

Identifikace enzymových aktivit štěpících sacharosu v kultuře bakterie *Leuconostoc garlicum*

Bc. Viktor Holomek

Diplomová práce
2015

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Viktor Holomek
Osobní číslo: T12860
Studijní program: N2808 Chemie a technologie materiálů
Studijní obor: Inženýrství ochrany životního prostředí
Forma studia: prezenční

Téma práce: Identifikace enzymových aktivit štěpicích sacharosu
v kultuře bakterie *Leuconostoc garlicum*

Zásady pro vypracování:

1. Proveďte literární rešerši na dané téma.
2. Navrhněte postup identifikace enzymových aktivit štěpicích sacharosu.
3. Proveďte příslušné experimenty.
4. Teorii, výsledky a diskuzi sepište v předepsané formě.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: tiskárenská/elektronická

Seznam odborné literatury:

1. S.M. Holt, H. Al-Sheikh and K.-J. Shim. (2001) Characterization of dextran-producing *Leuconostoc* strains. *Lett.Appl.Microbiol.*32, 185-189.
2. P. Cipek, E. Hlavoňová, M. Matulová, D. Mislavcová, J. Růžička, M. Koutný, L. Kepřová. (2011) Isolation and characterization of an extracellular glucan produced by *Leuconostoc garlicum* PR. *Carbohydr.Polym.*83, 88-93.
3. J. Káš, M. Kodlíček, O. Valentová. (2006) *Laboratorní techniky biochemie*. VŠCHT Praha.
4. K. Štulík a kol. (2004) *Analytické separační metody*. UK v Praze, Nakladatelství Karolinum, Praha 2004.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Marek Ingr, Ph.D.

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

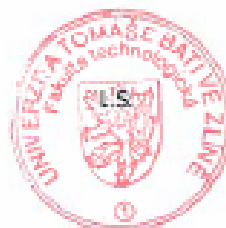
20. ledna 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

15. května 2015

Ve Zlíně dne 10. února 2015

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan



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

Příjmení a jméno: HOLDTEK VIKTOR

Obor: 102P

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 neobhajení práce.

Ve Zlíně 14.5.2015


.....

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 nevyjádřeně 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 nahlázení 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, užje-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).

⁴⁾ 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). Odprá-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 vynaložil, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Dextransacharasa je enzym, původně izolovaný z bakterie *Leuconostoc mesenteroides*, který katalyzuje přenos zbytků D-glukopyranosylu ze sacharózy do struktury dextransu, přičemž se uvolňuje fruktosa. Dextran je látka hojně používaná v lékařství jako náhradní koloidní roztok krevní plasmy (plasmaexpander). Využívá se i jako sorbent k separaci molekul v náplňových kolonách (sephadex). Dextran tvořený bakterií *leuconostoc garlicum* vykazuje relativně vysoký stupeň čistoty a její roztoky vykazují relativně nízkou viskozitu. Existuje několik možných metod jak prokázat aktivitu enzymu s jeho následnou izolací. Některé tyto postupy jsou studovány v této práci. Enzymová aktivita štěpící sacharosu může být prokázána metodou na redukující cukry, která využívá kyseliny bicinchoninové. Metoda je založena na detekci měďných iontů vzniklých redukcí iontů měďnatých redukujícími sacharidy pomocí této kyseliny. S využitím této metody bylo možno stanovit Michaelisovu konstantu enzymu, Pro ověření identity enzymové reakce byla vyvinuta metoda na bázi chromatografie na tenké vrstvě. Ta slouží k rozlišení jednotlivých redukujících monosacharidů, a tedy k určení vedlejšího produktu enzymem katalyzované reakce. Zjištěná přítomnost fruktosy v reakční směsi potvrzuje, že aktivním enzymem je skutečně dextransacharasa. Zároveň byla zkoumána i možnost detekce enzymové aktivity metodou zymogramu, tedy identifikace dextransu vytvořeného aktivní dextransacharasou v gelu po gelové elektroforéze. Tato metoda však neposkytla očekávané výsledky, pravděpodobně proto, že dextransacharasa je z podstatné části vázána na dextran. Byly rovněž učiněny pokusy o izolaci a zakoncentrování dextransacharasy, bylo však dosaženo pouze dílčího úspěchu metodou frakčního vysolování proteinů síranem amonným.

Klíčová slova: Dextran, dextransacharasa, enzym, *Leuconostoc garlicum*, aktivita, izolace

ABSTRACT

Dextranase is an enzyme isolated from bacterium *Leuconostoc garlicum*, which catalyzes the transfer of D-glucopyranosyl from sucrose to dextran structure, while fructose is released. Dextran is widely used in medicine as a substitute blood plasma colloid (plasma expander). Dextran can be used as a sorbent for molecular separation in packet column (sephadex). There are several methods of activity detection and isolation of the enzyme. Enzyme activity cleaving sucrose can be detected using assay for reducing sugars, which makes use of bicinchoninic acid. This assay is based on the bicinchoninic-acid detection of Cu^+ ions obtained by the reduction of Cu^{2+} ions by reducing carbohydrates. This method allowed us to determine the Michaelis constant of the enzyme. To confirm the identity of the enzymatic reaction a method based on thin-layer chromatography was developed. This method is able to distinguish among different reducing monosaccharides and thus to determine the byproduct of the enzymatic reaction. The presence of fructose in the reaction mixture determined this way indicates that the active enzyme is really dextranase. A possibility of detection of the enzyme activity by the method of zymogram, i.e. identification of dextran produced by the active dextranase in a gel after gel electrophoresis, was studied simultaneously. However, this method did not bring expected results, likely due to the fact that a substantial part of dextranase is bound to dextran. Attempts were made in order to isolate and concentrate dextranase, but only one method, fraction precipitation by ammonium sulfate, was partially successful. Here you are, after incubation of the enzyme with sucrose, the fructose created spots visible, which are freely into solution. Since it is likely that dextranase is bound to the resulting dextran, it is possible to perform the method of zymogram. This method is based on the detection of dextran. For the separation and concentration of the sample are suitable methods such as ammonium sulphate or fractionation gel chromatography. Chromatography in this case could not be used, due to the low concentration of the enzyme.

Keywords: Dextran, dextranase, enzyme, *Leuconostoc garlicum*, activity, isolation

Tímto bych chtěl poděkovat svému vedoucímu diplomové práce RNDr. Marku Ingrovi, Ph.D. za odborné vedení, čas, který mi věnoval a za důležité rady, které mi při vypracování diplomové práce poskytnul.

Dále bych chtěl poděkovat i všem ostatním, jako rodině, přátelům a mým nejbližším, kteří mě podporovali a pomáhali nejen při sepsání diplomové práce, ale po celou dobu mého studia.

Obsah:

TEORETICKÁ ČÁST.....	12
1 DEXTRAN	13
1.1 HISTORIE	13
1.1.1 DEXTRAN 70	13
1.1.2 DEXTRAN 40	15
1.1.3 DEXTRAN 1	16
1.1.4 OSTATNÍ TYPY.....	16
1.2 STRUKTURA.....	17
1.3 VLASTNOSTI	18
1.4 PRODUKCE DEXTRANU	19
1.4.1 FERMENTACE	20
1.4.2 FAKTORY TVORBY DEXTRANU	20
1.5 BUDOUCÍ VÝVOJ	22
1.6 VYUŽITÍ.....	23
1.6.1 FRAKCE DEXTRANU	23
1.6.2 SEPHADEX.....	23
1.6.3 KONJUGÁTY DEXTRANU S BIOLOGICKY AKTIVNÍMI LÁTKAMI.....	24
1.6.4 PŘÍPRAVKY DEXTRAN-HEMOGLOBINU	25
1.6.5 LÉKAŘSKÝ DEXTRAN.....	25
2 DEXTRANSACHARASA	26
2.1 BIOSYNTÉZA.....	26
2.1.1 PURIFIKACE	27
2.2 VĚTVĚNÍ (1).....	28
3 LEUCONOSTOC GARLICUM.....	29
PRAKTICKÁ ČÁST	30
4 MATERIÁL A METODY	31
4.1 MATERIÁL	31
4.2 PŘÍSTROJE.....	32
4.3 METODY	32

4.3.1	DIALÝZA	32
4.3.2	VYSOLOVÁNÍ SÍRANEM AMONNÝM.....	32
4.3.3	STANOVENÍ SACHARIDŮ ZA POMOCI KYSELINY BICINCHONINOVÉ	33
4.3.4	TRICINOVÁ ELEKTROFOREZA	34
4.3.5	ELEKTROFORÉZA SDS-PAGE.....	34
4.3.6	CHROMATOGRFIE NA TENKÉ VRSTVĚ	35
4.3.7	HPLC IONTOVÁ CHROMATOGRFIE	36
4.3.8	<i>IN SITU</i> DETEKCE AKTIVITY DEXTRANSACHARASY	36
5	VÝSLEDKY	37
5.1	DIALÝZA.....	37
5.2	STANOVENÍ REDUKUJÍCÍCH SACHARIDŮ ZA POMOCI KYSELINY BICINCHONINOVÉ	38
5.3	CHROMATOGRFIE NA TENKÉ VRSTVĚ	48
5.4	DETEKCE SYNTETIZOVANÉHO DEXTRANU PROSTŘEDNICTVÍM ZYMOGRAMU	52
	DISKUZE	56
	ZÁVĚR	59
	CITOVANÁ LITERATURA	60
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	63
	SEZNAM OBRÁZKŮ	64
	SEZNAM TABULEK.....	66

TEORETICKÁ ČÁST

1 DEXTRAN

1.1 HISTORIE

Dextran, byl objeven v roce 1874 německo-polským průmyslníkem Karlem Wilhelmem Scheiblerem. Stalo se to při pozorování záhadného zhušťování šťávy z cukrové řepy a cukrové třtiny. Bylo zjištěno, že toto zhušťování bylo způsobeno látkou s empirickým vzorcem ($C_6H_{10}O_6$), která má pozitivní optickou rotaci. V roce 1861 Pasteur dokázal, že byl tento sliz mikrobiologického původu a van Tieghem bakterii, která toto způsobovala, pojmenoval jako *Leuconostoc mesenteroides*. (1)

V roce 1941 Hehre poprvé ohlásil bezbuněčnou syntézu dextransu za pomoci sacharosy coby substrátu. Krátce poté byl enzym, odpovědný za syntézu dextransu, pojmenován dextransacharasa. (2)

1.1.1 DEXTRAN 70

V padesátých letech 19. století mladý švédský biochemik B. Ingelman začal na ústavu biochemie a fyzikální chemie univerzity v Uppsale, zkoumat polysacharidy a proteiny ze šťávy cukrové řepy. Objevením dextransu v této tekutině se v následujících letech rozjela série zkoumání polysacharidů. (3)

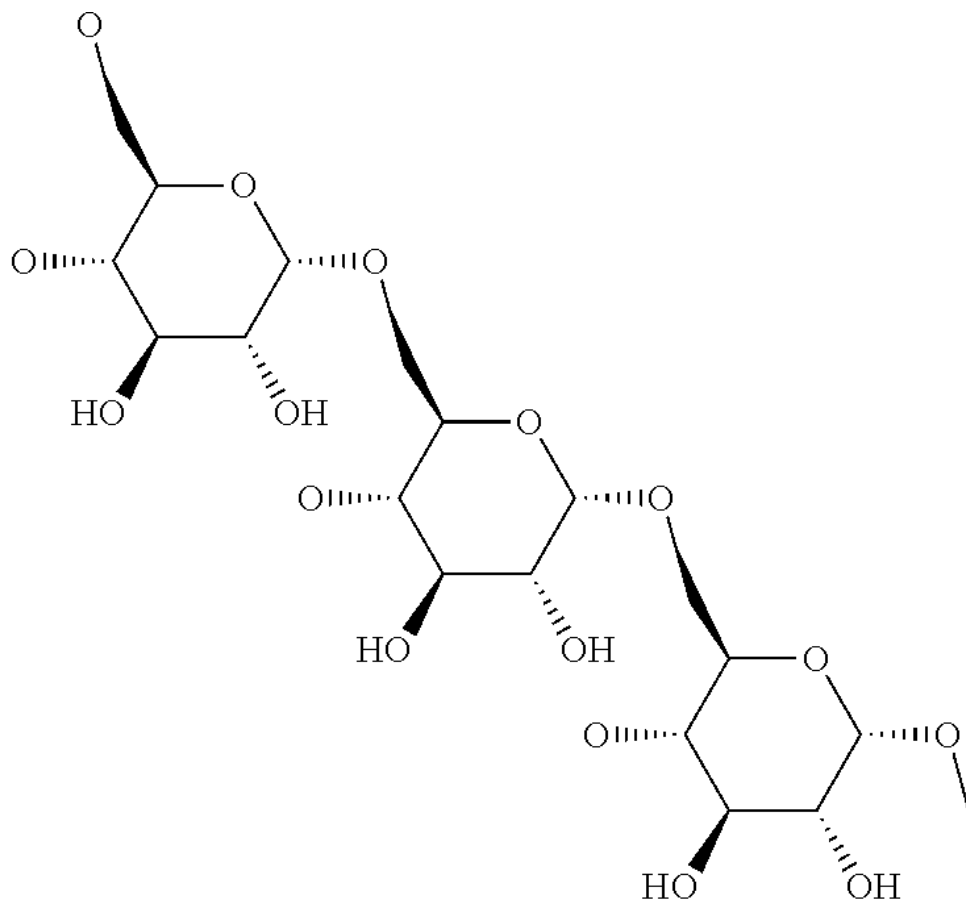
Ke konci roku 1942 se k Ingelmanovi připojil A. Grönwall a oba nadále zkoumali tuberculin (extrakt z patogenní bakterie *Mycobacterium tuberculosis*). V té době bylo značné úsilí věnováno výzkumu lyofilizace krevní plazmy pro vojenskou medicínu. Až po několika měsících narazili na myšlenku, že by se hydrolyzovaný dextran mohl používat jako náhražka plazmy. Po dalších procesech, jako je částečná hydrolýza, frakcionace a dalších rozsáhlých biologických výzkumů se Švédská farmaceutická společnost o několik měsíců později rozhodla, že zafinancuje tento projekt. Rok na to byly zahájeny, pod vedením lékaře G. Bohmanssona, rozsáhlé klinické testy. Dextran byl v té době čerpán z bakterie *Leuconostoc mesenteroides* (kmene 7E). Ten byl poněkud rozvětvenější než ten, který se používá nyní.

V roce 1947 byl povolen 6% roztok pro klinické účely ve Švédsku a později i v Anglii. Tento nový produkt byl upraven a pojmenován jako dextran 70. Mezitím byl v USA studován kmen *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 izolovaný z infikované

láhve piva, který po podrobnějších studiích tvořil jen jemně rozvětvený dextran. Tento objev učinil, Allene Jeanes. (4)

V letech 1949-50, vyvolal multidisciplinární výzkumný program v NRRC obrovský zájem o tento produkt, za účelem poskytnutí základních informací k produkci syntetického expandéru krevního objemu za pomoci dextranu.

Čtyři americké společnosti začaly od konce roku 1951 dextran z NRRL B-512(F) produkovat pro lékařské účely. Tento 6% roztok dextranu 70 byl doporučen k léčbě šoku, jako například při krvácení, popáleninách, v chirurgii nebo při traumatu. Taktéž se terapeuticky využívá pro snížení rizika vzniku trombózy a rizika pooperační fatální embolie plic.(5) (6)

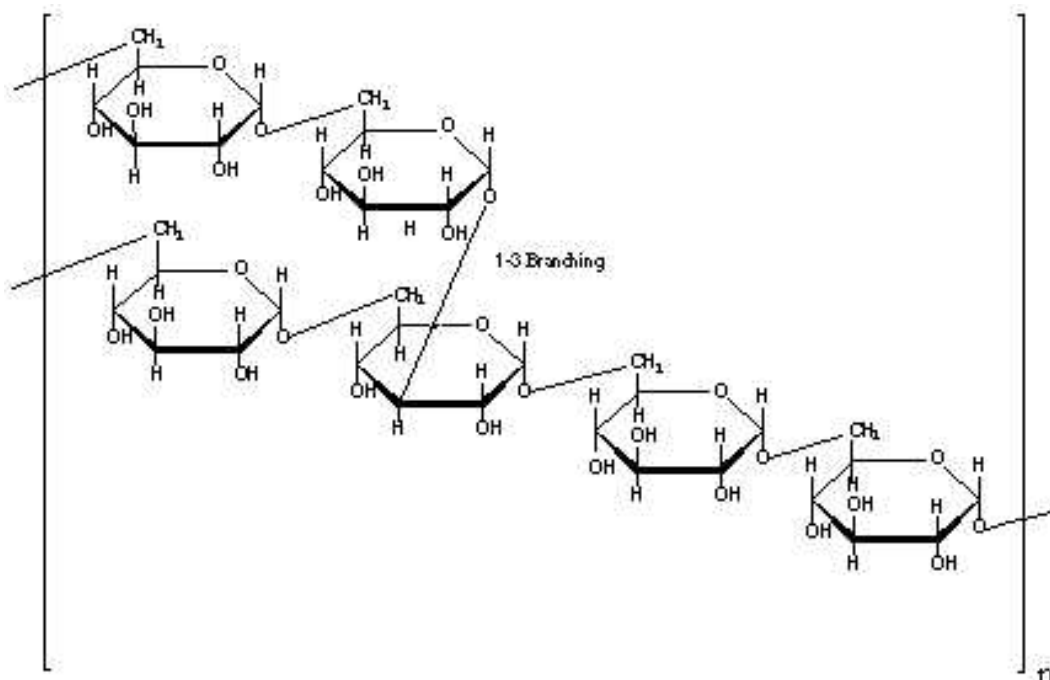


Obr. 1: Struktura Dextranu 70

1.1.2 DEXTRAN 40

Na počátku roku 1961 byl další produkt pojmenován jako dextran 40. Následující návrh Ingelmana a Gelina (7) byl přímým důsledkem dřívějšího pozorování degradačních vlastností dextrau, o molekulární hmotnosti menší jak 50 000, Hintem a Thorsenem (8) a Gelinovou zprávou o poruchách oběhové soustavy po šoku a traumatech (9). Zájem o tento produkt byl urychlen zjištěním, že frakce s nízkou molekulární hmotností, dokáží poskytnout zlepšení průtokových vlastností krve snížením viskozity, a také inhibují shlukování erytrocytů. Ačkoliv byl optimální efekt inhibice shlukování okolo M_w 25 000, byl nakonec vybrán dextran 40, protože byl snadno vylučitelný ledvinami.

Antitrombické působení Dextranu 40 a Dextranu 70, experimentálně prokázané Gelinem a jeho kolegy a klinicky prokázané Koekkenbergem, poskytuje ochrannou léčbu žilní trombózy a pooperační fatální plicní embolie. Dávkování dextranu 40 by nemělo přesahovat 20 ml/kg (10% fyziologického roztoku) váhy lidského těla. Takové dávkování je doporučeno prvních 24 hodin u pacientů, kteří podstupují vysoce rizikové operace, nebo trpí vysokým rizikem poranění. (10) (11)



Obr. 2: Struktura Dextranu 40

1.1.3 Dextran 1

Se zvýšeným využíváním dextranů pro klinické účely se objevily zprávy o dextranem vyvolané anafylaktické reakci (Dextraninduced anaphylactoid reactions - DIARs). Tyto reakce jsou občas, i když jen zřídka, život ohrožující. Mezi lety 1968 a 1981 se zjišťovalo, jak zabránit vzniku DIARs. Bylo otestováno několik protilátek, ale žádná nebyla účinná. Až později se objevila myšlenka principu inhibice haptenem. Hapten je malá molekula, která dokáže vyvolat imunitní odpověď pouze v tom případě, že je připojená k velké molekule, jako je například protein. Protein sám o sobě nemusí vyvolávat imunitní odpověď. (12) Tato myšlenka odstartovala následné dlouhodobé testování na zvířatech, kdy se až v roce 1982, frakce dextranu o Mw 1000 spolu s jednomocným haptenem, ukázaly jako řešení problému. Proto je 20 ml tohoto 15% roztoku podáváno ještě před infuzí Dextranu 40 nebo 70. (13)

1.1.4 OSTATNÍ TYPY

V následujících obdobích vznikaly další a další typy dextranů. Jako je např. Dextran s přídavkem železa, který je vhodný pro intramuskulární a nitrožilní podání k léčbě nedostatku železa. Tento roztok nejlépe účinkuje za pomoci roztoku glukosy. (14)

Dalším byl sulfonovaný dextran. Ten dělal veliké zdravotní problémy do doby, nebyl imobilizovaný na celulóze. Poté se využíval jako látka k odstranění LDL cholesterolu během plazmaferézy (proces odebírání plasmy z krevního oběhu). (15)

Diethylaminoethyl dextran (DEAE-dextran) byl využíván v podobě tablet k redukování cholesterolu a tuku. (16)

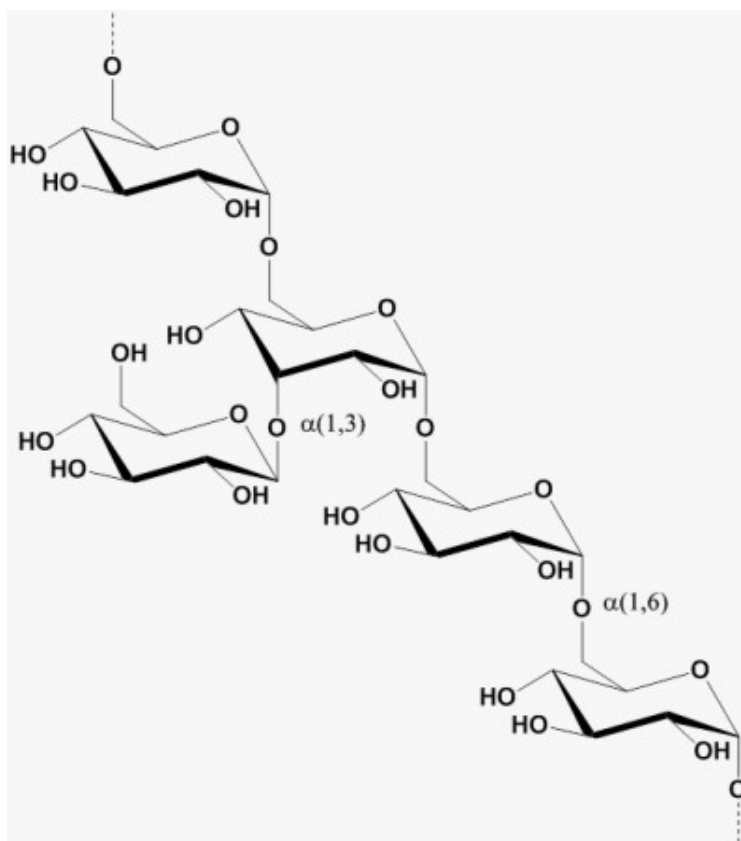
Infuzní roztoky 5 - 10% nízkomolekulární dextranu se díky své izosmolalitě osvědčily při transplantaci ledvin, jater, ale i rohovky. (17)

V roce 1972 byl vyvinut Debrisan. Je to roztok na čištění ran. Připravuje se emulzní polymerací dextranu s epichlorhydrinem v podobě malých kuliček. Přípravek dokáže absorbovat (cca 4 ml/g) výtok z infikovaných ran, vředů a zkrátit tím tak dobu hojení. V roce 1977 ho začal vyrábět farmaceutický průmysl komerčně.

Jako rozšiřující médium pro hysteroskopii se uplatnil Hyskon. Je to 32% roztok Dextranu 70 stabilizovaný 10% glukosou. (18)

1.2 STRUKTURA

Dextran tvořený bakterií *Leuconostoc mesenteroides* sestává z $\alpha(1,6)$ -propojených glykanů s postranními řetězci připojenými do 3. pozice páteře glukosy. Tyto postranní řetězce mohou občas také vycházet z $\alpha(1,4)$ -, nebo $\alpha(1,2)$ - rozvětvených vazeb. (19) Za pomoci perjodačních a methylačních analýz se stupeň větvení odhaduje přibližně na 5 %. Větve jsou většinou dlouhé 1-2 glukosových jednotek. Methylační analýza nerozpoznává pouze větve (1,3)-vazeb, ale také je kvantifikuje. Bylo zjištěno, že stupeň větvení lze snížit parciální kyselou hydrolyzou. Účinek však není nijak dramatický. Přesná struktura každého dextransu totiž závisí na konkrétní produkci mikrobiálního kmene, který se na ní podílí. (20)

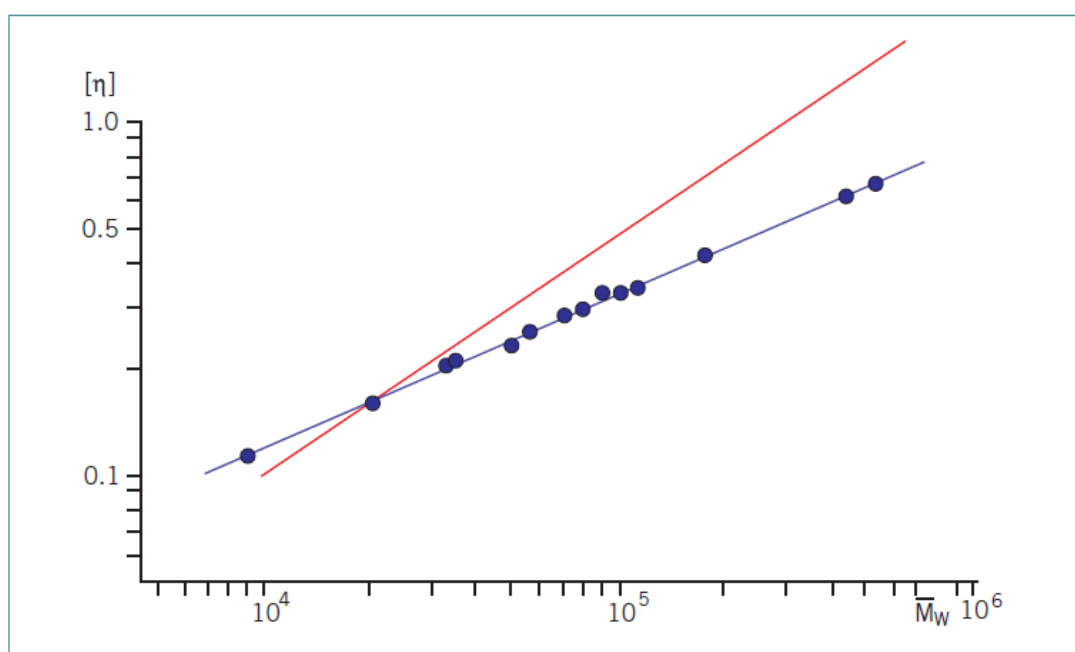


Obr. 3 : Fragment struktury dextransu

1.3 VLASTNOSTI

Dextran B-512(F) je volně rozpustný ve vodě, dimethylsulfoxidu, etylen-glykolu, glycerolu, 4-methylmorfolin-4-oxidu a hexamethylfosforamidu (karcinogenní). Některé frakce dextransu mohou vykazovat určitý stupeň krystalinity a mohou být převedeny do roztoku jen v tom případě, že se zahřejí.

Molární hmotnost nativního dextransu NRRL B512(F) byla změřena již několikrát. (21) (22) Její hodnota se pohybuje v rozmezí 9×10^6 a 500×10^6 . Měření v různorodých rozpouštědlech, jako např. 4M NaCl a 6M močovině, neodhalila žádné důkazy o přispívání k těmto mimořádně vysokým hodnotám. Vztah mezi M_w a limitním viskozitním číslem je zobrazen na obrázku 4.



Obr. 4: Graf závislosti viskozity oproti M_w dextransu B-512(f) (modrá křivka) a pro hypoteticky lineární dextran (červená křivka)

Výzkumy difúze dextransu skrze řadu membrán naznačují, že je dextran propouštěn více, než by bylo předpokládáno na základě Stokesova poloměru. Díky $\alpha(1,6)$ vazbám mezi polysacharidy, představují tyto látky třídu vysoce flexibilních polymerů. (23) U $M_w > 2000$ se dextran v roztoku chová jako rozbalitelná spirála. Molekulární rozměry dextransu jsou totiž závislé na rozpouštědle, molární hmotnosti a koncentraci polysacharidu.

Vlastnosti roztoku naznačují, že molekuly dextranu s $M_w > 105\ 000$ se chovají jako by byly vysoce rozvětvené. S dalším zvyšováním M_w nadále zvyšuje, dosahují molekuly větší symetrie. (24)

U oligosacharidů s $M_w < 2000$ se vlastnosti roztoku dají nejlépe vysvětlit tak, jakoby dextran přecházel z rozbalitelné spirály do podlouhlých konformací. Spirály dextranu jsou poměrně kompaktní v chudších rozpouštědlech, jako je například etylen glykol, ale jakmile přijdou do kontaktu se silným rozpouštědlem, jako je dimethylsulfoxid nebo formami, rozbálí se mnohem více. Bylo prokázáno, že molekulární rozměry dextranu, v závislosti na rostoucí koncentraci (0,5-3 %), klesají.

Bylo provedeno i několik pokusů krystalizace dextranu. Díky tomu by bylo možné provést rentgenovou difrakční analýzu a z výsledků by se poté dala zjistit jeho detailní molekulová struktura. Jeanes A. a spol. obdrželi výsledky rentgenové analýzy ze vzorků krystalického dextranu připraveného zvlhčováním a další úpravou ethanolem. (25) Jednotlivé krystaly byly narůstány z části dextranu o M_w 19 900. Z elektronové difrakce bylo zjištěno, že dextran sestává ze splených konformací po sobě jdoucích glukosových jednotek, které mají tvar dvojité šroubovice. Samotná buňka obsahuje dva antiparalelní řetězce těchto dvou glukosových jednotek.

1.4 PRODUKCE DEXTRANU

Největší důvody, proč se dextran vyrábí, jsou lékařské a technické účely. Vyrábí se v řadě zemí po celém světě. Odhaduje se, že se ročně vyrobí 500 tun dextranu po celém světě. Na východě se nejvíce využívá k fermentaci kmen *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(f) nebo B-512. V ostatních zemích se používají alternativní kmeny. (26)

Hlavní proces tvorby dextranu není závislý pouze na množství bakterie kultury *Leuconostoc*, ale také na koncentraci sacharosy v roztoku. Kultura, jakožto viskózní tekutina, je poté vysrážena v ethanolu nebo methanolu. Vytvořený nativní dextran je hydrolyzován ve zředěné kyselině a požadovaný dextran se vyizoluje frakcionací. I když jsou nyní i nové metody výroby, stále se upřednostňují ty staré. Při zavádění nové metody není důležitá pouze efektivnost výroby a jednoduchost, ale také splnění lékařských požadavků, bezpečnost a účinnost.

Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512(F) je členem čeledi *Lactobacillaceae*, rodu *Leuconostoc*, druhu *mesenteroides*. Organismus vytváří kulovité, nebo oválné buňky

a klasifikují se jako grampozitivní fakultativně anaerobní. Spolu s dextransarem a kyselinou mléčnou tvoří i mimo jiné oxid uhličitý, ethanol, mannitol a kyselinu octovou.

1.4.1 FERMENTACE

Ačkoliv slouží mnoho cukrů, jako je např. glukosa nebo maltosa, jako zdroj energie pro růst bakterií, pouze sacharosa nejlépe vyvolává produkci dextransaru. Z toho vychází, že kultivační média jsou závislá na přídavku sacharosy. Kyselina nikotinová, tiamin a kyselina panthotenová jsou nezbytné pro všechny druhy *Leuconostoc*. Cystin, kyselina glutamová, isoleucin a valin jsou důležité pouze pro *Leuconostoc mesenteroides*. V praxi se jako výživa pro bakterie využívají extrakty z kvasnic, kukuřičné louhy, kasein hydrolyzovaný kyselinami nebo sladové výtažky s přídavkem peptonu, nebo tryptonu. (27)

Laboratorní výrobu dextransaru výborně popsal Jeanes. Dextransary vytvořené z kultur z kvasnicového extraktu, sladového výtažku, nebo extraktu z jater byly velice podobné. Zajímavé je, že se během fermentace spotřebuje pouze čtvrtina živin a výtěžky dextransaru jsou i při delších časech stejné. (28)

1.4.2 FAKTORY TVORBY DEXTRANU

1.4.2.1 pH

Enzym vykazuje nejvyšší aktivitu pro tvorbu dextransaru při hodnotě pH 5.2, což je výrazně nižší hodnota než pH, které je potřeba k vytvoření enzymu v kultuře. Nejvyšší stabilita enzymu je v rozmezí pH 5 - 6,5. Jeho stabilita ale záleží i na přítomnosti dalších látek, při kterých vysokomolekulární dextransar působí jako stabilizátor.

Při fermentaci hodnota pH klesne ze 7.2 na 5 během 20 hodin z důvodu uvolnění organických kyselin a tím vytvoří prostředí pro syntézu dextransaru. I přesto, že byla doporučena pravidelná neutralizace roztokem 5-10N hydroxidu sodného, za zvýšení tvorby dextransacharasy, je jen málo důkazů o zvýšení produkce kvalitního dextransaru. Při zvýšeném pH (8) a snížené teplotě (20°C) se tvoří polysacharid levan. (29)

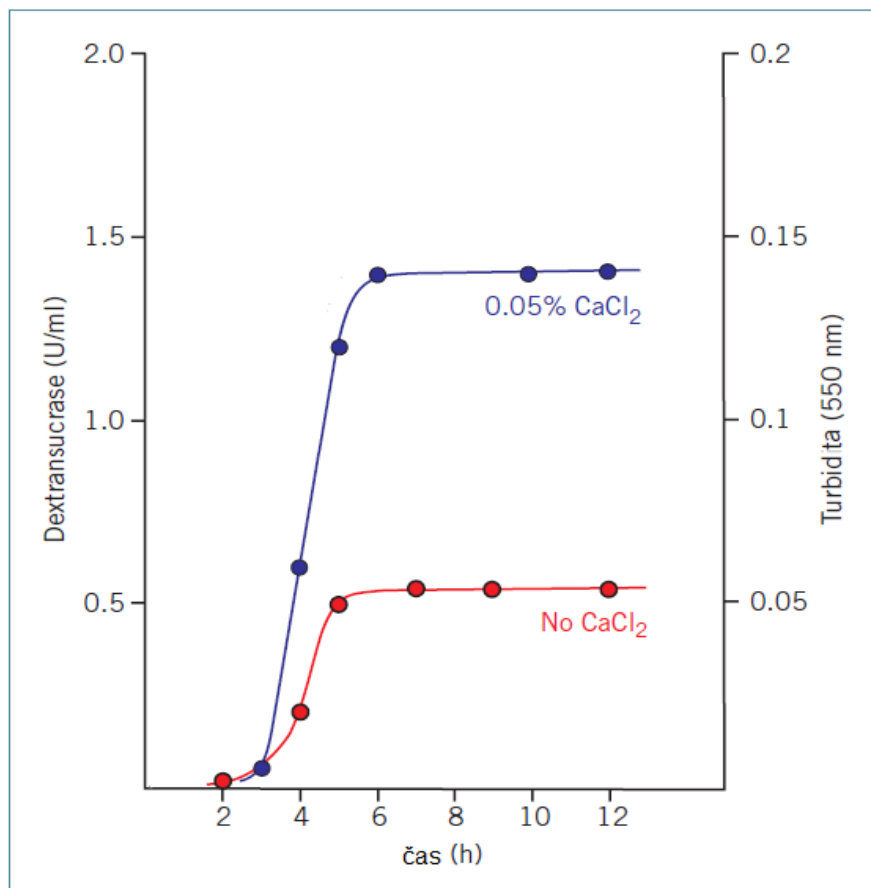
1.4.2.2 TEPLOTA

Teplota je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících výnos vysokomolekulárního dextransaru, rychlost jeho tvorby a jeho strukturu. Výnos vysokomolekulárního dextransaru klesá při nižších teplotách (25°C - 4°C), přičemž výnos nízkomolekulárního roste. Celkový výnos je ve všech případech velice podobný.

Při teplotě 35°C a vyšší je enzym nestabilní. Z praktického důvodu je doporučena teplota okolo 25°C. Je dokázáno, že větvení dextransu vzrůstá s teplotou v intervalu od 0-30 °C. (30)

1.4.2.3 VÁPŇÍK

Při prvních pokusech nebylo prokazatelné, že přebytek vápníku jakkoliv ovlivňuje vyšší výnosy dextransu. Až Robyt a Walseth oznámil dvojnásobný nárůst enzymu v celých buněčných kulturách po přidání 0,001-0,1% chloridu vápenatého. Lopes a Monsan zjistili, že na enzym dextransacharasy působí takové množství chloridu vápenatého stejně. Chlorid vápenatý se po procesu dá jednoduše odfiltrovat přidáním fosfátů. (31)



Obr. 5: Graf produkce dextransacharasy za přítomnosti a nepřítomnosti 0,05% chloridu vápenatého

1.4.2.4 ČAS

Na rozdíl od jiných kmenů *Leuconostoc*, prodloužení doby kultivace kultury B-512(F) během 24 hodin, vede k rapidnímu poklesu molární hmotnosti izolovaného nativního dextranu. Když fermentace probíhala 273 hodin, výsledný dextran měl hodnotu M_w 8,6 milionu, kdežto při 23 hodinové fermentaci byla M_w 39 milionu. Celkový výnos dextranu byl opět Beze změny.

Po 50 hodinové fermentaci celé kultury byl zaznamenán významný pokles viskozity a výnos dextranu v té době dosáhl svého maxima. (32)

1.4.2.5 KONCENTRACE SACHAROSY

Sacharosa je hlavní faktor biosyntézy dextranu. Ve 2% roztoku sacharosy je vytvořeno jen nepatrné množství dextranu. Se zvýšením koncentrace se rapidně zvýší výtěžek, molekulová hmotnost a struktura dextranu. Podrobná studie účinků vyšších koncentrací (10-50 %), byť většinou v bezbuněčných systémech odhalila, že se výnosy vysokomolekulárního dextranu snižují s odpovídajícím navyšováním nízkomolekulárního dextranu. Při 2% koncentraci sacharosy lze dosáhnout až 45,9 % vysokomolekulárního dextranu. Naopak při 50% koncentraci sacharosy lze dosáhnout pouze 2,5 % vysokomolekulárního dextranu. Zbýlá procenta jsou látky sestávající z mono- a oligosacharidů a nízkomolekulárního dextranu.

Poněkud komplikujícím faktorem, při zvyšování koncentrace sacharosy, je snižování větvení dextranu. Např. při 30% koncentraci sacharosy byl poměr (1,6) vazeb k jiným typům glykosidických vazeb mezi monosacharidovými jednotkami 29, zatímco při 5% koncentraci 8,5. Tyto hodnoty ale nebyly doposud potvrzeny moderní technikou. (33)

1.5 BUDOUCÍ VÝVOJ

Nativní dextran se většinou vyrábí diskontinuálně v buněčných kulturách. Bylo ale také vypracováno několik alternativních postupů. Např. použití extraktů z bezbuněčných enzymů, fermentace za přítomnosti akceptorů nebo kontinuální proces.

Přídavek (1 mg/ml) nízkomolekulárního dextranu do kultury významně ovlivnil produkci dextranu. Z koncentrovaného enzymu se poté podařilo obdržet až 33% výtěžek lékařského dextranu. (34)

Jen několik výrobců si přivlastnilo tuto techniku. Hlavních důvodů je mnoho. Hlavní frakce se vždy zdají být jako frakce s vysokým M_w , výnosy nemusí být vyšší než u standardních postupů, musí být vypracován proces pro výrobu nízkomolekulárního dextransu a musí být taktéž sestaveny nové údaje o bezpečnosti při této změně.

Produkce dextransu imobilizovanou dextransacharosou se zdála být dostačující. Proto se lékařský dextran dále vyráběl touto metodou. Výzkumy k vylepšení stávajících metod frakcinace a depolymerizace stále pokračují. Jsou testovány také metody smykového napětí, ultrazvuku, buď samotného, nebo v kombinaci s kyselou hydrolyzou. Dextran o nižší M_w lze taktéž získat pomocí štěpení endodextransou. Tyto produkty jsou méně polydisperzní.

Metody jako konvekční ethanolová frakcionace, nebo ultrafiltrace nejsou až tak účinné, jako metody předchozí. (35)

1.6 VYUŽITÍ

1.6.1 FRAKCE DEXTRANU

Domácí sacharosa, ovoce, nebo ovocné nápoje mohou obsahovat stopy dextransu. Požití malého množství dextransu tudíž není nic neobvyklého. Dextran NRRL B512(F) je ve střevech degradován bakterií, která dextran rozdělí a většina hydrolyzovaných produktů je absorbována, což má za následek rychlý nárůst hladiny cukru v krvi a glykogenu v játrech. I přes to jsou dextransy v UK a Evropě zakázány jako přísady do potravin. Používají se však jako komponenty k balení potravin.

Vyčištěné frakce dextransu s vysokou čistotou a nízkou úrovní chloridů se rozsáhle využívají ve fotografickém průmyslu. Přidáním nízké koncentrace dextransu do stříbrné emulze způsobuje výrazné zvýšení kvality fotek. Toto zlepšení se připisuje působením dextransu na konformaci molekul želatiny.

Taktéž se dextran ukázal jako dobré kryokonzervační činidlo pro člověka, zvířata a rostliny. Směs 5% dimethylsulfoxidu a 9% dextransu 70 se používá ke kryoprotekci lidských kmenových buněk kostní dřevě. (36)

1.6.2 SEPHADEX

Sephadex je sorbent, který se hojně využívá k separaci molekul o různých molekulových hmotnostech. Další využití má také v odsolování izolovaných proteinů,

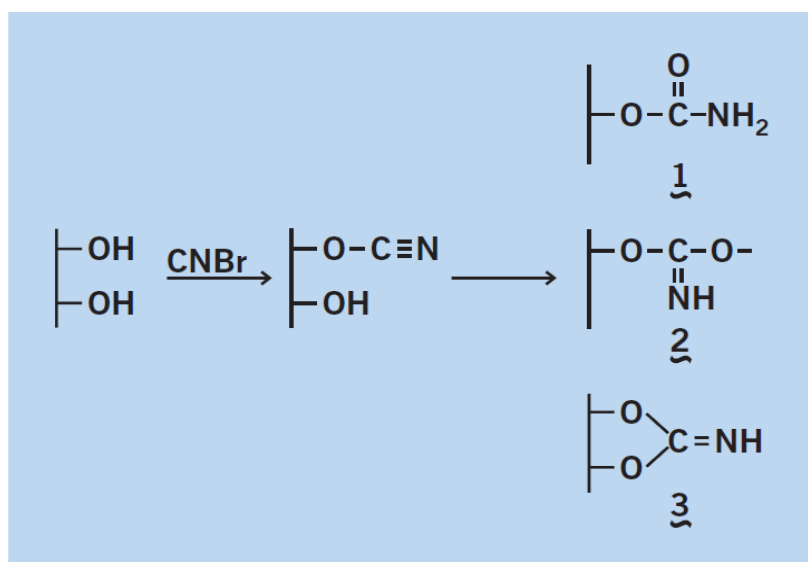
nebo k pročišťování proteinů. Nejdříve se sephadex plnil pouze do kolon velkých rozměrů, k tomu ale bylo potřeba velkého množství izolovaných proteinů. Velkým krokem dopředu bylo využití mikrokolon, kdy se ušetřilo potřebné množství vzorku, dali se izolovat obtížněji izolované proteiny a proteiny v malém množství. Jako plnivo do větších kolon se Sephadex používá dodnes.

Gel s největším množstvím pórů, Sepadex G-200, dokáže separovat proteiny o M_r 4000-800 000, kdežto horní limit pro Sephadex G-25 je 5000. Sephadex G-25 se nyní používá pro odsolování, nebo výměnu pufrů v mnoha velkých činnostech. Jako posledním byl vytvořen hydroxylpropyl derivát Sephadex LH-20. To usnadňuje separaci lipidů, hormonů, mastných kyselin atd. (37)

1.6.3 KONJUGÁTY DEXTRANU S BIOLOGICKY AKTIVNÍMI LÁTKAMI

Výzkum v této oblasti, která zahrnuje spojování léčiv, enzymů, hormonů a protilátek je velice širokého měřítká. Cíle konjugace dextransu jsou: prodloužení životnosti aktivní látky, zlepšení její stability, usnadnění zacílení léčiva, potlačení antigenicity části proteinu.

Jednou z klasických procedur je aktivace polysacharidů bromcyanem.



Obr. 6: Aktivace dextransu za získání meziproduktů: 1: karbamát, 2: lineární imidokarbonát a 3: cyklický imidokarbonát

Jako dalším z příkladů konjugací jsou úspěšné pokusy propojení dextransu s inzulinem. Hypoglykemické působení komplexu je mnohem lepší a déletrvající než samotný inzulin. (38)

1.6.4 PŘÍPRAVKY DEXTRAN-HEMOGLOBINU

Komplex obsahující approx. 1:1 molární hmotnosti Dextransu 20 a hemoglobinu je v těle po určitém čase odstraněn (20 % po 4 hodinách). Je to způsobeno tím, že se kyslík váže mnohem silněji než na hemoglobin. Ačkoliv jsou tyto komplexy neimunogenní, mohou představovat určitá rizika v aktivaci imunitního systému. Proto je nutné tyto komplexy nadále zkoumat. (39)

1.6.5 LÉKAŘSKÝ DEXTRAN

Při velkých ztrátách krve se dá použít dextrans, o relativně nízké molekulové hmotnosti, jako léčebný prostředek pro obnovu krevního objemu. Jelikož má přírodní dextrans obrovské molekulové hmotnosti ($5 \cdot 10^8$ Da) pro využití jako náhrada krevní plazmy, využívá se komerční dextrans. Optimální velikost dextransu jakožto náhrady krevní plazmy, takzvaný lékařský dextrans, je 40 000 - 100 000 Da velký. Látka s nízkou molekulovou hmotností je ledvinami velmi rychle vypuzena z oběhu, a proto je terapeuticky neúčinná. Materiál s příliš vysokou molekulovou hmotností zase může interferovat s běžnými procesy srážení krve.

Frakce lékařského dextransu s molekulovými hmotnostmi 70 000, 60 000 a 40 000 Da (respektive Dextrans 70, 60 a 40) jsou v současné době využívány jako náhrada krevní plazmy při její ztrátě. Dextrans má mnohem vyšší retenci v oběhu, než krystaloidy, které rychle pronikají membrány cév. Bylo prokázáno, že každý gram dextransu dokáže v oběhu zadržet až 20 ml vody.

Základním rysem Dextransu 40, krom vlastnosti expanze objemu krevní plazmy, je zlepšení toku krve. Tím snižuje viskozitu krve a zpomaluje nahromadění erytrocytů.

Dextrans produkovaný bakterií *Leuconostoc mesenteroides B-512* je nejlepší volbou pro tvorbu lékařského dextransu, protože má nízký stupeň antigenicity a vysoké procento (95 %) $\alpha(1,6)$ -glykosidických vazeb. Ty jsou velice důležité, protože enzymy v lidském těle mohou pomalu hydrolyzovat pouze $\alpha(1,6)$ vazby, na rozdíl od $\alpha(1,4)$ vazeb škrobu a glykogenu, které jsou rychle hydrolyzovány α -amylázami. Kromě toho $\alpha(1,6)$ - vazby dávají molekule vysokou rozpustnost, na rozdíl od $\alpha(1,4)$ -vazeb nebo β -vazeb. (40)

2 DEXTRANSACHARASA

Dextransacharasa je extracelulární glukosyltransferasa, která katalyzuje přenos zbytků D-glukopyranosylu ze sacharosy do dextransu, přičemž se uvolňuje fruktosa. Název získala pro skupinu enzymů, které dokáží syntetizovat dextrans různých struktur ze sacharosy. Zatímco druhy *Streptococcus* produkují tento enzym konstitutivně, u divokých kmenů *L. mesenteroides* je syntéza dextransacharasy vyvolána sacharosou. Quirasco a spol. nedávno prokázali nízkou produkci dextransacharasy z kultury *L. mesenteroides* NRRL B-512F, které narůstaly na D-glukose a D-fruktose.

Dextransacharasa z bakterie kmene *L. mesenteroides* NRRL B-512F se pro komerční výrobu dextransu využívá v nejvyšší míře. Tato dextransacharasa je vylučována v poměrně velkém množství do kultury supernatantu s minimálním počtem kontaminujících enzymů a tvoří rozpustný dextrans s vysokou molekulovou hmotností, na rozdíl od dalších kmenů *L. Mesenteroides* a *streptococcu* (tvořící zubní plak), které tvoří rozpustný i nerozpustný dextrans. Tyhle bakterie taktéž vytváří více než jeden typ dextransacharasy spolu s relativně velkým množstvím kontaminujících enzymů jako invertázy a levansacharasy. Z těchto důvodů slouží *L. mesenteroides* NRRL B-512F jako důležitý model ve studiu mechanismu biosyntézy dextransu za pomoci enzymu dextransacharasy. (41)

2.1 BIOSYNTÉZA

Jediný enzym může katalyzovat syntézu několika typů dextransu, což umožňuje vznik větveného polymeru. Ukázalo se, že některé bakteriální kmeny dokáží vylučovat i jiné dextransacharasy, které tvoří dextrans různých struktur. Z toho plyne, že struktura každého dextransu je charakteristická pro konkrétní dextransacharasu.

Produkce dextransu je ovlivněna řadou faktorů: fyzikální a chemické vlastnosti, rozpustnost, viskozita, specifická optická otáčivost, obsah dusíku, množství fosforu a popela v médiu, které dále závisí na specifických mikroorganismech, které jsou do procesu zapojeny.

Hodnota pH ovlivňuje produkci enzymu organismem, aktivitu enzymu a jeho stabilitu. Optimální hodnoty pH ale nejsou identické. Počáteční hodnoty pH pro fermentaci obecně leží mezi 6,7 a 7,2. Intenzivní produkce enzymu začíná po cca 6 hodinách, kdy

hodnota pH poklesne z 6,9 na 6,4. Tsuchiya a jeho kolegové doporučují přidavek alkálií do kultury k udržení hodnoty 6,7, dokud není dosažena maximální aktivita enzymu. Poté může hodnota pH klesnout k 5, kdy enzym ukazuje nejvyšší stabilitu a aktivitu. (42)

S koncentrací sacharosy od 0,5 % do 8,0 % roste i aktivita dextransacharasy. Nejvyšší vzrůst aktivity dextransacharasy je zaznamenán do 2% koncentrace sacharosy. Nad 2 % již není nárůst tak dramatický. Lopez a Monsan zjistili, že kontinuálním přidáváním sacharosy do kultury lze zvýšit výtěžek dextransacharasy. Při výběru optimální koncentrace sacharosy musí být brán v úvahu i výnos a kvalita dextranu. (43)

Posledním z hlavních činitelů je čas. Nejvyšší výtěžky dextransacharasy jsou zaznamenány okolo 6-8 hodinové fermentaci. Poté je narušena stabilita enzymu zvyšující se hodnotou pH.

2.1.1 PURIFIKACE

První pokusy purifikace enzymu B-512 (F) provedli Ebert a Schenk. (44) Mezi jejich metody patřilo mimo jiné srážení methanolem, chromatografie fosforečnanem vápenatým a srážení síranem amonným. Dostávali hodnoty okolo 2000 jednotek na miligram (U/mg) zbytkového dextranu.

Další purifikace enzymu byla provedena Robytem a Walsethem. (45) Odstraňování vázaného dextranu za pomoci endo-dextransasy byl velkým krokem dopředu. Specifická aktivita koncentrovaného dextranu ukázala hodnotu 53 U/mg (33% zisk). Poté následovala ultrafiltrace. Elektroforéza SDS PAGE odhalila dva bandy. Oba poskytovaly zřetelnou aktivitu dextransacharasy. Rychlejší band byl přidělen k monomeru a pomalejší k agregátům. Směs enzymu a nečistot nebylo možné vyčistit pouhým síranem amonným, ale může být urychlen, za předpokladu, že se přímo do kultury přidá ovalbumin (albumin extrahovaný z vaječného bílku).

Existence více forem dextransacharasy z B-512 (f) byla dokázána za pomoci GPC a elektroforézy. Čistý enzym ztrácí svou aktivitu při 4°C a i při -15°C je jeho aktivita snížena o 60 %. Enzym může být stabilizován za přidání 4 mg/ml dextranu. Pro purifikaci dextransacharasy z *Leuconostocu* může být předběžné ošetření dextransou provedeno mnoha postupy. Jako např. polyethylenglykol o M_w od 400 do 6000 v koncentracích od 5 do 40 %, který dokáže enzym účinně srážet.

Gelová permeační chromatografie na Bio-gel A5m nebo Sepharose™ 6B a iontová chromatografie na DEAE gelu byla často používána. Hydrofobní chromatografie využívána O-(fenoxyacetyl)celulosu byla vhodná pro určité typy dextransacharasy. Dextransacharasa má také dobrou afinitu ke Sephadexu. (46)

2.2 VĚTVĚNÍ

Snahy o zefektivnění větvení dextranu jsou stále poznamenány neúplnou znalostí větvení nativního dextranu. Ebert a spol. navrhl původní větvicí mechanismus založený na reakci akceptoru, kdy jsou rostoucí řetězce dextranu postupně předány akceptoru dextranu enzymem, čímž vyvolávají větvení. Jejich hypotéza vyplývá ze studia produktu obdrženého přidáním akceptoru radioaktivních izotopů dextranu o M_w 25 000. Mezi testovanými enzymy byl i B-512(f). Výsledky prokázaly, že vytvořený dextran má jen jeden akceptor. (47)

Robyt a Taniguchi dosáhli v oblasti větvení lepších výsledků. Ti využili radioaktivního značení nově vznikajících (1,3) vazeb. Předpokládá se, že přítomnost větvi nativního dextranu, syntetizovaným pouze enzymem se sacharosou, způsobuje, že volné molekuly dextranu jsou uvolňovány do media akceptorovou reakcí s glukosou a fruktosou. Přítomnost silně vázaného dextranu na enzym komplikuje jeho purifikaci. Později byl, za pomoci enzymu endodextranasy, výše zmíněný proces možný. Robyt a spol. byli schopni separovat dva extracelulární enzymy z *Leuconostoc mesenteroides* B-1355. (48)

3 *LEUCONOSTOC GARLICUM*

Existuje mnoho druhů bakterií mléčného kvašení, které dokáží tvořit sacharidy. Mezi ně patří mimo jiné bakterie rodů: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* a další. Ale jen *Streptococcus*, *Leuconostoc* a *Lactobacillus* dokáží produkovat dextran.

Leuconostoc garlicum, patřící do čeledi *Leuconostocaceae*, je kataláza-negativní, gram-pozitivní bakterie ve tvaru elipsovitých koků, odolná vůči vankomycinu (antibiotikum). První izolace byla provedena v roce 2002 z česneku. Infekčnosti této bakterie je velice vzácná. Je zaznamenán případ infekce dýchacího traktu po léčbě vankomycinem.

Nárůst bakterie *Leuconostoc garlicum* na Tryptonu za přítomnosti sacharosy probíhá většinou při 25°C. Během nárůstu bakterií vzniká mnoho typů extracelulárních polysacharidů. Proto je po nárůstu potřeba kulturu centrifugovat a smíchat s acetonem. Takto získané polysacharidy se poté vysuší. Následně se rozpustí v destilované vodě, dialyzují a lyofilizují. Poté následuje gelová chromatografie na Spheracrylu. Za pomoci metoda jako je HPLC apod. se zjišťuje obsah směsi a její vytržování. Proces se zakončuje purifikací.

Leuconostoc garlicum vykazuje relativně vysoký stupeň čistoty vytvořeného dextranu a její roztoky vykazují relativně nízkou viskozitu i ve vyšších koncentracích. To může být významným faktorem pro možné použití tohoto dextranu v průmyslových aplikacích.(49)

I. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

Kyselina jodistá - Penta

2,2´Biquinoline-4,4´decarboxylic acid - Fluka

HCl - Penta

Hydroxid sodný - Penta

Tween 20 - Riedel-de Haen

Serva Blue G - Serva

Fuchsin - Sigma

D(+)-Sucrosa - Fluka

D-Glukosa - Penta

F-Fruktosa - Penta

Methanol - Sigma

Dextranasa z *Chaetomium erraticum* - Sigma

Dextranasa z plísni rodu *penicillium* - Sigma

Chlorid sodný - Penta

Octan draselný - Penta

Vinan sodno-draselný - Lachema

Siřičitan sodný - Lachema

Síran měďnatý - Chemopol

Octan sodný - Penta

α -naftol - Lachema

4.2 Přístroje

Chromatografický systém pro kapalinovou chromatografii LC5000 - INGOS

HiTrap kolona CaptoQ

Centrifuga - Marathon 21000R

Termostat - Julabo

Elektroforéza - Consort (EV 245)

Elektroforéza vertikální - SCIE-PLAS

Spektrofotometr - PU 8800 UV/VIS

4.3 Metody

4.3.1 Dialýza

30 ml supernatantu bakterie *Leuconostoc garlicum* bylo napipetováno do dialyzační trubice o délce cca 8 cm. Dialyzační trubice byla vložena do kádinky naplněné 50 mM acetátovým pufrům o pH 5,4. Za stálého míchání při teplotě 4°C byl vzorek dialyzován po dobu 3 hodin. Poté byl acetátový pufr vyměněn za nový a opět probíhala dialýza po dobu dalších 3 hodin. Takto byl pufr vyměněn celkově 4x, přičemž jednou přes noc s celkovou délkou dialýzy 20 hodin. Po dialýze byl vzorek přelit do kónické zkumavky a zamražen.

4.3.2 Vysolování síranem amonným

K tomuto procesu byl zvolen dialyzovaný i nedialyzovaný roztok supernatantu bakterie *Leuconostoc garlicum* o celkovém množství 20 ml. K tomuto množství byl navíc přidán 1 ml pufru Tris a 1 g NaCl. Následoval běžný proces vysolování.

Nejprve byl roztok centrifugován při 13750 RPM po dobu 8 min za účelem odstranění nežádoucích sraženin. Následovalo přidání 2,22 g síranu amonného, čímž bylo docíleno 10% koncentrace. Tento roztok byl umístěn do lednice, kde byl míchán za stálé teploty po dobu 30 min. Po uplynulé době byl roztok centrifugován při 13750 RPM po dobu 10 minut. Supernatant byl slit a sraženina byla rozsuspendována v 1 ml acetátového pufru o pH 5,3. Postupně bylo přidáváno do roztoku stále větší množství síranu amonného.

15% koncentrace bylo dosaženo přidáním dalších 1,31 g síranu amonného, 20% koncentrace přidáním 1,47 g síranu amonného, 30% koncentrace přidáním 3,57 g síranu amonného a vysolování bylo zakončeno 40% koncentrací a to přídatkem 4,8 g síranu amonného. Obdobně jako u 10% koncentrace byl roztok po dobu 30 minut míchán v lednici s následovnou centrifugací při 13750 RPM po dobu 10 minut. Z rozsuspendované sraženiny každé vysolené frakce byl odebrán vzorek na elektroforézu SDS-PAGE.

4.3.3 Stanovení sacharidů za pomoci kyseliny bicinchoninové

Pro stanovení bílkovin kyselinou bicinchoninovou bylo třeba několika roztoků.

Roztok A: 100 mg kyseliny bicinchoninové (BCA), 200 mg uhličitanu sodného, 95 mg hydrogenuhličitanu sodného, 40 mg NaOH, 16 mg vlnanu sodného, 10 ml H₂O

Roztok B: 40 mg Síranu měďnatého, 1 ml H₂O

Roztok SWR (Standard working solution): Roztok A (upravený na hodnotu pH 11,25) + 220 µl roztoku B

Roztok sacharosy (40g/l): 4g Sacharosy, 100 ml acetátového pufru

Do mikro zkumavky bylo napipetováno 500 µl roztoku sacharosy a 100 µl vzorku. Jako vzorek byl většinou používán supernatant z bakterie *Leuconostoc garlicum*, nebo jeho jednotlivé frakce z vysolování. Tato směs byla inkubována při pokojové teplotě.

Samotný test byl proveden odebráním 5 µl výše uvedeného roztoku se vzorkem smíchaným s 250 µl roztoku SWR. Takto připravený roztok byl inkubován po dobu 30 min při teplotě 60 °C. Poté byl ochlazen na pokojovou teplotu a změřen na spektrofotometru při vlnové délce 562 nm. Vzorky byly odebrány v různých časových intervalech podle potřeby. Běžně se tento pokus používá na stanovení proteinů, ale taktéž se tímto pokusem, jako v našem případě, stanovují redukující sacharidy.

4.3.4 Tricinová elektroforéza

Nejprve byla sestavena aparatura. Ta sestává ze dvou k sobě přiložených skleněných destiček, mezi nimiž byla vložena speciální těsnící guma. Po okrajích byly z vnitřní strany umístěny spacers. Po sevření třemi svorkami po okrajích a zespod bylo mezi skla nalito 10 ml 15% separačního gelu, který byl ihned převrstven až po okraj gelem zaostřovacím. Do horní části sestavených skel byl vložen hřeben. Po zatuhnutí byl připravený gel mezi skly přemístěn do aparatury a následně do vaničky na elektroforézu naplněnou elektrodoým pufrem (anodový). Mezi skla byl nalit druhý elektrodový pufř (katodový). Po vytáhnutí hřebenu byly dráhy jemně upraveny. Do jednotlivých drah byly napipetovány vzorky. Vzorky byly předem namíchány a upraveny. 50 μ l vzorku bylo smícháno s 50 μ l vzorkového pufru a to celé bylo následovně 5 minut povařeno při 100 °C. Po cca 1,5 hodině, kdy probíhala elektroforéza, byl gel vyjmut a obarven dokud se zachycené proteiny neobarvily.

Použité roztoky:

15% separační gel: 5,0 ml 30,8% T, 2,6% C; 2,5 ml 1,5 M Tris (pH~8,8); 0,1 ml 10% (w/v) SDS; 0,1 ml 10% (w/v) Na₂S₂O₈; 0,004 ml TEMED; 2,3 ml H₂O

6% zaostřovací gel: 1,0 ml 30,8% T, 2,6% C; 1,25 ml 0,5 M Tris (pH~6,8); 0,06 ml 10% (w/v) SDS; 0,06 ml 10% (w/v) Na₂S₂O₈; 0,006 ml TEMED; 2,6 ml H₂O

5x elektrodový pufř: 0,125M Tris (7,6 g); 200 mM glycin (37,5 g); 0,5 % (w/v) SDS (25 g)

6x vzorkový pufř: 3,5 ml 1M Tris (pH~6,8); 3,0 ml glycerol; 1 g SDS; 600 μ l 2-merkapt ethanolu; 1,2 mg bromfenolová modř; destilovaná H₂O na doplnění objemu do 10 ml

Barvicí roztok: 10% kyselina octová, 0,1% Serva Blue G

Odbarvovací roztok: 10% kyselina octová

4.3.5 Elektroforéza SDS-PAGE

Jako druhý způsob separační metody byla provedena i elektroforéza SDS-PAGE. Postup byl podobný jako u tricínové. První rozdíl byl ve složení roztoků. Druhým rozdílem

bylo vrstvení gelů. Po nalití separačního gelu byl onen gel nejprve převrstven destilovanou vodou. Po 20 minutách, po zatuhnutí separačního gelu, byla voda slita a teprve poté byl nalit gel zaostřovací. Posledním rozdílem bylo složení elektrodového pufru.

Použité roztoky:

12% separační gel: 3,3 ml H₂O; 4 ml roztok polyakrylamidu; 2,5 ml 1,5M Tris (8,8 pH) ; 0,1 ml 10% (w/v) SDS; 0,1 ml 10% (w/v) Na₂S₂O₈; 0,004 ml TEMED

6% zaostřovací gel: 4,1 ml H₂O; 1 ml roztok polyakrylamidu; 0,75 ml 1,0 Tris (6,8 pH); 0,06 10% (w/v) SDS; 0,06 ml 10% (w/v) Na₂S₂O₈; 0,006 ml TEMED

Elektrodový pufr : 0,125M Tris (7,6 g); 200 mM glycin (37,5 g); 0,5 % (w/v) SDS (25 g)

6x vzorkový pufr: 3,5 ml 1M Tris (pH~6,8); 3,0 ml glycerol; 1 g SDS; 600 µl 2-merkapt ethanol; 1,2 mg bromfenolová modř; destilovaná H₂O do objemu 10 ml

4.3.6 Chromatografie na tenké vrstvě

Další separační metodou, kterou byla testována aktivita enzymu, byla chromatografie na tenké vrstvě.

Jako standardy byly použity 5% roztoky sacharosy, glukosy a fruktosy. Do mikrozkuhavky bylo napipetováno 500 µl roztoku sacharosy a 100 µl supernatantu. Vzorek byl inkubován za pokojové teploty po dobu 6 hodin. Mobilní fáze byla v podobě 85% Acetonitrilu.

Na dvě chromatografické destičky byly rovnoměrně, cca 1 cm od spodního okraje, naneseny standardy i vzorek. Po zaschnutí byly destičky ponořeny do mobilní fáze. Mobilní fáze byla nalita v uzavíratelné nádobě, kvůli nasycení vnitřního prostoru parami. Po napuštění mobilní fází byly destičky vysušeny.

Pro vyvolání byl použit barvicí roztok pro stanovení veškerých sacharidů.

Barvicí roztok: 0,5 g α -Naftolu, 95ml Ethanolu, 5 ml 97% H₂SO₄

První destičky byla vložena do barvicího roztoku a po vyjmutí byla inkubována po dobu 15 minut při 120 °C.

Po obarvení byly vypočítány retenční faktory. Retenční faktor (R_f) je hodnota určující poměr vzdálenosti, kterou urazí skvrna stanovované látky (a) ke vzdálenosti, kterou urazí čelo rozpouštědla (b).

$$R_f = \frac{a}{b}$$

4.3.7 HPLC iontová chromatografie

Při iontové chromatografii (anex) byla použita komerční kolona CaptoQ. Po ekvilibraci kolony pufrém A byl nasát vzorek supernatantu. Gradient byl nastaven od 0-100% během 25 minut a po dobu 15 minut byla koncentrace pufru B konstantní na 100 %. Poté byla chromatografie ukončena, vyhodnocena a použitelné frakce změřeny za pomoci elektroforézy.

Použité pufrы:

Pufr A: 50 mM MES (pH 6,5)

Pufr B: 50 mM MES + 1M NaCl

4.3.8 *In situ* detekce aktivity dextransacharasy

Připravený gel z předchozí elektroforézy SDS-PAGE byl 3x promyt acetátovým pufrém, každý po dobu 30 minut. Následně byl gel inkubován po dobu 72 hodin při 30°C v acetátovém pufru obohaceném o sacharosu o celkové koncentraci 10 %. Po třídní inkubaci byl gel promýván roztokem methanol:kyselina octová (50:10) po dobu 30 minut a poté byl po dobu 45 minut inkubován při pokojové teplotě v roztoku 1% kyseliny jodisté a 3% kyseliny octové. V následujících dvou hodinách byl gel opakovaně promýván destilovanou vodou.

V poslední části detekce byl gel ponořen do Schiffova činidla na 8 minut a následně opakovaně 30 minut promýván 0,5% siřičitanem sodným.

Použité roztoky:

Acetátový pufr: 20 mmol Octan sodný, 0,3mmol CaCl, 10% Tween, pH 5,4

Schiffovo činidlo: 0,2g fuchsinu, 1,65 g hydrogensířičitanu sodného, 2-10 ml konc.

HCl, 320 ml destilované vody

5 VÝSLEDKY

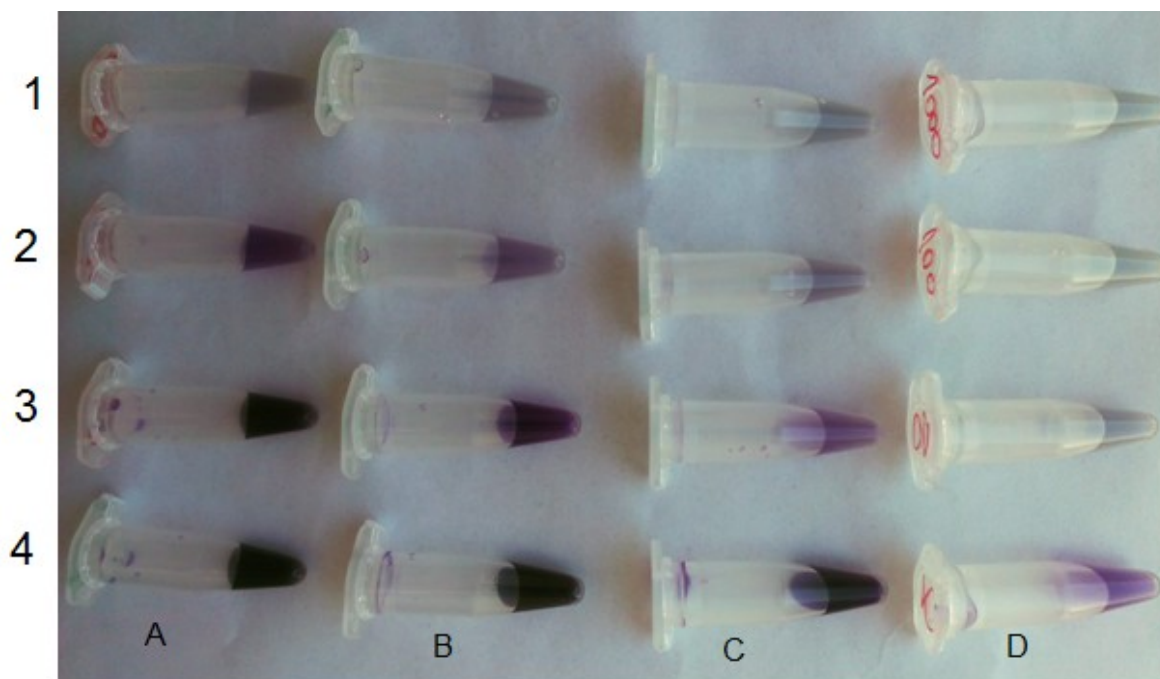
Cílem této práce bylo identifikovat aktivity enzymů štěpicích sacharosu, zejména pak pokusit se prokázat přítomnost enzymu dextransacharasy, který glukosovou jednotku z molekuly sacharosu zabudovává do struktury polysacharidu dextransu, zatímco odštěpenou fruktosu ponechává volně v roztoku. V případě prokázání tohoto enzymu je dalším cílem jeho izolace. Dosažení těchto cílů je však komplikováno několika faktory. Předně je to nízká koncentrace enzymu v supernatantu po odstředění bakteriální kultury, dále pak možná vazba dextransacharasy na dextrans – díky ní může dojít k odstranění podstatné části tohoto enzymu z média společně s dextransem, a konečně přítomnost redukujících sacharidů a minimálně stopových množství dextransu v supernatantu. Aby bylo možné detekovat aktivitu dextransacharasy pomocí nárůstu koncentrace buď redukujících sacharidů – v našem případě fruktosu, nebo dextransu, je nezbytné tyto látky z analyzovaných vzorků odstranit. Jako první byla vyvinuta metoda založená na stanovení redukujících sacharidů pomocí kyseliny bicinchoninové. Tento postup je analogií Smithovy metody stanovení koncentrace proteinů. (50) Redukující sacharidy, jakož i další nízkomolekulární látky, byly z roztoku odstraněny dialýzou.

5.1 Dialýza

Nejprve jsme odebrali 10 ml supernatantu bakterie *leuconostoc garlicum*, který jsme podrobili dialýze. Supernatant byl dialyzován v acetátovém pufru (5,4 pH) celkově 3x po dobu 3 hodin a jednou přes noc.

Pufr: 50 mM octan sodný (pH 5,4)

Takto dialyzovaný produkt jsme podrobili testu za pomoci kyseliny bicinchoninové pro zjištění, zda-li se zde nachází redukující cukry. Dialyzovaný vzorek jsme zředili 10x, 100x a 1000x.



Obr. 7: Sloupec A: vzorky z první, sloupec B: vzorky z druhé, sloupec C: vzorky ze třetí dialýzy a sloupec D: zředěné vzorky dialýzy probíhající přes noc. Řada 1: vzorek 1000x ředěný, řada 2: vzorek 100x ředěný, řada 3: vzorek 10x ředěný, řada 4: neředěný vzorek

Na obrázku 7 je zřetelně viditelné odstranění přebytečných redukujících sacharidů, které se nacházely ve vzorku.

5.2 Stanovení redukujících sacharidů za pomoci kyseliny bicinchoninové

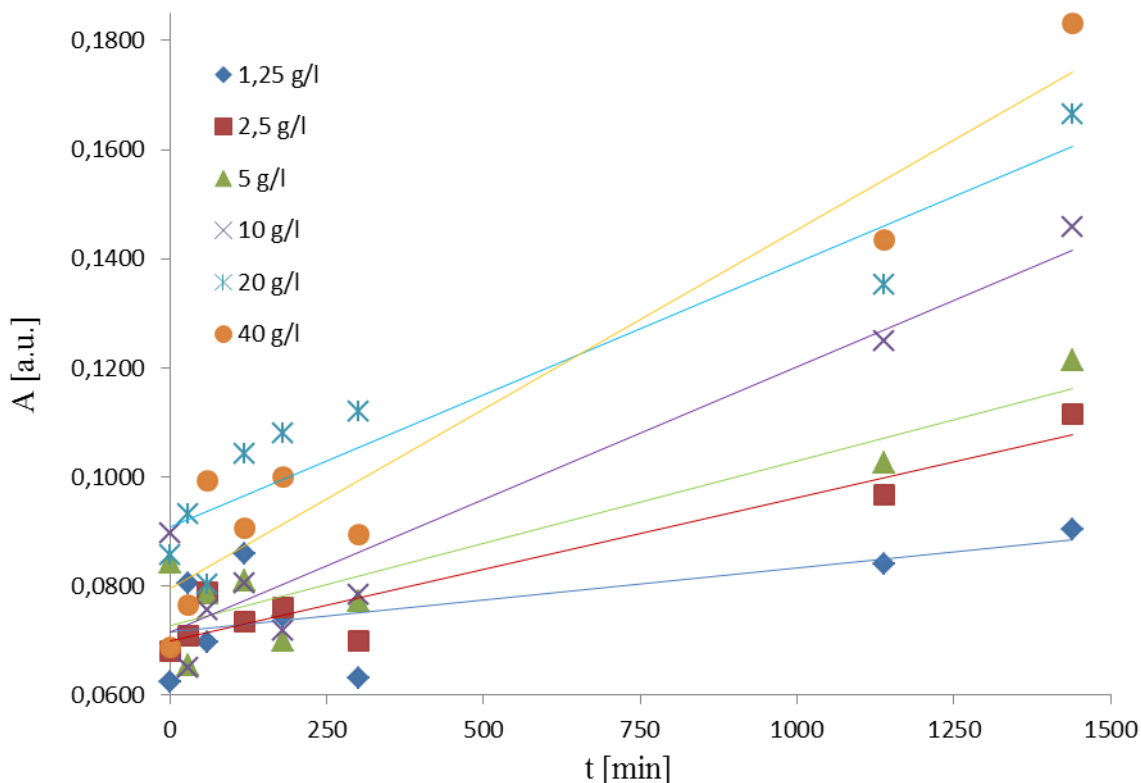
V následujících tabulkách a grafech je zobrazeno měření inkubovaného supernatantu na spektrofotometru. Tyto tři supernatanty o různé délce nárůstu (30, 40 a 48 hodin) byly nejprve dialyzovány a poté inkubovány v roztocích o rozdílné koncentraci sacharosy.

Supernatant z buněk *leuconostoc garlicum* po 30 hodinovém nárůstu:

Tab. 1: Hodnoty absorbance v závislosti na koncentraci sacharosu a době inkubace

Koncentrace [g/l]	čas [min]							
	0	30	60	120	180	300	1140	1440
1,25	0,0625	0,0806	0,0698	0,0858	0,0744	0,0632	0,0840	0,0904
2,5	0,0681	0,0709	0,0788	0,0734	0,0761	0,0699	0,0966	0,1114
5	0,0842	0,0654	0,0787	0,0810	0,0700	0,0771	0,1026	0,1213
10	0,0897	0,0650	0,0756	0,0805	0,0717	0,0783	0,1249	0,1459
20	0,0857	0,0932	0,0802	0,1043	0,1081	0,1119	0,1353	0,1666
40	0,0688	0,0764	0,0994	0,0905	0,1000	0,0894	0,1434	0,1831

V tabulce 1 jsou znázorněny naměřené hodnoty absorbance měřené na spektrofotometru při vlnové délce 562 nm, jednotlivé koncentrace roztoků se sacharosu (1,25; 2,5; 5; 10; 20 a 40 g/l), ve kterých byl vzorek supernatantu inkubován a doba inkubace při 30°C (0, 30, 60, 120, 180, 300, 1140 a 1440 minut).



Obr. 8: Hodnoty absorbance v závislosti na době inkubace

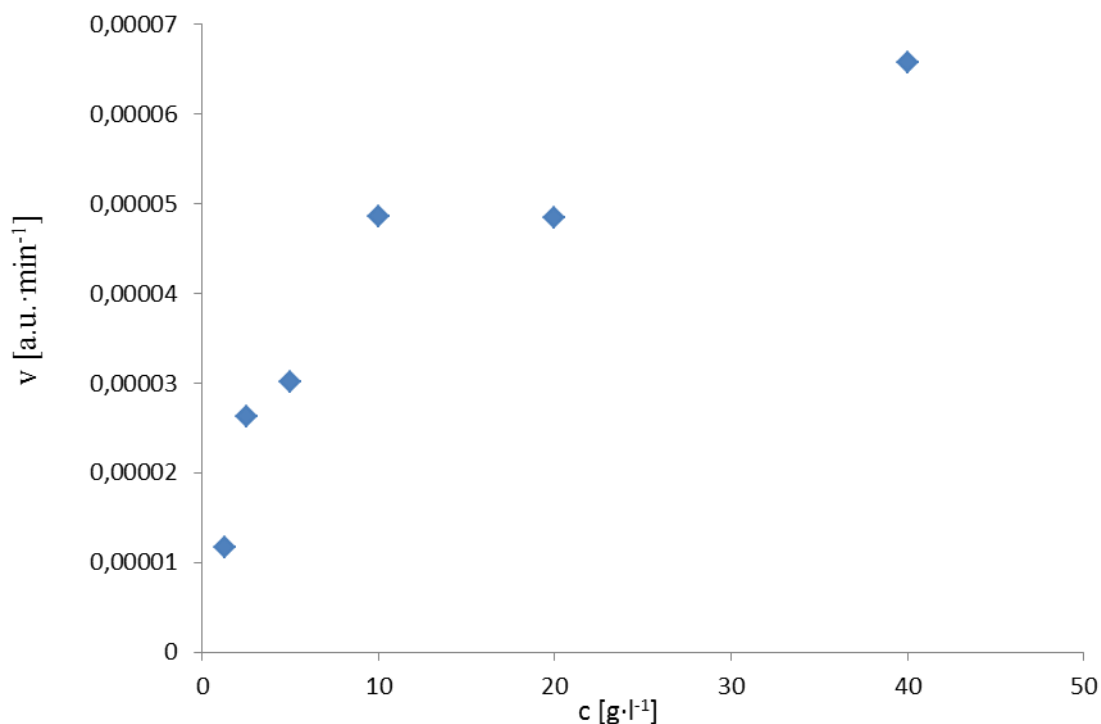
Tabulka 2 zobrazuje hodnoty relativní rychlosti syntézy dextransu v závislosti na počáteční koncentraci sacharosu. Relativní rychlost je dána nárůstem absorbance vyvolané

jako odezva detekční metody na koncentraci fruktosy vzniklé štěpením sacharosy, při němž se glukosová jednotka zabudovává do struktury dextranu. Tato rychlost je vypočítána jako směrnice přímků znázorněných v grafu na obrázku 9.

Tab. 2: Relativní rychlost syntézy v závislosti na koncentraci sacharosy spolu s jejich převrácenými hodnotami

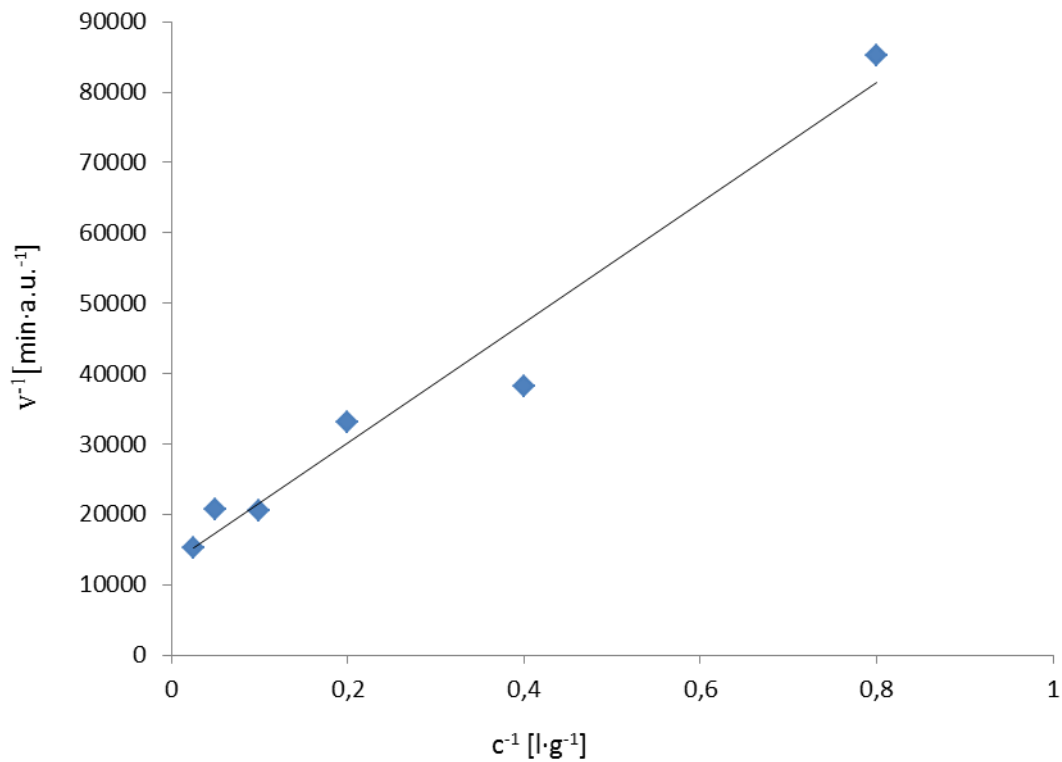
koncentrace [g·l ⁻¹]	relativní rychlost syntézy dextranu [a.u.·min ⁻¹]	reciproká hodnota koncentrace [l·g ⁻¹]	reciproká hodnota relativní rychlosti syntézy dextranu [min·a.u. ⁻¹]
1,25	$1,174 \cdot 10^{-5}$	0,8	85178,9
2,5	$2,624 \cdot 10^{-5}$	0,4	38109,8
5	$3,017 \cdot 10^{-5}$	0,2	33145,5
10	$4,866 \cdot 10^{-5}$	0,1	20550,8
20	$4,841 \cdot 10^{-5}$	0,05	20656,9
40	$6,577 \cdot 10^{-5}$	0,025	15204,5

Hodnoty z tabulky 2 jsou rovněž vyneseny do grafů 9 a 10.



Obr. 9: Hodnoty koncentrace sacharosy v závislosti na relativní rychlosti syntézy

Pro zjištění Michaelisovy konstanty byl použit linearizovaný výnos podle Lineweavera a Burka. K jeho konstrukci je zapotřebí převrácených hodnot koncentrací a regrese uvedených v tabulce 2.



Obr. 10: Reciproké hodnoty koncentrací v závislosti na reciprokých hodnotách
lineární regrese

Michaelisova konstanta:

$$v = V_m \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

její převrácená hodnota:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} \cdot \left(\frac{K_m}{[S]} + 1 \right)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

kde K_m/V_m je směrnice přímky a $1/V_m$ je daný úsek, poté:

$$\frac{1}{v} = 6,57 \text{ g}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{min}$$

Hodnota Michaelisovy konstanty enzymu, který byl přítomen v supernatantu z buněk *leuconostoc garlicum* po 30 hodinovém nárůstu je po zaokrouhlení 6,6 g/l, což po převedení hmotnostní koncentrace sacharózy na koncentraci molární dává hodnotu 19,2 mmol.dm⁻³.

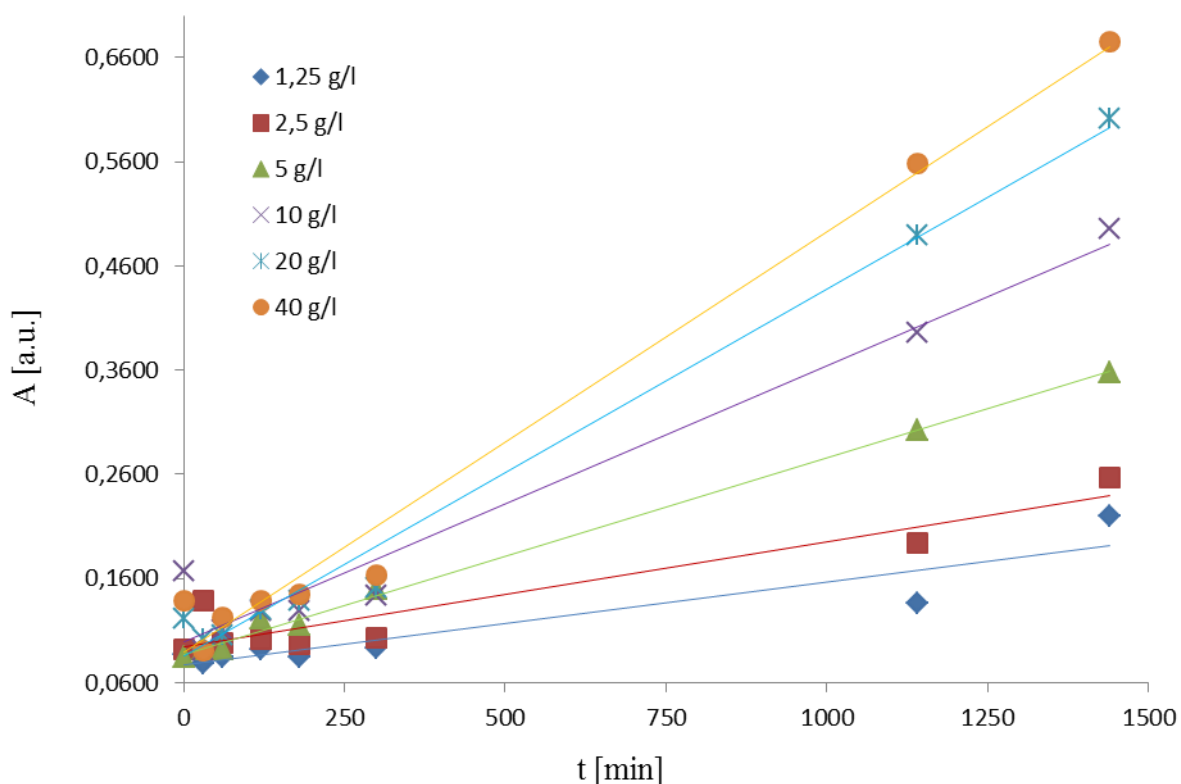
Michaelisova konstanta byla analogicky stanovena pro další vzorky bakteriální kultury, které se lišily od kultury původní dobou nárůstu. Tyto výsledky jsou zachyceny v tabulkách 4-6 a grafech 4-6 pro kulturu s dobou nárůstu 35 h a v tabulkách 6-9 a grafech 6-9 pro kulturu s dobou nárůstu 48 h.

Supernatant z buněk *leuconostoc garlicum* po 35 hodinovém nárůstu:

Tab. 3: Hodnoty absorbance v závislosti na koncentraci sacharózy a době inkubace

koncentrace [g/l]	čas [min]							
	0	30	60	120	180	300	1140	1440
1,25	0,0875	0,0787	0,0844	0,0926	0,0841	0,0936	0,1359	0,2196
2,5	0,0926	0,1394	0,0977	0,1015	0,0966	0,1032	0,1942	0,2568
5	0,0852	0,0916	0,0923	0,1212	0,1152	0,1497	0,3030	0,3579
10	0,1676	0,0905	0,1101	0,1293	0,1295	0,1435	0,3964	0,4958
20	0,1213	0,1020	0,1062	0,1307	0,1389	0,1506	0,4891	0,6015
40	0,1385	0,0913	0,1230	0,1390	0,1455	0,1632	0,5588	0,6745

V grafu na obrázku 11 jsou vyneseny hodnoty absorbance v závislosti na čase z tabulky 3.



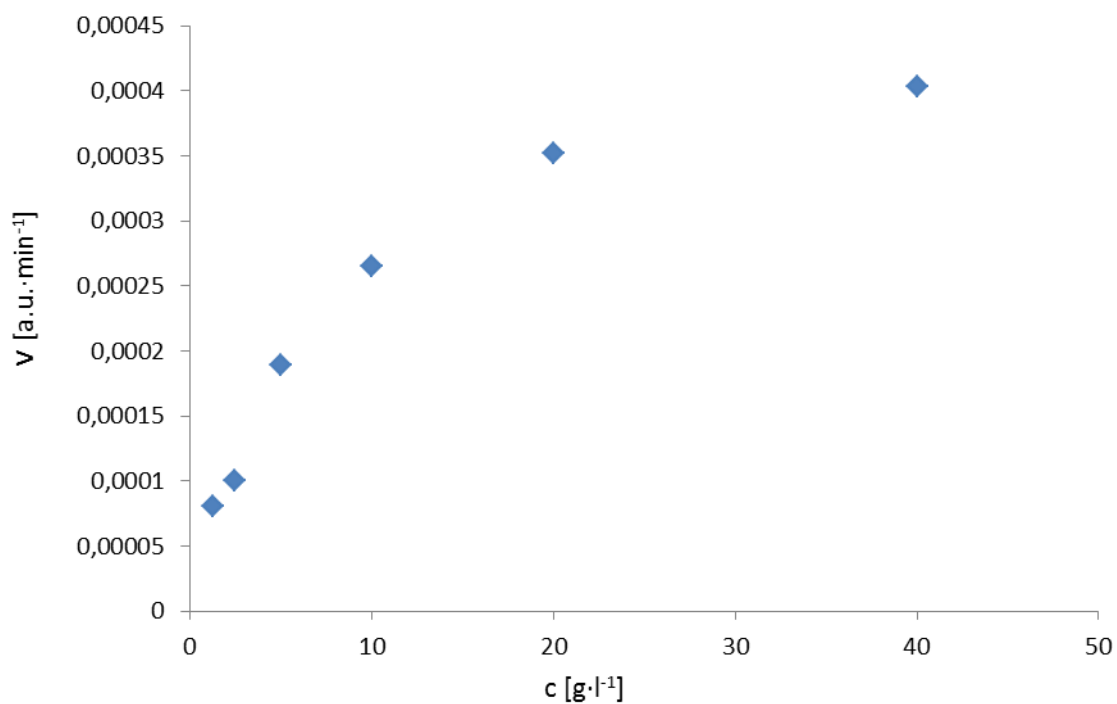
Obr. 11: Hodnoty absorbance v závislosti na době inkubace

Tabulka 4 a graf na obrázku 12 zobrazuje hodnoty relativní rychlosti syntézy dextranu v závislosti na počáteční koncentraci sacharosu.

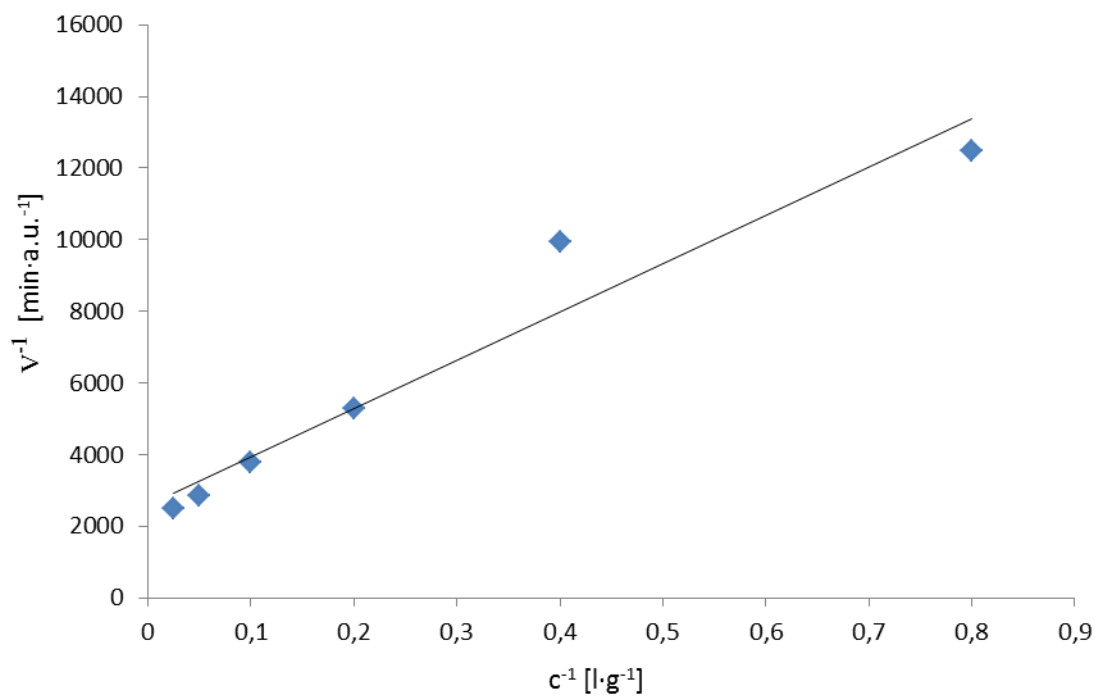
Tabulka 4: Relativní rychlost syntézy v závislosti na koncentraci sacharosu spolu s jejich převrácenými hodnotami

koncentrace [g·l ⁻¹]	relativní rychlost syntézy dextranu [a.u.·min ⁻¹]	reciproká hodnota koncentrace [l·g ⁻¹]	reciproká hodnota relativní rychlost syntézy dextranu [min·a.u. ⁻¹]
1,25	$8,02 \cdot 10^{-5}$	0,8	12468,8
2,5	$1,01 \cdot 10^{-4}$	0,4	9922,6
5	$1,89 \cdot 10^{-4}$	0,2	5294,9
10	$2,65 \cdot 10^{-4}$	0,1	3771,7
20	$3,52 \cdot 10^{-4}$	0,05	2840,2
40	$4,04 \cdot 10^{-4}$	0,025	2477,8

Hodnoty z tabulky 4 jsou rovněž vyneseny do grafů na obrázcích 12 a 13.



Obr. 12: Hodnoty koncentrace sacharosu v závislosti na relativní rychlosti syntézy



Obr. 13: převrácené hodnoty koncentrací v závislosti na převrácených hodnotách lineární regrese

Michaelisova konstanta byla opět vypočítána z předchozí rovnice:

$$\frac{1}{v} = 5,2 \text{ g}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{min}$$

Hodnota Michaelisovy konstanty dextransacharasy nacházející se v supernatantu z buněk *leuconostoc garlicum* po 35 hodinovém nárůstu je tedy 5,2 g/l.

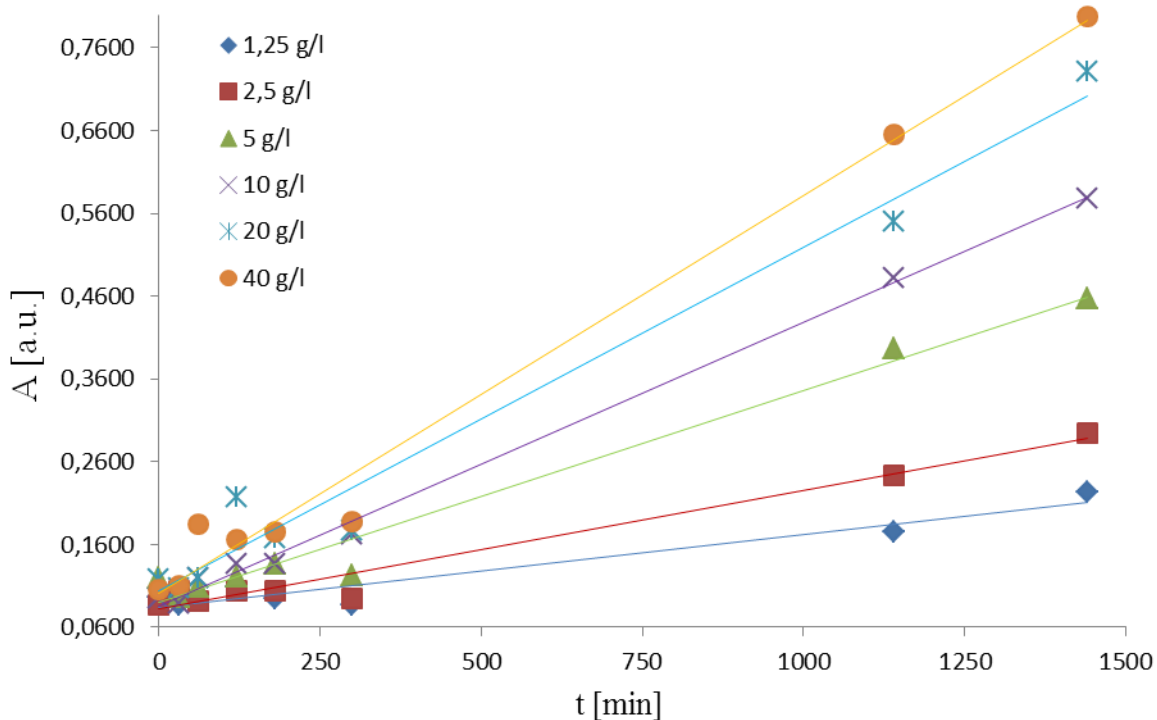
Po převedení hmotnostní koncentrace sacharózy na koncentraci molární je její hodnota 15,22 mmol.dm⁻³.

Supernatant z buněk *leuconostoc garlicum* po 48 hodinovém nárůstu:

Tab. 5: Hodnoty absorbance v závislosti na koncentraci sacharózy a době inkubace

koncentrace [g/l]	čas [min]							
	0	30	60	120	180	300	1140	1440
1,25	0,0964	0,0874	0,0917	0,1088	0,0942	0,0876	0,1752	0,2230
2,5	0,0875	0,1047	0,0919	0,1037	0,1042	0,0944	0,2441	0,2947
5	0,1188	0,0959	0,1081	0,1210	0,1372	0,1223	0,3961	0,4572
10	0,0944	0,0881	0,1191	0,1373	0,1367	0,1717	0,4820	0,5778
20	0,1177	0,1072	0,1192	0,2175	0,1672	0,1773	0,5496	0,7307
40	0,1054	0,1096	0,1840	0,1666	0,1750	0,1875	0,6555	0,7982

V grafu na obrázku 14 jsou vyneseny hodnoty absorbance v závislosti na čase z tabulky 5.

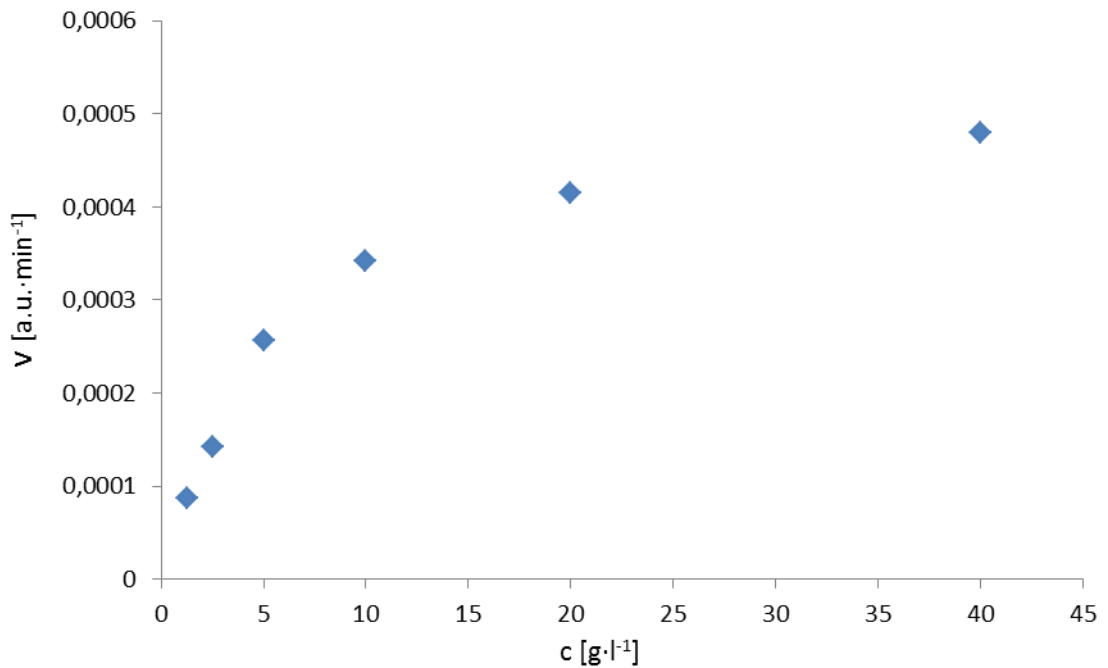


Obr. 14: Hodnoty absorbance v závislosti na době inkubace

Tabulka 6 a graf na obrázku 15 zobrazuje hodnoty koncentrace sacharosu v závislosti na hodnotě vypočítané z rovnice lineární regrese grafu dané absorbance.

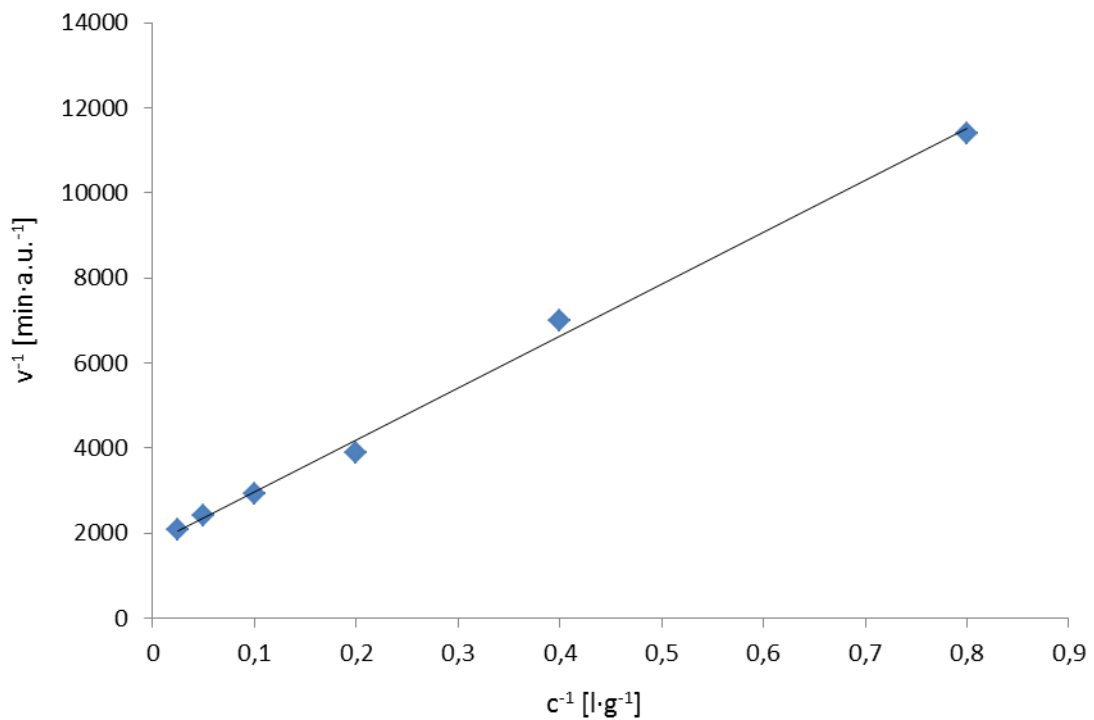
Tab. 6: Relativní rychlost syntézy v závislosti na koncentraci sacharosu relativní rychlost syntézy v závislosti na koncentraci sacharosu spolu s jejich převrácenými hodnotami

koncentrace [g·l ⁻¹]	relativní rychlost syntézy dextranu [a.u.·min ⁻¹]	reciproká hodnota koncentrace [l·g ⁻¹]	reciproká hodnota relativní rychlosti syntézy dextranu [min·a.u. ⁻¹]
1,25	$8,78 \cdot 10^{-5}$	0,8	11396,1
2,5	$1,43 \cdot 10^{-4}$	0,4	7005,3
5	$2,57 \cdot 10^{-4}$	0,2	3896,5
10	$3,42 \cdot 10^{-4}$	0,1	2922,4
20	$4,15 \cdot 10^{-4}$	0,05	2406,9
40	$4,80 \cdot 10^{-4}$	0,025	2083,7



Obr. 15: Hodnoty koncentrace sacharosu v závislosti na relativní rychlosti syntézy

Tabulka 6 a graf na obrázku 16 zobrazuje převrácené hodnoty grafu na obrázku 15.



Obr. 16: Převrácené hodnoty koncentrací v závislosti na převrácených hodnotách
lineární regrese

Michaelisova konstanta byla opět vypočítána z předchozí rovnice:

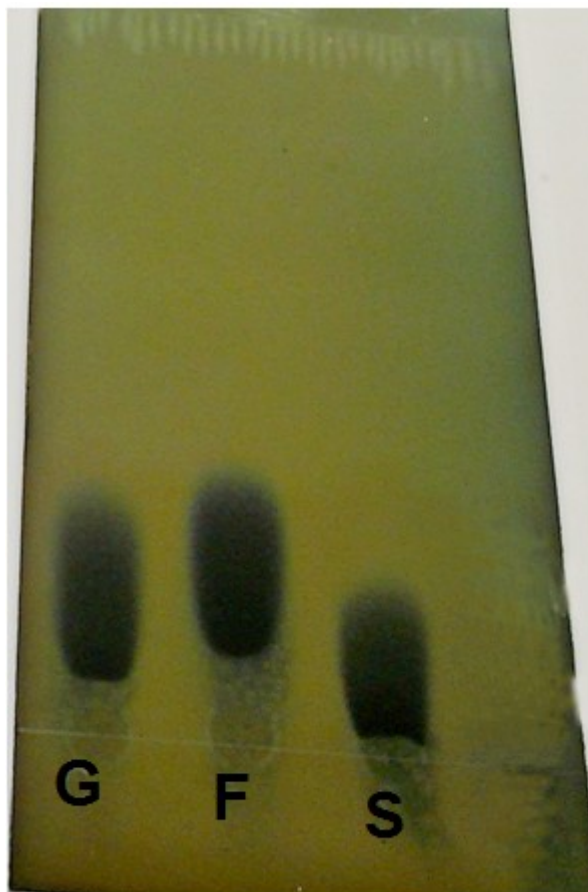
$$\frac{1}{v} = 6,9 \text{ g}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{min}$$

Hodnota Michaelisovy konstanty dextransacharasy nacházející se v supernatantu z buněk *leuconostoc garlicum* po 35 hodinovém nárůstu je tedy 6,9 g/l.

Po převedení hmotnostní koncentrace sacharózy na koncentraci molární je její hodnota 20,37 mmol.dm⁻³.

5.3 Chromatografie na tenké vrstvě

Bakteriální kultura může obsahovat více enzymů štěpících sacharosu na redukující monosacharidy, zejména invertasu katalyzující prosté štěpení sacharosu na glukosu a fruktosu, případně levansacharasu, která katalyzuje syntézu polysacharidu levynu složeného z fruktosových monomerních jednotek a v roztoku ponechává volnou glukosu. Proto bylo třeba analyzovat, jaké monosacharidy reakcí vznikají. K tomuto účelu jsme použili metodu chromatografie na tenké vrstvě. Jako standardy byly použity roztoky sacharosu, fruktosu a glukosu. Výsledky znázorněné na obrázku 9 ukazují, že nejrychleji migruje fruktosa, o něco pomalejší je glukosa a nejpomalejší je sacharosa.



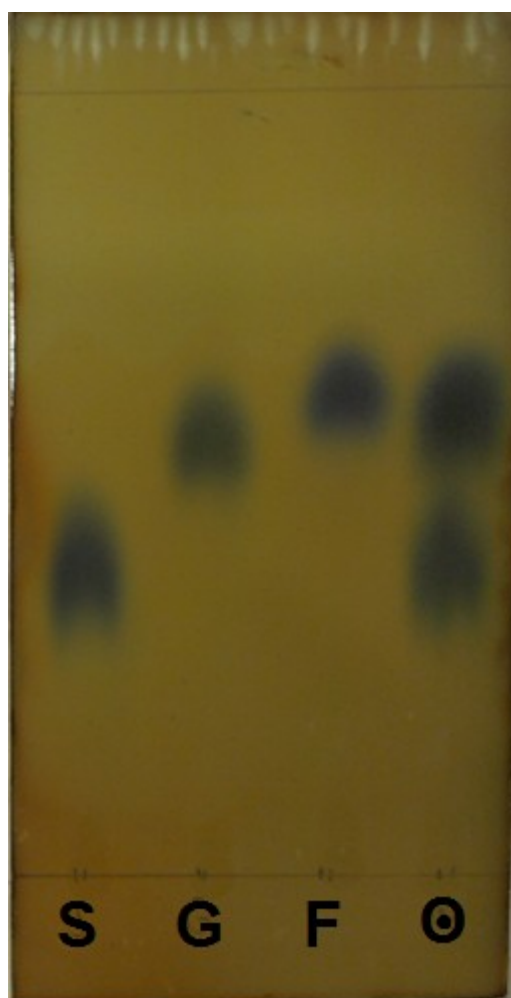
Obr. 17: Na levé straně je vidět glukosa, uprostřed fruktosa a napravo sacharosa

Následně byla analyzována reakční směs po šestihodinové inkubaci sacharosy se supernatantem z bakteriální kultury kultivované 48 hodin (obr. 18) a byly vypočteny retenční faktory jednotlivých látek, tedy skvrn na chromatogramu, ve všech drahách.

Tab. 7: Vypočtená hodnota retenčního faktoru z naměřených vzdáleností

Skvrna	Vzdálenost skvrny od startu (cm)	Vzdálenost čela od startu (cm)	Vypočtená hodnota R _f
Sacharosa	2,7	7	0,386
Glukosa	3,85	7	0,55
Fruktosa	4,25	7	0,607
Vzorek: horní skvrna	4,2	7	0,6
Vzorek: spodní skvrna	2,7	7	0,385

Bylo zjištěno, že tato směs obsahuje zbytky sacharosy a sacharid, jehož retenční faktor je podstatně blížíš standardu fruktosy než glukosy. Z toho lze usoudit, že reakční směs obsahuje volnou fruktosu, zatímco glukosa je zabudována do struktury dextranu, a tudíž není v reakční směsi přítomna. Je však třeba připustit, že analýza není zcela precizní, co se týče ostrosti skvrn, a bylo by žádoucí optimalizovat složení mobilní fáze, dávkování vzorku i dobu vyvíjení chromatogramu, což se z důvodů nedostatku času nepodařilo realizovat.

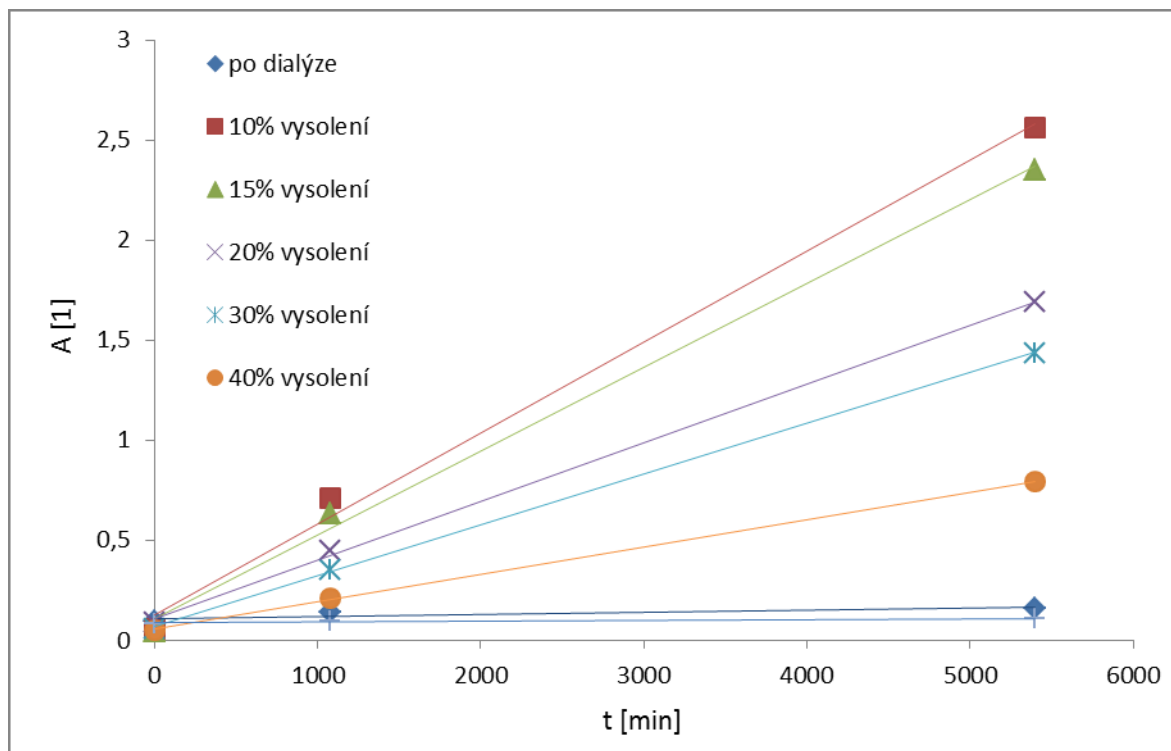


*Obr. 18: Písmeno S: roztok sacharosy,
G: roztok glukosy, F: roztok fruktosy,
O: inkubovaný roztok sacharosy se
supernatantem*

Protože se podařilo detekovat aktivitu dextransycharasy ve vzorku supernatantu po odstředění buněčná kultury bakterie *Leuconostoc garlicum*, pokusili jsme se rovněž o jeho izolaci. Jako výchozí krok tohoto postupu jsme provedli vysolení vzorku supernatantu síranem amonným. Použili jsme opět tu kulturu, která byla nejdéle kultivována, a to 48 hodin. Vysolením byly získány frakce vysrážené při celkových koncentracích síranu amonného 10, 15, 20, 30 a 40% a ze zbytkového supernatantu obsahujícího proteiny, které se nesrážejí ani v nejvyšší použité koncentraci. U jednotlivých frakcí po vysolení a rozpuštění v nativním roztoku byla stanovena aktivita dextransycharasy podobně jako v kapitole 5.2. Rozdíl byl ale v tom, že koncentrace sacharosy v roztoku, ve kterém byl vzorek supernatantu inkubován, byla ve všech případech stejná.

Tab. 8: Hodnota absorbancí z vysolených frakcí v závislosti na čase + jejich směrnice přímek

% vysolení	čas [min]			Směrnice přímek
	0	1080	5400	
po dialýze	0,0921	0,137	0,1621	0,00000333
10% vysolení	0,0537	0,7097	2,5603	0,00001092
15% vysolení	0,0449	0,6363	2,3535	0,00013582
20% vysolení	0,0917	0,4478	1,6892	0,00025425
30% vysolení	0,0573	0,353	1,4373	0,00029341
40% vysolení	0,0532	0,2133	0,7911	0,00041894
40% supernatant	0,085	0,0943	0,1049	0,00045396



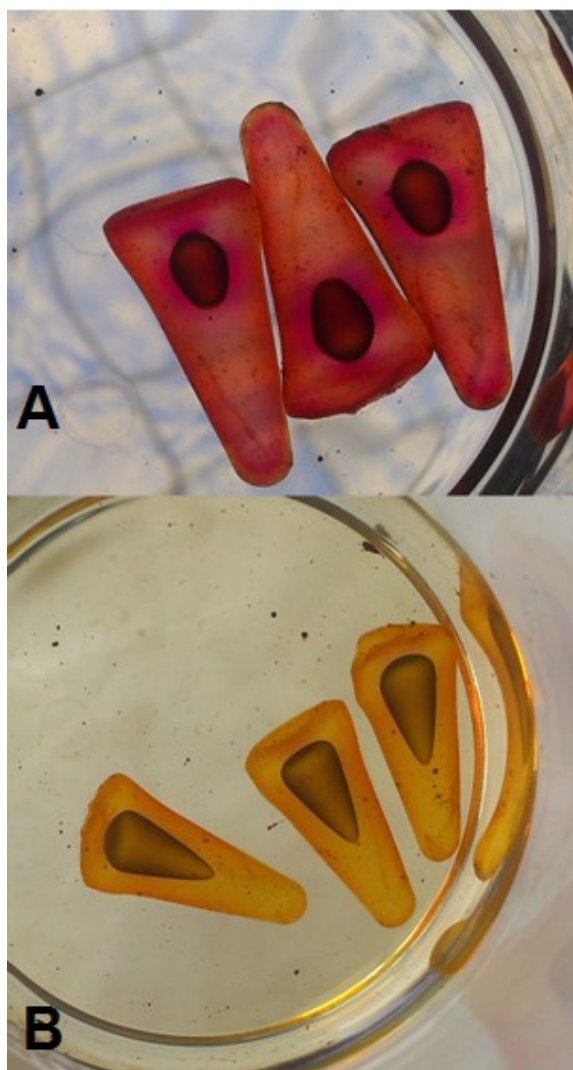
Obr. 19: Hodnota absorbancí vysolených frakcí v závislosti na čase

Nejvyšší nárůst hodnot absorbancí je viditelný u 10% vysolení supernatantu síranem amonným. Z toho se dá usoudit, že nejvyšší koncentrace dextransacharasy se nachází v této frakci. Z časových důvodů však nebylo možné s touto frakcí provést další purifikační, zejména chromatografické, experimenty.

5.4 Detekce syntetizovaného dextransu prostřednictvím zymogramu

Protože detekce enzymové aktivity prostřednictvím stanovení redukcí sacharidů může být ovlivněna eventuální přítomností jiných enzymových aktivit štěpících sacharosu, byl proveden pokus o vyvinutí metody založené bezprostředně na stanovení vznikajícího dextransu. Pro tento účel byla zvolena v literatuře popsaná metoda detekce dextransu syntetizovaného dextransacharasy přítomnou v polyakrylamidovém gelu po separaci elektroforézou SDS PAGE. (50) Tato forma detekce enzymové aktivity se nazývá zymogram. Z uvedeného zdroje vyplývá, že dextransacharasa by si měla zachovat svoji aktivitu i po provedení denaturující gelové elektroforézy, jestliže je nakonec gel převeden do nativního prostředí. Je-li následně gel inkubován v roztoku sacharosu, dojde k syntéze dextransu v tom místě, kde je lokalizován proužek dextransacharasy. Syntetizovaný dextrans je následně detekován pomocí Schiffova činidla.

Pro ověření detekce jsme nejprve, do mikrozkušavek připravili stejný gel, jako na elektroforézu SDS PAGE, do nějž jsme nechali zapolymerovat vzorek rozpuštěného dextranu. Po obarvení schiffovým činidlem byly viditelné výsledky, které jsou zobrazeny na obrázku 20.



Obr. 20: Vzorek dextranu uvnitř gelu SDS-PAGE podrobený metodě zymogramu.

Červeněji zbarvené vzorky (A) byly ponechány v schiffově činidle o několik minut déle než vzorky zbarveny do oranžova (B).

Tmavá místa uvnitř gelů jsou viditelně obarvené rozpuštěné vzorky dextranu. Jelikož tento test poskytl pozitivní výsledky, byla detekce použita i pro vlastní zymogram.

Nejdříve byl vzorek dialyzován kvůli odstranění přebytečných sacharidů, aby bylo pracováno se vzorkem s identickým preparátem jako v předchozím případě. S takto

vyčištěným vzorkem z poslední dialýzy jsme poté provedli detekci prostřednictvím zymogramu.

Do drah gelu jsme vložili následující vzorky:

1. PM
2. Supernatant povařený
3. Dialyzovaný supernatant povařený
4. Dialyzovaný supernatant inkubovaný při teplotě 38°C
5. Dextran inkubovaný při teplotě 38°C

Vzorky v drahách 4 a 5 jsme smíchali v poměru 1:1 se vzorkovým pufrem a inkubovali po dobu 6 hodin při teplotě 38°C. Vzorky 2 a 3 jsme taktéž smíchali se vzorkovým pufrem v poměru 1:1, ale následně jsme je povařili při 100°C po dobu 5 minut. Do dráhy 1 jsme napipetovali Protein Marker, ten ale není obarvitelný touto metodou. Proto je na obrázku 14 dráha prázdná.

Dextran použitý v dráze 5 byl izolován z bakteriální kultury stejné bakterie.

Byly vytvořeny 2 gely, z nichž jeden sloužil jako slepý pokus. První z nich byl po dobu 72 hodin inkubován v roztoku s 10% sacharosou. Druhý z nich (pravý) jako kontrolní byl ponechán po 72 hodin pouze v acetátovém pufru bez sacharosy. Výsledky jsou viditelné na obrázku 21.



Obr. 21: Gel SDS-PAGE podrobený metodě zymogram: 2. supernatant povařený, 3. dialyzovaný supernatant povařený, 4. dialyzovaný supernatant inkubovaný při teplotě 38°C, 5. dextran inkubovaný při teplotě 38°C

Na obou gelech jsou viditelné obarvené proužky. Na levém gelu, odpovídajícím inkubaci se sacharórou, je navíc od sousedního gelu viditelný proužek, který se nachází v 5. Dráze, v níž byl napipetován vzorek rozpuštěného dextranu. Tento výsledek zjevně neodpovídá očekávání, protože proužky v drahách 2-4 jsou přítomny jak na gelu inkubovaném se sacharózou, tak na gelu inkubovaném bez ní – slepém pokusu. Proto bylo nakonec od použití této detekční metody upuštěno, neboť její zavedení by vyžadovalo další značné množství experimentální práce, pokud by bylo možné vůbec.

DISKUZE

V této práci byla vyvinuta metoda pro stanovení aktivity enzymů, které dokáží přeměňovat neredukující cukry na redukující. Metoda je založena na detekci měďnatých iontů redukujícími sacharidy redukovaných na ionty měďné pomocí kyseliny bicinchoninové, obdobně jako v případě Smithovy metody stanovení koncentrace proteinů. Metoda je zjevně citlivá i na nízké koncentrace redukujících sacharidů a umožňuje tedy měřit i nízké aktivity enzymů, které tyto sacharidy vytvářejí. Na druhou stranu je v důsledku této vysoké citlivosti nezbytné odstranit ze vzorku veškeré redukující sacharidy, které jsou v něm přítomny před provedením analýzy, např. v důsledku předchozího bakteriálního nárůstu jako pozůstatky živné půdy nebo vedlejší produkty syntézy dextranu. Všechny redukující látky, tedy zejména sacharidy a proteiny, tedy musí být před provedením analýzy odstraněny do té míry, aby jejich koncentrace výrazně nepřevyšovala koncentraci redukujících sacharidů vytvořenou v průběhu stanovení. (Pokud jsou tyto látky přítomny v koncentracích srovnatelných s koncentrací vytvořených redukujících sacharidů nebo nižších, jejich další eliminace není nutná, protože tyto látky vytvoří jen konstantní pozadí měřeného signálu, které bude následně detekovanými látkami převyšeno).

Touto metodou byla změřena hodnota Michaelisovy konstanty dextransacharasy ve slabě koncentrovaných roztocích supernatanů z 3 bakteriálních nárůstů. Výsledky jsou ve velmi dobré vzájemné shodě, což svědčí o dobré funkčnosti a reprodukovatelnosti použité metody. Tyto výsledky byly dále porovnány s výsledky uvedenými v literatuře, s nimiž se poměrně dobře shodují. V literatuře jsou uvedené hodnoty, pro dextransacharasy bakterie *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. (51) Michaelisovy konstanty v rozmezí 12-16 mM. V našem případě byla průměrná hodnota Michaelisovy konstanty všech vzorků 18,26 mM. Nepatrný rozdíl ve výsledcích může být způsoben tím, že jde o enzym z jiné bakterie nebo nepřesností měření.

Identita dextransacharasy byla provedena pomocí tenkovrstvé chromatografie, pomocí níž byla analyzována reakční směs po proběhnutí reakce. Výsledek ukazuje, že ve směsi je kromě zbytků glukosy přítomna fruktosa, což odpovídá tomu, že katalyzovanou reakcí je opravdu syntéza dextranu. Tento experiment však nebyl z časových důvodů doveden k optimálnímu provedení, proto odečtení retenčních faktorů jednotlivých skvrn není zcela precizní, což ponechává určitou míru nejistoty, zda je detekovaným sacharidem skutečně jenom fruktosa, a není tedy možné zcela vyloučit ani kontaminaci jiným

enzymem štěpicím sacharosu, který může být v bakteriální kultuře rovněž přítomen (např. invertasa). To může být další eventuální příčinou ovlivnění hodnoty naměřené Michaelisovy konstanty enzymu.

Byl učiněn i pokus o izolaci enzymu. Supernatant buňky byl srážen síranem amonným za účelem částečné izolace a zvýšení koncentrace hledaného enzymu v roztoku. Nejvíce viditelné změny, které se poté projevíly při testu na redukující sacharidy byly již u 10% vysolení. Z toho vyplývá, že se enzym podařilo zkoncentrovat v 10% frakci. Celková koncentrace enzymu v nejsilnější frakci však byla stále velice nízká, takže se nepodařilo ho ani detekovat gelovou elektroforézou SDS PAGE. Přesto se nabízí možnost pokusit se doplnit izolační postup dalšími chromatografickými technikami a pokusit se získat čistší preparát. Z časových důvodů však nebylo možné tento směr dále sledovat. Celkově byly všechny pokusy komplikované tím, že volný enzym je v roztoku přítomen jen ve velmi nízké koncentraci. Znamená to, buď že je enzym velice aktivní, a to tak, že i přes nízkou koncentraci dokáže syntetizovat velké množství dextransu, anebo je pevně vázán na dextran velice silnou vazbou, která znemožňuje jeho snadné oddělení. Proto také nebyl enzym detekovatelný ani na elektroforeze SDS-PAGE, kde jsme se snažili enzym identifikovat, ale jeho nízká koncentrace to znemožňovala.

Vzhledem k tomu, že enzym je zjevně i přes nízkou koncentraci dostatečně aktivní, nelze vyloučit možnost měření jeho aktivity prostřednictvím detekce hlavního produktu jím katalyzované reakce, tedy dextransu. Tuto analýzu bohužel není možné provést ve výchozím buněčném supernatantu, kde je vždy přítomno alespoň stopové množství dextransu, který vznikl během kultivace bakterií. Jeho oddělení je relativně komplikované, protože ho, na rozdíl od látek nízkomolekulárních, není možné odstranit dialýzou. V principu by k tomuto účelu bylo možno použít i jiných metod, např. gelové chromatografie, ale ta zase nutně vede k nemalému zředění vzorku, takže by aktivita nemusela být detekovatelná již vůbec. Na druhou stranu, pokud v supernatantu existuje volná dextransacharasa, je možné tuto převést vhodnou elektroforetickou metodou do gelu, kde vytvoří samostatný proužek. Volný dextran je neutrální a do gelu putovat nebude. Podaří-li se během elektromigrace zachovat enzymovou aktivitu, nebo ji alespoň obnovit po ukončení elektroforézy, je možné detekovat aktivitu v gelu fixovaného enzymu prostřednictvím dextransu, který vznikne při inkubaci gelu v roztoku sacharózy a rovněž zůstane v gelu fixován na místě, kam doputoval enzym. Na tomto principu je založena metoda zymogramu, která byla popsána v literatuře. (52) Podle těchto autorů je enzym

velice stabilní. Enzym lze dokonce po proběhnutí elektroforézy SDS-PAGE znovu renaturovat, ale jen v případě, pokud nebyl enzym denaturován příliš vysokou teplotou. To byl důvod, proč byl vzorek inkubován při 38°C po dobu několika hodin, namísto jeho 5 minutového povaření. Bohužel jsme u tohoto pokusu nedosáhli dostatečně reprodukovatelných výsledků. Jediný výsledek pravděpodobně poukazuje na to, že je na dextransu, který je přítomen v bakteriálním supernatantu, navázána zkoumaná dextransacharasa, nebo jiné proteiny, které jsou mu schopny udělit nenulovou elektroforetickou mobilitu. Dextran totiž nemá žádné náboje, které by mohly během elektroforézy účinně migrovat v gelu směrem k anodě. Tento jev by mohl objasnit vzniklé proužky na gelu na obr. 14, které se nacházejí i ve slepém pokusu.

Proužek odpovídající přítomnému dextransu byl pozorován v poslední dráze, do níž byl přidán izolovaný dextran. Tento proužek je vidět pouze na gelu, který byl inkubován v roztoku 10% sacharosu. Možným vysvětlením tohoto jevu je, že v izolovaném dextransu bylo přítomno jisté množství denaturované dextransacharasy, která se ovšem mohla v rámci pokusu renaturovat do aktivní formy a syntetizovat dextran, který byl následně detekován reakcí s Schiffovým činidlem (vysoká stabilita a schopnost renaturace je v literatuře popsána). (52) Tento dextran byl ale izolován z jiné bakterie, tudíž se nemusí shodovat s naší zkoumanou dextransacharasou. Tento pokus se však dosud nepodařilo reprodukovat ani pozorování jinak vysvětlit, takže uvedené vysvětlení lze považovat pouze za pracovní hypotézu. Za pozitivní však lze považovat tu skutečnost, že se podařilo prokázat možnost detekce dextransu v gelu pomocí Schiffova činidla a její principiální použitelnost pro detekci aktivity dextransacharasy pomocí zymogramu. K praktickému použití metody je však třeba vyvinout vhodný elektroforetický postup, s jehož pomocí lze převést aktivní dextransacharasu do izolovaného proužku na polyakrylamidovém gelu. K tomuto účelu by mohla být využita např. nativní gelová elektroforéza v prostředí barviva Coomassie Brilliant Blue známá jako „Blue Native Electrophoresis“. S touto metodou byly provedeny některé orientační pokusy, ale dosud bez použitelného výsledku.

ZÁVĚR

I když se enzym dextransacharasy nepodařilo dokonale izolovat z dané bakteriální kultury, bylo provedeno několik metod, kde byla prokázána jeho aktivita. V prvním testu, na redukující cukry, byla aktivita prokázána v podobě narůstající absorbance vzorků inkubovaných v roztoku kyseliny bicinchoninové. Nárůst měďných iontů byl zaznamenáván a měřen na spektrofotometru. Z výsledných hodnot byla potom vypočítána Michaelisova konstanta jednotlivých testovaných vzorků. Jejich průměrná hodnota byla v dobré shodě s hodnotami, které jsou uváděny v odborné literatuře. Mírná odchylka může být způsobena i nepřesností měření, nebo kontaminací vzorku invertasou, která katalyzuje prosté štěpení sacharosy na glukosu a fruktosu, nebo levansacharasy, která katalyzuje syntézu polysacharidu levynu složeného z fruktosových monomerních jednotek. Levansacharasa zanechává v roztoku volnou glukosu.

Tenkovrstvá chromatografie dokazuje, že se v supernatantu vyskytuje enzym, který dokáže rozštěpit sacharosu na fruktosu a glukosu s tím, že glukosa se ihned poté zabudovává do struktury dextransu, a proto je na destičce viditelná jen fruktosa. Retenční faktory jednotlivých skvrn poukazují na fakt, že veškerá glukosa vytvořená dextransacharasou byla spotřebována ke tvorbě dextransu. Je tam ale vidět i mírné znečištění již zmiňovanou Levansacharasou nebo invertasou.

Při pokusu o izolaci enzymu, vysolováním síranem amonným, se ho podařilo zakonzentrovat v 10% frakci. Tento závěr je patrný v následném testu inkubovaného vysoleného vzorku se sacharosou za pomoci kyseliny bicinchoninové. V oné 10% frakci byl viditelný nejvyšší nárůst absorbancí.

V poslední řadě byla aktivita enzymu testována metodou zymogramu. Jelikož je volný dextran neutrální, tudíž nemá žádný náboj, kterým by mohl být přitahován v gelu při elektroforéze. Dextransacharasa pomocí zymogramu být prokázána může. Z testu je ale viditelný opět fakt, že daný enzym je v roztoku v minimální koncentraci, nebo je vázaný na dextran.

Závěrem se dá říci, že bylo vyvinuto několik metod pro zjištění aktivity enzymu a jednou metodou se dokázalo enzym zakonzentrovat. Následné purifikační metody byly negativní.

6 CITOVANÁ LITERATURA

1. Scheibler, C. Investigation on the nature of the gelatinous excretion which is observed in production of beet-sugar juices. *Z Dtsch Zucker-Ind*, 1874. 24, 309-335.
2. Hehre, E. J. *Science*. 1941. 93, 237-238.
3. Grönwall, A., Ingelman, B. *Vox Sang*. 1984. 47, 96.
4. Dimler, R.J. *Yearbook of Agriculture*. místo neznámé : U. S. Gov. Printing Office, 1969. 314.
5. Shoemaker, W.C. *Crit. Care Med*. 1976. 4, 71.
6. Gruber, U.F., Siegrist, J. *Arch. Klin. Chir*. 1962. 301, 128.
7. Gelin, L.E., Ingelman, B. *Acta Chir. Scand*. 1961. 122, 294.
8. Thorsen, G., Hint, H. *Acta Chir. Scand. Suppl*. 1954. 154.
9. Gelin, L.E. *Acta Chir. Scand*. 1956. 1, 210.
10. Borgstroem, S., Gelin, L.E., Zederfeldt, B. *Acta Chir. Scand. Suppl*. 1959. 247, 213.
11. Koekkenberg, L.J. *Bull. Soc. Int. Chir*. 1962. 5, 501.
12. [Online] http://en.wikipedia.org/wiki/Hapten#Hapten_inhibition. 15.3.2015
13. Richter, A.W. a Hedin, H.I. *Immunol. Today*. 1982. 132.
14. Kaisi, M., Ngwalle, E.W., Runyoro, D.E., Rogers, J., *Int. J. Gynecol. Obstet*. 1988. 26, 235.
15. Homma, Y., Mikami, Y., Tamachi, H., Nakaya, N., Nakamura, H., Goto, Y. *Metabolism*. 1987. 36, 419.
16. Pupita, F. a Barone, A. *Int. Clin. Pharm. Res*. 1983. 111, 287.
17. Proctor, E. a Joyce, M. *Transplantation*. 1978. 25, 92.
18. Taylor, P.J., Lewinthal, D., Leader, A., Pattinson, A.H., *Fertil. Steril*. 1987. 47, 861.
19. Jeanes, A., a spol. *Am. Chem. Soc*. 1954. 76, 5041-5047.
20. Lindberg, B. a Svensson, S. *Acta Chem. Scand*. 1968. 22, 1907.
21. Antonini, E. a spol. *Biopolymers*. 1964, 2, 27.

22. Hellman, N.N. Report on working conference on dextran. Peoria, 1951. 36.
23. Rees, D.A. a Scott, W.E. J.Chem.Soc. 1971. 469.
24. Wales, M., Marshall, P.A. a Weissberg, S.G. J.Polym.Sci. 1953. 10, 229.
25. Jeanes, A. a spol. J. Biol. Chem. 1948. 176, 617.
26. Ringfeil, M., Selenina, M. Proc. of the 2nd. Symposium on Continuous Cultivation of Microorganisms. Prague, 1962. str. 145.
27. Garvie, E.I. J. Gen. Microbiol. 1967. 48, 439.
28. Nadel, H., Randles, C.I., Stahly, G.L., Appl. Microbiol. 1953. 1, 217.
29. Jeanes, A., Am. Chem. Soc. místo neznámé : Symposium Ser., 1977. 45, 284.
30. Tsuchiya, H.M., Rist, C.E., J. Am. Chem. Soc. 1955. 77, 2412.
31. Lopez, A., Monsan, P. Biochemie. 1980. 62, 323.
32. Hamdy, M.K. The Ohio J. of Science. 1954. 54, 317.
33. Braswell, E., Goodman, A., Stern, K.G., J. Polym. Sci. 1962. 61, 143.
34. Hellman, N.N., Tsuchiya, H.M., Rogovin, S.P., Lamberts, B.L., Tobin, R., Glass, C.A., Stringer, C.S., Jackson, R.W., Senti, F.R., Ind. Eng. Chem. 1955. 47, 1592.
35. Basedow, A.M. Polym. Bull. 1980. 2, 337.
36. Echlin, P., Skaer, H.B., Gardiner, B.O.C., Franks., F., Asquith, M. H. J. Microsc. Oxford, 1977. 110, 239.
37. Curling, J.M. Separation of plasma proteins. 1983.
38. Armstrong, K., Noall, M.W., Stouffer, J.E., Biochem. Res. Commun. 1972. 47, 354.
39. Blumenstein, J. a spol. Progr. Clin. Biol. Res. 1978. 13, 205.
40. Robyt, J.F. Dextran. in Encyclopaedia of Polymer Science. New York, 1985.4, 753-767.
41. Sidebotham, R.L. Dextrans. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1974. 30, 371-444.
42. Tsuchiya, H.M. J. Bacteriol. 1952. 64, 521.
43. Lopez, A., Monsan, P. Biochemie. 1980. 62, 323.

44. Ebert, K.H., Schenk, G.Z. *Naturforsch.* 1962. 17b, 732.
45. Robyt, J.F., Walseth, T.F. *Carbohydr. Res.* 1979. 68, 95.
46. McCabe, M.M., Hamelik, R.M, Smith E.E. *Biochem. Biophys. Commun.* 1977. 78, 273.
47. Ebert, K.H., Schenk, G. *Advan. Enzymol. F.F. Nord*, 1968. 30, 179-219.
48. Robyt, J.F., Taniguchi, H. *Arch. Biochem. Biophys.* 1976. 174, 129.
49. Capek, P., Hlavoňová, E., Matulová, M., Mislovcová, D., Růžička, J., Koutný, M., Keprdová, L., *Carbohydrate Polymers. Isolation and characterization of an extracellular glucan produced by Leuconostoc garlicum.* 2011. 83, 88-93
50. Stoscheck, CM. *Quantitation of Protein. Methods in Enzymology.* 1990. 182, 50-69.
51. Robyt, J.F., Walseth, T.F. *Production, purification and properties of dextransucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F.* *Carbohydr. Res.* 1979. 68, 95-111.
52. Naessens, M.; A, Cerdobbel; Soetaert, W.; Vandamme, E.J. *J. Chem. Biotechnol. Belgium*, 2005. 80, 845-860.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

DIARs	Dextran induced anaphylactoid reactions
M _w	molekulová hmotnost
<i>L. mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
RPM	Otáčky za minutu
C	Význam třetí zkratky.
BCA	Kyselina bicinchoninová
Anex	Typ ionexové chromatografie
SDS_PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Struktura Dextranu 70

Obr. 2: Struktura Dextranu 4015

Obr. 3 : Fragment struktury dextranu17

Obr. 4: Graf závislosti viskozity oproti M_w dextranu B-512(f) (modrá křivka) a pro hypoteticky lineární dextran (červená křivka)

Obr. 5: Graf produkce dextransacharasy za přítomnosti a nepřítomnosti 0,05% chloridu vápenatého

Obr. 6: Aktivace dextranu za získání meziproductů: 1: karbamát, 2: lineární imidokarbonát a 3: cyklický imidokarbonát

Obr. 7: Sloupec A: vzorky z první, sloupec B: vzorky z druhé, sloupec C: vzorky ze třetí dialýzy a sloupec D: zředěné vzorky dialýzy probíhající přes noc. Řada1: vzorek 1000x ředěný, řada 2: vzorek 100x ředěný, řada 3: vzorek 10x ředěný, řada 4: neředěný vzorek

Obr. 8: Hodnoty absorbance v závislosti na době inkubace

Obr. 9: Hodnoty koncentrace sacharosy v závislosti na relativní rychlost syntézy

Obr. 10: Reciproké hodnoty koncentrací v závislosti na reciprokých hodnotách lineární regrese

Obr. 11: Hodnoty absorbance v závislosti na době inkubace

Obr. 12: Hodnoty koncentrace sacharosy v závislosti na relativní rychlost syntézy

Obr. 13: převrácené hodnoty koncentrací v závislosti na převrácených hodnotách lineární regrese

Obr. 14: Hodnoty absorbance v závislosti na době inkubace

Obr. 15: Hodnoty koncentrace sacharosy v závislosti na relativní rychlost syntézy

Obr. 16: Převrácené hodnoty koncentrací v závislosti na převrácených hodnotách lineární regrese

Obr. 17: Na levé straně je vidět glukosa, uprostřed fruktosa a napravo sacharosa

Obr. 18: Písmeno S: roztok sacharosy, G: roztok glukosy, F: roztok fruktosy, O: inkubovaný roztok sacharosy se supernatantem

Obr. 19: Hodnota absorbancí vysolených frakcí v závislosti na čase

Obr. 20: Vzorek dextranu uvnitř gelu SDS-PAGE podrobený metodě zymogramu.

Obr. 21: Gel SDS-PAGE podrobený metodě zymogram: 2. supernatant povařený, 3. dialyzovaný supernatant povařený, 4. dialyzovaný supernatant inkubovaný při teplotě 38°C, 5. dextran inkubovaný při teplotě 38°C

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Hodnoty absorbance v závislosti na koncentraci sacharosu a době inkubace

Tab. 2: Relativní rychlost syntézy v závislosti na koncentraci sacharosu spolu s jejich převrácenými hodnotami

Tab. 3: Hodnoty absorbance v závislosti na koncentraci sacharosu a době inkubace

Tab. 4: Relativní rychlost syntézy v závislosti na koncentraci sacharosu spolu s jejich převrácenými hodnotami

Tab. 5: Hodnoty absorbance v závislosti na koncentraci sacharosu a době inkubace

Tab. 6: Relativní rychlost syntézy v závislosti na koncentraci sacharosu relativní rychlost syntézy v závislosti na koncentraci sacharosu spolu s jejich převrácenými hodnotami

Tab. 7: Vypočtená hodnota retenčního faktoru z naměřených vzdáleností

Tab. 8: Hodnota absorbcí z vysolených frakcí v závislosti na čase + jejich směrnice přímk