

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MIKROBIÁLNÍ LIPÁZY A JEJICH VYUŽITÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

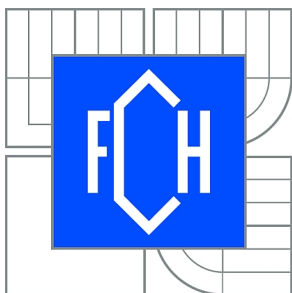
Bc. JANA PAVLAČKOVÁ

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MIKROBIÁLNÍ LIPÁZY A JEJICH VYUŽITÍ

MICROBIAL LIPASES AND THEIR APPLICATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JANA PAVLAČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. JIŘINA OMELKOVÁ, CSc.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0405/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Jana Pavlačková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Mikrobiální lipázy a jejich využití

Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité metody hodnocení
3. Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
4. Zhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Jana Pavlačková
Student(ka)

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na studium preparátu do odlučovačů tuků a odpadních potrubí, který obsahuje mikroorganismy s lipolytickou aktivitou.

Teoretická část práce popisuje lipázy, mikroorganismy, které tyto enzymy produkují, a využití lipáz. V této části jsou také uvedeny možnosti identifikace mikroorganismů.

Praktická část se zabývá studiem komerčního přípravku Sany Duo Spezial s prokázanou přítomností mikroorganismů s lipolytickou aktivitou. U těchto mikroorganismů byla provedena identifikace metodou PCR. Pomocí této metody byly mikroorganismy identifikovány jako rod *Bacillus* sp. Další charakteristika přípravku byla zaměřena na stanovení hodnoty $CHSK_{Cr}$ a výzkum vlivu různých podmínek kultivačního prostředí na produkci lipáz a jejich aktivitu. Studovaný byl vliv teploty, iontů a pH. Lipolytická aktivita byla stanovována spektrofotometricky s využitím činidla p-nitrofenyllaurátu, který se štěpí na žlutý produkt p-nitrofenol.

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on the study of the preparation for fat separators and wastewater pipes that contains the microorganisms with lipolytic activity.

Theoretical part of this thesis describes lipases, microorganisms producing this enzymes and usage of lipases. In this part possibilities of identification of microorganisms are presented too.

The practical part is concerned with the study of commercial preparation Sany Duo Spezial with proven presence of microorganisms with lipolytic activity. These microorganisms were identified by means of the PCR method. This method identified microorganisms like genus *Bacillus* sp. Next characterization of the preparation was focused on the determination of COD and the investigation of the influence of various conditions of culture medium on the lipases production and their activity. The effect of temperature, ions and pH was studied. Lipolytic activity was determine spectrophotometrically with usage of p-nitrophenyllaurate which dissociates to yellow product p-nitrophenol.

KLÍČOVÁ SLOVA

lipázy, lipolytická aktivita, *Bacillus* sp., odlučovače tuků, polymerázová řetězová reakce (PCR)

KEYWORDS

lipases, lipolytic activity, *Bacillus* sp., fat separators, polymerase chain reaction (PCR)

PAVLAČKOVÁ, J. *Mikrobiální lipázy a jejich využití*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 72 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Jiřina Omelková, 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

*Děkuji vedoucí mé diplomové práce
doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc.
za pomoc a podnětné rady při psaní
mé diplomové práce.*

OBSAH

1 Úvod	7
2 Teoretická část	8
2.1 Lipolytické enzymy	8
2.1.1 Mikrobiální lipázy	9
2.1.2 Živočišné lipázy.....	9
2.2 Lipidy	10
2.2.1 β -oxidace mastných kyselin.....	10
2.3 Mikroorganismy vykazující lipolytickou aktivitu	13
2.3.1 Bakterie.....	13
2.3.1.1 Bakterie s lipolytickou aktivitou	14
2.3.2 Houby	16
2.3.2.1 Kvasinky s lipolytickou aktivitou.....	17
2.3.2.2 Plísně s lipolytickou aktivitou	18
2.4 Technologické využití lipolytických enzymů.....	20
2.4.1 Lipázami katalyzované reakce.....	20
2.4.1.1 Příklady lipázami katalyzovaných reakcí nepřírodních substrátů	22
2.4.1.2 Lipázami katalyzovaná lipolýza derivátů fenolu.....	24
2.4.1.3 Lipázami katalyzovaná lipolýza flavonoidů a jejich derivátů.....	25
2.4.2 Lipázy aktivní při nízkých teplotách	25
2.4.3 Termostabilní lipázy	26
2.4.4 Odlučovače tuků	27
2.5 Identifikace mikroorganismů	29
2.5.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	29
2.5.1.1 Termostabilní DNA polymeráza	30
2.5.1.2 Kroky PCR	31
2.5.1.3 Elektroforéza v agarózovém gelu	31
3 Experimentální část	32
3.1 Materiál a metody	32
3.1.1 Komerční preparát	32
3.1.2 Použitá živná média.....	32
3.1.3 Použité kultury.....	32
3.1.4 Použité chemikálie.....	32
3.1.4.1 Komponenty pro PCR	33
3.1.5 Použité přístroje	33
3.1.6 Použitý software	34
3.1.7 Použité roztoky a jejich příprava	34
3.1.7.1 Roztoky pro izolaci a purifikaci DNA	34
3.1.7.2 Roztoky pro gelovou elektroforézu	34
3.1.7.3 Roztoky pro stanovení CHSK_{Cr}	35
3.1.7.4 Roztoky pro stanovení lipolytické aktivity.....	35
3.2 Pracovní postupy.....	36
3.2.1 Identifikace mikroorganismů metodou PCR	36
3.2.1.1 Izolace a purifikace DNA	36
3.2.1.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	36
3.2.1.3 Gelová agarózová elektroforéza bakteriální DNA	36
3.2.1.4 PCR s purifikovanou DNA.....	37
3.2.1.5 Detekce PCR produktu pomocí gelové agarózové elektroforézy.....	37
3.2.2 Chemická spotřeba kyslíku CHSK_{Cr}	37

3.2.2.1 Stanovení kalibrační křivky hydrogenftalanu draselného	37
3.2.2.2 Stanovení CHSK _{Cr}	38
3.2.3 Stanovení lipolytické aktivity s využitím měďnatého činidla	38
3.2.4 Stanovení lipolytické aktivity s využitím p-nitrofenyllaurátu	39
3.2.4.1 Stanovení kalibrační křivky p-nitrofenolu	39
3.2.4.2 Stanovení kalibrační křivky albuminu	39
3.2.4.3 Stanovení vlivu kultivační teploty na produkci lipáz	40
3.2.4.4 Stanovení vlivu iontů na produkci lipáz	41
3.2.4.5 Stanovení pH optima produkovaných lipáz	41
3.2.4.6 Stanovení rozpustných bílkovin ve vzorcích.....	41
4 Výsledky a diskuze	43
4.1 Identifikace mikroorganismů metodou PCR	43
4.1.1 Izolace a purifikace DNA	43
4.1.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	44
4.1.3 PCR s purifikovanou DNA	44
4.2 Stanovení podmínek pro užití komerčního preparátu	45
4.2.1 Stanovení lipolytické aktivity s využitím měďnatého činidla	45
4.2.2 Stanovení vlivu kultivační teploty na produkci lipáz	46
4.2.3 Stanovení vlivu iontů na produkci lipáz v průběhu kultivace	48
4.2.4 Stanovení pH optima produkovaných lipáz.....	50
4.3 Chemická spotřeba kyslíku CHSK _{Cr}	54
5 Závěr.....	56
6 Seznam použitých zdrojů.....	57
7 Seznam použitých zkratk	60
8 Seznam příloh	61

1 ÚVOD

Lipázy jsou hydrolytické enzymy produkované bakteriemi, kvasinkami, plísněmi i vyššími rostlinami a živočichy, kterým napomáhají k trávení lipidů přijímaných v potravě. Velký význam mají také při odbourávání znečištění způsobeného tuky.

Produkcí lipáz ovlivňuje celá řada vnějších faktorů, zejména teplota, pH prostředí, zdroje dusíku a tuků, koncentrace anorganických solí nebo dostupnost kyslíku.

Lipolytické enzymy přitahují značnou pozornost kvůli svému biotechnologickému potenciálu. Představují jednu z nejvýznamnějších skupin biokatalyzátorů pro biotechnologické aplikace. Využívají se ve farmacii a medicíně, v potravinářství, při výrobě detergentů nebo při syntézách nových chemikálií, při nichž je třeba spojení hydrofilní a hydrofobní části. Mají význam také při degradaci lipidů obsažených v odpadní vodě. Využívají se v odlučovačích tuků, kde štěpí tuky obsažené v odpadní vodě před tím, než se dostanou do kanalizace a následně do životního prostředí.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Lipolytické enzymy

Enzymy jsou bílkovinné makromolekuly s katalytickou funkcí, nacházející se ve všech živých systémech. Katalytickou funkci může vykonávat buď jednoduchá, nebo častěji složená molekula. Nebílkovinná část enzymů povahy složených bílkovin se označuje jako kofaktor. Je-li kofaktor pevně vázán na bílkovinnou složku enzymu a považuje se tedy za stabilní součást molekuly, označuje se jako prostetická skupina. Jindy je kofaktor s bílkovinnou složkou vázán jen slabě a může se od ní lehce oddělit, takový kofaktor se označuje jako koenzym [1].

Enzymy vykazují značnou specifitu, jak co do typu katalyzované reakce (reakční specifita), tak co do struktury přeměňovaných substrátů (substrátová specifita) [1].

Enzymová reakce probíhá v relativně malé oblasti enzymové molekuly, která se označuje jako aktivní centrum. Aktivní centrum obsahuje určité přesně rozmístěné funkční skupiny. Tyto funkční skupiny jsou součástí postranních řetězců aminokyselinových zbytků, které bývají v polypeptidovém řetězci vestavěny na různých místech. Jeho svinutím do prostorové struktury se však dostávají do bezprostřední blízkosti [1].

Enzymově katalyzované reakce probíhají různou rychlostí. Rychlost enzymově katalyzované reakce je závislá na koncentraci substrátu, množství enzymu, fyzikálně chemických vlastnostech prostředí a přítomnosti efektorů [1].

Z fyzikálně chemických vlastností prostředí ovlivňují rychlost reakce především teplota a pH. S růstem teploty roste i rychlost enzymově katalyzované reakce. Současně však také dochází k inaktivaci enzymu v důsledku denaturace jeho bílkovinné části a případně i odštěpení kofaktoru. Dochází tak ke vzniku teplotního optima, při kterém je enzymová reakce nejrychlejší. Katalytická aktivita enzymu je závislá i na pH prostředí. Většina enzymů pracuje neúčinněji jen v určité oblasti pH. Hodnota pH, při kterém je aktivita enzymu největší, se označuje jako pH optimum. Katalytickou účinnost enzymů výrazně ovlivňuje také řada látek – efektorů. Zvyšují-li tyto látky aktivitu enzymu, mluví se o aktivátorech (ionty některých kovů, organické látky), snižují-li účinek enzymu, označují se jako inhibitory (ionty těžkých kovů, organické i anorganické látky nízkomolekulové povahy) [1].

Enzymy se rozdělují do šesti hlavních tříd podle typu katalyzované reakce – oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, isomerázy a ligázy [1].

Lipolytické enzymy jsou karboxylesterázy, které hydrolyzují acylglyceroly na mastné kyseliny a glycerol. Lipolytické enzymy, které hydrolyzují acylglyceroly s uhlíkatým řetězcem mastných kyselin kratším než 10 C, jsou považovány za esterázy nebo karboxylázy. Enzymy, které hydrolyzují acylglyceroly obsahující řetězce mastných kyselin s počtem uhlíků větším než 10, jsou označovány jako lipázy nebo také jako triacylglycerol acylhydrolázy. Esterázy jsou aktivní ve vodných roztocích, zatímco „pravé“ lipázy jsou aktivnější spíše na rozhraní voda-lipid než ve vodné fázi [2].

Lipázy jsou serinové hydrolázy, obsahující shodnou sekvenci G-X₁-S-X₂-G jako katalytickou část, kde G = glycin, S = serin, X₁ = histidin a X₂ = glutamová nebo asparagová kyselina [3].

Lipolytické enzymy jsou děleny do tří skupin [2]:

První skupina je nespecifická. Lipolytické enzymy této skupiny uvolňují mastné kyseliny ze všech tří pozic acylglycerolu a kompletně hydrolyzují triacylglyceroly na mastné kyseliny a glycerol [2].

Druhá skupina lipolytických enzymů je 1,3-specifická. Uvolňuje mastné kyseliny z vnějších pozic triacylglycerolu a dává vznik 1,2-diacylglycerolům, 2,3-diacylglycerolům a 2-monoacylglycerolům za uvolnění mastných kyselin. Dlouhá inkubace triacylglycerolu s 1,3-specifickými lipázami vede většinou k úplné hydrolýze triacylglycerolů na mastné kyseliny a glycerol [2].

Třetí skupina zahrnuje lipolytické enzymy, které preferují určité mastné kyseliny. Jde například o lipázu B izolovanou z kvasinkovité houby *Geotrichum candidum*. Tyto lipázy se však nevyskytují u bakterií [2].

2.1.1 Mikrobiální lipázy

Enzymy produkované mikroorganismy jsou využívány častěji, než enzymy získávané z rostlin nebo živočichů, především kvůli větší katalytické aktivitě, větším výtěžkům, jednoduché genetické manipulaci, pravidelnému zásobení bez sezónního kolísání a rychlému růstu mikroorganismů na levném médiu. Mikrobiální enzymy jsou také stálejší než jim odpovídající rostlinné a živočišné enzymy a jejich produkce je výhodnější a bezpečnější [4].

Produkci lipáz ovlivňuje celá řada vnějších faktorů, zejména teplota, pH prostředí, zdroje dusíku a tuků, koncentrace anorganických solí a dostupnost kyslíku [2].

Lipolytické enzymy přitahují v dnešní době značnou pozornost kvůli svému biotechnologickému potenciálu. Představují nejvýznamnější skupinu biokatalyzátorů pro biotechnologické aplikace, které je úspěšně využívají při syntézách biopolymerů, při produkci agrochemikálií a aromatických sloučenin. Mikroorganismy spolu s lipázami, které produkují, mohou být součástí detergentů, dále mohou být využity v sýrařství nebo při výrobě potravinových doplňků [4].

Stanovení lipolytické aktivity u některých bakterií je důležitý diagnostický test. Jako substrát je obvykle používán olivový olej nebo jiné přirozené tuky. Důležitým faktorem ovlivňujícím přesnost stanovení je příprava dokonale emulgovaného a stabilního substrátu. Enzymová reakce probíhá tím rychleji, čím jemněji je tuk rozptýlen ve vodné fázi [2].

Lipázy jsou schopny produkovat i některé druhy kvasinek a plísní [5].

2.1.2 Živočišné lipázy

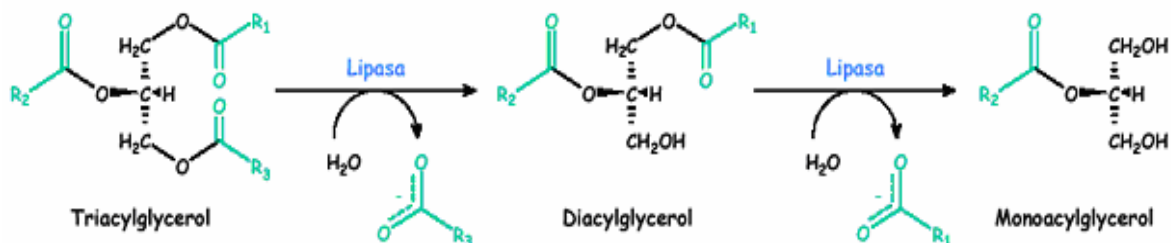
Nejdůležitější součástí tuků přijímaných v potravě jsou triacylglyceroly. Trávení a vstřebávání hydrofilních sloučenin (proteiny, sacharidy) je ve vodném prostředí organismu poměrně jednoduché, trávení a vstřebávání lipofilních složek je však procesem velmi komplikovaným [6].

Živočišné lipázy štěpí lipidy obsažené v přijímané potravě na absorbovatelnou formu. Většina tělních lipáz je vyráběna pankreatem, některé jsou však obsažené i ve slinách [7].

Trávení lipidů tedy začíná již v ústní dutině, kde lipázy obsažené ve slinách začínají katalyzovat hydrolýzu tuků. V ústech se tuky částečně emulgují, aby mohla snadněji proběhnout další fáze trávení [8].

Působením pankreatické lipázy (Obr. 1) ve dvanáctníku se nejprve odštěpí mastná kyselina vázaná na krajní skupině glycerolového zbytku a vznikne směs 1,2- a 2,3-diacylglycerolů. Ty se štěpí dále tak, že se opět oddělí jedna krajní skupina, a vznikají monoacylglyceroly.

Při obou reakcích se uvolní mastné kyseliny. V lačníku jsou přítomny intestinální lipázy, kterými se odštěpuje z malé části monoacylglycerolů poslední vázaná mastná kyselina, a vzniká molekula glycerolu [6].



Obr.1 Hydrolytické štěpení triacylglycerolu pankreatickými lipázami [9]

2.2 Lipidy

Lipidy, estery vyšších mastných kyselin a alkoholů nebo jejich derivátů, jsou důležitou součástí buněk a důležitou skupinou látek nerozpustných ve vodě, ale dobře rozpustných v polárních rozpouštědlech. Patří k významným složkám potravin a ve výživě člověka tvoří jednu z hlavních živin nezbytných pro zdraví a vývoj organismu [1, 10].

Základní součástí molekul lipidů jsou alifatické monokarboxylové kyseliny s dlouhým, až na výjimky nevětveným řetězcem, tvořeným 4 až 26 atomy uhlíku – mastné kyseliny. Molekuly přírodních mastných kyselin jsou tvořeny většinou sudým počtem atomů uhlíku. Mohou být nasycené nebo nenasycené, které převládají [1].

Některé mastné kyseliny, jako např. olejová nebo palmitová, jsou běžné v lipidech všech přírodních materiálů. Jiné mastné kyseliny jsou specifické pro mikroorganismy, rostliny nebo živočichy a jen pro určité rody, čeledi nebo řády. Mají proto význam v taxonomii [10].

2.2.1 β -oxidace mastných kyselin

Mastné kyseliny se nejčastěji odbourávají mechanismem zvaným β -oxidace (Obr. 2), kdy se z molekuly postupně odštěpuje acetyl-CoA a řetězec se zkrátí o dva atomy uhlíku [10].

Prvním krokem odbourání tuků je jejich hydrolytické štěpení, při kterém se přerušují esterové vazby a uvolňuje se glycerol a mastné kyseliny. Hydrolyzu katalyzují karboxylesterasy – lipázy. Lipázy jsou specifické pro příslušný organismus nebo jeho část, takže složení triacylglycerolů je jimi ovlivněno [1, 10].

Uvolněné mastné kyseliny se používají buď na resyntézu lipidů, nebo se odbourávají. Hlavní energeticky nejvýhodnější cestou je u živočichů, rostlin i mikroorganismů β -oxidace [1].

β -oxidace je cyklický pochod, který postupně zkracuje řetězec mastné kyseliny vždy o dva atomy uhlíku. Odbourávání se tedy děje po spirále nazývané podle svého objevitele Lynenova spirála. Proces β -oxidace se opakuje tak dlouho, dokud se celá mastná kyselina nerozloží na acetylové zbytky vázané na CoA. Vznikající acetyl-CoA může být dále oxidován v citrátovém cyklu nebo může vstoupit do biosyntetických dějů [1].

Mechanismus β -oxidace lze rozdělit na tři fáze [1]:

1. Aktivace mastné kyseliny [1]:

Převedením mastné kyseliny na makroergické thioestery se zvýší reaktivita mastných kyselin. Tuto aktivaci provádí lipáza - acetyl-CoA-synthetáza za součinnosti CoA a ATP [1].



V eukaryotických buňkách probíhá β -oxidace v matrix mitochondrií. Volné mastné kyseliny však neprocházejí mitochondriální membránou. Proto jejich aktivace probíhá v cytosolu na vnější straně mitochondriální membrány. Aktivovaná mastná kyselina je do mitochondrie přenesena po vazbě na derivát máselné kyseliny karnitin. Nejprve dojde k vazbě acyl-CoA na karnitin za uvolnění CoA do cytosolu. Acylkarnitin je transportován do mitochondriální matrix a acyl je přenesen na CoA z mitochondriální rezervy. Karnitin se poté vrací do cytosolu a acyl-CoA vstupuje do Lynenovy spirály [1, 11].

2. Vlastní β -oxidace [1]:

Při vlastní β -oxidaci dochází ke třem po sobě následujícím reakcím, které se opakují v každé obrátce spirály: dehydrogenaci, hydrataci, dehydrogenaci [1].

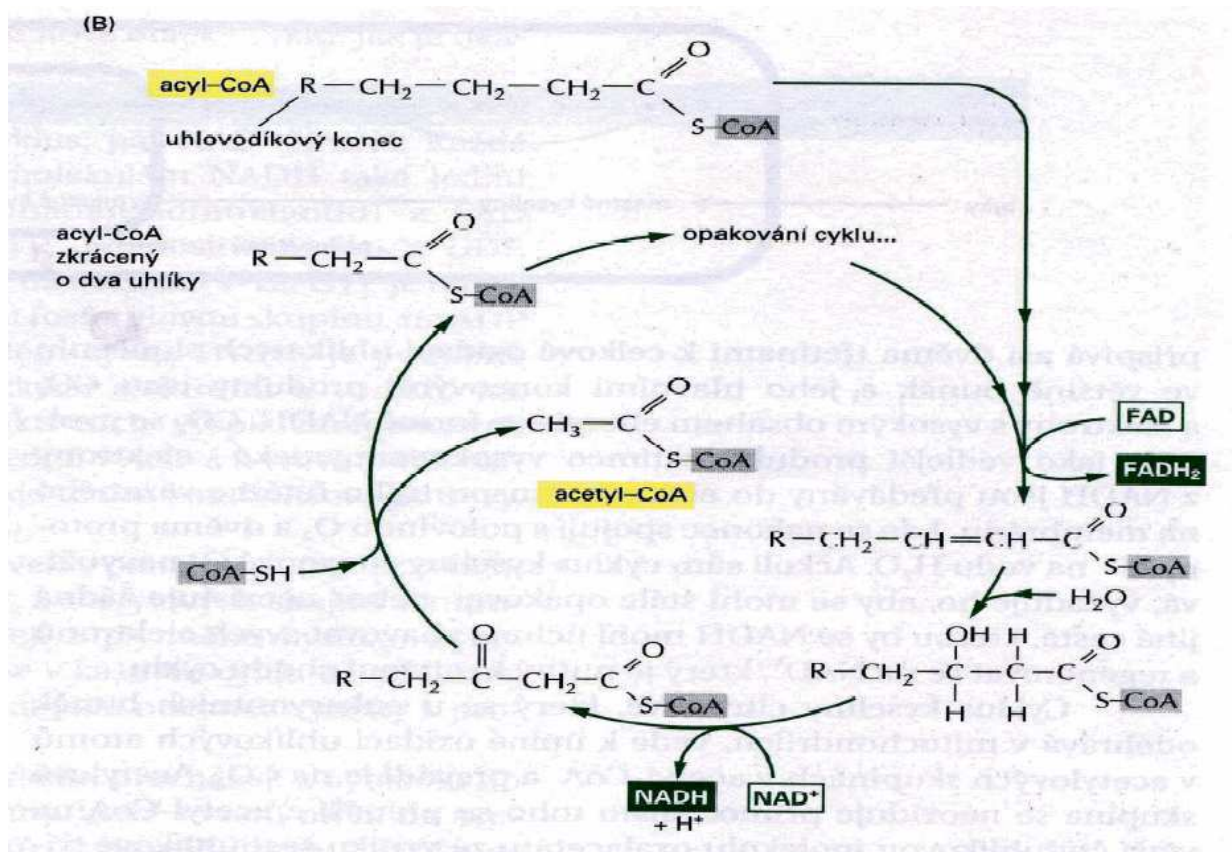
Při první dehydrogenaci, probíhající za účasti acyl-CoA-dehydrogenázy, dochází ke vzniku dvojné vazby mezi C_{α} a C_{β} . Následně dochází k adici molekuly vody na vytvořenou dvojnou vazbu za tvorby β -hydroxyacyl-CoA. Reakce je katalyzovaná enoyl-CoA-hydratázou. Ve třetím kroku, katalyzovaném 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenázou, vzniká β -oxoacyl-CoA [1].

3. Thiolysa:

Vzniklý β -oxoacyl-CoA je jako thioester velmi labilní a může se thiolyticky štěpit, přičemž mezi C_{α} a C_{β} původní mastné kyseliny vstoupí nová molekula CoA a z řetězce se uvolní dvouuhlíkatá jednotka jako acetyl-CoA. Tento krok je katalyzovaný β -oxoacyl-CoA-thiolázou [1, 11].

β -oxidace je pro buňku velmi významný proces, umožňující získat mnoho molekul ATP. Postupně odštěpované molekuly acetyl-CoA mohou ihned vstoupit do citrátového cyklu. Při jednom proběhnutí cyklu β -oxidace se také získává jedna molekula FADH_2 a jedna molekula NADH, jejichž reoxidací v dýchacím řetězci lze získat 5 molekul ATP. Dalších 12 molekul ATP se vytvoří při aerobním odbourávání odštěpené molekuly acetyl-CoA [1].

Méně běžná je tzv α -oxidace, kdy se odštěpuje karboxyl a řetězec se zkrátí o jeden atom uhlíku, přičemž vznikají mastné kyseliny s lichým počtem atomů uhlíku. Popsána byla také ω -oxidace, kdy se nejprve oxiduje methylová skupina na konci řetězce a tvoří se dikarboxylové kyseliny [10].



Obr. 2 Průběh β-oxidace [12]

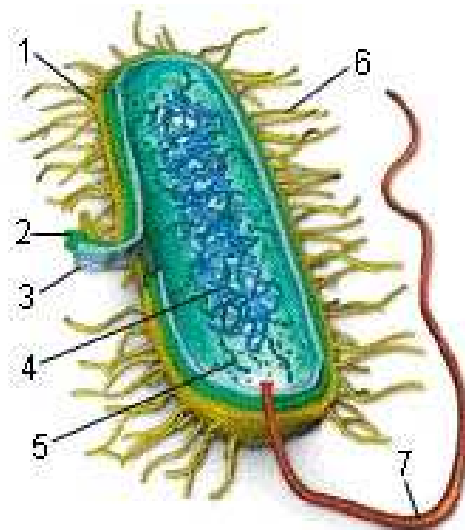
2.3 Mikroorganismy vykazující lipolytickou aktivitu

Lipázy jsou enzymy produkované bakteriemi, kvasinkami i plísněmi. Většina mikrobiálních lipáz patří mezi extracelulární enzymy. Většina mikroorganismů může produkovat více než jeden typ extracelulárních lipáz, které hydrolyzují různě dlouhé řetězce mastných kyselin [2].

2.3.1 Bakterie

Bakterie jsou prokaryotické organismy (Obr. 3), jejichž velikost se pohybuje v rozmezí od 1 μm do 5 μm délky a od 0,2 μm do 1 μm šířky. Buňky bakterií se rozmnožují příčným dělením, pučením, pomocí konidií a hormogonií. Po rozdělení mohou buňky zůstat ve shlucích a tvořit charakteristická seskupení. Některé bakterie mohou tvořit termorezistentní spory, tzv. endospory (spory uvnitř buněk), mikrocyty (klidové buňky obalené rezistentním obalem), nebo konidie odškrabované z vláken [13].

Tvarově nejsou bakterie příliš rozmanité, rozeznávají se bakterie kulovité tzv. koky a bakterie tyčinkovité. Kulovité bakterie se mohou vyskytovat samostatně nebo jako diplokoky, tetrády, streptokoky, stafylokoky a sarciny. Tyčinkovité bakterie mohou být válcovité rovné (bakterium, bacillus), rohlíčkovitě zahnuté (vibrio), spirálově stočené a neohebné (spirillum) nebo spirálovitě s mnoha závity a ohebné (spirochéta) [13].



Obr. 3 Prokaryotická buňka [14]

1 – pouzdro, 2 – buněčná stěna, 3 – cytoplazmatická membrána, 4 – jaderný materiál,
5 – ribozomy, 6 – fimbrie, 7 – bičík

2.3.1.1 Bakterie s lipolytickou aktivitou

Rod: *Bacillus*

Říše: Bacteria

Třída: Bacilli

Rod *Bacillus* byl objevený v 70. letech 19. století Ferdinandem Cohnem a Robertem Kochem. Všudypřítomnost a rozmanitost těchto bakterií v přírodě, mimořádná rezistence jejich endospor vůči chemickým a fyzikálním vlivům, cyklus tvorby endospor, produkce antibiotik, toxicita jejich spor a patogenita druhu *Bacillus anthracis* jim zajistily stálý zájem až do dnešní doby. [15]

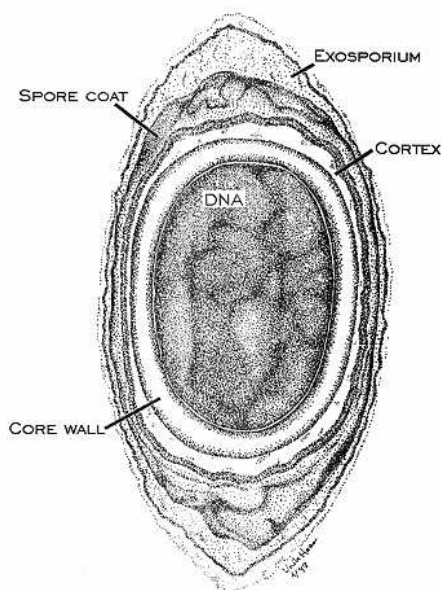
Druhů patřících do tohoto rodu je velké množství. Původní rozdělení tohoto rodu bylo změněno roku 2004 na základě analýzy ssRNA a vznikly nové čeledi a rody. Tato technika také odhalila fylogenetické vztahy. Překvapivě ukázala příbuznost některých druhů rodu *Bacillus* s některými nesporogenními druhy na úrovni řádu a čeledi. Naopak jiní zástupci rodu *Bacillus* byli zařazeni do nových čeledí v rámci řádu *Bacillales* [15].

Rod *Bacillus* je reprezentován širokou skupinou tyčinkovitých grampozitivních bakterií. Zástupci rodu bacilů jsou obligátně aerobní, případně fakultativně nebo obligátně anaerobní [16].

Jedná se především o mezofily, kteří rostou při teplotách mezi 30°C – 45°C. Někteří jsou ale také termofilní s teplotním optimem růstu vyšším než 65°C, jiní se řadí mezi psychrofilny rostoucí při teplotách kolem 0°C. Mohou růst ve velkém rozmezí pH od 2 do 11. Při optimálních podmínkách je generační doba kolem 25 minut [15].

Většina zástupců je pohyblivá pomocí laterálních nebo peritrichálních bičků [16].

V buňce vytváří vždy jen jednu endosporu (Obr. 4). Spory se vyznačují velkou odolností k vysokým teplotám, záření a jiným nepříznivým podmínkám [16].



Obr. 4 Endospora [15]

Velká část bacilů patří mezi saprofyty, osídlující především půdní prostředí, někteří zástupci jsou vzhledem k produkci toxinů patogenní [16].

Druhy rodu *Bacillus* hrají významnou roli ve vztahu ke člověku. Některé druhy jako *B. subtilis* (Obr. 5), *B. amyloliquefaciens* a *B. lichemiformis* jsou využívány v průmyslu na produkci enzymů, rozpouštědel a dalších molekul. Produkují také řadu antibiotik, která působí proti širokému spektru mikroorganismů. Např. bacitracin a gramicidin působí proti grampozitivním bakteriím, colistin a polymyxin proti gramnegativním bakteriím nebo mycobacillin proti plísním. Další jako *B. thuringiensis* a *B. sphaericus* jsou využívány na ochranu zemědělských plodin kvůli své insekticidové aktivitě, zatímco *B. mycoides* má schopnost podporovat růst rostlin. V Itálii a Vietnamu jsou *B. subtilis*, *B. clausii* nebo *B. alcalophilus* využívány jako bakteriální terapeutika na žaludeční nevolnosti [15, 17].

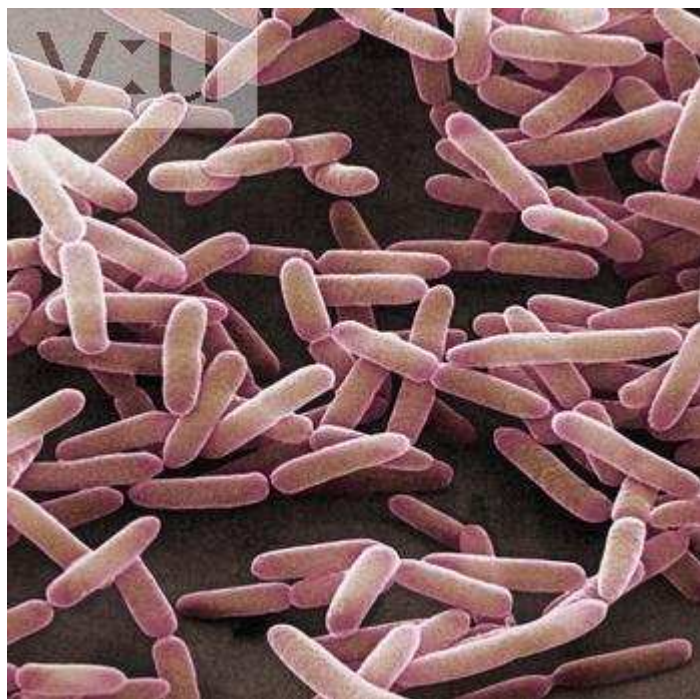
Na druhé straně *B. anthracis* nebo *B. cereus* jsou patogenní pro člověka i zvířata. *B. cereus* také kontaminuje potraviny a je příčinou jejich kažení. Rezistence spor k vysušení mu umožňuje přežít dlouhou dobu i ve vysušených potravinách (obiloviny, mouka) [16, 17].

Bacily mají bohaté enzymové vybavení, takže mohou rozkládat nejrůznější organický materiál. Většina druhů má velmi aktivní amylolytické, pektolytické a proteolytické enzymy [16, 18].

Lipolytickou aktivitu vykazují *B. subtilis*, *B. termocatenules*, *B. stearothermophilus*, *B. pumilus* a *B. alcalophilus* [3].

V přírodě nejrozšířenější je *B. subtilis*. Tvoří malé peritrichální buňky a produkuje několik polypeptidových antibiotik [16].

Extracelulární lipázy druhu *B. subtilis* byly purifikovány z růstového prostředí srážením síranem amonným a následnou sloupcovou chromatografií na phenyl-Sepharose a hydroxyapatitu. Purifikované lipázy mají silnou tendenci vytvářet agregáty [3].



Obr. 5 *Bacillus subtilis* [19]

Rod: *Pseudomonas*

Říše: Eubacteria

Třída: Gammaproteobacteria

Rod *Pseudomonas* patří mezi chemoorganotrofní nefermentující striktně aerobní gramnegativní tyčinkovité bakterie [13].

Jako zdroje uhlíku a energie využívají *Pseudomonas* nejrozmanitější organické sloučeniny. Jejich nutriční přizpůsobivost je dána přítomností řady indukčních operonů, které jsou v případě potřeby přepisovány, a tak zajišťují buňce přítomnost širokého spektra často neobvyklých enzymů. Široké enzymové vybavení způsobilo, že se některé druhy tohoto rodu používají pro průmyslové oxidace různých organických sloučenin. Významnou vlastností je výrazná proteolytická a lipolytická aktivita (*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. putina*, *P. fragi*) [13, 16, 18].

Na purifikaci a popis lipáz produkovaných *Pseudomonas* sp. je zaměřena řada výzkumů. Byla sledována produkce exo- a endolipáz produkovaných *P. fragi* CRDA 037 při růstu na syrovátce. Srážením síranem amonným byly získány částečně purifikované lipázové extrakty [3].

Rod: *Streptomyces*

Říše: Eubacteria

Třída: Actinobacteria

Zástupci rodu *Streptomyces* jsou chemoorganotrofní obligátně aerobní mikroorganismy [16].

Jsou vynikajícími producenty antibiotik (streptomycin, tetracykliny), produkují též enzymy degradující polymery – lipázy (*S. cinnamomeus*), proteázy, pektinázy, xylanázy, dextranázy a amylázy [16, 18].

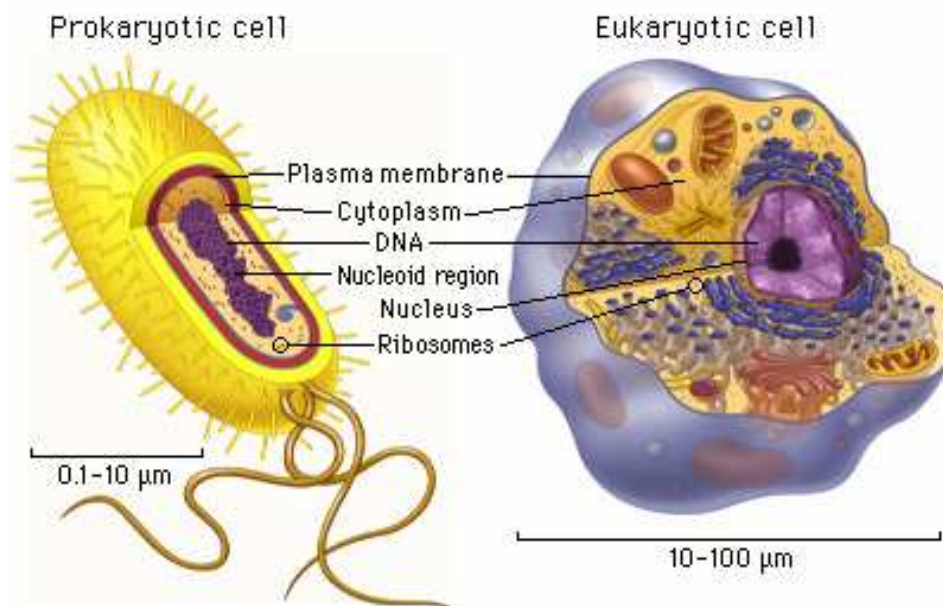
2.3.2 Houby

Houby jsou zástupci eukaryotických organismů, které mají v porovnání s bakteriemi složitější stavbu buněk (Obr. 6). Jedná se o heterotrofní organismy bez plastidů, proto u nich neprobíhá fotosyntéza [13].

Jejich tělo, stélka, může být jednoduchá i vícebuněčná, jednojaderná i vícejaderná. Buňky vláknitých hub tvoří typické řetězce, které se označují jako hyfy. Hyfy se rozrůstají a tvoří mycelium, které může být septy nebo bez sept. U kvasinek je možné pozorovat tzv. pseudomycelium tvořené pučícími, navzájem spojenými buňkami [13].

Ve vztahu ke zdroji živin houby vystupují jako saprotrofové živící se odumřelým materiálem organického původu, nebo paraziti rostlin, živočichů, hub i prvoků. Houby jsou také schopny vstupovat do symbiózy s jinými organismy [20].

Z hlediska mikrobiologie mají význam skupiny hub, které se vyskytují ve vodách povrchových, pitných a v odpadních kalech, sedimentech a exkrementech, či jsou součástí těl živočichů. Dále jsou významné skupiny hub, které jsou původci onemocnění, či mají biotechnologické využití [13].



Obr.6 Porovnání prokaryotické a eukaryotické buňky [21]

2.3.2.1 Kvasinky s lipolytickou aktivitou

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní mikroorganismy náležející mezi houby. Český název dostaly pro schopnost většiny druhů zkvašovat monosacharidy a některé disacharidy, případně i trisacharidy na ethanol a oxid uhličitý [18].

Rod: *Yarrowia van der Walt et von Arx*

Říše: Fungi

Třída: Ascomycetes

Yarrowia lipolytica je heterothalická askosporogenní kvasinka, která za podmínek vegetativního růstu může vytvářet pseudomycelium, případně i septované mycelium [16, 18, 22].

Je využívána zejména pro schopnost produkce extracelulárních enzymů (proteázy, lipázy). Významnou vlastností je také produkce ubichinonu Q₈. *Y. lipolytica* byla také úspěšně použita pro produkci biomasy z n-alkanů a produkci kyseliny citrónové ve spojitosti s růstem na těchto uhlovodících [16, 18, 22].

Rod: *Candida* Berkhout

Říše: Fungi

Třída: Ascomycetes

Rod *Candida* Berkhout obsahuje na 160 druhů kvasinek, které se vyznačují rozmanitými tvary buněk – kulovitými, elipsoidními, cylindrickými, lahvovitými, trojhrannými atd. [18, 23].

Lipázy produkované druhy rodu *Candida* sp. patří mezi enzymy nejvíce využívané pro biokatalytické účely. Obrovské možnosti využití má především *C. antarctica* [24].

C. antarctica byla izolována z permanentně zamrzlého jezera Vanada v Antarktidě. Díky množství využití lipáz produkovaných *C. antarctica* a jejich velkému významu

pro biokatalýzy byla jejich produkce optimalizována a byly popsány a purifikovány dva enzymy (lipáza A a B) [24].

Lipolytickou aktivitu vykazuje také *Candida rugosa* Diddens at Lodder [23].

C. rugosa produkuje dvě odlišné lipázy, k jejichž separaci byla nejprve využita extrakce ethanolem a poté vysokorozlišovací iontově výměnná sloupcová chromatografie. Při komerční přípravě lipáz rodu *Candida* byly identifikovány dokonce tři odlišné formy lipolytických enzymů [3].

2.3.2.2 Plísňe s lipolytickou aktivitou

Jako plísňe se označují mikroskopické vláknité eukaryotní mikroorganismy, náležející mezi houby [18].

Rod: *Aspergillus*

Říše: Fungi

Třída: Ascomycetes

Mezi nejrozšířenější druhy patří *Aspergillus niger*, který vytváří rychle rostoucí hrubě zrnité kolonie hnědočerné až černé barvy, jejichž spodní strana je světlá nebo žlutá [22].

A. niger má bohaté enzymové vybavení. Lipolytickou aktivitu vykazují kromě tohoto druhu také *A. oryzae*, *A. terreus*, *A. carneus* a *A. nidulans* [3].

Lipázy produkované druhem *A. niger* byly purifikovány srážením síranem amonným, hydrofobní interakcí, gelovou filtrací, iontově výměnnou chromatografií a adsorpcí na hydroxylapatit [3].

Purifikace lipáz byla provedena i u *A. terreus* metodou, skládající se ze srážení lipáz síranem amonným a acetonem, gelové filtrace a iontově výměnné chromatografie [3].

Lipázy *A. carneus* byly purifikovány využitím jednoduchého dvoukrokového procesu zahrnujícího srážení síranem amonným a hydrofobní chromatografií na octyl-Sepharose [3].

Rod: *Mucor*

Říše: Fungi

Třída: Zygomycetes

Rod *Mucor* vytváří na různých materiálech vláknitý bělavý porost s kulovitými nahnědlými sporangii [18].

Lipolytickou aktivitu vykazuje *M. javanicus*, produkující také amylolytické enzymy a zkvašující sacharidy za anaerobních podmínek na ethanol a oxid uhličitý. Z tohoto důvodu se v Japonsku a Číně používá pro výrobu alkoholických nápojů ze sóji [18].

Extracelulární glykoproteinové lipázy částečně purifikované ve dvou formách, A a B, produkuje *M. miehei* [3].

Rod: *Penicillium*

Říše: Fungi

Třída: Ascomycetes

Rod *Penicillium* je nejrozsáhlejším a nejrozšířenějším rodem plísní, obsahující asi 150 druhů. Patří mezi vláknité houby vyskytující se v půdě, vzduchu a na nejrůznějších potravinách [16, 22].

Lipolytickou aktivitu vykazuje *P. roqueforti*, *P. camembertii*, *P. citrinum* a *P. cyclopium* [3].

Lipázy druhu *P. camembertii* U-150 byly purifikovány na čtyři aktivní frakce procesem zahrnujícím srážení ethanolem, frakcionací síranem amonným a sloupcovou chromatografií na hydroxyapatitu a aminoocetyl-Sepharose [3].

Rod: *Rhizopus*

Říše: Fungi

Třída: Zygomycetes

Rod *Rhizopus* patří mezi vláknité houby, které se nacházejí v půdě, na hnilých ovoci a zelenině, starém chlebu a výkalech zvířat [25].

Lipolytickou aktivitu lze sledovat u druhů *R. oryzae*, *R. niveus*, *R. delemar*, *R. japonicus*, *R. arrhizus* a *R. chinensis* [3].

Při studiu tří lipáz, A, B a C, produkovaných druhem *R. delemar*, byla nejprve odfiltrována mycelia z živného média. Promytá a usušená mycelia byla rozmačkána s pískem promytým kyselinou a extrahována acetátovým pufrům. Koncentrovaný protein byl poté purifikován na sloupci Ultrogelu a Sephadexu G-150 [3].

Rod: *Rhizomucor*

Říše: Fungi

Třída: Zygomycetes

Rod *Rhizomucor* je vláknitá houba vyskytující se v půdě, na hnilých ovoci a zelenině. Zahrnuje tři druhy – *R. pusillus*, *R. miehei* a *R. variabilis* [25].

Lipázy produkované druhem *R. miehei* byly purifikované srážením síranem amonným a iontově výměnnou chromatografií na phenyl-Sephadexu a DEAE-Sepharose [3].

2.4 Technologické využití lipolytických enzymů

Poptávka po enzymech v posledních letech stále roste. Enzymy jsou využívány v různých odvětvích průmyslu, jako je průmysl farmaceutický, kosmetický nebo potravinářský [26].

Lepší porozumění enzymům a jejich katalytickému chování spolu s pokrokem molekulárního inženýrství vedlo v posledních letech k novým možnostem využití různých typů enzymů jako například proteáz, amyláz, oxidáz, glykosidáz, celuláz nebo lipáz [26].

Pokud jde o poslední jmenované, lipázy jsou využívány v průmyslu farmaceutickém, potravinářském nebo v průmyslu čistících přípravků. Jejich výhodou oproti klasickým chemickým katalyzátorům je jejich lepší substrátová specifita a fungování v mírných reakčních podmínkách. Jejich možnosti využití navíc rozšiřuje i skutečnost, že si ponechávají svoji aktivitu i v organických rozpouštědlech. Ve farmaceutickém průmyslu mohou být lipázy využívány na rozlišení racemických směsí nebo jako biokatalyzátory při syntézách chirálních meziproductů. V potravinářském průmyslu jsou tyto enzymy využitelné hlavně v procesech změny struktury olejů a tuků, ve kterých lipázová regiosektivita a typosektivita poskytují produkci specifických triacylglycerolů s předem určeným složením a rozložením mastných kyselin. Lipázy jsou také využívány v lipolytických reakcích, při kterých dochází k přenášení lipofilní části na hydrofilní, jako jsou cukry, aminokyseliny a proteiny nebo fenolické sloučeniny [26].

2.4.1 Lipázami katalyzované reakce

Hlavním problémem, který musí být v reakcích katalyzovaných lipázami překonán, je kombinace lipofilního substrátu s hydrofilním. Aby se dosáhlo reakcí s dostatečnou rychlostí a výtěžností a aby se překonal velký rozdíl v odlišné polaritě a afinitě substrátů k rozpouštědlu, musely být zváženy různé reakční parametry [26].

Vliv rozpouštědla

Nejlepším způsobem provedení reakce je její uskutečnění v podmínkách bez rozpouštědla. Pokud to však není možné, má volba vhodného rozpouštědla rozhodující význam. Musí být vybráno takové rozpouštědlo, které je netoxické, ve kterém enzym zůstane aktivní a nebude rychle inaktivován. To je případ rozpouštědel s hodnotou $\log P > 3$, například n-hexanu nebo n-heptanu. Tato rozpouštědla jsou využívána v reakcích jako je lipázami katalyzovaná restrukturalizace olejů a tuků, při kterých vznikají nové tuky s lepšími fyzikálními a/nebo nutričními vlastnostmi. Obvykle však tato rozpouštědla nejsou vhodná při reakcích, ve kterých se dva substráty značně liší svoji polaritou. Příkladem, objasňujícím tento problém, je enzymově katalyzovaná syntéza esterů cukru a tuku, ve které se hydrofilní molekula musí slučovat s lipofilní částí. V tomto případě není rozpouštědlo s hodnotou $\log P > 3$ vhodné, protože rozpustnost cukru v tomto médiu je malá nebo nulová. Musí být proto použita rozpouštědla s nižší hodnotou $\log P$ jako například acetonitril, terc-butanol nebo ethyl-methylketon [26].

Při výběru rozpouštědla je také rozhodující zvážení jeho toxicity. Příkladem může být pyridin, který byl dříve často používán jako rozpouštědlo při různých reakcích. I když užití tohoto média vede často k lepší výtěžnosti a rychlosti reakce, je snahou jej omezovat právě kvůli toxicitě [26].

Byly také hledány různé způsoby, jak zlepšit aktivitu enzymu v organických rozpouštědlech. Na zlepšení enzymové aktivity je možné využít například aditiva. Jako první byla provedena adice solí, především chloridu draselného, který ve výsledku zvětšil lipázovou

aktivitu v organických rozpouštědlech. Zlepšení lipázové aktivity bylo zjištěno také užitím Crownových etherů [26].

Iontové roztoky jako rozpouštědla

V současné době je zaznamenán vzrůstající zájem o iontová rozpouštědla užívaná jako média pro biokatalycké procesy. Iontová rozpouštědla jsou netěkavá a tepelně stabilní a navíc jejich hydrofobní/hydrofilní rovnováha může být přizpůsobena povaze základních kationů a anionů. Jsou také považovány za netoxická rozpouštědla. Iontové roztoky jsou přednostně používány při rozpouštění mnoha polárních a nepolárních molekul. Dovolují při lipázové katalýze dobrý kontakt mezi různě polárními substráty. Enzymy v těchto médiích také často vykazují, ve srovnání s běžnějšími organickými rozpouštědly, rostoucí selektivitu a stabilitu. Příkladem může být využití iontových rozpouštědel v lipázami katalyzovaných syntézách esterů cukrů a tuků nebo v lipolýze fenolických sloučenin [26].

Užívání iontových rozpouštědel v průmyslových biokatalytických reakcích je však doposud limitováno nejen vysokou cenou těchto sloučenin, ale také jejich použitelností pouze při produkcích využívajících vysokých objemů přidaných molekul [26].

Úprava lipáz a vliv vodní aktivity

Další významné parametry reakcí katalyzovaných lipázami se týkají samotných enzymů, především jejich úpravy. Během posledních deseti let se zlepšily různé techniky na úpravu lipáz, především v oblasti enzymové imobilizace, chemických modifikací nebo chemickém inženýrství. Cílem je modifikovat vybrané lipázy, zlepšit jejich vlastnosti jako je katalytická aktivita, substrátová specifita a stabilita (v určité oblasti pH nebo teploty) a možnost recyklace [26].

Nejdůležitějším parametrem v enzymově katalyzovaných reakcích je teorie optimální termodynamické vodní aktivity enzymu (a_w). Určuje efekt působení vody v hydrolytické rovnováze a rozložení vody mezi různé fáze, které mohou o navázání vody soutěžit. Katalytická aktivita enzymů je pravděpodobně ovlivněna jejich hydratačním stavem a a_w , které určují neměnní se optimum, zatímco jiné aspekty systému jsou změněny. Proto jsou rychlosti enzymových reakcí a výtěžky reakcí lépe popsány a předvíhány u vodní aktivity než u obsahu vody v médiu. Rozvoj esterifikací, interesterifikací nebo transesterifikací katalyzovaných lipázami vyžaduje studium vlivu vodní aktivity na katalyzovanou reakci. Studie tohoto parametru určuje, zda je na enzym vázaný dostatek vody, který by zabezpečil jeho optimální aktivní strukturu. Na druhé straně nadbytek vody u lipázové katalýzy může mít za následek konkurenční hydrolytické reakce. Studium obsahu vody musí být provedeno tak, aby definovalo optimální reakční podmínky, které dovolí enzymu katalyzovat přenos acylu a zabrání hydrolýze. Optimálnější hodnoty a_w jsou pro většinu lipáz mezi 0,25 - 0,45, což odpovídá obsahu vody od 0,5 % do 1 % [26].

Vliv substrátu a typu reakce

Mnoho dalších parametrů může přímo ovlivnit rychlost a výtěžek esterifikace. Enzymově katalyzované reakce jsou reversibilní, často je ale výhodné posunout rovnováhu reakce směrem k syntéze. To se dá provést různými způsoby. Prvním způsobem je přizpůsobení molárního poměru mezi dvěma reagujícími sloučeninami tak, aby byl nadbytek jednoho z těchto substrátů. V těchto podmínkách je upřednostněna esterifikace a reverzní hydrolýza je omezena. Obecně platí, že když se připojuje lipofilní podíl na hydrofilní, je obvykle lipidový

substrát ten, který je v nadbytku. Povaha donoru acylu jako takového také ovlivňuje efektivnost reakce. Například použití volných mastných kyselin v přímé esterifikaci vede k tvorbě vody. Ta musí být kontinuálně odstraňována, aby byla reakce posunuta směrem k tvorbě esteru a vyhnulo se tak reverzní hydrolýze. Odstranění vody se děje vypařovacími a pervaporačními metodami, adsorpcí na iontoměničové pryskyřice nebo užitím molekulových sít [26].

Hlavní problém v lipázami katalyzovaných lipolytických reakcích spočívá ve velmi rozdílné polaritě dvou reagujících substrátů. Proto jsou některé postupy zlepšující rychlost a výtěžnost založené na předběžné modifikaci jednoho ze substrátů. Je tak regulována jeho polarita a kontakt s jiným substrátem a enzymem ve vybraném organickém médiu. Například hydrofilní substrát může být chemicky modifikován v předběžném kroku. Dojde tak ke snížení jeho hydrofilní povahy a následkem toho se zvětší jeho rozpustnost ve vybraném rozpouštědle. V literatuře jsou popsány různé způsoby modifikace, které jsou užívané především při syntéze derivátů esterů cukrů a tuků. Nejběžnější je předběžná alkylace hydrofilní sloučeniny, jejímž výsledkem je vytvoření etherové vazby [26].

I další parametry však mohou ovlivnit efektivitu reakce. Důležitý je vliv experimentálních podmínek jako je teplota, tlak, množství enzymu, povaha bioreaktoru [26].

2.4.1.1 Příklady lipázami katalyzovaných reakcí nepřírodních substrátů

Kromě využívání reakcí katalyzovaných lipázami v oblasti restrukturalce olejů a tuků jsou lipázy také používány při esterifikacích, kterých se účastní nepřírodní substráty [26].

Syntéza mastných esterů kyseliny askorbové

Estery kyseliny askorbové, široce používané v potravinářském průmyslu jako antioxidanty, jsou ve srovnání s nemodifikovanou kyselinou askorbovou (vitamin C) zvýhodněné díky zvýšené rozpustnosti v olejích. Výhoda biokatalýzy oproti chemické katalýze může být ukázána na produkci 6-O-palmitoyl-L-askorbové kyseliny. Chemický proces zahrnuje kyselé katalyzovanou esterifikaci askorbové kyseliny, která vede k vytvoření směsi produktů. Naopak, enzymově katalyzovaná syntéza umožňuje tvorbu pouze jednoho produktu. Pokud jde o typ enzymu, reakce jsou většinou prováděny výhradně s imobilizovanými lipázami, produkovanými především druhy *Candida antarctica B* a *Rhizomucor mihei* [26].

Vzácně se používají při lipolýze askorbové kyseliny i jiné lipázy, např. druhu *Bacillus stearothermophilus SB1*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida rugosa* [26].

Dalším příkladem lipázy, kterou je možné využít při esterifikaci askorbové kyseliny, je lipáza produkovaná druhem *Burkholderia cepacia* [26].

Na průběh reakce má vliv molární podíl substrátu. S ojedinělými výjimkami jsou reakce vedeny s nadbytkem lipofilního substrátu z důvodu posunutí rovnováhy směrem k syntéze [26].

Různorodé výsledky reakcí byly získány v různých reakčních podmínkách (např. povaha rozpouštědla, povaha donoru acylu) a zdůrazňují důležitost enzymového prostředí na účinnost reakce. Rozhodující význam při dosažení uspokojivého konečného výtěžku mají zejména odstranění vedlejších produktů a kontrola vodní aktivity/obsahu vody v systému. Tvorba vedlejších produktů je závislá na povaze použitého donoru acylu, kterým může být volná mastná kyselina, alkylester nebo ireverzibilní donor acylu, jako je vinylster. Důležité je potom monitorování tvorby těchto vedlejších produktů, které jsou nejčastěji vychytávány (např. adsorpce vody na molekulová síta) nebo odstraněny z reakční směsi [26].

Vychytávání vody molekulovými sítěmi je také efektivní při dosahování uspokojivé reakční rychlosti a konečného výtěžku. Použití těchto sítí je důležité na optimální kontrolu tvořící se vody a jejího vlivu na vodní aktivitu. Obecně se ale striktní kontrola vodní aktivity jeví efektivnější než adsorpce vytvořené vody na molekulová síta [26].

Příklady syntézy esterů cukru nebo kyselých esterů cukru katalyzované lipázami

Lipolýza cukerných substrátů je příkladem modifikace, která může být provedena s hydrofilním substrátem před esterifikací donorem mastného acylu v lipázami katalyzované reakci a která zlepšuje rozpustnost tohoto cukru ve vybraném rozpouštědle [26].

Příkladem předběžné chemické hydrofobizace hydrofilního substrátu je lipolyzace dvou cukerných kyselin, glukuronové a chinonové [26].

Stejně jako při lipolýze vitamínu C, tak i při lipolýze derivátů cukru, je pro dosažení uspokojivých výsledků nezbytná kontrola obsahu vody a vodní aktivity [26].

Při syntéze esterů cukru se můžeme setkat i s použitím ionizovaných kapalin. Kim et al. (2003) jako první zhodnotili výhody iontového rozpouštědla oproti klasickým organickým rozpouštědlům při esterifikaci 6-O-chráněných cukrů vinylacetátem použitím lipázy *Candida rugosa* [26].

Reakce probíhající v iontových rozpouštědlech byly rychlejší a dávaly větší výtěžky než stejné reakce, probíhající v organických rozpouštědlech [26].

Lipolýza aminokyselin a jejich derivátů

Aminokyseliny a jejich deriváty jsou také nepřírodními substráty, které mohou být hydrofobizovány lipázami. Řada publikací se zabývá enzymatickou syntézou N-acylamínokyselin, které se také označují jako lipoaminokyseliny. Lipoaminokyseliny jsou povrchově i biologicky aktivní, čehož se využívá v kosmetických aplikacích. Obvykle se tyto sloučeniny získávají Schotten-Baumanovým procesem, který vyžaduje použití chloridů mastných kyselin a organických rozpouštědel [26].

Při syntézách těchto lipoaminokyselin byly popsány i některé případy použití enzymů, zejména lipáz. Problém lipolýzy aminokyselin nebo jejich derivátů enzymovou cestou je ještě složitější než v případě substrátů cukru. Kromě nízké rozpustnosti v organických rozpouštědlech vykazují aminokyseliny amfoterní vlastnosti. Ty musejí být překonány v případě, že se uvažuje o esterifikaci nebo amidaci jejich α -aminoskupiny nebo karboxylové skupiny. Aminokyseliny mají také různá místa možné lipolyzace. V případě lipolýzy postranních skupin mohou být mastné kyseliny použity jako donor acylu pro acylaci hydroxy, amino nebo thiolové skupiny za vzniku O-, N- nebo S-acyl lipolyzovaných sloučeniny. Na druhé straně lipolýza může nastat také na boční karboxylové skupině vytvořením buď mastného alkoholu nebo aminu [26].

Pro lipolýzu aminokyselin je také velmi důležité zvolit vhodnou kombinaci enzymu a rozpouštědla [26].

Mezi reakce, při kterých vznikají lipolýzou deriváty aminokyselin, může být zařazena také syntéza mastných esterů pyroglutamové kyseliny. Pyroglutamová kyselina je zbytek aminokyseliny, vznikající při kondenzaci omega karboxylových funkčních skupin glutamové kyseliny se svými aminoskupinami. Její deriváty jsou velmi atraktivní pro kosmetické aplikace především kvůli schopnosti hydratovat. Díky ní je možné udržovat vysoký obsah vlhkosti v rohovité vrstvě kůže [26].

Tyto reakce aminokyselin mohou být rozšířeny i na makromolekuly, jakými jsou proteiny. Příkladem může být lipázami katalyzovaná lipolýza izolace sojových proteinů. Tato reakce byla provedena při 60 °C s použitím i bez použití rozpouštědla. Při reakci byly využity lipázy produkované druhem *Mucor miehei* nebo *Rhizopus arrhizus*, připojující různě dlouhé mastné kyseliny a měnící tak délku řetězce [26].

2.4.1.2 Lipázami katalyzovaná lipolýza derivátů fenolu

Doposud uvedené příklady ukázaly, že různé typy substrátů mohou inhibovat lipázy při jejich esterifikaci mastnými alifatickými skupinami. Pokud jde o lipolýzu komplexů molekul jako jsou polyfenoly nebo jejich deriváty, stále více publikací se zabývá použitím lipáz na jejich modifikaci tak, aby byly regulovány jejich biologické a fyzikálně-chemické vlastnosti [26].

Příklady lipolýzy chlorogenových a fenolových kyselin ze zeleného kávového extraktu

V závislosti na druhu kávy obsahují *Coffea arabica* nebo *Coffea robusta* 5,5 – 12 % fenolových kyselin v zeleném kávovém suchém materiálu. Jedná se o hydroxy nebo methoxy deriváty kyseliny skořicové. Vyskytují se buď volné nebo vázané ve formě esterů nebo diesterů 1,3,4,5-tetrahydroxycyklohexankarboxylové kyseliny a díky skupinám tvořícím tyto sloučeniny se označují jako chlorogenové kyseliny. Tyto sloučeniny, které jsou částečně rozpustné ve vodě, vykazují silnou antioxidační aktivitu a baktericidní vlastnosti. Někteří autoři se zabývali možností připojit lipolytický alifatický řetězec k chlorogenové kyselině, aby modifikovali její hydrofilně-lipofilní rovnováhu. Získali by tak novou molekulu, která by měla emulzní vlastnosti i antioxidační aktivitu. Ačkoli bylo obtížné dosáhnout chemické esterifikace karboxylové skupiny chlorogenové kyseliny různými mastnými alkoholy kvůli tepelné citlivosti fenolických kyselin a možné oxidaci pod určitou hodnotou pH, rozhodli se autoři provedením lipolýzy chlorogenové kyseliny zhodnotit možnosti biokatalýzy [26].

Příklady lipolýzy dalších fenolických sloučenin a jejich derivátů

V poslední době byla také publikována esterifikace fenolických kyselin, především kyseliny skořicové a jejích derivátů. Jako první studoval esterifikaci funkčních fenolů Buisma et al., s cílem získat antioxidanty s emulzními vlastnostmi, které by byly využitelné v hydrofobních médiích. Byly provedeny dva způsoby syntézy těchto nových druhů molekul. Prvním způsobem bylo doplnění práce, která pojednává o esterifikaci kyseliny skořicové mastnými alkoholy a která odpovídá studii o aromatických sloučeninách s primární hydroxylovou skupinou. Tato skupina by mohla být esterifikována alifatickými kyselinami. Pokud jde o esterifikaci derivátů kyseliny skořicové a kyseliny benzoové, byla esterifikace provedena s butanolem a s lipázami, produkovanými různými mikroorganismy (*Candida antarctica*, *Humicola lanuginosa*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas sp.* a *Geotrichum candidum*) [26].

Druhý způsob syntézy, studovaný těmito autory, sestával z lipolýzy fenolů nesoucích primární hydroxylovou skupinu na aromatickém jádře. Při esterifikaci hydroxytyrosolu a 3,5-di-t-butyl-4-hydroxybenzylalkoholu byla použita lipáza produkovaná druhem *Candida antarctica* [26].

Dále byla zkoumána schopnost lipázy produkované *Pseudomonas cepacia* katalyzovat transesterifikaci derivátů kyseliny skořicové různými alkoholy. V první studii byly tyto lipázy použity v transesterifikačních reakcích ethylhydroskořičanů s různými alkoholy,

např. n-butanolem, isoamylalkoholem, benzylalkohol n-oktanolem a 1-fenylethanolem. Mezi těmito testovanými alkoholy poskytoval pouze n-butanol transesterifikační produkt [26].

Zkoumána byla také schopnost lipázy *Candida antarctica* a *Rhizopus miehei* katalyzovat syntézu lipolytických derivátů přírodních antioxidantů odvozených od kyseliny skořicové. Hydrofilní charakter přírodních antioxidantů, jako jsou fenolické kyseliny, redukuje účinnost lipáz ve stabilizovaných olejích a tucích. Proto se autoři zabývali modifikací těchto antioxidantů esterifikací lipofilním řetězcem tak, aby změnil jejich rozpustnost v olejích a emulzích. První esterifikace kyseliny skořicové oktanolem byla uskutečněna jako modelová reakce s dvěma imobilními lipázami v různých netoxických rozpouštědlech jako je aceton, 2-methyl-2-propanol a 2-methyl-2-butanol. Bylo zjištěno, že výtěžek reakce je závislý na použitém rozpouštědle a použité lipáze. Dobrý výtěžek (více než 80 %) byl získán při použití lipázy *Candida antarctica*, zatímco *Rhizopus miehei* prokázal střední až nízkou účinnost závislou na použitém rozpouštědle [26].

2.4.1.3 Lipázami katalyzovaná lipolýza flavonoidů a jejich derivátů

Flavonoidy jsou přírodní molekuly, které se nacházejí v mnoha druzích rostlin. Jsou velmi atraktivní vzhledem ke svým silným antioxidačním vlastnostem. Nacházejí se v různých druzích ovoce a zeleniny nebo v bylinách. Avšak hydrofilní povaha těchto antioxidantů snižuje jejich antioxidační ochranu pro tuky a oleje. K modifikaci flavonoidů a zvýšení jejich lipofily se mohou využít například lipázy. Bylo provedeno několik lipázami katalyzovaných acylací flavonoidních glykosidů s využitím lipáz, které umožnily vysoce regioselektivní esterifikaci. V této studii byla provedena enzymatická acylace rutinu a naringinu mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem. Jako biokatalyzátory byly použity lipázy *Candida antarctica* a byly hodnoceny různé reakční parametry. Enzymově katalyzovaná acylační syntéza rutinu a naringinu byla již popsána, ale většina práce byla provedena s toxickými organickými rozpouštědly. Proto se autoři rozhodli testovat méně toxická média jako aceton, THF a terc-butanol na esterifikaci rutinu nebo naringinu použitím mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem [26].

Hodnocen byl také vliv vodní aktivity použitím terc-butanolu jako rozpouštědla. Nejvyšší přeměna byla zjištěna pro hodnotu vodní aktivity 0,11 nebo méně. Dále byly testovány parametry jako je vliv množství lipázy nebo efekt koncentrace dekanové kyseliny [28].

2.4.2 Lipázy aktivní při nízkých teplotách

S rostoucím zájmem o možnosti využití psychofilních mikroorganismů roste i zájem o lipázy produkované těmito mikroorganismy a jejich využití v průmyslových aplikacích [4].

Lipázy aktivní při nízkých teplotách nabízejí nové příležitosti biotechnologického využití, které je založené na jejich katalytické aktivitě při nízké teplotě [4].

Za chladu aktivní enzymy spolu s mikroorganismy, které je produkují, pokrývají široké spektrum biotechnologických aplikací. Jsou součástí detergentů, potravinových aditiv (fermentace, sýrařství, pekařství), účastní se biotransformací a genové exprese, mohou být alternativou mezofilním enzymům v pivovarnictví a vinařství, při výrobě sýrů a potravinových doplňků [4].

Medicínské a farmaceutické aplikace

Lipázy mají také význam ve farmacii při transesterifikacích a hydrolýzách. Hrají primární roli v produkci speciálních lipidů. Mají význam při modifikacích monoglyceridů a jejich následném využití jako emulgátorů ve farmacii [4].

Syntéza některých chemikálií

Některé průmyslově významné chemikálie vyráběné chemickými procesy z tuků a olejů mohou být produkovány i lipázami s mnohem větší a lepší specifitou. Využití průmyslových enzymů dovoluje technologům rozvíjet procesy, které jsou bližší procesům probíhajícím v přírodě [4].

Využití v potravinářství

V potravinářském průmyslu je nutné, aby reakce probíhaly při nízké teplotě tak, aby se vyhnulo změnám ve složkách potravy způsobeným nevhodnými vedlejšími reakcemi, které jinak probíhají za vyšší teploty. Proto se v potravinářském průmyslu využívají psychrofilní a psychotropní mikroorganismy produkující lipázy. Lipázy se staly nedílnou součástí moderního potravinářství. Používání enzymů, které zlepšuje tradiční chemické procesy výroby potravin, se rozvinulo v několika posledních letech [4].

Ačkoli jsou mikrobiální lipázy využívány při výrobě potravin, některé z nich, obzvláště lipázy produkovány psychotropními bakteriemi *Pseudomonas* sp. a několika formami *Rhizopus* sp. a *Mucor* sp., způsobují kažení mléka, mléčných produktů a ovoce [4].

Detergenty

Komerčně důležitým polem pro aplikaci hydrolytických lipáz je jejich přidávání do detergentů, které jsou používány především v domácnostech, průmyslových prádelnách a myčkách nádobí. Každý rok je na výrobu detergentů prodáno asi 1000 t lipáz. Používání za chladu aktivních lipáz v detergentech má velkou výhodu při praní ve studené vodě, při kterém se snižuje spotřeba energie a zabraňuje se trhání textilních vláken [4].

Enzymy tedy mohou snižovat zatížení životního prostředí detergenty, protože šetří energii tím, že umožňují umývání a praní při nižších teplotách [4].

Lipázy také rozkládají mastné skvrny za vzniku hydrofilních látek, které jsou lépe odstranitelné než podobné nehydrolyzované skvrny [4].

Jinou běžnou komerční aplikací detergentů je jejich využití v myčkách nádobí, při čištění odpadů ucpaných lipidy v potravinářství nebo při čištění odpadních vod vznikajících v průmyslu a domácnostech [4].

2.4.3 Termostabilní lipázy

Zájem o termostabilní lipázy vzrostl v biotechnologických aplikacích kvůli jejich nízkým produkčním nákladům a výrazně lepší stabilitě. Jsou také vhodné pro využití v řadě průmyslových zpracování [27].

V posledních dvou desetiletích výrazně vzrostla biotechnologická důležitost těchto lipáz, především kvůli jejich univerzálnímu katalytickému chování [27].

Nejvíce využívané jsou tyto lipázy v průmyslu detergentů při odstraňování tuků z prádeln, myček nádobí i při čištění zanesených odpadů [27].

2.4.4 Odlučovače tuků

Lipidy přítomné ve vodě jsou obtížně odstranitelné a rozložitelné, protože jsou těžko rozpustné ve vodě. Metabolismus lipidů zahrnuje několik kroků. Lipidy jsou nejprve emulgovány a rozloženy na glycerol a mastné kyseliny. Následně jsou mastné kyseliny přeměněny β -oxidací na acetyl-CoA a nakonec vstupují do citrátového cyklu. Avšak odbourávání lipidů využitím metabolismu mikroorganismů trvá poměrně dlouho [28].

Lipidy mohou vytvářet olejový film na povrchu vody, bránit difúzi kyslíku ze vzduchu do vody a vést ke smrti mnoha forem vodního života. Agregáty tvořící se z kapek oleje a dalších odpadních látek přítomných ve vodě mohou také ucpávat kanalizační potrubí [29].

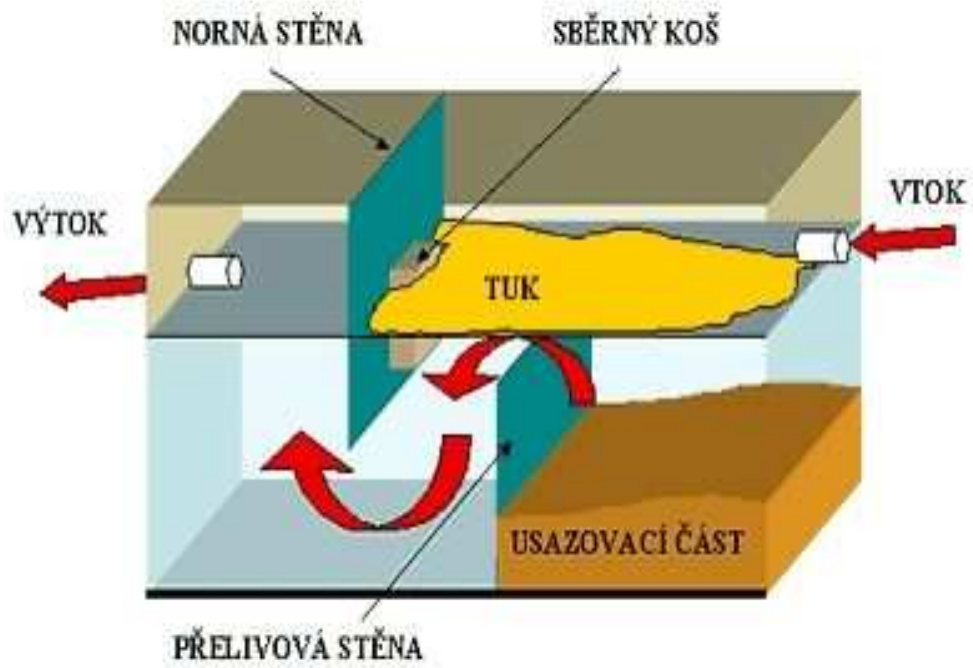
Kvůli ochraně životního prostředí byla zkoumána funkce lipáz s ohledem na jejich využití v lipidy kontaminované vodě. Kvůli zlepšení biodegradace lipidů v odpadní vodě byly studovány mikroorganismy jako *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* sp. a kvasinky kvůli jejich schopnosti odbourávat lipidy. Avšak tyto druhy projevují svoji schopnost odbourávat lipidy v závislosti na aktuálních podmínkách jako je teplota. Neumí také degradovat řadu lipidů a působí negativně na bakterie vyskytující se přirozeně v odpadních vodách [28].

Odlučovače tuků jsou určeny k zachycení tuků obsažených v odpadních vodách. Používají se zejména u připravených jídel, v potravinářském průmyslu, v průmyslu zpracování masa a masných výrobků, u fritovacích linek, úpraven brambor apod. Zařazují se jako čistící zařízení před malými čistírnami odpadních vod nebo před zaústěním do kanalizace. Do odlučovače tuků nesmí být sveden ostatní komunální odpad a vody obsahující oleje minerálního původu [30, 31].

Rozpuštěné tuky obsažené v odpadních vodách z potravinářských provozů mají tendenci vlivem ochlazení v kanalizačním systému změnit skupenství z kapalného na tuhé a vlivem menší měrné hmotnosti než má voda vyplavat na vodní hladinu. Tím se zvyšuje nebezpečí zanášení odpadních kanalizačních vedení. S prodlužováním doby zdržení v těchto systémech roste rovněž nebezpečí biologického zatížení životního prostředí [30].

Odlučovače využívají fyzikálních zákonů, zejména gravitace. Horká odpadní voda přiváděná do odlučovače tuků je uklidněna usměrňovací přepážkou, což umožňuje sedimentaci kalů a oddělení vzlínavých tukových částic, které vystupují k hladině. Předčištěná voda odtéká pod nornou stěnou do odtokového potrubí. Odloučené tuky se shromažďují na hladině sedimentačního prostoru. Odloučené a zachycené látky se vyvázejí k zneškodnění [32].

Fyzikální separace lipidů použitím odlučovačů tuků je efektivní na odstranění většiny lipidů z odpadní vody. Odstraněné lipidy jsou spalovány nebo vyhozeny na skládky odpadů. Avšak skládky a spalování lipidů obsahujících těžké oleje způsobují řadu problémů životního prostředí. Navíc odlučovače a separátory tuků způsobují nepříjemný zápach [28].



Obr.7 Schéma odlučovače tuků [33]

2.5 Identifikace mikroorganismů

V případech, kdy mikrobiální infekce anebo kontaminace představuje závažný problém, hraje definitivní typizace daného mikroorganismu klíčovou roli [34].

Konvenčně se mikroby identifikují za použití kultivačních a biochemických přístupů. Nevýhodou uvedených technik je obtížné rozlišení druhově odlišných, ale biochemicky, nebo morfologicky podobných druhů. V těchto případech představují molekulárně-genetické metody efektivní alternativu konvenčních metod [34].

Identifikaci mikroorganismů je možné provádět s využitím makroskopických metod, při kterých se hodnotí vzhled kolonie na kultivačním médiu (např. velikost, tvar, povrch nebo barva), dále se sleduje konzistence, zápach, vztah ke kultivační půdě (vrůstání do půdy apod.) nebo vztah mikroorganismů navzájem [35].

Druhou možností je využití mikroskopických metod, při kterých se sleduje tvar, uspořádání a pohyblivost buněk, dále je možné využít barvení grampozitivních a gramnegativních bakterií nebo detekci fruktifikačních struktur vláknitých hub a kvasinek [35, 36].

Třetí možností je použití biochemických testů, které se většinou provádějí v tekutých médiích ve zkumavkách, případně na šikmých agarrech nebo na Petriho miskách. Soubor těchto testů se nazývá „pestrá řada“, neboť při pozitivních reakcích často dochází díky přidaným indikátorům ke změně zbarvení média. Odlišný metabolismus mikroorganismů se projeví také tvorbou určitých výsledných produktů (tvorba plynu, tvorba sraženiny apod.) [37].

Mezi tyto testy se řadí např. průkaz katalázy, oxidázy, zkvašování cukrů, průkaz ureázy, tvorba indolu, redukce nitrátů na nitrity, průkaz dekarboxylázy nebo průkaz β -galaktosidázy [35, 36].

Pro biochemické testování je také možné využít diagnostické testy-mikrosety. Tyto diagnostické soupravy vyráběné centrálně jsou na rozdíl od klasických biochemických metod rychlejší a standardnější [37].

Obvykle se jedná o reprezentativní soubor biochemických testů uspořádaných na plastových mikrodestičkách. V jamkách těchto destiček jsou dehydratovaná diagnostická média s příslušnými substráty. Očkuje se suspenzí z čistých kultur o předem dané hustotě. Po 18 – 24 hodinové inkubaci, kdy dochází ke změnám ve zbarvení médií, se výsledky odečítají a vyhodnocují se buď převedením na příslušný kód, podle něhož se pak provede identifikace v identifikačním registru, nebo se výsledky vyhodnotí pomocí počítačových programů [37].

Každá souprava obsahuje návod na použití, tabulky pro zapisování výsledků, pomocná činidla (parafinový olej a reagentie) [37].

Všechny tyto soupravy jsou určeny pro rychlou a poměrně spolehlivou identifikaci bakterií izolovaných z klinického materiálu, potravin, pitné i povrchové vody, půdy apod. [37].

Bioanalytické metody jsou další možností identifikace mikroorganismů. Mezi tyto metody řadíme např. polymerázovou řetězovou reakci (PCR) nebo reverzně-transkripční polymerázovou řetězovou reakci (RT-PCR) [35, 36].

2.5.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je enzymová metoda sloužící k rychlé syntéze velkého množství definovaného úseku DNA in vitro. Tato metoda umožnila řadu experimentálních přístupů, jež byly dříve neproveditelné a počet aplikací PCR neustále vzrůstá. PCR nachází uplatnění při syntéze

fragmentů DNA na základě chromozomální DNA nebo cDNA při detekci infekčních mikroorganismů a virů v potravinách, vodě a půdě, kontrole výrobků, mapování genomů nebo charakterizaci genů atd. [38].

Důležitým předpokladem pro úspěšnou reakci je navržení vhodných primerů tak, aby byla zajištěna specifita reakce. Jak návrh oligonukleotidových primerů, tak programování reakčních kroků vychází z obecné znalosti struktury DNA a ze znalosti sekvence, k níž jsou příslušné oligonukleotidy komplementární [38].

Problémy při PCR mohou způsobit falešně-pozitivní reakce, inhibitory PCR a neúspěšná extrakce bakteriální DNA [39].

Při reakci se jedná o syntézu komplementárního řetězce k DNA templátu. Syntéza probíhá vždy ve směru 5'→3', přičemž žádná DNA polymeráza „neumí“ začít syntézu de novo, ale musí vždy navázat na předchozí volný 3' hydroxyl [38].

Reakční směs, obvykle o objemu v rozmezí 25 – 100 μl, se skládá z následujících složek [40]:

- Matrice DNA (DNA templát) – makromolekula DNA, podle které se komplementárně syntetizují nové řetězce DNA [40].
- Oligonukleotidové primery – synteticky připravené a komplementární k templátové DNA, která má být amplifikována. Primery jsou sekvenčně specifické [40].
- DNA polymeráza – syntéza nové DNA ve směru 5' → 3' podle sekvence nukleotidů v komplementárním řetězci DNA od 5' konce primeru [40].
- 3'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty (dNTP) – (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) – stavební kameny pro syntézu nové DNA [40].
- Mg²⁺ ionty – nezbytné pro aktivitu DNA-polymerázy, obvyklá koncentrace 1,5 mM Mg²⁺ [40].
- Pufr pro PCR – vytváří optimální prostředí pro DNA-polymerázu, standardní reakční pufr obsahuje 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 – 8,8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ [40].
- Voda pro PCR – pro doplnění směsi pro PCR na požadovaný objem, nejvhodnější je voda o odporu 18 mΩ [40].

2.5.1.1 Termostabilní DNA polymeráza

PCR využívá termostabilní DNA polymerázu pro opakovanou syntézu obou vláken. Podmínka teplotní stability enzymu je dána tím, že jedním krokem opakovaných cyklů je denaturace DNA tj. oddělení komplementárních vláken templátu za vysoké teploty (cca 95°C) [38].

Dostatečnou aktivitu enzymu po celou dobu amplifikace zajišťuje např. využití termostabilní DNA polymerázy (Taq DNA polymeráza z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*). Taq polymeráza má teplotní optimum při 75°C a poločas inaktivace je přibližně 40 min při 95 °C. Jedná se o enzym, který má pouze 5'→3' polymerázovou aktivitu a postrádá 3'→5' endonukleázovou aktivitu což znamená, že tento enzym není schopen opravovat chyby vzniklé při replikaci [38].

Kromě Taq polymerázy jsou používány také Pwo a Pfu DNA polymerázy. Tyto enzymy mají kromě polymerázové aktivity také 3'→5' exonukleázovou aktivitu, umožňující opravu chybně inkorporovaných deoxynukleotidů. Produkty tohoto enzymu jsou syntetizovány s desetinásobně vyšší přesností ve srovnání s Taq polymerázou. Proto je tento enzym vhodnější pro přípravu produktů pro klonování a pro přípravu značených sond. Syntetizuje pouze fragmenty do délky cca 3 kb [38].

Dále se dá využívat Tth DNA polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus thermophilus*, který má stejné teplotní optimum jako Taq DNA polymeráza. Předností tohoto enzymu je jeho schopnost působit i jako reverzní transkriptáza a tedy možnost přípravy cDNA [38].

2.5.1.2 Kroky PCR

Vlastní průběh zahrnuje periodické opakování tří cyklů představujících denaturaci templátu, připojení primerů a syntézu vlákna DNA [38].

Denaturace templátu je dosaženo zvýšením teploty vzorku na 95°C. Důležité je, aby došlo ke kompletní denaturaci obou vláken. Jinak by mohlo dojít k velmi rychlé renaturaci celé molekuly, což by zabránilo interakci s primery [38].

Připojení primerů vlastně znamená renaturaci, při níž je reakční směs ochlazená na zvolenou teplotu, která se pohybuje kolem 55°C [38].

Při syntéze vlákna DNA jsou připojovány jednotlivé deoxynukleotidy ve směru 5'→3'. Teplota je v případě použití Taq polymerázy při tomto kroku zvýšena na 75 °C, což je teplotní optimum tohoto enzymu. Výtěžek je závislý na vhodných reakčních podmínkách, které je často třeba optimalizovat. Jedná se zejména o koncentraci Mg²⁺ iontů a teplotu při připojení primerů [38].

2.5.1.3 Elektroforéza v agarózovém gelu

K identifikaci, separaci a purifikaci fragmentů DNA získaných pomocí PCR se používá elektroforéza v agarózovém či polyakrylamidovém gelu. Fragmenty DNA jsou děleny v elektrickém poli v závislosti na jejich velikosti. Volbou typu a koncentrace gelu lze zajistit vhodné podmínky pro dělení fragmentů v různých rozmezích molekulových hmotností [38].

Pro posouzení velikosti jednotlivých fragmentů se používají markery molekulových hmotností, což jsou komerčně dostupné směsi fragmentů DNA definovaných velikostí [38].

Porovnání polohy získaného fragmentu s odpovídajícím fragmentem markeru souží k odhadu jeho velikosti. Pro další použití lze fragmenty z gelu purifikovat [38].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Komerční preparát

Lipolytická aktivita byla testována u komerčního přípravku (KP) Sany Duo Spezial, jehož výrobcem je SANYTURA GmbH. Informace o složení tohoto preparátu nejsou známy.

3.1.2 Použitá živná média

- Brain Heart Infusion Broth – HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd.: Calf brain, infusion from 200,00 Gms/litre; BEF heart, infusion from 250,00 GMS/litre; Protease peptone 10,00 Gms/litre, Dextrose 2,00 Gms/litre, Sodium chloride 5,00 Gms/litre, Disodium phosphate 2,50 Gms/litre
- Nutrient Agar No. 2 – HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd.: Peptic digest of animal tissue 5,000 Gms/litre; Sodium chloride 5,000 Gms/litre; Beef extract 1,500 Gms/litre; Yeast extract 1,500 Gms/litre; Agar 15,000 Gms/litre

3.1.3 Použité kultury

Pro PCR byla využita kultura mikroorganismů vyizolovaná z KP a dále druhy rodu *Bacillus* získané z České sbírky mikroorganismů: *B. subtilis* CCM 1999, *B. cereus* CCM 2010^T, *B. licheniformis* CCM 2145^T, *B. thuringiensis* CCM 19^T, *B. mycoides* CCM 915, *B. megaterium* CCM 2037, *B. circulans* CCM 1611.

Pro stanovení CHSK_{Cr} a lipolytické aktivity byla využita kultura mikroorganismů obsažená v KP a dále čistá kultura *Bacillus subtilis* CCM 1999 získaná z České sbírky mikroorganismů.

3.1.4 Použité chemikálie

- Agaróza – Serva, Německo
- Albumin – Serva, Německo
- Destilovaná voda: H₂O – Fakulta chemická VUT, Brno
- Dihydrogenfosforečnan draselný KH₂PO₄ – Lach Ner, Neratovice
- Dichroman draselný K₂Cr₂O₇ - Lachema, Brno
- DNA standard Malamité 100 bp ladder – Moravské Prusy, ČR
- Dodecylsulfát sodný (SDS) – Lachema, Brno
- Ethanol C₂H₅OH – Merci s.r.o, Brno
- Ethidium bromid (5 mg/ml) – Sigma, USA
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) – Serva, Německo
- Fenol C₆H₅OH – Lachema, Brno
- Glycin p.a. – Vitrum, Praha
- Hydrogenftalan draselný – Vitrum, Praha
- Hydrogenfosforečnan sodný Na₂HPO₄·12H₂O – Lachema, Brno
- Hydroxid sodný NaOH – Lach Ner, Neratovice
- Chlorid sodný p.a. NaCl – Lach Ner, Neratovice
- Chlorid vápenatý dihydrát CaCl₂·2H₂O – Lach Ner, Neratovice
- Chloroform – Lachema, Brno
- Izoamylalkohol – Pliva-Lachema, Brno
- Izooktan C₈H₁₈ – Merck

- Kyselina boritá HBO_2 – Lachema, Brno
- Kyselina citronová bezv. p.a. – Vitrum, Praha
- Kyselina chlorovodíková HCl – Merci s.r.o., Brno
- Kyselina trichloroctová CCl_3COOH – Lachema, Brno
- Kyselina sírová H_2SO_4 – Lachema, Brno
- Lysozym – Reanal, Maďarsko
- Octan měďnatý monohydrát – Lach Ner, Neratovice
- Octan sodný – Lachema, Brno
- Olivový olej - Fluka Chemische Fabrik, Německo
- PCR vkládací pufr Yeloow load – Top Bio s.r.o., Praha
- p-nitrofenol $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$ – Fluka Chemische Fabrik, Německo
- p-nitrofenyllaurát $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_4$ – Fluka Chemische Fabrik, Německo
- Proteináza K – Sigma, USA
- Pyridin $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ – Lachema, Brno
- Síran hořečnatý bezvodý čistý MgSO_4 - Lach Ner, Neratovice
- Síran měďnatý – pentahydrát p.a. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – Lachema, Brno
- Síran rtuťnatý HgSO_4 – Lachema, Brno
- Síran stříbrný Ag_2SO_4 – Lachema Brno
- Uhličitan sodný Na_2CO_3 – Lachema, Brno
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-base) – Amresco, USA
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan hydrochlorid (Tris-HCl) – Amresco, USA

3.1.4.1 Komponenty pro PCR

- PCR voda – Biotika, Slovenská Ľupča
- PCR pufr kompletní – reakční pufr 10x PCR Blue Buffer (obsahující MgCl_2) – Top Bio, Praha
- PCR pufr bez MgCl_2 – reakční pufr 10x PCR Blue Buffer without MgCl_2 Top Bio, Praha
- MgCl_2 25mM – Top Bio, Praha
- dNTP směs 10 mM – Top Bio, Praha
- primery BK1/F a BK1/R1 - Generi-Biotech s.r.o., Hradec Králové
- Taq DNA polymeráza 1.1 (1U/ μl) – Top Bio, Praha

3.1.5 Použité přístroje

- Analytické váhy – AND GR-202-EC, Japonsko
- Cycler PTC-100TM - MJ Research , Watertown, USA
- Digitální fotoaparát Olympus
- Očkovací box - BIOAIR EuroClone, Itálie
- pH metr – Merci .s.r.o, inoLab pH 720, Brno
- Spektrofotometr - UV/VIS HELIOS DELTA – Thermospectronic England
- Termostat – LTE SCIENTIFIC LTD, Anglie
- Transiluminátor TVR 3121 – Spectroline, Paramount, USA
- NanoPhotometerTM - Implent, Německo
- Třepačka – KS 130 B-IKA, Německo
- Ultracentrifuga - Eppendorf centrifuge 5417R, Německo
- Váhy - Scaltec, SAS 50, USA

- Vaříč – ETA, Milovice nad Bečvou
- Vodní lázeň – Polystat cc1; Merci s.r.o., Brno
- Vortex – Heidolph, REAX top; Německo

3.1.6 Použitý software

- Microsoft Word 2002 SP3
- Microsoft Excel 2002 SP3
- Rotor Gene 6000 Series Software

3.1.7 Použité roztoky a jejich příprava

3.1.7.1 Roztoky pro izolaci a purifikaci DNA

1 M Tris-HCl, pH 7,8

12,1 g Tris-báze bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody. pH tohoto roztoku bylo upraveno pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 7,8. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na 100 ml.

Lyzační roztok A: 10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0

1 ml 1 M roztoku Tris-HCl (pH 7,8) byl smíchaný s 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98 ml destilované vody.

Lyzační roztok B: 10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0; lysozym 3 mg/ml

1 ml 1 M roztoku Tris-HCl (pH 7,5) byl smíchaný s 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98 ml destilované vody. Před použitím byly k roztoku přidány 3 mg/ml lysozymu.

CIZ (chloroform:izoamylalkohol)

Chloroform a izoamylalkohol byly smíchany v poměru 24:1.

TE pufr: 10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 1 mM EDTA, pH 8,0

K 900 ml destilované vody bylo přidáno 10 ml 1 M roztoku Tris-HCl (pH 7,8) a 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0). pH takto připraveného roztoku bylo upraveno na hodnotu 8 pomocí hydroxidu sodného a objem byl doplněn destilovanou vodou na 1000 ml. Před použitím byl roztok zředěn destilovanou vodou na koncentraci Tris-HCl 10 mM a EDTA 1 mM.

3.1.7.2 Roztoky pro gelovou elektroforézu

TBE pufr

54 g Tris báze, 27,5 g kyseliny borité a 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) bylo doplněno do 1000 ml destilovanou vodou; výsledné pH bylo upraveno pomocí 1 M hydroxidu sodného na 8,3. Takto připravený zásobní roztok byl před použitím ředěn 10x destilovanou vodou na výslednou koncentraci 45 mM Tris, 45 mM kyseliny borité a 1 mM EDTA.

Ethidium bromid 0,5 µg/ml

100 µl roztoku ethidiumbromidu (500 µg/ml) bylo zředěno 500 ml sterilní destilované vody.

3.1.7.3 Roztoky pro stanovení CHSK_{Cr}

Oxidační roztok

Do 500 ml destilované vody bylo přidáno 10,2148 g dichromanu draselného (předem vysušeného při 110 °C 2 hod.). Za stálého míchání bylo k tomuto roztoku přidáno 167 ml kyseliny sírové a 33,33 g síranu rtuťnatého. Po rozpuštění a ochlazení byl roztok doplněn vodou na 1000 ml.

Katalyzátorový roztok

V 1 l koncentrované kyseliny sírové bylo rozpuštěno 4,76 g síranu stříbrného.

3.1.7.4 Roztoky pro stanovení lipolytické aktivity

Měďnaté činidlo

pH připraveného 5% vodného roztoku octanu měďnatého bylo po přefiltrování upraveno pyridinem na 6,1.

p-nitrofenyllaurát 0,0025 mol/l

0,02 g p-nitrofenyllaurátu bylo rozpuštěno v 25 ml ethanolu.

p-nitrofenol, 0,0025 mol/l

0,0819 g p-nitrofenolu bylo rozpuštěno v 250 ml destilované vody.

Citrát-fosforečnanový pufr, pH 3-6

17,9 g hydrogenfosforečnanu sodného bylo rozpuštěno v 1000 ml vody. pH tohoto roztoku bylo upraveno kyselinou citrónovou na požadovanou hodnotu (3-6). Roztok kyseliny citrónové byl připraveným rozpuštěním 1,92 g této kyseliny v 1000 ml vody. Celkový objem pufru byl 250 ml.

Fosfátový pufr, pH 7,2

1,431 g hydrogenfosforečnanu sodného a 0,549 g dihydrogenfosforečnanu draselného bylo rozpuštěno v 240 ml destilované vody. pH bylo upraveno na hodnotu 7,2 pomocí roztoku hydroxidu sodného.

Tris-HCl pufr, pH 8

K 50 ml 0,1 M roztoku Tris-HCl bylo přidáno 26,8 ml 0,2 M kyseliny chlorovodíkové. Objem roztoku byl doplněn na 250 ml.

Glycin-NaOH pufr, pH 9, pH 10

0,74 g glycinu bylo rozpuštěno v 200 ml vody. pH tohoto roztoku bylo upraveno na příslušnou hodnotu (9, 10) pomocí roztoku hydroxidu sodného. Tento roztok byl připraven rozpuštěním 0,4 g hydroxidu sodného v 100 ml vody. Celkový objem pufru byl 100 ml.

3.2 Pracovní postupy

3.2.1 Identifikace mikroorganismů metodou PCR

3.2.1.1 Izolace a purifikace DNA

Kultivace

Bakterie obsažené v KP a sbírkové druhy rodu *Bacillus* byly kultivovány na pevném živném médiu Nutrient Agar No. 2 při 37 °C 24 hod.

Příprava buněk pro izolaci DNA

Kultura buněk narostlá na pevném živném médiu byla rozsuspendována ve zkumavce obsahující 0,5 ml 1,5% chloridu sodného. Připravená suspenze byla centrifugována při 15 000 ot./3 min a supernatant byl slit.

Lyze buněk

Sediment byl rozsuspendovaný v 1 ml roztoku A a suspenze byla centrifugována při 15 000 ot./3 min. Supernatant byl slit a k sedimentu bylo přidáno 500 µl roztoku B. Vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 3 hod. K suspenzi bylo poté přidáno 25 µl 10% SDS a 5 µl proteinázy K. Promíchané vzorky byly inkubovány při 55 °C do druhého dne.

Fenolová extrakce DNA

K lyzátu buněk byl přidán stejný objem fenolu (500 µl) a směs byla kývavým pohybem promíchávána po dobu 4 min. Následně byla zcentrifugována při 15 000 ot./3 min a vodní fáze s DNA byla odebrána do čisté zkumavky. K vodní fázi s DNA bylo přidáno 700 µl CIZ směsi a směs byla kývavým pohybem promíchávána po dobu 4 min. Po centrifugaci při 15 000 ot./3 min byla vodní fáze s DNA odebrána do čisté zkumavky.

Přesrážení DNA ethanolem

Ke vzorku DNA bylo přidáno 20 µl 3 M octanu sodného. Po promíchání byl přidán 96% ethanol a DNA se nechala vysrážet při -20 °C do dobu 15 min. Po centrifugaci 15 000 ot./15 min byl supernatant slit a sediment byl sušen asi 15 min. Poté bylo k DNA přidáno 250 µl TE pufru a směs byla ponechána v chladničce do druhého dne.

3.2.1.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

DNA rozpuštěná v TE pufru byla využita ke spektrofotometrickému stanovení koncentrace a čistoty DNA pomocí přístroje NanoPhotometer™. Absorbance byla měřena v rozmezí vlnových délek 230 nm – 320 nm. K měření byly využity 3 µl vzorku DNA.

3.2.1.3 Gelová agarózová elektroforéza bakteriální DNA

0,8% agarózový gel byl připravený rozpuštěním 0,4 g agarózy v 50 ml TBE pufru a pečlivým rozvařením v mikrovlnné troubě. Gel byl nalit do misky s hřebínkem a ponechán ztuhnout.

Na podložce bylo smícháno 10 µl DNA, 10 µl PCR vody a 5 µl vkladacího pufru a tato směs byla nanášena do komůrek gelu. Vanička s gelem byla převrstvena TBE puftrem a byl zapnut zdroj napětí (80 V / 60 min).

Po skončení elektroforézy byl gel obarven ethidium bromidem a pozorován na transiluminátoru v UV světle a fotografován.

3.2.1.4 PCR s purifikovanou DNA

Bylo připraveno 25 μl PCR směsi dle Tabulky 1.

Tab. 1 PCR směs

Komponenty PCR	Množství (μl)
PCR voda	15,7
10 x reakční pufr	2,5
Směs DTP (10 mM)	0,5
BK1/F (10 pmol/ μl)	0,5
BK1/R (10 pmol/ μl)	0,5
Taq polymeráza 1.1 (1U/ μl)	0,3
DNA (10 ng/ μl)	1,0
1.6 mM MgCl_2	4,0

Jako pozitivní kontrola byla využita PCR směs s DNA *Bacillus* sp.

Jako negativní kontrola byla využita PCR směs, která obsahovala místo DNA matrice PCR vodu.

Vzorky, obsahující všechny komponenty PCR, byly dokonale promíchány, krátce centrifugovány a následně umístěny do cycleru, který pracoval dle následujícího programu:

1. krok – denaturace: 95 °C, 1 min
2. krok – připojení primerů: 57 °C, 1 min
3. krok – syntéza DNA: 72 °C, 1 min

Kroky se opakovaly 30x. Před prvním krokem byla provedena denaturace 95 °C/5 min, v posledním cyklu byla syntéza prodloužena na 10 min.

3.2.1.5 Detekce PCR produktu pomocí gelové agaróзовé elektroforézy

Postup byl obdobný jako v kapitole 3.2.1.3. V případě detekce PCR produktu byl však připraven 1,8% gel. Vzorek DNA nanášený na gel byl připravený přidáním 5 μl vkladacího pufru k 20 μl amplifikované DNA.

3.2.2 Chemická spotřeba kyslíku CHSK_{Cr}

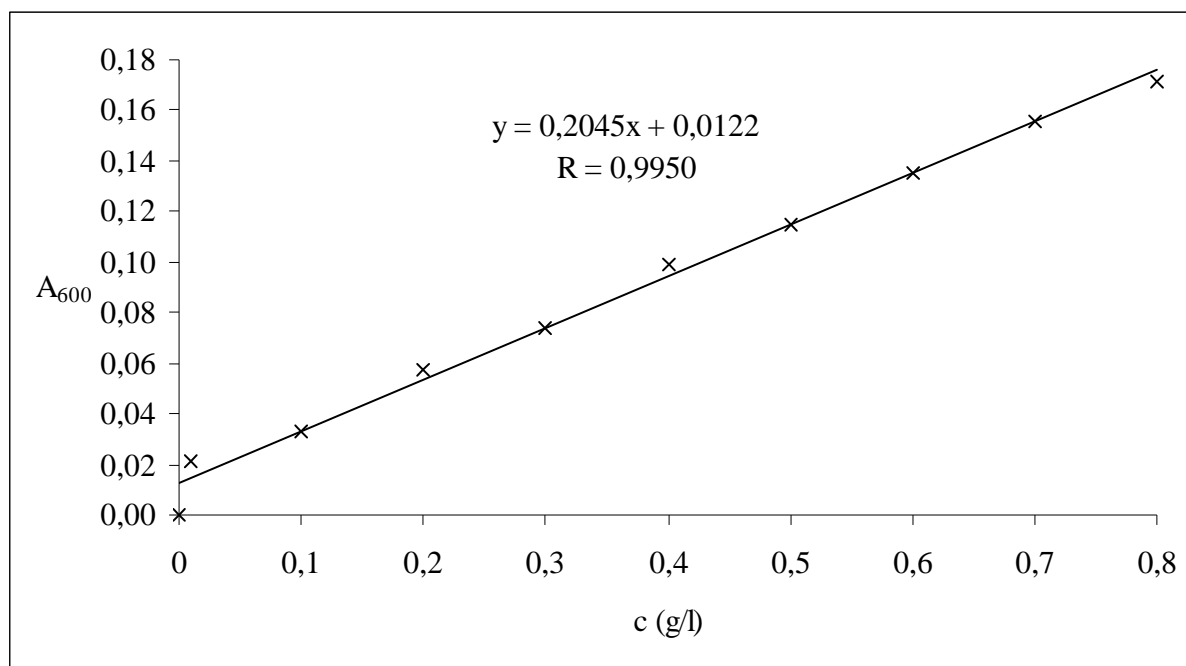
3.2.2.1 Stanovení kalibrační křivky hydrogenftalanu draselného

0,851 g hydrogenftalanu draselného bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Připravený standardní roztok má CHSK_{Cr} právě 1000 mg/l.

Z tohoto standardního roztoku byla připravena do série desetimililitrových odměrných baněk kalibrační řada roztoků o CHSK_{Cr} 10 mg/l až 800 mg/l.

Z odměrných baněk bylo odpipetováno 2,5 ml do uzavíratelné zkumavky, bylo přidáno 1,5 ml oxidačního roztoku a 3,5 ml katalyzátorového roztoku. Zkumavky byly uzavřeny a po promíchání zahřívány 2 hod při 150 °C.

Po vychladnutí zkumavek byl jejich obsah zředěn 5 ml destilované vody. Po promíchání byla měřena absorbance při 600 nm proti vodnému blanku. Blank byl zpracovaný stejně jako vzorek, pouze místo supernatantu byla použita destilovaná voda.



Graf 1 Kalibrační křivka hydrogentalanu draselného

3.2.2.2 Stanovení $CHSK_{Cr}$

300 ml kultivačního média Brain Heart Infusion Broth, ke kterému bylo přidáno 1,5 ml olivového oleje, bylo zaočkováno 5 ml kultury.

V časových intervalech byly z kultivační baňky odebírány 2 ml kultury. Po centrifugaci (4000 ot./min, 10 min, chlazení) bylo k 1 ml supernatantu přidáno 9 ml vody. Z tohoto naředěného vzorku bylo odpipetováno 2,5 ml do uzavíratelné zkumavky, bylo přidáno 1,5 ml oxidačního roztoku a 3,5 ml katalyzátorového roztoku. Zkumavky byly uzavřeny a po promíchání zahřívány v mineralizačním boxu 2 hod při 150 °C.

Po vychladnutí zkumavek byl jejich obsah zředěn 5 ml destilované vody. Po promíchání byla měřena absorbance při 600 nm proti vodnému blanku. Blank byl zpracovaný stejně jako vzorek, pouze místo supernatantu byla použita destilovaná voda.

3.2.3 Stanovení lipolytické aktivity s využitím měďnatého činidla

50 μ l kultury bylo smícháno s 1 ml emulze olivového oleje připravené z 0,5 ml olivového oleje a 0,5 ml Tris-HCl pH 8,5. Reakční směs byla třepána na třepáče 1 hodinu při 37 °C. Poté byl přidán 1 ml 6 M HCl a 2 ml izooktanu. Směs byla promíchána na vortexu a centrifugována.

Z oddělené izooktanové vrstvy byl odebraný 1 ml a smícháný s 1 ml měďnatého činidla. Směs byla promíchána, centrifugována a byla proměřena absorbance horní vrstvy při 715 nm.

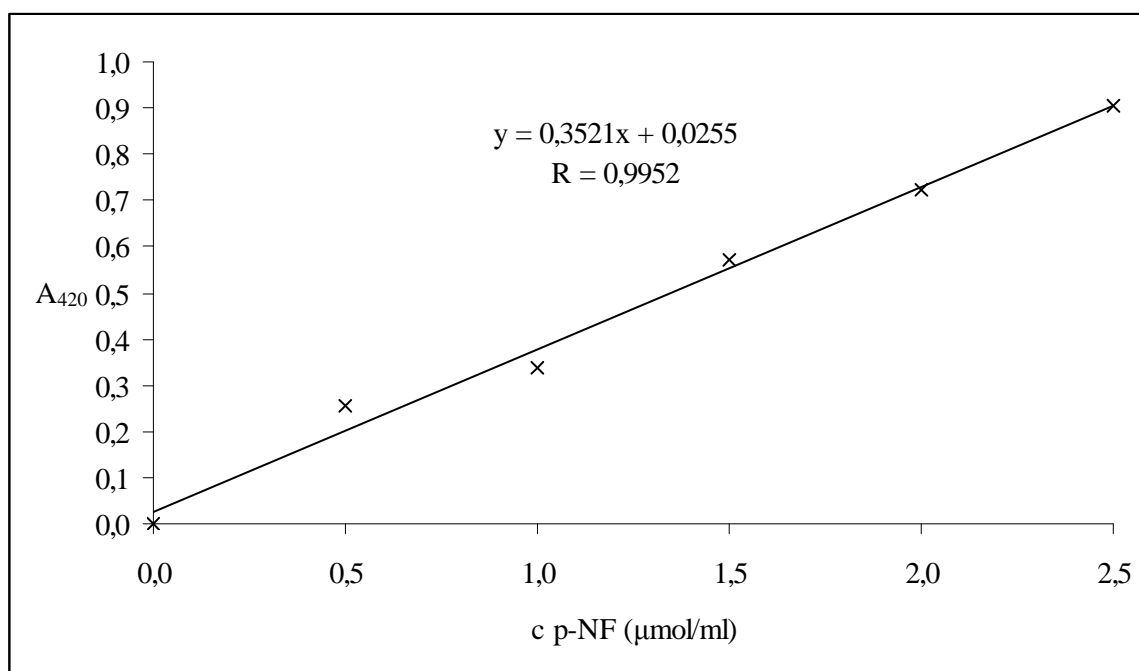
Blank byl připraven z 1 ml 6 M HCl a 2 ml izooktanu. Směs byla promíchána a centrifugována. Z oddělené izooktanové vrstvy byl odebraný 1 ml a smícháný s 1 ml měďnatého činidla. Směs byla promíchána, centrifugována a horní vrstva byla využita jako blank.

3.2.4 Stanovení lipolytické aktivity s využitím p-nitrofenyllaurátu

3.2.4.1 Stanovení kalibrační křivky p-nitrofenolu

Z 0,025 M p-nitrofenolu byla připravena kalibrační řada s koncentracemi v jednotlivých vzorcích 0,0005; 0,0010; 0,0015; 0,0020; 0,0025 mmol/ml. K vzorkům bylo přidáno 0,65 ml 0,05 M fosfátového pufru (pH 7,2) a 0,5 ml destilované vody. Obsah zkumavek byl promíchán a ponechán k inkubaci při 37 °C po dobu 30 min. Poté k nim bylo přidáno 0,1 ml 0,1 M uhličitanu sodného. Absorbance byla měřena spektrofotometricky při 420 nm.

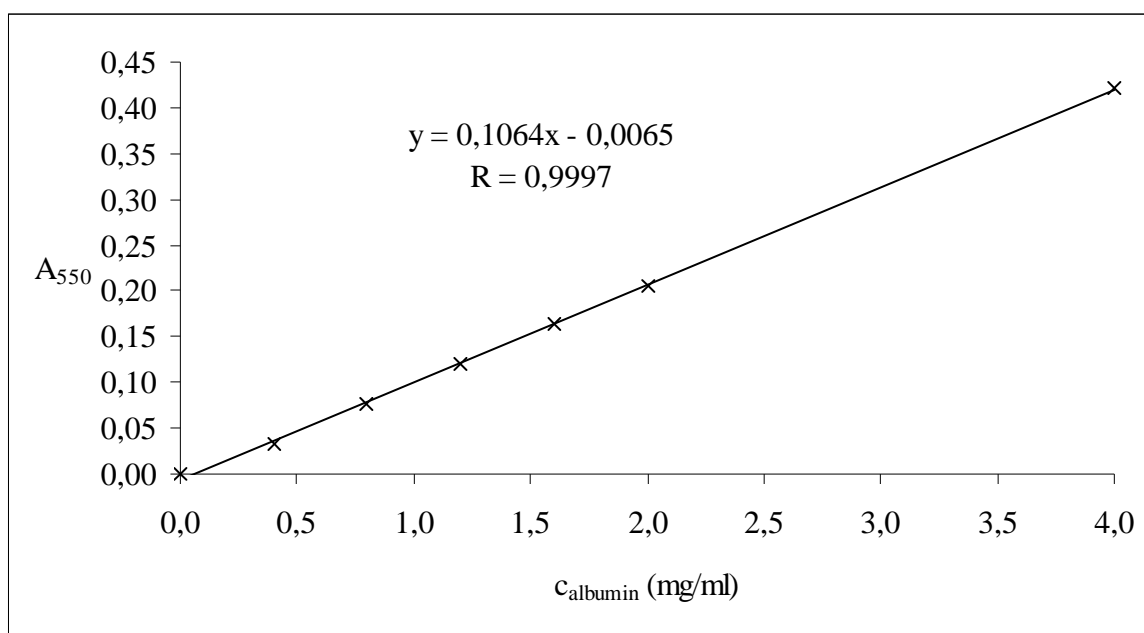
Blank byl připraven z 0,65 ml 0,05 M fosfátového pufru (pH 7,2), 0,5 ml destilované vody a 0,1 ml 0,1 M uhličitanu sodného.



Graf 2 Kalibrační křivka p-nitrofenolu

3.2.4.2 Stanovení kalibrační křivky albuminu

Ze základního roztoku albuminu o koncentraci 4 mg/ml byla připravena kalibrační řada s koncentracemi albuminu v jednotlivých vzorcích 0,0 (blank); 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 4,0 mg/ml. K vzorkům bylo přidáno 0,5 ml 10 M hydroxidu sodného a objem vzorků byl doplněn destilovanou vodou na 4,5 ml. Vzorky byly 10 minut povařeny, ochlazeny a ke každému bylo přidáno 0,25 ml 25% roztoku pentahydrátu síranu měďnatého. Po promíchání byly roztoky zfiltrvány a byla měřena jejich absorbance při 550 nm.



Graf 3 Kalibrační křivka albuminu

3.2.4.3 Stanovení vlivu kultivační teploty na produkci lipáz

100 ml kultivačního média Brain Heart Infusion Broth, ke kterému bylo přidáno 500 μ l olivového oleje, bylo zaočkováno 200 μ l kultury.

K 0,5 ml kultury kultivované při 5 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C, 37 $^{\circ}$ C a 50 $^{\circ}$ C bylo přidáno 0,65 ml 0,05 M fosfátového pufru, pH 7,2 a 0,1 ml 0,0025 mol/l p-nitrofenyllyurátu v ethanolu. Reakční směs byla promíchána a inkubována při teplotách 5 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C, 37 $^{\circ}$ C a 50 $^{\circ}$ C po dobu 30 min. Poté byl k reakční směsi přidán 0,1 ml 0,1 M uhličitanu sodného, směs byla promíchána a byla změřena absorbance při 420 nm.

Blank byl připraven z 0,5 ml destilované vody, 0,65 ml 0,05 M fosfátového pufru (pH 7,2), 0,1 ml 0,0025 M p-nitrofenyllaurátu v absolutním ethanolu a 0,1 ml 0,1 M uhličitanu sodného.

Lipolytická aktivita vyjádřená v mmol/ml·min byla vypočítána podle vztahu:

$$a = \frac{f_x \cdot A_{420}}{V \cdot t} \quad (1)$$

kde: f_x – přepočítávací faktor koncentrace lipolytických enzymů pro absorbanci rovnou 1, určený z kalibrační přímkou p-nitrofenolu,

A_{420} – absorbance naměřená u jednotlivých vzorků,

t – doba inkubace (30 min),

V – odebíraný objem kultivačního média pro stanovení.

Lipolytická aktivita byla následně přepočtena na relativní aktivitu $a_{rel.}$, kde naměřené hodnoty, vztažené k nejvyšší hodnotě pro dané měření, byly vyjádřeny v procentech.

3.2.4.4 Stanovení vlivu iontů na produkci lipáz

50 ml kultivačního média Brain Heart Infusion Broth, ke kterému bylo přidáno 250 μ l olivového oleje, bylo zaočkováno 100 μ l kultury.

K 0,5 ml kultury kultivované při 37 °C bylo přidáno 0,65 ml 0,05 M fosfátového pufru (pH 7,2) a 0,1 ml 0,0025 mol/l p-nitrofenyllyurátu v ethanolu. Reakční směs byla promíchána a inkubována při teplotě 37 °C po dobu 30 min. Poté byl k reakční směsi přidán 0,1 ml 0,1 M uhličitanu sodného, směs byla promíchána a byla změřena absorbance při 420 nm.

Kultivační média obsahovala vápenaté ionty v koncentracích 1, 2, 3, 4 mmol/l a hořečnaté ionty v koncentracích 1, 2, 3, 4 mmol/l.

Blank byl připraven z 0,5 ml destilované vody, 0,65 ml 0,05 M fosfátového pufru (pH 7,2), 0,1 ml 0,0025 M p-nitrofenyllaurátu v absolutním ethanolu a 0,1 ml 0,1 M uhličitanu sodného.

Lipolytická aktivita vyjádřená v mmol/ml·min byla vypočítána podle vztahu (1).

3.2.4.5 Stanovení pH optima produkovaných lipáz

250 ml kultivačního média Brain Heart Infusion Broth, ke kterému bylo přidáno 1,25 ml olivového oleje, bylo zaočkováno 500 μ l kultury.

K 0,5 ml kultury kultivované při 37 °C bylo přidáno 0,65 ml pufru o příslušném pH a 0,1 ml 0,0025 mol/l p-nitrofenyllyurátu v ethanolu. Reakční směs byla promíchána a inkubována při teplotě 37 °C po dobu 30 min. Poté byl k reakční směsi přidán 0,1 ml 0,1 M uhličitanu sodného, směs byla promíchána a byla změřena absorbance při 420 nm.

Využité pufrы: citrát-fosforečnanový pufr pH 3, 4, 5, 6, fosfátový pufr pH 7, Tris-HCl pH 8, glycin-NaOH pH 9, 10.

Blank byl připraven z 0,5 ml destilované vody, 0,65 ml příslušného pufru, 0,1 ml 0,0025 M p-nitrofenyllaurátu v absolutním ethanolu a 0,1 ml 0,1 M uhličitanu sodného.

Lipolytická aktivita vyjádřená v mmol/ml·min byla vypočítána podle vztahu (1).

3.2.4.6 Stanovení rozpustných bílkovin ve vzorcích

Ve zkumavce bylo smícháno 0,5 ml 10 M hydroxidu sodného, 3,8 ml destilované vody a 0,2 ml kultivačního média. Směs byla promíchána a umístěna na 10 minut do vroucí lázně. Po ochlazení bylo přidáno 0,25 ml 25% roztoku pentahydrátu síranu měďnatého. Po promíchání a filtraci byla měřena absorbance vzorku při 550 nm proti blanku. Blank byl připraven přidáním 0,5 ml hydroxidu sodného a 0,25 ml pentahydrátu síranu měďnatého ke 4 ml destilované vody.

Obsah bílkovin v mg v jednom ml vzorku byl vypočítán ze vztahu:

$$y = f_y \cdot A_{550} \quad (2)$$

kde: f_y – přepočítávací faktor koncentrace bílkovin pro absorbanci rovnou 1 určený z kalibrační přímky albuminu,

A_{550} – absorbance naměřená u jednotlivých vzorků bílkovin.

Ze zjištěného obsahu bílkovin ve vzorcích byl byla vypočítána lipolytická aktivita vztažená na bílkoviny v mmol/mg·min dle vztahu:

$$a_{spec.} = \frac{a}{y} = \frac{f_x \cdot A_{420}}{t \cdot f_y \cdot A_{550}} \quad (3)$$

kde: a - lipolytická aktivita vyjádřená v mmol/ml·min,
 y - obsah bílkovin v mg v jednom ml vzorku,
 f_x - přepočítávací faktor koncentrace lipolytických enzymů pro absorbanci rovnou jedné určený z kalibrační přímky p-nitrofenolu,
 f_y - přepočítávací faktor koncentrace bílkovin pro absorbanci rovnou jedné určený z kalibrační přímky p-nitrofenolu,
 A_{420} - absorbance naměřená u jednotlivých vzorků,
 A_{550} - absorbance naměřená u jednotlivých vzorků – stanovení bílkovin,
 t - doba kultivace.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem práce bylo stanovit optimální podmínky pro užití komerčního preparátu (KP) Sany Duo Spezial určeného do odlučovačů tuků a odpadních potrubí zanesených tuky.

Na základě předcházející studie [41], ve které bylo prokázáno, že tento přípravek obsahuje grampozitivní sporulující bakterie s lipolytickou aktivitou, byla provedena identifikace mikroorganismů metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Přípravek byl následně testovaný na schopnost produkovat lipolytické enzymy při různých kultivačních teplotách a při přidavku vápenatých a hořečnatých iontů do kultivačního média, které měly nasimulovat vliv tvrdosti vody. V průběhu kultivace bylo také sledováno pH optimum produkovaných lipáz a byla stanovena hodnota chemické spotřeby kyslíku ($CHSK_{Cr}$).

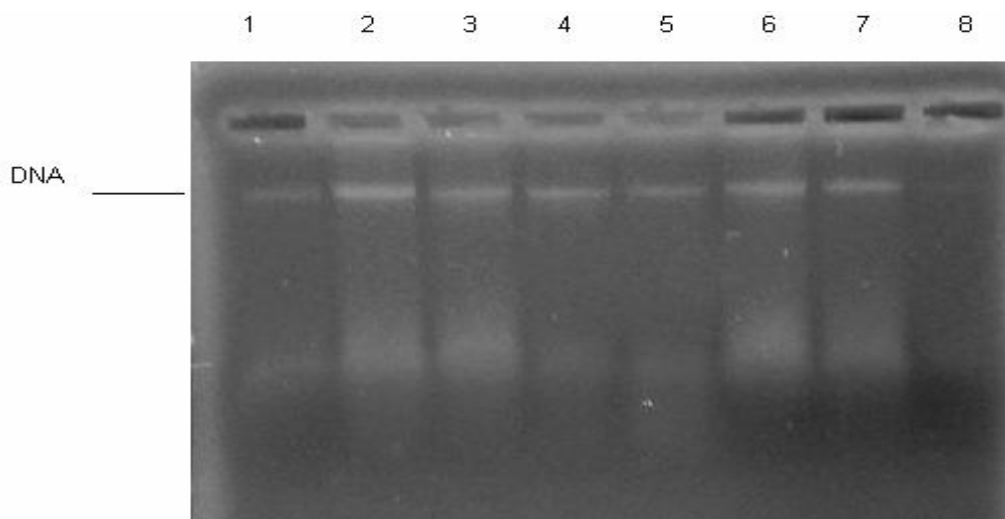
Pro porovnání bylo stanovení $CHSK_{Cr}$, stanovení lipolytické aktivity při různých kultivačních teplotách a stanovení pH optima provedeno také s kulturou *Bacillus subtilis* CCM 1999.

4.1 Identifikace mikroorganismů metodou PCR

Na základě předchozí studie bylo prokázáno [41], že KP obsahuje směsnou kulturu grampozitivních sporulujících bakterií. Pro přesnější identifikaci těchto bakterií byla využita metoda PCR.

4.1.1 Izolace a purifikace DNA

Pro identifikaci rodového zařazení mikroorganismů z KP byly použity jako srovnávací kultury různé druhy rodu *Bacillus*. Fenolovou extrakcí a přesrážením ethanolem byla z bakteriálních kultur vyizolována DNA. Její přítomnost byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou (Obr. 8).



Obr. 8 Gelová agarózová elektroforéza vyizolované DNA

běh 1: *B. subtilis* CCM 1999, běh 2: *B. cereus* CCM 2010^T, běh 3: *B. licheniformis* CCM 2145^T, běh 4: *B. thuringiensis* CCM 19^T, běh 5: *B. mycoides* CCM 915, běh 6: *B. megaterium* CCM 2037, běh 7: *B. circulans* CCM 1611, běh 8: komerční přípravek

Gelovou elektroforézou bylo prokázáno, že ze všech bakteriálních kmenů byla vyizolována DNA. Její koncentrace a čistota byla ověřena spektrofotometricky. Následně byla DNA použita pro PCR.

4.1.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Čistota a koncentrace vyizolované DNA byly stanoveny spektrofotometricky (Tab.2).

Tab. 2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty vyizolované DNA

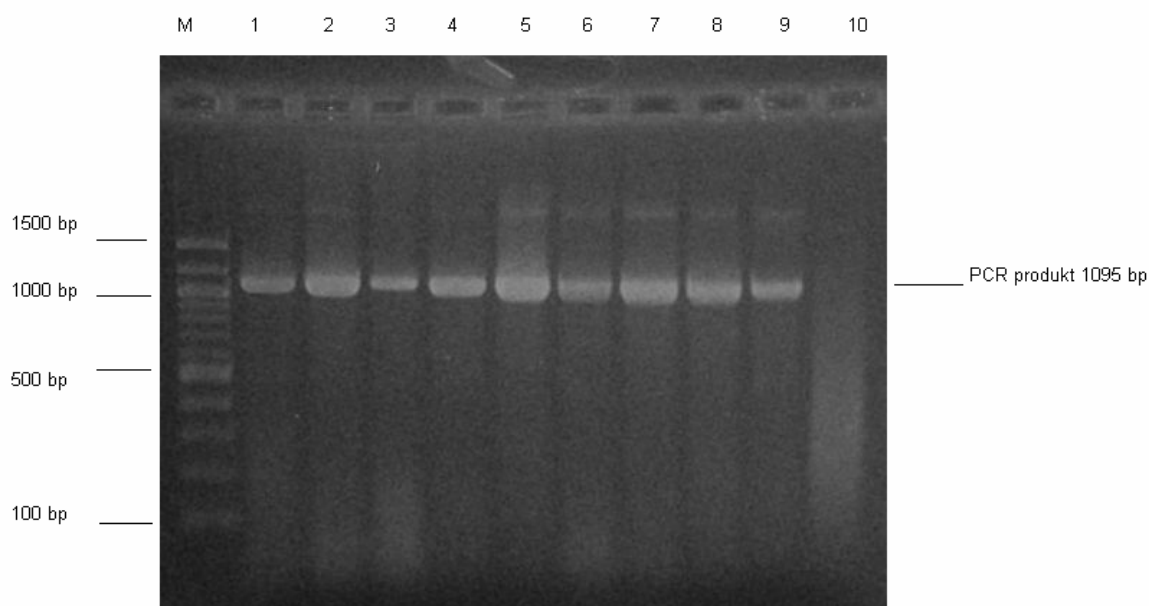
Číslo vzorku	Kultura	c (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}
1	<i>B. subtilis</i> CCM 1999	273,0	0,547	0,283	1,940
2	<i>B. cereus</i> CCM 2010 ^T	266,0	0,533	0,275	1,845
3	<i>B. licheniformis</i> CCM 2145 ^T	305,0	0,619	0,335	1,871
4	<i>B. thuringiensis</i> CCM 19 ^T	120,0	0,246	0,153	1,935
5	<i>B. mycoides</i> CCM 915	168,0	0,339	0,171	2,006
6	<i>B. megaterium</i> CCM 2037	350,0	0,721	0,438	1,679
7	<i>B. circulans</i> CCM 1611	129,0	0,262	0,136	1,962
8	KP	67,5	0,151	0,104	1,534

Spektrofotometrickým stanovením byla změřena koncentrace DNA u jednotlivých vzorků. Její znalost byla využita pro přípravu DNA o požadované koncentraci pro PCR. Poměr absorbancí A_{260/280} vypovídá o čistotě vzorku. Vzorky s hodnotou poměru nižší než 1,8 obsahovaly zbytky proteinů, vzorky s hodnotou poměru vyšší než 2,0 obsahovaly kromě DNA i RNA.

4.1.3 PCR s purifikovanou DNA

DNA, získaná vyizolováním ze srovnávacích kmenů i z KP, byla naředěna na koncentraci 10 ng/μl a takto připravená byla využita k PCR. PCR směs byla namíchána dle Tabulky 1, kap. 3.2.1.4.

Detekce PCR produktů byla provedena pomocí gelové agarózové elektroforézy (Obr. 9)



Obr. 9 Detekce PCR produktů pomocí gelové agarózové elektroforézy

běh M: standard Malamité (100 – 1500 bp), běh 1: *B. subtilis* CCM 1999, běh 2: *B. cereus* CCM 2010^T, běh 3: *B. licheniformis* CCM 2145^T, běh 4: *B. thuringiensis* CCM 19^T, běh 5: *B. mycoides* CCM 915, běh 6: *B. megaterium* CCM 2037, běh 7: *B. circulans* CCM 1611, běh 8: komerční přípravek, běh 9: pozitivní kontrola *B. cereus* CCM 2010^T, běh 10: negativní kontrola

PCR s rodově specifickými primery BK1/F a BK1/R potvrdila, že všechny použité kmeny náleží k rodu *Bacillus* sp. Jak u všech referenčních kmenů, tak i komerčního produktu se amplifikoval PCR produkt o velikosti 1095 bp, což odpovídá dle literatury [17, 42] rodu *Bacillus* sp. Různá intenzita amplikonů je zřejmě způsobena nižší koncentrací DNA v jednotlivých vzorcích.

4.2 Stanovení podmínek pro užití komerčního preparátu

KP byl testovaný na schopnost produkovat lipolytické enzymy při různých kultivačních teplotách, při přidavku vápenatých a hořečnatých iontů a dále bylo stanoveno pH optimum produkovaných lipáz. Lipolytická aktivita byla stanovována spektrofotometricky. Nejprve byla využita metoda s měďnatým činidlem. Tato metoda se však ukázala jako nevhodná, a proto byla k dalším stanovením využita metoda s p-nitrofenyllaurátem, který se štěpí na barevný produkt p-nitrofenol.

4.2.1 Stanovení lipolytické aktivity s využitím měďnatého činidla

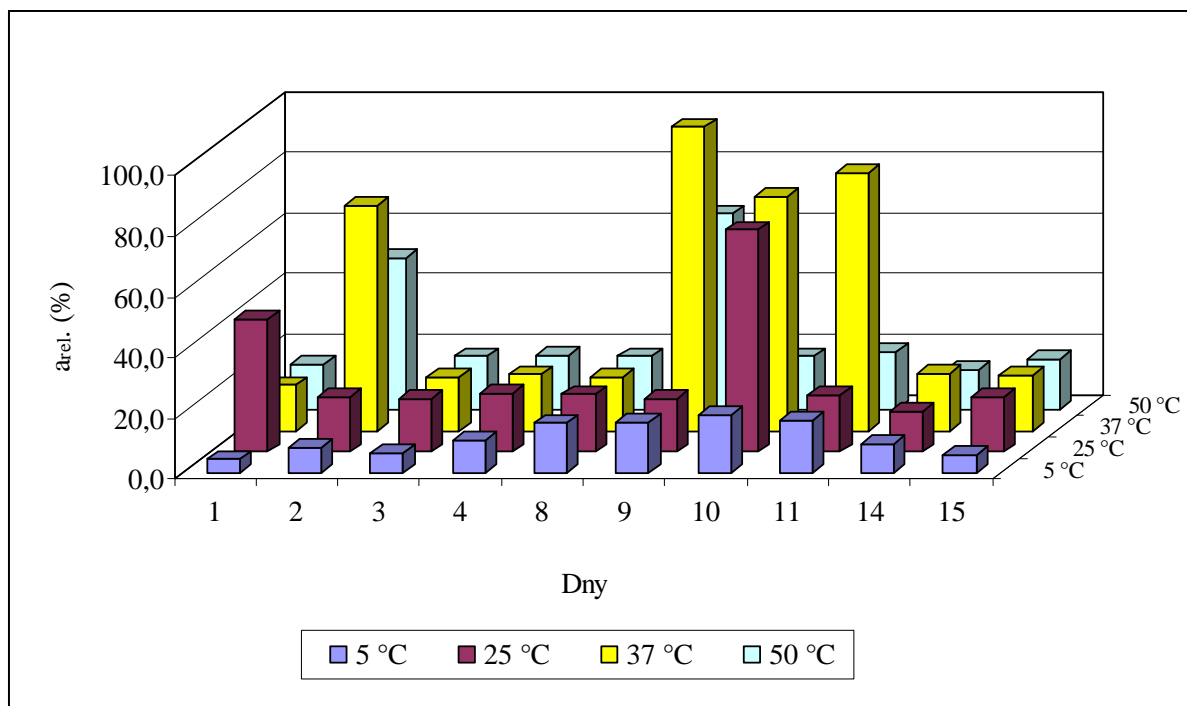
Bylo provedeno spektrofotometrické stanovení lipolytické aktivity, které je založeno na reakci volných mastných kyselin s měďnatým činidlem za tvorby barevných solí mastných kyselin.

Toto stanovení lipolytické aktivity nebylo vhodné k dalšímu použití z důvodu nemožnosti vytvoření stabilní emulze.

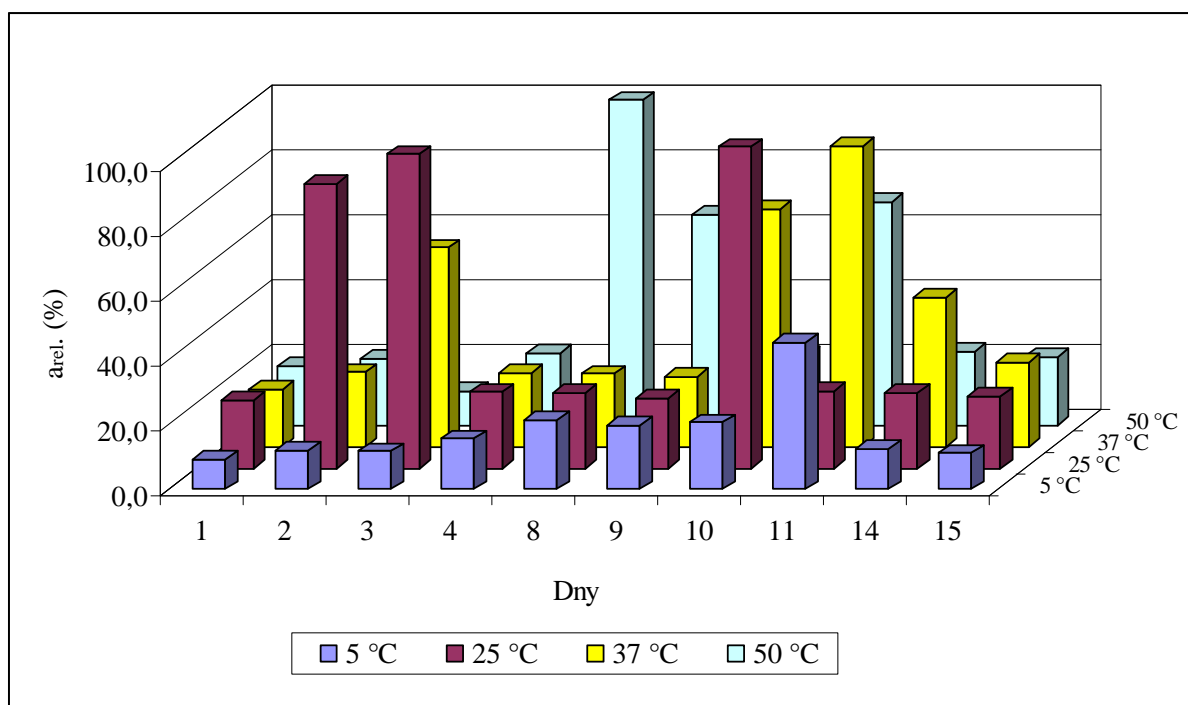
4.2.2 Stanovení vlivu kultivační teploty na produkci lipáz

Teplota vnějšího prostředí je jedním s hlavních faktorů, které ovlivňují rychlost rozmnožování mikroorganismů, jejich život a také produkci různých metabolitů, resp. enzymů. Teplota taktéž ovlivňuje i stabilitu produkovaných enzymů [18].

Vliv teploty na produkci lipáz u KP i u čisté kultury *B. subtilis* byl monitorován v rozmezí 5°C-50°C. Výsledky jsou zobrazeny v Grafech 4 a 5 jako relativní aktivita. Příslušná data k těmto grafům jsou uvedena v Příloze 1, kde jsou také uvedeny stanovené hodnoty rozpustných bílkovin a specifické aktivity.



Graf 4 Vliv teploty na produkci lipáz - KP



Graf 5 Vliv teploty na produkci lipáz – *B. subtilis*

Z Grafu 4 je patrné, že nejvyšší lipolytická aktivita resp. relativní aktivita (100 %) při kultivaci mikroorganismů obsažených v KP byla dosažena při 37 °C devátý den. Při porovnání hodnot v Grafu 4 je možné konstatovat, že teplota 37 °C je pro produkci lipáz u KP nejvhodnější. Při kultivaci čisté kultury *B. subtilis* (Graf 5) byla nejvyšší hodnota aktivity (100 %) stanovena při teplotě 50 °C osmý den. *B. subtilis* však vykazuje vyšší aktivitu také při teplotách 25 a 37 °C.

Při teplotě 5 °C mikroorganismy obsažené v KP i *B. subtilis* vykazovaly nízké hodnoty lipolytické aktivity po celou dobu kultivace. Pouze u *B. subtilis* bylo možné sledovat mírný nárůst jedenáctý den.

Při teplotě 25 °C u kultivace KP bylo možné sledovat nárůst aktivity první a desátý den, u *B. subtilis* druhý, třetí a taktéž desátý den.

Teplota 37 °C vedla k nárůstu aktivity produkovaných lipáz u KP druhý den, u *B. subtilis* den třetí. V obou případech následoval pokles aktivity a následně její opětovné zvýšení kolem desátého dne.

Teplota 50 °C způsobila u KP zvýšení aktivity druhý a devátý den, u *B. subtilis* došlo k nárůstu až od osmého dne.

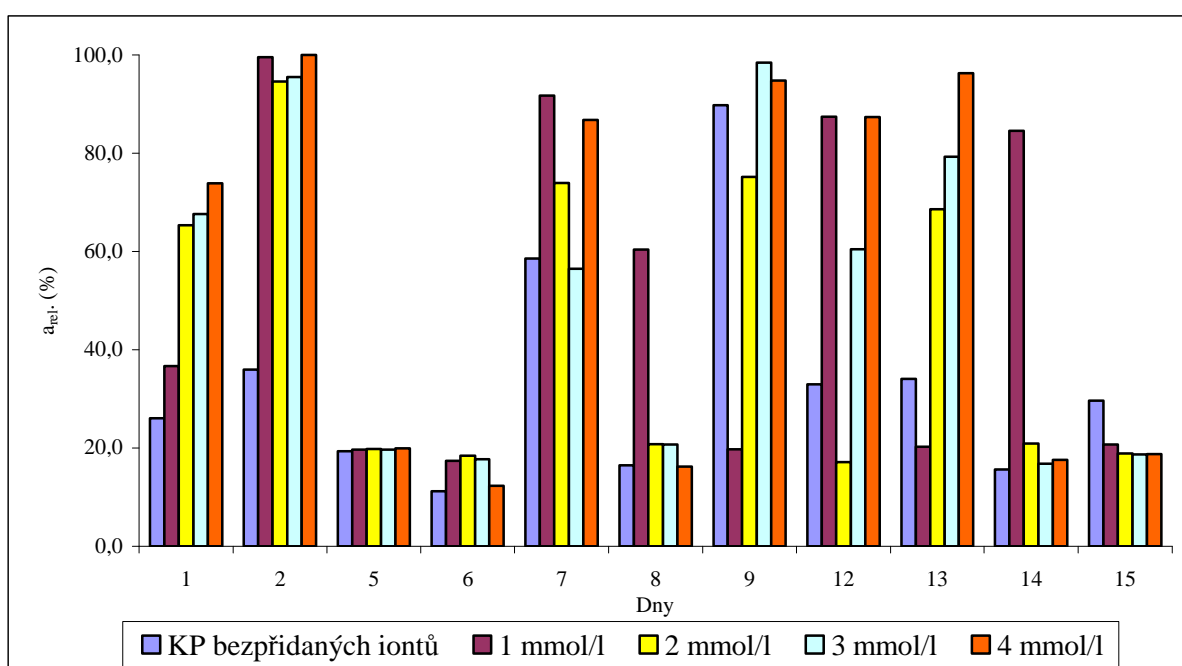
Při srovnání hodnot relativní aktivity pro toto stanovení s hodnotami pro obsah rozpustných bílkovin a specifické aktivity (Příloha 1) je patrné, že ačkoli nejvyšší hodnoty relativní aktivity byly stanoveny při 37 °C devátý den pro KP a při 50 °C osmý den pro *B. subtilis*, nejvyšší specifická aktivity byla dosažena pro KP druhý den při 37 °C a pro *B. subtilis* taktéž druhý den při 25 °C.

Srovnáním získaných výsledků s výsledky uvedenými v literatuře [43] pro kultivaci a produkci lipáz u *B. subtilis*, která je zde uvedena jako 37 °C, je možné konstatovat, že v tomto případě se získané výsledky, tzn. aktivita vykazovaná při 37 °C, shodují s výsledky uvedenými v literatuře.

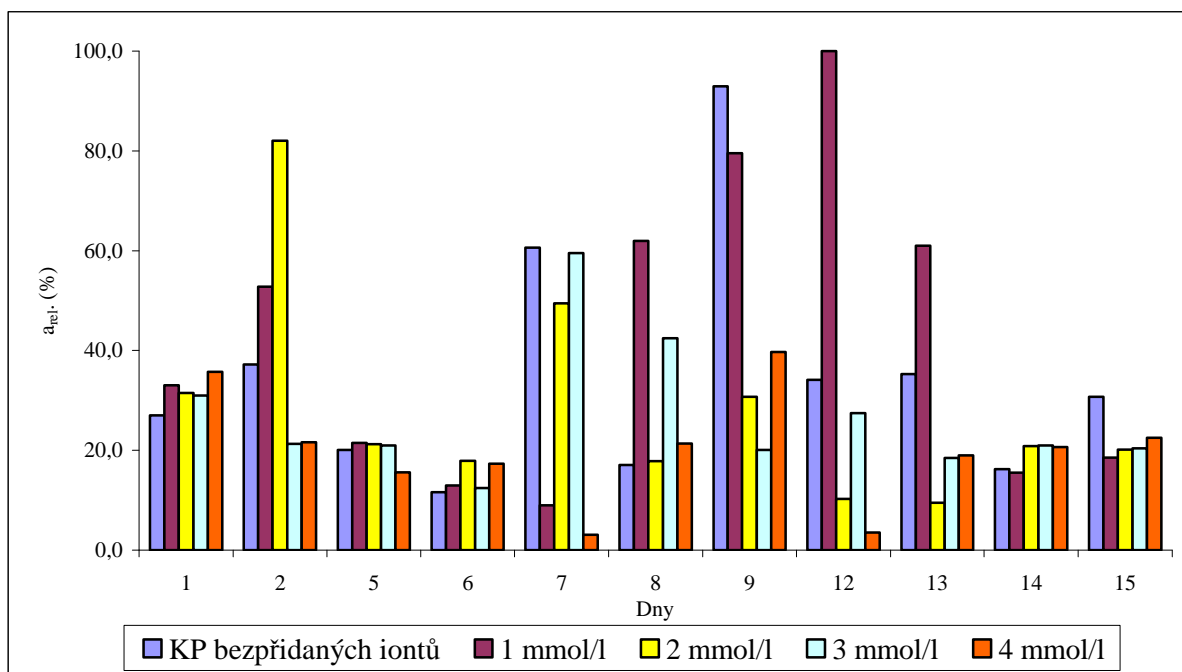
4.2.3 Stanovení vlivu iontů na produkci lipáz v průběhu kultivace

Kationty vápenaté a hořečnaté tvoří buněčnou hmotu mikroorganismů, a proto do určité koncentrace stimulují růst mikroorganismů. V živných prostředích však musí být zachovány určité poměry jednotlivých aniontů a kationtů, neboť velký nadbytek jednoho iontu může inhibovat transport jiného iontu přes cytoplazmatickou membránu nebo může mít inhibiční účinek na některé enzymy [18].

Produkce lipáz byla sledována u KP po přidavku vápenatých (ve formě dihydrátu chloridu vápenatého) a hořečnatých iontů (ve formě síranu hořečnatého) do kultivačního média, přičemž výsledky byly porovnány s kultivací bez přidavku anorganických sloučenin. Přídavek měl nasimulovat různé stupně tvrdosti vody. Příslušné koncentrace hořečnatých a vápenatých iontů pro jednotlivé stupně tvrdosti vody byly připraveny podle literatury [44]. Stupnice tvrdosti vody je uvedena v Příloze 2. Výsledky stanovení jsou uvedeny v Grafech 6 a 7 a v Příloze 3.



Graf 6 Vliv Mg^{2+} iontů na produkci lipáz



Graf 7 Vliv Ca^{2+} iontů na produkci lipáz

Studiem vlivu různých koncentrací vápenatých a hořečnatých iontů přidávaných do kultivačních médií při kultivaci mikroorganismů z KP bylo zjištěno, že tyto ionty mají vliv na produkci lipáz u studovaného KP.

Studiem vlivu hořečnatých iontů (Graf 6) bylo zjištěno, že tyto ionty mají stimulační efekt na produkci lipáz a dosahované aktivity jsou při přidavku vyšší ve srovnání s KP bez přidavku iontů. První a druhý den došlo k výraznému nárůstu aktivity. Pátý a šestý den následovalo snížení s následným opětovným zvýšením. Závěr kultivace byl doprovázen snížením lipolytické aktivity.

Nejvyšší hodnoty lipolytické aktivity byly stanoveny pro všechny koncentrace hořečnatých iontů druhý den kultivace.

Vliv vápenatých iontů je zobrazen v Grafu 7. Vápenaté ionty mají na produkci lipáz stimulační efekt při koncentraci 1 mmol/l. Tato koncentrace vedla ke zvýšení produkce na počátku kultivace (druhý den) a následně dvanáctý a třináctý den. Při koncentraci 1 mmol/l byla dvanáctý den zjištěna nejvyšší hodnota tohoto stanovení (100 %). Pozitivní vliv byl zjištěn také u koncentrace 2 mmol/l druhý den kultivace. Koncentrace 3 a 4 mmol/l měly na produkci lipáz inhibiční účinek.

Z uvedeného vyplývá, že z hlediska tvrdosti odpadní vody, která by byla vypouštěna přes odlučovače tuků do odpadu, by bylo optimální, aby byla tato voda měkká až středně tvrdá.

Tento závěr není v souladu s poznatky z odborné literatury [45], kde je uvedeno, že optimální tvrdost vody je 0,0 mmol/l vápenatých a hořečnatých iontů.

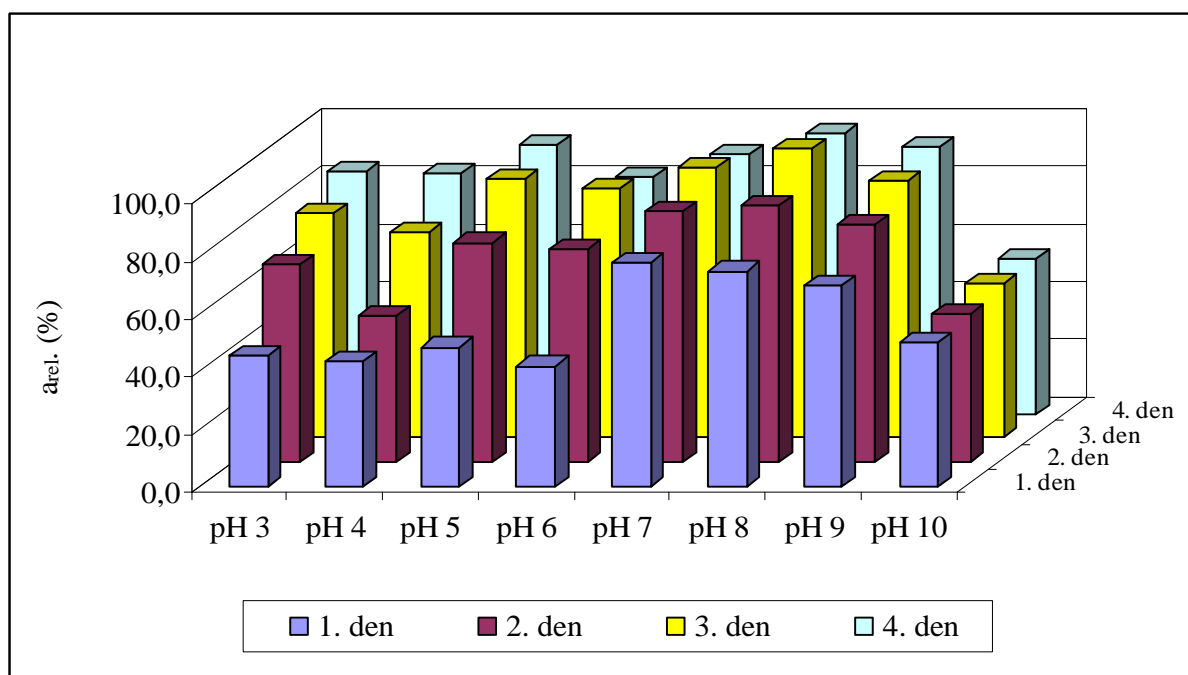
4.2.4 Stanovení pH optima produkovaných lipáz

Růst MO i jejich biochemická činnost jsou silně ovlivněny koncentrací vodíkových iontů v prostředí. Stanovení pH optima produkovaných lipáz je důležité z hlediska jejich technologického využití [18].

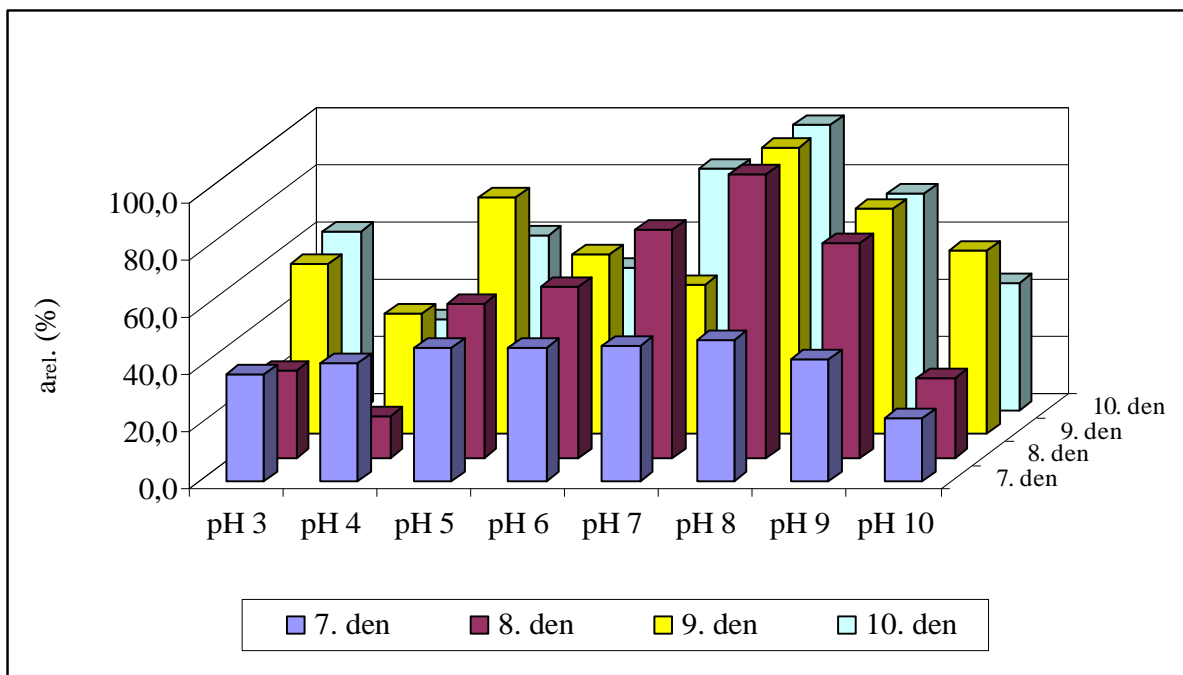
Lipolytická aktivita byla sledována ve třech časové úsecích v průběhu patnácti dní a to: 1.-4. den, 7.-10. den a 12.-15. den.

Lipolytická aktivita byla monitorována v rozmezí pH 3-10 u mikroorganismů obsažených v KP a u čisté kultury *B. subtilis*.

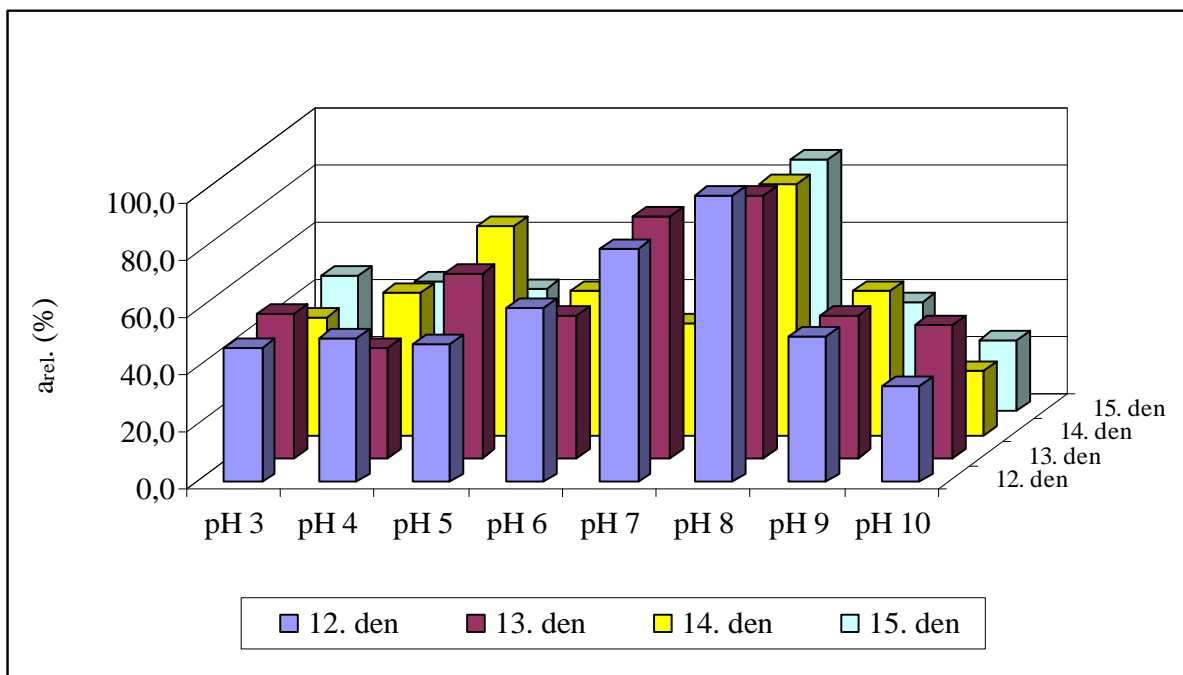
V Grafech 8-10 jsou zobrazeny pH profily pro jednotlivé časové úseky pro kultivaci mikroorganismů z KP. Hodnoty k těmto grafům jsou uvedeny v Příloze 4.



Graf 8 Stanovená pH optima 1.-4 den - KP



Graf 9 Stanovená pH optima 7.-10 den - KP



Graf 10 Stanovená pH optima 12.-15 den - KP

V případě kultivace MO obsažených v KP (Grafy 9-11) byla nejvyšší relativní aktivita dosažena při pH 8.

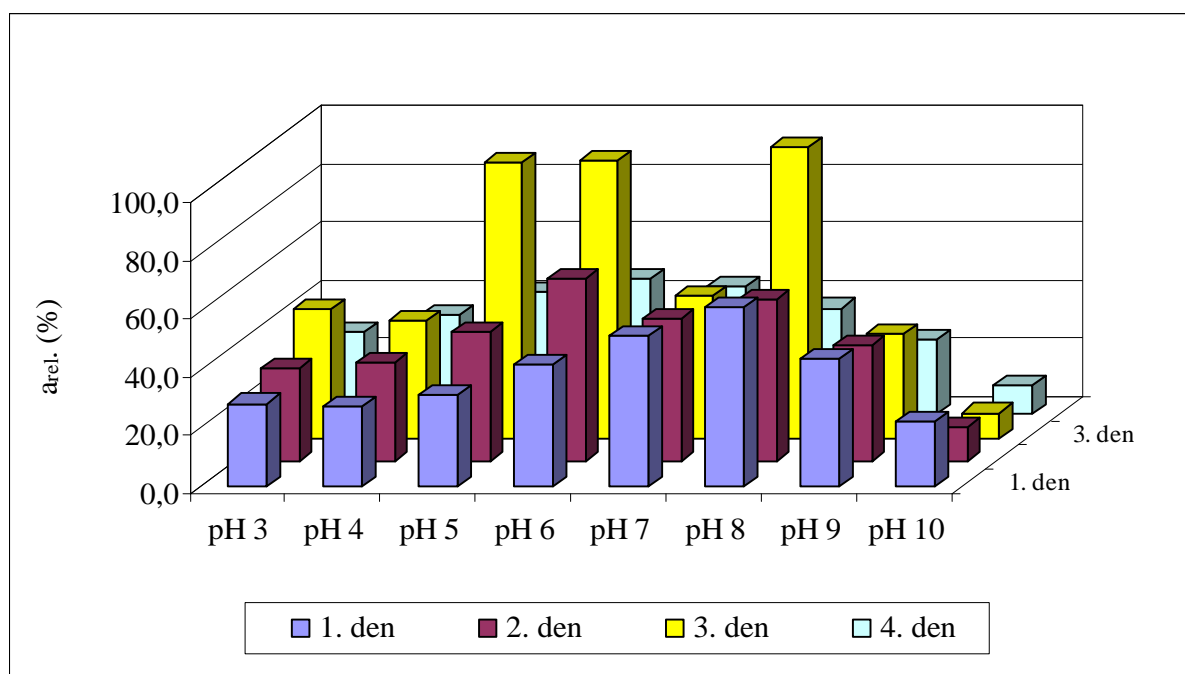
V prvním časovém úseku (Graf 8) bylo možné sledovat nejvyšší hodnotu relativní aktivity (100 %) při pH 8 třetí den. První a druhý den docházelo k nárůstu aktivity při všech hodnotách pH.

V druhém časovém úseku (Graf 9) byla u KP stanovena nejvyšší relativní aktivita (100 %) desátý den při pH 8. Z Grafu 10 potom vyplývá, že v třetím časovém úseku byla nejvyšší hodnota (100 %) stanovena při pH 8 dvanáctý den.

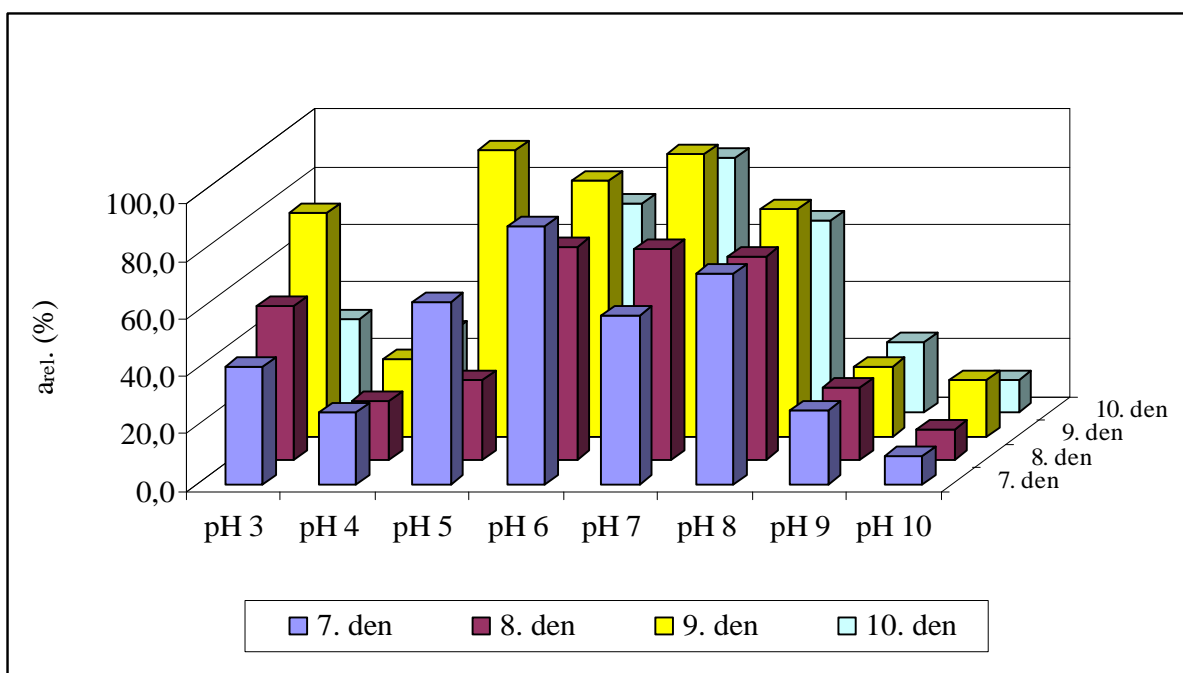
Při srovnání období prvního až čtvrtého dne a sedmého až desátého dne je patrné, že v druhém období byly dosaženy ve srovnání s ostatními pH vyšší hodnoty relativní aktivity při pH 7-9, v prvním období byly tyto rozdíly v rámci sledovaného rozsahu pH menší. Podobný efekt bylo možné sledovat dvanáctý až patnáctý den, kdy vyšších hodnot bylo dosaženo dvanáctý a třináctý den při pH 7 a 8, čtrnáctý a patnáctý den již pouze u pH 8.

Z výše uvedeného vyplývá, že nejvyšších hodnot aktivity pro kultivaci mikroorganismů z KP bylo dosaženo při pH 8. Naměřené hodnoty v prvním časovém úseku kultivace však v porovnání s ostatními časovými úseky dosahovaly nejvyšších hodnot v celém rozsahu měřeného pH. Přičemž aktivita se pohybovala v rozmezí $9,106 \cdot 10^{-5}$ - $1,836 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml·min (Příloha 4).

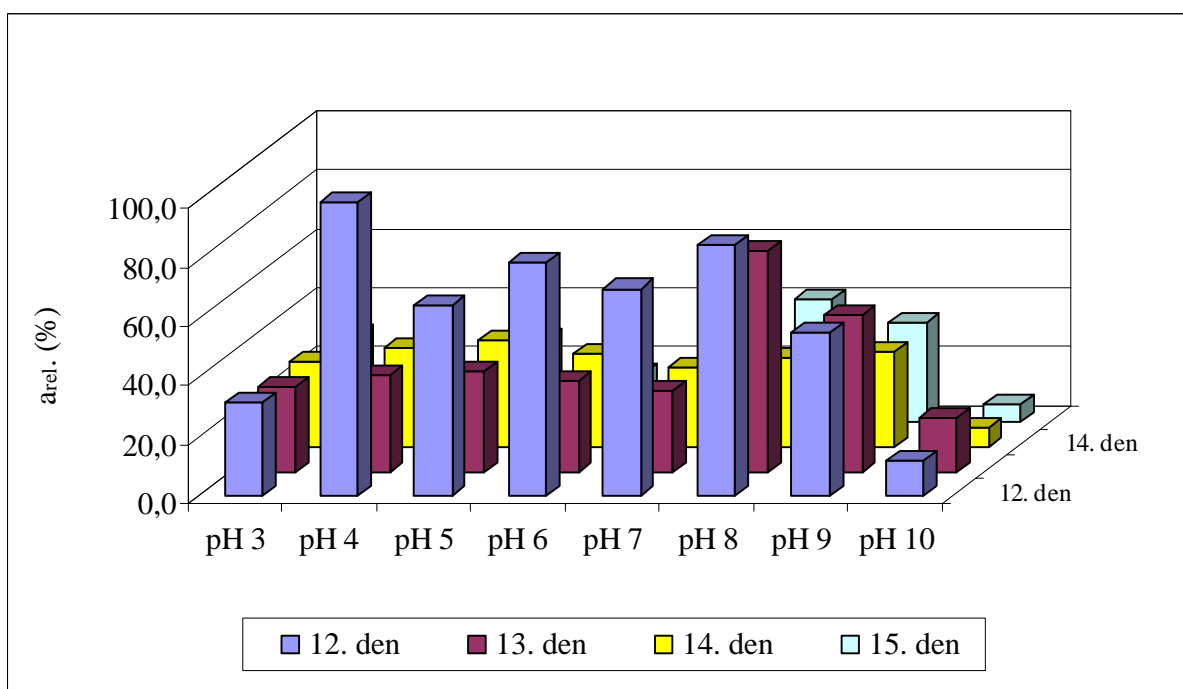
V následujících grafech (Grafy 11-13) jsou zobrazeny pH profily produkovaných lipáz pro jednotlivé časové úseky kultivace *B. subtilis*. Příslušná data k těmto grafům jsou uvedena v Příloze 5.



Graf 11 Stanovená pH optima 1.-4. den – *B. subtilis*



Graf 12 Stanovená pH optima 7.-10. den – *B. subtilis*



Graf 13 Stanovená pH optima 12.-15. den – *B. subtilis*

Při kultivaci *B. subtilis* bylo v prvním časovém úseku (Graf 11) dosaženo nejvyšší aktivity (100 %) při pH 8 třetí den. Kromě pH 8 však byly tento den vyšší hodnoty dosaženy také při pH 5 a 6. Ostatní dny tohoto období vykazovaly ve srovnání s třetím dnem maximálně 60 % nejvyšší hodnoty.

V druhém období (Graf 12) byl sledovaný nárůst aktivity sedmý a devátý den v rozmezí pH 5-8. Devátý den byla při pH 5 stanovená nejvyšší hodnota aktivity (100 %) v tomto období. Osmý a desátý den byl nárůst aktivity sledovaný při pH 6-8.

V období třetího časového úseku (Graf 13) bylo vyšších hodnot aktivity dosaženo pouze dvanáctý den, kdy při pH 4 byla stanovena nejvyšší hodnota aktivity (100 %) tohoto období. Třináctý den bylo dosaženo vyšší hodnoty již pouze při pH 8. Čtrnáctý a patnáctý den byla aktivita ve srovnání s předešlými dny nízká.

Z uvedeného vyplývá, že pH optimum u *B. subtilis* klesá s přibývajícím dny kultivace.

Srovnáním výsledků s hodnotami uvedenými v literatuře [27] je možné říci, že výsledky se neshodují. Dle literatury vykazují lipázy produkované rodem *Bacillus* sp. nejvyšší hodnoty aktivity při pH 8-10, zatímco z Grafů 11-13 vyplývá, že nejvyšších hodnot aktivity bylo dosaženo v rozmezí pH 4-8.

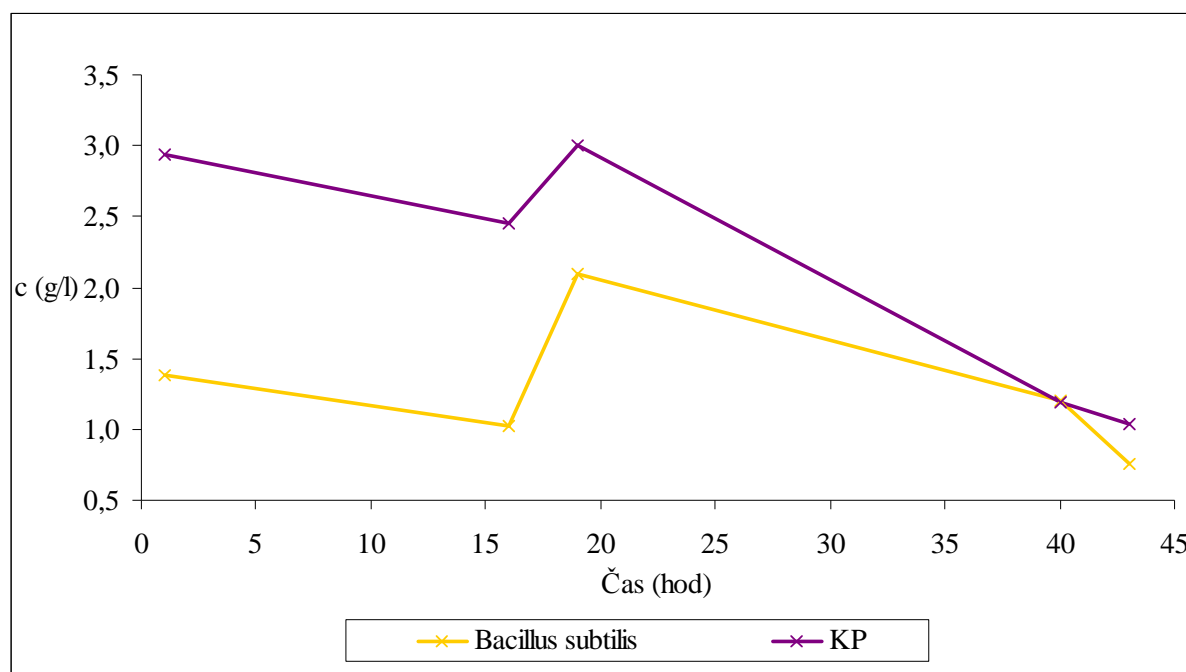
4.3 Chemická spotřeba kyslíku $CHSK_{Cr}$

$CHSK_{Cr}$ udává hmotnostní koncentraci kyslíku ekvivalentní hmotnosti silného oxidačního činidla spotřebovaného za daných podmínek na oxidaci organických látek v 1 l vody. Využívá se tedy jako ukazatel obsahu oxidovatelných látek v odpadní vodě.

K oxidaci se využívá dichroman draselný v silně kyselém prostředí kyseliny sírové při dvouhodinovém varu. Oxidace organických látek je katalyzována stříbrnými ionty a probíhá v nadbytku dichromanu. Pro maskování chloridů, které by byly za podmínek stanovení oxidovány na Cl_2 a způsobovaly by při stanovení $CHSK_{Cr}$ pozitivní chybu, se přidává síran rtuťnatý. Koncentrace chromitého iontu vzniklého redukcí dichromanu draselného, která je úměrná obsahu organických látek v vzorku, se stanoví spektrofotometricky.

Stanovení bylo provedeno pro KP i pro čistou kulturu *B. subtilis*.

Závislosti koncentrace organických látek v médiu na čase je uvedena v Grafu 14. Naměřené hodnoty absorbancí a vypočítané hodnoty koncentrací jsou uvedeny v Příloze 6.



Graf 14 Závislost koncentrace organických látek na čase

V Grafu 14 je možné rozeznat tři fáze. V první fázi docházelo k mírnému poklesu $CHSK_{Cr}$. V tomto úseku docházelo k nárůstu biomasy a buňky využívaly organické látky z prostředí ke svému množení a růstu. V následující fázi došlo k výraznému nárůstu $CHSK_{Cr}$. Buňky

v tomto úseku pravděpodobně začaly produkovat organické metabolity do prostředí. Ve třetí fázi byl pokles způsoben metabolickým rozkladem organických látek až na jednoduché anorganické látky.

Z grafu je tedy patrné, že během dvou dnů došlo ke snížení obsahu organických látek z počáteční koncentrace 3,918 g/l u KP a 1,378 g/l u *B. subtilis* na koncentraci 1,038 g/l (tj. snížení o 65 %) u KP a 0,752 g/l u *B. subtilis* (tj. snížení o 28 %) po 43 hodinách kultivace. Protože tuk je v tomto případě chápán také jako organické znečištění, pokles koncentrace ukazuje na jeho rozklad bakteriemi. Tento rozklad je efektivnější v případě využití KP.

5 ZÁVĚR

Cílem práce bylo stanovit vhodné podmínky pro využití komerčního preparátu (KP) do odlučovačů tuků Sany Duo Spezial.

Prvním krokem bylo stanovení rodového zastoupení mikroorganismů, obsažených v tomto přípravku. Metodou PCR byla zjištěna přítomnost rodu *Bacillus* sp.

Následně byl přípravek testovaný na schopnost produkovat lipázy při různých kultivačních teplotách, při přidavku vápenatých a hořečnatých iontů do kultivačního média a dále bylo stanoveno pH optimum.

Studiem vlivu teploty na produkci lipáz v průběhu patnáctidenní kultivace mikroorganismů obsažených v KP a čisté kultury *B. subtilis* byla stanovena optimální teplota pro KP 37 °C, pro *B. subtilis* 25-50 °C. Výsledky získané pro kultivaci *B. subtilis* tedy vykazují širší teplotní optimum, než bylo pro *B. subtilis* zjištěno v literatuře [43], v níž je uvedena teplota 37 °C.

Předmětem dalšího výzkumu bylo stanovení vlivu hořečnatých a vápenatých iontů na produkci lipáz u KP. Bylo zjištěno, že ionty mají vliv na aktivitu produkovaných lipolytických enzymů. Ve srovnání s KP bez přidaných iontů bylo nejvyšší aktivity dosaženo druhý den při přidavku hořečnatých iontů o koncentraci 1-4 mmol/l a při přidavku vápenatých iontů 2 mmol/l taktéž druhý den. Společným vyhodnocením těchto výsledků by bylo optimální, aby odpadní voda vypouštěná do potrubí a odlučovačů tuků byla měkká až středně tvrdá [44]. Tento poznatek se neshoduje s literaturou [45], kde je jako optimální stanovena koncentrace iontů 0,0 mmol/l.

Dále byl studovaný vliv pH na aktivitu lipáz produkovaných mikroorganismy obsaženými v KP a čistou kulturou *B. subtilis*. Ze stanovených hodnot aktivity vyplývá, že vhodné pH pro KP je pH 8, pro *B. subtilis* pH 4-8. Tyto výsledky se neshodují s literaturou [27], ve které je uvedeno jako vhodné pH pro aktivitu lipáz produkovaných *B. subtilis* pH 8-10.

Dalším stanovením bylo zjištění hodnoty CHSK_{Cr}, která vypovídá o obsahu organického znečištění ve vodě. Zde bylo možné sledovat snížení obsahu organických látek z počáteční koncentrace 3,918 g/l u KP a 1,378 g/l u *B. subtilis* na koncentraci 1,038 g/l u KP (tj. snížení o 65 %) a 0,752 g/l u *B. subtilis* (tj. snížení o 28 %) po 43 hodinách kultivace. Z výše uvedeného vyplývá, že při odbourávání organických nečistot je výhodnější použít směsnou kulturu obsaženou v KP, než čistý kmen *B. subtilis*.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Vodrážka, Z.: *Biochemie*. vyd. 2. Praha: ACADEMIA, 1999. 506 s. ISBN 80-200-0600-1.
- [2] Horáková, D., Němec M., Szostková M.: *Laboratorní cvičení z fyziologie bakterií*. [online]. Brno, Masarykova univerzita, únor 2007 [cit. 16. 12. 2007]. Dostupné z: <http://is.muni.cz/elportal/estud/prif/ps06/3074288/Labor.cv.z_fyziol.bakterii_upravene.pdf>.
- [3] Saxena, R. K., Sheoran A., Giri B., Davidson W. S.: Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, vol. 52, pp. 1-18.
- [4] Joseph, B., Ramteke P. W., Thomas, G., Shrivastava, N.: Standard Review Cold-active microbial Lipases: a versatile tool for industrial applications. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, June 2007, vol. 2, pp. 39-48. ISSN 1538/2273.
- [5] Kocková-Kratochvílová, A.: *Kvasinky ve výzkumu a praxi*. vyd. 1. Praha: Academia, 1986. 376 s. ISBN 21-023-86.
- [6] *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta* [online]. [cit. 2. 3. 2008]. Dostupný z: <http://home.zf.jcu.cz/public/departments/koz/vyz/pred_03b.pdf>.
- [7] *PCC Natural Markets* [online]. c2001-2008, [cit. 2. 3. 2008]. Dostupný z: <<http://www.pccnaturalmarkets.com/health/2874007/>>.
- [8] *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta* [online]. [cit. 2. 3. 2008]. Dostupný z: <http://home.zf.jcu.cz/public/departments/koz/vyz/pred_10.pdf>.
- [9] *Základy biochemie – Metabolismus lipidů* [online]. [cit. 2. 3. 2008]. Dostupný z: <<http://ibiochemie.upol.cz/WebGraphics/biochemie/download/Modul-04.pdf>>.
- [10] Velíšek, J.: *Chemie potravin I*. Tábor: OSSIS, 2002. 344 s. ISBN 80-86659-00-3.
- [11] Márová, I.: *Přednášky z biochemie II*. FCH VUT Brno. 2007. Nepublikované.
- [12] Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing, Ústí nad Labem: Espero Publishing, c1998. 630 s. ISBN 80-902906-0-4.
- [13] Ambrožová, J.: *Mikrobiologie v technologii vod*. Praha: VŠCHT Praha, 2004. 244 s. ISBN 80-7080-534-X.
- [14] Vrtiška, O.: Neviditelní kouzelníci. *Časopis ABC* [online]. 9. 7. 2001, č. 14 [cit. 10. 12. 2007]. Dostupné z: <<http://www.iabc.cz/scripts/detail.php?id=2267>>.
- [15] *The genus Bacillus* [online]. [cit. 24. 11. 2009]. Dostupný z: <<http://textbookofbacteriology.net/Bacillus.html>>.
- [16] *Fyziologie průmyslových mikroorganismů* [online]. [cit. 14. 12. 2007]. Dostupný z: <http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/fyziolII.pdf>.
- [17] Xi-Yang Wu, Walker, M.J., Hornitzky, M., Chin, J.: Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of Bacillus species of environmental significance. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, vol 64, pp. 107-119.
- [18] Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

- [19] *Visual Unlimited* [online]. [cit. 2. 2. 2008]. Dostupný z: <<http://www.visualsunlimited.com/browse/vu901/vu901040.html>>.
- [20] Rosypal S.: *Nový přehled biologie*. vyd. 1. Praha: Scientia, 2003. 797 s. ISBN 80-7183-268-5.
- [21] *BioCoach Activity* [online]. [cit. 2. 2. 2008]. Dostupný z: <http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/cells/common.html>.
- [22] Chumchalová, J., Němč M., Kotoučková, L., Páčová, Z., Savická, D., Kubátová, A., Patáková, P. : *Miniatlas mikroorganismů* [online]. c2007, poslední revize 11. 11. 2007 [cit. 20. 12. 2007]. Dostupný z: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/>>.
- [23] Kocková-Kratochvílová, A.: *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. vyd. 1. Bratislava: Alfa, 1990. 699 s. ISBN 80-05-00644-6.
- [24] de María, P. D., Carboni-Oerlemans, Ch., Tiun, B., Bargeman, G., van der Meer, A., van Gemert, R.: Biotechnological applications of *Candida Antarctica* lipase A: State-of-the-art. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2005, vol. 37, pp. 36-46.
- [25] *Doktor Fungus* [online]. c2007 [cit. 29. 1. 2008]. Dostupný z: <<http://www.doctorfungus.org/thefungi/>>.
- [26] Villeneuve, P.: Lipases in lipophilization reaction. *Biotechnology Advances*, 2007, vol. 25, pp. 515-536.
- [27] Bora, L., C Kalita, M.: Production of thermostable alkaline lipase on vegetable oils from thermophilic *Bacillus* sp. DH4, characteriaztion and its potential applications as detergent additive. *Journal of chemical technology ans biotechnology*, 2008, vol. 83, pp. 688-693.
- [28] Matsumya, Y., Wakita, D., Kimura, A., Sanpa, S., Kubo, M.: Isolation and characterization of a lipid-degrading bacterium and its application to lipid-containing wastewater treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, vol. 103, no. 4, pp. 325-330.
- [29] Mongkolthanaruk, W., Dharmsthiti, S.: Biodegradation of lipid-rich wastewater by mixed bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2002, vol. 50, pp. 101-105.
- [30] *Hauraton* [online]. [cit. 27. 2. 2008]. Dostupný z: <http://www.hauraton.cz/pdf_odluc/hauraton_odlucovace.pdf>.
- [31] *BMTO VÝSTAVBA* [online]. [cit. 27. 2. 2008]. Dostupný z: <<http://www.euroregin.cz/prezentace/liberecky/liberec/bmto/obrazky/pdf/ltpproj.pdf>>.
- [32] *EKO Pardubice* [online]. [cit. 27. 2. 2008]. Dostupný z: <<http://www.ekopardubice.cz/cs/15-odlucovace-tuku/>>.
- [33] *CDP Plast* [online]. [cit. 27. 2. 2008]. Dostupný z: <<http://www.cdpplast.cz/index.php?menu=odlucovace>>.
- [34] *Laboratoř molekulárních metod – SVÚ Praha* [online]. [cit. 13. 2. 2010]. Dostupný z: <www.lmmpraha.wz.cz/mseq.html>.
- [35] Rosenberg, M.: *Přednášky z Biotechnologie II*. FCH VUT Brno, 2009. Nепublikované.
- [36] *Identifikace mikroorganismů* [online]. [cit. 13. 2. 2010]. Dostupný z: <<http://biomikro.vscht.cz/documents/metmiklab/Metmiklab6a.pdf>>.

- [37] *Identifikace mikroorganismů pomocí biochemických testů* [online]. [cit. 13. 2. 2010]. Dostupný z: <http://webak.upce.cz/~kbbv/Student/Vyuka/Obecna_klinicka_mikrobiologie/Laboratorni_cviceni/Navody/Biochemicke_testy.pdf>.
- [38] Králová, B., Fukal, L., Rauch, P., Ruml, T.: *Bioanalytické metody*. Praha: VŠCHT Praha, 2007. 254 s. ISBN 978-807080-449-3.
- [39] Oliwa-Stasiak, K., Molár, C.I., Arshak, K., Bartoszcze, M., Adley, C.C.: Development of a PCR assay for identification of the *Bacillus cereus* group species. *Journal of Applied Mikrobiology*, 2009, vol. 108, pp. 266-273. ISSN 1364-5072
- [41] Španová A., Rittich B.: *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Brno, 2010. 85 str. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [41] Pavlačková, J.: *Mikroorganizmy s lipolytickou aktivitou a jejich využití*. Brno, 2008. 54 s. Bakalářská práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně, ústav Chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
- [42] Saadaoui, I., Rouis, S., Jaoua, S.: A new Tunisian strain of *Bacillus thuringiensis* kurstaki having high insecticidal activity and δ -endotoxin yield. *Arch Microbiol*, 2009, vol 191, pp. 341-348.
- [43] Selva Mohan T., Palavesam, A., Immanuel, G.: Isolation and characterization of lipase-producing *Bacillus* strains from oil mill waste. *African Journal of Biotechnology*, 2008, vol 7. ISSN 1684-5315.
- [44] [Vodarenstvi.cz](http://www.vodarenstvi.cz) [online]. [cit. 15. 3. 2010]. Dostupný z: <<http://www.vodarenstvi.cz/clanky/jak-tvrda-muze-byt-voda>>.
- [45] Aikaitė-Stanaitienė, J., Matikevičienė, V., Levišauskas, D., Grigiškis, S., Baškys, E.: Optimization of complex technology for grease wastes utilization. *Environment. Technology. Resources*, 2009, vol. 1. ISBN 978-9984-44-027-9.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

apod.	a podobně
atd.	a tak dále
ATP	adenosintrifosfát
CoA	koenzym A
č.	číslo
DEAE	aniontový iontoměnič obsahující diethylaminoethylové funkční skupiny, používaný k chromatografickému dělení některých enzymů a dalších bílkovin
DNA	deoxyribonukleová kyseliny
FADH ₂	redukovaná forma flavinadeninukleotidu
KP	komerční přípravek
log P	rozdělovací koeficient
NADH ₂	redukovaná forma nikotinadeninukleotidu
např.	například
popř.	popřípadě
tzv.	takzvaně

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Stanovení vlivu kultivační teploty na produkci lipáz

Příloha 2: Stupnice tvrdosti vody

Příloha 3: Stanovení vlivu iontů na produkci lipáz

Příloha 4: Stanovení pH optima produkovaných lipáz -KP

Příloha 5: Stanovení pH optima produkovaných lipáz –*B. subtilis*

Příloha 6: Stanovení $CHSK_{Cr}$

Příloha 1: Stanovení vlivu kultivační teploty na produkci lipáz

Hodnoty lipolytické a relativní aktivity pro stanovení vlivu teploty na produkci lipáz - KP a *Bacillus subtilis* (Grafy 4 a 5). V příloze jsou dále uvedeny naměřené hodnoty obsahu rozpustných bílkovin a specifické aktivity.

Den	Teplota (°C)	KP			
		a (mmol/ml·min)	a _{rel} (%)	y (mg/ml)	a _{spec.} (mmol/mg·min)
1	5	$4,013 \cdot 10^{-4}$	4,567	1,078	$3,744 \cdot 10^{-5}$
	25	$3,852 \cdot 10^{-4}$	43,832	1,112	$3,465 \cdot 10^{-4}$
	37	$1,317 \cdot 10^{-4}$	14,982	0,889	$1,481 \cdot 10^{-4}$
	50	$1,321 \cdot 10^{-4}$	15,034	1,026	$1,287 \cdot 10^{-4}$
2	5	$7,371 \cdot 10^{-5}$	8,388	0,747	$9,864 \cdot 10^{-5}$
	25	$1,595 \cdot 10^{-4}$	18,152	0,913	$1,747 \cdot 10^{-4}$
	37	$6,523 \cdot 10^{-4}$	74,226	0,497	$1,313 \cdot 10^{-3}$
	50	$4,396 \cdot 10^{-4}$	50,026	0,700	$6,280 \cdot 10^{-4}$
3	5	$5,822 \cdot 10^{-5}$	6,625	1,490	$3,907 \cdot 10^{-5}$
	25	$1,544 \cdot 10^{-5}$	17,575	1,873	$8,246 \cdot 10^{-5}$
	37	$1,560 \cdot 10^{-4}$	17,753	0,733	$2,128 \cdot 10^{-4}$
	50	$1,539 \cdot 10^{-4}$	17,512	1,187	$1,296 \cdot 10^{-4}$
4	5	$9,576 \cdot 10^{-5}$	10,898	0,856	$1,119 \cdot 10^{-4}$
	25	$1,705 \cdot 10^{-4}$	19,402	1,287	$1,325 \cdot 10^{-4}$
	37	$1,627 \cdot 10^{-4}$	18,520	0,884	$1,840 \cdot 10^{-4}$
	50	$1,582 \cdot 10^{-4}$	18,005	0,525	$3,014 \cdot 10^{-4}$
8	5	$1,452 \cdot 10^{-4}$	16,525	1,239	$1,172 \cdot 10^{-4}$
	25	$1,661 \cdot 10^{-4}$	18,898	0,752	$2,208 \cdot 10^{-4}$
	37	$1,565 \cdot 10^{-4}$	17,806	0,464	$3,376 \cdot 10^{-4}$
	50	$1,543 \cdot 10^{-4}$	17,564	0,487	$3,168 \cdot 10^{-4}$
9	5	$1,482 \cdot 10^{-4}$	16,861	1,428	$1,037 \cdot 10^{-4}$
	25	$1,538 \cdot 10^{-4}$	17,501	1,017	$1,512 \cdot 10^{-4}$
	37	$8,788 \cdot 10^{-4}$	100,000	0,889	$9,883 \cdot 10^{-4}$
	50	$5,674 \cdot 10^{-4}$	64,567	0,776	$7,315 \cdot 10^{-4}$
10	5	$1,674 \cdot 10^{-4}$	19,055	1,684	$9,945 \cdot 10^{-5}$
	25	$6,430 \cdot 10^{-4}$	73,176	1,026	$6,265 \cdot 10^{-4}$
	37	$6,776 \cdot 10^{-4}$	77,113	0,989	$6,855 \cdot 10^{-4}$
	50	$1,542 \cdot 10^{-4}$	17,543	1,088	$1,417 \cdot 10^{-4}$
11	5	$1,520 \cdot 10^{-4}$	17,302	1,575	$9,653 \cdot 10^{-5}$
	25	$1,631 \cdot 10^{-4}$	18,562	1,400	$1,165 \cdot 10^{-4}$
	37	$7,473 \cdot 10^{-4}$	85,039	1,291	$5,787 \cdot 10^{-4}$
	50	$1,672 \cdot 10^{-4}$	19,024	1,093	$1,530 \cdot 10^{-4}$
14	5	$8,340 \cdot 10^{-5}$	9,491	1,268	$6,580 \cdot 10^{-5}$
	25	$1,185 \cdot 10^{-4}$	13,480	1,140	$1,039 \cdot 10^{-4}$
	37	$1,663 \cdot 10^{-4}$	18,929	0,440	$3,782 \cdot 10^{-4}$
	50	$1,151 \cdot 10^{-4}$	13,102	0,903	$1,275 \cdot 10^{-4}$

15	5	$5,388 \cdot 10^{-5}$	6,131	1,603	$3,360 \cdot 10^{-5}$
	25	$1,576 \cdot 10^{-4}$	17,932	1,963	$8,028 \cdot 10^{-5}$
	37	$1,599 \cdot 10^{-4}$	18,194	0,946	$1,690 \cdot 10^{-4}$
	50	$1,471 \cdot 10^{-4}$	16,735	1,022	$1,439 \cdot 10^{-4}$

Den	Teplota (°C)	<i>B. subtilis</i>			
		a (mmol/ml·min)	a _{rel} (%)	y (mg/ml)	a _{spec.} (mmol/mg·min)
1	5	$6,430 \cdot 10^{-5}$	9,093	1,074	$5,989 \cdot 10^{-5}$
	25	$1,487 \cdot 10^{-4}$	21,031	1,310	$1,135 \cdot 10^{-4}$
	37	$1,234 \cdot 10^{-4}$	17,456	0,927	$1,332 \cdot 10^{-4}$
	50	$1,280 \cdot 10^{-4}$	18,095	1,059	$1,208 \cdot 10^{-4}$
2	5	$8,359 \cdot 10^{-5}$	11,820	0,799	$1,046 \cdot 10^{-4}$
	25	$6,177 \cdot 10^{-4}$	87,345	0,520	$1,187 \cdot 10^{-3}$
	37	$1,615 \cdot 10^{-4}$	22,831	0,709	$2,276 \cdot 10^{-4}$
	50	$1,451 \cdot 10^{-4}$	20,522	0,525	$2,764 \cdot 10^{-4}$
3	5	$8,248 \cdot 10^{-5}$	11,663	1,551	$5,317 \cdot 10^{-5}$
	25	$6,827 \cdot 10^{-4}$	96,543	1,466	$4,656 \cdot 10^{-4}$
	37	$4,322 \cdot 10^{-4}$	61,122	0,861	$5,021 \cdot 10^{-4}$
	50	$7,316 \cdot 10^{-5}$	10,346	0,580	$1,262 \cdot 10^{-4}$
4	5	$1,102 \cdot 10^{-4}$	15,590	1,097	$1,005 \cdot 10^{-4}$
	25	$1,650 \cdot 10^{-4}$	23,327	0,629	$2,622 \cdot 10^{-4}$
	37	$1,589 \cdot 10^{-4}$	22,466	0,629	$2,525 \cdot 10^{-4}$
	50	$1,568 \cdot 10^{-4}$	22,179	0,454	$3,454 \cdot 10^{-4}$
8	5	$1,507 \cdot 10^{-4}$	21,305	1,126	$1,338 \cdot 10^{-4}$
	25	$1,629 \cdot 10^{-4}$	23,040	1,140	$1,429 \cdot 10^{-4}$
	37	$1,580 \cdot 10^{-4}$	22,348	0,586	$2,695 \cdot 10^{-4}$
	50	$7,072 \cdot 10^{-4}$	100,000	0,686	$1,031 \cdot 10^{-3}$
9	5	$1,396 \cdot 10^{-4}$	19,739	1,007	$1,386 \cdot 10^{-4}$
	25	$1,516 \cdot 10^{-4}$	21,435	0,738	$2,054 \cdot 10^{-4}$
	37	$1,532 \cdot 10^{-4}$	21,670	0,771	$1,988 \cdot 10^{-4}$
	50	$4,590 \cdot 10^{-4}$	64,905	0,719	$6,384 \cdot 10^{-4}$
10	5	$1,452 \cdot 10^{-4}$	20,535	0,970	$1,498 \cdot 10^{-4}$
	25	$6,989 \cdot 10^{-4}$	98,826	0,705	$9,917 \cdot 10^{-4}$
	37	$5,157 \cdot 10^{-4}$	72,929	0,766	$6,731 \cdot 10^{-4}$
	50	$1,514 \cdot 10^{-4}$	21,409	1,537	$9,849 \cdot 10^{-5}$
11	5	$3,192 \cdot 10^{-4}$	45,140	1,225	$2,606 \cdot 10^{-4}$
	25	$1,660 \cdot 10^{-4}$	23,470	1,074	$1,546 \cdot 10^{-4}$
	37	$6,537 \cdot 10^{-4}$	92,433	0,714	$9,152 \cdot 10^{-4}$
	50	$4,853 \cdot 10^{-4}$	68,624	0,955	$5,079 \cdot 10^{-4}$
14	5	$8,931 \cdot 10^{-5}$	12,629	0,908	$9,834 \cdot 10^{-5}$
	25	$1,620 \cdot 10^{-4}$	22,909	0,530	$3,058 \cdot 10^{-4}$
	37	$3,229 \cdot 10^{-4}$	45,662	0,411	$7,847 \cdot 10^{-4}$
	50	$1,587 \cdot 10^{-4}$	22,440	0,752	$2,110 \cdot 10^{-4}$
15	5	$7,814 \cdot 10^{-5}$	11,050	1,726	$4,526 \cdot 10^{-5}$

	25	$1,543 \cdot 10^{-4}$	21,826	1,253	$1,231 \cdot 10^{-4}$
	37	$1,823 \cdot 10^{-4}$	25,780	0,856	$2,129 \cdot 10^{-4}$
	50	$1,470 \cdot 10^{-4}$	20,783	1,741	$8,444 \cdot 10^{-5}$

Příloha 2: Stupnice tvrdosti vody

Stupeň tvrdosti vody	Koncentrace (mmol/l)
velmi měkká	0 – 0,7
měkká	0,7 – 1,3
středně tvrdá	1,3 – 2,1
dosti tvrdá	2,1 – 3,2
tvrdá	3,2 – 5,3
velmi tvrdá	> 5,3

Příloha 3: Stanovení vlivu iontů na produkci lipáz

Hodnoty lipolytické a relativní aktivity pro stanovení vlivu iontů na produkci lipáz u KP (Grafy 6 a 7).

Den	Koncentrace Mg^{2+} iontů (mmol/l)	KP			
		a (mmol/ml·min)	a_{rel} (%)	y (mg/ml)	$a_{spec.}$ (mmol/mg·min)
1	0	$2,274 \cdot 10^{-4}$	26,057	1,528	$1,489 \cdot 10^{-4}$
	1	$3,201 \cdot 10^{-4}$	36,681	1,334	$2,400 \cdot 10^{-4}$
	2	$5,702 \cdot 10^{-4}$	65,328	1,589	$3,588 \cdot 10^{-4}$
	3	$5,900 \cdot 10^{-4}$	67,600	1,140	$5,176 \cdot 10^{-4}$
	4	$6,449 \cdot 10^{-4}$	73,890	1,726	$3,736 \cdot 10^{-4}$
2	0	$3,137 \cdot 10^{-4}$	35,941	1,012	$3,099 \cdot 10^{-4}$
	1	$8,686 \cdot 10^{-4}$	99,524	1,173	$7,405 \cdot 10^{-4}$
	2	$8,257 \cdot 10^{-4}$	94,609	0,818	$1,009 \cdot 10^{-3}$
	3	$8,336 \cdot 10^{-4}$	95,507	1,523	$5,473 \cdot 10^{-4}$
	4	$8,728 \cdot 10^{-4}$	100,000	1,182	$7,381 \cdot 10^{-4}$
5	0	$1,691 \cdot 10^{-4}$	19,376	0,918	$1,843 \cdot 10^{-4}$
	1	$1,719 \cdot 10^{-4}$	19,693	1,272	$1,351 \cdot 10^{-4}$
	2	$1,728 \cdot 10^{-4}$	19,799	1,301	$1,329 \cdot 10^{-4}$
	3	$1,715 \cdot 10^{-4}$	19,651	1,093	$1,570 \cdot 10^{-4}$
	4	$1,737 \cdot 10^{-4}$	19,905	1,348	$1,289 \cdot 10^{-4}$
6	0	$9,761 \cdot 10^{-5}$	11,184	1,466	$6,657 \cdot 10^{-5}$
	1	$1,519 \cdot 10^{-4}$	17,410	1,958	$7,760 \cdot 10^{-5}$
	2	$1,608 \cdot 10^{-4}$	18,425	0,411	$3,908 \cdot 10^{-4}$
	3	$1,549 \cdot 10^{-4}$	17,748	1,083	$1,430 \cdot 10^{-4}$
	4	$1,072 \cdot 10^{-4}$	12,283	1,471	$7,288 \cdot 10^{-5}$
7	0	$5,111 \cdot 10^{-4}$	58,562	1,797	$2,844 \cdot 10^{-4}$
	1	$8,003 \cdot 10^{-4}$	91,702	2,625	$3,049 \cdot 10^{-4}$

	2	$6,453 \cdot 10^{-4}$	73,943	1,253	$5,149 \cdot 10^{-4}$
	3	$4,931 \cdot 10^{-4}$	56,501	1,201	$4,105 \cdot 10^{-4}$
	4	$7,574 \cdot 10^{-4}$	86,786	1,376	$5,503 \cdot 10^{-4}$
8	0	$1,440 \cdot 10^{-4}$	16,501	1,234	$1,167 \cdot 10^{-4}$
	1	$5,273 \cdot 10^{-4}$	60,412	2,280	$2,313 \cdot 10^{-4}$
	2	$1,812 \cdot 10^{-4}$	20,761	2,195	$8,256 \cdot 10^{-5}$
	3	$1,806 \cdot 10^{-4}$	20,698	2,374	$7,608 \cdot 10^{-5}$
	4	$1,413 \cdot 10^{-4}$	16,195	2,743	$5,152 \cdot 10^{-5}$
9	0	$7,833 \cdot 10^{-4}$	89,746	1,514	$5,175 \cdot 10^{-4}$
	1	$1,724 \cdot 10^{-4}$	19,757	1,395	$1,236 \cdot 10^{-4}$
	2	$6,564 \cdot 10^{-4}$	75,211	0,993	$6,609 \cdot 10^{-4}$
	3	$8,594 \cdot 10^{-4}$	98,467	1,045	$8,222 \cdot 10^{-4}$
	4	$8,276 \cdot 10^{-4}$	94,820	1,665	$4,971 \cdot 10^{-4}$
12	0	$2,878 \cdot 10^{-4}$	32,981	1,774	$1,623 \cdot 10^{-4}$
	1	$7,630 \cdot 10^{-4}$	87,421	1,447	$5,272 \cdot 10^{-4}$
	2	$1,497 \cdot 10^{-4}$	17,156	1,107	$1,353 \cdot 10^{-4}$
	3	$5,277 \cdot 10^{-4}$	60,465	1,991	$2,650 \cdot 10^{-4}$
	4	$7,625 \cdot 10^{-4}$	87,368	2,053	$3,715 \cdot 10^{-4}$
13	0	$2,975 \cdot 10^{-4}$	34,091	0,837	$3,554 \cdot 10^{-4}$
	1	$1,768 \cdot 10^{-4}$	20,254	0,501	$3,526 \cdot 10^{-4}$
	2	$5,988 \cdot 10^{-4}$	68,605	0,686	$8,731 \cdot 10^{-4}$
	3	$6,919 \cdot 10^{-4}$	79,281	0,610	$1,134 \cdot 10^{-3}$
	4	$8,405 \cdot 10^{-4}$	96,300	0,785	$1,070 \cdot 10^{-3}$
14	0	$1,366 \cdot 10^{-4}$	15,655	0,970	$1,409 \cdot 10^{-4}$
	1	$7,381 \cdot 10^{-4}$	84,567	1,376	$5,362 \cdot 10^{-4}$
	2	$1,823 \cdot 10^{-4}$	20,888	0,889	$2,050 \cdot 10^{-4}$
	3	$1,464 \cdot 10^{-4}$	16,776	1,357	$1,079 \cdot 10^{-4}$
	4	$1,537 \cdot 10^{-4}$	17,611	1,499	$1,025 \cdot 10^{-4}$
15	0	$2,588 \cdot 10^{-4}$	29,651	1,802	$1,436 \cdot 10^{-4}$
	1	$1,806 \cdot 10^{-4}$	20,687	1,258	$1,435 \cdot 10^{-4}$
	2	$1,649 \cdot 10^{-4}$	18,890	1,041	$1,584 \cdot 10^{-4}$
	3	$8,165 \cdot 10^{-4}$	93,552	1,173	$1,392 \cdot 10^{-4}$
	4	$1,636 \cdot 10^{-4}$	18,742	1,759	$9,297 \cdot 10^{-5}$

Den	Koncentrace Ca ²⁺ iontů (mmol/l)	KP			
		a (mmol/ml·min)	a _{rel} (%)	y (mg/ml)	a _{spec.} (mmol/mg·min)
1	0	$2,274 \cdot 10^{-4}$	26,984	1,528	$1,489 \cdot 10^{-4}$
	1	$2,782 \cdot 10^{-4}$	33,005	1,249	$2,228 \cdot 10^{-4}$
	2	$2,652 \cdot 10^{-4}$	31,472	1,514	$1,752 \cdot 10^{-4}$
	3	$2,611 \cdot 10^{-4}$	30,980	1,447	$1,804 \cdot 10^{-4}$
	4	$3,012 \cdot 10^{-4}$	35,742	1,277	$2,359 \cdot 10^{-4}$
2	0	$3,137 \cdot 10^{-4}$	37,219	1,012	$3,099 \cdot 10^{-4}$
	1	$4,447 \cdot 10^{-4}$	52,764	1,154	$3,853 \cdot 10^{-4}$
	2	$6,915 \cdot 10^{-4}$	82,047	1,045	$6,615 \cdot 10^{-4}$

	3	$1,794 \cdot 10^{-4}$	21,292	1,589	$1,129 \cdot 10^{-4}$
	4	$1,824 \cdot 10^{-4}$	21,642	0,880	$2,073 \cdot 10^{-4}$
5	0	$1,691 \cdot 10^{-4}$	20,066	0,918	$1,843 \cdot 10^{-4}$
	1	$1,813 \cdot 10^{-4}$	21,511	0,761	$2,381 \cdot 10^{-4}$
	2	$1,788 \cdot 10^{-4}$	21,215	1,845	$9,693 \cdot 10^{-5}$
	3	$1,768 \cdot 10^{-4}$	20,974	1,007	$1,755 \cdot 10^{-4}$
	4	$1,313 \cdot 10^{-4}$	15,577	1,462	$8,983 \cdot 10^{-5}$
6	0	$9,761 \cdot 10^{-5}$	11,582	1,466	$6,657 \cdot 10^{-5}$
	1	$1,519 \cdot 10^{-4}$	12,972	0,870	$1,256 \cdot 10^{-4}$
	2	$1,608 \cdot 10^{-4}$	17,909	0,686	$2,201 \cdot 10^{-4}$
	3	$1,549 \cdot 10^{-4}$	12,458	1,216	$8,637 \cdot 10^{-5}$
	4	$1,072 \cdot 10^{-4}$	17,340	0,832	$1,756 \cdot 10^{-4}$
7	0	$5,111 \cdot 10^{-4}$	60,646	1,797	$2,844 \cdot 10^{-4}$
	1	$7,574 \cdot 10^{-5}$	8,987	1,017	$7,449 \cdot 10^{-5}$
	2	$4,165 \cdot 10^{-4}$	49,425	0,847	$4,920 \cdot 10^{-4}$
	3	$5,014 \cdot 10^{-4}$	59,496	0,998	$5,024 \cdot 10^{-4}$
	4	$2,583 \cdot 10^{-5}$	3,065	1,561	$1,655 \cdot 10^{-5}$
8	0	$1,440 \cdot 10^{-4}$	17,088	1,234	$1,167 \cdot 10^{-4}$
	1	$5,222 \cdot 10^{-4}$	61,959	1,376	$3,794 \cdot 10^{-4}$
	2	$1,504 \cdot 10^{-4}$	17,843	1,003	$1,500 \cdot 10^{-4}$
	3	$3,580 \cdot 10^{-4}$	42,474	1,466	$2,441 \cdot 10^{-4}$
	4	$1,798 \cdot 10^{-4}$	21,336	1,797	$1,000 \cdot 10^{-4}$
9	0	$7,833 \cdot 10^{-4}$	92,939	1,514	$5,175 \cdot 10^{-4}$
	1	$6,703 \cdot 10^{-4}$	79,529	0,511	$1,312 \cdot 10^{-3}$
	2	$2,588 \cdot 10^{-4}$	30,706	0,553	$4,676 \cdot 10^{-4}$
	3	$1,694 \cdot 10^{-4}$	20,099	0,842	$2,012 \cdot 10^{-4}$
	4	$3,344 \cdot 10^{-4}$	39,683	0,875	$3,822 \cdot 10^{-4}$
12	0	$2,878 \cdot 10^{-4}$	34,154	1,774	$1,623 \cdot 10^{-4}$
	1	$8,428 \cdot 10^{-4}$	100,000	0,960	$8,778 \cdot 10^{-4}$
	2	$8,672 \cdot 10^{-5}$	10,290	0,691	$1,256 \cdot 10^{-4}$
	3	$2,311 \cdot 10^{-4}$	27,422	0,989	$2,338 \cdot 10^{-4}$
	4	$2,952 \cdot 10^{-5}$	3,503	0,572	$5,159 \cdot 10^{-5}$
13	0	$2,975 \cdot 10^{-4}$	35,304	0,837	$3,554 \cdot 10^{-4}$
	1	$5,139 \cdot 10^{-4}$	60,974	1,244	$4,131 \cdot 10^{-4}$
	2	$8,026 \cdot 10^{-5}$	9,524	0,374	$2,148 \cdot 10^{-4}$
	3	$1,555 \cdot 10^{-4}$	18,446	0,534	$2,909 \cdot 10^{-4}$
	4	$1,603 \cdot 10^{-4}$	19,015	0,799	$2,005 \cdot 10^{-4}$
14	0	$1,366 \cdot 10^{-4}$	16,212	0,970	$1,409 \cdot 10^{-4}$
	1	$1,310 \cdot 10^{-4}$	15,545	0,378	$3,462 \cdot 10^{-4}$
	2	$1,757 \cdot 10^{-4}$	20,843	0,634	$2,772 \cdot 10^{-4}$
	3	$1,766 \cdot 10^{-4}$	20,952	0,657	$2,686 \cdot 10^{-4}$
	4	$1,741 \cdot 10^{-4}$	20,657	0,610	$2,853 \cdot 10^{-4}$
15	0	$2,588 \cdot 10^{-4}$	30,706	1,802	$1,436 \cdot 10^{-4}$
	1	$7,819 \cdot 10^{-4}$	18,555	1,400	$1,117 \cdot 10^{-4}$
	2	$1,695 \cdot 10^{-4}$	20,109	0,761	$2,226 \cdot 10^{-4}$

	3	$1,720 \cdot 10^{-4}$	20,405	1,026	$1,676 \cdot 10^{-4}$
	4	$1,896 \cdot 10^{-4}$	22,496	1,036	$1,830 \cdot 10^{-4}$

Příloha 4: Stanovení pH optima produkovaných lipáz - KP

Stanovené hodnoty lipolytické a specifické aktivity pro KP při různých hodnotách pH (Grafy 8-10). V příloze jsou dále uvedeny naměřené hodnoty obsahu rozpustných bílkovin a specifické aktivity.

Den	pH	KP – první období			
		a (mmol/ml·min)	a _{rel.} (%)	y (mg/ml)	a _{spec.} (mmol/mg·min)
1	3,0	$8,257 \cdot 10^{-5}$	44,975	1,239	$6,663 \cdot 10^{-5}$
	4,0	$7,934 \cdot 10^{-5}$	43,216		$6,403 \cdot 10^{-5}$
	5,0	$8,811 \cdot 10^{-5}$	47,990		$7,110 \cdot 10^{-5}$
	6,0	$7,602 \cdot 10^{-5}$	41,407		$6,135 \cdot 10^{-5}$
	7,2	$1,412 \cdot 10^{-4}$	76,935		$1,140 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$1,364 \cdot 10^{-4}$	74,271		$1,100 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$1,274 \cdot 10^{-4}$	69,397		$1,028 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$9,106 \cdot 10^{-5}$	49,598		$7,348 \cdot 10^{-5}$
2	3,0	$1,256 \cdot 10^{-4}$	68,392	0,889	$1,412 \cdot 10^{-4}$
	4,0	$9,263 \cdot 10^{-5}$	50,452		$1,042 \cdot 10^{-4}$
	5,0	$1,392 \cdot 10^{-4}$	75,829		$1,566 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$1,349 \cdot 10^{-4}$	73,467		$1,517 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$1,593 \cdot 10^{-4}$	86,784		$1,792 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$1,627 \cdot 10^{-4}$	88,593		$1,829 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$1,505 \cdot 10^{-4}$	81,960		$1,692 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$9,420 \cdot 10^{-5}$	51,307		$1,059 \cdot 10^{-4}$
3	3,0	$1,424 \cdot 10^{-4}$	77,538	0,473	$3,010 \cdot 10^{-4}$
	4,0	$1,310 \cdot 10^{-4}$	71,357		$2,770 \cdot 10^{-4}$
	5,0	$1,641 \cdot 10^{-4}$	89,397		$3,470 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$1,580 \cdot 10^{-4}$	86,080		$3,341 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$1,714 \cdot 10^{-4}$	93,367		$3,624 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$1,836 \cdot 10^{-4}$	100,000		$3,882 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$1,636 \cdot 10^{-4}$	89,095		$3,458 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$9,752 \cdot 10^{-5}$	53,116		$2,062 \cdot 10^{-4}$
4	3,0	$1,538 \cdot 10^{-4}$	83,769	0,407	$3,781 \cdot 10^{-4}$
	4,0	$1,532 \cdot 10^{-4}$	83,467		$3,767 \cdot 10^{-4}$
	5,0	$1,712 \cdot 10^{-4}$	93,226		$4,210 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$1,505 \cdot 10^{-4}$	81,960		$3,699 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$1,644 \cdot 10^{-4}$	89,548		$4,042 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$1,782 \cdot 10^{-4}$	97,035		$4,380 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$1,695 \cdot 10^{-4}$	92,312		$4,167 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$9,844 \cdot 10^{-5}$	53,618		$2,420 \cdot 10^{-4}$

Den	pH	KP – druhé období			
		a (mmol/ml·min)	a _{rel.} (%)	y (mg/ml)	a _{spec.} (mmol/mg·min)
7	3,0	$1,329 \cdot 10^{-4}$	37,332	0,440	$3,022 \cdot 10^{-4}$
	4,0	$1,475 \cdot 10^{-4}$	41,425		$3,354 \cdot 10^{-4}$
	5,0	$1,655 \cdot 10^{-4}$	46,477		$3,763 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$1,678 \cdot 10^{-4}$	47,124		$3,815 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$1,683 \cdot 10^{-4}$	47,254		$3,826 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$1,764 \cdot 10^{-4}$	49,534		$4,010 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$1,533 \cdot 10^{-4}$	43,057		$3,486 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$7,934 \cdot 10^{-5}$	22,280		$1,804 \cdot 10^{-4}$
8	3,0	$1,089 \cdot 10^{-4}$	30,570	0,568	$1,918 \cdot 10^{-4}$
	4,0	$5,259 \cdot 10^{-5}$	14,767		$9,265 \cdot 10^{-5}$
	5,0	$1,924 \cdot 10^{-4}$	54,016		$3,389 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$2,122 \cdot 10^{-4}$	59,585		$3,739 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$2,851 \cdot 10^{-4}$	80,052		$5,023 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$3,524 \cdot 10^{-4}$	98,964		$6,209 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$2,671 \cdot 10^{-4}$	75,000		$4,706 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$9,816 \cdot 10^{-5}$	27,565		$1,730 \cdot 10^{-4}$
9	3,0	$2,108 \cdot 10^{-4}$	59,197	0,553	$3,809 \cdot 10^{-4}$
	4,0	$1,495 \cdot 10^{-4}$	41,969		$2,701 \cdot 10^{-4}$
	5,0	$2,952 \cdot 10^{-4}$	82,902		$5,335 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$2,233 \cdot 10^{-4}$	62,694		$4,035 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$1,859 \cdot 10^{-4}$	52,202		$3,359 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$3,557 \cdot 10^{-4}$	99,870		$6,427 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$2,800 \cdot 10^{-4}$	78,627		$5,060 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$2,290 \cdot 10^{-4}$	64,301		$4,138 \cdot 10^{-4}$
10	3,0	$2,228 \cdot 10^{-4}$	62,565	0,544	$4,096 \cdot 10^{-4}$
	4,0	$1,144 \cdot 10^{-4}$	32,124		$2,103 \cdot 10^{-4}$
	5,0	$2,173 \cdot 10^{-4}$	61,010		$3,994 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$1,771 \cdot 10^{-4}$	49,741		$3,257 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$2,998 \cdot 10^{-4}$	84,197		$5,513 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$3,561 \cdot 10^{-4}$	100,000		$6,547 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$2,712 \cdot 10^{-4}$	76,166		$4,987 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$1,578 \cdot 10^{-4}$	44,301		$2,900 \cdot 10^{-4}$

Den	pH	KP – třetí období			
		a (mmol/ml·min)	a _{rel.} (%)	y (mg/ml)	a _{spec.} (mmol/mg·min)
12	3,0	$1,659 \cdot 10^{-4}$	46,945	1,774	$3,050 \cdot 10^{-4}$
	4,0	$1,774 \cdot 10^{-4}$	50,209		$3,262 \cdot 10^{-4}$
	5,0	$4,788 \cdot 10^{-5}$	47,990		$3,118 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$2,148 \cdot 10^{-4}$	60,783		$3,949 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$2,878 \cdot 10^{-4}$	81,462		$5,292 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$3,534 \cdot 10^{-4}$	100,000		$6,496 \cdot 10^{-4}$

	9,0	$1,801 \cdot 10^{-4}$	50,966		$3,311 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$1,192 \cdot 10^{-4}$	33,734		$2,191 \cdot 10^{-4}$
13	3,0	$1,777 \cdot 10^{-4}$	50,287	0,837	$3,267 \cdot 10^{-4}$
	4,0	$1,373 \cdot 10^{-4}$	38,851		$2,524 \cdot 10^{-4}$
	5,0	$2,279 \cdot 10^{-4}$	64,491		$4,190 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$1,749 \cdot 10^{-4}$	49,504		$3,216 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$2,975 \cdot 10^{-4}$	84,204		$5,470 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$3,248 \cdot 10^{-4}$	91,906		$5,970 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$1,754 \cdot 10^{-4}$	49,634		$3,224 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$1,652 \cdot 10^{-4}$	46,762		$3,038 \cdot 10^{-4}$
	14	3,0	$1,449 \cdot 10^{-4}$		41,018
4,0		$1,738 \cdot 10^{-4}$	49,191	$3,196 \cdot 10^{-4}$	
5,0		$2,565 \cdot 10^{-4}$	72,585	$4,715 \cdot 10^{-4}$	
6,0		$1,775 \cdot 10^{-4}$	50,235	$3,263 \cdot 10^{-4}$	
7,2		$1,366 \cdot 10^{-4}$	38,668	$2,512 \cdot 10^{-4}$	
8,0		$3,091 \cdot 10^{-4}$	87,467	$5,682 \cdot 10^{-4}$	
9,0		$1,770 \cdot 10^{-4}$	50,104	$3,255 \cdot 10^{-4}$	
10,0		$7,814 \cdot 10^{-5}$	22,115	$1,437 \cdot 10^{-4}$	
15	3,0	$1,665 \cdot 10^{-4}$	47,128	1,802	$3,062 \cdot 10^{-4}$
	4,0	$1,603 \cdot 10^{-4}$	45,352		$2,946 \cdot 10^{-4}$
	5,0	$1,494 \cdot 10^{-4}$	42,272		$2,746 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$1,518 \cdot 10^{-4}$	42,950		$2,790 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$2,588 \cdot 10^{-4}$	73,238		$4,758 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$3,100 \cdot 10^{-4}$	87,728		$5,699 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$1,347 \cdot 10^{-4}$	38,120		$2,476 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$8,663 \cdot 10^{-5}$	24,517		$1,593 \cdot 10^{-4}$

Příloha 5: Stanovení pH optima produkovaných lipáz – *B. subtilis*

Stanovené hodnoty lipolytické a specifické aktivity pro KP při různých hodnotách pH (Grafy 11-13). V příloze jsou dále uvedeny naměřené hodnoty obsahu rozpustných bílkovin a specifické aktivity.

Den	pH	<i>B. subtilis</i> – první období			
		a (mmol/ml·min)	a _{rel.} (%)	y (mg/ml)	a _{spec.} (mmol/mg·min)
1	3,0	$1,015 \cdot 10^{-4}$	28,424	1,405	$7,224 \cdot 10^{-5}$
	4,0	$9,798 \cdot 10^{-5}$	27,442		$6,975 \cdot 10^{-5}$
	5,0	$1,118 \cdot 10^{-4}$	31,318		$7,960 \cdot 10^{-5}$
	6,0	$1,504 \cdot 10^{-4}$	42,119		$1,071 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$1,836 \cdot 10^{-4}$	51,421		$1,307 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$2,200 \cdot 10^{-4}$	61,628		$1,566 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$3,460 \cdot 10^{-5}$	43,953		$2,463 \cdot 10^{-5}$
	10,0	$9,290 \cdot 10^{-4}$	21,964		$6,614 \cdot 10^{-5}$
2	3,0	$1,154 \cdot 10^{-4}$	32,326	1,405	$8,216 \cdot 10^{-5}$

	4,0	$1,218 \cdot 10^{-4}$	34,109		$8,669 \cdot 10^{-5}$
	5,0	$1,605 \cdot 10^{-4}$	44,961		$1,143 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$2,246 \cdot 10^{-4}$	62,920		$1,599 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$1,753 \cdot 10^{-4}$	49,096		$1,248 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$1,993 \cdot 10^{-4}$	55,814		$1,419 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$1,569 \cdot 10^{-4}$	39,948		$1,117 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$7,842 \cdot 10^{-5}$	12,119		$5,582 \cdot 10^{-5}$
3	3,0	$1,568 \cdot 10^{-4}$	43,928	1,107	$1,116 \cdot 10^{-4}$
	4,0	$1,431 \cdot 10^{-4}$	40,078		$1,019 \cdot 10^{-4}$
	5,0	$3,377 \cdot 10^{-4}$	94,574		$2,404 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$3,400 \cdot 10^{-4}$	95,220		$2,420 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$1,744 \cdot 10^{-4}$	48,837		$1,241 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$3,570 \cdot 10^{-4}$	100,000		$2,542 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$1,426 \cdot 10^{-4}$	35,633		$1,015 \cdot 10^{-4}$
10,0	$4,327 \cdot 10^{-5}$	8,533	$3,080 \cdot 10^{-5}$		
4	3,0	$9,964 \cdot 10^{-5}$	27,907	1,258	$7,093 \cdot 10^{-5}$
	4,0	$1,222 \cdot 10^{-4}$	34,238		$8,702 \cdot 10^{-5}$
	5,0	$1,503 \cdot 10^{-4}$	42,093		$1,070 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$1,648 \cdot 10^{-4}$	46,150		$1,173 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$1,563 \cdot 10^{-4}$	43,773		$1,113 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$1,293 \cdot 10^{-4}$	36,227		$9,208 \cdot 10^{-5}$
	9,0	$1,272 \cdot 10^{-4}$	35,633		$9,057 \cdot 10^{-5}$
	10,0	$3,054 \cdot 10^{-5}$	8,553		$2,174 \cdot 10^{-5}$

Den	pH	<i>B. subtilis</i> – druhé období			
		a (mmol/ml·min)	a _{rel.} (%)	y (mg/ml)	a _{spec.} (mmol/mg·min)
7	3,0	$2,611 \cdot 10^{-4}$	40,896	0,724	$1,859 \cdot 10^{-4}$
	4,0	$1,597 \cdot 10^{-4}$	25,014		$1,137 \cdot 10^{-4}$
	5,0	$4,036 \cdot 10^{-4}$	63,223		$2,873 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$5,757 \cdot 10^{-4}$	90,173		$4,098 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$3,769 \cdot 10^{-4}$	59,032		$2,683 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$4,678 \cdot 10^{-4}$	73,266		$3,330 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$1,637 \cdot 10^{-4}$	25,636		$1,165 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$6,320 \cdot 10^{-5}$	9,899		$4,499 \cdot 10^{-5}$
8	3,0	$3,455 \cdot 10^{-4}$	54,118	1,041	$2,460 \cdot 10^{-4}$
	4,0	$1,312 \cdot 10^{-4}$	20,549		$9,339 \cdot 10^{-5}$
	5,0	$1,781 \cdot 10^{-4}$	27,890		$1,268 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$4,761 \cdot 10^{-4}$	74,566		$3,389 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$4,696 \cdot 10^{-4}$	73,555		$3,343 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$4,548 \cdot 10^{-4}$	71,243		$3,238 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$1,606 \cdot 10^{-4}$	25,159		$1,143 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$6,790 \cdot 10^{-5}$	10,636		$4,834 \cdot 10^{-5}$
9	3,0	$4,987 \cdot 10^{-4}$	78,107	0,449	$3,550 \cdot 10^{-4}$
	4,0	$1,734 \cdot 10^{-4}$	27,153		$1,234 \cdot 10^{-4}$

	5,0	$6,384 \cdot 10^{-4}$	100,000		$4,545 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$5,683 \cdot 10^{-4}$	89,017		$4,046 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$6,297 \cdot 10^{-4}$	98,627		$4,482 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$5,051 \cdot 10^{-4}$	79,118		$3,596 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$1,551 \cdot 10^{-4}$	24,292		$1,104 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$1,255 \cdot 10^{-4}$	19,653		$8,932 \cdot 10^{-5}$
10	3,0	$2,071 \cdot 10^{-4}$	32,442	0,880	$1,474 \cdot 10^{-4}$
	4,0	$1,817 \cdot 10^{-4}$	28,468		$1,294 \cdot 10^{-4}$
	5,0	$1,542 \cdot 10^{-4}$	24,147		$1,097 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$4,654 \cdot 10^{-4}$	72,905		$3,313 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$5,683 \cdot 10^{-4}$	89,017		$4,046 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$4,276 \cdot 10^{-4}$	66,980		$3,044 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$1,588 \cdot 10^{-4}$	24,870		$1,130 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$7,252 \cdot 10^{-5}$	11,358		$5,162 \cdot 10^{-5}$

Den	pH	<i>B. subtilis</i> – třetí období			
		a (mmol/ml·min)	a _{rel.} (%)	y (mg/ml)	a _{spec.} (mmol/mg·min)
12	3,0	$1,705 \cdot 10^{-4}$	31,753	0,866	$1,214 \cdot 10^{-4}$
	4,0	$5,369 \cdot 10^{-4}$	100,00		$3,822 \cdot 10^{-4}$
	5,0	$3,478 \cdot 10^{-4}$	64,777		$2,476 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$4,253 \cdot 10^{-4}$	79,210		$3,028 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$3,778 \cdot 10^{-4}$	70,361		$2,689 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$4,571 \cdot 10^{-4}$	85,137		$3,254 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$2,980 \cdot 10^{-4}$	55,498		$2,121 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$6,458 \cdot 10^{-5}$	12,027		$4,597 \cdot 10^{-5}$
13	3,0	$1,550 \cdot 10^{-4}$	28,866	0,832	$1,103 \cdot 10^{-4}$
	4,0	$1,767 \cdot 10^{-4}$	32,904		$1,258 \cdot 10^{-4}$
	5,0	$1,832 \cdot 10^{-4}$	34,124		$1,304 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$1,639 \cdot 10^{-4}$	30,515		$1,166 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$1,459 \cdot 10^{-4}$	27,165		$1,038 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$4,036 \cdot 10^{-4}$	75,172		$2,873 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$2,851 \cdot 10^{-4}$	53,093		$2,029 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$9,899 \cdot 10^{-5}$	18,436		$7,047 \cdot 10^{-5}$
14	3,0	$1,553 \cdot 10^{-4}$	28,918	0,880	$1,105 \cdot 10^{-4}$
	4,0	$1,790 \cdot 10^{-4}$	33,333		$1,274 \cdot 10^{-4}$
	5,0	$1,952 \cdot 10^{-4}$	36,357		$1,390 \cdot 10^{-4}$
	6,0	$1,709 \cdot 10^{-4}$	31,821		$1,216 \cdot 10^{-4}$
	7,2	$1,461 \cdot 10^{-4}$	27,216		$1,040 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$1,642 \cdot 10^{-4}$	30,584		$1,169 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$1,738 \cdot 10^{-4}$	32,371		$1,237 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$3,432 \cdot 10^{-5}$	6,392		$2,443 \cdot 10^{-5}$
15	3,0	$1,610 \cdot 10^{-4}$	39,983	1,802	$1,146 \cdot 10^{-4}$
	4,0	$8,635 \cdot 10^{-5}$	16,082		$6,147 \cdot 10^{-5}$
	5,0	$1,533 \cdot 10^{-4}$	28,557		$1,092 \cdot 10^{-4}$

	6,0	$8,931 \cdot 10^{-5}$	16,632		$6,357 \cdot 10^{-5}$
	7,2	$2,222 \cdot 10^{-4}$	41,375		$1,581 \cdot 10^{-4}$
	8,0	$2,235 \cdot 10^{-4}$	41,615		$1,591 \cdot 10^{-4}$
	9,0	$1,827 \cdot 10^{-4}$	34,021		$1,300 \cdot 10^{-4}$
	10,0	$3,487 \cdot 10^{-5}$	6,495		$2,483 \cdot 10^{-5}$

Příloha 6: Stanovení $CHSK_{Cr}$

Hodnoty absorbancí pro výpočet $CHSK_{Cr}$ a vypočtené koncentrace (Graf 14).

Doba od zaočkování (hod)	KP		<i>B. subtilis</i>	
	A_{600}	c (g/l)	A_{600}	c (g/l)
1	0,814	3,918	0,294	1,378
16	0,513	2,449	0,221	1,021
19	0,626	3,001	0,440	2,092
40	0,256	1,190	0,259	1,207
43	0,225	1,038	0,166	0,752