	63,00	63,50
η_θ [mPa.s]	0,95	1,03	3,35	16,80	29,07	37,40	40,60	46,47	49,20	55,00	63,13	63,53
η [mPa.s]	0	0,08	2,40	15,85	28,12	36,45	39,65	45,52	48,25	54,05	62,18	62,58
\bar{x}	0,95	1,03	3,35	16,80	29,10	37,40	40,60	46,50	49,20	55,00	63,20	63,50
σ	0	0,01	0	0	0,06	0	0	0,06	0,10	0	0,12	0,06



Obr. 17. Růst viskozity v jednotlivých dnech kultivace – Test I.
Chybové úsečky odpovídají hodnotě $\pm \sigma$, každý bod je průměrem tří měření.

Mírný růst viskozity se objevuje až druhý kultivační den (Obr.17). U prvního testu má křivka růstu viskozity exponenciální charakter. Od druhého po pátý den kultivace je tempo růstu viskozity vysoké, od šestého až po jedenáctý den se lehce zpomaluje. Mezi jedenáctým a čtrnáctým dnem je růst viskozity nevýznamný, přesto i zde byla na konci testu naměřena nejvyšší hodnota 62,6 mPa.s (po odečtení viskozity samotného minerálního média, jehož hodnota byla 0,95 mPa.s).

7.1.2 Test II

U druhého testu jsme chtěli ověřit vztah mezi přísunem kyslíku a produkcí extracelulárního polysacharidu, proto byl průtok vzduchu snížen na $0,13 \text{ dm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ pomocí zaškrcení silikonové hadičky hned za výstupem z peristaltického čerpadla. Kultivace proběhla v Minerálním médiu K (4.1.).

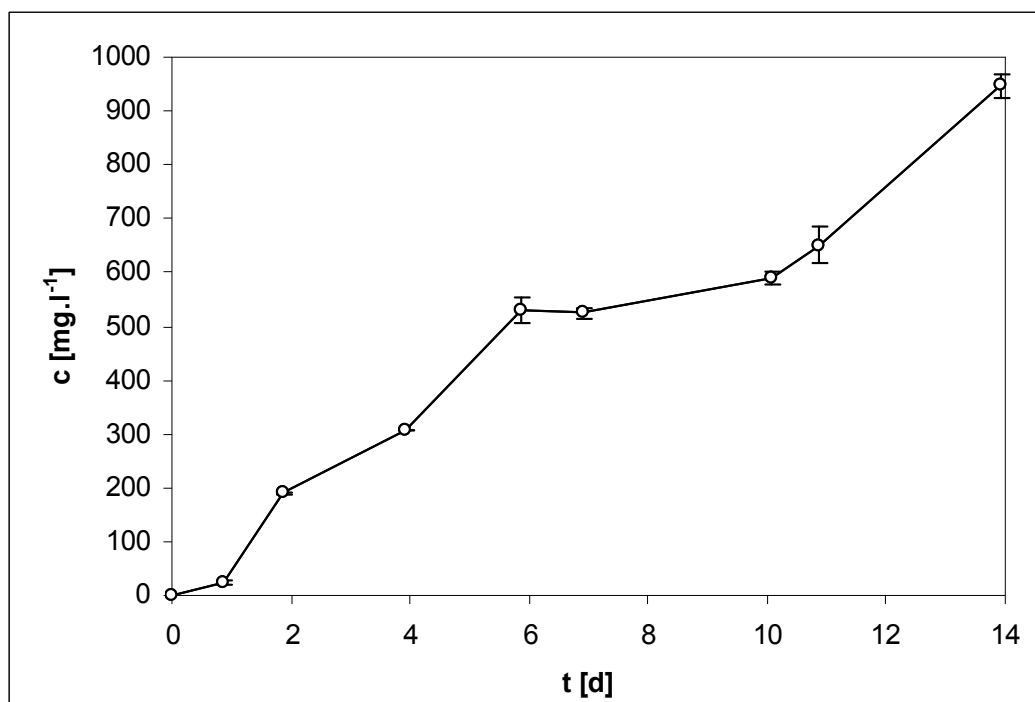
Koncentrace buněčné bílkoviny v jednotlivých kultivačních dnech Testu II

Byla analyzována koncentrace buněčné bílkoviny pomocí bicincholinové kyseliny (5.1.), její případný vzestup vyjadřuje nárůst biomasy. Analýza byla provedena u separovaných bakteriálních buněk, které byly separovány z odebraného živného média, promyty a ucho-

vávány do následné analýzy při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (4.2). Bakteriální buňky byly centrifugovány při 12500 g po dobu 15 minut.

Tab. 22. Koncentrace buněčné bílkoviny v kultivačních dnech - Test II

t [h]	t [d]	A ₁ [1]	A ₂ [1]	A ₃ [1]	A ₀ [1]	ředění	c [mg.l ⁻¹]	\bar{x}	σ
0	0	0	0	0	0	-	0	0	0
21	1	0,023	0,017	0,021	0,020	20	24	27	5
45	2	0,127	0,127	0,125	0,126	20	190	193	1
94	4	0,200	0,201	0,200	0,200	20	306	308	1
141	6	0,332	0,360	0,335	0,342	20	529	520	24
166	7	0,333	0,341	0,345	0,339	20	525	529	10
242	10	0,388	0,373	0,380	0,380	20	589	591	12
261	11	0,397	0,441	0,422	0,420	20	651	657	35
334	14	0,593	0,622	0,609	0,608	20	946	950	23



Obr. 18. Koncentrace buněčné bílkoviny v závislosti na době kultivace – Test II.
Chybové úsečky odpovídají hodnotě $\pm \sigma$, každý bod je průměrem tří měření.

První dva dny kultivace byl v čerstvém živném pravděpodobně dostatek kyslíku pro množení bakterií, a proto je na křivce patrný nárůst koncentrace buněčné bílkoviny již první den kultivace (Obr.18). Druhý den následuje skokový nárůst, kdy se růstová křivka patrně dostává do logaritmické fáze. Čtvrtý den vykazuje tempo růstu mírné zpomalení, ale do šestého dne kultivace se opět zrychlí. Mezi šestým a desátým dnem kultivace byla zaznamenána nejprve stagnace a poté opět mírný růst (stacionární fáze). Nemáme dostatek in-

formací k dispozici, abychom mohli s jistotou určit, zda je vyšší koncentrace šestý den způsobena experimentálními chybami nebo se jedná o skutečný vývoj, který nastal v živném médiu. Po 14 dnech dosahuje koncentrace buněčné bílkoviny nejvyšší hodnoty ze všech testů (t.j. 940 mg.l⁻¹) (Tab. 22).

Celkové množství polysacharidu a polysacharid kyselého charakteru – Test II

Stanovili jsme koncentraci veškerých sacharidických složek v živném médiu pomocí fenol-sulfátové metody. V jednotlivých dnech jsme odebírali vzorek živného média, ze kterého byly odstraněny bakteriální buňky, poté bylo živné médium s obsahem EPS zamraženo, po ukončení testu přečištěno a následně analyzováno (4.3.1,5.4).

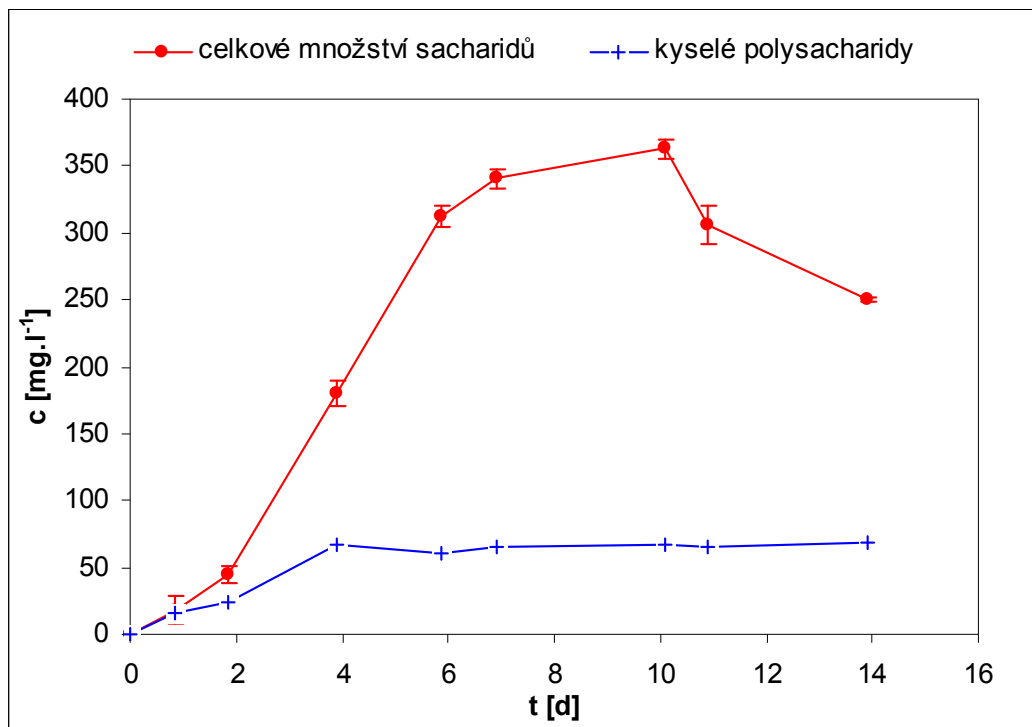
Tab. 23. Celkové množství polysacharidu měřeno fenol-sulfátovou metodou – Test II

t [h]	t [d]	A ₁ [1]	A ₂ [1]	A ₃ [1]	A ₀ [1]	ředění	c [mg.l ⁻¹]	\bar{x}	σ
0	0	0	0	0,294	0,098	-	0	0	0
21	1	0,220	0,156	0,247	0,208	2	18	24	22
45	2	0,283	0,277	0,231	0,264	2	42	50	13
94	4	0,458	0,467	0,407	0,444	2,5	196	188	19
141	6	0,647	0,699	0,672	0,673	2,5	346	322	15
166	7	0,691	0,735	0,735	0,721	2,5	378	359	15
242	10	0,754	0,785	0,738	0,759	2,5	403	380	14
261	11	0,615	0,714	0,653	0,661	2,5	338	301	29
334	14	0,566	0,572	0,560	0,566	2,5	276	271	3

Stanovili jsme koncentraci kyselých polysacharidů pomocí alciánové modři v živném médiu. Alikvotní podíl pro analýzu byl odebírán ze stejného vzorku, jako u fenol-sulfátové metody.

Tab. 24. Polysacharid kyselého charakteru stanovený pomocí alciánové modři – Test II

t [h]	t [d]	A ₁ [1]	A ₂ [1]	A ₃ [1]	A ₀ [1]	ředění	c [mg.l ⁻¹]	\bar{x}	σ
0	0	0	0	0	0	-	0	0	0
21	1	0,895	0,915	0,892	0,901	-	16	14	4
45	2	0,877	0,865	0,874	0,872	-	24	24	2
94	4	0,715	0,728	0,727	0,723	-	67	65	2
141	6	0,737	0,748	0,743	0,743	-	61	60	2
166	7	0,718	0,737	0,737	0,731	-	65	67	3
242	10	0,714	0,727	0,724	0,722	-	68	67	2
261	11	0,723	0,726	0,733	0,727	-	66	68	2
334	14	0,712	0,714	0,737	0,721	-	68	68	4



Obr. 19. Množství polysacharidu vyprodukované danou kulturou v čase-Test II.
Chybové úsečky odpovídají hodnotě $\pm \sigma$, každý bod je průměrem tří měření.

Na křivce je patrný mírný nárůst koncentrace obou typů polysacharidu již první den kultivace, který u celkového množství sacharidů pokračuje stejným tempem i druhý den a poté byl zaznamenán prudký růst jejich koncentrace do šestého dne kultivace (Obr.19). Mezi šestým a desátým dnem se objevuje pokles v tempu růstu, mezi desátým a jedenáctým dnem kultivace dokonce i prudký pokles v jejich koncentraci, který i když s patrným zmírňením se udržel až do konce testu (Tab.23).

Koncentrace polysacharidů kyselého charakteru je první den testu téměř na stejné úrovni jako koncentrace celkových sacharidů, ale již druhý je mezi oběma hodnotami rozdíl, který se dále zvyšuje. Od čtvrtého dne až do konce testu koncentrace kyselých polysacharidů stagnuje na hodnotě 68 mg.l^{-1} (Tab. 24).

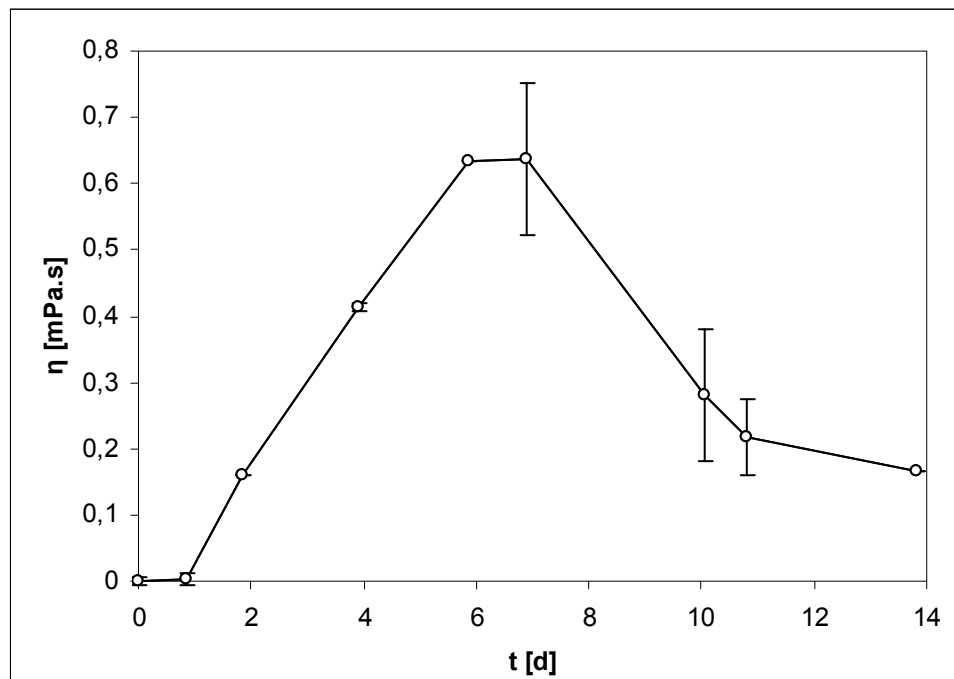
Stanovení dynamické viskozity – Test II

Zvýšení koncentrace EPS přítomných v živném médiu vyvolá i nárůst viskozity v tomto médiu. Ihned po odebrání vzorku a centrifugaci jsme měřili viskozitu živného média s přítomným EPS. Tímto rychlým způsobem se dalo dobře odhadnout, jakým způsobem se vyvíjí produkce extracelulárních polysacharidů.

Tab. 25. Stanovené hodnoty dynamické viskozity v čase – Test II

t[h]	0	21	45	94	141	166	241	259	332
t[d]	0	1	2	4	6	7	10	11	14
η_1 [mPa.s]	0,95	0,96	1,10	1,35	1,58	1,58	1,22	1,16	1,11
η_2 [mPa.s]	0,93	0,94	1,10	1,36	1,58	1,58	1,22	1,16	1,10
η_3 [mPa.s]	0,95	0,94	1,11	1,36	1,57	1,58	1,23	1,16	1,12
η_0 [mPa.s]	0,94	0,95	1,10	1,36	1,58	1,58	1,22	1,16	1,11
η [mPa.s]	0,00	0,00	0,16	0,41	0,63	0,64	0,28	0,22	0,17
\tilde{x}	0,95	0,94	1,10	1,36	1,58	1,58	1,22	1,16	1,11
σ	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01

η_{1-3} , jednotlivá měření viskozity; η , dynamická viskozita, u které byla odečtena viskozita živného média (0,95), \tilde{x} , medián tří paralelních hodnot η_{1-3} ; σ , směrodatná odchylka tří paralelních hodnot η_{1-3} ;



Obr. 20. Růst viskozity v jednotlivých dnech kultivace – Test II.

Chybové úsečky odpovídají hodnotě $\pm \sigma$, každý bod je průměrem tří měření.

Změna dynamické viskozity živného média je patrná až druhý den kultivace, kdy začíná její prakticky lineární růst, který se zastavuje šestý den kultivace (Obr.20). Sedmý den viskozita stagnuje a poté následuje téměř stejně rychlý pokles, který se zpomaluje až v závěru testu. Absolutní hodnoty viskozity jsou velmi nízké, pohybují se pod hranicí 1 mPa.s (Tab.25).

7.1.3 Test III

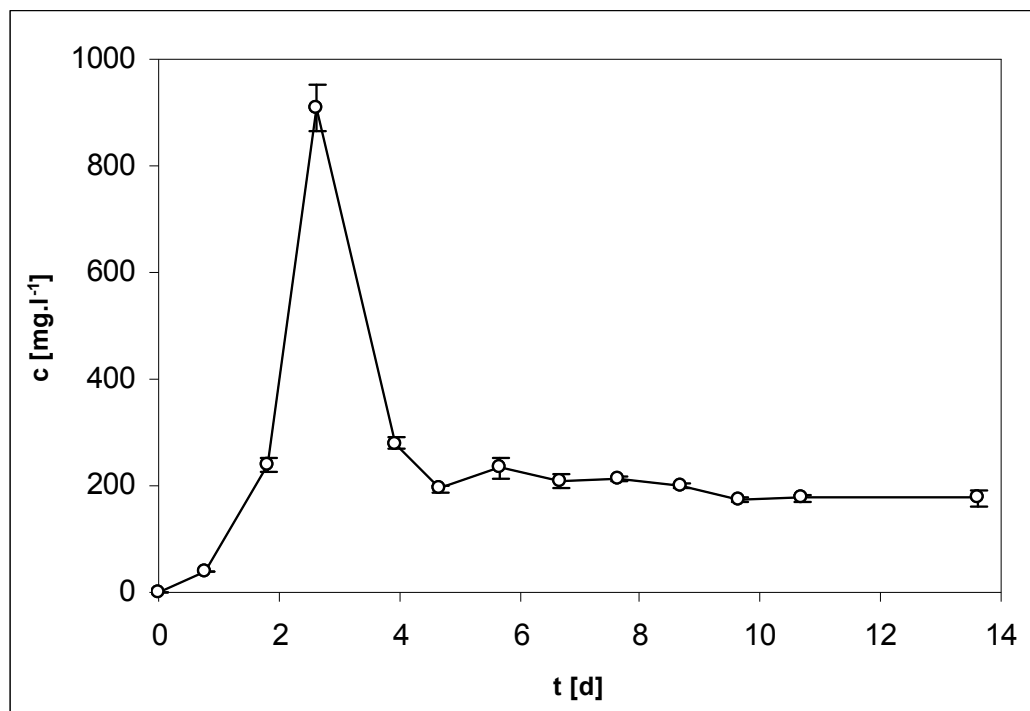
Byl zvýšen průtok vzduchu na hodnotu $0,57 \text{ dm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ ve srovnání s Testem II a to tak, že byla mírně povolena zaškrcená silikonová hadička za výstupem z membránového čerpadla. Kultivace proběhla v Minerálním médiu K (4.1.).

Koncentrace buněčné bílkoviny v jednotlivých kultivačních dnech Testu III

Byla analyzována koncentrace buněčné bílkoviny pomocí bicincholinové kyseliny (5.1.), její případný vzestup vyjadřuje nárůst biomasy. Analýza byla provedena u separovaných bakteriálních buněk, které byly separovány z odebraného živného média, promyty a uchovávány do následné analýzy při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ (4.2). Bakteriální buňky byly separovány centrifugací při 12500 g po dobu 15 minut.

Tab. 26. Koncentrace buněčné bílkoviny v kultivačních dnech - Test III

t [h]	t [d]	A ₁ [1]	A ₂ [1]	A ₃ [1]	A ₀ [1]	ředění	c [mg.l ⁻¹]	\bar{x}	σ
0	0	0	0	0	0	-	0	0	0
19	1	0,696	0,719	0,705	0,707	-	38	38	1
44	2	0,456	0,454	0,405	0,438	13	240	254	26
63	3	0,411	0,452	0,408	0,424	50	909	864	88
94	4	0,459	0,512	0,477	0,483	13	280	275	24
112	5	0,399	0,383	0,376	0,386	13	194	191	10
137	6	0,381	0,440	0,469	0,430	13	233	242	40
160	7	0,433	0,368	0,406	0,402	13	208	212	29
184	8	0,413	0,415	0,398	0,409	13	214	218	8
209	9	0,384	0,401	0,400	0,395	13	202	206	8
232	10	0,354	0,371	0,370	0,365	13	175	179	8
257	11	0,354	0,367	0,378	0,366	13	176	177	11
327	14	0,350	0,407	0,347	0,368	13	178	162	30



Obr. 21. Koncentrace buněčné bílkoviny v závislosti na době kultivace – Test III.

Chybové úsečky odpovídají hodnotě $\pm \sigma$, každý bod je průměrem tří měření

Na růstové křivce stanovené podle koncentrace buněčné bílkoviny můžeme sledovat velmi rychlý nárůst v prvních dnech kultivace (Obr. 21). V čerstvém živném médiu je dostatek živin, proto se bakteriální buňky množí velmi rychle. Nemáme k dispozici dostatek hodnot, abychom mohli správně odlišit lagovou fázi od fáze zpomaleného růstu. Logaritmická fáze nastává během druhého dne kultivace a během třetího přechází do stacionární fáze, zde je naměřena i nejvyšší koncentrace buněčné bílkoviny 909 mg.l^{-1} (Tab. 26). Čtvrtý den je patrný pokles koncentrace buněčné bílkoviny a poté jen pozvolný úbytek, který se zastavuje v závěrečné fázi testu. Pátý den kultivace je zaznamenán mírný pokles koncentrace, který může být způsoben jednak experimentálními chybami při analýze, ale také závadou na aparatuře, kdy nedocházelo k provzdušňování živného média po dobu, kterou nelze přesně ověřit. U třetího testu opět

Celkové množství polysacharidu a polysacharid kyselého charakteru – Test III

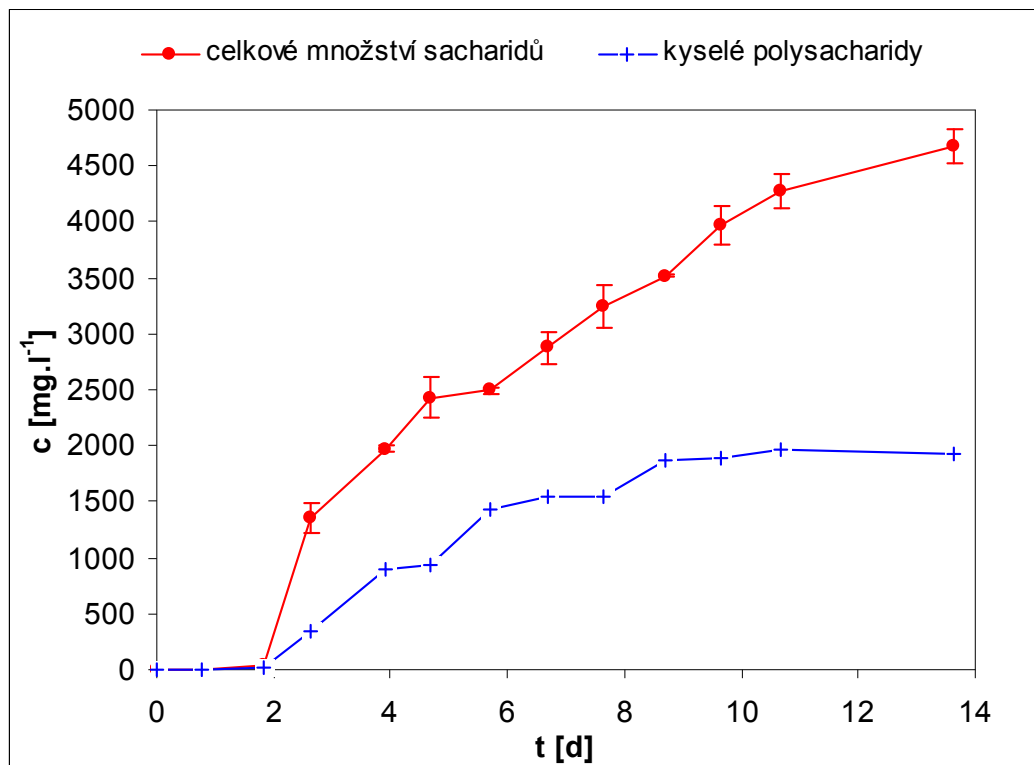
Stanovili jsme koncentraci veškerých sacharidických složek v živném médiu pomocí fenol-sulfátové metody. V jednotlivých dnech jsme odebírali vzorek živného média, ze kterého byly odstraněny bakteriální buňky, poté bylo živné médium s obsahem EPS zamraženo, po ukončení testu přečištěno a následně analyzováno (4.3.1,5.4).

Tab. 27. Celkové množství polysacharidu měřeno fenol-sulfátovou metodou – Test III

t [h]	t [d]	A ₁ [1]	A ₂ [1]	A ₃ [1]	A ₀ [1]	ředění	c [mg.l ⁻¹]	\bar{x}	σ
0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
19	1	0,234	0,266	0,356	0,285	2	0	1	29
44	2	0,303	0,233	0,253	0,263	3	35	28	25
63	3	0,786	0,586	0,569	0,647	10	1356	1214	281
94	4	0,446	0,451	0,470	0,456	20	1971	1949	59
112	5	0,641	0,505	0,517	0,554	20	2430	2256	350
137	6	0,378	0,385	0,372	0,378	30	2491	2489	45
160	7	0,289	0,247	0,244	0,260	50	2875	2724	293
184	8	0,280	0,328	0,267	0,292	50	3243	3107	374
209	9	0,317	0,316	0,313	0,315	50	3518	3526	24
232	10	0,355	0,324	0,383	0,354	50	3968	3980	343
257	11	0,411	0,372	0,359	0,381	50	4278	4177	315
327	14	0,445	0,393	0,408	0,415	50	4681	4596	311

Tab. 28. Polysacharid kyselého charakteru stanovený pomocí alciánové modři – Test III

t [h]	t [d]	A ₁ [1]	A ₂ [1]	A ₃ [1]	A ₀ [1]	ředění	c [mg.l ⁻¹]	\bar{x}	σ
0	0	0,999	0,962	0,973	0,978	-	0	0	0
19	1	0,999	1,001	0,997	0,999	-	0	0,5	1
44	2	0,885	0,878	0,892	0,885	-	26	28	2
63	3	0,729	0,742	0,746	0,739	5	342	353	14
94	4	0,735	0,739	0,752	0,742	13	899	912	36
112	5	0,733	0,732	0,736	0,734	13	933	940	8
137	6	0,703	0,701	0,705	0,703	18	1429	1431	11
160	7	0,705	0,713	0,713	0,710	20	1542	1549	29
184	8	0,705	0,714	0,706	0,708	20	1554	1560	30
209	9	0,654	0,656	0,662	0,657	20	1875	1870	27
232	10	0,655	0,653	0,660	0,656	20	1883	1892	23
257	11	0,639	0,641	0,651	0,644	20	1962	1970	41
327	14	0,644	0,656	0,648	0,649	20	1926	1922	39



Obr. 22. Množství polysacharidu vyprodukované danou kulturou v čase-Test III.
Chybové úsečky odpovídají hodnotě $\pm \sigma$, každý bod je průměrem tří měření.

Růst koncentrace obou typů shodně začíná až druhý den kultivace (Obr.22). U celkového množství sacharidů je zaznamenán nejvyšší nárůst koncentrace právě druhý den a poté roste koncentrace přibližně lineárně. Stagnace růstu šestý den kultivace může být způsobena experimentálními chybami anebo je to následek výpadku provzdušňování živného média

z předchozího dne. Tempo růstu koncentrace celkových sacharidů se zastavuje až na konci testu na hodnotě 4681 mg.l⁻¹ (Tab.27).

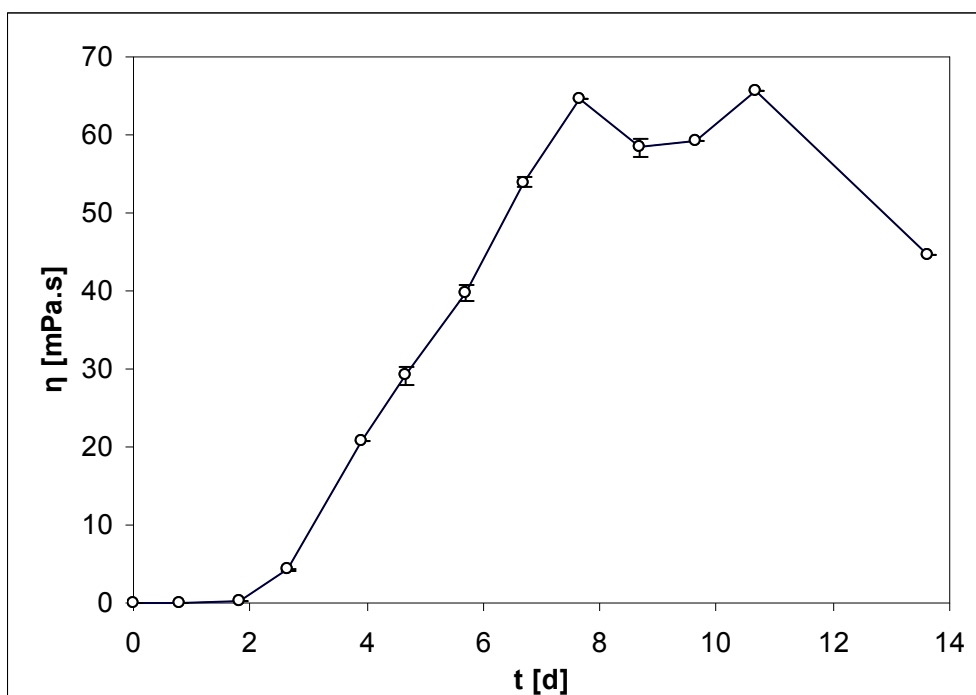
Koncentrace kyselých polysacharidů přibližně do devátého dne zaujímá poloviny z celkového množství polysacharidů, poté se růst prakticky zastavuje a jejich koncentrace v živném médiu je konstantní (Tab.28).

Stanovení dynamické viskozity – Test III

Zvýšení koncentrace EPS v živném médiu vyvolá zvýšení viskozity tohoto média. Ihned po odebrání vzorku a centrifugaci byla měřena viskozita živného média s přítomným EPS. Tímto rychlým způsobem se dalo dobře odhadnout, jakým způsobem se vyvíjí produkce extracelulárních polysacharidů.

Tab. 29. Stanovené hodnoty dynamické viskozity v čase – Kultivace III

t[h]	0	19	44	63	94	112	137	160	184	209	232	257	327
t[d]	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	14
η_1 [mPa.s]	0,95	0,97	1,31	5,20	21,60	30,00	40,70	54,90	65,50	59,40	60,30	66,50	45,60
η_2 [mPa.s]	0,95	0,98	1,31	5,21	21,60	30,20	40,80	54,90	65,50	59,20	60,30	66,50	45,60
η_3 [mPa.s]	0,94	0,96	1,31	5,20	21,60	30,20	40,60	54,80	65,50	59,40	60,30	66,50	45,60
η_σ [mPa.s]	0,95	0,97	1,31	5,20	21,60	30,13	40,70	54,87	65,50	59,33	60,30	66,50	45,60
η [mPa.s]	0	0,02	0,36	4,26	20,65	29,19	39,75	53,92	64,55	58,39	59,35	65,55	44,65
\bar{x}	0,95	0,97	1,31	5,20	21,60	30,20	40,70	54,90	65,50	59,40	60,30	66,50	45,60
σ	0,01	0,01	0	0,01	0	0,12	0,10	0,06	0	0,12	0	0	0



Obr. 23. Růst viskozity v jednotlivých dnech kultivace – Test III.

Chybové úsečky odpovídají hodnotě $\pm \sigma$, každý bod je průměrem tří měření.

Dynamická viskozita v živném médiu s přítomnými EPS roste od druhého až po osmý den kultivace prakticky lineárně (Obr.23), poté následuje mírný propad. Desátý den kultivace viskozita stagnuje a jedenáctý den je zaznamenán nárůst. Na konci testu je opět zřetelný pokles viskozity z 66 mPa.s na 45 mPa.s (Tab.29), která byla měřena pětkrát se stejnými výsledky. Další vzorek nebylo možné odebrat, protože zbylý objem živného média byl v tu dobu již znehodnocen zásluhou trichloroctové kyseliny.

7.1.4 Test IV

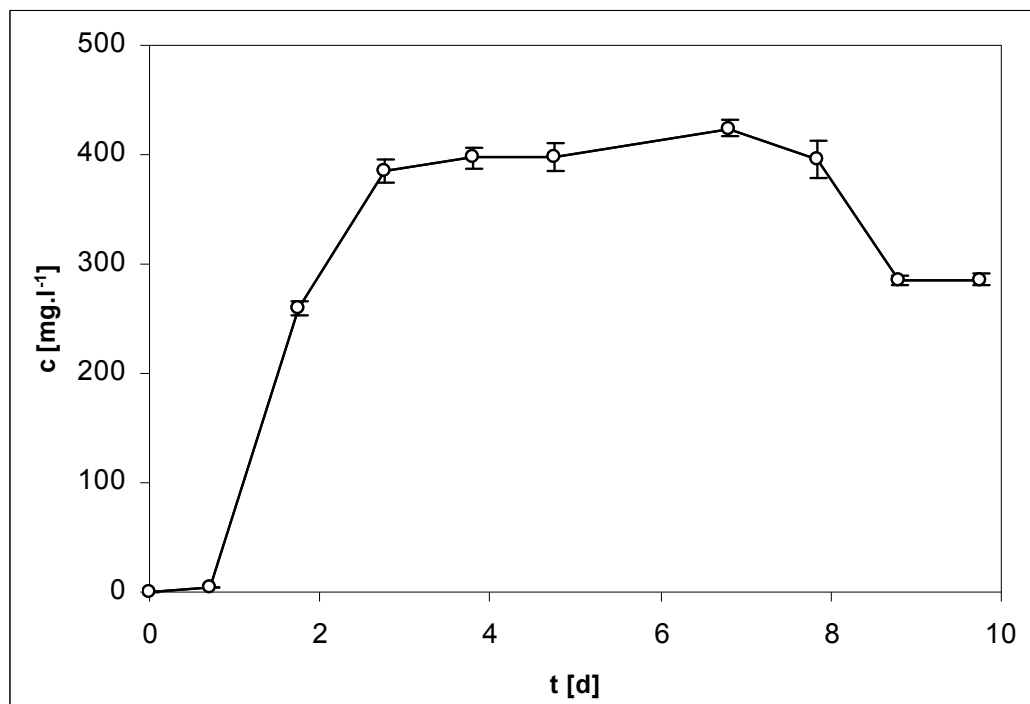
U čtvrtého testu jsme zachovali maximální průtok vzduchu o hodnotě $1,35 \text{ dm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, ale ke změně zde došlo oproti předchozím testům v použití **Minerálního média L** (4.1), což bylo vysoce žádoucí vzhledem k potížím s rušením chemických analýz. Vlivem tohoto opatření, nebylo nutné přečišťovat odebrané vzorky s přítomným EPS dle postupu (4.3.1). Tento test byl z časových důvodů ukončen již desátý den kultivace. Čtvrtý test byl zaočkován suspenzí vytvořenou z petriho misky, která byla zaočkována „čerstvou“ kulturou z mrazícího boxu. Ostatní Testy byly zaočkovány suspenzí vytvořenou z kultury přeočkovávané z petriho misek a uchovávané v lednici po několik měsíců.

Koncentrace buněčné bílkoviny v jednotlivých kultivačních dnech Testu IV

Byla analyzována koncentrace buněčné bílkoviny pomocí bicincholinové kyseliny (5.1.), její případný vzestup vyjadřuje nárůst biomasy. Analýza byla provedena u separovaných bakteriálních buněk, které byly separovány z odebraného živného média, promyty a uchovávány do následné analýzy při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ (4.2). Bakteriální buňky byly separovány centrifugací při 12500 g po dobu 15 minut.

Tab. 30. Koncentrace buněčné bílkoviny v kultivačních dnech - Test IV

t [h]	t [d]	A ₁ [1]	A ₂ [1]	A ₃ [1]	A _σ [1]	ředění	c [mg.l ⁻¹]	\bar{x}	σ
0	0	0	0	0	0	-	0	0	0
17	1	0,189	0,187	0,194	0,190	-	4	4	0
42	2	0,547	0,569	0,587	0,568	10	260	264	14
66	3	0,608	0,654	0,648	0,637	13	385	398	22
91	4	0,627	0,656	0,669	0,651	13	397	405	19
114	5	0,652	0,607	0,599	0,619	13	399	414	25
164	7	0,688	0,664	0,692	0,681	13	424	445	13
188	8	0,611	0,647	0,689	0,649	13	396	409	34
211	9	0,514	0,517	0,534	0,522	13	285	275	9
234	10	0,530	0,508	0,531	0,523	13	286	302	11



Obr. 24. Koncentrace buněčné bílkoviny v závislosti na době kultivace – Test IV.
Chybové úsečky odpovídají hodnotě $\pm \sigma$, každý bod je průměrem tří měření

Vzorky u tohoto testu byly odebírány již po 17 hodinách, proto je dobře patrná lagová fáze na růstové křivce, kdy se bakteriální buňky přizpůsobují novému prostředí a prakticky se nemnoží (Obr.24). Již druhý den kultivace je zaznamenán skokový nárůst v koncentraci buněčné bílkoviny, kdy růstová křivka přechází do logaritmické fáze, mezi druhým a třetím dnem by měla následovat fáze zpomaleného růstu a poté až do sedmého dne stacionární fáze. Devátý den následuje fáze poklesu buněk s koncovou hodnotou 286 mg.l⁻¹ (Tab.30).

Tento poněkud „učebnicový tvar“ růstové křivky kazí fakt uvedený v kapitole (6.3) a to, že desátý den tohoto testu bylo provedeno ověření podmínek centrifugace, při kterém jsme zjistili, že skutečná koncentrace bakteriálních buněk by měla být 420 mg.l⁻¹. To přibližně odpovídá sedmému dnu kultivace (Tab.30). Zda se držela koncentrace buněčné bílkoviny na konstantní hodnotě nebo zda byla ten den vyšší nemůžeme již zjistit. Ze závěrů v kapitole (6.3) rovněž vyplývá, že podmínky centrifugace, tak jak byly provedeny, by mohly být dostačující pro sedimentaci bakteriálních buněk při viskozitě do 29 mPa.s. U Testu IV je to tato hodnota překročena šestý den kultivace (Tab.33) a tak by měl (Obr.24) odpovídat skutečnosti pouze v prvních dnech kultivace.

Celkové množství polysacharidu a polysacharid kyselého charakteru – Test IV

Stanovili jsme koncentraci veškerých sacharidických složek v živném médiu pomocí feno-sulfátové metody. V jednotlivých dnech jsme odebírali vzorek živného média, ze kterého

byly odstraněny bakteriální buňky, poté bylo živné médium s obsahem EPS zamraženo, po ukončení testu přečištěno a následně analyzováno (4.3.1;5.4).

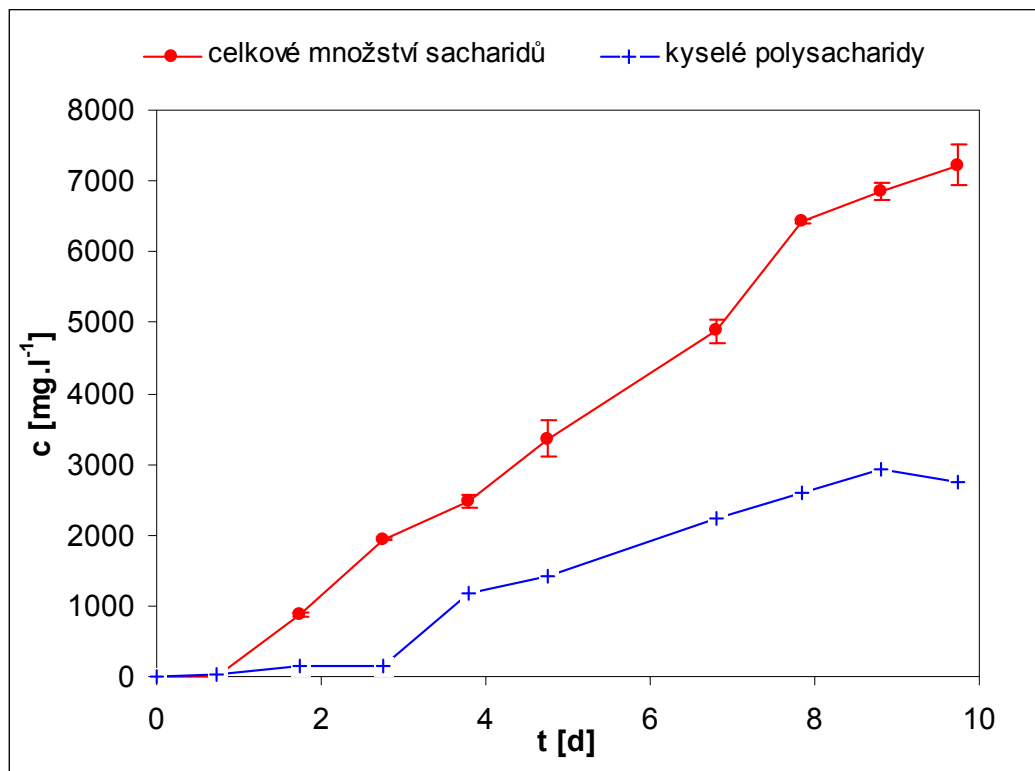
Tab. 31. Celkové množství polysacharidu měřeno fenol-sulfátovou metodou – Test IV

t [h]	t [d]	A ₁ [1]	A ₂ [1]	A ₃ [1]	A _σ [1]	ředění	c [mg.l ⁻¹]	\bar{x}	σ
0	0	0,276	0,311	0,294	0,294	-	0	0	0
17	1	0,361	0,352	0,375	0,363	-	8	7	3
42	2	0,437	0,385	0,421	0,414	10	887	902	62
66	3	0,437	0,430	0,436	0,434	20	1943	1951	18
91	4	0,371	0,338	0,388	0,366	30	2474	2512	177
114	5	0,285	0,211	0,242	0,246	60	3356	3300	519
164	7	0,355	0,356	0,397	0,369	60	4884	4891	334
188	8	0,463	0,470	0,466	0,466	60	6430	6425	49
211	9	0,644	0,688	0,653	0,662	45	6848	6757	243
234	10	0,565	0,482	0,523	0,523	60	7225	7221	579

Stanovili jsme koncentraci kyselých polysacharidů pomocí alciánové modři v živném médiu. Alikvotní podíl pro analýzu byl odebírán ze stejného vzorku, jako u fenol-sulfátové metody.

Tab. 32. Polysacharid kyselého charakteru stanovený pomocí alciánové modři – Test IV

t [h]	t [d]	A ₁ [1]	A ₂ [1]	A ₃ [1]	A _σ [1]	ředění	c [mg.l ⁻¹]	\bar{x}	σ
0	0	0	0	0	0,934	-	0	0	0
17	1	0,934	0,920	0,930	0,928	-	24	22	2
42	2	0,508	0,507	0,513	0,509	-	157	158	1
66	3	0,543	0,546	0,551	0,547	-	144	148	1
91	4	0,622	0,615	0,630	0,622	10	1179	1170	25
114	5	0,552	0,545	0,554	0,550	10	1425	1419	17
164	7	0,754	0,757	0,760	0,757	30	2242	2250	28
188	8	0,718	0,721	0,719	0,719	30	2593	2603	14
211	9	0,682	0,687	0,688	0,686	30	2914	2910	31
234	10	0,696	0,702	0,707	0,702	30	2761	2752	53



Obr. 25. Množství polysacharidu vyprodukované danou kulturou v čase-Test IV.

Chybové úsečky odpovídají hodnotě $\pm \sigma$, každý bod je průměrem tří měření.

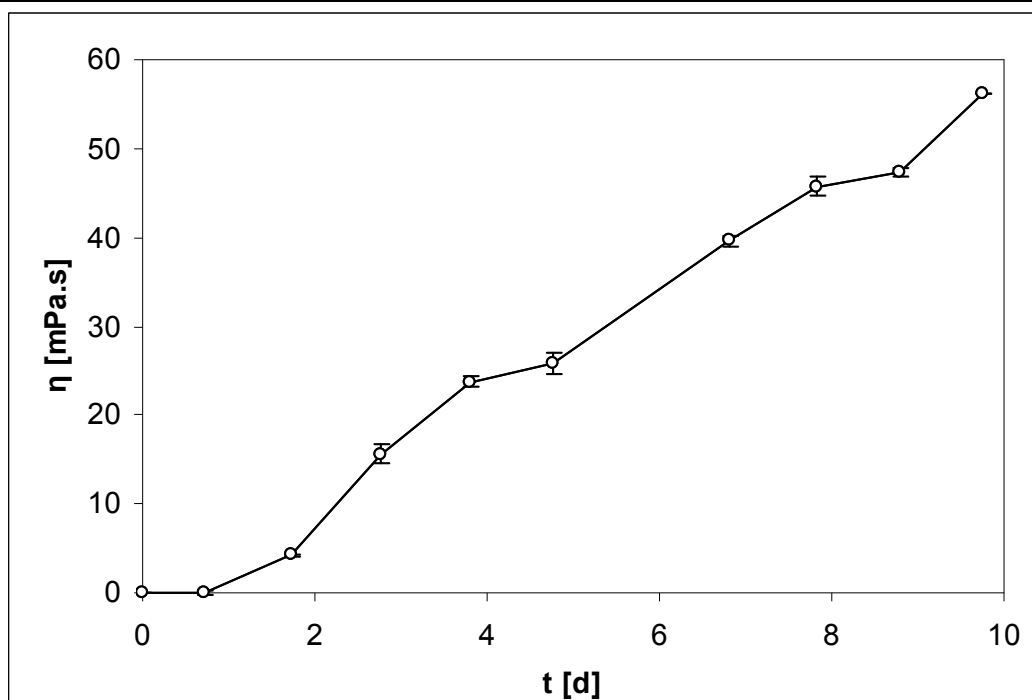
Koncentrace celkového množství polysacharidů začíná růst již druhý den kultivace (Obr.25), čtvrtý den je zaznamenán pokles tempa růstu, v dalších třech dnech pokračuje lineární růst. Pátý den kultivace se koncentrace vzrostla rychleji než v předchozích dnech, do konce testu je opět patrný lineární růst koncentrace, který se zastavuje na hodnotě 7225 mg.l⁻¹ (Tab.31).

Patrný růst koncentrace EPS kyselého charakteru je zaznamenán až čtvrtý den kultivace, který pokračuje lineárním růstem koncentrace až do devátého dne na hodnotu 2914 mg.l⁻¹ (Tab.32).Desátý den kultivace je zaznamenán mírný pokles koncentrace EPS kyselého charakteru.

Stanovení dynamické viskozity – Test IV

Zvyšující se koncentrace EPS přítomných v živném médiu zvyšuje viskozitu živného média. Ihned po odebrání vzorku a centrifugaci jsme měřili viskozitu živného média s přítomným EPS. Tímto rychlým způsobem jsme mohli dobře odhadnout, jakým způsobem se vyvíjí produkce extracelulárních polysacharidů.

t[h]	0	17	42	66	91	114	164	188	211	234
t[d]	0	1	2	3	4	5	7	8	9	10
η_1 [mPa.s]	0,94	0,96	5,22	16,5	24,7	26,6	40,6	46,7	48,3	57,2
η_2 [mPa.s]	0,94	0,99	5,2	16,5	24,6	26,8	40,5	46,8	48,2	57,2
η_3 [mPa.s]	0,95	0,99	5,2	16,7	24,6	26,8	40,5	46,6	48,3	57,2
η_0 [mPa.s]	0,94	0,98	5,21	16,57	24,63	26,73	40,53	46,70	48,27	57,20
η [mPa.s]	0,00	0,04	4,26	15,62	23,69	25,79	39,59	45,76	47,32	56,26
\bar{x}	0,94	0,99	5,20	16,50	24,60	26,80	40,50	46,70	48,30	57,20
σ	0,01	0,02	0,01	0,12	0,06	0,12	0,06	0,10	0,06	0,00



Obr. 26. Růst viskozity v jednotlivých dnech kultivace – Test IV.

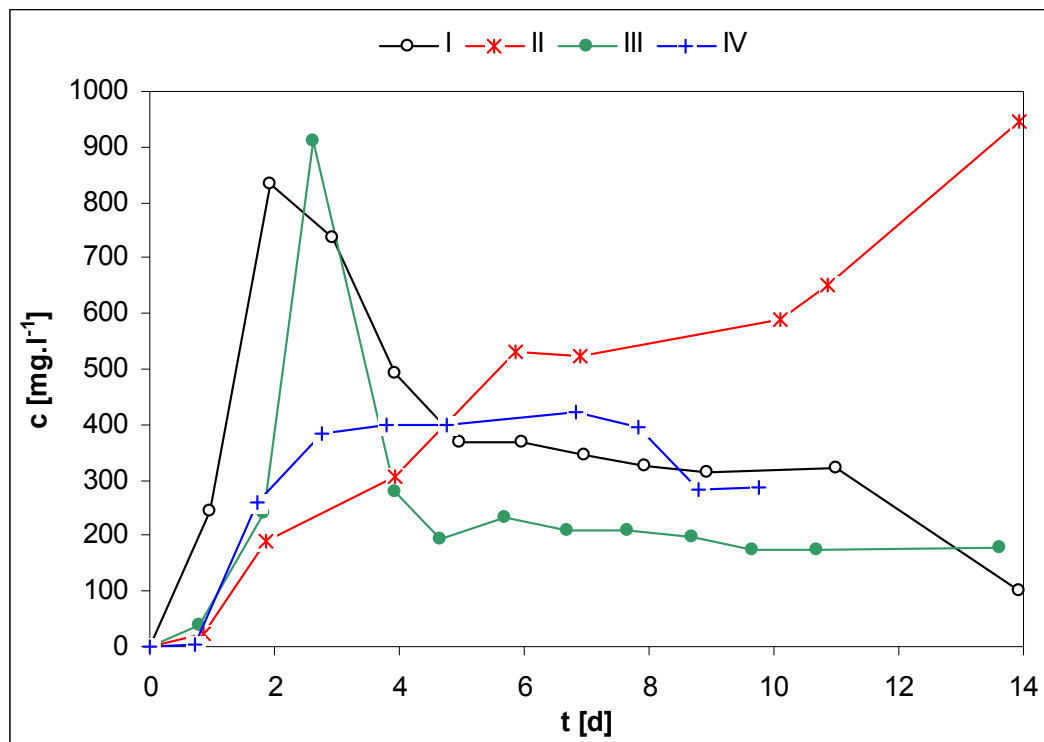
Chybové úsečky odpovídají hodnotě $\pm \sigma$, každý bod je průměrem tří měření.

Mírný nárůst dynamické viskozity živného média byl zaznamenán až druhý den kultivace (Obr.26), poté následuje rychlé tempo růstu viskozity, které se zmírní pátý den kultivace a pokračuje až do konce testu, kde dosahuje hodnoty 56 mPa.s (Tab.33).

7.1.5 Shrnutí testů

Koncentrace buněčné bílkoviny stanovená v biomase -Testy I-IV

Srovnání růstu koncentrace buněčné bílkoviny v separovaných buňkách u jednotlivých testů.



Obr. 27. Koncentrace buněčné bílkoviny v čase-Testy I-IV.

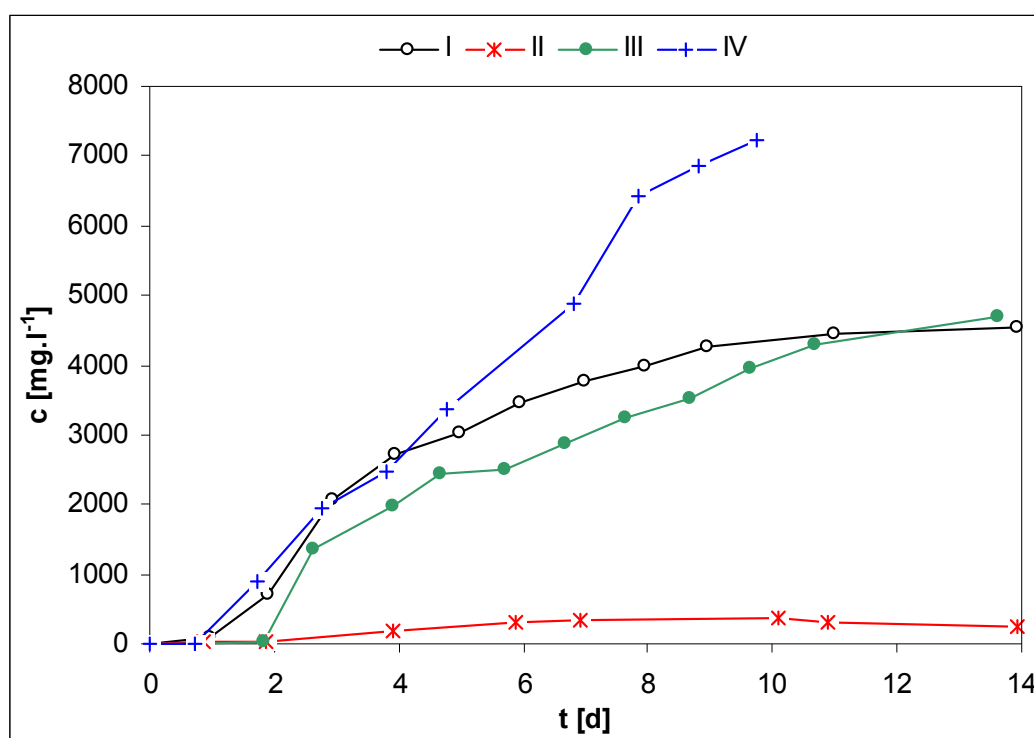
U tří testů, kde bakteriální buňky rostly v živném médiu s KA se pohybuje maximální koncentrace buněčné bílkoviny kolem hodnoty 900 mg.l^{-1} , ale jinak se všechny tři křivky navzájem liší (Obr.27). Na křivce 1. testu nemůžeme pozorovat lagovou fázi narozdíl od všech ostatních křivek, protože test byl proveden jen jednou, nelze s jistotou určit, zda jsou tyto kultivační podmínky natolik optimální, že tato fáze chybí nebo se jedná o chybu ve způsobu zaočkování živného média. Přesto koncentrace buněčné bílkoviny u 1. a 3. testu obdobná, její křivku charakterizuje prudký nárůst v prvních dnech kultivace a podobně strmý pokles, který nastává kolem 4. a 5. dnu kultivace. V dalších dnech je množství buněčné bílkoviny konstantní. Naprosto odlišný charakter od ostatních křivek byl zaznamenán u 2. testu, kde se potýkaly bakteriální buňky s výrazně sníženým přísunem vzduchu. Růstová křivka připomíná tzv. dvojistou růstovou křivku charakteristickou pro dva typy substrátu, ale tento test jsme dělali pouze jednou a navíc je zde naměřeno nejméně hodnot, nemůžeme říct, zda se nejedná o experimentální chybu, či zda je tento výsledek skutečný. Ani snížený průtok vzduchu ($0,5 \text{ dm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$) u třetího testu nebrání bakteriím v růstu, tato křivka sice vykazuje pozdější logaritmickou fázi, ale byla zde stanovena vyšší koncentrace buněčné bílkoviny než u 1. testu, poté následuje pokles a koncentrace se drží na nižší hladině, než u prvního testu. Nemáme dostatek informací, abychom mohli říct, že je to způsobeno sníženým průtokem vzduchu, i když by to tak mohlo vypadat.

U 4. testu nebyl průtok vzduchu omezen, ale KA v minerálním médiu byl nahrazen lysinem a současně byl použit desetinásobný fosfátový tlumivý roztok. Koncentrace bakteriál-

ních buněk kolem sedmého dne je zde vyšší než u Testu I a III, což by nasvědčovalo, že takto upravené živné médium je vhodnější. Opět zde musíme opakovat, že nemáme dostatek podkladů, abychom tento závěr prohlásit za pravdivý. Jakékoliv tvrzení znesnadňuje i závěr získaný v kapitoly (6.3) o sedimentaci buněk při vyšší viskozitě.

Celkové množství polysacharidu stanovené fenol-sulfátovou metodou -Testy I-IV

Srovnání růstu celkového množství EPS během kultivace u jednotlivých Testů.



Obr. 28. Množství polysacharidu vyprodukované danou kulturou-TestyI-IV.

Křivky vyjadřující koncentraci EPS (Obr.28) v jednotlivých dnech kultivace u 1. a 3. testu vykazují rychlé tempo růstu do čtvrtého dne kultivace a poté následuje zmírnění rychlosti růstu EPS, v obou testech bylo dosaženo po 14 dnech přibližně stejné koncentrace (cca 4500 mg.l⁻¹). U třetího testu je o něco pomalejší rychlost produkce EPS, což by mohlo být způsobeno snížením průtoku vzduchu. Koncentrace se prakticky vyrovnají až po deseti dnech kultivace (Obr.28).

Naproti tomu, téměř lineární tvar až do šestého dne, má křivka charakterizující 4. test, kde bylo použito minerální médium s lysinem, kolem sedmého dne s objevuje vyšší růst a poté následuje opět lineární nárůst koncentrace EPS. Protože tento test byl ukončen předčasně, nelze určit, zda by pokračoval lineární růst koncentrace EPS nebo zda by následovalo zpomalení růstu jako u 1. a 3. testu. Koncentrace EPS je zde mnohem vyšší (cca 7200 mg.l⁻¹), a proto se nabízí hypotéza, že kombinace desetinásobného fosfátového pufru společně s minerálním médiem obsahujícím lysin je pro produkci EPS nejvýhodnější. Pokud ale

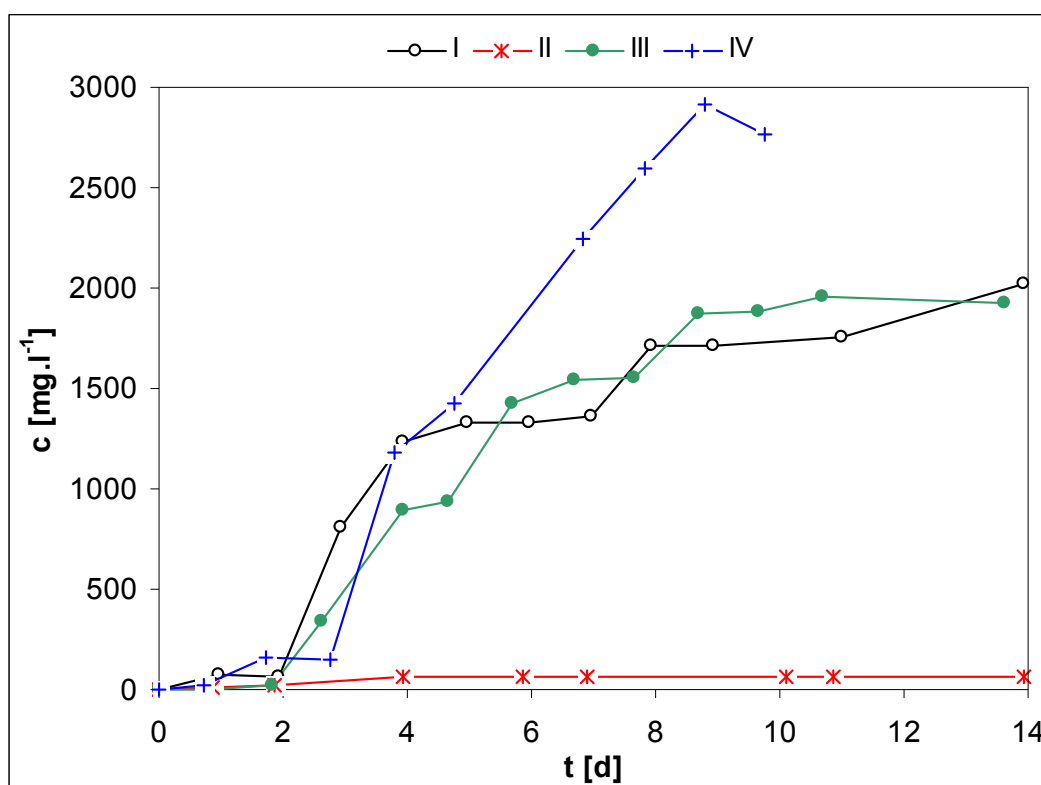
srovnáme viskozity (Obr. 30), nic takového se nepotvrzuje. S vyšší pravděpodobností je naměřená nižší koncentrace EPS u 1. a 3. testu výsledkem postupu. Při prvních třech testech bylo nutné jednotlivé vzorky přechistit pomocí vysrážení EPS, a protože má sražený polymer vynikající adhezi na sklo, došlo pravděpodobně při tomto procesu k nežádoucím ztrátám.

U druhého testu došlo k téměř mizivé tvorbě EPS ve srovnání s ostatními. Tento závěr je v souladu s poznatky s literatury, kde je zdokumentován pozitivní vliv množství kyslíku na tvorbu EPS především u *Agrobacteria Temufaciencis* [31].

Začátek produkce EPS u jednotlivých testů je ovlivněn růstovými křivkami bakterií.

Koncentrace EPS kyselého charakteru stanovené pomocí alciánové modři -Testy I-IV

Srovnání růstu koncentrace EPS kyselého charakteru během kultivace u jednotlivých Testů.



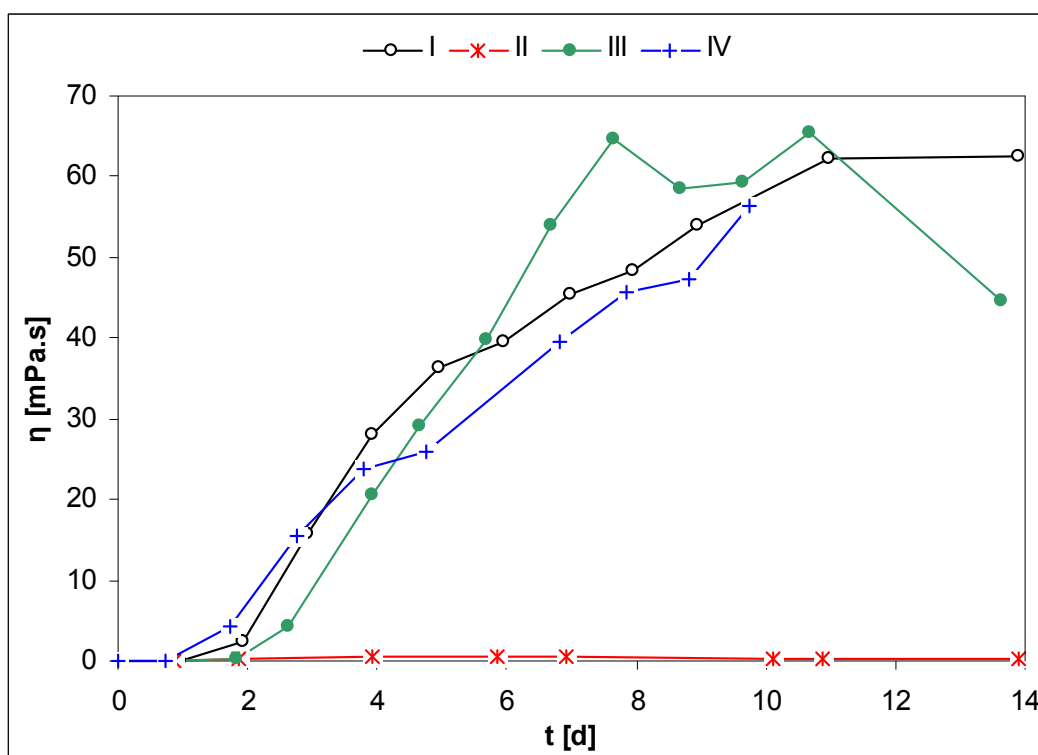
Obr. 29. Kyselý polysacharid vyprodukovaný v čase-Testy I-IV.

Koncentrace EPS kyselého charakteru (Obr.29) opět odpovídá kultivačním podmínkám jednotlivých testů. U druhého testu je téměř mizivá, ve srovnání s ostatními testy, u čtvrtého testu je naopak nejvyšší. Křivky představující koncentraci kyselého EPS u prvního a třetího testu mají velmi podobný tvar. U prvního testu začal dříve růst bakterií, které rov-

něž dříve začaly produkovat EPS, a proto je tato křivka nepatrně posunuta. Srovnáním jednotlivých křivek vyplývá, že od osmého (devátého dne) se koncentrace EPS kyselého charakteru prakticky nemění.

Dynamická viskozita živného média s přítomným EPS – Testy I-IV

Srovnání vývoje dynamické viskozity živného média během kultivace u jednotlivých Testů.



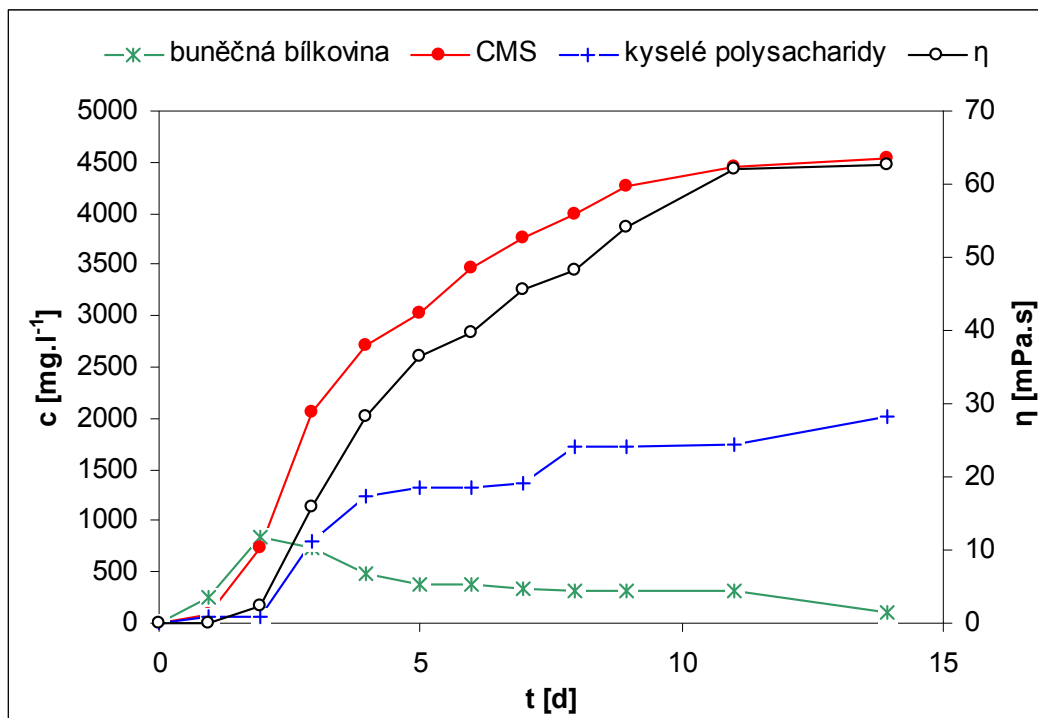
Obr. 30. Dynamická viskozita v závislosti na čase-Testy I-IV.

Charakter křivek reprezentujících dynamickou viskozitu by se měl blížit charakteru křivek vyjadřujících celkovou koncentraci polysacharidů v kultivačním médiu, protože právě produkcí EPS se zahušťuje médium (tento vztah ovšem nemusí být lineární). Rychlý růst viskozity v prvních dnech kultivace a snížení tempa v závěru lze pozorovat u všech testů (kromě Testu II, kde se rovněž konal, ale je natolik mizivý, že není patrný na (Obr. 30)). U ostatních testů se viskozita pohybuje kolem 63 mPa.s v závěrečných dnech kultivace. Výjimečný je Test III u kterého je zaznamenán devátý den pokles viskozity a poslední den dokonce výrazný propad.

Podobný jev byl zaznamenán již u Testu II, (ale tam je opodstatněn výsledky získanými z fenol-sulfátové metody, která rovněž vykazuje pokles EPS). Vzorek již nebylo možno znovu odebrat a závada na viskozimetru je prakticky vyloučena.

Srovnání růstových křivek - Test I

Vývoj jednotlivých ukazatelů, které charakterizují nárůst biomasy a EPS během kultivace.

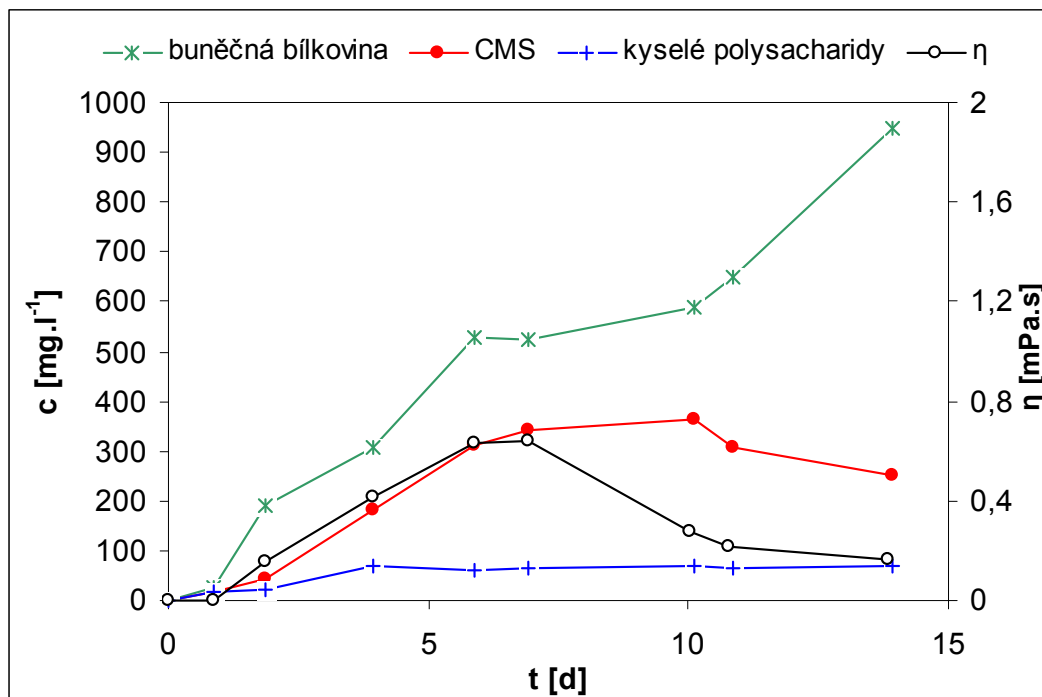


Obr. 31. Křivky růstu koncentrace buněčné bílkoviny a EPS křivek Test I

Nejrychlejší počáteční růst má křivka znázorňující koncentraci buněčné bílkoviny, křivky reprezentující produkci EPS začínají růst později (Obr.31). To odpovídá teoretickým poznatkům, že produkce EPS nastává až ve stacionární fázi růstové křivky [4]. Křivky představující koncentraci celkového množství sacharidů (CMS) a viskozity mají exponenciální tvar, jejich tempo růstu je obdobné. Koncentrace polysacharidů kyselého charakteru se po celou dobu kultivace drží téměř na polovině. Pokud budeme sledovat křivku představující koncentraci buněčné bílkoviny a křivku viskozity po čtvrtém dnu kultivace, kdy viskozita rychle roste nad 30 mPa.s, mohla by právě rostoucí viskozita zhoršovat sedimentaci buněk a tím snižovat naměřenou koncentraci buněčné bílkoviny.

Srovnání růstových křivek - Test II

Vývoj jednotlivých ukazatelů, které charakterizují nárůst biomasy a EPS během kultivace.

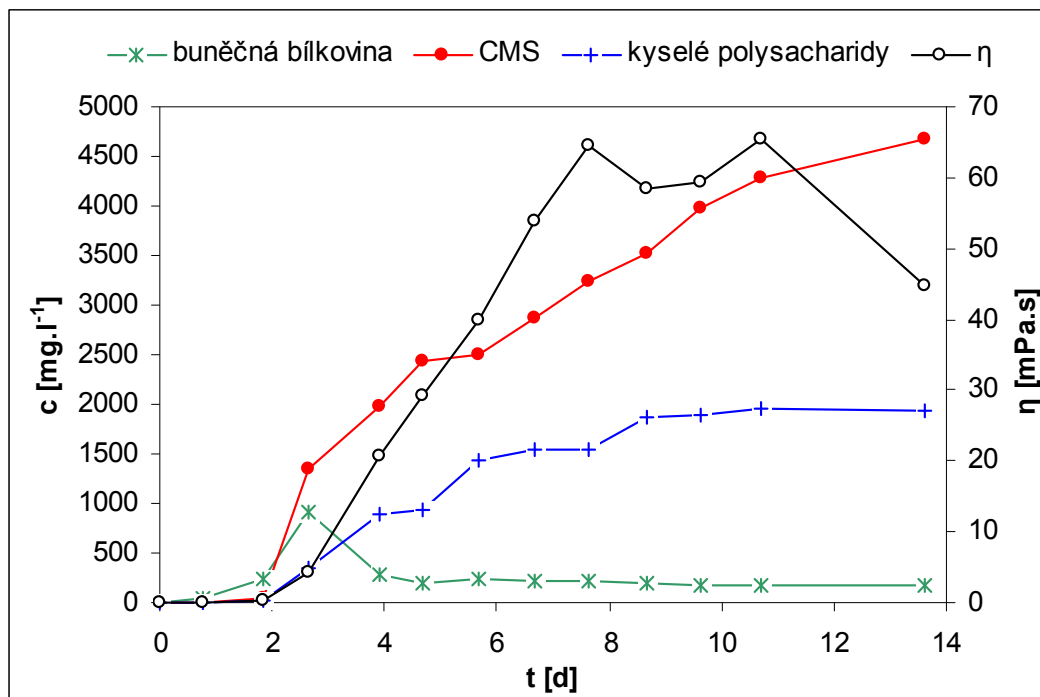


Obr. 32. Křivky růstu koncentrace buněčné bílkoviny a EPS křivek Test II

U druhého testu se projevil nedostatek kyslíku, mikroorganismy spotřebovávaly jeho převážnou část na biosyntézu a vytvářely jen nepatrné množství EPM (Obr.32). Zajímavý je propad viskozity sedmý den, který je následován i poklesem koncentrace EPS o čtyři dny později. V tomto období rovněž začíná růst koncentrace buněčných bílkovin. Vypadá to jako by mikroorganismy rozkládaly vyprodukovaný EPS a použily jej na syntézu, i když je tato hypotéza v rozporu z odbornou literaturou [1]. Pro ověření této hypotézy by byla potřebná další série testů. U Testu II by měla koncentrace buněčné bílkoviny nejuvěrněji vystihovat skutečný vývoj růstu biomasy, protože zde nekomplikuje separaci bakteriálních buněk zvýšená viskozita kultivačního média.

Srovnání růstových křivek - Test III

Vývoj jednotlivých ukazatelů, které charakterizují nárůst biomasy a EPS během kultivace.

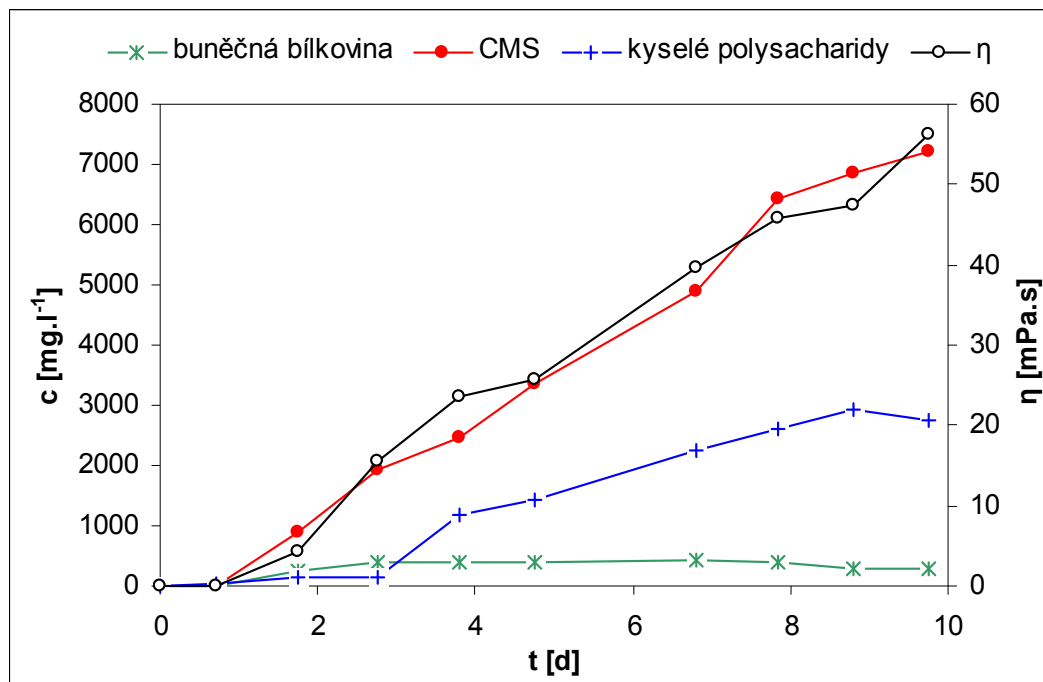


Obr. 33. Křivky růstu koncentrace buněčné bílkoviny a EPS křivek Test III

U Testu III je rovněž zřetelný nejprve růst buněk a poté se zvyšuje koncentrace polysacharidů. Je zde patrný především skokový nárůst celkového množství polysacharidů, viskozita si udržuje lineární charakter růstu až do osmého dne kultivace, poté následuje její propad narozdíl od koncentrace polysacharidů, která naopak roste. U testů I a IV nedocházelo k podobným jevům, koncentrace EPS rostla současně s viskozitou, i když tento vzájemný vztah není lineární (Obr.33).

Srovnání růstových křivek - Test IV

Vývoj jednotlivých ukazatelů, které charakterizují nárůst biomasy a EPS během kultivace.



Obr. 34. Křivky růstu koncentrace buněčné bílkoviny a EPS křivek - Test IV

Test IV nebyl jako jediný přečištěn pomocí vysrážení a následného rozpuštění EPS v destilované vodě. Nedošlo tedy k žádným ztrátám polymeru, analýzy by zde měly být nejpresnější. Křivky vyjadřující viskozitu a koncentraci polymeru rostou téměř lineárně a paralelně. Především u koncentrace celkových sacharidů není zde patrné rychlé tempo růstu v prvních pěti dnech a následné zvolnění v posledních dnech kultivace, jako je tomu především u Testu I. Příčinou může být právě kvasničný autolyzát, který by mohl navodit u mikroorganismů jejich rychlejší růst a produkci EPS [30]. Test byl ukončen předčasně, takže nemůžeme říct, zda by lineární charakter vydržel i dále.

8 CHARAKTERIZACE IZOLOVANÉHO POLYSACHARIDU

Zpravidla po 14 dnech kultivace byl z živného média izolován extracelulární polymer (polysacharid), který pochází z testů I, III a IV. A to tak, že byly nejdříve odseparovány buňky, vysráženy a odseparovány bílkoviny (pouze test III). Přítomný polymer byl vysrážen, přečištěn (opětovným rozpuštěním v destilované vodě a přesrážením) a vysušen (5.4).

8.1 Stanovení množství polysacharidů a bílkovin v EPM

Během vysrážení v acetonu došlo k rozdělení polymeru na dvě frakce, které se dokonale rozdělily do druhého dne (4.3.2). I po přidání dalšího objemu acetonu zůstávala část polymeru na dně. Nebyli jsme si jisti, zda je to důsledek nedostatečného množství acetonu, nebo zda se jedná o dva typy polymeru, které se rozdělili díky svým rozdílným fyzikálním vlastnostem, a proto byly obě frakce přesráženy, sušeny a analyzovány izolovaně. Část EPS, která klesla ke dnu byla označena u všech testů jako **A**, část která plavala na hladině byla označena **B**, obě se výrazně lišily svým vzhledem. Frakce A byla hladká, lesklá, snadno se trhala, postrádala svůj tvar a měla gelový charakter. Plovoucí frakce B měla charakter klubka vláken, byla drsná, matná a na povrchu jevila vláknitou strukturu.

Výtěžek izolovaného EPS

Po vysušení v exsikátoru byl EPS zvážen. Zjistili jsme tak množství pevného podílu, který je přítomen v jednom litru živného média (5.4).

Tab. 34. Stanovení výtěžku izolovaného EPS z 1 litru živného média

Vzorek	V _{ZM} [ml]	m _F [mg]	Frakce [%]	m _i [g]	c _{PS} [g.l ⁻¹]	c _{CMS} [g.l ⁻¹]	Ztráty [%]
A Test I	540	0,1412	6	2,2037	4,0809	4,530	10
B Test I		2,0625	94				
A Test III	520	0,4312	22	1,9357	3,7225	4,681	20
B Test III		1,5045	78				
A Test IV	585	3,3468	83	4,0489	6,9212	7,225	4
B Test IV		0,7021	17				

V_{ZM}, objem živného média před zahájením izolace EPS; m_i, navážka vysušeného EPS; m_F, navážka vysušené frakce; c_{PS} koncentrace EPS v živném médiu; c_{CMS}, koncentrace celkových sacharidů stanovená fenol-sulfátovou metodou v Testech I-III; Ztráty, vypočtené dle rovnice (Rovnice 6), výsledek byl odečten od hodnoty 100;

Poněkud nečekaný je objem kultivačního média, který zůstal po čtrnáctidenní kultivaci v láhvi. Z výchozího jednoho litru bylo odebráno na vzorky k Testům I-IV cca 150 ml. Při kultivaci docházelo ke značnému pění, část média tedy odtekla ven. Dále pravděpodobně docházelo k velkému odparu v důsledku kontinuálního vhnání suchého vzduchu do aparatury (Tab.34).

Pokud srovnáme frakce, na které se EPS rozdělil, zjistíme, že u Kultivačního média K (Test I a III) větší část plavala na hladině, zatímco u Testu IV, kde bylo použito Kultivační

médium L je tento poměr přesně obrácen. U Testu III byla k vysrážení použita trichloroctová kyselina, polymer se hůře srážel a taky separoval.

Srovnáním koncentrací EPS poslední den kultivace Testů I,II,IV (7.) a izolovaného EPS z těchto testů, zjistíme, že ztráty jsou nejvyšší u Testu III, kde byla k izolaci použita trichloroctová kyselina. Ta podstatně zhoršila separaci vysráženého polymeru, který téměř nezmenšil svůj objem, musel být téměř všechn filtrován přes filtr (modrá páska), který měl tendenci se ucpávat. Tyto potíže se objevily i při přesrážení a nevyřešil je ani přídavek dalšího množství acetonu. Z tohoto důvodu jsme tento bod při následujícím testu zavrhl.

Dále jsou překvapivé poměrně nízké ztráty v průběhu izolace, především u Testu IV je velmi nepravděpodobné, že v celém procesu došlo k pouze čtyřprocentním ztrátám, zvláště pokud srovnáme ještě výsledky s hodnotami v (Tab.35). Domníváme se tedy, že EPS pravděpodobně nebyl zcela vysušen.

Složení izolovaného EPS

Vysušený EPS byl rozdrcen ve skleněné třecí misce, 1 mg byl rozpuštěn v destilované vodě, protřepáván v ruce a poté ponechán přes noc v lednici (5.4). Následně byl vzorek podroben spektrofotometrickým analýzám, které měly určit čistotu vzorku.

Tab. 35. Složení extracelulárního polymeru izolované z Testů I,III a IV

Vzorek	m [mg]	m _B [mg]	B [%]	m _{CS} [mg]	CS [%]	m _{KP} [mg]	KP [%]	OS [%]
A Test I	1,05	0,16	15	0,85	81	0,31	30	4
B Test I	1,40	0,12	8	0,67	48	0,25	18	44
A Test III	1,20	0,03	2	0,20	17	0,03	3	81
B Test III	1,00	0,06	6	0,22	22	0,06	6	72
A Test IV	1,10	0,06	6	0,93	84	0,37	37	10
B Test IV	1,30	0,08	6	0,68	52	0,23	17	42

m,navážka polymeru; m_B,hmotnost bílkovin; B, podíl bílkovin v EPM; m_{CS}, hmotnost celkových sacharidů; CS podíl sacharidických sloučenin v EPM; m_{KP}, hmotnost polysacharidů kyselého charakteru; KP, podíl polysacharidů kyselého charakteru v EPM; OS, podíl ostatních složek a nečistot v EPM;

Z (Tab. 35) vyplývá, že izolovaný polymer se skládá z malého množství bílkovin, jejich nejvyšší přítomnost byla zaznamenána u Testu I, což může být způsobeno přítomností kvasničného autolysátu, který se dostatečně neodstranil ani po přesrážení. (Tomu odpovídá i vizuální hodnocení, protože tento EPS měl žluto-hnědou barvu i po přečištění). U Testu III je podíl bílkovin nižší, bílkoviny zde byly odstraněny pomocí trichloroctové kyseliny, ale tento EPS opět může obsahovat kvasničný autolysát. Živné médium s lysinem v Testu IV neruší výrazně stanovení, a proto lze tyto hodnoty považovat za nejpřesnější (Tab.35).

Výsledky analýz polysacharidů jsou více než překvapivé. Vyplývá z nich, že podstatnou část extracelulárního polymeru netvoří polysacharid. Především plovoucí frakce (B) Testů I a IV je tvořena z polysacharidu pouze padesáti procenty. Nejméně polysacharidu bylo naměřeno u Testu III, což může mít na svědomí kyselina trichloroctová, která by mohla reagovat s přítomnými polysacharidy (např. esterifikací). Že se nejedná o analytickou chybu bylo patrné již při přípravě vzorku, neboť u Testů I a IV vytvořil 1 mg EPS v 1 ml vody

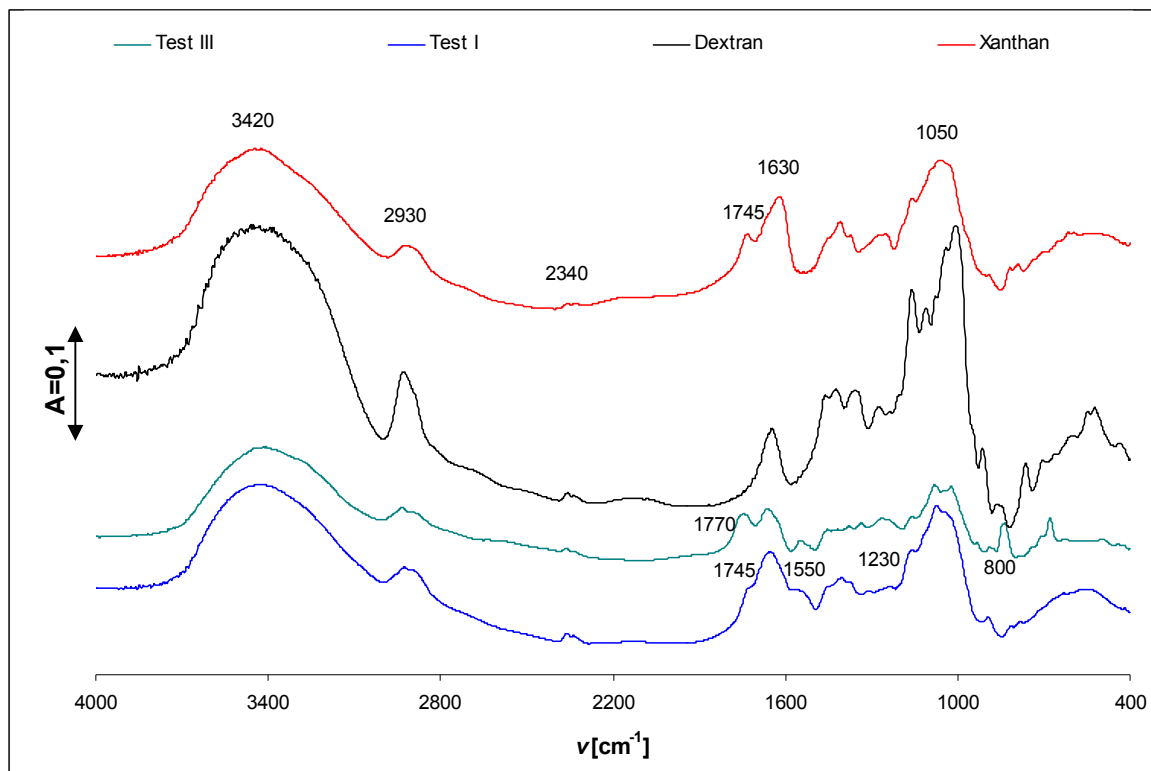
vysoce viskózní gel na rozdíl od Testu III. Vzniklé potíže se srážením bílkovin jsou nečekané, protože prakticky ve všech postupech izolace EPS se tento krok opakuje, tudíž se nedá čekat, že by měl znehodnotit vzniklý produkt. Proto je žádoucí, aby byl tento bod izolace EPS dále testován.

U všech Testů může izolovaný EPS obsahovat chemicky vázanou vodu, kterou jsme nebyli schopni odstranit použitými technikami. V rámci přípravné fáze jsme se pokoušeli izolovaný EPS po předsušení v digestoři (2 h) dosušit v sušárně při 50°C po dobu 1 h. Tento postup se neukázal jako optimální, protože jsme se obávali, že tato teplota by mohla poškodit polymer, který získal po vysušení hnědou barvu. Taky jsme se obávali možné přítomnosti zbytkového rozpouštědla. Jako výhodnější a účinnější způsob sušení by bylo třeba použít lyofilizaci.

8.2 Infračervená spektra extracelulárních polymerů

IČ spektra byla naměřena podle postupu uvedeném v kapitole (5.3.1). Tato metoda vyžaduje, aby byl použit vzorek ve formě jemného prášku, což představuje nemalé potíže při přípravě tablety, neboť rozetření izolovaného EPS na třecí misce vyžaduje značné úsilí.

IČ spektra byla naměřena u všech izolovaných polysacharidů. Ze získaných výsledků jsme zjistili, že se jejich charakter nemění podle změn podmínek v kultivaci (typ substrátu, množství kyslíku), ale v závislosti na izolaci EPS. Pro lepší přehlednost byly vybrány IČ spektra dvou izolovaných EPS z Testu I a Testu III, kde byl postup při izolaci obohacen o vysrážení proteinů pomocí trichloroctové kyseliny (4.3.2.). Pro srovnání jsme stejným způsobem stanovili IČ spektra dalších polysacharidů – xanthanu a dextranu. Výsledky jsou uvedeny na (Obr. 35). Jelikož jde o kvalitativní stanovení, zajímá nás pouze vlnově (ν), při kterém jsou patrné absorpční pásy, ne absolutní hodnota absorbance, proto jsou jednotlivá spektra posunuta na ose y tak, aby se nepřekrývala.



Obr. 35. IČ spektra u vybraných vzorků získaná dle postupu (5.3.1.)

Pokud se budeme dívat na výsledná spektra jako na celek, je na první pohled patrný výrazný rozdíl mezi spektry xanthanu a dextransu. Xanthan se na rozdíl od dextransu nápadně podobá především IČ spektru EPS izolovaného u Testu I. Podle těchto výsledků lze říci, že obě sloučeniny jsou si svým složením blízké [25].

V oblasti charakteristických vibrací funkčních skupin ($4000\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$) je výrazný široký absorpční pás kolem hodnoty vlnočtu 3420 cm^{-1} , způsobený valenční vibrací skupiny O-H (u polysacharidů jde o vliv glykosidické vazby, proto zde byla zjištěna odezva u všech vzorků) [8,25]. Méně výrazný absorpční pás způsobuje C-H vazba u vlnočtu kolem hodnoty 2930 cm^{-1} , který je rovněž společný u všech stanovených vzorků. Další společný absorpční pás kolem hodnoty 2340 cm^{-1} byl patrně vytvořen přítomností CO_2 , kterým byl kontaminován vzorek ze vzduchu, při přípravě tablet a následném měření tablet na přístroji [25]. Pro nás významný vlnočet se nachází kolem hodnoty 1745 cm^{-1} , který by měl být důkazem přítomnosti karboxylových skupin. Karboxylové funkční skupiny dávají extracelulárním polysacharidům jejich kyselý charakter. U xanthanu je jejich vysoké množství indikováno malým ostrým píkem. V EPS, který jsme získali, je menší množství těchto skupin, jak vyplývá ze srovnání spektrofotometrických metod, kde stanovujeme celkovou koncentraci EPS a podíl jeho kyselé části. Pík je na spektru Testu I menší, ale můžeme říci, že tato metoda potvrdila přítomnost karboxylových skupin, protože v opačném případě by byl u vlnočtu 1745 cm^{-1} zaznamenán propad absorbance. Významný pás absorbance v oblasti vlnočtu 1650 cm^{-1} by mohl znamenat přítomnost karboxylové vazby v aminech (peptidická vazba CO-NH) u izolovaného EPS, u xanthanu je pás posunut k hodnotě 1630 cm^{-1} [20]. Tento posun může být určován pevností vazeb a tím také vznikne možnost vět-

ších či menších vibrací. Pás absorpance v oblasti vlnočtu 1550 cm^{-1} by mohl indikovat přítomnost aminocukrů u izolovaného EPS, naproti tomu u xanthanu tento pás zcela chybí [32].

Řada bakteriálních polysacharidů vykazuje v této oblasti absorpční pás 1230 cm^{-1} , který znamená přítomnost sulfoskupin (OSO_3^-). Spektrum Testu I vykazuje nepatrný pík v této oblasti, který by mohl naznačovat jistou přítomnost sulfoskupin, ale jedná se o natolik nevýrazný záznam, že může být způsoben kontaminací (např. z živného média). Naproti IČ spektrum xanthanu vykazuje u hodnoty vlnočtu 1230 cm^{-1} propad absorpance, sulfoskupiny tedy pravděpodobně nevlastní. Pro potvrzení správnosti hypotézy, bychom potřebovali použít jako standard dodecylsulfát sodný, který však nebyl v současné době k dispozici.

Oblast skeletálních vibrací, nazývaná též oblastí „otisků prstů“ ($1500 - 600\text{ cm}^{-1}$), je charakteristická pro každé chemické individuum. Absorpční pásy v této oblasti jsou ovlivněny strukturou molekuly, výrazný pík v oblasti 1050 cm^{-1} je charakteristický pro sacharidy, protože jej způsobuje glykosidická vazba [25,32].

Porovnáním výsledných spekter izolovaných EPS z Testu I a Testu III, zjistíme odlišnosti v oblasti vlnočtu $1770 - 400\text{ cm}^{-1}$. Výrazný absorpční pás u Testu III v oblasti 1770 cm^{-1} by mohl být způsoben přítomností α -halogenesterů. Na první pohled se může zdát (*Obr. 35*), že tento pík je totožný s absorpčním pásem v oblasti 1745 cm^{-1} , který způsobují karboxylové skupiny, při větším zvětšení a bližším ohledání je zřejmé, že jde o dva různé píky. Přítomnost trichloroctové kyselin se pravděpodobně projevila i v oblasti skeletálních vibrací, absorpční pás u vlnočtu 800 cm^{-1} znamená přítomnost C-Cl vazby [25]. IČ spektrum Testu III je téměř totožné s dalšími spektry naměřenými izolovaných EPS stejným způsobem. U různých druhů minerálního média se liší nepatrně tvarem píků v oblasti otisků prstů (nikoliv přítomností či absencí píků). Dále byly měřeny IČ spektra EPS izolovaného z Minerálního média obohaceného o sacharosu (4.1.), v rámci přípravných testů Kultivace I (6.1.1.), který byl vysrážen opět trichloroctovou kyselinou. Přesto naměřené IČ spektrum, je téměř totožné s Testem III. To tedy dokazuje, že rozdíly nejsou výsledkem kontaminace, či nečistot v EPS.

Jednotlivé absorpční pásy byly identifikovány a přiřazeny jednotlivým chemickým vazbám a sloučeninám pomocí odborné literatury, především pak srovnáním získaných spekter se spektry dalších EPS. Aby jsme byli schopni identifikovat jednotlivé sloučeniny podle IČ spektra naprosto spolehlivě, museli by jsme mít k dispozici kompletní elementární analýzu. Pomocí samotného IČ spektra látky nelze s jistotou tvrdit, zda je dotyčná sloučenina opravdu přítomná, protože se píky některých sloučenin mohou nacházet v poměrně širokém rozmezí. IČ spektroskopie je velmi výhodná k potvrzení závěrů získaných elementární analýzou [25,20,32].

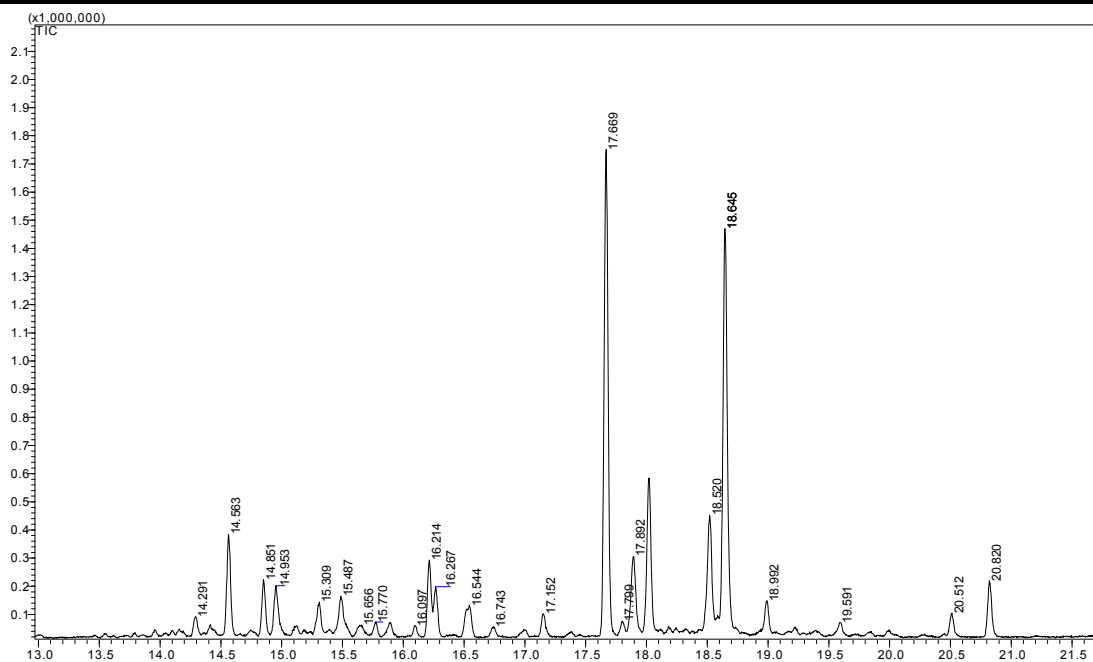
8.3 Výsledky GC-MS analýzy

Analýze byl podroben pouze EPS izolovaný z Testu I (4.3.2), glukosa a xanthan, a to třikrát vedle sebe. Vzorky byly vysušeny pod vakuem a podrobeny hydrolyze která, zrušila glykosidické vazby za vzniku methyl glykosidů. Tyto sloučeniny byly poté derivatizovány dle postupu uvedeného v kapitole (5.3.2.), aby byly převedeny na těkavé deriváty a byl usnadněn jejich přechod do plynné fáze [29].

Pomocí plynové chromatografie jsme získali chromatogram izolovaného EPS, ve kterém jsme po integraci získali hodnoty retenčních časů (R_t) u jednotlivých píků a hmotnostní spektra k nim náležící. Pomocí databáze NIST, která je přímo propojená se systémem vyhodnocování záznamu GC-MS, jsme identifikovali jednotlivé silylované sacharidy dle hmotnostních spekter. Výsledky i míra pravděpodobnosti, že se jedná o daný sacharid jsou uvedeny v tabulce (Tab. 36.).

Tab. 36. Monosacharidy přítomné v EPS izolované z Testu I, identifikované srovnáním hmotnostních spekter v databázi NIST.

Sacharid identifikován jako:	Retenční čas [min]	Pravděpodobnost [%]
Manofuranosa	14,953	84
	15,250	93
Galaktopyranosa	17,669	94
	17,799	85
	17,892	92
	19,591	85
	18,520	81
Manopyranosa	18,992	80

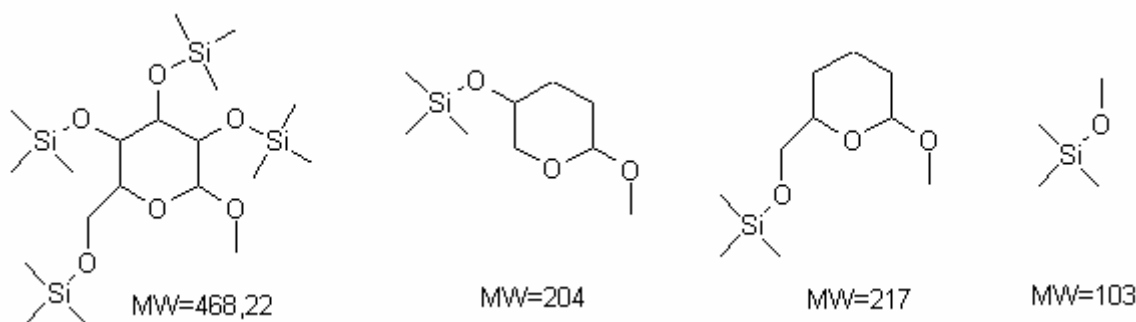


Obr. 36. Chromatogram EPS izolovaného z Testu I

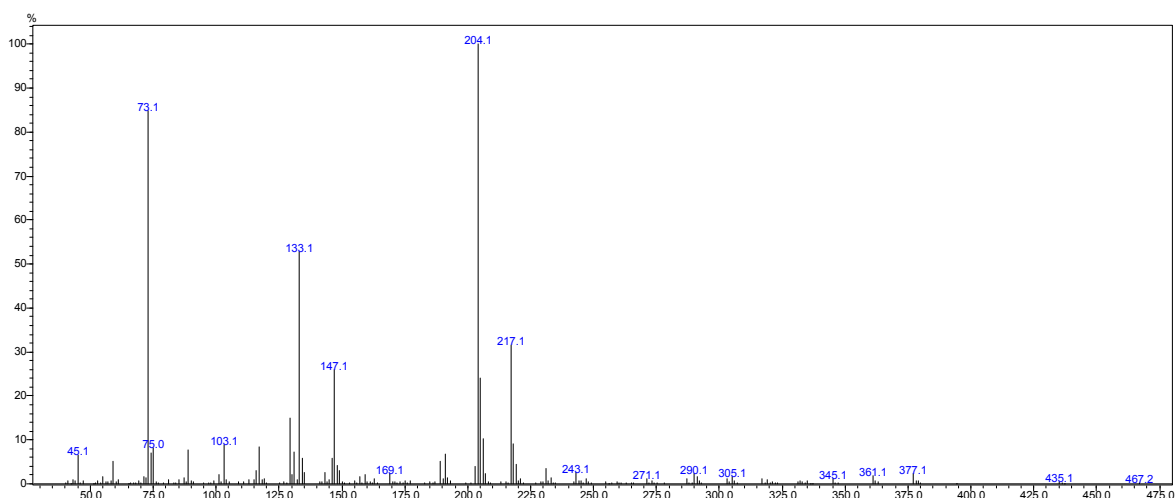
Identifikací hmotnostních spekter jednotlivých píků jsme zjistili, že vzorek obsahuje řadu znečišťujících komponentů, které se vyskytovaly u všech vzorků, proto se domníváme, že pocházejí z chemikálií použitých v přípravné fázi. Vzhledem k tomu, že navážka vzorku je extrémně nízká (100 μg), dosahují tyto kontaminující píky vysokých hodnot (např. R_t , 18,645 – byl dle hmotnostního spektra určen na 92 % jako hexadekanová kyselina).

Identifikované sacharidy podle databáze nelze brát u monosacharidů zcela vážně. Seriozní výsledky bychom získali srovnáním získaných hmotnostních spekter se standardy např. manosa, fukosy, rhamosy či glukuronové kyseliny, které prozatím nebyly k dispozici. Jako standard byla použita pouze glukosa. Proto můžeme s jistotou říct, že hmotnostní spektrum píku pod retenčním časem 17,669 (Obr. 38.), které bylo identifikováno jako galaktopyranosa, ve skutečnosti patří glukose, protože je totožné s tím, které jsme získali u píku daného retenčního času analýzou glukosy.

Silylovaná glukosa s molární hmotností 468,22 se rozpadá při ionizaci na fragmenty, ty byly u hmotnostního spektra identifikovány dle molekulové hmotnosti, (Obr. 37; Obr. 38). Pík s molekulovou hmotností 73,1 patří silanizačnímu činidlu Trisill.



Obr. 37. Silylovaná glukosa a její fragmenty přítomné v hmotnostním spektru

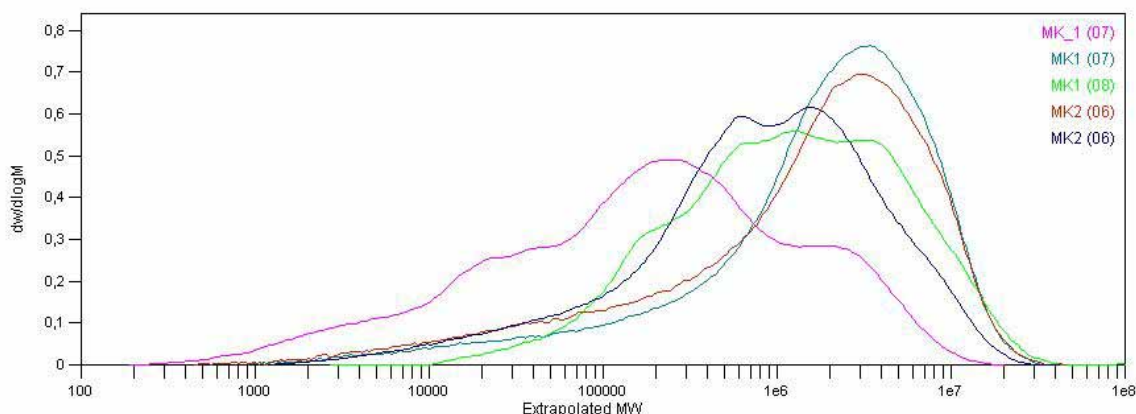


Obr. 38. Hmotnostní spektrum glukosy vytvořené u retenčního času $R_t=17,669$ min

8.4 Výsledky gelové chromatografie

Testovány byly dva vzorky EPS izolovaný z Testu I. Příprava proběhla dvěma způsoby. Vzorek označený jako MK_1, byl rozpouštěn 4 hodiny, vzorky MK1 a MK2 byly rozpouštěny 18 hodin (5.3.3). Dále jsme testovali, zda izolované EPS se při srážení rozdělilo vlivem molekulové hmotnosti, a proto vzorek který klesl ke dnu je na (Obr. 39.) označen jako MK1 a MK_1, křivky pod označením MK2 patří EPS, který ve směsi acetonu a vody plaval. MK1 a MK2 byly testovány paralelně dvakrát vedle sebe. Izolovaný EPS byl mimo kalibraci, proto nejsou výsledné absolutní hodnoty relevantní a nejsou zde uvedeny. Lze stanovit pouze odhad, že molekulová hmotnost polymeru (MW) se pohybuje mezi hodnotami $1 \cdot 10^6 - 3 \cdot 10^6$ Da. Zároveň analýza neprokázala, že se testované vzorky MK1 a MK2 liší v molekulové hmotnosti, na druhou stranu bylo zjištěno, že výsledné hodnoty se mění v závislosti na přípravě vzorku před analýzou, prodloužená doba rozpouštění vedla k vyšší získání MW, zdá se tedy, že za delší dobu došlo k rozpuštění frakce polysacharidu z vyšší MW.

Pro přesné stanovení molární hmotnosti na gelové chromatografii je nezbytné vypracovat postup úpravy vzorku před analýzou a zajistit vhodné standardy.



Obr. 39. Distribuční křivky EPS izolovaných z Testu I.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo vyzkoušet možnosti studia produkce bakteriálních extracelulárních polysacharidů v podmínkách naší laboratoře. Šlo tedy o testování podmínek kultivace, zavádění analytických metod, které umožní sledovat některé významné parametry během kultivace, metody izolace a následné charakterizace vzniklého polymeru.

Úvodní část experimentální práce byla zaměřena na optimalizaci kultivačních podmínek. Základ kultivace tvoří živné médium, které svým složením může významně ovlivnit následující chemické analýzy. Nejprve jsme využili již prověřené minerální médium s kvasničným autolyzátem, u kterého jsme sledovali zvýšení, či snížení produkce EPS při změně substrátu. Výsledkem vynaloženého úsilí bylo dosažení vyšších výtěžků EPS s využitím manitolu a trojnásobné koncentrace fosfátového tlumivého roztoku.

Při analýze vyprodukovaného EPS jsme zaznamenali negativní vliv kvasničného autolyzátu obsaženého v minerálním médiu na kvantitativní analýzy, a proto jsme zaměnili v průběhu experimentální práce Minerální médium K (s kvasničným autolyzátem) za Minerální médium L, jež obsahuje lysin a neruší spektrofotometrické analýzy. Toto živné médium s manitolem a trojnásobnou koncentrací pufru se ukázalo v závěru experimentální práce jako slibné. Bylo také ověřováno množství dostupného kyslíku na produkci EPS. Ukázalo se, že intenzivnější provzdušňování vede k vyšší produkci EPS.

Aby bylo možno sledovat proces produkce EPS při kultivaci *Agrobacteria tumefaciens*, byly zavedeny analytické metody pro stanovení celkového množství sacharidů, množství polysacharidů kyselého charakteru a bílkovin. Jednotlivé metody byly před zahájením série Testů upravovány tak, aby byly proveditelné v měřítku mikrotitračních destiček, jež umožní stanovit absorbanci na spektrofotometru Tecan, který je součástí vybavení katedry. Miniaturizace metod vedla k zefektivnění práce.

V rámci diplomové práce byl vyvinut postup při stanovení celkového množství sacharidů fenol-sulfátovou metodou. V průběhu vývoje metody se podařilo postupně zlepšit parametry kalibrace. Metoda byla uzpůsobena tak, aby při práci s agresivní koncentrovanou kyselinou sírovou nemohlo dojít k poškození spektrofotometru.

Byla také zavedena metoda stanovení kyselých polysacharidů pomocí alciánové modři. Zkoušeli jsme různý poměr činidel a vzorku, nakonec jsme dospěli k závěru, že optimální je postup uvedený v literatuře, pouze jsme upravili pipetované množství vzorku, činidel a přípravu roztoku barviva.

Při stanovení bílkovin bicincholinovou kyselinou docházelo k nestejnomyšlnému odparu z jamek mikrotitrační destičky při kultivaci a tím k různé absorbanci u jednotlivých řad jamek. Pomocí drobných technických opatření jsme zvýšili vlhkost prostředí tak, že k odparu nedocházelo vůbec a nebo jen v takovém množství, které nemělo vliv na přesnost analýzy.

Pomocí těchto tří spektrofotometrických metod jsme sledovali růst EPS v živném médiu. Praktické výsledky analýz jsou shrnuty do grafů, které mapují průběh produkce EPS během kultivace, při sníženém množství kyslíku a u různých druhů živného média. Stanovením celkového množství sacharidů v živném médiu jsme zjistili, že koncentrace EPS se po čtrnácti dnech kultivace pohybuje v rozmezí 4,5 – 7,2 g.l⁻¹. Ze získaných křivek se zdá že exponenciální fáze růstu pravděpodobně nastala po třech dnech kultivace, k zvýšené produkci EPS docházelo až ve stacionární fázi růstu a to v průběhu následujících šesti dnů. Získaný podíl EPS stanovený pomocí metody pro kyselené polysacharidy byl vůči celkovému množství EPS čtyřicetiprocentní.

Dalším stanoveným úkolem bylo navrhnout vhodný postup izolace, který se skládá z vzájemně na sebe navazujících kroků, jež zahrnují separaci bakteriálních buněk, odstranění proteinů, vysrážení, purifikaci a následné vysušení EPS. Jako vhodný byl po provedení předběžných testů zvolen postup vysrážení acetonem. Vyzkoušeli jsme rovněž selektivní odstranění proteinů přidavkem trichloroctové kyseliny (v množství 35 g.l⁻¹). Ukázalo se však, že přidavek trichloroctové kyseliny komplikuje pozdější vysrážení EPS, docházelo ke změně vzhledu, pravděpodobně i fyzikálních vlastností polysacharidu a tím i k jeho horšímu srážení.

Další diskutabilní krok, který způsoboval komplikace, bylo sušení získaného polysacharidu. V našich podmínkách se jako nejvhodnější jevílo předsušení v digestoři a následné dosušení v exsikátoru nad oxidem fosforečným. Předsušení EPS v digestoři je však nouzové řešení, neboť při tomto procesu hrozí zvýšené riziko napadení polymeru plísněmi apod. Optimální (a v odborné literatuře často uskutečňovaná) by byla lyofilizace polysacharidu, kterou jsme ovšem nemohli použít, neboť v naší laboratoři není příslušné zařízení k dispozici.

Provedením izolace jsme získali vysušený EPS v množství, které odpovídá 3,7 – 6,9 g z jednoho litru živného média.

Pomocí dostupných metod jsme se pokusili získaný EPS charakterizovat.

Tabletovou metodou jsme získali IČ spektra EPS, u kterých jsme si ověřili přítomnost kyselých funkčních skupin, jejichž množství jsme stanovili pomocí alciánové modří. Zjistili jsme, že největší úskalí této metody se skrývá v přípravě vzorku, který se musí dokonale roztříit na jemný prášek. Spektrum získaného EPS velmi připomíná spektrum xanthanu, a proto se domníváme, že oba polysacharidy si mohou být blízké svým složením.

Pro charakterizaci našeho EPS jsme se pokusili využít i GC-MS analýzy. Tento experiment však přinesl rozporné výsledky, podařilo se pouze identifikovat některé signály monosacharidových komponent. Aby bylo možné vyvodit nějaké závěry ze získaných výsledků této metody, je nezbytné mít k dispozici sadu standardů možných monosacharidů.

Izolovaný EPS byl podroben analýze gelovou permeační chromatografií s cílem získat distribuční křivku jeho molekulové hmotnosti. Ukázalo se, že izolovaný EPS se vyznačuje širokou distribuční křivkou molekulové hmotnosti v oblasti 1.10⁶ -3. 10⁶ Da. Pro získání

lepších výsledků bude nezbytné vypracovat přesnější metodiku postupu přípravy vzorku před analýzou.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] RUAS-MADIEDO P., DE LOS REYES-GAVILAN C G.: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. American Dairy Science Association 2005; 88, 843-856
- [2] DE VUYST L., DEGGEST B.: Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS. Microbiology Reviews 1999; 23,153-177
- [3] FRAVSSE N., COUDERS F., POINSOT V.: Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. European Journal of Biochemistry 2003; 270,1365
- [4] SUTHERLAND W. I.: Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. International Dairy Journal 2001; 11, 663-674
- [5] BOHIN J.P.: Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. FEMS Microbiology Letters 2000; 186, 11-19
- [6] KOMANIECKA I., CHOMA A.: Isolation and characterization of periplasmic cyclic β -glucans of Azorhizobium caulinodans. FEMS Microbiology Letters 2003; 227, 263-269
- [7] DE PHILIPPIS R., VINCENZINI M.: Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. FEMS. Microbiology Reviews 1998; 22,151-175
- [8] VELASCO S., ARKOLD E., PAESE M., GRAGE H., IRASTORZA A., RADSTROM P., VAN NIEL E.W.J.: Environmental factors influencing growth of and exopolysaccharide formation by *Pediococcus parvulus*. FEMS Microbiology Letters 2006; 128
- [9] GARCÍA-OCHOA F., SANTOS V.E., CASA. J.A., GÓMEZ E.: Xanthan gum: production, recovery, and properties. Biotechnology Advances 2000; 18, 549-579
- [10] GARNIER CH., GORNER T., GUINOT-THOMAS P., CHAPPE P., de DONATO PH.: Exopolymeric production by bacterial strains isolated from activated sludge of paper industry. Water research 2006; 40: 3115-3122
- [11] KACHLANY S.C., LEVERY S.B., KIM J.S., REUHS B.L., LION L.W., GRIORSEL W.C.: Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. Environmental Microbiology 2001; 3 ,774-784
- [12] MONSAN P., BOZONNET., ALBENNE C., JOUCLA G., WILLEMOT R., SIMÉON M.: Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. International Dairy Journal 2001; 11, 675-685
- [13] MATSUKAWA S., WATANABE T.: Gelation mechanism and network structure of mixed solution of low- and high- acyl gellan studied by dynamic viscoelasticity, CD and NMR measurements. Food Hydrocolloids 2007; 21, 1355-1361
- [14] PELOSI L., BULONE V., HEUX .: Polymorphism of curdlan and (1-3)- β -D-glucans synthesized in vitro and X-ray diffraction analysis. Carbohydrate Polymers 2006; 66, 199-207

- [15] JIN Y., ZHANG H., YIN Y., NISHINARI K.: Comparison of curdlan and its carboxymethylated derivative by means of Rheology, DSC, and AFM. *Carbohydrate Research* 2006; 341, 90-99
- [16] MCKELLAR R.C., VAN GEEST J., CUI W.: Influence of and environmental conditions on the composition of exopolysaccharide produced by *Agrobacterium radiobacter*. *Food Hydrocolloids* 2003; 17: 429-437
- [17] ZEVENHUIZEN L.P.T.M.: Succinoglycan and galactoglucan. *Carbohydrate Polymers* 1997; 33: 139-144
- [18] RAMEY B.E., MATTHYSSE A.G., FUQUA C.: The FNR-type transcriptional regulator SinR controls maturation of *Agrobacterium tumefaciens* biofilms. *Molecular Microbiology* 2004;52,1495-1511
- [19] MONHEIT G.D., COLEMAN K.M.: Hyaluronic acid fillers. *Dermatologic Therapy* 2006;Vol. 19, 141-150
- [20] ORTEGA-MORALES B.O., SANTIAGO-GARCÍA J.L., CHAN-BACAB M.J., MOPPERT X., MIRANDA-TELLO E., FARDEAU M.L., CARRERO J.C., BARTOLO-PÉREZ P., VALADÉZ-GONZÁLEZ A., GUEZENNEC J.: Characterization of extracellular polymers synthesized by tropical intertidal biofilm bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 2006; ISSN 1364-5072
- [21] VERMANI M.V., KELKAR S.M., KAMAT M.Y.: Studies in polysaccharide production and growth of *Azobacter vinelandii* MTCC 2459, a plant rhizosphere isolate. *Letters in Applied Microbiology* 1997; 24: 379-383
- [22] DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry* 1955
- [23] RAMUS J.: Alcian Blue: A quantitative aqueous assay for algal acid and sulfated polysaccharides. *I. Phycol* 1977; 13, 345-348
- [24] CAÑIZARES-MACÍAS P., HERNÁNDEZ-GARCIADIEGO L., GÓMEZ-RUÍZ H.: An automated flow injection analysis procedure for the determination of reducing sugars by DNSA Method. *Journal of food science* 2001; 66: 407-411
- [25] MILATA V., SEGLA P.: *Spektrálne metódy v chémii*. STU Bratislava 2004; ISBN 80-227-2049-6
- [26] BAROŠOVÁ E.: Růstové a metabolické vlastnosti vybraných mikroorganismů izolovaných z aktivovaného kalu s viskózním bytřením. *Studentská vědecká práce*. Zlín:UTB ve Zlíně, 2004. 25 str.
- [27] SMITH P.K.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Foreign Patent Documents* 1960; 436/80,86,87,88,164
- [28] Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay (Smith) [online], 20.10.2004, dostupné na www:
<<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/bca.html>>
- [29] LAUS M.C., LOGMAN T.J., VAN BRUSSEL A.N., CARLSON R.W., AZADI P., GAO M., KIJNE J.W.: Involvement of *exo5* in Production of Surface Polysaccharides in *Rhizobium leguminosarum* and Its Role in Nodulation of *Vicia sativa* subsp. *nigra*. *Journal of Bacteriology* 2004; Vol. 186, No. 19, 6617-6625

- [30] GORRET N., MAUBOIS J.L., ENGASSER J.M., GHOUL M.: Study of the effects of temperature, pH and yeast extract on growth and exopolysaccharides production by *Propionibacterium acidipropionici* on milk microfiltrate using a response surface methodology. *Journal of Applied Microbiology* 2001;90:788-796
- [31] LEE I.Y., KIM M.K., LEE J.H., SEO W.T., JUNG J.K., LEE H.W., PARK Y.H.: Influence of agitation speed on production of curdlan by *Agrobacterium* species. *Bioprocess Engineering* 1999; 20, 283-287
- [32] NOCHOLS C.A.M., GARON S., BOWMAN J.P., RAGUÉNÉS G., GUÉZENNEC J.: Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. *Journal of Applied Microbiology* 2004; 96, 1057-1066

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

EPS	Extracelulární polysacharidy.
EPM	Extracelulární polymer.
HA	Hyaluronová kyselina.
R	Ramusova (metoda)
FS	Fenol-sulfátová (metoda)
BCA	Bicincholinová kyselina
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostním spektroskopii
MM K	Minerální médium s kvasničným autolyzátem
MM L	Minerální médium s lysinem
KA	Kvasničný autolyzát
IČ	Infračervené
UIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
FT-IR	Fourierova transformační infračervená spektroskopie

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Struktura cyklických β -glukanů <i>Escherichia coli</i> a <i>Agrobacteria tumefaciens</i> [5].	12
Obr. 2. Struktura xanthanu produkovaného	17
Obr. 3. Struktura dextransu syntetizovaného	17
Obr. 4. Struktura alternanu syntetizovaného	17
Obr. 5. Struktura gelanu syntetizovaného <i>Sphingomonas elodea</i> [13].....	18
Obr. 6. Struktura kurdlanu syntetizovaného	18
Obr. 7. Struktura succinoglycanu syntetizovaného druhu <i>Agrobacterium spp.</i> a <i>Rhizobium meliloti</i> [4]	19
Obr. 8. Struktura hyaluronové kyseliny syntetizované.....	19
Obr. 9. Schéma aparatury použité pro kultivaci u Testů I-IV	28
Obr. 10. Kalibrační závislost standardu bílkoviny-příprava.....	32
Obr. 11. Kalibrační závislost standardu bílkoviny- modifikovaný postup.	33
Obr. 12. Kalibrační závislost pro výpočet celkového množství sacharidů.....	35
Obr. 13. Kalibrační závislost pro výpočet polysacharidů kyselého charakteru.....	37
Obr. 14. Srovnání IČ spekter xanthanu v přirozené formě a po úpravě na třecí misce.....	39
Obr. 15. Koncentrace buněčné bílkoviny v závislosti na čase kultivace – Test I.	53
Obr. 16. Množství polysacharidu vyprodukované danou kulturou v čase-Test I.....	55
Obr. 17. Růst viskozity v jednotlivých dnech kultivace – Test I.....	57
Obr. 18. Koncentrace buněčné bílkoviny v závislosti na době kultivace – Test II.	58
Obr. 19. Množství polysacharidu vyprodukované danou kulturou v čase-Test II.....	60
Obr. 20. Růst viskozity v jednotlivých dnech kultivace – Test II.	61
Obr. 21. Koncentrace buněčné bílkoviny v závislosti na době kultivace – Test III.	63
Obr. 22. Množství polysacharidu vyprodukované danou kulturou v čase-Test III.	65
Obr. 23. Růst viskozity v jednotlivých dnech kultivace – Test III.	66
Obr. 24. Koncentrace buněčné bílkoviny v závislosti na době kultivace – Test IV.....	68
Obr. 25. Množství polysacharidu vyprodukované danou kulturou v čase-Test IV.....	70
Obr. 26. Růst viskozity v jednotlivých dnech kultivace – Test IV.....	71
Obr. 27. Koncentrace buněčné bílkoviny v čase-Testy I-IV.	72
Obr. 28. Množství polysacharidu vyprodukované danou kulturou-TestyI-IV.	73
Obr. 29. Kyselý polysacharid vyprodukovaný v čase-Testy I-IV.	74

Obr. 30. Dynamická viskozita v závislosti na čase-Testy I-IV.	75
Obr. 31. Křivky růstu koncentrace buněčné bílkoviny a EPS křivek Test I.....	76
Obr. 32. Křivky růstu koncentrace buněčné bílkoviny a EPS křivek Test II	77
Obr. 33. Křivky růstu koncentrace buněčné bílkoviny a EPS křivek Test III.....	78
Obr. 34. Křivky růstu koncentrace buněčné bílkoviny a EPS křivek - Test IV	79
Obr. 35. IČ spektra u vybraných vzorků získaná dle postupu (5.3.1.)	83
Obr. 36. Chromatogram EPS izolovaného z Testu I.....	85
Obr. 37. Silylovaná glukosa a její fragmenty přítomné v hmotnostním spektru	86
Obr. 38. Hmotnostní spektrum glukosy vytvořené u retenčního času $R_t=17,669$ min.....	86
Obr. 39. Distribuční křivky EPS izolovaných z Testu I.	87

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Objem pipetovaného standardu bílkoviny do mikrotitrační destičky.....	31
Tab. 2. Absorbance v závislosti na koncentraci bílkoviny [28] - příprava.....	32
Tab. 3. Absorbance v závislosti na koncentraci bílkoviny – modifikovaný postup.....	33
Tab. 4. Objem pipetovaného standardu bílkoviny při získání kalibrační rovnice.....	34
Tab. 5. Objem pipetovaného standardu xanthanu do mikrotitrační destičky – FS metoda	34
Tab. 6. Absorbance v závislosti na koncentraci xanthanu-kalibrace FS metody	35
Tab. 7. Objem pipetovaného standardu xanthanu do mikrotitrační destičky – R metoda.....	36
Tab. 8. Absorbance v závislosti na koncentraci xanthanu – kalibrace R metody	37
Tab. 9. Vliv různých kultivačních podmínek na viskozitu – Kultivační test I.....	44
Tab. 10. Sledování viskozity v závislosti na čase – Kultivační test II	45
Tab. 11. Dynamická viskozita v závislosti na různé koncentraci KA – Kultivační test III.....	46
Tab. 12. Sledování viskozity v závislosti na různé síle pufru	47
Tab. 13. Vzhled roztoku ve zkumavce po přidavku různých činidel	47
Tab. 14. Koncentrace buněčné bílkoviny u různých podmínek centrifugace ($\eta = 29$ mPa.s).....	49
Tab. 15. Koncentrace buněčné bílkoviny u různých parametrů centrifugace ($\eta = 60$ mPa.s).....	49
Tab. 16. Srovnání absorbance u různých chemikálií o shodné koncentraci – FS metoda	50
Tab. 17. Srovnání absorbance u různých chemikálií o shodné koncentraci – R metoda	51
Tab. 18. Koncentrace buněčné bílkoviny v kultivačních dnech - Test I	53
Tab. 19. Celkové množství polysacharidu měřeno fenol-sulfátovou metodou – Test I.....	54
Tab. 20. Polysacharid kyselého charakteru stanovený pomocí alciánové modři – Test I.....	55
Tab. 21. Stanovené hodnoty dynamické viskozity v čase – Test I.....	56
Tab. 22. Koncentrace buněčné bílkoviny v kultivačních dnech - Test II.....	58
Tab. 23. Celkové množství polysacharidu měřeno fenol-sulfátovou metodou – Test II.....	59

Tab. 24. Polysacharid kyselého charakteru stanovený pomocí alciánové modři – Test II	59
Tab. 25. Stanovené hodnoty dynamické viskozity v čase – Test II.....	61
Tab. 26. Koncentrace buněčné bílkoviny v kultivačních dnech - Test III.....	62
Tab. 27. Celkové množství polysacharidu měřeno fenol-sulfátovou metodou – Test III	64
Tab. 28. Polysacharid kyselého charakteru stanovený pomocí alciánové modři – Test III	64
Tab. 29. Stanovené hodnoty dynamické viskozity v čase – Kultivace III.....	66
Tab. 30. Koncentrace buněčné bílkoviny v kultivačních dnech - Test IV	67
Tab. 31. Celkové množství polysacharidu měřeno fenol-sulfátovou metodou – Test IV	69
Tab. 32. Polysacharid kyselého charakteru stanovený pomocí alciánové modři – Test IV	69
Tab. 33. Stanovené hodnoty dynamické viskozity v čase – Kultivace IV	70
Tab. 34. Stanovení výtěžku izolovaného EPS z 1 litru živného média	80
Tab. 35. Složení extracelulárního polymeru izolované z Testů I,III a IV	81
Tab. 36. Monosacharidy přítomné v EPS izolované z Testu I, identifikované srovnáním hmotnostních spekter v databázi NIST.	85