

Příprava karboxymethyl chitin-glukanového komplexu ze *Schizophyllum commune*

Bc. Věra Krpatová

Diplomová práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav analýzy a chemie potravin
akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Věra KRPATOVÁ**
Osobní číslo: **T10524**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Příprava karboxymethyl chitin–glukanového komplexu ze *Schizophyllum commune***

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizujte *Schizophyllum commune*
2. Popište chitin–glukanový komplex jako výchozí substrát pro karboxymethylační reakci
3. Charakterizujte a popište karboxymethylační reakce polysacharidů

II. Praktická část

1. Připravte a charakterizujte chitin–glukanový komplex jako výchozí substrát pro karboxymethylační reakci
2. Stanovte vliv doby reakce a reakčních složek na poměr rozpustné a nerozpustné části produktu a stupeň karboxymethylace nerozpustné části
3. Charakterizujte připravený karboxymethyl chitin–glukanový komplex

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. **NATTAPULWAT N., PURKKAO N., SUWITHAYAPAN O. (2009) Preparation and Application of Carboxymethyl Yam (Dioscorea esculenta) Starch AAPS PharmSciTech, Vol. 10, No. 1.**
2. **BOHARI YAACOB, MOHD CAIRUL IQBAL MOHD AMIN, KAMARUDDIN HASHIM, BUKHORI ABU BAKA. 2011. Optimization of Reaction Conditions for Carboxymethylated Sago Starch. Iranian Polymer Journal. V.20 (3). 195-204.**
3. **JAYAKUMAR R., PRABAHARAN M., NAIR S.V., TOKURA S., TAMURA H., SELVAMURUGAN N. (2010) Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. Progress in Materials Science. V.55. 675-709.**
4. **EFANOV M. V., POPOVA A. A. (2011) Carboxymethylation of peat by monochloroacetic acid. Chemistry of Natural Compounds, Vol. 47 (3). 498-500.**

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

6. ledna 2012

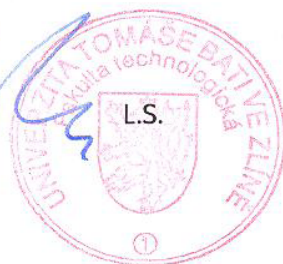
Termín odevzdání diplomové práce:

21. května 2012

Ve Zlíně dne 15. února 2012



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan





doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 2.5. 2012



.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo připravit karboxymethyl chitin glukánový komplex. Pro jeho přípravu bylo využito mycelium vyšší houby *Schizophyllum commune*. Z mycelia byl izolován chitin-glukanový komplex, který je znám díky své biologické aktivitě a sorpčním vlastnostem. Komplex nachází uplatnění ve farmaceutickém, kosmetickém průmyslu a potravinářství. Po karboxymethylaci bylo dosaženo nejen očekávaného zlepšení nasáklivosti a zgelovatění kopolymeru, ale zvýšila se i schopnost absorpce měďnatých iontů a to trojnásobně.

V práci je popsána submerzní kultivace *S. commune*, charakterizace chitin-glukanového komplexu a je sledován vliv podmínek karboxymethylace. Produkt byl charakterizován na základě fyzikálních vlastností.

Klíčová slova: *Schizophyllum commune*, glukany, chitin/chitosan-glukanový komplex, karboxymethylace.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to prepare carboxymethyl chitin glucan complex. The mycelium of higher fungus *Schizophyllum commune* was used as a substrate for carboxymethyl chitin glucan complex preparation. Chitin-glucan complex, which is known for its biological activity and sorption properties, was isolated from mycelium. The complex is used in pharmaceutical, cosmetic and food industries. Carboxymethylation resulted in better sorption and gel formation of the copolymer. Copper ion absorption increased three times.

Submerged cultivation of *S. commune* is described and characteristics of chitin-glucan complex and the effect of reaction conditions on CGC carboxymethylation are observed. The physical properties of the obtained carboxymethyl CGC were characterized.

Keywords: *Schizophyllum commune*, glucanes chitin/chitosan glucan complex, carboxymethylation,

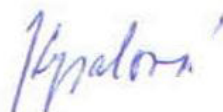
Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D. za ochotu a odborné vedení. Mému konzultantovi Dzionisovi Smirnou, Ph.D. za odborné připomínky, pomoc a čas, který mi věnoval při zpracování diplomové práce. Kolegům Ing. Evě Procházkové a Ing. Martinovi Krčmářovi za řadu cenných připomínek a podnětů.

Ráda bych také poděkovala své rodině a zvláště pak manželovi za pochopení a podporu při studiu.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně 2.5. 2012



.....

podpis

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 CHARAKTERIZACE HUB	12
1.1 ROZDĚLENÍ HUB	12
1.2 BUNĚČNÁ STĚNA	13
1.2.1 β - glukany.....	14
1.3 <i>SCHIZOPHYLLUM COMMUNE</i>	18
1.4 BUNĚČNÁ STĚNA <i>SCHIZOPHYLLUM COMMUNE</i>	19
2 CHITIN-GLUKANOVÝ KOMPLEX	22
3 KARBOXYMETHYLAČNÍ REAKCE POLYSACHARIDŮ	23
3.1 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KARBOXYMETHYLACI.....	25
4 VLASTNOSTI KARBOXYMETHYLOVANÉHO KOMPLEXU	27
4.1 BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI.....	27
4.2 REOLOGICKÉ VLASTNOSTI.....	28
II PRAKTICKÁ ČÁST	29
5 CÍL PRÁCE.....	30
6 MATERIÁLY A METODY	31
6.1 PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A CHEMIKÁLIE	31
6.2 PŘÍPRAVA KARBOXYMETHYL CHITIN-GLUKANOVÉHO KOMPLEXU	33
6.2.1 Příprava mycelia.....	33
6.2.2 Příprava chitin-glukanového komplexu	34
6.2.3 Karboxymethylace CGC	35
6.3 TESTOVÁNÍ MOŽNOSTÍ OVLIVNĚNÍ KARBOXYMETHYLACE	35
6.3.1 Kyselina monochloroctová a její sodná sůl.....	35
6.3.2 Poměr voda/IPA	36
6.3.3 Množství přidaného NaOH	36
6.4 METODY ANALÝZ.....	36
6.4.1 Stanovení obsahu sacharózy a glukózy	36
6.4.2 Stupeň substituce.....	37
6.4.3 Stanovení obsahu glukózaninu.....	37
6.4.4 Sorpční kapacita	38
6.4.5 IČ spektrum	39
6.4.6 Analýza struktury vzorků	39
6.4.7 Analýza rheologických vlastností	40
7 VÝSLEDKY A DISKUZE	41
7.1 KULTIVACE <i>SCHIZOPHYLLUM COMMUNE</i>	41
7.2 CHARAKTERISTIKA CHITIN-GLUKANOVÉHO KOMPLEXU	43
7.3 KARBOXYMETHYLACE CHITIN-GLUKANOVÉHO KOMPLEXU	45
7.3.1 Vliv použití kyseliny monochloroctové a její sodné soli	45
7.3.2 Vliv poměru vody/IPA.....	47
7.3.3 Vliv množství přidaného NaOH a doby reakce	48
7.3.4 Optimalizovaný postup karboxymethylace.....	51

7.4 CHARAKTERISTIKA KARBOXYMETHYL CHITIN-GLUKANOVÉHO KOMPLEXU	52
ZÁVĚR	55
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	56
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	62
SEZNAM OBRÁZKŮ	63
SEZNAM TABULEK	64

ÚVOD

Chitin-glukanový komplex je kopolymer získávaný z buněčné stěny hub. Díky výrazné biologické aktivitě a sorpčním vlastnostem nachází uplatnění ve farmaceutickém, kosmetickém průmyslu a potravinářství. Komplex se skládá z β -(1,3/1,6)-glukanu nebo glukanu, kovalentně spojeného s chitinem. Pro beta-glukany hub jsou prokázány imunomodulační, protinádorové, protizánětlivé, antimikrobiální, antivirové, antioxidační, radioprotekční účinky. Chitin a jeho neacetylovaný derivát chitosan jsou vyhledávanými biopolymery, pro vysoký obsah nukleofilních skupin jsou využívány např. pro sorpci těžkých kovů. Díky své polykationické struktuře mají silnou antibakteriální a antifungální aktivitu.

Chitin-glukanový komplex je nerozpustný ve vodě. Jeho biologická aktivita a sorpční vlastnosti jsou podmíněny především interakcí s povrchem mikrovláken. Dá se očekávat, že se zvětšením aktivního povrchu mikrovláken bude docházet k zlepšení užitečných vlastností chitin-glukanového komplexu. Pro navýšení aktivního povrchu CGC může být použita povrchová karboxymethylace mikrovláken. Předpokládaným výsledkem je zlepšení nasákavosti a zgelovatění kopolymeru.

V rámci diplomové práce bude prozkoumaná možnost použití submersního mycelia *Schizophyllum commune* pro výrobu karboxymethyl chitin-glukanového komplexu. Bude sledován vliv parametrů chemické reakce na karboxymethylaci CGC a popsány fyzikální vlastnosti karboxymethyl chitin-glukanového komplexu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERIZACE HUB

Houby tvoří jednu z pěti samostatných říší živých organismů, která se nazývá *Fungi* [1]. Původně byly součástí rostlinné říše jako nezelené rostliny [2]. Jsou to jedno- a více buněčné, eukaryotické organismy, které se vyznačují převážně saprotrofním způsobem výživy [1]. Nemohou asimilovat CO₂, neboť jim chybí fotosyntetická barviva. Plodnice hub tvoří jednoduchá pletiva složená z hubových vláken, tzv. hyf, jejichž stěny obsahují hlavně chitin [2]. V ekosystémech představují destruenty rozmanitých látek organického původu, jako je celulóza, lignin, keratin apod. Malá část z více jak 300 tisíc odhadovaného počtu hub se adaptovala k parazitismu. Vedle nežádoucích vlivů je řada druhů hub využívána v průmyslové výrobě potravin (pivo, víno sýry), léků (antibiotika, imunosupresiva, alkaloidy), organických látek (kyseliny, alkohol, enzymy, vitamíny), ale i pro genetické a metabolické (biotransformační) studie [1].

Houby jsou chemoheterotrofní organismy, jejichž metabolismus je uzpůsoben k získávání energie intermediálních sloučenin z látek organického původu. Živiny přijímají houby absorpcí. Vedle primárního metabolismu je pro houby charakteristická produkce a sekrece velkého a různorodého počtu sekundárních metabolitů, jejichž funkce a potenciální využití nebylo dosud zkoumáno. Houby mají eukaryotickou stavbu, čímž se více podobají savčím buňkám než bakteriím [1].

1.1 Rozdělení hub

Z hlediska léčebného i potravinářského využití mají pro člověka význam druhy s makroskopickými plodnicemi, které patří do dvou tříd – *Ascomycota* a *Basidiomycota*:

Ascomycetes (houby vřeckaté, vřeckovýtrusné), jsou mnohobuněčné houby s článkovaným myceliem. Jsou typické pohlavním rozmnožováním za vzniku vřecek, tvořících se zpravidla v plodnicích. Vřecka produkují výtrusy (askospory). Řada druhů se vyskytuje i v konidiové formě, např. štetičkovec žlutavý (*Penicillium chrysogenum*), produkující známé antibiotikum účinné vůči stafylokokům. Patří sem také významná plíseň kropidlák rýžový (*Aspergillus oryzae*), tvořící enzymy lipázu a amylázu [2]. Ty se například podílejí na výrobě sójové omáčky, ale také rýžového vína. Touto plísní fermentovaná rýže má silné protinádorové účinky. Dále sem patří také kvasinky, padlí, z pěstovaných hub potom lanýž černovýtrusý (*Tuber melanosporum*) [2].

Bazidiomycetes, (houby stopkaté, stopkovýtrusé), jsou s myceliem většinou dvoujaderným, na kterém se za příznivých podmínek tvoří plodnice produkující kyjovité bazidie. Na nich se následně vytvářejí výtrusy (bazidiospory). Do této třídy patří všechny nejvýznamnější druhy léčivých hub. Tato třída má tři důležité řády:

- chorošovitě, *Aphyllphorales (Polyporales)*, který tvoří hlavně dřevní saprofité a parazité, např. rody trsnatec (*Grifola*), choroš (*Polyporus*), poenatka (*Poria*) aj.
- lupenotvaré, *Agaricales*, je z většiny zastoupený saprofyty a také mykorhizními druhy. Patří sem většina pěstovaných hub, např. rody hlíva (*Pleurotus*), houževnatec (*Letntinula*), nebo žampion (*Agaricus*),
- hřibovitě, *Boletales*, je posledním významným řádem, typickým mykorhizou, kdy jsou houby vázány na určité rostliny. Jsou to u nás nejznámější a nejvíce sbírané i pojídané hřibovité houby [2].

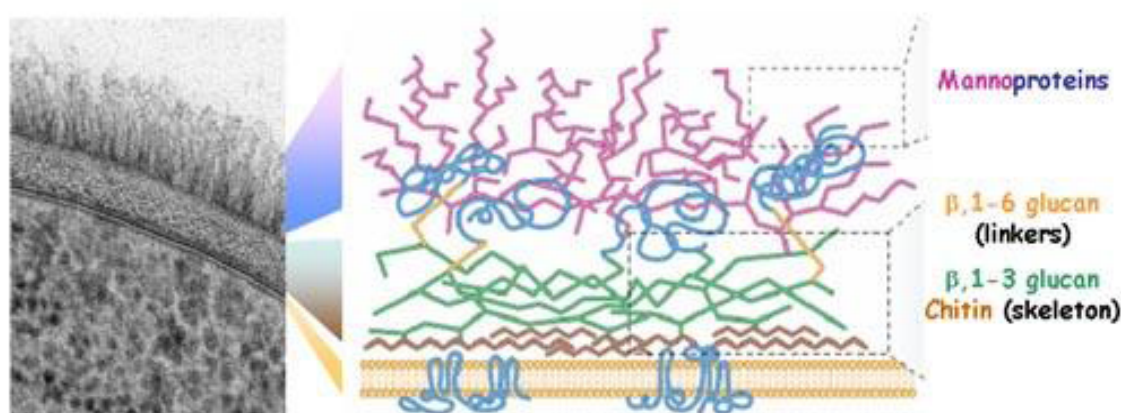
1.2 Buněčná stěna

Buňka hub, stejně jako buňka rostlin, má přítomnou rigidní vícevrstevnou buněčnou stěnu, která dává buňce výsledný tvar [3], pružnost a pevnost [4]. Je složena většinou z chitinu a může obsahovat celulózu, β -glukan, D-glukózamin, fruktan, mannan (Tab. 1, Obr. 1) [3], proteiny a glykoproteiny [4]. Ve vnější vrstvě se vyskytují melaniny.

Tab.1. Hlavní polymery nacházející se v buněčných stěnách různých hub [4].

	Fibrilární polymery	Matricové polymery
Oomycety	β -(1,3), β -(1,6)-glukan, celulóza	Glukan
Chytridiomycety	Chitin; glukan	Glukan
Zygomycety	Chitin; chitosan	Polyglukuronová kyselina; glukuronomannoproteiny
Askomycety	Chitin; β -(1,3), β -(1,6)-glukan	α -(1,3)-glukan; galaktomannoproteiny
Basidiomycety	Chitin; β -(1,3), β -(1,6)-glukan	α -(1,3)-glukan; xylomannoproteiny
Deuteromycety	Chitin; β -(1,3), β -(1,6)-glukan	α -(1,3)-glukan; galaktomannoproteiny

Buněčná stěna těsně přiléhá k cytoplazmatické membráně. U některých hub může tato struktura chybět, potom se jedná o tzv. nahé buňky (místo ní se uplatňuje ektoplazma) [3].



Obr. 1. Struktura buněčné stěny kvasinek [5].

Mezi jednotlivými komponenty buněčné stěny jsou kovalentní vazby – makromolekulární struktury. Chitin je vázán přímo na plasmatickou membránu, na chitinovou vrstvu navazuje vrstva glukánů. Některé manoproteiny jsou vázány na β -1,6 glukany glykosyl-fosfatidylinositolovou vazbou, *Piv* proteiny (proteiny s vnitřním opakováním) jsou spojené s β -1,3 glukany [6].

Ve středu buněčné stěny hub se nachází mikrofibrilární a semikrystalická struktura polysacharidických složek, která je uspořádána do matrice. Ta je navázána na amorfni matrix, vzniká tak vrstvená struktura dodávající buňce pružnost a pevnost. Nemá tudíž jen rigidní strukturu, ale i strukturu dynamickou. Může tak získávat značné kvalitativní i kvantitativní změny jak mezi různými druhy, ale také mezi různými morfologickými formami stejného druhu, např. vlivem stresu nebo během vývoje [4].

Komunikace cytoplazmy a protoplazmy mezi jednotlivými úseky hyf je umožněna díky perforaci sept, kterými jsou odděleny jednotlivé buňky [4].

1.2.1 β - glukany

β -Glukan je chemické označení polymeru β -glukózy. Takových polymerů, lišících se polohou glykosidické vazby je známo více (příkladem je celulóza - (1 \rightarrow 4)- β -D-glukan).

Významnou vlastností β -glukanů jsou jejich fyziologické účinky. Patří do skupiny fyziologicky účinných látek, které se souhrnně označují jako modifikátory biologické odpovědi (biological response modifiers, BRMs) [7]. Průmyslově významné a nejvíce studované glukany byly izolovány ze dvou technologicky významných druhů, pekařského droždí *Saccharomyces cerevisiae* a vláknité houby *Aspergillus niger* [8].

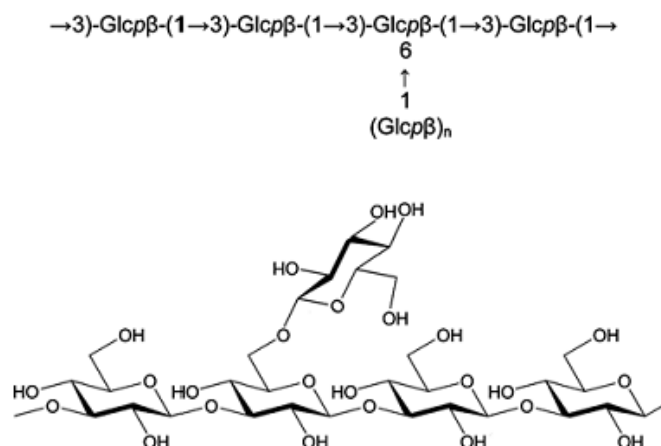
Nejjednodušší (1,3)- β -glukany jsou lineární a nerozvětvené (např. Curdlan a Pachyman). Složitější β -glukany (β -Glc) jsou větveny v postranním řetězci na C(O)6 (β -1,6) uhlíku jednotlivými β -Glc nebo krátkými β -oligo-Glc řetězci (patří sem extracelulární slizy hub, např. Laminariny, Schizophyllan). Dalším typem jsou tzv. cyklické β -glukany, jako např. glukán z *Brachyrhizobium japonicum*, které tvoří páry vzájemně propojených bloků tvořených z (1,3)- a (1,6)- propojených β -Glc jednotek s možnou modifikací v postranním řetězci. Tyto molekuly mohou být navíc substituovány nesacharidickou složkou. Stěny kvasinek a hub obsahují zpravidla lineární tzv. brach-on-branch (1,3)- β -Glc řetězce spojené (1,6)- vazbami, vyskytující se jako komplexy s jinými polysacharidy a proteiny. Také u streptokoků, konkrétně *Streptococcus pneumoniae* typ 37, byl nalezen glukán s (1,3)- β -Glc kostrou s (1,2)- připojenými β -Glc jednotkami v hlavním řetězci. (1,3;1,4)- β -glukany obilnin, trav, lišejníků a dalších druhů jsou vesměs lineární a skládají se z kratších úseků (1,4)- vázaných β -Glc zbytků s vloženými delšími úseky (1,3)- vázaných β -Glc zbytků. Mnoho z těchto β -glukanů má triviální názvy odpovídající rodovému jménu zdroje, ze kterého byly izolovány (Tab. 2) [9].

Tab. 2. Některé zdroje β -glukanu [9].

Název	Zdroj	Charakter polymeru
Curdlan	<i>Alcaligenes faecalis</i>	lineární
Laminaran	<i>Laminaria sp.</i>	lineární
Pachyman	<i>Poria cocos</i>	větvený
Lentinan	<i>Lentinus edodes</i>	větvený
Pleuran (HA-glucan)	<i>Pleurotus ostreatus</i>	větvený
Schizophyllan	<i>Schizophyllum commune</i>	větvený
Sclerotinan (SSG)	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	větvený
Scleroglucan	<i>Sclerotium glaucanicum, S. rolfsii</i>	větvený
Grifolan	<i>Grifola frondosa</i>	větvený
T-4-N, T-5-N	<i>Dictyophora indusiata</i>	větvený
Yeast glucan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	větvený

(1,3;1,6)- β -glukany větvené v postranním řetězci

Jedná se o intracelulární zásobní polysacharidy některých hnědých řas, oomycet, chryzomonád a rozsivek, vyskytují se hojně na povrchu hyf a ve sklerociu askomycet a bazidiomycet (Obr. 2) [10].

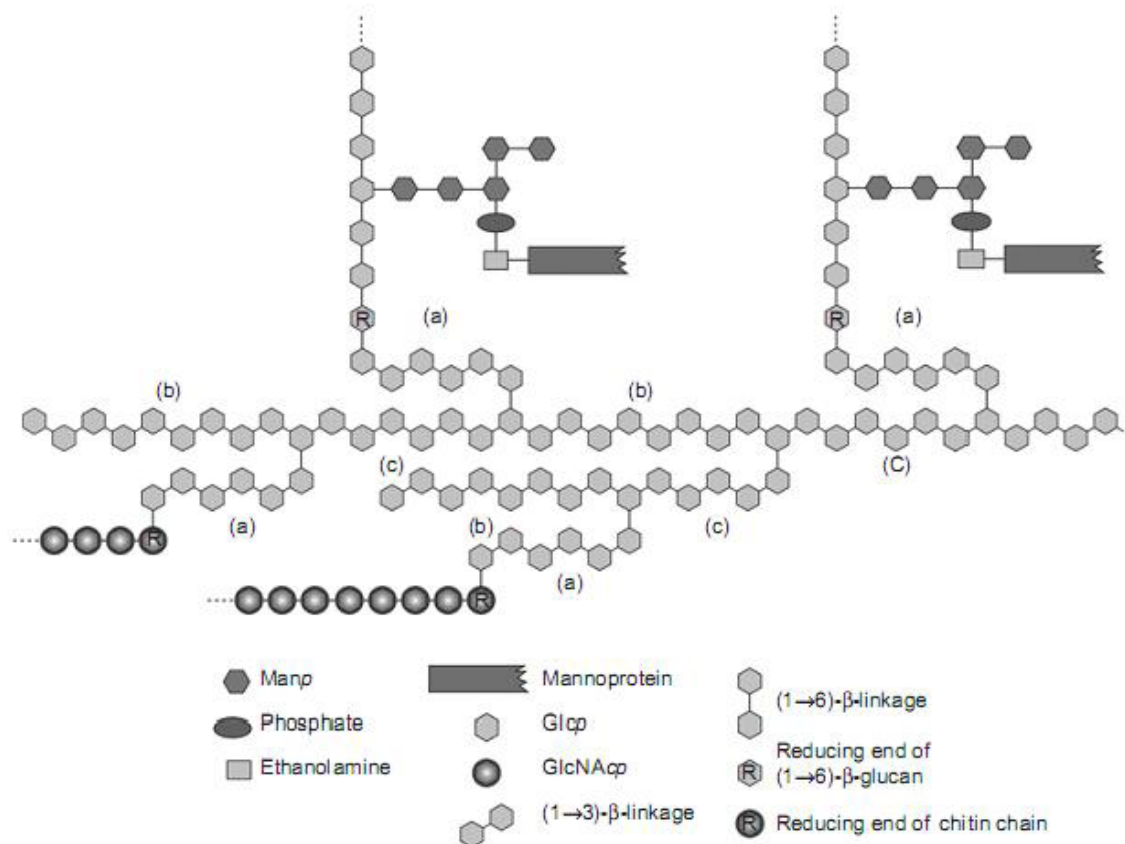


Obr.2. Větvený (1,3;1,6)- β -glucan [9].

(1,3;1,6)- β -glukany s řetězci propojenými tzv. branch-on-branch

Nachází se ve stěnách kvasinek, hub a oomycet. Nejdůkladněji popsany β -glukan má ve své buněčné stěně kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Glukan s neredukujícími konci tvoří základ molekuly a je pomocí kovalentních vazeb spojen s chitinem nebo (1,6)- β -glukanem či mannoproteinem, se kterými tvoří 40 – 50 % buněčné stěny [11].

Na vnějším povrchu jsou pak mannoproteiny, které jsou spojeny s (1,6)- β -glukany přes zbytky glykosylfosfatidylinositolu. Přímě s (1,3;1,6)- β -glukany jsou spojeny i *Pir* proteiny (proteiny s vnitřním opakováním). Celý heteropolymerní komplex pak tvoří trojrozměrnou síť (Obr. 3) [11].



Obr.3. Schéma trojrozměrné sítě heteropolymerního komplexu *Saccharomyces cerevisiae* [9].

Další zástupce kvasinek, *Candida albicans*, v hyfách a stěně obsahuje (1,3;1,6)- β -glukan s obsahem 30 – 39 % (1,3)- a 43 % (1,6)- vazeb, na rozdíl od klíčících hyf kde je tento poměr obrácený: 67 % (1,3)- a 14 % (1,6)- vazeb. Pomocí kovalentní vazby je (1,3;1,6)- β -glukan spojen s chitínem a (1,6)- β -glukanem [12].

Heteropolysacharidový komplex vytvářející trojrozměrnou síť podobný *S. cerevisiae* obsahuje i široká skupina β -glukanů hub. Rozdíl nalezneme v základu skeletu, který má na svých neredukujících koncích kovalentně navázaný buď chitin a větvený galaktomannan nebo (1,3;1,4)- β -glukan. Patří sem například *Aspergillus fumigatus* [13].

1.3 *Schizophyllum commune*

Taxonomické zařazení:

Říše: *Fungi* – houby

Kmen: *Basidiomycota* – stopkovýtrusné

Třída: *Agaricomycetes* – stopkovýtrusé

Řád: *Agaricales* – pečárkotvaré

Čeleď: *Schizophyllaceae* – klanolístkovité [14]

Schizophyllum commune neboli klanolístka obecná je drobná dřevokazná houba, napadající mrtvé (saprofytický růst) i živé dřevo (parazitický růst). Způsobuje bílou hnilobu, která rychle proniká do běli dřeva, rovněž poškozují a ucpávají cévy [14].

Plodnice je jednoletá, bez třeně, klobouk bývá polokruhovitý, vějířovitý, do 5 cm v průměru. Na povrchu je jemně plstnatý, bělavý, šedý, za vlhka šedohnědý. Fruktifikace probíhá během června a července a poté v říjnu až listopadu (Obr. 4) [15].

Lišty jsou velmi řídké, radiálně uspořádané, podélně rozštěpené, šedohnědé až hnědé, obvykle s nafialovělým nádechem, měkké a pružné, za sucha kožovité. Dužnina je velmi tenká, tuhá, kožovitá, šedohnědá, bez vůně a chuti [14]. Výtrusný prach bílý až načervenalý, výtrusy bezbarvé, drobné, elipsovité válcovité, hladké, neamyloidní, velikosti 3-4 x 1-1,5 μm [15].



Obr.4. A: plodnice *Schizophyllum commune* [15], B: průřez plodnicí [16].

S. commune je jednou z nejrozšířenějších dřevokazných hub, napadá hlavně bělové listnáče i jehličnany, mezi „oblíbené“ rody patří buky (*Fagus*), lípy (*Tilia*), olše (*Alnus*) a duby (*Quercus*) [14]. Její rozšíření je celosvětové. Bazidiospory zachovávají klíčivost ještě po 25 letech. Rychlost růstu hyf je 0,25-0,30 mm/h. Optimální teplota růstu je 31 °C. Způsobuje korozivní rozklad dřeva [15]. Bylo dokázáno, že při submerzní kultivaci produkuje značné množství kyseliny L-jablečné [17]. Plodnice obsahují hlavně polysacharid (glukan) Schizophyllan, také některé vitamíny skupiny B, vlákninu, minerální látky a jiné [2]. Je to jediná houba s podvinujícími se lištami. Její občasné zelené zbarvení způsobuje řasa, rostoucí na jejím povrchu. Před vysušením se chrání tak, že při nedostatečné vlhkosti se rozeklaná ostří lišt zavinou [15].

Byly popsány případy výskytu klanolístky také na kulturních rostlinách (jahodník), jako původce kažení ovoce (jablka), ale i jako lidského patogenu (zánět mozku, izolován z míšní tekutiny a míchy). V některých oblastech např. v Nigerii ji konzumují nebo je používána jako žvýkačka [15].

Plodnice má protinádorové účinky, zvláště u rakoviny žaludku a tlustého střeva, působí však i proti mnoha mikrobům, např. *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, i kvasinkám, např. *Candida albicans*. Je prokázáno i imunomodulační a antioxidační působení. Užívají se suché plodnice ve formě odvaru nebo prášku [2].

Při fermentaci *S. commune* extracelulárně produkuje Schizophyllan což je neionogenní, ve vodě rozpustný homopolysacharid skládající se z lineárního řetězce β -D-(1-3)-glukopyranózové skupiny a β -D-(1-6)-glukopyranosové skupiny [18]. Tento polysacharid, řazený mezi tzv. β -glukany, upoutal v posledních letech pozornost ve farmaceutickém odvětví pro svou imunomodulační, antineoplastickou a antivirovou aktivitu, které jsou vyšší než u ostatních glukanů [19]. Nicméně, Schizophyllan byl shledán spíše neúčinný při rakovině žaludku, ale prodlužuje dobu přežití u pacientů s rakovinou hlavy a krku [20]. Uvedený glukan mimo jiné zpomaluje stárnutí pokožky [19].

1.4 Buněčná stěna *Schizophyllum commune*

Buněčná stěna bazidiomycety *Schizophyllum commune* je složena především z glukanů a z menší části z chitinu [9]. Dále pak obsahuje glukózu, manózu, xylózu, glukózaminy, aminokyseliny a lipidy (Tab. 3). Glukany jsou ve vodě nerozpustné, můžeme je však částečně rozpustit v alkalickém prostředí. S-glukany, rozpustná část glukanu, vytváří

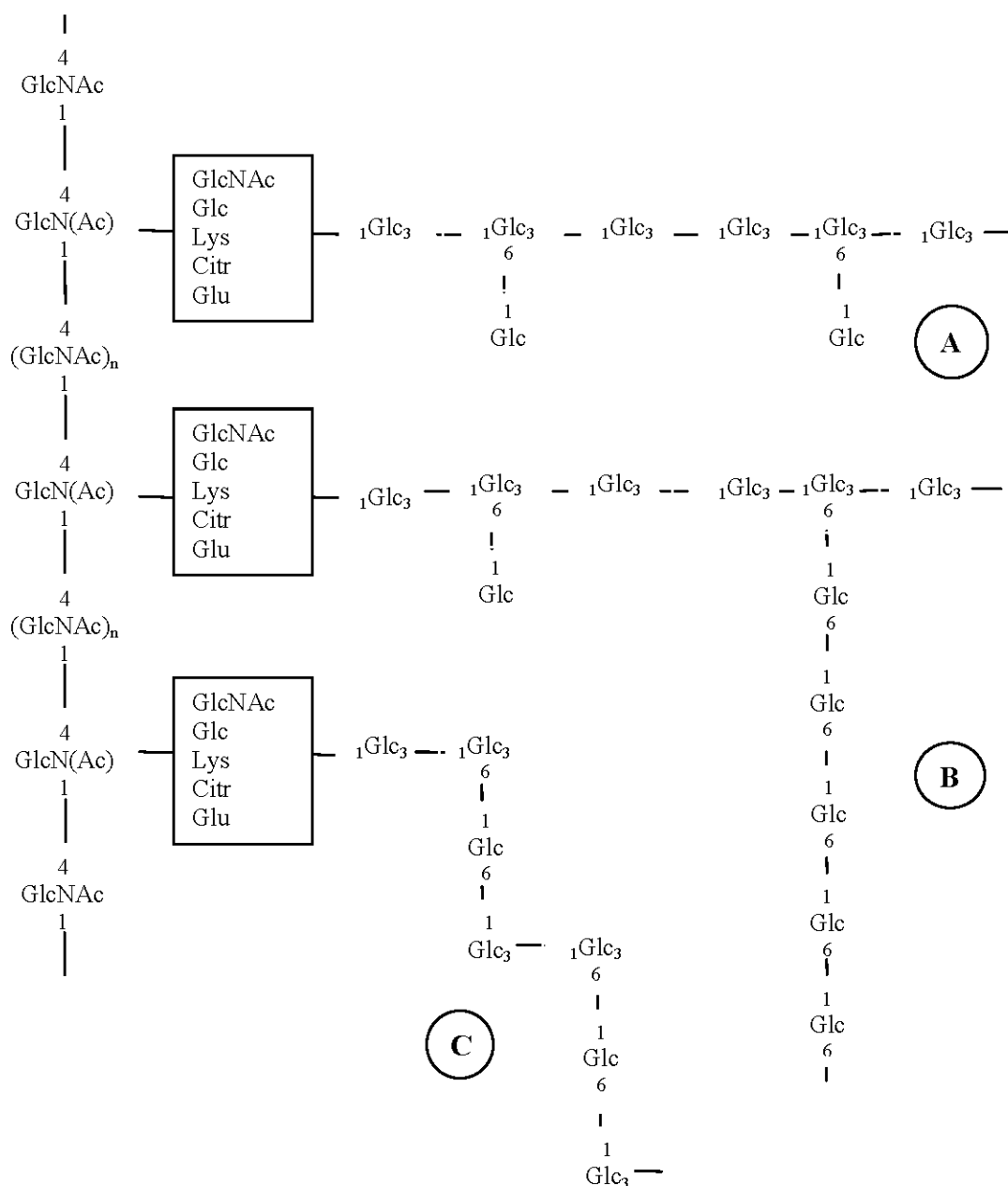
mikrokrystalickou vrstvu na vnějším povrchu stěny. Tato vrstva je složená z α -(1,3)-glukanu. R-glukan, alkalicky nerozpustná část glukanu, je složena z chitinu a komplexní struktury glukanu, které jsou vázány β -(1,3)- a β -(1,6)- vazbami.

Při analýze byla provedena hydrolýza jednotlivých frakcí S- a R- glukanů a následně byly štěpeny *exo*- β -(1,3)-glukanázou [21].

Tab.3. Přehled složek buněčné stěny *Schizophyllum commune* [21].

Složka	V sušině buněčné stěny (%)	Alkalicky rozpustná část		Alkalicky nerozpustná část	
		v sušině (%)	v buněčné stěně (%)	v sušině (%)	v buněčné stěně (%)
V sušině	-	-	28,1	-	57,5
Glukóza (-H ₂ O)	67,6	77,7	32,9	67,9	57,7
Manóza (-H ₂ O)	3,4	12,1	100	-	-
Xylóza (-H ₂ O)	0,2	0,7	100	-	-
Acetylhexóزامin (-H ₂ O)	12,5	0,2	0,1	22,2	102,1
Aminokyseliny	6,4	2,2	3,0	9,2	88,8
Lipidy (volné)	1	-	-	-	-
Lipidy (vázané)	2	-	-	-	-
Celkem	93,1	92,9	-	99,8	-

Rozsáhlá degradace R-glukanu s (1,3) β -glukanázou má za následek, že zbytky chitinu stále obsahují malé fragmenty glukanu. Pravděpodobná struktura tohoto glukanu je 16 % z původního glukanu (zobrazen jako C na Obr. 5). Předpokládá se, že ošetření kyselinou dusičnou deacetyluje rozpustný R-glucan/chitin komplexu. Hlavní část glukanu je ve dvou rozlišitelných druzích a to v přibližně stejném množství: jeden rozpustný ve vodě (Obr. 5 B) a druhý v zásadách (Obr. 5 A). V modelu jsou tyto tři různé varianty, (1,3) a (1,6)- β lineární glukany, popsány ve vazbě na chitin. Ničméně nelze vyloučit propojení mezi glukany a např. N-acetylglukózaminem. Zvláštní zájem je o glukan na Obrázku 5 označený A, protože se úzce podobá glukanu, který vylučuje *S. commune* do kultivačního média v různých množstvích v závislosti na kultivačních podmínkách [22].



Obr.5. Struktura R glukanu/chitin komplexu a možnosti větvení [22].

Aminokyseliny jsou běžně k nalezení u alkalicky nerozpustných chitin-glukanových komplexů hub a jsou obecně odvozovány z peptidoglykanů. *S. commune* obsahuje pozoruhodné složení těchto aminokyselin. Téměř 50 % tvoří lysin, 20 % citrullin a asi 12,5 % kyselina glutamová. Citrullin se obvykle nevyskytuje v peptidových materiálech, ale v proteinech buněčné stěny. U glykopeptidů jsou lysin a arginin obvykle zapojeny do N-glykosidických vazeb. Je možné, že u R-glukan/chitinového komplexu je arginin nahrazen citrulinem. Vazby spojující glukanové řetězce s chitinem mohou tedy obsahovat lysin, citrulin, glukózu a (N-acetyl)-glukózamin. Sled a způsob propojení mezi těmito monomery zůstává do značné míry neznámý [22].

2 CHITIN-GLUKANOVÝ KOMPLEX

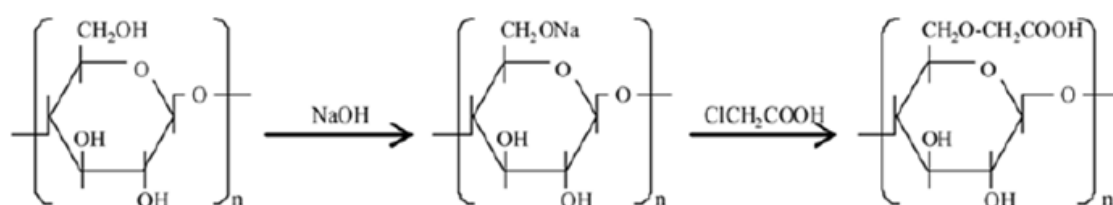
Chitin-glukan (CGC) je přírodní polymer hub a je jednou z hlavních složek buněčné stěny. Skládá se z biologicky aktivních polysacharidů chitinu (opakují se jednotky N-acetyl-D-glukózaninu) a 1,3-1,6- β -glukanu (opakují se jednotky D-glukózy). Tyto polymery jsou kovalentně spojeny, tvoří trojrozměrné síť [23], jsou ve vodě nerozpustné a dodávají buněčné stěně pevnost. Rozdíl ve stupni zesílení mezi β -glukany a chitinem u některých kvasinek a hub má za následek získání produktů s různým poměrem mezi β -glukanem a chitinem [24]. Např. při produkci kyseliny citronové obsahuje odpadní mycelium *Aspergillus niger* chitin-glukan s obsahem až 40 % chitinu [25]. Účinnost CGC může být regulována chemickou modifikací chitinu a β -D-glukanů nebo modifikací poměrů chitin a β -D-glukanů. V případě chitinu je deacetylační stupeň (SD) jedním z nejdůležitějších parametrů, které ovlivňují jeho biologickou aktivitu. Uvádí se, že částečná deacetylace chitinu má vyšší analgetický, protinádorový, antikoagulační a antimikrobiální účinek [23]. Chitin-glukanový komplex je také dobrý enterosorbent, který je schopen absorbovat ionty těžkých kovů [26].

CGC je využíván i pro dietetické výrobky, např. KiOnutrime-CG[™] firmy KitoZyme. Produkt je biotechnologického původu a má obsah více než 90 % chitin-glukanu, který je hlavní složkou v buněčných stěnách mycelia *Aspergillus niger*. Složka je uvedena na trh jako doplněk stravy pro zvýšení denního příjmu vlákniny. Nejvyšší dávka (0,8 g na kg tělesné hmotnosti za den) bez nežádoucích účinků je přibližně 6,6 g / kg tělesné hmotnosti, přibližně 80-ti násobek doporučeného příjmu g/kg tělesné hmotnosti [27].

Glukany jsou složeny z molekul glukózy spojených glykosidickými vazbami. Jedna molekula glukózy může být spojena kovalentními vazbami s více než dvěma dalšími molekulami glukózy, takže vznikají silně větvené makromolekuly. Ty mají schopnost pojmout a přenést značné množství informací vzhledem k četným možnostem kombinací vazeb a molekul. Makromolekulu glukanu tvoří základní lineární páteřová osa. Způsobem napojení a počtem bočních řetězců se jednotlivé glukany odlišují jak strukturou tak následně i léčivými účinky. Obecně farmakologicky neúčinnější skupinou jsou β -1,3-glukany [28].

3 KARBOXYMETHYLAČNÍ REAKCE POLYSACHARIDŮ

Karboxymethylace je chemickou reakcí, kterou byl modifikován chitin-glukanový komplex izolovaný ze *Schizophyllum commune*. Při této reakci se zlepšuje rozpustnost ve vodě, což zvyšuje viskozitu komplexu, zároveň stoupá jeho biologická dostupnost. Bylo vydáno několik článků o karboxymethylaci chitin-glukanového komplexu, izolovaného z producentů jako *Aspergillus niger* a *Saccharomyces cerevisiae*, a o jejím vlivu na biologickou aktivitu produktu. Obecná karboxymethylace glukózy je znázorněna na Obrázku 6.



Obr.6. O-karboxymethylace glukanu [29].

V dostupné literatuře bylo popsáno několik způsobů provedení reakce na různém substrátu. Karboxymethyl glukán se získává ze *Saccharomyces cerevisiae* takto: 6M vodný roztok NaOH, se za stálého míchání přidá ke glukánové pastě (glukan + isopropanol). Nažloutlá isopropanol (IPA) se po odstranění ze směsi nahradí čerstvou. Pak se směs nechá 30 minut botnat, znovu se obmění IPA a směs se zahřeje na 50 °C. Po přidání kyseliny monochloroctové se směs inkubuje po dobu 5 hodin při 50 °C. Vstupy pro 10 g suchého glukanu: NaOH - 100 g vodného roztoku NaOH (316 g/1000 g vody), IPA - 330 ml, kyselina monochloroctová 22-24.5 g [30].

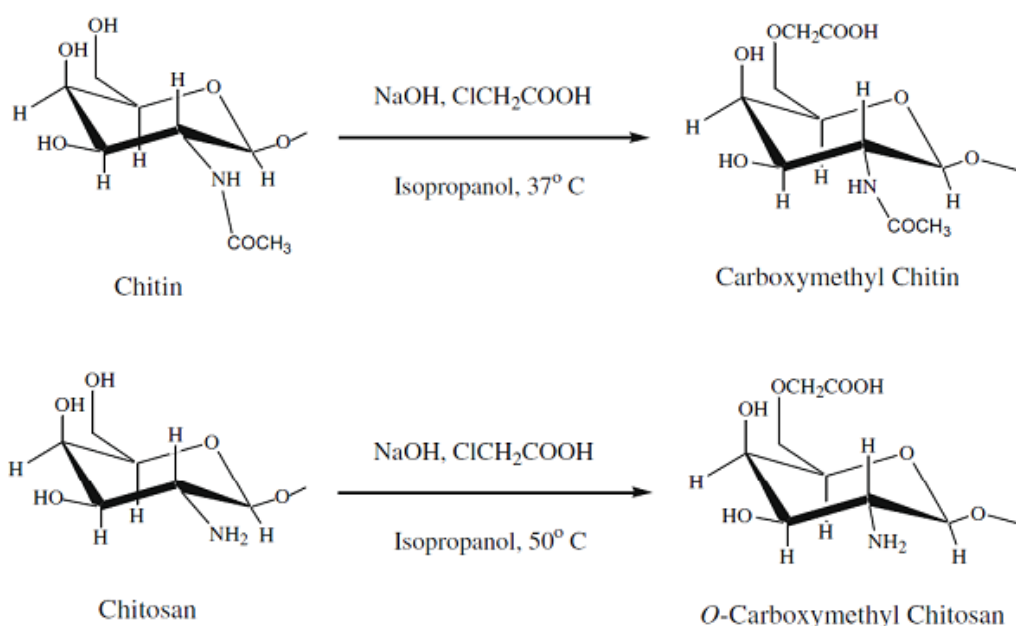
V případě chitin-glukanu z *Aspergillus niger* se provádí derivatizace: k 10 g chitin-glukan komplexu se přidá 12,4 ml vodného roztoku NaOH (300 g/l) a 125 ml IPA. Suspenze se míchá při 10 °C po dobu 1 hodiny. Následně se přidá sodná sůl kyseliny monochloroctové (7,9 g pro dosažení substitučního stupně 0,5) rozmíchaná v 14 ml vody, směs se míchá při teplotě 70 °C po dobu 2 hodin. Přebytek NaOH se zneutralizuje 6 M HCl a sůl se odstraní dialýzou. Získal se karboxymethyl chitin-glukanový komplex se stupněm substituce 0,43, který byl stanoven potenciometrickou titrací roztokem KOH [31].

Další karboxymethylační reakce sacharidů:

- Karboxymethylace škrobu (*Dioscorea esculenta*): škrob (10,0 g), se rozsuspnduje v IPA (100 ml) a přidá se vodný roztok hydroxidu sodného. Směs se míchá při

kontrolované teplotě 30 °C po dobu 10 minut. Přidá se sodná sůl kyseliny monochloroctové a míchání pokračuje požadovaný čas. Ve směsi se upraví pH na 5,0 přidáním 50 % ledové kyseliny octové. Karboxymethylovaný škrob se zfiltruje a promyje se ethanolem [32].

- Karboxymethylace celulózy: 900 ml IPA/ethanolu (1/1 V/V) se smíchá se 40,5 ml 45 % (w/v) roztoku hydroxidu sodného. Celulóza se zváží, namočí do smíšeného roztoku a důkladně míchá po dobu 10 minut. Směs se umístí na vodní lázeň při teplotě 70 °C a dále míchá. Karboxymethylační reakce je zahájena přidáním roztoku kyseliny monochloroctové (MCA) a důkladně se míchá po dobu 15 minut. Roztok MCA se připraví smícháním předem stanové hmotností MCA ve 40 ml IPA. Použije se 30-ti molární přebytek MCA vůči celulóze [29].
- Karboxymethylace rašeliny: navážka vzduchem sušeného vzorku rašeliny (3,0 g) se umístí do baňky vybavené míchadlem a zpětným chladičem. Přidá se IPA (60 ml), postupně se přidává vodný NaOH (20 ml, 30 %), míchá se při 50 °C po dobu 1-6 hodin. Postupně se přidává MCA (3,5 g, 0,25 mol/mol rašelina OH), a teplota se udržuje na 50-100 °C po dobu 1-6 hodin. Po skončení reakce, se produkt odfiltruje, promyje ethanolem (96 %), okyselí kyselinou octovou (90 %) na hodnotu pH 5 a promývá až do neutrálního pH [33].
- Karboxymethylace chitosanu: chitosan (10 g), NaOH (20 g), IPA/voda, v rozmezí od 0 do 100 %, 100 ml celkem) se přidají do baňky a nechají se reagovat při pokojové teplotě po dobu 24 hodin. Chloroctová kyselina (15 g) se rozpustí v IPA (20 ml), po částech se přidá do reakční směsi a míchá se 4 hodiny při dané teplotě. Reakce se zastaví přidáním 70 % (v/v) ethanolu (200 ml) [34].
- Karboxymethylace škrobového prášku sago (vyrábí se především ze středu kmene ságoových palem *Metroxylon sago* [35]): Reakční podmínky jsou stanoveny na 20 % koncentraci NaOH, reakční doba 1 h, reakční teplota 55 °C a sodná sůl MCA v molárním poměru 1,5:1. K potvrzení proběhnutí reakce se využije absorbance IČ spektra kde se objeví nový pik (1587 cm⁻¹), který potvrzuje přítomnost karboxymethylových skupin [36].



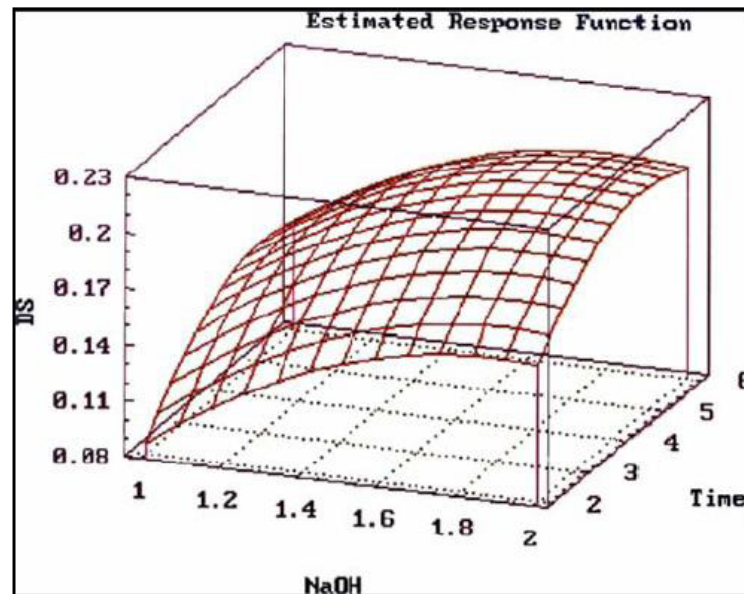
Obr. 7. Chemická reakce chitinu a chitosanu O-karboxymethylací [37].

3.1 Faktory ovlivňující karboxymethylaci

V literatuře bylo analyzováno několik faktorů ovlivňujících karboxymethylaci.

Při karboxymethylaci rašeliny byl sledován vliv doby ošetření při 50 °C. K tomu bylo využito časové rozmezí 1 až 6 hodin s odebráním vzorku po 1 hodině. S přibývajícím časem se projevilo značné zvýšení obsahu karboxymethylových skupin a to až o 60 %. Také byl sledován vliv teploty. Podmínky byly stanoveny na časový úsek 3 hodin při teplotním rozmezí 50 až 100 °C s navyšováním po 10 °C. Obsah karboxymethylových skupin se s rostoucí teplotou zvýšil o necelých 40 % [33].

U škrobu byl při karboxymethylaci sledován vliv použitého množství NaOH v koncentraci 0,5, 1,0 a 1,5 mol.l⁻¹. S rostoucím množstvím NaOH se zvyšoval stupeň substituce, po dosažení určitého maxima začal opět klesat. Stejný účinek mělo zvyšování podílu sodné soli monochloroctové kyseliny. Ta se testovala v koncentraci 1,443, 2,150 a 2,867 mol.l⁻¹. Stupeň substituce, stejně jako v případě koncentrace NaOH, se do určité hladiny zvyšoval, ale pak začal klesat. Reakční doba, kde bylo zvoleno rozpětí 2, 4 a 6 hodin, měla stejný průběh (Obr. 8) [32].



Obr. 8. Vliv času a koncentrace NaOH na stupeň substituce [32].

Rozpustnost karboxymethyl chitin-glukanového komplexu ve vodě závisí na podmínkách reakce a stupni substituce. Komplex připravený při teplotě 10 °C je vodorozpustný, při teplotách 20 až 60 °C je ve vodě nerozpustný. Zvýšení reakční teploty zvýší podíl karboxymethylovaného chitinu. Poměr vody a isopropanolu v reakci byl testován v poměrech 0/10, 2/8, 5/5, 8/2 a 10/0. Při zvýšení poměru vody vůči isopropanolu v reakci se snížil podíl karboxymethylovaného chitinu. Nicméně nejlepších výsledků bylo dosaženo při poměru 2/8 [37].

4 VLASTNOSTI KARBOXYMETHYLOVANÉHO KOMPLEXU

4.1 Biologické vlastnosti

Karboxymethyl chitin-glukan (CM-CG) vykazuje protektivní vlastnosti (antimutagení) čehož se dá využít v dietách. Potkani byli krmeni standardním nebo CM-CG obohaceným krmivem. Poté byly izolovány krevní lymfocyty, testikulární buňky a hepatocyty. Hodnotilo se indukované poškození DNA. CM-CG, přidáný ve stravě, sám nevyvolal žádný negativní vliv na zdravotní stav zvířat, nebo na DNA v buňkách potkana. Ovšem izolované kmenové buňky ze skupiny krmené CM-CG, byly odolnější proti působení oxidačního stresu. Ten byl vyvolán viditelným světlem excitovanou methylenovou modří [38].

CM-CG výrazně snižuje hladinu oxidačního poškození DNA vyvolané H_2O_2 v lidských HepG2 (jaterní buňky využívané k výzkumu jaterních nemocí) a HeLa (rakovinové buňky získané z cervikálního karcinomu, jsou využívány na mikrobiologické nebo histopatologické testy) buňkách, ale neměnil úroveň alkylačního poškození DNA vyvolané methylmethansulfonátem (MMS) nebo *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG). Jedná se o alkylační činidla používané ve výzkumu mutageneze a rekombinací. Narušují DNA a způsobují mutagenezi. Účinnost oprav zlomu v jednořetězcové DNA, vyvolané MMS a MNNG byla signifikantně vyšší u HepG2 buněk ošetřených CM-CG. Kromě toho byla potvrzena antioxidační aktivita karboxymethyl chitin-glukanu [39].

Ochranný účinek proti oxidačnímu poškození DNA, který byl vyvolán H_2O_2 a viditelným světlem excitovanou methylenovou modří u V79 plicních buněk křečků, mají i další deriváty glukanu. Účinek byl zkoumán u karboxymethyl glukanu (CM-G) a sulfoethyl glukanu (SE-G) ze *Saccharomyces cerevisiae* a karboxymethyl chitin-glukanu (CM-CGC) z *A. niger*. Studie ukazují, že všechny tři testované glukany snižují oxidační poškození DNA. Schopnost snižovat genotoxickou aktivitu zvýšil v pořadí: CM-G < SE-G < CM-CGC. Předpokládá se, že analyzované glukany vykazují ochranné účinky proti oxidačnímu poškození DNA v důsledku náhrady obou radikálů OH a singletového kyslíku [40].

Z mycelia *Aspergillus niger* byl karboxymethylací připraven ve vodě rozpustný karboxymethyl chitin-glukan (CM-CG), u kterého byla hodnocena schopnost stimulovat makrofágy a poté byla porovnána s karboxymethyl glukánem (CMG) z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Oba deriváty, CMG i CMCG, prokázaly podobnou biologickou

aktivitu stimulující makrofágy *in-vivo*, proto představují potenciální zdroj přírodní imunomodulační látky. Účinnost CM-CG byla 1,7 krát vyšší než CMG [41].

Ultrazvukem depolymerizovaný CM-CG z *Aspergillus niger* snižuje klastrogenní efekt cyklofosfamidu. Jeho ochranný účinek je však závislý na koncentraci. Díky ultrazvuku, který sníží molekulovou hmotnost, je CM-CG schopen lépe projít přes stěnu trávicího traktu [42].

Působení na činnost některých hydrolytických enzymů a peroxidáz byla zkoumána v extraktu z kořenů a listů kukuřice ošetřené karboxymethyl chitin-glukanem z mycelia *Aspergillus niger*. Výsledkem bylo snížení aktivity kyselá a alkalická fosfatázy v izolovaných extraktech. Deriváty polysacharidů hub, díky vlivu na aktivitu vybraných enzymů, mohou najít využití v přípravcích na ochranu rostlin [43].

4.2 Reologické vlastnosti

Čistě viskózní kapaliny jsou látky, které při nulové rychlosti deformace vykazují vždy nulové tečné napětí. Látky čistě elastické vykazují při nulovém napětí vždy nulovou deformaci a po skončení napětí se tyto látky vrací do původního nezatíženého stavu. U čistě elastických látek závisí napětí v každém okamžiku pouze na velikosti deformace, naopak u látek čistě viskózních závisí napětí na rychlosti deformace. U viskoelastických kapalin nezávisí napětí pouze na velikosti a rychlosti deformace, ale závisí na celém předchozím průběhu deformace. U těchto látek po skončení toku nenabude napětí okamžitě nulové hodnoty, ale bude k nulové hodnotě klesat postupně [44].

Reologická charakterizace suspenzních systémů je v literatuře často popisována pomocí měření „meze toku“, tedy veličinou udávající určitou míru koheze studovaného systému. Jednotlivé makromolekulární řetězce studovaného viskoelastického suspenzního systému jsou k sobě drženy různými typy přitažlivých sil, (např. vodíkových můstků) a vytvářejí určitou formu slabě strukturovaného fyzikálního gelu. Při zamíchání takového materiálu dojde k částečnému narušení dynamické rovnováhy, a k částečnému rozbití „gelové sítě“. Proces tvorby a zániku této struktury je ovšem reverzibilní a je tedy pouze otázkou času a dalších termodynamických veličin, než dojde k jejímu zpětnému obnovení.

Pro měření hodnot meze toku byly vyvinuty a v literatuře popsány speciální měřicí nástavce (vrtulový nástavec), které zajišťují dostatečný kontakt se suspenzí a významně snižují nežádoucí vedlejší procesy u studovaného systému (např. sedimentační vlivy).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo charakterizovat chitin-glukanový komplex ze submersního mycelia *S.commune* jako výchozí substrát pro výrobu CM-CGC, stanovit vliv jednotlivých faktorů na karboxymethylaci CGC a popsat vlastnosti připraveného karboxymethyl chitin-glukanového komplexu.

6 MATERIÁLY A METODY

6.1 Přístroje, zařízení a chemikálie

Přístroje a zařízení

- ❖ Autokláv Systec VX-150 (Systec, DE)
- ❖ Elektronový mikroskop Vega II LSU (Tescan, ČR)
- ❖ Fermentor (+ ovládací software a příslušenství) Techfors S - 30 L (Infors HT, CH)
- ❖ Homogenizátor (+ nástavce) T25 digital ULTRA-TURRAX® (IKA, DE)
- ❖ Hřídelová míchačka EUROSTAR Digital (IKA, DE)
- ❖ IČ spektrometr FTIR 8400S (Shimadzu, JP)
- ❖ Konduktometr WTW Cond 315i (WTW, DE)
- ❖ Laminární box Jouan MSC12 (Jouan, FR)
- ❖ Magnetická míchačka C-MAG HS10 (IKA, DE)
- ❖ Mlýnek IKA magicLab s modulem MK (IKA, DE)
- ❖ NMR Bruker Avance™ III 500 MHz + sonda BBF0 plus (Bruker, USA)
- ❖ Odstředivka Eppendorf Mini Spin (Eppendorf, DE)
- ❖ Odstředivka Jouan KR25i + rotor AKL 500-11 (Jouan, FR)
- ❖ Optický mikroskop (Nikon ECLIPSE CX55i, JP)
- ❖ pH metr ORION 3 STAR (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ❖ Rheometr AR – G2 (TA Instrument, USA)
- ❖ Spektrofotometr HELIOS EPSILON (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ❖ Sušárna Ecocell 55 (BMT, ČR)
- ❖ Sušící váhy HR 73 Halogen Moisture Analyser (Mettler Toledo, USA)
- ❖ Termostat Incucell 55 (BMT, ČR)
- ❖ Třepačka INNOVA® 44 Incubator Shaker Series (NBS, USA)
- ❖ Váhy Adventurer™ Pro (Ohaus, CH)

Chemikálie

- ❖ Bromid draselný, p.a. 99% (Lach:Ner, ČR)
- ❖ Diethylether, p.a., min. 99 % (Lach:Ner, ČR)
- ❖ Dichroman draselný, p.a. 99,5% (Lach:Ner, ČR)
- ❖ Ethanol, min. 96 %, následně denaturovaný 10 % propan-2-olu (Lihovar Chrudim, ČR)
- ❖ GOD-POD reagent (BioVendor, ČR)
- ❖ Hydrogenfosforečnan disodný, dodekahydrát, p.a., min. 98 % (Lach:Ner, ČR)
- ❖ Hydroxid sodný, p.a., min. 98 % (Lach:Ner, ČR)
- ❖ Invertasa z *S. cerevisiae*, 200 – 300 jednotek/mg (Fluka, USA)
- ❖ Jodid draselný, p.a. 99,5% (Lach:Ner, ČR)
- ❖ Kvasničný autolyzát (Yeast extract; A. Constantino & C. S.p.A., IT)
- ❖ Kyselina bromovodíková, p.a., 48 % (Lach:Ner, ČR)
- ❖ Kyselina chlorovodíková, p.a. 35% (Penta, ČR)
- ❖ Kyselina monochloroctová, p.a., 98% (Penta, ČR)
- ❖ Kyselina sírová, p.a., 98% (Lach:Ner, ČR)
- ❖ PDA agar (Potato Dextrose Agar M096, HiMedia, IN)
- ❖ Propan-2-ol (Shell, NL)
- ❖ Sacharosa (Cukrovary TDT, ČR)
- ❖ Síran hořečnatý, heptahydrát (Penta, ČR)
- ❖ Síran měďnatý pentahydrát, p.a. 99,2% (Lach:Ner, ČR)
- ❖ Sodná sůl kyseliny monochloroctové, p.a. 98% (Merck, ČR)
- ❖ Struktol SB 2020 (Struktol, USA)
- ❖ Škrob rozpustný (Lach:Ner, ČR)
- ❖ Thiosíran sodný roztok, p.a. 1M (Lach:Ner, ČR)

6.2 Příprava karboxymethyl chitin-glukanového komplexu

6.2.1 Příprava mycelia

Pro přípravu mycelia byl použit kmen *Schizophyllum commune* #127, kultivovaný na Petriho misce s živnou půdou PDA (Potato Dextróze Agar) s přidavkem kvasničného autolyzátu a agaru. Inkubuje se v termostatu při 29 °C po dobu 7 dní.

Pro přípravu inokula I. stupně byla použita 250 ml Erlenmeyerova baňka se 100 ml média. Složení základní polysyntetické živné půdy: sacharóza, kvasničný autolyzát, Na₂HPO₄·12H₂O, MgSO₄·7H₂O, po rozpuštění bylo upraveno pH koncentrovanou HCl na hodnotu 5,5 - 5,8.

Sterilní baňka byla v laminárním boxu zaočkována pomocí mikrobiologického háčku 10 kousky mycelia z Petriho misky o velikosti 5x5 mm a označena datem očkovaní. Miska pro zaočkování musí být stará 4 – 6 týdnů nebo čerstvě připravená. Takto připravená baňka byla kultivována v rotačním inkubátoru při teplotě 29 °C po dobu 7 dní.

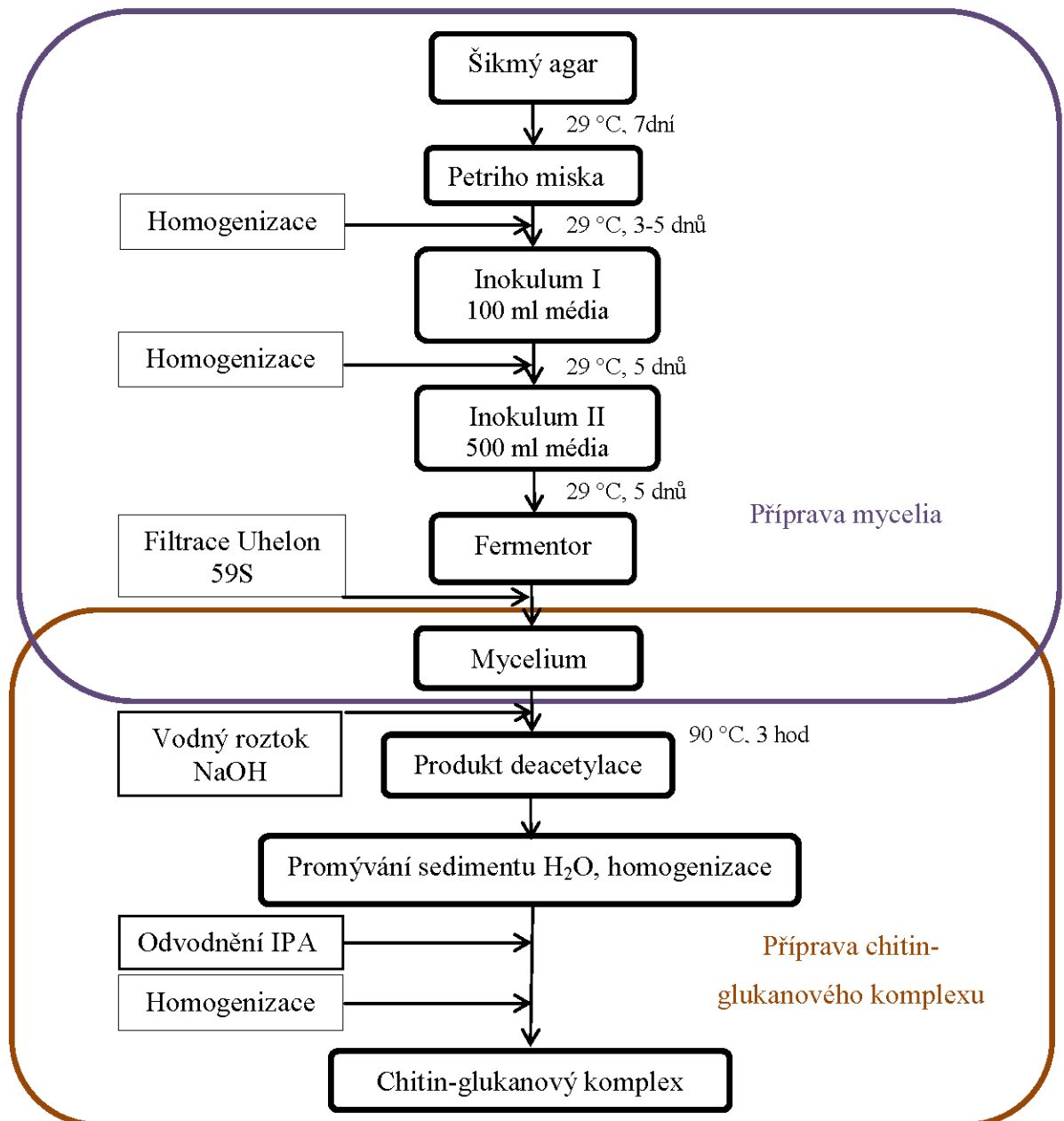
Inokulum II. stupně bylo připraveno v 1000 ml Erlenmeyerově baňce o objemu média 500 ml. Inokulum I. stupně bylo homogenizováno za použití digitálního Ultra-TURRAX IKA T 25 a sterilního nástavce při otáčkách 11 000 za minutu. Sterilní baňka s 500 ml média byla zaočkována cca 40 ml rozmixovaného inokula I. stupně. Baňka byla označena datem očkovaní a kultivována na rotačním inkubátoru při teplotě 29 °C po dobu 4 dnů. Na přípravu 5 baněk inokula II. stupně byly použity 2 baňky inokula I. stupně.

Kultivační fermentor s médiem, které je stejné jako pro přípravu baněk s jednotlivými inokulačními stupni, s tím rozdílem, že bylo navíc přidáno 20 kapek odpěňovacího činidla Struktol SB 2020. Před sterilizací bylo nutné upravit pH živné půdy na hodnotu 6,5. Sterilizace fermentoru probíhala *in-situ* dle příslušného návodu na použití fermentoru dodaného výrobcem zařízení. Fermentor byl zaočkován 5 %-ty inokula II. stupně sterilním transferem. Kultivace fermentoru probíhala při 29 °C, 150 RPM a vzdušnění 1,5 vvm po dobu 7 dnů.

Z narostlé biomasy bylo filtrací, přes polyamidovou plachetku Uhelon 59S, odstraněno co největší množství vody. V připraveném myceliu byla stanovena sušina na automatických sušících vahách HR 73 Halogen Moisture Analyser.

6.2.2 Příprava chitin-glukanového komplexu

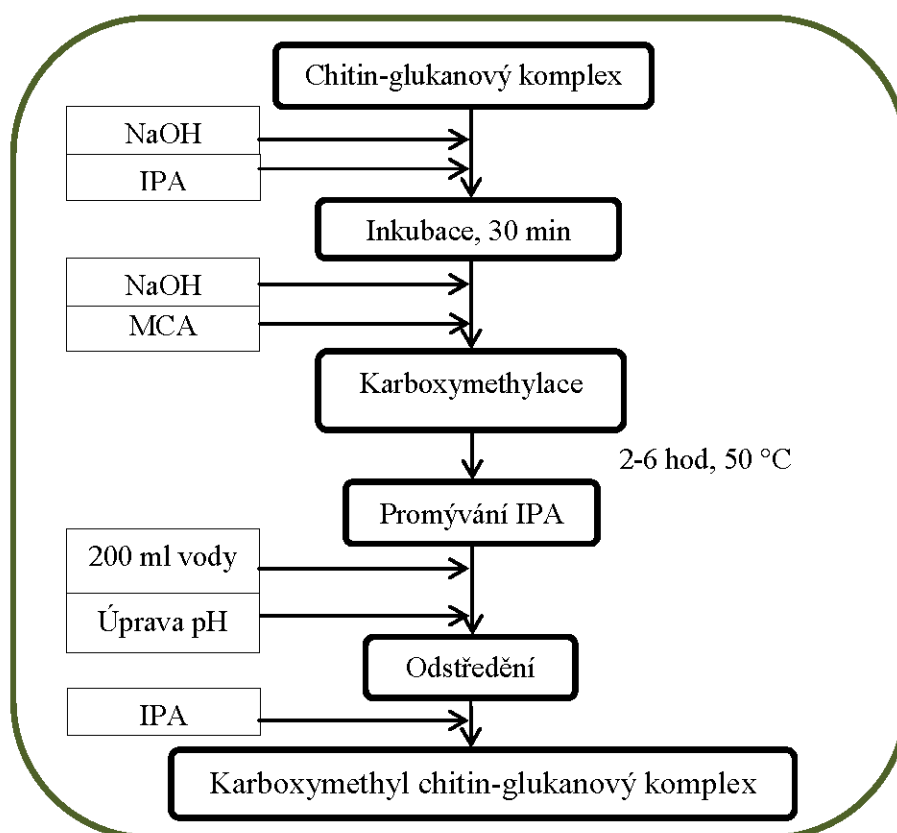
Mokrý mycelium bylo převedeno na suspenzi (1 g NaOH mycelia/50 ml vody s 12,5 g NaOH), homogenizováno (Ultra-Turrax T25 Digital IKA) a inkubováno při teplotě 90 °C 3 hodiny za stálého míchání. Poté byla směs odstředěna, usazená suspenze byla dispergována v demineralizované vodě a znovu odstředěna. CGC byl odvodněn přidávkem IPA filtrován přes polyamidovou plachetku Uhelon 59S (Obr. 9). Sušina byla stanovena na automatických sušicích vahách.



Obr.9. Schématické znázornění přípravy chitin-glukanového komplexu.

6.2.3 Karboxymethylace CGC

CGC (3 gramy suchého komplexu) byl smíchán s vodou, NaOH a IPA turraxován a inkubován při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Poté byla suspenze zahřána na 50 °C a byl přidán roztok NaOH a kyselina monochloroctová (MCA) či vodný roztok sodné soli MCA. Inkubace proběhla při 50 °C po nastavenou dobu (2,4 a 6 hodin). Suspenze byla 3x promyta 200 ml IPA, poté rozpuštěna ve 200 ml vody a bylo upraveno pH 6M HCl na 4,5-5. Suspenze byla míchána 12 hodin, odstředěna (10 min/5 000 G), supernatant byl slit, k sedimentu bylo přidáno 200 ml vody a znovu odstředěno. Supernatant i sediment byly vysráženy a vysušeny IPA na vodorozpustnou a nerozpustnou část CM-CGC (Obr. 10).



Obr.10. Schéma přípravy karboxymethyl chitin-glukanového komplexu.

6.3 Testování možností ovlivnění karboxymethylace

6.3.1 Kyselina monochloroctová a její sodná sůl

Při experimentu byl použit připravený chitin-glukanový komplex. K mokrému CGC (3 g suchého) bylo přidáno: 8,8 g NaOH v 10 ml vody a 131 ml IPA. Suspenze se inkubovala 30 minut při pokojové teplotě. Dále se suspenze zahřála na 50 °C a přidal se (u MCA) 2,8 NaOH v 22 ml vody a 6,6 g MCA. Při použití Na-MCA bylo přidáno 8,2 g Na-MCA

v 22 ml vody. Reakce probíhala 4 hodiny při 50 °C. Poté byl vzorek zpracován standardním způsobem (viz kapitola 5.2.3.).

6.3.2 Poměr voda/IPA

Byly testovány 3 poměry vody a IPA - 12:131, 32:131 a 42:131. CGC (3 g suchého) byl smíchán se 131 ml IPA a s různým množstvím vody (12, 32 a 42 ml), ve které bylo rozpuštěno 13,2 g NaOH. Směs byla inkubována po dobu 30 minut, pak zahřána na 50 °C. Ke směsi byly přidány 2,8 g NaOH rozpuštěné ve 2 ml vody a ihned 6,6 g MCA. Reakce probíhala při 50 °C, přičemž vzorek byl odebrán ve 2, 4 a 6 hodině a zpracován standardním způsobem (viz kapitola 5.2.3.).

6.3.3 Množství přidaného NaOH

Experiment byl proveden následovně: CGC (3 g suchého) byl smíchán se 131 ml IPA a různým množstvím NaOH (8,8 g, 13,2 g nebo 17,6 g) rozpuštěným v 10 ml vody. Směs byla inkubována po dobu 30 minut při laboratorní teplotě, pak zahřána na 50 °C. Byly přidány 2,8 g NaOH ve 2 ml vody a ihned 6,6 g MCA. Reakce probíhala při 50 °C, přičemž ve 2, 4 a 6 hodě byl odebrán vzorek a zpracován standardním způsobem (viz kapitola 5.2.3.).

6.4 Metody analýz

6.4.1 Stanovení obsahu sacharózy a glukózy

Obsah glukózy byl stanoven biochemickým kitem GOD-POD: Po oxidaci glukózy na glukonovou kyselinu specifickou glukozaoxidázou reagoval uvolněný peroxid vodíku se substrátem (4-aminophenazon a fenol) Tinderovou reakcí za vzniku barevného komplexu chinoniminu, jehož absorbance odpovídala množství glukózy.

V kapalném podílu, po filtraci přes polyamidovou plachetku Uhelon 59S, byl stanoven obsah sacharózy a glukózy. Vzorek (0,1 ml) byl vhodně zředěn demineralizovanou vodou a rozdělen na dvě poloviny. K jedné byla přidána invertáza (2 μ l v PBS pufru) a sacharóza byla štěpena na glukózu a fruktózu (90 minut, 37 °C); druhá polovina byla k analýze použita bez úpravy. K 1 ml reagenčního roztoku bylo přidáno 10 μ l vzorku a po 10 minutové inkubaci při 37 °C byla měřena absorbance při 500 nm. Obsah glukózy ve vzorku bez přídavku invertázy byl určen přímo výpočtem z kalibrační křivky. Obsah sacharózy byl vypočítán ze stanoveného množství glukózy, přičemž její koncentrace byla

vypočítána z rozdílu absorbancí vzorku štěpeného invertázou a vzorku bez přídavku invertázy. Obsah sacharózy a glukózy byl vyjádřen v g/l.

6.4.2 Stupeň substituce

Provedení zkoušky pomocí kyseliny chlorovodíkové

Vzorek CGC (cca 0,5 g) byl rozpuštěn v 30 ml demineralizované vody a bylo přidáno 20 ml 0,2 M NaOH. Směs byla převedena do 100 ml odměrné baňky a doplněna po rysku. Z toho bylo odebráno 25 ml do Erlenmeyerovy baňky, byly přidány 2 kapky indikátoru fenoftalein a titrováno 0,04M HCl. Titrace byla třikrát opakována, spotřeba byla odečtena s přesností 0,05 ml. Ze spotřeby titračního činidla byl vypočítán stupeň substituce.

$$SD = \frac{162 \cdot n_{COOH}}{m_{dS} - 58 \cdot n_{COOH}}$$

$$n_{COOH} = (V_b - V) \cdot C_{HCl} \cdot 4$$

n_{COOH}	množství COOH [mol]
m_{dS}	hmotnost suchého vzorku [g]
V_b	objem HCl před titrací [ml]
V	objem HCl po titraci [ml]
C_{HCl}	koncentrace HCl [mol/l]
4	poměr celkového objemu roztoku (100 ml) a objemu odebraného pro titraci (25 ml)

Stupeň substituce byl vypočten jako aritmetický průměr všech opakování a byl zaokrouhlen na dvě desetinná místa [32].

6.4.3 Stanovení obsahu glukózaminu

Obsah glukózaminu byl důležitou charakteristikou vzorku, která s výsledkem celkového obsahu dusíku sloužil k určení poměru chitosanu/chitinu a glukanu v komplexu. Zároveň umožnil vypočítat stupeň deacetylace chitinu.

Titrační metoda určuje množství volných aminoskupin. Přímou metodou, tedy bez hydrolýzy, byl stanoven pouze glukózamin (také odpovídající množství dusíku), bez započítání přítomného N-acetyl-D-glukózaminu. Metoda byla založena na přídavku HBr

ke vzorku, kyselina se vážala pouze na volné skupiny glukózáminu za vzniku glukózámin hydrobromidu a po vymytí nadbytku nevázané HBr mohl být vzorek titrován NaOH. Množství uvolněné a následně titrované HBr pak přímo odpovídalo obsahu aminoskupin, tedy i obsahu glukózáminu [45].

500 mg vzorku bylo mícháno 15 hodin se 100 ml 0,2 M HBr. Po této době bylo do suspenze přidáno dalších 50 ml 9 M HBr a ještě 10 minut byl vzorek míchán. Suspenze vzorku byla odstředěna (20 minut, 5000 rpm) a sediment byl převeden na fritu (S3 nebo S4), na které byl promýván směsí metanol/dietyléter (1:1) tak dlouho, než bylo dosaženo neutrálního pH. Nerozpustný podíl z frity byl převeden na 4 hodiny do bezvodého dietyléteru a po jeho odfiltrování přes fritu byl sušen při 60 °C po dobu 15 hodin. Z takto upraveného vzorku bylo naváženo 200 mg, ke kterým bylo přidáno 100 ml demineralizované vody, a vzorek byl na magnetické míchačce míchán 15 hodin. Vzniklá suspenze byla titrována 0,1 M roztokem NaOH do neutrálního pH (měřeno pH metrem). Obsah glukózáminu byl vypočítán ze spotřeby NaOH a byl vyjádřen jako procentuální obsah. Limit obsahu glukózáminu byl určen 4 – 7 %.

6.4.4 Sorpční kapacita

Provedení zkoušky pomocí thiosíranu sodného

Do odstředivací kyvety (50 ml) bylo naváženo 0,5 g vzorku práškového karboxymethyl chitin-glukanu. Pipetou bylo přidáno 25 ml demineralizované vody tak, aby pokud možno byla smočena většina prášku. Vzorek bylo nutno nechat nabotnat minimálně 30 minut. K rozpuštěnému vzorku v kyvetě byl pipetou přidán 5 ml 4 % roztoku síranu měďnatého a obsah kyvety byl homogenizován skleněnou tyčinkou, která byla po vyjmutí z kyvety ostříknuta demineralizovanou vodou. Kyvety byly vloženy do centrifugy a odstředěny 8-10 minut při 3000 – 5000 RPM.

Z kyvet byl po odstředění opatrně slit supernatan, do kyvet bylo pipetou přidáno 30 ml demineralizované vody, homogenizováno a znovu odstředěno za výše uvedených podmínek. Supernatant byl opět slit a pipetou bylo přidáno 10 ml 1M roztoku kyseliny sírové. Sediment byl rozpustěn v kyselině pomocí homogenizačního nástavce dispergačního zařízení. Obsah kyvety byl kvantitativně převeden do Erlenmeyerovy nebo titrační baňky (250 ml).

K roztoku v baňce byly pipetou přidány 4 ml 30 % roztoku jodidu draselného a byl ihned titrován standardním roztokem thiosíranu sodného do světle žlutého zbarvení. Potom byly

přidány 2 ml roztoku škrobu (roztok zmodrá, až zčerná) a opatrně titrováno do odbarvení (mléčně bílý roztok). Spotřeba byla odečtena s přesností 0,05 ml. Ze spotřeby titračního činidla byla vypočítána sorpční kapacita.

$$SD = \frac{32,44 \cdot f \cdot a}{m \cdot S - (16 \cdot f \cdot a)}$$

a spotřeba titračního činidla [ml]

f faktor titračního činidla, l

m navážka vzorku [mg]

S sušina vzorku [%]

Výpočet sorpční kapacity vzorku byl vypočten jako aritmetický průměr všech opakování a zaokrouhlen na dvě desetinná místa.

6.4.5 IČ spektrum

Měřeno na spektrofotometru FTIR 8400S za standardních přednastavených podmínek. Pomocí tabletovače byla z KBr připravena tableta, jejíž spektrum bylo použito jako referenční (background). Při přípravě tablety se vzorkem bylo použito znovu KBr, který byl rozetřen s malým množstvím vzorku.

6.4.6 Analýza struktury vzorků

SEM analýza ukázala mikrostrukturu vzorku. Mikrofotografie vzorků byly pořízeny na elektronovém skenovacím mikroskopu po předchozím pozlacení vzorků, které probíhalo po dobu 120 sekund při intenzitě proudu 18 mA. Vlastní fotografie byly pořízeny při těchto nastavených podmínkách: napětí 2,44 – 10 kV, detektor: SE, zvětšení 300 – 20 000 krát, vakuum: high, vzdálenost mezi objektivem a vzorkem: 4 – 5 mm.

Tato analýza nemá při mezioperační kontrole ani při běžné analýze větší význam. Vzorky byly fotografovány z důvodu jejich charakterizace v pevném stavu, např. kvůli určení struktury a porovnání s obdobnými vzorky.

6.4.7 Analýza rheologických vlastností

Rheologické vlastnosti byly měřeny na Rheometru AR – G2 s nástavcem pro gelovité materiály (Obr. 11) a zpracovány programem Rheology Advantage Data Analysis. Měřené vzorky měly koncentraci 1,5 % a byly měřeny při laboratorní teplotě.

Měřená suspenze byla připravena v nádobce o minimálním průměru 8 cm a minimální výšce 10 cm. Požadavky na tyto minimální rozměry nádoby a tedy i na minimální objem měřeného materiálu souvisejí s tím, že lopatky měřicí „vrtulky“ musí být dostatečně vzdáleny od stěn nádoby, aby nedocházelo k ovlivnění měřených hodnot vlivem mezní vrstvy kapaliny přisedlé ke stěně.



Obr. 11. Speciální nástavec pro měření rheologických vlastností pro gelovité materiály.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Kultivace *Schizophyllum commune*

Schizophyllum commune je v biotechnologii dobře známý organizmus. Jak již bylo zmíněno, využívá se jeho produkce vodorozpustného β -glukanu Schizophyllan [46], kyseliny jablečné [47] a jako u mnoha dalších hub produkce celé řady průmyslově využitelných enzymů jako invertázy [48], esterázy ferulové kyseliny [49], polyfenol oxidázy lakázy [50], celulózy, xylanázy [51], acetylxylan esterázy [52], β -glukózidázy [53], α -glukuronidázy [54], cholesterol oxidázy [55] a dalších. Díky svému rychlému růstu při submerzní kultivaci je možné ho využít pro získání mycelia a přípravu chitin-glukanového komplexu. Z něho byl následnou karboxymethylací získán karboxymethyl chitin-glukanový komplex.

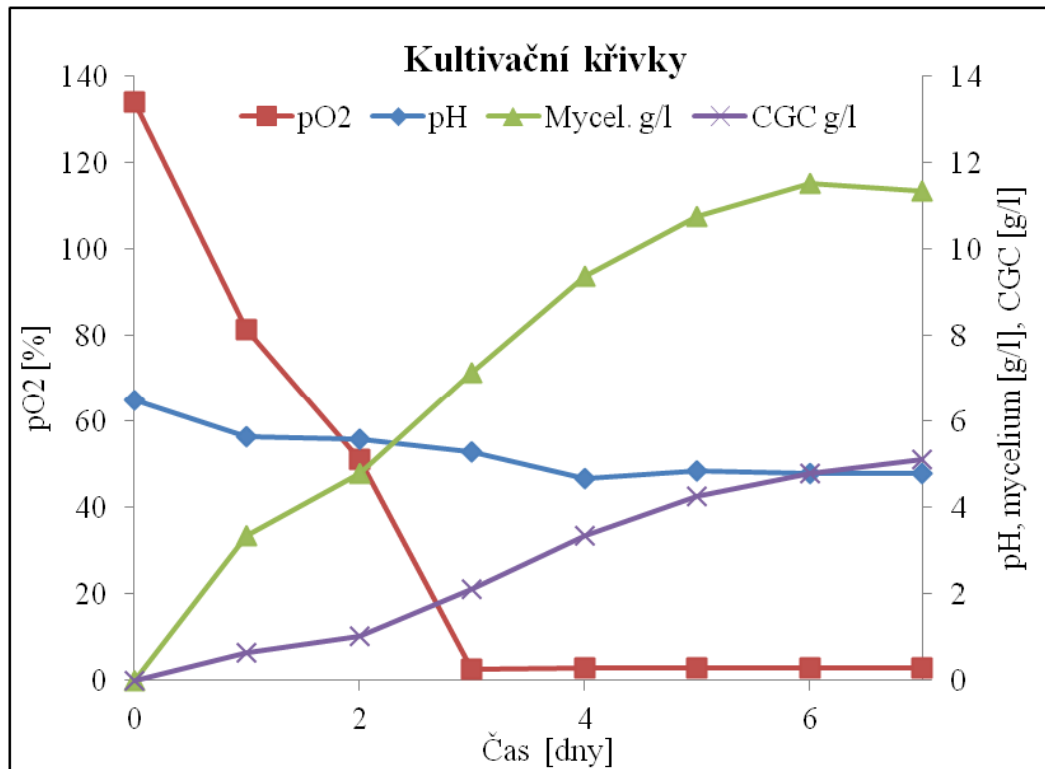
Nejprve bylo nutné zjistit, zda je submersní kultivace *S. commune* schopna zabezpečit dostatečné množství chitin-glukanového komplexu, jakožto suroviny pro přípravu karboxymethyl chitin-glukanu. Z toho důvodu byla nejprve provedena kultivace *S. commune* v bioreaktoru, během které bylo sledováno hned několik parametrů: nárůst mycelia, pH, vzdušnění, spotřeba zdroje uhlíku, výtěžek chitin-glukanového komplexu, obsah CGC v myceliu a poměrném zastoupení chitinu a glukanu v izolovaném komplexu.

Růst v bioreaktoru probíhal po dobu 7 dnů, během této doby *S. commune* dosáhl nárůstu biomasy, přepočítané na sušinu, 11,3 g/l. Fáze exponenciálního růstu pokračovala, až do 6 dne kultivace, poté se množství mycelia už nemění. S intenzivním nárůstem mycelia se značně zvyšuje i spotřeba kyslíku, od třetího kultivačního dne kyslíková sonda zaznamenává prakticky nulový parciální tlak kyslíku v médiu. V průběhu prvních čtyř dnů kultivace pH živné půdy kleslo z 5,5 na pH 4,8 a poté se již nezměnilo (Obr. 12).

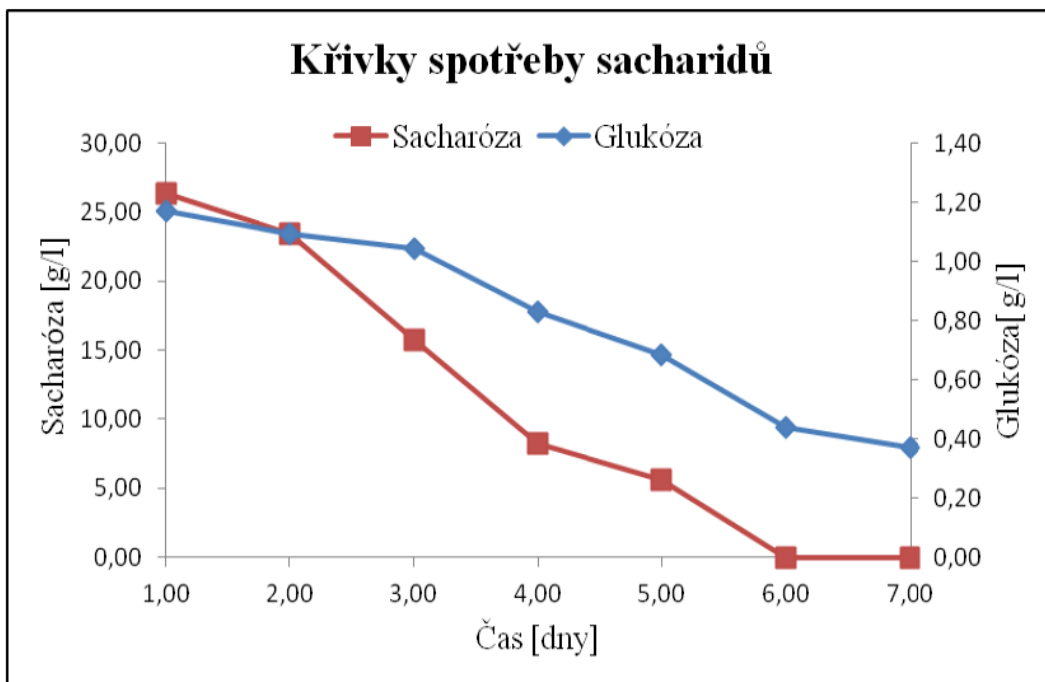
Živná půda obsahuje jako zdroj uhlíku sacharózu. Její obsah se rovnoměrně snižoval během celé kultivace, až 6 dne dosáhl nulové koncentrace. V živné půdě byla od prvního dne zaznamenaná glukóza, což koresponduje s popsanou produkcí invertázy [48]. Obsah glukózy se měnil paralelně s obsahem sacharózy. Ke konci kultivace byl zdroj uhlíku téměř kompletně spotřebován (Obr. 13).

V závislosti na nárůstu mycelia se zvyšuje i výtěžek chitin-glukanového komplexu (v gramech na litr živné půdy), který je součástí buněčné stěny *S. commune*. Výtěžek CGC

se zvyšuje po celou dobu kultivace a dosahuje konečných hodnot, po přepočítání na sušinu 5,3 g/l po 7 dnech (Obr. 12).

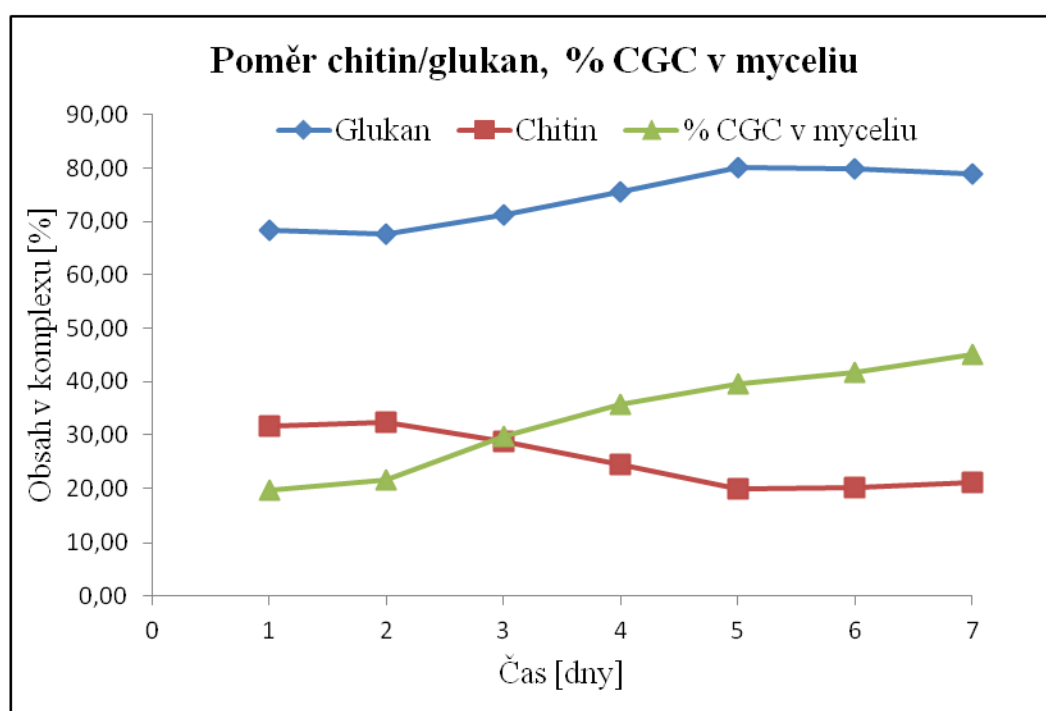


Obr. 12. Růst mycelia [g/l], produkce CGC [g/l], změna pH a pO2 během kultivace *S. commune*.



Obr. 13. Změna obsahu sacharózy a glukózy v živné půdě během kultivace *S. commune*.

Během kultivace se podíl chitinu-glukanového komplexu v myceliu postupně zvyšuje z 20 % na 45 %, což lze vysvětlit nárůstem buněčné stěny. Existuje předpoklad, že prekurzory těchto stěnových fibrilárních polymerů jsou tvořeny na rostoucím konci hyfy ještě jako alkalicky rozpustné glukany, následně dochází k prodlužování řetězců, stávají se rozvětvenými a zkrříženým propojováním transglykosilací dochází k připojení chitinu na tuto glukanovou matici za tvorby nerozpustných mikrofibril [56]. Spolu se změnou podílu chitin-glukanového komplexu v myceliu se mění i jeho složení – v průběhu růstu stoupá poměrné zastoupení glukanové složky. K navýšení výtěžku CGC z biomasy během kultivace pak dochází právě vlivem nárůstu zastoupení glukanu (Obr. 14).



Obr. 14. Změna podílu chitinu a glukanu v CGC a nárůst CGC v myceliu [%] v průběhu kultivace.

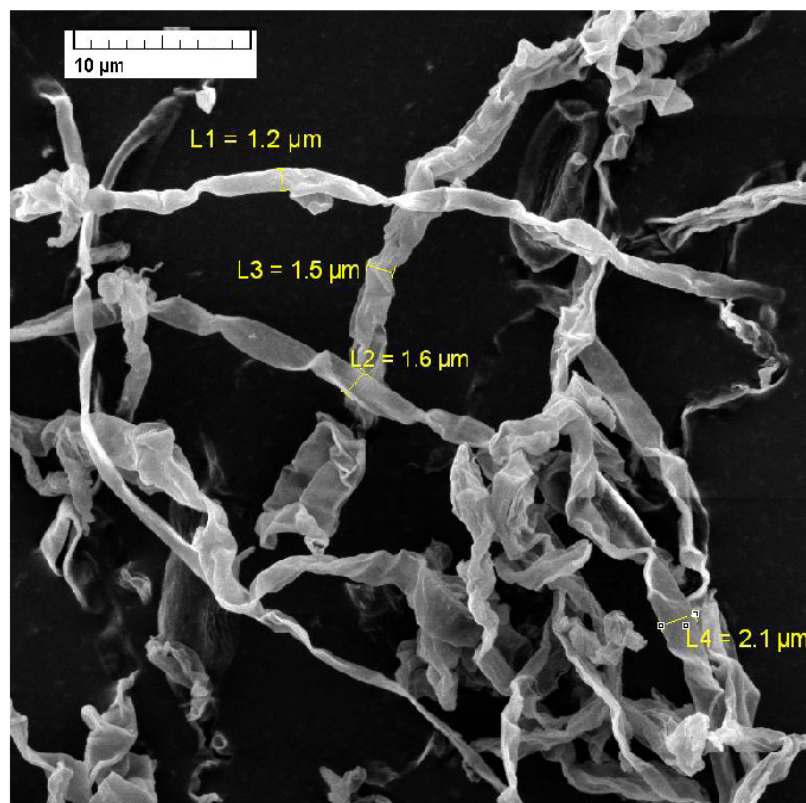
7.2 Charakteristika chitin-glukanového komplexu

Jako surovina pro karboxymethylaci byl použit chitin-glukanový komplex. Komplex byl připraven pomocí alkalické extrakce mycelia dle postupu, který je detailně popsán v kapitole 5.2. Pro extrakci CGC bylo použito mycelium ze sedmého dne kultivace. Suchý komplex se podobá jemnému prášku, který vytváří měkkou houbovitou strukturu. Má bílou až světle žlutou barvu a je bez vůně a zápachu (Obr. 15).



Obr.15. Struktura chitin-glukanového komplexu.

Mikrostruktura tohoto vstupního materiálu, analýza metodou SEM ukázala, že je složen z mikrovláken o průměru cca 2 μm (Obr. 16). Tvar a velikost mikrovláken odpovídá tvaru a velikosti hyf *S.commune* [25].



Obr.16. Chitin-glukanový komplex zdokumentovaný metodou SEM.

Je známo, že CGC z buněčné stěny *S. commune* je složen z chitinu a kovalentně vázaného glukanu. Dá se předpokládat, že v průběhu extrakce CGC z mycelia koncentrovaným hydroxidem může dojít k částečné deacetylaci chitinu. Stupeň deacetylace chitinu a složení CGC (poměr mezi chitinem a glukánem) lze vypočítat z obsahu glukózáminu a glukanu

v CGC. Pro stanovení volných aminoskupin patřících glukózáminu byla použita titrace s HBr. Stanovení ukázalo, že 1g CGC obsahuje 0,04 mol glukózáminu. Pro určení obsahu glukanu v CGC byla použita kyselá hydrolyza (6M HCl), produkty hydrolyzy glukózámin (0,46 mg/ml) a kyselina levulinová (2,46 mg/ml), byly stanoveny metodou kapilární elektroforézy. Obsah glukózáminu odpovídá celkovému obsahu chitinu a chitosanu, protože během hydrolyzy dochází k deacetylaci glukózáminu jako základní jednotky chitinu.

Kombinací těchto údajů s výsledky z titrace HBr se dá vyvodit složení CGC: glukán 88,3 %, glukózámin 6,4 %, N-acetylglukózámin 5,4 %, stupeň deacetylace chitinu 60 %.

Chitin-glukanový komplex je nerozpustný ve vodě, organických rozpouštědlech, slabých roztocích kyselin a zásad. Při smíchání s vodou tvoří gelovitou suspenzi.

7.3 Karboxymethylace chitin-glukanového komplexu

U postupu přípravy karboxymethyl chitin-glukanu z CGC byl sledován efekt změny následujících parametrů:

- použití kyseliny monochloroctové nebo její sodné soli,
- poměr voda/IPA,
- množství přidaného NaOH,
- množství použité monochloroctové kyseliny,
- čas reakce.

Všechny experimenty byly provedeny podle kapitoly 5.3.2., vstupní množství CGC bylo vždy 3 g. Výsledky jsou udány jako aritmetický průměr z minimálně 3 měření ± směrodatná odchylka.

7.3.1 Vliv použití kyseliny monochloroctové a její sodné soli

V dostupné literatuře je zmiňováno využití jak pro karboxymethylaci pomocí kyseliny monochloroctové (MCA) [31] nebo její sodné soli (Na-MCA) [32]. Proto bylo nutné rozhodnout, která varianta bude lépe uplatnitelná a poskytne prokazatelnější výsledky.

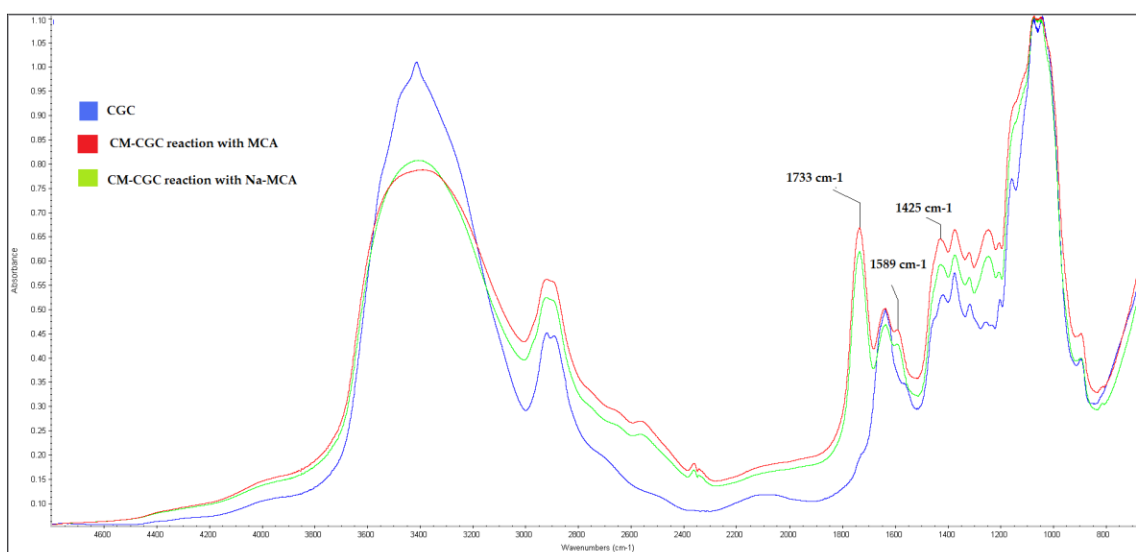
Po karboxymethylaci CGC jsou získány dva různé podíly, vodorozpustný a nerozpustný, porovnány byly oba dva. Ve vodě nerozpustná část byla dominantní v obou vzorcích. Z výsledků je patrné, že cca 12 % CM-CGC se stal rozpustným ve vodě. Navýšení ve vodě nerozpustného CM-CGC na 116 % v případě použití MCA, a 115 % v případě použití soli

MCA ze vstupní suroviny napovídá, že do polysacharidu byly zapracovány karboxymethylové skupiny (Tab. 4).

Tab.4. Poměr rozpustné a nerozpustné části a SD při použití MCA a Na-MCA.

	Výtěžek [g]		SD nerozpustného CM-CGC (titrace s HCl)
	Rozpustný CM-CGC	Nerozpustný CM-CGC	
MCA	0,42 ± 0,12	3,49 ± 0,19	1,18 ± 0,16
Na-MCA	0,38 ± 0,15	3,46 ± 0,17	1,11 ± 0,13

Derivatizace byla lépe prokázána charakteristickými absorpčními píky v IČ spektru (Obr. 17). Z IČ spektra je patrné, že po derivatizaci se objevuje nový pík 1733 cm^{-1} , který není patrný u výchozího CGC. Tento pík pak u vzorku CGC potvrzuje proběhnutí karboxymethylační reakce. Výsledný naměřený pík 1728 cm^{-1} odpovídá hodnotám představujícím karboxylové skupiny [57]. Zároveň můžeme z intenzity absorpčního píku 1733 cm^{-1} předpokládat vyšší stupeň substituce u CM-CGC připraveného s MCA než při použití Na-MCA.



Obr.17. IČ spektrum CGC a CM-CGC po reakci MCA a Na-MCA.

Pro určení stupně substituce (SD) se v literatuře uvádí několik způsobů stanovení např. titrace kyselinou chlorovodíkovou [32] nebo reakce s měďnatými ionty. Pro určení SD byla využita titrace s kyselinou chlorovodíkovou. Výsledky ukázaly, že vyšší SD má CM-CGC připravený s MCA (Tab. 4).

Porovnání SD vzorků pomocí titrace s kyselinou chlorovodíkovou je méně vhodné než vyhodnocením IČ spektrem z důvodu nízké rozpustnosti vzorků a časově náročného

postupu stanovení. U nerozpustného CM-CGC jsou titrační metody hodně závislé na homogenitě vzorku a kvalitě promytí mycelia. Z tohoto důvodu je pro další vyhodnocení vzorků využito porovnání IČ spektra, u kterého bylo dosaženo stejného výsledku jako při titračním stanovení.

7.3.2 Vliv poměru vody/IPA

Poměr vody a IPA v reakční směsi je významný parametr ovlivňující karboxymethylaci. Jayakumar a kol. uvádí, že při zvýšení poměru vody oproti IPA v reakci se sníží podíl karboxymethylovaného chitinu [37]. Proto bylo provedeno ověření i pro karboxymethyl chitin-glukan.

Bylo zjištěno, že zvýšení obsahu vody v reakční směsi způsobí aglutinaci CGC. Vzorek s nejvyšším podílem vody byl zcela aglutinovaný a míchání během reakce bylo téměř nemožné (Obr. 18).



Obr.18. Vliv množství vody na strukturu komplexu A-12:131, B-32:131 a C-42:131.

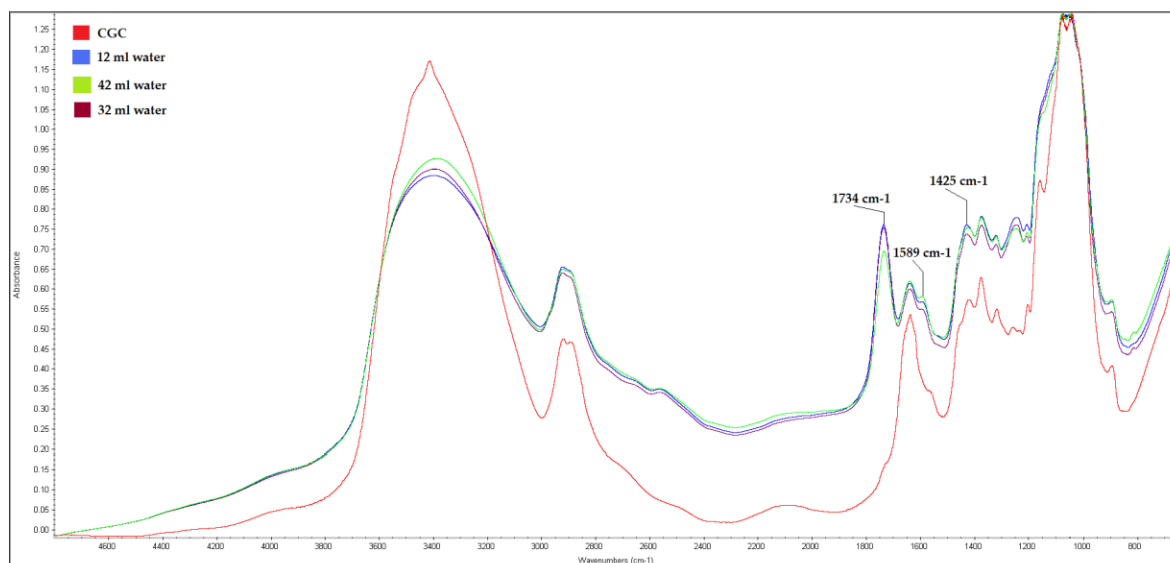
Kromě toho bylo zjištěno, že výtěžek ve vodě nerozpustné části CM-CGC postupně klesá se zvýšením podílu vody. Pokud jde o vodorozpustnou část CM-CGC, můžeme jen těžko dojít k jednoznačnému závěru, z důvodu značných ztrát v průběhu sedimentace a promývání vysráženého produktu (Tab. 5).

Tab.5. Poměr rozpustné a nerozpustné části při různém poměru voda:IPA.

voda : IPA	Výtěžek [g]	
	Rozpustný CM-CGC	Nerozpustný CM-CGC
12 : 131	0,33 ± 0,11	3,03 ± 0,20
32 : 131	0,44 ± 0,16	3,00 ± 0,18
42 : 131	0,36 ± 0,14	2,60 ± 0,12

Intenzita absorpčního pásma 1734 cm^{-1} na IČ spektru ukázala, že zvyšující se podíl vody při karboxymethylaci snižuje stupeň substituce. Ve výsledku byl jako nejlepší poměr vody a IPA pomocí IČ spektra a stupně substituce určen poměr 12:131. Z toho vyplývá, že

karboxymethylace CGC musí být prováděna s minimálním množstvím vody v reakční směsi (Obr. 19).



Obr.19. IČ spektrum CM-CGC při různém poměru voda: IPA.

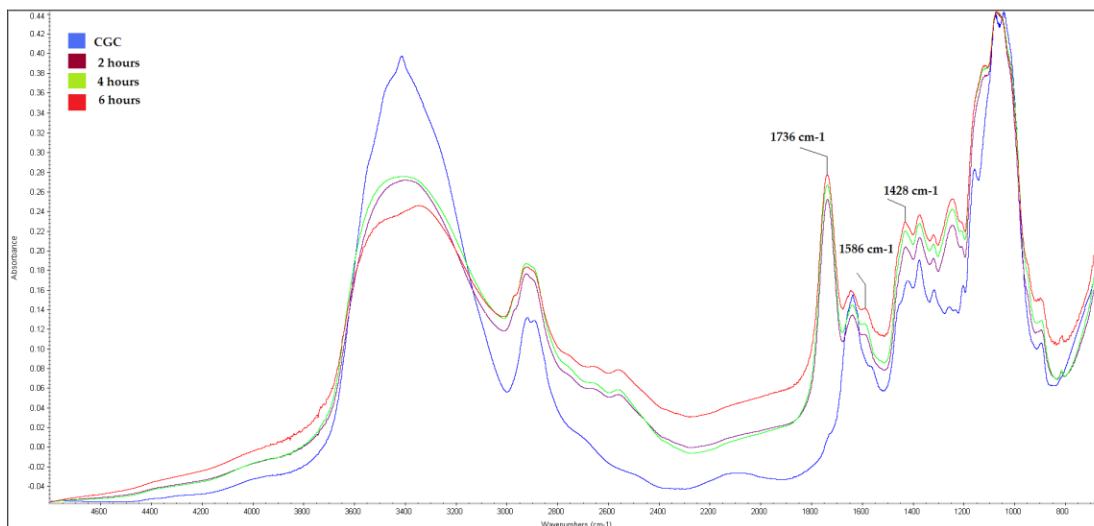
7.3.3 Vliv množství přidaného NaOH a doby reakce

U škrobu byl při karboxymethylaci prokázán vliv použitého množství NaOH. S rostoucím množstvím NaOH se zvyšoval stupeň substituce, ale jen po určitou hranici a pak začal klesat [29]. Při sledování vlivu koncentrace NaOH na karboxymethylaci CGC byla také sledována závislost na době reakce (2, 4, 6 hodin). Pokus ukázal, že v prvním případě, kdy reakční směs obsahovala 8,8 g NaOH, množství nerozpustného CM-CGC po 4 hodinách karboxymethylace mírně vzrostlo a poté začalo klesat. Pokles může být spojen s degradací komplexu v alkalickém prostředí. Po 6 hodinách reakce se navyšuje množství vodorozpustné části (Tab. 6).

Tab.6. Poměr rozpustné a nerozpustné části při reakci s 8,8 g NaOH.

Čas reakce [h]	Výtěžek [g]	
	Rozpustný CM-CGC	Nerozpustný CM-CGC
2	0,51 ± 0,13	3,54 ± 0,25
4	0,50 ± 0,14	3,63 ± 0,20
6	0,57 ± 0,14	3,08 ± 0,23

Soudě podle intenzity absorpčních pásem IČ spektra se stupeň substituce v čase zvyšoval. Nicméně mezi vzorky 4 hodiny a 6 hodin je minimální rozdíl (Obr. 20).

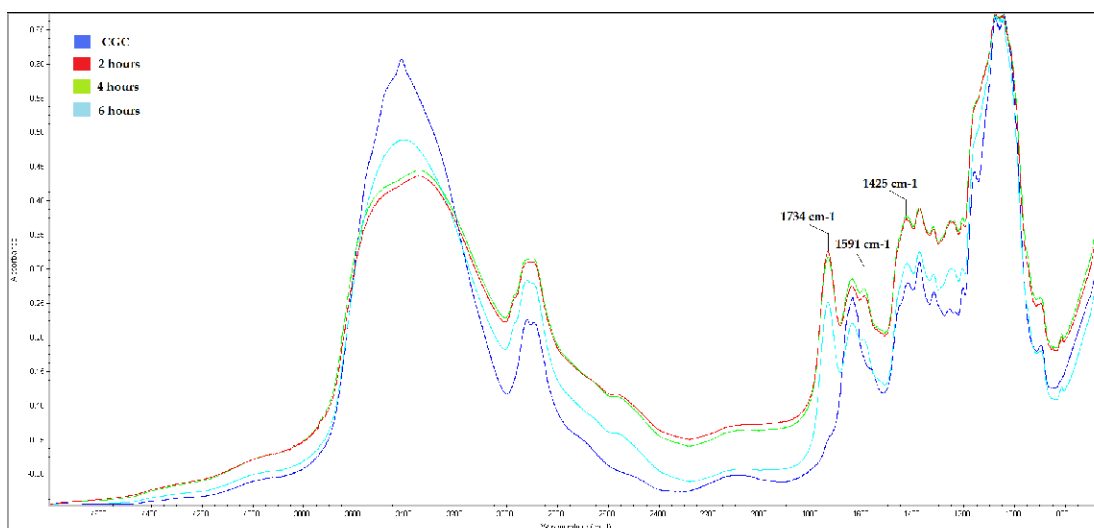


Obr.20. IČ spektrum CM-CGC s 8,8g NaOH po 2,4 a 6 hodinách.

V druhém případě, kdy reakční směs obsahovala 13,2 g NaOH množství nerozpustné CM-CGC mírně vzrůstalo během celé doby reakce (Tab. 7). Stupeň substituce určený z dat z IČ spektra ukazuje minimální rozdíl mezi vzorky z 2 a 4 hodin. Vzorek z 6 hodin měl výrazně nižší intenzitu absorpčního pásma, tedy i nižší hodnotu výsledného stupně substituce (Obr. 21).

Tab.7. Poměr rozpustné a nerozpustné části při reakci s 13,2 g NaOH po 2,4 a 6 hodinách.

Čas reakce [h]	Výtěžek [g]	
	Rozpustný CM-CGC	Nerozpustný CM-CGC
2	0,55 ± 0,15	1,98 ± 0,19
4	0,31 ± 0,12	2,14 ± 0,16
6	0,34 ± 0,18	2,28 ± 0,12

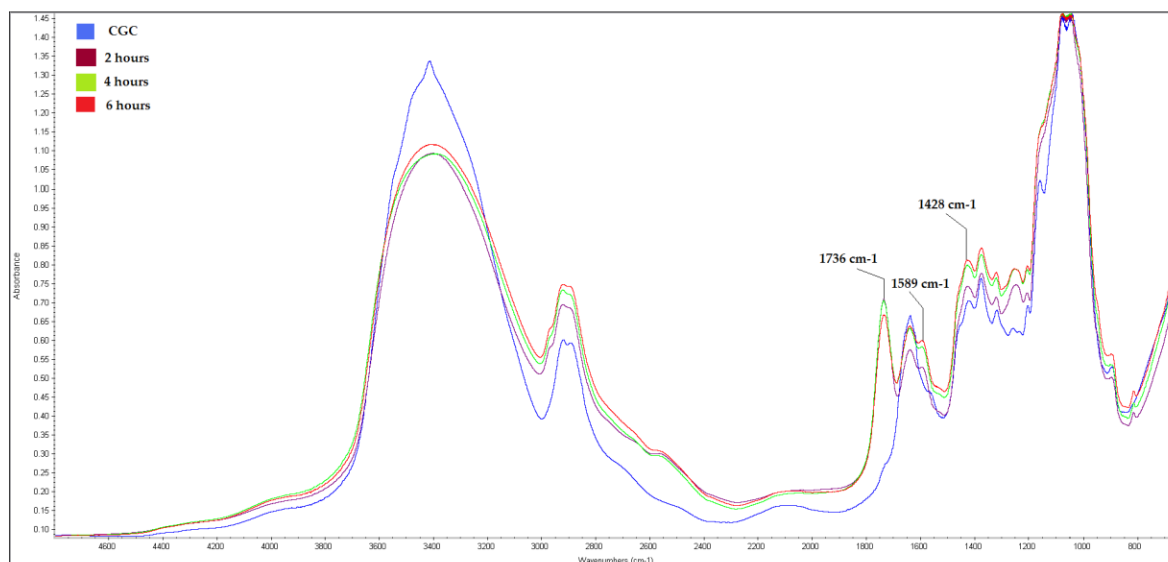


Obr.21. IČ spektrum CM-CGC s 13,2 g NaOH po 2,4 a 6 hodinách.

V posledním experimentu, při navýšení koncentrace NaOH na 17,6 g byl trend odlišný. Množství nerozpustného CM-CGC se během celé doby reakce mírně snižovalo (Tab. 8). Podle absorpčního pásma při 1736 cm^{-1} dochází během prvních 4 hodin k navyšování jeho intenzity, v 6 hodině již pravděpodobně začíná docházet k degradaci komplexu, což se projeví snížením intenzity i poklesem výtěžku reakce. Podle píku 1736 cm^{-1} množství karboxymethylových skupin v CM-CGC s časem klesalo (Obr. 22).

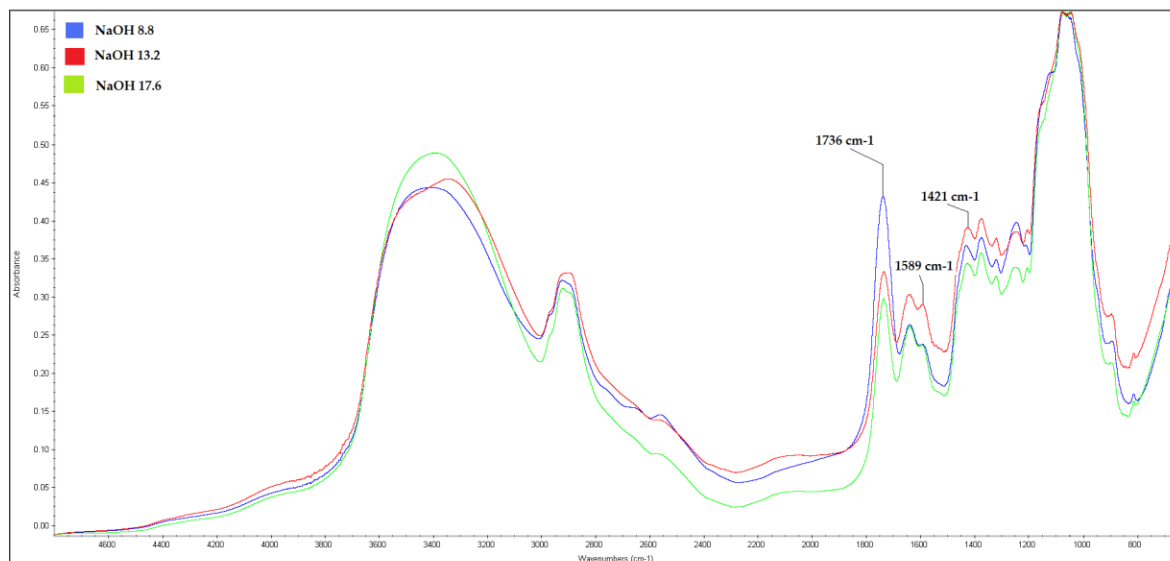
Tab.8. Poměr rozpustné a nerozpustné části při reakci s 17,6 g NaOH po 2,4 a 6 hodinách.

Čas reakce [h]	Výtěžek [g]	
	Rozpustný CM-CGC	Nerozpustný CM-CGC
2	$0,32 \pm 0,16$	$3,10 \pm 0,18$
4	$0,38 \pm 0,14$	$2,98 \pm 0,13$
6	$0,21 \pm 0,09$	$2,78 \pm 0,20$



Obr.22. IČ spektrum CM-CGC s 17,6 g NaOH po 2,4 a 6 hodinách.

Pro srovnání vlivu koncentrace NaOH byly vybrány vzorky izolované po 4 hodinové reakci. Bylo zjištěno, že intenzita absorpčního pásma 1736 cm^{-1} se snižuje s rostoucí koncentrací NaOH (Obr. 23).



Obr. 23. Porovnání IČ spekter při různé koncentraci NaOH.

Experiment ukázal, že zvýšením množství NaOH v reakční směsi se obecně snižuje výtěžek CM-CGC a množství navázaných karboxymethylových skupin. Nejlepších výsledků, vzhledem k předpokládanému užití, bylo dosaženo při koncentraci NaOH 8,8 g. Díky provedené kinetice, lze na základě IČ spekter a určené absorpci při 1736 cm^{-1} stanovit optimální dobu karboxymethylace CGC na 4 hodiny (Obr. 23).

7.3.4 Optimalizovaný postup karboxymethylace

Shrnutím výsledků můžeme navrhnout optimální podmínky karboxymethylace CGC z mycelia *S. commune*. Pro optimální přípravu požadovaného produktu musí být splněny tyto podmínky:

- po kultivaci biomasy musí být mycelium zpracováno postupem uvedeným v kapitole 5.2.2.,
- izolovaný chitin-glukanový komplex musí být co možná nejvíce zbaven vody odvodněním IPA, pro vlastní karboxymethylaci CGC může být s výhodou použit takto odvodněný produkt, provede se pouze přepočítání na sušinu,
- karboxymethylace CGC: navážka CGC, odpovídající 3 g suché hmotnosti, se smíchá s předem připraveným roztokem vzniklým rozpuštěním NaOH v demineralizované vodě s přídavkem IPA (11,6 g NaOH, 10 ml vody a 131 ml IPA), směs se inkubuje při pokojové teplotě po dobu 30 min (homogenizace a nabobtnání chitin-glukanu), poté se suspenze zahřeje na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a přidá se 6,6 g MCA, reakce probíhá při této teplotě 4 hodiny za neustálého míchání,

- izolace produktu CM-CGC: po karboxymethylaci se zastaví míchání a po sedimentaci produktu se z reakční směsi odstraní dekantací IPA, následně se sediment, tedy produkt CM-CGC, promíchá s demineralizovanou vodou (cca 200 ml), hodnota pH se upraví na 5,0-5,5 pomocí 6 M HCl a míchá se 30 min, krok dekantace a promývání demineralizovanou vodou se opakuje tolikrát, až je dosaženo vodivosti nižší než 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$, při promývání produktu je vymyt vodorozpustný podíl a zůstane pouze ve vodě nerozpustná část CM-CGC, která se odvodní s pomocí IPA a suší se při 60 °C po dobu 12-24 hodin.

Jistě existují další možnosti zvýšení stupně substituce, jako např. optimalizace koncentrace MCA a času inkubace CGC po přidání IPA-voda-NaOH za laboratorní teploty. Tyto experimenty nebyly vzhledem k časovým možnostem této diplomové práce provedeny.

7.4 Charakteristika karboxymethyl chitin-glukanového komplexu

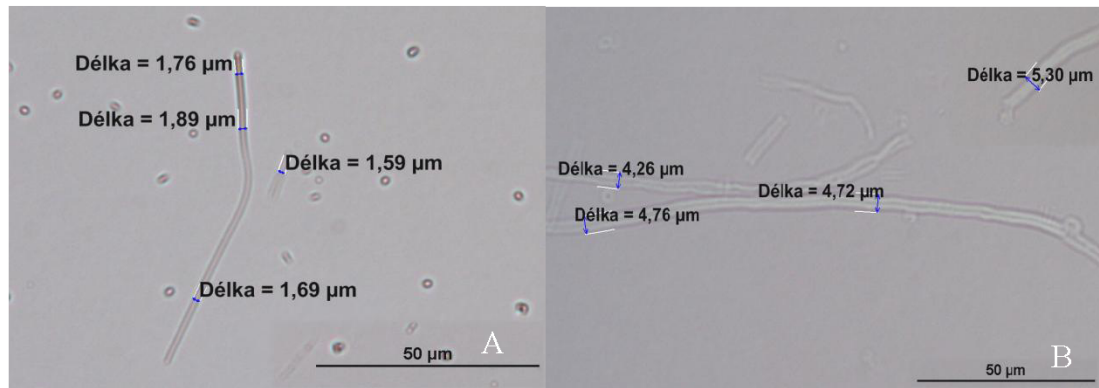
Karboxymethylovaný komplex má v suchém stavu strukturu jemného prášku, který má světle žlutou barvu a je bez vůně a zápachu (Obr. 24).



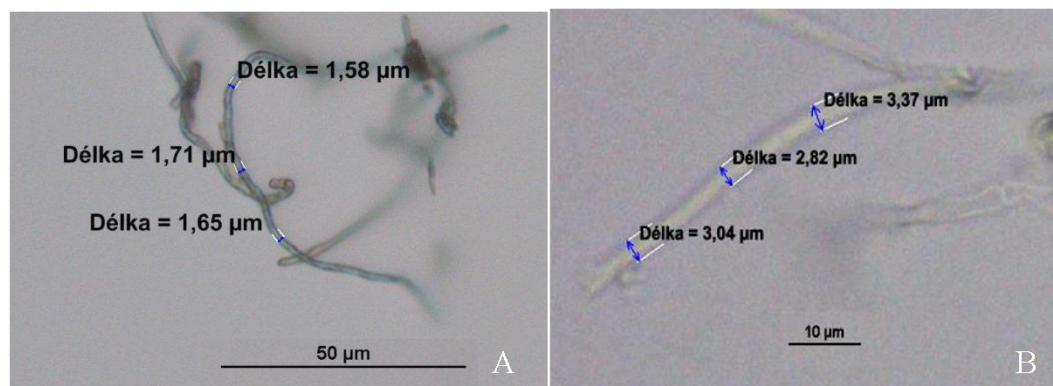
Obr.24. Karboxymethylovaný chitin-glukanový komplex.

Mikroskopická struktura CGC se po karboxymethylaci nemění, jak ukazuje obrázek z optického mikroskopu (Obr. 25A.). Velikost mikrovláken zůstala nezměněná a to o průměru 1,5 až 2 μm .

Při kontaktu s vodou mikrovlákna CM-CGC bobtnají ve větší míře než CGC. Z obrázků (Obr. 25A, 25B) je patrná bobtnací mohutnost CM-CGC, kdy mikrovlákna navýšila svůj průměr o 193 %. Zatímco mikrovlákna CGC zvýšila svůj průměr pouze o 87 % (Obr. 26). Data ukazují že karboxymethylovaný CGC má po namočení větší aktivní povrch mikrovláken.



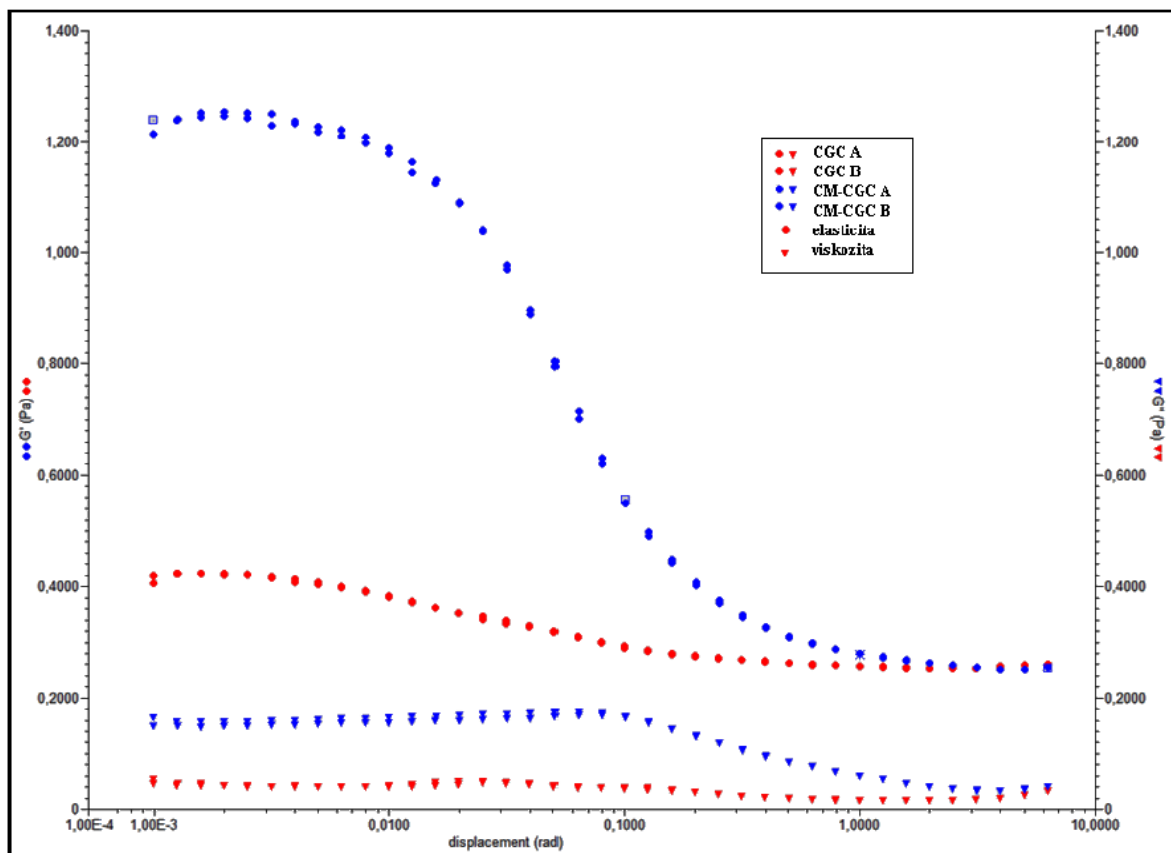
Obr. 25. CGC z optického mikroskopu, A: Suchá vlákna CM-CGC, B: nabotnalá vlákna CM-CGC.



Obr. 26. CGC z optického mikroskopu, A: suchý komplex, B: komplex po nabotnutí s vodou.

Pomocí karboxymethylace bylo dosaženo mírného zgelovatění povrchu mikrovláken. Při vizuálním porovnání můžeme zhodnotit, že s vodou smíchaný CGC vytvořil suspenzi, zatímco CM-CGC po smíchání s vodou vytvořil gelovitou strukturu. Podle předpokladu byly karboxymethylací ovlivněny reologické vlastnosti suspenze CGC. Rozdíl mezi 1,5 % suspenzí CGC a gelem CM-CGC je patrný z grafu reologických vlastností (Obr. 27). U materiálu CM-CGC byly detekovány značně vyšší hodnoty parciálních stříhových modulů, elastického G' a viskózního G'' než u porovnávaného materiálu CGC. Zvýšená hodnota stříhového modulu G' vypovídá o nárůstu hydrodynamického odporu systému, resp. zvýšení jeho mechanické „tuhosti“. Tento fakt je pravděpodobně dán zvýšenou tvorbou spletenin jednotlivých makromolekulárních řetězců a vzniku určité časově proměnné gelovité sítě, která celý systém roztoku stabilizuje.

Oproti tomu u suspenze CGC je tvorba podobných spletenin spíše méně pravděpodobná, proto je celková tuhost tohoto systému, daná stříhovými moduly podstatně nižší.



Obr.27. Graf porovnání reologických vlastností mezi CGC a CM-CGC.

Je známým faktem, že CGC vykazuje pozoruhodnou vlastnost absorpce iontů kovů. Pro zjištění, zda karboxymethylace ovlivňuje sorpční kapacitu CGC, byla sledována absorpce Cu^{2+} z roztoku porovnáním CGC a CM-CGC. Experiment byl proveden následovně: CGC a CM-CGC byly rozsuspendovány ve vodě a byl přidán nadbytek CuSO_4 . Suspenze byla intenzivně promíchána a nenavázané množství Cu^{2+} bylo odstraněno promytím demineralizovanou vodou. CGC a CM-CGC s navázanými Cu^{2+} byly opět rozsuspendovány ve vodě, byla přidána H_2SO_4 k uvolnění kovových iontů, uvolněné Cu^{2+} byly kvantifikovány titrací thiosíranem sodným. Experiment prokázal, že 1 g CGC je schopen absorbovat až 0,21 mMol Cu^{2+} iontů, zatímco 1 g CM-CGC absorboval 0,63 mMol Cu^{2+} iontů. Ze získaných výsledků vyplývá, že karboximethylace zvýšila sorpční kapacitu CGC pro Cu^{2+} ionty 3krát.

ZÁVĚR

K přípravě karboxymethyl chitin-glukanového komplexu bylo využito mycelium vyšší houby *S. commune*. Bylo zjištěno, že při submersní kultivaci *S. commune* produkuje 11,3 g/l mycelia, které obsahuje 40 % chitin-glukanového komplexu. Celková produkce komplexu dosáhla 5,3 g/l po 7 dnech kultivace. V průběhu kultivace se postupně zvyšoval obsah CGC v myceliu a zároveň se tím zvyšoval podíl glukanu v komplexu.

Chitin-glukanový komplex byl charakterizován jako jemný prášek, který má bílou až světle žlutou barvu a je bez vůně a zápachu. Je složen z mikrovláken o průměru cca 2 μm . Komplex je složen z glukanu (88,3 %), glukózaminu (6,4 %), N-acetylglukózaminu (5,4 %) a stupeň deacetylace chitinu dosahuje 60 %.

Pro samotnou karboxymethylaci CGC byl testován vliv několika parametrů. Z výsledků lze pro reakci doporučit kyselinu monochloroctovou než její sodnou sůl. Při jejím využití byl vyšší výtěžek a karboxymethyl chitin-glukanový komplex vykazoval vyšší stupeň substituce. Poměr vody a IPA v reakční směsi také ovlivňoval karboxymethylaci, kdy se s rostoucím podílem vody snižoval stupeň substituce. Při zvyšování koncentrace NaOH v reakční směsi nad 8,8 g se snižoval výtěžek CM-CGC a množství navázaných karboxymethylových skupin.

Mikroskopická struktura chitin-glukanového komplexu se po karboxymethylaci nemění. Velikost mikrovláken zůstala nezměněná a to o průměru cca 2 μm . Při kontaktu s vodou mikrovlákna CM-CGC botnají 2,2x více než CGC. Pomocí karboxymethylace bylo dosaženo mírného zgelovatění povrchu mikrovláken. CGC tvořil po smíchání s vodou suspenzi, zatímco CM-CGC po smíchání s vodou vytvořil gelovitou strukturu. U vodní suspenze CM-CGC byly totiž detekovány značně vyšší hodnoty parciálních stříhových modulů, elastického G' a viskózního G'' než u porovnávaného materiálu CGC. Po karboxymethylaci se navýšila i schopnost absorbovat měďnaté ionty a to trojnásobně než je tomu u CGC.

Karboxymethyl chitin-glukan připravený ze submerzního mycelia *S. commune* je perspektivní látka pro využití v potravinářských, kosmetických a farmaceutických výrobcích.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BUCHTA, Vladimír. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. Praha : Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-565-5.
- [2] VALÍČEK, Pavel. *Houby a jejich léčivé účinky*. Benešov : START, 2011, str. 135. ISBN 978-80-86231-54-9.
- [3] AMBROŽOVÁ, Jana. *Mikrobiologie v technologii vod*. Praha : VŠCHT Praha, 2004. ISBN 80-7080-534-X.
- [4] KAVANAGH, K. *Fungi: Biology and Applications*. Chichester : Wiley, 2005, str. 280. ISBN 0-470-86702-7.
- [5] GOW, N. Professor Neil Gow: Chair in Microbiology. *School of Medical Sciences*. [Online] [Citace: 5. 3 2012.] <http://www.abdn.ac.uk/sms/staffprofile.php?id=n.gow>.
- [6] KAVKOVÁ, Miloslava. *Biologie houbových organismů*. České Budějovice : JCU, 2011.
- [7] NOVÁK, Miroslav. β -glukany, historie a současnost. *Chemické listy*. 2007, **101**, 872-880. ISSN 1213-7103.
- [8] ŠANDULA J., KOGAN G., KAČURÁKOVÁ M., MACHOVÁ E. Microbial (1,3)- β -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate Polymers*. 1999, **38**, 247-253. ISSN 0144-8617.
- [9] BACIC A., FINCHER G. B., STONE B. A. *Chemistry, biochemistry and biology of (1,3)- β -glucans and related polysaccharides*. Melbourne : Elsevier Inc., 2009, str. 677. ISBN 978-0-12-373971-1.
- [10] ALEKSEEVA S. A., SHEVCHENKO N. M., KUSAYKIN M. I., PONOMRENKO L. P., ISAKOV V. V., ZVYAGINTSEVA T. N. Polysaccharides of diatoms occurring in Lake Baikal. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2005, **41**, 185-191. ISSN 1608-3024.
- [11] ENSLEY H. E., TOBIAS B., PRETUS H. A., MCNAMEE R. B., JONES E. L., BROWDER W., WILLIAMS D. L. NMR spectral analysis of a water-insoluble (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Research*. 1994, **258**, 307-311. ISSN 0008-6215.

- [12] KOLLAR R., REINHOLD B., PETRAKOVA E., YEH H., ASHWELLI G., DRGONOVA J., KAPTEYN J., KLIS F., CABIB E. Architecture of the yeast cell wall – $\beta(1\rightarrow6)$ -glucan interconnects mannoprotein, $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan, and chitin. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997, **272**, 17762-17775. ISSN 0021-9258.
- [13] KIM Y. T., KIM E. H., CHEONG C., WILLIAMS D. L., KIM C. W., LIM S. T. Structural characterization of β -D-(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)-linked glucans using NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*. 2000, **328**, 331-341. ISSN 0008-6215.
- [14] KOLAŘÍK, Jaroslav. *Péče o dřeviny rostoucí mimo les - II*. Vlašim : ZO ČSOP, 2005. ISBN 978-80-86327-85-3.
- [15] ANTONÍN, Václav. *Encyklopedie hub a lišejníků*. Praha : Academia, 2006. ISBN 80-200-1476-4.
- [16] PETERSEN, J. H. *MycoKey*. [Online] [Citace: 12. 2 2012.] Dostupné z: <http://www.mycology.org/result.shtml?genSpec=Genus&ID=750&showList=Result&random=7>. JHP-94.261.
- [17] KAWAGOE M., HYAKUMURA K., SUYE S., MIKI K., NAOE K. Application of bubble column fermentors to submerged culture of *Schizophyllum commune* for production of l-malic acid. *Fermentation and Bioengineering*. 1997, **84 (4)**, 333-336. ISSN 1389-1723.
- [18] RAU U., BRANDT C. Oxygen controlled batch cultivations of *Schizophyllum commune* for enhanced production of branched β -1,3-glucans. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 1994, **16**, 161-165. ISSN 1976-3816.
- [19] KIMURA, Y. et al. Clinical evaluation of sizofiran as assistant immunotherapy in treatment of head and neck cancer. *Acta Otolaryngology*. 1994, **114**, 192-195. ISSN 0001-6489.
- [20] BORCHERS A. T., STERN J. S., HACKMAN R. M., KEEN C. L., GERSHWIN M. E. Mushrooms, tumors, and immunity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1999, **221 (4)**, 281-293. ISSN 1525-1376.
- [21] SIETSMA J. H., WESSELS J. G. H. Chemical analysis of the hyphal wall of *Schizophyllum commune*. *Biocimica et Biophysica Acta*. 1977, **496**, 225-239. ISSN 0005-2736.

- [22] SIETSMA J. H., WESSELS J. G. Evidence for covalent linkages between chitin and β -Glucan in fungal wall. *Journal of General Microbiology*. 1979, **114**, 99-108. ISSN 0022-1287.
- [23] OKAMOTO Y., KAWAKAMI K., MIYAKATE K., MORIMOTO M., SHIGESAMA Y., MINAMI S. Analgesic effects of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 2002, **49**, 249-52. ISSN 0144-8617.
- [24] CHAUHAN A. K., VARMA A. *A Textbook of Molecular Biotechnology*. New Delhi : I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., 2009, str. 1354. ISBN 9789380026374.
- [25] SMIRNOU D., KRČMÁŘ M., PROCHÁZKOVÁ E. Chitin-Glucan Complex Production by *Schizophyllum commune* Submerged Cultivation. *Journal of Microbiology*. 2011, **60** (3), 223-228. ISSN 1225-8873.
- [26] SHABRUKOVA N. V., ZYABLIKOVA T. A., ZAYNETDINOVA D. R., KHALITOV F. G., GAMAYUROVA V. S. Study of the nature of chitin-glucan bond in chitin-glucan complex. *Biochemistry and Biotechnology*, 2001, **4** (1). ISSN 0928-4869.
- [27] EFSA, European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the safety of 'Chitin-glucan' as a Novel Food ingredient. *EFSA Journal*. Parma, Italy : ESFA, 2010, **8** (7). ISSN: 1831-4732.
- [28] HLADÍK, Lumír. Houby při podpoře imunity organismu člověka. *Bylinné prostředky pro zdraví*. [Online] 2004. [Citace: 8. Leden 2012.] Dostupné z:<http://hladik.hopem.cz/byliny/lecive-ucinky-hub.pdf>.
- [29] YOON M. J., DOH S. J., IM J. N. Preparation and Characterization of Carboxymethyl Cellulose Nonwovens by a Wet-laid Process. *Fibers and Polymers*. 2011, **12** (2), 247-251. ISSN 1229-9197.
- [30] MAGNANI M., CALLARI M. C., DE MACEDO F. C., MORI M. P., COLUS I. M. S., CASTRO-GOMEZ R. J. H. Optimized methodology for extraction of (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative. *Carbohydrate Polymers*. 2009, **78** (4), 658-665. ISSN 01448617.
- [31] MACHOVÁ E., KOGAN G., ŠOLTÍS L., KVAPOLOVÁ K., ŠANDULA J. Ultrasonic depolymerization of the chitin–glucan isolated from *Aspergillus niger*. *Reactive & Functional Polymers*. 1999, **42**, 265–271. ISSN 1381-5148.

- [32] NATTAPUTWAT N., PURKKAO N., SUWITHAYAPAN O. Preparation and Application of Carboxymethyl Yam (*Dioscorea esculenta*) Starch. *AAPS PharmSciTech*. 2009, **10** (1), 193-198. ISSN 1530-9932.
- [33] EFANOV M. V., POPOVA A. A. Carboxymethylation of peat by monochloroacetic acid. *Chemistry of Natural Compounds*. 2011, **47** (3), 498–500. ISSN 1573-8388.
- [34] WANG G., LU g., AO Q., GONG Y., ZHANG X. Preparation of cross-linked carboxymethyl chitosan for repairing sciatic nerve injury in rats. *Biotechnology Letters*. 2010, **32**, 59-66. ISSN 1573-6776.
- [35] ELEVITCH, Craig R. *Traditional Trees of Pacific Islands: Their Culture, Environment, and Use*. Holualoa : Permanent Agriculture Resources, 2006, str. 816. ISBN 0970254458.
- [36] YAACOB B., AMIN M. C. I. M., HASHIM K. Optimization of Reaction Conditions for Carboxymethylated Sago Starch. *Iranian Polymer*. 2011, **20** (3), 195-204. ISSN 1735-5265.
- [37] JAYAKUMAR R., PRABAHARAN M., NAIR S. V., TOKURA S., TAMURA H., SELVAMURUGAN N. Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. *Progress in Materials Science*. 2010, **55**, 675–709. ISSN 0079-6425.
- [38] LAZAROVÁ M., LÁBAJ J., KOGAN G., SLAMENOVÁ D. Carboxymethyl chitin-glucan enriched diet exhibits protective effects against oxidative DNA damage induced in freshly isolated rat cells. *Neoplasma*. 2006, **53** (5), 434-439. ISSN 0028-2685.
- [39] SLAMENŇOVÁ D., KOVÁČIKOVÁ I., HORVÁTHOVÁ E., WSÓLOVÁ L., NAVAROVÁ J. Carboxymethyl chitin-glucan (CM-CG) protects human HepG2 and HeLa cells against oxidative DNA lesions and stimulates DNA repair of lesions induced by alkylating agents. *Toxicol In Vitro*. 2010, **24** (7), 1986-1992. ISSN 0887-2333.
- [40] SLAMENŇOVÁ D., LÁBAJ J., KRIŽKOVÁ L., KOGAN G., ŠANDULA J., BRESGEN N., ECKL P. Protective effects of fungal (1→3)-β-D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. *Cancer Letters*. 2003, **198** (2), 153-160. ISSN 0304-3835.

- [41] DERGUNOVA M. A., ALEXEENKO T. V., ZHANAEVA S. Y. Characterization of the novel chemically modified fungal polysaccharides as the macrophage stimulators. *International Immunopharmacology*. 2009, **9**, 729-733. ISSN 1567-5769.
- [42] CHORVATOVICOVÁ D., MACHOVÁ E., SANDULA J. Ultrasonication: the way to achieve antimutagenic effect of carboxymethyl-chitin-glucan by oral administration. *V13 Mutation Research*. 1998, **412 (1)**, 83-89. ISSN 0027-5107.
- [43] TAMÁS L., HUTTOVÁ J., MISTRÍK I., KOGAN G. Effect of Carboxymethyl Chitin-Glucan on the Activity of Some Hydrolytic Enzymes in Maize Plants. *Chemical papers*. 2002, **56 (5)**, 326-329. ISSN: 1336-9075.
- [44] JANALÍK, J. *Viskozita tekutin a její měření*. Ostrava : VŠB TU, 2010. ISBN 80-7078-595-0.
- [45] KHAN, T.A. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2002, **5 (3)**, 205-212. ISSN 1482-1826.
- [46] KUMARI M., SURVASE A. S., SINGHAL S. R. Production of schizophyllan using *Schizophyllum commune* NRCM. *Bioresource Technology*. 2008, **99 (5)**, 1036-1043. ISSN 0960-8524.
- [47] QINGYAO Y., XIUPING Q. Effects of Some Nutrient Conditions on Mycelium Growth and L-malic Acid Production of *Schizophyllum commune*. *Acta Edulis Fungi*. 1996, **3**, 18-24. ISSN 1005-9873.
- [48] HEBE P. Rojo, VATTUONE M. A., SAMPIETRO A. R. Invertase from *Schizophyllum commune*. *Phytochemistry*. 1994, **37 (1)**, 119-123. ISSN 0031-9422.
- [49] BILOUS, MACKENZIE C. R., DORIS. Ferulic Acid Esterase Activity from *Schizophyllum commune*. 1988, **54 (5)**, 789-792. ISSN 1098-5336.
- [50] DE VRIES O. M. H., KOOISTRA W. H. C. F., WESSELS J. G. H. Formation of an Extracellular Laccase by a *Schizophyllum commune* Dikaryon. 1986, **132**, 2817-2826. ISSN 1465-2080.
- [51] HALTRICH D., PREISS M., STEINER W. Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of *Schizophyllum commune*. *Enzyme and Microbial Technology*. 1993, **15 (10)**, 854-860. ISSN 0141-0229.

[52] HALGASOVÁ N., KUTEJOVÁ E., TIMKO J. Purification and some characteristics of the acetylxylan esterase from *Schizophyllum commune*. *Biochemical journal*. 1994, **298**, 751-755. ISSN 0264-6021.

[53] DESROCHERS M., JURASEK L., PAICE M. G. High Production of β -Glucosidase in *Schizophyllum commune*: Isolation of the Enzyme and Effect of the Culture Filtrate on Cellulose Hydrolysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 1981, **41**, 222-228. ISSN 1098-5336.

[54] TENKANEN M., SIIKA-AHO M. An α -glucuronidase of *Schizophyllum commune* acting on polymeric xylan. *Journal of Biotechnology*. 2000, **78 (2)**, 149-161. ISSN 0168-1656.

[55] FUKUYAMA M., MIYAKE Y. Purification and Some Properties of Cholesterol Oxidase from *Schizophyllum commune* with Covalently Bound Flavin. *Journal of Biochemistry*. 1978, **85(5)**, 1183-1193. ISSN 1756-2651.

[56] WESSELS, J. G. H. Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *New Phytology*. 1993, **123**, 397-413. ISSN 1469-8137.

[57] ZHAO Z., WANG Z., YE N., WANG S. A novel N, O-carboxymethyl amphoteric chitosan/poly (ethersulfone) composite MF membrane and its charged characteristics. *Desalination*. 2001, **144**, 35-39. ISSN 0011-9164.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CGC	Chitin-glukan komplex
CM-CGC	Karboxymethyl chitin-glukan komplex
IPA	isopropanol
MCA	Kyselina monochloroctová.
Na-MCA	Sodná sůl kyseliny monochloroctové
SD	Stupeň substituce (Substitution of Degree)
vvm	Množství litrů vzduchu za 1 minutu v 1l média

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr.1.	Struktura buněčné stěny kvasinek [5].	14
Obr.2.	Větvený (1,3;1,6)- β -glucan [9].	16
Obr.3.	Schéma trojrozměrné sítě heteropolymerního komplexu <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [9].	17
Obr.4.	A: plodnice <i>Schizophyllum commune</i> [15], B: průřez plodnicí [16].	18
Obr.5.	Struktura R glukanu/chitin komplexu a možnosti větvení [22].	21
Obr.6.	O-karboxymethylace glukanu [29].	23
Obr.7.	Chemická reakce chitinu a chitosanu O-karboxymethylací [37].	25
Obr.8.	Vliv času a koncentrace NaOH na stupeň substituce [32].	26
Obr.9.	Schématické znázornění přípravy chitin-glukanového komplexu.	34
Obr.10.	Schéma přípravy karboxymethyl chitin-glukanového komplexu.	35
Obr.11.	Speciální nástavec pro měření reologických vlastností pro gelovité materiály.	40
Obr.12.	Růst mycelia [g/l], produkce CGC [g/l], změna pH a pO ₂ během kultivace <i>S. commune</i> .	42
Obr.13.	Změna obsahu sacharózy a glukózy v živné půdě během kultivace <i>S. commune</i> .	42
Obr.14.	Změna podílu chitinu a glukanu v CGC a nárůst CGC v myceliu [%] v průběhu kultivace.	43
Obr.15.	Struktura chitin-glukanového komplexu.	44
Obr.16.	Chitin-glukanový komplex zdokumentovaný metodou SEM.	44
Obr.17.	IČ spektrum CGC a CM-CGC po reakci MCA a Na-MCA.	46
Obr.18.	Vliv množství vody na strukturu komplexu A-12:131, B-32:131 a C-42:131.	47
Obr.19.	IČ spektrum CM-CGC při různém poměru voda: IPA.	48
Obr.20.	IČ spektrum CM-CGC s 8,8g NaOH po 2,4 a 6 hodinách.	49
Obr.21.	IČ spektrum CM-CGC s 13,2 g NaOH po 2,4 a 6 hodinách.	49
Obr.22.	IČ spektrum CM-CGC s 17,6 g NaOH po 2,4 a 6 hodinách.	50
Obr.23.	Porovnání IČ spekter při různé koncentraci NaOH.	51
Obr.24.	Karboxymethylovaný chitin-glukanový komplex.	52
Obr.25.	CGC z optického mikroskopu, A: Suchá vlákna CM-CGC, B: nabotnalá vlákna CM-CGC.	53
Obr.26.	CGC z optického mikroskopu, A: suchý komplex, B: komplex po nabotnání s vodou.	53
Obr.27.	Graf porovnání reologických vlastností mezi CGC a CM-CGC.	54

SEZNAM TABULEK

Tab.1.	Hlavní polymery nacházející se v buněčných stěnách různých hub [4].	13
Tab.2.	Některé zdroje β -glukanu [9].	15
Tab.3.	Přehled složek buněčné stěny <i>Schizophyllum commune</i> [21].	20
Tab.4.	Poměr rozpustné a nerozpustné části a SD při použití MCA a Na-MCA.	46
Tab.5.	Poměr rozpustné a nerozpustné části při různém poměru voda:IPA.	47
Tab.6.	Poměr rozpustné a nerozpustné části při reakci s 8,8 g NaOH.....	48
Tab.7.	Poměr rozpustné a nerozpustné části při reakci s 13,2 g NaOH po 2,4 a 6 hodinách.	49
Tab.8.	Poměr rozpustné a nerozpustné části při reakci s 17,6 g NaOH po 2,4 a 6 hodinách.	50