

**Možnosti mikrobiální degradace a využití odpadů
z potravinářských výrob**

**Prospects of microbial degradation and waste
utilization from food processing industry**

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá problematikou mikrobiálních degradací odpadních materiálů potravinářského průmyslu. Problematika je orientována na produkci technologicky významných enzymů produkovaných mikroorganismy, které jsou schopny daný odpad využívat jako zdroj uhlíku.

První část dizertační práce, zabývající se produkcí polygalakturonas, byla vypracována v rámci studijních pobytů na Chemickém ústavu SAV, oddělení Glykomiky v Bratislavě. Použitým odpadem a současně zdrojem uhlíku pro růst mikroorganismů a produkci enzymů byly hroznové výlisky z vinařství. Na tomto odpadním materiálu byla testována produkce pektolytických enzymů. Na základě screeningu byl vybrán mikrobiální kmen s nejvyšší produkcí polygalakturonasové aktivity. Produkované enzymy byly nejprve izolovány extrakčními metodami, purifikovány a následně proteomicky identifikovány.

V další části dizertační práce byla pozornost zaměřena na lipasy a čištění odpadních vod s obsahem lipidů. Důvodem byla spolupráce s firmou zabývající se konstrukcí odlučovačů tuků. Předmětem této části bylo studium vlastností dodaného komerčního přípravku, prostudování podmínek mikrobiální produkce lipas, identifikace mikroflóry přítomné v komerčním přípravku a testování mikrobiálních kmenů pro vývoj nového přípravku. Testování mikrobiálních kmenů proběhlo za účelem realizace nápadu firmy vyvinout nový přípravek do odlučovače tuků.

Klíčová slova: pektolytické enzymy, hroznové výlisky, lipolytické enzymy, odpadní vody

ABSTRACT

This work deals with the problem of microbial degradation of the waste materials from food industry. This work is focused on the production of technological significant enzymes producing by microorganisms, which were able to use the waste as a sole carbon source.

In the first part of this work, the attention was focused on the production of pectolytic enzymes. This part was made within study interships in Slovak Academy of Sciences, department of Glycomics in Bratislava. The grape pomace as the waste form winegrowing was used as a sole carbon source for microbial growth and enzymes production. The production of pectolytic enzymes was tested on this waste. After screening the most suitable microorganisms was chosen with the highest production of polygalacturonase activity. Produced enzymes were isolated by extraction techniques, purified and then identified proteomically.

The aim of the second part of this work was the waste water treatment containing lipids and lipolytic enzymes. The reason was the cooperation with the company constructing grease traps. The characterization of supplied commercial preparations was the subject of this work and the other reason was the characterization of conditions for lipases secreting by microorganisms, identification of microorganisms present in the commercial preparation and testing of new microbial cultures for the development of new preparation for the grease traps.

Keywords: pectolytic enzymes, grape pomace, lipolytic enzymes, waste water

Illková, K.: Možnosti mikrobiální degradace a využití odpadů z potravinářských výrob, 2011, 114 s. Dizertační práce. Fakulta chemické, Vysoké učení technického v Brně. Ústav chemie a technologie potravin. Vedoucí dizertační práce: doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis doktoranda

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucí mé dizertační práce doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc. a zároveň Ing. Evě Stratilové, PhD. a doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za jejich ochotu, vstřícnost a zejména za jejich profesijní vedení, rady a přátelskou pomoc a podporu při řešení mé dizertační práce. Současně bych chtěla poděkovat Ing. Daně Flodrové, PhD. za pomoc na Ústavu analytické chemie, České Akademie Věd.

OBSAH

ABSTRAKT	2
ÚVOD	7
TEORETICKÁ ČÁST	8
1 Odpady rostlinného původu	8
1.1 Struktura odpadů rostlinného původu	8
1.1.1 Xylan	9
1.1.3 Galakto(gluko)mannan	10
1.1.4 Xyloglukan	10
1.1.5 Pektin	10
1.1.6 Lignin	12
1.2 Enzymová degradace polysacharidové matrix rostlin	13
1.2.1 Degradace celulosy	13
1.2.2 Degradace xylanu	13
1.2.3 Degradace galakto(gluko) mannanu	13
1.2.4 Degradace xyloglukanu	14
1.2.5 Degradace pektinu	14
1.3 Produkce mikrobiálních enzymů na odpadech rostlinného původu	16
1.3.1 Produkční mikroorganismy	16
1.3.2 Degradovatelné substráty	17
1.3.3 Podmínky produkce enzymů	17
1.3.4 Faktory ovlivňující solid state fermentaci	17
1.4 Produkce pektolytických enzymů	18
1.5 Matoliny (hroznové výlisky)	19
2 Odpadní vody	20
2.1 Čištění odpadních vod	20
2.1.1 Způsoby čištění odpadních vod	20
2.1.1.1 Anaerobní čištění odpadních vod	22
2.1.1.2 Aerobní čištění odpadních vod	22
2.1.2 Organického znečištění odpadních vod	23
2.2 Lapáky tuků	23
2.3 Odbourávání lipidů	25
2.3.1 Odbourávání triacylglycerolu	25
2.3.2 Odbourávání glycerolu	25
2.3.3 Odbourávání mastných kyselin	26
2.4 Lipolytické enzymy	27
2.4.1 Struktura lipas	27
2.4.2 Mechanismus účinku lipas a kinetika enzymové reakce	28
2.4.3 Mechanismus hydrolýzy mikrobiálních lipas	30
2.5 Mikrobiální degradace lipidů v odpadních vodách	31
CÍL PRÁCE	32
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
3 Polygalakturonasy	33
3.1 Odpadní materiál	33
3.2 Mikroorganismy	33
3.2.1 <i>Geotrichum candidum</i>	33
3.3 Použitá kultivační média a typy kultivací	34
3.4 Metody	34
3.4.1 Extrakční metody	34
3.4.1.1 Extrakce proteinů z fermentačního média	34

3.4.2	Separační metody	36
3.4.2.1	Gelová permeační chromatografie na nosiči Sephadex G-25 Medium	35
3.4.2.2	Iontově výměnná chromatografie	36
3.4.2.3	Vysokoučinná proteinová kapalinová chromatografie	36
3.4.3	Analytické metody	38
3.4.3.1	Isoelektrická fokusace na polyakrylamidovém gelu	38
3.4.3.2	Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS	39
3.4.3.3	MALDI – TOF/TOF hmotnostní spektrometrie	39
3.4.3.4	Bioanalyzátor	41
3.4.4	Biochemické metody	41
3.4.4.1	Stanovení obsahu proteinů	41
3.4.4.2	Stanovení enzymových aktivit	41
3.4.4.3	Stanovení způsobu účinku	42
3.4.4.4	Stanovení hodnoty Michaelisovy konstanty K_m	42
3.4.4.5	Stanovení tepelné stability	42
3.4.4.6	Stanovení teplotního optima	42
4	Produkce lipas	43
4.1	Materiál	43
4.2	Metody	44
4.2.1	Biochemické metody	44
4.2.1.1	Důkaz mikroflóry s lipolytickou aktivitou	44
4.2.1.2	Stanovení lipolytické aktivity	45
4.2.1.3	Stanovení teplotního optima extracelulární lipasy	45
4.2.1.4	Stanovení pH optima extracelulární lipasy	46
4.2.1.5	Barvení dle Grama	46
4.2.2	Analytické metody	46
4.2.2.1	Stanovení degradace a utilizace mastných kyselin	46
4.2.2.2	Stanovení chemické spotřeby kyslíku	47
4.2.3	Molekulárně biologické metody	47
4.2.3.1	Příprava hrubého lyzátu buněk rodu <i>Bacillus</i>	47
4.2.3.2	Příprava hrubého lyzátu buněk přípravku SanyDuo Spezial	48
4.2.3.3	Izolace DNA metodou fenol-chloroformové extrakce	48
4.2.3.4	Izolace DNA pomocí magnetických částic P (HEMA-co-GMA)	48
4.2.3.5	Polymerázová řetězová reakce	49
4.2.3.6	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase	50
4.2.3.7	Amplifikovaná ribosomální DNA restriční analýza	51
	VÝSLEDKY A DISKUZE	53
5	Produkce polygalakturonas	53
5.1	Výběr kmene	53
5.2	Vliv typu kultivace a složení fermentačního média na produkci polygalakturonas, růst a morfologii <i>G. candidum</i>	54
5.3	Produkce extracelulárních polygalakturonas	55
5.4	Izolace polygalakturonas	56
5.5	Charakterizace extracelulárních polygalakturonas	57
5.5.1	Stanovení pH optim na substráty s různým stupněm polymerizace	58
5.5.2	Teplotní optimum a tepelná stabilita polygalakturonas	60
5.5.3	Stanovení kinetických parametrů, K_m	61
5.5.4	Stanovení způsobu účinku polygalakturonan hydrolas	63
5.5.5	Stanovení izoelektrického bodu polygalakturonas	64
5.5.6	Částečná purifikace polygalakturonas	65

5.6	Charakterizace polygalakturonas z hlediska Mr	66
5.6.1	Stanovení molekulových hmotností polygalakturonas gelovou filtrací	66
5.6.2	Analýza částečně purifikovaných proteinů na Bioanalyzátoru 2010	67
5.6.3	Identifikace pektolytických enzymů na základě primárních struktur	69
6	Produkce lipas	76
6.1	Studium vlastností komerčního přípravku	76
6.1.1	Důkaz lipolytické aktivity mikroflóry přítomné v komerčním přípravku	76
6.1.2	Sledování lipolytické aktivity a uvolněných mastných kyselin	77
6.1.3	Vliv pH a teploty na produkci lipas komerčního přípravku	78
6.1.4	Organické znečištění odpadních vod	80
6.1.5	Identifikace mikroflóry přítomné v komerčním přípravku	82
6.1.5.1	Gramovo barvení	82
6.1.5.2	Doménově specifická polymerázová řetězová reakce	83
6.1.5.3	Rodově specifická polymerázová řetězová reakce	84
6.1.5.4	Rodově specifická polymerázová řetězová reakce v reálném čase	85
6.1.5.5	Amplifikovaná ribozomální DNA restrikční analýza	86
6.2	Testování vybraných bakteriálních kmenů pro vývoj nového přípravku	88
6.2.1	Vliv pH na produkci lipas	88
6.2.2	Vliv teploty na produkci lipas	88
6.2.3	Vliv tenzidů na produkci lipas	90
	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	96
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	109
	PŘEHLED PUBLIKACÍ	111
	ŽIVOTOPIS	113

ÚVOD

Odpadní materiály potravinářského průmyslu představují zátěž pro životní prostředí, a proto je snaha o jejich ekologickou likvidaci velkým přínosem.

Vinařská oblast Morava zahrnuje asi 96 % ploch registrovaných vinic v České republice, přičemž celková rozloha vinohradů představuje 18 500 hektarů (*online Vína z Moravy, Vína z Čech*)¹. Zákon 321/2004 Sb., o vinohradnictví a vinařství a navazující právní předpisy (vyhláška 323/2004 Sb.) stanovuje povinnosti výrobcům týkající se odstranění vedlejších produktů vznikajících při zpracování nebo výrobě, společně s vedením příslušné evidence v evidenční knize. Jedním z vedlejších produktů jsou i matoliny. Jedná se o **biologicky rozložitelný odpad**, který se tradičně likviduje zaoráváním na vinicích (*Zemánek a kol.*)².

Dalším nemalým problémem jsou zařízení společného stravování, která musí zabezpečit předčistění odpadních vod, pro odstranění tuků tak, aby splňovaly požadavky kanalizačního řádu a emisních limitů. Tento proces probíhá v zařízeních pod názvem lapače tuků, přičemž pro urychlení čistícího procesu se aplikují přípravky s biologickou aktivitou.

Mikroorganismy obecně disponují širokým enzymovým vybavením, mají schopnost produkovat celou škálu enzymů degradující organický materiál, jako jsou tuky, oleje, celulóza, xylan, pektin, proteiny, škrob a další. Produkují především hydrolytické enzymy podílející se na degradaci polymerů na menší molekuly, které mohou být dále využity buňkami a začleněny do dalších biochemických reakcí. Hydrolytické enzymy mají obrovský potenciál pro využití v mnoha průmyslových aplikacích. Enzymů, uskutečňujících tyto reakce, je využíváno především v potravinářství, papírenském průmyslu, průmyslu detergentů, při odstraňování toxických odpadů a olejů. Tyto enzymy mohou být produkovány různými mikroorganismy v závislosti na podmínkách kultivace. Průmyslově se činnosti mikroorganismů využívá nejen v tradičním kvasném nebo mlékárenském průmyslu, ale i v dalších odvětvích. Průmyslově připravené enzymy mikrobiálního původu nacházejí stále širší uplatnění. Kromě těchto enzymů se ještě používají celé mikrobiální buňky, pomocí nichž se uskutečňují specifické reakce např. oxidace steroidních látek při výrobě léků. Mikrobiální enzymové reakce probíhají většinou úzce specificky, nevyžadují vysoké teploty ani tlaky, čímž se snižují náklady na provozní zařízení a energii (*Vodrážka a kol. 1998*)³.

Příkladem likvidace odpadů mohou být různé mikroorganismy, které využívají daný odpadní materiál jako zdroj uhlíku a současně jsou schopné svou enzymovou činností tyto odpady hydrolyzovat³. Z tohoto důvodu se hlavní pozornost zaměřila na mikroorganismy produkující hydrolytické enzymy odbourávající odpadní biopolymery.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Odpady rostlinného původu

Zemědělské a průmyslové odpady v dnešní době představují jednu z příčin znečištění životního prostředí. Legislativně pravidla pro předcházení vzniku odpadů a pro nakládání s nimi při dodržování ochrany životního prostředí, ochrany zdraví člověka a trvale udržitelného rozvoje stanovuje zákon o odpadech, č. 185/2001 Sb. a jeho novelizované znění v zákonu č. 383/2008 Sb (*online Sbírka zákonů*)⁴. Odpady můžeme zpracovávat mnoha způsoby – fyzikálně, chemicky, fyzikálně-chemicky a biologicky.

Většina odpadů rostlinného původu obsahuje celulosu (30 – 40 %), hemicelulosu (xylan 20 – 40 %) a lignin (20 – 30 %). Využití těchto odpadů má široké uplatnění⁵:

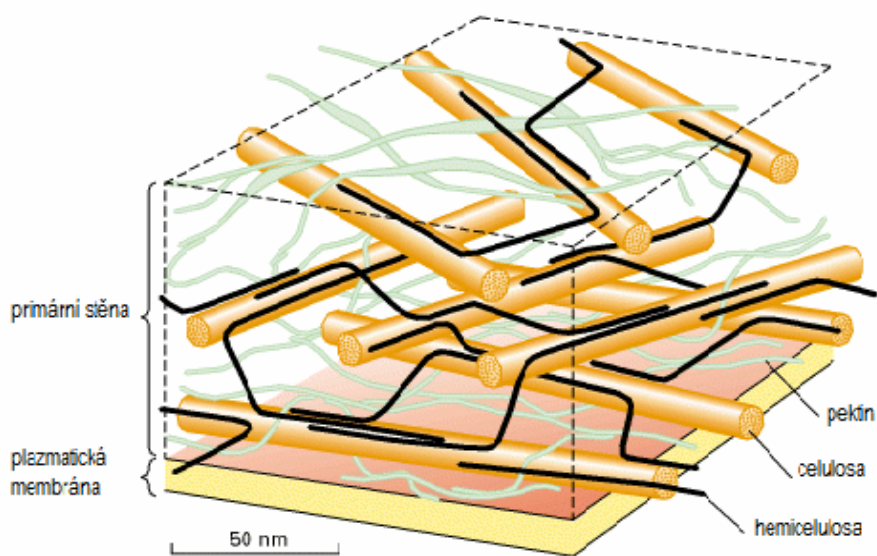
- substrát pro růst mikroorganismů a syntéza vhodných metabolitů
- zkrmování hospodářskými zvířaty
- kompostování a hnojení zemědělských plodin

Mezi odpadní materiály rostlinného původu může být zařazena vylisovaná cukrová třtina (bagasa), řepné řízky, rýžové slupky, pšeničná sláma, hlíznatý materiál obsahující škrob, odpad z hroznové révy, odpad ze semen slunečnice a sóji, banánů, jablek, odpad po vylisování řepkového a palmového oleje, ale také ze zpracování dřeva a jiné (*Mohanty a kol. 2009, Mamma a kol. 2008*)^{5,6}.

1.1 Struktura odpadů rostlinného původu

Hlavní složku odpadů rostlinného původu představují polysacharidy. Polysacharidy buněčné stěny rostlin jsou jedny z nejrozšířenějších organických sločenin v přírodě a představují důležitý zdroj uhlíku využitelný mikroorganismy, zahrnující prokaryota a nižší eukaryota. Některé z těchto mikroorganismů jsou patogeny rostlin, zatímco jiné je využívají pro svůj saprofytický růst. Tyto mikroorganismy produkují široké spektrum enzymů schopné štěpit vazby v polysacharidech. Mnoho těchto enzymů má využití v různých průmyslových odvětvích (*Ronald a kol. 2002*)⁷.

Polysacharidový komplex jako stavební materiál rostlin vzniká spojením několika paralelně uspořádaných celulóзовých řetězců stabilizovaných vodíkovými vazbami, přičemž pojivo mezi nimi vytvářejí další polysacharidy s větvenou strukturou, tzv. hemicelulózy **obr. 1**. Hemicelulózy obsahují jako stavební jednotky různé monosacharidy (D-xylosu, D-galaktosu, L-arabinosu, D-glukosu a uronové kyseliny). Matrici, v níž jsou uložena celulóзовá vlákna, tvoří kromě dalších pektiny a hlavně lignin (*Darbyshire a Hendry 1981*)⁸.



Obr. 1: Složení rostlinné buněčné stěny (Darbyshire a Hendry 1981) ⁸

1.1.1 Celulosa

Celulosa představuje v přírodě široce rozšířený organický biopolymer, který je hlavní složkou membrán rostlinných buněk. Je složena z D-glukosových jednotek spojených v dlouhé nerozvětvené řetězce vazbou $\beta(1 \rightarrow 4)$. Pro člověka a pro mnoho druhů obratlovců je celulosa nestravitelná, protože nevytváří enzymy, které ji štěpí; naopak přežvýkavci mají v trávicím ústrojí mikroorganismy, které celulosu rozkládají. Celulosa se získává ze dřeva odstraňováním doprovodných složek (lignin, hemicelulosity atd.) a takto získaná tzv. buničina se používá v papírenském a textilním průmyslu. Acetáty celulosy jsou podstatou umělého hedvábí, nitráty se užívají jako výbušniny (bezdýmný střelný prach), pohonné látky pro rakety a laky. Z celulosy se vyrábí rovněž celuloid a celofán. Prekursorem biosynthesy celulosy jsou aktivované formy glukosy, UDP-glukosa nebo její analog GDP-glukosa (Leujene a Deprez 2010) ⁹.

1.1.2 Xylan

Xylan jako hlavní složka hemicelulosity je lineární polymer D-xylosových zbytků spojených vazbami $\beta(1 \rightarrow 4)$ se substituovanými postranními řetězci β -4-O-methyl- α -D-glukuronové kyseliny, acetylových a arabinosylových zbytků vázanými vazbou $\beta(1 \rightarrow 2)$, (Newman a kol. 1998, Joshi a kol. 2003) ^{10,11}.

1.1.3 Galakto(gluko)mannan

Necelulosové polysacharidy galakto a glukomannan se v rostlinné buněčné stěně vyskytují v mnohem menší míře než ostatní hlavní složky. Galaktomannany jsou tvořeny sítí (1→4) β-D-mannosových zbytků s galaktosovými jednotkami navázanými v poloze O6 (Goldberg a kol. 1991)¹², zatímco glukomannan je polymer s náhodně rozloženými vazbami (1→4) spojenými β-D-glukosovými a (1→4) β-D-spojenými mannosovými zbytky (York a kol. 1990)¹³.

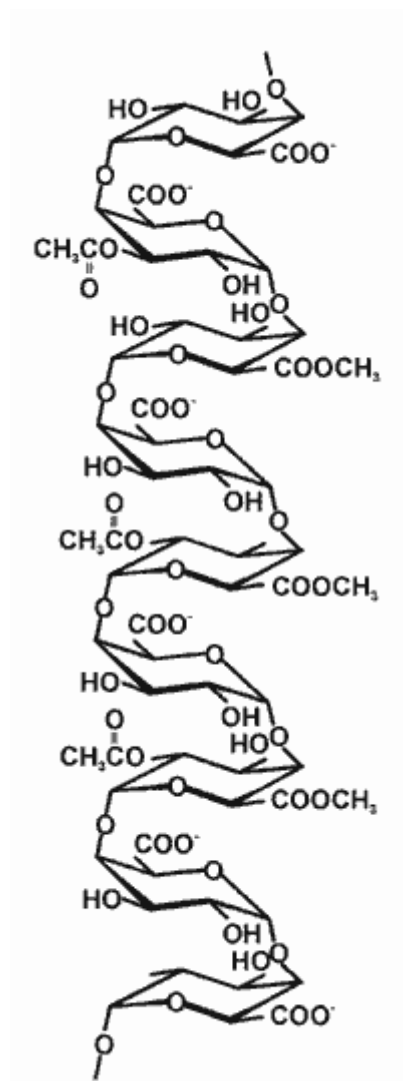
1.1.4 Xyloglukan

U dvouděložných rostlin se nachází xyloglukan obsahující lineární řetězce (1→4) β-D-glukanu s navázanými jednotkami α-D-xylosy v poloze O6 na glukosové jednotce. Některé z xylosových zbytků jsou dále substituovány α-L-Ara nebo β-D-Gal v závislosti na druhu rostliny, galaktosa je dále substituována α-L-fukosovými jednotkami (Hisamatsu a kol. 1991, Pauly a kol. 1999)^{14,15}. Glukanová síť xyloglukanu je vázána vodíkovými vazbami na povrch celulosových mikrofibril (Schols a kol. 2009)¹⁶.

1.1.5 Pektin

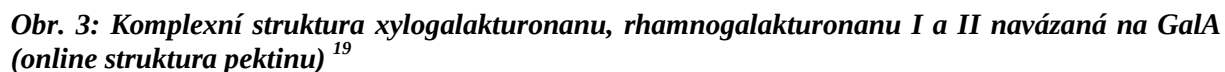
Pektin je jedna z hlavních komponent buněčné stěny rostlin a pravděpodobně jedna z nejkomplexnějších makromolekul v přírodě. Je přítomný ve střední lamelle a primární stěně rostlinných buněk. Hraje důležitou roli během zrání, uchování a zpracování rostlinného materiálu. Pro svoje schopnosti želírovat, stabilizovat a zahušťovat je široce používán v potravinářském průmyslu. V jeho struktuře se nachází tři základní skupiny pektinových polysacharidů – homogalakturonan (HGA), rhamnogalakturonan I (RGI) a rhamnogalakturonan II (RGII), (Guillotin 2005)¹⁷.

Z hlediska struktury se jedná o komplexní polysacharid vzniklý zesíťováním jednotek kyseliny D-galakturonové vazbami α(1→4), tzv. homogalakturonan **obr. 2** a segmentů obsahujících vazbami spojené α(1→2) L-rhamnosylové a α(1→4) D-galakturonosylové zbytky po stranách rozvětvené jednotkami arabinanů, arabinogalaktanů a galaktanů - rhamnogalakturonan I (online structure of homogalakturonan)¹⁸.



Obr. 2: Struktura homogalakturonanu – HGA (online structure of pectin) ¹⁸

Dalším strukturním elementem pektinu je xylogalakturonan (XGA) a rhamnogalakturonan II **obr. 3**. Rhamnogalakturonan II je navíc tvořen zvláštními cukernými zbytky: Api (D-adiposa), AceA (3-karboxy-5-deoxy-L-xylosa), Dha (2-keto-3-deoxy-D-lyxo-heptulosarová kyselina) a Kdo (2-keto-3-deoxy-D-manno-oktulosonová kyselina). Současně bylo potvrzeno, že relativní poměr těchto různých strukturních elementů se může významně lišit v závislosti na rostlinném pletivu. Pektiny hrají významnou roli v konzistenci ovoce a zeleniny. Vzhledem ke komplikované struktuře pektinových látek se na jejich odbourávání podílí několik skupin enzymů (Guillotin 2005) ²⁰.



Lignin je jednou z hlavních komponent dřevní hmoty, kde tvoří asi 25 % biomasy. V menším množství je lignin součástí vlákniny ovoce, zeleniny a obilovin, v malém množství se také vyskytuje i v lihovinách zrajících v dubových sudech, kam se dostává výluhem ze dřeva (Šušla a Svobodová 2006) ²¹. Lignin je představován heterogenním polyfenolickým biopolymerem složeným ze třech základních monomerních jednotek koniferyl alkoholu, sinapyl alkoholu a *p*-kumaryl alkoholu. Jednotky jsou vzájemně vázány etherovými (C-O-C) nebo uhlíkovými (C-C) vazbami. Biodegradace ligninu je zajišťována třemi typy enzymů – ligninperoxidasou, mangan-dependentní peroxidasou a lakasou (Hoondal a kol. 2002, Doi a kol. 2004) ^{22,23}.

1.2 Enzymová degradace polysacharidové matrix rostlin

Degradace rostlinné buněčné stěny hraje důležitou roli v koloběhu uhlíku. Stěny rostlinných buněk jsou složeny z celulosy, hemicelulosy, pektinu a ligninu. Tyto komponenty jsou degradovány enzymaticky na menší oligomery, eventuelně glukosu, pentosu a menší uhlíkaté sloučeniny metabolizující na CO₂. Enzymový systém v sobě zahrnuje celulasy, xylanasy, xyloglukanasy, pektinasy, chitinasy a další vedlejší enzymy podílející se na degradaci stěny rostlin (*de Vries a Visser 2001*)²⁴.

1.2.1 Degradace celulosy

Biodegradaci celulosy zajišťují tři třídy enzymů: endo- β -1, 4-glukanasy (endoglukanasy EC 3.2.1.4, glykosidové hydrolasy rodin 5, 6, 12, 74), cellobiohydrolasy (exoglukanasy EC 3.2.1.91, glykosidové hydrolasy rodiny 6) a β -1,4-glukosidasy (β -glukosidasy EC 3.2.1.21, glykosidové hydrolasy rodin 1, 2), (*Ronald a kol. 2002*)⁷.

Obecně jsou endoglukanasy malé proteiny o molekulové hmotnosti 20 – 40 kDa, aktivující hlavně amorfni oblasti celulosy a hydrolyzují celulosu na kratší oligosacharidy (*Gielkens a kol. 1999*)²⁵. Dalšími enzymy degradující celulosu jsou cellobiohydrolasy působící exo mechanismem uvolňující cellobiosu z konce řetězce celulosy. Uvolňování D-glukosy z cellobiosy je pak dosaženo působením β -glukosidas. β -glukosidasy zároveň hrají roli při degradaci xyloglukanu a galaktoglukomannanu (*Ivanova a kol. 1983, Hayashida a kol. 1988, Teeri 1997, Komerlink a kol. 1993*)^{26, 27, 28, 29}.

1.2.2 Degradace xylanu

Na rozdíl od celulosy, biodegradace xylanu vyžaduje širokou škálu enzymů. Tyto enzymy mohou být rozděleny na enzymy působící na xylanovou síť a na ty, které působí na boční řetězce. Dvě třídy enzymů, endo- β -1, 4-xylanasy (EC 3.2.1.8, glykosidové hydrolasy rodin 10 a 11) a β -1,4-D-xylosidasy (EC 3.2.1.37, glykosidové hydrolasy rodiny 2) působí na xylanovou síť. Endoxylanasy jsou enzymy působící endo mechanismem a hydrolyzují vazbu $\beta(1\rightarrow4)$ na xylooligosacharidy s různou délkou řetězce a postranními skupinami. Xylooligosacharidy jsou dále degradovány na D-xylosu β -xylosidasou (*Beldman a kol. 1993*)³⁰.

Další skupinou jsou enzymy působící na boční řetězce xylanu, dvě třídy zahrnují α -L-arabinofuranosidasy (EC 3.2.1.55, glykosidové hydrolasy rodin 2, 51, 54) odstraňující α -1,2- a α -1,3-L-arabinosový zbytek a arabinoxylan arabinofuranohydrolasy (glykosidové hydrolasy rodiny 62). Arabinofuranosidasy uvolňují oba terminální zbytky L-arabinosy a krátké arabinooligosacharidy z xylanu (*Ademark a kol. 1998*)³¹.

1.2.3 Degradace galakto(gluko) mannanu

Na degradaci galakto(gluko)mannanu se podílí celkem šest tříd enzymů (*Ronald a kol. 2002*)⁷:

- endo- β -1,4-D-mannanasy (EC 3.2.1.78, glykosidové hydrolasy rodiny 5)
- β -1,4-D-mannosidasy (EC 3.2.1.25, glykosidové hydrolasy rodiny 1)
- α -1,4-D-galaktosidasy (EC 3.2.1.22, glykosidové hydrolasy rodin 27, 36)
- β -1,4-galaktosidasy (EC 3.2.1.23, glykosidové hydrolasy rodin 1, 35)

- β -1,4-glukosidasy (EC 3.2.1.21, glykosidové hydrolasy rodin 1,2)
- galaktomannan acetyl esterasy

Endomannanasy štěpí síť galakto(gluko)mannanu za uvolnění manno-oligosacharidů hlavně mannobiosy a mannotriosy). Endomannasy preferují galakto(gluko)mannany s málo substituovanou D-galaktosou. β -mannosidasy uvolňují D-mannosu z neredukujícího konce galakto(gluko)mannanu (Civas a kol. 1984, Erikson a kol. 1968, Ademark a kol. 1999)^{32,33,34}. Následně jsou α -D-galaktosové zbytky odstraňovány z galakto(gluko)mannanu působením α -galaktosidas (Puls a kol.)³⁵ a hydrolyzovány koncové zbytky D-glukosy β -glukosidasami a acetylové zbytky připojené na D-mannosu jsou odstraňovány galaktomannan acetyl esterasy (Hasper a kol. 2002)³⁶.

1.2.4 Degradace xyloglukanu

Páteří řetězce xyloglukanu je identický s celulosou a při degradaci jsou vyžadovány dva typy celulolytických enzymů štěpících tento řetězec: endo- β -1, 4-glukanasy (EC 3.2.1.4, glykosidové hydrolasy rodiny 12) a β -1,4-glukosidasy (EC 3.2.1.21, glykosidové hydrolasy rodin 1, 2). Degradace bočních řetězců xyloglukanu vyžaduje součinnost dalších šesti typů enzymů: α -1,6-D-xylosidas, α -L-arabinofuranosidas (EC 3.2.1.55), α -1,2-L-fukosidas, α -1,2-L-galaktosidas, β -D-galaktosidas (3.2.1.23) a xyloglukan acetylesteras (Ronald a kol. 2002)⁷.

1.2.5 Degradace pektinu

Pektinové polysacharidy reprezentují velkou část primární buněčné stěny a střední lamely. Přispívají k mechanické pevnosti buněčné stěny a adhezi mezi buňkami; z tohoto důvodu je pektin spojen s pevností ovoce a zeleniny. Struktura pektinových polysacharidů může být pozměněna během zrání ovoce nebo jeho zpracování. Na enzymové degradaci pektinů se podílí komplexní systém hydrolytických (pektinesterasy a polygalakturonasy) a lytických (pektát a pektinlyasy) enzymů. Celkem bylo identifikováno 11 typů enzymů degradujících řetězec pektinu (Ronald a kol. 2002)⁷:

- polygalakturonasa (EC 3.2.1.15, glykosidová hydrolasa rodiny 28)
- exopolygalakturonasa (EC 3.2.1.67, glykosidová hydrolasa rodiny 28)
- exopolygalakturonosidas (EC 3.2.1.82, glykosidová hydrolasa rodiny 28)
- endorhamnogalakturonasa (glykosidová hydrolasa rodiny 28)
- rhamnogalakturonan rhamnohydrolasa
- rhamnogalakturonan galakturonohydrolasa
- α -rhamnosidas (EC 3.2.1.40, glykosidová hydrolasa rodiny 28)
- endoxylogalakturonan hydrolasa (EC 3.2.1.- glykosidová hydrolasa rodiny 28)
- pektin lyasa (EC 4.2.2.10, polysacharidová lyasa rodiny 1)
- pektat lyasa (EC 4.2.2.2, polysacharidová lyasa rodiny 1)
- rhamnogalakturonan lyasa (polysacharidová lyasa rodiny 4)

Kromě toho bylo identifikováno dalších 11 typů enzymů působících na degradaci bočních řetězců pektinu (Ronald a kol. 2002)⁷:

- pektin acetyl esterasa
- pektin methyl esterasa (EC 3.1.1.11, esterasová rodina 8)
- rhamnogalakturonan acetyl esterasa (esterasová rodina 12)
- α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55, glykosidové hydrolasy rodin 1, 51, 54)
- endo- α -1,5-arabinasa (EC 3.2.1.99, glykosidová hydrolasa rodiny 43)
- β -1,4-D-galaktosidase (EC 3.2.1.23, glykosidová hydrolasa rodiny 1, 35)
- β -1,3-endogalaktanasa
- β -1,4-endogalaktanasa (EC 3.2.1.89, glykosidová hydrolasa rodiny 53)
- β -1,6-endogalactanasa
- β -1,3-exogalactanasa (EC 3.2.1.145, glykosidová hydrolasa rodiny 55)
- feruloyl esterasa

Degradace homogalakturonanu

Degradace homogalakturonanu je v první řadě zajišťována polygalakturonasami katalyzujícími hydrolytickou reakci $\alpha(1\rightarrow4)$ glykosidických vazeb neesterifikovaného HGA. Pro většinu PGas jsou preferenčními substráty D-galakturonany s vysokou molekulovou hmotností. Rychlost štěpení polymerního substrátu klesá se zkracováním jeho řetězce. Způsob účinku není na polymerní substráty u všech polygalakturonas stejný, což se projevuje rozdíly v poměru poklesu viskozity k počtu rozštěpených glykosidických vazeb (Hesová 2002)³⁷.

Endopolygalakturonasa (endoPGasa) stejně jako endoxylogalakturonan hydrolasa (endoXGasa) působí na páteř homogalakturonanu nebo xylogalakturonanu náhodným způsobem účinku, zatímco exopolygalakturonasa (exoPGasa) působí od neredukujícího konce homogalakturonanu. Výsledkem působení těchto enzymů je uvolnění jednotek D-galakturonové kyseliny a disacharidu D-xylosy-D-galakturonové kyseliny v případě působení xylogalakturonan hydrolasy na D-xylosu (*van der Vlugt-Bergmans a kol. 2000*)³⁹. Endoxylogalakturonan hydrolasa byla popsána u plísně *Aspergillus* (*Kester a kol. 1999, Benen a kol. 1996*)^{38, 40}. Tento enzym nehydrolyzuje nesubstituovaný galakturonan, ale uvolňuje xylogalakturonan oligosacharidy o různé délce.

Dalšími endoenzymy uplatňujícími se při degradaci homogalakturonanu jsou pektin a pektát lyasy. Tyto enzymy působí na pektin mechanismem β -eliminace. V podstatě odštěpují ze substrátu nebo do něj vnášejí malé molekuly (H_2O , CO_2 , NH_3 ,...) bez pomoci dalšího reaktantu. Jsou povahy složených bílkovin a na podtřídy je lze dělit dle typu štěpených nebo syntetizovaných vazeb. Pektátlyasy a pektinlyasy štěpí glykosidové vazby pektátu nebo pektinu přenosem vodíku (transeliminací) z polohy C-4 do polohy C-5 aglykonové části substrátu. Pektin lyasa preferuje pektiny s vysokým stupněm esterifikace, zatímco pektát lyasa pektiny s nízkým stupněm esterifikace (*Vodrážka a kol. 1998*)³.

Degradace Rhamnogalakturonanu I

Rhamnogalakturonan hydrolasy a rhamnogalakturonan lyasy štěpí páteřní řetězce rhamnogalakturonanu I. Aktivita rhamnogalakturonasy je ovlivňována přítomností acetylových zbytků, a proto je tento enzym závislý na působení rhamnogalakturonan acetyl esterasy (*Gielkens a kol. 1999*)²⁵.

Dalšími enzymy působícími na RGI exo mechanismem jsou rhamnogalakturonan rhamnohydrolasa a rhamnogalakturonan galakturonohydrolasa. První z enzymů je specifický pro koncový zbytek rhamnosy, zatímco druhý pro koncový zbytek rhamnosy (Manzares a kol. 2001) ⁴¹. Arabinová složka pektinové postranní části je štěpena za součinnosti α -L-arabinofuranosidas a endoarabinanas. Arabinofuranosidasy jsou specifické pro terminální konec α -1,3 vázaného L-arabinosového zbytku a endoarabinasa pro α -1,2 a α -1,5 vázané L-arabinosového zbytky. Pro účinnou hydrolýzu arabinanu je důležitá endoarabinasa (Kaneko a kol. 1993, Dunkel a kol. 1995) ^{42,43}. Endogalaktanasy, exogalaktanasy a β -galaktosidasy degradují galaktan. Tyto tři typy enzymů jsou vyžadovány pro kompletní degradaci galaktanu ⁴⁵.

Acetylové zbytky HGA a RGI jsou štěpeny pektin acetylesterasami a rhamnogalakturonan acetylesterasami (Christgau a kol. 1996) ⁴⁴. Pektin methylesterasy (PME) hydrolyzují methylestery z HGA, který je methylesterifikován v pozici 6 a acetylován v pozici 2 nebo 3 ⁴⁶. Feruloyl esterasy uvolňují zbytky kyseliny ferulové navázané na L-arabinosu a D-galaktosu od konce postranního řetězce (Khanh a kol. 1991, Jayani a kol. 2005) ^{45, 46}.

1.3 Produkce mikrobiálních enzymů na odpadech rostlinného původu

Mikrobiální enzymy patří mezi nejdůležitější produkty získané člověkem. Jsou využívány ve velké míře v různých oblastech průmyslu a potravinářských biotechnologiích. Vývoj v biotechnologiích se podřizuje novým aplikacím těchto enzymů. Hlavním zdrojem enzymů jsou mikroorganismy produkované za podmínek solid state fermentace (SSF) nebo submerzní fermentace (SmF), (Pandey 1999) ⁴⁷.

1.3.1 Produkční mikroorganismy

Většina mikroorganismů, zahrnující bakterie, kvasinky i plísňe je schopna produkovat velké množství různých skupin enzymů pro příklad uvedených v **tabulce 1** (Pandey 1999) ⁴⁷.

Tab. 1: Mikroorganismy schopné produkovat široké spektrum enzymů (Pandey 1999) ⁴⁷

mikroorganismus	enzym
<i>Trichoderma reesei</i>	celulasa
<i>Aspergillus niger</i>	celulasa, xylanasa
<i>Aspergillus oryzae</i>	celulasa, β -glukosidasa
<i>Penicillium chrysosporium</i>	xylanasa, β -xylosidasa
<i>Pleurotus ostreatus</i>	lakasa, Mn-peroxidasa
<i>Trametes versicolor</i>	lakasa, Mn-peroxidasa
<i>Bacillus licheniformis</i>	xylanasa
<i>Streptomyces sp.</i>	proteasa
<i>Candida rugosa</i>	lipasa
<i>Aspergillus foetidus</i>	polygalakturonasa
<i>Bacillus megaterium</i>	β -amylasa
<i>Bacillus subtilis</i>	α -amylasa
<i>Rhizopus sp.</i>	glukoamylasa
<i>Aspergillus sp</i>	glukoamylasa

Příkladem vhodného produkčního mikroorganismu je plíseň *Aspergillus niger*, u kterého byla popsána produkce až 19 typů enzymů (Pandey 1999)⁴⁷. Obecně jsou hydrolytické enzymy, celulasy, xylanasy, pektinasy a jiné, produkovány plísnovými kulturami. *Trichoderma* sp. a *Aspergillus* sp. jsou nejrozšířenějšími producenty enzymů (Pandey 1999)⁴⁷.

1.3.2 Degradovatelné substráty

Odpadním materiálem využívaným pro produkci enzymů jsou většinou zemědělské odpady. Tyto odpady jsou široce dostupné a z ekonomického hlediska poměrně levné. Jsou vhodné pro produkci mikrobiálních enzymů za podmínek solid state i submerzní fermentace. Mezi nejčastěji používané odpady lze zařadit řepné řízky; odpad z cukrové třtiny; bagasu; pšeničnou, rýžovou, kukuřičnou slámu; pšeničné otruby; hroznové nebo jablečné výlisky; odpady ze zpracování banánů, čaje; odpad po vylisování olivového oleje; odpad ze zpracování řepky, škrobu a mnoho dalších typů odpadních materiálů (Pandey 1999)⁴⁷.

Výběr vhodného substrátu a kultivačních podmínek hraje důležitou roli při produkci enzymů. Účinnost hydrolýzy odpadu je pak ovlivňována několika faktory, především hodnotou pH, teplotou nebo produkčním mikroorganismem. Roli hraje zároveň cena a dostupnost zvoleného substrátu (Pandey 1999)⁴⁷.

1.3.3 Podmínky produkce enzymů

Až 90 % průmyslově používaných mikrobiálních enzymů je produkováno prostřednictvím submerzní kultivace. Při submerzní kultivaci se velmi často využívají předem optimalizované podmínky a geneticky modifikované mikroorganismy. Podmínky SmF představují výhody vůči solid state kultivaci (Pandey 1992)⁴⁸. Většina enzymů produkováných za podmínek submerzní kultivace může být produkována i za podmínek solid state kultivace. V případě solid state kultivace s vyššími výtěžky. Vyprodukované enzymy jsou stabilní v širokém rozmezí teplot i pH. Nevýhodou je menší nárůst biomasy oproti SmF (Manpret a kol. 2005, Hölker a kol. 2004)^{49,50}.

Hlavním aspektem solid state procesu je růst mikroorganismů na zvlhčeném pevném odpadním materiálu za absence volné vody. Nízký obsah vlhkosti při této fermentaci znamená omezený limit pro výběr mikroorganismu. Solid state proces je proto vhodný zejména pro produkci enzymů pomocí vláknitých hub, jelikož simuluje jejich životní podmínky. Výhodou je produkce enzymů s vysokou aktivitou (Couto a kol. 2005)⁵¹. Zemědělským odpadem využívaným při solid state fermentaci jsou např. pomerančové výlisky nebo cukrová třtina. Tyto zemědělské odpadní substráty jsou efektivním substrátem pro produkci depolymerizujících enzymů, degradujících pektinovou složku rostlinné buněčné stěny, za podmínek SSF (Couto a kol. 2006)⁵².

1.3.4 Faktory ovlivňující solid state fermentaci

Hlavní faktory ovlivňující mikrobiální produkci enzymů v SSF systému zahrnují výběr vhodného substrátu a mikroorganismu, předčištění substrátu, velikost částic substrátu, obsah vody a vodní aktivitu substrátu, relativní vlhkost, typ inokula, kontrolu teploty fermentace, dobu fermentace, míru rozpuštěného kyslíku a obsah CO₂ (Pandey 1999)⁴⁷.

1.4 Produkce pektolytických enzymů

Pektolytické enzymy představují heterogenní skupinu enzymů hydrolyzující pektinové substance. Tyto enzymy jsou široce rozšířené jak u vyšších rostlin, tak i mikroorganismů. Zároveň hrají důležitou roli při měknutí ovoce a zeleniny během zrání a uchovávání (Martin a kol. 2004)⁵³.

Je známo, že mikrobiální pektolytické enzymy tvoří 25 % prodeje ze všech prodáváných enzymů a většina z nich je plísňového původu. Nejznámějším průmyslovým producentem pektolytických enzymů je plíseň *Aspergillus niger* (Martin a kol. 2004)⁵³.

Nejrozšířenějšími enzymy jsou endoPGasy, které jsou produkovány většinou plísní, bakteriemi, ale i mnoha kvasinkami. Známými producenty jsou: *Aureobasidium pullulans*⁵⁴, *Fusarium moniliforme*⁵⁵, *Neurospora crassa*⁵⁶, *Rhizopus stolonifer*⁵⁷, *Aspergillus sp.*⁵⁸, *Thermomyces lanuginosus*⁵⁹, *Peecilomyces clavisporus*⁶⁰. ExoPGasy mají v porovnání s endoPGasami menší technologický význam. Producenty exoPGas jsou například *Erwinia carotovora*⁶¹, *Agrobacterium tumefaciens*⁶², *Bacteroides thetaiotamicron*⁶³, *Erwinia chrysanthemi*⁶⁴, *Alternaria mali*⁶⁵, *Fusarium oxysporium*⁶⁶, *Ralstonia solanacearum*⁶⁷, *Bacillus sp.*⁶⁸. ExoPGasy jsou význačné dvěma produkoványmi typy: plísňové exoPGasy, kde hlavním a konečným produktem je monogalakturonová kyselina (MGA) a bakteriální exopolygalakturonosidasa, kde hlavním produktem je kyselina digalakturonové (Wijesundera a kol. 1984)⁶⁹.

Pektát lyasy jsou dalšími enzymy produkoványmi mnoha bakteriemi a některými patogenními plísněmi. Producenty jsou: *Colletotrichum lindemuthionum*⁷⁰, *Bacteroides thetaiotaomicron*⁷¹, *Erwinia carotovora*⁷², *Amucala sp.*⁷³, *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea*⁷⁴, *Colletotrichum magna*⁷⁵, *Erwinia chrysanthemi*^{76,77}, *Bacillus sp.*^{78,79}, *Bacillus sp. DT-7*⁸⁰, *Colletotrichum gloeosporioides*^{81,82}.

Producenty pektin lyas jsou: *Aspergillus japonicus*⁸³, *Penicillium paxilli*^{84,85}, *Penicillium sp.*^{86,87,88}, *Pythium splendens*⁸⁹, *Pichia pinus*⁹⁰, *Aspergillus sp.*⁹¹, *Thermoascus aurantiacus*⁹².

Pektin esterasová aktivita je podmíněna metabolismem buněčné stěny zahrnující růst buněk, zrání ovoce, stárnutím a patogenitu (Gaffe a kol. 1997, Dorokhov a kol. 1999)^{93,94}. Komerční pektinasy se používají pro ochranu a úpravu textury zpracovávaného ovoce a zeleniny, stejně jako pro extrakci a číření ovocných džusů (Fayaz a kol. 1993)⁹⁵. Produkce pektin esteras je potvrzena u rostlin, bakteriích patogenních pro rostliny a plísní: *Rhodotorula sp.*⁹⁶, *Erwinia chrysanthemi*⁹⁷, *Saccharomyces cerevisiae*⁹⁸, *Pseudomonas solanacearum*⁹⁹, *Aspergillus niger*¹⁰⁰, *Lactobacillus lactis subsp. Cremoris*¹⁰¹, *Penicillium frequentans*¹⁰², *Penicillium occitanis*¹⁰³, *Aspergillus japonicus*¹⁰⁴ a mnoho dalších.

1.5 Matoliny (hroznové výlisky)

Matoliny jsou hroznové výlisky po získání moštu z rmutu, jinak odpadová hmota. Matoliny se dají využít k dalšímu zpracování. Výlisnost moštu se pohybuje mezi 60 – 75 %, v závislosti na odrůdě a vyzrálости hroznů. Za předpokladu, že z 1 ha se v ČR dosáhne průměrného výnosu 6 tun hroznů, bude odpad matoliny cca 20 – 45 tis. tun (*online Vinařský slovník*)¹⁰⁵.

Například v Itálii se z výlisků modrých hroznů vyrábí v parních destilačních kotlích grappa, ze semínek se lisuje hroznový olej, oceňovaný zejména labužníky. Konečný zbytek se buď suší odpadním teplem z destilace grappy a využívá se jako palivo pro vyvíječe páry, nebo se suší na pokrutiny pro skot. Matoliny jsou v zahraničí využívány i jinými speciálními technologiemi. Druhotné zpracováním odpadu po lisování rmutu lze tedy optimálně využít při tzv. bezodpadových technologiích. Macerací matolin ve vodě lze získat výluh pro další zpracování, např. nealkoholických nápojů nebo tzv. druháku (*online Vinařský slovník*)¹⁰⁵.

Složení a struktura primární stěny bobulí hroznů je velmi zajímavá z důvodu jejich důležitosti v technologii výroby vína. Vylisovaná dužina obsahuje celulosu, hemicelulosu, pektinové polysacharidy homogalakturonanu, rhamnogalakturonanu I a II (*Vidal a kol. 2001*)¹⁰⁶. Jejich chemické složení je bohaté na základní živiny vyžadované pro růst široké škály mikroorganismů. Tento odpadní produkt obsahuje vysoký podíl ligninu, celulosy a vysoké procento výživných minerálních prvků, zvláště dusík a draslík vhodných pro mikrobiální růst. Hroznové výlisky mohou být využity pro zvířata jako potrava, speciálně v suchých obdobích, když je nedostatek čerstvého krmiva. Jejich používání je limitováno na 30 % celkové potravy přežvýkavců díky velmi nízké výživové hodnotě. Odpad z hroznové révy může být použit například jako substrát pro produkci celulas, pektinas a xylanas. Vhodnými producenty těchto enzymů mohou být například plísně *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Monascus purpureus* (*Bottela a kol. 2007, Bertran a kol. 2004, Bottela a kol. 2005*)^{107,108,109}.

2 Odpadní vody

Odpady z potravinářských výrob zahrnují především tuhé odpady a odpadní vody. Zpravidla největším problémem je oblast odpadních vod, neboť potravinářské výroby v sobě zahrnují řadu jednotlivých postupů jako je praní, extrakce, odpařování, filtrace atd. Odpadní vody běžně obsahují vysoké koncentrace suspendovaných částic a rozpustných organických látek jako jsou sacharidy, bílkoviny a lipidy (Bitton 2005) ¹¹⁰.

Lipidy jsou přítomné buď jako volné, adsorbované nebo emulgované. Volné lipidy patří mezi látky plovoucí. Volné a adsorbované lipidy jsou odstraňovány v mechanickém stupni čistírny odpadních vod. Další část lipidů je ve splaškových vodách přítomna v neusaditelné emulgované formě (online skripta VŠCHT, Marek) ¹¹¹.

2.1 Čištění odpadních vod

Čištění odpadních vod zahrnuje celou řadu technologických procesů. V první fázi procesu, tzv. předčištění se oddělují hrubé mechanické nečistoty jako je písek, štěrk, a podobně. Další primární úpravou se v sedimentačním tanku odstraňují z vody nerozpustné látky. Dále navazují procesy biologické oxidace, oddělování a stabilizace kalu, desinfekce a konečná úprava (online Způsoby čištění odpadních vod) ¹¹².

2.1.1 Způsoby čištění odpadních vod

Mezi základní způsoby čištění odpadních vod můžeme zahrnout jak postupy mechanické, tak i způsoby chemické nebo biologické. Při všech postupech čištění odpadních vod vzniká kal, který se dále zpracovává (online Způsoby čištění odpadních vod) ¹¹²:

- mechanickými postupy lze docílit usazení hrubých nečistot v sedimentačních nádržích a lapácích písku
- chemické postupy využívají srážecích reakcí, dále neutralizací kyselin a zásad, extrakcí a adsorpčních procesů. Těchto postupů se hlavně využívá tam, kde je potřeba upravit odpadní vodu před vypuštěním do toků.
- biologické postupy využívají rozkladu organické hmoty pomocí mikroorganismů. Tyto biologické postupy pak mohou být využity za aerobních nebo anaerobních podmínek

Mechanické čištění

Mechanické čištění je proces, při němž jsou zachycovány částice na přepážce nebo ve vrstvě materiálu. Tento proces se nazývá **filtrace**. Filtrací lze odstranit emulgované částice. Dle velikosti částic se rozlišují česle, síta, mikrosíta a mikrofilmy (online Způsoby čištění odpadních vod) ¹¹².

Usazování

Usazování patří k nejrozšířenějším separačním procesům, kde separace tuhých částic je dána gravitací záviselou na velikosti a tvaru částice a hustotě kapaliny. Z hlediska usazování je důležitý i charakter suspenze. V technologii úpravy vody se rozlišují suspenze tvořené z částic zrnitých a vločkovitých. K vločkovitým suspenzím patří biologický aktivovaný kal, hydroxidy těžkých kovů. Proces usazování probíhá v usazovacích nádržích procesem sedimentace (*online Způsoby čištění odpadních vod*)¹¹².

Lapáky tuků a plovoucích nečistot, flotace

Pokud je koncentrace tuků a olejů v odpadní vodě taková, že k jejich zachycení nepostačuje usazovací nádrž, je nutno zařadit lapáky tuků a olejů. Tyto látky snižují účinnost biologického čištění, zejména zhoršením přestupu kyslíku do vody a do kultury mikroorganismů (*online Způsoby čištění odpadních vod*)¹¹².

Flotace

Flotace je separační proces, používaný pro oddělení dispergovaných částic z kapaliny, při kterém se tyto částice spojují s mikrobublinami plynu za vzniku flotačních komplexů, kteří jsou vynášeny k hladině (*online Způsoby čištění odpadních vod*)¹¹².

Biologické čištění

Při biologickém čištění se užívá degradačních schopností směsné kultury mikroorganismů. Tato kultura je tvořena směsí heterotrofních aerobních i fakultativně anaerobních bakterií, autotrofních bakterií, přítomny jsou plísňe a kvasinky. Kvalitativní i kvantitativní složení směsné kultury je dáno složením odpadní vody i parametry procesu (doba zdržení, zatížení biomasy a stáří kalu). Tato směsná kultura se nazývá aktivovaný kal. Cílem biologického čištění odpadních vod je koagulovat, odbourat neusaditelné koloidní látky a stabilizovat organické látky. Organické látky přítomné ve vodách jsou pak mikroorganismy schopny využívat jako substrát, který je z části oxidován na CO₂ a vodu, částečně je převeden na novou biomasu (*online Způsoby čištění odpadních vod*)¹¹².

Při čištění odpadních vod se můžeme setkat s několika typy kalů, které vznikají během jednotlivých čistících procesů (*online Způsoby čištění odpadních vod*)¹¹²:

- primární kal - kal z usazovacích nádrží
- biologický kal - přebytečná biomasa z biologických: reaktorů, zachycená v dosazovacích nádržích
- smíšený surový kal - směs primárního a biologického kalu a v tomto případě jde o vlastní odpad z čištění kalu
- chemický kal - z koagulace, srážení - neutralizace apod.

Zpracování kalů

Zpracování kalů se skládá z prvotního zahuštění kalu, které je následované jeho stabilizací a odvodněním. Takto zpracovaný kal již nepodléhá dále biochemickým rozkladům a při skladování či aplikaci jako hnojivo nezpůsobuje hygienické či senzorické závady (*online Způsoby čištění odpadních vod*)¹¹².

Zahušťování kalu je závislé na druhu kalu, primární kal je většinou zahušťován sedimentací, zatímco ostatní druhy kalů flotací (*online Způsoby čištění odpadních vod*)¹¹².

Stabilizaci kalu lze zajistit aerobní, anaerobní nebo chemickou stabilizací. Při *anaerobní stabilizaci (methanizace, vyhnívání)* dochází mikrobiálními procesy v anaerobním prostředí k rozkladu biologicky rozložitelné organické hmoty provázené produkcí bioplynu neboli kalového plynu. Při *aerobní stabilizaci* kalu dochází k rozkladu organické hmoty biomasy autooxidačním procesem takzvaného endogenního metabolismu a současně je oxidačními procesy rozkládána organická hmota exogenního substrátu, která nebyla rozložena v procesu čištění. Výhodou aerobní stabilizace je srovnatelný stupeň rozkladu organické hmoty s anaerobní stabilizací, nízké koncentrace biologické spotřeby kyslíku (BSK) v kalové vodě, přeměna amoniakálního dusíku na dusičnany, jednoduchý provoz a nízké investiční náklady. Nevýhodou je vysoká spotřeba elektrické energie, s celkově horší energetickou bilancí, vyplývající i z toho, že není produkován bioplyn. *Chemická stabilizace* kalu se provádí přidávkou zásady do odvodněného kalu, obvykle oxidu nebo hydroxidu vápenatého, čímž se zvýší pH směsi na cca 12 nebo i více. Při tomto pH dochází k usmrcení patogenů, ale organická hmota zůstává nerozložena (*online Způsoby čištění odpadních vod*)¹¹².

Odvodňování kalu

Při odvodňování kalu dochází k dalšímu odstranění vody ze suspenze, a to na úroveň, při níž je konsistence kalu tuhá a lze s ním manipulovat jako se zemínou (*online Způsoby čištění odpadních vod*)¹¹².

Mezi **konečné etapy zpracování kalu** se řadí skládkování kalu, dále jeho spalování, zakomponování do stavebních materiálů, jeho kompostace nebo se může používat také jako hnojivo (*online Způsoby čištění odpadních vod*)¹¹².

2.1.1.1 Anaerobní čištění odpadních vod

Proces anaerobní stabilizace odpadních kalů lze využít při čištění odpadních vod, a to zejména vysoce znečištěných průmyslových vod. Spodní hranice pro ekonomický provoz bývá udávána hodnotou chemické spotřeby kyslíku (CHSK) kolem 2000 mg.l⁻¹. Rozklad složitých organických sloučenin na jednodušší sloučeniny probíhá především působením extracelulárních enzymů. Jejich hydrolytickým účinkem jsou štěpeny proteiny na aminokyseliny, polysacharidy (škrob, celulóza) na monosacharidy (glukosa) a lipidy na mastné kyseliny (obvykle s větším počtem uhlíkových atomů) a další složky, např. u tuků na glycerol. Konečnými produkty anaerobního rozkladu organické hmoty je methan a CO₂, které jsou uvolňovány jako bioplyn. Část CO₂ však zůstává rozpuštěna příp. chemicky vázána ve vodném prostředí. Produktem rozkladu dusíkatých látek je amoniak, tvořící s oxidem uhličitým hydrogenuhličitán amonný. Produktem rozkladu organických sloučenin s obsahem síry je sirovodík H₂S (*online Způsoby čištění odpadních vod*)¹¹².

2.1.1.2 Aerobní čištění odpadních vod

Anaerobní čištění představuje první stupeň biologického čištění, za kterým musí následovat aerobní dočištění, např. aktivačním procesem. Jeho úkolem je odstranit zbytkové znečištění, meziprodukty anaerobního rozkladu a převést vodu do kyslíkatého stavu, aby mohla být vypouštěna do toků (*online Způsoby čištění odpadních vod*)¹¹².

2.1.2 Organického znečištění odpadních vod

Míru organického znečištění odpadních vod lze posuzovat na základě dvou základních stanovení. První z nich tzv. **Biologická spotřeba kyslíku (BSK)** nám určuje množství biologicky odbouratelných látek ve znečištěných odpadních vodách. Je vyjádřena jako množství kyslíku, které se spotřebuje na rozklad organických látek za časový interval (g/m^3). Druhým ukazatelem organického znečištění je tzv. **Chemická spotřeba kyslíku (CHSK)**, kterou lze posoudit míru znečištění, je vyjádřena jako množství kyslíku odpovídajícího spotřebě oxidačního činidla při úplné oxidaci organických látek ve vodě. CHSK lze stanovit standardní dichromanovou metodou (*online Způsoby čištění odpadních vod*)¹¹².

2.2 Lapáky tuků

Z důvodu své nemísitelnosti s vodou, flokulační a usazovací schopnosti, lipidy přítomné v průmyslových odpadních vodách, zejména při zpracování masa, a masných výrobků, při zpracování mléka a mléčných výrobků, a také lipidy ze zařízení společného stravování, jsou schopny způsobit řadu problémů v provozu čistíček odpadních vod. Lipidy zabraňují procesu difúze kyslíku, vyskytují se jako usazeniny v tancích až na hladině tekutiny, ucpávají potrubí a způsobují řadu dalších problémů (*Cammarota a kol. 2006, Wakelin a kol. 1997*)^{113,114}. Proto je nutné v provozech, kde vzniká odpadní voda obsahující tuky, zabudovat **odlučovače tuků**. Zařazují se také před čističky odpadních vod nebo před vyústěním do kanalizace. Ostatní komunální odpad, ropné látky, minerální oleje, splaškové, balastní a dešťové vody se nesmí do odlučovače tuků vpouštět (*online skripta VŠCHT, Marek*)¹¹¹.

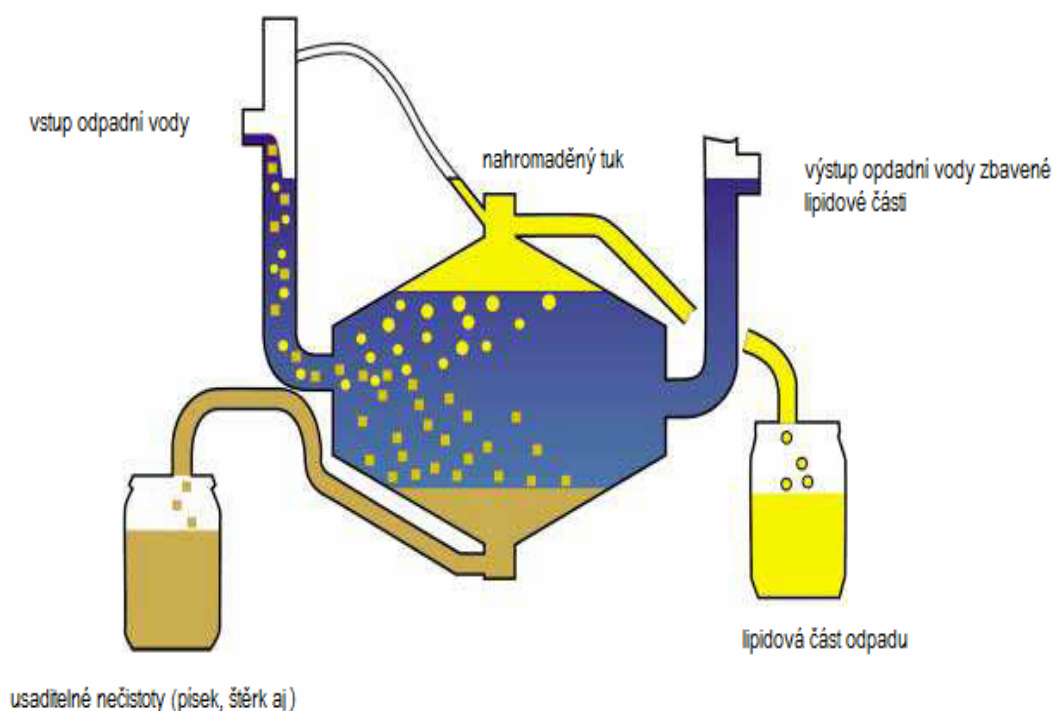
Princip odlučovačů tuků a olejů je opačný k sedimentačním nádržím. Odpadní voda se přivádí ke dnu separační nádrže, po zmenšení průtočné rychlosti dojde k oddělení tuků a olejů z vody. Hromadí se u hladiny, kde jsou stírány. Proces lze urychlit zavedením tlakového vzduchu. Tukové částice se nabalují na vzduchové bubliny a jsou vynášeny na povrch v podobě pěny. Pokud jsou tuky a oleje v emulgované formě, je nutno nejprve emulze chemicky narušit. Poté je vhodnou separační operací tlaková flotace (*online Způsoby čištění odpadních vod*)¹¹².

Lapáky tuků neboli odlučovače slouží k zachycení a odloučení odpadních tuků a olejů rostlinného a živočišného původu ze znečištěných vod v oblasti potravinářských služeb a v průmyslových provozech. Schéma odlučovače je uvedeno na **obr. 2.2 (Pitter 2009)**¹¹⁵. Separováním tuků se úspěšně zabraňuje usazování těchto látek v kanalizačních rádech a tím se zamezuje jejich ucpávání.

Odlučovač tuků je plastová nebo kovová nádrž (**obr. 4**), kterou je nutno umístit v průmyslových objektech za účelem separace tuků z odpadních vod. Separace vodné od organické fáze, která jako horní vrstva zůstává v nádrži, probíhá na základě časové prodlevy. Takto předčištěné vody lze vypouštět do kanalizace. Na základě konstrukce mohou být odlučovače tuků určeny pro vnitřní instalaci nebo pro instalaci do země a instalace mimo budovy. Podle systému odčerpání obsahu rozlišují se (*Pitter 2009*)¹¹⁵:

- odlučovače s úplným odčerpáním obsahu
- odlučovače s částečným odčerpáním obsahu

Průmysloví producenti odpadních vod se musí vhodnými opatřeními postarat o to, aby vody, které obsahují značný podíl tuků, nepronikly do veřejné kanalizační sítě. V podnicích, kde vznikají odpadní vody znečištěné tuky, musí být podle české technické normy ČSN EN 1825 instalovány odlučovače tuků, které zaručí zadržování tuků a olejů organického původu ze splaškové vody. To platí např. pro zařízení společného stravování a masozpracující provozy. Na ochranu budovy je třeba instalovat čerpací zařízení s rezervním čerpadlem. Proto musí být za každým odlučovačem tuků, který je nainstalován zpravidla v úrovni pozemní komunikace, nainstalováno čerpací zařízení nebo přečerpávací stanice (Pitter 2009) ¹¹⁵.



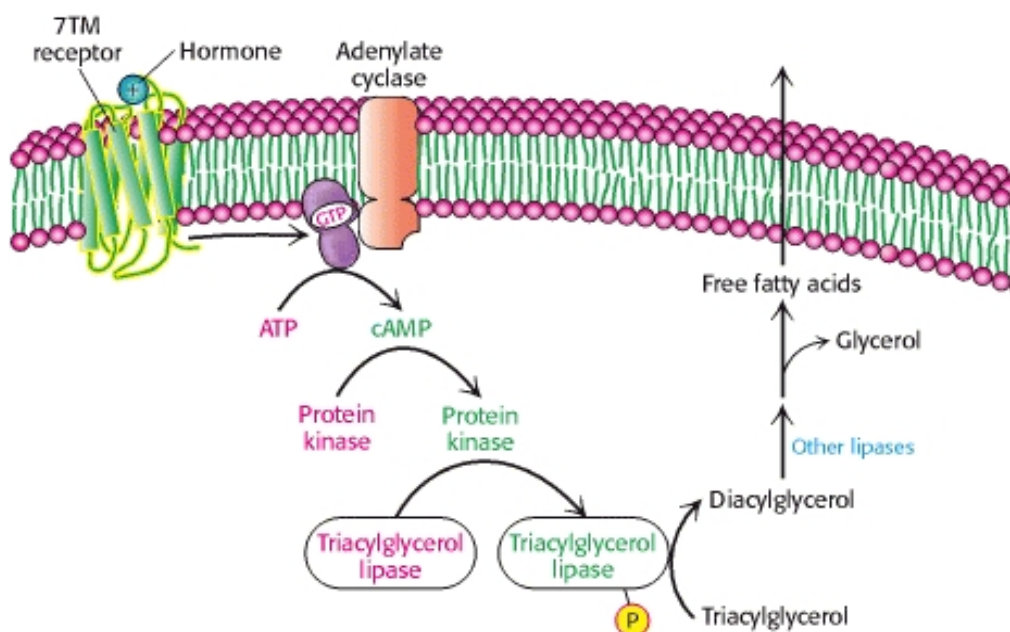
Obr. 4: Schéma odlučovače tuků (online Odlučovače tuků a ropných látek) ¹¹⁶

2.3 Odbourávání lipidů

Z organického hlediska lipidy řadíme mezi triacylglyceroly. Základem je glycerol s esterově navázanými vyššími mastnými kyselinami (Berg a kol. 2002)¹¹⁷.

2.3.1 Odbourávání triacylglycerolu

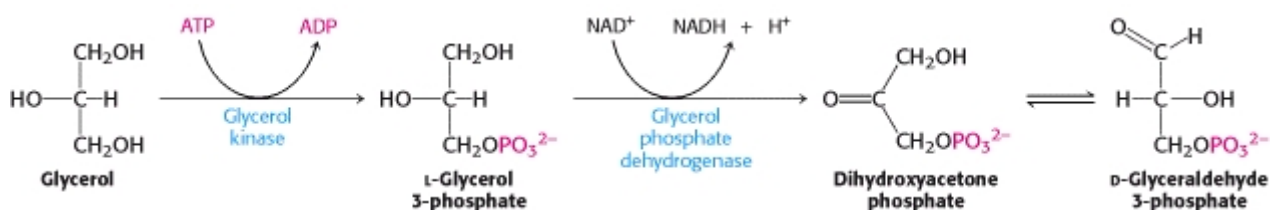
V první fázi je triacylglycerol TAG postupně odbouráván za součinnosti několika lipolytických enzymů na glycerol a mastné kyseliny. Iniciací pro odbourávání TAG je zvýšená hladina cAMP, který stimuluje protein kinasu A. Tato kinasa aktivuje triacylglycerollipasu fosforylací, která atakuje triacylglycerol za jeho postupného odbourávání (obr. 5), (Berg a kol. 2002)¹¹⁷.



Obr. 5: Aktivace kinasy A pomocí cAMP a odbourávání TAG (Berg a kol. 2002)¹¹⁷

2.3.2 Odbourávání glycerolu

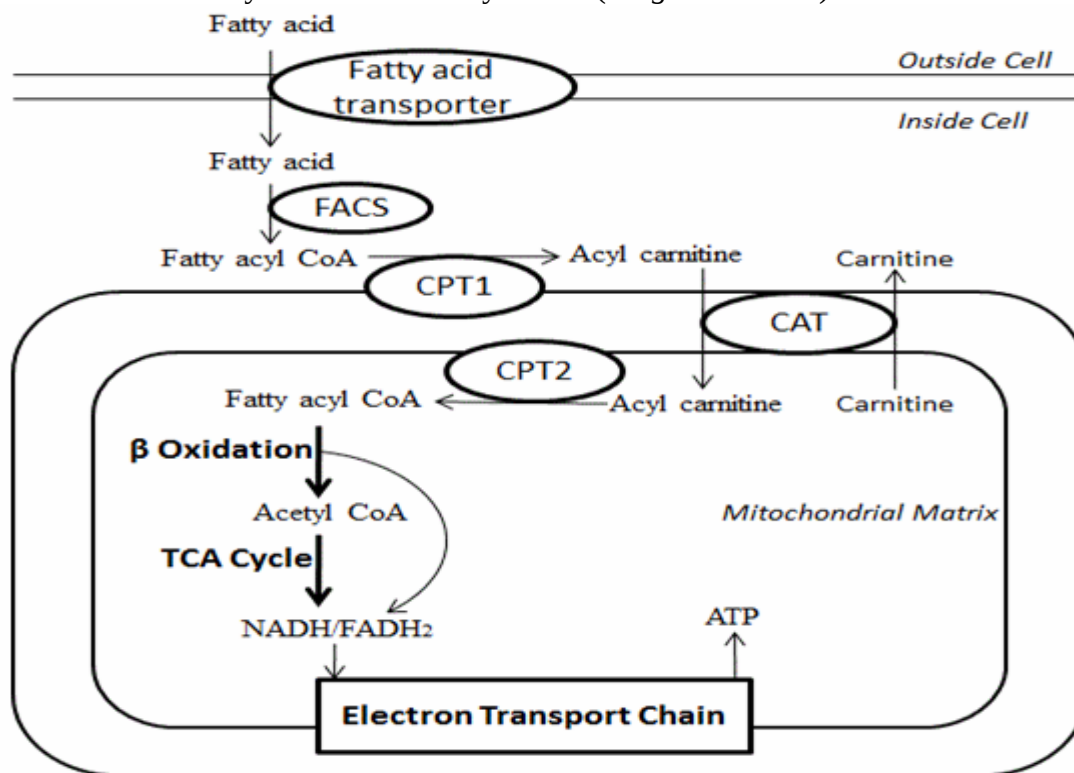
Glycerol vytvořený lipolýzou je v dalším cyklu fosforylován glycerolkinasou a oxidován na dihydroxyaceton fosfát. Dihydroxyaceton fosfát je izomerizován na glyceraldehyd-3-fosfát a je využit jako meziprodukt v metabolismu glukosy nebo glukoneogeneze, obr. 6, (Berg a kol. 2002)¹¹⁷.



Obr. 6: Přeměna glycerolu na glyceraldehyd-3-fosfát (Berg a kol. 2002)¹¹⁷

2.3.3 Odbourávání mastných kyselin

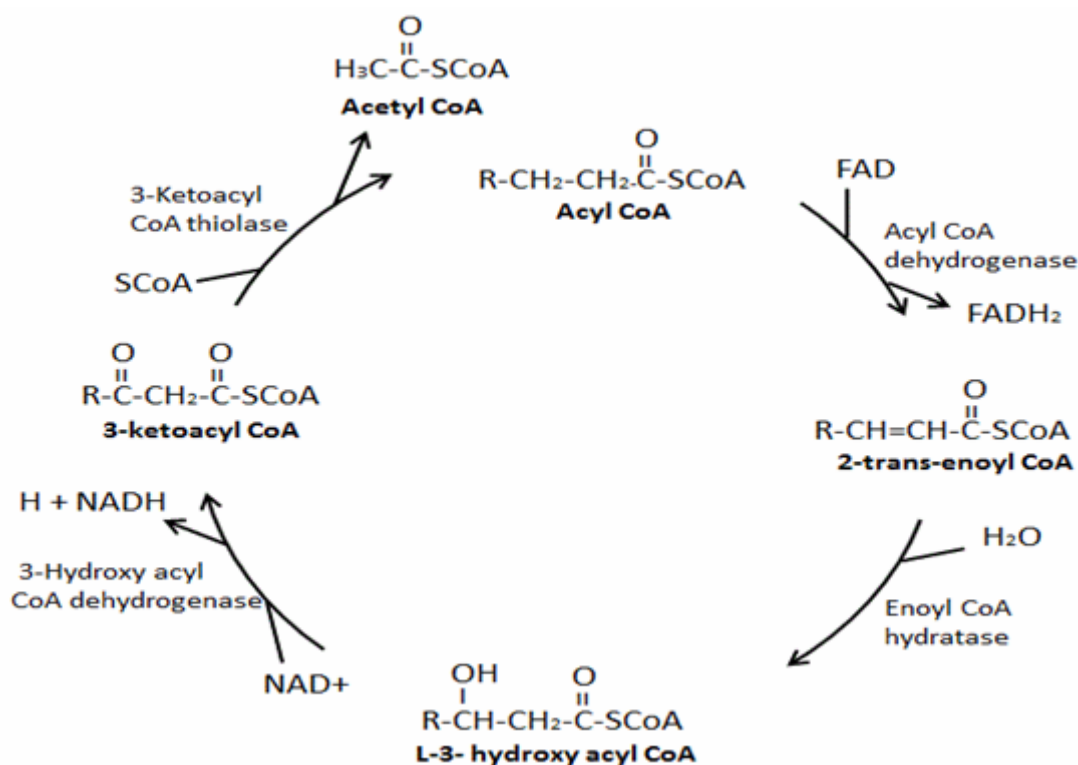
Mastné kyseliny jsou oxidovány mechanismem β -oxidace, jehož výsledkem je acetyl-CoA, který dále vstupuje do Krebsova cyklu. β -oxidace je proces probíhající v mitochondriích (**obr. 7**). Předpokladem je aktivace mastných kyselin a jejich přenesení přes mitochondriální membránu eukaryotní buňky. Mastná kyselina (acyl-CoA) je nejprve aktivována acetyl-CoA-synthasou za účasti ATP a přes mitochondriální membránu je transportována za účasti karnitin palmitoyltransferasy (v obrázku označena CTP1). Po přenesení přes membránu dojde za účasti karnitin palmitoyl transferasy 2 (CTP2) k uvolnění acyl-CoA a jeho vstupu do cyklu β -oxidace a zkrácení acyl-CoA o dva atomy uhlíku (Berg a kol. 2002) ¹¹⁷.



Obr. 7: Schéma transportu aktivovaného acyl-CoA přes mitochondriální membránu (Berg a kol. 2002) ¹¹⁷

Vlastní mechanismus β -oxidace mastných kyselin je rozdělen do čtyř kroků (**obr. 8**), (Berg a kol. 2002) ¹¹⁷:

- z aktivovaného acyl-CoA jsou působením acyl-CoA-dehydrogenasy odštěpeny dva atomy vodíku z uhlíku C2 a C3. Následnou oxidací pomocí flavinadenindinukleotidu FAD vzniká α , β nenasycený acyl-CoA
- vzniklý α , β nenasycený acyl-CoA je hydratován za účasti enzymu enoyl-CoA-hydratasy a vzniká β -hydroxyacyl-CoA
- v následující reakci je β -hydroxyacyl-CoA oxidován na β -ketoacyl-CoA, je vyžadována účast β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasy a koenzymu nikotinamidadenindinukleotidu (NAD^+)
- v poslední části dochází pomocí Claisenovy reakce ke štěpení β -ketoacyl-CoA za vzniku dvou sloučenin, acetyl-CoA, který vstupuje do Krebsova cyklu a acyl-CoA kratšího o dva atomy uhlíku.



Obr. 8: Schéma odbourávání mastných kyselin (Berg a kol. 2002) ¹¹⁷

2.4 Lipolytické enzymy

Lipolytické enzymy řadíme mezi esterové hydrolasy, katalyzující ve dvoufázovém systému voda – lipid, rozklad mono-, di- a triacylglycerolů na vyšší mastné kyseliny, alkohol a glycerol komplexním mechanismem závislým na mnoha faktorech (online www.lipidlibrary.aocs.org/animbio/faoxid/index.htm) ¹¹⁸. Jako lipolytické enzymy označujeme lipasu (**EC 3.1.1.3 triacylglycerolacylhydrolasa**) a esterasu (**EC 3.1.1.1 karboxylesterhydrolasa**). Jsou charakteristické svojí schopností hydrolyzovat hydrofobní dlouhé (EC 3.1.1.3) i krátké (EC 3.1.1.1) řetězce esterů karboxylových kyselin (Jaeger a kol. 1994) ¹¹⁹. Jsou známy živočišné, rostlinné i mikrobiální lipolytické enzymy. Mnoho z nich vykazuje širokou substrátovou specifitu. Vykazují vysokou regio- a stereospecifitu, která je dělá atraktivními biokatalyzátory pro produkci opticky čistých sloučenin v chemických syntézách. Význam těchto enzymů spočívá ve skutečnosti, že nevyžadují kofaktory, jsou obvykle poměrně dosti stabilní a dokonce aktivní v organických rozpouštědlech (Singh a kol. 2006) ¹²⁰.

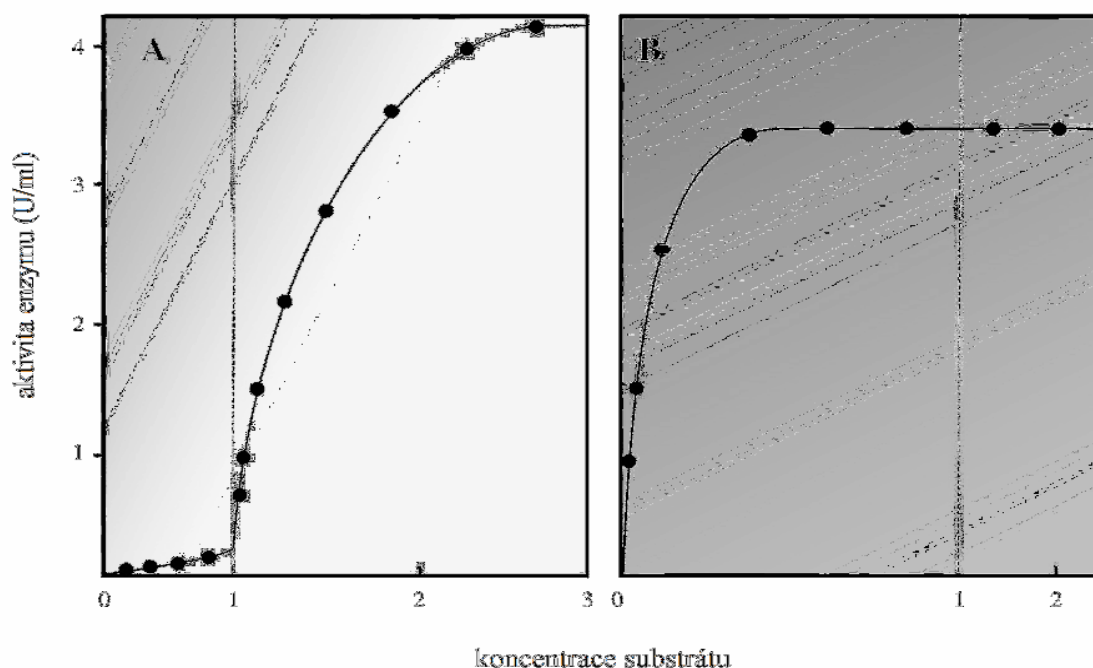
2.4.1 Struktura lipas

Lipolytické enzymy řadíme mezi tzv. serinové hydrolasy. Trojrozměrná 3D struktura těchto enzymů vykazuje charakteristické α/β -ohyby – α -helixy a β -listy. Katalytická triáda je složena ze tří aminokyselinových zbytků, a to serinu-asparaginu-histidinu; u některých lipas se vyskytuje glutamin namísto asparaginu (Jaeger a kol. 1994) ¹¹⁹.

2.4.2 Mechanismus účinku lipas a kinetika enzymové reakce

Lipolytická reakce probíhá pouze na rozhraní fází lipid – voda, z čehož je zřetelné, že koncentrace substrátu na rozhraní fází (vyjádřena v mol/m²) přímo ovlivňuje rychlost reakce. Z tohoto důvodu je molární koncentrace a stav (kapalný, tuhý) substrátu důležitý, pokud ovlivňuje fázovou rovnováhu. Proto mohou v jedné fázi existovat molekuly substrátu v rozdílném stavu bez přímého vlivu na reakční rychlost (Jaeger a kol. 1994)¹¹⁹.

Aktivita esterasy je funkcí koncentrace substrátu a řídí se kinetikou Michaelis-Mentenové, maximální reakční rychlost je dosažena při koncentraci substrátu, která je mnohonásobně menší než je bod nasycení, přičemž stav emulze substrát – voda neovlivňuje tuto rychlost. Na rozdíl od toho, lipasy nevykazují žádnou aktivitu, dokud je substrát (lipid) ve stavu jednotlivých molekul ve vodě. Když koncentrace substrátu převýší bod rozpustnosti, začíná se formovat emulze, a reakční rychlost výrazně narůstá. Z **obr. 9** je patrné, že aktivita lipas přímo závisí na přítomnosti rozhraní fází. Z toho vyplývá definice: „lipasy jsou karboxylesterasy působící pouze na emulze substrát – rozpouštědlo“ (Jaeger a kol. 1994)¹¹⁹.

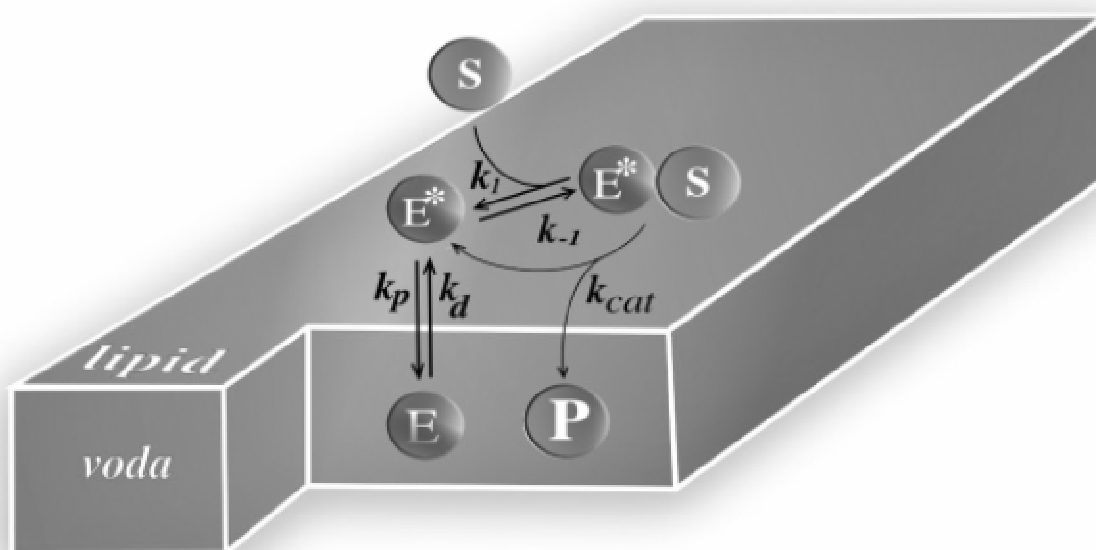


Obr. 9: Mezifázová aktivace lipasy a esterasy s různou substrátovou koncentrací přesahující saturační bod: A – klasický aktivitní profil pankreatické lipasy a B – aktivitní profil koňské jaterní esterasy (Jaeger a kol. 1994)¹¹⁹

Tato vlastnost lipas našla vysvětlení, když byla poprvé objevena prostorová struktura. Bylo zjištěno, že aktivní centrum enzymu je chráněno polypeptidovým řetězcem ve formě pokličky, znemožňující napojení samotné molekuly lipidu na enzym a následnou tvorbu aktivního komplexu. Naproti tomu, pokud lipasa přichází do přímého styku s lipidovou fází, začínají konformační změny, které posunou chránící polypeptidový řetězec a umožní přístup lipidů do aktivního centra enzymu. V důsledku hydrofóbní části pokličky dochází k hydrofóbní interakci s lipidovou fází, a tím se zvyšuje síla vazby enzym-substrát. Tato skutečnost vysvětluje fenomén aktivace lipas v přítomnosti fázového rozhraní působením pokličky polypeptidové povahy, čím lze rozlišit esterázy od lipas. Pokud enzym působící na

triacylglyceroly nevykazuje fenomén aktivace, má být považovaný za esterasu. Kinetika lipolytické reakce se neřídí rovnicí Michaelis-Mentenové, přestože tento model platí jen pro homogenní jednofázový systém, ve vodě rozpustný má být enzym i substrát. Proto se uvádí nový předpokládaný model (**obr. 10**), který se skládá ze dvou kroků (Jaeger a kol. 1994) ¹¹⁹:

- fyzikální adsorpce lipázy na povrch lipidové fáze, souběžně s aktivací enzymu a posunem ochranné polypeptidové pokličky
- vytvoření komplexu enzym-substrát, který je následně hydrolyzován na produkt a regenerovaný enzym, tento krok se může popsat jako povrchový model Michaelis-Mentenové, ve kterém se koncentrace substrátu vyjadřuje v molech na jednotky mezifázového povrchu, namísto v molech na jednotky celkového objemu

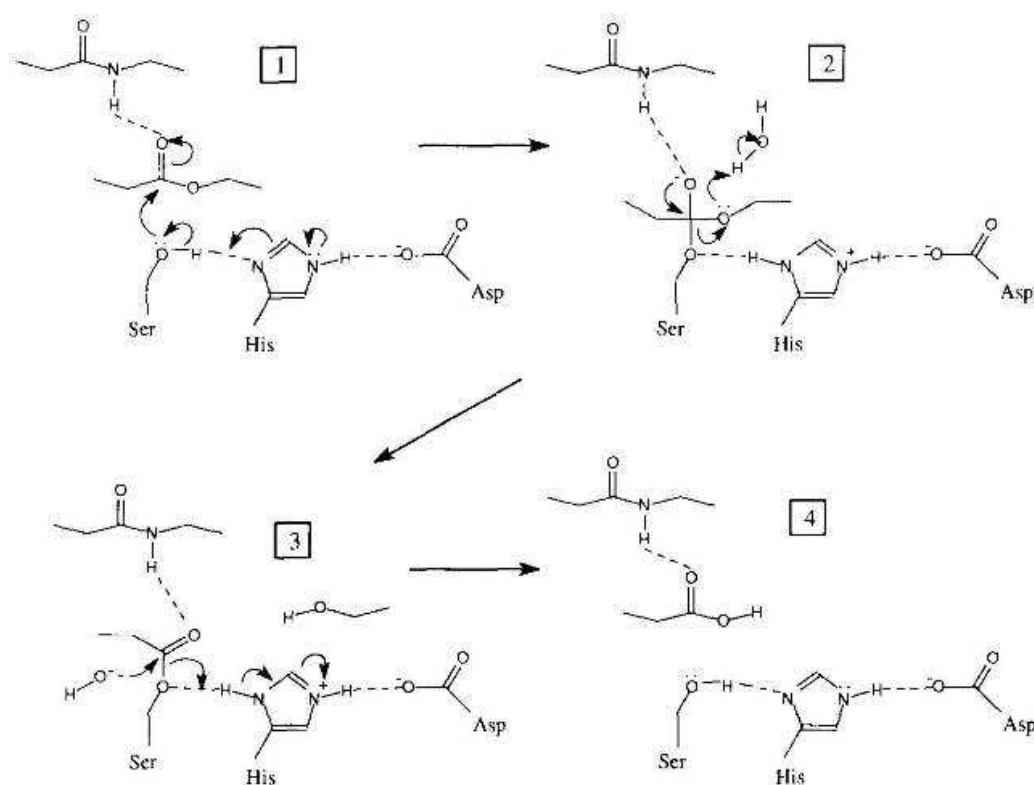


Obr. 10: Model pro popsání kinetiky enzymové reakce na povrchu rozhraní fází (Jaeger a kol. 1994) ¹¹⁹

2.4.3 Mechanismus hydrolýzy mikrobiálních lipas

Mechanismus esterové hydrolýzy je v podstatě stejný jak pro lipasu, tak i esterasu, je složen ze čtyř kroků **obr. 11** (Bornscheuer a kol. 2002) ¹²¹:

- substrát se váže na aktivovaný serin za tvorby tetraedrálního intermediátu. Intemediát je stabilizován katalýzou His a Asp zbytků
- následně dochází k uvolnění alkoholu a tvorbě komplexu acyl-enzym
- v dalším kroku nastává nukleofilní atak za stabilizace tetraedrálního intermediátu
- tento intermediát se mění na produkt (kyselina nebo ester) a volný enzym



Obr. 11: Mechanismus hydrolýzy esterové vazby (Bornscheuer a kol. 2002) ¹²¹

Porovnáním aminokyselinových sekvencí a 3D struktury lipas a esteras bylo navrženo, aby jejich rozlišení bylo provedeno na základě pH; aktivní místo lipasy disponuje negativním potenciálem v rozmezí pH spojeným s maximem lipasové aktivity (typicky při pH 8,0), zatímco aktivní místo esterasy vykazuje podobné chování, ale při hodnotách pH 6,0, které souvisí s obvyklým nižším aktivitním pH optimum (Tlou 2006) ¹²².

2.5 Mikrobiální degradace lipidů v odpadních vodách

Restaurace a zařízení rychlého občerstvení produkují odpadní vody s obsahem lipidů. Tyto odpadní vody jsou v technologii čištění odpadních vod neakceptovatelné. Z tohoto důvodu v posledních několika letech nastává výzkum mikroorganismů pro použití v bioreaktorech čističek odpadních vod. V současnosti existuje několik studií zabývajících se růstem mikroorganismů na lipidových substrátech z odlučovačů tuků používaných v restauracích a zařízeních rychlého stravování (Wakelin a kol. 1997)¹¹⁴.

Fast-foodový průmysl představuje jeden z nejrozsáhlejších problémů spojený s čištěním odpadních vod s obsahem tuků. Složení mastných kyselin tuků odcházejících do odpadních vod je zcela závislé na menu, typu používaných tuků a olejů daného fast-foodu. Navzdory existenci rozmanitých produktů, jako jsou odlučovače tuků a biologické doplňky, které jsou schopny pomoci při řešení těchto problémů, nejsou tyto doplňky považovány manažery restaurací za dostatečně výkonné. Tento problém pak vede výrobce biologických doplňků a odlučovačů tuků k většímu zamýšlení v oblasti vývoje nových mikrobiálních kultur pro použití v bioreaktorech určených pro čištění odpadních vod pocházejících z fast-foodových restaurací (Wakelin a kol. 1997, Chipasa a kol. 2006)^{114,123}.

Mikrobiální degradaci lipidů v odpadních vodách lze praktikovat jak za podmínek aerobních, tak i anaerobních. Za anaerobních podmínek je produktem rozkladu organické hmoty methan a oxid uhličitý. Tento proces probíhá v tzv. UASB (Upflow Anaerobic Sludge Bed) a EGSB (Expanded Granular Sludge Bed) reaktorech, zatímco za aerobních podmínek jsou výslednými produkty oxidace voda a oxid uhličitý (Singh 2006)¹²⁰. Přítomnost lipidů v aerobním systému čištění odpadních vod je považována za nežádoucí. Vysoký obsah lipidů má negativní vliv na přenos kyslíku k mikroorganismům a vede k redukci mikrobiální aktivity. Z tohoto důvodu se mikroorganismy používají buď v imobilizované formě, nebo ve formě aktivovaného kalu (Singh 2006)¹²⁰. Aerobní čištění odpadních vod působením mikroorganismů bylo dokumentováno v několika studiích (Nunn, 1986; Ratledge 1992)^{125,126}.

Z hlediska mikrobiální degradace lipidů v odpadních vodách jsou nejvíce studovanými mikrobiálními druhy bakterie rodu *Acinetobacter*, *Bacillus*, rod *Pseudomonas* a dále některé termofilní druhy *Thermus*. Tyto druhy byly testovány jak za laboratorních podmínek, tak v provozech čističek odpadních vod. Z dostupných výsledků je potvrzena schopnost těchto bakterií degradovat lipidy v odpadních vodách. Vyšší účinnosti je však dosahováno při použití směsných kultur těchto bakterií (Bhumibbamon a kol. 2002a, Bhumibbamon 2002b)^{124,127}.

CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo sledovat využitelnost potravinářských odpadních materiálů jako potenciálního zdroje uhlíku pro růst mikroorganismů a s tím související produkci hydrolytických enzymů. Z tohoto důvodu byla experimentální část rozdělena na dvě poloviny, přičemž v první části bylo pojednáno o produkci, izolaci a identifikaci polygalakturonas, zatímco druhá část byla věnována charakterizaci komerčního přípravku, optimalizaci podmínek pro produkci lipas a návrhu nového přípravku. V obou částech byly popsány odpadní zdroje, mikroorganismy a použité metody.

Při řešení experimentální části byla sledována využitelnost odpadu z vinařství, jako zdroje uhlíku pro růst kvasinkovitého mikroorganismu *Geotrichum candidum* a produkce pektolytických enzymů degradujících pektinovou složku rostlinné buněčné stěny, především polygalakturonas. Cílem bylo produkované polygalakturonasy izolovat, charakterizovat a proteomicky identifikovat.

V druhé části práce byl charakterizován komerční přípravek odbourávající lipidy přítomné jako organické znečištění v potravinářských odpadních vodách. Tento komerční přípravek byl použit pro degradaci lipidů v odlučovačích neboli lápacích tuků. Úkolem bylo otestovat komerční přípravek z hlediska jeho schopnosti degradovat lipidy. Cílem charakterizace byla i identifikace přítomné směsné mikrobiální kultury a navržení vhodných mikrobiálních druhů pro přípravu nového preparátu.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část byla rozdělena. V první části bylo pojednáno o metodách a postupech použitých při sledování produkce polygalakturonas. Zatímco druhá polovina byla zaměřena na charakterizaci komerčního přípravku, degradaci lipidů a návrhu nového přípravku.

3 Polygalakturonasy

Cílem této experimentální části bylo využití odpadního rostlinného materiálu z vinařství askomycetou *Geotrichum candidum* CCY 16-1-29 pro produkci pektolytických enzymů. Produkované enzymy byly purifikovány a identifikovány.

3.1 Odpadní materiál

Zdroj uhlíku pro růst mikroorganismů a produkci polygalakturonas představovaly hroznové výlisky (matolína) získané po vylisování bílých hroznů vinné révy pěstovaných v oblasti jižní Moravy.

3.2 Mikroorganismy

83 mikroorganismů, poskytnutých slovenskou Zbierkou kvasinek (Culture Collection of Yeasts, CCY) bylo testováno na produkci PGas. Jako vhodní kandidáti vykazující vysokou extracelulární polygalakturonasovou aktivitu byli vybráni zástupci z třídy kvasinkovitých *Geotrichum candidum* CCY 16-1-29 (teleomorfní forma *Galactomyces geotrichum*), *Aureobasidium pullulans* CCY 27-1-115 a plíseň *Aspergillus foetidus* EGEK635 z turecké sbírky plísní při univerzitě Ege, ústav Bioinženýrství, Izmir, Turecko (*Taskin a Stratilová 2008*)¹²⁸.

3.2.1 *Geotrichum candidum*

Geotrichum candidum lze taxonomicky zařadit mezi kvasinkovité mikroorganismy. Tento kvasinkovitý mikroorganismus disponuje enzymy hydrolyzujícími nativní celulosu a pektin (*Gente a kol. 2006*)¹²⁹ a je jedním z původců měknutí ovoce a zeleniny (*Hang a kol.*)¹³⁰. *Geotrichum candidum* je rozšířená ubikvitně, vyskytuje se v mléčných výrobcích, na kyselém zelí a okurkách, půdě, vodě a aktivovaných kalech z odpadních vod z výroby plastů, vláken, organických chemikálií atd. Žije v prostředí s omezeným množstvím dusíku i fosforu a při poměrně nízkém pH prostředí. Lehko oxiduje různé látky jako acetát, ethanol, izopropanol, glycerol. Na agarových půdách tvoří jemné kožovité porosty a podobné kožky vytváří i na kapalných půdách. Vyskytuje se ve vegetativní formě rozmnožování arthrokonidiemi (*Kocková-Kratochvílová 1999*)¹³¹.

3.3 Použitá kultivační média a typy kultivací

Poskytnuté druhy mikroorganismů byly nejprve zaočkovány na tekuté sladidinové médium a následně přeočkovány na pektinové médium za účelem sledování produkce extracelulárních PGas. Vybrané druhy s vysokou polygalakturonasovou aktivitou byly použity ke sledování produkce PGas na hroznových výliscích. Hroznové výlisky (navážka 70 g) sloužily jako zdroj uhlíku. Celkem byly testovány 4 typy kultivačních médií (**obr. 12**), lišící se v obsahu solí, přidavku kvasničného autolyzátu (KA) a ve zvlhčení nebo zalití hroznových výlisků 100 ml roztoku solí nebo vody. Testovala se kultivace stacionární a kultivace na třepačce probíhající po dobu 10 dní při teplotě 28 °C. Roztok solí obsahoval 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g MgSO_4 , 1 g K_2HPO_4 a 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ byl doplněn na 1000 ml vody s 3 ml nebo bez kvasničného autolyzátu a autoklávován. Odběry probíhaly v časových intervalech (3., 4., 5., 6., 7. a 10. den).



Obr. 12: Použité typy kultivačních médií za podmínek SSF kultivace

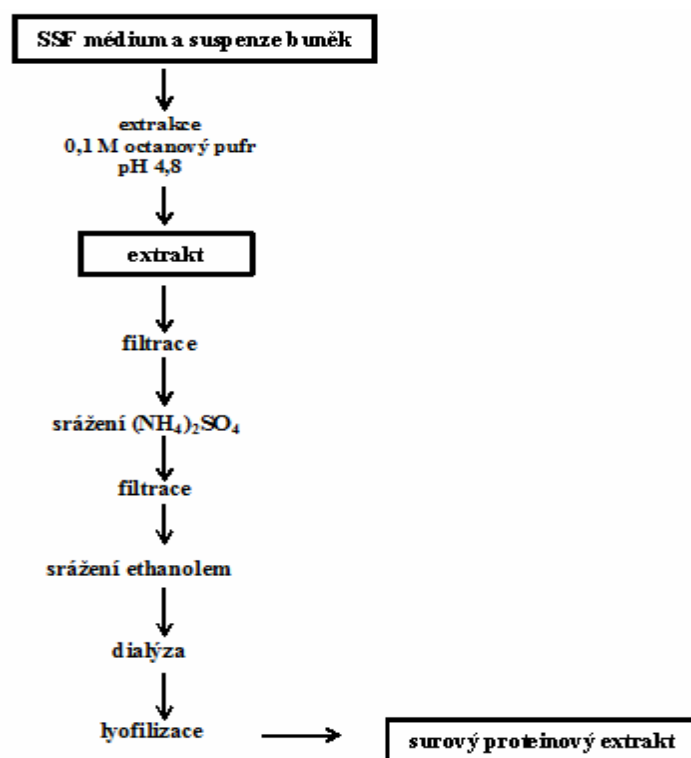
3.4 Metody

Pro extrakci a purifikaci extracelulárních polygalakturonas bylo použito několik typů metod vedoucích k jejich úspěšné izolaci o požadované čistotě a stabilitě těchto enzymů.

3.4.1 Extrakční metody

3.4.1.1 Extrakce proteinů z fermentačního média

Po uplynutí příslušné kultivační doby byly hroznové výlisky za podmínek SSF kultivace zality 50 ml 0,1 M octanového pufru pH 4,8 a po dobu 30 minut třepány na třepačce při 160 rev/min. Buňky a zbytek hroznových výlisků byly odstraněny filtrací. Surový proteinový extrakt byl získán srážením proteinu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (24 h, 4 °C), filtrací, rozpuštěním precipitátu v malém množství destilované vody, opětovným srážením v ethanolu v poměru 1:4, 24 h, 4 °C, dialýzou v destilované vodě a lyofilizací (**obr. 13**).



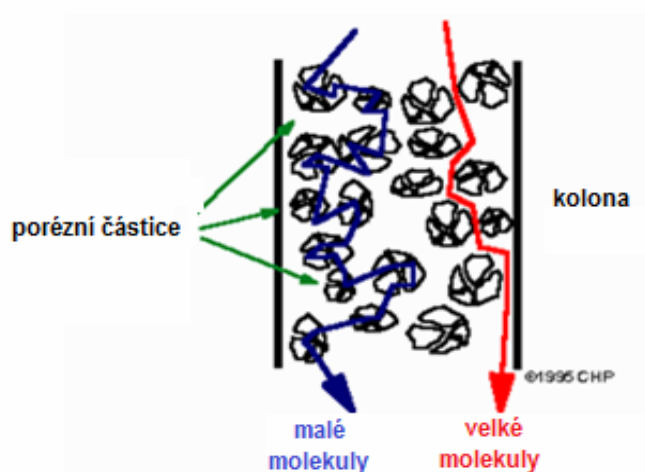
Obr. 13: Postup izolace surového proteinového extraktu

3.4.2 Separační metody

Izolovaný proteinový extrakt byl dále purifikován a separován na základě molekulové hmotnosti pomocí gelové permeační chromatografie (GPC), iontové výměnné chromatografie (FPLC).

3.4.2.1 Gelová permeační chromatografie na nosiči Sephadex G-25 Medium

Gelová permeační chromatografie na gelových nosičích představuje účinný systém separace molekul s různou molekulovou hmotností (*obr. 14*). Prostředím je hydrofilní dextranový (Sephadex), agarosový (Sephacrose) nebo akrylamidový (Biogel P) gel (*online návod Sephadex G 25*)¹³².



Obr. 14: Princip gelové permeační chromatografie (*online návod Sephadex G 25*)¹³²

Sephadex G-25 Medium

Separace proteinů probíhala na nosiči Sephadex G-25 Medium (Pharmacia) koloně (1,5 x 90 cm). Proteinový extrakt byl rozpuštěn v malém množství redestilované vody a nanesen na kolonu. Objem frakce byl 5 ml, průtoková rychlost 0,3 ml/min. Ve frakcích byla stanovena polygalakturonasová aktivita, obsah proteinů (spektrofotometricky při 280 nm) a obsah solí (měřením vodivosti). Frakce vykazující polygalakturonasovou aktivitu byly lyofilizovány.

3.4.2.2 Iontově výměnná chromatografie

Iontová výměna je nejpoužívanější chromatografickou technikou pro separaci nebo purifikaci proteinů a dalších nabitých biomolekul. Princip iontové výměnné chromatografie závisí na reverzibilní adsorpci nabitých molekul na imobilizované skupiny opačného náboje (*online návod CM-Sephadex C-50*)¹³³.

CM-Sephadex C-50

CM-Sephadex C-50 je připravený síťováním dextranu epichlorhydrinem. Hlavní funkční skupinu představuje karboxymethyl. C-50 je typ Sephadexu vhodný pro větší biomolekuly, proteiny s molekulovou hmotností v rozmezí 30 000 – 100 000 (*online Superdex 75*)¹³⁴. Separace proteinů probíhala v rozmezí hodnot pH 3,6 – 5,6, přičemž molární koncentrace použitého octanového pufru jsou uvedeny v *tabulce 2*.

Tab. 2: Molární koncentrace octanového pufru použité při separaci proteinů na CM Sephadex C-50; A – optimalizace separace, B-podmínky použité pro opakovanou separaci

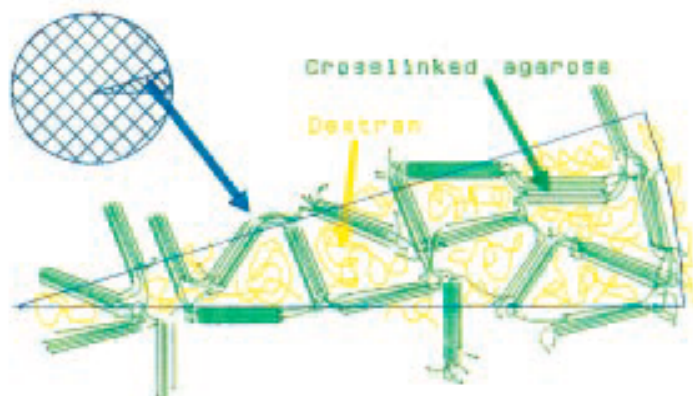
A	B
0,05 M pH 3,6	0,05 M pH 4,4
0,10 M pH 4,2	0,10 M pH 5,2
0,15 M pH 4,8	0,15 M pH 5,6
0,20 M pH 5,2	0,15 M pH 5,6 + 1 M NaCl
0,20 M pH 5,6	
0,20 M pH 5,6 + 1 M NaCl	

Objem frakce činil 5 ml/20 min, eluční rychlost 0,25 ml/min. Ve frakcích byla stanovena opět polygalakturonasová aktivita a obsah proteinů spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm. Vybrané frakce byly lyofilizovány.

3.4.2.3 Vysokoúčinná proteinová kapalinová chromatografie

FPLC (Fast protein liquid chromatography) je zařízení pro rychlou a efektivní purifikaci proteinů. Mobilní fází je kapalina, stacionární fází gelová náplň, kde míra rychlosti elučního roztoku je kontrolována pumpou. Existuje několik typů náplní kolon v závislosti na typu preferované separace.

V této práci byla použita kolona typu GPC **Superdex 75** (1,0 x 30 cm) separující v rozmezí 3 000 – 70 000 Da. Matricí byl kovalentně spojený dextran s vysocesesíťovanými agarosovými částicemi (*obr. 15*).



Obr. 15: Superdex 75: průměr částic 13 - 15 μ m, složení matrice dextran/zesíťovaná agarózy (online návod Superdex 75) ¹³⁴

Samotný separační proces metodou FPLC probíhal za podmínek:

- 1 h kalibrace kolony v elučním pufru s průtokovou rychlostí 0,5 ml/min
- rozpuštění nasyceného roztoku vzorku a aplikace na kolonu, eluce 0,05 M fosfátovým pufrém, pH 7,0 obsahující 0,15 M NaCl
- vyhodnocení frakcí na obsah proteinů a enzymové aktivity na základě pH optima a preferenci vůči polymeru a oligomerům kyseliny galakturonové (0,5 % PGA a 1 mM (GA)₅ o pH 4,6)

Výsledkem tohoto měření bylo stanovení molekulové hmotnosti proteinů na základě charakterizovaných standardů. Pro kalibrační křivku byl použit MW-GF-1000 Molecular Weight Marker kit (Sigma), (**tab. 3**).

Tab 3: Molecular Weight Marker kit pro standardizaci Superdex 75 kolony

standard	molekulová hmotnost (Da)
cytochrom C	12 400
uhličitá anhydrasa	29 000
albumin bovine	66 000
alkoholická dehydrogenasa	150 000
β -amylasa	200 000
apoferritin	443 000
thyroglobulin	669 000

3.4.3 Analytické metody

3.4.3.1 Isoelektrická fokusace na polyakrylamidovém gelu

Elektromigrační technika používaná pro separaci proteinů podle jejich izoelektrických bodů. Předpokladem je vytvoření gradientu pH. Jednotlivé molekuly amfiontů se pohybují podle svého okamžitého náboje až do místa, kde pH okolí odpovídá jejich isoelektrickému bodu (Radola 1980) ¹³⁵.

Pro isoelektrickou fokusaci byly použity dva typy gelů: separační polyakrylamidový gel a detekční agarózový gel.

Separační polyakrylamidový gel (13,5 x 17 x 0,1 cm)

3,6 ml 30 % akrylamid AA
3,0 ml Bis-akrylamid Bis-AA (2 %)
1,0 ml glycerol
1,5 ml amfolyty pH 3-10 (SERVA)
7,0 ml destilovaná voda

odsát bublinek
5,0 µl TEMED
0,8 ml persíran amonný (APS)

Detekční agarózový gel

150 mg dekagalakturonové kyseliny (DP 10)/5 ml destilované vody
100 mg agarózy (Top-Bio)/7,5 ml destilované vody (příprava rozvařením)
2,5 ml 0,5 M octanového pufru pH 5,0

Uvedené roztoky byly smíchány a vlity při teplotě 75 °C do předem připravené matrice, následovalo ztuhnutí gelu při laboratorní teplotě a uchování při 4 °C. Samotná izoelektrická fokusace probíhala následným způsobem sestávajícím z nanesení nasycených roztoků vzorků, prefokusace a fokusace.

Podmínky isoelektrické fokusace:

Prefokusace	začátek	120 V
	30 min	220 V
Fokusace	30 min	220 V
	30 min	400 V
	30 min	600 V
	45 min	800 V
	45 min	1 000 V

Detekce polygalakturonas na agarózovém gelu

Detekce probíhala přiložením detekčního agarózového gelu na polyakrylamidový gel s inkubační dobou do druhého dne, tzv. zymogram metodou (Balali a kol. 2009)¹³⁶.

Detekční gel byl po uplynutí inkubační doby obarven po dobu 60 min Rutheniovou červenou. Zóny byly vyhodnoceny na základě standardu IEF Marker 3 – 10 Liquid mix (Serva).

3.4.3.2 Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS

Elektroforetická metoda v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) pro charakterizaci bílkovin. Separace bílkovin probíhá na základě rozdílné molekulové hmotnosti, kdy se SDS váže na bílkovinný řetězec molekuly v poměru 1,4 g SDS/g proteinu.

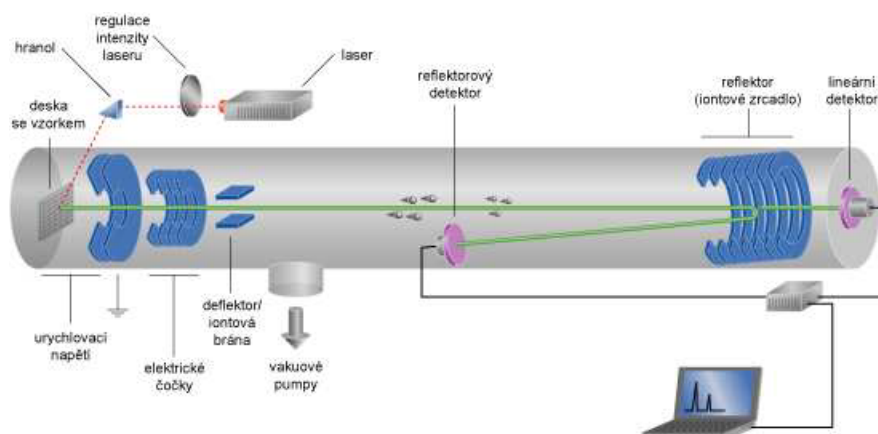
Pro SDS-PAGE byl použit **10 % separační polyakrylamidový gel** o následujícím složení:

destilovaná voda	2,05 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8 s 0,4 % SDS	1,25 ml
AA/Bis-AA (30 % / 0,8 % (w/v))	1,65 ml
10 % APS	0,025 ml
TEMED	0,0025 ml

Pro stanovení molekulové hmotnosti proteinů byl použit Unstained Protein Molecular Weight Marker kit (Serva) o velikosti 14,4 – 116 kDa a Broad Range standard 6,5 – 200 kDa. Proteiny byly detekovány jednak barvením na Coomassie blue a také barvením na stříbro (Fermentas).

3.4.3.3 MALDI – TOF/TOF hmotnostní spektrometrie

MALDI – TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionnization/Time of Flight), metoda analýzy proteinů založená na poměru hmotnosti a náboje m/z . Předpokladem je převedení molekul vzorku do plynné fáze za vzniku charakteristického náboje (ionu). Schéma hmotnostního spektrometru je zobrazena na **obr. 16** (online <http://bimikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/basics.php>)¹³⁷.



Obr. 16: Schéma hmotnostního spektrometru MALDI – TOF/TOF (online <http://bimikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/basics.php>)¹³⁷

Po SDS-PAGE byly vizualizované proteinové zóny po barvení na Coomassie blue vyřezány z gelu a přeneseny do mikrocentrifugačních zkumavek a podrobeny následujícím procedurám spolu s analýzou MALDI-TOF/TOF:

Promytí gelů

Vyřezané části gelu byly promyty destilovanou vodou a dvakrát směsí voda/acetonitril (1:1) po dobu 15 min. Po odstranění směsi byl přidán acetonitril (ACN pro dehydrataci a odbarvení gelu). Acetonitril byl odstraněn a kousky gelu byly rehydratovány přidáním 0,1 M NH_4HCO_3 . Po 5 min byl přidán stejný objem acetonitrilu, po 15 min inkubace byl roztok odstraněn a gel vysušen ve vakuové centrifuze (Eppendorf).

Redukce a alkylace

Vyřezné části gelu byly promyty roztokem s 10 mM dithiothreitem v 0,1 M NH_4HCO_3 a inkubovány 45 min při 56 °C. Po uplynutí inkubační doby byl roztok přepipetován do zkumavky s předem připraveným 55 mM iodoacetamidem v 0,1 M NH_4HCO_3 . Směs byla inkubována ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 30 min. Iodoacetamidový roztok byl odstraněn a gel byl promyt 0,1 M NH_4HCO_3 po dobu 5 min a potom acetonitrilem po dobu 15 min. Promývací cyklus byl opakován dokud Coomassie blue nebylo vymyto.

Štěpení trypsinem

Po odstranění Coomassie blue byly vyřezané části gelu vysušeny a rehydratovány štěpícím pufrům obsahujícím 50 mM NH_4HCO_3 , 5 mM CaCl_2 a 12,5 ng/μl trypsinu (Promega). Po 45 min inkubace byl supernatant odstraněn a přemístěn do zkumavky s 20 μl stejného pufru (bez enzymu). Enzymová reakce probíhala při 37 °C do druhého dne.

Extrakce peptidů

Peptidy byly extrahovány přidáním 25 mM NH_4HCO_3 a inkubovány po dobu 15 min. Poté byl přidán stejný objem ACN a inkubovány opět 15 min. Extrakce byla opakována 2x s 5 % kyselinou mravenčí a ACN (1:1); extrakt byl zakoncentrován ve vakuové centrifuze (Eppendorf).

Purifikace a zakoncentrování peptidů

Pro odsolení a zakoncentrování peptidových extraktů byla použita chromatografická kolonka "ZipTip pipette tips" s C18 reverzní fází (Millipore, USA). Vysušené a zakoncentrované vzorky byly rozpuštěny v 20 μl 0,5 % kyseliny trifluoroctové (TFA) a purifikovány podle ZipTip protokolu.

ZipTip C18 purifikační protokol

Zvlhčení:	2 x 10 μl 100 % ACN
Ekvilibrace:	2 x 10 μl ACN : 0,1 % TFA (5:95)
Navázání:	10 x 10 μl vzorku rozpuštěného v 0,5 % TFA
Promytí:	2 x 10 μl 0,1 % TFA
Eluce:	5 x 10 μl ACN : 0,1 % TFA (60:40)
Regenerace špičky:	2 x 10 μl ACN : 0,1 % TFA (60:40)

MALDI-TOF/TOF analýza

MALDI-TOF/TOF měření probíhalo v pozitivním reflektrotronovém módu představovaném Applied Biosystem 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA). TOF/TOF přístroj byl vybaven Nd:YAG laserem (355 nm), 3 – 7 pulsů a 200 Hz. Obě spektra MS i MS/MS vyžadovaly dvoustupňové reflektrotronové zrcadlo. Použité byly volty 20 kV a 8 kV. Data byly vyhodnoceny v Explorer 4.5 softwaru (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) s využitím databáze Mascot (www.matrixscience.com). Vyhledávání probíhalo podle parametrů: database – NCBIInr a SwissProt; taxonomy – Fungi; enzyme – trypsin; allowed missed cleavage – 1; fixed modification – carbamidomethyl (C); variable modifications – none; peptide tolerance – $\pm 1,2$ Da; MS/MS tolerance – $\pm 0,6$ Da; peptide charge – (+1); monoisotopic masses; instrument – MALDI-TOF/TOF.

Vyhodnocení spekter

Spektra byla vyhodnocena s využitím databáze Uniprot (aplikace BLAST, ALIGN a CLUSTALW2 porovnávacího programu).

3.4.3.4 Bioanalyzátor

Tato metoda byla využita s nově vyvinutou technologií **lab-on-chip** pro analýzu proteinů a nukleových kyselin (DNA, RNA). V případě analýzy proteinů metodou SDS-PAGE jde o miniaturizaci její analytické instrumentace, která v sobě spojuje určení molekulové hmotnosti, kvality i kvantity. Přibližná doba analýzy se pohybuje kolem 30 – 40 min a ve výsledku jsou poskytnuta vysoce kvalitní data v digitální podobě (*online návod Bioanalyzer 2010: www.agilent.com/chem/labonachip*)¹³⁸.

Pro analýzu proteinů byl použit Agilent Protein 230 Kit, který je vhodný pro analýzu proteinů od velikosti 14 – 230 kDa. Vzorky pro analýzu byly připraveny dle návodu Agilent Protein 230 Assay Protocol (*online návod Bioanalyzer 2010: www.agilent.com/chem/labonachip*)¹³⁸. Výstupem byla SDS-PAGE v digitální podobě s využitím elektroforegramů.

3.4.4 Biochemické metody

3.4.4.1 Stanovení obsahu proteinů

Obsah proteinů v jednotlivých vzorcích byl vyhodnocen spektrofotometricky měřením absorpance při vlnové délce 280 nm v UV oblasti (Jennway 6305 Spectrophotometer), další metodou použitou pro stanovení proteinů byla metoda dle Lowryho. Obsah proteinů byl vyhodnocen na základě kalibrační křivky albuminu (1 mg/ml).

3.4.4.2 Stanovení enzymových aktivit

Enzymová aktivita vyšetřovaných proteinů byla stanovena na polymer kyseliny galakturonové (PGA) a na oligosubstráty kyseliny galakturonové; dimer (GA)₂, trimer (GA)₃, tetramer (GA)₄ a pentamer (GA)₅.

Stanovení aktivity probíhalo v časovém intervalu měřením přírůstků redukujících skupin při 30 °C pomocí Somogyi činidel. Reakční směs obsahovala jednotlivé substráty (0,5 % PGA; 1 mM oligosubstráty v 0,1 M octanovém pufru při pH optimu zjištěném v rozmezí pH 3,6 – 5,6) a enzymový roztok v poměru 1:1. Aktivita byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 530 nm. Celková aktivita byla vyjádřena v μmol redukujících skupin za minutu vztažené na mg extracelulárního proteinu pomocí kalibrační křivky kyseliny D-galakturonové.

3.4.4.3 Stanovení způsobu účinku

Stanovení způsobu účinku bylo provedeno viskozimetricky měřením degradace 0,5 % roztoku pektanu sodného v 0,1 M octanovém pufru, pH 4,8 pomocí Ubbelohdeho viskozimetru při 30 °C (roztok obsahoval 18 ml substrátu + 2 ml enzymu). Tento parametr byl vztažen na pokles viskozity v časových intervalech.

3.4.4.4 Stanovení hodnoty Michaelisovy konstanty K_m

Michaelisova konstanta K_m je základní charakteristikou dvojice enzym – substrát. Její hodnota závisí na typu substrátu a podmínkách jako je teplota, pH a iontová síla roztoku. Michaelisova konstanta purifikovaných enzymů byla stanovena měřením počátečních rychlostí enzymu na oligosubstráty (0,1 - 0,5 M) a polymer kyseliny galakturonové (0,5 %). Enzymová reakce probíhala při 30 °C v prostředí octanového pufru o hodnotě pH dané pH optimem. Ředění substrátů 4:1, 3:2, 2:3, 1:4. Hodnota Michaelisovy konstanty byla vyjádřena metodou podle Lineweaver-Burk ($1/S = f(1/v)$).

3.4.4.5 Stanovení tepelné stability

Tepelná stabilita neboli míra tepelné inaktivace enzymu byla vyhodnocena na základě dvouhodinové inkubace enzymu při teplotách v rozmezí 25 – 60 °C a následným stanovením enzymové aktivity při 30 °C.

3.4.4.6 Stanovení teplotního optima

Teplotní optimum purifikovaného enzymu bylo stanoveno měřením přírůstků redukujících skupin spektrofotometricky při 530 nm v rozmezí teplot 25 – 70 °C. Substrát byl 0,5 % roztok pektanu sodného.

4 Produkce lipas

Cílem této části bylo charakterizovat komerční přípravek určený pro rozklad tuků a olejů v odlučovačích tuků pomocí analytických a molekulárně biologických metod. Následně pak navrhnout vhodný mikrobiální kmen a optimalizovat podmínky aplikace nového přípravku do odlučovačů tuků.

4.1 Materiál

Komerční přípravek – SanyDuo Spezial

Komerční preparát SanyDuo Spezial (Sanytura GmbH), který je dle dostupných informací směsí bakterií, enzymů (lipas, amylas, proteas aj.) a povrchově aktivních látek (*online Odlučovače tuků a ropných látek*)¹¹⁶. Jednalo se o přípravek určený k degradaci lipidů do odlučovače tuků.

Bakteriální kmeny použité při identifikaci a optimalizaci

V experimentech byly použity bakteriální kmeny získané z České sbírky mikroorganismů, Brno, ČR (Czech Collection of Microorganisms, CCM):

Bacillus cereus CCM 2010^T

Bacillus subtilis CCM 1999

Bacillus licheniformis CCM 2145^T

Bacillus circulans CCM 1611

Bacillus megaterium CCM 2037

Bacillus mycoides CCM 915

Bacillus thuringiensis CCM 19^T

Bacillus subtilis CCM 1999

Geobacillus therocatenulatus CCM 2809^T

Geobacillus thermodenitrificans CCM 2566^T

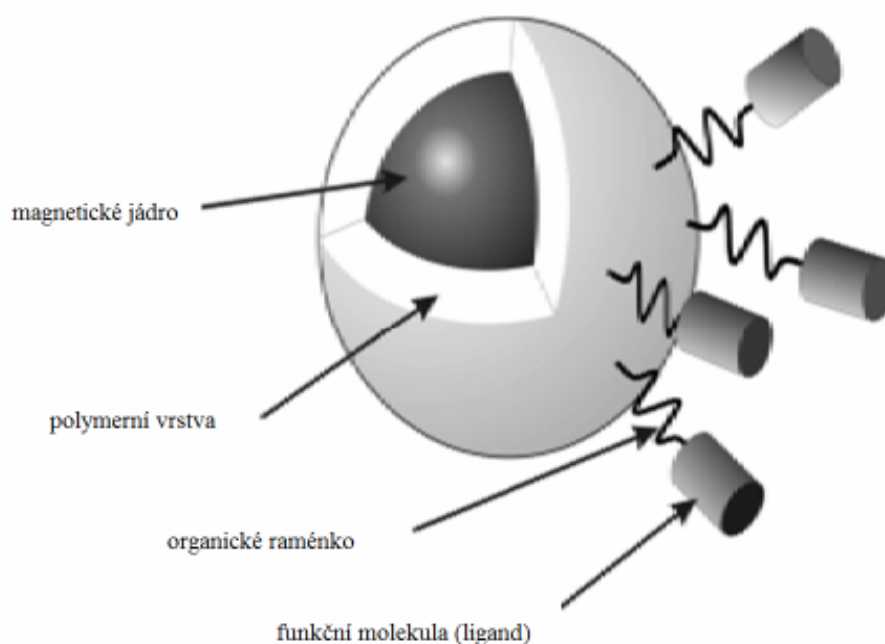
Směsná termofilní kultura bakterií rodu *Thermus* a *Bacillus* z čističky odpadních vod

Média pro submerzní a povrchovou kultivaci

- 1,12 g K₂HPO₄
0,48 g KH₂PO₄
5,00 g NaCl
0,10 g MgSO₄·7H₂O
2,00 g (NH₄)₂SO₄
0,10 mg ethylentetradiamin kyseliny octové (EDTA)
2 % lipidový substrát jako uhlíkatý zdroj (olivový, palmový, slunečnicový, řepkový olej)
- Brain Heart Infusion Broth (HiMedia Čaderský Envitek, Brno)
- Spirit Blue Agar + lipidový substrát (HiMedia Čaderský Envitek, Brno)
- Nutrient Broth No. 2 (HiMedia Čaderský Envitek, Brno)

Magnetické nosiče použité při izolaci DNA

Magnetické polymerní nosiče poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) P(HEMA-co-GMA) byly použity při izolaci bakteriální DNA. Tyto magnetické nosiče byly vytvořeny kombinací organické polymerní matrice a anorganického jádra zajišťujícího magnetické vlastnosti (**obr. 17**). Nosiče byly připraveny Ing. D. Horákem, CSc. na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze kopolymerizací 2-hydroxyethyl a glycidyl methakrylátu ve směsi toluen/2-methylpropan-1-ol a v přítomnosti magnetických nanočástic získaných koprecipitací Fe (II) a Fe(III) solí s NH_4OH (Rittich a kol. 2009) ¹³⁹.



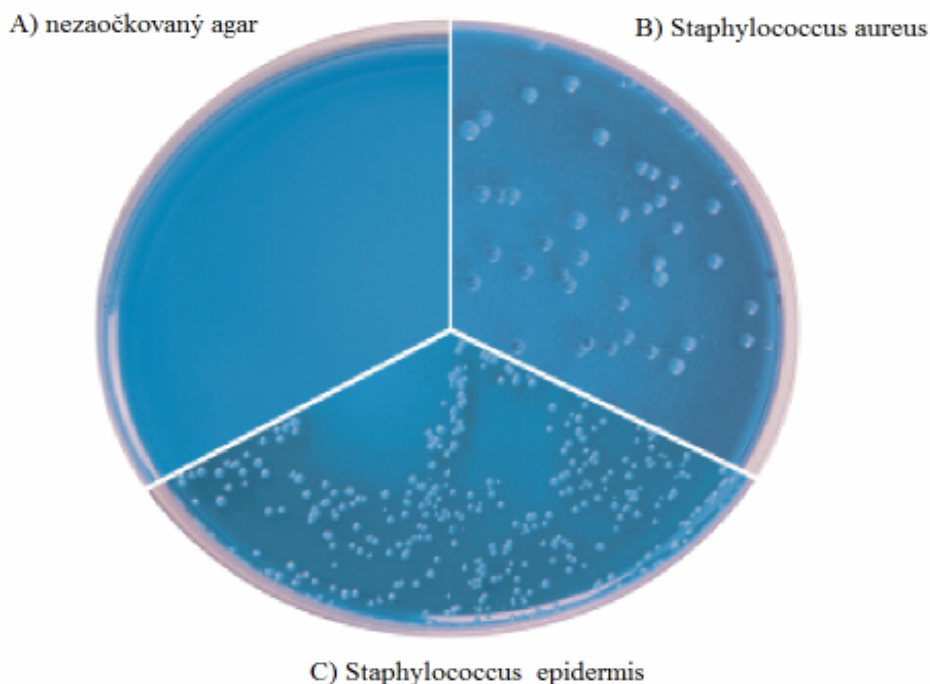
Obr. 17: Příklad magnetické částice použitelné pro izolaci DNA (Ritticha kol. 2009) ¹³⁹

4.2 Metody

4.2.1 Biochemické metody

4.2.1.1 Důkaz mikroflóry s lipolytickou aktivitou

Pro důkaz lipolytické aktivity mikroorganismů přítomných v komerčním přípravku byl použit Spirit Blue Agar. Spirit Blue Agar představuje lipidové emulzní médium pro rychlé stanovení lipolytické aktivity vyšetřovaných mikroorganismů. Indikátorem lipolýzy je barvivo Spirit blue. Lipolytické mikroorganismy metabolizují lipidy v médiu a kolem kolonií se vytváří světlé prstence indikující lipolýzu **obr. 18**, (online návod pro přípravu Spirit Blue agar) ¹⁴⁰.



Obr. 18: Spirit Blue Agar s koloniemi indikujícími lipolýzu: A) nezaočkovaný agar; B) kolonie bakterie *Staphylococcus aureus* indikující lipolýzu; C) kolonie bakterie *Staphylococcus epidermis* indikující lipolýzu (online návod pro přípravu Spirit Blue agar) ¹⁴⁰

Komerční přípravek (ředění 1:100) byl zaočkován na Spirit Blue, jako lipidový substrát byl použit tributyrin (glyceroltributyrát). Inkubace trvala 72 h při 30 °C. Po třech dnech byl vyhodnocen důkaz lipolytické aktivity.

4.2.1.2 Stanovení lipolytické aktivity

Lipolytická aktivita byla stanovena spektrofotometricky při 420 nm během 10 denní submerzní kultivace. Reakční směs obsahovala 500 µl kultury, 650 µl 0,05 M fosfátového pufru pH 7,2 a 100 µl 2,5 mM p-nitrophenyllaurátu (p-NPL) v ethanolu jako substrátu. Hydrolytická reakce proběhla při 37 °C po dobu 30 min. Po uplynutí inkubační doby, bylo přidáno 100 µl Na₂CO₃, směs byla promíchána a změřena absorbance při vlnové délce 420 nm. Standardizace byla provedena pomocí kalibrační křivky p-nitrophenolu, p-NP (µg/ml), kdy jedna jednotka lipasové aktivity byla definována jako množství p-nitrofenolu, které se uvolní z 1 µg p-nitrophenyllaurátu po 30 min za podmínek metody (Sigurgísladóttir a kol.) ¹⁴¹.

4.2.1.3 Stanovení teplotního optima extracelulární lipasy

Teplotní optimum lipasy produkované do kultivačního média bylo stanoveno v rozmezí teplot 20 – 65 °C spektrofotometricky při 420 nm. Substrátem byl 2,5 mM p-nitrophenyllaurát v ethanolu.

4.2.1.4 Stanovení pH optima extracelulární lipasy

pH optimum bylo stanoveno v rozmezí hodnot pH 3 – 10 spektrofotometricky při 420 nm, substrátem byl 2,5 mM p-nitrophenyllaurát při teplotě 37 °C.

4.2.1.5 Barvení dle Grama

Gramovo barvení umožilo rozlišit grampozitivní a gramnegativní bakterie v komerčním přípravku. Toto barvení se začalo používat jako jeden z diagnostických a taxonomických ukazatelů. Principem procedury je barvení usmrcené bakteriální kultury roztokem krystalové violeti a Lugolova roztoku a následné odbarvení působením organického rozpouštědla, např. ethanolu. Grampozitivní bakterie zůstanou fialově obarvené i po působení organického rozpouštědla, zatímco gramnegativní se odbarví. Aby byly i odbarvené gramnegativní bakterie lépe pozorovatelné pod mikroskopem, dobarví se kultura nějakým světlejším barvivem, nejčastěji safraninem na červenou (Šilhánková 2002)¹⁴².

4.2.2 Analytické metody

4.2.2.1 Stanovení degradace a utilizace mastných kyselin

Schopnost komerčního přípravku degradovat různé lipidové substráty (olivový, palmový, řepkový a slunečnicový olej, vepřové sádlo, hovězí lůj) byla stanovena během 10 denní submerzní kultivace. Jako modelová odpadní voda sloužilo tekuté médium s obsahem minerálních solí doplněné 2 % lipidovým substrátem.

Samotný proces stanovení probíhal následujícím způsobem: z každé Erlenmayerovy baňky bylo asepticky odebráno 20 ml kultivačního média a přeneseno do dělicí nálevky s 20 ml hexanu. Směs byla třepána 2 min a po rozdělení vrstev, byla horní vrstva oddělena do předem zvážené nádoby. Spodní vrstva byla reextrahována dalšími 20 ml hexanu a opakován byl stejný postup. Extrakt byl odpařen a odparek zvážen a rozpuštěn v 50 ml neutrálního alkoholu v přítomnosti indikátoru fenolftaleinu. Roztok byl titrován 0,1 M KOH do stáleho slabě růžového zbarvení. Stejný postup byl aplikován na všechny použité substráty v průběhu celé kultivace (El-Bestawy a kol. 2005)¹⁴³.

Lipidovou degradaci indikovaly volné mastné kyseliny (% FFA) vyjádřené z rovnice (El-Bestawy a kol. 2005)¹⁴²:

$$\% FFA = \frac{V_{KOH} \cdot c_{KOH} \cdot M \cdot 100}{1000 \cdot m} \quad (1)$$

Kde, V_{KOH} je spotřebovaný objem 0,1 M KOH v konečném (inflexním) bodě titrace, c_{KOH} je přesná koncentrace KOH vzatá ze standardizace KOH na kyselinu šťavelovou, M molekulová hmotnost dané mastné kyseliny a m hmotnost extraktu vzniklá z rozdílu před a po odpaření (El-Bestawy a kol. 2005)¹⁴².

4.2.2.2 Stanovení chemické spotřeby kyslíku

Stanovení chemické spotřeby kyslíku (CHSK) se používá k posouzení organického znečištění vod. Je definována jako množství kyslíku odpovídajícího spotřebě oxidačního činidla při úplné oxidaci organických látek ve vodě. Chemická spotřeba kyslíku byla stanovena standardní dichromanovou metodou popsanou v *Methods for the Examination of Waters and Associated Materials 1976-2011* ¹⁴⁴.

4.2.3 Molekulárně biologické metody

Charakteristika komerčního přípravku SanyDuo (Sanytura GmbH) pomocí molekulárně biologických metod spočívala v identifikaci bakterií přítomných v tomto přípravku. Předpokladem byla přítomnost bakterií rodu *Bacillus*.

Kultivace bakterií z přípravku SanyDuo Spezial

Bakteriální buňky izolované z komerčního přípravku SanyDuo Spezial byly kultivovány za aerobních podmínek při teplotě 30 °C na Brain Heart Infusion Broth mediu po dobu 72 hodin. Po kultivaci a přečištění bakteriálních kolonií pomocí křížového roztěru bylo možno přistoupit k samotné izolaci DNA (*Rittich a kol. 2009, Sambrook 2001*) ^{145,146}.

Kultivace sbírkových kmenů bakterií rodu *Bacillus*

Sbírkové kmeny bakterií rodu *Bacillus* byly zaočkovány do živného média č. 2 (Nutrient Broth No. 2), kultivace probíhala po dobu 72 hodin při 30 °C. Po kultivaci bylo možno přistoupit k přípravě hrubých lyzátů buněk a izolaci bakteriální DNA (*Rittich a kol. 2009, Sambrook 2001*) ^{145, 146}.

Izolace bakteriální DNA byla provedena pomocí metody fenol-chloroformové extrakce a srážení DNA ethanolem (*Rittich a kol. 2009, Sambrook 2001*) ^{145, 146} a dále pomocí magnetických částic poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate), P (HEMA-co-GMA), (*Kubisz 2010*) ¹⁴⁷.

4.2.3.1 Příprava hrubého lyzátu buněk rodu *Bacillus*

Hrubé lyzáty buněk byly připraveny po centrifugaci bakteriálních buněk (15000 ot. po dobu 3 min. Vzniklý sediment byl resuspendován v roztoku A (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0) a centrifugován. Supernatant byl odstraněn a sediment byl resuspendován v 500 µl lyzačního roztoku B (lysozym 3 mg/ml, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA; pH 8,0). Vzorky byly ponechány při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny, poté bylo přidáno 25 µl 10 % SDS a 5 µl proteinasy K (10 µg/ml) a vzorky byly inkubovány při teplotě 55 °C do druhého dne (*Rittich a kol. 2009, Sambrook 2001*) ^{145, 146}.

4.2.3.2 Příprava hrubého lyzátu buněk přípravku SanyDuo Spezial

Hrubý lyzát buněk izolovaných z komerčního přípravku SanyDuo Spezial byl připraven z bakteriálních buněk narostlých na živném médiu Brain Heart Infusion Broth (Čaderský Envitek) s přidavkem agarů (15 g/l). Postupným přečištěním byly izolovány 3 odlišné typy bakteriálních kolonií. Jednotlivé bakteriální kolonie byly resuspendovány v roztoku A (10 mM Tris-HCl, pH 7.8; 5 mM EDTA, pH 8.0) a směs byla centrifugována. Supernatant byl slit a sediment byl resuspendován v 500 µl lyzačního roztoku B (lysozym 3 mg/ml, 10 mM Tris-HCl, pH 7.8; 5 mM EDTA, pH 8.0). Vzorčky byly ponechány při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny, poté bylo přidáno 25 µl 10 % SDS a 5 µl proteinasy K (10 µg/ml) a vzorky byly inkubovány při teplotě 55 °C do druhého dne (Rittich a kol. 2009, Sambrook 2001) ^{145,146}.

4.2.3.3 Izolace DNA metodou fenol-chloroformové extrakce

K získanému lyzátu buněk byl přidán stejný objem fenolu a směs byla opatrně promíchávána po dobu 4 min. Následovala centrifugace při 15 000 ot. po dobu 3 min, poté byla odebrána vodná fáze s DNA do čisté mikrozkušavky. K vodné fázi s DNA bylo přidáno 700 µl CIZ (chloroform : izoamylalkohol) směsi (opět promícháno po dobu 4 min s následnou centrifugací), vodná fáze byla opět odebrána do čisté mikrozkušavky (Rittich a kol. 2009, Sambrook 2001) ^{145,146}.

Ke vzorku DNA byla přidána 1/10 objemu 3 M octanu sodného, poté byl přidán 1 ml 96 % ethanolu a obsah byl promíchán. DNA se nechala vysrážet při – 20 °C po dobu 15 min, následovala centrifugace při 15 000 ot. po dobu 15 min. Supernatant byl slit a dále se pracovalo pouze se sedimentem. Sediment DNA byl sušen v termostatu a DNA byla následně rozpuštěna v 100 µl TE pufru (10 mM Tris/HCl pH 8,0 a 1 mM EDTA) do druhého dne (Rittich a kol. 2009, Sambrook 2001) ^{145,146}.

4.2.3.4 Izolace DNA pomocí magnetických částic P (HEMA-co-GMA)

Separační směs s magnetickými nosiči pro izolaci bakteriální DNA byla připravena v eppendorfových zkumavkách (1,5 – 2,0 ml) v různých objemech dle **tabulky 4**. Výsledná optimální koncentrace polyethylenglykolu jednotlivých složek reakční směsi je uvedena modře.

Tab. 4: Optimální koncentrace a složení jednotlivých složek separační směsi

	Komponenta/µl	Výsledná koncentrace PEG 6000					
		8%			16%		
1.	H ₂ O	50	100	200	0	0	0
2.	NaCl (5M)	100	200	400	160	200	400
3.	PEG (40%)	50	100	200	190	200	400
4.	mag. částice (2mg/ml)	25	50	100	25	50	100
5.	vzorek (DNA nebo hrubý lyzát)	25	50	100	25	50	100
výsledný objem (µl)		250	500	1000	250	500	1000

Směs připravená dle **tabulky 4** byla promíchána a inkubována 15 min při laboratorní teplotě. Magnetické částice s navázanou DNA byly odseparovány pomocí magnetického separátoru (15 min při laboratorní teplotě). Supernatant byl slit a částice s navázanou DNA byly promyty 70% EtOH v závislosti na objemu vzorku (250–1000 µl). Částice byly opětovně odseparovány magnetickým separátorem (2 min při laboratorní teplotě) a krátce usušeny v termostatu (do vypaření ethanolu) při teplotě 55 °C (Kubisz 2010) ¹⁴⁷.

DNA byla eluována do 50 µl TE pufru (10 mM Tris/HCl pH 8,0 a 1 mM EDTA) 1 h při laboratorní teplotě, následně byly magnetické částice odseparovány 2 min při laboratorní teplotě a eluovaná DNA přepipetována do čisté zkumavky. Takto připravená DNA byla použita na spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace, gelovou elektroforézu a do PCR (Kubisz 2010) ¹⁴⁷.

4.2.3.5 Polymerázová řetězová reakce

Pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) byly použity dva typy primerů; dva univerzální bakteriální primery DG74 (5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3') a RW01 (5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3'), (Greisen a kol. 2004) ¹⁴⁸ (Generi-Biotech) pro doménu *Bacteria* a dva rodově specifické primery pro *Bacillus* sp. BK1/F (5'-TCACCAAGGCAACGATGCG-3') a BK1/R (5'-CGTATTACCGCGGCATG-3'), (Xi-Yang a kol. 2006) ¹⁴⁹ (Generi-Biotech). Podmínky a parametry PCR reakce jsou uvedeny v následujícím přehledu.

PRC směs pro primery pro doménu *Bacteria* DG74 a RW01

13 µl	PCR voda
5,0 µl	PCR pufr
1,0 µl	10 mM dNTP
1,0 µl	10 pmol/µl primer DG74
1,0 µl	10 pmol/µl primer RW01
2,0 µl	Taq 1.1 Polymerasa (1U/µl)
2,0 µl	DNA matrice (10 ng/µl)
25 µl	celkový objem

PCR směs pro rodově specifické primery BK1/F a BK1/R

32,7 µl	PCR voda
5,0 µl	PCR pufr
1,0 µl	10 mM dNTP
0,5 µl	10 pmol/µl primer BK1/F
0,5 µl	10 pmol/µl primer BK1/R
0,3 µl	Taq 1.1 Polymerasa (1U/µl)
8,0 µl	1,6 mM MgCl ₂
2,0 µl	DNA matrice (10 ng/µl)
50 µl	celkový objem

Parametry PCR amplifikace

DG74 a RW01 (370 bp)	BK1/F a BK1/R (1095 bp)
95 °C/5 min	95 °C/5 min
95 °C/1 min	95 °C/1 min
57 °C/1 min	63 °C/1 min
72 °C/1 min	72 °C/1 min
72 °C/10 min	72 °C/10 min

Celkový počet PCR cyklů byl v obou případech 30.

Při PCR byla použita DNA izolovaná z kultur připravených z jednotlivých kolonií komerčního přípravku SanyDuo. DNA bakterií sbírkových kmenů rodu *Bacillus* byla použita jako pozitivní kontrola v PCR. Z této DNA byly amplifikovány PCR produkty, které byly dále štěpeny restrikťasami a sloužily při porovnání s restrikčními fragmenty bakterií komerčního přípravku v další části této práce.

4.2.3.6 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR) je varianta PCR umožňující přímé sledování PCR produktů v průběhu polymerázové reakce prostřednictvím detekce fluorescenčního signálu v termocykleru. Pro detekci produktu se užívají interkalační barviva vázící se na DNA, fluorescenčně značené sondy nebo fluorescenčně značené primery (Gilberte a kol. 2006)¹⁵⁰.

RT-PCR reakce byla provedena s rodově specifickými primery BK1/F a BK1/R. Měření proběhlo na termocykleru Corbett Rotor-Gene 6000 s vyhodnocovacím softwarem Rotor-Gene 6000 Software 1.7. Podmínky RT-PCR jsou uvedeny níže v přehledu.

RT-PCR směs pro rodově specifické primery

12,5 µl	SYTO-9 qPCR 2x Master Mix (Top-Bio s.r.o.)
1,0 µl	10 pmol/µl primer BK1/F
1,0 µl	10 pmol/µl primer BK1/R
9,5 µl	PCR voda
1,0 µl	DNA (10 ng/µl)

25,0 µl celkový objem

Parametry RT-PCR amplifikace

95 °C/5 min
95 °C/1 min
60 °C/1 min
72 °C/1 min
72 °C/10 min

Celkový počet PCR cyklů byl 30.

Uvedený SYTO-9 qPCR 2x Master Mix (Top-Bio s.r.o.) obsahoval fluorescenční barvivo 3. generace SYTO-9, interkalující mezi báze DNA bez negativních vlivů na amplifikaci. Výhodou byla také přítomnost hot-start polymerasy.

4.2.3.7 Amplifikovaná ribosomální DNA restrikční analýza

Metoda amplifikované ribosomální DNA restrikční analýzy (ARDRA) je založená na polymorfismu délky restrikčních fragmentů genů kódující malou (16S) podjednotku ribozomu bakterií. Platí zde jednoduché pravidlo: frekvence náhodného vzniku místa restrikčního štěpení (4 bp sekvence) se může vyskytovat 1 x každých 256 bp (Kubarachew a kol. 2003)¹⁵¹.

Předpokladem pro provedení restrikční analýzy byla amplifikace PCR produktů s použitím rodově specifických primerů BK1/F a BK1/R a přečištění vzniklého PCR produktu. Tento přečištěný PCR produkt byl následně štěpen za pomoci restrikčních endonukleas *AluI* (AG⁺CT) a *TaqI* (T⁺CGA), (Fermentas) s následnou detekcí na agarózovém gelu. Digitalizované fingerprinty byly použity pro porovnání experimentálních a teoretických ARDRA fragmentů (Xi-Yang a kol. 2006)¹⁴⁹. K přečištění PCR produktů byly použity magnetické částice P (HEMA-co-GMA) použité při purifikaci DNA.

Přečištění PCR produktů s využitím magnetických částic P (HEMA-co-GMA)

PCR produkty byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 4.3.2.5

Příprava směsi pro přečištění PCR produktů

50 µl	PCR voda
100 µl	5 M NaCl
50 µl	PEG 6000 (40 %)
25 µl	P (HEMA-co-GMA) Fkol 135B ox
25 µl	PCR produkt
200 µl	celkový objem

Připravená směs byla promíchána a inkubována 15 min při laboratorní teplotě. Částice s navázanými PCR produkty byly odseparovány pomocí magnetického separátoru po dobu 15 min při laboratorní teplotě. Supernatant byl slit a byl uvolněn magnet z magnetického pásu. Zkumavky obsahující nosiče s navázanými PCR produkty byly promyty 70% EtOH v závislosti na objemu vzorku. Částice P (HEMA-co-GMA) byly odseparovány magnetem 2 min při laboratorní teplotě a mikrozskumavky krátce usušeny v termostatu (do vypaření ethanolu) při teplotě 55 °C (Kubisz 2010)¹⁴⁷.

PCR produkty byly eluovány do 25 µl TE pufru (10 mM Tris/HCl pH 8,0 a 1 mM EDTA) 1 h při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byly částice odseparovány 2 min při laboratorní teplotě a eluované PCR produkty přepipetovány do čisté zkumavky. Takto přečištěné PCR produkty byly štěpeny restrikčními endonukleasami *AluI* a *TaqI* (Fermentas).

Příprava směsí pro štěpení pomocí restrikčních endonukleas *AluI* a *TaqI*

1,0 µl	restrikční endonukleasa <i>AluI</i>
1,5 µl	10 x NEBuffer 2
7,5 µl	PCR voda
5,0 µl	přečištěný PCR produkt
15,0 µl	celkový objem

1,0 µl	restrikční endonukleasa <i>TaqI</i>
1,5 µl	10 x NEBuffer 2
7,5 µl	PCR voda
5,0 µl	přečištěný PCR produkt
15,0 µl	celkový objem

Reakční podmínky: *AluI* (4 h inkubace při 37 °C) a *TaqI* (4 h inkubace při 65 °C)

Po naštěpení byly restrikční fragmenty vyhodnoceny pomocí agarozové gelové elektroforézy v 2 % agarozovém gelu v prostředí 0,5 x TBE pufru (45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá, 1 mM EDTA, pH 8,0), agarozový gel byl barven roztokem ethidium bromidu po dobu 20 min a vizualizován UV zářením. Velikost restrikčních fragmentů byla odečtena s použitím standardu 100 bp DNA (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledková a diskuzní část je rozdělena do dvou okruhů. První řeší produkci technologicky významných enzymů, polygalakturonas, mikroorganismy kultivovanými na hroznových výliscích tvořících jeden z odpadů potravinářského průmyslu. V druhém okruhu jsou uvedeny a diskutovány výsledky vyplývající z charakterizace komerčního přípravku a návrhu nového produktu pro efektivní čištění odpadních vod.

5 Produkce polygalakturonas

5.1 Výběr kmene

Produkční kmen byl vybrán na základě provedeného screeningu 83 kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů ze Slovenské sbírky kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů (Culture Collection of Yeasts, CCY) na jejich schopnost produkovat polygalakturonasy na pektinu jako jediném zdroji uhlíku v kultivačním médiu. Nejvyšší produkci vykazovaly kmeny *Geotrichum candidum* CCY 16-1-29 (teleomorfní forma *Galactomyces geotrichum*), *Aureobasidium pullulans* CCY 27-1-115, který byl jako producent popsán už dříve (Stratilová a kol. 2006)¹⁵² Kromě těchto dvou kmenů byl na základě údajů (Taskin a Stratilová 2008)¹²⁸ testován i kmen plísně *Aspergillus foetidus* EGEK635 z turecké sbírky plísní při univerzitě Ege, ústav Bioinženýrství, Izmir, Turecko.

Všechny tři výše zmíněné mikroorganismy byly schopny růst na hroznových výliscích, přičemž byla zaznamenána produkce extracelulárních polygalakturonas. Polygalakturonasy produkované *Aureobasidium pullulans* (Stratilová a kol 2006)¹⁵² a *Aspergillus foetidus*¹²⁸ se po izolaci projeví jako extrémně nestabilní. Z tohoto důvodu byly zmíněné dva kmeny vyloučeny z dalšího testování. Nestabilita produkovaných polygalakturonas mohla být způsobena zvýšeným množstvím přirozených složek hroznových výlisků, např. rostlinných ochranných proteinů jako PGIP (Jorbet a kol. 2006)¹⁵³, anebo zbytky postřiků, které mohly způsobovat nestabilitu polygalakturonas. V jiných studiích (Stratilová a kol 2006¹⁵²; Taskin a Stratilová¹²⁸) byla prokázána vysoká produkce polygalakturonas pomocí *A. pullulans* a *A. foetidus*, ale i jejich stabilita. V těchto případech byly ale jako zdroje uhlíku použity řepné řízky, pšeničné otruby a citrusový pektin^{128, 152}.

Stabilní polygalakturonasy produkoval na hroznových výliscích kmen *G. candidum* CCY 16-1-29. Z těchto důvodů se práce dále omezila na charakterizaci polygalakturonas produkovaných právě tímto kmenem.

Geotrichum candidum je kvasinkovitý mikroorganizmus známý hlavně jako součást přirozené mikroflóry některých francouzských sýrů (Larpin a kol. 2006)¹⁵⁴, kde hrají důležitou úlohu jeho proteasy (Boutrou a kol. 2006)¹⁵⁵. Dalšími zkoumanými enzymy *G. candidum* byly lichenasa a laminarinasa jako enzymy degradující β -glukan (Piegza a kol.)¹⁵⁶. Nejvíce prací ovšem bylo zaměřeno na optimalizaci produkce a charakterizaci lipolytických enzymů (Vernet a kol. 1993, Mladenoska a kol. 2001, de Medeiros Burket a kol. 2005)^{157, 158, 159}.

První práce, která se zabývala možnou produkcí pektolytických enzymů tímto mikroorganizmem, pochází z roku 1969 (Barash a kol 1969)¹⁶⁰. Autoři v ní popsali izolaci a vlastnosti polygalakturonas.

Později byly identifikovány vícere formy polygalakturonas, přičemž se předpokládalo, že některé formy enzymu jsou typické pro fytopatogenní kmeny, zatímco jiné formy jsou produkovány i nepatogeny (Nakamura *et al.* 2002, 2003)^{161,162}. Ani v jednom případě nebyla zkoušena produkce enzymů za podmínek solid state kultivace, i když její výhody byly již známy (Gowthaman *a kol.* 2001, Pandey *a kol.* 2000)^{163,164}.

5.2 Vliv typu kultivace a složení fermentačního média na produkci polygalakturonas, růst a morfologii *G. candidum*

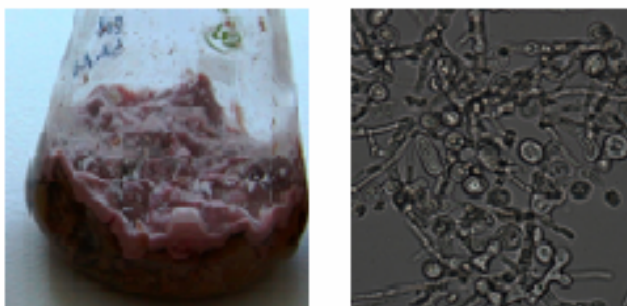
Celkem byly testovány 4 typy kultivačních médií lišící se v obsahu solí, přidavku kvasničného autolyzátu a ve zvlhčení nebo zalití hroznových výlisků roztokem solí nebo vody. Testovala se kultivace stacionární a kultivace na třepačce. Nejvýhodněji se jevila solid state (SSF) kultivace na výliscích zvlhčených roztokem solí a kvasničným autolyzátem. Výhodou SSF kultivace bylo také snížení nákladů na provozní zařízení (Pandey *a kol.* 1999)⁴⁷.

Jak již naznačovaly výsledky získané při optimalizaci produkce lipas (Mladenoska *a kol.* 2001, de Medeiros Burket *a kol.* 2005)^{158, 159}, *G. candidum* je na jedné straně citlivé na míchání pravděpodobně v důsledku poškození mycelií (Arends *a kol.* 1975)¹⁶⁵, na druhé straně však potřebuje dostatečný přísun kyslíku (de Medeiros Burket *a kol.* 2005)¹⁵⁹. Stejně jako v případě lipas, růst kmene a produkce polygalakturonas byla nižší, když se kultivovalo buď za míchání anebo byl kmen zalit zvlhčovací roztokem.

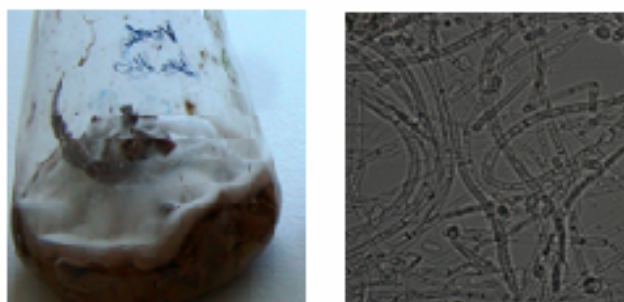
Mikroorganismy vytvářející mycelia byly schopny pokrýt celý povrch substrátu a produkovat velké množství extracelulárních hydrolytických enzymů. Mimo typu kultivace mělo na produkci polygalakturonas vliv i složení zvlhčovacího roztoku, protože přítomnost stopových prvků spolu s kvasničným autolyzátem ji výrazně zvýšilo. Podobný efekt byl pozorovaný i u produkce polygalakturonas plísní *A. foetidus* na řepných řízcích a pšeničných otrubách (Taskin *a Stratilová* 2008)¹²⁸.

Kromě produkce polygalakturonas, složení kultivačního média mělo vliv i na produkci barviva a morfologii testovaného kmene (**Obr. 19**).

A) SSF kultivace s přidavkem minerálních solí



B) SSF kultivace bez přidavku minerálních solí



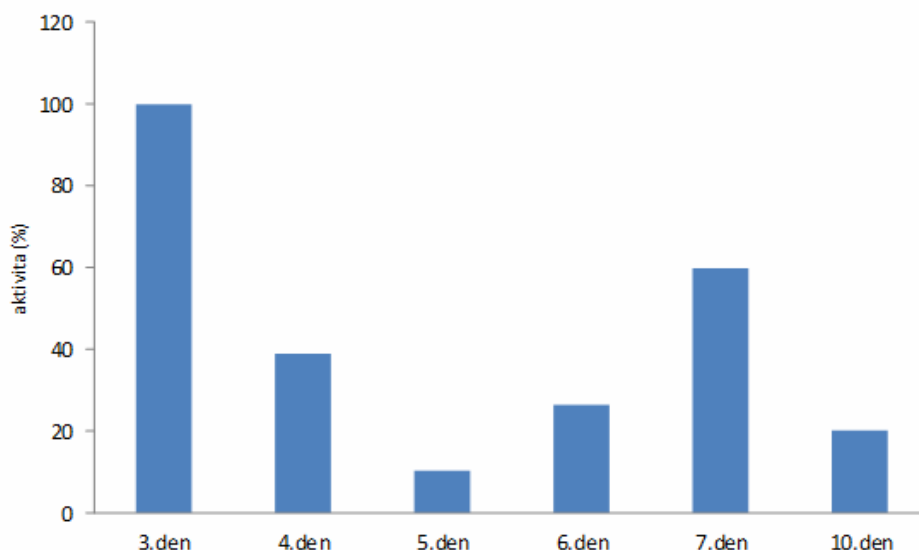
Obr. 19: Vliv přidavku minerálních solí na vzhled a zbarvení kolonií *G. candidum*: A) SSF kultivace s přidavkem minerálních solí; B) SSF kultivace bez přidavku minerálních solí (zvětšeno světelným mikroskopem, použité zvětšení 15 x 60)

Askomyceta *G. candidum* je známá tvorbou kožovitého povrchu svých kolonií. Vliv složení kultivačního média se projevil ve zbarvení kožovitých povrchů kolonií buněk *G. candidum* a pak také v morfologii buněk **obr. 19 A,B**. **Obr. 19 A** znázorňuje buňky, které rostly v podmínkách SSF kultivace s přidavkem minerálních solí. Kolonie má růžovou barvu, je kožovitá a buňky mají převážně elipsoidní tvar. V podmínkách bez přidavku solí **obr. 19 B** je kolonie bílá a už její povrch naznačuje přednostní vytváření hyf. Rozdíl v morfologii buněk *G. candidum* nebyl dosud v literatuře popsán.

V následujících experimentech se pro kultivaci *G. candidum* na hroznových výliscích používala solid state kultivace s přidavkem minerálních solí a kvasničného autolýzátu

5.3 Produkce extracelulárních polygalakturonas

Produkce polygalakturonas (PGas) byla sledována v průběhu 10 denní kultivace *G. candidum*. Aktivita byla stanovena spektrofotometricky měřením přírůstku redukujících skupin podle Somogyiho (Somogyi 1952)¹⁶⁷ při vlnové délce 530 nm s využitím kalibrační křivky kyseliny galaktopyranuronové. Takto stanovená aktivita je součtem aktivit všech produkovaných polygalakturonan hydrolas, to je polygalakturonas (EC. 3.2.1.15, zvaná taky endopolygalakturonasa, dále endoPGasa) a exopolygalakturonas (EC 3.2.1.67, dále exoPGasa).



Obr. 20: Produkce polygalakturonas během 10 denní SSF kultivace *G. candidum*

Na **obr. 20** je znázorněn průběh solid state kultivace v průběhu 10 dnů. Vzorky byly odebrány 3., 4., 5., 6., 7. a 10. den solid state kultivace. Z **obr. 20** je zřejmé, že nejvyšší produkce extracelulární polygalakturonasové aktivity byla pozorována během 3. a 7. dne SSF kultivace. Podobný průběh, vyžadující alespoň částečnou inaktivaci enzymů, byl pozorován taky u tří kmenů *A. pullulans* kultivovaných stacionárně na pektinové půdě (Stratilová a kol. 2006) ¹⁵². V tomto případě byly na počátku produkovány hlavně endoPGasy, které se pak inaktivovaly. ExoPGasy bez invazivní funkce byly produkovány v průběhu celé kultivace a nárůst aktivity v pozdější fázi kultivace byl připisán těmto enzymům. Autoři předpokládali, že endoPGasy jsou nevyhnutelné pro kolonizaci média v prvních fázích růstu a v případě nepatogenních mikroorganismů pak ztrácejí význam. Patogenní mikroorganismy, jako je např. *Aspergillus niger*, produkují endoPGasy v průběhu celého svého růstu (Stratilová a kol. 1996) ¹⁶⁸. Pro určení typu enzymů v 3. a 7. dni kultivace *G. candidum* byly tyto enzymy izolovány a charakterizovány.

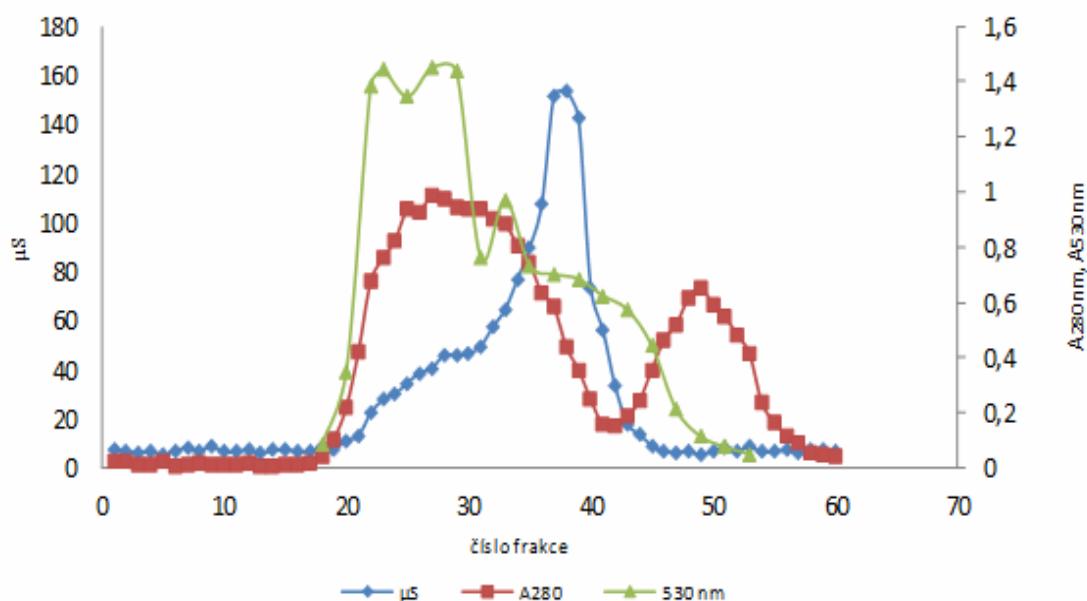
Hang a kol. ¹³⁰ potvrdili produkci endoPGasy druhem *G. candidum* na nálevu z kysaného zelí. Nejvyšší polygalakturonasové aktivity na tomto uhlíkatém zdroji bylo dosaženo na 0,5 % pektát v 0,1M octanovém pufru v rozmezí pH 4,5 – 5,0.

5.4 Izolace polygalakturonas

Izolace surového proteinového extraktu z kultivačního média byla provedena podle schématu na **obr. 13** v kapitole 3.4.1.1.

Surový proteinový extrakt byl po částečném odsolení dialýzou nanesen na kolonu s náplní Sephadex G-25 Medium (**obr. 21**) s cílem odstranit nízkomolekulární sloučeniny od proteinů. Ve frakcích byla monitorována polygalakturonasová aktivita, obsah solí a proteinů.

Na základě stanovení enzymové aktivity a solí ve frakcích se dá usuzovat, že část enzymu interagovala s nosičem a tím došlo k jeho zdržování na koloně. Z tohoto důvodu byly sbírané frakce rozděleny na části I. (frakce 18 – 30), II. (frakce 31 – 35) a III. (frakce 36 – 54) s naměřenou polygalakturonan hydrolasovou aktivitou. Protože se vzorky I. - III. lišily jen stupněm kontaminace, co se projevilo v jejich aktivitě, jsou dále uvedeny jen výsledky pro vzorek I. Odsolené vzorky z 3. a 7. dne kultivace nevykazovaly výrazné rozdíly v bílkovinném, aktivním, nebo solném profilu. Majoritní frakcí byla frakce číslo I.



Obr. 21: Sephadex G-25 Medium: odsolení proteinového extraktu ze 3. dne kultivace

5.5 Charakterizace extracelulárních polygalakturonas

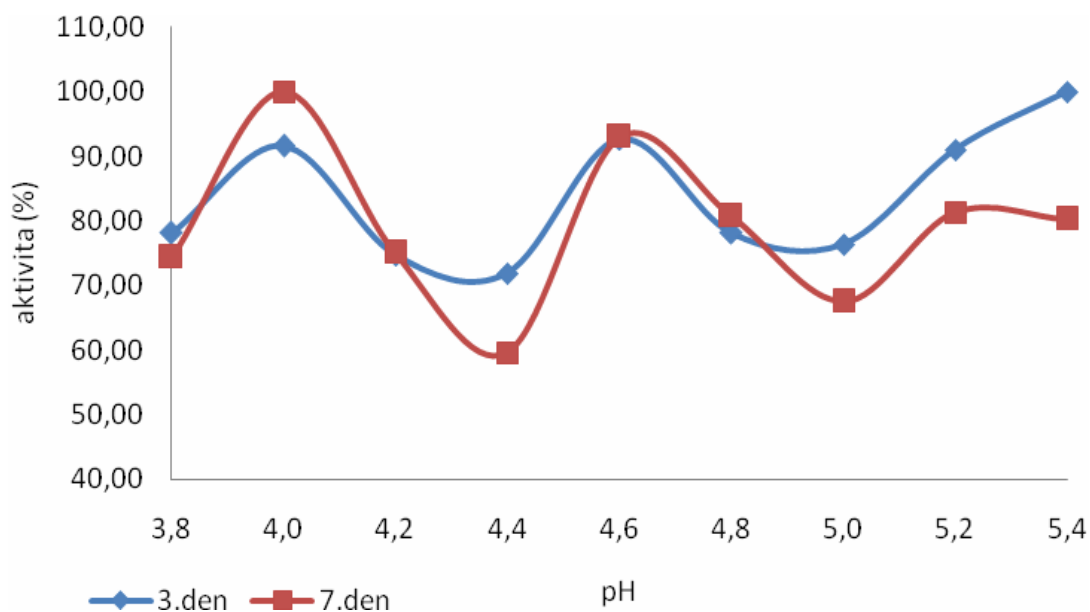
Polygalakturonasy se liší některými svými vlastnostmi, na základě kterých se dá určit, jestli jde o endoPGasu nebo exoPGasu (Rexová-Benková a Markovič, 1976) ¹⁶⁹. Základním rozlišovacím znakem je neschopnost endoPGasy štěpit digalakturonovou kyselinu. Protože tento enzym štěpí polymerní substrát (PGA) endomechanismem, při korelování poklesu viskozity a přírůstku redukujících skupin v průběhu reakce odpovídá poklesu viskozity na 50% méně než 3% rozštěpených vazeb substrátu. Produkty reakce jsou delší fragmenty PGA, v pozdějších fázích reakce oligogalakturonové kyseliny. V případě exoPGas viskozita klesá extrémně pomalu, protože se ze substrátu odštěpuje výlučně kyselina galaktopyranuronová. Mimo typické exoPGasy, která preferuje polymerní substráty jako endoPGasa, existují exoPGasy preferující oligogalakturonové kyseliny. Tyto se někdy pro rozlišení nazývají i oligogalakturonát hydrolasy a byly identifikované jak u rostlin, tak i u mikroorganismů (Stratilová a kol., 2005a; 2005b; 2006; Flodrová a kol. 2007; 2009) ^{170, 151, 171, 172, 173}.

Izolované extracelulární polygalakturonasy produkované *G. candidum* byly charakterizovány z hlediska pH optima, substrátové preference, teplotního optima, tepelné stability, kinetických parametrů, izoelektrického bodu a molekulové hmotnosti.

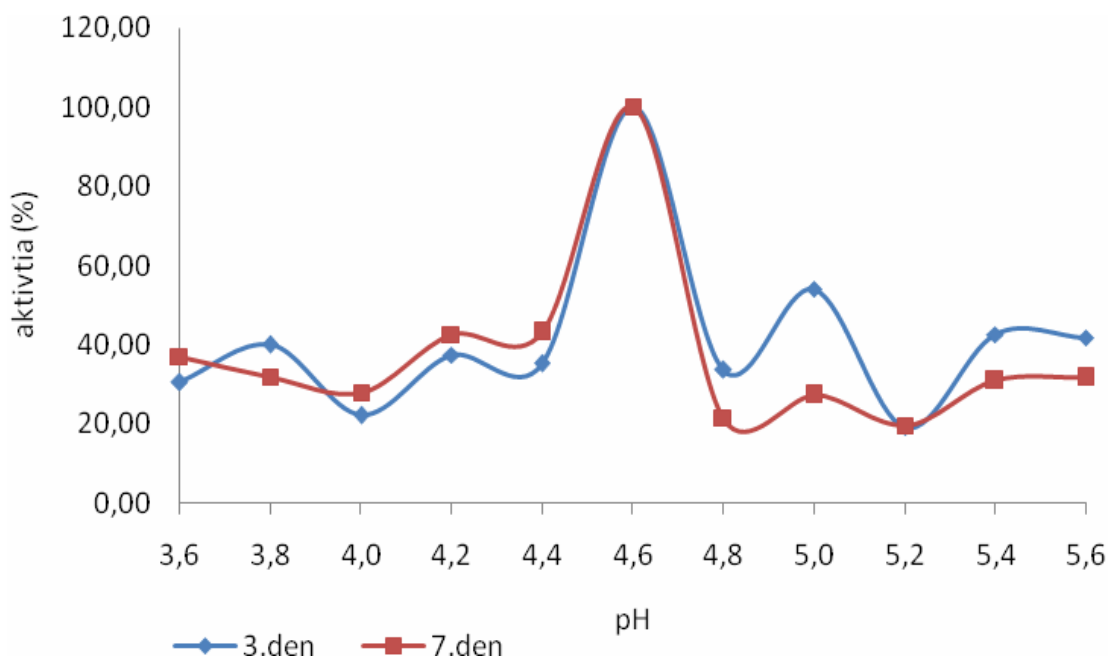
5.5.1 Stanovení pH optim na substráty s různým stupněm polymerizace

pH optimum polygalakturonas v izolovaném směsném preparátu extracelulárních proteinů *G. candidum* z 3. a 7. dne kultivace bylo stanoveno v rozmezí pH 3,6 – 5,6 měřením enzymové aktivity na 1 mM oligosubstráty – digalakturonan (GA)₂, tetragalakturonan (GA)₄ a 0,5 % pektan s různými hodnotami pH, **obr. 22 (A, B, C)**.

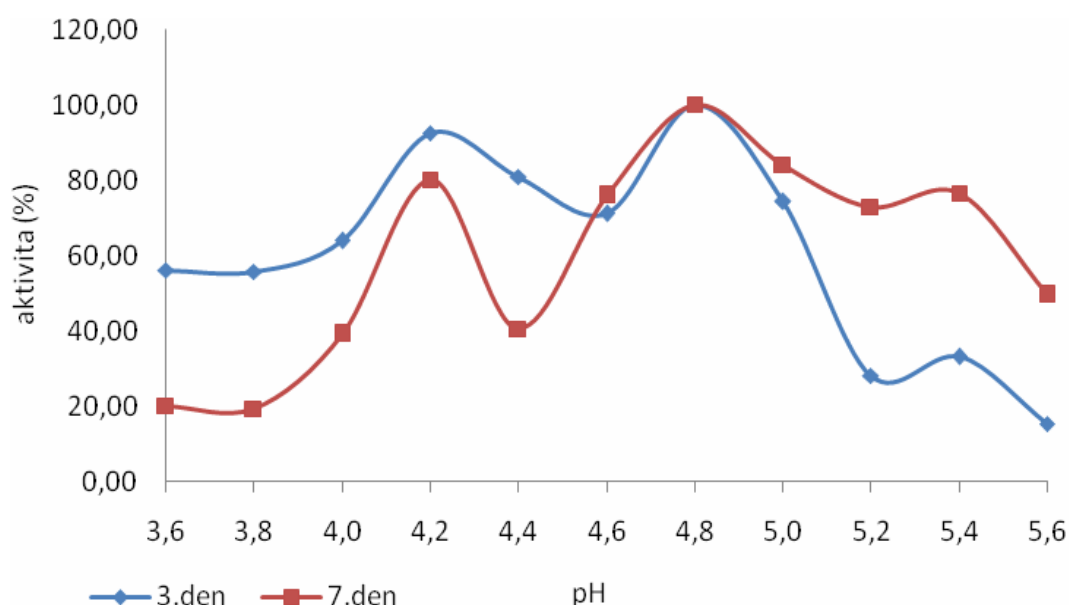
A)



B)



C)



Obr. 22: pH optima polygalakturonas izolovaných v 3. a 7. dni kultivace. Substrát: A – dimer (GA)₂, B – tetramer (GA)₄, C – polymer PGA

Na základě substrátové preference se stanovené pH optima dají přiřadit těmto enzymům:

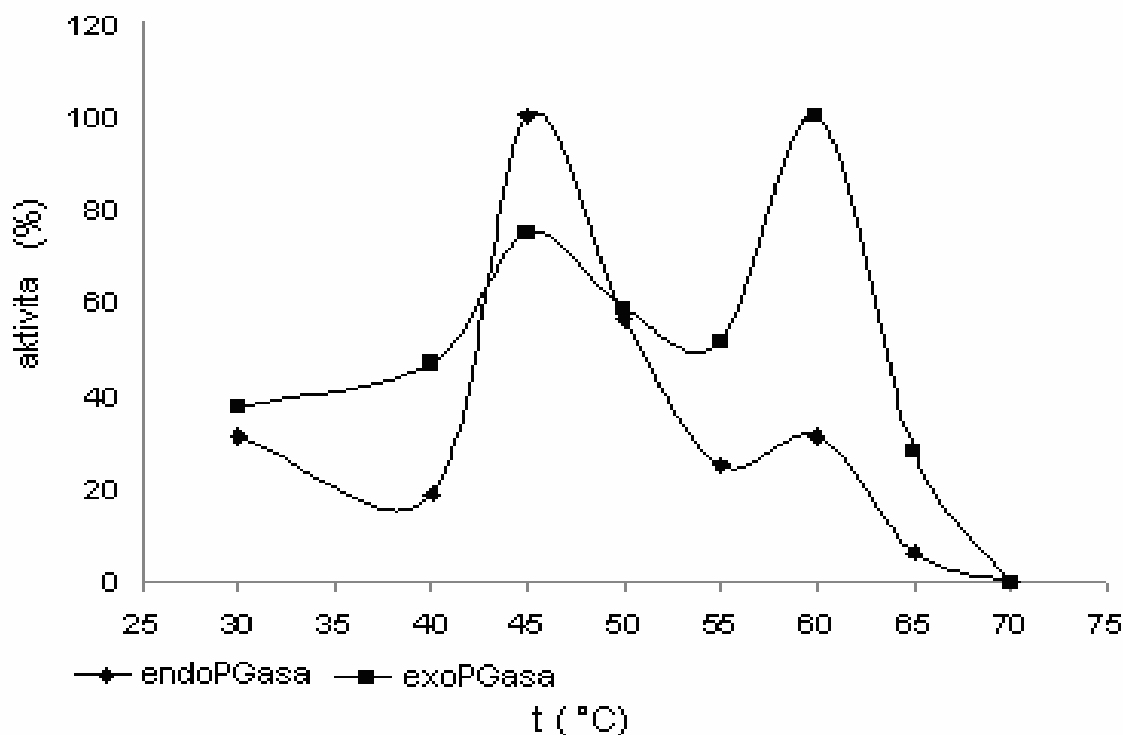
- pH optimum 4,2 a 4,8 – endoPGasa (preference pro polymer, dimer neštěpí)
- pH optimum 4,6 – exoPGasa s preferencí pro oligogalakturonové kyseliny (preference pro tetramer, štěpí dimer, polymer štěpí pomalu)
- pH optimum 5,4 – pravděpodobně typická exoPGasa s preferencí pro polymer

Ostatní pH optima, např. v oblasti pH 3,8 – 4,0 a pH 5,0 se bez další separace forem spolehlivě přiřadit nedají. I když byly pozorovány určité rozdíly v minoritních formách, endoPGasa s pH optimem 4,8 a exoPGasa s pH optimem 4,6 se nacházely jako majoritní enzymy ve vzorcích odebraných 3. i 7. den kultivace. Výrazný rozdíl v substrátové preferenci (**obr. 22 B, C**) umožnil charakterizaci těchto enzymů ve směsném preparátu, i když byly blízké hodnoty pH optim. Z těchto důvodů se v další práci na stanovení aktivity endoPGasy používala 0,5% PGA pH 4,8 a exoPGasy 1 mM (GA)₄ nebo (GA)₅ pH 4,6.

(Barash a kol. 1969) ¹⁶⁰ popsali mechanismus působení polygalakturonas. Řetězec polygalakturonátu je štěpen náhodně na menší oligogalakturonové jednotky, zatímco tetrame galakturonové kyseliny je štěpen v poměru 3 + 1 nebo 2 + 2. V případě pentameru kyseliny galakturonové štěpí jednotky v poměru 3 + 2. Hang a kol. ¹³⁰ potvrdili produkci endoPGasy druhem *G. candidum* na nálevu z kysaného zelí, nejvyšší polygalakturonasové aktivity bylo dosaženo na 0,5 % pektát v 0,1M octanovém pufru v rozmezí pH 4,5 – 5,0, což je v souladu s našimi výsledky.

5.5.2 Teplotní optimum a tepelná stabilita polygalakturonas

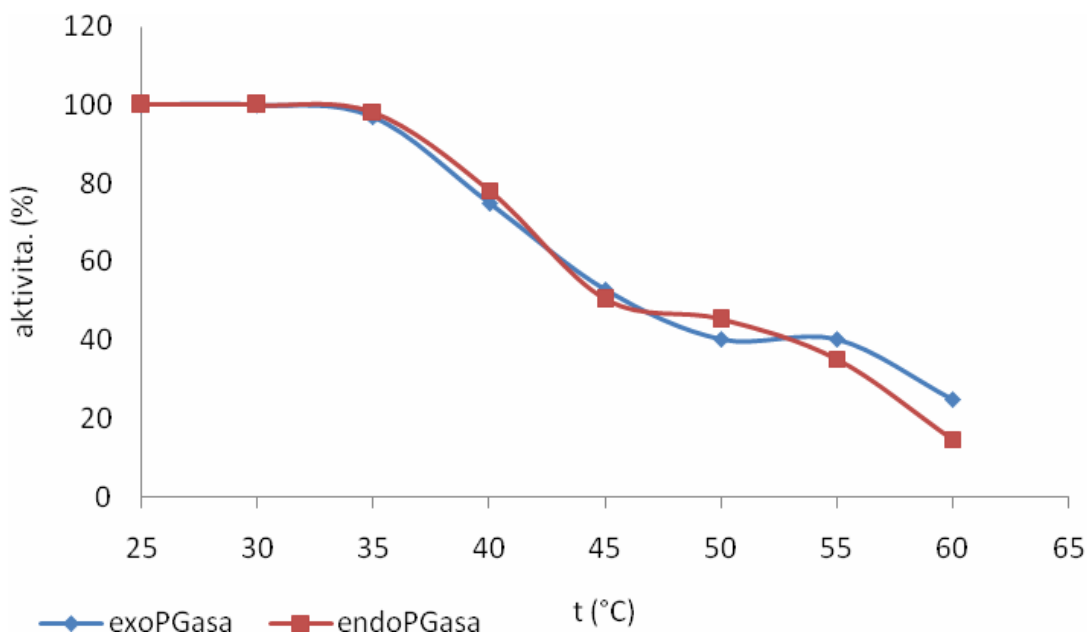
Teplotní optimum polygalakturonas bylo stanoveno měřením aktivity na 0,5 % PGA v rozmezí teplot 30 – 70 °C. EndoPGasa měla teplotní optimum 45 °C (stanovené při jejím pH optimu 4,8) a exoPGasa optimum 60 °C (stanovené při jejím pH optimu 4,6) **obr. 23**.



Obr. 23: Teplotní optimum endoPGasy při pH 4,8 a exoPGasy při pH 4,6

Rozdíl v teplotních optimech endoPGas a exoPGas byl publikovaný i pro jiné mikrobiální polygalakturonasy, např. *A. pullulans* CCY 27-1-111 produkoval endoPGasu s teplotním optimem 50 °C a exoPGasu s teplotním optimem 60 °C (Stratilová a kol., 2005a) ¹⁷⁰. Optimální teplota okolo 60 - 70 °C byla pozorovaná i pro exoPGasy z rostlin (Stratilová a kol. 2005b; Flodrová a kol. 2007; 2009) ^{171, 172, 173}.

Tepelná stabilita jako významný parametr průmyslově důležitých enzymů byla stanovena i pro vzorek ze 3. dne i ze 7. dne kultivace. Vzorky byly 2 hodiny inkubovány při teplotách v rozsahu 25 – 60 °C a pak v nich byla stanovena polygalakturonasová aktivita při 30 °C. V obou případech byla pozorována inaktivace ve dvou stupních (**obr. 24**), které by mohly odpovídat majoritní formě endoPGasy a exoPGasy. Předpokládáme, že endoPGasa byla stabilní jen do 35°C, nad 55 °C byla také pozorována výrazná inaktivace exoPGasy.



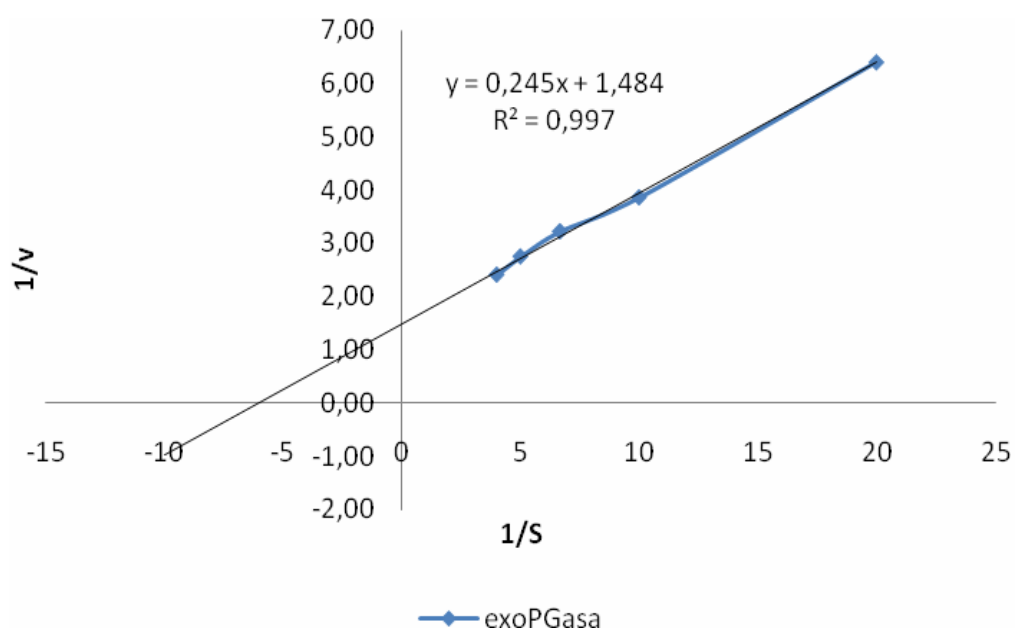
Obr. 24: Tepelná stabilita produkovaných polygalakturonan hydrolas

Pro endoPGasu purifikovanou *Hangem a kol.*¹³⁰ indikovala teplota 40 °C 50 % ztrátu aktivity enzymu, což znamená, že tento enzym vykazoval podobnou tepelnou stabilitu jakou jsme zjistili pro endoPGasu studovanou v této práci. Vyšší tepelná stabilita exoPGasy v porovnání s endoPGasou byla zaznamenána také u enzymů produkovaných *A. pullulans* (Stratilová a kol. 2005a)¹⁷⁰.

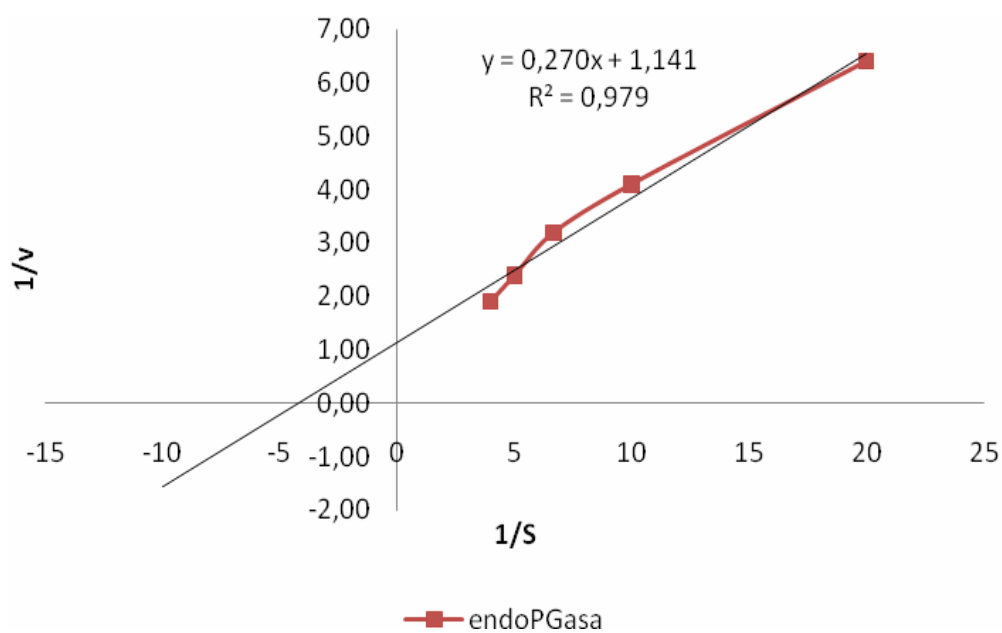
5.5.3 Stanovení kinetických parametrů, K_m

Michaelisovy konstanty izolovaných polygalakturonas byly stanoveny měřením počátečních rychlostí při různých koncentracích substrátů od 0,05 – 0,25 % PGA a od 0,05 – 0,5 mM (GA)₅. Reakce probíhala při teplotě 30 °C. Hodnoty Michaelisových konstant byly vypočítány lineární regresí, **obr. 25 A, B**. Hodnota K_m pro endoPGasu stanovená na substrát PGA pH 4,8 byla $6,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a pro exoPGasu stanovená na substrát (GA)₅ pH 4,6 $11,4 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Tyto hodnoty byly zatíženy chybou způsobenou zbytkovými aktivitami druhého enzymu, které se projevily např. při stanovení teplotního optima (**obr. 23**), ale i tak řádově odpovídají hodnotám K_m běžně naměřeným pro tyto enzymy (Stratilová a kol. 2005a; Taskin a Stratilová, 2008)^{170, 128}.

A)



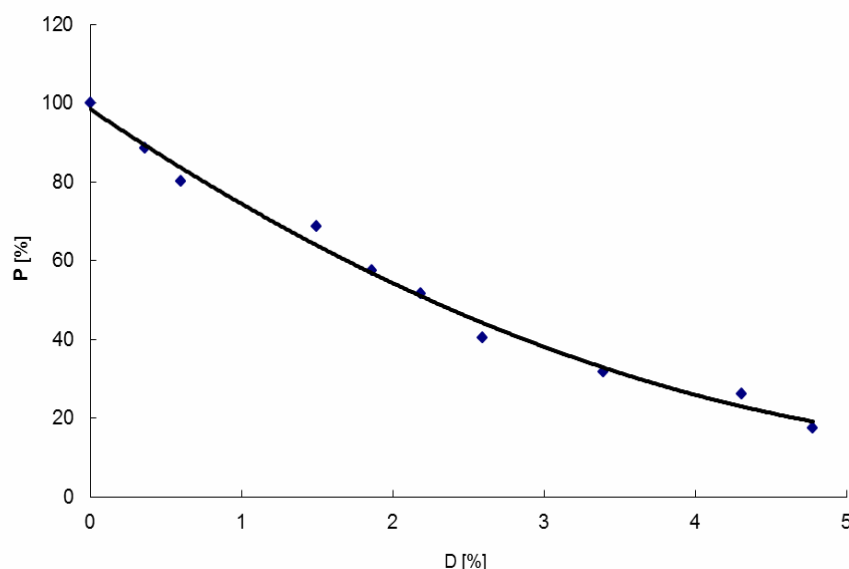
B)



Obr. 25: Závislost počátečních rychlostí na koncentraci substrátu ($1/S \times 1/v$): A – *exoPGasa*; B – *endoPGasa*

5.5.4 Stanovení způsobu účinku polygalakturonan hydrolas

Mechanismus účinku polygalakturonas na polymerní substrát se dá nejjednodušeji stanovit korelací poklesu viskozity polymerního substrátu na stupeň jeho degradace. Protože předcházející výsledky naznačovaly na produkci endoPGasy ne jen v prvních fázích kultivace, jak tomu bylo v případě třech kmenů *A. pullulans* kultivovaných na pektinové půdě (Stratilová a kol. 2006)¹⁵², testoval se vzorek odebraný ze 7. dne kultivace (**Obr. 26**). Pokles viskozity 0,5 % polygalakturonanu v 0,1 M octanovém pufru pH 4,8 byl měřen v průběhu reakce v Ubbelohdeho viskozimetru. V stejných časových intervalech byly odebírány vzorky na stanovení stupně degradace polymerního substrátu. Při 50 % poklesu viskozity došlo ke 2,2 % degradaci polymerního substrátu (0,5% PGA) a zároveň ke štěpení glykosidických vazeb, což naznačovalo náhodný způsob účinku.



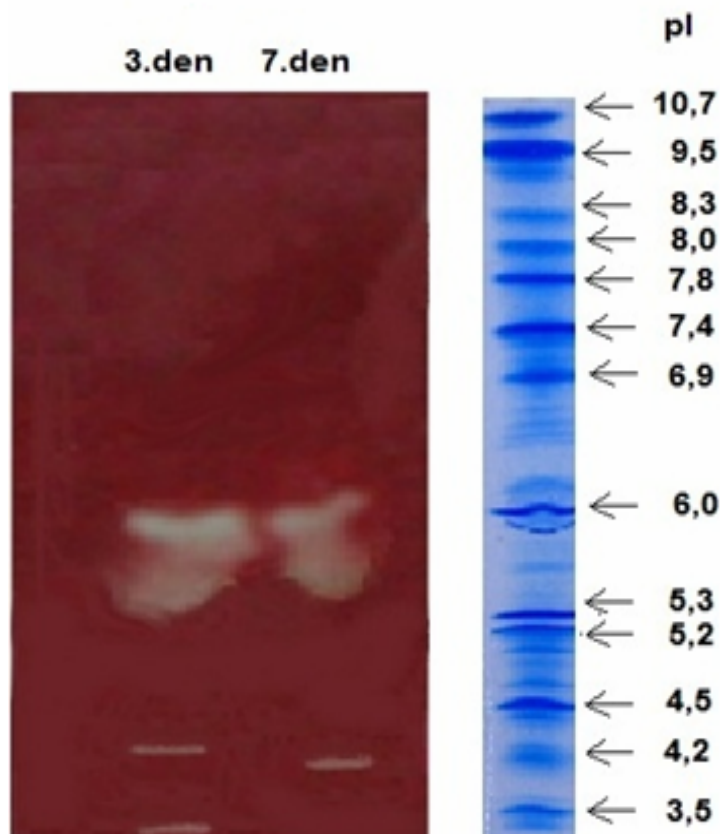
Obr. 26: Mechanismus účinku endoPGasy: závislost poklesu viskozity na stupni degradace polymerního substrátu (počtu rozštěpených vazeb polymerního substrátu)

Protože poklesu viskozity na 50% odpovídal přibližně jen 2,2 % rozštěpených vazeb (**Obr. 26**), převažující mechanismus účinku byl náhodný (endomechanismus). Znamená to, že majoritním enzymem byla typická polygalakturonasa, EC 3.2.1.15 (endoPGasa) štěpící náhodným mechanismem. V případě, že předpoklad (Stratilové a kol. 2006)¹⁵² o produkci endoPGas patogenními a nepatogenními kmeny v pozdějších fázích kultivace je správný, tento výsledek by naznačoval, že *G. candidum* CCY 16-1-29 je fytopatogenní kmen, i když byl izolovaný jako přirozená mikroflóra listů broskve.

Shodný mechanismus působení endoPGasy *G. candidum* byl již popsán (Barashem a kol. 1970)¹⁶⁰. V případě pentameru kyseliny galakturonové štěpil tento enzym jednotky v poměru 3 + 2.

5.5.5 Stanovení izoelektrického bodu polygalakturonas

Izoelektrické body (pI) polygalakturonas byly stanoveny pomocí IEF-PAGE. Izoelektrické body byly identifikovány pomocí IEF standardů (pH 3 – 10) s detekcí izolovaných forem polygalakturonas na dekagalakturonanový substrát (DP 10). Z **obr. 27** je zřejmé, že byly nalezeny dvě majoritní formy polygalakturonas s izoelektrickým bodem v oblasti pI 5,3 - 6,0 produkovaných ve 3. i 7. dni kultivace. Zároveň bylo potvrzeno několik minoritních forem polygalakturonas s izoelektrickým bodem v oblasti pI 3,4; 4,3 v případě polygalakturonas izolovaných 3. den a pI 4,2 v případě polygalakturonas izolovaných 7. den solid state kultivace. Minoritní formy se postupně inaktivovaly.

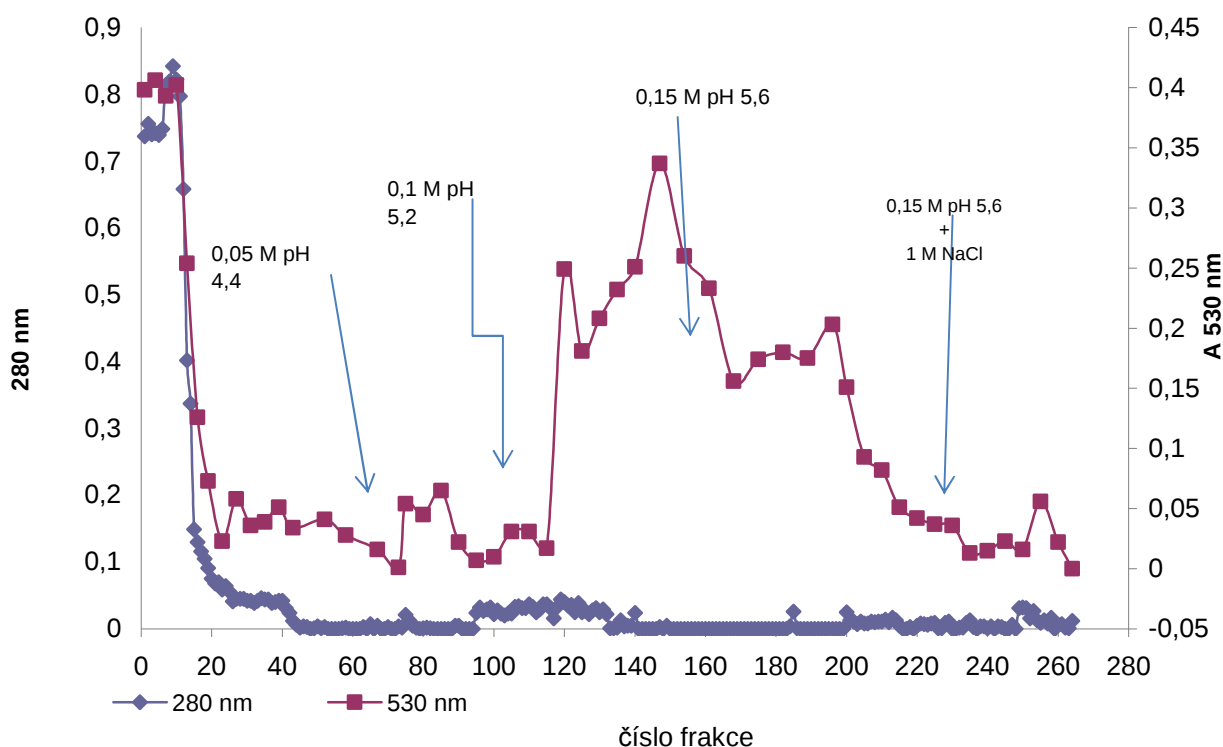


Obr. 27: IEF-PAGE purifikovaných majoritních a minoritních forem polygalakturonas produkovaných 3. a 7. den kultivace *G. candidum*

Z uvedeného experimentu vyplývá, že *G. candidum* CCY 16-1-29 produkovalo na hroznových výliscích výlučně kyselé PGasy. (Nakamura a kol. 2002)¹⁶¹ sledovali produkci PGas patogenním druhem *G. candidum* a zjistili, že tento druh je schopen produkovat také bazické PGasy (pI 8,3). Protože známým regulátorem indukce jednotlivých forem PGas je pH prostředí (Stratilová a kol. 1996)¹⁶⁹, může být produkce forem s různým pI ovlivněna právě tímto faktorem.

5.5.6 Částečná purifikace polygalakturonas

Částečná purifikace polygalakturonas byla provedena na CM-Sephadex C-50 koloně ekvilibrované 0,05 M octanovým pufrem při pH 4,4. Proteiny byly postupně eluovány kolonou použitím 0,05 M octanového pufru pH 4,4; 0,1 M octanového pufru pH 5,2; 0,15 M octanového pufru pH 5,6 a 0,15 M octanového pufru pH 5,6 s přidavkem 1 M NaCl. Eluční rychlost 0,25 ml/min. V eluovaných frakcích byla stanovena polygalakturonasová aktivita spektrofotometricky při 530 nm a obsah proteinů při 280 nm. Na **obr. 28** jsou znázorněny proteinové frakce postupně eluované CM-Sephadex C-50 kolonou. Pro charakterizaci purifikačních kroků po CM Sephadex C-50 koloně byly vzaty frakce I (1 – 23), III (75 – 100), VI (120 – 168), VII (169 – 203), VIII (204 – 235) a frakce IX (250 – 261). V jednotlivých frakcích byla stanovena polagalakturonasová aktivita vztažená na mg lyofilizátu, specifická aktivita na mg proteinu celkový protein. Současně byl spočítán výtěžek eluovaných frakcí po CM-Sephadex C-50 koloně. Eluční profily proteinu a aktivity pro vzorky z 3. a 7. dne kultivace byly téměř zhodné, proto uvádíme jen ten pro 3. den (**obr. 28**).



Obr. 28: CM-Sephadex C-50 column: vzorek eluovaný octanovým pufrem o různém pH a molaritě

Efektivitu purifikačního kroku na CM-Sephadex C-50 pro vzorek z 3. a 7. dne kultivace zobrazuje **tabulka 5**. V tabulce jsou uvedeny vypočítané aktivity polygalakturonas v přepočtu na 1,0 mg lyofilizátu (frakce po G25: lyofilizát získaný 3. den 31,4 mg, 7. den 28,3 mg; frakce po CM: I. 130 mg, III. 60 mg, VI. 6,1 mg, VII. 86,9 mg, VIII. 344 mg a IX. 119 mg), jejich specifická aktivita v přepočtu na mg proteinu a hodnoty celkového proteinu získaných po dělení na Sephadex G25 koloně a CM-Sephadex C-50 koně. Nejvyšší výtěžek byl stanoven u frakcí I (1 – 23) a III (75 – 100) po CM-Sephadex C-50 koloně. Výtěžek v procentech reprezentuje podíl bílkovin ve frakci z celkového proteinu naneseného na kolonu. Aktivita lyofilizátu je navíc přepočtena na navážku použitých hroznových výlisků jako zdroje uhlíku (navážka 70 g).

Tab. 5: Výtěžnost a efektivita jednotlivých purifikačních kroků (3. den & 7. den)

Purifikační krok	$a_{\text{lyofilizát}}$ ($\mu\text{mol/min.mg}$)	celk. protein (mg)	$a_{\text{spec.}}$ ($\mu\text{mol/min.mg}$)	Výtežek (%)
Sephadex G-25				
frakce I (18 – 30)*	55,1 & 32,9	0,8 & 0,4	67,7 & 80,2	100 & 100
CM Sephadex C-50				
frakce I (1 – 23)	3,8 & 3,9	0,7 & 0,2	5,2 & 21,8	87,5 & 50
frakce III (75 – 100)	3,2 & 2,6	0,2 & 0,04	14, 8 & 65	25 & 10
frakce VI (120 – 168)	1,6 & 0,3	0,08 & 0,03	20,7 & 10	10 & 7,5
frakce VII (169 – 203)	1,1 & 1,7	0,05 & 0,01	22 & 170	6,3 & 2,5
frakce VIII (204 – 235)	1,6 & 1,3	0,05 & 0,3	32 & 4,3	6,3 & 75
frakce IX (250 – 261)	2,5 & 2,5	0,09 & 0,06	27,7 & 41,6	11,3 & 15

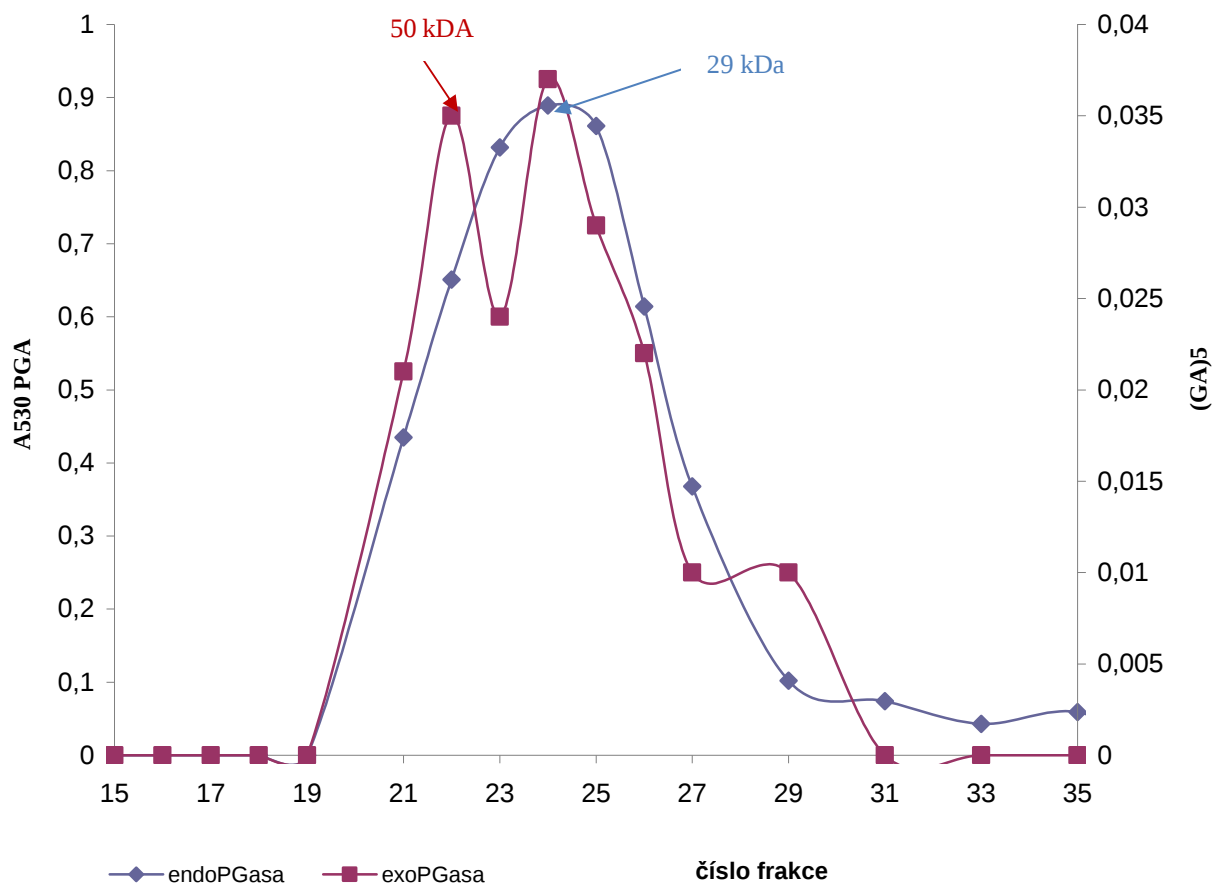
- viz. obr. 21

Vzhledem ke zjištění výrazného poklesu aktivity v průběhu pročišťování, nebyl uskutečněn další purifikační krok. (z nanesené aktivity vzorku z 3. dne kultivace 55,05 $\mu\text{mol/min}$ se z kolony získalo 13,45 $\mu\text{mol/min}$ a z nanesené aktivity vzorku ze 7. dne kultivace 32,95 $\mu\text{mol/min}$ se z kolony získalo 12,75 $\mu\text{mol/min}$).

5.6 Charakterizace polygalakturonas z hlediska M_r

5.6.1 Stanovení molekulových hmotností polygalakturonas gelovou filtrací

Stanovení molekulových hmotností polygalakturonas bylo provedeno gelovou filtrací na Superdex 75 koloně. Mobilní fází byl 0,05 M fosfátový pufr pH 7,0 obsahující 0,15 M NaCl. Polygalakturonasová aktivita ve frakcích byla stanovena na 0,5 % pektan sodný pH 4,8 a na 1 mM pentagalakturonan pH 4,6. Molekulové hmotnosti byly vztaženy na kalibrační křivku získanou pomocí Molecular Weight Marker Kit (Sigma) v rozsahu M_r 12,5 – 700 kDa. Pomocí Molecular weight marker kitu byla molekulová hmotnost endoPGasy 29 kDa a exoPGasy 50 kDa.



Obr. 29: Gelová filtrace na Superdex 75 column: endoPGasa 29 kDa, exoPGasa 50 kDa

Na **obr. 29** je znázorněno stanovení molekulových hmotností purifikovaných polygalakturonas. Frakci č. 24 u křivky pro endoPGasu odpovídala molekulová hmotnost 29 kDa, frakci č. 22 u křivky pro exoPGasu molekulová hmotnost 50 kDa. Výhodou tohoto stanovení bylo, že detekce probíhala na základě stanovení polygalakturonasové aktivity, což SDS-PAGE u těchto enzymů neumožňovala. Nevýhodou byla naopak poměrná nepřesnost, protože toto stanovení polygalakturonasové aktivity záviselo i na teriální struktuře (sbalení) enzymu.

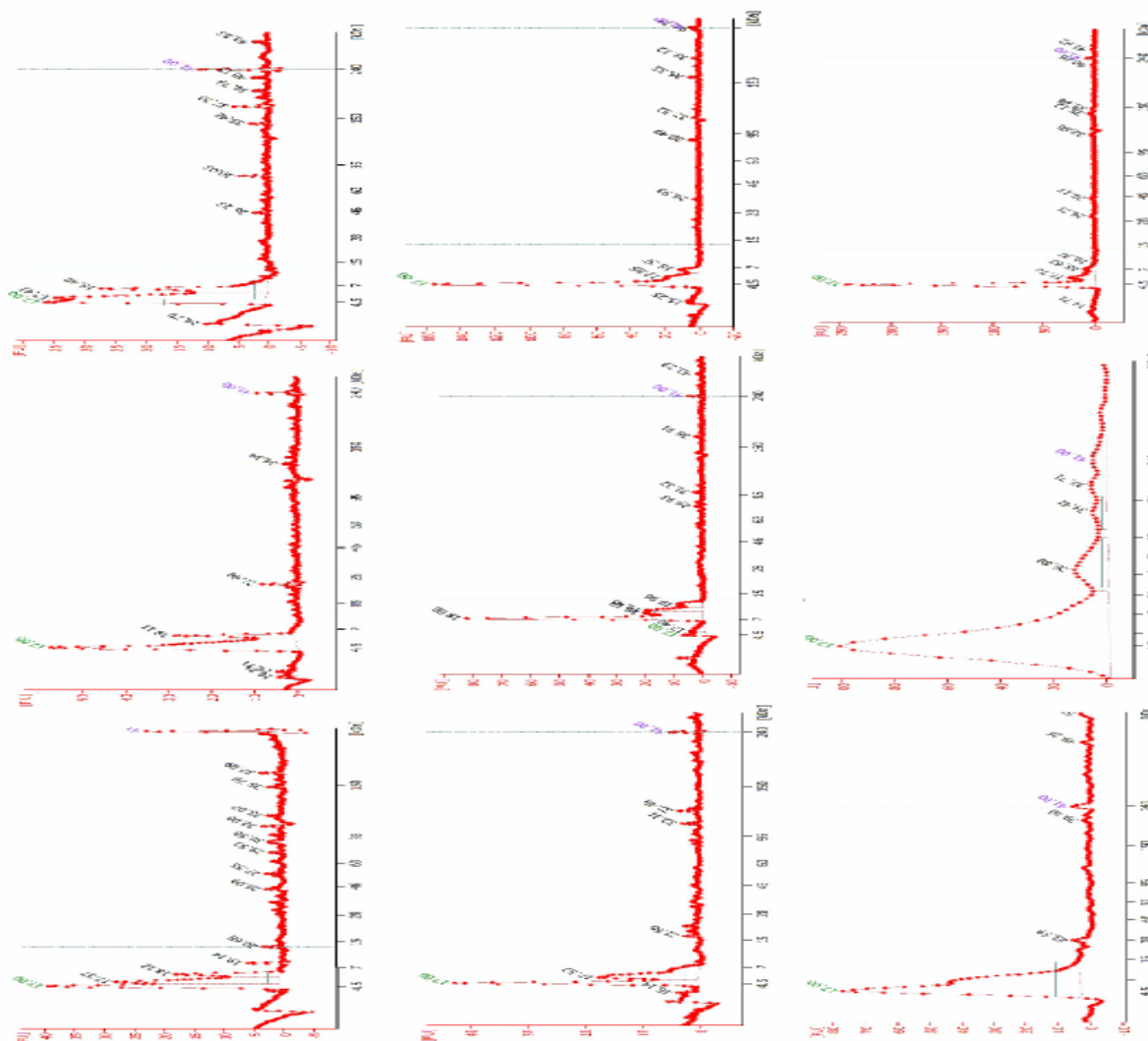
5.6.2 Analýza částečně purifikovaných proteinů na Bioanalyzátoru 2010

Molekulové hmotnosti částečně purifikovaných proteinů byly na závěr stanoveny s využitím elektroforézy v miniaturním provedení (na čipu). Výsledkem bylo stanovení molekulových hmotností purifikovaných proteinů spolu s elektroforegramy. V **tab. 6** jsou uvedeny stanovené molekulové hmotnosti eluovaných frakcí po CM-Sephadex C-50 koloně s využitím elektroforézy na čipu, na **obr. 30** pak elektroforegramy eluovaných frakcí po CM-Sephadex C-50 koloně, vzorek 7. den kultivace. Touto metodou byly analyzovány eluované proteinové frakce po CM-Sephadex C 50 koloně, vzorek 7. den kultivace. Pro vyhodnocení byl použit program Protein 230 BioAnalyzer 2100 a standard 4,5 – 240 kDa. Vzhledem na molekulové hmotnosti polygalakturonas stanovené gelovou filtrací (29 a 50 kDa), se na další experimenty použily pouze frakce I, III, VI - IX.

Vzhledem na molekulové hmotnosti majoritních PGas stanovené gelovou filtrací (29 a 50 kDa) a jejich isoelektrické body, se na další experimenty použily pouze frakce VI – IX, ve kterých se detekovaly proteiny s molekulovými hmotnostmi v oblasti 27,6 – 50,0 kDa.

Tab. 6: Molekulové hmotnosti eluovaných proteinových frakcí po CM Sephadex C-50 koloně stanovené pomocí proteinového čipu 230 na bioanalyzátoru 2100

Frakce I pH 4,4 (kDa)	Frakce II pH 4,4 (kDa)	Frakce III pH 4,4 (kDa)	Frakce IV pH 4,4 (kDa)	Frakce V pH 5,2 (kDa)	Frakce VI pH 5,2 (kDa)	Frakce VII pH 5,6 (kDa)	Frakce VIII pH 5,6 (kDa)	Frakce IX pH 5,6 + NaCl (kDa)
5,2	6,1	5,0	5,4	5,1	5,5	27,6	50,0	5,6
6,5	24,5	6,1	17,1	7,2	6,6	206,9	133,5	7,0
45,0	131,8	8,3	109,3	8,8	36,4		182,5	9,4
81,3		13,4	123,0	9,6	87,8			31,6
144,2		44,1		11,2	111,8			44,4
172,6		55,1		80,6	158,5			115,8
200,8		75,0		98,0	189,6			141,7
224,9		88,2		168,6	236,4			227,1

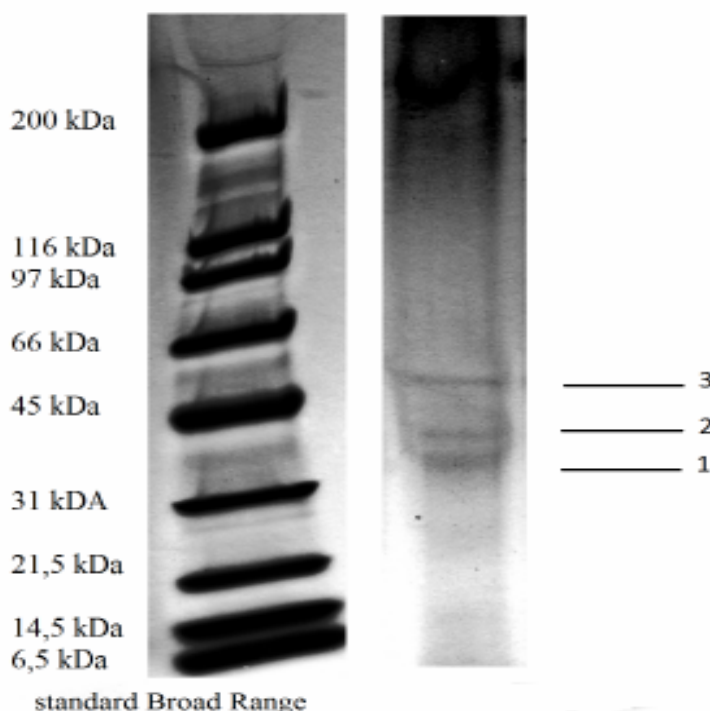


Obr. 30: Elektroforegramy frakcí I – IX vyhodnocených softwarem Protein 230 BioAnalyzer

5.6.3 Identifikace pektolytických enzymů na základě primárních struktur

Částečně přečištěné proteiny (frakce VI – IX, uvolněné z kolony s náplní CM Sephadex C-50 při pH 5.2 – 5.6 s NaCl) byly separovány pomocí SDS-PAGE a detekovány barvením na Coomassie blue. V oblasti molekulových hmotností 36 – 50 kDa byly vizualizované tři výraznější zóny (**obr. 31**). Proteiny v jednotlivých zónách byly chemicky modifikovány a štěpeny trypsinem podle postupu uvedeným v kapitole 3.5.1.3.

Purifikované polygalakturonasy byly separovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy, na **obr. 31** v zóně 36 kDa byla detekována endoPGasa, v zóně 50 kDa exoPGasa. Navíc identifikovaným enzymem byla pektinmethylesterasa o molekulové hmotnosti 44 kDa. Produkce pektinmethylesterasy nebyla doposud u druhu *G. candidum* popsána, ale její přítomnost se dá předpokládat.



Obr. 31: SDS-PAGE částečně purifikovaných proteinů *G. Candidum* (frakce VI – IX z CM Sephadex C-50): 1 – endoPGasa, 2 – PME, 3 - exoPGasa

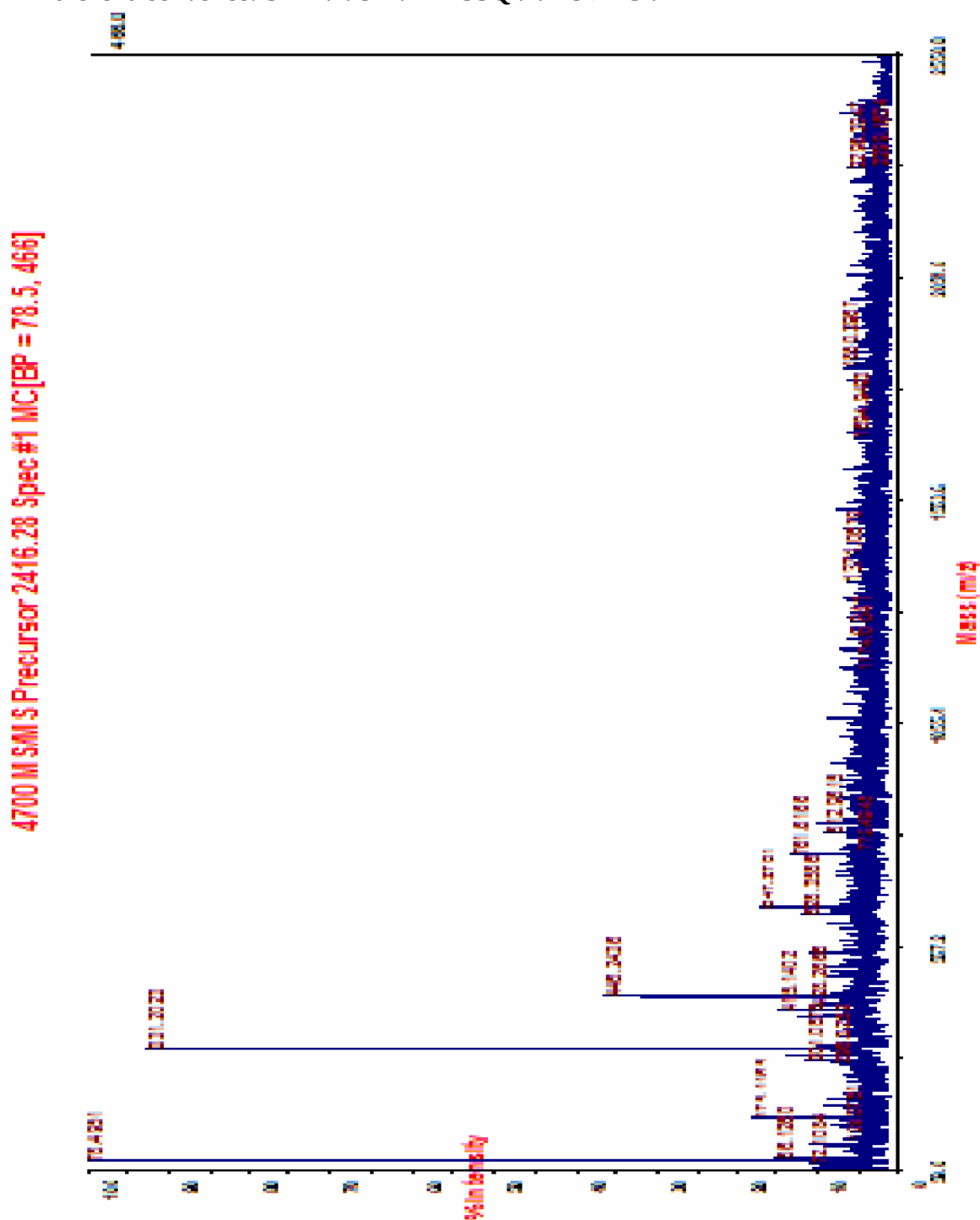
MALDI – TOF/TOF analýza

Po extrakci a pročištění štěpů se hmotností spektrometrií MALDI – TOF/TOF stanovily z naměřených MS spekter jejich molekulové hmotnosti (m/z) a následně bylo určeno pořadí aminokyselin jejich vybraných fragmentů (MS/MS spektrum). Pro prvotní vyhledávání podobností aminokyselinových sekvencí se známými strukturami proteinů se použil program Mascot (www.matrixscience.com). Vyhledávání probíhalo podle parametrů uvedených v kapitole 3.5.1.3.

MS/MS spektrum peptidu s m/z 2416,2813 pocházejícím z proteinu 1 (**obr. 31**) je znázorněno na **obr. 32**. Nalezená sekvence aminokyselin tohoto tryptického štěpu byla „SNNVVSNNILSSQVVNSDNGVR“. Tato sekvence byla podle podobnostního vyhledávání totožná se sekvencí endoPGasy *G. candidum* Ap2PG1 (Nakamura a kol. 2002)

Peptid po tryptickém štěpení 2416,2813 *m/z*

- nalezená sekvenca: SNNVVSNNILSSQVVNSDNGVR



Obr. 32: MS/MS spektrum peptidu m/z 2416,2813

Pomocí Uniprot databáze a využitím jejich prostředků jako Blast a Aligment, jako i programu Clustal W2, bylo nalezeno umístění dané sekvence v molekule Ap2PG1 a bylo provedeno porovnání struktury Ap2PG1 (**Q8NK97**) se strukturami nejpodobnějších proteinů s databází (**obr. 33**). Nejvyšší podobnost se zjistila s polygalakturonasami (endoPGasami, EC. 3.2.1.15) z *G. candidum* S31PG1 (Nakamura a kol. 2003) ¹⁶² (**Q96WQ1**), *Penicillium expansum* (**O59925**) a *Fusarium oxysporum* (**Q53UB0**).

Porovnávání struktury měly 129 identických pozic, podobných bylo 131. Charakteristika porovnávaných enzymů:

Q8NK97 (*Galactomyces geotrichum* syn. *Geotrichum candidum* Ap2PG1)

- polygalakturonasa Ap2PG1 (366 AA; 38 026 Da), rodina GH 28 vykazující polygalakturonasovou aktivitu
- primární struktura vykazuje sekvenci shodnou se sekvencí štěpu s m/z 2416,2813 získanou z proteinu 1 (**obr. 31**)

Q96WQ1 (*Geotrichum candidum* S31PG1)

- polygalakturonasa S31PG1 (368 AA; 38 133 Da), rodina GH 28 vykazující polygalakturonasovou aktivitu

O59925 (*Penicillium expansum* PEPG1)

- polygalakturonasa PEPG1 (378 AA; 38 028 Da), rodina GH 28 vykazující polygalakturonasovou aktivitu s náhodným způsobem účinku hydrolyzující vazby $\alpha(1\rightarrow4)$ -D-galaktosiduronového řetězce pektinu a dalších galakturonanů

Q53UB0 (*Fusarium oxysporum* PG1)

- polygalakturonasa PG1 (371 AA; 38 519 Da), rodina GH 28 vykazující polygalakturonasovou aktivitu

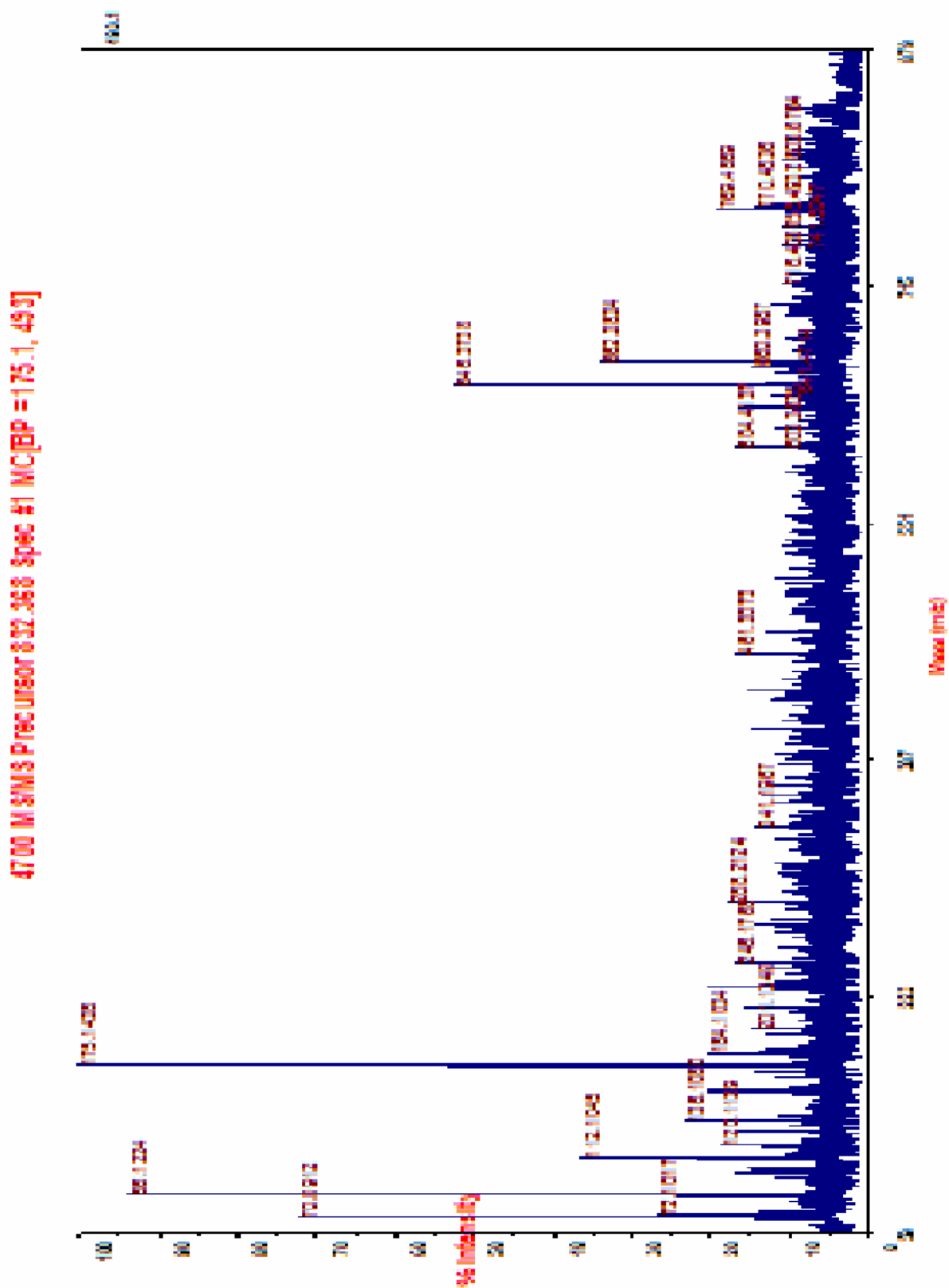
Na základě těchto výsledků lze usoudit, že protein 1 (**obr. 31**) je endoPGasa EC. 3.2.1.15. Molekulová hmotnost tohoto proteinu odpovídá podle SDS-PAGE okolo 36 kDa. Podobná molekulová hmotnost, 36,4 kDa, byla potvrzena při analýze vzorků na Bioanalyzátoru 2010 ve frakci VI (**tab. 4**). EndoPGasa Ap2PG1 produkovaná též *G. candidum*¹⁶¹, se kterou měl protein 1 shodnou 23 aminokyselin dlouhou sekvencí, měla molekulovou hmotnost 38 kDa (366 AK). Toto nebyl jediný rozdíl mezi těmito dvěma endoPGasami. Lišily se i izoelektrickým bodem; zatímco nalezená forma měla izoelektrický bod v kyselé oblasti (pI 5,2 – 6,0), Ap2PG1 měla zásaditý (pI 8,3)¹⁶¹. (Barash a kol. 1984)¹⁶⁶ izolovali endoPGasu produkovanou *G. candidum* s využitím afinitní chromatografie. Tento enzym měl molekulovou hmotnost 38 kDa identickou s molekulovou hmotností Ap2PG1, ale isoelektrický bod měl hodnotu 7,8. Dá se předpokládat, že se jedná jen o podobné formy endoPGasy, evolučně spřízněné, přičemž na základě získaných údajů nelze rozlišit, zda se jedná o projev kmenové variability anebo jiných podmínek kultivace (vliv pH).

Ap2PG1 byla označena jako typická endoPGasa patogenního kmenu *G. candidum*¹⁶¹. Další endoPGasou produkovanou patogenním druhem *G. candidum* je polygalakturonasa S31PG1¹⁶². Vzhledem na zjištěnou podobnost primárních struktur endoPGas se dá předpokládat, že *G. candidum* CCY 16-1-29 bude patřit mezi patogenní kmeny, i když byl tento izolovaný jako přirozená mikroflóra listů broskve. EndoPGasa popsaná Barashem a kol.¹⁶⁶ byla stejně jako Ap2PG1 a S31PG1 produkovaná patogenním druhem napadajícím citrusové plody^{161, 162, 166}.

Podobně jak byla vyhodnocená analýza hmotnostní spektrometrií proteinu 1, byla vyhodnocena i pro protein 2 (**obr. 31**). MS/MS spektrum peptidu s m/z 832,3676, který pocházel z tohoto proteinu, je znázorněn na **obr. 34**. Nalezená sekvence aminokyselin tohoto tryptického štěpu byla „ANASLSIR“. Tato sekvence byla podle podobnostního vyhledávání totožná se sekvencí pektinmethylesterasy (PME) *Leptoshaeria maculans* (**E4ZJT9**).

Peptid po tryptickém štěpení m/z 832,3676

- nalezená sekvence ANASLSIR



Obr. 34: MS/MS spektrum peptidu 832,3676

tr E4ZHH5 E4ZHH5_LEPMJ	---MHPSLGFIILSLAVALAATPSHPERRTAR--HSSPDGCLTVGKGGKFH	45
sp Q5B7U0 PMEA_EMENI	--MRVQSYLSLFSLVGAALCAPREHFKRTAR--TSAPAGCLTVGSGTYS	46
tr E4ZJT9 E4ZJT9_LEPMJ	MRLAIIVAGLLQACLAKSSVSRKACQNHSAKPLDGC PKGTL LVGPGQHFT	50
	: : : : : : : : : : : :	
tr E4ZHH5 E4ZHH5_LEPMJ	KVQDAVDALDKSNPKSQSCIYIAKGKYQEQTIEKIASPLIIYGETSDTSD	95
sp Q5B7U0 PMEA_EMENI	TIGAAFAALGSSSE-ACIYISAGTYKEQLTFQ-YAGPLTLYGETTDTSS	94
tr E4ZJT9 E4ZJT9_LEPMJ	SVQSAIISLPKDTSP-HHILVLAGNYTEQINVT-RPGPVLYGETDNDD	98
	: : * . : * * : * . * * : . . : : * * * : . . .	
tr E4ZHH5 E4ZHH5_LEPMJ	YNSNAVITITQGRSQ-----DNFKNENDKTATLRAHTPN-----	128
sp Q5B7U0 PMEA_EMENI	YKKNVTVTITHISS-----PEAG-SLVSATVNAAMDN-----	126
tr E4ZJT9 E4ZJT9_LEPMJ	QKKNVTNIIWRNATGSAANSTLDNAYTSVLTVAPTFNASATGSGPNGSPV	148
	: . * : * : : : : : : : : . : . * . .	
tr E4ZHH5 E4ZHH5_LEPMJ	-----LKVYNINLVNTRG--AGSQALAVSASGDKQAYYACQLIGY	166
sp Q5B7U0 PMEA_EMENI	-----FTMYNINVVNGYG--KGAQAVALAASGERQGYGCGQLFGY	164
tr E4ZJT9 E4ZJT9_LEPMJ	AKDTPFGNTDFRAYNLNFINDYRPVYVSGPSLAVSVSYANSSFYCGFYSY	198
	: : * : * : * : : : : : : : : : * : : : * : : *	
tr E4ZHH5 E4ZHH5_LEPMJ	QDTVLA-QTGKQLYAKCYIEGATDFIFGEEAFALFHGCTIGVLPKEKGKG	215
sp Q5B7U0 PMEA_EMENI	QDTLYA-RVGQYYSNICYIEGAVDYIFG-DASAWFGECDI---VSNGAG	208
tr E4ZJT9 E4ZJT9_LEPMJ	QDTVYVGKLGNGAYFYRNEIAGITDFLYG-FGTAWIQSSLLTLRGCGGGIT	247
	* : : : * : . * * . : : * : * : : : : : : *	
tr E4ZHH5 E4ZHH5_LEPMJ	HITANGADDESNSKIFVIENSSIAAARDKSVKDGSYTLGRPWHHARTVF	265
sp Q5B7U0 PMEA_EMENI	YITAMSRETASDPAWYCFDHCNIYKSGLDLTGDVY-LGRPWRVLARVIY	257
tr E4ZJT9 E4ZJT9_LEPMJ	AWKGTNTTFANKYGVYIHNSNIVK ANASLSIRG KCA-LGRPWNEQHRSLF	296
	 : : : . . : : : * * * * *	
tr E4ZHH5 E4ZHH5_LEPMJ	QNCDSLAVINEVGWSTWNDNDPRN-DYAFFGEYGN TGKGALGKRPKW---	311
sp Q5B7U0 PMEA_EMENI	QNSELSDIINAAGWTTMAEG-----ATPLYYEIGNTG DGADTSKRLY---	299
tr E4ZJT9 E4ZJT9_LEPMJ	ANCYMDDSIQPGGYIRWSTTDPRINANTTMAEYKSYGPGWDEKARVAGNT	346
	* . : . * : * : : : : * . * * .	
tr E4ZHH5 E4ZHH5_LEPMJ	-----VKQLKKPIAITEVLDK-----DYKSWTDASYLG-----	339
sp Q5B7U0 PMEA_EMENI	-----LSEISAAVTKATVLGS-----DWTDWLDWSY-----	325
tr E4ZJT9 E4ZJT9_LEPMJ	TAVWGEKEMEGWRGVGDVVFQFPGEGRGGNGVWIDKEVLVEGGMVGFKGGV	396
	: . : . * : : : . * * .	
tr E4ZHH5 E4ZHH5_LEPMJ	----	
sp Q5B7U0 PMEA_EMENI	----	
tr E4ZJT9 E4ZJT9_LEPMJ	EGGE 400	

Porovnávané struktury měly 57 identických pozic, podobných bylo 105. Charakteristika porovnávaných enzymů:

E4ZJT9 (*Leptosphaeria maculans*)

- pektinmethylesterasa (400 AA; 43 167 Da), rodina CE 8, pektinesterasová rodina vykazující aspartylesterasovou a pektinesterasovou aktivitu
- primární struktura vykazuje sekvenci zhodnou se sekvencí štěpu s m/z 832,3676 získanou z proteinu 2 (**obr. 31**)

E4ZHH5 (*Leptosphaeria maculans*)

- pektinesterasa (339 AA; 36 927 Da), rodina CE 8, pektinesterasová rodina s pektin esterazovou aktivitou

Q5B7U0 *Emmericella nidulans*, syn. *Aspergillus nidulans*

- pektinmethylesterasa A, pmeA (325 AA; 34 859 Da), rodina CE 8, pektinesterasová rodina s pektinesterasovou aktivitou

Uvedené výsledky naznačují, že protein 2 (**obr. 31**) by mohl být PME, EC. 3.1.1.11. Molekulová hmotnost tohoto proteinu odpovídala podle SDS-PAGE okolo 44 kDa. Podobná molekulová hmotnost, 44,4 kDa, byla stanovená při analýze vzorků na Bioanalyzátoru 2010 ve frakci IX (**tab. 5**). Proteiny frakce IX byly uvolňované z kolony s náplní CM Sephadexu C-50 až 1 M NaCl, což naznačuje bazický charakter izoelektrického bodu tohoto proteínu.

Z dostupné literatury není produkce PME u druhu *G. candidum* potvrzena, avšak vzhledem na funkci tohoto enzymu se dá očekávat. Pektinmetylesterasa totiž demetyluje v pektinu homogalakturonan a tím připravuje substrát pro PGasy.

Protein 3 (**obr. 31**) se pomocí hmotnostní spektrometrie analyzovat nepodařilo, i když molekulová hmotnost 50 kDa stanovená SDS-PAGE naznačovala, že by se mohlo jednat o exoPGasu. Protein se stejnou molekulovou hmotností byl identifikovaný při analýze vzorků na Bioanalyzátoru 2010 i ve frakci VIII. Kdyby šlo skutečně o tento enzym, na základě uvolňování z kolony s CM Sephadexem C-50 (část 5.6) by se dalo usuzovat, že jde o majoritní PGasu s méně kyselým izoelektrickým bodem (**obr. 27**), protože endoPGasa se uvolňovala ve frakci VI.

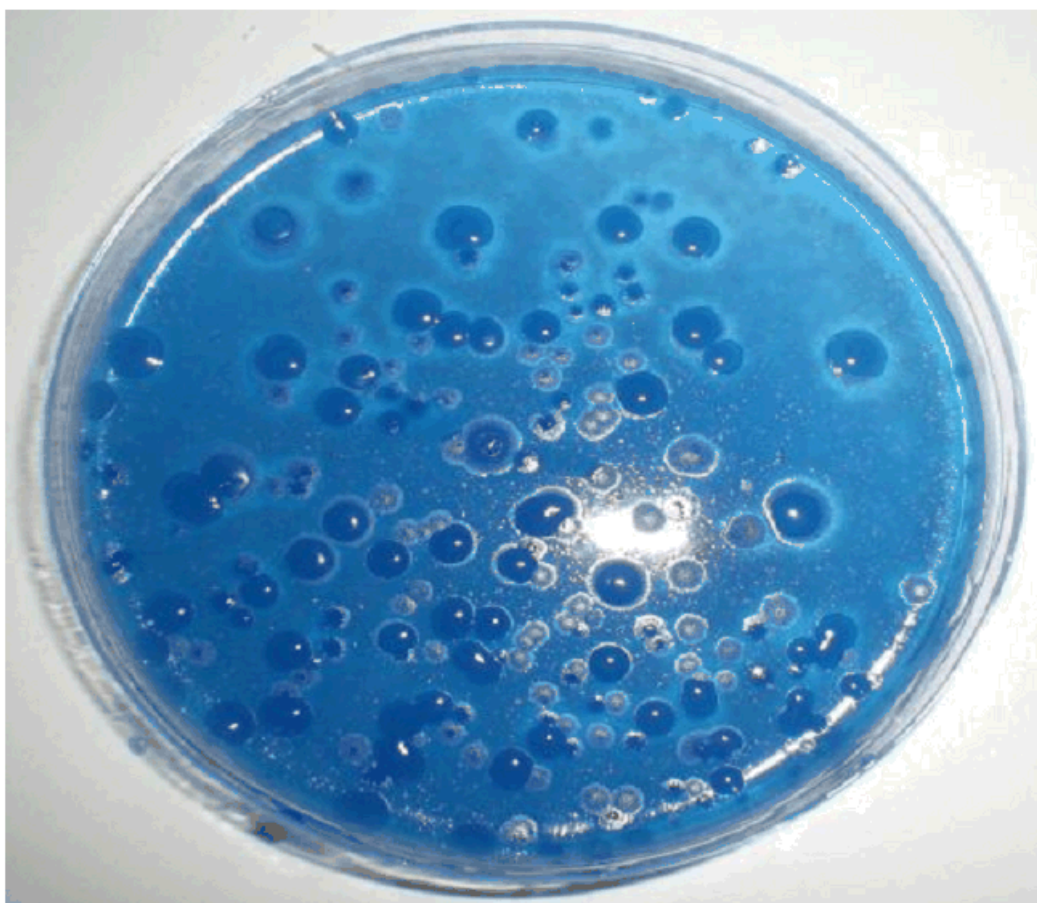
6 Produkce lipas

Tato část dizertační práce byla zaměřena na studium vlastností komerčního přípravku SanyDuo degradovat lipidy v odpadních vodách. Nejprve byl proveden důkaz přítomnosti mikroorganismů v přípravku, důkaz lipolytické aktivity, stanovení lipolytické aktivity a porovnání schopnosti degradovat různé lipidové substráty. Byla provedena identifikace mikroflóry přítomné v komerčním přípravku a nakonec testování a sledování podmínek produkce lipas u vybraných mikrobiálních kmenů pro vývoj nového produktu.

6.1 Studium vlastností komerčního přípravku

6.1.1 Důkaz lipolytické aktivity mikroflóry přítomné v komerčním přípravku

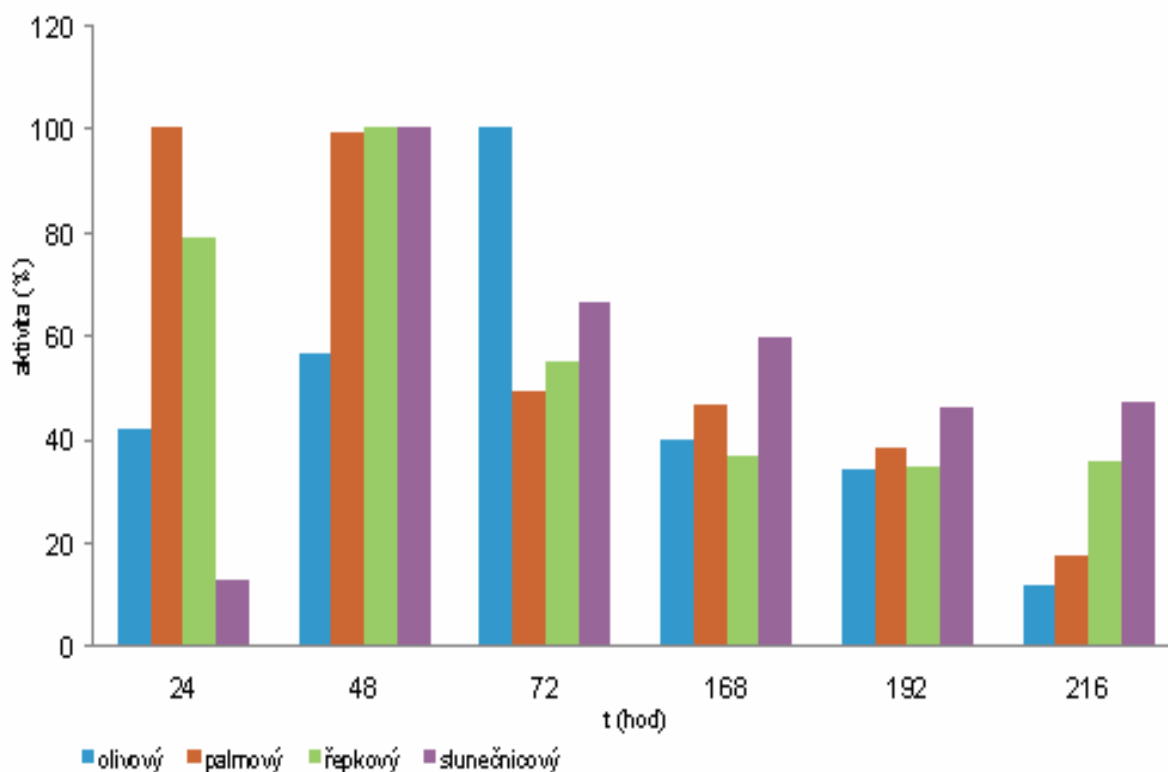
Spirit blue agar byl použit k důkazu lipolytické aktivity mikroflóry přítomné v komerčním přípravku (KP). KP naředěný v poměru 1:100 byl zaočkován na spirit blue agar a po uplynutí 72 h inkubační doby (30 °C) byla vyhodnocena přítomnost mikroflóry s lipolytickou aktivitou. Důkaz lipolytické aktivity se projevil světlými prstenci v okolí mikrobiálních kolonií **obr. 36**.



Obr. 36: Spirit blue agar indikující důkaz lipolytické aktivity komerčního přípravku

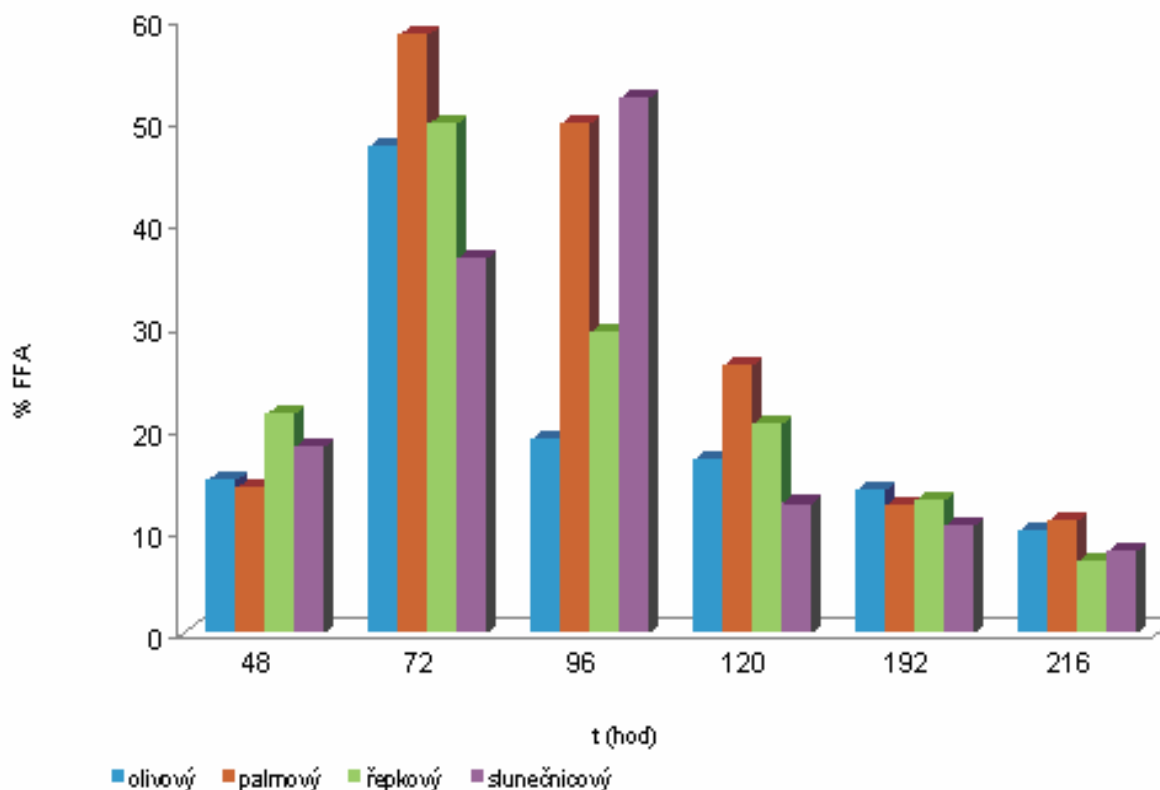
6.1.2 Sledování lipolytické aktivity a uvolněných mastných kyselin

Lipolytická aktivita byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 420 nm. Jako substrát byl využit 2,5 mM p-nitrophenyllaurát v ethanolu. Hydrolytická reakce probíhala při 37 °C po dobu 30 minut. Jako modelová odpadní voda bylo použito kultivační médium o složení: 1,12 g K_2HPO_4 ; 0,48 g KH_2PO_4 ; 5,00 g NaCl; 0,10 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 2,00 g $(NH_4)_2SO_4$; 0,10 mg EDTA a 2 % lipidový substrát jako uhlíkatý zdroj (olivový, palmový, slunečnicový, řepkový olej). Lipolytická aktivita KP byla stanovena na různé lipidové substráty **obr. 37**. Nejvyšších hodnot lipolytické aktivity KP bylo dosaženo první a druhý den v případě, kdy substrátem byl palmový a řepkový olej. Vyšší aktivita u ostatních substrátů (olivový a slunečnicový olej) se projevila až ve druhém a třetím dni kultivace. Závěrem lze říci, že lipolytická aktivita byla ovlivněna složením lipidových substrátů (odlišné složení a obsah mastných kyselin). Toto zjištění by bylo třeba zohlednit při aplikaci KP na odpadní vody, kdy lze počítat s pomalejším nárůstem biomasy KP v souvislosti s typem uhlíkatého zdroje v odpadních vodách.



Obr. 37: Lipolytická aktivita kmečního přípravku s použitím různých substrátů

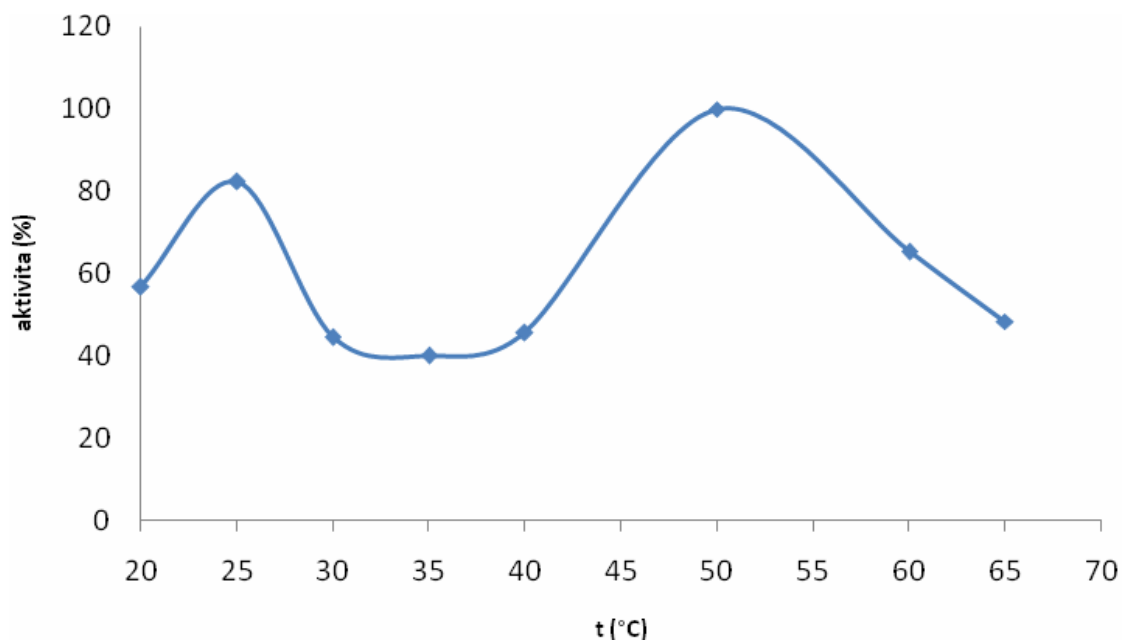
Stanovení uvolněných mastných kyselin bylo provedeno za účelem zjištění schopnosti KP degradovat lipidové substráty a využívat produkty této degradace jako zdroj uhlíku. Olivový, palmový, řepkový a slunečnicový olej byly použity jako lipidový substrát pro modelové odpadní vody. Nejlépe degradovatelným substrátem byl palmový olej (60 % FFA) po třech dnech kultivace, pak následoval řepkový (50 % FFA) a olivový olej (47 % FFA). Slunečnicový olej (52 % FFA) dosáhl nejlepší degradovatelnosti až po pěti dnech **obr. 38**. Z tohoto experimentu lze opět posoudit vliv složení substrátu na odpadní vodu.



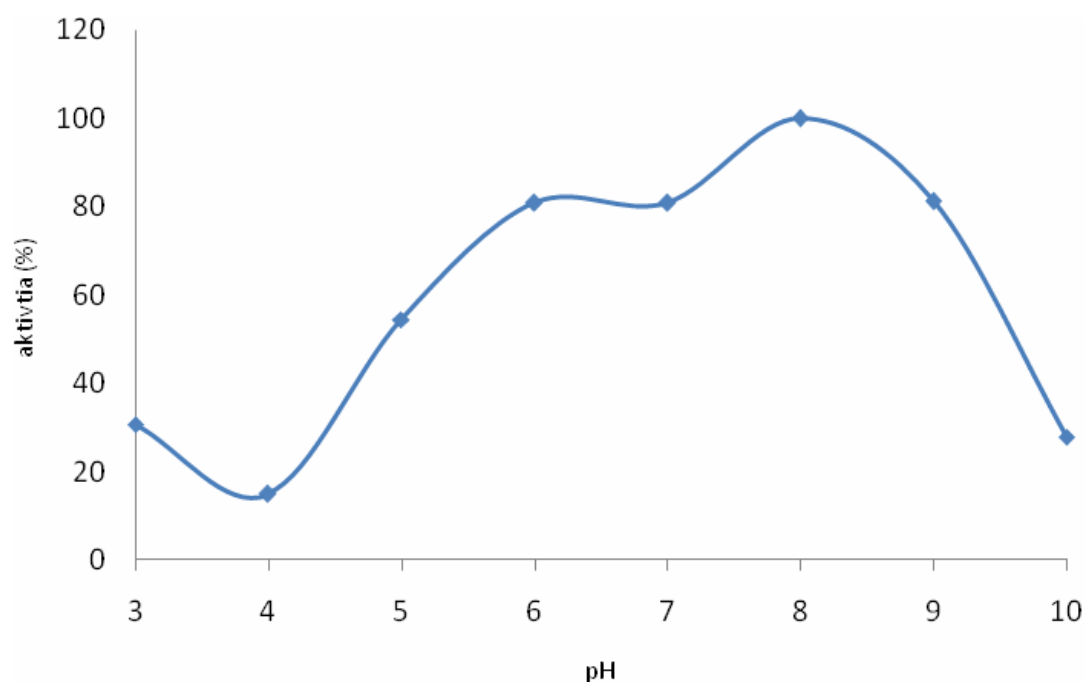
Obr. 38: % uvolněných mastných kyselin sledovaná při degradaci olejnatých substrátů

6.1.3 Vliv pH a teploty na produkci lipas komerčního přípravku

Lipasy produkované v průběhu kultivace do prostředí fermentačního média byly charakterizovány z hlediska teploty a pH. Teplotní rozmezí, ve kterém byla sledována teplota produkovaných lipas byla v rozmezí teplot 20 – 65 °C. Na základě tohoto sledování byly zjištěny dvě optimální teploty vhodné pro produkci lipas. První teplota produkce lipas při 25 °C a druhá teplota při 50 °C (**obr. 39**). Současně byl sledován i vliv pH na produkci lipas. pH bylo sledováno v rozmezí pH 3,0 – 10,0. První optimální pH bylo stanoveno při hodnotě pH 6,0; druhé pH při hodnotě pH 8,0 (**obr. 40**).



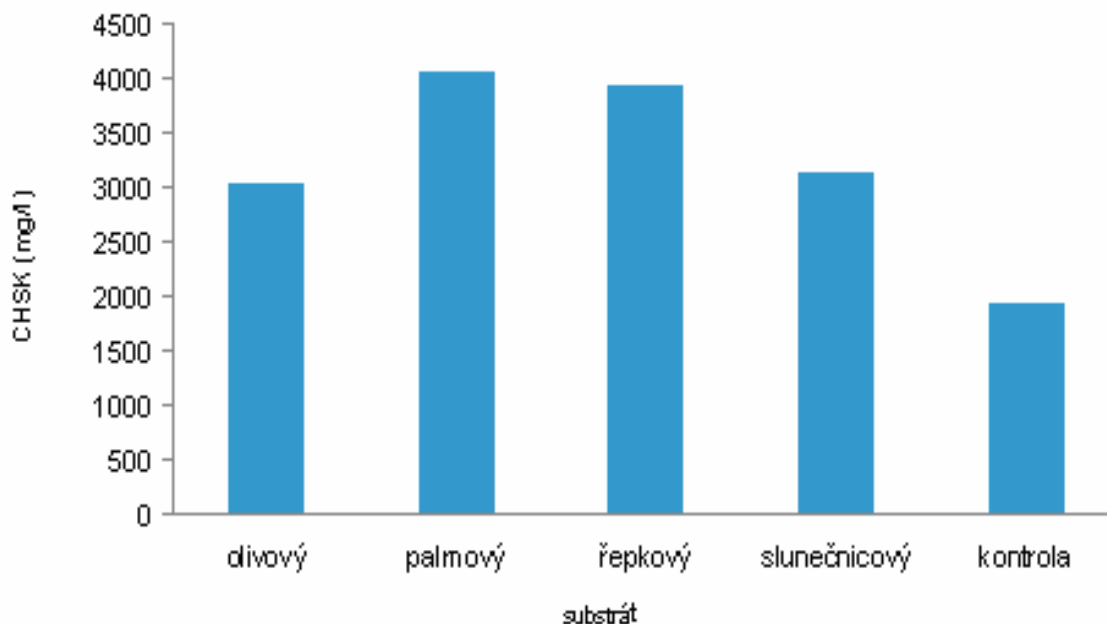
Obr. 39: Vliv teploty na produkci extracelulárních lipas komerčního přípravku



Obr. 40: Vliv pH na produkci extracelulárních lipas komerčního přípravku

6.1.4 Organické znečištění odpadních vod

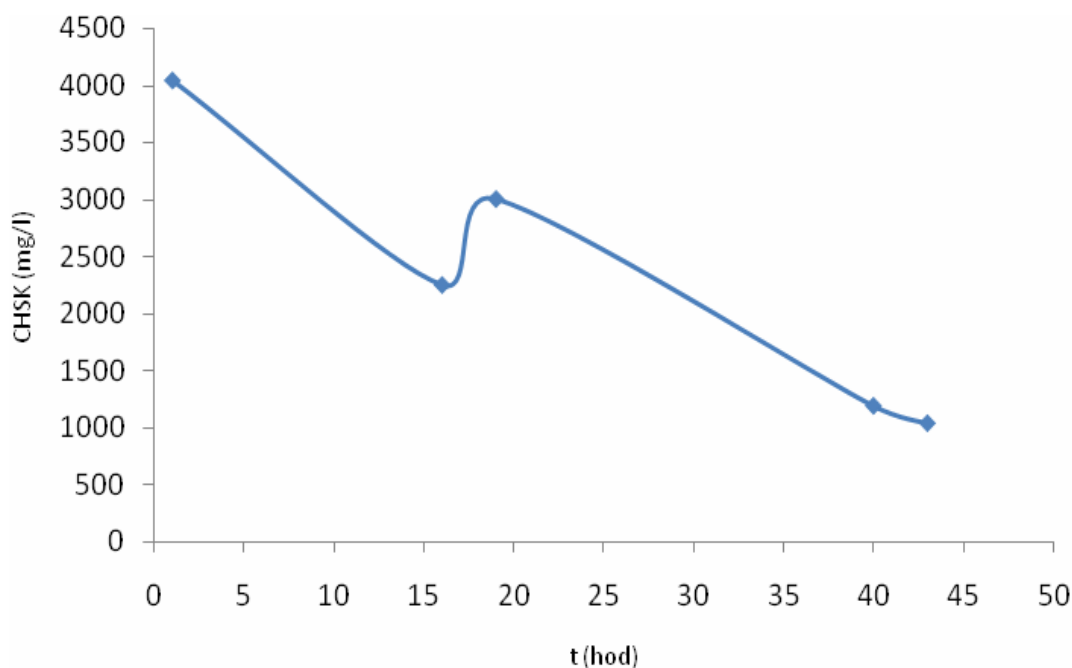
Chemická spotřeba kyslíku, jako ukazatel obsahu oxidovatelných organických látek a zároveň organického znečištění odpadních vod, byla stanovena dichromanovou metodou CHSK na modelové odpadní vody (kultivační médium doplněné různými lipidovými substráty a aplikace komerčního přípravku). Jako kontrola byla použita vodovodní voda. Na **obr. 41** a **tabulce 7** je znázorněn obsah oxidovatelných organických látek v jednotlivých modelových odpadních vodách.



Obr. 41: Obsah oxidovatelných organických látek v modelových odpadních vodách (mg/l)

Tab. 7: Obsah oxidovatelných organických látek v modelových odpadních vodách (mg/l)					
substrát	olivový	palmový	řepkový	slunečnicový	kontrola
mg/l	3020	4040	3920	3130	1930

Tímto stanovením byla zjištěna míra organického znečištění modelových odpadních vod. Bylo zjištěno, že nejvíce znečištěnou odpadní vodou byla modelová odpadní voda s přidavkem palmového oleje (koncentrace organických látek 4040 mg/l). Tento lipidový substrát byl zároveň vyhodnocen jako nejlépe degradovatelný substrát s nejvyšší produkcí lipas **obr. 38**. V další části byla sledována závislost koncentrace organických látek na čase (měření probíhalo po dobu dvou dnů). Ukazatel obsahu oxidovatelných látek byl sledován pro modelovou odpadní vodu (**obr. 42**) s přidavkem palmového oleje, který byl vyhodnocen jako nejlépe degradovatelný substrát.



Obr. 42: Závislost koncentrace organických látek na čase

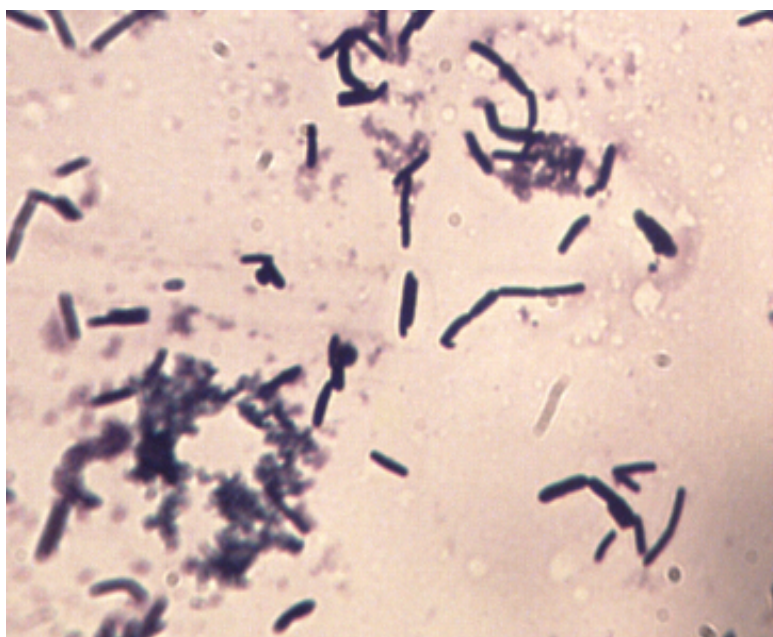
Z uvedeného **obr. 42** je možno rozeznat tři fáze průběhu poklesu organických látek. V první fázi došlo k poklesu oxidovatelných látek, zatímco v druhé fázi k jejich zvýšení. Toto lze vysvětlit postupným nárůstem biomasy, kdy přítomná mikroflóra začala využívat organické látky ke svému rozmnožování. Ve třetí a zároveň poslední fázi poklesu docházelo k metabolizaci organických látek na jednoduché sloučeniny a jejich vylučování do prostředí. Závěrem lze říci, že během dvou dnů došlo k výraznému snížení obsahu organických látek v modelové odpadní vodě (o 74 %, výchozí koncentrace 4040 mg/l na konečnou koncentraci 1038 mg/l) a zároveň degradaci lipidového substrátu pomocí mikroflóry přítomné v komerčním přípravku na nižší metabolity.

6.1.5 Identifikace mikroflóry přítomné v komerčním přípravku

Identifikace mikroflóry v komerčním přípravku SanyDuo (Sanytura GmbH) byla provedena pomocí molekulárně genetických metod. Předpokladem byla přítomnost bakterií rodu *Bacillus* (online Odlučovače tuků a ropných látek)¹¹⁶. Jedním z prvních testů bylo rozlišení grampozitivních a gramnegativních bakterií a potvrzení domény *Bacteria*. Zástupci rodu *Bacillus* byli identifikováni v rodově specifické PCR. Identifikace jednotlivých druhů *Bacillus* byla provedena pomocí amplifikované ribozomální DNA restrikční analýzy (ARDRA). Identifikace mikroflory komerčního přípravku proběhla za účelem identifikace druhového mikrobiálního zastoupení pro návrh nového produktu do odlučovače tuků.

6.1.5.1 Gramovo barvení

Gramovo barvení bylo využito k rozlišení grampozitivních (G+) a gramnegativních (G-) bakterií komerčního přípravku. Rozdíl v barevnosti je dán odlišným složením buněčné stěny bakterií, G+ se barví modrofialově, G- do růžova. Bakterie přítomné v KP byly G+ typu, **obr. 43** (zvětšeno světelným mikroskopem 15 x 100, imerzní objektiv, tyčinkovité bakterie G+).

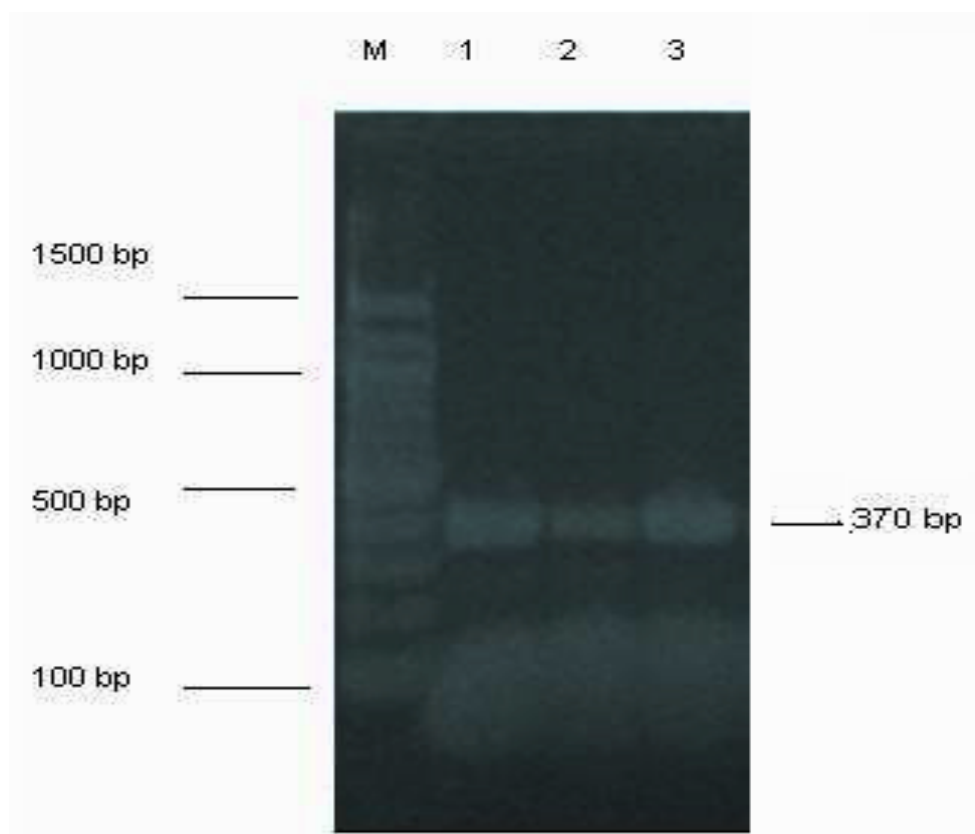


Obr. 43: G⁺ tyčinkovité bakterie komerčního přípravku SanyDuo (Sanytura GmbH), zvětšeno světelným mikroskopem 15 x 100, pozorováno imerzním objektivem)

6.1.5.2 Doménově specifická polymerázová řetězová reakce

Předpokladem pro potvrzení přítomnosti domény *Bacteria* byla izolace DNA. Izolace DNA byla provedena pomocí fenolové extrakce. Koncentrace a čistota izolované a purifikované DNA byla ověřena spektrofotometricky.

Samotné ověření probíhalo metodou polymerázové řetězové reakce za použití dvou univerzálních bakteriálních primerů DG74 (5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3') a RW01 (5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3'), (Greisen a kol 2004)¹⁴⁸. PCR směs a podmínky PCR cyklu jsou uvedeny v kapitole 3.2.4.3. Specifita univerzálních bakteriálních primerů pro doménu *Bacteria* byla potvrzena polymerázovou řetězovou reakcí izolované genomové DNA bakterií komerčního přípravku s detekcí ampliconů agarózovou gelovou elektroforézou. Velikost ampliconů (370 bp) odpovídala velikosti PCR produktů získaných po amplifikaci DNA s univerzálními bakteriálními primery **obr. 44**. Pro vyloučení falešně pozitivních výsledků byla jako kontrola použita genomová DNA sbírkového kmene *Bacillus subtilis* CCM 1999 (Czech Collection of Microorganisms, Masarykova Univerzita).

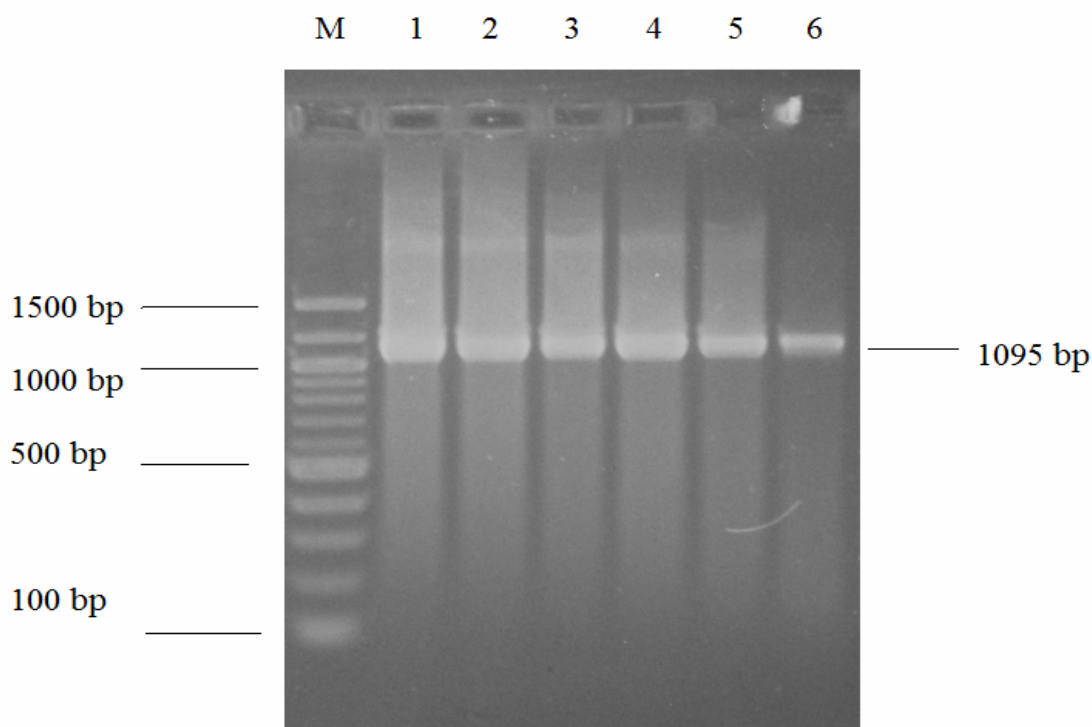


Obr. 44: Agarózová gelová elektroforéza amplifikované DNA s využitím doménově specifických primerů DG74 a RW01 (370 bp): M – DNA standard; 1, 2 – bakterie izolované z komerčního přípravku; 3 – kontrola *B. subtilis* CCM 1999

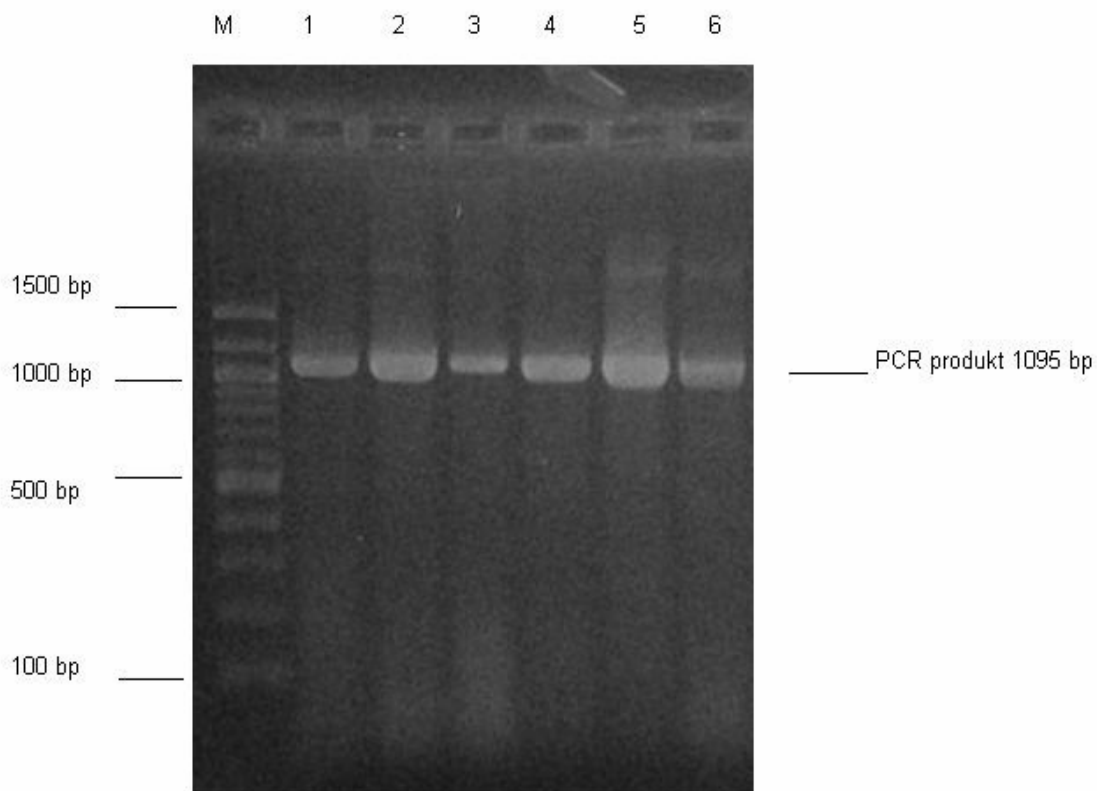
6.1.5.3 Rodově specifická polymerázová řetězová reakce

Pro izolaci DNA bakterií byly použity dvě metody. Standardní metoda fenolové extrakce a alternativní metoda zvyšující citlivost PCR a vedoucí ke snížení falešně negativních výsledků plynoucí z přítomnosti PCR inhibitorů v reálném vzorku (KP). Izolace DNA byla provedena pomocí magnetických P (HEMA-co-GMA) částic pokrytých karboxylovými skupinami. Stejný postup byl použit s úspěchem při izolaci bakteriální DNA z mléčných výrobků (Kubisz 2010)¹⁴⁷.

Pro polymerázovou řetězovou reakci byly použity specifické primery pro rod *Bacillus* sp. BK1/F (5'-TCACCAAGGCAACGATGCG-3') a BK1/R (5'-CGTATTCACCGCGGCATG-3'), byly amplifikovány PCR produkty o velikosti 1095 bp (Xi-Yang a kol. 2006)¹⁴⁹. Specifita rodově specifických primerů *Bacillus* byla potvrzena polymerázovou řetězovou reakcí s detekcí agarózovou gelovou elektroforézou. Na **obr. 45** je uvedena rodově specifická PCR s DNA izolovanou metodou fenolové extrakce, na **obr. 46** rodově specifická PCR DNA izolovaná pomocí magnetických částic P (HEMA-co-GMA). Izolace DNA pomocí magnetických částic P (HEMA-co-GMA) se ukázala efektivnější. Výhodou izolace DNA pomocí magnetických částic P (HEMA-co-GMA) byla rychlost izolace DNA, lepší kvalita a čistota izolované DNA. Kvalita izolované DNA se projevila při amplifikaci PCR produktů. Tento rozdíl je pozorovatelný na uvedených obrázcích. Zároveň také došlo ke snížení inhibitorů PCR reakce.



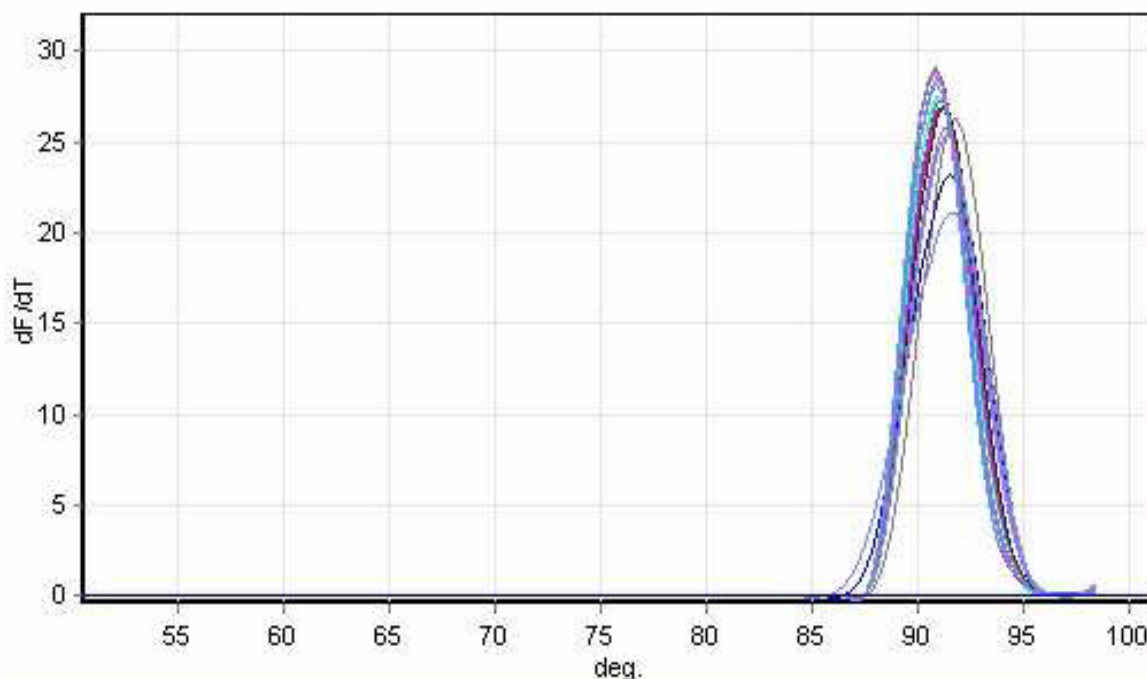
Obr. 45: Detekce PCR produktů pomocí agarózové gelové elektroforézy. S využitím rodově specifických primerů BK1/F a BK1/R byla amplifikována DNA izolovaná fenolovou extrakcí: M – DNA standard; 1, 2 – bakterie komerčního přípravku; 3 – *B. subtilis* CCM 1999, 4 – *B. licheniformis* CCM 2145^T; 5 – *B. megaterium* CCM 2037; 6 – *B. cereus* CCM 2010^T



Obr. 46: Detekce PCR produktů pomocí agarózové gelové elektroforézy. S využitím rodově specifických primerů BK1/F a BK1/R byla amplifikována DNA izolovaná pomocí magnetických částic P (HEMA-co-GMA): M – DNA standard; 1, 2 – bakterie komerčního přípravku; 3 – *B. subtilis* CCM 1999, 4 – *B. licheniformis* CCM 2145^T; 5 – *B. megaterium* CCM 2037; 6 – *B. cereus* CCM 2010^T

6.1.5.4 Rodově specifická polymerázová řetězová reakce v reálném čase

RT-PCR reakce byla provedena s rodově specifickými primery BK1/F a BK1/R specifickými pro rod *Bacillus* (Xi-Yang a kol. 2006) ¹⁴⁹. Kvalita izolované DNA pomocí magnetických částic P (HEMA-co-GMA) byla ověřena PCR v reálném čase. Touto metodou došlo k vyloučení nespecifických PCR produktů. RT-PCR byla provedena s použitím SYTO-qPCR 2x Master Mix (Top-Bio, Česká Republika) za podmínek uvedených v kapitole 3.2.3.4. Měření proběhlo na termocycleru Corbett Rotor-Gene 6000 pomocí vyhodnocovacího softwaru Rotor-Gene 6000 Software 1.7. Na **obr. 47** jsou uvedeny křivky tání, které se používají k ověření specifity amplifikovaných produktů. Specifické produkty se odlišují od nespecifických jinou teplotou tání.

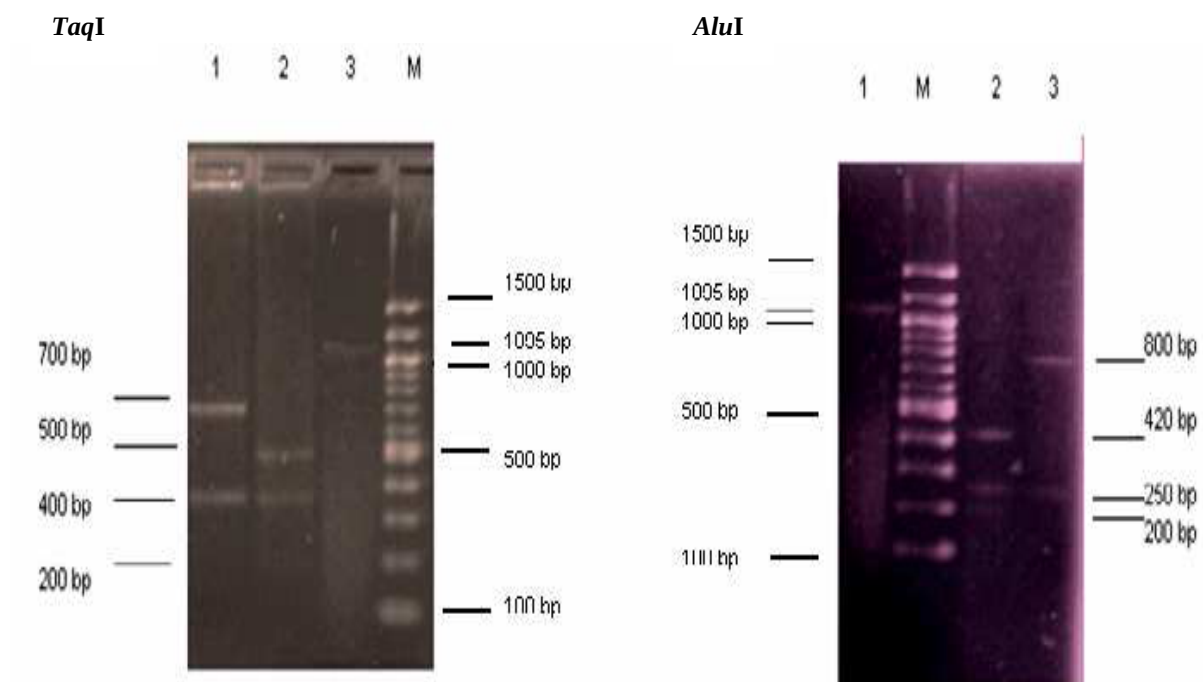


Obr. 47: Křivky tání - ověření specifity RT-PCR produktů

Specifita rodově specifických primerů BK1/F a BK1/R pro rod *Bacillus* byla ověřena PCR v reálném čase s DNA izolovanou pomocí magnetických částic P (HEMA-co-GMA) bakterií z komerčního přípravku a DNA extrahovanou z referenčních vzorků *Bacillus* sp. Zároveň byla vyloučena nespecifičnost PCR produktů. Důkazem byly křivky tání se shodnou teplotou tání (92 °C) ve všech případech amplifikace produktů.

6.1.5.5 Amplifikovaná ribozomální DNA restrikční analýza

Bacillus sp. izolované z komerčního přípravku byly identifikovány po kultivaci na Brain Heart Infusion Broth s přídavkem agaru. Na agarových plotnách byly pozorovány dva typy morfologicky odlišných kolonií. Kolonie byly přečištěny 3x pomocí křížového roztěru. Identifikace druhů byla provedena metodou ARDRA. Amplifikony byly štěpeny restrikčními endonukleasami typu *AluI* a *TaqI*. Amplikony byly před štěpením přečištěny magnetickými částicemi P (HEMA-co-GMA). Při ARDRA analýze byly štěpeny i referenční druhy *Bacillus* pro srovnání štěpených produktů komerčního přípravku. Zároveň byly vyhledány teoretické pozice ARDRA *Bacillus* sp. digestů dostupné na internetových stránkách <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. ARDRA metodou s použitím *TaqI* restrikční endonukleasy byly v komerčním přípravku identifikovány bakteriální druhy: *Bacillus cereus* (400, 700 bp fragmenty) a *Bacillus licheniformis* (200, 350, 500 bp fragmenty; s použitím *AluI* restrikční endonukleasy: *Bacillus subtilis* (200, 200, 250, 400 bp fragmenty) a *Bacillus licheniformis* (250, 800 bp fragmenty) – **obr. 48**.



Obr. 48: *TaqI*: 1 – *B. cereus*, 2 – *B. licheniformis*, 3 – neštěpený PCR produkt, M – DNA standard; *AluI*: 1 – neštěpený PCR produkt, M – DNA standard, 2 – *B. subtilis*, 3 – *B. licheniformis*

Technika amplifikované ribozomální DNA restrikční analýzy byla použita pro taxonomickou studii bakterií rodu *Bacillus*. Pro tuto techniku byly zvoleny rodově specifické primery BK1/F a BK1/R a spolu s restriktasami *AluI* a *TaqI* byly použity k identifikaci bakterií v komerčním přípravku. V komerčním přípravku byly identifikovány bakterie rodu *Bacillus*, konkrétně druhy *B. cereus*, *B. subtilis* a *B. licheniformis*. Bakteriální DNA izolovaná nově syntetizovanými magnetickými částicemi poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate), P (HEMA-co-GMA) byla vysoké kvality a vhodná pro PCR. Ve srovnání s izolací DNA metodou fenolové extrakce, byla tato technika jednodušší a rychlejší.

6.2 Testování vybraných bakteriálních kmenů pro vývoj nového přípravku

Cílem této části bylo otestovat vybrané mikrobiální kmeny pro vývoj nového přípravku do odlučovače tuků.

Testované mikrobiální kmeny:

- *Bacillus subtilis* CCM 1999
- *Geobacillus thermodenitrificans* CCM 2566^T
- *Geobacillus thermocatenulatus* CCM 2809^T
- směsná kultura bakterií *Bacillus* a *Thermus*

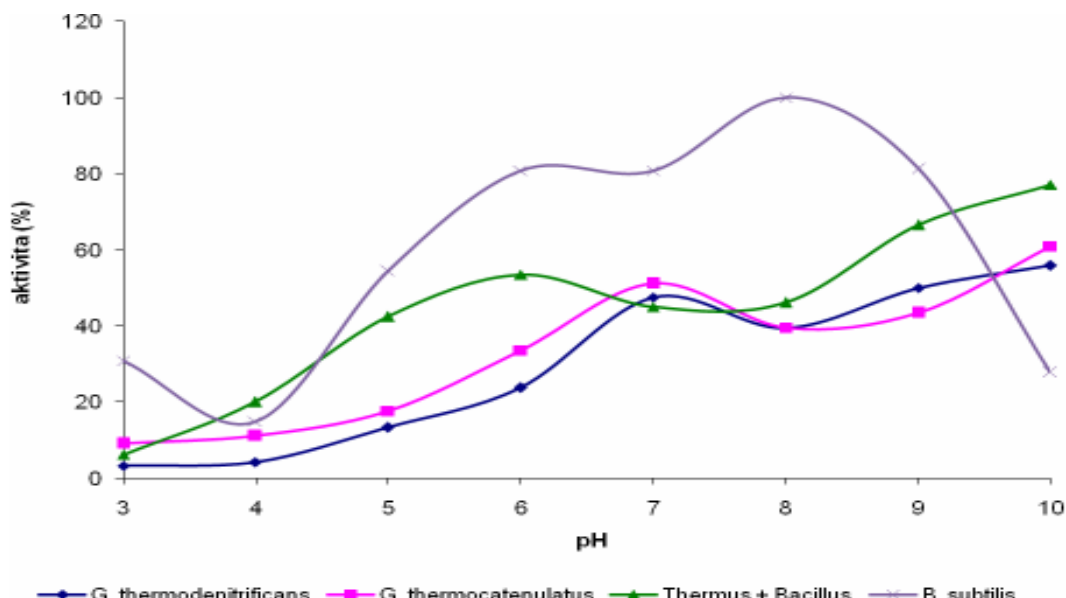
Z kapitoly 6.1.3 s názvem Stanovení vlivu pH a teploty na produkci lipas komerčního přípravku viz **obr. 39** a **40** vyplynulo, že identifikované bakterie z komerčního přípravku produkovaly lipasy v optimálním rozsahu pH 6,0 – 8,0. Přičemž optimální teplota pro produkci lipas bakteriemi komerčního přípravku byla stanovena při teplotách 25 °C a 50 °C. Tyto stanovené hodnoty pH a teplot byly porovnány s hodnotami naměřenými u výše zmíněných kmenů. Na základě výsledků pak byl navržen vhodný kmen pro nový přípravek do odlučovače tuků. Byl sledován vliv pH, vliv teploty a vliv tenzidu na produkci lipas.

6.2.1 Vliv pH na produkci lipas

Stanovení optimálního pH pro produkci lipas představovalo důležitý faktor pro nárůst mikrobiální biomasy. pH bylo stanoveno v rozmezí hodnot pH 3,0 – 10,0 pro všechny uvedené druhy mikroorganismů, optimální pH jsou uvedena v **tab. 8** a na **obr. 49**. U všech bakteriálních druhů byly stanoveny dvě formy produkovaných lipas. Shodná pH vykazoval komerční přípravek spolu s kulturou *B. subtilis*, a to při pH 6,0 a 8,0. Bora a kol. 2008¹⁷⁸ sledovali produkci lipas termofilním kmenem *B. subtilis* DH4 a zjistili maximální produkci při pH 9,0 po 36 hodinách kultivace. Tento enzym byl stabilní v rozmezí pH 6,0 -10,0. Toto rozmezí pH bylo zjištěno i u termofilních druhů *Geobacillus thermodenitrificans*, *Geobacillus thermocatenulatus* a směsné kultury *Bacillus* a *Thermus*. Alkalická lipasa nachází využití v průmyslu detergentů (Bora a kol. 2008)¹⁷⁸.

Tab. 8: Hodnoty pH stanovené pro produkci lipas u jednotlivých kmenů

KP	<i>B. subtilis</i>	<i>G. thermodenitrificans</i>	<i>G. thermocatenulatus</i>	<i>Bacillus</i> + <i>Thermus</i>
pH 6,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 7,0	pH 6,0
pH 8,0	pH 8,0	pH 10,0	pH 10,0	pH 10,0



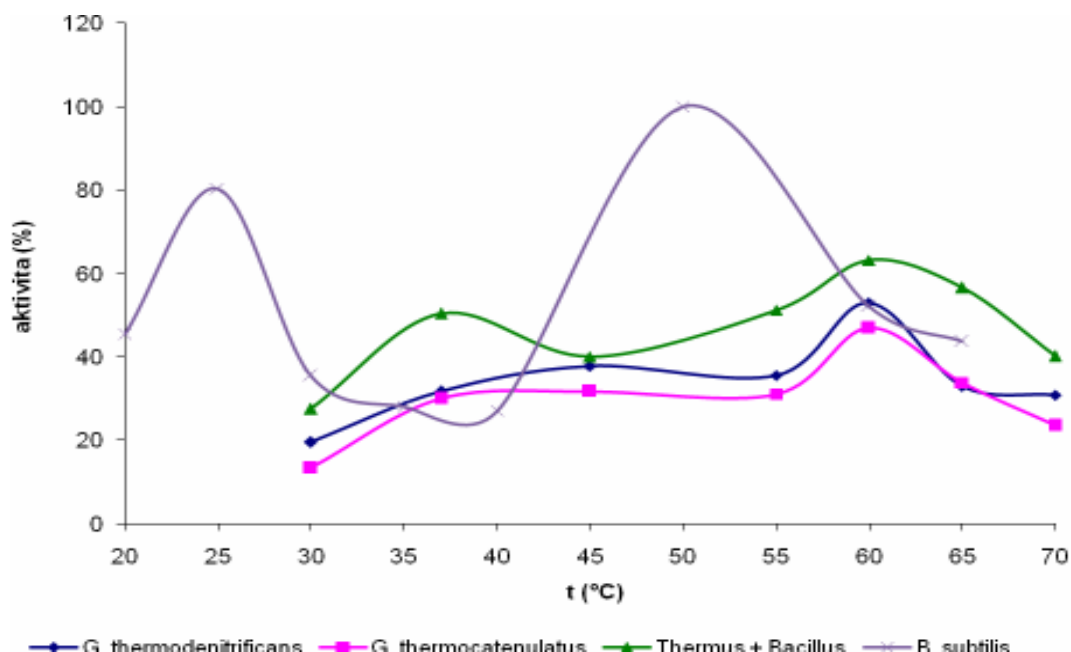
Obr. 49: Vliv pH na produkci lipas bakteriálními druhy *G. thermodenitrificans*; *G. Thermocatenulatu*, směsnou termofilní kulturou *Bacillus* a *Thermus* a *Bacillus subtilis*

6.2.2 Vliv teploty na produkci lipas

Vliv teploty představoval další důležitý faktor pro růst, množení a produkci lipas. U všech bakteriálních druhů byly stanoveny dvě optimální teploty, při kterých jsou lipasy uvolňovány do prostředí, a zřejmě se jedná o dvě formy produkovaných lipas, **tab. 9**. Produkce lipas byla zaznamenána při teplotách 25 °C a 50 °C pro komerční přípravek a bakteriální kmen *B. subtilis* CCM 1999. V rozmezí teplot 30 – 70 °C pak pro termofilní druhy a směsnou kulturu, **obr. 50**. Teploty stanovené u termofilních druhů pak optimální teploty, při kterých byly produkovány lipasy 45 °C a 60 °C a teploty produkce lipas u směsné kultury teploty 37 °C a 60 °C. Bora a kol. 2008¹⁷⁸ izolovali alkalickou lipasu produkovanou termofilním kmenem *B. subtilis* DH4 v pozdně stacionární růstové fázi s teplotním optimem 50 °C na rostlinných olejích, které byly použity jako zdroj uhlíku. Mezofilní druh *Bacillus* (Mohan a kol. 2008)¹⁷⁹ produkoval extracelulární lipasu při pH 7,0 s optimálními teplotami 27°C, 37 °C a 47 °C. Tato publikovaná teplotní optima byla v souladu s výsledky získanými při sledování vlivu teploty na produkci lipas u komečního přípravku a kmene *B. subtilis* CCM 1999.

Tab. 9: Vliv teploty na lipasy produkované do prostředí

KP	<i>B. subtilis</i>	<i>G. thermodenitrificans</i>	<i>G. thermocatenulatus</i>	<i>Bacillus + Thermus</i>
25 °C	25°C	45 °C	45 °C	37 °C
50 °C	50 °C	60 °C	60 °C	60 °C

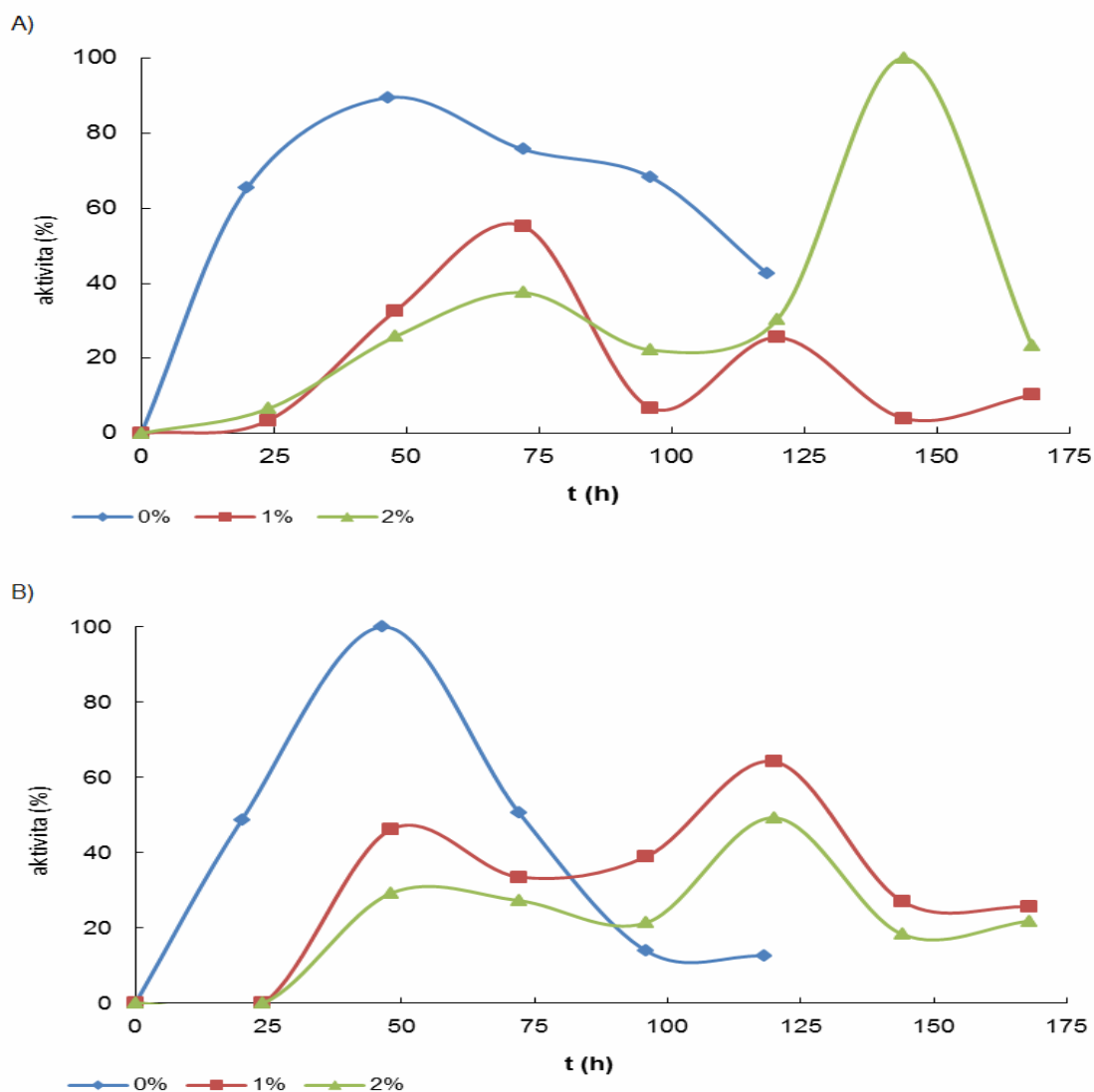


Obr. 50: Vliv teploty na lipasy produkované druhy *G. thermodenitrificans*; *G. Thermocatenulatus*; směšnou termofilní kulturou *Bacillus* a *Thermus* a *Bacillus subtilis*

6.2.3 Vliv tenzidů na produkci lipas

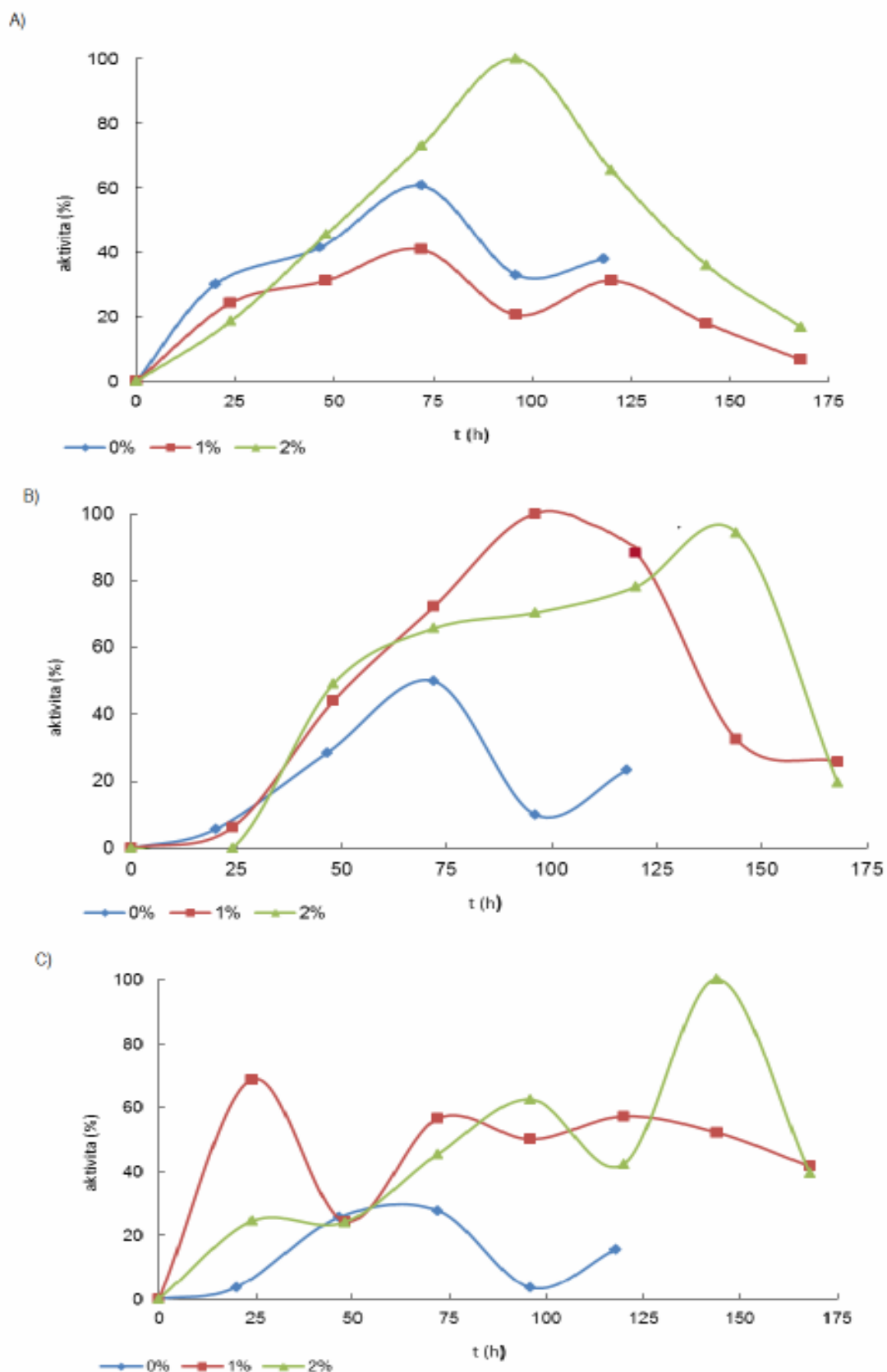
Produkce lipas může být ovlivněna přítomností tenzidů v odpadních vodách. Tyto tenzidy jsou součástí odpadních vod v důsledku aplikace čisticích prostředků a mohou tedy ovlivňovat růst a množení buněk a s tím související produkci lipas (Anjalci a kol. 2010)¹⁸⁰. Vliv vyšších koncentrací tenzidů v odpadní vodě má v některých případech antimikrobiální účinek, avšak při nízkých koncentracích může být jejich vliv stimulační (Anjalci a kol. 2010)¹⁸⁰. Stanovení vlivu tenzidů na produkci lipas probíhalo přidáním Tweenu 20 do fermentačního média o koncentracích 0, 1 a 2 % Tweenu 20 a stanovením lipolytické aktivity spektrofotometricky při 420 nm.

U komerčního přípravku a bakteriální kultury *B. subtilis*, měl přídavek Tweenu 20 do fermentačního média negativní vliv na produkci lipas v koncentracích tenzidu 1 a 2 %. Produkce lipas byla v tomto případě silně potlačena a byl zřejmý antimikrobiální vliv tohoto tenzidu, **obr. 51 A, B**. Extracelulární lipasy byly produkovány až po 100 hodinách kultivace.



Obr. 51: Vliv přídavku Tweenu 20 na produkci lipas: A) komerční přípravek; B) *Bacillus subtilis*

V případě obou termofilních druhů a směsné kultury *Bacillus* a *Thermus* byla přítomnost tenzidu v médiu vyžadována. Při 2 % koncentraci Tweenu 20 se projevilo vliv tohoto tenzidu pozitivně již po dvou dnech kultivace, **obr. 52 A, B, C**). Pozitivní účinek spočíval ve zvýšení produkce lipas, neboť při nulové koncentraci Tweenu 20 nebyla pozorována taková produkce jako při 2 % koncentraci Tweenu 20.



Obr. 52: Vliv přídavku Tweenu 20 na produkci lipas: A) *G.thermodenitricans*; B) *G.thermocatenulatus*; C) směšná kultura *Bacillus* a *Thermus*

Z vyplývajících výsledků lze konstatovat vliv tenzidu na produkci lipas, v případě mezofilních druhů došlo při vyšších koncentracích Tweenu 20 k inhibici lipolytické aktivity a tím současně k nižší produkci lipas. U termofilních druhů byl naopak účinek Tweenu 20 pozitivní, měl vliv na produkci lipas a došlo ke zvýšení lipolytické aktivity. Vliv Tweenu 20 na produkci lipas byl potvrzen *Anjanci a kol. 2010*¹⁸⁰, kteří sledovali antimikrobiální účinek Tweenu 20 na produkci lipas na emulzi slunečnicového oleje jako uhlíkatého zdroje.

Produkce mikrobiálních lipas byla stanovena spektrofotometricky při 420 nm na p-nitrophenyl laurát. Z naměřených výsledků byla potvrzena produkce lipas v pozdně exponenciální a časně stacionární růstové fázi. Tyto poznatky byly potvrzeny i v odborných článcích *Ghosh a kol. 1996*, *Korsten a kol. 1996*^{181, 182} potvrdili produkci lipas v pozdně exponenciální a časně stacionární růstové fázi.

Výsledky z poslední kapitoly této dizertační práce „*Testování vybraných bakteriálních kmenů pro vývoj nového přípravku*“ byly naměřeny ve spolupráci s Ing. Janou Artýszkovou, a proto uvádím odkaz na citaci její diplomové práce (*Artýszková 2011*)¹⁸³.

ZÁVĚR

Tato dizertační práce byla orientována na problematiku využití odpadních materiálů jako zdroje uhlíku pro produkci dalších významných látek a zefektivnění čištění odpadních vod. Cílem bylo sledovat možnosti mikrobiální produkce technologicky významných enzymů na odpadních materiálech potravinářského průmyslu. Dizertační práce byla rozdělena na dvě části.

První část pojednávala o mikrobiální degradaci rostlinného odpadu vznikajícího při výrobě vína a produkci pektolytických enzymů na tomto odpadním materiálu. Na hroznových výliscích byla sledována produkce polygalakturonas třemi kmeny: *Geotrichum candidum* CCY 16-1-29, *Aureobasidium pullulans* CCY 27-1-115 a *Aspergillus foetidus* EGEK 635. Všechny tři uvedené mikroorganismy byly schopny růst na hroznových výliscích, přičemž byla zaznamenána produkce extracelulárních enzymů. Avšak polygalakturonasy produkované *A. pullulans* a plísní *A. foetidus* se po izolaci projevíly jako extrémně nestabilní. Z tohoto důvodu byla produkce polygalakturonas dále studována jen u kmene *G. candidum* CCY 16-1-29. Nejefektivnější byla kultivace SSF s výlisky zvlčenými roztokem solí a přídatkem kvasničného autolyzátu. Nejvyšších enzymových aktivit bylo dosaženo ve 3. a 7. dni kultivace. Při studiu těchto pektolytických enzymů se pozornost zaměřila na identifikaci jednotlivě produkovaných polygalakturonas. Ty byly dále purifikovány a charakterizovány použitím několika metod.

Na základě pH optima, substrátové preference, isoelektrického bodu, molekulové hmotnosti, teplotního optima, tepelné stability, způsobu účinku a kinetických konstant byly charakterizovány dvě majoritní formy polygalakturonas, polygalakturonasa (EC 3.2.1.15) štěpící pektát náhodně a exopolygalakturonasa (EC 3.2.1.67) preferující oligomerní substráty. Kromě těchto dvou enzymů byly produkovány další, minoritní formy polygalakturonas. Majoritní enzymy byly produkovány v průběhu celé kultivace, spektrum minoritních forem se měnilo. Polygalakturonasa byla lehce identifikována i hmotnostní spektrometrií, protože měla identickou sekvenci s publikovanou polygalakturonasou *G. candidum* Ap2PG1. Rozdíl v enzymech byl ovšem v izoelektrických bodech a patrně také v molekulové hmotnosti. Náhodně identifikovaným enzymem hmotnostní spektrometrií byl enzym podobný pektinmethylesterase druhu *Leptosphaeria maculans*, (EC 3.1.1.11) Z dostupné literatury není produkce pektinmethylesterasy u druhu *G. candidum* popsána, avšak se dá předpokládat z jeho funkce.

Z charakterizace enzymů vyplynulo, že kmen *G. candidum* CCY 16-1-29 patří pravděpodobně mezi fytopatogenní kmeny *G. candidum*. Doposud získané výsledky potvrdily, že odpadní materiál jako hroznové výlisky by bylo možno využít pro produkci pektolytických enzymů, zvláště pektinmethylesteras, polygalakturonas a exopolygalakturonas, které jsou technologicky významné enzymy hrající roli při zpracování ovoce a zeleniny, např. při výrobě ovocných nápojů.

Druhá část dizertační práce byla zaměřena na studium vlastností komerčního přípravku do odlučovače tuků. Komerční přípravek byl analyzován z hlediska své funkce. Touto charakterizací byly zjištěny vhodné podmínky pro produkci extracelulárních lipolytických enzymů. A současně byly zjištěny podmínky pro nový produkt do odlučovače tuků.

Mikroorganismy přítomné v přípravku byly kultivovány za aerobních i anaerobních podmínek a bylo zjištěno, že tyto mikroorganismy patří mezi fakultativní anaerobi. Bylo zjištěno, že přípravek je použitelný v oblasti pH 6,0 - 8,0. Teplotní optimum produkovaných lipas bylo zjištěno při teplotě 25 °C a 50 °C. Byla také potvrzena schopnost komerčního přípravku degradovat různé lipidové substráty. Nejlépe degradovatelným substrátem byl palmový olej.

Mikroflora přípravku byla mikroskopicky zařazena mezi bakterie a na základě Gramova barvení mezi bakterie G+. Bylo zjištěno, že převládající mikroflórou v komerčním přípravku je rod *Bacillus*. Bakterie rodu *Bacillus* byly nejprve potvrzeny metodou polymerázové řetězové reakce s použitím doménově specifických primerů a pak s využitím rodově specifických primerů. Metodou amplifikované ribosomální DNA restrikční analýzy byly bakterie zařazeny do druhů, konkrétně *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis* s použitím restriktasy *AluI* a *Bacillus cereus* a *Bacillus licheniformis* s použitím restriktasy *TaqI*. Specifita tohoto druhů byla ještě navíc potvrzena metodou RT-PCR s využitím křivek tání.

Na základě těchto výsledků byly pro nový produkt do odlučovače tuků navrženy druhy *Bacillus subtilis*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Geobacillus thermodenitrificans* a směsná kultura používaná v čističce odpadních vod *Thermus* a *Bacillus*. Nejlépe využitelná byla směsná kultura termofilních bakterií *Thermus* a *Bacillus* z čističky odpadních vod. Do nového přípravku lze tedy doporučit tuto směsnou bakteriální kulturu, protože byl potvrzen pozitivní vliv přítomnosti Tweenu 20 v kultivačním médiu, přičemž povrchově účinné látky jsou součástí odpadních vod a vyskytují se v nich jako zbytky čisticích prostředků. U testovaných mezofilních druhů došlo při vyšších koncentracích Tweenu 20 k inhibici lipolytické aktivity. U termofilních druhů byl naopak účinek Tweenu 20 pozitivní. Přídavek Tweenu 20 zvyšoval lipolytickou aktivitu.

Směsná termofilní kultura *Bacillus* a *Thermus* používaná v čističkách odpadních vod bude základem pro nový produkt do odlučovače tuků. Problematika degradace lipidů v odpadních vodách a použití přípravků do odlučovačů tuků by měla být dále studována. Odpadní vody obašhují lipidy, které jsou různého původu, a proto by bylo vhodné problematice čištění odpadních vod věnovat dále pozornost.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. Vína z Moravy, Vína z Čech, k dispozici online na <http://www.wineofczechrepublic.cz/5-3-krajem-vina-cz.html>.
2. Zemánek, P., Plíva, P., Burg, P. Composting of residual biomass from viticulture production. Článek ve formátu pdf k dispozici online na <http://svt.pi.gin.cz/vuztwweb/doc/clanky/zivotniprostredi/0519kompvinohrady.pdf?menuid=156>
3. Vodrážka, Z., Rauch, P., káš, J.: Enzymologie. Praha: VŠCHT, 1998. s. 171 . ISBN 80-7080-330-4.
4. Sbírka zákonů k dispozici online: www.mvcr.cz/soubor/sb124-08-pdf.aspx.
5. Mohanty, S. K., Behera, S., Swain, M. R., Ray, R. CH.: Bioethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by solid-state fermentation. *Applied Energy*, 2009, vol. 86, no. 5, pp. 640-644.
6. Mamma, D., Kourtoglou, E., Christakopolous, P.: Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology*, 2008, vol. 99, no. 7, pp. 2373-2383.
7. Ronald, P. de Vries, Maureen, C., McCann, and Jaap Visser: Modification of Plant Cell Wall Polysaccharides Using Enzymes from *Aspergillus*. *Handbook of Carbohydrate Engineering*, 2002, pp. 613 – 631.
8. Darbyshire, B., Hendry, G.: *New Phytol.* 87 (1981), pp. 249 – 256.
9. Lejeune, A., Deprez, T.: Cellulose structure and properties, derivatives and industrial use. *Biotechnology in Agriculture, Industry and Medicine* 2010, Nova Publisher ISBN 978-1-60876-388-7.
10. Newman, R. H., Evidence for assignment of ¹³C NMR signals to cellulose crystallite surfaces in wood, pulp and isolated celluloses, *Holzforschung*, 52, 157–159, 1998.
11. Joshi, H. and Kapoor, V. P., *Cassia grandis* Linn f. seed galactomannan: structural and crystallographic studies, *Carbohydr. Res.*, 338, 1907–1912, 2003.
12. Goldberg, R., Gillou, L., Prat, R., Dupenhoat, C. H., Michon, V., Structural features of the cell wall polysaccharides of *Asparagus officinalis* seeds, *Carbohydr. Res.* 210, 263–276, 1991.
13. York, W. S., van Halbeek, H., Darvill, A. G., and Albersheim, P., The structure of plant cell walls. 29. Structural analysis of xyloglucan oligosaccharides by H-1-NMR spectroscopy and fast atom bombardment mass spectrometry, *Carbohydr. Res.*, 200, 9–31, 1990.
14. Hisamatsu, M., Impallomeni, G., York, W. S., Albersheim, P., and Darvill, A. G., The structure of plant cell walls. 31. A new undecasaccharide subunit of xyloglucans with 2 alpha-L-fucosyl residues, *Carbohydr. Res.*, 211, 117–129, 1991.

15. Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A., and York, W. S., Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants, *Plant J.*, 20, 629–639, 1999.
16. Schols, H. A., Visser, R. G. F., Voragen, A.G.J.: Pectins and Pectinases 2009, Wageningen Academic Publisher, ISBN 978-90-8686-108-8.
17. Guillotin, S.: *Studies on the intra- and intermolecular distributions of substituents in commercial pectins*, PhD. Thesis Wageningen University, The Netherlands, 2005. ISBN 90-8504-265-8.
18. Structure of homogalacturonan, online: <http://www.ccruc.uga.edu/~mao/galact/gala.htm>.
19. Structure of pectin: obrázek ve formátu jpg k dispozici online na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1924/figure/ch22.f6/?report=objectonly>.
20. Velíšek, J.: *Chemie potravin* 1. 2. vyd. Tábor: OSSIS. 2002. 344 s. ISBN 80-86659-00-3.
21. Šušla, M., Svobodová, K.: Ligninolytické enzymy jako účinné nástroje pro biodegradaci obtížně rozložitelných organopolutantů. *Chemické listy*, 2006, ročník 100, č. 10, s. 889-895, ISSN 1213-7103, 0009-2770
22. Hoondal, G. S., Tiwari, R. P., Tewari, R., Dahiya, N., Beg, Q. K.: Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, No. 59, pp. 409-418.
23. Doi, R. H., Kosugi, A.: Cellulosomes: Plant-all-wal-degrading enzyme complexes, *Reviews in Natural Microbiology*, July 2004, Volume 2, pp. 541 – 551.
24. de Vries, R. P. and Visser, J., *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides, *Microb. Mol. Biol. Rev.*, 65, 497–522, 2001.
25. Gielkens, M. M. C., Dekkers, E., Visser, J., and de Graaff, L. H., Two cellobiohydrolase-encoding genes from *Aspergillus niger* require D-xylose and the xylanolytic transcriptional activator XlnR for their expression, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4340–4345, 1999.
26. Ivanova, G. S., Beletskaya, O. P., Okunev, O. N., Golovlev, E. L., and Kulaev, I. S., Fractionation of cellulase complex of the fungus *Aspergillus terreus*, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 19, 275–281, 1983.
27. Hayashida, S., Mo, K., and Hosoda, A., Production and characteristics of aviceldigesting and non-avicel-digesting cellobiohydrolases from *Aspergillus ficuum*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1523–1529, 1988.
28. Teeri, T. T., Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases, *Trends Biotechnol.*, 15, 160–167, 1997.
29. Kormelink, F. J. M., Gruppen, H., Vietor, R. J., and Voragen, A.G.J., Mode of action of the xylan-degrading enzymes from *Aspergillus awamori* on alkali-extractable cereal arabinoxylans, *Carbohydr. Res.*, 249, 355–367, 1993.

30. Beldman, G., Searle-van Leeuwen, M. J. F., de Ruiter, G. A., Siliha, H. A., and Voragen, A. G. J., Degradation of arabinans by arabinases from *Aspergillus aculeatus* and *Aspergillus niger*, *Carbohydr. Polym.*, 20, 159–168, 1993.
31. Ademark, P., Varga, A., Medve, J., Harjunpaa, V., Drakenberg, T., Tjerneld, F., and Stålbrand, H., Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: purification and properties of a α -mannanase, *J. Biotechnol.*, 63, 199–200, 1998.
32. Civas, A., Eberhard, R., le Dizet, P., and Petek, F., Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii* Secreted (α -D-galactosidase and α -D-mannanase, *Biochem. J.*, 219, 857–863, 1984
33. Eriksson, K. W., Winell, M., Purification and characterization of a fungal α -mannanase, *Acta Chem. Scand.*, 22, 1924–1934, 1968.
34. Ademark, P., Lundqvist, J., Hagglund, P., Tenkanen, M., Torto, N., Tjerneld, F., and Stålbrand, H., Hydrolytic properties of a α -mannosidase purified from *Aspergillus niger*, *J. Biotechnol.*, 75, 281–289, 1999.
35. Puls, J., Schorn, B., and Schuseil, J., Acetylmannanesterase: a new component in the arsenal of wood mannan degrading enzymes, in *Biotechnology in pulp and paper industry*. Eds Kuwahara, M. Shimada, M. (Uni Publisher Co., Ltd. Tokyo, Japan), pp. 357-363.
36. Hasper, A. A., Dekkers, E., van Mil, M., van de Vondervoort, P. J. I., and de Graaff, L. H., Egl, C. A new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1556–1560, 2002.
37. Hesová, J.: Vplyv pH na produkciu rôznych foriem polygalakturonázy produkovanej kmeňmi *Aureobasidium pullulans*, Diplomová práca, Bratislava 2002, 41 s.
38. Kester, H. C. M., Benen, J. A. E., and Visser, J., The exopolygalacturonase from *Aspergillus tubingensis* is also active on xylogalacturonan, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30, 53–57, 1999.
39. van der Vlugt-Bergmans, C. J. B., Meeuwsen, P. J. A., Voragen, A.G.J., and van Ooyen, A.J.J., Endo-xylogalacturonan hydrolase, a novel pectinolytic enzyme, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 36–41, 2000.
40. Benen, J., Parenicová, L., Kusters-van Someren, M., Kester, H., and Visser, J., Molecular genetic and biochemical aspects of pectin degradation in *Aspergillus*, in *Pectins and Pectinases*, Visser, J. and Voragen, A.G.J., Eds., Elsevier Science, Amsterdam, 1996, pp. 331–346
41. Manzanares, P., van den Broeck, H. C., de Graaff, L. H., and Visser, J., Purification and characterization of two different α -L-rhamnosidases, RhaA and RhaB, from *Aspergillus aculeatus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 2230–2234, 2001.
42. Kaneko, S., Shimasaki, T., and Kusakabe, I., Purification and some properties of intracellular α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* 5–16, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1161–1165, 1993.

43. Dunkel, M. P. H., and Amado, R., Analysis of endo-(1→5)- α -L-arabinanase degradation patterns of linear (1→5)- α -L-arabino-oligosaccharides by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, *Carbohydr. Res.*, 268, 151–158, 1995.
44. Christgau, S., Kofod, L. V., Halkier, T., Anderson, L. N., Hockauf, M., Dorreich, K., Dalboge, H., and Kauppinen, S., Pectin methyl esterase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast and characterization of the recombinant enzyme, *Biochem. J.*, 319, 705–712, 1996.
45. Khanh, N. Q., Ruttkowski, E. K., Leidinger, A. H., and Gottschalk, M., Characterisation and expression of a genomic pectin methyl esterase-encoding gene in *Aspergillus niger*, *Gene*, 106, 71–77, 1991.
46. Jayani, R. S., Saxena, S., Gusta, R. Review: Microbial pectinolytic enzymes. *Process Biochemistry* 40 (2005) pp. 2931–2944.
47. Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. R., Nigam P.: Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science* 77 (1), 149-162 1999
48. Pandey, A.: Recent process developments in solid-state fermentation *Process Biochem.*, 1992, Vol. 27, Issue 2, pp. 109-117.
49. Manpret, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S., Banerjee, U. C.: Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*. 2005, vol. 1(2), pp. 1-9
50. Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J.: J. Biotechnological advantages of laboratory scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 64, pp. 175-186.
51. Couto, S. R., Sanromán, M. A.: Application of solid state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal* 22 (2005) 211-219.
52. Couto, S. R., Sanromán, M. A.: Application of solid state fermentation to food industry – A review. *Journal of Food Engineering* 76 (2006) 291-302.
53. Martin, N., de Souza, S. R., da Silva, R., Gomes, E. Pectinase production by fungal strains in solid state fermentation using agro-industrial bioproduct. *An internal Journal of Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol. 47, n.5: PP. 813-819, September 2004. ISBN 1516-8913.
54. Sakai, T., Takaoka, A. Purification, crystallization and some properties of endo-polygalacturonase from *Aureobasidium pullulans*. *Agric. Biol. Chem.* 1984;49:449–58.
55. De Lorenzo, G., Salvi, G., Degra, L., D'Ovidio, R., Cervone, F. Introduction of extracellular polygalacturonases and its mRNA in the phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme*. *J. Gen. Microbiol.* 1987;133:3365–73.
56. Polizeli, M. L. T. M., Jorge, J. A., Terenzi, H. F. Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *J. Gen. Microbiol.* 1991; 137:1815–23.

57. Manachini, M., Fortina, C., Parini, C.. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnol. Lett.* 1987;9:219–24.
58. Nagai, M., Katsuragi, T., Terashita, T., Yoshikawa, K., Sakai, T. Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64:1729–32.
59. Kumar, S. S., Palanivelu, P. Purification and characterization of an exopolypolygalacturonase from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. *World J Microbiol Biotechnol* 1999;15:643–6.)
60. Souza, J. V. B, Silva, T. M, Maia, M. L. S, Teixeira, M. F. S.: Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavisporus* 2A. UMIDA.1. *Process Biochem.* 2003; 4:455–8.
61. Palomaki, T., Saarilahti, H. T. Isolation and characterization of new C-terminal substitution mutation affecting secretion of polygalacturonases in *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *FEBS Letters* 1997;400: 122–6.
62. Rodrigues-Palenzuela P., Burr T. J., Collmer, A. Polygalacturonase is a virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *J. Bacteriol.* 1991;173:6547–52.
63. Tierny, Y., Bechet, M., Joncquiert, J.C., Dubourguier, H.C., Guillaume, J.B. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of genes encoding pectate lyase and pectin methylesterase activities from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Microbiol.* 1994;76:592–602.
64. Koboyashi, T., Gigami, N., Tajima, N., Suzumatsu, A., Haghihara, H., Kakai. Purification and properties of a galacturonic acid-releasing exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001;65:842–7.
65. Nozaki, K., Miyairi, K., Hizumi, S., Fukui, Y., Okuno, T. Novel exopolygalacturonases produced by *Alternaria mali*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997;61:75–80.
66. Maceira, F. I. G., Pietro, A.D., Roncero, M.I.G. Purification and characterization of a novel exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum*. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 154:37–43.
67. Huang, Q, Allen, C. An exo-poly- α -D-galacturonosidase, Peh B, is required for wild type virulence of *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.* 1997;179:7369–78.
68. Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., Vandamme, E. J. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 1993;39:231–94.
69. Wijesundera, R. L. C, Bailey, J. A, Byrde R. J. W. Production of pectin lyase by *Colletotrichum lindemuthionum* in culture and in infected bean (*Phaseolus vulgaris*) tissue. *J Gen Microbiol* 1984;130:285–90.
70. McCarthy, R. E., Kotarski, S. F., Salyers, A. A. Location and characteristics of the enzymes involved in the breakdown of polygalacturonic acid by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Bacteriol.* 1985;161:493–9.

71. Kotoujansky, A. Molecular genetics of pathogenesis by soft-rot *Erwinia*. *Annu Rev Phytopathol* 1987; 25:405–30.
72. Bruhlmann, F. Production and characterization of an extracellular pectate lyase from an *Amycolata* sp. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61:3580–5.
73. Margo, P., Barbaro, L., Chilosi, G., Avanti, C., Palestra, G. M. Pectinolytic enzymes produced by *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea*. *FEMS Microbiol Lett* 1994;117:1-6.
74. Wattad, C., Freeman, S., Dinoor, A., Prusky, D. A. Nonpathogenic mutant of *Colletotrichum magna* is deficient in extracellular secretion of pectate lyase. *Molec Plant-Microbe Interac* 1995; 8:621–6.
75. Favey, S., Bourson, C., Bertheou, Y., Kotoujansky, A., Boccara, M. Purification of the acidic pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 2942.
76. Shevchik, V. E., Robert-Baudouy, J., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. Pectate lyase Pel 1 of *Erwinia chrysanthemi* 3937 belongs to a new family. *J Bacteriol* 1997; 179:7321–30.
77. Koboyashi, T., Koike, K., Yoshimatsu, T., Gigami, N., Suzumatsu, A., Ozawa, T. Purification and properties of a low-molecular weight, high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999; 63:72–5.
78. Singh, S. A., Plattner, H., Diekmann, H. Exo polygalacturonate lyase from a thermophilic *Bacillus* sp. *Enzyme Microbial Technol* 1999; 25:420–5.
79. Takao, M., Nakaniwa, T., Yoshikawa, K., Terashita, T., Sakai, T. Purification and characterization of thermostable pectate lyase with protopectinase activity from thermophilic *Bacillus* sp. TS 47. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64:2360–7.
80. Takao, M., Nakaniwa, T., Yoshikawa, K., Terashita, T., Sakai, T. Molecular cloning, DNA sequence, and expression of the gene encoding for thermostable pectate lyase of thermophilic *Bacillus* sp. TS 47. *Biosci. Biotechnik. Biochem.* 2001;65:322–9.
81. Kashyap, D. R., Chandra, S., Kaul, A., Tesaří, R. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World J Microbiol Biotechnol* 2000; 16:277–82.
82. Yakoby, N., Kobiler, I., Dinoor, A., Prusky, D. pH regulation of pectate lyase secretion modulates the attack of *Colletotrichum gloeosporioides* in avocado fruits. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:1026–30.
83. Ishii, S., Yokotsuka, T. Purification and properties of pectin lyase from *Aspergillus japonicus*. *Agric Biol Chem* 1975;39:313–21.
84. Szajer, I., Szajer, C. Formation and release of pectin lyase during growth of *Penicillium paxilli*. *Biotechnol Lett* 1985; 7:105–8.
85. Szajer I, Szajer C. Pectin lyase of *Penicillium paxilli*. *Biotechnol Lett* 1982; 4:549–52

86. Di'az-Borra's, M. A, Aguilar, R. V, Glimenez, E. H. Comparacio'n de la actividad pectinolitica in vitro entre cepas de *Penicillium* sensibles y resistentes a fungicidas comerciales. *Alimentaria* 1987; 24: 57–8.
87. Alana, A., Alkorta, I., Dominguez, J. B, Llama, M. J, Serra, J. L. Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56:3755–9.
88. Sapunova, L. I, Mikhailova, R. V, Lobanok, A.G. Properties of pectin lyase preparations from the genus *Penicillium*. *Appl Microbiol Biochem* 1995; 31:435–8.
89. Chen, W. C, Hsieh H. J., Tseng, T. C. Purification and characterization of a pectin lyase from *Pythium splendens* infected cucumber fruits. *Botanical Bull Academia Sinica* 1998; 39:181–6.
90. Moharib, S. A, El-Sayed, S. T, Jwanny, E. W. Evaluation of enzymes produced from yeast. *Nahrung* 2000; 44:47–51.
91. Sunnotel, O., Nigam, P. Pectinolytic activity of bacteria isolated from soil and two fungal strains during submerged fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 2002; 18:835–9.
92. Martins, E. S, Silva, D., Da Silva, R., Gomes E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochem* 2002; 37:949–54.
93. Gaffe, J., Tizando, M. E, Handa, A. K. Characterization and functional expression of a ubiquitously expressed tomato pectin methylesterase. *Plant Physiol* 1997; 114:1547–56
94. Dorokhov, Y. L, Nankinem, K., Dropova, O.Y, Mertis, A., Saarinen, J., Kalkkinen, N., A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host-cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein. *FEBS Letters* 1999; 461:233–8
95. Fayaz, A., Asbi, B. A, Ghazali, H. M, Che Man, T. B, Jinap, S. Pectinesterase extraction from papaya. *Food Chem* 1993; 47:183–5.
96. Vaughan, I. L. H., Jakubczly, T., McMillan, J. D., Higgins, T. E., Dave, B. A., Crampton, V.M. Some pink yeasts associated with softening of olives. *Appl Microbiol* 1969; 18:771–5.
97. Potkanem, K, Heikinheimo, R, Pakkanen, R. Purification and characterization of *Erwinia chrysanthemi* B374 pectin methylesterase produced by *Bacillus subtilis*. *Enzyme Microbial Technol* 1992; 14: 832–6
98. Gainvors, A., Frezier, V., Lemaesquier, H., Lequart, C., Aigle, M., Belarbi, A. Detection of polygalacturonase, pectin lyase and pectinesterase activities in *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast* 1994; 10:1311–9.
99. Schell, M. A, Denny, T. P, Huang, J. Extracellular virulence factors of *Pseudomonas solanacearum*: role in disease and their regulation. In Mol. Mech. Bacterial. Virulence. The Netherlands: *Kluwer Academic Press*; 1994. p. 311-24.
100. Maldonado, M. S, Saad, A. M. S. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1998; 20:34–8.

101. Karam, N. E, Belarbi, A. Detection of polygalacturonase and pectinesterases in lactic acid bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1995; 11:559–63.
102. Kawano, C. Y, Chellegatti, M. A. S. C, Said, S., Fonseca, M. J. V. Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*. *Biotechnol Appl Biochem* 1999; 29:133–40.
103. Hadj-Taieb, N., Ayadi, M., Trigui, S., Bouabdollah, F., Gargouri, A. Hyper production of pectinase activities by fully constitutive mutant (CT 1) of *Penicillium occitanis*. *Enzyme Microbial Technol* 2002; 30:662–6.
104. Semanova, M. V., Grishutin, S. G., Gusakov, A. V., Okunev, O. N., Sinitsyu, A. P. Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. *Biochemistry* 2003; 68:559–69.
105. Vinařský slovník online: <http://www.znalecvin.cz/matoliny/>.
106. Vidal, S., Williams, P., O'Neill, M.A., Pellerin, P. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 45 (2001), pp. 315-323.
107. Botella, C., Diaz, A., de Ory, I., Webb, C., Blandino, A.: Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 2007, vol. 42, no. 1, pp. 98-101.
108. Bertran, E., Sort, X., Soliva, M., Trillas, I.: Composting winery waste: sludges and grape stalks. *Bioresource Technology*, 2004, vol. 95, no. 2, pp.203-208.
109. Botella, C., de Ory, I., Webb, C., Cantero, D., Blandino, A.: Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal*, 2005, vol. 26, no. 2-3, pp. 100-106.
110. Bitton, G., *Wastewater Microbiology*. 3rd edition by John Wiley & Sons, Inc. (2005), ISBN 0-471-65071-4.
111. Marek, M.: *Environmentální problémy v podmínkách výroby potravin, příklady řešení*, VŠCHT Praha, skripta online.
112. Způsoby čištění odpadních vod k dispozici online na www.rybarstvi.eu/dok%20rybari/chemie/cistení%20prehled.doc.
113. Cammarota, M. C., Freire, D.M.G., A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresource Technology* 97 21952210 (2006).
114. Wakelin, N. G., Forster, C.F., *An Investigation into Microbial Removal of Fats, Oils and Greases*. *Bioresource Technology* 59, 3743, (1997).
115. Pitter, P., *Hydrochemie*. Vydavatelství VŠCHT, 4. vydání Praha (2009), ISBN 978-80-7080-701-9.
116. online ACO Stavební prvky spol. s.r.o. Odlučovače ropných látek a tuků. Online na <http://www.aco.cz/aco/program/odlucovacitechnika/> [citace 20090331].

117. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L.: The utilization of fatty acids as fuel requires three stages of processing. *Biochemistry*, 5th edition, New York 2002, ISBN 10:0-7167-3051-0.
118. β -oxidation of FFA k dispozici online na <http://www.lipidlibrary.aocs.org/animbio/fa-oxid/index.htm>.
119. Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijsktra, B. W., Colson, C., Heuvel, M., Misset, O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology reviews* 15 (1994) 2963.
120. Singh, R., Gupta, N., Goswami, V. K., A simple activity staining protocol for lipases and esterases, *Appl. Microbial Biotechnol.* (2006) 70: 679-682.
121. Bornscheuer, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis; *FEMS Microbiology Reviews* 26 (2002) 73-81.
122. Tlou, M. G. Molecular cloning, kinetic and structural properties of family VII carboxyl esterases, January 2006, Magister Scientiae, faculty of Natural science, University of Free State, Bloemfontein.
123. Chipasa, K. B., Medrycka, K.: Behaviour of lipids in biological wastewater treatment processes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2006) 33: 635-645.
124. Bhumibhamon, O., Phattayakorn, K.: Lipase-producing microorganisms for use in ceontaminated fat and oil kitchen wastewater treatment. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 2002.
125. Nunn, W. D. A molecular view of fatty acid catabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, 50 (1986), 179-192.
126. Ratledge, C. Microbial oxidations of fatty alcohols and fatty acids. *J. Chem. Biotechnol.* 55 (1992), 399-400.
127. Bhumibhamon, O., Kopraserstak, A., Funthong, S.: Biotreatment of high fat and oil wastewater by lipase producing microorganisms. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 2002.
128. Taskin, E., Stratilová, E.: Polygalacturonases produced under solid state and submerged fermentation conditions by two strains of *Aspergillus foetidus*. *Turkish Journal of Biochemistry*. 2008, 33 (4), pp. 190-196.
129. Gente, S., Sohler, D., Coton, E., Duhamel, C., Gueguen, M.: Identification of *Geotrichum candidum* at the species and strain level: proposal for standardized protocol; *Ind. Microbial Biotechnol.* (2006) 33: 1019-1031.
130. Hang, Y. D., Woodams, E. E. Production and characterization of polygalacturonase from *Geotrichum candidum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8, 480-482.
131. Kocková-Kratochvílová, A.: Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov, Vydavateľství ALFA Bratislava, ISBN 80-05-00644-6, 1999.
132. Sephadex G-25 online: www.chembio.uoguelph.ca/educmat/.../g25.pdf.
133. Sephadex CM- 50 online: www.gelifesciences.com/.../71710400AD.pdf.

134. Návod online Superdex 75: www.gelifesciences.com/.../18103411AB.pdf.
135. Radola, B. J. Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μm polyacrylamide gels on silanized glass plates or polyester films. *Electrophoresis*, 1 (1980) 43-56.
136. Balali, G. R., Iranpor, M. Application of pectic zymogram in the identification and genetic variation of *Fusarium species*. *Journal of Agriculture Technology*, 2009.
137. online: <http://bimikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/basics.php>.
138. http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G293890054_KitProtein230_ebook.pdf.
139. Rittich, B., Španová, A. Šálek, P., Němcová, P., Trachtová, Š. Horák, D.: Separation of PCR-ready DNA from dairy products using magnetic hydrophilic microspheres and poly(ethylene glycol)-NaCl water solutions. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 321 (2009) 1667-1670.
140. Spirit blue agar and Lipase Reagent, návod k dispozici online: <http://www.interlabdist.com.br/dados/produtos/bula/doc/1518848ff7e6109313.pdf>.
141. Sigurgísladóttir, S., Konráðsdóttir, M., Jónsson, Á., Kristjánsson, J. K. and Matthiasson, E.: Lipase activity of thermophilic bacteria from icelandic hot springs. *Biotechnology Letters* Volume 15, Number 4, 361-366, DOI: 10.1007/BF00128277.
142. Šilhánková, J. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Nakladatelství Academia 2. vyd. 2002, ISBN 80-200-1024-6.
143. El-Bestawy, E., El-Mahry M. H., El-Adl N. E.: The potentiality of free Gramnegative bacteria for removing oil and grease from contaminated industrial effluents; *World Journal of Microbiology & Biotechnology* (2005) 21: 815-822.
144. Index of Methods for the examination of waters and associated materiále 1976-2011 k dispozici online ve formátu pdf na http://www.environment-agency.gov.uk/static/documents/Research/SCA_Blue_Book_236.pdf.
145. Rittich, B., Španová, A., Horák, D., *Food Res. Inter.* 42 (2009) 493-498.
146. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular cloning*(3rd ed.): Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2001, 235 p. ISBN 978-087969577-4.
147. Kubisz, P. *Reverzibilní imobilizace DNA na nově syntetizovaných magnetických nosičích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 43 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
148. K. Greisen, M. Loeffelholz, A. Purohit, D. Leong, *J. Clin. Microbiol.* 32 (2004) 355-361.
149. Xi-Yang Wu, M. J. Walker, M. Hornitzky, J. Chin; Development of a groupspecific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *Journal of Microbiological Methods* 64 (2006) 107-119.
150. Gilberte, K. A., Lee, D. Y., Beaudete, L. A.; Molecular techniques in wastewater:

Understanding microbial communities, detecting pathogens and real-time process control. *Journal of Microbiological Methods* 66 (2006).

151. Kubarachew, M., Enger, Ø., Sandaa, R. A., Lemma, E., Bjorvatn, B.; Amplified ribosomal DNA restriction analysis in the differentiation of related species of mycobacteria. *Journal of Microbiological Methods* 55 (2003) 83-90.

152. Stratilová, E., Dzúrová, M., Breierová, E., and Omelková, J.: Production and biochemical characterization of polygalacturonases produced by *Aureobasidium pullulans* from forest soil. *Annals of Microbiology (Biomedical and Life Sciences)* Volume 56, Number 1, 35-40.

153. Joubert, D. A., Slaughter, A. R., Kemp, G., Becker, J. V., Krooshof, G. H, Bergmann, C., Benen, J., Pretorius, I. S., Vivier, M. A.: The grapevine polygalacturonase-inhibiting protein (VvPGIP1) reduces *Botrytis cinerea* susceptibility in transgenic tobacco and differentially inhibits fungal polygalacturonases. *Transgenic Res.* 15 (2006) 687-702.

154. Larpin, S., Mondoloni, C., Goerges, S., Vernoux, J.-P., Guéguen, M., Desmasures N.: *Geotrichum candidum* dominates in yeast population dynamics in Livarot, a French red-smear cheese. *FEMS Yeast Res* 6 (2006) 1243–1253.

155. Boutrou, R., Aziza, M., Amrane, A.: Enhanced proteolytic activities of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* in mixed culture. *Enzyme and Microbial Technol.* 39 (2006) 325–331.

156. Piegza, M., Witkowska, D., Robak, M.: Hydrolases of *Geotrichum candidum* in barley β -glucan degradation. *El. J. Pol. Agr. Univ.* 9 (2006) 17.

157. Vernet, T., Ziomek, E., Recktenwald, A., Schrag, J. D., de Montigny, Ch., Tessier, D. C., Thomas, D. Y., Cygler, M.: Cloning and Expression of *Geotrichum candidum* Lipase I1 Gene in Yeast. Probing of the enzyme active site by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 26212-26219.

158. Mladenoska, I., Dimitrovski, A.: Lipase production by *Geotrichum candidum*-M2. *Bull. Chem. Technol. Mac.* 20, (2001) 39-43.

159. de Medeiros Burkert, J. F., Maldonado, R. R., Maugeri Filho, F., Rodrigues, M. I.: Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80 (2005) 61–67 DOI: 10.1002/jctb.1157.

160. Barash, I., Eyal, Z.: Properties of a polygalacturonases produced by *Geotrichum candidum*. *Phytopathology* 60 (1970), pp. 27-30.

161. Nakamura, M., Iwai, H., Arai, K.: Cloning and characterization of a polygalacturonases gene *candidum*. Division of Mycology and Plant Pathology, Tel Aviv Israel 1969. Ap2PG1 from *Geotrichum candidum* citrus race Ap2 pathogenic to apple fruit. *J. Gen. Pathol.*, 68 (2002), 333-337.

162. Nakamura, M., Iwai, H., Arai, K. Polygalacturonase S31PG1 from *Geotrichum candidum* citrus race S31 expressed in *Schizosaccharomyces pombe* versus S31PG1 regarding soft rot on lemon fruit. *J. Gen. Plant Pathol.* (2003), 69: 283:291.

163. Gowthaman, M. K., Krishna, Ch., Moo-Young, M.: Fungal solid state fermentation – an overview. *App. Mycol. Biotechnol.* 1 (2001) 305-
164. Pandey, A., Soccol, C. R., Mitchell, D.: New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and Products. *Proc. Biochem.* 35 (2000) 1153–1169.
165. Arends, M., Dorokhov, V. V., Turochkina, T. M., Borisova, T. G. *Priklad. Biochem. Microbiol*, 16 (1975) 691.
166. Barash, I., Zilberman, E., Marcus, L. Purification of *Geotrichum candidum* endopolygalacturonase from culture and from host tissue by affinity chromatography on cross-linked polypectate. *Physiological Plant Pathology*, Volume 25, Issue 2, September 1984, Pages 161-169.
167. Somogyi, M. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195 (1952), pp. 19 -23.
168. Stratilová, E., Breierová, E., Vadkertiová, R.: Effect of Cultivation and Storage pH on the Production of Multiple Forms of Polygalacturonase by *Aspergillus niger*, *Biotechnol. Lett.* 18, 41 (1996)
169. Rexová-Benková, L., & Markovič, O. (1976). Pectic enzymes. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 33, 323-385.
170. Stratilová, E., Dzúrová, M., Omelková, J. Comparison of oligo-D-galactosiduronate hydrolase produced by microorganism and plants. *Chem. Listy* 99, 344-345 (2005).
171. Stratilová, E., Dzúrová, M., Malovíková, A., Omelková, J. Oligogalacturonate Hydrolase from Carrot Roots. *Z. Naturforsch.* 60c, 899-905 (2005).
172. Flodrová, D., Dzúrová, M., Lišková, D., Ait Mohand, F., Mislovičová, D., Malovíková, A., Voburka, Z., Omelková, J., Stratilová, E. Pectate Hydrolases of Parsley (*Petroselinum crispum*) Roots. *Z. Naturforsch.* 62c, 382-388 (2007).
173. Flodrová, D., Garajová, S., Malovíková, A., Mislovičová, D., Omelková, J., Stratilová, E. Oligogalacturonate hydrolase with unique substrate preference from the pulp of parsley roots. *Biologia, Bratislava* 64, 228-234 (2009).
174. Markovič, O., Janeček, Š. Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution. *Protein Eng.* 14 (2001): 615–631.
175. Markovič, O., Janeček, Š.: Pectin methylesterases: sequence-structural features and phylogenetic relationships. *Carbohydrate Research* 339 (2004) 2281–2295.
176. Jenkins, J.; Mayans, O.; Smith, D.; Worboys, K.; Pickersgill, R. W.: Three-dimensional structure of *Erwinia chrysantemi* pectin methylesterase reveals a novel esterase active site. *J. Mol. Biol.* 2001, 305, 951–960.

177. Johansson, K.; El-Ahmad, M.; Friemann, R.; Jornvall, H.; Markovic, O.; Eklund, H.: Crystal structure of plant pectin methylesterase. *FEBS Lett.* 2002, 514, 243–249.
178. Bora, L., Kalita, M.C.: Production of thermostable alkaline lipase on vegetable oils from a thermophilic *Bacillus* sp. DH4, characterization and its applications as detergent additive. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83: 688-693 2008.
179. Mohan, T.S., Palavesam, A., Immanuel, G.: Isolation and characterization of lipase-producing *Bacillus* strains from oil mill waste. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (15), pp. 2728-2735, 2008.
180. Anjalci, C.H., Madhusmita, D., Chadrsekaran, N., Mukherjee, A. Antibacterial of sunflower oil microemulsion. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol.2, Suppl.1, 2010.
181. Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P., Davidson, S. Microbial lipases: production and applications. *ScienceProgress* (1996), 79 (2), 119-157.
182. Korsten, L., Cook, N. Optimizing culturing conditions for *Bacillus subtilis*. South African Avocado Growers' Association Yearbook 1996. 19:54-58.
183. Artýzsková, J. Odbourávání tuků v odpadech. Diplomová práce, Vysoké Učení Technické v Brně, Fakulta Chemická, 2011. 72 s.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

UDP	uridindifosfát
GDP	guanosindifosfát
HGA	homogalakkturonan
RGI	rhamnogalakkturonan I
RGII	rhamnogalakkturonan II
XGA	xylogalakkturonan
GalA	galacturonic acid
PME	pektin methylesterasa
endoPGa	polygalakturonasa působící endo mechanismem
exoPGa	polygalakturonasa působící exo mechanismem
MGA	monogalacturonic acid
BSK	biologická spotřeba kyslíku
CHSK	chemická spotřeba kyslíku
ČSN EN 1825	Česká technická norma/Evropská norma
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
TAG	triacylglycerol
ATP	adenosintrifosfát
FAD	flavinadenindinukleotid
NAD ⁺	nikotinamidindinukleotid
His	histidin
Asp	asparagin
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Bed
EGSB	Expanded Granular Sludge Bed
CCY	Culture Collection of Yeasts
CCM	Czech Collection of mMicroorganisms
SSF	Solid State Fermentation
KA	kvasničný autolýzát
GPC	Gel Permeation Chromatography
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
PGA	Polygalacturonic acid
IEF-PAGE	Izoelektrická fokusace na polyakrylamidovém gelu
AA	akrylamid
bis-AA	bis-akrylamid
TEMED	tetramethylethylendiamin
APS	amonium per sulfát
DP10	dekagalacturonic acid
SDS	dodecyl sulfát
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS
MALDI-TOF/TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Light
ACN	acetonitril
TFA	trifluoroacetic acid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
GA ₂	dimer galakturonové kyseliny
GA ₃	trimer galakturonové kyseliny
GA ₄	tetramer galakturonové kyseliny
GA ₅	pentamer galakturonové kyseliny
KP	komerční přípravek

EDTA	ethylendiamin tetraoctová kyselina
P(HEMA-co-GMA)	poly(2-hydroxyethylmethacrylate-co-glycidylmethacrylate)
p-NPL	p-nitrophenyllaurát
p-NP	p-nitrophenol
MK	mastná kyselina
FFA	free fatty acids
CIZ	chloroformizoamylalkohol
EtOH	ethanol
PEG 6000	polyethylenglykol 6000
PCR	polymerázová řetězová reakce
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
ARDRA	amplifikovaná ribosomální DNA restrikční analýza
AA	amino acid
G+	grampozitivní
G-	gramnegativní

PŘEHLED PUBLIKACÍ

2011

ZICHOVÁ, M.; ILLKOVÁ, K.; HABÁNÍKOVÁ, K.; OMELKOVÁ, J. *Production of cellulase and polygalacturonase on plant origin waste*. Praha: ČSCH, 2011. s. 1035-1035.

ILLKOVÁ, K.; VADKERTIOVÁ, R.; STRATILOVÁ, E. *The enzymatic activity of yeast isolated from plant material*. Bratislava: Natura o. z., 2011. s. 76-76.

ILLKOVÁ, K.; OMELKOVÁ, J.; STRATILOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R. *Polygalacturonase produced by Geotrichum candidum under solid state fermentation on grape pomace*. Bratislava: Natura o. z., 2011. s. 75-75.

2010

VOBĚRKOVÁ, S.; ILLKOVÁ, K.; OMELKOVÁ, J. Screening of fungal species for hydrolytic enzymes in straw degradation. In *Book of Abstracts and Full text from 5th European Congress on Food*. Bratislava: Food Research Institute, 2010. s. 268-272. ISBN: 978-80-89088-90-4.

ILLKOVÁ, K.; ŠPANOVÁ, A.; TRACHTOVÁ, Š.; RITTICH, B. *PCR Identification of Bacillus strains from commercial product and its application to the wastewater*. Book of Abstracts. Bratislava: Food Research Institute, 2010. s. 176-176. ISBN: 978-80-89088-90- 4.

ILLKOVÁ, K.; OMELKOVÁ, J.; VOBĚRKOVÁ, S.; HABÁNÍKOVÁ, K. *Production of cellulase and polygalacturonase by Aureobasidium pullulans in submerged and solid state systems*. Bratislava: Natura o. z., 2010. s. 107-107.

ILLKOVÁ, K.; TRACHTOVÁ, Š.; ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B. *PCR and ARDRA Differentiation of Related Species of Bacillus*. Conference Proceedings. Kysucke Nove Mesto: Pamida International Ltd., 2010. s. 120-121. ISBN: 978-80-970168-4- 5.

ILLKOVÁ, K.; TRACHTOVÁ, Š.; ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B. PCR identification of Bacillus strains from a complex sample. In *Book of full papers*. Bratislava: Food Research Institute, 2010. s. 243-248. ISBN: 978-80-89088-89- 8.

2009

ILLKOVÁ, K.; OMELKOVÁ, J.; PAVLAČKOVÁ, J.; GOJKOVIC, Ž. Characterization of preparation for fat separators. *Nova Biotechnologica*, 2009, roč. 9, č. 3, s. 225-230. ISSN: 1337-8783.

ILLKOVÁ, K.; OMELKOVÁ, J.; PAVLAČKOVÁ, J.; GOJKOVIC, Ž. *CHARACTERIZATION OF PREPARATION FOR FAT SEPARATORS*. Book of abstracts. Trnava: 2009. s. 53-53. ISBN: 978-80-8105-127-2.

2008

ILLKOVÁ, K., OMELKOVÁ, J., VLČKOVÁ, B. Lipid degradation and its application to lipid- containing wastewater. *Chemické listy*, 2008, roč. 2008, č. NO15, s. 124-126. ISSN: 0009-2770.

ILLKOVÁ, K.; OMELKOVÁ, J.; VLČKOVÁ, B. Enzyme Degradation of LIPIDS and its Application i Lipid- Containing Wastewater. In *Book of abstracts 4th meeting on Chemistry & Life 2008*. Brno: 2008. s. 1 (1 s.).

2007

VÍTOVÁ, E.; LOUPANCOVÁ, B.; ŠTOUDKOVÁ, H.; ZEMANOVÁ, J.; ILLKOVÁ, K. A rapid and simple method for the direct analysis of fatty acids by gas chromatography. In *Book of abstracts and abbreviated papers*. Bratislava: STU, 2007. s. 5-7. ISBN: 978-80-227-2698-6.

ŽIVOTOPIS

SOUČASNOST

Student 5. ročníku navazujícího doktorského studia, hlavní náplní řešení dizertační práce na téma: Možnosti mikrobiální degradace odpadních materiálů a využití enzymů pod vedením Doc. Ing. Jiřiny Omelkové, CSc.

Osobní údaje

Titul/Jméno/Příjmení	Ing. Kateřina Illková
Adresa	Floriánská 580, 672 01 Moravský Krumlov
Telefon	+420 605 441 196
E-mail	katkaillkova@tiscali.cz
Státní příslušnost	Česká Republika
Datum narození	18. 3. 1983

Vzdělání

2007 – 2010 Fakulta chemická, Vysoké Učení Technické v Brně doktorské studium (školitel: doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.)

2002 – 2007 Fakulta chemická, Vysoké Učení Technické v Brně magisterské studium (školitel: Ing. Eva Vítová)

Studijní pobyt

ZS 2010/2011 Erasmus: Slovenská Akadémie Věd Bratislava, chemický ústav, oddělení Glykomiky (školitel: Ing. Eva Stratilová, PhD.)

LS 2010/2011 MŠMT: Slovenská Akadémie Věd Bratislava, chemický ústav, oddělení Glykomiky (školitel: Ing. Eva Stratilová, PhD.)

Projekty

Grantový projekt FRVŠ v rámci rozšíření předmětu Praktikum z genetiky mikroorganismů realizovaného na fakultě chemické VUT Brno s názvem Moderní genetické diagnostické metody v molekulární biotechnologii (2009).

Ve spolupráci s Jihomoravským centrem pro mezinárodní mobilitu projekt podpory stáží středoškolských studentů na výzkumných pracovištích vysokých škol.

Spolupráce s firmou ACO stavební prvky, spol. s.r.o. zabývající se konstrukcí odlučovačů tuků pro studium přípravků do nich používaných.

Kurzy

6/2011 odborný seminář pořádaný firmou HermesLabSystem na téma zavedení nových technologií v oblasti DNA, RNA a proteinů (Agilent), Slovensko

6/2011 odborný seminář (Fermentas), Troubleshooting in PCR and RT-PCR, ústav virologický Slovenské Akademie Věd

12/2010 školení o databázích proteinů (Protein Data Bank Europe, PDBE), ústav molekulární biologie Slovenské Akademie Věd, Dúbravská cesta 9, Bratislava, Slovensko

Pedagogická praxe

Praktikum z mikrobiologie, Praktikum z genetiky mikroorganismů, Praktikum z biotechnologie