

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Karel Musil

**Studium biologicky aktivních sekundárních metabolitů
produkovaných vybraným kmenem hub rodu *Geosmithia*
metodou UPLC-DAD-TOF-MS**

**Study of bioactive secondary metabolites produced by fungi of
genus *Geosmythia* using UPLC-DAD-TOF-MS**

Bakalářská práce

Praha 2013

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru GAČR
P506/11/2302.

Prohlášení

Tato práce byla vypracována na Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i. pod vedením školitele RNDr. Terezy Tylové, Ph.D. a školitele-garanta Doc. RNDr. Zuzany Bosákové, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 14.8.2013

.....

Abstrakt (CZ)

Tato práce se zabývá studiem kmenu hub RJ0258 (*Geosmithia* sp.9), u kterého byla dříve zjištěna produkce sekundárních metabolitů s antimikrobiální aktivitou. Produkce sekundárních metabolitů je značně závislá na kultivačních podmínkách a následné získávání těchto metabolitů na typu použité extrakční metody. Práce zahrnuje optimalizaci kultivačních podmínek houbové kultury pro zajištění maximální produkce látek s antimikrobiální aktivitou, následné zpracování fermentačního média, metodiku extrakce těchto biologicky aktivních látek a jejich separaci kapalinovou chromatografií.

Při provedených testech bylo zjištěno optimální složení kultivačního média – agar s maltózovým extraktem (MEA – 100 ml, maltózový extrakt – 2 g, glukosa – 2 g, pepton 0,1 g, úprava pH na 5-6). Dále bylo zjištěno, že nejvhodnější doba kultivace je 11 dní od počátku kultivace, kdy dochází na základě testů biologické aktivity k největší produkci sekundárních metabolitů s antimikrobiální aktivitou. Po kultivaci bylo fermentační médium extrahováno metodou kapalina-kapalina roztokem 5% kyseliny octové v ethylacetátu. Po odpaření a rozpuštění získaného extraktu byl extrakt analyzován metodou UPLC-DAD-TOF-MS. Analýzy probíhaly na koloně Acquity UPLC BEH C18 a extrakt byl separován za použití lineární gradientové eluce s mobilními fázemi (A) 0,1% vodného roztoku kyseliny mravenčí a (B) acetonitrilu. UPLC umožňuje díky své vysoké účinnosti separovat mnoho sekundárních metabolitů ve složité matrici, použití DAD detekce spolu s hmotnostní detekcí nám potom poskytuje mnoho důležitých informací o jednotlivých látkách. Antimikrobiální aktivita extraktů byla testována Kirby-Bauerovým diskovým difúzním testem pomocí indikačního organismu *Kocuria rhizophila*.

Klíčová slova: houby rodu *Geosmithia*, SPE, LLE, UPLC-DAD-TOF-MS

Předmětová hesla: studium biologicky aktivních mikrobiálních sekundárních metabolitů hub, hledání nových antibiotik, nová antibiotika z přírodních zdrojů, test biologické aktivity

Abstract (EN)

This work is dealing with study of fungal strain RJ0258 (*Geosmithia* sp.9) which was previously found to be the producer of secondary metabolites with antimicrobial activity. Production of secondary metabolites is significantly dependent on the conditions of cultivation and the subsequent gaining of these metabolites depends on the extraction method as well. This thesis involves the optimization of the cultivation conditions for fungal culture to ensure maximum production of substances with antimicrobial activity, the subsequent treatment of the fermentation medium, the extraction procedure focused on biologically active substances and finally the chromatographic separation.

The most suitable design of the fermentation broth was chosen based on the tests - Malt extract agar medium (MEA – 100 ml, malt extract – 2 g, glucose – 2 g, pepton 0,1 g, pH adjusted to 5-6). Moreover, it was found out, that the optimal time of cultivation is 11 days, because, according to the test of biological activity, there is the highest production of secondary metabolites with antimicrobial activity. Following cultivation, the fermentation medium was extracted liquid-liquid extraction employing solution of 5% acetic acid in ethyl acetate. After evaporation and dissolution of the extract the obtained extract was analyzed by UPLC-DAD-TOF-MS. Separation was carried out on Acquity UPLC BEH C18 column under linear gradient elution program with mobile phase (A) 0.1 % aqueous formic acid and (B) acetonitrile. UPLC enables due to its high efficiency the separation of high amount of secondary metabolites in difficult matrix, the employment of both DAD and mass spectrometric detection provide, moreover, a lot of important spectral characteristic of the present substances. The antimicrobial activity of the extracts was tested using Kirby-Bauer disc diffusion test with *Kocuria rhizophila* as indicating organism.

Key words: fungi of the genus *Geosmithia*, SPE, LLE, UPLC-DAD-TOF-MS

Subject heading: study of bioactive secondary metabolites produced by fungi, searching for new antibiotics, new antibiotics from natural resources, bioassay tests

Poděkování

Zde bych rád poděkoval mé školitelce RNDr. Tereze Tylové, Ph.D. za profesionální přístup, přátelskou atmosféru, příjemné pracovní prostředí, ochotu kdykoli pomoci a poskytnout užitečnou radu po celou dobu zpracování této bakalářské práce. Mé velké díky patří také Mgr. Miroslavu Kolaříkovi, Ph.D., bez něhož by tato práce vůbec nebyla možná, za ochotu pomoci a za udělení potřebných informací ohledně řešené problematiky. Dále bych rád poděkoval školitelce-garantce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, Csc. za vstřícné jednání, poskytování cenných informací a rad. Poděkování patří také RNDr. Miladě Chudíčkové za příjemnou spolupráci a poskytování informací.

V poslední řadě bych chtěl poděkovat rodičům a mým nejbližším za podporu během celého studia.

Obsah

1 Úvod	9
1.1 Mikrobiální metabolity a jejich využití	9
1.2 Cíle práce	9
2 Teoretická část	11
2.1 Přírodní látky	11
2.2 Metabolismus	11
2.2.1 Primární metabolismus	12
2.2.2 Sekundární metabolismus	12
2.3 Biologická aktivita	13
2.3.1 Testování biologické aktivity	13
2.4 Antibiotika	13
2.4.1 Problematika antibiotické rezistence	13
2.5 Houby jako producenti sekundárních metabolitů	14
2.5.1 Houby rodu Geosmithia	14
2.5.2 Kultivace mikroorganismů v laboratorních podmínkách	15
2.6 Extrakce sekundárních metabolitů z kultivačního média	15
2.6.1 Extrakce kapalina-kapalina	16
2.6.2 Extrakce na pevné fázi	16
2.7 Chromatografie	17
2.7.1 Kapalinová chromatografie	17
2.7.2 Účinnost separace v chromatografii	17
2.8 Vysokoučinná kapalinová chromatografie	19
2.8.1 Chromatografie s normální fází	20
2.8.2 Chromatografie s obrácenou fází	20
2.8.3 Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie	20
2.9 Detekce v kapalinové chromatografii	21
2.9.1 Detektor diodového pole	21
2.9.2 Detekce hmotnostní spektrometrií	21
2.9.2.1 Ionizace elektrosprejem	22
2.9.2.2 Průletový analyzátor	22

3 Experimentální část	24
3.1 Chemikálie.....	24
3.2 Instrumentace	24
3.3 Kultivační podmínky pro kmen RJ0258 (<i>Geosmithia</i> sp.9).....	25
3.4 LLE	25
3.5 SPE.....	25
3.6 UPLC-DAD-TOF-MS	26
3.7 Stanovení biologické aktivity sekundárních metabolitů v extraktu	26
4 Výsledky a diskuze	28
4.1 Optimalizace kultivačních podmínek	28
4.2 Optimalizace extrakčních metody.....	31
4.2.1 Srovnání metod LLE a SPE.....	34
4.3 Optimalizace UPLC-DAD-TOF-MS.....	34
5 Závěr	36
6 Přílohy	37
7 Literatura	38

Seznam zkratek a použitých symbolů

CI	chemická ionizace
C4	butyl
C18	oktadecyl
DAD	detektor diodového pole (z angl. „Diode array detector“)
EI	ionizace elektronovým paprskem
ESI	ionizace elektrosprejem
GC	plynová chromatografie (z angl. „Gas chromatography“)
<i>H</i>	výškový ekvivalent teoretického patra kolony
HPLC	vysokoučinná kapalná chromatografie (z angl. „High-performance liquid chromatography“)
<i>l</i>	délka kolony
LC	kapalinová chromatografie (z angl. „Liquid chromatography“)
LC- TOF-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s průletovým analyzátozem
LLE	extrakce kapalina-kapalina (z angl. „Liquid-liquid extraction“)
M	molekulová hmotnost
<i>m/z</i>	poměr hmotnost/náboj iontu
MALDI	ionizace laserem za spoluúčasti matrice
ME	maltózový extrakt (z angl. „Malt Extract“)
MEA	agar s maltózovým extraktem (z angl. „Malt Extract Agar“)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. „Mass spectrometry“)
<i>n</i>	počet teoretických pater kolony
NP-HPLC	chromatografie s normální fází (z angl. „Normal-phase HPLC“)
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
RK	živné médium s označením RK
RP-HPLC	chromatografie na reverzní fází (z angl. „Reverse-phase HPLC“)
RT	laboratorní teplota (z angl. „Room temperature“)
RVO	rotační vakuová odparka
SOB	superoptimální médium (z angl. „Super Optimal Broth“)
SPE	extrakce na pevné fází (z angl. „Solid-phase extraction“)

TLC	tenkovrstvá chromatografie (z angl. „Thin-layer chromatography“)
TOF	průletový analyzátor (z angl. „Time-of-flight“)
TOF-MS	hmotnostní spektrometrie s průletovým analyzátozem
t_R	retenční čas
TSB	tryptonové sojové médium (z angl. „Tryptone soya broth“)
u	lineární rychlost mobilní fáze
UPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. „Ultra-performance liquid chromatography“)
UPLC-DAD-TOF-MS	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole a tandemově zapojeným hmotnostním detektorem s průletovým analyzátozem
UV/VIS	ultrafialové/viditelné záření (z angl. „Ultraviolet/Visible“)
YEAST	kvasniční extrakt
z	náboj iontu

1 Úvod

1.1 Mikrobiální metabolity a jejich využití

Člověk stále objevuje a vyrábí nové látky. Většinou jsou to sloučeniny člověku prospěšné, může se však jednat i o látky škodlivé pro lidské zdraví i životní prostředí. Tento fakt je spojen také s výskytem nových onemocnění či rozšířením rizika vzniku infekcí a rakoviny [1, 2]. Souvisejícím celosvětovým problémem je stále stoupající rezistence patogenních činitelů na používaná farmaka. To vede ke zvyšující se potřebě po náhradě antibiotik, na které si některé mikroorganismy v průběhu své evoluce vytvořili resistenci. Od objevu prvních antibiotik až dodnes jsou nejpoužívanějším druhem antibiotik látky získané z mikrobiálních kultur, jejich semisyntetické a syntetické deriváty či analogy. Mikroorganismy jsou nejstarší formou života na zemi, dokázali se přizpůsobovat svému okolí a činí tak i dnes [1].

Z tohoto faktu vyplývá, že studium mikrobiálních sekundárních metabolitů mělo a stále může mít velký přínos pro lidské zdraví, neboť tyto organismy jsou schopné produkovat velké množství dosud neznámých metabolitů vykazujících biologickou aktivitu. Samotná produkce metabolitů je však značně ovlivněna vnějšími podmínkami. Rozhodujícím faktorem je především složení a množství živin, které má mikroorganismus k dispozici. Neméně důležitá je i doba, po kterou organismus žije na daném místě a při daných podmínkách. Po delší době může docházet k vyčerpání živin, což může mít za příčinu úmrtí mikroorganismu nebo úpravu metabolických drah s ohledem na dostupné látky. Samotná izolace metabolitů pak závisí na charakteru látek a tím i na druhu použité extrakční metody. V každém ohledu mohou mikrobiální sekundární metabolity poskytnout řešení v problematice bakteriální rezistence na známá léčiva a mohou vést k objevení léčiv na doposud nevléčitelné nemoci či poskytnout látky vhodné pro šetrnější způsoby léčby přijatelnější pro pacienty [1].

1.2 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo studium vybraného kmene hub RJ0258 (*Geosmithia* sp.9) z rodu *Geosmithia*. Prvním krokem byl vývoj extrakční metody vhodné pro extrakci sekundárních metabolitů s antimikrobiální aktivitou, která je využitelná pro extrakci těchto látek ve velkém množství z důvodu jejich následné izolace. Dále pak byly optimalizovány podmínky kultivace tohoto kmene s cílem zajištění takových podmínek, které vedou

k maximální produkci biologicky aktivních sekundárních metabolitů. Analýzy byly provedeny metodou UPLC-DAD-TOF-MS a pro samotné testování antimikrobiální aktivity byl využit Kirby-Bauerův diskový difúzní test na indikačním organismu *Kocuria rhizophila*.

2. Teoretická část

2.1 Přírodní látky

Termínem přírodní látky (přírodní produkty) jsou míněny látky získané z přírodních zdrojů. Mezi takovéto přírodní zdroje můžeme zahrnout prakticky všechny živé organismy, které látky produkují nebo tyto látky přímo obsahují [3]. Jsou produkovány hlavně mikroorganismy (bakterie, houby aj.), řasami, rostlinami či hmyzem. Tyto organismy jsou součástí ekosystémů, v nichž jsou mezi sebou vzájemně propojeny a v nichž spolu v mnoha směrech interagují [1]. Představují tak potenciální nekonečný zásobník známých a možná i dosud neznámých látek, které mají či mohou mít svůj užitek ve společnosti. Přírodní látky jsou v zájmu zkoumání široké vědecké společnosti a dá se předpokládat, že stále existují organismy člověkem nepopsané, které mohou být zdrojem velmi užitečných doposud neznámých látek. Tento předpoklad platí hlavně pro mikrobiální producenty, kterých je obrovské množství a jsou nejméně probádány [1, 3].

Tabulka 1. Počet známých a možných druhů mikroorganismů [3].

skupina	popsané	předpokládané
Bakterie	≈ 6000	1 500 000
Aktinomyceta	≈ 4000	50000-80000
Houby	≈ 8000	několik milionů
Viry	≈ 5000	≈ 50000
Řasy	≈ 2500	≈ 400000
Vyšší rostliny	≈ 35000	1 500 000
Hmyz	více než milion	8-10 milionů
Mořští bezobratlí	20000-25000	několik milionů
Obratlovci	≈50000	50000-55000

2.2 Metabolismus

Metabolismus definujeme jako souhrn biochemických reakcí zprostředkovaných organismem. Takovéto reakce můžeme také označit jako metabolické dráhy, které dělíme na primární a sekundární. Produkty těchto metabolických drah pak označujeme jako primární a sekundární metabolity [3, 4].

2.2.1 Primární metabolismus

Primární metabolismus můžeme definovat jako souhrn majoritních biochemických reakcí potřebných k životu a samotné funkci organismu. Zároveň tyto reakce poskytují jen několik konečných produktů [4].

2.2.2 Sekundární metabolismus

Jako sekundární metabolismus můžeme označit biochemické reakce probíhající v organismu za účelem syntézy funkčně profitující pro daný organismus. Produkty těchto reakcí jsou sekundární metabolity [3]. Samotný proces sekundárního metabolismu je často spojený se specifickou částí životního cyklu organismu, neboť organismus samotné sekundární metabolity nepotřebuje pro svůj růst a vývoj. Ve srovnání s primárními metabolity zde nalezneme několik podstatných rozdílů od struktury až po vlastnosti. Pokud se podíváme na vlastnosti sekundárních metabolitů, zjistíme, že jsou často specifické svým účinkem na své okolí. Zároveň druh a charakter sekundárních metabolitů se liší mezi jednotlivými producenty. Stejně či podobné metabolity jsou tudíž schopny syntetizovat jen malé skupiny organismů či pouze daný druh organismu [3]. Velmi významnou vlastností sekundárních metabolitů je jejich častá biologická aktivita. Díky této vlastnosti si řada sekundárních metabolitů našla své uplatnění, a to především ve farmacii v podobě antibiotik [3]. Účinky sekundárních metabolitů, hlavně rostlinného původu, byly známy již ve starověku, nicméně nejznámějším příkladem významnosti sekundárních metabolitů je objev penicilinu Alexandrem Flemingem (1929) [1, 3].

V současné době je věnována největší pozornost hlavně sekundárním metabolitům produkovaných mikroorganismy, a to hned z několika důvodů. Svět mikroorganismů není zdaleka zcela prostudován a stále jsou objevovány organismy dosud nepopsané.

Jako další důvod můžeme uvést stále se zvětšující problém resistance mikroorganismů na některé formy léčiv (především na antibiotika), vznik nových patogenních látek a pochopitelně i nemocí, na které člověk dosud nenašel lék. S těmito problémy je úzce svázána snaha lidí nahradit dosavadní farmaceutické preparáty či najít zcela nové. A jsou to právě mikrobiální sekundární metabolity, jak bylo uvedeno výše, které našly v mnoha případech uplatnění jako léky ve farmacii [2-5].

2.3 Biologická aktivita

Tento termín označuje obecně všechny typy interakcí mezi chemickou látkou a libovolným molekulárním subjektem nebo živým organismem. Tato aktivita se může projevit „*in vitro*“ na molekulární úrovni, nebo může být pozorována „*in vivo*“ na činnosti celého organismu [3].

2.3.1 Testování biologické aktivity

Kirby-Bauerův diskový difúzní test patří k velmi často využívaným testům ke zjištění biologické aktivity studovaných látek. Provádí se za účelem stanovení citlivosti nebo rezistence patogenních aerobních a fakultativně anaerobních bakterií vůči různým antimikrobiálním látkám. Patogenní bakterie je nanášena na agarovou půdu, na jejíž povrch se následně umístí disky z filtračního papíru impregnovaného antimikrobiální látkou. Následná přítomnost nebo absence růstu okolo disků je nepřímým měřítkem schopnosti této sloučeniny inhibovat organismus při kultivaci. V případě, že není kmen rezistentní, se v závislosti na citlivosti bakterie a koncentraci antibiotika vytvoří okolo disků inhibiční zóny [6, 7].

2.4 Antibiotika

Sekundární metabolity izolované z mikroorganismů vykazující antimikrobiální, protinádorové a antivirové účinky jsou označovány jako antibiotika. Antibiotikum je obecně látka (sekundární metabolit) regulující růstové procesy, replikaci nebo působící danou reakcí (regulačně, inhibičně, stimulačně) na život prokaryotických nebo eukaryotických buněk na biochemické úrovni při své minimální koncentraci [3].

2.4.1 Problematika antibiotické rezistence

Termínem rezistence označujeme necitlivost patogenního mikroorganismu na léčivo. Rozlišujeme přirozenou rezistenci (vyplývá z podstaty organismu) a získanou rezistenci (nadměrné užívání antibiotik či stálý styk bakterií s antibiotiky vylučovanými do životního prostředí vedoucí ke vzniku rezistence). Získaná mikrobiální rezistence představuje celosvětový problém a vede k nutnosti hledat nová antibiotika [2].

2.5 Houby jako producenti sekundárních metabolitů

Houby jsou druhou nejrozšířenější skupinou eukaryot a zahrnují mnoho kmenů s unikátními a neobvyklými biochemickými vlastnostmi. Touto vlastností je hlavně schopnost metabolicky syntetizovat široké spektrum látek, které pak mohou být potencionálními toxiny, léky, a nebo dokonce obojím. Ve srovnání s počty známých, neprobádaných a očekávaných možných druhů organismů v přírodě (**Tabulka 1**) se jeví houby jako největší možný zdroj látek s následným možným využitím [3]. Potenciál využití hub stoupá s přihlédnutím k faktu, že stále dochází k objevování nových nepopsaných kmenů, přičemž každý takový kmen bývá specifický schopností syntetizovat určitou skupinu látek. Dalším faktem je spjatost života hub s různými a někdy i unikátními styly ekosystému (extrémní podmínky, moře, půda atd.). Poznáváním nových druhů hub ještě vzroste tato chemická diverzifikace produkovaných látek a s tím i možnost jejich využití pro člověka. Vezmeme-li v úvahu všechny tyto poznatky, dává objevování a studium hub (jejich metabolismu a produkovaných látek) velký potenciál pro budoucnost [3, 4].

2.5.1 Houby rodu *Geosmithia*

Filamentární houby rodu *Geosmithia* (Ascomycota: Hypocreales) jsou málo známé, ačkoli jsou celosvětově rozšířeným symbiontem kůrovců (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). Jakožto symbiont interaguje houba s hostitelskou rostlinou mnoha směry, nicméně povaha těchto interakcí je v případě hub *Geosmithia* stále neznámá. Studium a identifikace produkovaných látek nám pak poskytují náhled na ekologii rodu těchto hub. Sekundární metabolity symbiotických hub vykazují četnou biologickou aktivitu, která z nich dělá možné kandidáty na případná nová farmaka a pro jiné další aplikace. Jedním z hlavních důvodů ke zkoumání toho rodu hub je fakt, že fenotyp rodu *Geosmithia* se velmi podobá rodu *Penicillium*, jenž je producentem známého penicilinu. Tato skutečnost tedy vkládá do rodu *Geosmithia* velké naděje pro jejich možné využití [8-10]. Pro studium biologicky aktivních sekundárních metabolitů byl vybrán kmen RJ0258 (*Geosmithia* sp.9), který se podle dřívějších studií vyznačoval zajímavou antimikrobiální aktivitou [9, 11].

2.5.2 Kultivace mikroorganismů v laboratorních podmínkách

Jak již bylo zmíněno, růst organismu a případná produkce sekundárních metabolitů organismem je závislá na podmínkách kultivace a přísunu živin potřebných pro život mikroorganismu (houby). Je tedy nutné najít vhodné kultivační podmínky, které by nahradily přirozené prostředí mikroorganismu. V souladu s tím je také nutné zajistit podmínky, při kterých houba produkuje sekundární metabolity, a to především ty, které se vyznačují mikrobiální aktivitou. Produkce sekundárních metabolitů je především ovlivněna složením kultivačního média [12]. Pro správnou kultivaci hub je nutné zajistit organismu dostatečný zdroj uhlíku nejčastěji v podobě různých organických látek, které mohou houby metabolizovat. Většina hub je schopna využít jako zdroj uhlíku sacharidy (sacharóza, glukóza, maltóza), ale i jiné látky na bázi uhlovodíků. Houby však na rozdíl od některých organismů často potřebují i zdroj dusíku (např. asparagin). Pro správnou kultivaci hub jsou často vyžadovány i přísady různých minerálních látek nebo vitaminů. Většinu těchto potřeb dnes splňují komerčně vyráběná živná média jako agar s maltózovým extraktem (MEA), maltózový extrakt (ME), superoptimální extrakt (SOB), kvasniční extrakt (YEAST) aj., které se případně doplní zdrojem uhlíku a dusíku dle potřeby. Kromě vlivu živin je dále kultivace závislá také na teplotě, hodnotě pH a době, po kterou kultivace probíhá [13, 14].

Pro maximální produkci biologicky aktivních látek je proto nutné tyto podmínky otestovat a najít ty nejvhodnější.

2.6 Extrakce sekundárních metabolitů z kultivačního média

Nutným krokem předcházejícím chromatografické analýze sekundárních metabolitů je jejich extrakce z kultivačního média. Samotné kultivační médium je velmi složitá matrice obsahující mnoho látek, a proto je třeba před samotnou analýzou vzorek přečistit a v mnoha případech i zakoncentrovat. V tomto kroku jsou analyty (sekundární metabolity) zbaveny látek, které by s nimi mohly interferovat a ovlivnit tak jejich stanovení. Provedením purifikace a prekoncentrace vzorku pak docílíme zvýšení citlivosti a spolehlivosti stanovení. Pro takovéto úpravy vzorků jsou v závislosti na matici nejčastěji používané extrakce kapalina-kapalina (LLE, z angl. „Liquid-liquid extraction“) nebo extrakce na pevné fázi (SPE, z angl. „Solid-phase extraction“) [15, 16].

2.6.1 Extrakce kapalina-kapalina

Metoda LLE využívá různých rozpustností látek ve dvou nemísitelných fázích - vodné a organické fázi. Extrahovaná látka přechází do rozpouštědla (fáze), ve kterém je více rozpustná, a zbytek matrice zůstává ve fázi druhé. K odstranění nepolárních nečistot, např. lipidů a cholesterolu, se používají rozpouštědla jako je hexan a cyklohexan. Metoda je vhodná pro práci s většími objemy. Je však časově náročná, a je závislá na složení matrice a látkách, které chceme stanovit. Nevýhody mohou spočívat například v možnosti ztráty vzorku adsorpcí na sklo [15, 16].

2.6.2 Extrakce na pevné fázi

Principem SPE je zachytávání analytu nanášeném v kapalné fázi na fázi stacionární na základě různorodých interakcí analytu a stacionární fáze. Selektivita extrakce je dosažena chemickou povahou použitého sorbentu, volbou kapalné fáze či úpravou vzorku na požadovanou hodnotu pH. Vzorek je, nejčastěji za sníženého tlaku, nanesen v jednom rozpouštědle a filtruje se přes patronu SPE. Následuje promytí, při kterém se odstraní většina znečišťujících a interferujících látek. Poslední fází je eluce rozpouštědlem, ve kterém je analyt rozpustný [15]. Patrony se vyrábí v podobě malých jednorázových kazet (kolonek) naplněných sorbentem. Jako sorbent (stacionární fáze) se nejčastěji používá silikagel či polymerní sorbent, často s chemicky vázanými skupinami jako octadecyl (C18), fenyl, aminopropyl, iontoměniče (katexy i anexy) a v neposlední řadě i afinitní materiály pro imunoadsorpci. S přidáním dalších funkčních skupin je dále možné rozšířit použití a selektivitu SPE [15].

Extrakce pomocí SPE ve srovnání s LLE má mnoho výhod, jako např. významně nižší spotřebu rozpouštědel, jednoduchost nebo vyšší reprodukovatelnost. Další velkou výhodou je fakt, že během extrakce dochází k čištění vzorku a zároveň k jeho zakoncentrování, což vede ke zvýšení citlivosti metody [15, 16].

Velmi dobré výsledky bývají dosaženy kombinací SPE extrakce s chromatografickými metodami.

2.7 Chromatografie

Chromatografie je separační metoda, při které dochází k rozdělování (separování) látek obsažených ve vzorku. Vzorek se vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, které označujeme jako fázi stacionární a mobilní. Metoda je dnes široce využívána ke kvalitativní i kvantitativní analýze vzorku [17]. Jak plyne z názvu, stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je naopak pohyblivá. Vzorek se nanese na začátek stacionární fáze a pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek unášen chromatografickou soustavou. Látky obsažené ve vzorku mohou se stacionární fází interagovat, zachycují se na stacionární fázi a tím se při pohybu zdržují. Síla interakce různých látek se stacionární fází se liší. Tím dochází k rozdílnému zadržování látek stacionární fází a separaci složek ve vzorku. Stacionární fází nejdříve prochází látky které jsou nejméně zadržované, a nebo nejsou zadržovány vůbec [17, 18].

Z chromatografických technik se pro separaci mikrobiálních sekundárních metabolitů v získaných extraktech využívá vysokoúčinná kapalná chromatografie (HPLC, z angl. „High-performance liquid chromatography“) [15, 19, 20], ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UPLC, z angl. „Ultra-performance liquid chromatography“) [21] a plynová chromatografie (GC, z angl. „Gas chromatography“) [22, 23]. Mimo instrumentálních metod je možné využít i tenkovrstvé chromatografie (TLC, z angl. „Thin-layer chromatography“) [23, 24].

2.7.1 Kapalinová chromatografie

U kapalinové chromatografie (LC, z angl. „Liquid chromatography“) slouží jako mobilní fáze kapalina. Rozhodujícím faktorem pro separaci látek jsou nejen jejich interakce se stacionární fází, ale i volba použité mobilní fáze výrazně ovlivní výslednou separaci složek ve vzorku. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fázi a doba, kterou stráví v jedné nebo druhé fázi, je dána afinitou analytu k jednotlivé fázi [17]. Podle uspořádání pak můžeme rozdělit kapalinovou chromatografii na kolonovou, tenkovrstvou a papírovou.

2.7.2 Účinnost separace v chromatografii

Účinnost kolony definujeme jako její schopnost separovat složky, které jsou obsaženy ve vzorku. Účinnost kolony roste s její schopností od sebe oddělovat složky ve směsi.

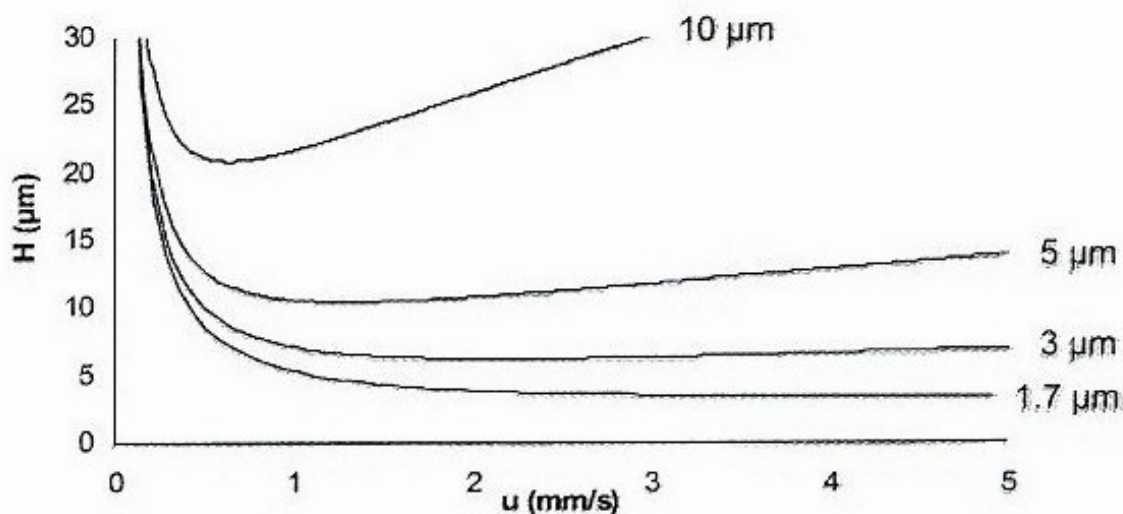
Účinnost kolony je vyjadřována tzv. počtem teoretických pater kolony – n . Teoretické patro je pomyslná část kolony, kde dochází k ustanovení rovnováhy analytu mezi mobilní a stacionární fází. Délka této části je výškový ekvivalent teoretického patra kolony – H . Výškový ekvivalent teoretického patra pro kolonu je určen podílem její délky – l a počtem teoretických pater kolony – n . Účinnost kolony tedy roste s počtem teoretických pater a klesá s výškou teoretického patra.

Účinností kolony se zabývá van Deemterova teorie, podle níž vedou k rozšiřování zóny v koloně a zároveň k růstu výškového ekvivalentu teoretického patra tři děje - odpor proti přenosu hmoty, turbulentní a molekulární difúze. Související Van Deemterova rovnice pak popisuje vztah mezi lineární rychlostí mobilní fáze u a výškou teoretického patra kolony H nebo účinností kolony. Účinnost separace nebo výška teoretického patra H kolony podle van Deemtera je dána **Rovnicí č.1**.

$$H = A + B/u + Cu \quad (1)$$

kde A , B a C jsou konstanty charakterizující kolonu a u je lineární rychlost mobilní fáze nejčastěji měřená v milimetrech za sekundu. Grafickým znázorněním této rovnice je pak van Deemterova křivka (**Obrázek 1**). Minimum van Deemterovy křivky pak odpovídá ideální u , kdy kolona dosahuje své nejvyšší účinnosti [25-27].

Vzhledem k tomu, že velikost částic je jednou z proměnných van Deemterovy křivky, může tato veličina významně ovlivnit účinnost chromatografické separace (**Obrázek 1**). Menší částice mají tendenci snižovat hodnotu H , to znamená, že se zvýší počet teoretických pater kolony na jednotku délky a kolona se stává účinnější. Částice stacionární fáze o malé velikosti mají za následek rychlejší přenos látek mezi stacionární a mobilní fází, protože se podstatně zmenší délka jejich difúzní dráhy. Jednou z výhod použití malých částic stacionární fáze je to, že kolona může být zkrácena a počet teoretických pater kolony zůstává stejný nebo podobný. Zkrácení délky kolony znamená rychlejší separaci, které může být dosaženo, jelikož míra separace je úměrná délce kolony [17, 25, 26].



Obr. 1 Graf van Deemterových křivek za použití kolon o rozdílné velikosti částic [28].

2.8 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

HPLC je instrumentální chromatografická metoda využívaná k separaci látek ze směsi, pro kvalitativní a kvantitativní stanovení látek ve vzorku, nebo k přečištění látek. HPLC je založena na principu klasické kapalinové chromatografie s tím rozdílem, že HPLC je částečně či úplně automatizována a pracuje s vyššími tlaky [17].

Kapalinový chromatograf HPLC se skládá obvykle z čerpadla, dávkovače, chromatografické kolony a detektoru, za kterým následuje zapisovací zařízení (počítač).

Čerpadla musí zajistit lineární přívod mobilní fáze. V koloně probíhá samotná separace látek. Analytické HPLC kolony jsou běžně vyráběny o rozměrech 2,1 - 4,6 mm v průměru a délce 30 - 250 mm. Kolony jsou naplněné sorbentem o velikosti částic nejčastěji 2 - 50 mikrometrů. To HPLC zaručuje vysokou účinnost při separaci, a z tohoto důvodu je dnes jednou z nejpoužívanějších chromatografických metod.

Na základě různých interakcí látek se stacionární fází (sorbentem) za stejných podmínek chromatografie využít HPLC ke kvalitativním stanovením dle získaných retenčních veličin. Detektor po separaci v koloně poté generuje signál úměrný množství látky ve vzorku a tím umožňuje kvantitativní analýzu složek obsažených ve vzorku [17, 18].

2.8.1 Chromatografie s normální fází

Chromatografie s normální fází (NP-HPLC, z angl. „Normal-phase HPLC“) byla jako první uspořádání kapalinové chromatografie vyvinuta již na začátku 20. století. V tomto uspořádání se využívá polární stacionární fáze na bázi oxidu křemičitého nebo oxidu hlinitého. Jako mobilní fáze se pak užívá nepolární rozpouštědlo (např. hexan), ke kterému se přidává pro úpravu polaritý malé množství polárního rozpouštědla (např. ethanol, methanol). Tato metoda je vhodná především pro vysoce hydrofobní látky, které jsou nerozpustné v polárních nebo vodných rozpouštědlech [17].

2.8.2 Chromatografie s obrácenou fází

Použití NP-HPLC se omezilo po roce 1970 s vyvinutím chromatografie na reverzní fází RP-HPLC (z angl. „Reverse-phase HPLC“), která je dnes přednostně využívána. Hlavním důvodem byla špatná reprodukovatelnost retenčních časů v důsledku přítomnosti vody nebo protických organických rozpouštědel [17]. U RP-HPLC je stacionární fáze nepolárního charakteru a mobilní fází naopak polárního. Dnes používané stacionární nepolární fáze jsou uhlovodíkové řetězce (C4 - C18), které jsou chemicky vázané na nosič na bázi silikagelu, kopolymerů styrenu a divinylbenzenu aj. potažené uhlíkem. Ve většině případů slouží jako mobilní fáze směs vody a organického rozpouštědla (např. acetonitrilu, isopropanolu, methanolu). Vzhledem k nepolárnímu charakteru stacionární fáze k ní mají větší afinitu látky s vyšším obsahem hydrofobních oblastí, tedy méně polární. Na počátku analýzy jsou obvykle dělené látky rozpuštěny ve vodě a svými hydrofobními skupinami se zachytí na kolonu; poté se postupně z kolony eluují s rostoucím gradientem koncentrace organického rozpouštědla [17].

2.8.3 Ultra-vysokúčinná kapalinová chromatografie

Spolu s postupným zdokonalováním technik bylo možné vyrábět stacionární fáze o menší velikosti částic. Pochopitelně pak došlo ke zdokonalení a vylepšení mnoha analytických metod. Metoda UPLC funguje na stejném principu jako HPLC, liší se však v použití kolon s menší velikostí částic (méně než 2 μm) a s tím souvisejících vyšších tlaků než je tomu u HPLC. Hlavními výhodami tohoto relativně nového přístupu chromatografie je účinnější separace, zvýšená citlivost, rychlejší analýza, snížení provozních nákladů, či

nižší spotřeba rozpouštědla. Nevýhodou UPLC je vyšší generovaný zpětný tlak než je tomu u konvenční HPLC, a proto UPLC vyžaduje speciální instrumentaci. Celkově UPLC přináší významné vylepšení v chromatografických technikách [18, 26-28].

2.9 Detekce v kapalinové chromatografii

Nejběžněji používanými detektory jsou fotometrické, refraktometrické, fluorescenční a hmotnostní. K dosažení nejlepší citlivosti stanovení se dnes pak využívá tandemového zapojení dvou detektorů. První z nich je pak zpravidla nedestruktivní a druhý naopak destruktivní. K detekci sekundárních metabolitů z těchto tandemových zapojení je pak pro vysokou citlivost nejrozšířenější použití detektoru diodového pole (DAD, z angl. „Diode array detector“) s tandemově zapojeným hmotnostním spektrometrem (MS, z angl. „Mass-spectrometry“) [17, 18, 20, 29].

2.9.1 Detektor diodového pole

DAD detektor patří do skupiny fotometrických detektorů založených na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek viditelného a ultrafialového záření (UV/VIS). DAD detektor v tomto smyslu snímá v reálném čase celé spektrum vlnových délek bez přerušení. Ve spojení s počítačem (řídící jednotkou) umožňuje detekci látky při jakékoliv zvolené vlnové délce a porovnání měřených spekter s uloženými, předem naměřenými daty nebo s knihovnou spekter.

2.9.2 Detekce hmotnostní spektrometrií

MS je analytická metoda, která stanovuje hmotnosti molekul a atomů po jejich převedení na ionty. Podstatou MS je separace iontů produkovaných v iontovém zdroji přístroje na základě jejich efektivní hmotnosti (m/z , kde je m -hmotnost iontu a z -nábojové číslo) a jejich následná detekce [30, 31].

Hmotnostní spektrometr je tvořen z těchto součástí: iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor a počítač. K tvorbě iontů (ionizaci) v hmotnostní spektrometrii můžeme dosáhnout několika způsoby např. ionizací elektronovým paprskem (EI), **ionizací elektrospřem (ESI)**, chemickou ionizací (CI), desorpcí laserem za spoluúčasti matrice (MALDI) aj. U většiny ionizačních metod je možnost tvorby jak pozitivně tak i negativně nabitých iontů vzorku. Vytvořené ionty jsou pak děleny v hromadném analyzátoru. Mezi

nejběžnější analyzátory patří kvadrupolový, iontová cyklotronová rezonance, iontová past, a **průletové analyzátory (TOF, z angl. „Time-of-flight“)**. Detektor pak následně poskytuje signál úměrný počtu dopadajících iontů detekcí elektrického proudu. Výsledkem metody je hmotnostní spektrum iontů zkoumaného vzorku, které zobrazuje zastoupení jednotlivých iontů v závislosti na hodnotě m/z [17, 30, 31].

Hmotnostní spektrometrie patří k nejdokonalejším a nejmodernějším analytickým metodám vůbec. Kromě kvantitativní a kvalitativní analýzy poskytuje i analýzu izotopického složení jednotlivých prvků, ze kterých je vzorek složen. V lékařství je využívána ve screeningu vrozených metabolických poruch a k detekci metabolitů obecně [32, 33].

2.9.2.1 Ionizace elektrosprejem (ESI)

Technika ionizace je určena především pro disperzi kapalin a aerosolů ve spojení s různými druhy analyzátorů. Hlavní užití představuje v on-line spojení UPLC/HPLC s MS. Patří mezi měkké techniky ionizace, což znamená, že energetický přebytek dodaný molekule a vzniklá fragmentace primárně vzniklého iontu je malá. Ionizace elektrosprejem produkuje vznik nabitých iontů $[M+zH]^{z+}$, $[M+zH]^{z-}$, kde M je molekulová hmotnost a z je náboj iontu [17, 29-31].

2.9.2.2 Průletový analyzátor

V TOF analyzátoru jsou ionty po akceleraci v elektrickém poli separovány v letové trubici na základě jejich m/z . Ionty jsou z iontového zdroje akcelerovány napětím a stanovuje se doba průletu iontu letovou trubicí k detektoru. Mezi dvěma různými ionty je tedy rozdíl v dobách letu trubicí [30, 31].

TOF-MS má velký význam pro analýzu látek, protože tyto analyzátory poskytují vysokou specifitu jak kvůli vysoké přesnosti a vysokému rozlišení stanovení hmotnosti, ale umožňuje i tvorbu vysoce selektivních přesných hmotnostních chromatogramů studovaných látek ve složitých maticích. Přesné určení hmotnosti a získané elementární složení studovaných látek mohou být použity i pro navržení struktury analytů [29].

Výhodou analyzátoru TOF-MS je jeho schopnost analyzovat vzorek obsahující teoreticky neomezený počet látek. Proto se s výhodou spojuje s kapalinovou chromatografií (LC-TOF-MS) pro schopnost sledování velkého počtu analytů s vysokou

citlivostí během jedné analýzy. Kombinace s UPLC pak jen podtrhuje významné výhody týkající se citlivosti, selektivity a rychlosti stanovení. TOF poskytuje selektivitu a úplnou kontrolu přesné hmotnosti a UPLC vytváří úzké píky, což snižuje možnost vzniku nežádoucích interferencí [17, 29-32, 34, 35].

Z uvedených vlastností vyplývá, že zvolená instrumentace je velmi vhodná pro analýzu neznámých sekundárních metabolitů přítomných ve složité matici.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

Pro LLE extrakci byl použit: ethylacetát (99,70%, Lach-Ner, ČR), hexan (99,00%, Merck, Německo), chloroform (99,80%, Chromservis, ČR), kyselina octová (99,00%, Sigma-Aldrich, Německo).

Při SPE extrakci byl použit: hydroxid amonný (30,00%, Sigma-Aldrich, Německo), kyselina mravenčí (98,00%, Sigma-Aldrich, Německo), methanol LC-MS (99,95%, Biosolve, Nizozemsko) a voda (HPLC gradient grade) připravená reverzní osmózou přístrojem Milli-Q (Millipore, USA).

Na přípravu mobilních fází pro UPLC-DAD-TOF-MS analýzy byl použit: acetonitril (99,95%, Biosolve, Nizozemsko), kyselina mravenčí (98,00%, Sigma-Aldrich, Německo) a voda (HPLC gradient grade) připravená reverzní osmózou přístrojem Milli-Q (Millipore, USA).

3.2 Intrumentace

Pro filtraci před extrakcí na pevné fázi byly použity filtrační papíry Filter Discs (Quant.) Grade: 392 (Munktell Filter AB, Švédsko).

SPE byly prováděny na kolonkách Oasis MCX, Oasis HLB (Waters, USA) a Strata-X-C (Phenomenex, USA) o objemu 3 ml s obsahem 60 mg sorbentu. U Oasis MCX a Strata-X-C je používán sorbent na bázi polymerů s funkcí kationtové výměny, Oasis HLB používá sorbent na bázi kopolymeru N-vinylpyrrolidonu (hydrofilní) a divinylbenzenu (lipofilní).

K odstředění vzorků před analýzami UPLC byla použita centrifuga Mini Spin plus (Eppendorf AG, Německo).

K UPLC analýzám byl využíván ultra-vysokoúčinný kapalinový chromatograf Acquity UPLC (Waters, Praha, ČR) složený z vysokotlaké pumpy (Acquity UPLC Solvent Manager), automatického dávkovače (Acquity UPLC Sample Manager), termostatu (Acquity UPLC Column Heater/Cooler), detektoru diodového pole (Acquity UPLC Diode Array Detector) a tandemově zapojeného Waters LCT Premier XE hmotnostního spektrometru s analyzátozem TOF s ESI ionizací (Waters MS, Manchester, UK). Pro analýzy byla použita kolona Acquity UPLC BEH C18 (100 × 2,1 mm, 1,7 μm, Waters, USA). Data byla vyhodnocena v programu MassLynx V4.1 software (Waters, USA).

3.3 Kultivační podmínky pro kmen RJ0258 (*Geosmithia* sp.9)

Inokulum kmene RJ0258 bylo ponecháno na miskách agaru s maltózovým extraktem (MEA; složení: maltózový extrakt, 20 g/l a agar, 20 g/l) a následně zaočkováno do tekutého MEA média č. 3 (složení uvedeno v **Tabulce 2**) v 250ml Erlenmeyerových baňkách a třepáno na rotační třepačce po dobu 11 dní v temnu při 24 °C. Složení kultivačního média a délka kultivace byly vybrány na základě testů, které jsou popsány dále v textu (Kapitola 4.1). Po uplynutí doby kultivace bylo u fermentačních médií změřeno pH, médium bylo centrifugováno (3500 G, 10min, RT) a zfiltrováno za sníženého tlaku za použití Büchnerovy nálevky s filtračním papírem.

Tabulka 2. Složení kultivačního média a podmínky kultivace.

označení média	složení	pH	teplota	doba kultivace
3	MEA – 100 ml ME – 2 g glukosa – 2 g pepton - 0,1	5-6	24 °C	11 dní

MEA-agar s maltózovým extraktem, ME-maltózový extrakt

3.4 LLE

Pro extrakci bioaktivních sekundárních metabolitů z fermentačního média byla jako optimální metoda LLE zvolena dvoustupňová extrakce roztokem 5% kyseliny octové v ethylacetátu. K extrakci bylo použito 20 ml fermentačního média, které bylo extrahováno vždy 20 ml extrakčního činidla (15 min). Poté byl celý objem centrifugován (3500 G, 10 min, RT). Frakce ethylacetátu byly poté spojeny, odpařeny do sucha na rotační vakuové odparce (RVO) a přerozpuštěny ve 40 µl methanolu.

3.5 SPE

K prvotnímu testování optimálního složení kultivačního média byla použita dříve publikovaná SPE metoda pomocí sorbentu Oasis MCX [21]. Na začátku každé extrakce byla kolonka kondicionována 4 ml methanolu a následně ekvilibrována 4 ml Milli-Q vody. Po promytí bylo na kolonku nanášeno 20 ml fermentačního média, u kterého se upravilo pH kyselinou mravenčí na hodnotu 2,5. Po sorpci analytu na sorbent kolonky byla kolonka promyta 1 ml 1% vodným roztokem kyseliny mravenčí. Po promytí byla kolonka sušena

prosáváním vzduchem po dobu 5 minut. V posledním kroku byl analyt eluován z kolony 1 ml methanolu a eluát poté odpařen do sucha na RVO a přerozpuštěn ve 40 µl methanolu.

3.6 UPLC-DAD-TOF-MS

Analýzy sekundárních metabolitů metodou UPLC byly uskutečněny na koloně Acquity UPLC BEH C18 (100 × 2,1 mm, 1,7 µm) s lineární gradientovou elucí (**Tabulka 3**) za použití mobilních fází (A) 0,1% vodného roztoku kyseliny mravenčí a (B) 100% acetonitrilu. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,4 ml/min, teplota kolony 25 °C a teplota vzorků byla 10 °C. Dávkovaný objem vzorku byl 2 µl a data byla měřena v UV/VIS oblasti v rozmezí vlnových délek 200-600 nm.

Rozhraní ionizace ESI Waters LCT Premier XE TOF-MS bylo nastaveno pro práci jak v režimu pozitivních, tak i negativních iontů a parametry hmotnostní detekce TOF-MS byly následující: napětí na vstupním kuželu 40 V, napětí na sprejové kapiláře ±2500 V, teplota bloku iontového zdroje 120 °C, teplota desolvatačního plynu (dusíku) 350 °C, průtok desolvatačního plynu 800 L/h, průtok plynu na vstupním kuželu 50 L/h, W mód, čas skenu 0,1 s, časová prodleva mezi skeny 0,01 s. Přesnost měřené hmotnosti byla zajištěna pomocí kontinuálního nástřiku referenční látky leucinu-enkefalinu.

Tabulka 3. Lineární gradientová eluce užitá při UPLC-DAD-TOF-MS analýzách.

čas (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
15	65	35
25	0	100
27	0	100
30	95	5

* A-0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí, B-acetonitril

3.7 Stanovení biologické aktivity sekundárních metabolitů v extraktu

Biologická aktivita sekundárních metabolitů v připravených extraktech byla testována Kirby-Bauerovým diskovým difúzním testem. Na terčík ze sterilního filtračního papíru bylo nanášeno dvakrát po 12 µl testovaného extraktu rozpuštěného v methanolu. Impregnovaný terčík filtračního papíru byl následně sušen do odpaření veškerého methanolu. Po vysušení byl terčík přiložen na agarovou misku, která byla předem zaočkována souvisle po celém povrchu indikačním organismem *Kocuria rhizophila* (Gram-pozitivní bakterie, CCM552). Inhibice růstu byla sledována po 16ti hodinové

inkubaci při 37 °C a v případě pozitivního výsledku vyhodnocována změřením průměru inhibiční zóny.

4.0 Výsledky a diskuze

4.1 Optimalizace kultivačních podmínek

Celkem bylo testováno 10 kultivačních médií za daných podmínek kultivace. Získané extrakty z těchto fermentačních médií byly poté testovány na biologickou aktivitu. Na základě největších inhibičních zón v Kirby-Bauerově testu bylo vybráno nejvhodnější kultivační médium zajišťující nejvyšší produkci biologicky aktivních sekundárních metabolitů. Složení jednotlivých kultivačních médií a inhibiční zóny získaných extraktů jsou uvedeny v **Tabulce 4** (Přílohy). Inokula byla připravena do 250ml Erlenmeyerových baněk a vložena na rotační třepačku, kde v temnu po dobu 14 dní a při 24 °C probíhala kultivace. Po uplynutí doby kultivace bylo u fermentačních médií změřeno pH, média byla centrifugována (3500 G, 10min, RT) a zfiltrována za sníženého tlaku. Pro extrakci sekundárních metabolitů byla použita dříve publikovaná SPE metoda pomocí sorbentu Oasis MCX (viz. Kapitola 3.5, [21]).

Získané extrakty byly poté analyzovány metodou UPLC-DAD-TOF-MS a podrobeny testu biologické aktivity podle Kirby-Bauera. Na základě dosažených výsledků bylo jako optimální kultivační médium zvoleno testované médium označené č. 3, zajišťující produkci největšího množství biologicky aktivních sekundárních metabolitů.

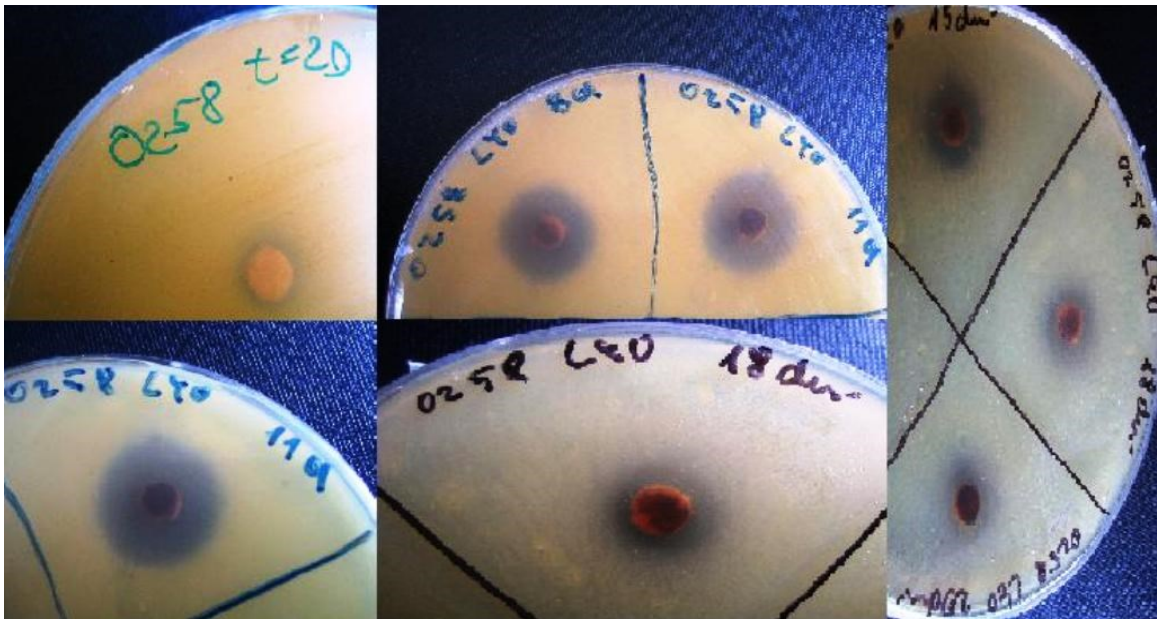
Po zvolení nejvhodnějšího složení média pro kultivaci bylo nutné také zjistit optimální dobu kultivace, kdy studovaný houbový kmen RJ0258 produkuje do fermentačního média nejvíce biologicky aktivních metabolitů. K testování bylo připraveno osm baněk s vybraným kultivačním médiem (MEA, č. 3). Šest z nich bylo zaočkováno houbou RJ0258 a zbylé dvě byly použity jako tzv. blankové médium (absence houbových kultur). Počínaje druhým dnem kultivace byl každý druhý až třetí den odebírán alikvot 5 ml fermentačního média z každé z baněk ve sterilním prostředí laminárního boxu (aby bylo zabráněno kontaminaci). Odebrané objemy fermentačního média byly spojeny a extrahovány popsanou metodou LLE (viz. Kapitola 3.4). Metoda LLE (místo dříve použité SPE) byla zvolena na základě uskutečněných testů extrakční metody, jak je uvedeno v následující Kapitole 4.2. Testy biologické aktivity podle Kirby-Bauera ukázaly, že největší biologickou aktivitu vykazuje extrakt získaný po 11 dnech kultivace a následně dochází k jejímu poklesu. Z tohoto faktu bylo usouzeno, že optimální doba kultivace je 11 dní. Hodnoty pH a výsledky testů biologické aktivity v průběhu kultivace jsou uvedeny v **Tabulce 5**. Ukázky výsledků testování biologické aktivity extraktů pomocí

Kirby-Bauerova diskového testu jsou uvedeny na **Obrázku 2**. Ukázky UPLC-DAD chromatogramů extraktů fermentačního média po 2, 11 a 20 dnech kultivace jsou uvedeny na **Obrázku 3**, kde je zvýrazněn potencionálně biologicky aktivní sekundární metabolit s označením SM1. Z tohoto obrázku je evidentní, že po 2 dnech ($t = 2d$) ještě nedochází k produkci sekundárních metabolitů, což odpovídá nulové biologické aktivitě a vyššímu pH fermentačního média. V 11 dnech kultivace ($t = 11d$) je pak produkce maximální, což opět koreluje s aktivitou. A po 20 dnech kultivace ($t = 20d$) biologická aktivita klesá. Porovnáním chromatogramů je vidět i úbytek některých látek v chromatogramu, což značí možnou nestabilitu a rozklad látek.

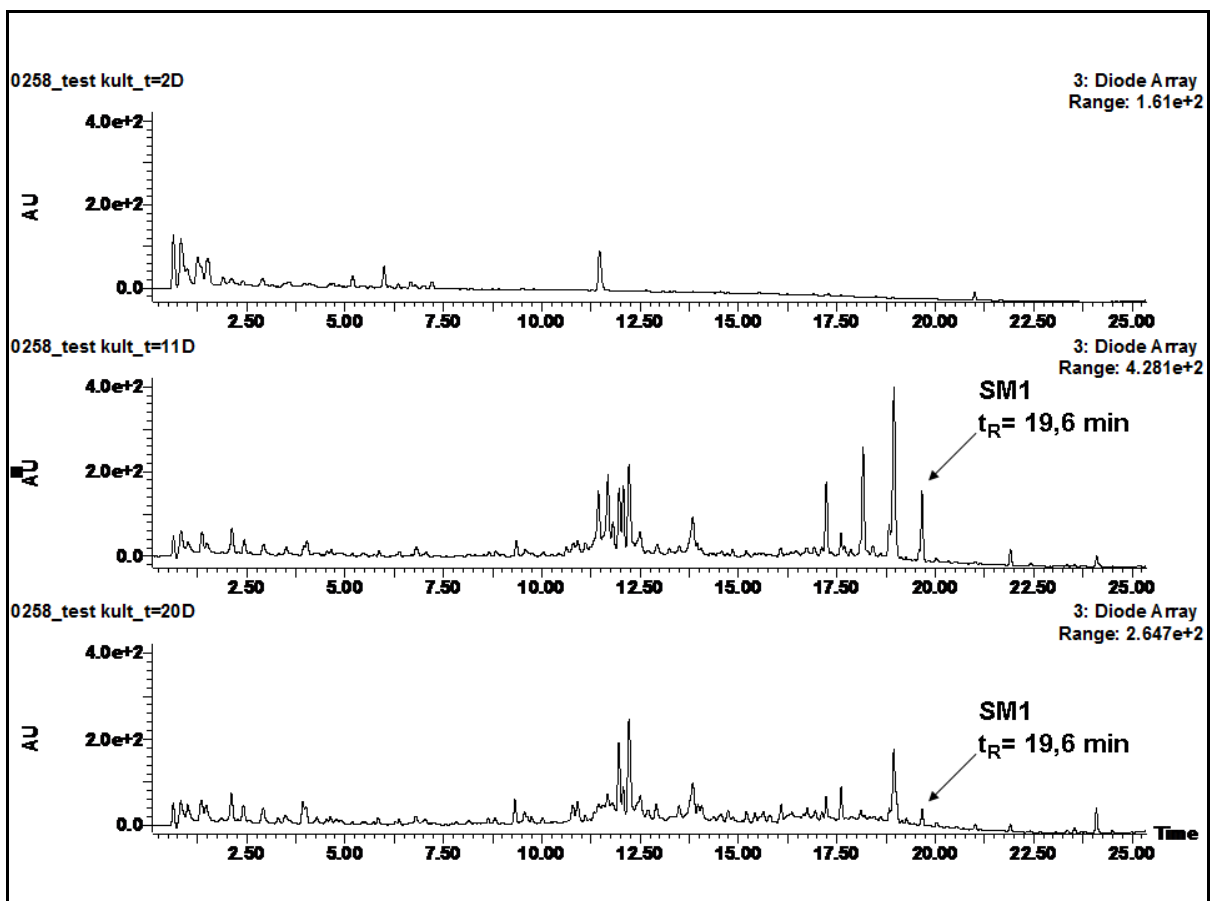
Srovnání chromatogramů extraktu z blankového média (absence houbových kultur) a kultivace po 11 dnech uvádí **Obrázek 4**. Na základě tohoto porovnání je možné určit, které látky pochází ze samotného média a které jsou sekundární metabolity produkované houbou RJ0258.

Tabulka 5. Sledování biologické aktivity a hodnoty pH kultivačního média v průběhu kultivace.

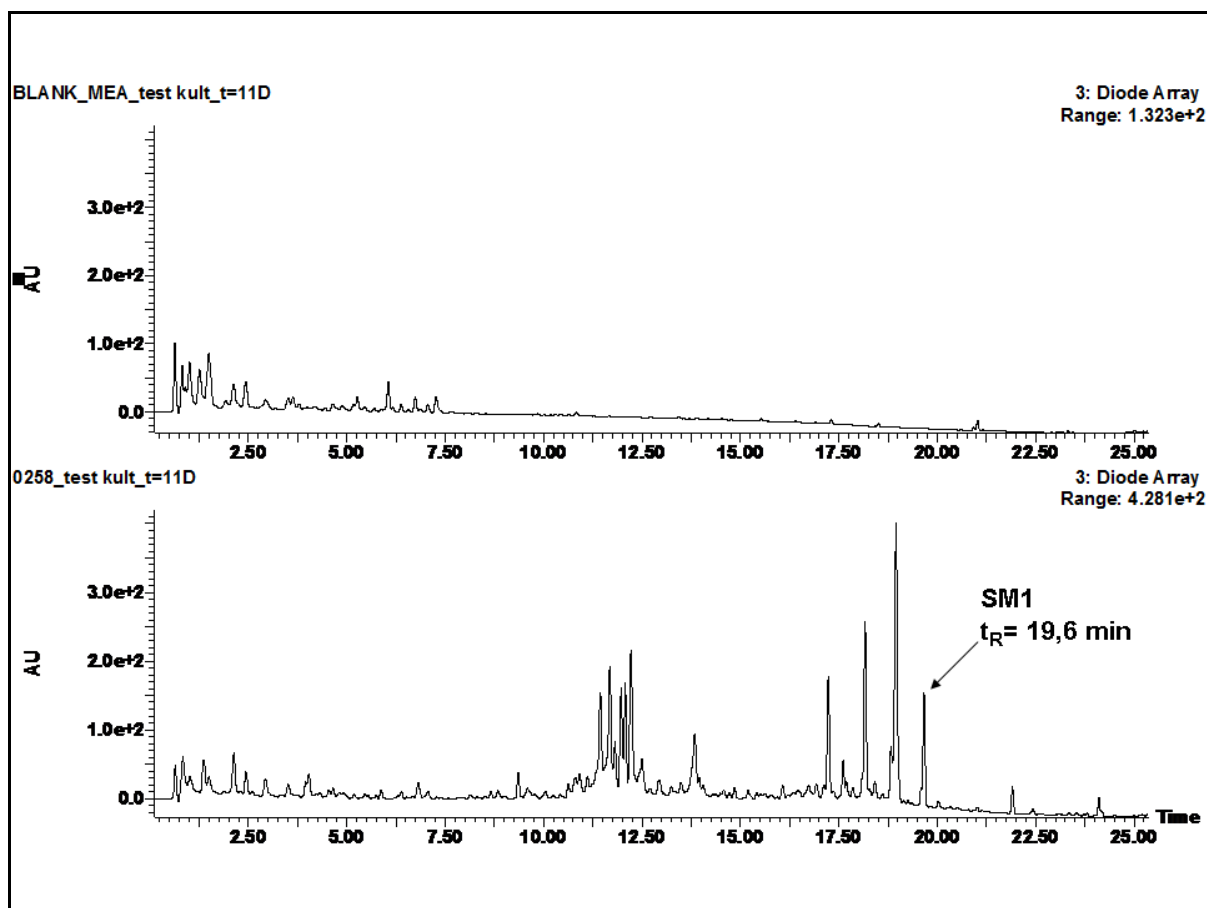
odběr	doba kultivace	pH média	pH blank	biologická aktivita	průměr inhibiční zóny
1	2 dny	5,0	neměřeno	ne	0,0 cm
2	4 dny	3,72	5,51	ano	1,1 cm
3	6 dní	3,66	5,44	ano	1,5cm
4	8 dní	3,60	4,39	ano	1,5cm
5	11 dní	3,61	4,28	ano	1,7 cm
6	13 dní	3,62	4,26	ano	1,0 cm
7	15 dní	3,64	4,21	ano	1,0 cm
8	18 dní	3,65	4,23	ano	1,0 cm
9	20 dní	3,63	4,24	ano	0,9 cm



Obr. 2. Ukázka Kirby-Bauerova difuzního (diskového) testu pro zjišťování antimikrobiální aktivity houbových extraktů během kultivace.



Obr. 3. UPLC-DAD chromatogramy extraktu fermentačního média po 2, 11 a 20 dnech kultivace (shora dolů).



Obr. 4. UPLC-DAD chromatogramy extraktu blankového (nahore) a fermentačního média (dole) po 11 dnech kultivace.

4.2 Optimalizace extrakční metody

Ve snaze izolovat co nejvíce biologicky aktivních látek z fermentačního média byla testována různá rozpouštědla pro LLE a různé sorbenty pro SPE. Jednalo se o následující soustavy: ethylacetát, chloroform, hexan a 5% roztok kyseliny octové v ethylacetátu (LLE) a Oasis HLB, Oasis MCX a Strata-X-C (SPE). K extrakci bylo použito vždy 20 ml fermentačního média.

Pro LLE extrakce byly zvoleny následující podmínky: Extrakční poměr médium-rozpouštědlo byl 1:1 (v/v). Testování s ethylacetátem, chloroformem a 5% roztokem kyseliny octové v ethylacetátu bylo prováděno jedнокrokovou extrakcí. Pro hexan byla zvolena dvoukroková extrakce, kdy v prvním kroku bylo fermentační médium extrahováno hexanem a po oddělení hexanové fáze bylo médium následně reextrahováno ethylacetátem.

Podmínky SPE extrakcí za použití různých sorbentů jsou uvedeny v **Tabulce 6**. Testované sorbenty byly vybrány na základě dříve provedené studie různých kmenů hub rodu *Geosmithia*. V této studii bylo také zjištěno, že sekundární metabolity obsažené ve fermentačním médiu jsou neutrální či slabě kyselé povahy [21]. Tento fakt byl také podpořen srovnáním pH fermentačního média během kultivace s pH fermentačního média s kultivací blankového média (absence houbových kultur), kdy dochází během kultivace k poklesu pH média obsahujícího inokulum. Vzhledem k povaze sorbentu bylo u testování kolonek Oasis MCX a Strata-X-C upraveno pH fermentačního média kyselinou mravenčí na $\text{pH} \approx 2,5$.

Po extrakci zmíněnými způsoby byly organické frakce odpařeny do sucha a poté rozpuštěny ve 40 μl 100% methanolu. Po rozpuštění byly vzorky extraktů podrobeny Kirby-Bauerovým diskovým difúzním testům pro zjištění biologické aktivity (popsáno v Kapitole 3.7) a analyzovány UPLC-DAD-TOF-MS metodou. Výsledky testování biologické aktivity jednotlivých extraktů jsou uvedeny v **Tabulce 7 a 8**.

Během testování byla u iontoměničových SPE kolonek pozorována biologická aktivita pouze pro eluáty získané elucí 1, ale eluáty z eluce 2 aktivitu nevykazovaly (viz. **Tab. 6**). Nevím, co to je? Mělo by být v předcházejícím textu označeno Z toho plyne, že všechny antimikrobiální látky se eluují v kroku 1 a jedná se tudíž o neutrální nebo slabě kyselé látky, jak je uvedeno dříve. Eluční krok 2 byl proto při extrakci vynechán.

Z porovnání **Tabulky 7 a 8** vyplývá, že nejvyšší inhibiční zóny vykazoval extrakt získaný metodou LLE za použití 5% kyseliny octové v ethylacetátu jako extrakčního činidla. Tento postup byl proto zvolen jako nejvhodnější pro získání největšího množství biologicky aktivních sekundárních metabolitů. K dosažení větší výtěžnosti byla zavedena místo jednostupňové extrakce, použité pro testování, extrakce dvoustupňová, přičemž extrakční poměr byl zachován (1:1, v/v) a extrakty byly následně spojeny.

Tabulka 6. Postup testování SPE metody.

Typ SPE kolonky	Oasis MCX 60mg (Waters)	Oasis HLB 60mg (Waters)	Strata-X-C 60mg (Phenomenex)
Sorbent	silný katex	hydrofilně-lipofilní kopolymer	katex
Kondicionace	4 ml 100% methanol	4 ml 100% methanol	4 ml 100% methanol
Ekvilibrace	4 ml H ₂ O	4 ml H ₂ O	4 ml H ₂ O
Fermentační médium (úprava pH)	20 ml (pH 2,5)	20 ml (bez úpravy)	20 ml (pH 2,5)
Promytí	1 ml 1% HCOOH	1 ml H ₂ O	1 ml 1% HCOOH
Doba sušení	5 minut	5 minut	5 minut
Eluce 1	1 ml 100% methanol	1 ml 100% methanol	1 ml 100% methanol
Eluce 2	1 ml 5% NH ₄ OH – methanol (5:95, v/v)	---	1 ml 5% NH ₄ OH- methanol (5:95, v/v)

Tabulka 7. Výsledky testů biologické aktivity pro extrakty získané metodou SPE.

Typ SPE kolonky	BIOLOGICKÁ AKTIVITA (inhibiční zóna v cm)	
	Eluce 1	Eluce 2
Oasis MCX	1,0	0
Oasis HLB	0	0
Strata-X-C	1,5	0

Tabulka 8. Výsledky testů biologické aktivity pro extrakty získané metodou LLE.

extrakční rozpouštědlo	BIOLOGICKÁ AKTIVITA (inhibiční zóna v cm)
ethylacetát	1,3
chloroform	1,3
5% CH ₃ COOH-ethylacetát (5:95, v/v)	1,7
hexan → ethylacetát	1,1

4.2.1 Srovnání metod LLE a SPE

Optimální rozpouštědlo bylo voleno na základě testů biologické aktivity. Podle průměru (velikosti) inhibiční zóny lze odhadnout výtěžnost extrahovaných biologicky aktivních látek.

Prakticky bylo z dřívějších prací potvrzeno, že SPE metoda je vhodnější pro práci s malými objemy vzorku [20] a pro zpracování většího objemu je lepší použít metodu LLE [15, 16]. Jelikož izolované sekundární metabolity nebyly dosud podrobně specifikovány, můžeme o výtěžnosti a reprodukovatelnosti jen spekulovat. Vzhledem k podobnostem závěrů s dřívějšími použitými postupy pro extrakci biologicky aktivních látek se dá předpokládat, že i zde dojde k potvrzení faktů z minulosti. To znamená, že u SPE můžeme očekávat jak výrazně lepší reprodukovatelnost, nicméně pro extrakci většího množství sekundárních metabolitů z velkého objemu média (za účelem následné izolace a identifikace biologicky aktivních sekundárních metabolitů) je vhodnější metoda LLE.

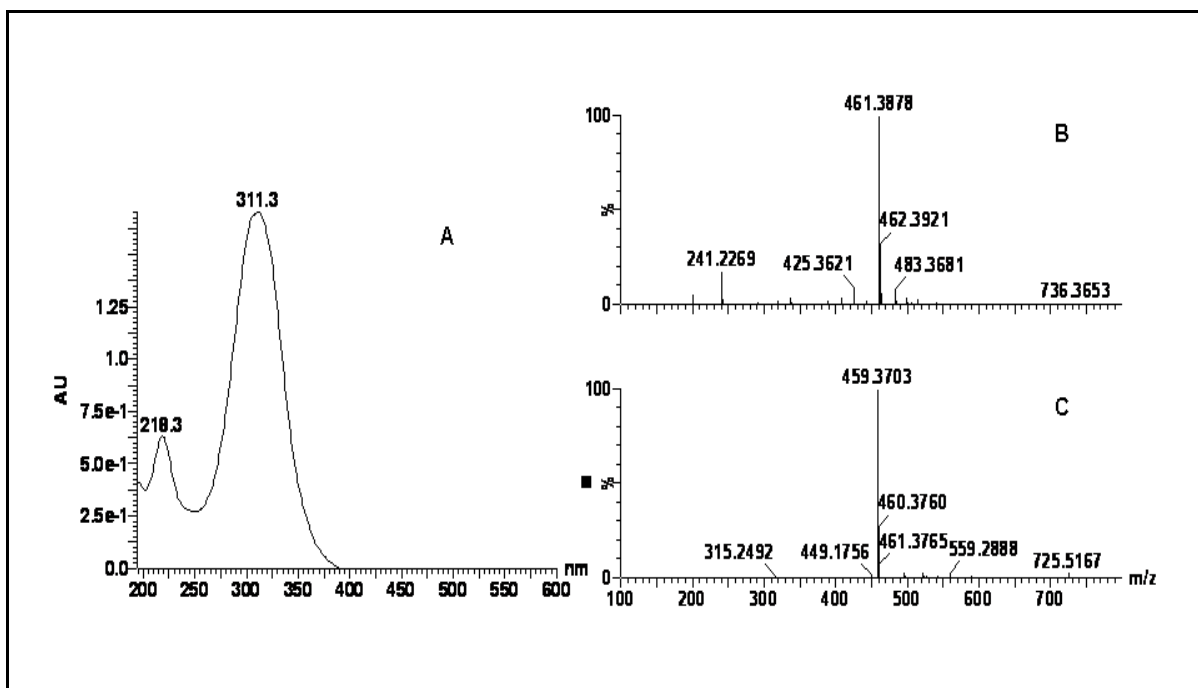
4.3 Optimalizace UPLC-DAD-TOF-MS

Optimalizace analýz metodou UPLC probíhala na základě dříve použitých podmínek a mobilních fází pro analýzy UPLC-DAD [21]. Oproti podmínkám a složení mobilních fází uvedených v citaci nedošlo ke změnám s výjimkou složení použitých mobilních fází. Jednalo se o nahrazení mobilní fáze (A), kde byl dříve používán 0,1% vodný roztok kyseliny trifluoroctové, 0,1% vodným roztokem kyseliny mravenčí z důvodu větší kompatibility s MS detekcí. Díky UPLC dochází k separaci velkého počtu látek ve vzorku za poměrně krátkou dobu, kdy celá analýza trvala 25 minut. Použitím metody UPLC-DAD-TOF-MS pak získáváme hodně informací o každé látce v chromatogramu - retenční čas, UV/VIS spektrum, MS spektrum v ESI módu + i -. Příklad charakteristiky sekundárního metabolitu SM 1 je uveden na **Obr. 5**.

Z chromatogramů extraktu z blankového média a fermentačního média po 11 dnech kultivace (**Obr. 4**) je vidět, že píky odpovídající detekovaným látkám s retenčním časem do 7,5 minuty pocházejí ze samotného kultivačního média a ostatní jsou látky produkované houbou RJ0258 s možnou biologickou aktivitou.

UPLC chromatogramy extraktů fermentačního média po 2, 11 a 20 dnech kultivace (**Obr. 3**) pak potvrzují, že se jedná o biologicky aktivní látky. Porovnáním chromatogramů

je vidět úbytek některých sekundárních metabolitů v chromatogramu, což koreluje s testy biologické aktivity, kdy docházelo k postupnému poklesu mikrobiální aktivity extraktů.



Obr. 5 Spektrální charakteristika píku SM1 ($t_R = 19,6\text{min}$): A – UV/VIS spektrum (200-600 nm) ; B – MS spektrum v ESI+ ; C - MS spektrum v ESI-.

5 Závěr

Jak již bylo řečeno úvodem, vzrůstající rezistence na současná antibiotika podporuje hledání nových terapeutických látek například z přírodních zdrojů. Symbiotické houby představují slibný zdroj biologicky aktivních sekundárních metabolitů, které mohou být potenciálními novými antibiotiky. Pro získání bioaktivních sekundárních metabolitů je však důležitá správná kultivace a následná extrakce velkého množství těchto látek, aby mohly být dále izolovány v čistém stavu za účelem identifikace či testování biologické aktivity.

Studium vybraného kmene RJ0258 (*Geosmithia* sp.9) filamentární houby rodu *Geosmithia* produkujícího sekundární metabolity s antimikrobiální aktivitou bylo provedeno především ve snaze izolovat co největší množství biologicky aktivních látek z fermentačního média. Během studia byly nalezeny vhodné podmínky kultivace (složení kultivačního média, doba kultivace) a vhodná extrakční metoda (LLE) za účelem získání co největšího množství biologicky aktivních sekundárních metabolitů.

Při provedených testech bylo zjištěno optimální složení kultivačního média – médium MEA, č. 3 (MEA – 100 ml, ME – 2 g, glukosa – 2 g, pepton 0,1 g, úprava pH na 5-6) a doba kultivace 11 dní, kdy dochází k největší produkci sekundárních metabolitů vykazujících antimikrobiální aktivitu. Naopak s uplynutím každého dalšího dne dochází k poklesu této aktivity. Nepodařilo se však objasnit, z jakého důvodu k poklesu dochází, a tak možnými příčinami mohou být nestabilita těchto látek nebo postupné spotřebování těchto metabolitů houbou jako živin při jejich nedostatku.

Dále byla vyvinuta metoda extrakce LLE za použití 5% kyseliny octové v ethylacetátu, kterou bylo, podle testů biologické aktivity, získáno nejvíce biologicky aktivních látek.

K separaci látek byla použita metoda UPLC-DAD-TOF-MS, která svou vysokou účinností umožňuje separaci mnoha látek ve složité matrici, jakou je i fermentační tekutina. Detekce DAD ve spojení s TOF-MS detekcí nám pak dává mnoho zajímavých informací o každé látce ve vzorku (UV/VIS spektrum, MS spektrum).

Výsledky získané v této bakalářské práci budou dále použity pro izolaci biologicky aktivních sekundárních metabolitů houbového kmene RJ0258 pomocí preparativní HPLC a jejich následné identifikace pomocí nukleární magnetické rezonance.

6 Přílohy

Tabulka 3. Složení kultivačního média a podmínky kultivace

(připravovala RNDr. Milada Chudíčková)

Látka	Médium									
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
Dest. H ₂ O	100 ml	100 ml					100 ml			100 ml
MEA			100 ml	100 ml	100 ml	100 ml				
SOB								100 ml		
RK									100 ml	
TSB										3 g
ME			2 g			2 g				
YEAST	0,01g	0,01g			0,005 g	0,005 g	0,05 g	0,5 g		
KCl	0,012 g	0,012 g						0,019 g		
NaCl							0,05 g	0,064 g		
Ca(SO ₄) ₂ ·4H ₂ O	0,1 g	0,1 g								
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,015 g	0,015 g								
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,002 g	0,002 g								
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,025 g	0,025 g								
KH ₂ PO ₄	0,025 g	0,025 g				0,1 g			0,2 g	
Glukóza		10 g	2 g							
Sacharóza	10 g			4 g					3 g	
L-asparagin	1 g	1 g			2g					
Trypton							0,1g	2 g		
Pepton			0,1 g	0,1 g	0,005 g					
Močovina						0,064 g				
Úprava pH	5,2		5-6					7,5	5, 8	
Cornsteep									2 g	
BIOLOGICKÁ AKTIVITA (inhibiční zóna v cm)	1,0	1,1	2,4	1,0	1,3	2,3	1,2	1,0	1,7	0,9

7 Literatura

1. Larsen, T.O., et al., *Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery*. Nat Prod Rep, 2005. **22**(6): p. 672-95.
2. Silver, L.L. and K.A. Bostian, *Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. **37**(3): p. 377-83.
3. Berdy, J., *Bioactive microbial metabolites*. J Antibiot (Tokyo), 2005. **58**(1): p. 1-26.
4. Keller, N.P., G. Turner, and J.W. Bennett, *Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(12): p. 937-47.
5. Frisvad, J.C., B. Andersen, and U. Thrane, *The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi*. Mycol Res, 2008. **112**(Pt 2): p. 231-40.
6. Bauer, A.W., et al., *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*. Am J Clin Pathol, 1966. **45**(4): p. 493-6.
7. Bauer, A.W., D.M. Perry, and W.M. Kirby, *Single-disk antibiotic-sensitivity testing of staphylococci; an analysis of technique and results*. AMA Arch Intern Med, 1959. **104**(2): p. 208-16.
8. Six, D.L., K. Bourtzis, and T.A. Miller, *Insect Symbiosis*. Bark beetle-fungus symbiosis. 2003: CRC Press, Baton Rouge (FL, USA).
9. Kolarik, M., et al., *Geosmithia fungi are highly diverse and consistent bark beetle associates: evidence from their community structure in temperate Europe*. Microb Ecol, 2008. **55**(1): p. 65-80.
10. Stodulkova, E., et al., *Hydroxylated anthraquinones produced by Geosmithia species*. Folia Microbiol (Praha), 2009. **54**(3): p. 179-87.
11. Tylová, T., *Liquid chromatography methods for analysis of microbial secondary metabolites of bioactive nature*.
Disertační práce, UK, Praha 2013.
12. Shin, H.J., C.J. Kim, and S.B. Kim, *Optimization of culture medium for rifamycin SV production by Amycolatopsis mediterranei MM2 using statistical designs*. Biotechnol Bioprocess Eng, 2007. **12**(4): p. 457-461.
13. Xing, Y.M., et al., *Determination of optimal carbon source and pH value for sclerotial formation of Polyporus umbellatus under artificial conditions*. Mycol Prog, 2011. **10**(1): p. 121-125.
14. Carlile, M.J. and S.C. Watkinson, *The Fungi*. Fungi and biotechnology, Fermentation technology. 1994: ACADEMIC PRESS INC., San Diego , CA 92101.
15. Turner, N.W., S. Subrahmanyam, and S.A. Piletsky, *Analytical methods for determination of mycotoxins: a review*. Anal Chim Acta, 2009. **632**(2): p. 168-80.
16. Fedeniuk, R.W. and P.J. Shand, *Theory and methodology of antibiotic extraction from biomatrices*. J Chromatogr A, 1998. **812**(1-2): p. 3-15.
17. Kazakevich, Y. and R. Lobrutto, *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. 2007: Wiley & Sons, Inc., Hoboken (NJ, USA).
18. Zotou, A., *An overview of recent advances in HPLC instrumentation*. Cent Eur J Chem, 2012. **10**(3): p. 554-569.

19. Krause, C., J. Kirschbaum, and H. Bruckner, *Peptaibiotics: an advanced, rapid and selective analysis of peptaibiotics/peptaibols by SPE/LC-ES-MS*. Amino Acids, 2006. **30**(4): p. 435-43.
20. Stoppacher, N., et al., *Characterisation of the peptaibiome of the biocontrol fungus Trichoderma atroviride by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008. **22**(12): p. 1889-98.
21. Tylova, T., M. Kolarik, and J. Olsovska, *The UHPLC-DAD fingerprinting method for analysis of extracellular metabolites of fungi of the genus Geosmithia (Acomycota: Hypocreales)*. Anal Bioanal Chem, 2011. **400**(9): p. 2943-52.
22. Nielsen, K.F. and U. Thrane, *Fast methods for screening of trichothecenes in fungal cultures using gas chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2001. **929**(1-2): p. 75-87.
23. Frisvad, J.C., O. Filtenborg, and U. Thrane, *Analysis and screening for mycotoxins and other secondary metabolites in fungal cultures by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography*. Arch Environ Contam Toxicol, 1989. **18**(3): p. 331-5.
24. Maul, C., et al., *Biomolecular-chemical screening: a novel screening approach for the discovery of biologically active secondary metabolites. III. New DNA-binding metabolites*. J Antibiot (Tokyo), 1999. **52**(12): p. 1124-34.
25. Majors, R.E., *Fast and Ultrafast HPLC on Sub-2- μ m Porous Particles - Where Do We Go from Here?* LCGC North Am, 2005. **23**(12): p. 1248-1255.
26. Swartz, M.E., *UPLC (TM): An introduction and review*. J Liq Chromatogr Relat Technol, 2005. **28**(7-8): p. 1253-1263.
27. Swartz, M.E., *Ultra performance liquid chromatography (UPLC): An introduction*. LCGC North Am, 2005: p. 8-14.
28. Nguyen, D.T.T., et al., *Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure*. J Sep Sci, 2006. **29**(12): p. 1836-1848.
29. Forcisi, S., et al., *Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling*. J Chromatogr A, 2013. **1292**: p. 51-65.
30. Univerzita obrany, F.v.z., *Základy hmotnostní spektrometrie*. 2013 (staženo dne 2.7.2013)
dostupné na http://www.pmfhk.cz/Prednasky/Hmotnostni_spektrometrie_08.pdf.
31. Holčápek, M. *Hmotnostní spektrometrie*. 2013 (staženo dne 2.7.2013)
dostupné na: http://holcapek.upce.cz/teaching/01_Uvod.pdf.
32. Plumb, R., et al., *Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orthogonal time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004. **18**(19): p. 2331-7.
33. Liu, S.P., et al., *Simultaneous quantification of five bioactive components of Acanthopanax senticosus and its extract by ultra performance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry*. Molecules, 2012. **17**(7): p. 7903-13.
34. Stolker, A.A., et al., *Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC-ToF-MS*. Anal Bioanal Chem, 2008. **391**(6): p. 2309-22.
35. Nielsen, M.K.K., et al., *Simultaneous screening and quantification of 52 common pharmaceuticals and drugs of abuse in hair using UPLC-TOF-MS*. Forensic Sci Int, 2010. **196**(1-3): p. 85-92.