



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**PRODUKCE ORGANICKÝCH KYSELIN VLÁKNITÝMI
MIKROSKOPICKÝMI HOUBAMI A VYUŽITÍ JEJICH
BIOMASY PŘI ODSTRAŇOVÁNÍ RIZIKOVÝCH PRVKŮ**

PRODUCTION OF ORGANIC ACIDS BY FIBROUS MICROSCOPIC FUNGI AND UTILIZATION OF THEIR
BIOMASS FOR REMOVAL OF RISK ELEMENTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Zuzana Juglová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Martin Urík, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1280/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Zuzana Juglová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **RNDr. Martin Urík, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Produkce organických kyselin vláknitými mikroskopickými houbami a využití jejich biomasy při odstraňování rizikových prvků

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracování literární rešerše k tématu práce
2. Provedení analýz obsahů organických kyselin v živných médiích
3. Provedení sorpčních experimentů se získanou biomasou
4. Zpracování získaných výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Zuzana Juglová
student(ka)

RNDr. Martin Urík, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit nejvýhodnější metodu produkce organických kyselin mikroskopickou vláknitou houbou rodu *Aspergillus niger* a zjištění účinnosti bioakumulace rtuti na narostlou biomasu. Teoretická část se především zaměřuje na jednotlivé organické kyseliny, jejich využití a metabolismus jejich vzniku. Dalším bodem teoretické části je toxicita rtuti a princip bioakumulace těžkých kovů na biomasu. Experimentální část se zaměřuje především na optimalizaci kultivace, stanovení obsahu vyprodukovaných organických kyselin v závislosti na typu kultivace. Druhým bodem praktické části je porovnání bioakumulace rtuti na biomasu v závislosti na koncentraci rtuti v roztoku. V celkovém srovnání je nejlepší kultivace dynamická. Dochází k většímu nárůstu biomasy, tím pádem k vyšší produkci organických kyselin. Vyšší produkce biomasy je také výhodná pro zefektivnění bioakumulace rtuti.

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis was to determine the most advantageous method for production of organic acids by microscopic filamentous fungus *Aspergillus niger* and to evaluate mercury bioaccumulation efficiency on collected fungal biomass. The theoretical part focuses primarily on utilization, metabolism and production on individual organic acids. This is followed by section focused on the toxicity of mercury and the principles of bioaccumulation of heavy metals in biomass. The experimental part focuses mainly on the optimization of cultivation, determination of content of produced organic acids, depending on the type of cultivation. Second point of practice part is evaluating of mercury bioaccumulation depending on the initial concentration of mercury in solution. In overall comparison, the best type of cultivation is dynamic. Higher biomass yield resulted in higher production of organic acids. The higher biomass synthesis is also beneficial for bioaccumulation of mercury.

KLÍČOVÁ SLOVA

Vláknité houby, organické kyseliny, bioakumulace, rtuť

KEYWORDS

Filamentous fungi, organic acids, bioaccumulation, mercury

JUGLOVÁ, Z. *Produkce organických kyselin vláknitými mikroskopickými houbami a využití jejich biomasy při odstraňování rizikových prvků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 39 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Martin Urík, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové/bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

DECLARATION

I declare that the bachelor thesis has been worked out by myself and that all the quotations from the used literary sources are accurate and complete. The content of the bachelor thesis is the property of the Faculty of Chemistry of Brno University of Technology and all commercial uses are allowed only if approved by both the supervisor and the dean of the Faculty of Chemistry, BUT.

.....
student's signature

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce RNDr. Martinovi Uríkovi, Ph.D. a konzultantovi doc. Ing. Pavlovi Divišovi, Ph.D za cenné rady, odbornou pomoc a čas, který mi věnovali v průběhu tvorby bakalářské práce.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Transport a syntéza organických kyseliny.....	9
2.1.1	Syntéza a extracelulární transport kyseliny citronové	9
2.1.2	Syntéza kyseliny glukonové	13
2.1.3	Syntéza a transport kyseliny oxalové.....	14
2.1.4	Syntéza kyseliny itakonové.....	15
2.2	Biosoropce a bioakumulace kovů biomasou mikroskopických vláknitých hub 16	
2.3	Rtuť a její toxicita.....	17
2.4	Kapilární isotachoforéza	19
2.4.1	Instrumentace	19
2.5	Atomová absorpční spektroskopie (Altec AMA 254)	20
2.5.1	Stanovení rtuti	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1	Laboratorní vybavení.....	22
3.2	Použité chemikálie.....	22
3.2.1	Chemikálie využité pro kultivaci vláknitých hub	22
3.2.2	Chemikálie využity jako standard pro isotachoforézu.....	22
3.2.3	Chemikálie využity pro isotachoforézu	22
3.2.4	Chemikálie využity pro CV – AAS	22
3.3	Kultivace <i>A. niger</i> pro stanovení organických kyseliny a bioakumulace.....	23
3.4	Příprava roztoků.....	23
3.4.2	Bioakumulace Hg^{2+} biomasou druhu <i>A. niger</i>	24
3.5	Růstové křivky.....	24
3.6	Stanovení organických kyseliny isotachoforézou	24
3.7	Stanovení obsahu rtuti v kapalných vzorcích metodou CV - AAS	25
4	VYHODNOCENÍ DAT A DISKUZE	26
4.1	Růstové křivky.....	26
4.2	Produkce organických kyselin dynamickou a statickou kultivací a změny v pH 27	
4.3	Bioakumulace rtuti <i>A. niger</i>	31

5 ZÁVĚR	33
6 CITACE	34
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	39

1 ÚVOD

Organické kyseliny hrají důležitou roli v ekologii a průmyslovém využití. Jedním z průmyslových způsobů výroby organických kyselin je využití extracelulární produkce těchto látek v průběhu kultivace mikroskopických hub. Mikroskopické houby nežijí v přirozeném prostředí, které je bohaté na volné cukry, proto nemají vyvinutý regulační systém pro produkci kyselin. Tedy pokud je kultivujeme v prostředí bohatém na zdroje lehce dostupných sacharidů, mohou se soustředit pouze na produkci kyselin, což vede k jejich zániku. Toho se využívá v průmyslu pro maximální produkci kyselin [1].

Existuje několik hypotéz, proč tyto látky mikroskopické vláknité houby produkují do extracelulárního prostředí. Význam organických kyselin je především v jejich interakci s přirozeným okolím, ve kterém se houby vyskytují (většinou půdy), ale také jejich produkce organických kyselin nepřímo souvisí s poklesem pH [2]. Organické kyseliny umožňují žít různým druhům mikroorganismů v prostředí, kde koncentrace bio – přístupných esenciálních kovů jsou nízké. Díky nim může docházet k mobilizaci minerálních živin z půdy. Uvolněné ionty kovů může využívat mikroorganismus, ale zároveň i rostliny. To je způsobeno chelatačními vlastnostmi organických kyselin ve spojení s rozpustností většiny sloučenin kovů v kyselém prostředí [1].

Tyto specifické vlastnosti mikroorganismů byly studovány zejména v těžebním průmyslu biohydrometalurgii. Zatím co bakterie byly přijaty v této oblasti pro zpracování méně kvalitních rud, zejména sulfidových minerálů, pro minerály silikátové, uhličitánové a oxidové, které nemohou být zpracovány autotrofními bakteriemi, se využívají heterotrofní mikroskopické houby. Výsledek jejich aplikace bývá extrakce požadovaných prvků z různých typů odpadních materiálů. Například kombinace izolátů *Aspergillus* a *Penicillium* mohou být využívány pro extrakci kobaltu a niklu, nebo izoláty *Aspergillus* s bakterií (*Bacillus* nebo *Pseudomonas*) se využívá pro extrakci zinku a niklu [3].

Dalším důvodem je produkce organických kyselin u saprofytických hub, které využívají především chelatačních vlastností oxalátů. Hyfy hub v lumenu rostlinné buňky produkují železo – redukující sloučeninu, peroxid vodíku a kyselinu šťavelovou. Kyselina šťavelová váže Fe^{3+} jako komplex, který difunduje do buněčné stěny spolu s H_2O_2 a redukujícími sloučeninami. Se změnou pH dojde pomocí redukujících sloučenin k rozpadu Fe - oxalátového komplexu a redukci na Fe^{2+} . Fe^{2+} poté reaguje s peroxidem vodíku a vzniká hydroxylový radikál, který naruší lignocelulózu. [4]

Jedním z důvodů může být také ochrana před růstem konkurentů, pomocí lokálního snížení pH, které taky nepřímo souvisí s produkcí organických kyselin. Mikroskopické vláknité houby jsou schopny vytvořit až pH 3, a v takovém to prostředí mnoho mikroorganismů nemá schopnost žít. Tedy snížené pH dává mikroskopickým houbám konkurenční výhodu před jinými rychle rostoucími mikroorganismy, především bakteriemi [1]. Kyselé půdy vedou k nižším poměrům bakterií k houbám, ale vyskytuje se vyšší relativní počet rezidentních bakterií tolerantnějších vůči kyselinám. Zatímco méně kyselé půdy vedli k vyšším poměrům bakterií k houbám [5]. Základním mechanismem, kterým bakterie zamezily růstu hub při vysokém pH, je neschopnost velkého množství hub se přizpůsobit těmto podmínkám [6].

Pokud jde o význam produkovaných organických kyselin z hlediska interakce se životním prostředím, umožňují detoxikovat půdy od kovů [2]. Na základě experimentů mohou být kyseliny s krátkým řetězcem rozděleny do tří skupin detoxikačních činidel: silné (citronová, šťavelová kyselina), středně silné (kyselina jablečná, malonová a salicylová), slabé (kyselina jantarová, mléčná, mravenčí, octová, ftalová). Detoxikační kapacity byly rozděleny podle polohy hydroxylové a karboxylové skupiny na hlavním uhlíkatém řetězci, aby podporovaly tvorbu stabilních cyklických struktur s hliníkem nebo těžkým kovem. Například v případě hliníku můžeme říct, že v půdách se nachází ve dvou formách - monomerní (Al^{3+} a hydroxid hlinitý) a komplexovaný (hliník vytváří komplex a organickou kyselinou). Experimentálně bylo zjištěno, že růst kořene rostliny byl korelován monomerní formou Al a komplexy Al s organickou kyselinou hliník inaktivovali. Aktivita ektomycorhýzních hub tak chrání rostlinu před toxicitou tvorbou komplexů kovů a vyprodukovaných organických kyselin [7].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Transport a syntéza organických kyseliny

Příjem živin u heterogenních organismů limituje jejich růst. Pro houby jsou potřebné nejenom látky, ze kterých se staví polymerní látky organismu, ale také látky, které fungují jako kofaktory a které vytvářejí vnitřní potenciál buňky (ionty), na jejichž zpřístupnění pro buňku se v extracelulárním prostředí aktivně podílí i organické kyseliny [8].

Buňky aktivně udržují složení intracelulárního média odlišného od extracelulárního, s čím souvisí výměna (translokace) látek mezi těmito prostředními. Aby buňky zároveň zabezpečili objemový růst a turgor, musí také aktivně udržovat nezbytný osmotický gradient, který umožňuje přijímat vodu do vnitřního prostředí. Při pohybu látek proti koncentračnímu gradientu hovoříme o aktivním transportu. Také se však v transportním ději vyskytuje difuze, což je volný nebo ulehčený přechod látek přes membránu ve směru elektrochemického gradientu. Nejaktivnějším místem pro látkovou výměnu u vláknitých hub jsou růstové vrcholky, kde zároveň dochází díky plastičtější a pórovitější buněčné stěně k snadnější sekreci enzymů [8].

2.1.1 Syntéza a extracelulární transport kyseliny citronové

Parametry rozhodující o efektivitě produkce kyseliny citronové kmeny *Aspergillus niger* byly stanoveny empiricky a zahrnují vysokou koncentraci cukrů, nízký obsah dusíku, určité stopové prvky kovů, vysokou koncentraci rozpuštěného kyslíku a nízké pH [9].

Nejběžněji využívaná technika produkce kyseliny citronové je ponořená fermentace. Pomocí tohoto procesu je vytvořeno téměř 80 % celkové světové produkce. Velkou výhodou je možnost využití fermentorů vyrobených z oceli, které mají provzdušňovací zařízení (umožňuje vyšší rozpustnost kyslíku) a zároveň mají chladicí plášť, kterým můžeme udržovat teplotu fermentace [10].

Médium by se tedy mělo skládat z uhlíkového zdroje, kterým je nejčastěji lehce metabolizovatelný cukr (sacharóza, fruktóza aj.). Toho by mělo být v médiu přibližně okolo 10 - 14 %. Pokud bychom v médiu měli koncentraci cukru pod 2,5 %, nebyla by vyprodukována žádná kyselina citronová. Jako dusíkatý zdroj se využívají amoniové soli (močovina, síran amonný, chlorid amonný, pepton aj.) a koncentrace dusíku pro produkci kyseliny citronové by měla být v rozsahu 0,1 až 0,4 mol/l. Vyšší koncentrace dusíku by zvyšovala spotřebu cukru, ale snižovala by produkci. Fosfáty v médiu mají významný vliv na výtěžnost kyseliny citronové. Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4) je nejpoužívanějším zdrojem fosfátů. Doporučená koncentrace je 0,5 až 5 g/l. Koncentrace a zastoupení stopových prvků je taky faktorem ovlivňujícím výtěžnost kyseliny citronové. Kationty zinku zvyšují produkci kyseliny, zatím co hořečnaté a železité ionty mohou její výtěžnost snižovat, pokud je přítomen v médiu fosfát. Při nedostatku manganu dochází k potlačení cyklu TCA. Optimální úroveň kationtů mědi byla stanovena na koncentraci 78 mg/l a síranu hořečnatého na 0,02 - 0,025 % [10].

Hodnota pH v extracelulárním prostředí se může průběžně měnit podle aktivity metabolických drah. Nejčastějšími příčinami tvorby kyselin je snížení pH. U druhů *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. a *Rhizopus* sp., může pH velmi rychle klesat až na hodnotu 3. Obecně se dá

řící, že pH okolo 2 je vhodné pro produkci kyseliny citronové. Vyšší hodnoty okolo 6 – 6,5 jsou však optimální pro růst a produkci kyseliny v melasovém mediu [10].

V intracelulárním prostředí je pro syntézu kyseliny citronové také důležité pH. *A. niger* je schopný udržovat intracelulární pH 7,7 přesto, že v okolním prostředí je pH okolo 1,5 [11]. Enzym, který hraje klíčovou roli při udržení pH homeostáze v buňkách je H^+ - extrudující P - ATPáza lokalizovaná v cytoplazmatické membráně. Pokud by byla její specifická aktivita příliš nízká, způsobilo by to hromadění protonů v buňkách, což by vedlo ke snížení intracelulárního pH. H^+ - ATPázy patří k podskupině ATPáz P - typu, které spojují hydrolýzou ATP s aktivním transportem kationtů přes cytoplasmatickou membránu. U hub je H^+ - ATPáza převládající membránový protein. Zajímavé je, že inhibice aktivity protonových pump v přítomnosti vanadu vyvolá snížení intracelulárního pH a následně lepší produkci kyseliny citronové [12, 13].

Metabolická dráha produkce kyseliny citronové byla dobře stanovena v *A. niger*. Studie Matina a Wilsona [14] a Clelanda a Johnsona [15] ukázaly, že kyselina citronová vzniká převážně glykolýzou hexóz s následnou kondenzací C4 a C2 látek. Proces (viz Obrázek 1) lze shrnout následovně:

1. příjem cukerného substrátu
2. glykolytický katabolismus glukózy za vzniku 2 molů pyruvátu,
3. následná konverze pyruvátů na acetyl – CoA a oxalacetát,
4. kondenzace těchto dvou perkurzorů do kyseliny citronové,
5. konečné vylučování kyseliny citronové [11].

Produkce citrátu z glukózy nebo sacharózy zahrnuje velký počet enzymatických kroků a rozděluje se na dva stupně: (1) glykolýzu probíhající v cytosole a (2) kondenzaci oxalacetátu a acetyl - CoA v mitochondrii [11].

Torres a spol. [16] studovali příjem glukózy *A. niger*. Kinetická analýza pak ukázala, že aspergily mají nejméně dva transportéry glukózy. Vysoko afinitní transport glukózy byl detekován poté, co *Aspergillus* vyrostl v nízké procentní koncentraci glukózy v mediu (1 % w/v) [11].

Nízko - afinitní transportér je pak využíván při vysokých koncentracích glukózy (15 %). Oba dva transportéry jsou regulovány pomocí vznikající kyseliny citronové [1]. Transportéry glukózy vykazují sníženou aktivitu při nízkém pH a aktivita transportéru s nízkou afinitou je mnohem méně ovlivněna podmínkami prostředí [16].

Glukóza a fruktóza jsou v cytosolu fosforylovány a následně přeměněny řadou enzymů na pyruvát [1].

Tato molekula je transportována do mitochondrie, kde je přeměněna na acetyl – CoA pomocí pyruvát dehydrogenázy a následně je sloučena s oxalacetátem na citrát. V cytosolu může být převeden na oxalacetát pomocí pyruvát karboxylázy [11].

Enzym pyruvát karboxyláza katalyzuje ATP – závislou reakci mezi pyruvátem a oxidem uhličitým pro tvorbu oxalacetátu. Oxalacetát je klíčový meziprodukt pro cyklus trikarboxylové kyseliny (TCA), a ten je podmínkou pro produkci kyselin různými vláknitými houbami. Pro hromadění kyseliny jsou důležité operace v reduktivní větvi cyklu TCA [17]. Původně byl přikládán vliv lokalizaci enzymu pyruvát karboxylázy pro produkci určitého množství nebo typu organické kyseliny [18]. Tedy lokalizace pyruvát karboxylázy v cytosolu

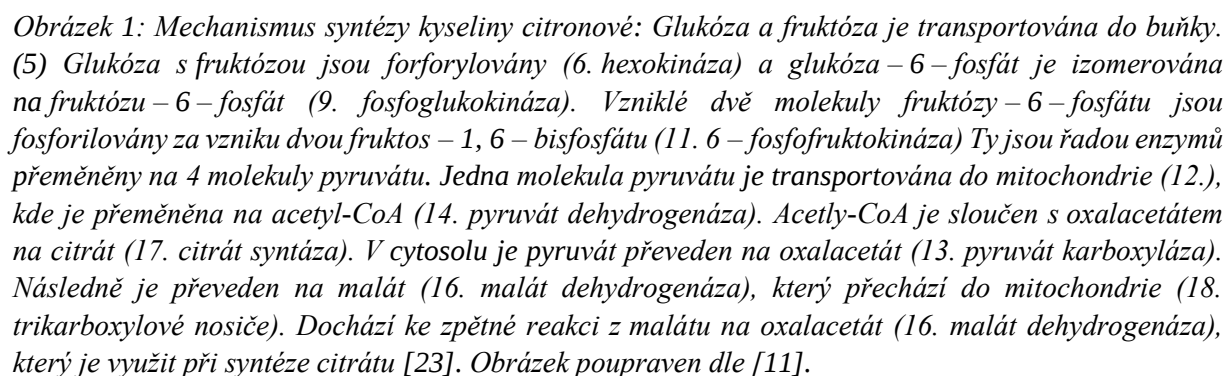
nebo v mitochondrii je důležitá pro nasměrování substrátu do cyklu TCA. To může být určující pro produkci určitého množství a typu organické kyseliny [17]. Podrobnější výzkum ale prokázal, že vztah mezi lokalizací tohoto enzymu v buňkách vláknitých hub rodu *Aspergillus* a akumulací organických kyselin není prokazatelný [19].

Oxalacetát po enzymatické přeměně na malát přechází do mitochondrie, kde dochází ke zpětné reakci z malátu na oxalacetát, který je využit při syntéze citrátu [11].

Malát v cytosolu je převedený stejným mitochondriálním nosičem jakým jsou transportovány trikarboxylové kyseliny. Je možné, že zvyšování koncentrace malátu, může vést k exportu citrátu ven z mitochondrie [20].

Export kyseliny citronové přes membránu je realizován pomocí extrémního pH gradientu mezi cytosolem a extracelulárním prostředím. Citrát existuje v různých iontových stavech v buňce, která má pH v rozmezí 6 – 7, zatím co médium má pH 2 nebo nižší. Jelikož je cytoplazmatická membrána pro citrátový anion permeabilní, přestupuje pravděpodobně do extracelulárního prostředí difuzí [21]. Koncentrace kyseliny citronové v intracelulárním prostředí je, ale o několik řádů nižší než v extracelulárním prostředí [22]. Jestli se kyselina citronová, hromadí extracelulárně při běžné koncentraci 1 M, její koncentrace v cytosolu je 2 - 30 mM [11]. Proto se předpokládá, že se kyselina citronová transportuje také aktivně za využití ATP. Tento transport je velmi citlivý na metabolické inhibitory. Bylo také zjištěno, že při pH 4 se sníží rychlost exportu citrátu na 42 % z rychlosti exportu při pH 2 [21]. Přejod kyseliny citronové z buňky může být velmi důležitým krokem v řízení toku. Proto je kyselina citronová průběžně odebírána při velkoobjemových produkcích [20].

Zajímavým vztahem je účinek kationtů Mn^{2+} na kmen *A. niger*. Pokud je v médiu nedostatek Mn^{2+} , dochází k změně vlastností permeáz pro příjem citrátu a k inverzi směru transportu tohoto nosiče. Absence Mn^{2+} tak vede k zvýšení extracelulární koncentrace kyseliny citronové [22].

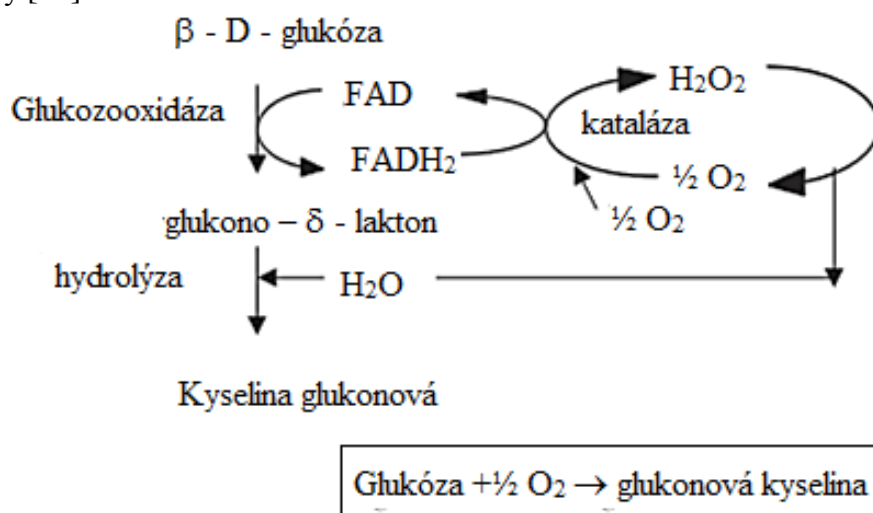


2.1.2 Syntéza kyseliny glukonové

Na rozdíl od kyseliny citronové, kdy se tvoří kyselina v buňce, vzniká kyselina glukonová extracelulárně [11]. V bakteriích je kyselina glukonová tvořena pomocí glukóza dehydrogenázy vázané na membránu, která využívá jako koenzym pyrolochinolin chinon, u hub je glukonová kyselina tvořena ve dvou krocích zahrnující (viz Obrázek 2):

1. oxidaci β -D-glukózy na D-glukono- δ -lakton enzymem glukozooxidázou za pomoci redukce FAD na FADH_2
2. enzymovou nebo samovolnou hydrolýzou na lakton a kyselinu glukonovou [20].

Oba využívané enzymy se nacházejí mimo hyfy, především v buněčných stěnách [20]. Protože může být proces katalyzován i v místě, kde chybí enzym glukozooxidáza pomocí katalázy z *A. niger*, tedy za vhodných podmínek, může být takto přeměněno téměř 100 % glukózy [11].



Obrázek 2: Oxidace glukózy na glukonovou kyselinu pomocí *A. niger* [23] Při redukční reakci glukozooxidáza katalyzuje oxidaci β -D-glukózy na D-glukono- δ -lakton, který je enzymaticky hydrolyzován na kyselinu glukonovou. Následně je FAD v kruhu redukován na FADH_2 . V oxidační polovině reakce se redukováná glukozooxidáza reoxiduje kyslíkem za vzniku H_2O_2 . Peroxid vodíku se pak katalázou štěpí na vodu a kyslík. Vzniklá voda je využita pro hydrolýzu D-glukono- δ -lakton na kyselinu glukonovou [24].

Glukonová kyselina je produkována rozmanitými mikroorganismy, jako jsou *Aspergillus*, *Penicillium*, *Pseudomonas* a *Gluconobacter*. Průmyslově nejvíce využívanými organismy ale jsou *A. niger* a *Gluconobacter* spp. V roce 1930 byla zavedena produkce glukonové kyseliny kmenem *A. niger*. Bylo zjištěno, že podmínky vedoucí k expresi glukozooxidázy (GOD), jsou také optimálními podmínkami pro průmyslovou výrobu glukonové kyseliny [20]. GOD je velmi specifickým enzymem. Jeho nízkou aktivitu způsobují substráty jiné než je β -D-glukóza, jako jsou např. D-mannosa, D-galaktosa aj. Inhibitory pro GOD jsou Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , hydroxylamin, hydrazin, fenyhydrazin atd. GOD z hlediska složení aminokyselin obsahuje zejména histidin, arginin, tyrosin, v menším zastoupení jsou lysin a fenylalanin. Studie také ukázaly, že nezbytnou součástí média pro funkci GOD je uhličitán vápenatý o koncentraci přibližně 3,5 %, kdy je dosaženo nejvyšší úrovně produkce GOD. Dalšími limitujícím faktorem je okysličení média: s rostoucím provzdušněním jednak roste produkce a také roste i sám mikroorganismus a pH. Optimum pH nemusí být vždy stejné

pro produkci jako pro růst, většinou se pro optimální produkci pohybujeme okolo hodnot 6 až 7 [24].

Hodnota pH je jednou z nejdůležitějších hodnot pro růst hub i pro produkci kyseliny glukonové. Téměř okolo 50 % produkce glukonové kyseliny bylo pozorováno při pH 5 – 7, nejlepší výtěžek pak byl pozorován při pH 6. Optimální teplota pro fermentaci byla okolo 30 °C, stejně jako pro růst mycelia. Při teplotě 45 °C byl vliv teploty na produkci zanedbatelný. Můžeme říct, že při zvyšování aerace se zvyšuje i produkce kyseliny glukonové. Glukóza a fruktóza byly nalezeny jako nejvhodnější zdroj uhlíku. Na druhé straně, lze říct, že při karboxymethyl celulóze, laktóze, galaktóze a celobióze nevznikla žádná kyselina glukonová. Bylo zjištěno, že lepší konverze glukózy na kyselinu glukonovou byla v poměrně zředěném médiu obsahujícího 10 – 20 % glukózy. Zdrojem dusíku je nejlepší 1% pepton, močovina byla nejhorším zdrojem dusíku. Zlepšení konverze glukózy na kyselinu glukonovou, někdy zajišťují anorganické soli. Pokud přidáme $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ v koncentraci vyšší než 0,025 %, stimuluje to produkci. Na druhé straně při přidání KH_2PO_4 o koncentraci vyšší než 0,05 % se produkce kyseliny snižuje. Volný chlorid draselný v médiu nemá významný vliv na produkci kyseliny glukonové. Obecně můžeme říct, že koncentrace anorganických solí vyšší než 0,1 % s pH 6,5 nejsou přínosné pro produkci kyseliny glukonové [25].

2.1.3 Syntéza a transport kyseliny oxalové

Šťavelová kyselina je produkována různými mikroskopickými houbami, zahrnující jak saprofytické tak fytopatogenní druhy [8]. Úloha patogeneze kyseliny šťavelové spočívá v okyselení tkání a sekvestraci vápníku z buněk tvorbou oxalátu vápenatého [26]. U fytopatogenních hub se předpokládá, že kyselina usnadňuje degradaci buněčné stěny rostlin [27]. To způsobuje onemocnění hospodářsky významných plodin, jako jsou brambory, fazole, chmel aj. V časně patogenezi se kyselina šťavelová akumuluje v infikovaných tkáních a patogen kolonizuje hostitelskou tkáň. Nepřímo také inhibuje aktivitu enzymů [26]. U saprofytických druhů, jako je *A. niger*, je hlavní role šťavelové kyseliny méně jasná. Produkce může souviset s mobilizací polysacharidů z rostlinných buněčných stěn. Jak okyselováním, tak chelatací může kyselina šťavelová také zvyšovat dostupnost kovových iontů [27].

Dalším důvodem tvorby této kyseliny může být biologická konkurence a detoxikace prostředí, např. vznik málo rozpustných oxalátů mědi zvyšuje toleranci vůči tomuto toxickému iontu [27].

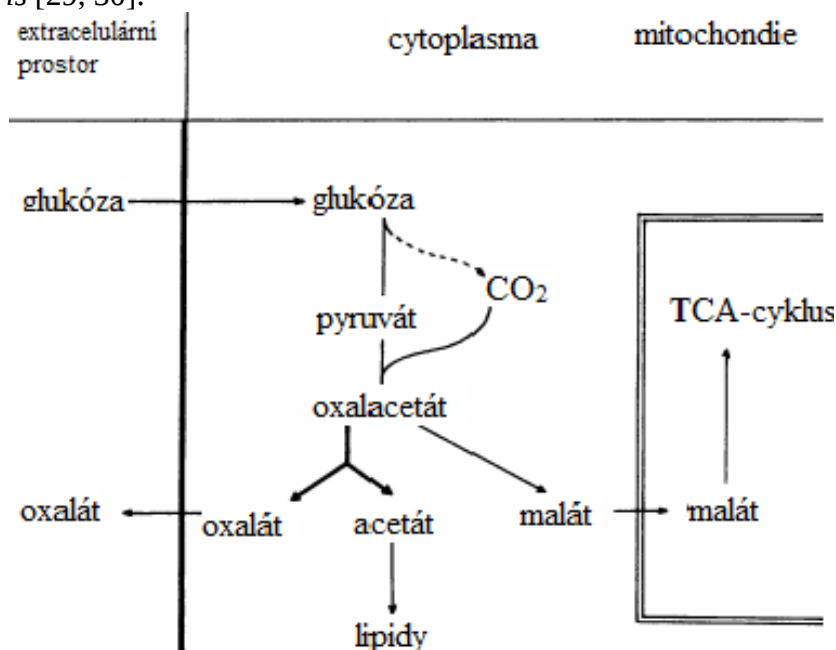
Biosyntéza kyseliny šťavelové vláknitými houbami je zvýhodněná vysokým pH média [28]. Při nízkém pH se téměř vůbec nevylučuje do extracelulárního prostředí, kde ji nahrazuje kyselina citronová [29]. To způsobuje problém při využití melasy jako substrátu pro její syntézu. Ta má pufrací schopnosti v rozmezí pH 5-6 [28].

U *A. niger* je biosyntéza oxalátu dána působením oxalacetát hydrolázy v cytosole, pro kterou je esenciální přítomnost Mn^{2+} . Tento enzym katalyzuje hydrolýzu oxalacetátu na oxalát a acetát v neutrálních až alkalických prostředích a za přítomnosti uhličitanu. Oxalát je produkován větví z dráhy pro tvorbu kyseliny citronové. Proto proces produkce probíhá stejně jako u kyseliny citronové až po oxalacetát vytvořený v cytosolu. Zde začíná působit

oxalacetát hydroláza (rozštěpení oxalacetátu na oxalát a acetát) a dochází k rychlému transportu oxalátu ven z buňky (viz Obrázek 3) [1].

Kyselina šťavelová je totiž toxická, a proto musí být celá transportována do extracelulárního prostředí. K akumulaci intracelulární kyseliny šťavelové dochází pouze v přítomnosti fosfátů a dusíku, pH musí být okolo neutrální hodnoty [28].

Další metabolickou dráhou syntézy oxalátu je oxidace glyoxalátu enzymem glyoxalát – NADP oxidoreduktáza (glyoxalát dehydrogenáza). Glyoxalát vzniká působením lyázy na isocitrát. Produkce glyoxalát dehydrogenázy je indukována při pH větším než 3,5 a optimální hodnotou pro aktivitu je pH 9. Tato dráha byla identifikována u několika druhů mikroskopických hub, jako je *Sclerotium rolfii*, *Fomes annosus* a nebo *Tyromyces palustris* [29, 30].



Obrázek 3: Jednoduché schéma biosyntézy oxalátu v *A. niger* a zobrazení oddělení produkce oxalátu od biosyntézy kyseliny citronové [28]. Glukóza je transportována do buňky. Kde je řadou enzymů přeměna na pyruvát se ztrátou oxidu uhličitého. Pyruvát je enzymem pyruvát karboxylázou přeměněn na oxalacetát s využitím odštěpeného oxidu uhličitého. Zde se začíná lišit biosyntéza kyseliny citronové (pokračuje na malát) a syntéza kyseliny šťavelové. Oxalacetát je enzymem oxalacetázou přeměněn na acetát a oxalát. Následně je oxalát transportován do extracelulárního prostředí [28, 31].

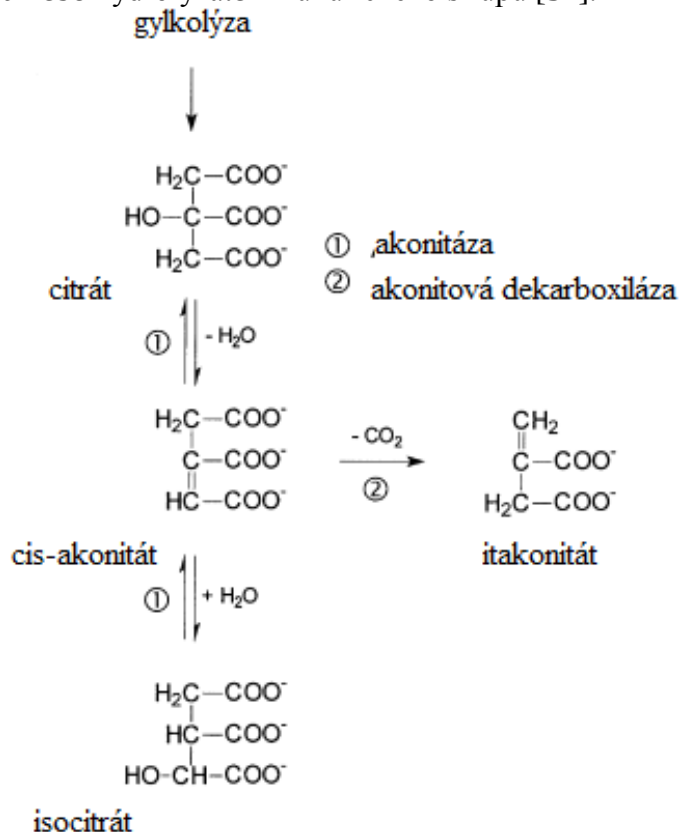
2.1.4 Syntéza kyseliny itakonové

Je mnoho teorií, které uvádí, jak probíhá biosyntéza kyseliny itakonové pomocí hub. Nicméně nejpravděpodobnější se zdá cesta přes glykosidickou dráhu a trikarboxylový cyklus, když kyselina itakonová vzniká enzymatickou dekarboxylací kyseliny citronové [32].

Její nejznámějším producentem je *Aspergillus terreus*. Biosyntéza kyseliny itakonové má mnoho společných znaků s produkcí kyseliny citronové kmeny *A. niger*. Produkce kyseliny itakonové je paralelní s produkcí kyseliny citronové se dvěma doplňkovými kroky (viz Obrázek 4). Prvním a nejdůležitějším krokem je dehydratace citrátu za tvorby cis-akonitátu. Druhým krokem je dekarboxylace cis-akonitátu za tvorby itakonové kyseliny. Akonitová dekarboxyláza se nachází výlučně v cytosolu, ale syntéza akonitátu a citrátu probíhají výhradně jen v mitochondrii. To znamená, že cis-akonitát pro dekarboxylaci musí být přepraven ven

z mitochondrie do cytosolu. Dodnes není známo, zda *A. terreus* transportuje cis-akonitát pomocí specifické akonitát/malát transferázy nebo citrát/malát antiportem [1].

Syntéza kyseliny itakonové probíhá nejlépe ve fosfátově limitovaném mediu a při koncentraci sacharózy mezi 100 – 150 g/l, nejlépe s glukózou, sacharózou, škrobem, melasou nebo hydrolyzátem kukuřičného sirupu [32].



Obrázek 4: Schéma syntézy kyseliny itakonové [32]. Od sacharózy, jako substrátu, se dostáváme stejnými kory jako u kyseliny citrónové až k citrátu. Zde dochází k dehydrataci akonitázou za vzniku cis-akonitátu. Následně může dojít k dekarboxylaci akonitovou dekarboxylázou na itakonitát, nebo dojde k hydrataci za pomoci enzymu akonitázy za vzniku isocitrátu.

Důležitou reakcí kyseliny itakonové je reakce s aminy, která vede k N-substituovaným pyrrolidonům. Ty pak mohou být využívány jako zahušťovadla v mazacích tucích, detergentech, šamponech, léčivech a herbicidech. Tetrapolymery obsahující 10 % itakové kyseliny mohou být využity jako vrtné výplachy [32].

2.2 Biosorpce a bioakumulace kovů biomasou mikroskopických vláknitých hub

Bakterie, houby a kvasinky mohou účinně odstraňovat těžké kovy z vodných roztoků [33]. Toho je možné využít v různých remediačních postupech.

Příjem těžkých kovů mikroorganismy může probíhat zachycením do buněčné struktury a následnou sorpcí na vazebná místa přímo v buněčné struktuře. Tento děj je nezávislý na metabolickém cyklu a je známá jako biosorpce nebo pasivní příjem [34]. Vysoká afinita těžkých kovů k biomase hub je výsledkem iontové interakce a tvorby komplexu mezi iontem kovu a vysoce zastoupenými funkční skupinami, které jsou přítomné na povrchu buňky. Do biosorpce kovů jsou zapojeny například funkční skupiny fosfátová, sulfátová, hydroxylová,

karboxylová, aminová a imidová. Tyto funkční skupiny mají za následek sorpci různých prvků např.: olova, rtuti, kadmia a mědi [35, 36]. Vysoké zastoupení funkčních skupin je způsobeno tím, že buněčná membrána se skládá převážně z polysacharidů, bílkovin a lipidů, které jsou právě na tyto funkční skupiny bohaté [36]. Hodnota izoelektrického bodu buněčné stěny *A. niger* (pH_{pzc}) je 7,21 [37].

Příjem těžkých kovů může také zahrnovat jejich přestup do buňky přes buněčnou membránu pomocí různých přenašečů. Tento režim příjmu kovů se označuje jako aktivní příjem. Příjem kovu v aktivním i pasivním režimu pak lze označit jako bioakumulace [34].

Biomasu získanou kultivací lze předem ošetřit fyzikálními nebo chemickými prostředky s cílem zvýšit kapacitu biosorpce kovu. Fyzikální metody úpravy zahrnují tepelné zpracování, lyofilizaci atd. Metody chemické úpravy jsou nejčastěji úprava biomasy kyselinami, alkalickými a anorganickými látkami [33]. Účinnost mrtvých buněk v biosorpci kovových iontů může být větší, ekvivalentní nebo nižší než u živých buněk a může záviset na faktorech, jako je druh a typ biomasy, která se využívá, dále metoda její předběžné úpravy nebo typ zkoumaného kovového iontu [33]. Studie ukazují, že pokud je biomasa *A. niger* považena v 0,5 mol/l hydroxidu sodném po dobu 15 minut, je biosorpce olova, kadmia a mědi v porovnání s bioakumulací těchto prvků živými buňkami účinnější. Pokud se ale podíváme na nikl, tak je jeho příjem daleko vyšší u živé biomasy než u upravené biomasy [34]. Je pravděpodobné, že odebrání niklu živou biomasou mohlo být způsobeno intracelulárním příjmem niklu nebo přítomností chelatačních ligandů, které mohou být přítomné na povrchu buňky [33].

Použití mrtvých buněk nabízí řadu výhod jako je to, že odstranění kovů nepodléhá limitům toxicity, není potřeba růstových médií a živin, ionty sorbovaných kovů mohou být snadno desorbovány a biomasa může být použita několikrát za sebou. [33]. Použití biomasy může být v některých případech výhodnější než využití iontoměničových pryskyřic [34].

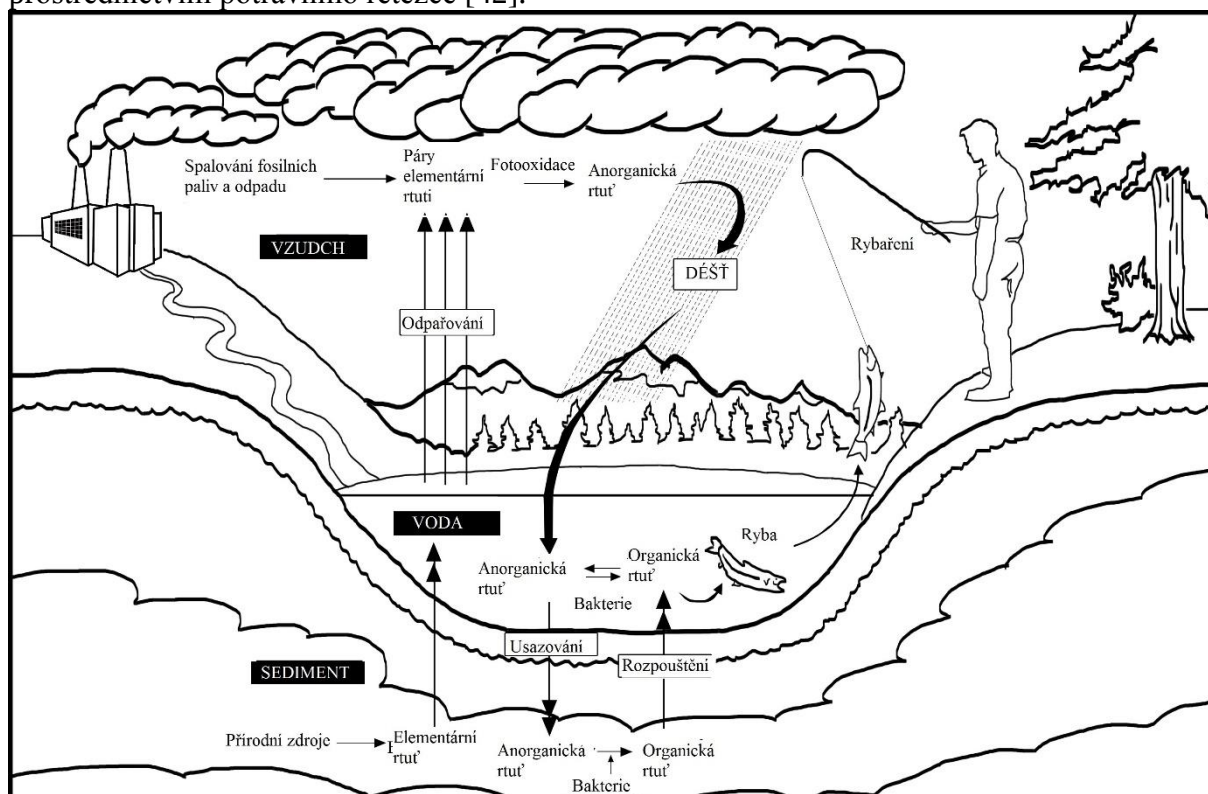
Mnoho druhů mikroorganismů bylo studováno na biosorpci těžkých kovů. Z hub jsou to například *Rhizopus arrhizus*, *Penicilium spinulium* a *Aspergillus niger*. Bakterie mají zastoupení v rodu *Pseudomonas*, z kvasinek se využívají *Saccharomyces cerevisiae* [38, 39, 40].

2.3 Rtut' a její toxicita

Rtut' existuje v několika formách. Anorganická rtut' zahrnuje kovovou a plynou (Hg^0) formu rtuti a rtuťné (Hg_2^{++}) a rtuťnaté (Hg^{++}) soli. Organická rtut' zahrnuje sloučeniny, ve kterých je rtut' vázaná na strukturu obsahující atomy uhlíku (např.: methylrtut'). Geochemické a biologické chování a také její klinický význam se liší podle chemické struktury sloučenin rtuti. Například inhalovaná elementární forma rtuti se snadno absorbuje přes slizniční membrány do plic a rychle se oxiduje na jiné formy (avšak ne dostatečně rychle, aby se zabránilo ukládání elementární rtuti do mozku). Metylová forma rtuti je snadno absorbována přes střeva a měkké tkáně, při vstupu do mozku se postupně demethyluje na elementární rtut' [41].

S výskytem rtuti v dešťové, zemní i mořské vodě jsou ohroženy její toxicitou všechny organismy na planetě. Znečištěná voda vede ke kontaminaci zeleniny nebo i masa rtutí. Ve vodním prostředí je anorganická rtut' přeměněna na organickou sloučeninu methylrtut'.

Tato sloučenina způsobuje, že je rtuť více náchylná ke shromažďování v organismu prostřednictvím potravního řetězce [42].



Obrázek 5: Koloběh rtuti [43]

Bylo zjištěno, že rtuť je příčinou různých druhů poruch, včetně neurologických, imunologických, srdečních a dokonce i genetických. Nejvyšší expozici rtuti jsou vystaveny národy, co mají vysoký příjem potravin, které pocházejí z mořského prostředí. Nejcitlivější vůči toxicitě rtuti jsou děti a plod. Snížený výkon v oblastech motorických funkcí a paměti byl zaznamenán u dětí, které byly vystaveny předpokládaným bezpečným hladinám rtuti. K podobným problémům (narušení pozornosti, jemné motoriky a slovní paměti) dochází i u dospělých při vystavení nízkým hladinám rtuti [42].

2.3.1.1 Možnosti odstranění rtuti z vod

Mnoho vědců se snaží najít nejlepší metodu (jak z ekonomického tak i z technologického hlediska) k odstranění rtuti z povrchových vod. Existuje řada chemických, mikrobiálních a fyzikálních metod pro odstranění rtuti z vod. Metody zahrnují srážení, sorpci, výměnu iontů a reverzní osmózu. Tyto procesy jsou účinné, ale je vytvářen nebezpečný odpad. Různé studie také zkoumaly odstranění kovu fotokatalýzou. Jako fotokatalyzátor byl využit prášek oxidu zinečnatého, který přeměňoval ionty rtuti (II) na kovovou rtuť v přítomnosti ultrafialového záření. [44]

Jednou ze zajímavých metod odstraňování rtuti je využití uhlíkových sorbentů pocházejících se skořápek ořechů. Adsorpční schopnost práškového aktivního uhlí získaného ze skořápek vlašských ořechů byla zkoumána za účelem vytvoření ekonomičtějšího a efektivnějšího sorbentu. Studie ukázali, že jednorázová sorpční kapacita tohoto sorbentu je 151,5 mg/g [45]. Zajímavým se taky jeví využití mikrobiální biomasy např.: *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio anguillarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Ulva lactuca* [38, 39, 46, 47].

2.4 Kapilární isotachoforéza

Isotachoforéza je jednou ze základních elektroforetických metod založených na separaci látek v elektrickém poli na základně jejich rozdílné elektroforetické mobility [48].

Pod vlivem aplikovaného elektrického pole se budou ionty pohybovat směrem k elektrodě rychlostí, která je ovlivněna například iontovým poloměrem, tvarem a nábojem iontu, stupněm disociace, pH, viskozitou rozpouštědla nebo teplotou. Většinou se využívá konstantní proud a tím pádem není možné najednou rozdělit anionty od kationtů [48].

Roztok vzorku bývá nadávkován mezi dva charakteristické roztoky. První roztok (vedoucí roztok) obsahuje ionty (vedoucí ionty), které mají stejný náboj, jako mají ionty ve vzorku, ale s tím rozdílem, že ionty ve vedoucím roztoku mají vyšší pohyblivost než nejrychlejší ionty ve vzorku. To zabezpečuje, že vzorek nikdy nemůže předběhnout vedoucí roztok. Druhý roztok (terminační roztok, nebo terminátor) obsahuje ionty (terminační ionty), které mají také stejný náboj jako vzorek, ale jejich rychlost je nižší než rychlost iontů ve vzorku. To znamená, že vzorek se nikdy nemůže nacházet za terminátorem [4].

Polarita elektrického pole musí být taková, aby vedoucí iont migroval na elektrodu, která je umístěná na stejné straně vzorku, jako je umístěn vedoucí roztok [7]. Po dosažení úplného oddělení, jednotlivé látky migrují v jednotlivých zónách odděleny ostrými hranicemi [48].

Jelikož je vzorek ohraničen vedoucím a terminačním roztokem, vzniká na začátku migrace vzorku homogenní smíšená zóna, která je tvořena všemi ionty, ty pak migrují s jinou rychlostí ale pod stejným potenciálovým gradientem. Následně se začnou vytvářet čisté zóny na přední straně smíšené zóny (nejrychlejší ionty) a na zadní straně smíšené zóny (nejpomalejší ionty). Po chvíli zmizí smíšená zóna úplně a vytvoří se plně oddělené zóny, které obsahují jenom jeden typ iontu. Jakmile se ionty oddělí, nikdy se zpětně nesmíchají a délka čisté zóny se udržuje konstantní, dokud roztokem prochází konstantní proud [49].

V kapilární isotachoforéze je obvykle zaznamenán signál s časem pomocí detektoru umístěným na konci kapiláry. U univerzálního detektoru je odpověď obvykle relativní výška (relativní výška schodu, RSH) [48].

2.4.1 Instrumentace

Separační kapiláry se aktuálně vyrábějí z polytetrafluorethylenu nebo oxidu křemičitého. Separační kapacita může být navýšena prodloužením kapiláry. Na druhé straně se tím zvýší doba analýzy a požadované maximální přepětí, proto musíme volit rozumný kompromis. Na začátku analýzy prochází proud pouze předběžnou kapilárou. Poté se ve vhodný okamžik hnací proud přepíná tak, že prochází analytickou kapilárou a zavádí požadované vzorkovací zóny do této kapiláry, kde dochází k dalšímu dělení [48].

Kapilára je připojena na každé straně k elektrodové komoře, kde se nachází platinová elektroda. V uzavřených systémech je komora spojená s předním elektrolytem semipermeabilní membránou. Terminační komora je pak spojena přes víceotáčkový ventil [48].

Vzorek je zaveden do uzavřeného systému mikrostříkačkou nebo vícecestupňovým ventilem (podobný jako u terminační komory) [48].

Detektory pro kapilární isotachoforézu můžeme rozdělit na univerzální a specifický. Signál z univerzálních detektorů je úměrný pohyblivost daných iontů a tyto detektory

zaznamenávají všechny zóny oddělené v úzkoproudé (analytické) kapiláře. K těmto detektorům patří potenciometrické, vodivostní a termometrické detektory. Limity detekce u detektorů potenciometrických a vodivostních jsou nízké okolo subnanomolu, ale u termometrického detektoru jsou limity poměrně vysoké. Na druhé straně, detektory speciální jako je UV-spektrometr umožňuje identifikaci některých látek přímo, nebo při nejmenším může poskytnout více informací o zónách [49].

2.5 Atomová absorpční spektroskopie (Altec AMA 254)

Atomový absorpční spektrometr se skládá ze tří základních prvků: zdroj záření, měrná cela, detektor.

Známe několik druhů zdrojů záření např.: výbojka s dutou katodou, bezelektrodová výbojka, xenonová výbojka aj. Na našem přístroji je využita nízkotlaká rtuťová výbojka [50]. Tato výbojka je zdrojem UV – C záření, které má vlnovou délku 253,7 nm.

Dalším důležitým optickým zařízením je monochromátor. Ten má za funkci izolovat měřené záření o dané vlnové délce. Monochromátor se skládá ze dvou štěrbin (vstupní a výstupní) a disperzní složky (hranolu nebo mřížky). Rozlišovací schopnost monochromátoru je umění rozlišit sousední absorpční pásma nebo dvě blízké spektrální čáry [51].

Atomizátor je další důležitou součástí spektrometru. Jejich úkolem je vytvořit volné atomy v základním stavu z našeho vzorku. Výjimku tvoří rtuť, protože její páry jsou již sami monoatomické. Konečná přesnost stanovení je z velké části závislá na účinnosti atomizátoru. Podle atomizátorů rozdělujeme atomovou absorpční spektrometrii na různé techniky: plamenovou, generování studených par, generování hydridů a elektrotermické atomizace. V našem případě byla využita technika studených par (viz 2.5.1) [50].

Jako detektor jsou většinou používány fotonásobiče. Ty jsou založeny na fotokatodě a anodě. Katoda je z lehce ionizovatelného materiálu (alkálie s antimonem, bismutem, nebo stříbrem). Anoda je kaskáda dinod. Foton dopadne na povrchu katody a tím způsobí emisi elektronu, pokud má foton dostatečnou energii pro ionizaci materiálu. Emitovaný elektron dopadne na kaskádu dinod a tím se vytvoří měřitelný proud, který je zaznamenán měřicí technikou [50, 51].

2.5.1 Stanovení rtuti

Rtuť a její sloučeniny patří k nejnebezpečnějším kontaminujícím látkám v životním prostředí. Biota může být vystavena rtuti a jejím sloučeninám z různých zdrojů jako jsou důlní hlušiny, průmyslové odpadní vody atd. [52].

Metoda AAS s generováním studených par (CV - AAS) je jednou z metod, která je nejpoužívanější pro stanovení celkového stopového množství rtuti v biologických a environmentálních materiálech [52]. Detekce rtuti je možná touto metodou, jelikož má jako prvek unikátní vlastnosti. Rtuť má značný tlak par při okolní teplotě (0,16 při 293 K) a její páry jsou stabilní a monoatomické. Rtuť je také snadno redukovatelná do kovové formy z její sloučenin [51].

Tato metoda stanovení je založena na vnesení vzorku na niklové nebo platinové lodičky do pícky, kde je spálena/uvolněna proudem kyslíku. Tímto proudem jsou nesené produkty spálení skrze katalyzátor, kde dojde k úplné oxidaci produktů a následné zachycení rtuti

amalgámem. Plynné produkty matrice (CO_2 , H_2O , oxid dusíku a síry) procházejí dále. Následně je rtuť termicky uvolňována z amalgámu a je měřena absorbance rtuťových výparů. Tento způsob stanovení je nazýván termooxidační [50, 53].

Pokud je koncentrace rtuti nižší než 0,1 mg/kg, je potřeba přidat kroky v postupu CV - AAS, které zahrnují překoncentraci Hg, aby byla zvýšená koncentrace rtuti, a aby se zabránilo interferencím, pokud by v roztoku zbyla organická matrice [50]. Při shromažďování rtuti je výsledná absorbance prakticky lineárně úměrná objemu zkušebního vzorku. Zlato - platinová gáza se ukázala jako nejsilnější a nejúčinnější kolektor (sběrač) rtuti [54].

Výhodou této metody je, že pro některé matrice může být technika studené páry využita přímo bez potřebných úprav (krev, moč, sliny) [52].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní vybavení

- analytické váhy AE 200 (Mettler Toledo, USA)
- třepačka Unimax 2010 (Heidolph, Německo)
- membránové filtry (Membrane Solution LCC, Čína)
- vývěva membránová (KNF Neuberger, Německo)
- pH metr HI8424 (Hanna Instruments, USA)
- elektrody HI1230B (Hanna Instruments, Itálie)
- isotachoforéza ZKI-01 (Villa Labeco, Slovenská republika)
- sušárna UN55 (Memmert, Německo)
- atomový absorpční spektrometr AMA 254 (Altec, Česká republika)

3.2 Použité chemikálie

3.2.1 Chemikálie využité pro kultivaci vláknitých hub

- Sabouraud dextrose broth s obsahem peptonu 10 g/l a dextrosy 20 g/l (HiMdia, India)

3.2.2 Chemikálie využity jako standard pro isotachoforézu

- Glukonát sodný CAS 527-07-1 ($C_6H_{11}NaO_7$; Sigma-Aldrich, Německo)
- Citrát sodný dihydrát CAS 6132-04-3 ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$; Centralchem, Slovenská republika)
- Kyselina šťavelová dihydrát CAS 6153-56-6 ($C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$; Centralchem, Slovenská republika)

3.2.3 Chemikálie využity pro isotachoforézu

- Vedoucí roztok (Chemický ústav, Slovenská republika) – 10 mmol/l kyselina chlorovodíková (HCl) + ϵ - aminokapronová kyselina + 0,1% methylhydroxyet hylcelulóza (mHEC)
- Terminátor (Chemický ústav, Slovenská republika) - 5 mmol/l kyselina kapronová ($C_6H_{12}O_2$) + histidin ($C_6H_9N_3O_2$).

3.2.4 Chemikálie využity pro CV – AAS

- Standart 1000 mg/l rtuti stabilizován v HNO_3 (Merck, Německo)
- Koncentrovaná kyselina dusičná (HNO_3 ; Centralchem, Slovenská republika)
- Koncentrovaná kyselina chlorovodíková (HCl; Centralchem, Slovenská republika)
- Dichroman didraselný ($K_2Cr_2O_7$ Centralchem, Slovenská republika)
- Dusičnan rtuťnatý ($Hg(NO_3)_2$ (Lachema, Česká republika)

3.3 Kultivace *A. niger* pro stanovení organických kyselin a bioakumulace

Kultivace *A. niger* pro stanovení koncentrace vyprodukovaných kyselin v kultivačním médiu, a také pro získání biomasy na bioakumulační experimenty se rtutí, byla provedena ve 150 ml tekutého živného média podle Sabourauda při 25 °C ve tmě v statické a dynamické (150 otáček/min) formě. Před kultivací bylo médium sterilizováno po dobu 15 min při 125 °C. Takto připravené médium bylo inokulované sporama odebraných ze sedmidenních kultur druhu *A. niger* v aseptických podmínkách.

V průběhu kultivace byly zaznamenávány změny hmotnosti (sušiny) biomasy, pH živného média a obsah vybraných kyselin isotachoforézou ve vybraných časových intervalech. Biomasa byla od média oddělena filtrací přes membránový filtr za podtlaku, pomocí membránové vývěvy. Následně byla biomasa promyta destilovanou vodou. Takto připravená biomasa byla využita pro bioakumulační experimenty, nebo sušena do konstantní hmotnosti při 65 °C.

3.4 Příprava roztoků

3.4.1.1 Příprava standardu glukonátu sodného

Pro přípravu standardu glukonové kyseliny o koncentraci 0,1 mmol/l byl využit glukonát sodný. Na vahách bylo naváženo 2,1820 g glukonátu sodného, který byl následně rozpuštěn ve vodě. Poté byl celý roztok zředěn na finální koncentraci 0,100 mmol/l o celkovém množství 100 ml.

3.4.1.2 Příprava standardního roztoku citrátu sodného

Pro přípravu standardu roztoku citrátu sodného o koncentraci 0,1 mmol/l byl využit citrát sodný. Na vahách bylo naváženo 2,9418 g citrátu sodného, který byl následně rozpuštěn ve vodě. Poté byl celý roztok zředěn na finální koncentraci 0,098 mmol/l v celkovém objemu 100 ml.

3.4.1.3 Příprava standardu šťavelanu sodného

Pro přípravu roztoku šťavelanu sodného o koncentraci 0,1 mmol/l bylo využito čistého šťavelanu sodného. Na vahách bylo odváženo 1,2629 g šťavelanu sodného, který byl následně rozpuštěn ve vodě. Poté byl celý roztok zředěn na finální koncentraci 0,100 mmol/l o objemu 100 ml.

Tabulka 1: naměřené a vypočítané hodnoty pro standardy šťavelanu sodného, citronanu sodného a glukonanu sodného využitých při isotachoforéze

Standard			
	Šťavelan sodný	Citrát sodný	Glukonát sodný
c (mmol/l)	0,100	0,098	0,100
RSH (0/1)	0,066	0,292	0,606
Délka (s)	15,0	15,6	24,0
M (g/mol)	126,07	294,10	218,14

3.4.1.4 Příprava standardního roztoku Hg^{2+}

Analytický standart o koncentraci 1000 mg/l Hg^{2+} byl zředěn na objem 100 ml s koncentrací 0,2 mg/l vodovodní vodou a přidavkem 1 ml koncentrované kyseliny dusičné, 0,1 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a 0,1 ml roztoku dichromanu didraselného o koncentraci 100 g/l.

3.4.1.5 Příprava zásobního roztoku Hg^{2+}

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 2,427 g $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ v odměrné baňce na 1 l, tak aby koncentrace Hg^{2+} byla 1500 mg/l. Odměrná baňka byla doplněna vodou a kyselinou dusičnou tak aby pH roztoku bylo přibližně 2. Před bioakumulačním experimentem byl zásobní roztok filtrován a koncentrace rtuti proměřena metodou CV - AAS.

3.4.2 Bioakumulace Hg^{2+} biomasou druhu *A. niger*

Po šestidenní kultivaci byl navážen 1 g vlhké biomasy do 250 ml kádinek. Poté bylo přidáno 50 ml zásobního roztoku Hg^{2+} tak, aby v daných 50 ml byla koncentrace rtuti v rozsahu 6 až 280 mg/l. Takto připravená suspenze byla ponechána 24 hodin ve tmě při 25 °C na třepačce o rychlosti 150 otáček. min^{-1} . Po uplynutí 24 hodin byl roztok přefiltrován membránovou filtrací. Oddělená biomasa byla vysušena při 65 °C do konstantní hmotnosti a zvážena. Ve filtrátu byla stanovena zbytková koncentrace rtuti metodou CV – AAS. Kontrolní vzorky tvořily roztoky rtuti bez přidané biomasy.

3.5 Růstové křivky

Vliv způsobu kultivace na růst druhu *A. niger* byl stanoven jako závislost hmotnosti sušiny biomasy na době kultivace. Ke stanovení biomasy byla využita gravimetrická metoda. Biomasa byla odebírána po přesně zaznamenané době, byla vložena na předem zvážené sklíčko, a vložena do vyhřáté sušárny. Po vysušení byly vzorky vyndány ze sušárny a nechány přes noc vychladnou a dosušit v exikátoru. Takto připravené vzorky byly zváženy a byla vypočtena jejich reálná hmotnost. Průběh nárůstu biomasy na čase byl zaznamenán do grafu.

Růstová křivka byla zpracována pomocí rovnice (1) dle Gompertza [55].

$$m = A \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{(\mu \cdot e)}{A} \cdot (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

Kde parametr A vyjadřuje maximální teoretickou hmotnost sušiny m (g), λ pak vyjadřuje délku *lag* fáze (h) a μ specifickou růstovou rychlost (1/h). Tyto parametry byly spočítány pomocí aplikace MS Excel, funkcí Řešitel, pro statickou i dynamickou kultivaci.

3.6 Stanovení organických kyselin isotachoforézou

Do přístroje byly postupně dávkovány vzorky. Nejprve byly vybrány z lednice vedoucí a terminační roztoky a byla připravena redestilovaná voda na proplachování vzorkového dávkovače. Přístroj byl nastaven do plnění módu a měřicí technika byla zapnuta. Celá aparatura byla propláchnutá terminačním roztokem. Následně byly do kapiláry postupně dávkovány potřebné roztoky. Jako první byl do kapiláry napuštěn vedoucí roztok o přibližném

objemu 1 ml, nejprve do horní a následně do spodní kapiláry. Tvorba bublinek byla pozorně sledována. Pokud byly bublinky tvořeny, vedoucí roztok byl vtlačován tak dlouho, dokud nebyla přítomná žádná bublinka. Jako druhý roztok byl nadávkován námi měřený vzorek. Bylo nadávkováno vždy okolo 3 ml. Jako poslední roztok byl puštěn terminační roztok, pomocí regulačního kolečka. Poté mohla být analýza vzorku spuštěna pomocí programu na počítači.

3.7 Stanovení obsahu rtuti v kapalných vzorcích metodou CV - AAS

Poté co byl přístroj zapnut, byl promýván vodovodní vodou tak, aby absorbance klesla pod hodnotu 0,003. Na řídicím počítači byla nastavena metoda pro stanovení obsahu rtuti ve vzorku a poté bylo do spalovací lodičky napipetováno přesně 100 µl standardu, respektive 100 µl vzorku. Na řídicí jednotce byla povolena analýza. Vzorek byl odpařen a byla změřena jeho absorbance. Po provedení analýz roztoků byl přístroj promyt vodovodní vodou do hodnoty absorbance 0,003.

4 VYHODNOCENÍ DAT A DISKUZE

4.1 Růstové křivky

Pro každou z kultivačních metod byla sestavena růstová křivka, která v našem případě vyjadřuje závislost hmotnosti biomasy na čase. V grafu můžeme rozeznat několik růstových fází, které vhodně opisuje růstová Gompertzova funkce modifikovaná podle Zwietering a kol. [55]. Tento model mikrobiálního růstu předpokládá sigmoidní funkci s třemi charakteristickými fázemi růstu [57]:

- *lag* fáze – dochází k adaptaci organismu a je charakterizován svojí časovou délkou λ
- *log* fáze – dochází k logaritmickému růstu organismu a je charakterizován specifickou maximální rychlostí růstu (μ_{max})
- stacionární fáze – dochází k významnému poklesu dostupných růstových živin a bylo dosaženo maximální hodnoty růstového parametru A .

Při dynamické a statické kultivaci je délka experimentálně stanovené *lag* fáze přibližně okolo jednoho dne (Tabulka 3). *A. niger* má výrazně rychlejší růst biomasy a kratší *lag* fázi oproti jiným mikroskopickým vláknitým houbám, což je nevýhodou v případě kontaminace potravinářských produktů, ale výhodou v aplikaci tohoto druhu v remediačních technikách [56].

Délky *lag* také naznačují, že *A. niger* si zvykal na dynamickou kultivaci trochu déle, než v případě statické kultivace.

Citlivějším parametrem pro porovnání obou typů kultivací je rychlost růstu, vyjádřena specifickou růstovou rychlostí μ (viz Tabulka 2). Vyšší je u dynamické kultivace. Proto i když je u druhého dne hmotnost sušiny biomasy téměř stejná, postupně se rozdíl hmotnosti biomasy zvětšuje, až růst mikroorganismu v statické kultivaci zaostává.

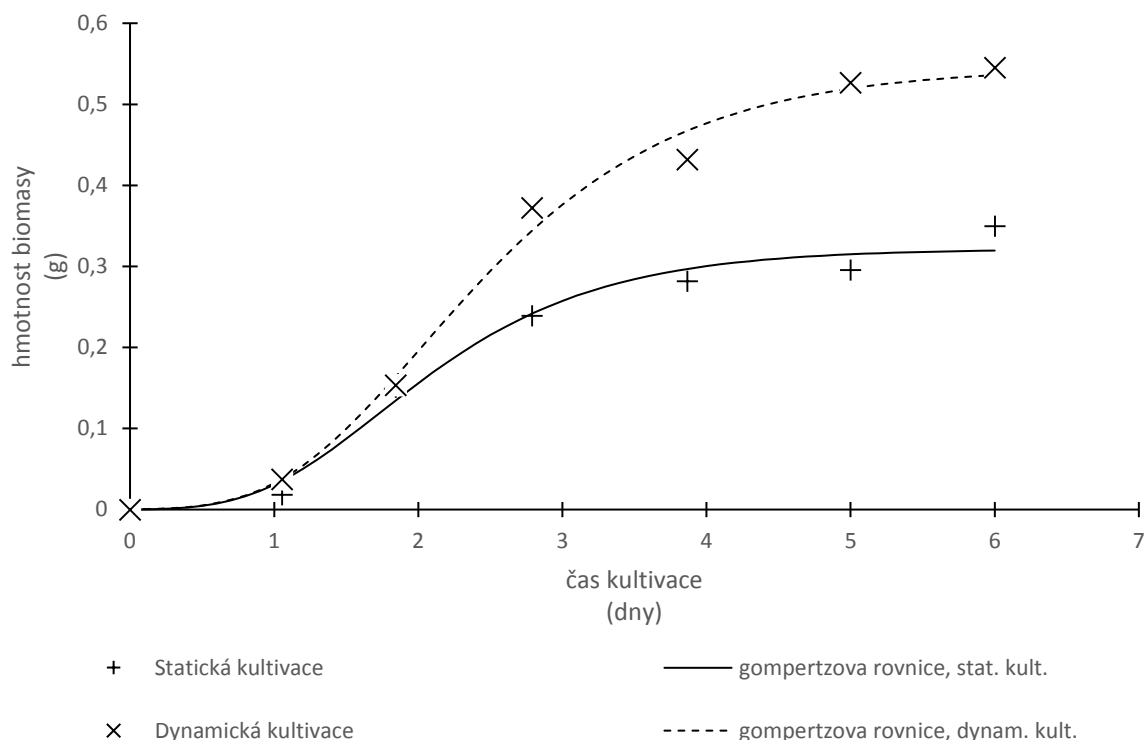
Taktéž je vyšší maximální dosažitelná hmotnost u dynamické kultivace. Jelikož bylo při obou kultivacích použito stejné médium, tak mají stejný zdroj uhlíku. Tedy se dá předpokládat, že dosažitelnou hmotnost biomasy ovlivňuje vyšší provzdušnění růstového média v dynamické kultivaci. To znamená, že pro mikroorganismus je výhodnější zdroj uhlíku (především sacharidů) z větší části prodýchat a přeměnit na energii. Tím se urychlí metabolické děje, v důsledku čeho se zrychlí růst biomasy. Taktéž se dá předpokládat, že byla lepší prostupnost živin a lepší homogenita prostředí. U statické kultivace se mohli pak metabolity více hromadit u biomasy a tím zpomalovat její růstu.

V 5. a 6. dnu kultivace se poměr biomasy mezi statickou a dynamickou kultivací nemění, také v těchto dnech je možné pozorovat začátek stacionární fáze (viz Graf 1). To naznačuje, že došlo k vyčerpání živin a nahromadění toxických metabolitů. Hmotnost biomasy se již nemění a zvyšuje se produkce sekundárních metabolitů. Což znamená, že mikroorganismus produkuje metabolity, které nejsou zaměřeny na růst, ale na přežití mikroorganismu (obraná funkce, zásobní látky atd.)

Z průběhu růstové křivky by se dalo předpokládat, že pokud bude změřen obsah vyprodukovaných kyselin v roztoku, bude jich množství zpočátku velmi podobné a po druhém dnu kultivace bude větší množství kyselin při dynamické kultivaci, jelikož je zde i více biomasy. Tento předpoklad bude ověřen v následujících experimentech.

Tabulka 2: Vypočítané hodnoty pro sestavení Gompertzovy rovnice pro statickou a dynamickou kultivaci

Statická kultivace			Dynamická kultivace		
A [g]	μ [1/den]	λ [den]	A [g]	μ [1/den]	λ [den]
0,32	0,14	0,88	0,55	0,20	1,04

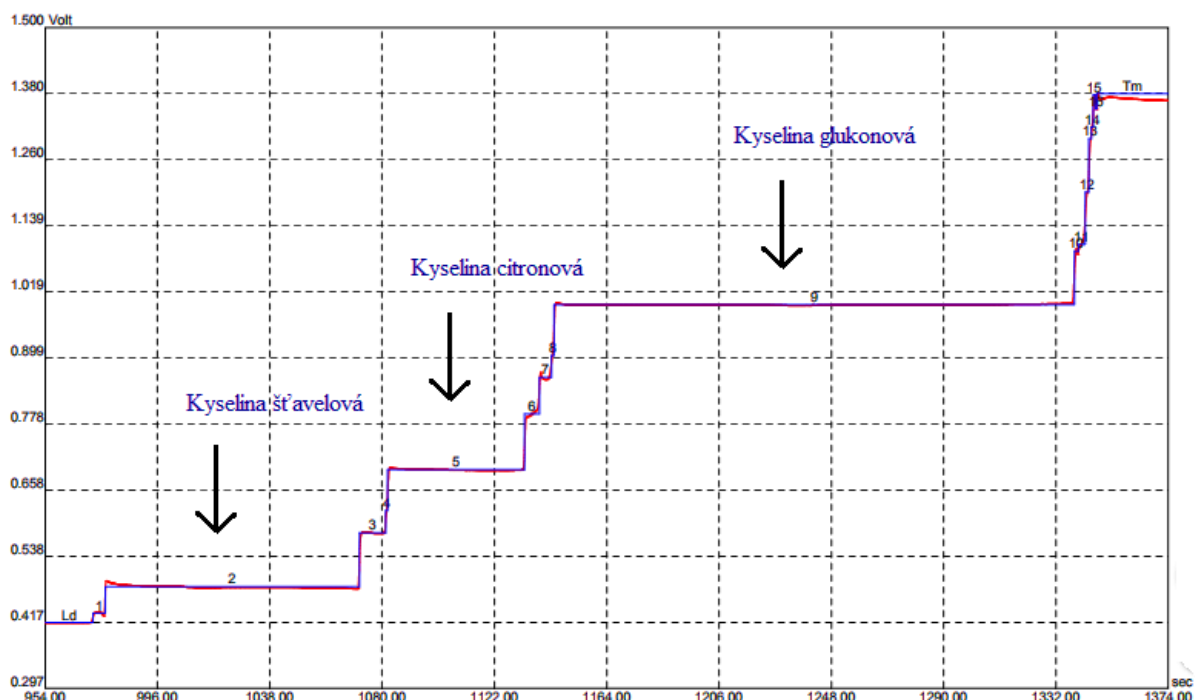


Graf 1: Závislost hmotnosti biomasy na čase kultivace pro statickou a dynamickou kultivaci (křivka dle Gompertzovy rovnice)

4.2 Produkce organických kyselin dynamickou a statickou kultivací a změny v pH

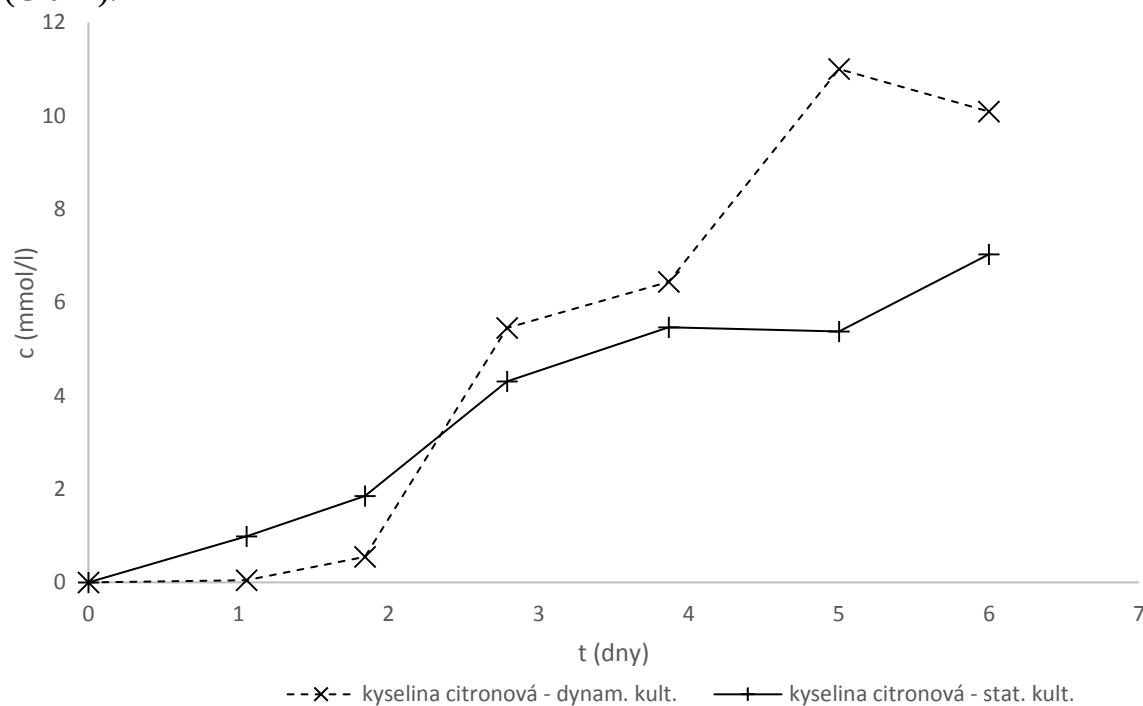
Předpoklad před měřením vyprodukovaných organických kyselin vláknitou houbou *A. niger* byl takový, že podle růstových křivek by mělo být po druhém dnu více kyselin v podmínkách dynamické kultivace.

Před měřením byly roztoky zředěny, aby prostředí média, především však vysoká koncentrace organických kyselin v médiu, nezabránila detekovat terminátor. Po změření roztoků vyšel záznam, ze kterého byly na základě údajů z měření standardů (jejich RSH faktorů a délky mezi inflexními body), identifikovány a kvantifikovány koncentračně relevantní organické kyseliny (viz Obrázek 6).



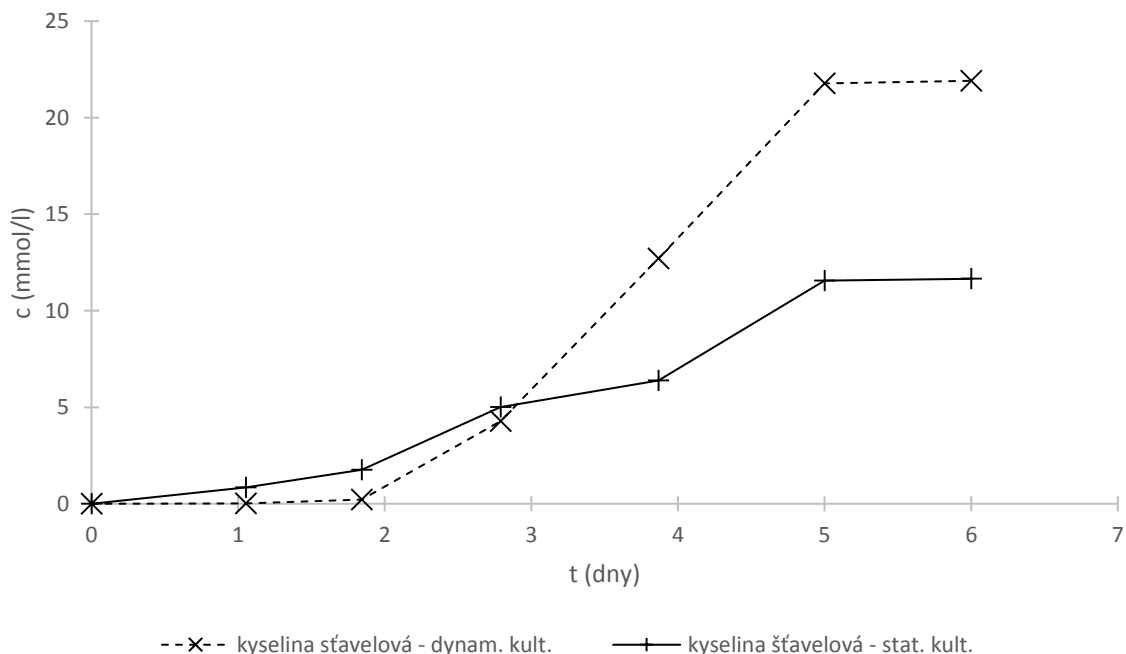
Obrázek 6: Příklad grafu naměřeného isotachorézou pro čtvrtý den dynamické kultivace

Kyselina citronová byla z počátku v hojnějším zastoupení při statické kultivaci a její nárůst byl kontinuální a postupně se zvyšoval. Naopak tomu bylo u dynamické kultivace, kdy zpočátku byl její přírůstek minimální a po druhém dnu (kdy vzrostla rychlost růstu) vzrostla rapidně produkce kyseliny citronové a překonala produkci kyseliny při statické kultivaci mikroorganismu. Tento trend se udržel do pátého dne. V tomto bodě byl pozorován mírný pokles obsahu kyseliny citronové. Tento pokles může být způsoben tím, že nastala stacionární fáze růstu a souvisí to se zpětnou sorpcí kyseliny citronové vláknitou mikroskopickou houbou (Graf 2).



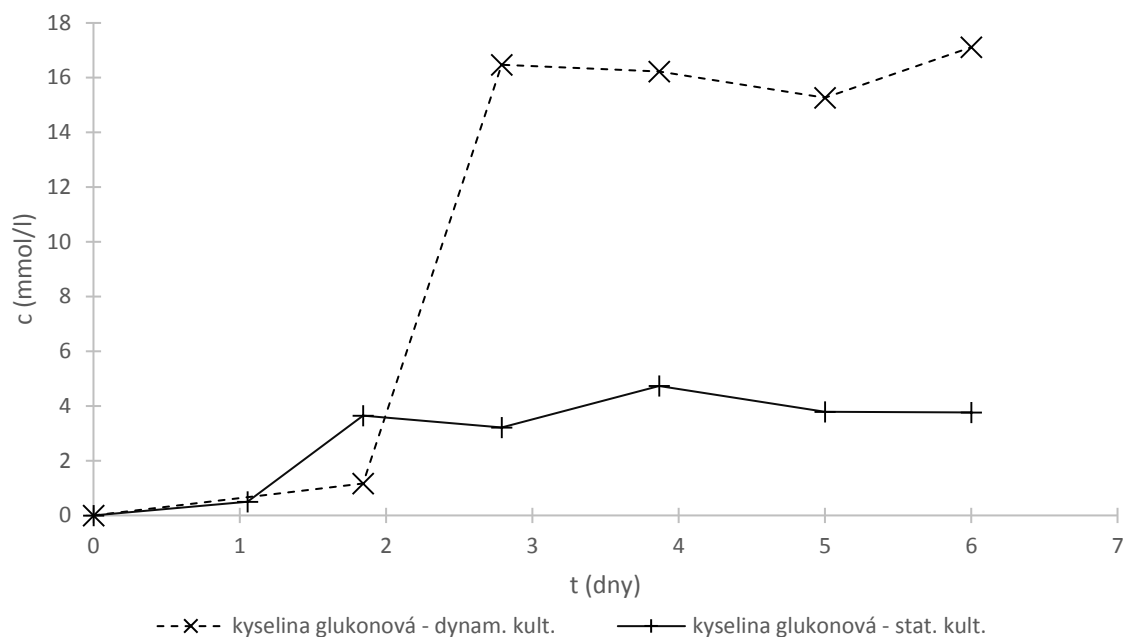
Graf 2: Graf závislosti koncentrace kyseliny citronové na čase pro statickou a dynamickou kultivaci

Přestože je celková koncentrace houbou vyprodukované kyseliny šťavelové asi dvojnásobně vyšší, trend změn v její koncentraci je velmi podobný jako u kyseliny citronové. Zatím co u statické kultivace koncentrace kyseliny šťavelové v médiu kontinuálně stoupá u statické kultivace celý čas, její koncentrace u dynamické kultivace *A. niger* byla velmi nepatrná až do druhého dne. Po ukončení *lag* fáze u dynamické kultivace však koncentrace prudce vzrostla a o velký rozdíl překonala koncentraci v médiu u statické kultivace. V obou typech kultivace se v pátém a šestém dnu hodnoty koncentrací významně nemění (Graf 3).



Graf 3: Závislost koncentrace kyseliny šťavelové na čase při dynamické a statické kultivaci.

V porovnání s ostatními dvěma organickými kyselinami, dochází u kyseliny glukonové k výrazné změně. Na začátku kultivace je sice větší množství kyseliny glukonové v médiu u kultivace statické, během druhého dne však dochází k velkému nárůstu koncentrace kyseliny glukonové. U statické i dynamické kultivace dochází ke stagnaci její koncentrace až do ukončení kultivace (Graf 4).

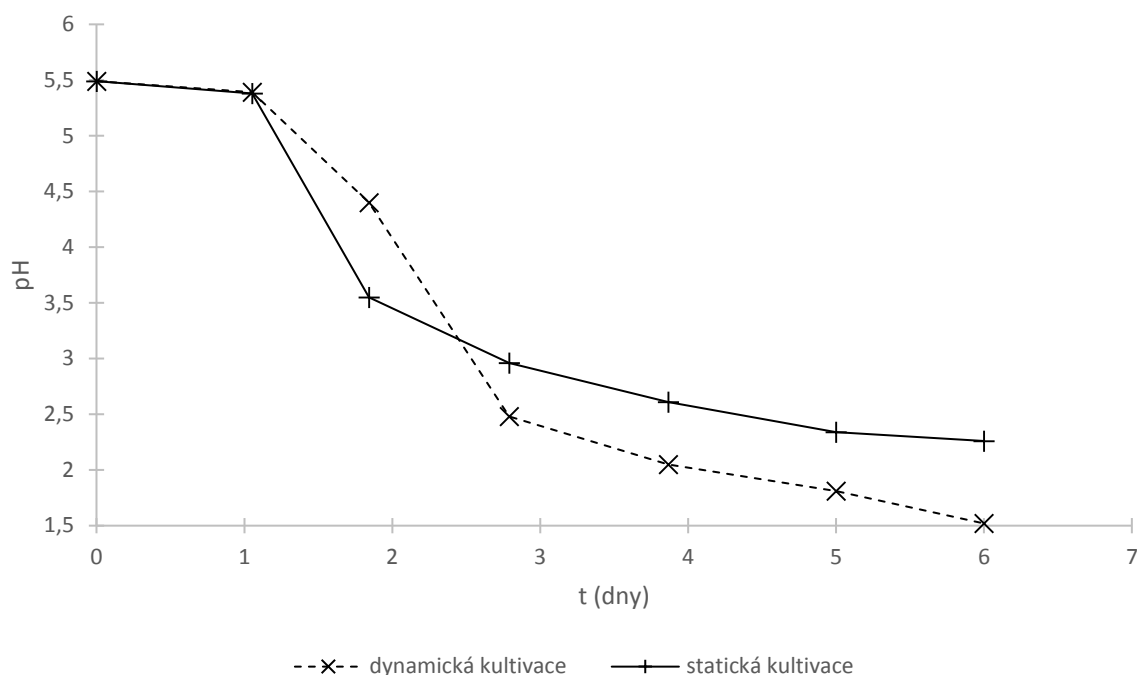


Graf 4: Koncentrace kyseliny glukonové na čase kultivace pro statickou a dynamickou kultivaci

Kubicek a kol. [58] uvádějí, že kritickým faktorem pro produkci kyseliny citronové je aerace živného média. Dále ukazují, že kyslík působí jako přímý regulátor akumulace kyseliny citronové. Zvýšení aerace podporuje produkci i jiných organických kyselin [59]. Vyšší produkce organických kyselin v dynamických podmínkách může také souviset s neustálým promícháváním média, a tím lepší přístupností živin. U statické kultivace pro změnu funguje volná difuze. Pokud dojde k náhlému poklesu dostupnosti kyslíku, buňka je vystavena vysokému stresu [60]. Také můžeme pozorovat pozitivní korelaci koncentrace kyselin v médiu s růstem biomasy. V exponenciální fázi růstu významně roste i koncentrace kyselin a u stacionární fáze růstu se obsah kyselin příliš neliší.

První den kultivace bylo pH shodné jak u dynamické tak u statické kultivace, ale následný nárůst kyseliny šťavelové a citronové (což odpovídá zvýšenému vylučování metabolitů) byl tak velký, že rychleji kleslo pH u statické kultivace. Teprve po druhém dni dynamické kultivace pH kleslo natolik, že bylo nižší než u dynamické kultivace a tento trend se již neměnil (Graf 5).

Z výsledků biomasy, koncentrací kyselin a pH se zdá, že *A. niger* si zvykal na prostředí a hůře se mu rostlo první dny v dynamické kultuře. Je možné, že jak se médium míchalo, bylo pro něj těžké vytvořit vlákna. To u statické kultivace problém nebyl, naopak při prvních dnech měl *A. niger* i dostatečný přístup ke kyslíku a tedy optimální podmínky pro růst. Pokud ale došlo k nárůstu mycelia, mikroorganismus si vytvořil poklop ze sebe samého a tím se zhoršila přístupnost vzduchu, a nemohl tak rychle růst. Na druhé straně při dynamické kultivaci, když si *A. niger* zvykl na prostředí a dokázal trochu povyrůst, podmínky se zidealizovali, mícháním byl zajištěn dostatečně velký přístup kyslíku a živin. Tím pádem mohl narůst do velkých rozměrů a produkovat velké množství kyselin.



Graf 5: závislost pH na dnech při statické a dynamické kultivaci

4.3 Bioakumulace rtuti *A. niger*

Výsledky ukazují, že vázání rtuti do biomasy druhu *A. niger* je složené ze dvou fází. V počátečních hodnotách (nižších koncentračních hodnotách) se trend v bioakumulační kapacitě odlišuje od ostatních hodnot (viz Tabulka 3). Rozděluje je koncentrace rtuti 25,48 mg/l. Z výsledků je patrné, že po tuto koncentraci se účinnost sorpce pohybovala okolo 60-70 %, ale po zvýšení koncentrace rtuti ve vodném roztoku byla účinnost 80 – 90 %. Takto vysoká účinnost byla očekávána, neboť různí autoři uvádějí vysokou afinitu rtuti k biomase mikroskopických vláknitých hub. Jako například Karunasagar [61] uvádí, že celková vaznost rtuti na biomasu činí 2,2 mg/g biosorbentu, což činí 92% účinnost biomasy ve vyvázání rtuti z roztoku. Tato vazebná kapacita byla stanovena opakovanými cykly sorpce, dokud nebyla pozorována žádná další vazba. Tyto hodnoty jsou pro anorganickou rtuť (Hg^{2+}), pokud by byla sledována organická rtuť, pak účinnost byla nižší [61].

Data naznačují, že bioakumulace nemá standartní průběh jednorvkové sorpce. Je možné předpokládat, že základní rozdíl spočívá v tom, že u většiny experimentů byla využita biomasa mrtvá, zato u tohoto experimentu byla použita biomasa živá bez chemické úpravy. Urík a kol [62] se setkali s podobným jevem u *Cladosporium cladosporioides*. Předpokládají, že to souvisí s narušením přirozené fyziologické bariéry, která by omezovala příjem rtuti. Tedy se domnívají, že se po překročení určité koncentrace (v tomto experimentu 25,5 mg/l) zvyšuje neřízená akumulace [62]. Dá se tedy předpokládat, že bioakumulace je složená ze dvou fází. V první fázi je dominantně rtuť vázaná na povrch buněčné membrány a v druhé fázi již dochází k bioakumulaci do intracelulárních prostorů.

Tabulka 3: Naměřené a vypočítané hodnoty pro bioakumulaci rtuti

hmotnost biomasy [g]	počáteční koncentrace rtuti v mediu [mg/l]	koncentrace celkové rtuti v mediu po kultivaci [mg/l]	Koncentrace celkové rtuti v biomase [mg/g]	účinnost bioakumulace [%]
0,1358	6,1	2,3	1,4	62,7
0,1186	11,7	5,1	2,8	56,5
0,1258	11,7	5,5	2,5	53,3
0,1325	25,5	7,8	6,7	69,6
0,1161	25,5	7,8	7,6	69,8
0,1129	68,8	8,3	26,8	87,9
0,1362	68,8	8,5	22,1	87,6
0,1539	144,2	14,6	42,1	89,9
0,1349	144,2	13,7	48,4	90,5
0,1489	221,2	24,6	66,0	88,9
0,1457	286,1	49,7	81,1	82,6
0,1379	286,1	52,8	84,6	81,6

5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit optimální kultivaci pro produkci organických kyselin a biomasy, která by byla využita pro bioakumulaci rtuti z vod. K práci byla vybrána mikroskopická vláknitá houba *Aspergillus niger*.

Teoretická část této bakalářské práce byla zaměřena na poznatky o jednotlivých organických kyselinách. Také byl rozveden metabolismus produkce těchto kyselin kmenem *A. niger*. V teoretické části byla také rozvedena problematika bioakumulace těžkých kovů z vodních roztoků, která byla především zaměřená na toxicitu rtuti a další možnosti jejího odstraňování z vodních roztoků. Zbytek teoretické části byl věnovaný stručné charakteristice metod, které byly využity pro stanovení organických kyselin (izotachoforéza) a množství rtuti před a po bioakumulaci (CV – AAS).

Experimentální část byla zaměřena na stanovení hmotnosti sušiny biomasy, produkce organických kyselin, pH media a bioakumulace rtuti na biomasu vláknité mikroskopické houby rodu *A. niger*.

V této práci bylo zjištěno, že největší nárůst biomasy nastává při dynamické kultivaci. To může být spojeno s lepším prostupem kyslíku v médiu a také lepším přístupem živin a odvodem metabolitů. U statické kultivace měla přístup ke kyslíku pouze horní vrstva, a prostup živin, respektive odvod metabolitů závisel pouze na difuzi látek v roztoku.

Vývoj nárůstu biomasy byl kopírován klesajícím pH v médiu. Na základě tohoto zjištění byl předpoklad, že nejvyšší produkce organických kyselin nastane při dynamické kultivaci. Tento předpoklad byl potvrzen. Šestý den kultivace byl velký rozdíl v koncentraci vyprodukovaných kyselin mezi dynamickou a statickou kultivací. *A. niger* se především využívá pro produkci kyseliny citronové. Té však bylo vyprodukováno nejméně. Nejvíce produkovaná byla kyselina šťavelová, která měla koncentraci v roztoku na konci dynamické kultivace 21,91 mmol/l.

Pro bioakumulaci rtuti byla využita biomasa z dynamické kultivace. Tento typ biomasy byl využit proto, že povrch *A. niger* je větší a hmotnost biomasy je vyšší. Odstraňování rtuti z roztoku bylo nejúčinnější při vyšších koncentracích (> 68 mg/l) rtuti. Tam byla účinnost mezi 80 – 90 %.

Tento princip využití *A. niger* je výhodný. Jelikož komerčně narostlá biomasa, která byla využita pro produkci organických kyselin, bude druhotně využita pro přečišťování vodních roztoků od těžkých kovů. Tedy největší výhodou jsou snížení nákladů. Navíc tato metoda není technologicky náročná.

6 CITACE

[1] Organic Acid Production by Filamentous Fungi. Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004, s. 307-340. ISBN 0306478668.

[2] LIAUD, Nadège, Christian GINIÉS, David NAVARRO, et al. Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. DOI: 10.1186/s40694-014-0001-z.

[3] ADELEKE, R. A., T. E. CLOETE, A. BERTRAND a D. P. KHASA. Mobilisation of potassium and phosphorus from iron ore by ectomycorrhizal fungi. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2010, 26(10), 1901-1913. DOI: 10.1007/s11274-010-0372-0. ISSN 0959-3993.

[4] KAROL, Paul J. a Meryl H. KAROL. Isotachopheresis. Journal of Chemical Education. 1978, 55(10), 626-630. DOI: 10.1021/ed055p626

[5] MATTHIES, Carola, Hans-Peter ERHARD a Harold L. DRAKE. Effects of pH on the comparative culturability of fungi and bacteria from acidic and less acidic forest soils. Journal of Basic Microbiology. 1997, 37(5), 335-343. DOI: 10.1002/jobm.3620370506. ISSN 0233111x.

[6] ROUSK, Johannes, Philip C. BROOKES a Erland BÅÅTH. Investigating the mechanisms for the opposing pH relationships of fungal and bacterial growth in soil. Soil Biology and Biochemistry. 2010, 42(6), 926-934. DOI: 10.1016/j.soilbio.2010.02.009. ISSN 00380717.

[7] SÁDECKÁ, J., J. POLONSKÝ, Michael COOKE a C. F. POOLE. ELECTROPHORESIS | Capillary Isotachopheresis. DOI: 10.1016/B0-12-226770-2/05391-6.

[8] JENNINGS, G. H. The Physiology of fungal nutrition. Cambridge: Cambridge University Press, 1996, 622 s. ISBN 9780521355247.

[9] SAUER, Michael, Danilo PORRO, Diethard MATTANOVICH, Paola BRANDUARDI a I GOLDBERG. Microbial production of organic acids: expanding the markets. Trends in Biotechnology. 2008, 26(2), 100-108. DOI: 10.1016/j.tibtech.2007.11.006. ISSN 01677799.

[10] VANDENBERGHE, Luciana P. S, Carlos R SOCCOL, Ashok PANDEY a Jean-Michel LEBEAULT. Microbial production of citric acid. DOI: 10.1590/S1516-89131999000300001.

[11] RUIJTER, G. J. G., C. P. KUBICEK a J. VISSER. Production of Organic Acids by Fungi. Industrial Applications. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2002, 213-230. DOI: 10.1007/978-3-662-10378-4_10. ISBN 978-3-642-07481-3.

[12] JERNEJC, Katarina a Matic LEGIŠA. A drop of intracellular pH stimulates citric acid accumulation by some strains of *Aspergillus niger*. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.05.002.

[13] KARAFFA, Levente a Christian P. KUBICEK. *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? Applied Microbiology and Biotechnology. 2003, 61(3), 189–196. DOI: 10.1007/s00253-002-1201-7. ISSN 1432-0614.

- [14] MARTIN, S.M. a P.W. WILSON. Uptake of C¹⁴O₂ by *Aspergillus niger* in the formation of citric acid. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 1954, 2(208), 679-689. DOI: 10.1016/0003-9861(51)90248-2. ISBN 10.1016/0003-9861(51)90248-2. ISSN 0021-9258.
- [15] CLELAND, W. W. a M.J. JOHNSON. TRACER EXPERIMENTS ON THE MECHANISM OF CITRIC ACID FORMATION BY *ASPERGILLUS-NIGER*. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 1954, 2(208), 679-689. ISSN 0021-9258.
- [16] TORRES, N. V., J. M. RIOL-CIMAS, M. WOLSCHEK a C. P. KUBICEK. Glucose transport by *Aspergillus niger*: the low-affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentrations. DOI: 10.1007/BF00178620.
- [17] BERCOVITZ, A, Y PELEG, E BATTAT, J. S ROKEM a I GOLDBERG. Localization o Pyruvate Carboxylase in Organic Acid -Producing *Aspergillus* Strains. Applied and Environmental Microbiology (AEM). 1990, 56(6), 1594-1597. ISSN 1098-5336.
- [18] KENEALY, William, Eli ZAADY, James C. DU PREEZ, Barry STIENGLITZ a Israel GOLDBERG. Biochemical Aspects of Fumaric Acid Accumulation by *Rhizopus arrhizus*. Applied and Enviromental Microbiology. 1986, 52(1), 128-133.
- [19] PUROHIT, Hemant J. a Colin RATLEDGE. Mitochondrial location of pyruvate carboxylase in *Aspergillus niger*. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1988.tb13920.x.
- [20] P. KUBICEK, Christian, Peter PUNT a Jaap VISSER. Production of Organic Acids by Filamentous Fungy. *The mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research*. 2nd ed. New York: Springer, 2012, s. 215-234. ISBN 978-3-642-11457-1
- [21] PAPAGIANNI, Maria. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.01.002. ISBN 10.1016/j.biotechadv.2007.01.002.
- [22] NETIK, Angela, Nestor V TORRES, Jose-Maria RIOL a Christian P KUBICEK. Uptake and export of citric acid by *Aspergillus niger* is reciprocally regulated by manganese ions: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. DOI: 10.1016/S0005-2736(97)00032-1.
- [23] RAMACHANDRAN, Sumitra, Pierre FONTANILLE, Ashok PANDEY a Christian LARROCHE. Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production. Food Technology [online]. 2006, 44(2), 185-195 [cit. 2017-10-23]. ISSN 13309862.
- [24] BANKAR, Sandip B., Mahesh V. BULE, Rekha S. SINGHAL a Laxmi ANANTHANARAYAN. Glucose oxidase — An overview. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.04.003.
- [25] SHINDIA, A. A., G. A. EL-SHERBENY, A. E. EL-ESAWY a Y. M. M. M. SHERIFF. Production of Gluconic Acid by Some Local Fungi: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. DOI: 10.4489/MYCO.2006.34.1.022.
- [26] DUTTON, Martin V. a Christine S. EVANS. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. DOI: 10.1139/m96-114.
- [27] RUIJTER, G.J.G., Peter J. I. VAN DE VONDERVOORT a Jaap VISSER. Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: an oxalate-non-producing mutant produces citric acid

at pH 5 and in the presence of manganese. Microbiology - UK. 1999, 145, 2569-2576. ISSN 1350-0872.

[28] KUBICEK, Christian P., Gerlinde SCHREFERL - KUNAR, Wilfried WÖHRER a Max RÖHR. Evidence for a Cytoplasmic Pathway of Oxalate Biosynthesis in *Aspergillus niger*. Applied and Environmental Microbiology. 1988, 54(3), 633-637.

[29] W. W., Cleland a Johnson M. J. Studies on the formation of oxalic acid by *aspergillus niger*. The Journal of Biological Chemistry. Wisconsin, 1956, (220), 595-606.

[30] GADD, Geoffrey M., Mahesh V. BULE, Rekha S. SINGHAL a Laxmi ANANTHANARAYAN. Fungal Production of Citric and Oxalic Acid: Importance in Metal Speciation, Physiology and Biogeochemical Processes. DOI: 10.1016/S0065-2911(08)60165-4.

[31] KHAN, Saeedur R. Calcium oxalate in biological systems. Boca Raton: CRC Press, 1995. ISBN 9780849376733.

[32] WILLKE, Th. a K.-D. VORLOP. Biotechnological production of itaconic acid. Applied Microbiology and Biotechnology. 2001, 56(3-4), 289-295. DOI: 10.1007/s002530100685. ISSN 0175-7598.

[33] KAPOOR, A. a T. VIRARAGHAVAN. Biosorption of heavy metals on *Aspergillus niger*: Effect of pretreatment. Bioresource Technology. 1998, 63(2), 109-113. DOI: 10.1016/S0960-8524(97)00118-1.

[34] KAPOOR, Anoop, T VIRARAGHAVAN a D.Roy CULLIMORE. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*: Effect of pretreatment. Bioresource Technology. 1998, 63(2), 109-113. DOI: 10.1016/S0960-8524(98)00192-8. ISSN 09608524.

[35] KAPOOR, Anoop, T. VIRARAGHAVAN a D.Roy CULLIMORE. Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*: Effect of pretreatment. Bioresource Technology. 1998, 63(2), 109-113. DOI: 10.1016/S0960-8524(97)00055-2. ISSN 09608524.

[36] NIRMAL KUMAR, J.I., Basil GEORGE, Rita N. KUMAR, P.R. SAJISH a Shailendra VIYOL. Biosorption of mercury and lead by dried *Aspergillus niger* Tiegh. isolated from estuarine sediments. International Journal of Environmental Studies. 2010, 67(5), 735 - 746. DOI: 10.1080/00207233.2010.517644.

[37] OOTHROYD, Peter. a Xuân Nam. PHẠM. Socioeconomic renovation in Viet Nam: the origin, evolution, and impact of doi moi. Chemical Engineering Journal. 2016, 2000, (34), 186-193. DOI: doi.org/10.1016/j.cej.2016.06.103.

[38] YAVUZ, Handan, Adil DENIZLI, Hakan GÜNGÜNEŞ, Mirka SAFARIKOVA a Ivo SAFARIK. Biosorption of mercury on magnetically modified yeast cells. Separation and Purification Technology. 2006, 52(2), 253-260. DOI: 10.1016/j.seppur.2006.05.001.

[39] SAY, R, Adil DENIZLI a M. Yakup ARICA. Biosorption of cadmium(II), lead(II) and copper(II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. 2001, 67(1), 67-70. DOI: 10.1016/S0960-8524(00)00071-7.

[40] WAGNER-DÖBLER, Irene, Harald VON CANSTEIN, Ying LI, Kenneth N. TIMMIS a Wolf-Dieter DECKWER. Removal of Mercury from Chemical Wastewater by Microorganisms in Technical Scale. Environmental Science and Technology. 200n. l., 34(21), 4628-4634. DOI: 10.1021/es0000652.

[41] BERNHOFT, Robin A. Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature. *Journal of Environmental and Public Health*. 2012, 10. DOI: 10.1155/2012/460508.

[42] ZAHIR, Farhana, Shamim J. RIZWI, Soghra K. HAQ a Rizwan H. KHAN. Low dose mercury toxicity and human health. *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2005, 20(2), 351-360. DOI: 10.1016/j.etap.2005.03.007. ISSN 382-6689.

[43] MARS: BIO-MED PROCESSES INC [online]. 2018, [cit. 2018-05-09]. Dostupné z: <http://www.marsbiomed.com/find-a-dentist/mercury-cycle/>

[44] SKUBAL, L.R. a N.K. MESHKOV. Reduction and removal of mercury from water using arginine-modified TiO₂. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2002, 148(1-3), 211-214. DOI: 10.1016/S1010-6030(02)00045-X. ISSN 1010 - 6030.

[45] ZEROUAL, Youssef, Adnane MOUTAOUAKKIL, Fatima ZOHRA DZAIRI, Mohamed TALBI, Park UNG CHUNG, Kangmin LEE a Mohamed BLAGHEN. Biosorption of mercury from aqueous solution by *Ulva lactuca* biomass. *Bioresource Technology*. 2003, 90(3), 349-351. DOI: 10.1016/S0960-8524(03)00122-6.

[46] KELLY, C. A., John W. M. RUDD a M. H. HOLOKA. Effect of pH on Mercury Uptake by an Aquatic Bacterium: Implications for Hg Cycling. *Environmental science and technology*. 2003, 37(13), 2941–2946. DOI: 10.1021/es026366o.

[47] CHANG, Jo-Shu a Juan HONG. Biosorption of mercury by the inactivated cells of *Pseudomonas aeruginosa* PU21 (Rip64). *Biotechnology and Bioengineering*. 1994, 44(8), 999-1006. DOI: 10.1002/bit.260440817.

[48] POSPICHAL, Jan, Petr GEBAUER, Petr BOCEK a C. F. POOLE. Measurement of mobilities and dissociation constants by capillary isotachopheresis. DOI: 10.1021/cr00092a011. ISBN 10.1021/cr00092a011.

[49] HIROKAWA, T., Petr GEBAUER, Petr BOCEK a C. F. POOLE. ELECTROPHORESIS | Isotachopheresis. In *Encyclopedia of Separation Science*, Oxford: Academia Press, 2000, 1272-1280. DOI: 10.1016/B0-12-226770-2/03611-5. ISBN 9780122267703.

[50] DOČEKAL, Bohumil. Atomová absorpční spektrometrie: sborník přednášek z kurzu. 2., upr. a dopl. vyd. Český Těšín: 2 THETA, 2003, 164 s. ISBN 80-86380-16-5.

[51] LAJUNEN, Lauri H.J. *Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1992, 241 s. ISBN 0-85186-873-8.

[52] SZÁKOVÁ, J., D. KOLÍHOVÁ, D. MIHOLOVÁ a P. MADER. Single-Purpose Atomic Absorption Spectrometer AMA-254 for Mercury Determination and its Performance in Analysis of Agricultural and Environmental Materials. *Chemical Papers* [online]. Poland: Versita, 2004, 2004, 58(5), 311-315 [cit. 2018-03-25]. ISSN 0366-6352.

[53] YNEK, Vaclav, Pavel SUBRT a Josef MARECEK. Uncertainties of mercury determinations in biological materials using an atomic absorption spectrometer - AMA 254. DOI: 10.1007/s007690050012. ISSN 0949-1775.

[54] WELZ, Bernhard a Michael SPERLING. *Atomic Absorption Spectrometry*. 3rd rev.Ed. Weinheim: Wiley-VCH, 1999, 941 s. ISBN 3-527-28571-7.

[55] ZWIETERING, MH, a VANTRIET. MODELING OF THE BACTERIAL-GROWTH CURVE. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 1990, 56(6), 1875-1881.

[56] TONNER, Peter D., Cynthia L. DARNELL, Barbara E. ENGELHARDT a Amy K. SCHMID. Detecting differential growth of microbial populations with Gaussian process regression. Genome Res [online]. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017, , 320-333 [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.1101/gr.210286.116. ISSN 1549-5469.

[57] GOUGOULI, Maria a Konstantinos P. KOUTSOUMANIS. Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. International Journal of Food Microbiology. 2010, 140(2-3), 254-262. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.021. ISSN 0168-1605.

[58] KUBICEK, C. P., O. ZEHENTGRUBER, Housam EL-KALAK a M. RÖHR. Regulation of citric acid production by oxygen: Effect of dissolved oxygen tension on adenylate levels and respiration in *Aspergillus niger*. European journal of applied microbiology and biotechnology. 1980, 9(2), 110-115. DOI: 10.1007/BF00503505.

[59] RASOULNIA, P. a S.M. MOUSAVI. Maximization of organic acids production by *Aspergillus niger* in a bubble column bioreactor for V and Ni recovery enhancement from power plant residual ash in spent-medium bioleaching experiments. Bioresource Technology. 2016, , 729-736. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.05.114.

[60] DIANO, A., J. PEETERS, J. DYNESSEN a J. NIELSEN. Physiology of *Aspergillus niger* in oxygen-limited continuous cultures: Influence of aeration, carbon source concentration and dilution rate. Biotechnology and Bioengineering. 2009, 5(103). DOI: 10.1002/bit.22329.

[61] KARUNASAGAR, D., J. ARUNACHALAM, K. RASHMI a P. Muthi MOHAN. Biosorption of inorganic and methyl mercury by a biosorbent from *Aspergillus niger*. World Journal of Microbiology & Biotechnology. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 213n. 1., 19, 291-295. DOI: 10.1023/A:1023610425758

[62] URÍK, Martin, Michal HLODÁK, Petra MIKUŠOVÁ a Peter MATÚŠ. Potential of Microscopic Fungi Isolated from Mercury Contaminated Soils to Accumulate and Volatilize Mercury(II). Water, Air, & Soil Pollution. 2014, 225(12). DOI: 10.1007/s11270-014-2219-z. ISSN 1573-2932

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

TCA cyklus	trikarboxylový cyklus
ATP	adenosintrifosfát
FAD	flavinadenindinukleotid
GOD	glukózooxidáza
RSH	relativní výška schodu
UV	ultrafialové záření
AAS	atomová absorpční spektrometrie
CV-AAS	atomová absorpční spektrometrie s generováním studených par