

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2016

Bc. Eva Hazuchová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**PRODUKCE MIKROBIÁLNÍCH ENZYMŮ A JEJICH
STABILIZACE ENKAPSULACÍ**

PRODUCTION OF MICROBIAL ENZYMES AND THEIR STABILIZATION BY ENCAPSULATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Eva Hazuchová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0939/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Eva Hazuchová	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace (N2846)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808T031)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Petra Matoušková, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Produkce mikrobiálních enzymů a jejich stabilizace enkapsulací

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- přehledná literární rešerše zaměřená na mikrobiální enzymy, zejména na extracelulární hydrolázy, jejich producenty a vlastnosti
- optimalizace metod kultivace mikroorganismů a stanovení aktivity enzymů
- indukce produkce vybraných mikrobiálních enzymů
- enkapsulace produkovaných enzymů
- srovnání dlouhodobé stability volných a enkapsulovaných enzymů

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Eva Hazuchová
Student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá produkcí mikrobiálních enzymů a jejich následnou stabilizací prostřednictvím enkapsulace. Teoretická část diplomové práce se zaměřuje na mikrobiální enzymy, zejména extracelulární hydrolázy, jejich producenty a vlastnosti. V rámci teorie je rovněž diskutována možnost aplikace enzymů v oblasti farmacie a medicíny.

Experimentální část diplomové práce byla zaměřena na samotnou produkci mikrobiálních enzymů a jejich stabilizaci. Sledovány byly produkce proteolytických a lipolytických enzymů v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu. Nejvyšší produkce enzymů byla zaznamenána u plísně *Aspergillus oryzae* při kultivaci na pšeničných otrubách 3. den kultivace. V rámci experimentální části byla dále provedena identifikace, izolace a purifikace enzymů. Podstatnou částí experimentu byla stabilizace naprodukovaných mikrobiálních enzymů prostřednictvím enkapsulace. Připraveny byly alginátové částice, stanovená enkapsulační účinnost se pohybovala v rozmezí 55 až 70 %. S nejvyšší účinností se enkapsulovaly enzymy plísně *Aspergillus oryzae*. Následně byla ve dvou prostředích (ve vodě a v gelu) v průběhu šesti týdnů sledována dlouhodobá stabilita enkapsulovaných enzymů a srovnána se stabilitou enzymů volných. U volných enzymů došlo během skladování k výraznému poklesu enzymových aktivit, a to především v rozmezí čtvrtého a šestého týdne uchovávání. U enkapsulovaných enzymů byl naopak pozorován nárůst enzymových aktivit. Stabilita byla studována rovněž z pohledu stability částic samotných. Obecně vyšší stabilitu vykazovaly částice uchovávány v prostředí gelu.

V předložené diplomové práci bylo testováno i potenciální využití enzymů ve farmacii, jakožto látek podporujících trávení. Dle dosažených výsledků by testované částice s enkapsulovanými mikrobiálními enzymy mohly být vhodné pro vybrané farmaceutické aplikace.

KLÍČOVÁ SLOVA

enzymy, mikrobiální enzymy, extracelulární hydrolázy, *Aspergillus oryzae*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Aureobasidium pullulans*, enkapsulace, farmacie, kosmetika

ABSTRACT

The present thesis deals with the production of microbial enzymes and their subsequent stabilization through encapsulation. The theoretical part focuses on microbial enzymes, especially extracellular hydrolases, their producers and characteristics. Within the theory is also discussed the possibility of the application of enzymes in the field of pharmacy and medicine.

Experimental work was focused on the actual production of microbial enzymes and methods for their to stabilization. The production of proteolytic and lipolytic enzymes in dependence on time and the used culture substrate were followed. The highest enzyme production was observed in *Aspergillus oryzae* when cultured on wheat bran at the third day of cultivation. In the experimental part was further carried out the identification, isolation and purification of enzymes. A substantial part of the experiment was to stabilize produced microbial enzymes by encapsulation. Enzymes were entrapped into alginate particles with encapsulation efficiency in the range of 55-70 %. The highest efficiency exhibited encapsulated enzymes from *Aspergillus oryzae*. Subsequently, long-term stability of the encapsulated enzyme in two environments (in water and gel) was followed during six weeks in comparison with free enzyme. During storage of free enzyme a significant decrease in enzyme activities occurred, especially between the fourth and sixth week of storage. On the contrary, in encapsulated increased enzyme activities were observed. Empty particles exhibited higher stability during storage in the gel than in water.

In this thesis potential use of enzymes in the pharmaceutical industry as agents promoting digestion was tested too. According to the results, particles with encapsulated microbial enzymes could be considered as suitable for some pharmaceutical applications.

KEYWORDS

enzymes, microbial enzymes, extracellular hydrolases, *Aspergillus oryzae*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Aureobasidium pullulans*, encapsulation, pharmaceuticals, cosmetics

HAZUCHOVÁ, E. *Produkce mikrobiálních enzymů a jejich stabilizace enkapsulací*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 73 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivaně Márové, Csc. za odborné vedení a všestrannou pomoc při řešení problémů. Dále bych ráda poděkovala své konzultantce Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za cenné rady, ochotu a pomoc při zpracování experimentální části. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, svému příteli a kamarádce Kristýně Eggerové, kteří mi byli velkou podporou během celého studia.

OBSAH

1 ÚVOD	9
2 TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 ENZYMY	10
2.1.1 Katalytická aktivita enzymů	10
2.1.2 Mechanismus enzymatické katalýzy	11
2.1.3 Koenzymy	11
2.1.4 Regulace enzymové aktivity	12
2.2 EXTRACELULÁRNÍ HYDROLÁZY	13
2.2.1 Proteázy	13
2.2.2 Lipázy	14
2.2.3 Další extracelulární hydrolázy	15
2.2.3.1 Amylázy	15
2.2.3.2 Celulázy	15
2.2.3.3 Xylanázy	15
2.3 VYBRANÉ MIKROORGANIZMY PRODUKUJÍCÍ EXTRACELULÁRNÍ HYDROLÁZY	15
2.3.1 Plíseň <i>Aspergillus oryzae</i>	15
2.3.2 Plíseň <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	17
2.3.3 Mikroorganismus <i>Aureobasidium pullulans</i>	17
2.4 APLIKACE ENZYMŮ VE FARMACII A KOSMETICE	18
2.4.1 Aplikace enzymů ve farmacii	19
2.4.1.1 Enzymatická léčba chronických ran	19
2.4.1.2 Enzymy podporující trávení	19
2.4.1.3 Enzymy jako onkolytika	19
2.4.2 Aplikace enzymů v kosmetice	20
2.4.2.1 Antioxidační kosmetika	20
2.4.2.2 Kosmetické přípravky proti celulitidě	21
2.4.2.3 „Anti-aging“ kosmetika – kosmetika proti stárnutí kůže	22
2.4.2.4 Enzymatický peeling	22
2.4.2.5 Hygiena dutiny ústní	24
3 CÍL PRÁCE	25
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1 CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ, MIKROBIÁLNÍ KMENY A ODPADNÍ SUBSTRÁTY	26
4.1.1 Použité chemikálie	26
4.1.2 Použité přístroje a pomůcky	27
4.1.3 Použité mikroorganismy	27
4.1.4 Použité odpadní substráty	27
4.2 KULTIVACE MIKROORGANIZMŮ	28
4.2.1 Uchovávání mikroorganismů	28
4.2.2 Příprava inokula	28
4.2.3 Produkční médium	28
4.3 STANOVENÍ ENZYMOVÝCH AKTIVIT	30
4.3.1 Stanovení proteolytické aktivity	30
4.3.1.1 Postup pro stanovení proteolytické aktivity	30

4.3.2	Stanovení lipolytické aktivity	30
4.3.2.1	Postup pro stanovení kalibrační křivky	30
4.3.2.2	Postup pro přípravu substrátu.....	30
4.3.2.3	Postup pro stanovení lipolytické aktivity	30
4.4	STANOVENÍ EXTRACELULÁRNÍCH BÍLKOVIN	31
4.4.1	Složení roztoků	31
4.4.1.1	Postup pro stanovení kalibrační křivky	31
4.4.1.2	Postup pro stanovení extracelulárních bílkovin	31
4.5	IDENTIFIKACE, IZOLACE A PURIFIKACE ENZYMŮ	31
4.5.1	Vertikální PAGE SDS elektroforéza.....	31
4.5.1.1	Postup pro přípravu roztoků	31
4.5.1.2	Postup pro přípravu polyakrylamidového gelu	32
4.5.1.3	Postup pro přípravu vzorků	32
4.5.1.4	Postup pro provedení elektroforézy	32
4.5.1.5	Postup pro barvení gelu Coomassie brilantovou modří	32
4.5.2	Gelová filtrace.....	32
4.5.3	Ultrafiltrace	33
4.6	STABILIZACE ENZYMŮ.....	33
4.6.1	Příprava částic pomocí enkapsulátoru.....	33
4.6.1.1	Postup pro přípravu částic pomocí enkapsulátoru.....	33
4.6.2	Stanovení enkapsulační účinnosti	33
4.6.2.1	Postup pro stanovení enkapsulační účinnosti	33
4.6.3	Stanovení dlouhodobé stability volných enzymů	34
4.6.3.1	Postup pro stanovení dlouhodobé stability volných enzymů	34
4.6.4	Stanovení dlouhodobé stability enkapsulovaných enzymů.....	34
4.6.4.1	Postup pro stanovení dlouhodobé stability enkapsulovaných enzymů	34
4.6.5	Stanovení dlouhodobé stability částic.....	34
4.6.5.1	Postup pro stanovení dlouhodobé stability částic.....	34
4.6.6	Uvolňování a zachování aktivit enkapsulovaných enzymů v GIT.....	34
4.6.6.1	Stanovení uvolňování a zachování aktivit enkapsulovaných enzymů v GIT.....	34
4.6.6.2	Postup pro přípravu modelové žaludeční šťávy	35
4.6.6.3	Postup pro přípravu modelové pankreatické šťávy	35
4.6.6.4	Postup pro přípravu modelové žlučové šťávy	35
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	36
5.1	KULTIVACE MIKROORGANIZMŮ.....	36
5.1.1	Plíseň <i>Aspergillus oryzae</i>	36
5.1.1.1	Stanovení proteolytické aktivity.....	36
5.1.1.2	Stanovení lipolytické aktivity.....	37
5.1.1.3	Stanovení extracelulárních bílkovin.....	38
5.1.2	Plíseň <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	40
5.1.2.1	Stanovení proteolytické aktivity.....	40
5.1.2.2	Stanovení lipolytické aktivity.....	42
5.1.2.3	Stanovení extracelulárních bílkovin.....	43
5.1.3	Mikroorganismus <i>Aureobasidium pullulans</i>	47
5.1.3.1	Stanovení proteolytické aktivity.....	47

5.1.3.2	Stanovení lipolytické aktivity.....	48
5.1.3.3	Stanovení extracelulárních bílkovin.....	49
5.2	IDENTIFIKACE, IZOLACE A PURIFIKACE ENZYMŮ	51
5.2.1	Vertikální PAGE SDS elektroforéza.....	51
5.2.2	Gelová filtrace.....	53
5.2.3	Ultrafiltrace	53
5.3	STABILIZACE ENZYMŮ.....	54
5.3.1	Stanovení enkapsulační účinnosti	55
5.3.2	Enkapsulace enzymů z plísňe <i>Aspergillus oryzae</i>	56
5.3.2.1	Stanovení dlouhodobé stability volných a enkapsulovaných enzymů	56
5.3.2.2	Stanovení dlouhodobé stability částic	57
5.3.3	Enkapsulace enzymů z plísňe <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	59
5.3.3.1	Stanovení dlouhodobé stability volných a enkapsulovaných enzymů	59
5.3.3.2	Stanovení dlouhodobé stability částic	60
5.3.4	Enkapsulace enzymů z mikroorganismu <i>Aureobasidium pullulans</i>	61
5.3.4.1	Stanovení dlouhodobé stability volných a enkapsulovaných enzymů	62
5.3.4.2	Stanovení dlouhodobé stability částic	63
5.4	APLIKACE ENZYMŮ VE FARMACII – ENZYMY PODPORUJÍCÍ TRÁVENÍ	64
6	ZÁVĚR.....	67
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	69
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	73

1 ÚVOD

V každém okamžiku působí v lidském těle tisíce enzymů. Podmínky teploty a tlaku jsou zde však tak mírné, že většina biochemických reakcí by za normálních podmínek vůbec neproběhla. Enzymy jsou biologické katalyzátory schopné tyto reakce urychlovat. Přítomnost enzymů je tedy velmi důležitá pro správné fungování organismu. Můžeme říci, že je doslova nezbytné, aby v těle byly všechny potřebné enzymy zastoupeny v dostatečném množství a v optimálním funkčním stavu.

Unikátních vlastností enzymů se využívá i v nejrůznějších průmyslových oblastech. Ačkoliv rostlinné i živočišné tkáně jsou cenným zdrojem těchto enzymů, zejména specializovaných, pro průmyslové aplikace je třeba mít k dispozici enzymy, které jsou dostupné sice v nižší čistotě, ale ve velkém množství a za ekonomicky přijatelnou cenu. Nejvhodnějším zdrojem těchto typů enzymů jsou mikroorganismy. Mezi nejvýznamnější průmyslově používané enzymy patří zejména proteázy, lipázy, amylázy, celulózy či xylanázy produkované řadou plísní, ale i bakterií a kvasinek. Jako substráty pro biotechnologickou produkci se v současné době nejčastěji používají různé odpady zemědělského a potravinářského průmyslu, díky čemuž jsou z ekonomického hlediska mikrobiální enzymy opět přínosem. Největší množství enzymů se spotřebovává při výrobě detergentů, dále pak v potravinářství a při výrobě krmných směsí. Své uplatnění však enzymy nacházejí i v oblasti farmacie a kosmetiky. Pro některé aplikace lze i zde využít mikrobiálních enzymů, je však nutné mít na paměti, že enzymy produkované mikroby za účelem aplikace ve farmacii či kosmetice se neobejdou bez dokonalé purifikace.

Předložená práce je kromě produkce mikrobiálních enzymů zaměřena také na jejich stabilizaci pomocí enkapsulace. Enkapsulace je definována jako zachycení jedné látky uvnitř druhé, výsledkem je potom částice tvořená jádrem s aktivní látkou a vnějším obalem. Při této technologii je tedy bioaktivní složka obklopena bariérou, jež ji chrání před škodlivým působením okolního prostředí a zajišťuje tak její stabilitu. Enkapsulaci se dostává stále více pozornosti ať už v oblasti farmaceutického, kosmetického či potravinářského průmyslu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

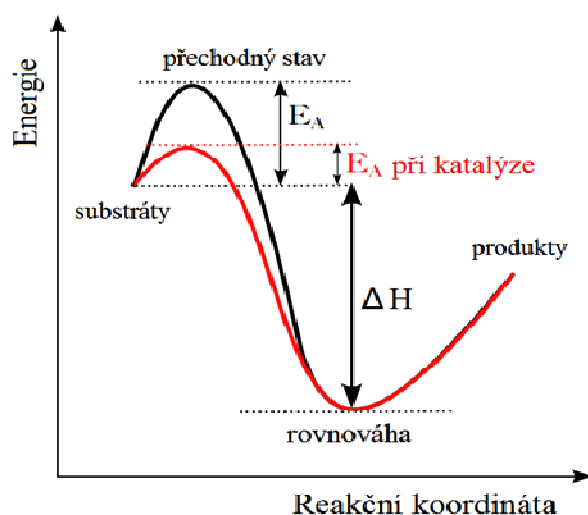
2.1 Enzymy

Jedním ze základních úkolů proteinů je jejich vystupování v roli enzymů – katalyzátorů, které zvyšují rychlost prakticky všech chemických reakcí v buňkách. Většina biochemických reakcí je tak pomalá, že v případě absence enzymatické katalýzy by vůbec neproběhla, jelikož podmínky teploty a tlaku kompatibilní s životem jsou velmi mírné. Enzymy urychlují tyto reakce více než milionkrát, tudíž reakce, které by jindy trvaly roky, mohou v přítomnosti příslušných enzymů proběhnout ve zlomcích sekundy. Buňky obsahují tisíce různých enzymů a právě jejich činnost určuje, která z mnoha možných chemických reakcí v dané buňce skutečně proběhne [1].

2.1.1 Katalytická aktivita enzymů

Stejně jako všechny ostatní katalyzátory jsou enzymy charakterizovány dvěma základními vlastnostmi. Zaprvé zvyšují rychlost chemických reakcí, aniž by docházelo k jejich samotnému spotřebovávání či změně. Zadruhé zvyšují reakční rychlosti beze změny chemické rovnováhy katalyzované reakce [1, 2].

Účinek enzymu na reakce tohoto typu je nejlépe ilustrován pomocí energetických změn, které nastávají během konverze substrátů na produkty (Obr. 1). Rovnováha reakce je určena konečnými energetickými stavy substrátů a produktů, které nejsou ovlivněny enzymatickou katalýzou. Aby reakce mohla proběhnout, musí být substrát nejprve převeden na vyšší energetický stav, který označujeme jako stav tranzitní neboli přechodný. Energie potřebná k dosažení tohoto tranzitního stavu (aktivační energie), představuje překážku pro průběh reakce, což omezuje její rychlost. Enzymy působí pomocí snížení aktivační energie, čímž se rychlost reakce zvyšuje. Zvýšená rychlost je potom stejná v obou směrech, jak ve směru přímém, tak ve směru zpětném, jelikož substráty i produkty musí projít stejným tranzitním stavem [1, 2].



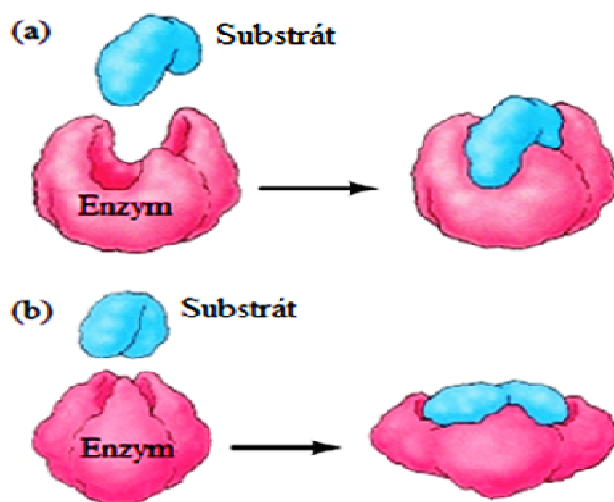
Obr. 1 Katalytické působení enzymu [2].

Katalytická aktivita enzymů však zahrnuje také navázání substrátů za účelem vytvoření komplexu enzym-substrát (ES). Substrát se váže na specifickou oblast enzymu nazývanou aktivní místo. Zatímco se substrát váže na toto aktivní místo, převede se na produkt reakce a následně se z enzymu uvolní [1].

2.1.2 Mechanismus enzymatické katalýzy

Vazba substrátu na aktivní místo enzymu je velmi specifickou interakcí. Aktivní místa jsou štěrbininy nebo prohlubně na povrchu enzymu, v nichž se nachází katalyticky aktivní aminokyselinové zbytky. Substráty se zpočátku vážou na aktivní místo nekovalentními interakcemi zahrnujícími vodíkové vazby, iontové vazby a hydrofobní interakce. Teprve jakmile je substrát navázán na aktivní místo enzymu, může několik mechanismů urychlit jeho přeměnu na produkt dané reakce. Většina biochemických reakcí však zahrnuje vzájemné působení mezi dvěma nebo více různými substráty [1].

Enzymy mohou urychlovat chemické reakce i pomocí změny konformace tzv. efektem přiblížení a orientace substrátů s cílem rychlejšího dosažení konformace tranzitního stavu. Nejjednodušším modelem interakce enzym-substrát je model zámku a klíče, v němž substrát přesně zapadá do aktivního místa (Obr. 2). V mnoha případech je však konfigurace jak enzymu, tak substrátu modifikována v průběhu vázání substrátu, takový proces je označován jako indukované přizpůsobení (Obr. 2). V takových případech se konformace substrátu mění tak, aby se více podobala konformaci tranzitního stavu. Stres, který je vyprodukován takovýmto narušením substrátu, může dále usnadnit jeho konverzi do tranzitního stavu, a to oslabením kritických vazeb. Kromě toho je tranzitní stav stabilizován jeho těsnými vazbami k enzymu, čímž se snižuje potřebná energie aktivace [1, 2, 3].



Obr. 2 Interakce ES – (a) model zámku a klíče, (b) model indukovaného přizpůsobení [1].

2.1.3 Koenzymy

Kromě vazby svých substrátů mohou aktivní místa enzymů vázat i jiné malé molekuly zúčastňující se katalýzy, jsou jimi tzv. prostetické skupiny. Prostetické skupiny jsou malé molekuly vázané na bílkoviny, ve kterých hrají rozhodující funkční role. Například kyslík, který je přenášen myoglobinem a hemoglobinem se váže na hem, prostetickou skupinu těchto proteinů. V jiných případech jsou na enzymy vázány kovové ionty (jako je zinek nebo železo) a hrají tak centrální roli v katalytickém procesu. Vedle těchto se účastní specifických typů enzymatických reakcí i nejrůznější nízkomolekulární organické molekuly. Tyto molekuly se nazývají koenzymy, protože spolupracují s enzymy za účelem zvýšení reakční rychlosti. Na rozdíl od substrátů, koenzymy jsou reakcemi, na kterých se podílí, nevratně pozměněny. Podléhají recyklaci a mohou se tak účastnit více enzymatických reakcí [1].

Koenzymy mohou sloužit jako přenašeče několika typů chemických skupin. Prominentním příkladem koenzymu je nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+), který funguje jako přenašeč

vodíku a elektronů v oxidačně-redukčních reakcích. NAD^+ může přijmout iont vodíku (H^+) a dva elektrony (e^-) z jednoho substrátu a vytvořit tak NADH. NADH pak může darovat tyto elektrony druhému substrátu za regenerace NAD^+ . Tímto způsobem NAD^+ přenáší elektrony z prvního substrátu (který oxiduje) na druhý (který redukuje) [1, 2].

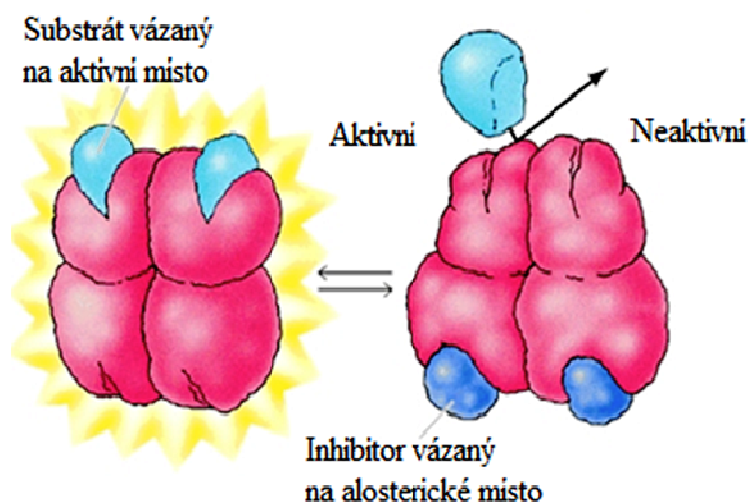
Jako elektronové přenašeče slouží i několik dalších koenzymů, jiné mohou být zapojeny do transportu jiných chemických skupin, například karboxylových či acylových. Mnoho koenzymů je také strukturně odvozeno od vitaminů, které jsou nutnou součástí potravy člověka a jiných vyšších živočichů, které ztratily schopnost tyto sloučeniny syntetizovat [1].

2.1.4 Regulace enzymové aktivity

Důležitým rysem většiny enzymů je, že jejich činnost není konstantní, může být však modulována. Enzymové aktivity lze tedy regulovat tak, aby pracovaly vhodným způsobem, za účelem přizpůsobení se různým fyziologickým potřebám, které mohou v průběhu života buňky vznikat [1, 2].

Jedním z běžných typů regulace enzymů je tzv. inhibice zpětnou vazbou, kde produkt metabolické dráhy inhibuje aktivitu enzymu podílejícího se na jeho syntéze. Například aminokyselina isoleucin se syntetizuje sérií reakcí, které začínají aminokyselinou threonin. První krok dráhy je katalyzován pomocí enzymu threonindeaminázy, který je inhibován isoleucinem, konečným produktem dráhy. Tímto způsobem dostatečné množství isoleucinu v buňce inhibuje threonindeaminázu a blokuje tak jeho další syntézu. V případě, že koncentrace isoleucinu klesá, zpětnovazebná inhibice je uvolněna, threonindeamináza již není inhibována a isoleucin je znovu syntetizován. Díky regulaci aktivity threonindeaminázy, buňka syntetizuje potřebné množství isoleucinu, ale zároveň brání plýtvání energií na syntézu více isoleucinu, než je potřeba [1, 3].

Zpětnovazebná inhibice je jedním z příkladů alosterické regulace, ve které je aktivita enzymu řízena vazbou malých molekul na regulační místa enzymu. Termín "alosterické regulace" pochází ze skutečnosti, že regulační molekuly se vážou nikoliv na katalytické místo, ale na jiné místo proteinu (allos = "jiný" a stereos = "místo"). Vazba regulační molekuly mění konformaci proteinu, což pozměňuje tvar aktivního místa a katalytickou aktivitu enzymu (Obr. 3). V případě threonindeaminázy, vazba regulační molekuly (isoleucin) inhibuje enzymatickou aktivitu. V jiných případech regulační molekuly slouží jako aktivátory, tedy spíše stimulující než potlačující své cílové enzymy [1, 2, 3].



Obr. 3 Alosterická regulace [1].

Aktivity enzymů mohou být také regulovány jejich interakcemi s jinými proteiny či pomocí kovalentních modifikací například přidáním fosfátových skupin k serinovým, threoninovým nebo tyrosinovým zbytkům. Fosforylace je obzvláště důležitým mechanismem pro regulaci enzymové aktivity, jelikož přidání fosfátových skupin stimuluje nebo inhibuje činnost různých enzymů. Kupříkladu svalové buňky reagují na epinefrin (adrenalin) odbouráváním glykogenu na glukózu, čímž se vytvoří zdroj energie pro zvýšenou svalovou aktivitu. Odbourávání glykogenu je katalyzováno enzymem glykogenfosforylázou, který je aktivován fosforylací v důsledku vazby adrenalinu na receptor nacházející se na povrchu svalové buňky. Fosforylace proteinů hraje ústřední roli v regulaci nejen metabolických reakcí, ale také mnoha dalších buněčných funkcí, včetně růstu a diferenciací buněk [1, 3].

2.2 Extracelulární hydrolázy

Dle místa působení lze enzymy rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří enzymy intracelulární, druhou pak enzymy extracelulární [3, 4].

Intracelulární enzymy, které tvoří většinu, zůstávají uvnitř buňky, ve které vznikly a tam vykonávají své specifické funkce. Fungují buď v rozpuštěné formě, nebo vázané v různých biologických strukturách. Mnohé z intracelulárních enzymů se vyskytují jen v některých orgánech, v případě lokalizace v buňkách pak pouze v některých jejích částech (organelách). Menší část intracelulárních enzymů naopak nemá specifickou lokalizaci a setkáváme se s nimi ve většině částí buněk a prakticky v celém organismu [3, 4].

Extracelulární enzymy jsou buňkami, které je vyrobily, vylučovány a nacházíme je tedy v četných tkáňových kapalinách, např. u živočichů v trávicích šťávách, krvi či mozkomíšním moku. Obdobným způsobem uvolňují do kultivačního prostředí extracelulární enzymy i některé mikroorganismy, jedná se zejména o enzymy katalyzující hydrolýzu živin [3, 4].

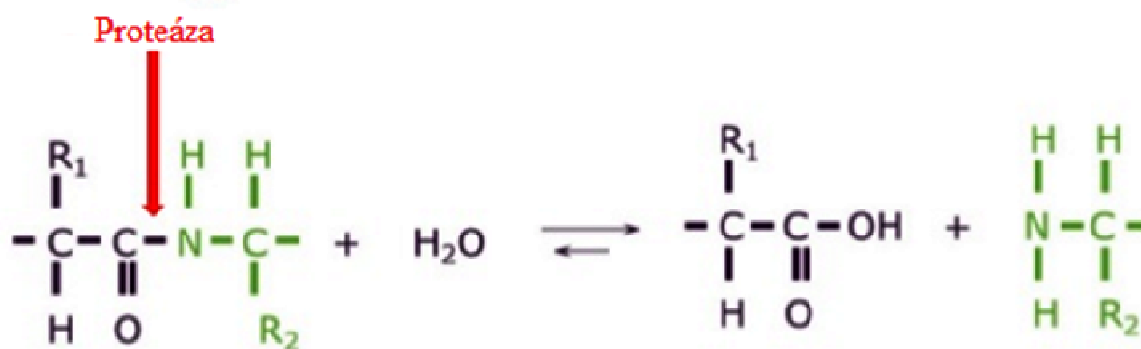
Úkolem hydrolytických enzymů je hydrolytické štěpení vazeb vzniklých kondenzací, např. vazeb peptidových, glykosidových či esterových. Jde o velmi početnou skupinu enzymů, vesměs povahy jednoduchých bílkovin. Na podtřídy se dále dělí podle typu štěpených vazeb [4].

2.2.1 Proteázy

Z hlediska praktické aplikace jsou proteázy zatím nejvýznamnější skupinou z třídy hydroláz. Společným rysem proteolytických enzymů je schopnost hydrolyzovat peptidové vazby bílkovinných substrátů (Obr. 4). Celá řada z nich však vykazuje další aktivity jako esterovou, koagulační nebo transpeptidázovou. Vzájemně se velmi liší původem, lokalizací, fyzikálně-chemickými vlastnostmi, specifitou, mechanismem působení, fyziologickými funkcemi i možnostmi jejich praktického využití [4].

Mikrobiální proteázy jsou jednou z nejdůležitějších skupin průmyslově a komerčně vyráběných enzymů podílejících se přibližně až na dvou třetinách celkových obchodů s enzymy. Ačkoli proteázy jsou produkovány mnoha mikroorganismy, důraz je kladen především na mikroorganismy schopné produkovat proteázy požadovaných vlastností. Tato možnost volby vhodných vlastností enzymů a snadnost jejich výroby ve velkých kvantech umožnily širokou aplikaci mikrobiálních proteáz v praxi [4, 5].

Proteolytické enzymy jsou využívány zejména při výrobě biologických pracích prostředků. Významnou roli však hrají také v potravinářství, kde nejčastěji nachází své uplatnění v mlékařenském, masném, pivovarnickém či pekárenském průmyslu. Další aplikace pak nacházíme v kožedělném průmyslu, při výrobě krmných směsí, ve farmacii a medicíně, při výrobě bílkovinných hydrolyzátů a v neposlední řadě ve výzkumu [4].



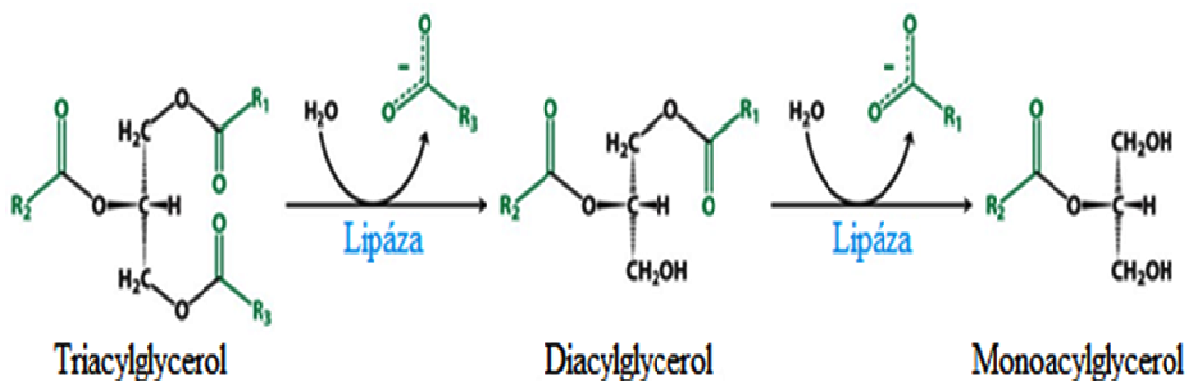
Obr. 4 Proteolytická aktivita [6].

2.2.2 Lipázy

Lipolytické enzymy jsou enzymy ubikvitní, a tudíž pro život zcela zásadní. Nalézt je můžeme jak u bakterií a plísní, tak u živočichů. Definovány jsou jako karboxylesterázy hydrolyzující acylglyceroly (Obr. 5). Lipázy, které hydrolyzují acylglyceroly s uhlíkatým řetězcem mastných kyselin tvořeným méně než deseti uhlíky, jsou považovány za esterázy nebo karboxylázy (EC 3.1.1.1). Enzymy, které hydrolyzují acylglyceroly obsahující řetězce mastných kyselin s počtem uhlíků větším nebo rovným deseti, jsou potom označovány jako lipázy nebo také jako triacylglycerolacylhydrolázy (EC 3.1.1.3). Esterázy jsou aktivní ve vodných roztocích, zatímco „skutečné“ lipázy jsou aktivnější spíše na rozhraní voda-lipid [7, 8].

Lipázy přitahují v současné době obrovskou pozornost, a to především díky jejich velkému biotechnologickému potenciálu. Většina lipáz používaných v průmyslu je řazena mezi enzymy mikrobiální, a to jak plísňového, tak bakteriálního původu. Mikrobiální lipázy jsou tedy důležitou skupinou biotechnologicky cenných enzymů, také vzhledem k všestrannosti jejich užitečných vlastností a snadné velkoobjemové produkci [9, 10].

Lipolytické enzymy nachází uplatnění v mnoha různých odvětvích. Mezi ty nejvýznamnější patří zejména potravinářství, výroba detergentů, farmacie, dále pak kožedělný, textilní, kosmetický a papírenský průmysl. Omezení průmyslového využití těchto enzymů bylo důsledkem jejich vysokých výrobních nákladů, tento problém mohou vyřešit molekulární technologie, které umožňují produkci těchto enzymů na vysoké úrovni a v podstatě v čisté formě [11, 12].



Obr. 5 Lipolytická aktivita [13].

2.2.3 Další extracelulární hydrolázy

Mezi významné extracelulární hydrolázy patří kromě proteolytických a lipolytických enzymů ještě další enzymy, jsou jimi amylázy, celulázy a xylanázy.

2.2.3.1 Amylázy

Amylázy jsou jedny z hlavních průmyslově používaných enzymů. Jedná se o enzymy hydrolyzující molekuly škrobu na oligomery složené z glukózových jednotek. Ačkoliv tyto enzymy lze získat z rostlin i živočichů, pro průmyslové aplikace se ukázaly být těmi nejvhodnějšími producenty právě mikroorganismy. Pro komerční výrobu však splňuje kritéria pouze několik vybraných kmenů [14].

Produkce amyláz tvoří přibližně 25 % světového trhu s enzymy. Své uplatnění nachází v nejrůznějších průmyslových odvětvích, mezi které patří zejména potravinářský, textilní a papírenský průmysl. Další neméně významnou aplikací je potom jejich využití při výrobě pracích prostředků [14].

2.2.3.2 Celulázy

Celulázy představují složitý enzymový systém katalyzující hydrolýzu nativní celulózy. Patří do enzymového vybavení některých mikroorganismů, prvoků a vyšších hub. Vzhledem k tomu, že kultivace prvoků nebyla zatím v průmyslovém měřítku zvládnuta, mají průmyslový význam pouze celulázy mikrobiální [4].

Mikrobiální celulázy ukázaly možnosti svého uplatnění v různých oborech zahrnujících mimo jiné papírenský, textilní, potravinářský, krmivářský a zemědělský průmysl. Do aplikací celulytických enzymů se vkládají velké naděje, jelikož celulózové suroviny (dřevo a dřevní odpady, sláma, odpadní papír aj.) nejsou dosud plně využívány jako suroviny pro biotechnologie a navíc patří mezi obnovitelné zdroje [4, 15].

2.2.3.3 Xylanázy

Xylan je hned po celulóze druhým nejrozšířenějším přírodním polysacharidem. Primární řetězec xylanu je složen z β -xylopyranozových zbytků a jeho kompletní hydrolýza vyžaduje činnost několika enzymů včetně endo-1,4- β -D-xylanázy (EC 3.2.1.8), který je pro depolymerizaci xylanu zásadní. Vzhledem k rozmanitosti chemických struktur xylanů odvozených z buněčných stěn dřeva, obilovin nebo jiných rostlinných materiálů, je známá široká škála xylanáz s různými hydrolytickými aktivitami, fyzikálně-chemickými vlastnostmi a strukturami [16].

Xylanázy a mikroorganismy, které je produkují, se v současné době používají k degradaci xylanu na obnovitelné pohonné hmoty a chemikálie, dále pak k aplikacím v potravinářském, textilním, zemědělském a papírenském průmyslu, kde hrají významnou roli především při zpracování odpadů [16].

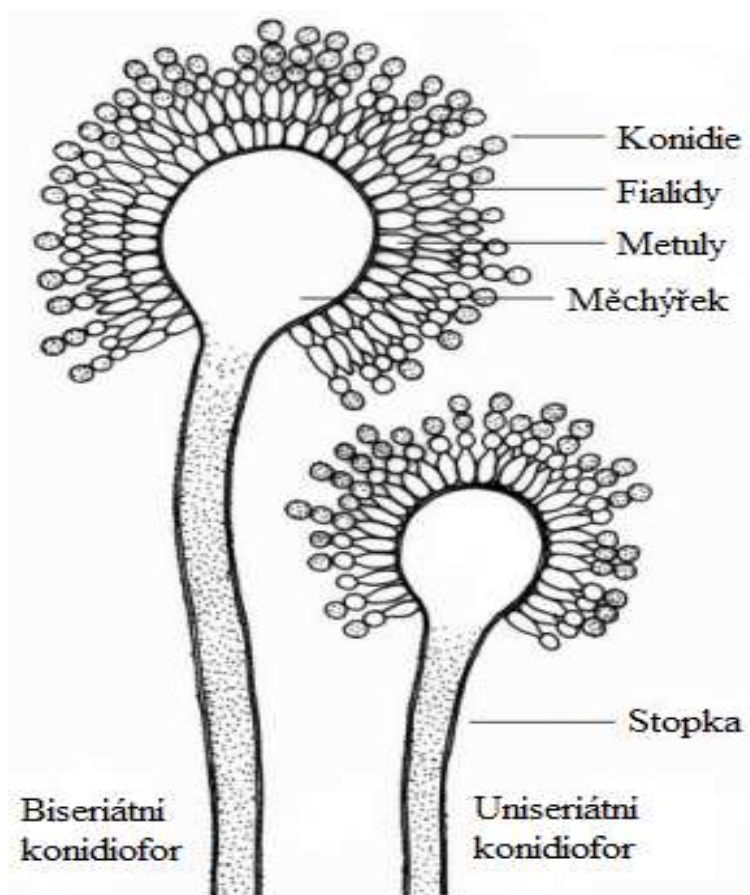
2.3 Vybrané mikroorganismy produkující extracelulární hydrolázy

Mikroorganismů produkujících extracelulární hydrolázy je celá řada, mezi ty významné lze zařadit *Aspergillus oryzae*, *Phanerochaete chrysosporium* či *Aurobasidium pullulans*.

2.3.1 Plíseň *Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae je vláknitá houba nebo plíseň vyznačující se kruhovým měchýřkem s vyčnívajícími konidiálními řetízky, které se následně jeví jako bílá načechraná vlákna upínající se na substrát (Obr. 6). Jedná se o plíseň hojně využívanou ve fermentačních procesech, a to díky své schopnosti produkovat velké množství extracelulárních bílkovin,

především pak amyláz, lipáz a proteáz. Tyto hydrolytické enzymy se ve velké míře vyskytují jak v rostlinách, tak zvířatech, ovšem pro komerční účely jsou vyráběny výhradně pomocí mikroorganismů. Plísně rodu *Aspergillus* stejně jako rodu *Penicillium* a *Rhizopus* jsou zvláště vhodné pro výrobu proteolytických enzymů, nicméně ne všechny druhy těchto rodů jsou považovány za bezpečné [17, 18, 19, 20].



Obr. 6 Biseriální a uniseriální konidiofor [21].

Rod *Aspergillus* zahrnuje celkově asi 150 druhů, z nichž několik bylo označeno za původce lidských onemocnění. Aspergily mohou způsobovat systémové mykózy i povrchové infekce, konidie přítomné v dýchacích cestách pak mohou mechanickým drážděním zhoršovat zdravotní stav alergiků a astmatiků. Nejčastějším původcem mykóz je *Aspergillus fumigatus*, méně častým potom *Aspergillus flavus* a *Aspergillus niger*. *Aspergillus flavus* se dále uvádí jako producent nebezpečných aflatoxinů [22].

Plísně rodu *Aspergillus* mají velmi bohatý enzymový aparát a jsou častými původci kažení potravin a krmiv. Díky silné lipolytické aktivitě způsobují znehodnocování olejnin, tuků, jedlých olejů a potravin na tyto tuky bohatých. Některé druhy jsou schopné snášet i velmi nízkou vodní aktivitu, proto mohou napadat sušené potraviny nebo potraviny s vysokým podílem cukrů a solí, jako je sušené maso, džemy, sušené ovoce a zelenina či obiloviny a pečivo. Zástupci rodu *Aspergillus* se vyskytují rovněž na čerstvém ovoci, citrusech a zelenině. Určité druhy se využívají pro průmyslovou kvasnou výrobu organických kyselin, jiné druhy se účastní například výroby sojové omáčky. Některé plísně tohoto rodu jsou schopné produkovat i antibiotika, která jsou ovšem velmi toxická, a proto v lékařství nenašla své uplatnění [17, 22].

2.3.2 Plíseň *Phanerochaete chrysosporium*

Phanerochaete chrysosporium je označována jako plíseň bílé hniloby produkující unikátní extracelulární oxidační enzymy degradující lignin, stejně tak jako příbuzné sloučeniny vyskytující se v explozivních kontaminovaných materiálech, pesticidech či toxickém odpadu [23, 24].

Lignin hraje v přírodních uhlíkatých cyklech klíčovou roli, a sice jako nejhojnější aromatická směs poskytující ochrannou matrix, která obklopuje celulózu mikrovláknami buněčných stěn rostlin. Tento amorfní a nerozpustný polymer postrádá stereoregularitu a na rozdíl od celulózy a hemicelulózy není citlivý na hydrolytický útok. Ačkoliv lze lignin nazvat impozantním substrátem, jeho degradace určitými plísněmi byla objevena a popsána již před 125 lety. Tyto mikroby, souhrnně označovány jako plísně bílé hniloby (protože degradují hnědý lignin a zanechávají bílou celulózu), jsou schopny účinné depolymerizace a mineralizace ligninu (Obr. 7). Všechny patří mezi basidiomycety, což je skupina plísní obsahující jak jedlé houby, tak i rostlinné patogeny [23].



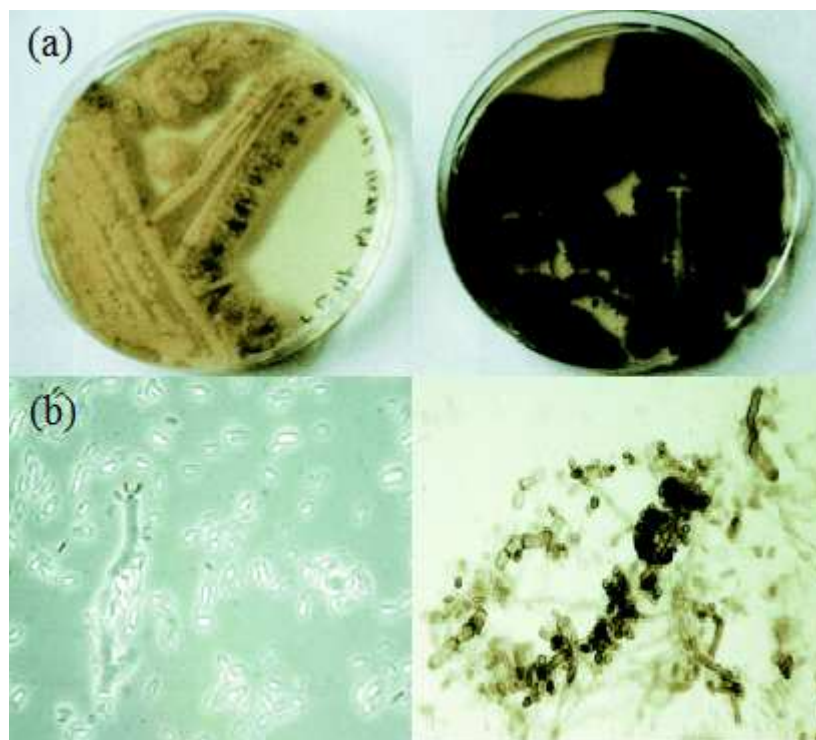
Obr. 7 Degradace ligninu a zanechání celulózy [25].

Phanerochaete chrysosporium je nejintenzivněji studovanou plísní bílé hniloby. Tyto plísně vylučují celou řadu peroxidáz a oxidáz, které působí nespecificky prostřednictvím tvorby volných radikálů ligninu, které následně podstupují spontánní štěpné reakce. Nespecifický charakter a výjimečný oxidační potenciál těchto enzymů přitahuje značný zájem o aplikace v bioprocesech, jako jsou degradace organopolutantů nebo bělení vláken [23].

Phanerochaete chrysosporium má několik vlastností, které mohou být velmi užitečné. Za prvé, oproti jiným bílým plísním zanechává celulózu dřevní hmoty prakticky nedotčenou. Za druhé, má velmi vysokou optimální teplotu (kolem 40 °C), což znamená, že může růst na kouscích dřeva v kompostu, který dosahuje i velmi vysoké teploty. Tyto charakteristiky ukazují na možnost uplatnění těchto plísní v biotechnologii [23].

2.3.3 Mikroorganismus *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans je černý kvasinco podobný mikroorganismus, jehož kolonie jsou nejprve bílé a později černají (Obr. 8). Toto černání může postupovat od středu, ale i po jednotlivých kruhových výsecích, jindy však také nepravidelně v soustředných kruzích. Zpočátku matné podhoubí se s postupným černáním stává vlhce lesklé [26].



Obr. 8 Černání kolonií – (a) na agaru po 3 (vlevo) a 7 (vpravo) dnech inkubace při 30 °C, (b) mikroskopické zobrazení po 3 (vlevo) a 7 (vpravo) dnech inkubace při 30 °C, vyznačeno mikroskopií s fázovým kontrastem, 40x zvětšeno [27].

Mikroorganismus *Aureobasidium pullulans* je zvláště známý pro svůj biotechnologický význam jako producent biologicky odbouratelného extracelulárního polysacharidu, pululanu. Tento polysacharid je považován za slibný biomateriál, který v současné době nachází uplatnění mimo jiné i v oblasti balicí techniky potravin a léčiv. Jeho biotechnologický potenciál lze rovněž pozorovat při produkci hydrolytických enzymů. Různé kmeny *Aureobasidium pullulans* izolované z různých prostředí mohou produkovat řadu enzymů, mezi které patří zejména amylázy, proteázy, lipázy, celulózy a xylanázy [28, 29].

Ačkoliv se jedná převážně o saprofytický organizmus, vyskytuje se i jako parazit na rostlinách a může zapříčinit i choroby zvířat. Velmi často jej lze nalézt na listech rostlin, na květech i plodech. V moštu před kvašením může vytvářet nevzhlednou sytě černou masu složenou z černých dvoubuněčných chlamydospor, které snášejí maximálně 2 % ethanolu, proto se ve víně už nevyskytují. Slouží též jako modelový mikroorganismus pro testování toxických účinků různých kovů. Odolnost k toxickým účinkům kovů se vysvětluje detoxikací. *Aureobasidium* je bohatý na různé hydrolytické enzymy, čehož lze využít také v praxi. Rozkládá celulózy, hemicelulózy, xylany, ligniny, škroby a další. Jeho aktivita je však často škodlivá (rozkládá barvy, rozrušuje elektrické kabely...). Při získávání biomasy mnohdy překáží černé barvivo, jindy je zase nežádoucí nadprodukce pululanového slizu nebo množství hyf. Kmen od kmene se však dosti liší, přičemž také záleží na kultivačních podmínkách [26].

2.4 Aplikace enzymů ve farmacii a kosmetice

Díky svým unikátním vlastnostem nacházejí enzymy čím dál tím větší uplatnění také v oblasti farmacie a kosmetiky. Pro některé aplikace lze i zde využít mikrobiálních enzymů, je však

nutné mít na paměti, že enzymy produkované mikroby za účelem aplikace ve farmacii či kosmetice se neobejdou bez dokonalé purifikace.

2.4.1 Aplikace enzymů ve farmacii

Enzymy používané jako léčiva mají dvě důležité vlastnosti, které je odlišují od ostatních typů léků. První charakteristikou je vysoce afinitní a specifická vazba se substrátem. Druhou vlastností je pak jejich schopnost mnohonásobné přeměny substrátu v cílový produkt. Žádné jiné molekuly se podobnými vlastnostmi nevyznačují, což vedlo k vývoji mnoha enzymových farmaceutických přípravků [30].

2.4.1.1 Enzymatická léčba chronických ran

Hojení ran je fyziologický proces, kdy dochází k obnově porušené struktury a funkce kůže. Jedná se o proces reparační, při kterém je poškozená tkáň nahrazena tkání vazivovou – jizvou [31].

Průběh hojení ran je urychlen, jestliže spodina rány je zbavena nekrotické tkáně. Nekrotická tkáň je zakotvena na povrchu rány pomocí vláken nativního kolagenu a může být uvolněna pouze po jeho enzymovém odbourání. Kolagenázy jsou jediné proteolytické enzymy schopné tato kolagenová vlákna štěpit. Atakují nepolární oblasti kolagenových vláken, čímž dochází k jejich rozpadu na vysokomolekulární peptidy, které mohou být dále kompletně odbourány kolagenovými peptidázami či jinými nespecifickými proteolytickými enzymy [32].

Účinek kolagenázy na čištění ran jako takové není díky její vysoké substrátové specifitě dostačující, jelikož postrádá schopnost štěpit jiné vláknité nebo globulární proteiny. Teprve kombinovaný účinek kolagenázy a jejích doprovodných enzymů zaručuje odbourávání všech bílkovin v ráně, což má za následek zesílení čistícího efektu [32].

Výhoda povrchové aplikace hydrolytických enzymů oproti jiným metodám čištění ran, jako je například chirurgické čištění, spočívá v jejím zařazení mezi metody netraumatické [32].

2.4.1.2 Enzymy podporující trávení

Častou příčinou potíží s trávicím ústrojím je nedostatek trávicích enzymů. Dostatečné množství trávicích enzymů je pro naše tělo velmi důležité, jelikož jejich hlavním úkolem je rozklad potravy na živiny, které následně využíváme ve formě energie či pro růst a obnovu buněk. Tyto enzymy podporují úroveň trávení v žaludku, čímž zvyšují množství odbourané potravy. Zatímco nestrávené potravy pokračující do tlustého střeva je podstatně méně, množství získaných živin připravených k absorpci je navýšeno [33].

Naše strava obecně obsahuje tři základní složky – sacharidy, bílkoviny a tuky. Enzymové doplňky určené pro podporu trávení jsou obvykle složeny z amyláz, proteáz a lipáz, přičemž každý z těchto enzymů je zaměřen na odbourávání jedné z těchto tří složek [33, 34, 35].

Amylázy jsou schopné rozkládat škrob, polysacharidy, cukry a vlákninu, nacházející se v ovoci, zelenině a obilninách. Lipázy jsou zodpovědné za rozklad tuků, které můžeme najít například v olivovém oleji, rybím tuku, kuchyňském oleji a másle. Proteázy odbourávají bílkoviny obsažené zejména v mase, oříškách, sýru či celozrnném obilí [34].

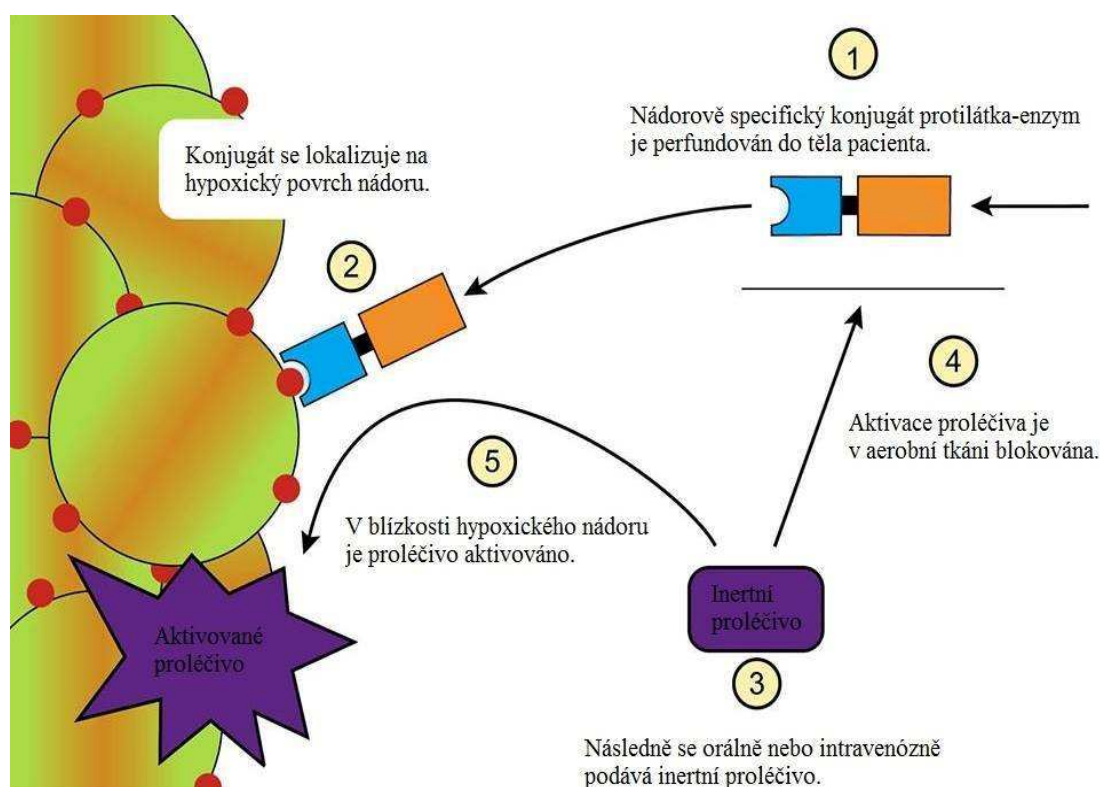
2.4.1.3 Enzymy jako onkolytika

V terapii nádorových onemocnění našly své uplatnění i některé enzymy, zejména pak asparagináza. Asparagináza je enzym katalyzující štěpení L-asparaginu na kyselinu asparagovou. Asparagin slouží jako prekurzor purinových složek DNA a podílí se na stavbě všech bílkovin. Nádorové buňky na rozdíl od normálních buněk jej však nejsou schopny

syntetizovat v dostatečném množství. Intravenózní podání asparaginázy proto zbavuje nádorové buňky přísunu látky nezbytné pro jejich růst a další dělení [36].

Důležitou charakteristikou procesu vzniku nádorové tkáně je proliferace. I zde uplatňují enzymy své unikátní vlastnosti. Bylo prokázáno, že odstranění proteoglykanů s navázaným chondroitinsulfátem prostřednictvím enzymu chondroitinázy AC, v menší míře pak chondroitinázy B, inhibuje růst nádoru a snižuje riziko rozšíření metastáz [30].

Použití enzymů jako terapeutických činidel při léčbě rakoviny znázorňuje i tzv. protilátkou řízená enzymatická terapie proléčivem (ADEPT). Při této terapii dochází k tomu, že monoklonální protilátka nesoucí enzym putuje přímo do nádorových buněk, kde tento enzym aktivuje proléčivo ničící rakovinné buňky, ne však buňky zdravé (Obr. 9) [30].



Obr. 9 Protilátkou řízená enzymatická terapie proléčivem (ADEPT) [37].

2.4.2 Aplikace enzymů v kosmetice

Enzymologie je novou oblastí výzkumu také v dermatologii a kosmetice, která se snaží zjistit, jak mohou tyto enzymy přispět k lepšímu vzhledu pokožky a k prevenci kožních problémů [38].

Kosmetický průmysl již nějakou dobu využívá enzymy pro obnovu povrchu pokožky a její vyhlazení. Enzymy se však ukázaly být velmi užitečným nástrojem rovněž pro terapeutické ošetření pleti doprovázející léčbu kůže a to mnoha stavů – stárnoucí, akné, s ucpanými póry či pigmentovými skvrnami [38].

2.4.2.1 Antioxidační kosmetika

Kůže je vnější bariéra těla, a tudíž je vystavena různým exogenním zdrojům oxidačního stresu, včetně ultrafialového záření a znečišťujících látek. Jako odpověď na tyto oxidační ataky jsou v kůži generovány reaktivní formy kyslíku (ROS) a jiné volné radikály [39].

Kůže je před škodlivými účinky těchto volných radikálů chráněna prostřednictvím endogenní antioxidační sítě skládající se z různých lipofilních a hydrofilních látek, které jsou zodpovědné za rovnováhu mezi prooxidanty a antioxidanty. V první fázi obrany dochází ke snížení reaktivních forem kyslíku pomocí antioxidačních enzymů, jako jsou superoxiddismutáza (SOD), kataláza a glutathionperoxidáza, jakož i malých molekul endogenního i exogenního původu, např. glutathionu a vitamínů C a E. Dojde-li tedy k oxidaci biomolekul, jsou tyto biomolekuly opraveny nebo nahrazeny biologickými ochrannými systémy. Nicméně biomolekuly jsou postupně oxidovány nevratným způsobem a jejich hromadění v průběhu času zapříčiňuje změny biologických funkcí, které postupně vedou ke stárnutí a nemocem s věkem souvisejícím [39].

Při vystavení působení UV záření se zde vytvoří nerovnováha mezi prooxidanty a antioxidanty, což vede k oxidačnímu stresu a potažmo ke stárnutí kůže prostřednictvím tohoto záření. Konstantní působení UV paprsků na kůži postupně vyčerpá antioxidanty v ní přítomné. Antioxidanty přítomné v rohové vrstvě jsou obzvláště citlivé na UV záření, přičemž jedna suberytemová dávka může vyčerpávat jejich koncentraci téměř na polovinu [39].

Superoxiddismutáza v kombinaci s katalázou je odpovědná za ochranu proteinů proti stárnutí kůže v důsledku oxidace. Tento enzym funguje prostřednictvím dismutace, procesu, během kterého jsou nebezpečné vysoce reaktivní volné radikály kyslíku převedeny na méně reaktivní formy. Superoxiddismutáza převádí nebezpečný superoxidový anion na peroxid vodíku, který je následně neutralizován peroxidázou [38, 40].

S věkem tyto ochranné mechanismy těla slábnou. Použitím kosmetických prostředků obsahujících enzymy superoxiddismutázu a peroxidázu je však možné přirozenou obranu těla posílit a zabránit tak oxidačnímu poškození pokožky a tedy jejímu stárnutí [40].

2.4.2.2 Kosmetické přípravky proti celulitidě

Spolu s rostoucími procenty obyvatel trpících nadváhou se stává čím dál tím větším problémem i celulitida. Nadváha v důsledku nadměrného příjmu potravin jde často ruku v ruce se vznikem přebytku podkožní tukové tkáně. Ačkoliv kaloricky omezená strava a pravidelné cvičení je účinným prostředkem pro dosažení ztráty celkové hmotnosti, málokdy jde o bezprostřední vliv na tukový obsah podkožní tkáně či na povrchový vzhled pokožky [41].

Ukládání a odbourávání tuku je řízeno dvěma sadami speciálních receptorů nazývaných alfa a beta receptory nacházejících se na povrchu jednotlivých tukových buněk, adipocytů. Beta-adrenergní receptory regulované za pomoci hormonu epinefrinu podporují odbourávání tuků (lipolýzu), zatímco alfa-adrenergní receptory tomuto odbourávání zabraňují a naopak podporují ukládání těchto tuků. V případě celulitidy tedy převažují alfa-adrenergní receptory nad beta-adrenergními [42].

Stimulace těchto receptorů vede ke změnám klíčového lipolytického (odbourávajícího tuky) enzymu nazývaného hormonálně citlivý triacylglycerollipázy. Tento enzym se nachází přímo v tukové buňce a je aktivován stimulací beta receptorů, kdy dochází k odbourání triacylglycerolů v tuku za uvolnění volných mastných kyselin a glycerolu do krevního řečiště. Naopak stimulace alfa receptorů inhibuje tento enzym a podporuje ukládání tuků [42].

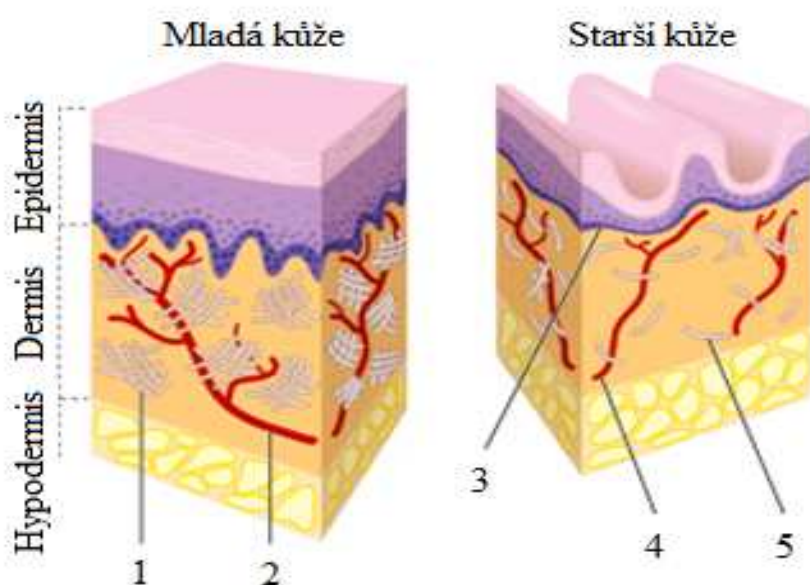
Lipázy v doprovodu dalších enzymů (enzymové komplexy) mohou tedy nacházet své uplatnění i v těchto kosmetických přípravcích proti celulitidě, kde účinek lipolytického enzymu spočívá v rychlejší hydrolýze tuků uložených v adipocytech [43].

2.4.2.3 „Anti-aging“ kosmetika – kosmetika proti stárnutí kůže

Stárnutí kůže je součástí lidské přirozenosti, zatímco však příznaky stárnutí vnitřních orgánů nejsou „očím“ okolí vystaveny, kůže poskytuje první zjevné známky plynoucího času [44].

Stárnutí kůže lze označit za složitý biologický proces, který je ovlivněn kombinací endogenních a exogenních činitelů. Vzhledem k tomu, že zdravý a hezký vzhled kůže je považován za jeden z hlavních faktorů představujících celkovou "pohodu" a "zdraví" lidí, stávají se prostředky proti stárnutí kůže stále více oblastí zájmu [44].

Jednou z nejdůležitějších konstrukčních látek v našem těle je kolagen, představuje zde 25 až 30 % z celkového množství bílkovin. Je hlavní složkou pro dosažení pružné a zářivé zdravé kůže, kterou tvoří až z 75 %. Jak stárneme, naše tělo ztrácí schopnost tento kolagen vytvářet, což způsobuje jeho úbytek. Úbytek kolagenu vede k zhroucení dermální vrstvy a tím přispívá ke vzniku vrásek a ztrátě pružnosti (Obr. 10) [45].



Obr. 10 Srovnání mladé a starší kůže – (1) organizovaná vlákna kolagenu, (2) cévní tkáň, (3) vyhlazení epidermálního/dermálního přechodu, (4) redukováná cévní tkáň, (5) dezorganizace a ztráta kolagenových vláken [45].

Za tvorbu a regeneraci kolagenových vláken jsou zodpovědné fibroblasty, buňky vazivové tkáně. Takzvaná „anti-wrinkle“ a „anti-aging“ kosmetika obsahuje látky, které proces stárnutí pleti mohou zpomalit. Mezi tyto látky patří například alkalická fosfatáza. Tento enzym stimuluje buněčný metabolismus a proliferaci fibroblastů, čímž zabraňuje předčasnému úbytku kolagenu [46].

2.4.2.4 Enzymatický peeling

Enzymatický peeling patří mezi kúry určené k povrchovému ošetření kůže. Aktivními činidly zde však nejsou kyseliny, ale enzymy. Enzymatický peeling je poměrně šetrná procedura vhodná pro všechny typy pleti včetně citlivé. Během tohoto procesu dochází k jemnému čištění pokožky od proteinových nečistot, sekrečních produktů mazových a potních žláz, stejně tak k odstranění odumřelých buněk rohové vrstvy kůže (Obr. 11). Výsledkem je hladká a lesklá pokožka s mnohem lepší texturou a klidným tónem, vypadající zářivě a zdravě.

Enzymatický peeling nevyžaduje žádnou rekonvalescenci, nedochází k žádnému odlupování kůže ani hyperémii [38, 47].

Rohová vrstva epidermis obsahuje proteolytické enzymy (proteázy) patřící do skupiny hydroláz. Tyto proteázy regulují rychlost chemických reakcí v tkáních a aktivně se podílejí na obnově epidermis prostřednictvím odbourávání bílkovin na peptidy a aminokyseliny. Jsou odpovědné za diferenciaci keratinocytů, tvorbu a destrukci desmozomů, ale také tvorbu lipidů nacházejících se v mezibuněčném cementu, zejména ceramidů [47].

Proces stárnutí je spojen se snížením aktivity proteolytických enzymů, což vede ke ztrátě vody a snížení rychlosti tvorby i obnovy konstrukčních prvků epidermálních buněk. Výsledkem potom je, že rohová vrstva se stává silnější, kožní tuk a nečistoty se hromadí na povrchu kůže a její textura působí nerovnoměrně, což může být doprovázeno i matným a šedým tónem pleti [47].

Proteolytické enzymy obsažené v roztoku enzymatického peelingu oslabují přilnavost korneocytů tím, že rozkládají funkční chemické vazby desmozomů, a tím snadněji dochází k deskvamaci rohové vrstvy. Jelikož velikost a náboj nedovolí enzymům proniknout hlouběji do kůže, působí tedy pouze v oblasti rohové vrstvy pokožky. Odstranění vnější vrstvy stimuluje produkci fibroblastů a obnovu kožních buněk [47].

Enzymatické peelinky obsahují enzymy jak rostlinného, tak živočišného i bakteriálního původu podobné proteolytickým enzymům vyskytujících se v kůži. Nejrozšířenějšími proteázami v peelinkových přípravcích jsou však rostlinné enzymy papain a bromelain [47].

Papain je proteolytický enzym rostlinného původu získávaný z latexové tekutiny papáje. Katalyzuje hydrolýzu proteinů na aminokyseliny, má antimikrobiální vlastnosti a odstraňuje mrtvé buňky vnější vrstvy kůže. Bromelain je rostlinný enzym s proteolytickou aktivitou nacházející se v ananasu. Rozkládá peptidové vazby mezi aminokyselinami uvnitř proteinů, odstraňuje odumřelé buňky z povrchu pokožky a má obrovské imunomodulační, protizánětlivé, protitokové, hojící se a lipolytické účinky [47].



Obr. 11 Před (vlevo) a po (vpravo) aplikaci enzymatického peelingu [47].

2.4.2.5 *Hygiena dutiny ústní*

Enzymy nacházejí své uplatnění také v oblasti hygieny dutiny ústní. Stávají se součástí zubních past, ústních vod či žvýkaček především za účelem odstranění patogenní mikroflóry způsobující zubní plak a kazy [48].

Mezi enzymy hrající zde významnou roli patří zejména amyloglukosidáza a glukosaoxidáza tvořící složky některých typů zubních past. Amyloglukosidáza štěpí škrob na glukózu, zatímco glukosaoxidáza oxiduje glukózu na glukonolakton a peroxid vodíku. Tento peroxid je dále prostřednictvím peroxidázy obsažené ve slinách přeměněn na hypothiokyanát. Hypothiokyanát je velmi silné antibakteriální činidlo, což má pozitivní vliv na prevenci tvorby zubního plaku, a to i za předpokladu, že lidé si obvykle čistí zuby jen po dobu 2 až 5 minut. Součástí takových přípravků někdy bývá i enzym lysozym. Lysozym má schopnost hydrolyzovat buněčné stěny některých patogenních bakterií způsobujících plak a záněty dásní [49].

Zánět je přirozenou obrannou reakcí našeho těla. Jedná se o fyziologický proces, kterým organismus udržuje rovnováhu vnitřního prostředí nebo reaguje na zevní či vnitřní poškození. Když organismus vyčerpá své možnosti potlačit příčinu a zhojit poškozenou tkáň akutní zánětlivou reakcí, přechází zánět do chronického stádia, tedy do stavu jakési nové rovnováhy mezi stále existující příčinou a možnostmi vlastní obranyschopností tkání. Takto nastolená rovnováha je ale obvykle doprovázena různě rychlou tkáňovou destrukcí. Ve vztahu k zánětlivému onemocnění v dutině ústní působí proteolytické enzymy dvěma směry. Jednak zvyšují vlastní obranyschopnost tkání a rovněž působí přímo na mikrobiální původce zánětu v zubním plaku [50].

Z hlediska ovlivnění vlastní obranyschopnosti tkání, proteolytické enzymy především zlepšují mikrocirkulaci ve tkáni a snižují otoky, čímž usnadňují hojení. Dále proteolytické enzymy snižují přilnavost bakterií k zubu a dásním i jejich schopnost tvořit plak [50].

S ohledem na skutečnost, že se jedná o terapii netoxickou, neagresivní, bez vedlejších lokálních i celkových účinků, proteolytické enzymy nabízejí velkou příležitost pro ochranu před chronickým zánětem způsobeným destruktivními procesy v dutině ústní. Výhodou je zcela jistě i to, že mohou být využívány dlouhodobě a to i u dětí, těhotných žen nebo u lidí s oslabenou imunitou [50].

3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo studium produkce mikrobiálních enzymů a testování možnosti jejich stabilizace využitím enkapsulačních technik.

V rámci práce byly řešeny následující dílčí úkoly:

- zpracování literární rešerše zaměřené na mikrobiální enzymy, zejména na extracelulární hydrolázy, jejich producenty a vlastnosti
- optimalizace metod kultivace mikroorganismů pomocí stanovení aktivity enzymů
- indukce produkce vybraných mikrobiálních enzymů a enkapsulace produkováných enzymů
- srovnání dlouhodobé stability volných a enkapsulovaných enzymů

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie, přístrojové vybavení, mikrobiální kmeny a odpadní substráty

4.1.1 Použité chemikálie

- Albumin, Serva (DEU)
- Alginát sodný, Sigma Aldrich (DEU)
- Azoalbumin, Serva (DEU)
- Bakteriologický agar, HiMedia (IND)
- Bromfenolová modř, Serva (DEU)
- β -merkapt ethanol, Serva (DEU)
- Coomassie brilliantová modř, Serva (DEU)
- D-glukóza bezvodá p.a., Lachema (CZE)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner (CZE)
- Dodecylsírán sodný, Serva (DEU)
- Dusičnan sodný p.a., Lach-Ner (CZE)
- Ethanol (96%) p.a., Lach-Ner (CZE)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo, Penta (CZE)
- Glycerol, Sigma Aldrich (DEU)
- Glycin, Penta (CZE)
- Hydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner (CZE)
- Hydrogenuhličitan sodný p.a., Lachema (CZE)
- Hydroxid sodný p.a., Lach-Ner (CZE)
- Chlorid draselný p.a., Lach-Ner (CZE)
- Chlorid kobaltnatý p.a., Lachema (CZE)
- Chlorid sodný p.a., Lachema (CZE)
- Chlorid vápenatý p.a., Lachema (CZE)
- Karbomer, Sino Lion (USA)
- Kvasničný autolyzát, HiMedia (IND)
- Kyselina boritá p.a., Lachema (CZE)
- Kyselina chlorovodíková (35%) p.a., Lach-Ner (CZE)
- Kyselina octová (80%) p.a., Lach-Ner (CZE)
- Kyselina trichloroctová p.a., Lachema (CZE)
- Methanol p.a., Lachema (CZE)
- Rotiphorese Gel 30 (37,5:1), Carl Roth (DEU)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin, Sigma Aldrich (DEU)
- Octan amonný p.a., Lachema (CZE)
- p-nitrofenol, Sigma Aldrich (DEU)
- p-nitrofenyl palmitát, Sigma Aldrich (DEU)
- Pankreatin, Sigma Aldrich (DEU)
- Pepsin, Sigma Aldrich (DEU)
- Pepton, Carl Roth (DEU)
- Persírán amonný, Serva (DEU)
- Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad (USA)
- Sephadex G-100, Pharmacia Fine Chemicals (SWE)
- Sírán amonný p.a., Lachema (CZE)
- Sírán hořečnatý heptahydrát p.a., Chemapol (CZE)

- Síran manganatý monohydrát p.a., Lach-Ner (CZE)
- Síran měďnatý pentahydrát p.a., Lach-Ner (CZE)
- Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Lachema (CZE)
- Síran železnatý heptahydrát p.a., Sigma Aldrich (DEU)
- Thiamin, Sigma Aldrich (DEU)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Serva (DEU)
- Triton X-100, Sigma Aldrich (DEU)
- Uhličitan sodný p.a., Lachema (CZE)
- Vínan sodno-draselný p.a., Lachema (CZE)
- Žlučové soli – směs kyseliny cholové a deoxycholové, Sigma Aldrich (DEU)

4.1.2 Použité přístroje a pomůcky

- Analytické váhy, Boeco (DEU)
- Centrifuga chlazená U-32, Boeco (DEU)
- Elektrický vařič, ETA (CZE)
- Elektroforetická aparatura P9DS, Owl Separation Systems (USA)
- Elektroforetický zdroj SH300, Shelton Scientific (USA)
- Enkapsulátor B-395 Pro, BÜCHI (CHE)
- Gelová filtrační aparatura BioLogic LP, Bio-Rad (USA)
- Mikrocentrifuga Mikro 200 Hettich, Hettich Zentrifugen (DEU)
- Očkovací box Aura mini, Bioair Instruments (GBR)
- Spektrofotometr UV-VIS Helios α , Unicam (GBR)
- Termostat INCU-Line, VWR (USA)
- Termostatovaná třepačka Heidolph Unimax 1010, Labicom (CZE)
- Ultrafiltrační aparatura KrosFlo, Spectrum Labs (GRC)
- Ultrazvuková lázeň PS02000 Ultrasonic Compact Cleaner 1,25 l, Powersonic (CZE)
- Vodní lázeň EL 20 D, Kavalier (CZE)
- Vortex, IKA Vortex Genius 3 (DEU)

4.1.3 Použité mikroorganismy

- Plíseň *Aspergillus oryzae* kmen CCM F-172 z České sbírky mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně
- Plíseň *Phanerochaete chrysosporium* kmen CCM 8074^T z České sbírky mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně
- Mikroorganismus *Aureobasidium pullulans* kmen CCM F-148 z České sbírky mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně

4.1.4 Použité odpadní substráty

- Dřevní piliny
- Pšeničné otruby
- Řepkové výlisky (2,55 % lipidů)

4.2 Kultivace mikroorganismů

4.2.1 Uchovávání mikroorganismů

K dlouhodobému uchovávání kultur bylo použito tuhé YPD médium (Tab. 1). Sterilizace byla provedena v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem po dobu 30 min, následně byly kultury uchovány na agarových plotnách ve tmě při 4 °C.

Tab. 1 Složení pevného YPD média.

Složky	Množství
Kvasničný autolýzát	10 g
Pepton	20 g
Glukóza	20 g
Bakteriologický agar	20 g
Voda	1 000 ml

4.2.2 Příprava inokula

K přípravě inokula bylo u všech kultur použito tekuté YPD médium (Tab. 2). Kultury byly zaočkovány z Petriho misky do 100 ml sterilního média v Erlenmayerově baňce o objemu 250 ml. Sterilizace byla provedena v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 30 min. Kultivace inokula probíhala za stálého třepání po dobu 4 dnů při teplotě 28 °C pro plíseň *Aspergillus oryzae* a mikroorganismus *Aureobasidium pullulans*, pro plíseň *Phanerochaete chrysosporium* pak při 39 °C. Takto připravená inokula s obsahem spor byla následně použita k zaočkování produkčních médií.

Tab. 2 Složení tekutého YPD média.

Složky	Množství
Kvasničný autolýzát	10 g
Pepton	20 g
Glukóza	20 g
Voda	1 000 ml

4.2.3 Produkční médium

K produkci enzymů byla použita minerální média a média s obsahem odpadních substrátů. Kultivace probíhala v 200 ml sterilního média v Erlenmayerových baňkách o objemu 500 ml. Sterilizace byla provedena v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem po dobu 30 min. Kultury byly zaočkovány 10 ml příslušného inokula. Kultivace probíhaly za stálého třepání po dobu 15 dnů při teplotě 28 °C pro plíseň *Aspergillus oryzae* a mikroorganismus *Aureobasidium pullulans*, pro plíseň *Phanerochaete chrysosporium* pak při 39 °C. V průběhu kultivace bylo pravidelně odebíráno malé množství vzorku pro stanovení aktivity a koncentrace produkováných enzymů.

Tab. 3 Složení minerálního média *Aspergillus oryzae*.

Složky	Množství
Dusičnan sodný	2,00 g
Hydrogenfosforečnan draselný	1,00 g
Chlorid draselný	0,50 g
Heptahydrát síranu hořečnatého	0,50 g
Síran železnatý	0,01 g
Glukóza	30,00 g
Voda	1 000,00 ml

Tab. 4 Složení minerálního média *Phanerochaete chrysosporium*.

Složky	Množství
Basal III médium	100 ml
Roztok stopových prvků	60 ml
Glukóza	10 g
Voda	840 ml

Tab. 5 Složení Basal III média.

Složky	Množství
Roztok stopových prvků	100 ml
Dihydrogenfosforečnan draselný	20 g
Síran hořečnatý	5 g
Chlorid vápenatý	1 g
Voda	900 ml

Tab. 6 Složení roztoku stopových prvků.

Složky	Množství
Síran hořečnatý	3,00 g
Síran manganatý	0,50 g
Chlorid sodný	1,00 g
Heptahydrát síranu železnatého	0,10 g
Chlorid kobaltnatý	0,10 g
Heptahydrát síranu zinečnatého	0,10 g
Síran měďnatý	0,10 g
Kyselina boritá	0,01 g
Voda	1 000,00 ml

Tab. 7 Složení minerálního média *Aureobasidium pullulans*.

Složky	Množství
Síran amonný	10,0 g
Dihydrogenfosforečnan draselný	10,0 g
Síran hořečnatý	0,5 g
Glukóza	40,0 g
Voda	1 000,0 ml

Při kultivaci plísní na odpadním substrátu byla vždy glukóza z příslušného minerálního média nahrazena daným odpadním substrátem o koncentraci 50 g/l.

4.3 Stanovení enzymových aktivit

V předložené práci byly stanovovány enzymové aktivity proteolytických a lipolytických enzymů.

4.3.1 Stanovení proteolytické aktivity

Pro stanovení proteolytické aktivity byl jako substrát použit roztok azoalbuminu o koncentraci 5 mg/ml. Princip tohoto stanovení spočívá ve vysrážení azoalbuminu působením kyseliny trichloroctové. Vzniklá sraženina přechází během centrifugace do sedimentu, zatímco azopeptidy, které vznikly enzymovou hydrolýzou azoalbuminu a jsou v kyselině trichloroctové rozpustné, zůstávají v supernatantu. Následně jsou detekovány při 440 nm. Jednotka aktivity je pak definována jako množství enzymu katalyzující přeměnu substrátu doprovázenou nárůstem absorbance o 0,001 za 1 min za podmínek testu [51].

4.3.1.1 Postup pro stanovení proteolytické aktivity

Kultury byly po kultivaci centrifugovány při 5 000 ot/min, 4 °C po dobu 5 min, získaný supernatant byl následně použit ke stanovení proteolytické aktivity.

0,1 ml substrátu bylo smícháno s 0,1 ml supernatantu a následně inkubováno při 37 °C po dobu 30 min. Reakce byla zastavena přidáním 0,41 ml 10% kyseliny trichloroctové, poté byly vzorky centrifugovány. V kyvetě bylo k 0,5 ml získaného supernatantu přidáno 0,7 ml 1 M hydroxidu sodného a nakonec byla změřena absorbance při 440 nm proti blanku.

4.3.2 Stanovení lipolytické aktivity

Stanovení lipolytické aktivity s využitím p-nitrofenylpalmitátu je založeno na schopnosti lipolytických enzymů štěpit tento substrát za vzniku žlutě zbarveného produktu p-nitrofenolu, který je následně spektrofotometricky detekován při 410 nm. Jednotka aktivity je pak definována jako množství enzymu katalyzující přeměnu substrátu doprovázenou nárůstem absorbance o 0,001 za 1 min za podmínek testu [51].

4.3.2.1 Postup pro stanovení kalibrační křivky

Pro naměření a sestavení kalibrační křivky byl použit standardní roztok p-nitrofenolu o koncentraci 0,5 mmol/l. Z tohoto roztoku byla naředěním pomocí 0,1 M Tris-HCl pufru pH 8,2 připravena kalibrační řada o koncentracích v rozmezí 0,005 až 0,05 mmol/l. Zkumavky byly dobře promíchány a na spektrofotometru byla změřena absorbance proti pufru při 410 nm.

4.3.2.2 Postup pro přípravu substrátu

0,013 5 g p-nitrofenylpalmitátu, 0,017 g SDS a 1 g Triton X-100 bylo naváženo do odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou na 100 ml. Roztok byl následně zahříván při 65 °C po dobu 15 min.

4.3.2.3 Postup pro stanovení lipolytické aktivity

Kultury byly po kultivaci centrifugovány při 5 000 ot/min, 4 °C po dobu 5 min, získaný supernatant byl následně použit ke stanovení lipolytické aktivity.

Do zkumavek bylo napipetováno 2,5 ml pufru pH 8,2, 2,5 ml substrátu a 1 ml supernatantu. Zkumavky byly inkubovány 30 min při laboratorní teplotě. Poté byl změřen nárůst absorbance při 410 nm.

4.4 Stanovení extracelulárních bílkovin

Stanovení dle Hartree-Lowryho je kolorimetrické. Původní fotometrická Lowryho metoda z roku 1951 patří k nejcitovanějším stanovením v biochemii. Činidlo má dvě složky: první složkou je činidlo biuretové, druhou složkou je pak Folin-Ciocalteauovo činidlo na fenoly. Jedná se o polykyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové, které se redukují tyrosinovými zbytky proteinů a barví se modře. Metoda byla mnohokrát upravena. Prezentovanou modifikaci vypracoval Hartree v roce 1972. Tato verze využívá tři činidla, z nichž první dvě jsou pro biuretové stanovení. Dochází tak k tvorbě daleko intenzivnějšího zbarvení a stanovení je lineární v širším rozsahu koncentrací [51].

Složení roztoků

Činidlo A: 2 g tetrahydrátu vlnanu sodno-draselného, 100 g uhličitanu sodného a 500 ml 1 M hydroxidu sodného, doplnit destilovanou vodou na 1 000 ml

Činidlo B: 2 g tetrahydrátu vlnanu sodno-draselného, 1 g pentahydrátu síranu měďnatého, 100 ml 1 M hydroxidu sodného, doplnit destilovanou vodou na 100 ml

Činidlo C: Folin-Ciocalteauovo činidlo a destilovaná voda (1:15)

4.4.1.1 Postup pro stanovení kalibrační křivky

Pro sestavení kalibrační křivky byl použit standardní roztok hovězího sérového albuminu o koncentraci 1 mg/ml. Z tohoto roztoku byla připravena kalibrační řada o koncentraci 0,025 až 0,5 mg/ml.

Do každé zkumavky bylo k 1 ml roztoku albuminu přidáno 0,9 ml Hartree-Lowryho činidla A, zkumavky byly následně inkubovány ve vodní lázni při 50 °C po dobu 10 min. Po ochlazení zkumavek bylo přidáno 0,1 ml Hartree-Lowryho činidla B. Zkumavky byly dále opět inkubovány po dobu 10 min, tentokrát však při laboratorní teplotě. Nakonec byly přidány 3 ml Folin-Ciocalteauova činidla a zkumavky byly ještě jednou 10 min inkubovány ve vodní lázni při 50 °C. Zkumavky byly rovněž ochlazeny a následně byla změřena jejich absorbance při 650 nm proti blanku, kde byl roztok albuminu nahrazen destilovanou vodou.

4.4.1.2 Postup pro stanovení extracelulárních bílkovin

Kultury byly po kultivaci centrifugovány při 5 000 ot/min, 4 °C po dobu 5 min, získaný supernatant byl následně použit ke stanovení extracelulárních bílkovin.

Koncentrace extracelulárních bílkovin byla stanovena metodou dle Hartree-Lowryho. Do každé zkumavky bylo k 1 ml supernatantu přidáno 0,9 ml Hartree-Lowryho činidla A, zkumavky byly následně inkubovány ve vodní lázni při 50 °C po dobu 10 min. Po ochlazení zkumavek bylo přidáno 0,1 ml Hartree-Lowryho činidla B. Zkumavky byly dále opět inkubovány po dobu 10 min, tentokrát však při laboratorní teplotě. Nakonec byly přidány 3 ml Folin-Ciocalteauova činidla a zkumavky byly ještě jednou 10 min inkubovány ve vodní lázni při 50 °C. Zkumavky byly rovněž ochlazeny a následně byla změřena jejich absorbance při 650 nm proti blanku, kde byl supernatant nahrazen destilovanou vodou.

4.5 Identifikace, izolace a purifikace enzymů

4.5.1 Vertikální PAGE SDS elektroforéza

4.5.1.1 Postup pro přípravu roztoků

Elektrodový pufr: 30,3 g Tris, 144 g glycinu a 10 g SDS, doplnit destilovanou vodou na 1 000 ml, (roztok je desetkrát koncentrovanější, před použitím je tedy nutno jej zředit)

Gelový pufr: 18,2 g Tris, 2,8 ml 32% kyseliny chlorovodíkové, doplnit destilovanou vodou na 100 ml

Vzorkovací pufr: 3,55 ml destilované vody, 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl pufru pH 6,8, 2,5 ml glycerolu, 2 ml 10% SDS a 0,2 ml 0,5% bromfenolové modři, k 950 μ l takto připraveného vzorkovacího pufru bylo dále přidáno 50 μ l β -merkaptoethanolu a použito při přípravě vzorků
Barvicí roztok: 25 ml kyseliny octové, 100 ml methanolu, 125 ml destilované vody a 0,5 g Coomassie brilliantové modři

Odbarvovací roztok: 25 ml kyseliny octové, 100 ml methanolu a 125 ml destilované vody

4.5.1.2 Postup pro přípravu polyakrylamidového gelu

Pro elektroforézu enzymových vzorků byl použit 12% gel. Do kádinky bylo napipetováno 3,4 ml redestilované vody, 4 ml 30% akrylamidu, 2,5 ml gelového pufru, 0,1 ml 10% SDS, 5 μ l TEMED a 50 μ l 10% APS. Připravená směs byla opatrně zamíchána a napipetována do prostoru mezi dvěma skly v nalévacím stojanu. Mezi skla byl vložen plastový hřebínek za účelem vytvoření jamek pro nanášení vzorků. Gel byl ponechán polymeraci po dobu 1 hod.

4.5.1.3 Postup pro přípravu vzorků

Vzorky byly smíchány se vzorkovacím pufrem v poměru 1:1 a dány na 4 min povařit.

4.5.1.4 Postup pro provedení elektroforézy

Po ztuhnutí gelu byl odstraněn plastový hřebínek a skla s gelem byla pečlivě upevněna do aparatury tak, aby elektrodový pufr nevytékal z elektrodového prostoru. Poté byl elektrodový pufr nalit. Do vytvořených jamek byly naneseny vzorky v množství 20 μ l a standardy Precision Plus Protein™ Dual Color v množství 5 μ l. Aparatura byla přikryta průhledným víkem, dobře utěsněna a připojena ke zdroji. Následně byly nastaveny parametry měření (120 V, 400 mA, 60 min) a elektroforéza byla spuštěna.

4.5.1.5 Postup pro barvení gelu Coomassie brilliantovou modří

Po ukončení elektroforézy byl gel pomocí stříčky spláchnut do Petriho misky a zalit barvicím roztokem. Poté byl gel ponechán 15 min na třepačce a roztok byl slit. Následně byl na gel nalit roztok odbarvovací, slit, opět nalit a rovněž ponechán na třepačce, tentokrát však po dobu 2 hod. Z důvodu odpařování methanolu byla Petriho miska zakryta alobalem.

Obarvený gel byl opatrně přenesen mezi dvě fólie a pomocí standardů Precision Plus Protein™ Dual Color o známé molekulové hmotnosti byla určena velikost fragmentů separovaných proteinů.

4.5.2 Gelová filtrace

K izolaci a purifikaci enzymů byla vyzkoušena metoda gelové filtrace. Gelová filtrace byla provedena s využitím aparatury Bio-Rad na kolonách o objemech 50 a 100 ml. Po elektroforetickém ověření molekulových hmotností separovaných proteinů byl jako náplň těchto kolon použit Sephadex G-100. Na větší kolonu se vzorek nanášel po 2 ml, přičemž optimální průtoková rychlost byla stanovena na 1 ml/min. Na menší kolonu se pak nanášelo 0,3 ml vzorku, a to s průtokovou rychlostí 0,5 ml/min. Jako mobilní fáze byla použita destilovaná voda. Na průtokovém UV detektoru byla následně snímána změna absorbance při 280 nm a výsledný chromatogram byl zaznamenán pomocí SW. Během gelové filtrace byla rovněž sledována změna iontové síly roztoku pomocí vodivostního detektoru.

Metoda gelové filtrace se však neukázala být dostatečně citlivou metodou pro identifikaci, izolaci a purifikaci námi získaných enzymů.

4.5.3 Ultrafiltrace

Ultrafiltrace byla provedena na zařízení KrosFlo se supernatantem kultivovaných plísň. Odebraný vzorek byl nejdříve ultrafiltrován přes membránu o velikosti pórů 5 kDa. Poté následovalo stanovení množství bílkovin (postupováno bylo dle návodu uvedeného v kapitole 3.4.1.2) a enzymových aktivit (postupováno bylo dle návodů uvedených v kapitolách 3.3.1.1 a 3.3.2.3), jak v původním roztoku, tak v koncentrátu a filtrátu po ultrafiltraci. V dalším kroku byl koncentrát z předchozí ultrafiltrace použit k další frakcionované ultrafiltraci, tentokrát však přes membránu o velikosti pórů 100 kDa. Opět následovalo stanovení množství bílkovin a enzymových aktivit v roztoku původním, v koncentrátu a filtrátu. Získaný filtrát byl ještě jednou podroben ultrafiltraci, a sice přes membránu o velikosti pórů 30 kDa. Znovu proběhlo stanovení množství bílkovin a enzymových aktivit v dílčích roztocích.

Velikosti jednotlivých membrán byly voleny na základě orientačního elektroforetického stanovení molekulových hmotností separovaných fragmentů bílkovin nacházejících se v supernatantu kultivovaných plísň. Pomocí stanovení množství bílkovin a enzymových aktivit byla kontrolována přítomnost proteáz, lipáz, popřípadě jejich směsí v dílčích frakcích.

4.6 Stabilizace enzymů

4.6.1 Příprava částic pomocí enkapsulátoru

Enkapsulátor B-395 Pro (BÜCHI) je poloautomatický přístroj sloužící k polymernímu zapouzdření chemických látek, biologických molekul, léčiv, vůní a aromátů, pigmentů, extraktů, buněk a mikroorganismů za sterilních i nesterilních podmínek. Samotná tvorba částic je pak založena na faktu, že regulovaný laminární proud vibrující s optimální frekvencí, se rozbije na kapky stejné velikosti.

4.6.1.1 Postup pro přípravu částic pomocí enkapsulátoru

Látka určená k enkapsulaci byla smíchána s enkapsulačním polymerem. Tato směs byla umístěna do tlakové láhve. Následně byla směs tlačena do pulzační komory tlakovým vzduchem. Dále byla směs prohnána tryskou (1 000 μm), kde po výstupu z této trysky byla rozdělena do jednotlivých kapiček o stejné velikosti. Kapičky prošly elektrickým polem mezi tryskou a elektrodou, čímž bylo způsobeno, že získaly povrchový náboj. Díky elektrostatickým odpuzivým silám byly částice dopadající do vytvrzovacího roztoku rozptýleny.

V předložené práci byly jako látky k enkapsulaci použity mikrobiální enzymy. Jako enkapsulační polymer byl použit 1% a 2% alginát. Vytvrzovacím roztokem byl 2% chlorid vápenatý.

4.6.2 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost enzymů byla určena pomocí stanovení extracelulárních bílkovin Hartree-Lowryho metodou. Postupováno bylo dle návodu uvedeného v kapitole 3.4.1.2.

4.6.2.1 Postup pro stanovení enkapsulační účinnosti

Při stanovení enkapsulační účinnosti za pomoci Hartree-Lowryho metody byla nejdříve změřena koncentrace bílkovin v roztoku obsahujícím mikrobiální enzymy určené k enkapsulaci. Následně byly enzymy enkapsulovány. Částice byly centrifugovány a v získaném supernatantu byla stanovena zbytková koncentrace bílkovin. Z rozdílu množství bílkovin před a po enkapsulaci byla zjištěna enkapsulační účinnost.

4.6.3 Stanovení dlouhodobé stability volných enzymů

Dlouhodobá stabilita volných enzymů byla určena pomocí stanovení enzymových aktivit. Postupováno bylo dle návodů uvedených v kapitolách 3.3.1.1 a 3.3.2.3.

4.6.3.1 Postup pro stanovení dlouhodobé stability volných enzymů

Dlouhodobá stabilita volných enzymů byla sledována ve dvou prostředích. Prvním prostředím byla voda, druhým prostředím byl gel (voda zahuštěná karbomerem na 0,5% roztok). Vlné enzymy byly uchovávány v dílčích prostředích po dobu 6 týdnů při teplotě 4 °C. Stabilita volných enzymů byla stanovena vždy po 2, 4 a 6 týdnech porovnáním enzymových aktivit na počátku a enzymových aktivit ve dnech stanovení.

4.6.4 Stanovení dlouhodobé stability enkapsulovaných enzymů

Dlouhodobá stabilita enkapsulovaných enzymů byla určena pomocí stanovení enzymových aktivit. Postupováno bylo dle návodů uvedených v kapitolách 3.3.1.1 a 3.3.2.3.

4.6.4.1 Postup pro stanovení dlouhodobé stability enkapsulovaných enzymů

Dlouhodobá stabilita enkapsulovaných enzymů byla sledována ve dvou prostředích. Prvním prostředím byla voda, druhým prostředím byl gel (voda zahuštěná karbomerem na 0,5% roztok). Enkapsulované enzymy byly uchovávány v dílčích prostředích po dobu 6 týdnů při teplotě 4 °C. Stabilita enkapsulovaných enzymů byla stanovena vždy po 2, 4 a 6 týdnech porovnáním enzymových aktivit na počátku a ve dnech stanovení.

4.6.5 Stanovení dlouhodobé stability částic

Dlouhodobá stabilita částic byla určena pomocí stanovení extracelulárních bílkovin Hartree-Lowryho metodou a pomocí stanovení enzymových aktivit. Postupováno bylo dle návodů uvedených v kapitolách 3.4.1.2, 3.3.1.1 a 3.3.2.3.

4.6.5.1 Postup pro stanovení dlouhodobé stability částic

Dlouhodobá stabilita částic byla sledována ve dvou prostředích. Prvním prostředím byla voda, druhým prostředím byl gel (voda zahuštěná karbomerem na 0,5% roztok). Částice s enkapsulovanými enzymy byly uchovávány v dílčích prostředích po dobu 6 týdnů při teplotě 4 °C. Stabilita částic byla stanovena vždy po 2, 4 a 6 týdnech porovnáním množství bílkovin a enzymových aktivit na počátku a ve dnech stanovení.

4.6.6 Uvolňování a zachování aktivit enkapsulovaných enzymů v GIT

Uvolňování a zachování aktivit enkapsulovaných enzymů v simulovaném procesu trávení bylo určeno pomocí stanovení extracelulárních bílkovin Hartree-Lowryho metodou a pomocí stanovení enzymových aktivit. Postupováno bylo dle návodů uvedených v kapitolách 3.4.1.2, 3.3.1.1 a 3.3.2.3.

4.6.6.1 Stanovení uvolňování a zachování aktivit enkapsulovaných enzymů v GIT

Pro simulaci fyziologického prostředí ke sledování uvolňování a zachování aktivit enkapsulovaných enzymů v gastrointestinálním traktu byly dle Československého lékopisu připraveny tři modelové trávicí šťávy – žaludeční, pankreatická, žlučová. Částice s enkapsulovanými enzymy byly postupně vystaveny působení těchto šťáv při 37 °C, a to v pořadí odpovídajícím průchodu trávicím traktem. Nejdříve byly částice vloženy do šťávy žaludeční a ponechány zde po dobu 20 min. Poté následovala šťáva pankreatická s dobou působení rovněž 20 min. Nakonec byly částice vloženy do šťávy žlučové a inkubovány zde tentokrát po dobu 40 min. Z rozdílu množství bílkovin ve šťávách samotných a množství

bílkovin ve šťávách po inkubaci s enkapsulovanými enzymy bylo zjištěno množství uvolněných enzymů v jednotlivých fázích gastrointestinálního traktu. Zachování aktivit uvolněných enzymů pak bylo stanoveno porovnáním enzymových aktivit enkapsulovaných enzymů před a po působení jednotlivých trávicích šťáv.

4.6.6.2 Postup pro přípravu modelové žaludeční šťávy

Žaludeční šťáva byla připravena rozpuštěním 0,25 g pepsinu ve 100 ml destilované vody. Následně bylo přidáno 0,84 ml 35% kyseliny chlorovodíkové, pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 0,9 [52].

4.6.6.3 Postup pro přípravu modelové pankreatické šťávy

Pankreatická šťáva byla připravena rozpuštěním 0,25 g pankreatinu a 1,5 g hydrogenuhličitanu sodného ve 100 ml destilované vody. Hodnota pH v roztoku byla následně upravena na 8,9 [52].

4.6.6.4 Postup pro přípravu modelové žlučové šťávy

Žlučová šťáva byla připravena přidáním 0,8 g žlučových solí do 200 ml fosfátového pufru o pH 8,0 [52].

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Kultivace mikroorganismů

Kultivace mikroorganismů byly provedeny dle návodů uvedených v kapitole 4.2. Studovanými mikrobiálními producenty byly plísně *Aspergillus oryzae*, *Phanerochaete chrysosporium* a mikroorganismus *Aureobasidium pullulans*. Jako odpadní substráty byly použity dřevní piliny, pšeničné otruby a řepkové výlisky (2,55 % lipidů).

5.1.1 Plíseň *Aspergillus oryzae*

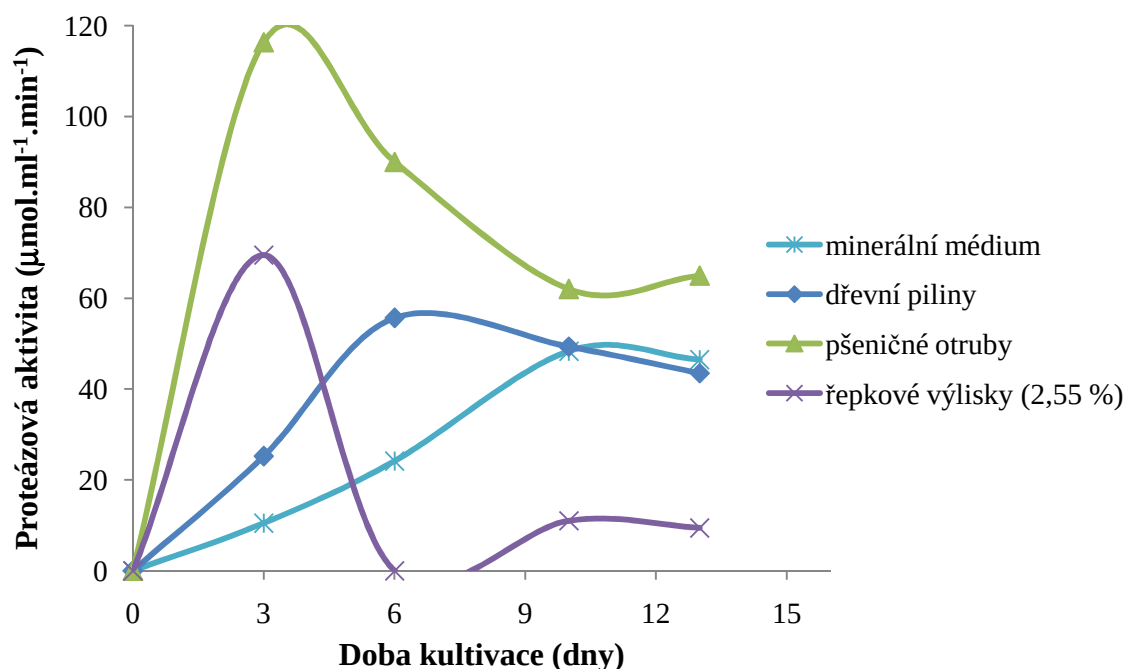
Kultivace plísně *Aspergillus oryzae* byly provedeny dle návodů uvedených v kapitole 4.2. Použitými odpadními substráty byly dřevní piliny, pšeničné otruby a řepkové výlisky (2,55 % lipidů).

5.1.1.1 Stanovení proteolytické aktivity

Stanovení proteolytické aktivity bylo provedeno dle návodů uvedených v kapitole 4.3.1. Produkce proteolytických enzymů byla sledována v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu. Stanovení proteolytické aktivity v médiu bylo provedeno 3., 6., 10. a 13. den kultivace (Tab. 8), (Obr. 12). Uvedené výsledky jsou průměrnými hodnotami ze dvou nezávislých kultivačních experimentů.

Tab. 8 Proteolytické aktivity ($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) stanovené u plísně *Aspergillus oryzae* v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu.

	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	10,50	24,16	48,33	46,50
Dřevní piliny	25,21	55,66	49,33	43,50
Pšeničné otruby	116,33	90,00	62,00	65,00
Řepkové výlisky (2,55 %)	69,50	0,00	11,01	9,45



Obr. 12 Závislost proteolytické aktivity s použitím různých kultivačních substrátů na době kultivace u plísně *Aspergillus oryzae*.

Při kultivaci plísně *Aspergillus oryzae* na pšeničných otrubách a řepkových výliscích (2,55 %) byla nejvyšší hodnota proteolytické aktivity naměřena 3. den kultivace. Při kultivaci na dřevních pilinách bylo maximum produkce zaznamenáno 6. den kultivace, na minerálním médiu pak v den 10. Stanovení proteolytické aktivity 13. den kultivace ukázalo téměř u všech použitých kultivačních substrátů pokles produkce.

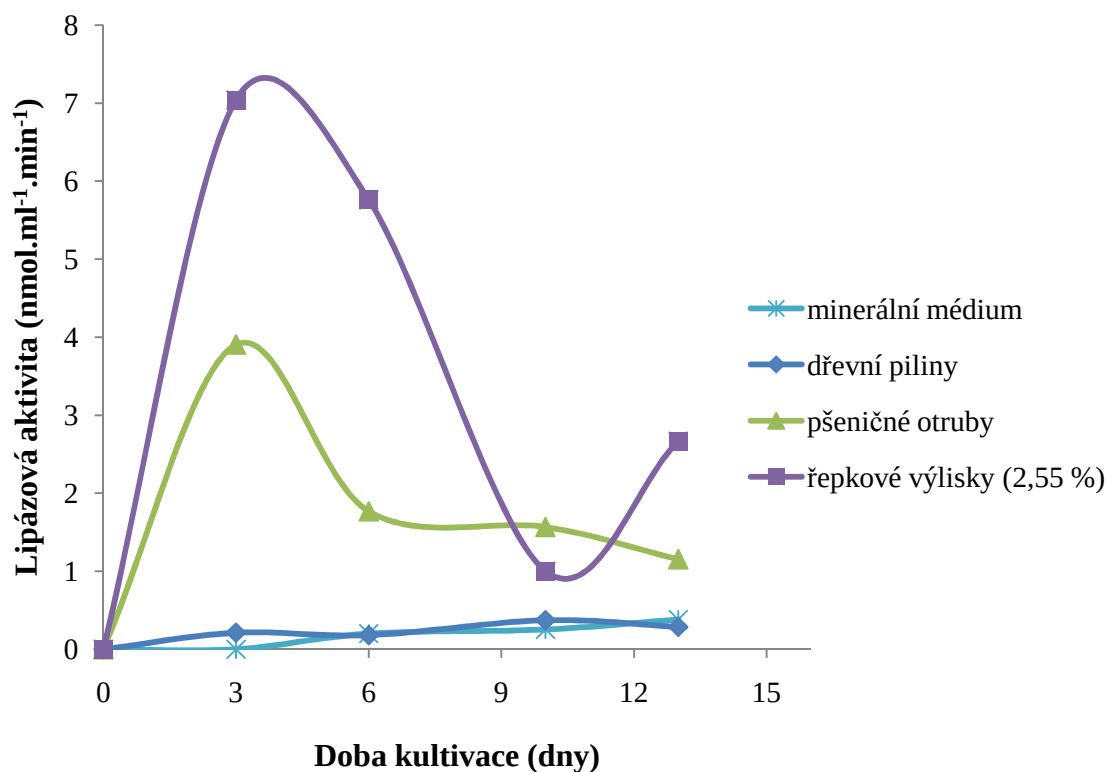
Nejvyšší produkce proteolytických enzymů u plísně *Aspergillus oryzae* byla naměřena při kultivaci na pšeničných otrubách 3. den kultivace.

5.1.1.2 Stanovení lipolytické aktivity

Stanovení lipolytické aktivity bylo provedeno dle návodů uvedených v kapitole 4.3.2. Produkce lipolytických enzymů byla sledována v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu. Stanovení lipolytické aktivity v médiu bylo provedeno 3., 6., 10. a 13. den kultivace (Tab. 9), (Obr. 13). Uvedené výsledky jsou průměrnými hodnotami ze dvou nezávislých kultivačních experimentů.

Tab. 9 Lipolytické aktivity ($\text{nmol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$) stanovené u plísně *Aspergillus oryzae* v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu.

	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	0,00	0,20	0,25	0,38
Dřevní piliny	0,21	0,18	0,37	0,28
Pšeničné otruby	3,90	1,77	1,56	1,15
Řepkové výlisky (2,55 %)	7,04	5,76	1,00	2,66



Obr. 13 Závislost lipolytické aktivity s použitím různých kultivačních substrátů na době kultivace u plísně *Aspergillus oryzae*.

Při kultivaci plísně *Aspergillus oryzae* na pšeničných otrubách a řepkových výliscích (2,55 %) byla nejvyšší hodnota lipolytické aktivity naměřena 3. den kultivace. Při kultivaci na dřevních pilinách bylo maximum produkce zaznamenáno 10. den kultivace, na minerálním médiu pak v den 13.

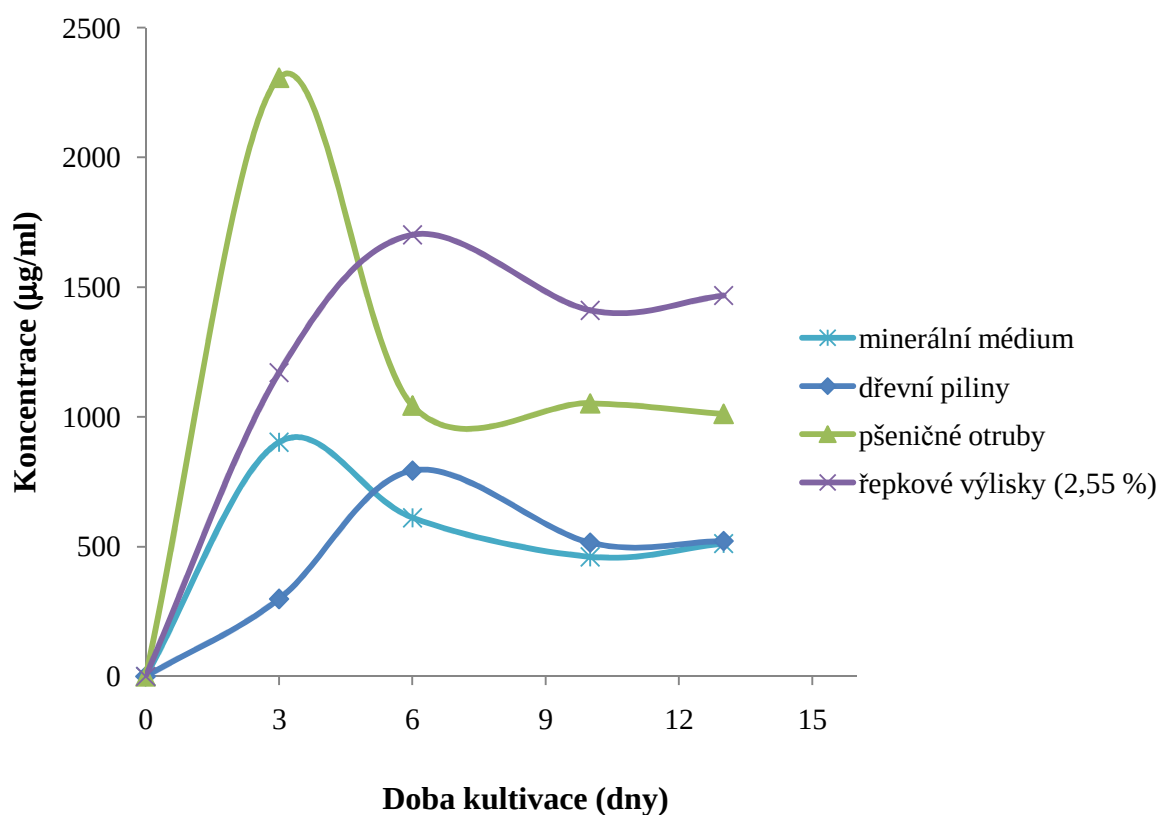
Nejvyšší produkce lipolytických enzymů u plísně *Aspergillus oryzae* byla naměřena při kultivaci na řepkových výliscích (2,55 %) 3. den kultivace.

5.1.1.3 Stanovení extracelulárních bílkovin

Stanovení extracelulárních bílkovin bylo provedeno dle návodů uvedených v kapitole 4.4. Produkce extracelulárních bílkovin byla sledována v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu. Stanovení extracelulárních bílkovin v médiu bylo provedeno 3., 6., 10. a 13. den kultivace (Tab. 10), (Obr. 14). Uvedené výsledky jsou průměrnými hodnotami ze dvou nezávislých kultivačních experimentů.

Tab. 10 Koncentrace extracelulárních bílkovin ($\mu\text{g/ml}$) stanovené u plísně *Aspergillus oryzae* v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu.

	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	902,05	610,96	460,62	511,80
Dřevní piliny	297,48	793,29	515,00	521,39
Pšeničné otruby	2 306,31	1 042,79	1 052,39	1 010,81
Řepkové výlisky (2,55 %)	1 170,75	1 701,74	1 410,65	1 468,23



Obr. 14 Závislost koncentrace extracelulárních bílkovin s použitím různých kultivačních substrátů na době kultivace u plísně *Aspergillus oryzae*.

Při kultivaci plísně *Aspergillus oryzae* na minerálním médiu a pšeničných otrubách byla nejvyšší hodnota extracelulárních bílkovin naměřena 3. den kultivace. Při kultivaci na dřevních pilinách a řepkových výliscích (2,55 %) bylo potom maximum produkce zaznamenáno v obou případech 6. den kultivace. Stanovení extracelulárních bílkovin 10. a 13. den kultivace ukázalo u všech použitých kultivačních substrátů viditelný pokles produkce.

Nejvyšší produkce extracelulárních bílkovin u plísně *Aspergillus oryzae* byla naměřena při kultivaci na pšeničných otrubách 3. den kultivace (Tab. 11).

Tab. 11 Shrnutí výsledků sledované produkce u plísně *Aspergillus oryzae* v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu.

Proteolytická aktivita ($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	10,50	24,16	48,33	46,50
Dřevní piliny	25,21	55,66	49,33	43,50
Pšeničné otruby	116,33	90,00	62,00	65,00
Řepkové výlisky (2,55 %)	69,50	0,00	11,01	9,45
Lipolytická aktivita ($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	0,00	0,20	0,25	0,38
Dřevní piliny	0,21	0,18	0,37	0,28
Pšeničné otruby	3,90	1,77	1,56	1,15
Řepkové výlisky (2,55 %)	7,04	5,76	1,00	2,66
Koncentrace extracelulárních bílkovin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	902,05	610,96	460,62	511,80
Dřevní piliny	297,48	793,29	515,00	521,39
Pšeničné otruby	2 306,31	1 042,79	1 052,39	1 010,81
Řepkové výlisky (2,55 %)	1 170,75	1 701,74	1 410,65	1 468,23

Na základě předchozích stanovení lze plíseň *Aspergillus oryzae* označit za vhodného producenta především proteolytických enzymů. Nejvyšší proteolytická aktivita ($116,33 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) byla stanovena při kultivaci na pšeničných otrubách 3. den kultivace. Nejvyšší lipolytická aktivita ($7,04 \text{ nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) byla potom stanovena při kultivaci na řepkových výliscích (2,55 %) rovněž 3. den kultivace. Nejvyšší koncentrace extracelulárních bílkovin činila $2\,306,31 \mu\text{g}/\text{ml}$, stanovena byla stejně jako nejvyšší proteolytická aktivita při kultivaci na pšeničných otrubách 3. den kultivace.

Pro další postupy byl pro produkci mikrobiálních enzymů pomocí plísně *Aspergillus oryzae* zvolen kultivační substrát pšeničné otruby s odběrem v 3. den kultivace.

5.1.2 Plíseň *Phanerochaete chrysosporium*

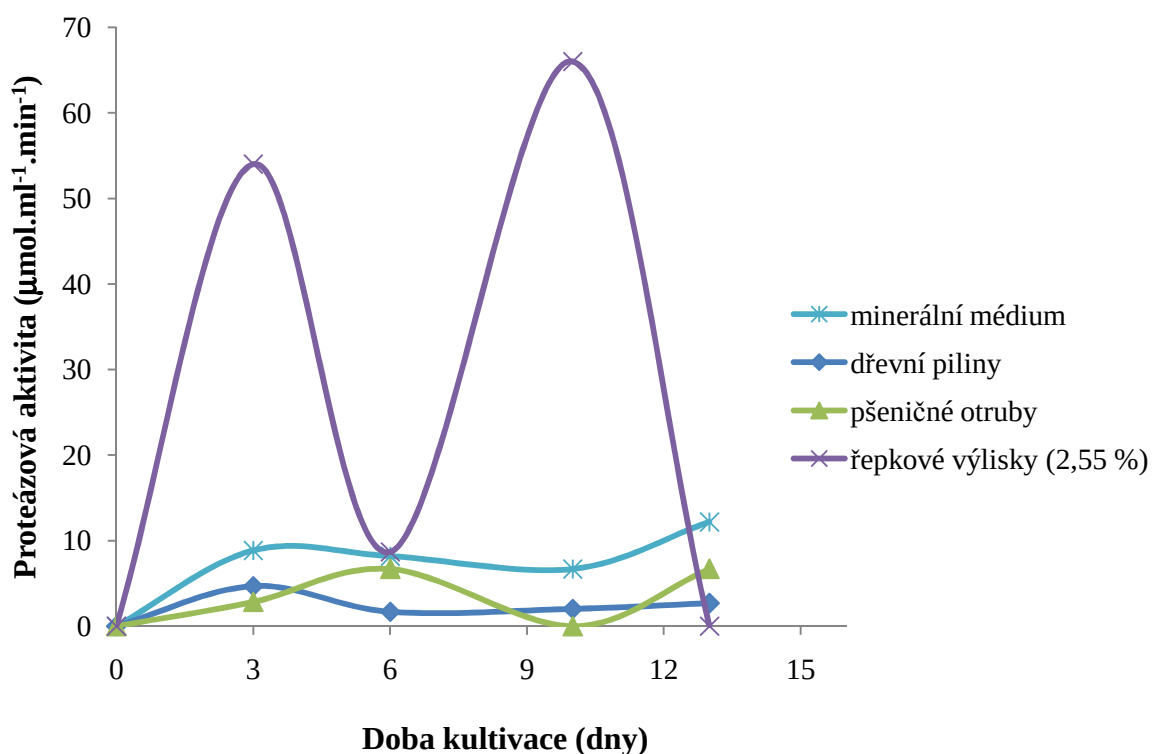
Kultivace plísně *Phanerochaete chrysosporium* byly provedeny dle návodů uvedených v kapitole 4.2. Kultivace této plísně probíhaly ve dvou typech produkčních médií, přičemž druhá sada produkčních kultivačních médií byla ochuzena o všechny stopové prvky a o poloviční množství fosforu (limitace dostupností živin). Následně byly produkce v obou typech médií porovnány. Použitými odpadními substráty byly dřevní piliny, pšeničné otruby a řepkové výlisky (2,55 % lipidů).

5.1.2.1 Stanovení proteolytické aktivity

Stanovení proteolytické aktivity bylo provedeno dle návodů uvedených v kapitole 4.3.1. Produkce proteolytických enzymů byla sledována v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu. Stanovení proteolytické aktivity v médiu bylo provedeno 3., 6., 10. a 13. den kultivace (Tab. 12), (Obr. 15) pro médium bez limitace a (Tab. 13), (Obr. 16) pro médium s limitací.

Tab. 12 Proteolytické aktivity ($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) stanovené u plísně *Phanerochaete chrysosporium* v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu – médium bez limitace.

	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	8,83	8,16	6,66	12,16
Dřevní piliny	4,66	1,66	2,00	2,66
Pšeničné otruby	2,83	6,66	0,00	6,66
Řepkové výlisky (2,55 %)	54,00	8,66	66,00	0,00



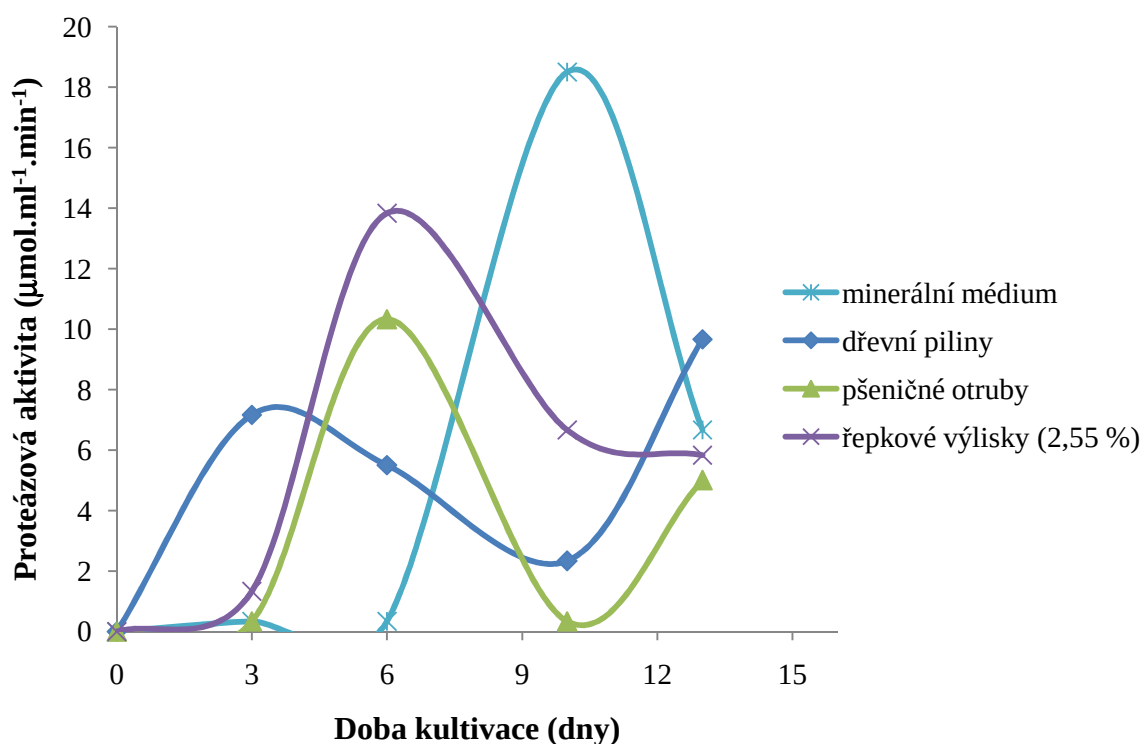
Obr. 15 Závislost proteolytické aktivity s použitím různých kultivačních substrátů na době kultivace u plísně *Phanerochaete chrysosporium* – médium bez limitace.

Při kultivaci plísně *Phanerochaete chrysosporium* na dřevních pilinách byla nejvyšší hodnota proteolytické aktivity naměřena 3. den kultivace. Při kultivaci na pšeničných otrubách bylo maximum produkce zaznamenáno 6. a 13. den kultivace. Při kultivaci na řepkových výliscích (2,55 %) byla vysoká produkce zaznamenána již 3. den kultivace, 6. den došlo k poklesu, maxima produkce na daném substrátu bylo dosaženo v den 10. V den 13. byla stanovena maximální hodnota při kultivaci na minerálním médiu.

Nejvyšší produkce proteolytických enzymů u plísně *Phanerochaete chrysosporium* byla naměřena při kultivaci na řepkových výliscích 10. den kultivace.

Tab. 13 Proteolytické aktivity ($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) stanovené u plísně *Phanerochaete chrysosporium* v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu – médium s limitací.

	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	0,33	0,33	18,50	6,66
Dřevní piliny	7,16	5,50	2,33	9,66
Pšeničné otruby	0,33	10,33	0,33	5,00
Řepkové výlisky (2,55 %)	1,33	13,83	6,66	5,83



Obr. 16 Závislost proteolytické aktivity s použitím různých kultivačních substrátů na době kultivace u plísně *Phanerochaete chrysosporium* – médium s limitací.

Při kultivaci plísně *Phanerochaete chrysosporium* na pšeničných otrubách a řepkových výliscích (2,55 %) byla nejvyšší hodnota proteolytické aktivity naměřena 6. den kultivace. Při kultivaci na minerálním médiu bylo maximum produkce zaznamenáno 10. den kultivace, na dřevních pilinách pak v den 13.

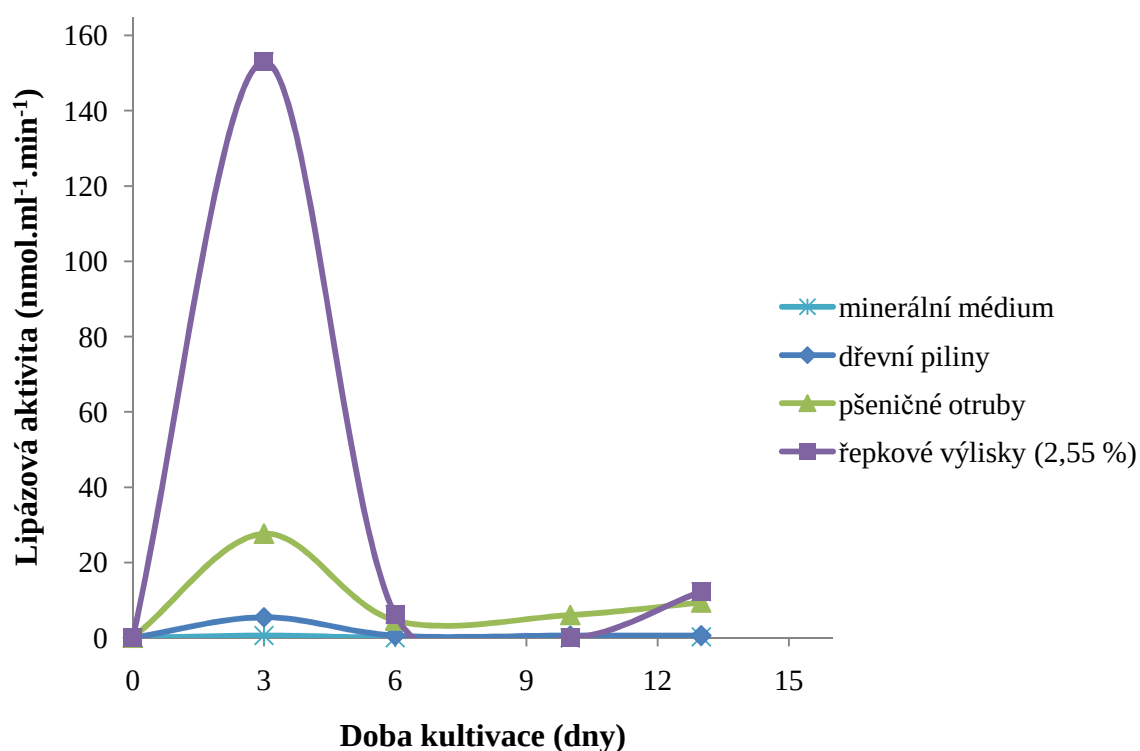
Nejvyšší produkce proteolytických enzymů u plísně *Phanerochaete chrysosporium* byla naměřena při kultivaci na minerálním médiu 10. den kultivace.

5.1.2.2 Stanovení lipolytické aktivity

Stanovení lipolytické aktivity bylo provedeno dle návodů uvedených v kapitole 4.3.2. Produkce lipolytických enzymů byla sledována v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu. Stanovení lipolytické aktivity v médiu bylo provedeno 3., 6., 10. a 13. Den kultivace (Tab. 14), (Obr. 17) pro médium bez limitace a (Tab. 15), (Obr. 18) pro médium s limitací.

Tab. 14 Lipolytické aktivity ($\text{nmol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$) stanovené u plísně *Phanerochaete chrysosporium* v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu – médium bez limitace.

	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	0,64	0,02	0,03	0,25
Dřevní piliny	5,44	0,58	0,61	0,58
Pšeničné otruby	27,62	4,60	6,08	9,36
Řepkové výlisky (2,55 %)	153,06	6,24	0,00	12,26



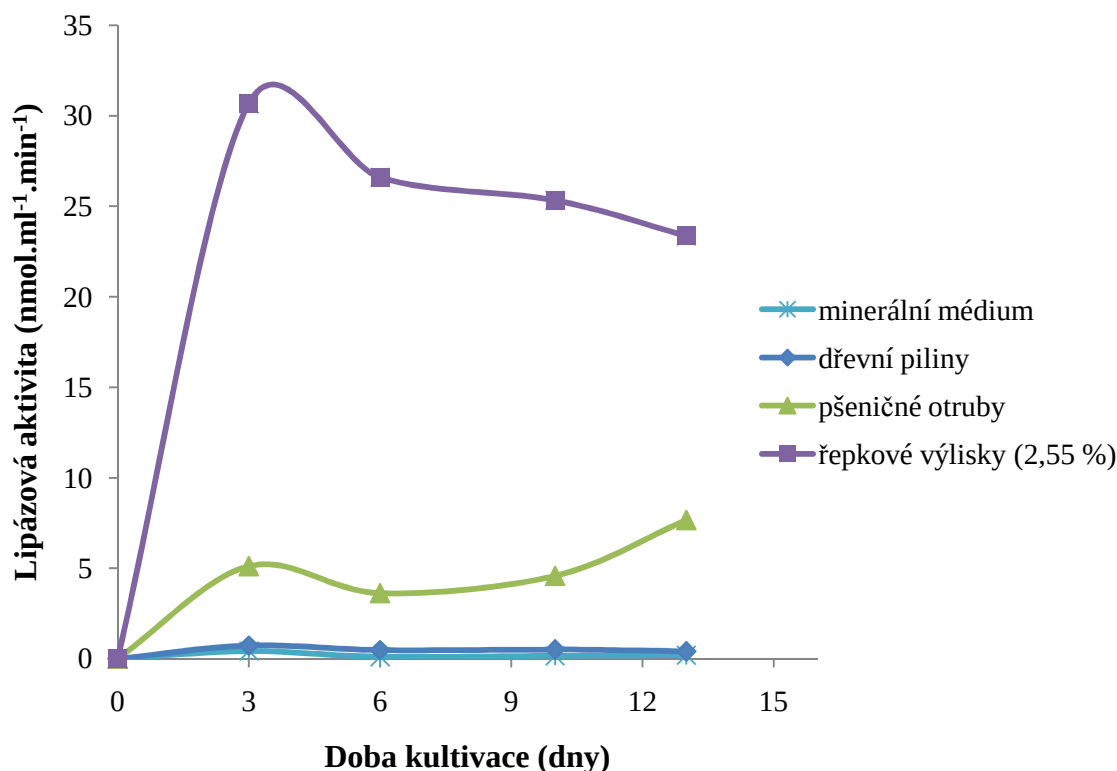
Obr. 17 Závislost lipolytické aktivity s použitím různých kultivačních substrátů na době kultivace u plísně *Phanerochaete chrysosporium* – médium bez limitace.

Při kultivaci plísně *Phanerochaete chrysosporium* na minerálním médiu, dřevních pilinách, pšeničných otrubách i řepkových výliscích (2,55 %) byla nejvyšší hodnota lipolytické aktivity naměřena již 3. den kultivace. V dalších dnech kultivace nebyl pozorován žádný výrazný nárůst produkce.

Nejvyšší produkce lipolytických enzymů u plísně *Phanerochaete chrysosporium* byla naměřena při kultivaci na řepkových výliscích (2,55 %) 3. den kultivace.

Tab. 15 Lipolytické aktivity ($\text{nmol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$) stanovené u plísně *Phanerochaete chrysosporium* v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu – médium s limitací.

	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	0,41	0,10	0,16	0,19
Dřevní piliny	0,72	0,46	0,50	0,39
Pšeničné otruby	5,09	3,62	4,57	7,64
Řepkové výlisky (2,55 %)	30,67	26,60	25,33	23,36



Obr. 18 Závislost lipolytické aktivity s použitím různých kultivačních substrátů na době kultivace u plísně *Phanerochaete chrysosporium* – médium s limitací.

Při kultivaci plísně *Phanerochaete chrysosporium* na minerálním médiu, dřevních pilinách a řepkových výliscích (2,55 %) byla nejvyšší hodnota lipolytické aktivity naměřena 3. den kultivace. Při kultivaci na pšeničných otrubách bylo potom maximum produkce zaznamenáno až 13. den kultivace.

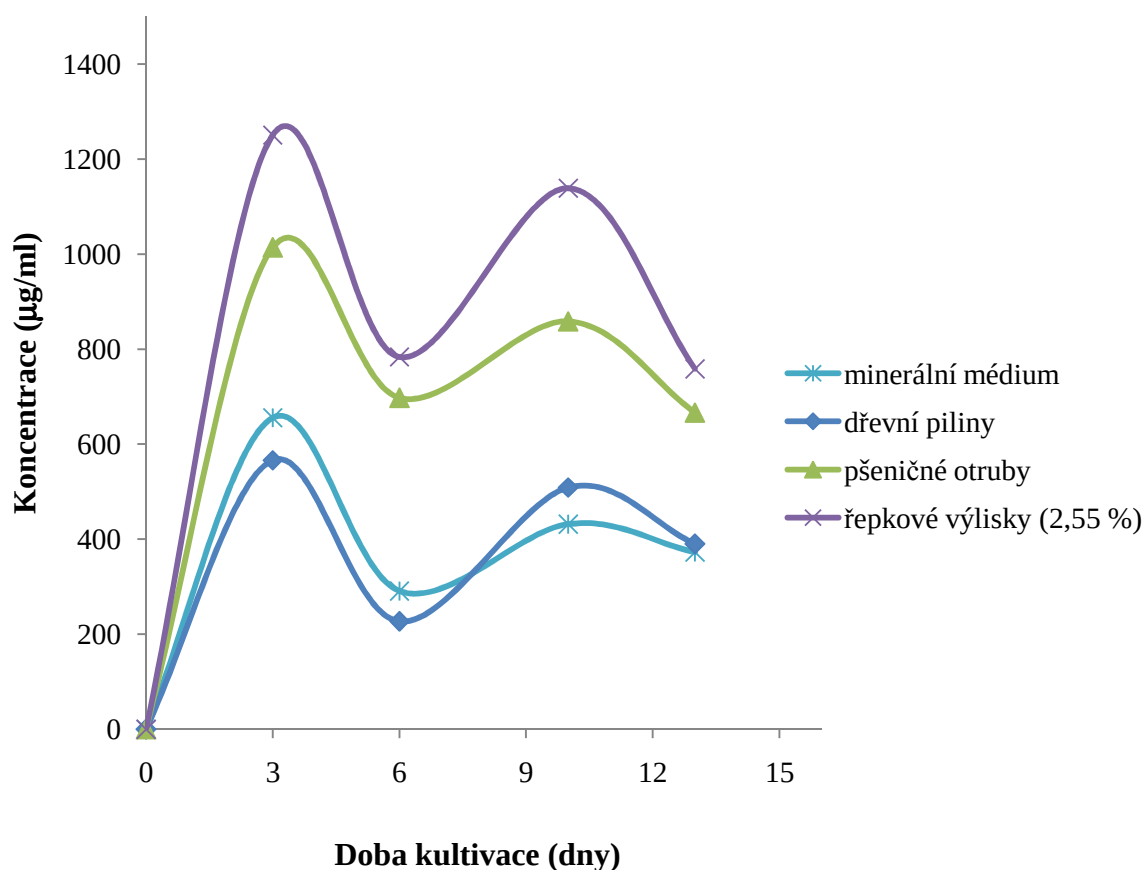
Nejvyšší produkce lipolytických enzymů u plísně *Phanerochaete chrysosporium* byla naměřena při kultivaci na řepkových výliscích (2,55 %) 3. den kultivace.

5.1.2.3 Stanovení extracelulárních bílkovin

Stanovení extracelulárních bílkovin bylo provedeno dle návodů uvedených v kapitole 4.4. Produkce extracelulárních bílkovin byla sledována v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu. Stanovení extracelulárních bílkovin v médiu bylo provedeno 3., 6., 10. a 13. den kultivace (Tab. 16), (Obr. 19) pro médium bez limitace a (Tab. 17), (Obr. 20) a pro médium s limitací.

Tab. 16 Koncentrace extracelulárních bílkovin ($\mu\text{g/ml}$) stanovené u plísně *Phanerochaete chrysosporium* v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu – médium bez limitace.

	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	655,74	291,08	431,83	372,97
Dřevní piliny	566,18	227,11	508,92	390,25
Pšeničné otruby	1 014,01	697,33	858,87	666,62
Řepkové výlisky (2,55 %)	1 250,71	783,69	1 138,76	758,74



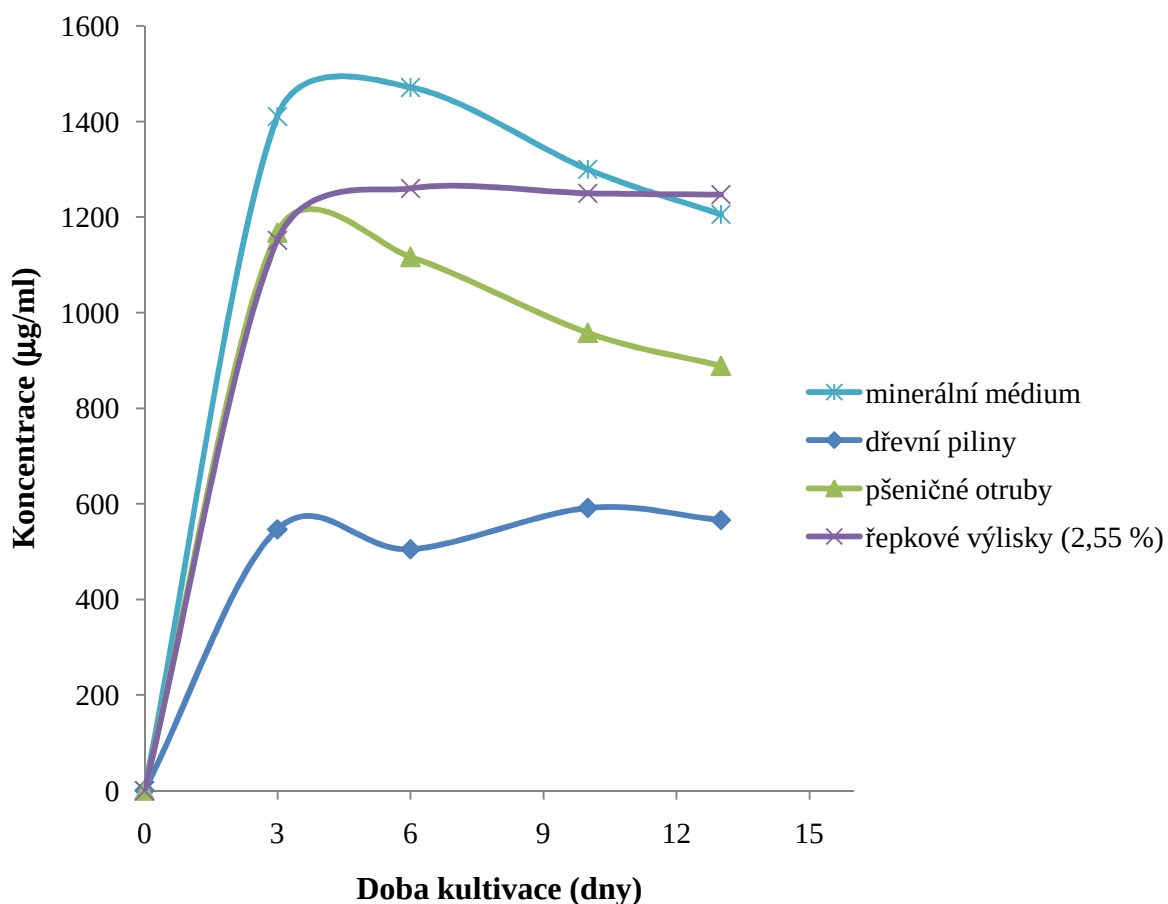
Obr. 19 Závislost koncentrace extracelulárních bílkovin s použitím různých kultivačních substrátů na době kultivace u plísně *Phanerochaete chrysosporium* – médium bez limitace.

Při kultivaci plísně *Phanerochaete chrysosporium* na minerálním médiu, dřevních pilinách, pšeničných otrubách i řepkových výliscích (2,55 %) byla nejvyšší hodnota extracelulárních bílkovin naměřena již 3. den kultivace. Další stanovení extracelulárních bílkovin ukázalo pokles produkce v 6. den, následný nárůst v 10. den a opětovný pokles při stanovení v 13. den kultivace. Pokles produkce extracelulárních bílkovin v 6. den kultivace odpovídá stanovení enzymových aktivit, kdy v 6. den došlo rovněž k jejich poklesu. Příčinou mohla být adaptace na jinou složku substrátu a produkce jiného hydrolytického enzymu.

Nejvyšší produkce proteolytických enzymů u plísně *Phanerochaete chrysosporium* byla naměřena při kultivaci na řepkových výliscích (2,55 %) 3. den kultivace.

Tab. 17 Koncentrace extracelulárních bílkovin ($\mu\text{g/ml}$) stanovené u plísně *Phanerochaete chrysosporium* v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu – médium s limitací.

	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	1 410,65	1 471,43	1 300,46	1 205,93
Dřevní piliny	546,99	505,40	591,77	566,18
Pšeničné otruby	1 167,55	1 116,37	958,22	889,25
Řepkové výlisky (2,55 %)	1 151,55	1 260,31	1 250,10	1 247,52



Obr. 20 Závislost koncentrace extracelulárních bílkovin s použitím různých kultivačních substrátů na době kultivace u plísně *Phanerochaete chrysosporium* – médium s limitací.

Při kultivaci plísně *Phanerochaete chrysosporium* na pšeničných otrubách byla nejvyšší hodnota extracelulárních bílkovin naměřena 3. den kultivace. Při kultivaci na minerálním médiu a řepkových výliscích (2,55 %) bylo potom maximum produkce zaznamenáno v obou případech 6. den kultivace, při kultivaci na dřevních pilinách v den 10. Stanovení extracelulárních bílkovin 13. den kultivace ukázalo u všech použitých kultivačních substrátů pokles produkce.

Nejvyšší produkce proteolytických enzymů u plísně *Phanerochaete chrysosporium* byla naměřena při kultivaci na minerálním médiu 6. den kultivace (Tab. 18).

Tab. 18 Shrnutí výsledků sledované produkce u plísně *Phanerochaete chrysosporium* v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu.

Médium bez limitace				
Proteolytická aktivita ($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	8,83	8,16	6,66	12,16
Dřevní piliny	4,66	1,66	2,00	2,66
Pšeničné otruby	2,83	6,66	0,00	6,66
Řepkové výlisky (2,55 %)	54,00	8,66	66,00	0,00
Lipolytická aktivita ($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	0,64	0,02	0,03	0,25
Dřevní piliny	5,44	0,58	0,61	0,58
Pšeničné otruby	27,62	4,60	6,08	9,36
Řepkové výlisky (2,55 %)	153,06	6,24	0,00	12,26
Koncentrace extracelulárních bílkovin ($\mu\text{g/ml}$)	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	655,74	291,08	431,83	372,97
Dřevní piliny	566,18	227,11	508,92	390,25
Pšeničné otruby	1 014,01	697,33	858,87	666,62
Řepkové výlisky (2,55 %)	1 250,71	783,69	1 138,76	758,74
Médium s limitací				
Proteolytická aktivita ($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	0,33	0,33	18,50	6,66
Dřevní piliny	7,16	5,50	2,33	9,66
Pšeničné otruby	0,33	10,33	0,33	5,00
Řepkové výlisky (2,55 %)	1,33	13,83	6,66	5,83
Lipolytická aktivita ($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	0,41	0,10	0,16	0,19
Dřevní piliny	0,72	0,46	0,50	0,39
Pšeničné otruby	5,09	3,62	4,57	7,64
Řepkové výlisky (2,55 %)	30,67	26,60	25,33	23,36
Koncentrace extracelulárních bílkovin ($\mu\text{g/ml}$)	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	1 410,65	1 471,43	1 300,46	1 205,93
Dřevní piliny	546,99	505,40	591,77	566,18
Pšeničné otruby	1 167,55	1 116,37	958,22	889,25
Řepkové výlisky (2,55 %)	1 151,55	1 260,31	1 250,10	1 247,52

Na základě předchozích stanovení lze plíseň *Phanerochaete chrysosporium* označit za vhodného producenta jak proteolytických, tak lipolytických enzymů.

Nejvyšší proteolytická aktivita u média bez limitace $66,00 \mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$ byla stanovena při kultivaci na řepkových výliscích (2,55 %) 10. den kultivace, poměrně vysoká aktivita však byla stanovena i 3. den kultivace ($54,00 \mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$). U média s limitací byla nejvyšší proteolytická aktivita $18,50 \mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$ stanovena při kultivaci na minerálním médiu 10. den kultivace. Nejvyšší lipolytická aktivita u média bez limitace $153,06 \text{nmol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$ byla stanovena při kultivaci na řepkových výliscích (2,55 %) 3. den kultivace. U média s limitací byla nejvyšší lipolytická aktivita $30,67 \text{nmol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$ stanovena rovněž při kultivaci na řepkových výliscích (2,55 %) s odběrem v 3. den kultivace. Nejvyšší koncentrace extracelulárních bílkovin činila u média bez limitace $1\,250,71 \mu\text{g/ml}$, stanovena byla při kultivaci na řepkových výliscích 3. den kultivace. U média s limitací nejvyšší koncentrace extracelulárních bílkovin činila $1\,471,43 \mu\text{g/ml}$, přičemž stanovena byla při kultivaci na minerálním médiu 6. den kultivace.

Pro další postupy bylo pro produkci mikrobiálních enzymů pomocí plísně *Phanerochaete chrysosporium* zvoleno médium s limitací. Jako kultivační substrát byly potom vybrány řepkové výlisky s odběrem vzorků 6. den kultivace.

5.1.3 Mikroorganismus *Aureobasidium pullulans*

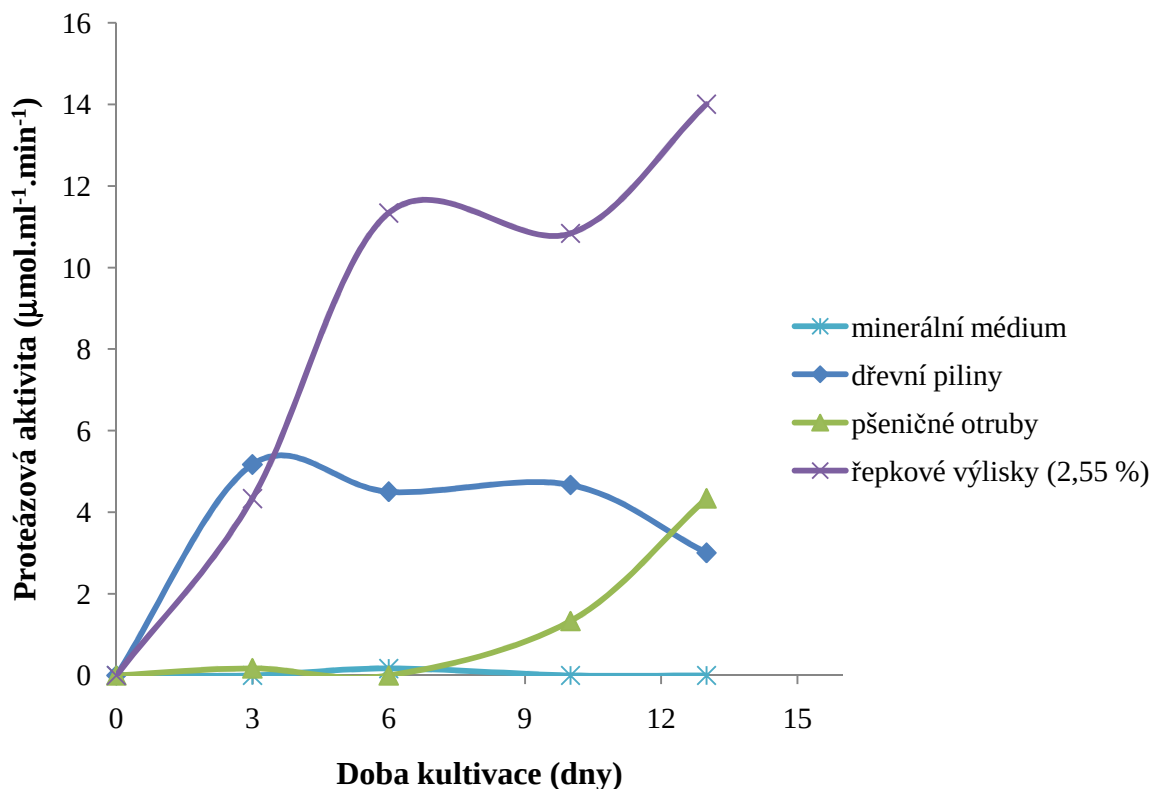
Kultivace mikroorganismu *Aureobasidium pullulans* byly provedeny dle návodů uvedených v kapitole 4.2. Použitými odpadními substráty byly dřevní piliny, pšeničné otruby a řepkové výlisky (2,55 % lipidů).

5.1.3.1 Stanovení proteolytické aktivity

Stanovení proteolytické aktivity bylo provedeno dle návodů uvedených v kapitole 4.3.1. Produkce proteolytických enzymů byla sledována v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu. Stanovení proteolytické aktivity v médiu bylo provedeno 3., 6., 10. a 13. den kultivace (Tab. 19), (Obr. 21).

Tab. 19 Proteolytické aktivity ($\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$) stanovené u mikroorganismu *Aureobasidium pullulans* v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu.

	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	0,00	0,16	0,00	0,00
Dřevní piliny	5,16	4,50	4,66	3,00
Pšeničné otruby	0,16	0,00	1,33	4,33
Řepkové výlisky (2,55 %)	4,33	11,33	10,83	14,00



Obr. 21 Závislost proteolytické aktivity s použitím různých kultivačních substrátů na době kultivace u mikroorganismu *Aureobasidium pullulans*.

Při kultivaci mikroorganismu *Aureobasidium pullulans* na dřevních pilinách byla nejvyšší hodnota proteolytické aktivity naměřena 3. den kultivace. Při kultivaci na minerálním médiu bylo potom maximum produkce zaznamenáno 6. den kultivace, na pšeničných otrubách a řepkových výliscích (2,55 %) pak v den 13.

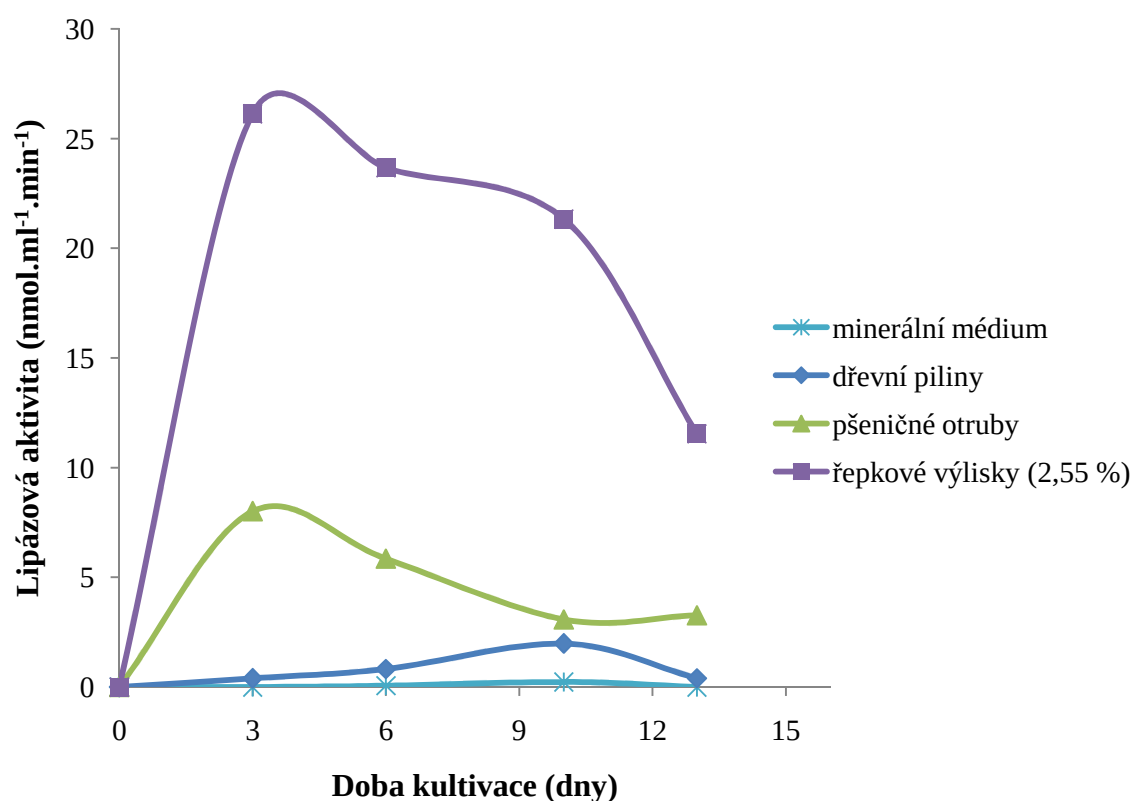
Nejvyšší produkce proteolytických enzymů u mikroorganismu *Aureobasidium pullulans* byla naměřena při kultivaci na řepkových výliscích (2,55 %) 13. den kultivace.

5.1.3.2 Stanovení lipolytické aktivity

Stanovení lipolytické aktivity bylo provedeno dle návodů uvedených v kapitole 4.3.2. Produkce lipolytických enzymů byla sledována v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu. Stanovení lipolytické aktivity v médiu bylo provedeno 3., 6., 10. a 13. den kultivace (Tab. 20), (Obr. 22).

Tab. 20 Lipolytické aktivity ($\text{nmol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$) stanovené u mikroorganismu *Aureobasidium pullulans* v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu.

	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	0,00	0,06	0,23	0,00
Dřevní piliny	0,39	0,82	1,98	0,40
Pšeničné otruby	8,01	5,85	3,08	3,27
Řepkové výlisky (2,55 %)	26,13	23,66	21,33	11,55



Obr. 22 Závislost lipolytické aktivity s použitím různých kultivačních substrátů na době kultivace u mikroorganismu *Aureobasidium pullulans*.

Při kultivaci mikroorganismu *Aureobasidium pullulans* na pšeničných otrubách a řepkových výliscích (2,55 %) byla nejvyšší hodnota lipolytické aktivity naměřena 3. den kultivace. Při kultivaci na minerálním médiu a dřevních pilinách bylo potom maximum produkce zaznamenáno 10. den kultivace.

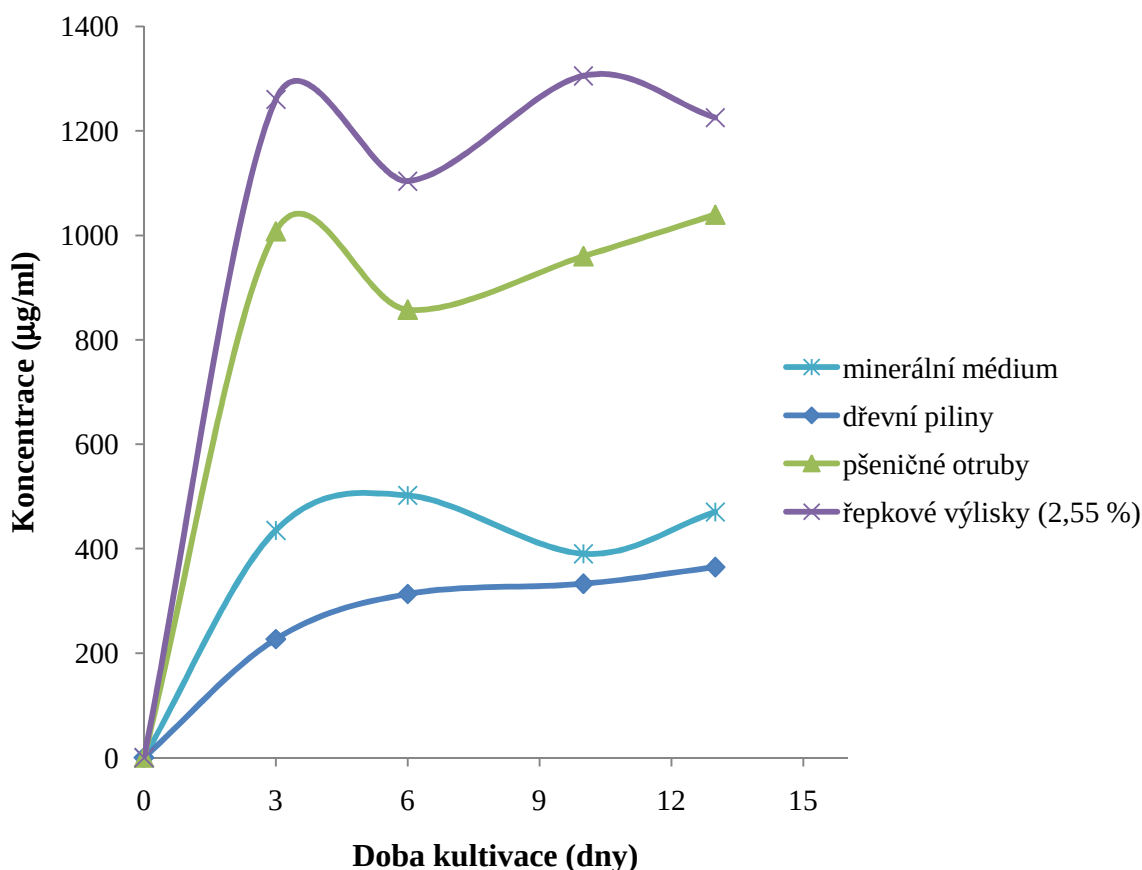
Nejvyšší produkce lipolytických enzymů u mikroorganismu *Aureobasidium pullulans* byla naměřena při kultivaci na řepkových výliscích (2,55 %) 3. den kultivace.

5.1.3.3 Stanovení extracelulárních bílkovin

Stanovení extracelulárních bílkovin bylo provedeno dle návodů uvedených v kapitole 4.4. Produkce extracelulárních bílkovin byla sledována v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu. Stanovení extracelulárních bílkovin v médiu bylo provedeno 3., 6., 10. a 13. den kultivace (Tab. 21), (Obr. 23).

Tab. 21 Koncentrace extracelulárních bílkovin ($\mu\text{g/ml}$) stanovené u mikroorganismu *Aureobasidium pullulans* v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu.

	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	435,03	502,20	390,20	470,21
Dřevní piliny	227,11	313,47	332,67	364,66
Pšeničné otruby	1 007,61	857,27	959,63	1039,60
Řepkové výlisky (2,55 %)	1 260,31	1 103,57	1 305,09	1 225,12



Obr. 23 Závislost koncentrace extracelulárních bílkovin s použitím různých kultivačních substrátů na době kultivace u mikroorganismu *Aureobasidium pullulans*.

Při kultivaci mikroorganismu *Aureobasidium pullulans* na minerálním médiu byla nejvyšší hodnota extracelulárních bílkovin naměřena 6. den kultivace. Při kultivaci na řepkových výliscích (2,55 %) bylo maximum produkce zaznamenáno 10. den kultivace, na dřevních pilinách a pšeničných otrubách pak v den 13.

Nejvyšší produkce extracelulárních bílkovin u mikroorganismu *Aureobasidium pullulans* byla naměřena při kultivaci na řepkových výliscích (2,55 %) 10. den kultivace.

Tab. 22 Shrnutí výsledků sledované produkce u mikroorganismu *Aureobasidium pullulans* v závislosti na čase a použitém kultivačním substrátu.

Proteolytická aktivita ($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	0,00	0,16	0,00	0,00
Dřevní piliny	5,16	4,50	4,66	3,00
Pšeničné otruby	0,16	0,00	1,33	4,33
Řepkové výlisky (2,55 %)	4,33	11,33	10,83	14,00

Pokračování Tab. 22.

Lipolytická aktivita (nmol.ml ⁻¹ .min ⁻¹)	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	0,00	0,06	0,23	0,00
Dřevní piliny	0,39	0,82	1,98	0,40
Pšeničné otruby	8,01	5,85	3,08	3,27
Řepkové výlisky (2,55 %)	26,13	23,66	21,33	11,55
Koncentrace extracelulárních bílkovin (µg/ml)	3. den	6. den	10. den	13. den
Minerální médium	435,03	502,20	390,20	470,21
Dřevní piliny	227,11	313,47	332,67	364,66
Pšeničné otruby	1 007,61	857,27	959,63	1 039,60
Řepkové výlisky (2,55 %)	1 260,31	1 103,57	1 305,09	1 225,12

Na základě předchozích stanovení lze mikroorganismus *Aureobasidium pullulans* označit za vhodného producenta jak proteolytických, tak lipolytických enzymů. Nejvyšší proteolytická aktivita 14,00 µmol.ml⁻¹.min⁻¹ byla stanovena při kultivaci na řepkových výliscích (2,55 %) 13. den kultivace. Nejvyšší lipolytická aktivita 26,13 nmol.ml⁻¹.min⁻¹ byla potom stanovena při kultivaci na řepkových výliscích (2,55 %) 3. den kultivace. Nejvyšší koncentrace extracelulárních bílkovin činila 1 305,09 µg/ml, stanovena byla při kultivaci na řepkových výliscích (2,55 %) 10. den kultivace (Tab. 22).

Pro další postupy byl pro produkci mikrobiálních enzymů pomocí mikroorganismu *Aureobasidium pullulans* zvolen kultivační substrát řepkové výlisky (2,55 %) s odběrem v 6. den kultivace.

5.2 Identifikace, izolace a purifikace enzymů

Identifikace, izolace a purifikace enzymů byly provedeny dle návodů uvedených v kapitole 4.5. Použitými metodami zde byly – vertikální PAGE SDS elektroforéza, gelová filtrace a ultrafiltrace.

5.2.1 Vertikální PAGE SDS elektroforéza

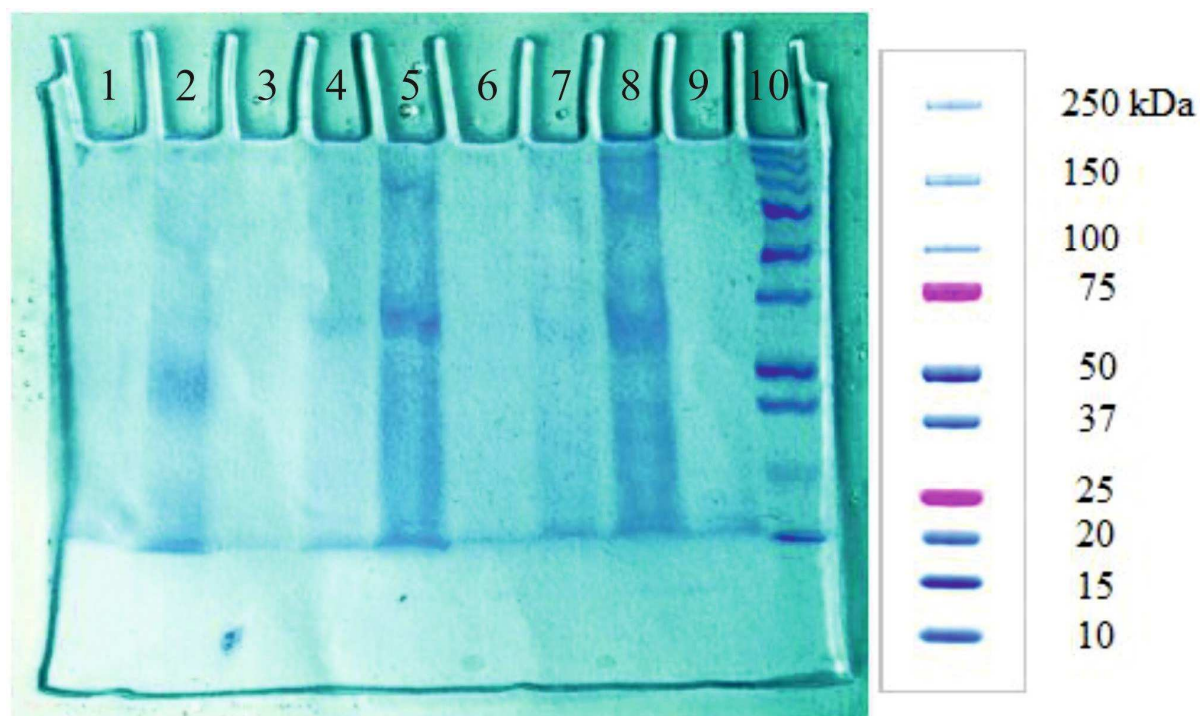
Vertikální PAGE SDS elektroforéza byla použita jako identifikační metoda k přehlednému určení distribuce proteinů ve vzorku podle jejich molekulové hmotnosti, postupováno bylo dle návodů uvedených v kapitole 4.5.1.

Elektroforetická separace enzymů byla provedena na 12% polyakrylamidovém gelu za použití standardů Precision Plus Protein™ Dual Color (Bio-Rad). Na gel byly nanášeny vzorky supernatantu kultur *Aspergillus oryzae*, *Phanerochaete chrysosporium* a *Aureobasidium pullulans* po ultrafiltraci na 5 kDa membráně. Naneseny byly jak koncentráty (7x zkoncentrováno), tak permeáty. Pro úplnost a srovnání byly naneseny i příslušné vzorky před ultrafiltrací (Tab. 23).

Tab. 23 Nanášení vzorků na gel.

Číslo jamky	Nanesený vzorek
1	<i>Aspergillus oryzae</i> před ultrafiltrací
2	<i>Aspergillus oryzae</i> po ultrafiltraci – koncentrát
3	<i>Aspergillus oryzae</i> po ultrafiltraci – permeát
4	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> před ultrafiltrací
5	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> po ultrafiltraci – koncentrát
6	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> po ultrafiltraci – permeát
7	<i>Aureobasidium pullulans</i> před ultrafiltrací
8	<i>Aureobasidium pullulans</i> po ultrafiltraci – koncentrát
9	<i>Aureobasidium pullulans</i> po ultrafiltraci – permeát
10	Precision Plus Protein™ Dual Color Standards

Na gel byly vzorky naneseny v množství 20 µl, standardy v množství 5 µl.



Obr. 24 Výsledek vertikální PAGE SDS elektroforézy s identifikační stupnicí standardů.

Elektroforetická metoda byla v tomto případě použita za účelem orientačního určení distribuce proteinů ve vzorku. Aby bylo možné zachytit proteiny v co nejširším rozsahu, byla zvolena ultrafiltrace pouze na 5 kDa membráně, tudíž zakoncentrování bylo velmi nízké, což se projevilo ve formě málo výrazných bandů. I takto nízké zakoncentrování se však ve výsledku ukázalo, srovnáme-li nanesené vzorky před ultrafiltrací s příslušnými koncentráty, zjistíme, že bandy koncentrátů jsou podstatně sytější a následné vyhodnocení o to snazší.

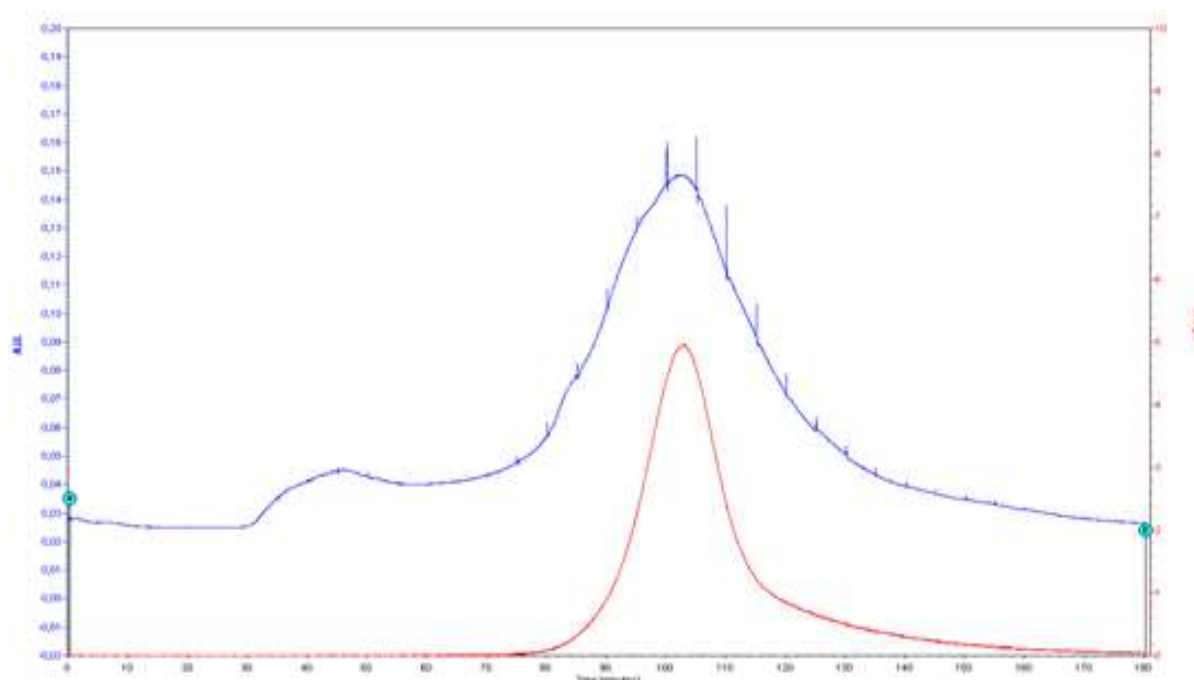
Dle výsledku vertikální PAGE SDS elektroforézy (Obr. 24) byla u koncentrátů zaznamenána přítomnost proteinů v oblasti od 250 do 90 kDa dále pak v oblasti od 35 do 20 kDa. Pro izolaci a purifikaci těchto proteinů byla použita metoda gelová filtrace na Sephadexu G-100 a metoda ultrafiltrace na membránách o velikosti 100 a 30 kDa.

5.2.2 Gelová filtrace

Gelová filtrace byla použita jako identifikační i izolační a purifikační metoda, postupováno bylo dle návodu uvedeného v kapitole 4.5.2.

Gelová filtrace byla provedena na kolonách o objemech 50 a 100 ml. Po elektroforetickém ověření molekulových hmotností separovaných proteinů byla jako náplň těchto kolon použita látka Sephadex G-100. Lepší separační účinnost byla zaznamenána u kolony o objemu 100 ml. V dalších měřeních se již kolona o objemu 50 ml nepoužívala. Optimalizován byl také průtok kolonou. Optimální průtoková rychlost 50 ml kolonou byla stanovena na 0,5 ml/min, kolonou o objemu 100 ml pak na 1 ml/min.

Metoda gelové filtrace se neukázala být dostatečně citlivou metodou pro identifikaci, izolaci a purifikaci námi získaných enzymů (Obr. 25). Důvodem špatné separace může být volba nosiče, krátká kolona (23,5 cm) i poměrně vysoký průtok na tak malý objem gelu. Na chromatogramu (modrém) je náznak rozdělení do dvou větších frakcí, vysokomolekulární (30-55 minuta) a nízkomolekulární (55-75 minuta). Tento proces dělení je dále možno optimalizovat.



Obr. 25 Chromatogram – supernatant plísně *Aspergillus oryzae* po kultivaci na pšeničných otrubách s přísadkou chloridu sodného o koncentraci 10 g/l, kolona o objemu 100 ml, nástřík 2 ml, průtok 1 ml/min (modrá křivka – záznam z UV detektoru při 280 nm, červená křivka – záznam z vodivostního detektoru).

5.2.3 Ultrafiltrace

Ultrafiltrace byla použita jako izolační a purifikační metoda, postupováno bylo dle návodu uvedeného v kapitole 4.5.3

Pro izolaci a purifikaci příslušných enzymů pomocí ultrafiltrace byly použity membrány o velikosti 100 a 30 kDa. Velikosti jednotlivých membrán byly zvoleny na základě počátečního elektroforetického stanovení molekulových hmotností separovaných fragmentů bílkovin nacházejících se v 7x zkoncentrovaném supernatantu kultivovaných plísni.

Pomocí stanovení enzymových aktivit a množství bílkovin byla kontrolována přítomnost proteáz, lipáz, popřípadě jejich směsí v dílčích frakcích. Výsledky měření plísně *Phanerochaete chrysosporium* jsou uvedeny v tabulce níže (Tab. 24).

Tab. 24 Ultrafiltrace 7x zkoncentrovaného supernatantu plísně *Phanerochaete chrysosporium* na 100 a 30 kDa membráně.

Ultrafiltrace na membráně o velikosti 100 kDa	Proteázová aktivita ($\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	Lipázová aktivita ($\text{nmol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	Koncentrace bílkovin ($\mu\text{g/ml}$)
Před ultrafiltrací	11,50	19,42	1 381,86
Koncentrát (>100 kDa)	9,50	13,01	1 301,90
Permeát (5-100 kDa)	4,33	11,11	1 189,94
Ultrafiltrace na membráně o velikosti 30 kDa	Proteázová aktivita ($\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	Lipázová aktivita ($\text{nmol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	Koncentrace bílkovin ($\mu\text{g/ml}$)
Před ultrafiltrací	4,33	11,11	1 189,94
Koncentrát (30-100 kDa)	3,33	7,68	1 033,20
Permeát (5-30 kDa)	0,00	1,96	825,28

Stanovení enzymových aktivit a množství bílkovin v jednotlivých frakcích po výše uvedených ultrafiltracích potvrdily přítomnost enzymů o velikostech určených elektroforetickou metodou (Tab. 24), (Obr. 24).

V případě kultury *Phanerochaete chrysosporium* výsledek elektroforézy ukázal dva bandy. První band se pohyboval okolo velikosti 100 kDa, druhý pak kolem 35 kDa. Izolace a purifikace této kultury metodou ultrafiltrace potvrdila proteolytickou aktivitu na pomezí 100 kDa, dále pak v oblasti 30-100 kDa. Lipolytická aktivita byla stanovena rovněž na pomezí 100 kDa a v oblasti 30-100 kDa. Navíc byla lipolytická aktivita stanovena v oblasti 5-30 kDa, tato aktivita však byla poměrně nízká, což může vysvětlovat absenci bandu při elektroforetickém stanovení.

Vzhledem k nepravděpodobnosti výskytu proteázy s molekulovou hmotností 100 kDa a vysokým koncentracím bílkovin ve všech frakcích lze výsledky stanovení přisoudit nefunkční membráně. Pro hrubou izolaci a purifikaci enzymů se tedy metoda ultrafiltrace ukázala být vhodnou, pro dostatečnou izolaci a purifikaci byla navržena další optimalizace gelové filtrace a ultrafiltrace a následné použití kombinace těchto dvou metod.

5.3 Stabilizace enzymů

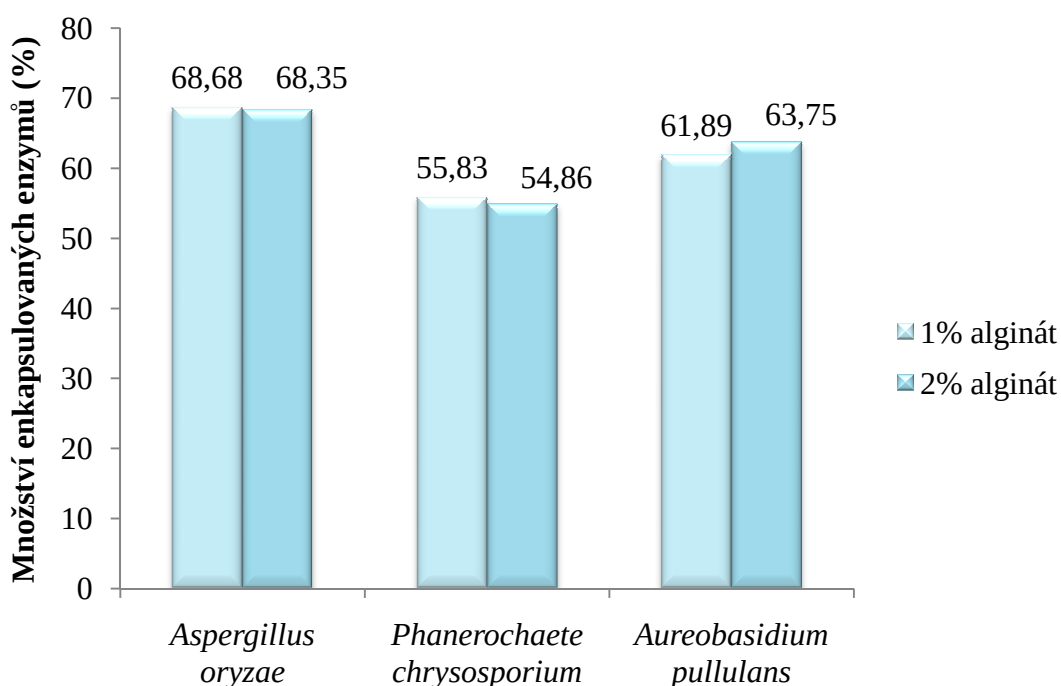
Stabilizace enzymů byly provedeny dle návodů uvedených v kapitole 4.6. Stabilizační metodou zde byla enkapsulace. Pomocí enkapsulátoru byly připraveny alginátové částice, a to jak s 1%, tak s 2% alginátem. Enkapsulovanými látkami byly 7x zkoncentrované supernatanty kultur *Aspergillus oryzae*, *Phanerochaete chrysosporium* a *Aureobasidium pullulans* po kultivaci.

5.3.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Stanovení enkapsulační účinnosti bylo provedeno dle návodů uvedených v kapitole 4.6.2. Enkapsulační účinnost byla stanovena u částic z 1% i z 2% alginátu, enkapsulovanými látkami byly 7x zkoncentrované supernatanty kultur *Aspergillus oryzae*, *Phanerochaete chrysosporium* a *Aureobasidium pullulans* po kultivaci. Tyto preparáty obsahovaly směs extracelulárních hydroláz s předpokládaným majoritním zastoupením proetáz a lipáz. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze dvou nezávislých experimentů (Tab. 25), (Obr. 26).

Tab. 25 Množství enkapsulovaných enzymů (%) naprodukovaných různými kulturami do alginátových částic za použití 1% a 2% alginátu.

	1% alginát	2% alginát
<i>Aspergillus oryzae</i>	68,68	68,35
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	55,83	54,86
<i>Aureobasidium pullulans</i>	61,89	63,75



Obr. 26 Množství enkapsulovaných enzymů (%) naprodukovaných různými kulturami do alginátových částic za použití 1% a 2% alginátu.

Enkapsulační účinnost alginátových částic se pohybovala v rozmezí 55 až 70 %. Enzymy produkované pomocí plísně *Aspergillus oryzae* se enkapsulovaly s účinností kolem 70 %, enzymy produkované pomocí *Phanerochaete chrysosporium* s účinností 55 %, enzymy mikroorganismu *Aureobasidium pullulans* pak s účinností kolem 60 %. S nejvyšší účinností se tedy enkapsulovaly enzymy plísně *Aspergillus oryzae*, a to jak v případě částic z 1%, tak v případě částic z 2% alginátu.

Z výsledků uvedených výše je patrné, že enkapsulační účinnosti do alginátových částic byly u enzymů téhož producenta srovnatelné, ať už se jednalo o alginát 1% či 2%.

5.3.2 Enkapsulace enzymů z plísně *Aspergillus oryzae*

Kultivace plísně *Aspergillus oryzae* byly provedeny dle návodů uvedených v kapitole 4.2. Na základě studia produkce mikrobiálních enzymů v kapitole 5.1 probíhala kultivace tohoto producenta na pšeničných otrubách, 3. den byl potom odebrán vzorek. Získaný supernatant kultury *Aspergillus oryzae* obsahující enzymy byl následně 7x zkoncentrován a použit pro stanovení dlouhodobých stabilit jak ve formě volné, tak ve formě vázané (enkapsulované).

5.3.2.1 Stanovení dlouhodobé stability volných a enkapsulovaných enzymů

Stanovení dlouhodobé stability volných a enkapsulovaných enzymů bylo provedeno dle návodů uvedených v kapitolách 4.6.3 a 4.6.4. Dlouhodobé stability byly sledovány po dvou, čtyřech a šesti týdnech, a to ve dvou prostředích – ve vodě a v gelu. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze dvou souběžných inkubačních experimentů (Tab. 26).

Tab. 26 Stanovení dlouhodobé stability volných a enkapsulovaných enzymů – enzymové aktivity a jejich procentuální vyjádření vzhledem k aktivitě původní.

Stabilita po dvou týdnech	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)
Volné ve vodě	48,66	93,89	3,64	53,82
Volné v gelu	19,66	37,94	5,38	79,47
Enkapsulované ve vodě (1%)	0,36	99,89	0,23	97,79
Enkapsulované ve vodě (2%)	0,28	95,10	0,18	92,97
Enkapsulované v gelu (1%)	0,03	9,07	0,00	0,00
Enkapsulované v gelu (2%)	0,25	83,92	0,00	0,00
Stabilita po čtyřech týdnech	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)
Volné ve vodě	50,33	97,11	3,96	58,54
Volné v gelu	19,66	37,94	5,42	80,09
Enkapsulované ve vodě (1%)	0,36	99,89	0,24	100,00
Enkapsulované ve vodě (2%)	0,26	89,53	0,20	100,00
Enkapsulované v gelu (1%)	0,00	0,00	0,11	48,88
Enkapsulované v gelu (2%)	0,23	78,31	0,17	87,54
Stabilita po šesti týdnech	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)
Volné ve vodě	29,89	57,67	2,30	33,95
Volné v gelu	5,74	11,08	3,00	44,38
Enkapsulované ve vodě (1%)	0,36	99,89	0,25	100,00
Enkapsulované ve vodě (2%)	0,26	89,53	0,18	94,00
Enkapsulované v gelu (1%)	0,35	95,34	0,23	97,79
Enkapsulované v gelu (2%)	0,26	89,53	0,19	97,44

Stanovení dlouhodobých stabilit volných a enkapsulovaných enzymů bylo provedeno za účelem jejich porovnání a následného posouzení techniky enkapsulace jako stabilizační metody.

Výsledky měření aktivit volných enzymů po dvou týdnech ukázaly pokles jak proteolytické, tak lipolytické aktivity. Nejvyšší stabilitu vykazovaly volné proteolytické enzymy v prostředí vody, nejnižší pak volné proteolytické enzymy v prostředí gelu. Po čtyřech týdnech se aktivity volných enzymů téměř nelišily od aktivit po dvoutýdenním stanovení. Při měření aktivit volných enzymů po šesti týdnech však došlo k výraznému poklesu těchto aktivit, a to ve všech případech. Dosud relativně stabilní proteolytické enzymy v prostředí vody klesly skoro na polovinu své původní aktivity.

Výsledky měření aktivit enkapsulovaných enzymů po dvoutýdenním uchovávání ukázaly v prostředí vody téměř stoprocentní zachování původních aktivit jak u částic z 1%, tak u částic z 2% alginátu. Téměř nulové až nulové aktivity byly však zaznamenány v prostředí gelu, výjimkou byly proteolytické enzymy zabalené v 2% alginátu. Po čtyřech týdnech se aktivity enkapsulovaných enzymů v prostředí vody výrazně nezměnily, opačně tomu bylo v případě uchovávání v gelu, zde došlo k výrazným změnám v podobě zvýšení aktivit. Měření po šesti týdnech pak zaznamenalo další navýšení enzymových aktivit, zejména enkapsulovaných enzymů v prostředí gelu. Na konci šestého týdne uchovávání tak téměř všechny enkapsulované enzymy dosahovaly své původní aktivity. Důvodem je možné postupné uvolňování enzymů ze struktur gelu.

Dle výsledků měření bylo zjištěno, že v případě enkapsulovaných mikrobiálních enzymů naprodukovaných pomocí plísně *Aspergillus oryzae* bylo po šestitýdenním stanovení dosaženo téměř ve všech případech stoprocentní aktivity, zatímco v případě volných enzymů docházelo v tuto dobu k výrazným poklesům těchto aktivit. Jinými slovy, v okamžiku, kdy aktivita volných enzymů výrazně klesala, aktivita enkapsulovaných enzymů byla prakticky nezměněna.

5.3.2.2 Stanovení dlouhodobé stability částic

Stanovení dlouhodobé stability částic bylo provedeno dle návodu uvedeného v kapitole 4.6.5. Dlouhodobé stability byly sledovány po dvou, čtyřech a šesti týdnech, a to ve dvou prostředích – ve vodě a v gelu. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze dvou souběžných inkubačních experimentů (Tab. 27), (Tab. 28).

Tab. 27 Stanovení dlouhodobé stability částic – množství uvolněných bílkovin a jejich procentuální vyjádření vzhledem k množství původnímu.

Stabilita po dvou týdnech	Koncentrace bílkovin	
	($\mu\text{l/ml}$)	(%)
Enkapsulované ve vodě (1%)	223,27	45,07
Enkapsulované ve vodě (2%)	214,63	43,53
Enkapsulované v gelu (1%)	163,13	32,93
Enkapsulované v gelu (2%)	188,72	38,28
Stabilita po čtyřech týdnech	Koncentrace bílkovin	
	($\mu\text{l/ml}$)	(%)
Enkapsulované ve vodě (1%)	223,91	45,20
Enkapsulované ve vodě (2%)	214,95	43,60
Enkapsulované v gelu (1%)	227,11	45,84
Enkapsulované v gelu (2%)	191,92	38,93

Pokračování **Tab. 27.**

Stabilita po šesti týdnech	Koncentrace bílkovin	
	($\mu\text{l/ml}$)	(%)
Enkapsulované ve vodě (1%)	320,24	64,64
Enkapsulované ve vodě (2%)	350,75	71,14
Enkapsulované v gelu (1%)	268,62	54,22
Enkapsulované v gelu (2%)	288,97	58,61

Výsledky měření ukázaly, že po dvoutýdenním uchovávání částic s enkapsulovanými enzymy se v prostředí vody a gelu uvolnilo 30-45 % původního množství bílkovin, přičemž stabilnějšími v tomto ohledu se ukázaly být částice uchovávané v prostředí gelu. Stanovení uvolněného množství bílkovin po čtyřech týdnech nezaznamenalo žádné výraznější změny, jinak tomu bylo při stanovení stability částic po šesti týdnech uchovávání. V tomto případě bylo u všech stanovovaných částic jak v prostředí vody, tak v prostředí gelu naměřeno znatelně vyšší množství uvolněných bílkovin.

Z hlediska použité koncentrace alginátu při přípravě částic, zde nebyl pozorován žádný významný rozdíl.

Tab. 28 Stanovení dlouhodobé stability částic – enzymové aktivity uvolněných bílkovin a jejich procentuální vyjádření vzhledem k aktivitě původní.

Stabilita po dvou týdnech	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)
Enkapsulované ve vodě (1%)	14,16	79,59	0,53	22,91
Enkapsulované ve vodě (2%)	15,16	85,62	0,41	17,96
Enkapsulované v gelu (1%)	0,00	0,00	0,00	0,00
Enkapsulované v gelu (2%)	0,50	2,82	0,00	0,00
Stabilita po čtyřech týdnech	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)
Enkapsulované ve vodě (1%)	14,50	81,46	0,54	23,37
Enkapsulované ve vodě (2%)	15,33	86,56	0,61	26,71
Enkapsulované v gelu (1%)	0,66	3,75	0,00	0,00
Enkapsulované v gelu (2%)	3,50	19,76	0,00	0,00
Stabilita po šesti týdnech	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)
Enkapsulované ve vodě (1%)	17,50	98,32	1,60	68,82
Enkapsulované ve vodě (2%)	17,62	99,49	1,98	85,80
Enkapsulované v gelu (1%)	12,33	69,29	0,85	36,70
Enkapsulované v gelu (2%)	16,00	90,32	0,89	38,84

V rámci stability částic byly testovány rovněž enzymové aktivity enzymů uvolněných v průběhu dlouhodobého uchovávání v prostředí vody a gelu. Tato informace je doplněním předchozích výsledků týkajících se stability částic, kde bylo sledováno nespecificky uvolnění proteinů z částic bez ohledu na zachování biologické aktivity enzymů.

Získané výsledky enzymových aktivit korespondovaly se stanovením množství uvolněných bílkovin. Celkový trend lze tedy označit takto – kde narůstalo množství uvolněných bílkovin, tam narůstala i enzymová aktivita.

5.3.3 Enkapsulace enzymů z plísně *Phanerochaete chrysosporium*

Kultivace plísně *Phanerochaete chrysosporium* byly provedeny dle návodů uvedených v kapitole 4.2. Na základě studia produkce mikrobiálních enzymů v kapitole 5.1 probíhala kultivace tohoto producenta na řepkových výliscích (2,55 %), 6. den byl potom odebrán vzorek. Získaný supernatant kultury *Phanerochaete chrysosporium* obsahující enzymy byl následně 7x zkoncentrován a použit pro stanovení dlouhodobých stabilit, jak ve formě volné, tak ve formě vázané (enkapsulované).

5.3.3.1 Stanovení dlouhodobé stability volných a enkapsulovaných enzymů

Stanovení dlouhodobé stability volných a enkapsulovaných enzymů bylo provedeno dle návodů uvedených v kapitolách 4.6.3 a 4.6.4. Dlouhodobé stability byly sledovány po dvou, čtyřech a šesti týdnech, a to ve dvou prostředích – ve vodě a v gelu. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze dvou souběžných inkubačních experimentů (Tab. 29).

Tab. 29 Stanovení dlouhodobé stability volných a enkapsulovaných enzymů – enzymové aktivity a jejich procentuální vyjádření vzhledem k aktivitě původní.

Stabilita po dvou týdnech	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)
Volné ve vodě	6,16	96,10	19,37	66,01
Volné v gelu	5,00	77,92	19,30	65,79
Enkapsulované ve vodě (1%)	0,00	0,00	0,25	23,32
Enkapsulované ve vodě (2%)	0,00	0,00	0,27	39,76
Enkapsulované v gelu (1%)	0,00	0,00	0,00	0,00
Enkapsulované v gelu (2%)	0,01	54,75	0,00	0,00
Stabilita po čtyřech týdnech	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)
Volné ve vodě	6,33	98,70	19,76	67,36
Volné v gelu	5,83	90,91	19,39	66,09
Enkapsulované ve vodě (1%)	0,05	100,00	0,39	35,95
Enkapsulované ve vodě (2%)	0,03	100,00	0,38	55,05
Enkapsulované v gelu (1%)	0,01	34,79	0,06	5,83
Enkapsulované v gelu (2%)	0,01	54,75	0,12	18,35
Stabilita po šesti týdnech	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)
Volné ve vodě	3,16	49,53	11,30	38,53
Volné v gelu	0,33	5,19	10,39	35,41
Enkapsulované ve vodě (1%)	0,04	100,00	0,84	76,75
Enkapsulované ve vodě (2%)	0,03	100,00	0,50	71,68
Enkapsulované v gelu (1%)	0,05	100,00	0,99	90,35
Enkapsulované v gelu (2%)	0,03	100,00	0,41	59,64

Stanovení aktivit volných enzymů po dvou týdnech ukázalo podobně jako v předchozím případě pokles jak proteolytické, tak lipolytické aktivity. Nejvyšší stabilita byla pozorována u volných proteolytických enzymů v prostředí vody, nejnižší pak u volných proteolytických enzymů v prostředí gelu. Po čtyřech týdnech ke změnám aktivit téměř nedošlo, po šesti týdnech však byl zaznamenán jejich výrazný pokles.

Výsledky měření aktivit enkapsulovaných enzymů po dvoutýdenním uchovávání ukázaly v případě proteolytických enzymů uchovávaných v prostředí vody a lipolytických enzymů uchovávaných v prostředí gelu nulové hodnoty. Nejvyšší aktivita byla pozorována u proteolytických enzymů v prostředí gelu enkapsulovaných do 2% alginátu. Po čtyřech týdnech pak došlo k navýšení enzymových aktivit téměř ve všech stanovovaných případech. Výrazné změny byly zaznamenány zejména u enkapsulovaných proteolytických enzymů uchovávaných v prostředí vody, kde došlo k navýšení enzymových aktivit z původních nulových až na stoprocentní. Měření po šesti týdnech pak v tomto nárůstu pokračovalo. Na konci šestého týdne uchovávání se tak enzymové aktivity pohybovaly od 60 do 100 % své původní aktivity.

Dle výsledků měření bylo zjištěno, že v případě enkapsulovaných mikrobiálních enzymů naprodukovaných pomocí plísně *Phanerochaete chrysosporium* bylo po šestitýdenním stanovení dosaženo ve všech případech více než 60 % původní aktivity, zatímco v případě volných enzymů docházelo v tuto dobu k výrazným poklesům těchto aktivit.

5.3.3.2 Stanovení dlouhodobé stability částic

Stanovení dlouhodobé stability částic bylo provedeno dle návodu uvedeného v kapitole 4.6.5. Dlouhodobé stability byly sledovány po dvou, čtyřech a šesti týdnech, a to ve dvou prostředích – ve vodě a v gelu. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze dvou souběžných inkubačních experimentů (Tab. 30), (Tab. 31).

Tab. 30 Stanovení dlouhodobé stability částic – množství uvolněných bílkovin a jejich procentuální vyjádření vzhledem k množství původnímu.

Stabilita po dvou týdnech	Koncentrace bílkovin	
	(μl/ml)	(%)
Enkapsulované ve vodě (1%)	438,23	99,05
Enkapsulované ve vodě (2%)	434,39	99,91
Enkapsulované v gelu (1%)	302,60	68,39
Enkapsulované v gelu (2%)	296,84	68,28
Stabilita po čtyřech týdnech	Koncentrace bílkovin	
	(μl/ml)	(%)
Enkapsulované ve vodě (1%)	441,43	99,77
Enkapsulované ve vodě (2%)	435,03	100,00
Enkapsulované v gelu (1%)	307,08	69,40
Enkapsulované v gelu (2%)	297,48	68,42
Stabilita po šesti týdnech	Koncentrace bílkovin	
	(μl/ml)	(%)
Enkapsulované ve vodě (1%)	438,23	99,05
Enkapsulované ve vodě (2%)	379,37	87,26
Enkapsulované v gelu (1%)	441,43	99,77
Enkapsulované v gelu (2%)	334,27	76,89

Výsledky měření ukázaly, že po dvoutýdenním uchovávání částic s enkapsulovanými enzymy se v prostředí vody a gelu uvolnilo 70-100 % původního množství bílkovin, přičemž stabilnějšími se ukázaly být částice uchovávané v prostředí gelu. Stanovení uvolněného množství bílkovin po čtyřech týdnech nezaznamenalo žádné výraznější změny. Po šesti týdnech uchovávání byl v případě enkapsulovaných enzymů uchovávaných v prostředí gelu zaznamenán další nárůst uvolněného množství bílkovin.

Z hlediska použité koncentrace alginátu při přípravě částic, zde nebyl pozorován žádný významný rozdíl.

Tab. 31 Stanovení dlouhodobé stability částic – enzymové aktivity uvolněných bílkovin a jejich procentuální vyjádření vzhledem k aktivitě původní.

Stabilita po dvou týdnech	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)
Enkapsulované ve vodě (1%)	0,00	0,00	0,90	11,07
Enkapsulované ve vodě (2%)	0,00	0,00	0,70	8,75
Enkapsulované v gelu (1%)	1,66	93,05	3,04	37,11
Enkapsulované v gelu (2%)	1,16	66,29	3,37	41,88
Stabilita po čtyřech týdnech	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)
Enkapsulované ve vodě (1%)	1,66	93,05	1,05	12,90
Enkapsulované ve vodě (2%)	0,50	28,41	0,84	10,47
Enkapsulované v gelu (1%)	1,83	100,00	3,30	40,37
Enkapsulované v gelu (2%)	1,66	94,69	3,26	40,35
Stabilita po šesti týdnech	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)
Enkapsulované ve vodě (1%)	1,83	100,00	6,26	76,47
Enkapsulované ve vodě (2%)	1,66	94,59	5,30	65,93
Enkapsulované v gelu (1%)	1,79	99,93	7,04	85,94
Enkapsulované v gelu (2%)	1,66	94,69	7,70	95,71

Enzymové aktivity ve většině případů korespondovaly se stanovením množství uvolněných bílkovin. Celkový trend lze tedy, podobně jako u předchozího testovaného kmene, popsat tak, že množství uvolněných bílkovin i enzymová aktivita se zvyšovaly souběžně.

5.3.4 Enkapsulace enzymů z mikroorganismu *Aureobasidium pullulans*

Kultivace mikroorganismu *Aureobasidium pullulans* byly provedeny dle návodů uvedených v kapitole 4.2. Na základě studia produkce mikrobiálních enzymů v kapitole 5.1 probíhala kultivace tohoto producenta na řepkových výliscích (2,55 %), 6. den byl potom odebrán vzorek. Získaný supernatant kultury *Aureobasidium pullulan* obsahující enzymy byl následně 7x zkoncentrován a použit pro stanovení dlouhodobých stabilit, jak ve formě volné, tak ve formě vázané (enkapsulované).

5.3.4.1 Stanovení dlouhodobé stability volných a enkapsulovaných enzymů

Stanovení dlouhodobé stability volných a enkapsulovaných enzymů bylo provedeno dle návodů uvedených v kapitolách 4.6.3 a 4.6.4. Dlouhodobé stability byly sledovány po dvou, čtyřech a šesti týdnech, a to ve dvou prostředích – ve vodě a v gelu. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze dvou souběžných inkubačních experimentů (Tab. 32).

Tab. 32 Stanovení dlouhodobé stability volných a enkapsulovaných enzymů – enzymové aktivity a jejich procentuální vyjádření vzhledem k aktivitě původní.

Stabilita po dvou týdnech	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)
Volné ve vodě	6,00	96,00	21,22	61,01
Volné v gelu	4,16	66,67	14,44	41,51
Enkapsulované ve vodě (1%)	0,00	0,00	0,37	19,57
Enkapsulované ve vodě (2%)	0,00	0,00	0,30	19,49
Enkapsulované v gelu (1%)	0,00	0,00	0,00	0,00
Enkapsulované v gelu (2%)	0,00	0,00	0,00	0,00
Stabilita po čtyřech týdnech	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)
Volné ve vodě	6,16	98,67	21,17	60,85
Volné v gelu	5,83	93,33	20,42	58,71
Enkapsulované ve vodě (1%)	0,06	97,37	0,39	20,69
Enkapsulované ve vodě (2%)	0,00	0,00	0,41	26,68
Enkapsulované v gelu (1%)	0,00	0,00	0,00	0,00
Enkapsulované v gelu (2%)	0,05	89,29	0,00	0,00
Stabilita po šesti týdnech	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)
Volné ve vodě	4,16	66,67	14,00	40,24
Volné v gelu	3,16	50,67	14,50	41,67
Enkapsulované ve vodě (1%)	0,06	97,37	0,89	46,80
Enkapsulované ve vodě (2%)	0,05	89,29	0,99	63,63
Enkapsulované v gelu (1%)	0,05	81,75	0,70	36,91
Enkapsulované v gelu (2%)	0,03	59,46	0,70	44,90

Enzymové aktivity volných enzymů po dvou týdnech ukázaly opět pokles jak v případě proteolytické, tak v případě lipolytické aktivity. Nejvíce stabilními byly jako v předchozích případech volné proteolytické enzymy v prostředí vody, nejnižší pak volné lipolytické enzymy v prostředí gelu. Během stanovení po čtyřech týdnech byl zaznamenán mírný nárůst enzymových aktivit, a to především v prostředí gelu. Při měření aktivit volných enzymů po šesti týdnech však došlo k poklesu těchto aktivit, a to ve všech případech.

Výsledky měření aktivit enkapsulovaných enzymů po dvoutýdenním uchovávání ukázaly v případě proteolytických enzymů uchovávaných v prostředí vody i gelu a lipolytických enzymů uchovávaných v prostředí gelu nulové hodnoty. Nejvyšší aktivita byla pozorována u lipolytických enzymů v prostředí vody. Po čtyřech týdnech pak došlo k částečnému nárůstu enzymových aktivit, přičemž významný nárůst byl pozorován u proteolytických enzymů, zde

se aktivity enzymů zvedly z nuly téměř na 100 %. Měření po šesti týdnech pak v nárůstu enzymových aktivit pokračovalo. Na konci šestého týdne uchovávání se tak proteolytické aktivity pohybovaly v rozmezí od 60 do 100 % své původní aktivity, u lipolytických aktivit pak v rozmezí 35-65 %.

Dle výsledků měření bylo zjištěno, že v případě enkapsulovaných mikrobiálních enzymů naprodukovaných pomocí mikroorganismu *Aureobasidium pullulans* bylo po šestitýdenním stanovení dosaženo ve většině případů více než 60 % původní aktivity, zatímco v případě volných enzymů docházelo v tuto dobu k výrazným poklesům těchto aktivit.

5.3.4.2 Stanovení dlouhodobé stability částic

Stanovení dlouhodobé stability částic bylo provedeno dle návodu uvedeného v 4.6.5. Dlouhodobé stability byly sledovány po dvou, čtyřech a šesti týdnech, a to ve dvou prostředích – ve vodě a v gelu. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze dvou souběžných inkubačních experimentů (Tab. 33), (Tab. 34).

Tab. 33 Stanovení dlouhodobé stability částic – množství uvolněných bílkovin a jejich procentuální vyjádření vzhledem k množství původnímu.

Stabilita po dvou týdnech	Koncentrace bílkovin	
	($\mu\text{l/ml}$)	(%)
Enkapsulované ve vodě (1%)	351,22	55,01
Enkapsulované ve vodě (2%)	404,96	61,58
Enkapsulované v gelu (1%)	319,23	50,00
Enkapsulované v gelu (2%)	296,84	45,14
Stabilita po čtyřech týdnech	Koncentrace bílkovin	
	($\mu\text{l/ml}$)	(%)
Enkapsulované ve vodě (1%)	371,05	58,12
Enkapsulované ve vodě (2%)	406,24	61,17
Enkapsulované v gelu (1%)	318,91	49,95
Enkapsulované v gelu (2%)	380,65	57,88
Stabilita po šesti týdnech	Koncentrace bílkovin	
	($\mu\text{l/ml}$)	(%)
Enkapsulované ve vodě (1%)	400,91	62,79
Enkapsulované ve vodě (2%)	435,63	66,24
Enkapsulované v gelu (1%)	407,22	63,78
Enkapsulované v gelu (2%)	438,23	66,64

Výsledky měření ukázaly, že po dvoutýdenním uchovávání částic s enkapsulovanými enzymy se v prostředí vody a gelu uvolnilo 45-60 % původního množství bílkovin, přičemž stabilnějšími se ukázaly být částice uchovávané v prostředí gelu. Stanovení uvolněného množství bílkovin po čtyřech týdnech zaznamenalo částečný nárůst, zejména v případě enkapsulovaných enzymů do 2% alginátu uchovávaných v gelu. Po šesti týdnech uchovávání byl pak zaznamenán další nárůst uvolněného množství bílkovin.

Z hlediska použité koncentrace alginátu při přípravě částic, zde nebyl pozorován žádný významný rozdíl.

Tab. 34 Stanovení dlouhodobé stability částic – enzymové aktivity uvolněných bílkovin a jejich procentuální vyjádření vzhledem k aktivitě původní.

Stabilita po dvou týdnech	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)
Enkapsulované ve vodě (1%)	0,00	0,00	0,98	9,11
Enkapsulované ve vodě (2%)	0,00	0,00	1,16	10,48
Enkapsulované v gelu (1%)	0,33	17,23	1,76	16,35
Enkapsulované v gelu (2%)	1,66	83,66	2,02	18,27
Stabilita po čtyřech týdnech	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)
Enkapsulované ve vodě (1%)	1,66	86,17	1,20	11,19
Enkapsulované ve vodě (2%)	1,33	66,93	0,99	8,94
Enkapsulované v gelu (1%)	0,50	25,85	1,79	16,64
Enkapsulované v gelu (2%)	1,66	83,66	2,09	18,85
Stabilita po šesti týdnech	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)
Enkapsulované ve vodě (1%)	1,83	94,79	5,05	46,96
Enkapsulované ve vodě (2%)	1,66	83,66	5,30	47,85
Enkapsulované v gelu (1%)	1,79	92,55	7,70	71,55
Enkapsulované v gelu (2%)	1,66	83,66	6,26	56,48

Výsledky enzymových aktivit, stejně jako u předešlých dvou kmenů, opět korespondovaly se stanovením množství uvolněných bílkovin.

5.4 Aplikace enzymů ve farmacii – enzymy podporující trávení

V rámci této kapitoly byla produkce mikrobiálních enzymů a jejich stabilizace enkapsulací testována k potenciální praktické aplikaci v modelových fyziologických podmínkách. Enzymy, jež jsou známy svým pozitivním až nenahraditelným účinkem v procesu trávení (více v kapitole 2.4.1.2), byly naprodukovány pomocí mikrobů (kapitola 4.2), enkapsulovány (kapitola 4.6.1) a vystaveny působení umělé žaludeční, pankreatické a žlučové šťávy v podmínkách simulujících průběh gastrointestinálního traktu. Následně bylo sledováno uvolňování a zachování aktivit enkapsulovaných enzymů, postupováno bylo dle návodů uvedených v kapitole 4.6.5. Výsledky měření jsou shrnuty níže. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze dvou souběžných inkubačních experimentů.

Tab. 35 Koncentrace uvolněných enzymů a jejich procentuální podíl v rámci GIT.

Žaludeční šťáva	Koncentrace bílkovin	
	($\mu\text{l/ml}$)	(%)
<i>Aspergillus oryzae</i> (1%)	38,38	27,27
<i>Aspergillus oryzae</i> (2%)	44,78	29,11
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (1%)	12,79	11,83
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (2%)	31,98	21,88
<i>Aureobasidium pullulans</i> (1%)	31,98	21,60
<i>Aureobasidium pullulans</i> (2%)	12,79	9,35

Pokračování **Tab. 35.**

Pankreatická šťáva	Koncentrace bílkovin	
	($\mu\text{l/ml}$)	(%)
<i>Aspergillus oryzae</i> (1%)	98,84	70,23
<i>Aspergillus oryzae</i> (2%)	105,55	68,61
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (1%)	90,20	83,43
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (2%)	110,03	75,27
<i>Aureobasidium pullulans</i> (1%)	112,27	75,81
<i>Aureobasidium pullulans</i> (2%)	118,99	86,92
Žlučová šťáva	Koncentrace bílkovin	
	($\mu\text{l/ml}$)	(%)
<i>Aspergillus oryzae</i> (1%)	3,51	2,50
<i>Aspergillus oryzae</i> (2%)	3,51	2,29
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (1%)	5,11	4,73
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (2%)	4,15	2,84
<i>Aureobasidium pullulans</i> (1%)	3,83	2,59
<i>Aureobasidium pullulans</i> (2%)	5,11	3,74

Na základě výsledků bylo zjištěno, že nejvíce enkapsulovaných enzymů se uvolnilo z částic v prostředí pankreatické šťávy (průměrně 76,71 %), méně v prostředí šťávy žaludeční (průměrně 20,17 %), zbytkové množství pak ve šťávě žlučové (průměrně 3,12 %). Alginátové částice tedy prokázaly vyšší stabilitu v kyselém pH žaludeční šťávy než v pH zásaditém, a to jak v případě částic připravených z 1%, tak z 2% alginátu. Druh mikrobiálního producenta v tomto stanovení rovněž nehrál významnou roli.

Vyšší stabilita v kyselém prostředí žaludeční šťávy je výhodou pro cílený transport enkapsulovaných enzymů do tenkého střeva, kde jsou působením pankreatické a žlučové šťávy částice rozloženy a enzymy se mohou uvolnit a být požitý například k enzymové terapii.

Tab. 36 Proteolytická a lipolytická aktivita uvolněných enzymů v rámci GIT a jejich procentuální vyjádření vzhledem k aktivitám původním.

Žaludeční šťáva	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)
<i>Aspergillus oryzae</i> (1%)	6,66	100,00	0,04	23,67
<i>Aspergillus oryzae</i> (2%)	1,66	100,00	0,01	5,09
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (1%)	1,16	100,00	0,01	4,52
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (2%)	3,00	100,00	0,02	3,60
<i>Aureobasidium pullulans</i> (1%)	1,50	100,00	0,04	7,91
<i>Aureobasidium pullulans</i> (2%)	1,16	100,00	0,06	29,66
Pankreatická šťáva	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%)
<i>Aspergillus oryzae</i> (1%)	40,83	100,00	2,10	100,00
<i>Aspergillus oryzae</i> (2%)	47,00	100,00	2,09	100,00
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (1%)	37,16	100,00	2,04	100,00
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (2%)	55,66	100,00	2,09	100,00
<i>Aureobasidium pullulans</i> (1%)	45,16	100,00	2,12	100,00
<i>Aureobasidium pullulans</i> (2%)	51,00	100,00	2,10	100,00

Pokračování **Tab. 36.**

Žlučová šťáva	Proteolytická aktivita		Lipolytická aktivita	
	($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)	($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(%)
<i>Aspergillus oryzae</i> (1%)	6,66	100,00	0,02	100,00
<i>Aspergillus oryzae</i> (2%)	11,33	100,00	0,03	100,00
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (1%)	0,33	100,00	0,01	15,05
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (2%)	4,16	100,00	0,03	33,76
<i>Aureobasidium pullulans</i> (1%)	3,33	100,00	0,02	24,68
<i>Aureobasidium pullulans</i> (2%)	0,50	100,00	0,01	15,26

Výsledky stanovení aktivit uvolněných enzymů v rámci gastrointestinálního traktu ukázaly nejvyšší zachování těchto aktivit v pH pankreatické šťávy, dále při působení šťávy žlučové, k většímu poklesu pak došlo ve šťávě žaludeční. Ke zmíněnému poklesu docházelo však pouze v případě aktivity lipolytické. Proteolytická aktivita zůstala stoprocentně zachována ve všech typech šťáv. Koncentrace použitého alginátu či druh mikrobiálního producenta zde opět nehrály významnou roli.

Dle dosažených výsledků lze tedy testované částice s enkapsulovanými mikrobiálními enzymy označit za vhodné pro farmaceutické aplikace, zvláště pak v podobě přípravků s cíleným transportem enzymů do trávicího traktu a s pozvolným uvolňováním při zachování jejich dostatečné aktivity. Materiál použitý na přípravu částic je stabilní v kyselém pH žaludku, takže enzymy uvnitř částic zůstanou nepoškozené a projdou v enkapsulované podobě do tenkého střeva. Zde se sice částice rozpadnou, ale aktivita uvolněných enzymů je v prostředí střeva vysoká a tak mohou uvolněné enzymy pozitivně ovlivňovat proces střevní digesce.

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na produkci mikrobiálních enzymů a jejich následnou stabilizaci prostřednictvím enkapsulace. Teoretická část byla věnována mikrobiálním enzymům, zejména extracelulárním hydrolázám, jejich producentům a vlastnostem. V rámci teorie byla studována také možnost aplikace enzymů v oblasti farmacie a medicíny. Ve farmacii byla diskutována možnost využití těchto enzymů jakožto látek podporujících léčbu chronických ran, látek podporujících trávení či jako látek onkolytických. V kosmetice pak byly enzymy prezentovány jako složky enzymatických peelingů, přípravků proti celulitidě, přípravků pečujících o hygienu dutiny ústní či jako složky antioxidační a kosmetiky proti stárnutí.

Experimentální část pak byla zaměřena na samotnou produkci mikrobiálních enzymů a jejich stabilizaci. Za účelem volby vhodného producenta mikrobiálních enzymů byla provedena optimalizace metod kultivace mikroorganismů pomocí stanovení enzymových aktivit. Sledovanými producenty byly plísně *Aspergillus oryzae* a *Phanerochaete chrysosporium*, dále pak mikroorganismus *Aureobasidium pullulans*. Kultivace probíhaly na minerálním médiu a na třech typech odpadních substrátů, těmito substráty byly dřevní piliny, pšeničné otruby a řepkové výlisky obsahující 2,55 % lipidů. Sledovanými enzymy byly proteázy a lipázy, přičemž stanovení těchto enzymových aktivit bylo provedeno vždy 3., 6., 10. a 13. den kultivace. Pro další postupy byl pro produkci mikrobiálních enzymů pomocí plísně *Aspergillus oryzae* zvolen kultivační substrát pšeničné otruby s odběrem 3. den kultivace. Pro plíseň *Phanerochaete chrysosporium* a mikroorganismus *Aureobasidium pullulans* byly jako kultivační substráty potom zvoleny řepkové výlisky (2,55 %) s odběrem v 6. den kultivace.

V rámci experimentální části byla dále provedena optimalizace také v oblasti identifikace, izolace a purifikace enzymů. Metoda gelové filtrace v použitém uspořádání se neukázala být vhodnou pro účinnou purifikaci námi získaných enzymů. K identifikaci enzymů dle molekulové hmotnosti byla použita především vertikální PAGE SDS elektroforéza. Pro separaci a purifikaci byla použita též metoda ultrafiltrace. Celkově lze shrnout, že další optimalizací obou použitých metod bude možné dosáhnout účinné purifikace enzymového preparátu odpovídající požadavkům EFSA na bezpečné produkty použitelné do potravin a kosmetiky.

Podstatnou částí experimentu byla stabilizace naprodukovaných mikrobiálních enzymů prostřednictvím enkapsulace. Alginátové částice, a to jak z 1%, tak z 2% alginátu, byly připraveny pomocí enkapsulátoru. Enkapsulační účinnost se pohybovala v rozmezí 55 až 70 %. S nejvyšší účinností se enkapsulovaly enzymy plísně *Aspergillus oryzae*. Následně byla ve dvou prostředích (ve vodě a v gelu) v průběhu šesti týdnů sledována dlouhodobá stabilita enkapsulovaných enzymů a srovnána se stabilitou enzymů volných. Společným trendem v rámci všech enkapsulovaných enzymů při stanovení dlouhodobých stabilit bylo zaznamenání výrazného poklesu aktivity volných enzymů v rozmezí čtvrtého a šestého týdne uchovávání. Ve stejném časovém úseku byl u enkapsulovaných enzymů naopak pozorován znatelný nárůst těchto enzymových aktivit, a to především v případě enkapsulovaných mikrobiálních enzymů naprodukovaných pomocí plísně *Aspergillus oryzae*. Stabilita byla studována rovněž u částic samotných. Sledováno bylo jak množství uvolněných bílkovin, tak zachování jejich aktivit. Průběh uvolňování bílkovin byl u všech studovaných producentů obdobný. Při stanovení stability částic po dvou týdnech došlo k částečnému uvolnění enzymů, přičemž nejmenší množství uvolněných bílkovin bylo zaznamenáno u enkapsulovaných

enzymů plísně *Aspergillus oryzae*, kde se během prvních dvou týdnů uvolnilo pouze 30-45 % bílkovin. Stanovení po čtyřech týdnech neukázalo ve většině případů žádné výraznější změny v uvolněném množství. Opačně tomu bylo však v případě šestitýdenního stanovení, kdy již docházelo k výraznému nárůstu uvolněných bílkovin. Obecně vyšší stabilitu vykazovaly částice uchovávané v prostředí gelu. Z hlediska použité koncentrace alginátu při přípravě částic, zde nebyl pozorován významný rozdíl. V rámci stability částic byly testovány rovněž enzymové aktivity bílkovin uvolněných v průběhu dlouhodobého uchovávání v prostředí vody a gelu. Získané výsledky enzymových aktivit ve většině případů korespondovaly se stanovením množství uvolněných bílkovin. Uvolněné enzymy si tedy zachovaly svoji aktivitu.

Testováno bylo i využití izolovaných enzymů ve farmacii jakožto látek podporujících trávení. Enkapsulované enzymy byly vystaveny působení žaludeční, pankreatické a žlučové šťávy v podmínkách simulujících průběh gastrointestinálního traktu. Následně bylo sledováno uvolňování a zachování aktivit enkapsulovaných enzymů. Na základě výsledků bylo zjištěno, že nejvíce enkapsulovaných enzymů se uvolnilo v prostředí pankreatické šťávy (průměrně 76,71 %), méně v prostředí šťávy žaludeční (průměrně 20,17 %), zbytkové množství pak ve šťávě žlučové (průměrně 3,12 %). Alginátové částice tedy prokázaly vyšší stabilitu v kyselém pH gastrointestinálního traktu než v pH zásaditém. Vyšší stabilita v kyselém prostředí žaludeční šťávy je výhodou pro cílený transport enkapsulovaných enzymů do tenkého střeva, kde jsou působením pankreatické a žlučové šťávy částice rozloženy a enzymy se mohou uvolnit a být požitý například k enzymové terapii. Výsledky stanovení aktivit uvolněných enzymů v rámci gastrointestinálního traktu ukázaly také nejvyšší zachování těchto aktivit při působení šťávy pankreatické.

Materiál použitý na přípravu částic je tedy stabilní v kyselém pH žaludku, takže enzymy uvnitř částic zůstanou nepoškozené a projdou v enkapsulované podobě do tenkého střeva. Zde se sice částice rozpadnou, ale aktivita uvolněných enzymů je v prostředí střeva vysoká, a tak mohou uvolněné enzymy pozitivně ovlivňovat proces střevní digesce. Na základě těchto výsledků lze tedy testované částice s enkapsulovanými mikrobiálními enzymy označit za vhodné pro farmaceutické aplikace, zvláště pak v podobě přípravků s cíleným transportem enzymů do trávicího traktu a pozvolným uvolňováním při zachování jejich dostatečné aktivity.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts. COOPER, Geoffrey M. *The Cell: A Molecular Approach* [online]. 2nd edition. Boston University: Sinauer Associates, 2000 [cit. 2016-04-25]. ISBN ISBN-10: 0-87893-106-6. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9921/>
- [2] Funkce buněk a lidského těla: Multimediální skripta. *Fblt.cz* [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://fblt.cz/skripta/ii-premena-latek-a-energie-v-bunce/6-enzymy/>
- [3] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd., dotisk. Praha: Academia, 2007. ISBN 978-80-200-0600-4.
- [4] VODRÁŽKA, Zdeněk, Jan KÁŠ a Pavel RAUCH. *Enzymologie*. 3. přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 1998. ISBN 80-708-0330-4.
- [5] KASANA, Ramesh Chand, Richa SALWAN a Sudesh Kumar YADAV. Microbial proteases: Detection, production, and genetic improvement. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 2011, **37**(3), 262-276 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.3109/1040841X.2011.577029. ISBN 10.3109/1040841X.2011.577029. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1040841X.2011.577029>
- [6] GLITSOE, V. a K. PONTOPPIDAN. The world of proteases – diversity and function. In: [Http://www.slideshare.net/](http://www.slideshare.net/) [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: http://www.slideshare.net/DSM_Animal_Nutrition/the-world-of-proteases-diversity-and-functionglitsoe-amsterdam2014?qid=9424b30f-9245-430c-9361-4e2260d503ed&v=&b=&from_search=1
- [7] GILHAM, D. a R. LEHNER. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods* [online]. 2005, **36**(2), 139-147 [cit. 2016-04-25]. PMID: 15893936. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15893936>
- [8] HORÁKOVÁ, Dana, Miroslav NĚMEC a Monika SZOSTKOVÁ. *Laboratorní cvičení z fyziologie bakterií* [online]. 1. vyd. Elportál, Brno: Masarykova univerzita, 2007 [cit. 2016-04-25]. ISSN: 1802-128X. Dostupné z: http://is.muni.cz/do/1499/el/estud/prif/ps06/3074288/Labor.cv.z_fyziol.bakterii_uprave_ne.pdf
- [9] ARPIGNY, Jean Louis a Karl-Erich JAEGER. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal* [online]. 1999, **343**(1), 177-183 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.1042/bj3430177. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1220539/pdf/10493927.pdf>
- [10] HASAN, Fariha, Aamer Ali SHAH a Abdul HAMEED. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2006, **39**(2), 235-251 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.016. ISBN 10.1016/j.enzmictec.2005.10.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022905004606>
- [11] HASAN, Fariha, Aamer Ali SHAH, Sundus JAVED a Abdul HAMEED. Enzymes used in detergents: Lipases. *African Journal of Biotechnology* [online]. 2010, **9**(31), 4836-4844 [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: http://www.academicjournals.org/article/article1380713950_Hasan%20et%20al.pdf
- [12] GANDHI, Neena N. Applications of lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 1997, **74**(6), 621-634 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.1007/s11746-997-0194-x. ISBN 10.1007/s11746-997-0194-x. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11746-997-0194-x>

- [13] Fatty Acid Metabolism: Basic Principles, Fat breakdown in digestive system - pancreatic lipases. *Oregonstate.edu* [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://oregonstate.edu/instruct/bb451/451material/lectures/fametabolismoutline.html>
- [14] DE SOUZA, Paula Monteiro a Pérola DE OLIVEIRA MAGALHÃES. Application of microbial α -amylase in industry – A review. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. 2010, **41**(4), 850-861 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.1590/S1517-83822010000400004. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3769773/>
- [15] KUHAD, Ramesh Chander, Rishi GUPTA a Ajay SINGH. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research* [online]. 2011, **2011**(2011) [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/er/2011/280696/>
- [16] A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. CHANDEL, Anuj K. a Silvio Silvério DA SILVA. *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization* [online]. InTech, 2013, s. 251-275 [cit. 2016-04-25]. ISBN 978-953-51-1119-1. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/sustainable-degradation-of-lignocellulosic-biomass-techniques-applications-and-commercialization/a-review-of-xylanase-production-by-the-fermentation-of-xylan-classification-characterization-and-app>
- [17] MACHIDA, Masayuki, Osamu YAMADA a Katsuya GOMI. Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from the History of Koji Mold and Exploration of Its Future. *Oxford Journals* [online]. 2008, **15**(4), 173-183 [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://dnaresearch.oxfordjournals.org/content/15/4/173.full>
- [18] TSCA Biotechnology Regulatory and Policy-Related Resources: Final risk assessment of *Aspergillus oryzae*. *Www3.epa.gov* [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/fra007.pdf>
- [19] CHUTMANOP, Jarun, Sinsupha CHUICHULCHERM, Yusuf CHISTI a Penjit SRINOPHAKUN. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* [online]. 2008, **83**(7), 1012-1018 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.1002/jctb. Dostupné z: <http://www.massey.ac.nz/~ychisti/Penjit.pdf>
- [20] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [21] Fylogeneze a morfologie bezcévných rostlin: 6. Praktické cvičení. *Botany.natur.cuni.cz* [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <https://botany.natur.cuni.cz/prasil/ucitelska-cv/06.pdf>
- [22] PRAŽÁKOVÁ, Kateřina. *Termorezistentní plísň v prostředí*. Brno, 2008. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta. Vedoucí práce doc. MUDr. Jan Šimůnek, Csc.
- [23] *Phanerochaete chrysosporium* RP-78 v 2.2. *Genome.jgi.doe.gov* [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://genome.jgi.doe.gov/Phchr2/Phchr2.home.html>
- [24] KAY-SHOEMAKE, J. L. a M. E. WATWOOD. Limitations of the lignin peroxidase system of the white-rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 1996, **46**(4), 438-442 [cit. 2016-04-25]. ISSN 1432-0614. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00166242#page-1>
- [25] Tom Volk's Fungus of the Month for May 1997: This month's fungus is *Phanerochaete chrysosporium*, a crust fungus important in

- biotechnology. *Botit.botany.wisc.edu* [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/may97.html
- [26] AUREOBASIDIUM PULULANS Viala et Boyer. *MINIATLAS MIKROORGANISMŮ* [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/aureob.htm>
- [27] Disseminated Nosocomial Fungal Infection by *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum*: a Case Report. *Jcm.asm.org* [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/41/9/4483/F2.expansion.html>
- [28] ZALAR, P., C. GOSTINČAR, G. S. DE HOOG, V. URŠIČ, M. SUDHADHAM a N. GUNDE-CIMERMAN. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology* [online]. 2008, **61**, 21-38 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.3114/sim.2008.61.02. ISBN 10.3114/sim.2008.61.02. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166061614601925>
- [29] SINGH, Ranjan, Rajeeva GAUR, Shikha BANSAL, Pritha BISWAS, Prabhash K. PANDEY, Farrukh JAMAL, Soni TIWARI a Manogya K. GAUR. *Aureobasidium pullulans* - An Industrially Important Pullulan Producing Black Yeast. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* [online]. 2015, **4**(10), 605-622 [cit. 2016-04-25]. ISSN 2319-7706. Dostupné z: <http://www.ijcmas.com/vol-4-10/Ranjan%20Singh,%20et%20al.pdf>
- [30] VELLARD, Michel. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2003, **14**, 444-450 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.1016/S0958-1669(03)00092-2. ISBN 10.1016/S0958-1669(03)00092-2. Dostupné z: http://www.biology.uoc.gr/courses/BIO113_Enzimiki_biotexnologia/images/documents/4.pdf
- [31] KARLOVÁ, Jarmila a Bronislava ČÍŽKOVÁ. Moderní hojení ran v 21. století. In: *Zdravi.euro.cz* [online]. 2010 [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/moderni-hojeni-ran-v-21-stoleti-455170>
- [32] Rozhodnutí_SUKLS182551_2010_kolagenáza_D03BA52.rtf. *Www.sukl.cz* [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: [file:///C:/Users/Eva/Downloads/NPM_SUKLS_182551_2010%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Eva/Downloads/NPM_SUKLS_182551_2010%20(1).pdf)
- [33] Digestive Enzymes. *Products.mercola.com* [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://products.mercola.com/digestive-enzymes/>
- [34] HOW DO ENZYMES AID IN DIGESTION? *Nationalenzyme.com* [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://nationalenzyme.com/education/enzyme-aids/>
- [35] KAUR, Ramandeep a Bhupinder Singh SEKHON. Enzymes as drugs: an overview. *Journal of Pharmaceutical Education and Research* [online]. 2012, **3**(2), 29-41 [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://search.proquest.com/openview/3ded00e0bb56a12c6eff9adbf2835efe/1?pq-origsite=gscholar>
- [36] Důležitá protinádorová léčiva. *Is.muni.cz* [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1431/jaro2008/C8790/Farm09.pdf>
- [37] Designed enzymes for the treatment of cancer. *Http://web.sci.ccny.cuny.edu/* [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://web.sci.ccny.cuny.edu/~koder/cancer.html>

- [38] SINGH, Vinay Kumar. Enzyme in Cosmetics. In: *Www.pharmatutor.org* [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://www.pharmatutor.org/articles/enzyme-in-cosmetics>
- [39] VINARDELL, María Pilar a Montserrat MITJANS. Nanocarriers for Delivery of Antioxidants on the Skin. *Cosmetics* [online]. 2015, 2(4), 342-354 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.3390/cosmetics2040342. ISBN 10.3390/cosmetics2040342. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2079-9284/2/4/342/htm>
- [40] LODS, DRES, JOHNSON, SCHOLZ a BROOKS. The future of enzymes in cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2000, 22(2), 85-94 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.1046/j.1467-2494.2000.00012.x. ISBN 10.1046/j.1467-2494.2000.00012.x. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1467-2494.2000.00012.x/full>
- [41] LUEDER, Maria, Jacques MOREL, Jane TIEDTKE a Olaf MARKS. Anti-Cellulite actives, dream or reality? In: *Www.lipoid-kosmetik.com* [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: http://www.lipoid-kosmetik.com/sites/default/files/files/PDF/en/Technical_Papers_Publikationen/13c_Anti_Cellulite_Slimming.pdf
- [42] BARCLAY, Laurie. A Scientific Solution to Unsightly Cellulite. In: *Www.lifeextension.com* [online]. 2008 [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://www.lifeextension.com/magazine/2008/8/a-scientific-solution-to-unsightly-cellulite/page-01>
- [43] Skeyndor Sada pro formování těla M. *Www.lekarna.cz* [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://www.lekarna.cz/skeyndor-sada-pro-formovani-tela-m/>
- [44] GANCEVICIENE, Ruta, Aikaterini I. LIAKOU, Athanasios THEODORIDIS, Evgenia MAKRANTONAKI a Christos C. ZOUBOULIS. Skin anti-aging strategies. *Dermatoendocrinol* [online]. 2012, 4(3), 308-319 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.4161/derm.22804. ISBN 10.4161/derm.22804. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3583892/>
- [45] Skin Health. *Nippicollagen.com* [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://nippicollagen.com/skin-health/>
- [46] BOKROVÁ, J. Příprava enkapsulovaných enzymů pro využití v kosmetice. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 85 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [47] Enzyme Peel. *Cosmetology-info.com* [online]. 2014 [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://cosmetology-info.com/21/Enzyme-Peel/>
- [48] AEHLE, Wolfgang. *Enzymes in Industry: Production and Applications* [online]. 3rd edition. Weinheim: Wiley-VCH, 2007 [cit. 2016-04-25]. ISBN 978-3-527-31689-2. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=VMfYJ-Dep-UC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>
- [49] Enzymes at work. *Novozymes.com* [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: http://novozymes.com/en/about-us/brochures/Documents/Enzymes_at_work.pdf
- [50] Význam proteolytických enzymů v péči o dutinu ústní. *Enzymel.cz* [online]. [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://enzymel.cz/#aktivni-enzymy>
- [51] MATOUŠKOVÁ, P. Produkce a charakterizace extracelulárních hydroláz z vybraných druhů plísní. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 100 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [52] *Československý lékopis*. Praha: Avicenum – Zdravotnické nakladatelství, 1987.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ADEPT	protilátkou řízená enzymatická terapie proléčivem
APS	persíran amonný
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E_A	aktivační energie
EC	Enzyme Comission
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
ES	komplex enzym-substrát
GIT	gastrointestinální trakt
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
ROS	reaktivní forma kyslíku
SDS	dodecylsíran sodný
SOD	superoxiddismutáza
SW	software
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	záření v ultrafialové oblasti spektra
YPD	Yeast Peptone Dextrose