

Produkce exopolymeru bakteriální kulturou PR

Bc. Lenka Keprdová

Diplomová práce
2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka KEPRDOVÁ**
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Produkce exopolymeru bakteriální kulturou PR**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na tvorbu extracelulárních polymerů gram pozitivními bakteriemi a na vlastnosti těchto polymerů.
2. Charakterizujte kulturu PR pomocí růstových, mikroskopických a biochemických testů a pokuste se na jejich základě zařadit tuto kulturu do vyšší taxonomické skupiny.
3. Experimentálně zhodnoťte produkční schopnosti kultury PR za různých podmínek – ověřte zejména vliv pH, složení kultivačního média a doby kultivace na produkci exopolymeru.
4. Získané výsledky přehledně zpracujte a diplomovou práci odevzdejte v tištěné i elektronické formě ve stanoveném termínu.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Vědecké práce zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect, SpringerLink, InterScience, Medline nebo SciFinder Scholar, případně práce dostupné z dalších zdrojů vědecké literatury

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

Datum zadání diplomové práce:

9. února 2009

Termín odevzdání diplomové práce:

15. května 2009

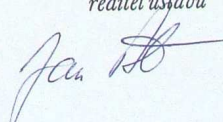
Ve Zlíně dne 10. února 2009



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.
ředitel ústavu



ABSTRAKT

Práce byla zaměřena na studium produkce bakteriálních exopolymerů, vytvářených kulturou PR. Součástí práce byla také charakterizace kultury PR, jejích růstových a biochemických vlastností. Ze získaných výsledků vycházela částečná identifikace kultury PR. Druhá část výzkumu se zabývala produkčními schopnostmi kultury PR v tekutých živných médiích. Podmínky kultivace, doba a také složení tekutého živného média, byly upravovány za účelem získání nejvyšší produkce exopolymerů. Růst buněk byl měřen pomocí zákalu médií a v průběhu kultivace byla také měřena viskozita a pH pro vyhodnocení produkce exopolymerů.

Klíčová slova: EPS, extracelulární polysacharidy, grampozitivní bakterie, produkce exopolymerů

ABSTRACT

My master thesis has focused on production of exopolymers formed by bacterial culture designated PR. Characterisation of PR bacterium, determination of its biochemical and growth properties have been the special part of the work. The conclusions have led to particular identification of PR culture. Second part of the research has aimed on production abilities of PR culture in liquid growth medium. The cultivation conditions, time of cultivation and composition of medium have been changed in order to maximize the yield of exopolymers. The cell growth has been determined by optical density of culture media and viscosity and pH of growth media were measured during the cultivation in order to evaluate the production of exopolymers.

Keywords: EPS, extracellular polysaccharides, gram-positive bacteria, production of exopolymers

Velice děkuji vedoucímu mé diplomové práce, doc. RNDr. Janu Růžičkovi Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, čas a podporu, které věnoval mé diplomové práci.

Mé poděkování patří také konzultantce mé diplomové práce, Ing. Evě Barošové, za příjemnou spolupráci a všestrannou pomoc.

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.

Ve Zlíně, 14.5.2009

.....
Bc. Lenka Keprdová

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA EXOPOLYSACHARIDŮ	12
1.1 STRUKTURA EXTRACELULÁRNÍCH POLYSACHARIDŮ.....	12
1.2 PRODUKCE A BIOSYNTÉZA EXOPOLYSACHARIDŮ.....	13
1.2.1 Mechanismus produkce homopolysacharidů	14
1.2.2 Mechanismus produkce a fáze biosyntézy heteropolysacharidů.....	14
1.3 MOLÁRNÍ HMOTNOST A CHARAKTER EXOPOLYSACHARIDŮ	15
1.4 FUNKCE EXOPOLYSACHARIDŮ V PŘIROZENÉM PROSTŘEDÍ.....	15
2 VYUŽITÍ A APLIKACE EXOPOLYSACHARIDŮ	17
2.1 POTRAVINÁŘSTVÍ, KOSMETIKA, FARMACIE	17
2.2 TECHNICKÝ PRŮMYSL, TĚŽBA.....	18
2.3 BIOREMEDIACE.....	18
2.4 VYUŽITÍ V ČISTÍRENSKÝCH TECHNOLOGIÍCH	19
3 NEJVÝZNAMĚJŠÍ DRUHY G+ BAKTERIÍ, TVOŘÍCÍ EXOPOLYSACHARIDY	21
3.1 MLÉČNÉ BAKTERIE	21
3.1.1 Příklady charakterizace některých exopolysacharidů mléčných bakterií	22
3.2 OSTATNÍ BAKTERIE.....	22
3.2.1 <i>Gordonia</i>	22
3.2.2 <i>Corynebacterium</i>	23
3.2.3 <i>Paenibacillus</i>	23
3.2.4 <i>Bacillus</i>	23
3.2.5 <i>Rhodococcus</i>	24
II METODICKÁ ČÁST	26
4 ŽIVNÁ MEDIA, ROZTOKY, CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE, POMŮCKY	27
4.1 ROZTOKY PRO PŘÍPRAVU ŽIVNÝCH MEDIÍ A ROZTOKY VYUŽITÉ PRO TESTY	27
4.1.1 Fyziologický roztok.....	27
4.1.2 Fosfátový pufr	27
4.1.3 Oxidačně fermentační medium (OF medium)	28
4.2 PEVNÉ ŽIVNÉ PŮDY.....	28
4.2.1 Tryptone yeast extract agar (TYA agar).....	28
4.2.2 VL agar.....	29
4.3 TEKUTÁ ŽIVNÁ MEDIA	30
4.3.1 Tryptone yeast medium se sacharosou (TYM + S).....	30
4.3.2 VL medium	31
4.3.3 Růst v mléce.....	32

4.4	PŘÍSTROJE	32
4.5	POMŮCKY.....	33
5	PRACOVNÍ POSTUPY	34
5.1	KULTURA PR.....	34
5.1.1	Konzervace kultury PR	34
5.2	KULTIVAČNÍ POKUSY.....	34
5.2.1	Příprava kultury PR k očkování	34
5.2.2	Kultivace na pevných živných půdách	35
5.2.3	Kultivace v tekutých médiích.....	35
5.3	GRAMOVO BARVENÍ	36
5.3.1	Měření délky a šířky buněk	36
5.3.2	Sporulační testy	36
5.4	BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI	36
5.4.1	Průmyslově vyráběné testy v mikrotitračních destičkách	37
5.4.2	Další testy	37
5.5	POSOUZENÍ TEKUTÝCH ŽIVNÝCH MEDIÍ Z HLEDISKA RŮSTU BAKTERIÍ A TVORBY EXOPOLYSACHARIDŮ	37
5.5.1	Měření absorbance	37
5.5.2	Měření pH	38
5.5.3	Měření viskozity.....	38
5.6	POSTUP ZÍSKÁVÁNÍ EXOPOLYSACHARIDU Z TEKUTÉHO KULTIVAČNÍHO MÉDIA.....	38
5.6.1	Centrifugace k odstranění buněk.....	38
5.6.2	Srážení exopolysacharidů.....	38
5.6.3	Centrifugace k získání polymeru a sušení.....	38
5.6.4	Přečištění exopolysacharidu	39
6	PROVEDENÍ JEDNOTLIVÝCH KULTIVAČNÍCH TESTŮ V TEKUTÝCH ŽIVNÝCH MÉDIÍCH.....	40
6.1	ZJIŠTĚNÍ OPTIMÁLNÍCH PODMÍNEK PRO ZÍSKÁNÍ EXOPOLYSACHARIDŮ	40
6.1.1	Určení optimální centrifugace k odstranění buněk.....	40
6.1.2	Porovnání rozpouštědel z hlediska srážení EPS.....	40
6.2	VÝBĚR VHODNĚ ŘEDĚNÉHO FOSFÁTOVÉHO PUFRU K PŘÍPRAVĚ TEKUTÝCH ŽIVNÝCH MEDIÍ.....	41
6.3	SROVNÁNÍ GLUKOSY A SACHAROSY Z HLEDISKA TVORBY EXOPOLYSACHARIDŮ V TEKUTÝCH ŽIVNÝCH MÉDIÍCH.....	42
6.4	RŮST KULTURY PR V MLÉCE	42
6.5	TEST KE ZJIŠTĚNÍ VYUŽITÍ DUSÍKATÉHO ZDROJE Z HLEDISKA TVORBY EXOPOLYSACHARIDŮ V TEKUTÉM ŽIVNÉM MÉDIU.....	43
6.6	RŮSTOVÝ TEST	43
6.6.1	Příprava živného media – Vitamíny.....	44
6.6.2	Příprava živného media – B-komplex	44
7	ZÁKLADNÍ ANALYTICKÉ STANOVENÍ HRUBĚ PŘEČIŠTĚNÉHO POLYSACHARIDU	45

7.1	STANOVENÍ SUŠINY A POPELA PŘEČIŠTĚNÉHO EXOPOLYSACHARIDU.....	45
7.1.1	Sušina	45
7.1.2	Popel.....	45
7.2	STANOVENÍ CELKOVÉHO A ORGANICKÉHO UHLÍKU.....	45
7.3	STANOVENÍ BÍLKOVIN	46
7.3.1	Příprava potřebných roztoků	46
7.3.2	Kalibrační křivka.....	46
7.4	STANOVENÍ SACHARIDŮ, FENOL – SULFÁTOVÁ METODA	47
III	DISKUZE A VÝSLEDKY	50
8	POKUSY VEDOUcí K ČÁSTEČNÉ IDENTIFIKACI KULTURY PR.....	51
8.1	KULTIVAČNÍ POKUSY NA PEVNÝCH ŽIVNÝCH PŮDÁCH.....	51
8.1.1	Test 1	51
8.1.2	Test 2	53
8.1.3	Test 3	55
8.2	GRAMOVO BARVENÍ	55
8.2.1	Sporulační testy	57
8.3	RŮST KULTURY PR V MLÉCE	58
8.4	BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI	58
8.5	SHRnutí VÝSLEDKŮ A ČÁSTEČNÁ IDENTIFIKACE KULTURY PR.....	60
9	POKUSY VEDOUcí K OPTIMALIZACI TEKUTÉHO ŽIVNÉHO MÉDIA Z HLEDISKA TVORBY EXOPOLYSACHARIDŮ	62
9.1	ZJIŠTĚNÍ OPTIMÁLNÍCH PODMÍNEK PRO ZÍSKÁNÍ EXOPOLYSACHARIDŮ	62
9.2	VÝBĚR VHODNĚ ŘEDĚNÉHO FOSFÁTOVÉHO PUFRU K PŘÍPRAVĚ TEKUTÝCH ŽIVNÝCH MEDIÍ	65
9.3	SROVNÁNÍ GLUKOSY A SACHAROSY Z HLEDISKA TVORBY EPS V TYM	70
9.4	TEST KE ZJIŠTĚNÍ VYUŽITÍ DUSÍKATÉHO ZDROJE Z HLEDISKA TVORBY EPS V TYM.....	74
9.5	RŮSTOVÝ TEST	80
9.6	SHRnutí VÝSLEDKŮ KULTIVAČNÍCH TESTŮ VEDOUcíCH K OPTIMALIZACI ŽIVNÉHO MÉDIA Z HLEDISKA TVORBY EXOPOLYSACHARIDŮ	84
10	ZÁKLADNÍ ANALYTICKÉ STANOVENÍ HRUBĚ PŘEČIŠTĚNÉHO POLYSACHARIDU.....	85
10.1	SUŠINA A POPEL EXOPOLYSACHARIDU	86
10.2	STANOVENÍ CELKOVÉHO A ORGANICKÉHO UHLÍKU.....	87
10.3	STANOVENÍ BÍLKOVIN	88
10.4	STANOVENÍ SACHARIDŮ	89
10.5	SHRnutí VÝSLEDKŮ ZÁKLADNÍHO ANALYTICKÉHO STANOVENÍ HRUBĚ PŘEČIŠTĚNÉHO POLYSACHARIDU	90
	ZÁVĚR	91

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	92
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	95
SEZNAM OBRÁZKŮ	96
SEZNAM TABULEK.....	97

ÚVOD

Mnohé bakteriální druhy mají schopnost produkovat polymery jako jsou polysacharidy, bílkoviny a další druhy polymerních sloučenin. Nejrozšířenější skupinou produkovaných exopolymerních sloučenin jsou u prokaryotických organismů právě extracelulární polysacharidy. Exopolysacharidy hrají velmi důležitou roli při bakteriálním růstu a ve strategiích buněk pro přežití v různých podmínkách, proto jsou tyto polysacharidy produkovány některými bakteriemi ve velkém množství.

Bakteriálním polymerům se v poslední době připisuje čím dál větší důležitost jako obnovitelnému zdroji polymerních sloučenin. Objeveno bylo velké množství polysacharidů, ale jen málo z nich se průmyslově vyrábí. Potíže pro průmyslovou výrobu může způsobovat patogenita bakterií, produkujících polysacharid, nebo velmi nákladná výroba. Přesto, mikrobiální polysacharidy mohou být využity v řadě různých odvětví, počínaje potravinářstvím, přes čistírenské technologie až po těžební průmysl. Proto se řada vědeckých týmů dnes zabývá hledáním nových mikrobiálních producentů těchto sloučenin s cílem poznání nepopsaných polymerních sloučenin nebo poznání průmyslově využitelné kultury.

Tato diplomová práce se zabývá bakteriální kulturou PR, která v předběžných testech vynikala vysokou produkcí bakteriálních polysacharidů. Aby kultura PR vytvářela polysacharidy, je potřeba dodat sacharosu, což je dostupná a levná surovina. Z těchto důvodů bylo velmi vhodné začít tuto kulturu blíže studovat, pokusit se o její identifikaci a v neposlední řadě optimalizovat živné médium z hlediska co nejvyšší produkce exopolysacharidů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA EXOPOLYSACHARIDŮ

Mnohé mikrobiální druhy mají schopnost extracelulárně produkovat polysacharidy nebo jiné typy polymerních sloučenin, jako bíkoviny, polyamidy či DNA. Tyto látky jsou souhrnně označovány jako extracelulární polymery (ECP). Nejrozšířenější skupinou ECP jsou u prokaryotických organismů extracelulární polysacharidy (EPS). Obecně buňky tvoří polysacharidy zásobní nebo strukturální. Takové polysacharidy plní v buňce řadu různých funkcí. Analýza struktury a reologických vlastností polysacharidů potvrdila, že existují velké rozdíly mezi jednotlivými polysacharidy. Toto platí i pro extracelulární exopolysacharidy, které jsou vylučovány ven z buňky. Extracelulární polysacharidy jsou produkovány různými druhy bakterií a řas, v menší míře je nalezneme také u kvasinek a hub. Mikrobiální exopolysacharidy mají široké průmyslové či potravinářské využití [1,2].

Mikrobiální extracelulární polysacharidy mohou být spojeny s povrchem buňky formou kapsulí nebo jsou vylučovány do extracelulárního prostoru ve formě slizu. Nazývají se proto kapsulárními nebo slizovými polysacharidy. Některé bakteriální druhy, které produkují kapsulární polysacharidy, mohou tytéž polysacharidy produkovat v podobě slizu na povrchu buňky nebo jako volné polysacharidy. Rozhodující faktor hraje napojení takového polysacharidu na stěnu buňky [2,3].

Exopolysacharidy hrají velmi důležitou roli při bakteriálním růstu a ve strategiích buňky pro přežití v různých podmínkách [3].

Některé bakterie produkují větší množství exopolysacharidů, a to i několik typů, jako je tomu u např. druhu *Paenibacillus jamilae*, který vytváří dva různé exopolysacharidy [4]. Jiné druhy bakterií mohou produkovat EPS i mnohem více. Druh *Rhodococcus sp.33* produkuje 33 různých extracelulárních polysacharidů [5]. Stejně exopolysacharidy, produkováné různými bakteriemi se zase mohou lišit v některých vlastnostech jako je rozvětvenost řetězce nebo procentuální obsah α vazeb [6].

1.1 Struktura extracelulárních polysacharidů

Bakteriální exopolysacharidy mají obvykle jednoduchou strukturu. Mohou to být buď homopolysacharidy, což jsou polymery obvykle složené z D-glukosy či D-fruktosy nebo heteropolysacharidy. Homopolysacharidy jsou již dlouhou dobu studovány zejména u mléčných bakterií [1].

Homopolysacharidy mléčných bakterií je možné rozdělit do 4 podskupin: [2]

- α – D – glukany (např. dextransy): Složeny hlavně z glukosových zbytků spojených vazbami α (1 – 6) nebo α (1 – 3) a výskyt různého stupně větvení řetězců.
- β – D – glukany: β (1-3) vazba spojená s β (1-2) a větvením.
- Fruktany (např. levan): Skládají se hlavně z D- fruktosových molekul spojených β (2-6) vazbami.
- ostatní (např. polygalaktan): Složeny ze strukturálně shodných jednotek s různými vazbami.

Bakteriální exopolysacharidy mohou být dle svého složení také zařazeny do skupiny heteropolysacharidů. Heteropolysacharidy jsou složeny z pravidelně se opakujících jednotek oligosacharidů. Tyto jednotky sahají velikostně od disacharidů po oktasacharidy. Opakující se jednotky jsou dále složeny ze 2 nebo více typů monosacharidů a mohou obsahovat další acylové skupiny jako dodatečný prvek v postranním řetězcích. Často nacházíme velké množství různých vazeb u těchto řetězců. K heteropolysacharidům se řadí např. gellan a xantan [1, 7].

1.2 Produkce a biosyntéza exopolysacharidů

Některé exopolysacharidy jsou syntetizovány během bakteriálního růstu, jiné během pozdějších fází buněčného vývoje. Produkce exopolysacharidů bývá obvykle zvýhodněná při nutriční nerovnováze živin (poměr C : N) a také je ovlivněna teplotou. Teplota by ve většině případů měla být nižší než je optimální pro kultivaci. Velkou roli může hrát také dostatečná aerace. Podmínky vhodné pro produkci exopolysacharidů však současně podporují tvorbu zásobních látek, jako je glykogen a PHB, což může být při průmyslové výrobě exopolysacharidů jistou nevýhodou [1].

Biosyntéza bakteriálních exopolysacharidů představuje velký komplex navazujících činností a reakcí, které zahrnují spolupráci množství genů a látek. Geny kódují enzymové a regulační bílkoviny, které jsou využívány pro syntézu exopolysacharidů. Syntéza všech exopolysacharidů je proces, který využívá nukleosid difosfátový sacharid [7].

Složitost takového systému dále podmiňují různé cesty syntézy. Příkladem může být syntéza exopolysacharidů u mléčných bakterií. U mezofilních druhů mléčných bakterií jsou geny

a bílkoviny plazmidového původu (př. *Lactococcus*), zatímco u termofilních druhů jsou geny a bílkoviny chromozomální (př. *Streptococcus* nebo *Lactobacillus*) [7].

Schopnost produkovat exopolysacharidy bývá nestálá, kolísavá. U mezofilních druhů mléčných bakterií souvisí nestálá povaha syntézy s geny pro syntézu EPS vázanými v plazmidech. Zatímco u termofilních druhů mléčných bakterií se předpokládá, že snížení produkce exopolysacharidů je dáno genetickou nestabilitou [7].

Úspěšné vytvoření exopolysacharidů závisí také na velkém množství tzv. pomocných enzymů. Tyto enzymy jsou nutné např. pro přípravu nukleotidů [7].

Mechanismy produkce homopolysacharidů či heteropolysacharidů se od sebe značně liší a jsou závislé na výsledném složení exopolysacharidů [8].

1.2.1 Mechanismus produkce homopolysacharidů

Produkce většiny homopolysacharidů je závislá na konkrétním substrátu, sacharose. V přítomnosti sacharosy jako substrátu a vysoce specifického enzymu – glykosyl transferasy dochází k tvorbě polysacharidů extracelulárně následovně. Sacharosa skládající se ze dvou monomerů, glukosy a fruktosy je enzymem štěpena vně buňky. Část vzniklých monomerů (fruktosa) je transportována do buňky a využita pro růst a energetické potřeby buňky. Část monomerů (glukosa) je využita k syntéze polysacharidů na povrchu buněk [8].

1.2.2 Mechanismus produkce a fáze biosyntézy heteropolysacharidů

Syntéza malé části homopolysacharidů a všech heteropolysacharidů probíhá uvnitř buňky, v cytoplazmě [8].

Biosyntéza se skládá ze 4 fází. První fáze souvisí s transportem jednoduchých sacharidů do cytoplazmy. Na něj navazuje syntéza sloučeniny sacharid – 1 – fosfát. Další fáze syntézy aktivuje a spojuje fosforylované sacharidy. Závěrečnou fází tvoří export vytvořeného EPS ven z buňky. Při vyvíjení strategie pro průmyslovou produkci exopolysacharidů musí být brány v úvahu všechny sekvence syntézy [7].

1.3 Molární hmotnost a charakter exopolysacharidů

Jak již bylo uvedeno, extracelulární polysacharidy jsou biopolymery mikrobiálního původu. Díky dlouhým řetězcům se obvykle špatně rozpouštějí ve vodě. Mezi jejich důležité vlastnosti, ceněné při aplikaci, patří mimo jiné emulgační schopnosti a stabilizace [2].

Polymery bývají obvykle směsí řetězců rozdílných délek a různého stupně polymerace. K určení polydisperzity řetězce je důležitý poměr M_w/M_n , kde M_w znamená průměrnou molární hmotnost a M_n průměrný počet řetězců. Čím vyšší je tento index, tím více je řetězec polydispergovaný. Pro průmyslovou produkci jsou běžné polymery s indexem rovným nebo vyšším 2 [9].

Ke zjištění molární hmotnosti polysacharidů je známo velké množství metod. Řadí se mezi ně různé druhy chromatografií, např. kapalinová, plynová a gelová permeační chromatografie [7].

Strukturní analýza kombinovaná se studii reologických vlastností ukazuje, že fyzikální charakter exopolysacharidů může být velmi různorodý. Polysacharid může být neutrální (např. EPS produkovaný *Lactobacillus delbruckii*) nebo polyelektrolyt (např. EPS produkovaný *Streptococcus thermophilus*) [10]. Z hlediska pH můžeme najít např. kyselé EPS (např. EPS produkovaný kulturou *Bacillus* CMG1403) [11]. Fyzikální vlastnosti a charakter závisí na chemickém složení, molární hmotnosti, struktuře, na kultivačních podmínkách a dokonce i na samotném druhu bakterie, která polysacharid syntetizuje [2].

Např. dextran produkovaný druhem *Weissella confusa* je více lineární než dextran vyprodukovaný bakterií *Leuconostoc mesenteroides*. *Weissella confusa* E392 vyprodukuje více dextransu než kultury *Leuconostoc citreum* E497 a *Leuconostoc mesenteroides* B512F. Dextran od *L. citreum* obsahuje okolo 11% α (1-2) vazeb a asi 3,5% α (1-3) vazeb, zatímco dextran od *W. confusa* je lineární jen s 2,7% α (1-3) vazeb [6].

1.4 Funkce exopolysacharidů v přirozeném prostředí

Z výzkumů vyplývá, že extracelulární polysacharidy v přirozeném prostředí hrají roli v ochraně mikrobiální buňky. Taková ochrana může být různorodá, např. ochrana před vysycháním nebo fagocytozou, před útokem virů, chrání buňku před antibiotiky nebo před toxickými látkami. EPS může též pomoci, pokud je buňka napadena protozoi a má úlohu i při udržování osmotického tlaku v buňce [2].

Příklad, kdy EPS tvoří ochrannou funkci můžeme nalézt u bakterie *Rhodococcus sp.33*. Tato bakterie produkuje velké množství extracelulárních polysacharidů, které pomáhají buňkám přežít počáteční šok z vysoké koncentrace benzenu. Tento druh tedy vykazuje vysokou toleranci k benzenu [5].

Mezi další důležité úlohy EPS patří tvorba biofilmu, který napomáhá přichycení buněk na nějaký pevný povrch, případně zvyšuje afinitu buňky k dané sloučenině. V případě patogenních bakterií, kam patří např. *Streptococcus pneumoniae* nebo *Streptococcus agalactiae*, slouží EPS i k imunitní reakci [2].

Většina bakterií, které produkují slizový EPS, nejsou schopny katabolizovat vlastní exopolysacharid. Z toho vyplývá, že extracelulární polysacharidy obvykle nemají zásobní funkci [2].

2 VYUŽITÍ A APLIKACE EXOPOLYSACHARIDŮ

Schopnost produkovat polysacharidy se u mikrobiálních druhů vyskytuje velmi často. Velké množství bakteriálních polysacharidů je potenciálně dostupné, ale není jednoduché je komerčně využívat. Jen malé množství polysacharidů lze průmyslově vyrábět. Jedním z důvodů jejich nevhodnosti může být patogenita bakterií, produkujících polysacharid a také možné vyšší výrobní náklady. V mnoha případech je velmi těžké udržet kvalitu a ručit za ni, případně zákaz výroby produktu státními orgány [1].

Přes všechny tyto problémy se některé exopolysacharidy už průmyslově vyrábí. Několik dalších bude pravděpodobně vyvinuto v průběhu několika let. Velký zájem o bakteriální polysacharidy je dán především tím, že se jedná o obnovitelný alternativní zdroj výrobků chemického průmyslu. Proto dnes existuje rozsáhlá a neustále obsáhlejší literatura o bakteriálních polysacharidech, kde najdeme informace od struktury jednotlivých EPS až po jejich možné průmyslové využití. Zdaleka ne všechny exopolysacharidy ale už byly prozkoumány. Je jich velké množství a lze předpokládat, že některé ještě nebyly objeveny [1].

Mikrobiální polysacharidy mohou být využity v řadě různých odvětví, počínaje potravinářstvím, přes čistírenské technologie až po těžební průmysl. Další možné využití je uvedeno v následujících podkapitolách.

2.1 Potravinářství, kosmetika, farmacie

Řada mikroorganismů využívaných v potravinářství produkuje exopolysacharidy, známé jsou hlavně mléčné bakterie, propionibakterie a bifidobakterie. Exopolysacharidy se vyskytují hlavně v jogurtech a fermentovaném mléku, ale můžeme je najít také v sýrech, fermentovaném masu a zelenině [2].

Mikrobiální polysacharidy jsou také cíleně přidávány do široké škály různých výrobků, protože mohou plnit funkci bioplniva. Pomáhají zvyšovat viskozitu, stabilitu, slouží jako emulgátory nebo k želírování. V potravinářství jsou velmi důležité hlavně exopolysacharidy vytvořené mléčnými bakteriemi. Tyto bakterie tvoří různé druhy EPS, které se liší ve složení, struktuře a velikosti [2]. Společnou ale mají jednu vlastnost – jedná se většinou o bezpečné přírodní produkty. I když některé druhy bakterií, patřících do skupiny mléčných bakterií, např. *Lactobacillus*, mohou být vyjímečně patogenní nebo podmíněně patogenní. Většina mléčných bakterií je ale považována za bezpečné organismy (GRAS, Generally

Recognized as Safe). Nejsou známe žádné zprávy o tom, že by některá z GRAS bakterií vyvolávala nějakou nemoc nebo vytvářela škodlivou sloučeninu [12].

V současné době patří exopolysacharidy tvořené mléčnými bakteriemi k velmi sledované skupině produktů. Hrají totiž důležitou roli v reologii, struktuře a jemnosti chuti kvašených mléčných výrobků. Např. jemná smetanová struktura je jeden z aspektů kvality jogurtu a jogurt tak může vykazovat zlepšení kvality i malým množstvím exopolysacharidu, který vyprodukuje jogurtové bakterie [2].

Exopolysacharidy, zvláště mléčných bakterií, mají vysoký potenciál pro využití a vývoj jako funkční potravinářské suroviny. Některé EPS jsou prospěšné pro lidské zdraví, byť jen tím, že mohou tvořit nestravitelnou součást jídla. Jiné mají protinádorové účinky, působí příznivě na imunitu nebo mají schopnost snižovat hladinu cholesterolu [2].

Ne všechny vlastnosti, které buňky získávají díky produkci polysacharidů, jsou však vždy pro lidi pozitivní: mohou bakteriím napomoci vyvolat onemocnění, díky ochraně např. před antibiotiky, kterou buňce EPS poskytují. Např. u bakterie *Rhodococcus equi* hrají exopolysacharidy velkou roli ve virulenci tohoto patogenu, který způsobuje koňskou pneumonii. Pět kapsulárních serotypů *R. equi* bylo charakterizováno a byla popsána zpráva o jejich virulenci. Dále následoval výzkum pro jejich využití v diagnostické serologii spojený s výzkumem vakcín [13].

2.2 Technický průmysl, těžba

Exopolysacharidy, produkované mikroorganismy, se v současné době objevují jako nové a průmyslově důležité zdroje polymerních materiálů. Možností jejich využití v průmyslu je velké množství. Exopolysacharidy se dají využít k suspendaci, stabilizaci, zahušťování, mohou působit jako emulgátory, lubrikanty. Některé EPS se mohou využít i v těžebním průmyslu, např. při těžbě ropy [3, 14].

2.3 Bioremediace

Mezi zajímavou vlastnost bakterií, produkujících exopolysacharidy, patří schopnost tvořit biologické bariéry v porézním vodním prostředí, např. v půdě. Tyto bakterie jsou schopné ucpat půdní kapiláry pro transport vody v půdě a omezit překážející tok vody nebo vodu

zastavit. Díky tomuto jsou schopné předejít kontaminaci podzemní vody. Tato technika se nazývá biologická bariéra nebo jen biobariéra [3].

Biobariéry, tvořené bakteriemi a vytvořeným sekretem exopolysacharidů, zacpou vodní tok a fyzikálně oddělí přiléhající plochy půdy. Tvoří tak ochranu proti postupu znečišťujících látek a klesá kontaminace prostředí. Biobariéry mohou být využity společně se stimulací bakterií k biodegradaci znečištění pomocí přídatku nutrientů nebo také přidáním specifických druhů bakterií, které jsou schopné rozložit špatně se rozkládající znečištění [3].

Exopolysacharidy hrají velkou roli v bakteriální biodegradaci nepolárních aromatických a alifatických složek. Např. *Rhodococcus* má rozsáhlé schopnosti katabolizovat širokou škálu organických látek, včetně polychlorovaných bifenyly (PCB) a také surové nafty. Díky těmto vlastnostem je tento rod vhodný k použití při bioremediacích kontaminovaných prostředí. Sliznaté druhy *Rhodococcus rhodochrous* rostou i ve velmi znečištěném prostředí, kde jiné odolné druhy růst nevykazují. Po přidavku exopolysacharidů vytvořených *R. rhodochrous* ale vykázaly tyto druhy obnovený růst [13].

V mořské vodě, zkontaminované ropnými látkami, má přídavek exopolysacharidů vytvořených kulturou *Rhodococcus rhodochrous* S-2, také velmi příznivý efekt. Po přidavku EPS se zastavila další emulgace ropných látek a zvětšila se degradace polyaromatických uhlovodíků původními druhy bakterií. To dokazuje, že exopolysacharidy hrají významnou roli nejen v životaschopnosti buněk ve velkém znečištění, ale pomáhají v biodegradaci špatně rozložitelných látek [13].

2.4 Využití v čistírenských technologiích

Anorganické flokulační činidla a organické polymery se často využívají v čistírenských technologiích, díky jejich příznivému poměru nízké ceny a silných flokulačních schopností. Některé ze syntetických flokulačních látek, které se používají, jsou však škodlivé pro člověka a prostředí a navíc nejsou ani biologicky rozložitelné. Proto je použití takových flokulantů relativně nebezpečné jako zdroj znečištění s nepříznivými účinky i na budoucí generace. Přírodně působící materiály, včetně chitosanu a želatiny, jsou bezpečné a biologicky rozložitelné, ale vykazují pouze slabé flokulační schopnosti [15].

Bioflokulant je druh biologicky rozložitelného makromolekulárního flokulantu, který tvoří mikroorganismy. Několik druhů bioflokulantů už bylo objeveno. Např. bílkovinný floku-

lant NOC1, který vytváří *Rhodococcus erythropolis* S1, má silné flokulační schopnosti pro anorganické i organické suspendované pevné látky. *Nocardia amarae* YK-1 také produkuje bílkovinný flokulant, FIX. Flokulant AI-201, vytvořený *Alcaligenes cupidus* KT201, se dá použít na kaolinovou suspenzi. F-J1 je efektivní flokulant pro suspenzi bentonitu [15].

Výše zmiňované bioflokulanty ale nemohou být prakticky použity v průmyslu pro jejich nízkou produktivitu a vysokou cenu. Předmětem výzkumu v současnosti i v dalších letech může být tedy nalezení nového bioflokulantu s vysokou flokulační schopností a dobrou produktivitou [15].

Z řady prací lze zmínit např. výzkum vědců He, Li, Chen a Lun z roku 2002 [15]. V průzkumu organismů, která tvoří flokulační činidla, byl z 51 druhů vybrán bioflokulant REA-11, produkováný bakterií *Corynebacterium glutamicum*. Zatím vykazuje velmi dobré vlastnosti při flokulaci roztoku kaolinového jílu a navíc má odbarvovací schopnost. Tyto vlastnosti si uchovává v širokém rozsahu pH, teploty a iontového prostředí. Výzkum bioflokulantů dále pokračuje [15].

3 NEJVÝZNAMĚJŠÍ DRUHY G+ BAKTERIÍ, TVOŘÍCÍ EXOPOLYSACHARIDY

Mezi nejvýznamnější druhy grampozitivních bakterií, které syntetizují exopolysacharidy patří hlavně bakterie mléčného kvašení. Významnou roli v produkci exopolysacharidů hrají i další druhy a rody bakterií, např. *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Rhodococcus* a další.

3.1 Mléčné bakterie

Exopolysacharidy mléčných bakterií mají výsadní postavení na trhu. Mléčných bakterií je velké množství a spousta z nich produkuje exopolysacharidy. Jsou využívány především v potravinářství. Jsou většinou klasifikovány jako bezpečné bakterie (GRAS), jak už bylo zmíněno dříve. Jejich využití je zejména ve výrobě kvašených mléčných výrobků, kde zlepšují viskozitu a strukturu. Některé mají navíc příznivé účinky na lidské zdraví [2,16].

Chemické složení, struktura a funkční vlastnosti exopolysacharidů mléčných bakterií závisí na druhu bakterie, kultivačních podmínkách a složení kultivačního media [12].

Jejich exopolysacharidy mohou být homopolysacharidy nebo heteropolysacharidy. Mezi homopolysacharidy se řadí dextran, který je tvořen *Leuconostoc mesenteroides* nebo *L. mesenteroides dextranicum*. Dále je znám alternan, který vytváří také *L. mesenteroides* a mutan, produkováný bakteriemi *Streptococcus mutans* a *Streptococcus sobrinus*. β – D – glukany jsou produkovány rody *Pediococcus* a *Streptococcus*. Fruktany jsou syntetizovány druhem *Streptococcus salivarius* [2].

Heteropolysacharidy produkují mezofilní a termofilní druhy mléčných bakterií. K mezofilním bakteriím patří *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus rhamnosus* a další. Ze známých termofilních bakterií jsou to *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrückii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* a *Streptococcus thermophilus* [2].

Většina polysacharidů, tvořena mléčnými bakteriemi, obsahuje kombinace obou α a β vazeb. a skládají se z různých variací sledového uspořádání monosacharidů [16].

Lactobacillus brevis G-77 a *Pediococcus damnosus* 2.6 produkují β – glukany, které vedou redukovat cholesterol v krvi a tím se stávají velmi prospěšné pro lidské zdraví. Kvašené výrobky, obsahující β – glukany, jsou vhodné dietní potraviny [16].

3.1.1 Příklady charakterizace některých exopolysacharidů mléčných bakterií

Extracelulární polysacharid, který je tvořen bakterií *Enterococcus durans*, zkoumali vědci Gu, Wu a Ma v roce 2004 [17]. Jedná se o druh mléčné bakterie, která byla izolována ze střevního traktu kohouta. Polysacharid byl vyčištěn pomocí gelové chromatografie a HPLC analýza ukázala, že se jedná o stejnorodý polysacharid bez obsahu nízkomolekulárních složek. Molární hmotnost byla stanovena metodou rozptylu světla na 42 000 Da. Složení stanovené metodou elementární analýzy ukázalo, že tento polysacharid se skládá z 41,08% uhlíku, 7,23% vodíku, bez obsahu dusíku, fosforu nebo síry. Struktura je založena na opakujících se pentasacharidových jednotkách, což bylo zjištěno pomocí NMR spektroskopie. Samotný monosacharid se skládá z glukosy a manosy v poměru 4 : 1 [17].

Mikroorganismus produkující exopolysacharidy byl izolován z dahi, tradičního indického nápoje z kvašeného mléka. Identifikován byl na základě morfologie a fyziologických a biochemických vlastností. Analýza ukázala na kulturu *Leuconostoc sp.* CFR 2181. Vyprodukovaný polysacharid byl amorfní a netvořil film. Byl rozpustný ve vodě a NaOH. Pročištěný polysacharid se skládal z 84% sacharidů, 11,2% redukcujících sacharidů, 2% vlhkosti, 0,8% bílkovin a 0,6% uronové kyseliny. Mezi sacharidy převládala z 91% glukosa a po 1,8% rhamnosa a arabinosa. Molární hmotnost polysacharidu byla stanovena gelovou permeační chromatografií v rozsahu mezi 10 000 Da a 1 500 000 Da. NMR analýza identifikovala přítomnost α (1-6) vazby [12].

3.2 Ostatní bakterie

Do skupiny ostatních bakterií řadím všechny druhy bakterií, které tvoří exopolysacharidy, ale nepatří do velké skupiny mléčných bakterií. V následujících kapitolách uvádím několik z mnoha příkladů bakterií, jenž tvoří významné exopolysacharidy.

3.2.1 *Gordonia*

Gordonia polyisoprenivorans byla izolovaná z podzemní vody, kontaminované průsakovými vodami ze skládky. Její buňky vykazují pozitivní test na katalázu, negativní na oxidázu a jsou nepohyblivé. Tento organismus roste v aerobním, ale také anaerobním prostředí v přítomnosti NaNO_3 . Byl identifikován pomocí srovnání 500 sekvencí 16S rDNA. Tato

bakterie produkuje největší množství exopolysacharidu na glukose. Bakterie syntetizuje exopolysacharid slizovitého charakteru nebo volný, v závislosti na růstové fázi kultury [3].

3.2.2 *Corynebacterium*

Druh, který syntetizuje velké množství bioflokulantu, byl izolován z půdy a identifikován jako *Corynebacterium glutamicum*. Bioflokulant dostal název REA-11. Byl srážen ze supernatantu kultury etanolem a čištěn iontově výměnnou a gelovou chromatografií. Chemickou a chromatografickou analýzou bylo zjištěno, že se jedná o nový druh bioflokulantu. Jeho chemické složení je postaveno na kyselině galakturonové, která má funkci stavební jednotky a dále obsahuje malé množství bílkovin. Molární hmotnost polysacharidu je okolo 100 000 Da. 80% flokulační aktivity bylo uvolněno do živného bujonu, zbývajících 20% zůstalo v buňkách [15].

3.2.3 *Paenibacillus*

Paenibacillus jamilae je druh izolovaný z kompostu obohaceného odpadní vodou pocházející z mletí oliv (OMWW). OMWW má podobné vlastnosti jako standardní kultivační medium pro produkci exopolysacharidů, hlavně vysoký poměr uhlíku a dusíku. Práce ukázala, že zemědělské odpady mohou být využity v průmyslové produkci exopolysacharidů. OMWW představuje vhodný a levný substrát, navíc jde o využití odpadu, což je také velmi prospěšné. Maximální produkce polysacharidu byla dosažena při obsahu 80% OMWW v kultivačním mediu. Gelová permeační chromatografie odhalila, že *Paenibacillus jamilae* produkuje 2 druhy exopolysacharidu. Molární hmotnost EPS I dosahovala okolo 500 kDa a u EPS II 2000 kDa. Biochemická analýza ukázala rozdílné vlastnosti těchto polysacharidů. Hlavní složky obou polysacharidů jsou glukosa, galaktosa a manosa. Oba typy EPS se liší v procentuálním obsahu sacharidů a navíc byly v EPS II detekovány malé frakce bílkovin [4].

3.2.4 *Bacillus*

Některé exopolysacharidy jsou produkovány bakteriemi tvořícími spory a patřící k druhům rodu *Bacillus* [4]. Jedná se o velmi širokou skupinu bakterií. Mezi nimi lze nalézt i kultury, které tvoří bioflokulační činidla, např. *Bacillus* CMG 1403 [11].

Biopolymerní flokulant, produkováný haloalkalofilní kulturou *Bacillus sp.* I-471 byl izolovaný ze vzorku mořské vody poblíž města Inchon v Korei. Bioflokulant byl produkováný v pozdější logaritmické fázi růstu. Chemická analýza ukázala, že se jedná o kyselý polysacharid, obsahující neutrální sacharidy, galaktosu, glukosu a fruktosu v poměru 5:2:1, a uronové kyseliny. NMR spektroskopii a FT-IR spektroskopii byla zkoumána struktura, ukázaly se karboxylové a hydroxylové skupiny, a zařadila tento polymer k heteroglykanům. Autoři soudí, že tento polymer může najít využití v bioremediacích a dalších odvětvích biotechnologického průmyslu [18].

Z půdní bakterie *Bacillus* CMG 1403 byl izolovaný vysokomolekulární, stejnorodý, bílý polymer. Jeho fyzikální a strukturní charakteristické vlastnosti byly studovány hlavními analytickými metodami. Skládá se z 85,85% z organických částí a z 12,78% vody. Tento polysacharid vykazoval flokulační vlastnosti v organických rozpouštědlech, jako je metanol, etanol, isopropanol a aceton a dále prokázal suspenzační a gelovací vlastnosti za míchání. Kvantitativně se skládá z 92,13% z hexosy jako neutrálních sacharidů a ze 7,86% z uronové kyseliny. Pomocí separace papírovou chromatografií bylo potvrzeno, že tento kyselý heteropolysacharid obsahuje glukuronovou kyselinu, galaktosu a manosu. Jeho molární hmotnost se pohybuje mezi 20 000 a 250 000 Da. Díky vysoké molární hmotnosti má schopnost absorbovat 435x víc vody, než je jeho suchá hmotnost. Má schopnost udržet víc než 40% absorbované vody při teplotě nad 60°C po dobu 20 dnů. Tento kyselý polysacharid je schopný biologického rozkladu a nevykazuje antimikrobní aktivity. Polysacharid má potenciál sloužit jako netoxický, biodegradabilní a environmentálně neškodný absorbent pro vodu a jako zahušřovadlo [11].

3.2.5 *Rhodococcus*

Rhodococcus je další bohatý rod mikroorganismů. Tyto mikroorganismy jsou známé produkcí extracelulárních polysacharidů obsahujících mastné kyseliny (FACEPS, Fatty acid-containing extracellular polysaccharides). Předchozí studie navrhovaly, aby FACEPS byly využity jako environmentálně neškodné produkty vhodné pro použití jako emulgátory, adsorbenty vlhkosti nebo zahušřovadla [19].

Zájem o extracelulární polysacharidy tvořené bakteriemi *Rhodococcus* je navíc posílen dvěma hlavními důvody. Za prvé, jejich exopolysacharidy mohou hrát důležitou roli ve virulenci a patogenitě některých druhů. Jak už bylo napsáno výše, jedná se např. o exopoly-

sacharid druhu *Rhodococcus equi*, který zvyšuje virulenci. Za druhé, exopolysacharidy tvořené bakteriemi *Rhodococcus*, jsou důležité při bakteriální degradaci nepolárních aromatických a alifatických složek. *Rhodococcus sp.* RHA1 vykazuje rozsáhlé metabolické aktivity směrem k široké skupině organických látek, mnohdy těžko rozložitelných. Tyto bakterie rozkládají polychlorované bifenyly, benzoan, fenylacetát, fenol, toluen, xylen, surovou naftu atd. To z nich dělá bakterie velmi vhodné k bioremediacím [13].

Jak již bylo uvedeno, *Rhodococcus* velmi často vytváří také víc než jeden druh exopolysacharidu. V případě *Rhodococcus sp.*33 je vytvářeno dokonce 33 různých druhů. Jeho exopolysacharidy mu pomáhají přežít nepříznivé prostředí, např. ve vysoké koncentraci benzenu. Exopolysacharidy tvořené tímto druhem se skládají z D-galaktosy, D-glukosy, D-manosy, D-glukuronové kyseliny a pyrohroznové kyseliny. Polysacharidy se skládají z tetrasacharidových opakujících se jednotek [5].

Rhodococcus erythropolis PR4, kultura mořské bakterie, produkuje také velké množství exopolysacharidů, mezi nimi najdeme exopolysacharid mucoidan. Jedná se o kyselý polysacharid slizovitého charakteru. Strukturální analýzou se ukázalo, že mucoidan se skládá z pentasacharidových opakujících se jednotek. Chemická analýza mucoidanu ukázala, že se skládá z glukosy, N-acetylglukosaminu, glukuronové kyseliny a fukosy, v poměru 2 : 1 : 1 : 1 [19].

II. METODICKÁ ČÁST

4 ŽIVNÁ MEDIA, ROZTOKY, CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE, POMŮCKY

Použité chemikálie a živná media byla dodána firmami Lachema (ČR), Penta (ČR), Fluka (Švýcarsko), Himedia (Indie), Imuna (Slovensko), a dalšími. Pokud není uvedeno jinak, chemikálie byly využity v čistotě p.a.

4.1 Roztoky pro přípravu živných medií a roztoky využitě pro testy

4.1.1 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok byl připraven z 8,5 g NaCl a 1000 ml destilované vody. Roztok byl sterilizován při teplotě 125°C po dobu 20 minut.

4.1.2 Fosfátový pufr

Fosfátový pufr je složen ze dvou roztoků. Roztok A se připraví navážením 9,0780 g KH_2PO_4 a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody. Pro přípravu roztoku B se naváží 23,9028g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a taktéž se rozpustí v 1000 ml destilované vody. V pokusech byl využit neředěný fosfátový pufr M/15 a také různě ředěné pufrы (viz. Tab. 1).

Tab.1: Využitě fosfátové pufrы a jejich příprava

Molarita	Ředění vůči M/15	Roztok A [ml]	Roztok B [ml]	Destilovaná voda [ml]
M/15	---	20	80	0
M/37,5	2,5x	8	32	60
M/75	5x	4	16	80
M/120	8x	2,5	10	87,5
M/150	10x	2	8	90

4.1.3 Oxidačně fermentační medium (OF medium)

Bylo připraveno rozpuštěním jednotlivých složek v destilované vodě a po přidání agaru byl roztok rozvařen ve vodní lázni. Po rozpuštění agaru bylo pH upraveno na hodnotu 7,2 – 7,4 tak, že barva OF media byla tmavě zelená. Dále bylo medium rozlito do zkumavek. Sterilizace byla provedena při 115°C po dobu 20 minut [20].

Složení:

- Pepton 0,2 g
- NaCl 0,5 g
- K₂HPO₄ 0,03 g
- Glukosa 1,0 g
- Bromthymolová modř 0,006 g
- Agar 0,3 g
- Destilovaná voda 100 ml

Pro OF test bylo využito standardní složení OF media. Pro další pokus bylo složení změněno vynecháním navážky glukosy a místo ní byla využita maltosa, navážka taktéž 1 g.

4.2 Pevné živné půdy

Pevné živné půdy byly naváženy podle návodu, případně byly obohaceny o další složky a dokonale rozpuštěné v odpovídajícím množství destilované vody dle návodu. Dále byly vysterilizovány při teplotě 125°C a 25 minut, pokud není uvedeno jinak. Po sterilizaci a dostatečném zchládnutí byly rozlity do sterilních Petriho misek v aseptickém boxu.

4.2.1 Tryptone yeast extract agar (TYA agar)

Základní složení této pevné živné půdy se skládá z 6 g/l tryptonu, 3 g/l kvasničného autolyzátu a 12 g/l agaru. Použitý TYA agar byl dodán firmou Himedia. Příprava spočívala v rozpuštění 21 g prášku v 1000 ml destilované vody. Tato živná půda byla dále modifikována přidáváním dalších živin tak, že k základu TYA agaru byly přidány alternativní zdroje uhlíku a energií.

Přehled využitých modifikací TYA agaru:

- TYA agar základ: 2,1 g TYA agaru, 100 ml destilované vody
- TYA agar s 2% sacharosy: přídavek 2 g sacharosy
- TYA agar s 2% glycerolu: přídavek 2 g glycerolu
- TYA agar s 1% mléčnanu sodného a 1% pyrohroznanu sodného (TYA + org. soli): přídavek 1g mléčnanu sodného a 1g pyrohroznanu sodného
- TYA agar s 2% maltosy: přídavek 2 g maltosy
- TYA agar s 2% galaktosy: přídavek 2 g galaktosy
- TYA agar s 2% rozpustného škrobu: přídavek 2 g rozpustného škrobu
- TYA agar s 2% fruktosy: přídavek 2 g fruktosy
- TYA agar s 2% manitolu: přídavek 2 g manitolu

4.2.2 VL agar

Je určený na kultivaci sporulujících a nesporulujících anaerobních mikroorganismů. Jedná se o bohatou pevnou živnou půdu, která poskytuje ideální podmínky pro růst velkého množství mikroorganismů. V pokusech byl využit VL agar od firmy Imuna. Skládá se z 10 g/l tryptonu, 5 g/l kvasničného autolyzátu, 2 g/l sušiny hovězího vývaru, 0,4 g/l L-cystein hydrochlorid, 5 g/l chloridu sodného, 2 g/l glukosy a 17,6 g/l agaru. Tento agar byl připraven suspendací 42 g prášku v 1000 ml destilované vody. Poté byl vysterilizován.

Tato živná půda byla pro testy růstu zkoumané kultury v různých podmínkách osmotického tlaku upravena zvýšením obsahu chloridu sodného a to následovně:

- VL agar se 4% NaCl: přídavek 3,5 g NaCl / 100 ml VL agaru
- VL agar se 6,5% NaCl: přídavek 6 g NaCl / 100 ml VL agaru
- VL agar se 10% NaCl: přídavek 9,5 g NaCl / 100 ml VL agaru
- VL agar se 15% NaCl: přídavek 14,5 g NaCl / 100 ml VL agaru

4.3 Tekutá živná media

Byla připravena navážením všech složek a rozpuštěním v odpovídajícím množství destilované vody nebo ve fosfátovém pufru různě naředěném. Poté byl pipetován potřebný objem připraveného media do kultivačních lahví. Tyto lahve byly vysterilizovány v autoklávu při 125°C po dobu 45 minut, pokud není uvedeno jinak. Živná media s využitím glukosy byly sterilizovány při nižší teplotě 115°C.

4.3.1 Tryptone yeast medium se sacharosou (TYM + S)

Základní složení tohoto tekutého živného media:

- Trypton 6 g
- Kvasničný autolyzát 3 g
- Sacharosa 100 g
- Destilovaná voda 1000 ml

V některých pokusech byla sacharosa nahrazena glukosou (100 g/l). 10% sacharosy v tekutých živných mediích bylo zjištěno jako nejvýhodnější dávkování pro tvorbu EPS [21].

Místo destilované vody byl pro některé pokusy využit různě ředěný fosfátový pufr, přehled pufrů je uveden v tabulce 1. Dále byla využita bohatší i chudší živná media zvýšením nebo snížením obsahu základních živin.

Přehled využitých modifikací TYM+S:

Tab.2: Složení živných medií pro test ke zjištění využití dusíkatého zdroje z hlediska tvorby EPS v TYM

Označení živných medií	Trypton [g]	Kvasničný autolyzát [g]	Sacharosa [g]	Fosfátový pufr M/150 [ml]
TYM+S	6	3	100	1000
TYMCH+S	4	2	100	1000
TYMT+S	9	3	100	1000
TYMK+S	6	6	100	1000

Složení dalších upravených TYM+S:

Základ složení následujících tekutých živných medií je trypton 6 g, sacharosa 100 g, fosfátový pufr 10x ředěný, M/150, 1000 ml. Dále byl k tomuto základu přidán kvasničný autolyzát (f. Imuna nebo f. Himedia) 3 g. Využit byl také kvasničný extrakt (f. Himedia) 3 g. Další tekuté živné medium bylo doplněno o vitaminový růstový suplement (f. Himedia), v množství odpovídajícím přidání 120 µg/l vitamínu B₁. K poslednímu živnému mediu byla přidána rozpuštěná tableta B-komplex (f. Zentiva), opět v množství odpovídajícím přídatku 120 µg/l vitamínu B₁.

Složení vitaminového růstového suplementu:

- Vitamin B₁ (120 µg/l), L-Glutamin (120 mg/l), adenin sulfát (12 mg/l), guanin hydrochlorid (360 µg/l), p-aminobenzoová kyselina (156 µg/l), L-cystin (13,2 mg/l), NAD (koenzym I) (30 mg/l), kokarboxylasa (1,2 mg/l), dusičnan železitý (240 µg/l), thiamin hydrochlorid (36 µg/l), cystein hydrochlorid (310,8 mg/l), dextrosa (2,4 mg/l), destilovaná voda

Složení B-komplexu:

- Vitaminy: B₁ (120 µg/l), B₂ (120 µg/l), B₅ (180 µg/l), B₆ (60 µg/l), PP (1,2 mg/l)
- Pomocné látky: monohydrát laktosy, kukuřičný škrob, želatina, stearan vápenatý, mastek, koloidní bezvodý oxid křemičitý, sacharosa, oxid titaničitý, sodná sůl karmelosy, tekutý parafín, čokoládová hněd' CH, zlatá hněd' CH, bílý a karnaubský vosk, lanolin

4.3.2 VL medium

V pokusu byla využita poloviční navážka, než je udáno výrobcem, f. Himedia. VL medium bylo připraveno navážením všech složek a rozpuštěním za studena v odpovídajícím množství fosfátového pufru (10x ředěný, M/150). Dále bylo přefiltrováno přes červený filtr k odstranění agaru a vysterilizováno.

Složení bylo následující:

- Trypton 5g
- NaCl 2,5g
- Masový extrakt 1g

- Kvasničný extrakt 2,5g
- Cystein hydrochlorid 0,2g

4.3.3 Růst v mléce

Jako tekuté živné medium bylo využito i mléko, nízkotučné a plnotučné, ošetřené UHT.

4.4 Přístroje

- Přístroj k počítání bakterií, Schütt count plus, Schütt labortechnik, Německo
- Mikroskop Olympus, model CX41RF, Filipíny
- Centrifuga MR23i, Jouan, Francie
- Box laminární BIO IIA, Telstar, Španělsko
- Biologický termostat BT 120, ČR
- Biologický inkubátor B15, Německo
- Temperovaný box 25°C, UTB, ČR
- Temperovaný box 5°C, UTB, ČR
- Předvážky KERN 440 – 47, Německo
- Analytické váhy KERN 770, Německo
- Ultratermostat MLW 2UC, Německo
- Vibrační viskozimetr SV10, AND, Japonsko
- Elektrická trouba MORA 524, ČR
- Míchačka elektromagnetická MM2A, ČR
- Laboratorní sterilizátor, SANoclav, Německo
- Centrifuga Rotanta 460 R, Hettich, Německo
- Hlubokomrazící box, Dairei, Dánsko
- Minitřepačka, Schoeller instruments, Brazílie
- Třepačka GFL 3020, ČR

- pH metr Inolab 730set, Německo
- pH elektroda SenTix 41, Inolab, Německo
- Spektrofotometr UV 540, Unicam, Anglie
- Kahan laboratorní malý, Gasprofi, Německo
- Spínací hodiny Dehl, Německo
- Analyzátor uhlíku Schimadzu 5000A
- Spektrofotometr Tecan, Sunrise, USA

4.5 Pomůcky

- Injekční stříkačky sterilní, Braun, Německo
- Sterilní zkumavky, Gama group, ČR
- Petriho misky sterilní, Gama group, ČR
- Laboratorní sklo SIMAX, ČR
- Stříkačkové filtry millipore MCE, Millex GS, Irsko
- Automatické pipety Transferpette, Brand, Německo
- Automatické pipety Discovery, PZ HTL, Polsko
- Laboratorní kličky, UTB, ČR
- Anaerostat 2,5l objem, Merck, Německo
- Reagent pro vytvoření anaerobní atmosféry, Anaerocult „A“, Merck, Německo
- Mikrotitrační destička, Gama, ČR

5 PRACOVNÍ POSTUPY

5.1 Kultura PR

Na čistírně odpadních vod ve firmě Hamé Babice a.s. se objevila flotující silná vrstva biomasy. Jednalo se o vrstvu flotujícího kalu. Aktivovaný kal měl výrazné tendence viskosního bytnění, které poukazuje na nadměrnou tvorbu exopolysacharidů. Toto viskosní bytnění způsobuje obtíže, ale také může být zdrojem kultur s produkcí exopolysacharidů. Kultura PR byla izolovaná z tohoto aktivovaného kalu Barošovou v rámci probíhající disertační práce [21].

5.1.1 Konzervace kultury PR

Kultura PR je uchovávána při -80°C v hluboko mrazícím boxu. Konzervace kultury byla provedena následovně:

Nejdříve se na analytických vahách zvažila sterilní ependorfka a sterilně se do ní vpravila nasbíraná biomasa čisté kultury. Naplněná ependorfka se znovu zvažila. Poté bylo přidáno 15 hmotnostních procent glycerolu, který se promíchal s biomasou. Takto připravená ependorfka byla uložena v mrazícím boxu.

Takto uchovaná kultura byla dále využívána pro předkultivaci před jednotlivými testy, v případě, že bylo potřeba naočkovat misky s agarem k dalším kultivačním pokusům a nebyla k dispozici jiná nezamražená kultura.

5.2 Kultivační pokusy

5.2.1 Příprava kultury PR k očkování

Kultura PR byla očkovaná dvěma způsoby. Na pevné živné půdy byla kultura PR očkována buď přímo vyočkováním jedné kolonie nebo ze suspenze, v obou případech křížovým rozetěrem. Tekutá živná media byla očkována objemově v poměru 1 : 1000 (např. na 20 ml živného media bylo očkováno 20 μl suspenze), není-li uvedeno jinak. K udržení aseptického prostředí se využíval laminární box.

Suspenze kultury PR se připravovala podle 2. stupně McFarlandovy stupnice. Ten byl připraven smícháním 9,8 ml 1% H_2SO_4 s 200 μl 1% vodného roztoku BaCl_2 . Takto nachysta-

ný zakalený roztok sraženiny BaSO₄ sloužil jako vzor intenzity zakalení připravované suspenze kultury.

Nejdříve bylo třeba naočkovat křížovým roztěrem misky s VL agarem, které se kultivovaly cca 4 dny dopředu. Narostlá biomasa byla rozmíchána v potřebném množství sterilního fyziologického roztoku, dokud intenzita zakalení neodpovídala připravenému vzoru.

5.2.2 Kultivace na pevných živných půdách

Kultura PR byla kultivována v různých teplotních podmínkách, 5°C, laboratorní teplota, 25°C, 30°C, 37°C a 58°C. Z hlediska zjištění kyslíkových potřeb byla kultivace prováděna aerobně, anaerobně i mikroaerofilně. Kultivace byly prováděny v temnu.

Mikroaerofilní kultivace byla provedena pomocí exikátoru a svíčky. Naočkované misky společně se svíčkou byly umístěny do exikátoru, svíčka byla zapálena a exikátor uzavřen. Svíčka spálila většinu vzduchu a pak sama zhasla.

Podmínky pro anaerobní kultivaci byly zajištěny v anaerostatu. Do něj se vložily naočkované misky. Poté byl připraven reagent pro vytvoření anaerobní atmosféry, Anaerocult „A“. Příprava spočívala v rovnoměrném zalití Anaerocultu 35 ml destilované vody. Anaerocult byl ihned poté vložen do anaerostatu a ten byl následně neprodyšně uzavřen.

Při kultivacích byl sledován růst, charakter kolonií (mukózní, nemukózní) a intenzita růstu na různých agarech a živinách.

5.2.3 Kultivace v tekutých mediích

Pro zjištění optimálních podmínek produkce exopolysacharidu kulturou PR byla využívána tekutá živná media. Kultura PR byla v lahvích kultivována v temnu v temperovaném boxu při 25°C na třepačce. Rychlost třepání bylo nastaveno na 105 otáček za minutu. Při kultivaci byla střídána doba klidu a třepání, což bylo zajištěno využitím spínacích hodin (15 minut stání, 15 minut třepání).

Také v tekutých živných mediích byly sledovány různé kyslíkové podmínky. Rozdílné kyslíkové podmínky byly zajištěny různým naplněním lahví živným médiem. Např. láhev pro anaerobní kultivaci byla naplněna celá, 100 ml láhev s poměrem vzdušné a kapalně fáze 4 : 1 byla naplněna 20 ml živného media.

Při kultivacích v tekutých mediích byly vždy nachystány i slepé vzorky. Jejich příprava i inkubační podmínky přesně odpovídaly podmínkám pro vzorky, ale slepé vzorky nebyly naočkovány suspenzí kultury PR.

5.3 Gramovo barvení

Fixovaná kultura na podložním sklíčku byla nejdříve převrstvena roztokem krystalové violeti, která působila asi 60 vteřin. Bez oplachování byla barva slita a převrstvila se Lugolovým roztokem. Opět se ponechala působit 60 vteřin. Roztok byl slit, opatrně opláchnut destilovanou vodou a odbarven v šikmé poloze etanolem, dokud odtékalo barvivo (ne déle než 20 až 25 vteřin). Preparát byl dokonale opláchnut destilovanou vodou a dobarven zředěným karbolfuchsinem po dobu 60 vteřin. Nakonec byl preparát důkladně opláchnut destilovanou vodou a usušil se [22].

5.3.1 Měření délky a šířky buněk

Pomocí počítačového programu QUICK PHOTO PRO 2.0 (Olympus) byla změřena přibližná délka a šířka buněk barveného preparátu.

5.3.2 Sporulační testy

Test na sporulující bakterie byl proveden 2 způsoby. První způsob bylo pozorování staré kultury nabarvené Gramovým barvením mikroskopem. Další způsob byl teplotní test. Z kultury starší alespoň 10 dnů byla rozmíchána suspenze buněk, která byla na vodní lázni zahřáta na 80°C po dobu 11 minut. Takto upravená suspenze buněk se vyočkovala na VL agar a nechala se inkubovat mikroaerofilně a aerobně.

5.4 Biochemické vlastnosti

Pro pomoc při identifikaci kultury byly provedeny následující biochemické testy. Jednalo se o průmyslově vyráběné testy dodané firmou Lachema, pokud není uvedeno jinak. Výsledky těchto testů byly využity v počítačovém programu TNW verze 6,5 (verze z roku 2006) za účelem identifikace kultury.

5.4.1 Průmyslově vyráběné testy v mikrotitračních destičkách

Pro zjištění biochemických vlastností kultury PR byly využity průmyslově vyráběné testy v mikrotitračních destičkách, Enterotest 24, Streptotest 16 a Staphytest 16. Enterotest 24 je určen pro gramnegativní druhy bakterií, proto pokud vyšly různé výsledky ve 2 testech, byl dán větší důraz na výsledky testů Streptotest 16 a Staphytest 16. Tyto testy jsou určené pro grampozitivní bakterie. Návod k použití u průmyslově vyráběných testů je přiložen od výrobce.

5.4.2 Další testy

Kromě výše uvedených testů v mikrotitračních destičkách byly využity ještě další jednotlivé testy. Opět byly dodány firmou Lachema. Jednalo se o Oxi test, test na tvorbu katalázy a také VP test na tvorbu acetoinu.

Mimo průmyslově vyráběných testů byl ještě proveden OF test. Tento test udává, zda je bakterie schopná aerobně nebo anaerobně využívat glukosu (nebo jiný sacharid). Pozitivní výsledek se prokáže zežloutnutím původně tmavě zeleného OF media.

5.5 Posouzení tekutých živných medií z hlediska růstu bakterií a tvorby exopolysacharidů

Změny v průběhu kultivace tekutých živných medií byly sledovány 4 různými způsoby a to měřením absorbance, pH a viskozity tekutého živného media a občasně stanovením exopolysacharidů vážkově. Měření probíhalo podle časových možností téměř každý den a kultivační testy trvaly 10 – 15 dnů. Dny pro vážkové stanovení byly určeny pro každý kultivační test zvlášť.

5.5.1 Měření absorbance

Z hlediska posouzení růstu bakterií v tekutém živném mediu byla zvolena hodnota OD_{600} , což je absorbance při vlnové délce 600 nm. Čím více bakterie v živném mediu rostou, tím je vyšší zakalení roztoku a vyšší absorbance. Absorbance byla měřena proti slepému vzorku, což je vzorek nenaočkovaného sterilního tekutého živného media. Pro měření absorbance byl využit spektrofotometr UV 540.

5.5.2 Měření pH

pH tekutých živných medií bylo měřeno na pH metru 730set od firmy Inolab s měřicí elektrodou SenTix 41.

5.5.3 Měření viskozity

Viskozita tekutých živných medií byla měřena na vibračním viskozimetru SV 10. Při prvním měření na tomto přístroji byla provedena dvoubodová kalibrace pomocí destilované vody a 65% roztoku sacharosu o známé viskozitě. Poté před každým měřením byla provedena zkrácená kalibrace pomocí destilované vody. Viskozita byla měřena při $25^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ a zapsána až po ustálení hodnot. Měření proběhlo pro každý vzorek 3x vedle sebe.

5.6 Postup získávání exopolysacharidu z tekutého kultivačního média

Zvolený postup získávání polysacharidu má 3 základní kroky. Patří mezi ně centrifugace k odstranění buněk, srážení exopolysacharidů a centrifugace k získání exopolysacharidu [23].

5.6.1 Centrifugace k odstranění buněk

K odstředování vzorků za účelem odstranění buněk byla využita centrifuga od firmy Jouan. Vzorky byly rozděleny do kyvet a vyváženy na předvážkách. Rozdíl hmotnosti jednotlivých kyvet pro tuto centrifugu může činit maximálně 2 g. Po vyvážení byly kyvety centrifugovány při 20 000 g po dobu 30 minut. Teplota byla nastavená na 25°C .

5.6.2 Srážení exopolysacharidů

Slitý supernatant po centrifugaci byl srážen vychlazeným rozpouštědlem (aceton, v poměru 5 dílů acetonu na 1 díl supernatantu). Supernatant byl přidáván k rozpouštědлу za neustálého míchání na míchačce. Poté byla kádinka překryta polyethylenovou folií a nechala se v lednici do dalšího dne.

5.6.3 Centrifugace k získání polymeru a sušení

Obsah kádinky byl převeden do kyvet, vyvážen a centrifugoval se na centrifuze Rotanta 460R při 4600 g po dobu 15 minut při nastavené teplotě 10°C . Usazený polymer byl sušen

nejdříve v digestoři až do vyprchání acetonu. Poté se dále vysušoval v exikátoru nad P_2O_5 . Vzhledem ke ztrátám, které byly způsobeny velkou viskozitou vzorků po kultivaci (vzorky zůstávaly nalepené na lahvích, kyvetách) jsme tyto získané polymery vážili pouze na předvážkách.

5.6.4 Přechištění exopolysacharidu

Exopolysacharid byl rozpuštěn ve stejném objemu destilované vody, jaký byl původní objem živného media, odkud byl izolován (50 ml). Poté byl znovu vysrážen, zcentrifugován a sušen dle postupu, který je uveden výše.

6 PROVEDENÍ JEDNOTLIVÝCH KULTIVAČNÍCH TESTŮ V TEKUTÝCH ŽIVNÝCH MÉDIÍCH

6.1 Zjištění optimálních podmínek pro získání exopolysacharidů

Byly připraveny lahve o objemu 250 ml a 100 ml, které se naplnily TYM se sacharosou (TYM+S) v následujících poměrech:

- 6 lahví po 50 ml TYM+S v 250 ml lahvích – poměr 4 díly vzduchu k 1 dílu TYM+S
- 2 lahve po 50 ml TYM+S v 100 ml lahvích – poměr 1 díl vzduchu k 1 dílu TYM+S
- 2 lahve po 100 ml TYM+S v 100 ml lahvích – bez vzduchu

Tyto lahve se vysterilizovaly a naočkovaly suspenzí kultury PR dle 2. stupně McFarlandovy stupnice v množství 100 μ l na láhev. Kultivace trvala 7 dnů, při střídavém třepání a klidu v 25°C a v temnu. Po kultivaci následovalo ověření míry centrifugace, výběr vhodného srážedla a posouzení produkce EPS v různých kyslíkových podmínkách.

Nejdříve byla změřena viskozita ve všech lahvích s buňkami. Poté byly slity a smíchány vzorky z 6 lahví (4:1). Následně byl směsný vzorek rozdělen opět na 3 díly. Ty byly centrifugovány při 10 000, 15 000 a 20 000 g 30 minut při 25°C. V získaných supernatantech byla znovu změřena viskozita.

6.1.1 Určení optimální centrifugace k odstranění buněk

Buňky byly promyty resuspendací v roztoku fosfátového pufru a následovala nová centrifugace při stejných podmínkách jaké jsou uvedeny výše. Tento postup byl proveden 3x po sobě. Po poslední centrifugaci byly promyté buňky resuspendovány v definovaném objemu 10 ml a stanovila se sušina buněk. Poté byla určena nejlepší intenzita centrifugace k odstranění buněk.

6.1.2 Porovnání rozpouštědel z hlediska srážení EPS

Supernatanty po opětovném změření viskozity byly znovu smíchány dohromady a následně opět rozděleny na 6 homogenních vzorků. Tyto vzorky byly sráženy pomocí 3 vychlazených rozpouštědel, acetonu, etanolu a izopropanolu. Rozpouštědla byla přidávána

v objemovém poměru 3 : 1 a 5 : 1 (3 nebo 5 dílů rozpouštědla na jeden díl supernatantu). Kádinky s roztokem supernatantu, srážedla a sraženého exopolysacharidu byly ponechány přes noc v lednici a poté se cetrifugovaly (viz. kap. 5.6.3).

6.2 Výběr vhodně ředěného fosfátového pufru k přípravě tekutých živných medií

Láhve o objemu 100 ml byly připraveny v dostatečném počtu na 11 dnů kultivace a 2 paralelní měření každého vzorku. Láhve byly naplněny 20 ml tekutého živného media se sacharosou a vysterilizovány. Poté byly naočkovány 20 μ l suspenze kultury PR. Kultivace probíhala 11 dnů na třepačce, kdy se střídala doba klidu a třepání. V průběhu kultivace probíhalo téměř každý den měření absorbance, viskozity a pH v lahvích. Ke každé živné půdě byly nachystány i slepé vzorky pro kontrolu čistoty. Funkci slepých vzorků plnila nenačkovaná média.

Obsah testovaných lahví:

Základní složení TYM+S se liší v jednotlivých živných médiích pouze využitím destilované vody nebo různě ředěných fosfátových pufrů, jak vyplývá z následující tabulky.

Tab.3: Složení tekutých živných medií využitých v tomto testu

Označení živných půd	Základní složky	Proměnná složka, 1000 ml
M/15	Trypton 6 g/l Kvasničný autolyzát 3 g/l Sacharosa 100 g/l	Fosfátový pufr neředěný, M/15
M/37,5		Fosfátový pufr ředěný 2,5x, M/37,5
M/75		Fosfátový pufr ředěný 5x, M/75
M/120		Fosfátový pufr ředěný 8x, M/120
M/150		Fosfátový pufr ředěný 10x, M/150
Voda		Destilovaná voda

6.3 Srovnání glukosy a sacharosy z hlediska tvorby exopolysacharidů v tekutých živných médiích

V tomto pokusu byla sledována 2 tekutá živná media. Základ živných médií byl TYM a jednou byla jako cukr přidána sacharosa 100 g/l a do druhého živného media byla místo sacharosy přidána glukosa, taktéž 100 g/l. Místo destilované vody byl použit fosfátový pufr, 10x ředěný, M/150.

Pro pokus byly připraveny láhve o objemu 100 ml v dostatečném počtu na 16 dnů kultivace a 2 paralelní měření. Láhve byly naplněny 20 ml živného media. Od každého media byly nachystány i slepé vzorky. Po sterilizaci byly vzorky naočkovány a uloženy v kultivační místnosti. V průběhu kultivace byla měřena absorbance, pH a viskozita vzorků.

U tohoto pokusu proběhlo i stanovení vázkové, kdy byly v průběhu kultivace postupně získávány exopolysacharidy. Exopolysacharidy byly získány 4., 7., 10. a 15. den kultivace ve 3 paralelních stanoveních. Na to byly připraveny jiné láhve, o objemu 250 ml. Tyto láhve byly naplněny 50 ml živného media a naočkovány 50 μ l suspenze kultury PR. Kultivace proběhla stejně jako u živných médií na měření.

6.4 Růst kultury PR v mléce

Bylo použito nízkotučné mléko Benefit (0,5% tuku) a plnotučné mléko Tatra (3,5% tuku). Oba výrobky byly od výrobce upraveny UHT ohřevem, tedy sterilní.

Láhve o objemu 100 ml byly prázdné vysterilizovány při 125°C po dobu 35 minut. Poté byly sterilně naplněny mlékem v poměru 1:4, 1:1 a 1:0 v aseptickém boxu. Tyto láhve byly naočkovány objemově, 20 ml mléka bylo naočkováno 20 μ l, 50 ml mléka bylo naočkováno 50 μ l a 100 ml mléka bylo naočkováno 100 μ l suspenze kultury PR. Vzorky byly připraveny ve 2 paralelních pokusech. Od každého druhu mléka byly nachystány i slepé vzorky. Tyto láhve byly kultivovány 7 dnů v teplotě 25°C a v teplotě 45°C, v klidu a temnu. Každý den proběhlo jen mírné protřepání vzorků.

V průběhu kultivace bylo sledováno srážení mléka. Na konci kultivace byla změřena viskozita a pH vzorků.

6.5 Test ke zjištění využití dusíkatého zdroje z hlediska tvorby exopolysacharidů v tekutém živném médiu

V tomto pokusu byly sledovány 4 živné media, přesné složení je uvedeno v kapitole 4.3.1, tabulka 2. Tento pokus se skládal jednak z měření vzorků a jednak z izolace EPS.

Pro měření vzorků byly připraveny láhve o objemu 100 ml, naplněny 20 ml živného media a vysterilizovány. Poté byly asepticky naočkovány 20 μ l suspenze kultury PR, kromě slepých vzorků. Kultivace trvala 15 dnů. V těchto lahvích probíhalo téměř každý den měření absorbance, pH a viskozity.

O den později byly nachystány láhve o objemu 250 ml pro získání EPS. Pro každé živné medium 6 lahví, které jsou potřebné pro 2 stanovení ve třech paralelních měřeních. První získání proběhlo z každého živného media jindy. Čas získání byl určený na den, kdy vzorky na měření viskozity budou druhý den po sobě vykazovat obdobné hodnoty. Druhé získání proběhlo u všech vzorků stejně a to 15. den kultivace.

6.6 Růstový test

V tomto pokusu bylo využito 6 různých tekutých živných medií. Základ všech tvořil trypton 6 g/l a sacharosa 100 g/l. K přípravě živných medií byl využit fosfátový pufr, 10x ředěný, M150, 1000ml. Toto základní složení živných medií bylo doplněno viz. přehled níže.

Názvy živných medií a doplnění složení:

- **KA Imuna:** kvasničný autolyzát (f.Imuna) 3 g/l
- **KA Himedia:** kvasničný autolyzát (f. Himedia) 3 g/l
- **Kvas. extrakt.:** kvasničný extrakt (f. Himedia) 3 g/l
- **Vitamíny:** vitaminový růstový suplement (f. Himedia), přidáný v množství odpovídajícím přidání 120 μ g vitamínu B₁
- **B-komplex:** rozpuštěná tableta B-komplex, přidána v množství odpovídajícím přidání 120 μ g vitamínu B₁

Další tekuté živné medium bylo **VL medium**, do něj nebyl přidán žádný trypton, jen sacharosa 100 g/l. Postup přípravy a složení je v kap. 4.3.2.

Po přípravě a sterilizaci všech živných medií byly naočkovány 20 μ l suspenze PR, kromě slepých vzorků. Kultivace trvala 11 dnů. V průběhu inkubace probíhalo měření vzorků absorbance, pH a viskozity.

6.6.1 Příprava živného media – Vitamíny

Nejdříve bylo připraveno živné medium skládající se z 3 g tryptonu, 50 g sacharosy a 480 ml fosfátového pufru. Po smíchání bylo pipetováno do lahví 19,2 ml tohoto roztoku a poté proběhla sterilizace. Mezitím byl přichystán vitamínový růstový suplement podle návodu. Složení vitaminového růstového supplementu je v kapitole 4.3.1. Ten byl sterilní od výrobce. Poté byly doplněny vysterilizované láhve 0,8 ml vitaminového růstového supplementu. Nakonec tedy v každé láhvi bylo potřebných 20 ml.

6.6.2 Příprava živného media – B-komplex

Nejdříve byla rozdrcena a rozemleta 1 tableta B-komplexu. Poté byla rozpuštěna v 1000 ml fosfátového pufru, 10x ředěném, M/150. Tak byl získán zásobní roztok o koncentraci 200 μ g/l B₁. Následně bylo smícháno 600 ml zásobního roztoku se 400 ml fosfátového pufru. Tak byl připraven pracovní roztok o koncentraci 120 μ g/l B₁. 300 ml tohoto pracovního roztoku bylo vysterilizováno filtrací přes stříkačkový membránový filtr, millipore MCE.

Mezitím byl připraven živný roztok složený z 3 g tryptonu, 50 g sacharosy a 200 ml fosfátového pufru 10x ředěného, M/150. Tento roztok byl vysterilizován společně s prázdnými 100 ml lahvemi. Po sterilizaci byl smíchán živný roztok se sterilním pracovním roztokem. Tak bylo získáno potřebné sterilní živné medium, které bylo asepticky pipetováno do sterilních lahví v laminárním boxu.

7 ZÁKLADNÍ ANALYTICKÉ STANOVENÍ HRUBĚ PŘEČIŠTĚNÉHO POLYSACHARIDU

Zahrnují kvantitativní stanovení exopolysacharidu. V současné době probíhá jeho detailnější analýza na externím pracovišti zahrnující kvalitativní stanovení.

7.1 Stanovení sušiny a popela přečištěného exopolysacharidu

Před samotným stanovením byly kelímky vyžihány při 550°C po dobu 2 hodin. Po zchládnutí v exikátoru byly zváženy na analytických vahách. Stanovení bylo provedeno pro každý vzorek 3x vedle sebe.

7.1.1 Sušina

5 ml roztoku přečištěného a znovu rozpuštěného exopolysacharidu bylo napipetováno do vyžiháných kelímků. Kelímky byly sušeny nejdříve při 70°C a po odpaření veškeré tekutiny byla teplota zvýšena na 105°C. Při této teplotě byly vzorky sušeny 3 hodiny – do konstatní hmotnosti. Poté byly kelímky ponechány na 2 hodiny v exikátoru ke zchládnutí. Pak byly opět zváženy na analytických vahách.

Stejný postup byl využit i ke stanovení sušiny buněk v pokusu v kapitole 6.1.

7.1.2 Popel

Po zvážení kelímků na sušinu se tytéž využily i na stanovení popela v sušině. Kelímky byly žihány v peci s teplotou 550°C na 2 hodiny. Po vyžihání byly opět kelímky umístěny do exikátoru na 2 hodiny a nechaly se vychladnout. Následně byly znovu zváženy na analytických vahách.

7.2 Stanovení celkového a organického uhlíku

Stanovení celkového a organického uhlíku bylo provedeno na analyzátoru uhlíku Schimadzu 5000A. Princip stanovení je následující.

Vhodně naředěný vzorek je zplyněn při 680°C na platinové destičce, která působí jako katalyzátor. Vzniklý CO₂ je změřen na nedisperzním IČ detektoru.

7.3 Stanovení bílkovin

Metoda spočívá v redukci kationtu Cu^{2+} v silně alkalickém prostředí v přítomnosti bílkovin. Princip tohoto stanovení spočívá v tvorbě barevného komplexu mezi vzniklým Cu^+ a bicincholinovou kyselinou (BCA). Intenzita fialového zabarvení barevného komplexu závisí na koncentraci bílkovin v roztoku. Metoda je velmi citlivá [23, 24].

7.3.1 Příprava potřebných roztoků

Reagent A: 8 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 1,6 g vinanu sodného bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. pH se upravilo na 11,25 pomocí 10 M NaOH

Reagent B: 0,4 g BCA bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody

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

Pracovní činidlo: 1 díl reagentu C byl smíchán s 25 díly reagentu B a poté bylo přidáno 26 dílů reagentu A

Zásobní roztok standardu: 1 g albuminu byl rozpuštěn v 1000 ml destilované vody

7.3.2 Kalibrační křivka

Ke kalibraci byl využit roztok albuminu o různých koncentracích v rozsahu 0 až 80 mg/l. Vzorky o stejné koncentraci byly pipetovány 3x vedle sebe. Kalibrace byla provedena v rámci diplomové práce [25].

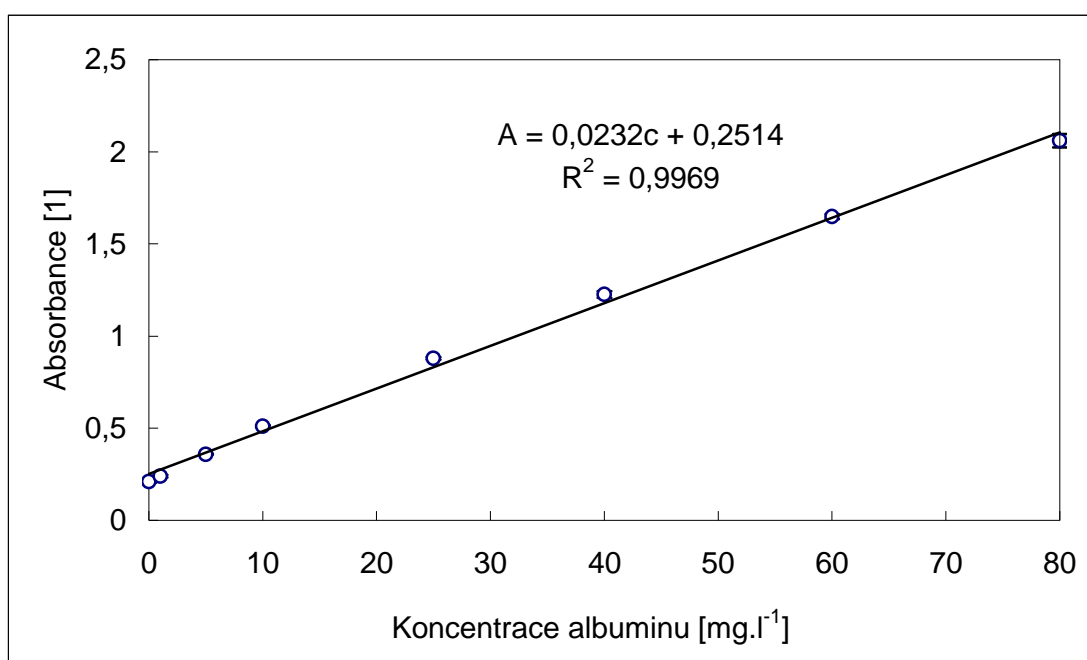
Vzorky nebo standardy o známé koncentraci byly pipetovány do zkumavek, 0,7 ml. Poté bylo připraveno pracovní činidlo. Hned poté bylo pipetováno 0,7ml pracovního činidla do zkumavek. Takto připravené vzorky se daly inkubovat do 60°C po dobu 60 minut. Dále byly vzorky zchlazeny. Absorbance byla změřena při 562 nm. Vzorky i standardy byly měřeny ve 3 paralelních měřeních. Výpočet koncentrace vzorků byl proveden dosazením absorbance vzorků do získané rovnice kalibrační křivky.

Tab.4: Příprava kalibračních roztoků

Standard [ml]	0	0,1	0,5	1	2,5	4	6	8
Dest. voda[ml]	100	99,9	99,5	99	97,5	96	94	92
C [mg/l]	0	1	5	10	25	40	60	80

Tab.5: Absorbance v závislosti na koncentraci albuminu v roztoku standardů [25]

Koncentrace [mg/l]	A ₁ [1]	A ₂ [1]	A ₃ [1]	Průměr absorbance [1]	±
0	0,204	0,231	0,198	0,211	0,017
1	0,224	0,257	0,238	0,240	0,017
5	0,363	0,365	0,349	0,359	0,009
10	0,512	0,495	0,526	0,511	0,016
25	0,879	0,861	0,897	0,879	0,018
40	1,278	1,212	1,185	1,225	0,049
60	1,631	1,689	1,623	1,648	0,036
80	2,035	1,983	2,163	2,060	0,093



Obr.1: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci albuminu[25]

7.4 Stanovení sacharidů, fenol – sulfátová metoda

Pomocí fenol – sulfátové metody se stanovují kvantitativně polysacharidy, oligosacharidy, monosacharidy a jejich metylové deriváty. Princip spočívá v hydrolýze glykosidických va-

zeb koncentrovanou kyselinou sírovou. Fenol reaguje s monosacharidovými zbytky za vzniku žlutooranžového zbarvení. Intenzita zbarvení odpovídá koncentraci sacharidů v roztoku. Tato metoda se provádí v mikrotitračních destičkách [23, 26, 27].

Nejdříve byla změřena absorbance prázdné destičky s víkem na spektrofotometru Tecan při vlnové délce 490 nm. Poté byly dávkovány jednotlivé složky do jamek. Do jamky byl nejdříve pipetován vzorek o objemu 30 μl , poté bylo přidáno 30 μl 5% fenolu. Následně byla jamka doplněna 150 μl koncentrované 98% kyseliny sírové. Obsah jamky byl důkladně promíchán pětinasobným opakovaným nasáváním a vysáváním obsahu jamky do špičky mikrodávkače a zpět. Takto připravená destička se vzorky se nechala stát 60 minut v laboratorní teplotě přikrytá víkem. Poté byla změřena absorbance. Vzorky byly dávkovány ve 4 paralelních měřeních [23, 26].

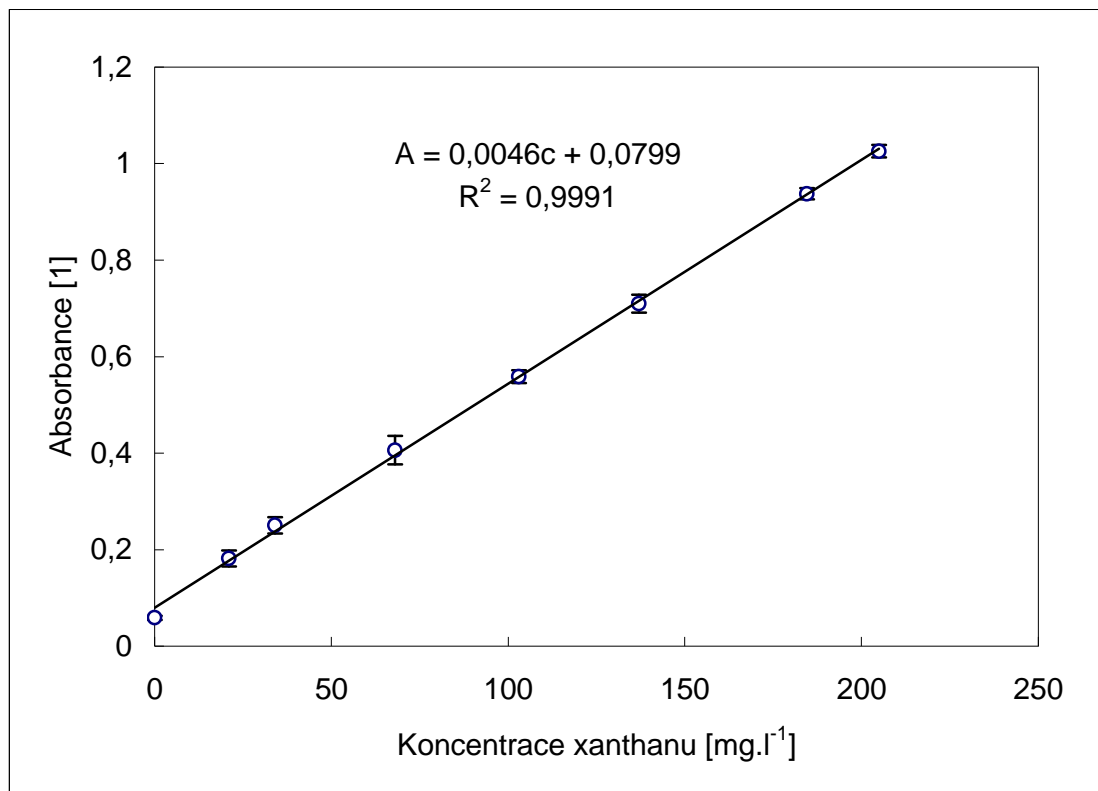
Kalibrační křivka byla měřena obdobně. Nejdříve se připravil zásobní roztok xanthanu rozpuštěním 20,5 mg xanthanu ve 100 ml destilované vody. Zásobní roztok byl pipetován 3x vedle sebe do mikrotitrační destičky a poté doplněn na 30 μl destilovanou vodou, viz. Tab.6) [23].

Tab.6: Příprava standardních roztoků xanthanu v mikrotitrační destičce

Standard [μl]	0	3	5	10	15	20	27	30
Dest. voda [μl]	30	27	25	20	15	10	3	0
C [mg/l]	0	21	34	68	103	137	184,5	205

Tab.7: Absorbance v závislosti na koncentraci standardních roztoků xanthanu

Koncentrace [mg/l]	A ₁ [1]	A ₂ [1]	A ₃ [1]	Průměr absorbance [1]	±
0	0,069	0,061	0,047	0,059	0,011
21	0,229	0,170	0,146	0,182	0,043
34	0,201	0,276	0,274	0,250	0,043
68	0,319	0,453	0,446	0,406	0,075
103	0,598	0,535	0,543	0,559	0,034
137	0,671	0,695	0,764	0,710	0,048
184,5	0,903	0,952	0,957	0,937	0,030
205	1,048	0,988	1,041	1,026	0,033



Obr.2: Kalibrační závislost absorpce na koncentraci xanthanu

III. DISKUZE A VÝSLEDKY

8 POKUSY VEDOUcí K ČÁSTEČNÉ IDENTIFIKACI KULTURY PR

Jak již bylo psáno výše, kultura PR byla izolovaná z aktivovaného kalu, který jevil známky viskozního bytnění. Z aktivovaného kalu bylo vyizolováno více bakteriálních kultur, kultura PR však při předběžných testech růstu na pevných živných půdách vynikala v produkci polysacharidů (což bylo pozorováno jako silně mukozní charakter kolonií). Kultura PR navíc produkovala velké množství polysacharidů v přítomnosti levného substrátu, sacharosy [21].

Proto bylo velmi vhodné začít tuto kulturu zkoumat a pokusit se ji identifikovat. Následně další část diplomové práce navazuje na výsledky z podzimní části práce a je zaměřena na produkční schopnosti kultury PR.

8.1 Kultivační pokusy na pevných živných půdách

8.1.1 Test 1

První úkol bylo zjistit, na jakých agarech a v jakých podmínkách kultura PR roste. Kultura PR byla naočkována na 5 druhů živných agarů a kultivována v různých teplotních a kyslíkových podmínkách. Jednalo se o TYA agar, TYA agar se sacharosou, TYA agar s glycerolem, TYA agar s mléčnanem sodným a pyrohroznem sodným (TYA + org.soli) a VL agar. V průběhu kultivace byla sledována intenzita a charakter růstu (mukozní, nemukozní). Výsledky kultivačního testu jsou v tabulce 8.

Tab.8: Výsledky kultivačního testu 1

	Aerobní růst					Mikroaerofilní růst	Anaerobní růst
	5°C	Lab. teplota	30°C	37°C	58°C	Lab. teplota	Lab. teplota
TYA	+-	+	+	+-	-	+-	+-
TYA + 2% glycerolu	+-	+	+	+-	-	+-	+-
TYA+ 2% sacharosy	±	+++	++	++	-	++++	++++
TYA+org.soli	-	+	+	+-	-	+	+-
VL agar	/	++	/	/	/	+++	+++

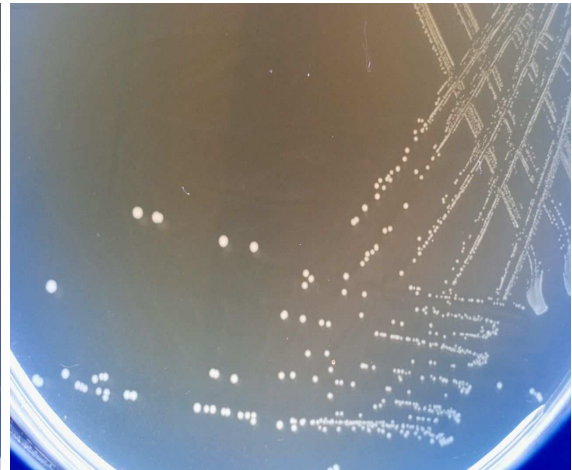
Vysvětlivky: -.....kultura neroste
+-.....zanedbatelný růst, bez mukozních kolonií
+.....kultura roste, ale netvoří mukozní kolonie. Vyšší počet + značí intenzivnější růst
++.....růst společně s tvorbou mukozních kolonií, intenzita odpovídá počtu +
/nebylo provedeno

Z tabulky je patrné, že z hlediska tvorby pouzder (mukozních kolonií) je podle výsledků nejvýhodnější laboratorní teplota. V prostředí s nižším obsahem kyslíku (mikroaerofilní či anaerobní kultivace) kultura tvoří více polysacharidu. Nejvyšší tvorba polysacharidů na pevných živných půdách je v anaerobních podmínkách.

Z hlediska růstu kultury PR bez tvorby polysacharidů je optimální VL agar při mikroaerofilních nebo anaerobních podmínkách při laboratorní teplotě. Kultura také vykazuje výrazný růst na TYA se 2% sacharosou při teplotě 37°C. Tyto závěry potvrzují i následující obrázky, kde je vidět růst kultury PR na TYA agaru, VL agaru a TYA agaru se sacharosou při laboratorní teplotě a v podmínkách mikroaerofilní kultivace. Růst na TYA je výrazně slabší než na VL agaru. Na TYA se sacharosou je patrný výrazný mukozní charakter kolonií.



Obr.3: TYA agar



Obr.4: VL agar



Obr.5: TYA agar se 2% sacharosy

8.1.2 Test 2

Zajímalo nás, zda je kultura PR schopná rozkládat i jiné cukry na polysacharidy. Dříve bylo ověřeno, že glukosa jako substrát v tomto směru vyhovuje. PR roste i na glukose a tvoří z ní polysacharidy, ale méně výrazně jako na sacharose [21].

Nejdříve byly připraveny živné půdy, TYA se 2% maltosy, TYA se 2% galaktosy, TYA se 2% rozpustného škrobu, TYA se 2% fruktosy a TYA se 2% manitolu. Naočkované živné půdy se kultivovaly při laboratorní teplotě aerobně a mikroaerofilně. Odečet byl po 4 a 8 dnech kultivace. První odečet růstu je zvolen na 4. den z toho důvodu, že kultura roste velmi pomalu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9.

Tab.9: Výsledky kultivačního testu 2

	Aerobní růst		Mikroaerofilní růst	
	4. den	8. den	4. den	8. den
TYA + 2% maltosy	+++	+++	+++	++++
TYA + 2% galaktosy	+++	+++	+++	++++
TYA + 2% rozp. škrobu	++	++	++	++
TYA + 2% fruktosy	+	+	+	+
TYA + 2% manitolu	+	+	+	+

Vysvětlivky: +.....kultura roste slabě, bez tvorby mukozních kolonií

++.....střední růst, bez tvorby mukozních kolonií

+++.....silný růst, bez tvorby mukozních kolonií

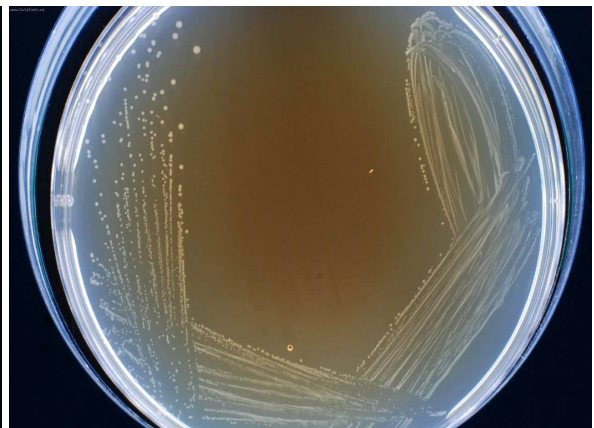
++++.....velmi silný růst, bez tvorby mukozních kolonií

Z tabulky 9 jsou patrné následující výsledky. Při využití jiných cukrů jako substrátu kultura PR dobře roste, avšak bez tvorby polysacharidů. Nejlépe kultura roste opět mikroaerofilně a to na TYA + 2% maltosy nebo na TYA + 2% galaktosy.

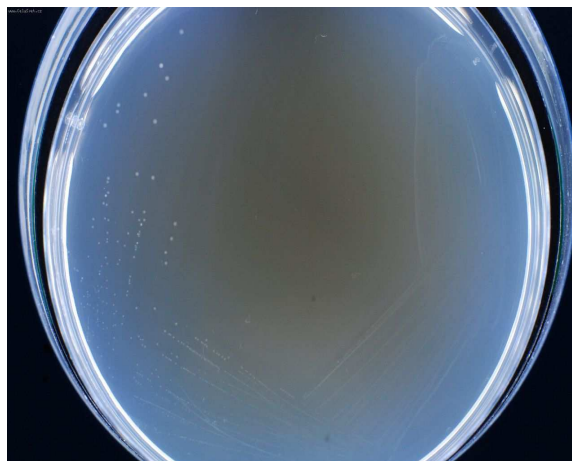
Obrázky 6 až 8 demonstrují porovnání růstu kultury na VL agaru, TYA agaru a TYA agaru se 2% maltosy.



Obr.6: TYA agar + 2% maltosy



Obr.7: VL agar



Obr.8: TYA agar

Na fotkách je vidět, jak rozdílně roste kultura PR na různých substrátech. Na obyčejném TYA agaru je růst velmi nevýrazný, kultura roste velmi pomalu. Růst kultury na VL agaru i na TYA agaru se 2% maltosy je velmi silný. Také potřebná biomasa se vytvoří rychleji.

Růst na VL agaru je o něco výraznější, než na TYA s maltosou. Další výhodou VL agaru je rychlejší příprava a menší spotřeba surovin. VL agar byl proto použit ve všech následujících

cích pokusech, když bylo potřeba nakultivovat co nejvíc biomasy, např. pro výrobu suspenze buněk na očkování, nebo pro konzervaci kultury PR.

8.1.3 Test 3

Tento růstový test byl zaměřen na toleranci kultury PR k různému osmotickému tlaku. Pro tento test byly nachystány VL agary s různou koncentrací NaCl. Přichystané misky byly kultivovány aerobně, mikroaerofilně a anaerobně při laboratorní teplotě. Odečet byl proveden 6. den kultivace.

Tab.10: Výsledky růstového testu 3

	Aerobní růst	Mikroaerofilní růst	Anaerobní růst
VL, 0,5% NaCl	++	+++	+++
VL, 4% NaCl	+	+	+
VL, 6,5% NaCl	-	-	-
VL, 10% NaCl	-	-	-
VL, 15% NaCl	-	-	-

Vysvětlivky: -.....kultura neroste

+.....slabý růst

++.....středně silný růst

+++.....silný růst

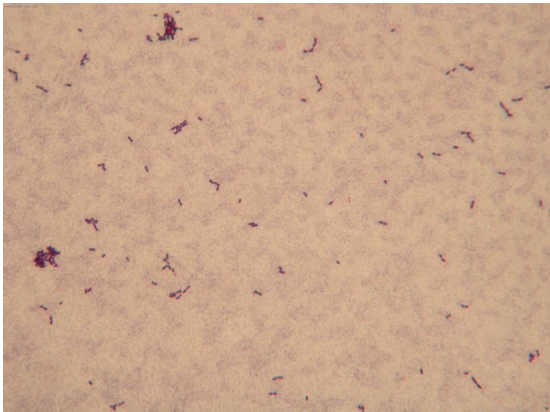
Z výsledků je patrné, že kultura není příliš tolerantní ke změnám osmotického tlaku a nejvíce jí vyhovuje klasický VL agar, jen s 0,5% obsahem NaCl. Kultura rostla slabě i při 4% obsahu NaCl, s vyšší koncentrací soli byl růst negativní.

8.2 Gramovo barvení

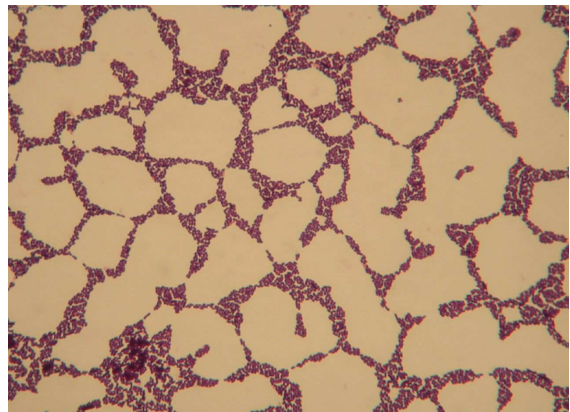
Z hlediska identifikace kultury jsou velmi důležité výsledky Gramova barvení. Na pozorování byly barveny kultury kultivované na VL agaru při aerobních a anaerobních podmínkách a také mukozní kultura na agaru TYA se sacharosou, kultivovaná aerobně. Výsledky barvení jsou vidět na obrázcích 9, 10 a 11 a v tabulce 11.

V souvislosti s Gramovým barvením byly provedeny ještě další testy. Pomocí počítačového programu QUICK PHOTO PRO 2.0 (Olympus) byla změřena přibližná délka a šířka buněk barveného preparátu. V tomto případě byl měřen preparát kultivovaný na TYA se sacharóou, protože v tomto případě buňky netvořily husté shluky a v preparátu se vyskytovaly i samostatné buňky. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 12.

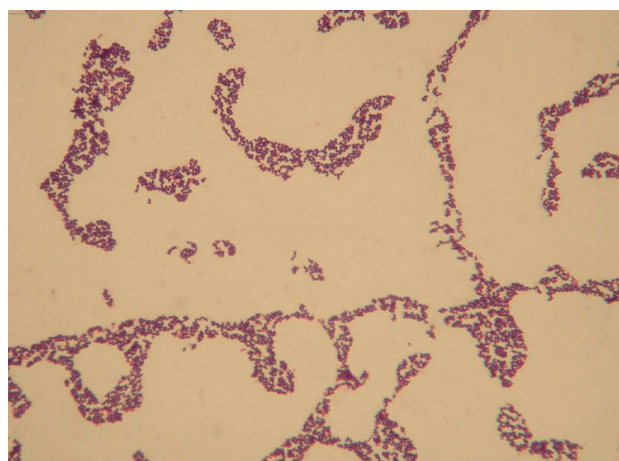
Poslední test, který byl proveden společně s Gramovým barvením, se týkal sporulace bakterií. Tento test byl velmi důležitý, protože z jeho výsledků se dalo určit nebo vyloučit velké množství bakteriálních druhů, mezi které mohla kultura PR patřit.



Obr.9: TYA se 2% sacharósy



Obr.10: VL agar, aerobní růst



Obr.11: VL agar, anaerobní růst

Tab.11: Výsledky Gramova barvení

	Pozorování
VL agar, aerobní růst	Jedná se o Gram pozitivní tyčinky, mají zakulacené konce. Některé buňky jsou delší. Shlukují se k sobě ve velkém množství, občasně vytvářejí řetízky.
VL agar, anaerobní růst	Jsou vidět jen malé rozdíly mezi anaerobním a aerobním růstem. G+ tyčinky se zakulacenými konci. Také tvoří shluky, ale méně husté než u aerobního růstu. Častěji tvoří řetízky.
TYA + 2% sacharosu	Jedná se o G+ tyčinky. Buňky tvoří řetízky a malé shluky. Polysacharid je také částečně nabarven.

Tab.12: Měření buněk barvených Gramovým barvením

	Počet měření	Nejvyšší hodnota [μm]	Nejnižší hodnota [μm]	Střední hodnota [μm]	\pm
Délka	31	1,29	0,55	0,82	0,12
Šířka	31	0,44	0,20	0,33	0,06

8.2.1 Sporulační testy

Tyto testy mohou vyloučit nebo potvrdit příbuznost kultury PR s velkým rodem *Bacillus* nebo dalšími bakteriemi, které vytvářejí spory.

Test na sporulující bakterie byl proveden 2 způsoby. První způsob provedení tohoto testu spočíval v barvení staré kultury Gramem. Kultura byla kultivována na VL agaru 14 dnů a poté mikroskopicky zhodnocena, jestli netvoří spory. Tento test vyšel negativní, žádné spory nebyly pod mikroskopem vidět.

Druhý způsob provedení patří mezi kultivační pokusy. Nejdříve byla rozmíchána suspenze buněk, které se kultivovaly 14 dnů. Zkumavky pak byly zahřáty na 80°C na vodní lázni 11 minut. Poté byly tyto suspenze buněk vyočkovány na VL agar a nechaly se inkubovat aerobně a mikroaerofilně. Také tento test vyšel negativní, což potvrdilo správnost prvního

sporulačního testu a vyloučilo příbuznost kultury PR s rodem *Bacillus* nebo jinými sporujícími bakteriemi.

8.3 Růst kultury PR v mléce

Některé druhy bakterií rodu *Lactobacillus* mají schopnost během několika hodin srážet mléko při 45°C. Proto úkolem tohoto růstového testu v mléku bylo zjistit, zda kultura PR sráží nebo zahušťuje mléko v různých teplotních (25 a 45°C) a kyslíkových podmínkách. Tento test byl hodnocen průběžně vizuálně a na konci kultivace bylo změřeno pH a viskozita.

V průběhu testu se nepotvrdila schopnost srážet mléko ani při 25°C ani při 45°C u žádného kyslíkového poměru. Kultura PR mléko (nízkotučné i plnotučné) také nezahušťovala, nebo jen velmi mírně. Viskozita mléka po 7 denní kultivaci dosáhla zanedbatelných hodnot kolem 1,50 mPa.s. Naměřené pH bylo mírně nižší v mléce kultivovaném při teplotě 25°C a dosáhlo hodnot kolem 6 (pH slepého vzorku v této teplotě bylo 6,6). pH měřené v mléku kultivovaném při 45°C se nelišilo od slepého vzorku. Z toho lze usoudit, že kultura PR v mléce při 45°C pravděpodobně téměř neroste. Růst kultury PR v mléce při 25°C je prokázán snížením pH, avšak k zahušťování ani srážení mléka nedošlo.

8.4 Biochemické vlastnosti

Pro pomoc při identifikaci kultury PR bylo velmi důležité zjistit její základní biochemické vlastnosti. K tomu byly využity hlavně průmyslově vyráběné testy v mikrotitračních destičkách Enterotest 24, Streptotest 16 a Staphytest 16 a další jednotlivé testy jako je Oxi test, test na tvorbu katalasy nebo acetoinu. K biochemickým testům patří také OF test.

Výsledky těchto biochemických testů se daly využít v počítačové databázi bakteriálních druhů, program TNW verze 6.5. Tento program je dělaný pro výsledky z testů mikrotitračních destiček, podle zadaných výsledků může pomoci určit jakému bakteriálnímu druhu se daná kultura nejvíce podobá.

Tab.13: Výsledky biochemických testů

	Pozitivní výsledky	Negativní výsledky
Enzymy	Leucin aminopeptidasa (LAP) α -galaktozidasa (aGA) β -galaktozidasa (ONP)	Lysin (LYS), ureasa (URE), β -glukuronidasa (GLR), fosfatasa (PHS), arginin (ARG), fenylalanin (PHE), ornitin (ORN), esku- lin (ESL)
Sacharidy	Sacharosa (SUC), xylosa (XYL), maltosa (MLT), manosa (MAS), glukosa (GLU), galaktosa (GAL), rhamnosa (RHA), melibiosa (MLB), rafinosa (RAF), cellobi- osa (CEL)	Inulin (INU) ribosa (RIB) laktosa (LAC) trehalosa (TRE)
Metaboly	Acetoin	Simons citrát (SCI), inositol (INO), malonát (MAL), sirovo- dík(H ₂ S), nitráty (NIT), in- dol(IND)
Ostatní	Glukosa/novobiocin (GLN)	Dulcitol (DUL), sorbitol(SOR), manitol (MAN), adonitol (ADO)
Další testy	VP test na acetoin	Oxi test – cytochrom oxidasa, OF test, test na katalasu

Pozitivní vyšel test na leucin aminopeptidasu, ten patří mezi enzymy. Dále má pozitivní výsledek u enzymů α -galaktozidasa a β -galaktozidasa, což jsou enzymy štěpící laktosu. Samostatný test na rozklad laktosy ale vyšel negativně.

Kultura PR má také enzymy na rozklad velkého množství sacharidů, jak je vidět v tabulce. Při těchto rozkladech se snižuje pH. Toto by měl potvrdit i OF test, který však vyšel negativní (s glukosou i maltosou). V další kapitole je ale pH měřeno a v průběhu kultivace klesá (viz např. Obr.13). Proto se dá předpokládat, že kultura PR má schopnost okyselovat živné

medium, produkuje kyselinu z glukosy i sacharosy, ale jen v podmínkách bohatšího živného media, než je OF medium.

Z metabolitů vyšel pozitivní test jen na tvorbu acetoinu. Ten byl ale potvrzen 2 testy, jedním samostatným a jeden test byl součástí testu v mikrotitrační destičce. Poslední pozitivní výsledek se týká kombinovaného testu, rozklad glukosy v přítomnosti antibiotik. Kultura PR je proti Novobiocinu rezistentní.

Tyto výsledky byly využity v programu TNW 6.5. Podle dosažených výsledků ze Streptotestu nenašel program žádnou podobnost. Kultura PR tedy s největší pravděpodobností není zástupcem rodu *Streptococcus*.

Při dosažení všech výsledků byla nalezena částečná podobnost u druhu *Corynebacterium glucuronolyticum* (47,74%). Coryneformní bakterie jsou nepravidelné G+ tyčinky, nemají rovnoběžné strany. Tyto bakterie mohou produkovat exopolysacharidy, proto by mezi ně mohla kultura PR patřit [28]. Program ale tuto domněnku nepotvrdil, navíc rod *Corynebacterium* vytváří katalasu, která u kultury PR vyšla negativní. Program rovněž nenalezl významnější shodu s rodem *Leuconostoc*. Pravděpodobně se tedy jedná o méně známou bakterii.

8.5 Shrnutí výsledků a částečná identifikace kultury PR

Jelikož patří kultura PR do grampozitivních bakterií, může náležet k jednomu ze dvou nejvýznamějších kmenů, *Actinobacteria* a *Firmicutes*. Tyto 2 kmene se od sebe liší v zastoupení guaninu a cytozinu v DNA. *Actinobacteria* má zastoupení těchto bází vyšší než 50%, *Firmicutes* nižší. Test na zastoupení těchto bází v DNA ale nelze v podmínkách mikrobiologické laboratoře UTB provést [28].

Po prozkoumání nejběžnějších rodů kmene *Actinobacteria* bylo zjištěno, že tyto rody neodpovídají zjištěným biochemickým vlastnostem kultury PR. Nejpodobnější skupinou z tohoto kmene se jevila čeleď *Bifidobacteriaceae*, kde je jediný rod *Bifidobacterium*. Tyto bakterie ale mají příliš odlišný tvar, proto byla tato možnost identifikace zavržena [28].

Velký bakteriální kmen *Firmicutes* šel velmi lehce zúžit, spousta rodů se dala vyloučit vyřazením sporulujících bakterií (*Bacillus*...). Ve výběru nakonec zůstaly 3 možné rody bakterií [28]. Jako poslední možnost se muselo počítat i s tím, že kultura PR může být neznámá bakterie.

- Rod *Lactobacillus*: Jedná se o bohatý rod, zahrnující kolem 70 druhů bakterií, z nichž mnohé rostou při 45°C.
- Rod *Carnobacterium*: Podle výsledků popsaných výše se mohl vzít do úvahy. Dalšími výsledky však byl pravděpodobně vyloučen, protože tento rod neroste při 45°C, kdežto kultura PR ano [21].
- Rod *Weisella*: Tento rod je velmi podobný, jedná se o G+ tyčinky, mají zakulacené konce, jsou nepohyblivé, nesporulující. Mají schopnost růst v kyselých podmínkách [28]. Tento rod ale také neroste při 45°C, proto by mohl být s největší pravděpodobností vyloučen také.

Podle dosažených výsledků může kultura PR patřit k rodu *Lactobacillus*, případně se jedná o neznámou bakterii nejasného taxonomického zařazení.

Mimo jiné je cílem identifikace kultury metodou 16s rDNA, což ale není cíl diplomové práce. V současné době probíhá identifikace kultury PR na externím specializovaném pracovišti.

9 POKUSY VEDOUCÍ K OPTIMALIZACI TEKUTÉHO ŽIVNÉHO MÉDIA Z HLEDISKA TVORBY EXOPOLYSACHARIDŮ

Exopolysacharidy jsou průmyslově vyráběny v tekutých živných médiích. Následující pokusy jsou proto zaměřeny na optimalizaci tekutého živného média, z hlediska co nejvyšší tvorby exopolysacharidů.

S rostoucí viskozitou vzorků byl předpokládán vyšší obsah vytvořených exopolysacharidů. Také z tohoto důvodu bylo některých pokusech sledováno množství vytvořeného exopolysacharidu vážkovým stanovením.

9.1 Zjištění optimálních podmínek pro získání exopolysacharidů

První kultivační test s tekutými živnými médii byl zaměřen na zjištění vhodných kyslíkových podmínek při kultivaci v tekutých živných médiích a také na ověření 3 rozpouštědel a jejich vhodného poměru pro získání exopolysacharidu. Dále byl tento test také zaměřen na ověření vhodné intenzity centrifugace k odstranění buněk. U zjištění vhodných podmínek pro získání exopolysacharidu se vycházelo z postupu Pištěkové [23].

Získání exopolysacharidů spočívalo ve třech základních krocích. První krok byla centrifugace na odstranění buněk z živného média, poté se supernatant srážel vychlazeným rozpouštědlem a nakonec se sražený polymer znovu centrifugoval. Hlavní úkol této části testu bylo zjistit, jaká je nejvhodnější intenzita centrifugace k odstranění buněk a které rozpouštědlo a v jakém poměru získá ze supernatantu nejvíc polymeru. Intenzita centrifugace byla vyhodnocena pomocí sušiny buněk, nejlepší rozpouštědlo a poměr byl vyhodnocen vážkovým stanovením získaného exopolysacharidu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 14 a 15.

Tab.14: Viskozita živného média po 11 dnech kultivace PR v TYM+S

Poměr vzdušné a kapalně fáze (TYM+S : vzduch)	Viskozita [mPa.s]			
	1. měření	2. měření	3. měření	Průměr
1 : 4	223	219	227	200,5
	225	222	226	
	166	165	161	
	163	161	167	
	210	213	215	
	215	213	218	
1 : 1	190	190	189	152,2
	112	116	116	
1 : 0	147	150	151	144
	136	139	141	

Z tabulky 14 vyplývá, že nejvhodnější poměr vzdušné a kapalně fáze pro kultivaci kultury PR v tekutém živném médiu je poměr 1 : 4, tedy 1 díl živného média ku 4 dílům vzduchu. Tento fázový poměr byl dodržován ve všech dalších kultivačních testech.

Tab.15: Sušina buněk při různé intenzitě centrifugace

Centrifugace	Pozorování	X ₅ [g]		Průměr [g]	Průměr - P [g]	Sušina buněk [g/l]
10 000g	Malý terčík buněk (Ø 0,3 cm)	0,01206	0,01229	0,01218	0,00125	0,250
15 000g	Větší terčíky buněk (Ø 0,5 – 0,8 cm)	0,01240	0,01263	0,01252	0,00159	0,318
20 000g	Větší, hutnější terčíky buněk, kulatější (Ø 1 cm)	0,01300	0,01312	0,01306	0,00214	0,427
Slepý vzorek, fosf. pufr	-	0,01093	0,01092	0,01093	-	-

Vysvětlivky: X₅.....sušina buněk v 5 ml [g]

P.....průměr slepého vzorku [g]

Podle výsledků, uvedených v tabulce 15, byla zjištěna nejlepší centrifugace pro odstranění buněk, intenzita 20 000 g. Při této intenzitě centrifugace je z živného media odstraněno nejvíce buněk, sušina buněk činí 0,427 g/l získané resuspenzi. Z tabulky je jasné patrné, že čím vyšší je intenzita centrifugace, tím více buněk se z živného média odstraní. To je potvrzeno i pozorováním velikosti terčíku buněk po proběhlé centrifugaci.

Při tomto pokusu byla taky měřena viskozita smíchaného vzorku před centrifugací a po různě intenzivním centrifugování.

Tab.16: Viskozita před a po centrifugaci

	Průměr viskozity před centrifugací [mPa.s]	Průměr viskozity po centrifugaci [mPa.s]
10000g	182	251
15000g		210,5
20000g		214

Výsledné hodnoty viskozity uvedené v tabulce 16 ukazují, že viskozita se po centrifugaci zvýšila, ale nedá se říct, že by viskozita přímo úměrně odpovídala intenzitě centrifugace.

Tab.17: Vážkové vyhodnocení účinnosti rozpouštědel

Rozpouštědlo	Poměr živného media k rozpouštědлу	Hmotnost supernatantu [g]	Výtěžek EPS [g]	Výtěžnost [%]
Isopropanol	1 : 3	35	2,02	57,7
	1 : 5	36	2,37	65,8
Aceton	1 : 3	36	2,21	61,4
	1 : 5	36	2,50	69,4
Etanol	1 : 3	36	1,88	52,2
	1 : 5	37	2,03	54,9

Tučně vyznačená hodnota v tabulce 17 ukazuje nejlepší dosaženou výtěžnost v procentech, vztaženou k maximální výtěžnosti exopolysacharidu, kterou lze z dané hmotnosti superna-

tantu dostat. Zvýrazněno je také nejvhodnější rozpouštědlo, aceton a nejlepší poměr živného media k rozpouštědlu, v tomto případě 1 : 5.

Součástí tohoto stanovení bylo i pozorování vysrážených polysacharidů. V případě acetonu se po centrifugaci vytvořila kompaktní sraženina a supernatant zůstal čirý. V případě izopropanolu se vytvořila kompaktní sraženina, ale supernatant se úplně nevyčěřil. Co se týká etanolu, také se vytvořila kompaktní sraženina a supernatant byl téměř čirý.

Také získané polymery byly mírně rozdílné. V případě ethanolu byl vysrážený polymer světlejší, polymery vysrážené acetonem a izopropanolem měly barvu nažloutlou až žlutohnědou.

Úplně čirý supernatant po centrifugaci k získání polymeru, stejně jako nejvyšší procentuální výtěžnost rozhodly o dalším využívání acetonu (1 : 5) ke srážení exopolysacharidů v následujících vázkových testech.

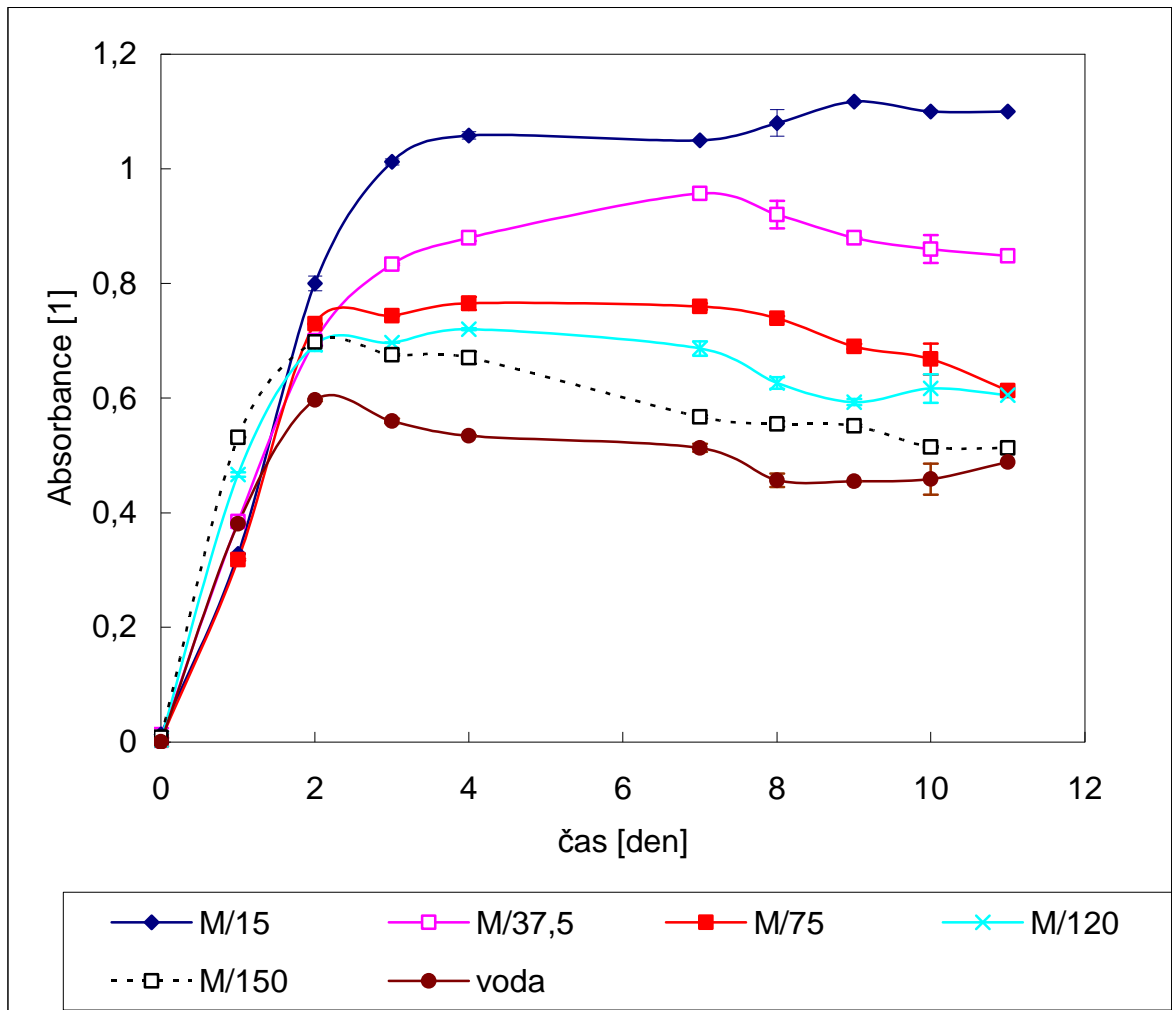
9.2 Výběr vhodně ředěného fosfátového pufru k přípravě tekutých živných medií

Tento pokus byl zaměřen na vyhodnocení nejvhodnějšího typu fosfátového pufru a to tak, že byla připravena sada živných medií. V nich byla destilovaná voda nahrazena několika typy pufrů s různou pufrací kapacitou (viz. Tab.3). V průběhu kultivace kultury PR v těchto médiích byl sledován růst kultury (OD_{600}), pH a viskozita média.

Tab.18: Růst kultury v různě ředěných fosfátových pufrech, vyjádřeno hodnotami OD_{600}

	Průměr OD_{600} v různých dnech měření									
	0.den	1. den	2.den	3.den	4.den	7.den	8.den	9.den	10.den	11.den
M/15	0,013	0,328	0,800	1,012	1,058	1,050	1,080	1,118	1,102	1,100
M/37,5	0,005	0,385	0,700	0,834	0,880	0,957	0,920	0,880	0,860	0,849
M/75	0,004	0,318	0,730	0,744	0,766	0,760	0,739	0,690	0,668	0,613
M/120	0,004	0,467	0,693	0,697	0,720	0,687	0,627	0,593	0,617	0,605
M/150	0,008	0,532	0,698	0,676	0,671	0,567	0,555	0,552	0,515	0,513
Voda	0,000	0,381	0,597	0,560	0,534	0,513	0,567	0,455	0,459	0,488

Pozn.: Absorbance v různých dnech měření pro každé živné médium je průměrem 2 hodnot



Obr.12: Růst kultury vyjádřený hodnotami OD_{600} v závislosti na čase

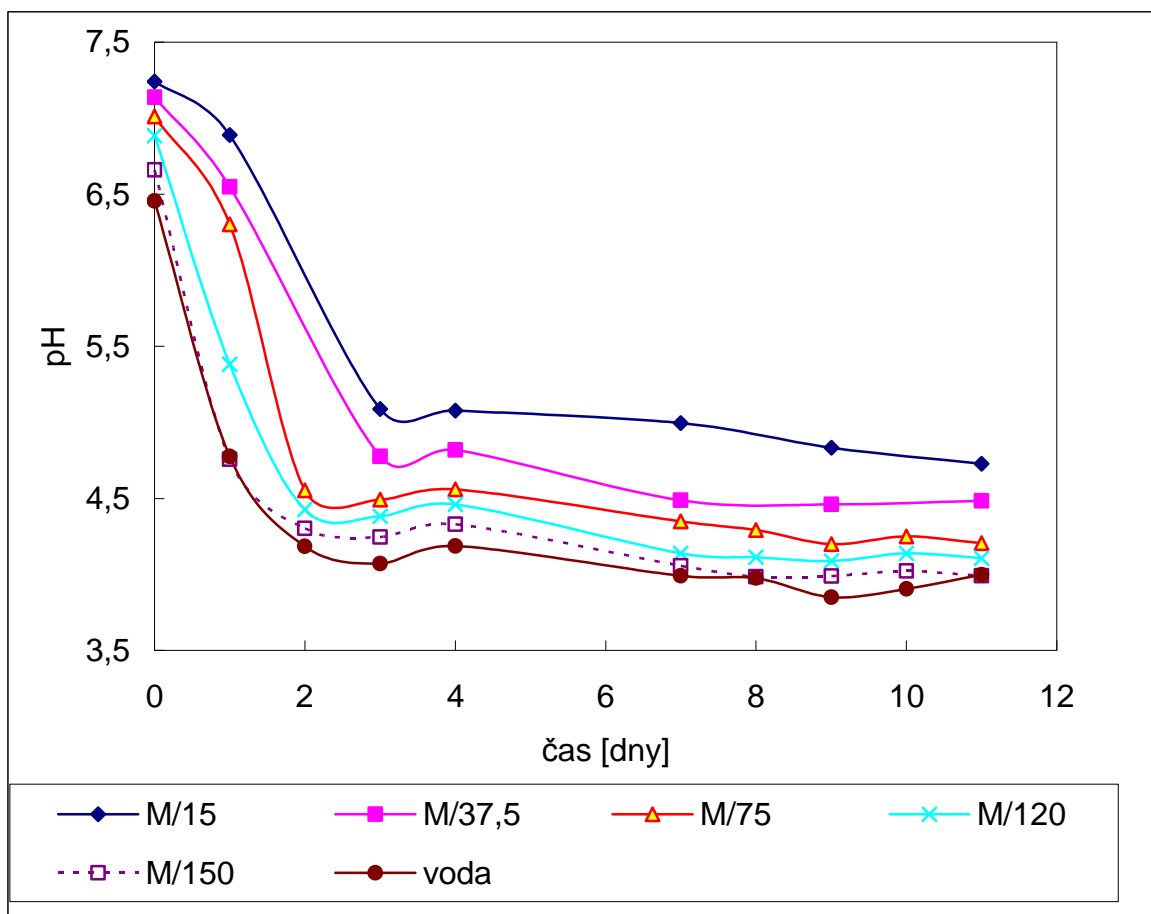
Na obrázku 12 lze vidět závislost absorbance na dnech kultivace pro jednotlivá živná média. Z obrázku je vidět, že nejlépe roste kultura v nejvíce pufrovaném živném mediu, označení M/15. Nejméně roste v nepufrovaném mediu, s destilovanou vodou. Ostatní živná média jsou mezi nimi, úměrně tomu, jak silně je dané živné médium pufrováno. Dá se říci, že čím více je živné médium pufrováno, tím lépe v něm kultura PR roste.

Z grafu je také vidět, že kultura PR roste nejvíc první 4 dny kultivace a dále se už růst zastavuje.

Tab.19: Závislost pH různě pufrovaných živných médií na dnech kultivace

Čas kultivace [dny]	Průměr pH					
	M/15	M/37,5	M/75	M/120	M/150	voda
0	7,240	7,138	7,012	6,885	6,659	6,454
1	6,888	6,548	6,301	5,381	4,756	4,776
2	-	-	4,553	4,427	4,302	4,184
3	5,086	4,776	4,493	4,384	4,247	4,071
4	5,076	4,817	4,561	4,460	4,331	4,188
7	4,995	4,488	4,350	4,139	4,057	3,991
8	-	-	4,292	4,113	3,985	3,977
9	4,831	4,460	4,199	4,087	3,989	3,850
10	-	-	4,250	4,139	4,022	3,904
11	4,727	4,484	4,206	4,107	3,990	3,998

Pozn.: Hodnoty pH jsou průměr 2 měření



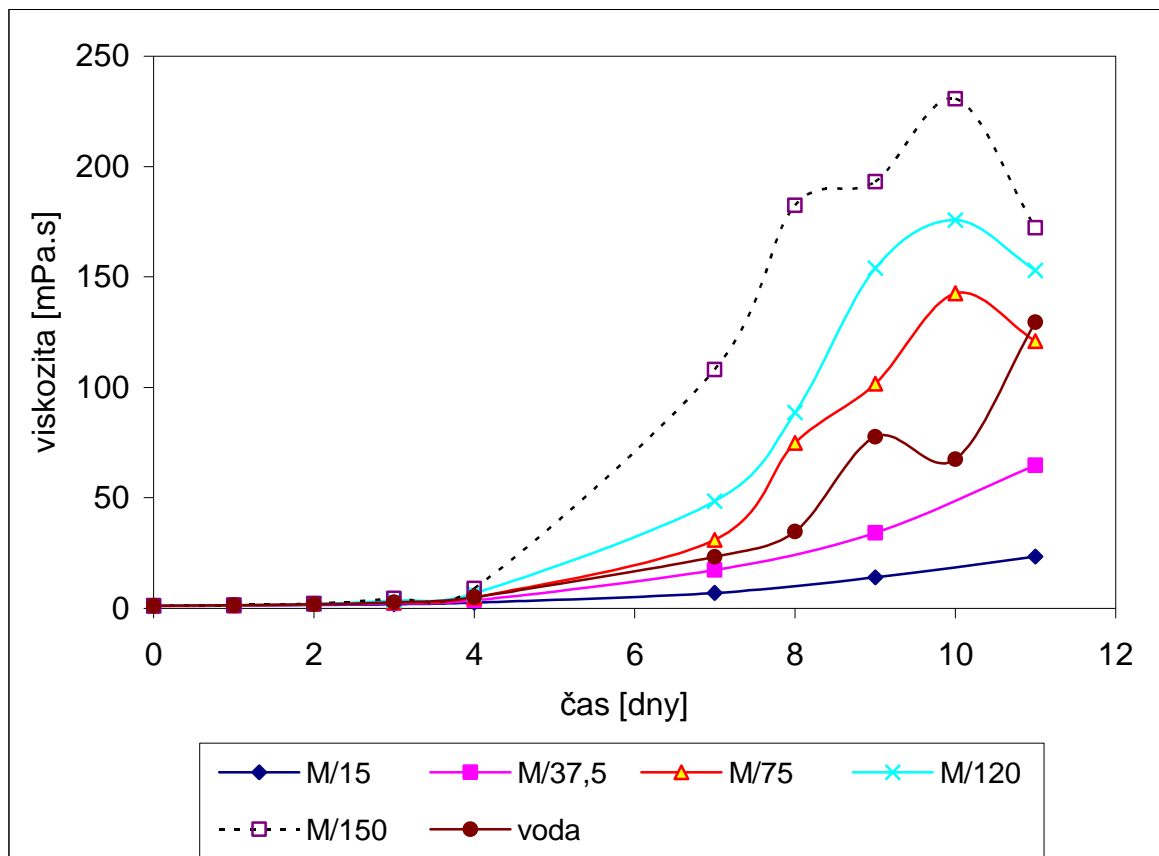
Obr.13: Závislost pH různě pufrovaných živných médií na čase

Na obrázku 13 je graficky znázorněna závislost pH různě pufrovaných živných médiích. V průběhu prvních 2 dnů kultivace pH ve všech médiích značně kleslo a dále klesalo jen pomalu. Kolem 4. dne kultivace pH mírně stouplu u všech vzorků. V grafu je vidět závislost pH na pufrační kapacitě, u více pufrovaných vzorků klesá pH pomaleji a na konci klesne méně než u méně pufrovaných nebo nepufrovaného vzorku. pH u vzorku s destilovanou vodou klesá v průběhu kultivace nejvíce.

Tab.20: Viskozita různě pufrovaných živných médií v průběhu kultivace TYM+S

Čas kultivace [dny]	Průměr viskozity [mPa.s]					
	M/15	M/37,5	M/75	M/120	M/150	voda
0	1,25	1,18	1,17	1,19	1,19	1,17
1	1,30	1,37	1,36	1,50	1,50	1,39
2	-	-	2,06	2,04	2,22	1,85
3	1,86	2,33	2,78	3,64	4,49	2,73
4	2,55	3,68	4,99	6,65	8,84	5,09
7	6,99	17,32	30,9	48,47	108,08	23,15
8	-	-	74,87	88,63	182,33	34,68
9	13,88	34,15	101,67	154,00	193,17	77,67
10	-	-	142,67	175,67	230,67	67,50
11	23,35	64,75	121,00	153,00	172,17	129,50

Pozn.: Průměrná viskozita uvedená v tabulce je průměr ze 6 měření



Obr.14: Závislost viskozity na pufracní kapacitě média a dnech kultivace

Tučně zvýrazněné hodnoty v tabulce 20 ukazují nejvyšší hodnotu viskozity pro každý měřicí den. Ve všech případech je nejvyšší viskozita právě u vzorku M/150, který je pufovan 10x ředěným fosfátovým pufrém. Tyto výsledky jsou velmi dobře vidět na obrázku 14. Z tohoto důvodu byl zvolen 10x ředěný fosfátový pufr jako nejvhodnější prostředí pro kultivaci kultury PR v tekutých živných médiích.

Jako druhý vzorek s nejvyšší viskozitou se ukazuje živné médium M/120, třetí je M/75 a poté následuje nepufované živné médium s destilovanou vodou. Nejvíce pufované živné média M/37,5 a M/15 vykazují v průběhu kultivace nejnižší viskozitu.

Po srovnání výsledků z měření absorpance, pH i viskozity se ukazuje, že živná média, ve kterých nejlépe kultura PR roste, vykazují nejnižší viskozitu živného média a tím i nejnižší produkci exopolysacharidů. pH u nejvíce viskozního vzorku M/150 klesá až mírně pod 4, taktéž i v ostatních vzorcích s vyšší viskozitou klesá pH k této hodnotě.

Z výsledků lze usoudit, že pro vyšší produkci exopolysacharidů jsou vhodnější horší podmínky pro růst kultury PR, protože exopolysacharidů je vytvořeno více, když kultura pomaleji roste.

9.3 Srovnání glukosy a sacharosy z hlediska tvorby EPS v TYM

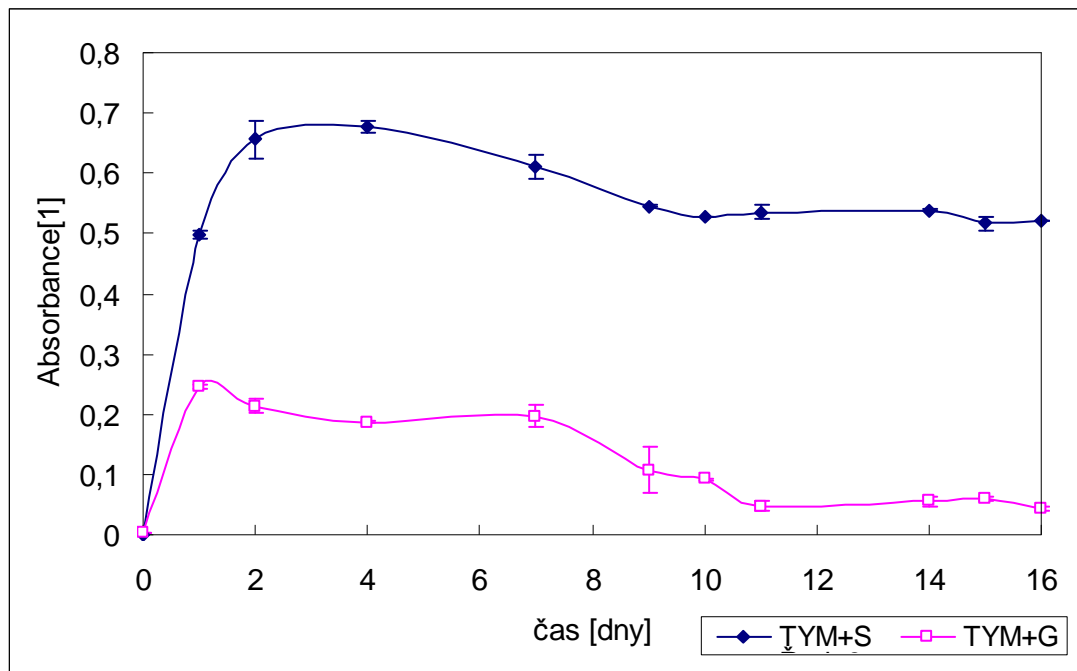
Již dříve bylo prokázáno, že kultura PR tvoří exopolysacharidy na pevných živných půdách ze sacharosy a v menším množství i z glukosy [21]. Produkce exopolysacharidů na pevných živných půdách se ale může teoreticky lišit od produkce v tekutých médiích a proto byl třetí kultivační test zaměřen na srovnání živného média s glukosou a se sacharosou. V průběhu kultivačního testu byla opět měřena absorbance, pH a viskozita médií. V tomto testu byla navíc provedeno získání exopolysacharidů ve stanovené dny a následně jejich vážkové stanovení.

Tab.21: Růst kultury v tekutém médiu s glukosou a sacharosou, vyjádřeno hodnotami OD_{600}

Čas [dny]	Hodnoty OD_{600} při kultivaci v různých médiích							
	TYM+S ₁	TYM+S ₂	Průměr TYM+S	±	TYM+G ₁	TYM+G ₂	Průměr TYM+G	±
0	0	0	0	-	0,003	0,003	0,003	-
1	0,488	0,506	0,497	0,006	0,24	0,251	0,246	0,004
2	0,61	0,704	0,657	0,032	0,23	0,196	0,213	0,015
4	0,694	0,661	0,678	0,011	0,183	0,191	0,187	0,003
7	0,638	0,583	0,611	0,019	0,168	0,227	0,198	0,020
9	0,543	0,548	0,546	0,002	0,165	0,05	0,108	0,039
10	0,526	0,53	0,528	0,001	0,093	0,09	0,092	0,001
11	0,519	0,552	0,536	0,011	0,061	0,035	0,048	0,009
14	0,54	0,537	0,539	0,001	0,043	0,067	0,055	0,008
15	0,501	0,532	0,517	0,010	0,057	0,063	0,060	0,002
16	0,522	0,521	0,522	0,001	0,039	0,046	0,043	0,002

Vysvětlivky: TYM+S.....tekuté živné medium se sacharosou

TYM+G.....tekuté živné medium s glukosou

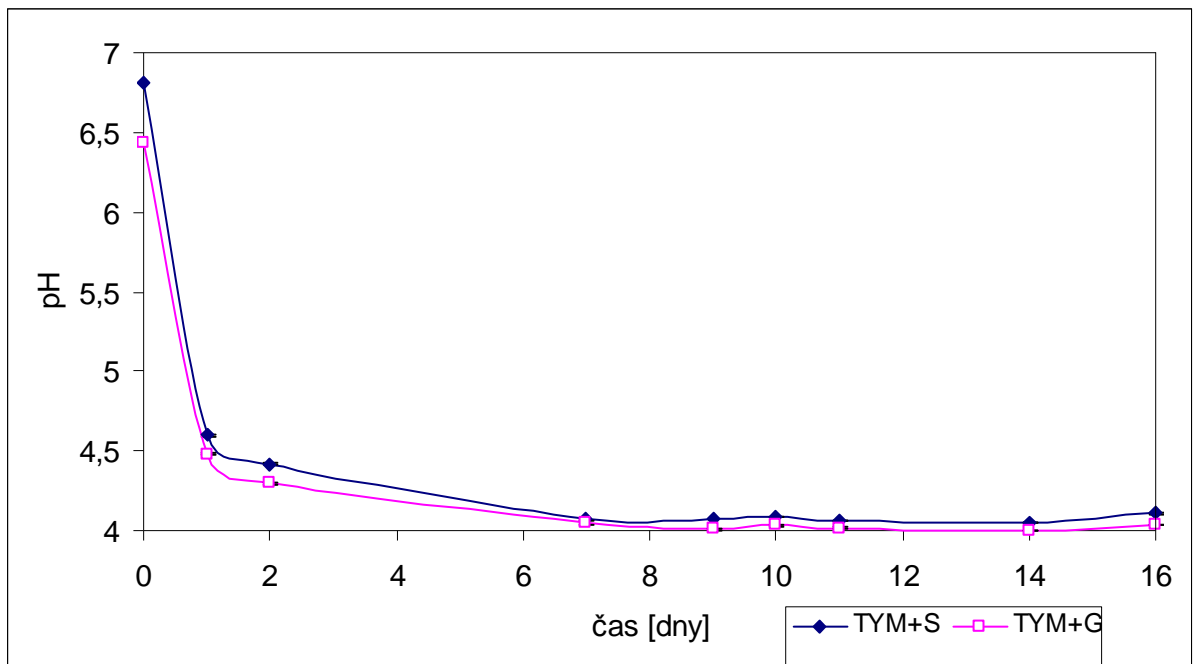


Obr.15: Závislost absorbance na čase v mediu se sacharosou nebo glukosou

Růst kulury PR se v obou živných médiích značně liší, jak je znázorněno na obrázku 15. Co se týká média s glukosou, nárůst zákalu a tedy i absorbance probíhal pouze první den, poté už absorbance klesala, nebo byla v některých dnech konstantní. Růst absorbance v tekutém mediu se sacharosou probíhal až do 3 dne. Následující dny začala absorbance postupně mírně klesat.

Tab.22: pH v živném mediu se sacharosou (TYM+S) a s glukosou (TYM+G)

Čas [dny]	pH							
	TYM+S ₁	TYM+S ₂	Průměr TYM+S	±	TYM+G ₁	TYM+G ₂	Průměr TYM+G	±
0	6,811	6,811	6,811	-	6,439	6,439	6,439	-
1	4,611	4,590	4,601	0,007	4,474	4,488	4,481	0,005
2	4,419	4,422	4,421	0,001	4,306	4,291	4,299	0,005
7	4,075	4,075	4,075	-	4,038	4,061	4,050	0,008
9	4,072	4,072	4,072	-	4,022	4,002	4,012	0,006
10	4,095	4,086	4,091	0,003	4,046	4,028	4,037	0,006
11	4,064	4,057	4,061	0,002	4,023	4,010	4,017	0,004
14	4,054	4,047	4,051	0,002	4,008	3,991	4,000	0,006
16	4,108	4,106	4,107	0,001	4,041	4,040	4,041	0,000



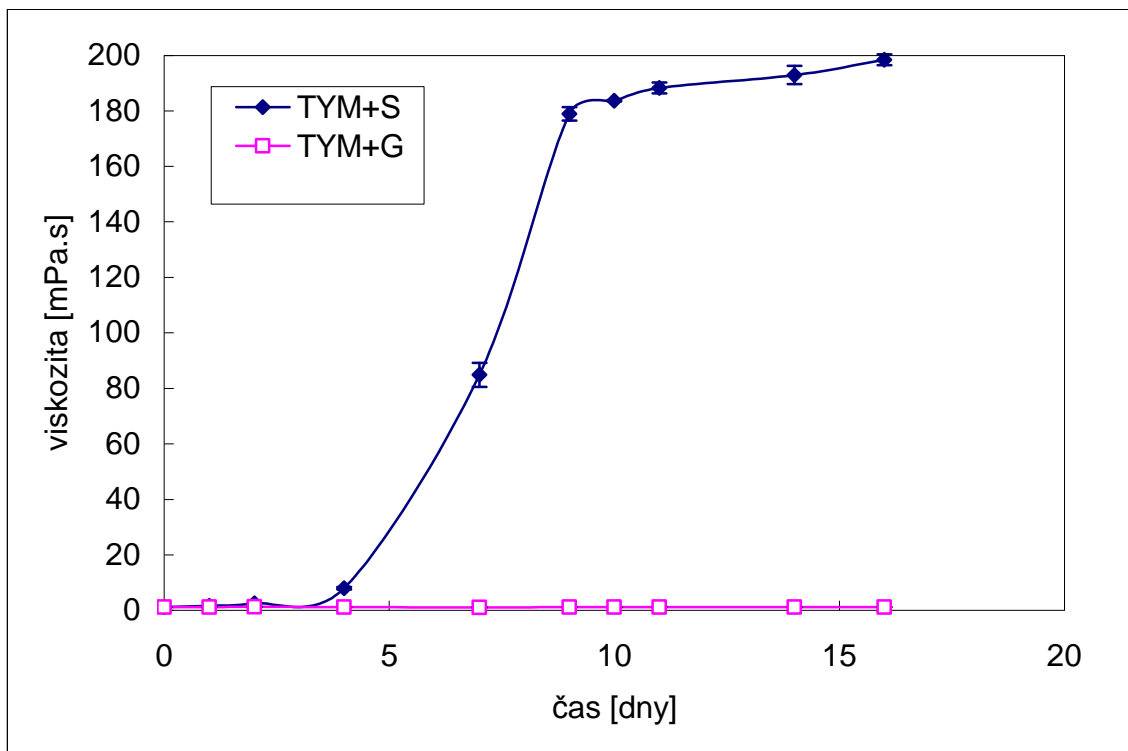
Obr.16: Závislost pH na dnech kultivace u živných médií s glukosou a sacharosou

Na obrázku 16 je vidět, že oba vzorky, TYM+S i TYM+G, se v průběhu kultivace v podstatě nelišily. Získané hodnoty pH jsou u obou živných médií téměř shodné.

Tab.23: Viskozita v živném médiu se sacharosou (TYM+S) a s glukosou (TYM+G)

Dny kultivace	Viskozita [mPa.s]			
	TYM+S		TYM+G	
	Průměr	±	Průměr	±
0	1,14	0,004	1,13	0,002
1	1,675	0,013	1,14	0,002
2	2,54	0,019	1,24	0,004
4	7,99	0,452	1,19	0,004
7	84,87	4,293	1,09	0,004
9	179,00	2,413	1,18	0,002
10	183,67	0,225	1,18	0,003
11	188,33	2,013	1,21	0,002
14	193	3,318	1,13	0,002
16	198,5	1,961	1,17	0,002

Pozn.: Viskozita uvedená v tabulce je průměrem 6 měření



Obr.17: Závislost viskozity živných médií se sacharosou a glukosou na dnech kultivace

Výsledky, uvedené v tabulce 23, stejně tak jako graf na obrázku 17, ukazují, že v průběhu tohoto kultivačního testu rostla viskozita jen v živném médiu se sacharosou. Z důvodu možné kontaminace media s glukosou (a tím ovlivnění výsledků) byla provedena kontrola tohoto media.

Na konci kultivace byla jedna láhev s živným médiem s glukosou využita na naočkování VL agarů křížovým roztěrem za účelem kontroly čistoty kultury PR v tomto médiu. Po odečtení tohoto testu bylo zjištěno, že kultura PR v médiu s glukosou je čistá, vyočkovaná kultura PR na VL agaru rostla velmi dobře. Bylo tím prokázáno, že k ovlivnění testu nedošlo.

Tab.24: Vážkové stanovení EPS z živného média se sacharosou (TYM+S) a s glukosou (TYM+G)

Dny kultivace	Hmotnost získaného EPS [g]							
	TYM+S				TYM+G			
	1.	2.	3.	Průměr	1.	2.	3.	Průměr
4	2,32	2,18	2,03	2,177	-	0,11	0,20	0,155*
7	2,42	2,54	2,48	2,48	0,18	0,08	0,12	0,127*
10	2,94	2,98	3,27	3,033	0,3	0,28	0,35	0,31*
15	3,08	2,78	2,95	2,937	-	-	-	*

Vysvětlivky: *vzhled ani charakter produktu neodpovídá polysacharidu z TYM+S

Výsledky z tabulky 23 i z grafu na obrázku 17 potvrzují i vážkové stanovení v tabulce 24. Z živného média se sacharosou se podařilo získat nejvíc polysacharidu 10. den kultivace, 3,033g.

Vzhled ani charakter získaného produktu z tekutého živného média s glukosou vůbec neodpovídá charakteru, vzhledu a vlastnostem polysacharidu získaného z média se sacharosou. Vzhledem k nízké viskozitě média s glukosou (viz. Tab.23) a vzhledem ke kontrole čistoty kultury PR v tomto tekutém médiu, kdy byla potvrzena čistota kultury PR, je dokázáno, že kultura PR v tekutém médiu s glukosou netvoří exopolysacharidy.

Z výsledků v tabulce 23 a 24 dále vyplývá, že viskozita a také množství získaných polymerů se po 10. dnu kultivace příliš nezvyšuje. Kultivace živného média se sacharosou delší než 10 dnů nedá vyšší výsledky viskozity ani vyšší výtěžek exopolysacharidu, proto je 10 denní kultivace nejvhodnější.

9.4 Test ke zjištění využití dusíkatého zdroje z hlediska tvorby EPS v TYM

Předpokládali jsme, že u bohatších živných médií se budou exopolysacharidy vytvářet dříve[21] a mohla by se tím zkrátit zjištěná vhodná doba kultivace. Testovaná živná média jsou vypsána v tabulce 2. Podstatou testu byla kultivace v médiích s proměnnými koncentracemi tryptonu a kvasničného autolyzátu.

Tento pokus se skládal jednak z měření viskozity, pH a absorbance, ale také z vážkového stanovení. Polysacharid byl získáván poprvé u každého živného média ve dni, kdy viskozi-

ta vykazovala 2 dny po sobě obdobné hodnoty. Na konci kultivace bylo vážkové stanovení zopakováno pro všechny živné média.

V pokusu byl využit nový kvasničný autolyzát od firmy Himedia, z důvodů tenčících se zásob kvasničného autolyzátu od firmy Imuna, který byl využíván v předchozích testech. Pokus však byl zastaven předčasně, protože viskozita všech živných médií zůstávala i po 4 dnech kultivace na hodnotě do 2 mPa.s. Pro potvrzení, čím bylo způsobeno, že kultura PR netvořila polysacharid, byla provedena řada testů: křížové roztěry na VL agar pro kontrolu čistoty kultury, křížový roztěr na TYA se 2% sacharosy, aby bylo potvrzeno, že kultura PR z lahví využitých v testu má pořád schopnost vytvářet polysacharidy. Dále by proveden kultivační test, kdy se nachystaly láhve se starým (f.Imuna) i novým (f. Himedia) kvasničným autolyzátem, aby byla provedena kontrola, zda jsou nízké výsledky viskozity způsobeny druhem kvasničného autolyzátu. Kontrola čistoty kultury ukázala, že kultura PR v lahvích původního testu byla čistá. Kontrola její schopnosti tvořit exopolysacharid také vyšla pozitivně. Po odečtení kultivačního testu se starým a novým kvasničným autolyzátem bylo potvrzeno, že nízkou viskozitu způsobil kvasničný autolyzát od firmy Himedia. Proto musel být celý pokus opakován se starým kvasničným autolyzátem od firmy Imuna. Následně byl uspořádán další růstový test (kapitola 9.5), což byl pokus zjistit a vysvětlit, co je potřebným faktorem pro tvorbu exopolysacharidu kulturou PR.

Uvedeny jsou pouze výsledky z testu s kvasničným autolyzátem od firmy Imuna.

Tab.25: Růst kultury v různě bohatých živných médiích vyjádřena hodnotami OD_{600}

Dny kultivace	Průměr hodnot OD_{600} [1]			
	TYM+S	TYMT+S	TYMK+S	TYMCH+S
0	0,000	0,006	0,003	0,001
1	0,579	0,608	0,828	0,268
2	0,637	0,684	0,639	0,509
3	0,665	0,667	0,647	0,601
4	0,658	0,655	0,639	0,635
7	0,609	0,630	0,595	0,607
8	0,615	0,652	0,599	0,638
9	0,680	0,654	0,676	0,640
10	0,665	0,680	0,686	0,644
11	0,609	0,619	0,618	0,625
15	0,591	0,615	0,665	0,582

Vysvětlivky: TYM+S.....běžně využívané medium se sacharosou

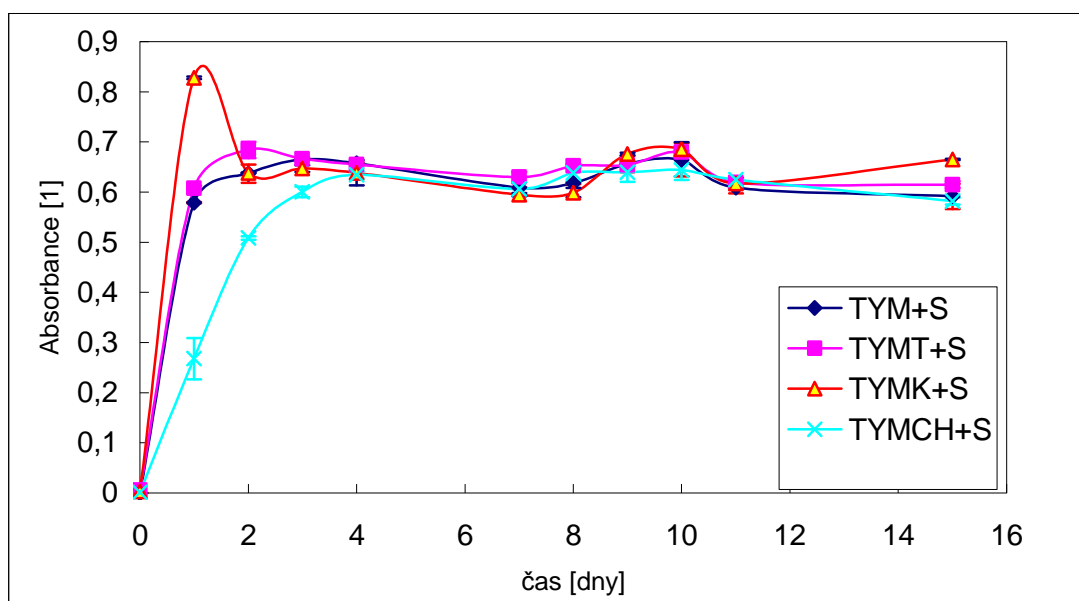
TYMT+S.....medium bohatší o trypton

TYMK+S.....medium bohatší o kvasničný autolyzát

TYMCH+S.....medium chudší o trypton i kvasničný autolyzát

Přesné složení těchto médií je v tabulce 2.

Pozn.: Hodnoty v tabulce jsou průměr 2 měření



Obr.18: Graf závislosti absorbance na dnech kultivace pro různě bohatá živná média

Na obrázku 18 vidíme, že po 2 dnech kultivace se růst všech živných médií ustálil na podobné hodnotě kolem 0,6 a dále se měnil jen mírně. Absorbance byla nejvyšší už první den kultivace v mediu bohatším o kvasničný autolyzát, dále ale také klesla na hodnotu mírně nad 0,6.

Tab.26: pH různě bohatých živných médií

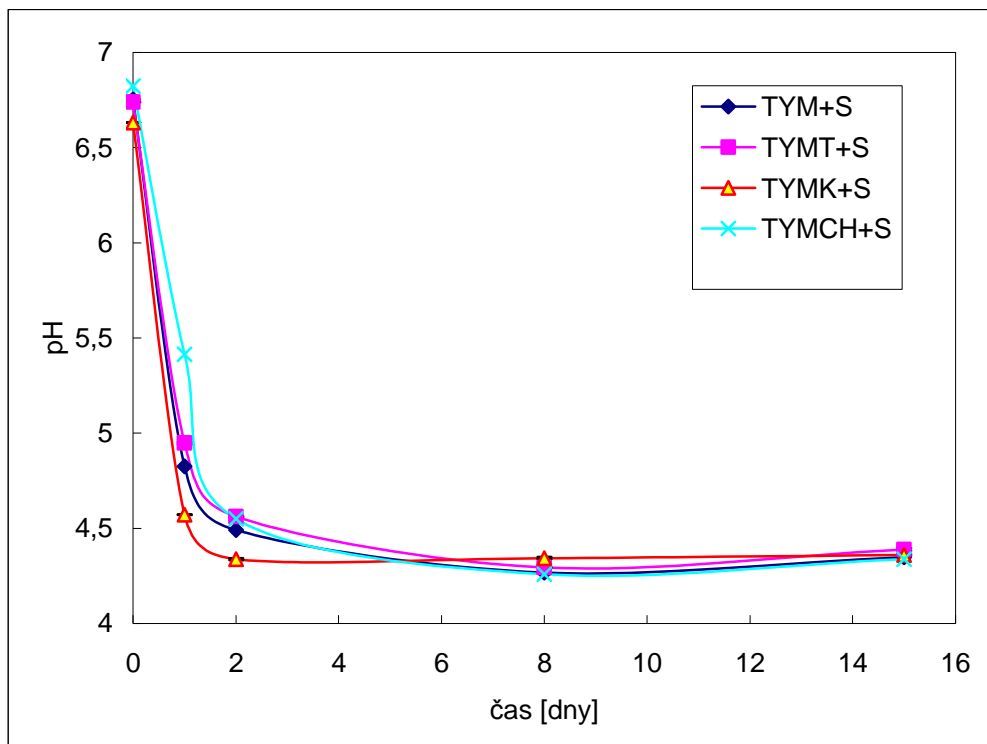
Dny kultivace	Průměr pH			
	TYM+S	TYMT+S	TYMK+S	TYMCH+S
0	6,752	6,739	6,631	6,823
1	4,826	4,948	4,573	5,415
2	4,492	4,562	4,338	4,551
8	4,268	4,295	4,344	4,259
15	4,348	4,389	4,361	4,339

Vysvětlivky: TYM+S.....běžně využívané medium se sacharosou

TYMT+S.....medium bohatší o trypton

TYMK+S.....medium bohatší o kvasničný autolyzát

TYMCH+S.....medium chudší o trypton i kvasničný autolyzát



Obr.19: Závislost pH na dnech kultivace v různě bohatých živných médiích

Výsledky v tabulce 26 a také graf na obrázku 19 ukázaly, že pH se v různě bohatých živných médiích v podstatě neliší. Všechna živná média ustálila v průběhu kultivace pH na hodnotě mírně nad 4,3.

Tab.27: Viskozita různě bohatých živných médií

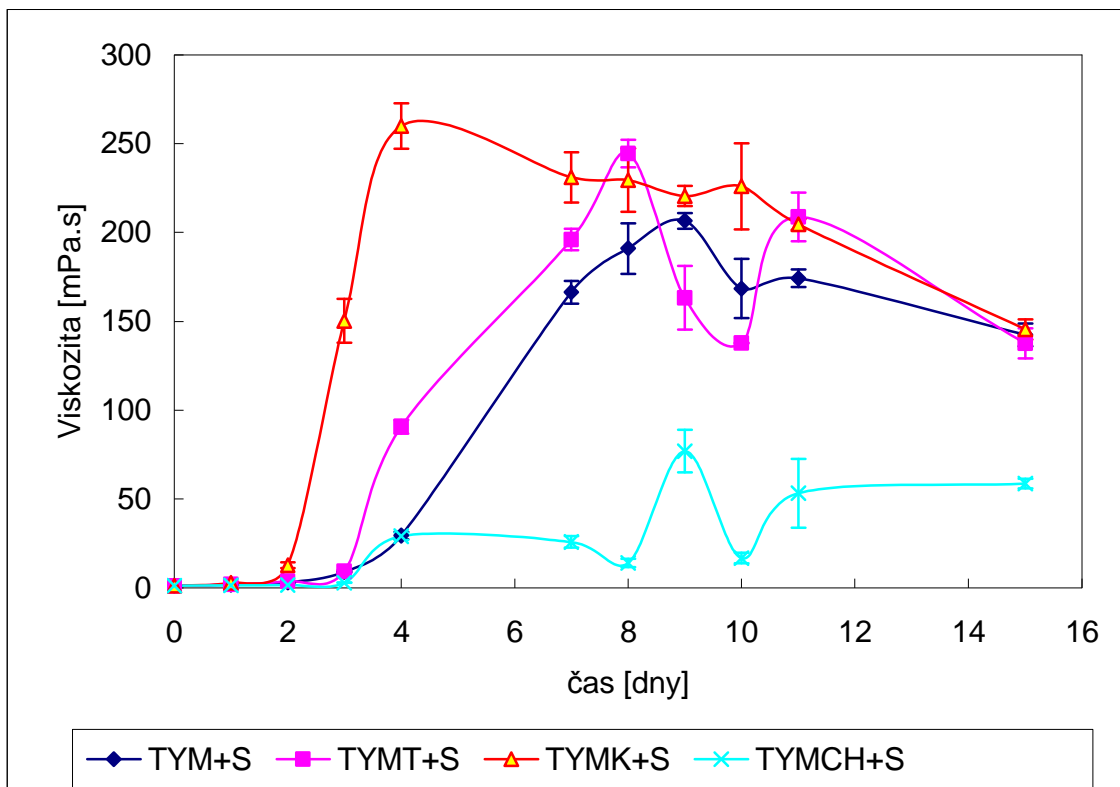
Dny kultivace	Průměr viskozity [mPa.s]			
	TYM+S	TYMT+S	TYMK+S	TYMCH+S
0	1,23	1,17	1,25	1,22
1	1,76	1,92	2,92	1,51
2	3,56	3,85	12,75	1,64
3	9,03	9,40	150,30	2,95
4	29,39	90,67	260,00	28,99
7	166,50	196,00	231,00	25,87
8	191,00	244,50	229,50	14,10
9	206,50	163,33	220,50	76,92
10	168,50	137,84	226,00	16,82
11	174,34	208,67	204,50	53,15
15	142,50	137,67	145,50	58,64

Vysvětlivky: TYM+S.....běžně využívané medium se sacharosou

TYMT+S.....medium bohatší o trypton

TYMK+S.....medium bohatší o kvasničný autolyzát

TYMCH+S.....medium chudší o trypton i kvasničný autolyzát



Obr.20: Závislost viskozity různě bohatých živných médií na čase

Výsledky z tabulky 27 ukazují, že nejvyšší hodnotu viskozity dosáhlo živné medium se zvýšeným množstvím kvasničného autolyzátu už 4. den kultivace. Zároveň je tato hodnota nejvyšší dosažená viskozita v průběhu celého kultivačního testu. Druhou nejvyšší hodnotu viskozity dosáhlo živné medium s vyšším obsahem tryptonu a to 8. den kultivace. Standardní i chudší živné medium dosáhlo nejvyšší hodnoty viskozity shodně 9. den kultivace. Chudší medium však za celou dobu kultivace nedosahovalo příliš vysokých hodnot viskozity, jeho nejvyšší hodnota je 76,92 mPa.s, kdežto ostatní media dosáhly viskozity nad 200 mPa.s. Jak je vidět v grafu na obrázku 20, hodnoty viskozity byly v tomto testu velmi rozkolísané.

Tab.28: Vázkové stanovení polysacharidů z různě bohatých živných médií

Den stanovení	TYM+S [g]	TYMT+S [g]	TYMK+S [g]	TYMCH+S [g]
6	-	-	3,52	2,24
8	-	2,73	-	-
9	2,64	-	-	-
15	2,94	2,87	2,85	2,68

Vysvětlivky: TYM+S.....běžně využívané medium se sacharosou

TYMT+S.....medium bohatší o trypton

TYMK+S.....medium bohatší o kvasničný autolyzát

TYMCH+S.....medium chudší o trypton i kvasničný autolyzát

Pozn.: Každá hodnota v tabulce je průměr ze 3 paralelních stanovení

Výsledky vázkového stanovení v tabulce 28 ukazují, že nejvíce exopolysacharidu se získalo z živného média bohatšího o kvasničný autolyzát a to 3,52 g, což odpovídá 70,4% maximálního výtěžku polysacharidu (50 ml živné půdy s obsahem sacharosy 10%). 15. den kultivace bylo provedeno stanovení pro všechny živné média a objevila se určitá nerovnováha mezi hodnotou viskozity a hmotností získaného exopolysacharidu. Standardní živné medium a obě živná media se zvýšeným obsahem dusíku dosáhly tento den viskozity kolem 140 mPa.s, z čehož bylo získáno průměrně 2,9 g polysacharidu, což činí 58% maximální výtěžnosti. Chudší živné medium dosáhlo viskozity tento den jen 58,64 mPa.s a bylo z něho získáno 2,68 g polysacharidu, to je 53,6% maximální výtěžnosti. Z toho vyplývá, že náš prvotní předpoklad, že s růstem viskozity roste lineárně i množství získaného exopolysacharidu je nepřesný. Dá se předpokládat, že závislost viskozity a polysacharidu v roztoku bude lineární jen v určitých mezích. Po dosažení určité hraniční koncentrace polysacharidu v živném médiu se začne viskozita zvyšovat skokově pravděpodobně z důvodu interakce samotných řetězců polysacharidu mezi sebou.

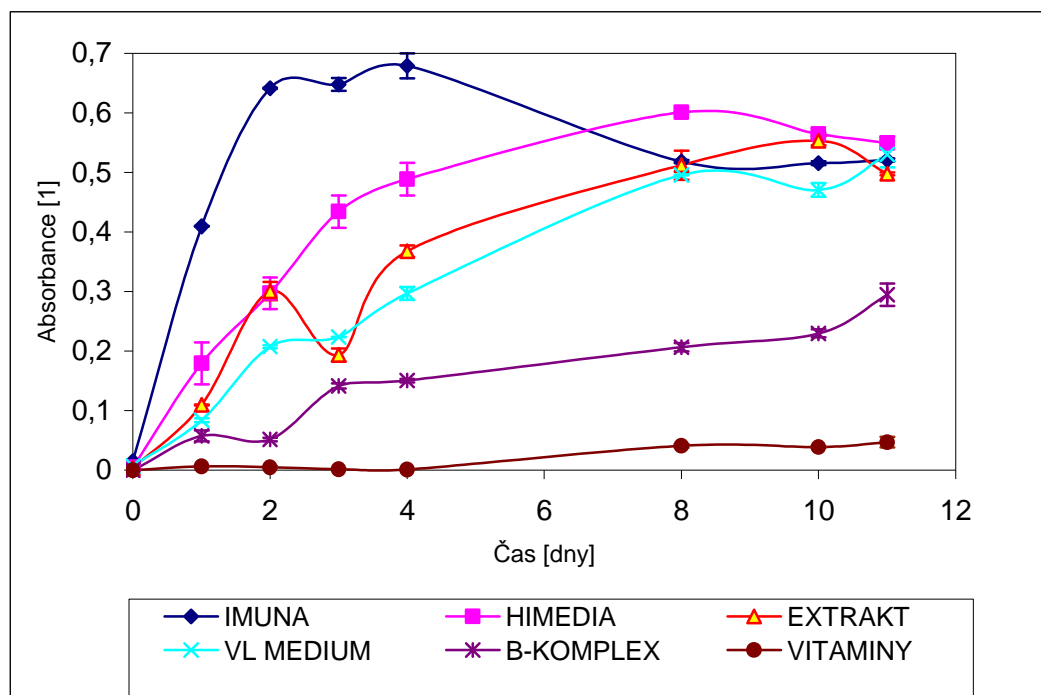
9.5 Růstový test

Důvody pro poslední růstový test jsou vypsány v kapitole 9.4. Úkol tohoto testu bylo pokusit se vysvětlit, co je potřebným faktorem pro tvorbu exopolysacharidů kulturou PR. K tomu bylo využito 6 různých živných médií, jejichž složení je vypsáno v kapitole 6.6.

V průběhu kultivace byla měřena absorbance a viskozita. Na začátku a na konci kultivace bylo změřeno pH.

Tab.29: Růst kultury PR v průběhu růstového testu

Dny kultivace	Průměr hodnot OD ₆₀₀ [1]					
	KA Imuna	KA Hi-media	Kvas. ex-trakt	VL medium	B-komplex	Vitamíny
0	0,015	0,005	0,003	0,007	0,000	0,000
1	0,409	0,179	0,109	0,084	0,058	0,007
2	0,641	0,297	0,301	0,208	0,052	0,005
3	0,648	0,434	0,194	0,224	0,142	0,002
4	0,679	0,489	0,368	0,297	0,151	0,001
8	0,518	0,601	0,512	0,500	0,207	0,041
10	0,516	0,565	0,553	0,471	0,230	0,039
11	0,521	0,549	0,498	0,530	0,295	0,047



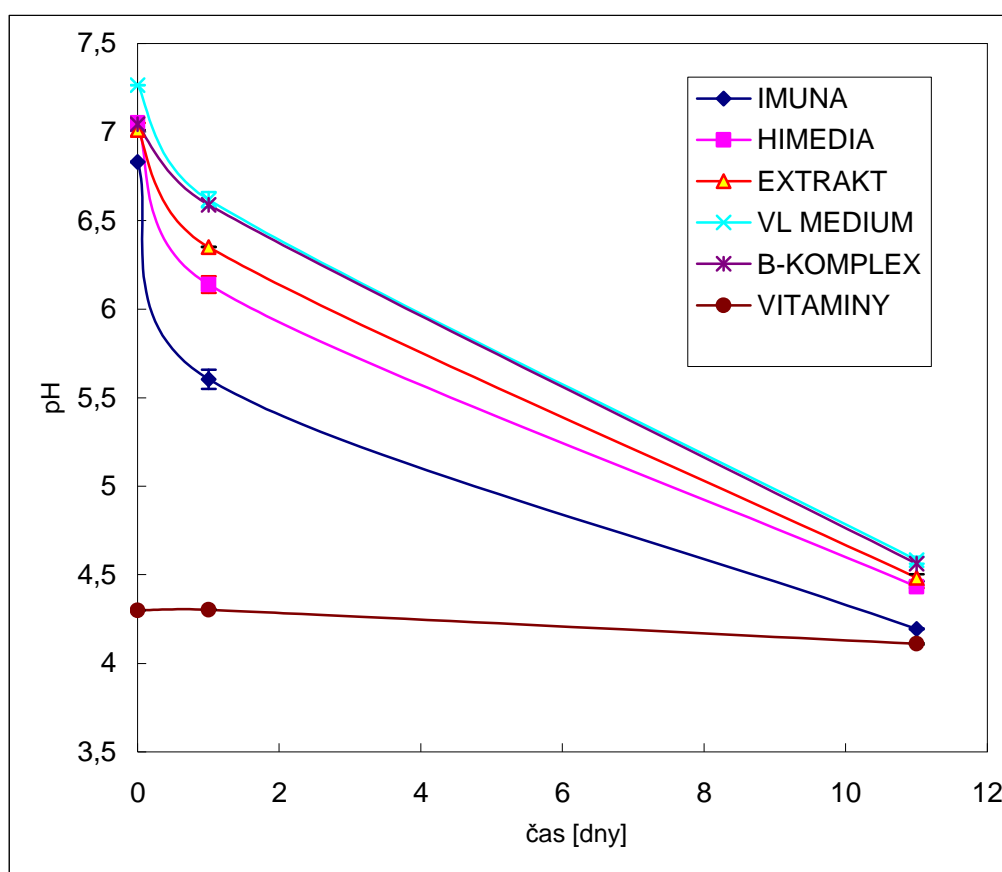
Obr. 21: Závislost hodnot OD₆₀₀ různých živných médií v růstovém testu

Z výsledků je patrné, že nejlépe roste kultura PR v živném mediu se starým kvasničním autolyzátem od firmy Imuna. Živná media s novým kvasničním autolyzátem Himedia, s kvasničním extraktem Himedia a také VL medium se v průběhu kultivace dostane také

na hodnotu absorbance kolem 0,5, kde se také ustálila hodnota absorbance živného media Imuna. Kultura PR roste hůř v živném mediu s B-komplemem a velmi špatně roste v mediu s vitaminovým růstovým suplementem.

Tab.30: pH živných médií v průběhu růstového testu

Dny kultivace	Průměr pH					
	Imuna	Himedia	Extrakt	VL medium	B-komplex	Vitamíny
0	6,831	7,051	7,012	7,265	7,045	4,300
1	5,604	6,138	6,350	6,618	6,589	4,304
11	4,196	4,432	4,512	4,582	4,562	4,111



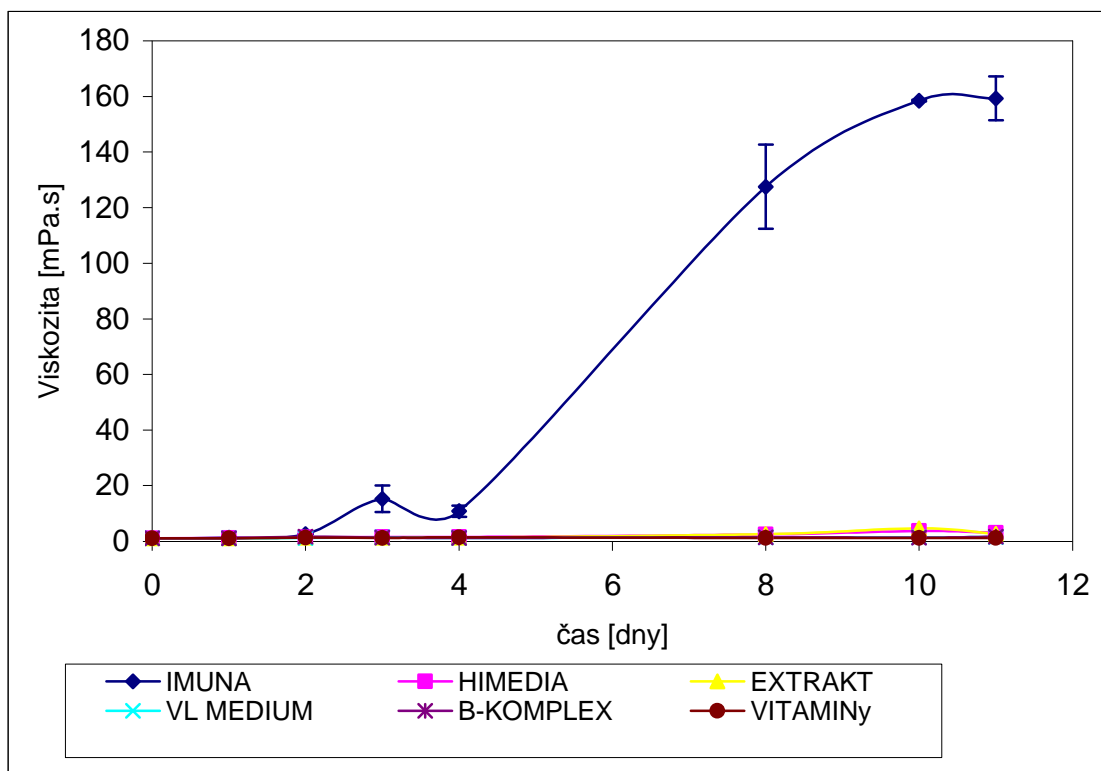
Obr.22: Závislost pH na dnech kultivace v průběhu růstového testu

Z dosavadních výsledků lze vidět, že pH klesá rychleji u živných médií, kde kultura PR lépe roste. Nejrychleji klesá v živném mediu Imuna, nejpomaleji v živném mediu s vitaminovým růstovým suplementem. To bylo pravděpodobně způsobeno tím, že růstový suplement příliš okyselil živné medium označené vitamíny a proto kultura PR hned nerost-

1a. Kultura PR má schopnost růstu i v kyselém prostředí s pH kolem 4, ale pravděpodobně se musí na takové prostředí nejdříve adaptovat, k tomu jí může pomáhat i tvorba exopolysacharidů.

Tab.31: Viskozita živných médií v průběhu růstového testu

Dny kultivace	Průměr viskozity [mPa.s]					
	KA Imuna	KA Himedia	Kvas. extrakt	VL medium	B-komplex	Vitamíny
0	1,18	1,19	1,12	1,19	1,14	1,18
1	1,41	1,27	1,15	1,13	1,12	1,18
2	2,63	1,44	1,39	1,23	1,76	1,39
3	15,26	1,61	1,36	1,48	1,36	1,21
4	10,87	1,64	1,43	1,29	1,30	1,44
8	127,50	2,49	2,63	1,47	1,49	1,25
10	158,50	3,85	4,74	1,52	1,38	1,23
11	159,30	3,11	2,73	1,61	1,72	1,22



Obr.23: Závislost viskozity živných médií na dnech kultivace v růstovém testu

Hlavní úkol tohoto testu bylo pokusit se zjistit, který faktor je nutný k tvorbě polysacharidu kulturou PR. Jak je vidět na obrázku 23, viskozita roste pouze v případě živného média se starým kvasničným autolyzátem od firmy Imuna, všechna ostatní živná media dosahují zanedbatelných hodnot viskozity. Tímto pokusem se tedy nepodařil objasnit hlavní faktor, který je potřebný pro tvorbu exopolysacharidů kulturou PR. Jediné, co se potvrdilo, je, že v tekutých živných médiích je kvasničný autolyzát od firmy Imuna nezbytný k tomu, aby kultura PR vytvářela polysacharidy ve velkém množství.

9.6 Shrnutí výsledků kultivačních testů vedoucích k optimalizaci živného média z hlediska tvorby exopolysacharidů

Pomocí kultivačních pokusů v tekutých živných médiích byly zjištěny následující optimální podmínky pro kultivaci kultury PR v tekutých živných médiích za účelem nejvyšší produkce exopolysacharidů.

- Nejvhodnější poměr kapalné a vzdušné fáze v kultivačních lahvích je 1 : 4
- Živné medium pufrované 10x ředěným fosfátovým pufrem, M/150
- Sacharosa se jeví jako jediný vhodný substrát, 10%
- 10 dnů dlouhá kultivace pro standardní (TYM+S: 6 g tryptonu a 3 g kvasničného autolyzátu na 1000 ml), pro medium bohatší o kvasničný autolyzát (TYMK+S: 6 g tryptonu a 6 g kvasničného autolyzátu na 1000 ml) stačí kultivace 4 dny
- Kvasničný autolyzát musí být dodán firmou Imuna

10 ZÁKLADNÍ ANALYTICKÉ STANOVENÍ HRUBĚ PŘEČIŠTĚNÉHO POLYSACHARIDU

K těmto základním stanovením byl využit polysacharid získaný v kultivačním testu ke zjištění dusíkatých potřeb. Vzorek A značí polysacharid získaný ze standardního živného média TYM+S a vzorek B značí polysacharid získaný z chudšího živného média, TYMCH+S. Tyto polysacharidy byly z časových důvodů přečištěné pouze 1x a poté byly rozpuštěny v 50 ml destilované vody (původní objem živného média, z něhož byly získány). Každý vzorek se v pokusech měřil ve 2 paralelních stanoveních a 3x vedle sebe.

Tab.32: Ztráty polysacharidu hrubým přečištěním

Vzorek	Hmotnost surového EPS [g]	Hmotnost hrubě přečištěného EPS [g]	Ztráty [%]
A ₁	2,68	1,69	36,9
A ₂	2,64	1,73	34,47
B ₁	2,46	1,57	33,71
B ₂	2,14	1,27	40,65

Surový polysacharid ztratil prvním hrubým přečištěním kolem 30 až 40% své původní hmotnosti. Přečištěný polysacharid byl také výrazně bělejší než původní surový polymer. Vykazoval také odlišné vlastnosti od surového polysacharidu. Surový polysacharid byl žlutý až nahnědlý, jeho povrch lepil a v destilované vodě klesal ke dnu. Přečištěný polysacharid byl světle žlutý až bělavý, nelepil a na vodě určitou dobu plaval.

10.1 Sušina a popel exopolysacharidu

Sušina a popel byly stanoveny podle postupu uvedeném v kapitole 7.1.

Tab.33: Sušina přečištěného exopolysacharidu z *TYM+S* a *TYMCH+S*

Vzorek	měření	Hmotnost EPS v 5 ml [g]	Průměr [g]	Sušina v přečištěném roztoku [g/l]	Sušina přečištěného polysacharidu [%]
A ₁	1.	0,01486	0,01481	29,62	87,63
	2.	0,01473			
	3.	0,01484			
A ₂	1.	0,01486	0,01467	29,34	84,79
	2.	0,01486			
	3.	0,01429			
B ₁	1.	0,01347	0,01327	26,54	84,52
	2.	0,01332			
	3.	0,01301			
B ₂	1.	0,01144	0,01111	22,22	87,48
	2.	0,01105			
	3.	0,01085			

Tab.34: Stanovení popela v sušině přečištěného exopolysacharidu

Vzorek	měření	Hmotnost popela v 5 ml [g]	Průměr [g]	Popel v roztoku [g/l]	Popel v sušině polysacharidu [%]
A ₁	1.	0,00167	0,00153	3,06	10,33
	2.	0,00164			
	3.	0,00129			
A ₂	1.	0,00150	0,00123	2,46	8,39
	2.	0,00110			
	3.	0,00110			
B ₁	1.	0,00097	0,00109	2,18	8,21
	2.	0,00129			
	3.	0,00101			
B ₂	1.	0,00111	0,00104	2,08	9,36
	2.	0,00113			
	3.	0,00087			

Výsledky v tabulkách 33 a 34 udávají sušinu polysacharidu. Průměrná sušina pro vzorek A, získaný z TYM+S, činí 86,21% a z toho je 9,36% nespalitelných popelovin. Průměrná sušina pro vzorek B, získaný z chudšího živného media TYMCH+S, činí 86%, z toho je 8,79% nespalitelných popelovin. Co se týká sušiny a popela, vzorek A a B se od sebe tedy liší velmi málo.

10.2 Stanovení celkového a organického uhlíku

Stanovení celkového a organického uhlíku bylo provedeno na analyzátoru uhlíku Schimadzu 5000A.

Tab.35: Celkový a organický uhlík v exopolysacharidu z TYM+S a TYMCH+S

Vzorek	měření	Celkový uhlík v roztoku [g/l]	Celkový uhlík v polymeru Průměr [mg/g sušiny polymeru]	Organický uhlík v roztoku [g/l]	Organický uhlík v polymeru Průměr [mg/g sušiny polymeru]
A ₁	1.	13,066	469,26	12,872	462,57
	2.	13,106		12,912	
	3.	15,526		15,320	
A ₂	1.	13,332	445,85	13,126	439,20
	2.	13,116		12,922	
	3.	12,792		12,606	
B ₁	1.	12,130	454,46	11,938	447,03
	2.	12,068		11,858	
	3.	11,986		11,796	
B ₂	1.	9,874	444,69	9,688	435,60
	2.	9,800		9,608	
	3.	9,968		9,742	

Výsledky měření uhlíku pro vzorek A, získaný ze standardního živného media TYM+S, udává průměrně 457,56 mg/g celkového uhlíku v sušině, z toho průměrně 450,89 mg tvoří organický uhlík. Celkový uhlík v sušině pro vzorek B, získaný z chudšího média TYMCH+S, vykazuje průměrné hodnoty 449,575 mg/g a z toho je v průměru 441,32 mg organického původu.

10.3 Stanovení bílkovin

Polymer získaný z kultury PR nemusí být čistě polysacharid, mohl by obsahovat i bílkoviny, proto bylo provedeno stanovení bílkovin pomocí bicincholinové kyseliny. Obsah bílkovin byl vypočítán pomocí kalibrační křivky na obrázku 1.

Tab.36: Stanovení bílkovin v exopolymeru kultury PR

Vzorek	měření	Absorbance při 562nm [1]	Koncentrace bílkovin v roztoku [g/l]	Průměr koncentrace polymeru [mg/g sušiny]
A ₁	1.	0,456	1,764	65,36
	2.	0,480	1,971	
	3.	0,492	2,074	
A ₂	1.	0,482	1,988	65,99
	2.	0,470	1,884	
	3.	0,695*	-	
B ₁	1.	0,404	1,316	50,00
	2.	0,404	1,316	
	3.	0,408	1,350	
B ₂	1.	0,338	0,747	39,06
	2.	0,345	0,807	
	3.	0,345	0,807	

Pozn: *.....při stanovení byla zkumavka znečištěna, proto byla tato hodnota vyloučena

V tabulce 36 jsou výsledky stanovení bílkovin. Průměrná hodnota koncentrace bílkovin pro vzorek A byla vypočtena na 65,68 mg/g sušiny přečištěného polymeru. V případě chudšího živného média TYMCH+S činí průměrná hodnota koncentrace bílkovin 44,53 mg/g sušiny přečištěného polymeru. Podle těchto výsledků je možné, že produkt, který vytváří kultura PR nemusí být čistý polysacharid nebo může být obsah bílkovin v produktu pouze zbytek nečistot, které se nepodařilo odstranit hrubým přečištěním polysacharidu.

10.4 Stanovení sacharidů

Celkové množství sacharidů bylo stanoveno pomocí fenol – sulfátové metody v mikrotitračních destičkách. Koncentrace sacharidů v roztoku jednotlivých vzorků byla vypočtena pomocí rovnice kalibrační křivky, která je na obrázku 2.

Tab.37: Celkové množství sacharidů v exopolysacharidu kultury PR

Vzorek	měření	Absorbance při 490 nm [1]	Průměr absorbance [1]	Koncentrace sacharidů v roztoku [g/l]	Koncentrace sacharidů v polymeru [mg/g sušiny]
A ₁	1.	0,8235	0,8505	3,3504	113,12
	2.	0,8615			
	3.	0,8665			
A ₂	1.	0,8703	0,8264	3,2460	79,55
	2.	0,8218			
	3.	0,7870			
B ₁	1.	0,7830	0,7953	3,1100	117,18
	2.	0,8298			
	3.	0,7730			
B ₂	1.	0,6968	0,6640	2,5400	114,31
	2.	0,6628			
	3.	0,6325			

Pozn.: Koncentrace je přepočtena na ředění vzorků. Každé ze 3 měření jednotlivých vzorků je průměr ze 4 hodnot absorbance

V tabulce 37 je znázorněno celkové množství sacharidů v hrubě přečištěném polymeru. Průměrná hodnota koncentrace sacharidů v sušině pro vzorek A, získaný ze standardního živného media TYM+S, je 96,34 mg/g. Průměrná hodnota pro vzorek B, získaný z chudšího živného media TYMCH+S, je o něco vyšší a dosáhla hodnoty 115,75 mg/g.

10.5 Shrnutí výsledků základního analytického stanovení hrubě přečištěného polysacharidu

Hrubým přečištěním ztratil polysacharid v průměru 30 až 40% své původní hmotnosti. Vzorek, získaný ze standardního živného media TYM+S, vykazoval následující hodnoty. Sušina vzorku činila 86,21% a z toho bylo 9,36% nespalitelných popelovin. Tento vzorek obsahoval průměrně 457,56 mg/g celkového uhlíku v sušině a z toho bylo v průměru 450,89 mg uhlíku organického původu. Vzorek obsahoval v sušině průměrně 65,68 mg/g bílkovin a 96,34 mg/g sacharidů.

Druhý vzorek, získaný z chudšího živného media TYMCH+S, vykazoval hodnoty o něco nižší. Sušina tohoto vzorku byla stanovena na 86%, z čehož bylo 8,79% nespalitelných popelovin. Při stanovení uhlíku bylo dosaženo průměrné hodnoty 449,575 mg/g celkového uhlíku v sušině a z toho bylo v průměru 441,32 mg uhlíku organického původu. Koncentrace bílkovin a sacharidů v sušině tohoto vzorku byly stanoveny 44,53 mg/g a 115,75 mg/g.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo pokusit se identifikovat kulturu PR a také optimalizovat tekuté živné medium s ohledem na produkční schopnosti kultury PR. Pro konečné ucelení celé práce bylo provedeno ještě základní analytické stanovení hrubě přečištěného polysacharidu, který byl získán v průběhu práce.

Pro identifikaci bylo zjištěno množství základních informací o kultuře PR. Z důležitých výsledků uvedu, že kultura PR patří do grampozitivních bakterií, jejíž buňky mají tvar tyčinek se zakulacenými konci. Buňky občasně řetízkují či vytvářejí shluky. Kultura PR netvoří spory, roste ve velkém rozsahu teplot (5 – 45°C) a také v silně kyselém prostředí s hodnotou pH kolem 4. Tato kultura je schopná růst aerobně, mikroaerofilně i anaerobně a dovede využít celou řadu cukrů pro své potřeby. Polysacharidy na pevných živných půdách však tvoří jen ze sacharosy a v menším množství také z glukosy. Za účelem identifikace byla provedena také řada biochemických testů pro zjištění biochemických vlastností kultury PR, celková identifikace kultury PR ale nakonec nebyla dosažena. Podle získaných výsledků může kultura PR nejpravděpodobněji patřit k bakteriím rodu *Lactobacillus* nebo se jedná o méně známou bakterii nejasného taxonomického zařazení.

Z hlediska optimalizace produkčního tekutého živného media bylo zjištěno několik základních vlastností a podmínek, které musí být splněny pro vyšší produkci exopolysacharidů. Nejvhodnější poměr kapalné a vzdušné fáze v kultivačních lahvích se ukázal poměr 1:4. Velmi důležité je také vhodně pufrovat živné medium a to 10x ředěným fosfátovým pufrům s molaritou M/150. Dále bylo zjištěno, že sacharosa se jeví jako jediný vhodný substrát pro produkci exopolysacharidů kulturou PR v tekutých médiích. To je ale velmi výhodné z hlediska možné budoucí průmyslové produkce, protože sacharosa se dá označit jako levná surovina. Pro vysokou produkci exopolysacharidů v tekutých médiích je nutné využít pro přípravu živného media kvasničný autolyzát od firmy Imuna, protože s jinými substráty tvoří kultura PR exopolysacharidy v minimálním množství. Délka potřebné doby kultivace se liší podle množství dodaných dusíkatých látek. Standardní živné medium TYM+S je vhodné kultivovat 10 dnů, pro bohatší media se potřebná kultivační doba zkracuje.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SUTHERLAND, Ian W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, 2001, 11, s. 663 – 674
- [2] DE VUYST, Luc , DEGEEST, Bart. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 1999, 23, s. 153 - 177
- [3] FUSCONI, R., GODINHO, M. J. L. ,HERNÁNDEZ, I. L. C., BOLOSSAN, N. R. *S. Gordonia polyisoprenivorans* from groundwater contaminated with landfill leachate in a subtropical area: characterization of the isolate and exopolysaccharide production. *Brazilian journal of mikrobiology*, 2006, 37, s. 168-174
- [4] MORILLO, J. A., DEL ÁGUILA, V. G., AGUILERA, M., RAMOS-CORMENZANA, A., MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M. Production and characterization of the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae* grown on olive mill-waste waters. *World journal of microbiology & biotechnology*, 2007, 12, s. 1705-1710
- [5] URAI, M. , AIZAWA, T., ANZAI, H. et al. Structural analysis of an extracellular polysaccharide produced by a benzene tolerant bakterium, *Rhodococcus* sp.33. *Carbohydrate research*, 2006, 5, s. 616-623
- [6] MAINA, N.H., TENKANEN, M., MAAHEIMO, H., et al. NMR spectroscopic analysis of exopolysaccharides produced by *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa*. *CARBOHYDRATE RESEARCH*, 2008, 9, s. 1446-1455
- [7] LAWS, A., GU, Y. , MARSHALL, V. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology advances*, 2001, 19, s. 597 – 625
- [8] DE VUYST, L., DE VIN, F., VANINGELGEM, F., DEGEEST, B. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 2001, 11, 9, s. 687-707.
- [9] LAMBO-FODJE, A. M., LEEMAN, M., WAHLUND, K.-G., NYMAN, M., ÖSTE, R., LARSSON, H. Molar mass and rheological characterisation of an exopolysaccharide from *Pediococcus damnosus* 2,6. *Carbohydrate polymers*, 2007, 68, s. 577-586

- [10] CANQUIL, L., VILLARROEL, M., BRAVO, S., et al. Behavior of the rheological parameters of exopolysaccharides synthesized by three lactic acid bacteria. *CARBOHYDRATE POLYMERS*, 2007, 2, s. 270-279
- [11] MUHARUMADI, AHMED, N. Isolation and characterization of exopolysaccharide produced by indigenous soil bacterium *Bacillus* strain CMG1403. *IRANIAN POLYMER JOURNAL*, 2008, 5, s. 315-323
- [12] VIJAYENDRA, S. V. N., PALANIVEL, G., MAHADEVAMMA, S., THARANATHAN, R. N. Physico-chemical characterization of an exopolysaccharide produced by a non-ropy strain of *Leuconostoc* sp. CFR 2181 isolated from dahi, an Indian traditional lactic fermented milk product. *CARBOHYDRATE POLYMERS*, 2007, 72, s. 300-307
- [13] PERRY, M. B., MACLEAN, L. L., PATRAUCHAN, M. A., VINOGRADOV, E. The structure of the extracellular polysaccharide produced by *Rhodococcus* sp. RHA1. *Carbohydrate Research*, 2007, 342, s. 2223-2229
- [14] LEELA, J. K., SHARMA, G. Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*. *Bioprocess Engineering*, 2000, 23, s. 687-689
- [15] HE, N., LI, Y., CHEN, J., LUN, S.-Y. Identification of a novel bioflocculant from a newly isolated *Corynebacterium glutamicum*. *Biochemical Engineering Journal*, 2002, 11, s. 137-148
- [16] MÅRTENSSON, O., DUENAS-CHASCO, M., IRASTORZA, A., ÖSTE, R., HOLST, O. Comparison of growth characteristic and exopolysaccharide formation of two lactic acid bacteria strains, *Pediococcus damnosus* 2,6 and *Lactobacillus brevis* G-77, in an oat-bases, non-dairy medium. *Lebensm.-Wiss*, 2003, 36, s.353-357
- [17] GU, X.M., WU, H. M., MA, G. R. Isolation, purification and structural elucidation of EPS-I, an extracellular polysaccharide from *Enterococcus durans*. *CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES-CHINESE*, 2004, 7, s. 1288-1290
- [18] KUMAR, C. G., JOO, H.-S., KAVALI, R., CHOI, J.-W., CHANG, CH.-S. Characterization of an extracellular biopolymer flocculant from a haloalkalophilic Ba-

- cillus isolate. World journal of microbiology & biotechnology, 2004, 20, s. 837-843
- [19] URAI, M., YOSHIKAWA, H., ANZAI, H., OGIHARA, J., IWABUCHI, N., HARAYAMA, S., SUNAIRI, M., NAKAJIMA, M. Structural analysis of mucoi-dan, an acidic extracellular polysaccharide produced by a pristane-assimilating marine bacterium, *Rhodococcus erythropolis* PR4. Carbohydrate Research, 2007, 342, s. 927-932
- [20] HUGH R., LEIFSON E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 1952, 66, s. 24 – 26.
- [21] BAROŠOVÁ, 2008, 2009, osobní sdělení
- [22] HÄUSLER J. Mikrobiologické metody kontroly jakosti vod II, Ministerstvo ŽP, nakl. Brázda, Praha. ISBN 80-85368-01-3.
- [23] PIŠTĚKOVÁ H. Možnosti izolace a charakterizace bakteriálních polysacharidů. Diplomová práce. UTB ve Zlíně, 2007.
- [24] SMITH P. K. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Foreign Patent documents, 1960. 436/80,86,87,88,164
- [25] HUSÁROVÁ L. Flokulační vlastnosti bakteriálních exopolymerů. Diplomová práce. UTB ve Zlíně, 2009.
- [26] DUBOIS M., GILLES K. A., HAMILTON J. K., REBERS P. A., SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical chemistry 1955.
- [27] CUDLÍN J. Vybrané metody v mikrobiologii. Academia, Praha 1981.
- [28] SEDLÁČEK I. Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita, Brno 2007. ISBN: 80-210-4207-9

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BCA	Bicincholinová kyselina
ECP	Extracelulární polymery, exopolymery
EPS	Extracelulární polysacharidy, exopolysacharidy
FACEPS	Exopolysacharidy obsahující mastné kyseliny (fatty acid-containing extracellular polysaccharides)
FT-IR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GRAS	Bezpečné organismy (Generally Recognized As Safe)
HPLC	Kapalinová chromatografie
KA	Kvasničný autolyzát
M/15 – M/150	Molarita fosfátového pufru nebo také označení živných médií, podle obsažených pufrů
NMR	Nukleární magnetická rezonance
OD ₆₀₀	Absorbance měřená při 600 nm
OF	Oxidačně fermentační (test, medium)
OMWW	Odpadní voda z mletí oliv
PCB	Polychlorované bifenyly
PHB	Kyselina poly- β -hydroxy máselná
PR	Označení mikrobiální kultury
TYA	Pevná živná půda (tryptone yeast extract agar)
TYM+S	Základní tekuté živné medium se sacharosou
TYMCH+S	Tekuté živné medium, chudší o trypton i kvasničný autolyzát
TYMK+S	Tekuté živné medium, bohatší o kvasničný autolyzát
TYMT+S	Tekuté živné medium, bohatší o trypton
VL	Pevné nebo tekuté bohaté živné medium

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr.1: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci albuminu[25].....	47
Obr.2: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci xanthanu.....	49
Obr.3: TYA agar.....	52
Obr.4: VL agar.....	52
Obr.5: TYA agar se 2% sacharosy.....	53
Obr.6: TYA agar se 2% maltosy	54
Obr.7: VL agar.....	54
Obr.8: TYA agar.....	54
Obr.9: TYA se 2% sacharosy.....	56
Obr.10: VL agar, aerobní růst.....	56
Obr.11: VL agar, anaerobní růst.....	56
Obr.12: Růst kultury vyjádřený hodnotami OD ₆₀₀ v závislosti na čase.....	66
Obr.13: Závislost pH různě pufrovaných živných médií na čase.....	67
Obr.14: Závislost viskozity na pufrací kapacitě média a dnech kultivace.....	69
Obr.15: Závislost absorbance na čase v mediu se sacharosou nebo glukosou.....	71
Obr.16: Závislost pH na dnech kultivace u živných médií s glukosou a sacharosou.....	72
Obr.17: Závislost viskozity živných médií se sacharosou a glukosou na dnech kultivace.	73
Obr.18: Graf závislosti absorbance na dnech kultivace pro různě bohatá živná media.....	76
Obr.19: Závislost pH na dnech kultivace v různě bohatých živných médiích.....	77
Obr.20: Závislost viskozity různě bohatých živných médií na čase.....	79
Obr.21: Závislost hodnot OD ₆₀₀ různých živných médií v růstovém testu.....	81
Obr.22: Závislost pH na dnech kultivace v průběhu růstového testu.....	82
Obr.23: Závislost viskozity živných médií na dnech kultivace v růstovém testu.....	83

SEZNAM TABULEK

Tab.1: Využití fosfátové pufrů a jejich příprava	27
Tab.2: Složení živných médií pro test ke zjištění využití dusíkatého zdroje z hlediska tvorby EPS v TYM.....	30
Tab.3: Složení tekutých živných médií využitých v tomto testu	41
Tab.4: Příprava kalibračních roztoků.....	46
Tab.5: Absorbance v závislosti na koncentraci albuminu v roztoku standardů [25].....	47
Tab.6: Příprava standardních roztoků xanthanu v mikrotitrační destičce.....	48
Tab.7: Absorbance v závislosti na koncentraci standardních roztoků xanthanu	48
Tab.8: Výsledky kultivačního testu 1	51
Tab.9: Výsledky kultivačního testu 2	53
Tab.10: Výsledky růstového testu 3.....	55
Tab.11: Výsledky Gramova barvení	57
Tab.12: Měření buněk barvených Gramovým barvením	57
Tab.13: Výsledky biochemických testů	59
Tab.14: Viskozita živného média po 11 dnech kultivace PR v TYM+S.....	63
Tab.15: Sušina buněk při různé intenzitě centrifugace.....	63
Tab.16: Viskozita před a po centrifugaci.....	64
Tab.17: Vážkové vyhodnocení účinnosti rozpouštědel	64
Tab.18: Růst kultury v různě ředěných fosfátových pufrách, vyjádřeno hodnotami OD ₆₀₀	65
Tab.19: Závislost pH různě pufrovaných živných médií na dnech kultivace.....	67
Tab.20: Viskozita různě pufrovaných živných médií v průběhu kultivace TYM+S	68
Tab.21: Růst kultury v tekutém médiu s glukosou a sacharosou, vyjádřeno hodnotami OD ₆₀₀	70
Tab.22: pH v živném médiu se sacharosou (TYM+S) a s glukosou (TYM+G).....	71
Tab.23: Viskozita v živném médiu se sacharosou (TYM+S) a s glukosou (TYM+G)	72
Tab.24: Vážkové stanovení EPS z živného média se sacharosou (TYM+S) a s glukosou (TYM+G)	74
Tab.25: Růst kultury v různě bohatých živných médiích vyjádřena hodnotami OD ₆₀₀	76
Tab.26: pH různě bohatých živných médií	77
Tab.27: Viskozita různě bohatých živných médií.....	78

Tab.28: Vážkové stanovení polysacharidů z různě bohatých živných médií	80
Tab.29: Růst kultury PR v průběhu růstového testu	81
Tab.30: pH živných médií v průběhu růstového testu	82
Tab.31: Viskozita živných médií v průběhu růstového testu.....	83
Tab.32: Ztráty polysacharidu hrubým přečištěním	85
Tab.33: Sušina přečištěného exopolysacharidu z TYM+S a TYMCH+S	86
Tab.34: Stanovení popela v sušině přečištěného exopolysacharidu	86
Tab.35: Celkový a organický uhlík v exopolysacharidu z TYM+S a TYMCH+S	87
Tab.36: Stanovení bílkovin v exopolymeru kultury PR	88
Tab.37: Celkové množství sacharidů v exopolysacharidu kultury PR	89

EVIDENČNÍ LIST DIPLOMOVÉ PRÁCE

Sigla (místo uložení diplomové práce)	Ústřední knihovna UTB ve Zlíně
Název diplomové práce	Produkce exopolymeru bakteriální kulturou PR
Autor diplomové práce	Bc. Lenka Keprdová
Vedoucí diplomové práce	doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.
Vysoká škola	Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Adresa vysoké školy	Mostní 5139, 760 01 Zlín
Fakulta (adresa, pokud je jiná než adresa VŠ)	Fakulta technologická Nám. T.G.Masaryka 275, 762 72 Zlín
Katedra (adresa, pokud je jiná než adresa VŠ)	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Rok obhájení DP	2009
Počet stran	98
Počet svazků	1
Vybavení (obrázky, tabulky...)	23 obrázků, 37 tabulek
Klíčová slova	EPS, extracelulární polysacharidy, grampozitivní bakterie, produkce exopolymerů

