

## OBSAH

|                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ABSTRAKT .....</b>                                                              | <b>3</b>  |
| <b>ÚVOD .....</b>                                                                  | <b>4</b>  |
| <b>CÍL PRÁCE .....</b>                                                             | <b>5</b>  |
| <b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>                                                       | <b>6</b>  |
| <b>1 Odpady rostlinného původu .....</b>                                           | <b>6</b>  |
| 1.1 Produkce mikrobiálních enzymů na odpadech rostlinného původu .....             | 6         |
| 1.1.1 Produkční mikroorganismy .....                                               | 6         |
| 1.1.1.1 Geotrichum candidum .....                                                  | 6         |
| 1.1.2 Degradovatelné substráty .....                                               | 6         |
| 1.1.3 Podmínky produkce enzymů .....                                               | 7         |
| 1.1.4 Faktory ovlivňující solid state fermentaci .....                             | 7         |
| 1.2 Mikrobiální produkce polygalakturonas.....                                     | 7         |
| 1.3 Matoliny jako zdroj uhlíku .....                                               | 7         |
| <b>2 Odpadní vody .....</b>                                                        | <b>8</b>  |
| 2.1 Čištění odpadních vod .....                                                    | 8         |
| 2.2 Lapáky tuků.....                                                               | 8         |
| 2.3 Mikrobiální degradace lipidů v odpadních vodách .....                          | 9         |
| <b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>                                                    | <b>10</b> |
| <b>3 Produkce polygalakturonas.....</b>                                            | <b>10</b> |
| 3.1 Výběr kmene a vliv typu fermentačního média na produkci polygalakturonas ..... | 10        |
| 3.2 Produkce polygalakturonas .....                                                | 11        |
| 3.3 Charakterizace extracelulárních polygalakturonas .....                         | 11        |
| 3.3.1 Stanovení způsobu účinku polygalakturonas.....                               | 12        |
| 3.3.2 Stanovení izoelektrického bodu polygalakturonas .....                        | 12        |
| 3.3.3 Částečná purifikace polygalakturonas .....                                   | 13        |
| 3.4 Charakterizace polygalakturonas z hlediska Mr.....                             | 14        |
| 3.4.1 Stanovení molekulových hmotností polygalakturonas gelovou filtrací.....      | 14        |
| 3.4.2 Analýza částečně purifikovaných proteinů na Bioanalyzátoru 2010.....         | 15        |
| 3.4.3 Identifikace pektolytických enzymů na základě primárních struktur .....      | 16        |
| <b>4 Produkce lipas .....</b>                                                      | <b>19</b> |
| <b>4.1 Studium vlastností komerčního přípravku .....</b>                           | <b>19</b> |
| 4.1.1 Důkaz lipolytické aktivity mikroflóry přítomné v komerčním přípravku .....   | 19        |
| 4.1.2 Sledování lipolytické aktivity a uvolněných mastných kyselin .....           | 19        |
| 4.1.3 Vliv pH a teploty na produkci lipas komerčního přípravku .....               | 21        |
| 4.1.4 Organické znečištění odpadních vod .....                                     | 21        |
| 4.1.5 Identifikace mikroflóry přítomné v komerčním přípravku.....                  | 23        |
| 4.1.5.1 Gramovo barvení .....                                                      | 23        |
| 4.1.5.2 Doménově specifická polymerázová řetězová reakce .....                     | 223       |
| 4.1.5.3 Rodově specifická polymerázová řetězová reakce .....                       | 24        |
| 4.1.5.4 Rodově specifická polymerázová řetězová reakce v reálném čase .....        | 25        |
| 4.1.5.5 Amplifikovaná ribozomální DNA restrikční analýza .....                     | 25        |
| 4.2 Testování vybraných bakteriálních kmenů pro vývoj nového přípravku .....       | 26        |
| 4.2.1 Vliv pH na produkci lipas.....                                               | 26        |
| 4.2.2 Vliv teploty na produkci lipas .....                                         | 27        |
| 4.2.3 Vliv tenzidů na produkci lipas.....                                          | 28        |
| <b>ZÁVĚR.....</b>                                                                  | <b>31</b> |
| <b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>                                               | <b>33</b> |
| <b>PŘEHLED PUBLIKACÍ.....</b>                                                      | <b>37</b> |

## 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 byla 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.

## 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 internships in Slovak Academy of Sciences, department of Glycomics in Bratislava. The grape pomace as the waste from 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.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** pektolytické enzymy, hroznové výlisky, lipolytické enzymy, odpadní vody

**KEYWORDS:** pectolytic enzymes, grape pomace, lipolytic enzymes, waste water

## 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*)<sup>1</sup>. 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 ve vinicích (*Zemánek a kol.*)<sup>2</sup>.

Dalším nemalým problémem jsou zařízení společného stravování, která musí zabezpečit předčištění 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 degradujících 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*)<sup>3</sup>.

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

## 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.

# 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*)<sup>4</sup>. 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 uplatnění<sup>5</sup>:

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*)<sup>5,6</sup>.

### 1.1 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*)<sup>7</sup>.

#### 1.1.1 Produkční mikroorganismy

Většina mikroorganismů, zahrnující bakterie, kvasinky i plísňe je schopna produkovat velké množství různých skupin enzymů (*Pandey 1999*)<sup>7</sup>.

Příkladem vhodného produkčního mikroorganismu je plíseň *Aspergillus niger*, u kterého byla popsána produkce až 19 typů enzymů (*Pandey 1999*)<sup>47</sup>. Obecně jsou hydrolytické enzymy, celulasyl, xylanasy, pektinasy a jiné, produkovány plísňovými kulturami. *Trichoderma* sp. a *Aspergillus* sp. jsou nejrozšířenějšími producenty enzymů (*Pandey 1999*)<sup>7</sup>.

##### 1.1.1.1 *Geotrichum candidum*

*Geotrichum candidum* lze taxonomicky zařadit mezi kvasinkovité mikroorganismy. Tento kvasinkovitý mikroorganismus disponuje enzymy hydrolyzujícími nativní celulosu a pektin (*Gente a kol. 2006*)<sup>8</sup> a je jedním z původců měknutí ovoce a zeleniny (*Hang a kol.*)<sup>9</sup>. *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*)<sup>10</sup>

#### 1.1.2 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; bagasa; 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*)<sup>7</sup>.

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 hrají zároveň cena a dostupnost voleného substrátu (Pandey 1991)<sup>7</sup>.

### 1.1.3 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, které představují výhody vůči solid state kultivaci (Pandey 1992)<sup>11</sup>. Většina enzymů produkovaných za podmínek submerzní kultivace může být produkována i za podmínek solid-state kultivace. V případě solid state kultivace 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)<sup>12,13</sup>.

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)<sup>14</sup>. 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)<sup>15</sup>.

### 1.1.4 Faktory ovlivňující solid state fermentaci

Hlavní faktory ovlivňující mikrobiální syntézu 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 CO<sub>2</sub> (Pandey 1999)<sup>7</sup>.

## 1.2 Mikrobiální produkce polygalakturonas

Polygalakturonasy patří mezi pektolytické enzymy představující heterogenní skupinu enzymů hydrolyzujících 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)<sup>16</sup>.

Je známo, že mikrobiální pektolytické enzymy tvoří 25 % prodeje ze všech prodáváných enzymů a většina z nich je plísňového původu. Nejznámějším průmyslovým producentem polygalakturonas je plíseň *Aspergillus niger* (Martin a kol. 2004)<sup>16</sup>.

Nejrozšířenějšími enzymy jsou endoPGasy, které jsou produkovány většinou plísní, bakteriemi, ale i mnoha kvasinkami. Známými producenty jsou: *Aureobasidium pullulans*<sup>17</sup>, *Fusarium moniliforme*<sup>18</sup>, *Neurospora crass*<sup>19</sup>, *Rhizopus stolonifer*<sup>20</sup>, *Aspergillus sp.*<sup>21</sup>, *Thermomyces lanuginosus*<sup>22</sup>, *Peacilomyces clavisporus*<sup>23</sup>. ExoPGasy mají v porovnání s endoPGasami menší technologický význam. Producenty exoPGas jsou například *Erwinia carotovora*<sup>24</sup>, *Agrobacterium tumefaciens*<sup>25</sup>, *Bacteroides thetaiotamicron*<sup>26</sup>, *Erwinia chrysanthemi*<sup>27</sup>, *Alternaria mali*<sup>28</sup>, *Fusarium oxysporium*<sup>29</sup>, *Ralstonia solanacearum*<sup>30</sup>, *Bacillus sp.*<sup>31</sup>. ExoPGasy jsou význačné dvěma produkovanými typy: plísňové exoPGasy, kde hlavním a konečným produktem je monogalakturonová kyselina (MGA) a bakteriální exopolygalakturonosidasa, kde hlavním produktem je kyselina digalakturonová (Wijesundera a kol. 1984)<sup>32</sup>.

## 1.3 Matoliny jako zdroj uhlíku

Matoliny jsou hroznové výlisky po získání moštu z rmutu, jinak odpadová hmota. Matoliny se dají využít k dalšímu zpracování. Výliskost moštu se pohybuje mezi 60 – 75 %, v závislosti na odrůdě a vyzrálosti 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)<sup>33</sup>.

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 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*)<sup>33</sup>.

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*)<sup>34</sup>. 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 xylanase. 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*)<sup>35, 36, 37</sup>.

## 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*)<sup>38</sup>.

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*)<sup>39</sup>.

### 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*)<sup>40</sup>.

### 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 čističek odpadních vod. Lipidy zabírají proces 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*)<sup>41, 42</sup>. 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*)<sup>39</sup>.

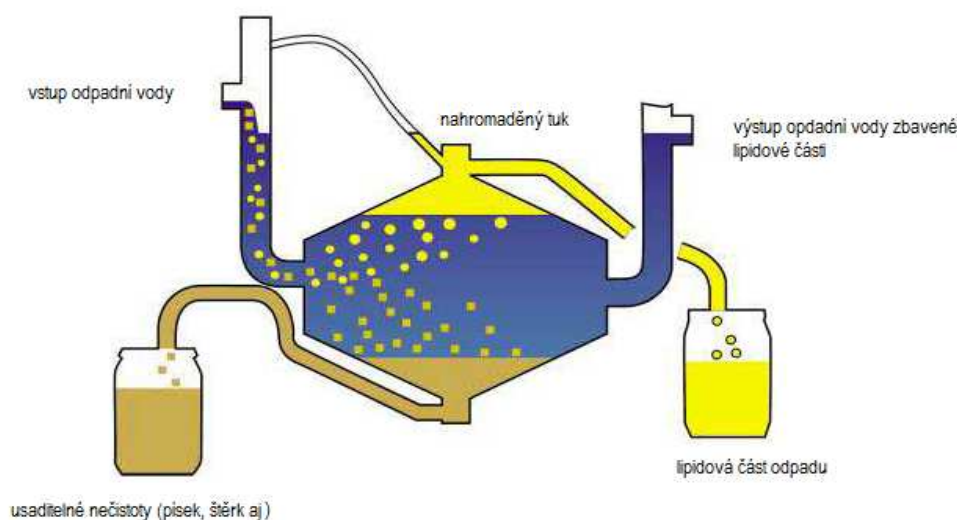
Princip odlučovačů tuků a olejů je opačný k sedimentačním nádržím. Odpadní voda se přivádí ke dnu separační nádrže, po zmenšení průtočné rychlosti dojde k oddělení tuků a olejů z vody. Hromadí se u hladiny, kde jsou stírány. Proces lze urychlit zavedením tlakového vzduchu. Tukové částice se nabalují 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*)<sup>40</sup>.

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*)<sup>43</sup>. 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) <sup>43</sup>:

- 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 zadržení 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) <sup>43</sup>.



**Obr. 1: Schéma odlučovače tuků (online Odlučovače tuků a ropných látek <sup>44</sup>**

## 2.3 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 vývoj mikrobiálních kultur pro použití v bioreaktorech čistíček 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) <sup>42</sup>.

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 zamyšlení 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) <sup>42, 45</sup>.

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) <sup>45</sup>. 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)<sup>46</sup>. Aerobní čištění odpadních vod působením mikroorganismů bylo dokumentováno v několika studiích (Nunn, 1986; Ratledge 1992)<sup>47,48</sup>. 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*)<sup>49,50</sup>.

## 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.

### 3 Produkce polygalakturonas

#### 3.1 Výběr kmene a vliv typu fermentačního média na produkci polygalakturonas

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) a jejich schopnosti 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*). *Geotrichum candidum* je kvasinkovitý mikroorganizmus známý hlavně jako Součást přirozené mikroflóry některých francouzských sýrů (*Larpin a kol. 2006*)<sup>51</sup>, kde hrají důležitou úlohu jeho proteasy (*Boutrou a kol. 2006*)<sup>52</sup>. Dalšími zkoumanými enzymy *G. candidum* byly lichenasa a laminarinasa jako enzymy degradující  $\beta$ -glukan (*Piegza a kol.*)<sup>53</sup>. 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*)<sup>54,55,56</sup>.

První práce, která se zabývala možnou produkcí pektolytických enzymů tímto mikroorganizmem, pochází z roku 1969 (*Barash a kol. 1969*)<sup>57</sup>. 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 (*Nakanuta a kol. 2002, 2003*)<sup>58,59</sup>. 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*)<sup>60,61</sup>. Celkem byly testovány 4 typy kultivačních médií lišící se v obsahu solí, přidavku kvasničného autolyzáta 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*)<sup>7</sup>.

Jak již naznačovaly výsledky získané při optimalizaci produkce lipas (*Mladenoska a kol. 2001*, *de Medeiros Burket a kol. 2005*)<sup>55,56</sup>, *G. candidum* je na jedné straně citlivé na míchání pravděpodobně v důsledku poškození mycelií (*Arends a kol. 1975*)<sup>62</sup>, na druhé straně však potřebuje dostatečný přísun kyslíku (*de Medeiros Burket a kol. 2005*)<sup>56</sup>. Stejně jako v případě lipas, růst kmene a produkce polygalakturonas byla nižší, když se kultivovalo buď za míchání anebo byl kmen zalit zvlhčovacím 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 houbou *A. foetidus* na řepných řízcích a pšeničných otrubách (*Taskin a Stratilová 2008*)<sup>63</sup>. Kromě produkce polygalakturonas, složení kultivačního média mělo vliv i na produkci barviva a morfologii testovaného kmene.

### 3.2 Produkce polygalakturonas

Solid state kultivace *G. candidum* na hroznových výliscích probíhala po dobu 10 dnů. Vzorky byly odebírány 3., 4., 5., 6., 7. a 10. den. 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)<sup>64</sup>. 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 připsán 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)<sup>65</sup>. Pro určení typu enzymů v 3. a 7. dni kultivace *G. candidum* byly tyto enzymy izolovány a charakterizovány. Hang a kol.<sup>9</sup> 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.

### 3.3 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)<sup>66</sup>. Základním rozlišovacím znakem je neschopnost endoPGasy štěpit digalakturonovou kyselinu. Protože tento enzym štěpí polymerní substrát (PGA) endomechanismem, při korelování poklesu viskozity a přírůstku redukcujících skupin v průběhu reakce zodpovídá poklesu viskozity na 50% méně než 3% rozštěpených vazeb substrátu. Produkty reakce jsou delší fragmenty PGA, v pozdějších fázích reakce oligogalakturonové kyseliny. V případě exoPGasy 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)<sup>67,68,64,69,70</sup>.

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. 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 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)<sub>4</sub> nebo (GA)<sub>5</sub> pH 4,6. (Barash a kol. 1969)<sup>57</sup> popsali mechanismus působení polygalakturonas. Řetězec polygalakturonátu je štěpen náhodně na menší oligogalakturonové jednotky, zatímco tetramer 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.<sup>9</sup> 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.

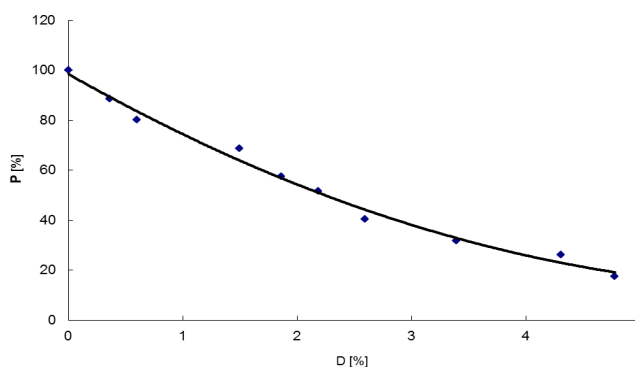
Rozdíl v teplotních optimech endoPGasy a exoPGasy byl publikovaný i pro jiné mikrobiální polygalakturonasy, např. *A. pullulans* CCY 27-1-111 produkoval endoPGasu s teplotním optimem 50 °C a exoPGasu s teplotním optimem 60 °C (Stratilová a kol., 2005a)<sup>67</sup>. Optimální teplota okolo 60 - 70 °C byla pozorována i pro exoPGasy z rostlin (Stratilová a kol. 2005b; Flodrová a kol. 2007; 2009)<sup>68,69,70</sup>.

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 se pozorovala inaktivace ve dvou stupních,

kteř by mohly zodpovídat majoritní formě endoPGasy a exoPGasy. Předpokládáme, že endoPGasa byla stabilní jen do 35°C, nad 55 °C byla také pozorována výrazná inaktivace exoPGasy. Pro endoPGasu purifikovanou *Hangem a kol.*<sup>9</sup> 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*)<sup>67</sup>.

### 3.3.1 Stanovení způsobu účinku polygalakturonas

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*)<sup>64</sup>, testoval se vzorek odebraný ze 7. dne kultivace (**Obr. 2**). 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 odebrány 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.

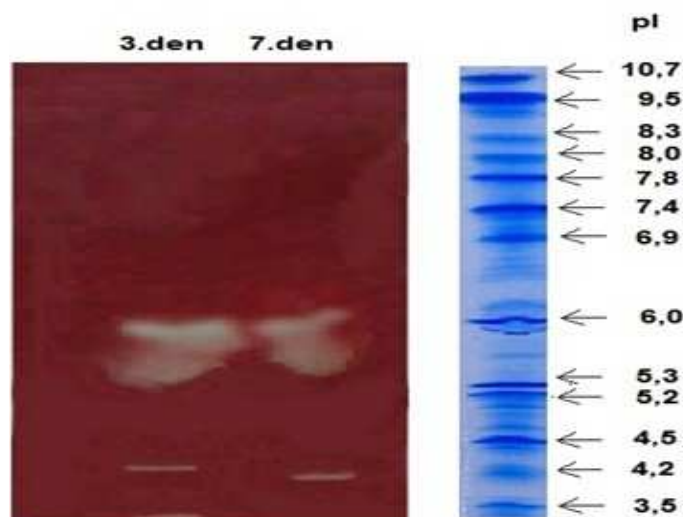


**Obr. 2: Mechanismus účinku endoPGasy: závislost poklesu viskozity na stupni degradace polymerního substrátu (počtu rozštěpených vazeb polymerního substrátu)**

Protože poklesu viskozity na 50% odpovídal přibližně jen 2,2 % rozštěpených vazeb, 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 (*Stratilová a kol. 2006*)<sup>64</sup> 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*)<sup>57</sup>. V případě pentameru kyseliny galakturonové štěpil tento enzym jednotky v poměru 3 + 2.

### 3.3.2 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. 3** 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.

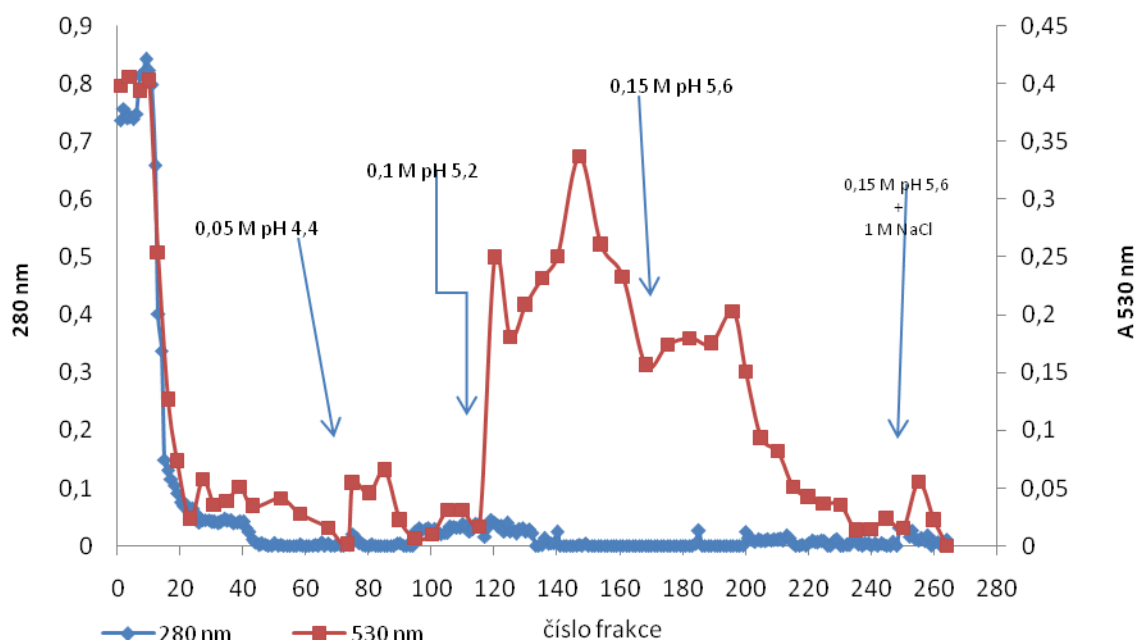


**Obr. 3: IEF-PAGE** purifikovaných majoritních a minoritních forem polygalakturonas produkovaných 3. a 7. den kultivace *G. candidum*

Z uvedeného experimentu vyplývá, že *G. candidum* CCY 16-1-29 produkovalo na hroznových výliscích výlučně kyselé PGasy. (Nakamura a kol. 2002)<sup>58</sup> 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)<sup>65</sup>, může být produkce forem s různým pI ovlivněná právě tímto faktorem.

### 3.3.3 Částečná purifikace polygalakturonas

Částečná purifikace polygalakturonas byla provedena na CM-Sephadex C-50 koloně ekvilibrované 0,05 M octanovým pufrům 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 přidávkem 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. 4** 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 polygalakturonasová 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 shodné, proto uvádíme jen ten pro 3. den (**obr. 4**).



**Obr. 4:** CM-Sephadex C-50 kolona: 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 1**. 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 aktivity 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. 1:** Výtěžnost a efektivita jednotlivých purifikačních kroků (3. den & 7. den)

| Purifikační krok        | $a_{\text{lyofilizát}}$<br>( $\mu\text{mol/min.mg}$ ) | celk. protein (mg) | $a_{\text{spec.}}$<br>( $\mu\text{mol/min.mg}$ ) | Výtěžek (%) |
|-------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------|-------------|
| 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   |

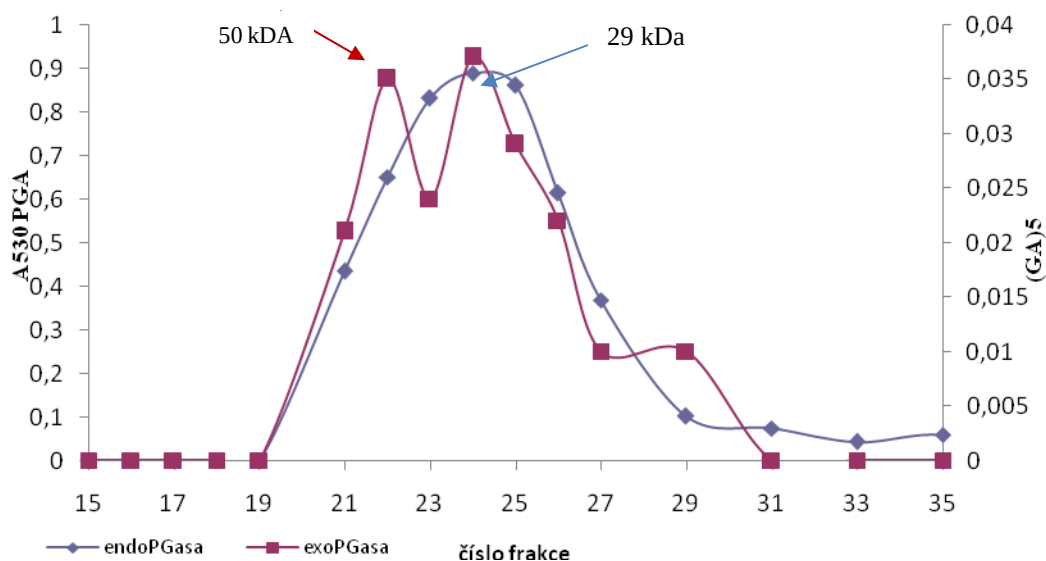
Vzhledem ke zjištění výrazného poklesu aktivity v průběhu pročišťování, nebyl uskutečněn další purifikační krok. (z nanesené aktivity vzorku z 3. dne kultivace 55,05  $\mu\text{mol/min}$  se z kolony získalo 13,45  $\mu\text{mol/min}$  a z nanesené aktivity vzorku ze 7. dne kultivace 32,95  $\mu\text{mol/min}$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

### 3.4 Charakterizace polygalakturonas z hlediska $M_r$

#### 3.4.1 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 vztaheny 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. 5:** Gelová filtrace na Superdex 75 column: endoPGasa 29 kDa, exoPGasa 50 kDa

Na **obr. 5** 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 terciální struktuře (sbalení) enzymu.

### 3.4.2 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. 2** jsou uvedeny stanovené molekulové hmotnosti eluovaných frakcí po CM-Sephadex C-50 koloně s využitím elektroforézy na čipu. 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 polygalakturonas stanovené gelovou filtrací (29 a 50 kDa) a jejich izoelektrické body, se na další experimenty použily pouze frakce VI – IX, ve kterých se detekovaly proteiny s molekulovými hmotnostmi v oblasti 27,6 – 50,0 kD

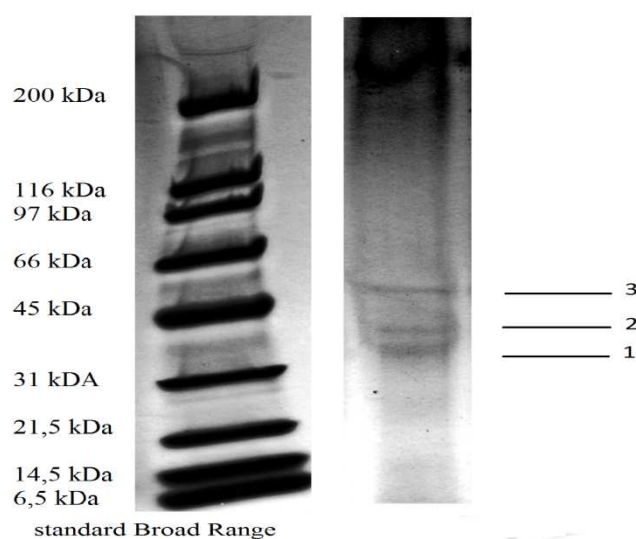
**Tab. 2:** Molekulové hmotnosti eluovaných proteinových frakcí po CM Sephadex C-50 koloně stanovené pomocí proteinového čipu 230 na bioanalyzátoru 2100

| Frakce I<br>pH 4,4<br>(kDa) | Frakce II<br>pH 4,4<br>(kDa) | Frakce III<br>pH 4,4<br>(kDa) | Frakce IV<br>pH 4,4<br>(kDa) | Frakce V<br>pH 5,2<br>(kDa) | Frakce VI<br>pH 5,2<br>(kDa) | Frakce VII<br>pH 5,6<br>(kDa) | Frakce VIII<br>pH 5,6<br>(kDa) | Frakce IX<br>pH 5,6 + NaCl<br>(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                               |

### 3.4.3 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. 6**). Proteiny v jednotlivých zónách byly chemicky modifikovány a štěpeny trypsinem podle postupu uvedeném v kapitole 3.5.1.3.

Purifikované polygalakturonasy byly separovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy, na **obr. 6** 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. 6:** 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](http://www.matrixscience.com)). MS/MS spektrum peptidu s  $m/z$  2416,2813 pocházejícím z proteinu 1 (**obr. 6**) je znázorněno na **obr. 7**. 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)<sup>58</sup>.

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. Nejvyšší podobnost se zjistila s polygalakturonasami (endoPGasami, EC. 3.2.1.15) z *G. candidum* S31PG1 (Nakamura a kol. 2003)<sup>58</sup> (**Q96WQ1**), *Penicillium expansum* (**O59925**) a *Fusarium oxysporum* (**Q53UB0**). Poslední aminokyselina nově nalezené sekvence „SNNVVSNNILSSQVVNSDNGVR“ (v obrázku označena modře), arginin, je součástí jednoho z vazebních míst PGAs, striktně konzervované sekvence RI/VK (Markovič a Janeček 2001)<sup>71</sup>.

#### Porovnání nalezené sekvence endoPGasy Ap2PG1 se sekvencemi endoPGas

Nalezená sekvence endoPGasy (označena modře) byla identická se sekvencí Ap2PG1 *Galactomyces geotrichum*. Ap2PG1 byla porovnávána se známými sekvencemi endoPGAAs. Sekvence podobného aminokyselinového složení měly: *Geotrichum candidum* S31PG1, *Penicillium expansum* a *Fusarium oxysporum*, **obr. 7**.



|                           |                                                                |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------|
| tr  Q8NK97  Q8NK97 _GEOCN | HLFSTTRIL---AHAAHVAAAP---ADG-DLHAR-ASCIFK--DAKSA 38            |
| tr  Q96WQ1  Q96WQ1 _GEOCN | HLFSAKSAIF---AHAAI AVAAP---TEG-DLQARGGACVER--DAHSA 39          |
| sp  Q59925  PGLR _PĚMEN   | HILTRSVVLGELGSASLALASPVELAEGSELTPGGSACSYSGTSGAAA 50            |
| tr  Q53UB0  Q53UB0 _FUSOX | -HVERNIAIA---ALLPAFAST-----LPKEDPCSVTDYSGLATA 36               |
|                           | :: :: : : : *:: : : *                                          |
| tr  Q8NK97  Q8NK97 _GEOCN | IAGKKSCSNI VLQDI AVPAGETLIL TGLNKGTVVTFAGTTTFG-YKEWVG 87       |
| tr  Q96WQ1  Q96WQ1 _GEOCN | IAGKKSCSSI TLENI AVPAGQTLLD TGLAKGTVVTFAGTTTFG-YKEWVG 88       |
| sp  Q59925  PGLR _PĚMEN   | IAGKAGCSSI TLNNVVVPAGTTLLD TGLASGTKVIFEGTTTFG-YKQWAG 99        |
| tr  Q53UB0  Q53UB0 _FUSOX | VS---SCTNI VLNGF QVPTGKALDL SKLKDGATVTFKGTTFATTADNDF 83        |
|                           | :: : *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *             |
| tr  Q8NK97  Q8NK97 _GEOCN | PLI SVSGD SI TVNQASG GKI QCDGARWWD GKG SNDG-KI KPKEFYAHKHQ 136 |
| tr  Q96WQ1  Q96WQ1 _GEOCN | PLI SVSGD SI TVNQASG GKI DCGGSEWWD GKG SNGGKTEPKKEFAAKHLQ 138  |
| sp  Q59925  PGLR _PĚMEN   | PLI SI SGTHI QVSGASGHLI DGQSGEWWWD GKG SNGKTHI KPKEFFAHSLK 149 |
| tr  Q53UB0  Q53UB0 _FUSOX | DPI VI SGNIG TI TGASGHVI DGNEPAYWD GEG SNNKDNPKPDHFI VVKKT 133 |
|                           | *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *                  |
| tr  Q8NK97  Q8NK97 _GEOCN | --NSNINGLQVYNTFVQGSIL-SDHL TL SNI LIDNRAGDKTNG----- 177        |
| tr  Q96WQ1  Q96WQ1 _GEOCN | --NSNIQGLQVYNTFVQAFSIL-SDHL TL SNI LIDNRAGDKTPNG----- 179      |
| sp  Q59925  PGLR _PĚMEN   | G-SSTI TGLMIKDSPVQVESISGSSGLTI SGVTI DNMKNGDTNKL----- 192      |
| tr  Q53UB0  Q53UB0 _FUSOX | TGNSKI TNLNI QNWAVHVEDITGSSQLTI SGLILDNLGDKPKNAKS GSLP 183     |
|                           | :: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *                   |
| tr  Q8NK97  Q8NK97 _GEOCN | -GHNTDAFDVGSSTYITIDHATVYNQDDCLAINSGDHI TFQNGVCSGGHG 226        |
| tr  Q96WQ1  Q96WQ1 _GEOCN | -GHNTDAFDVGSSTFIITIDHATVYNQDDCLAINSGDHI IFQNGVCSGGHG 228       |
| sp  Q59925  PGLR _PĚMEN   | -GHNTDGFDI GDSDSITITGATVYNQDDCLAINSGTIVFSGGYCSGGHG 241         |
| tr  Q53UB0  Q53UB0 _FUSOX | AAHNSDGFDI SS SDHVTLDNHDVYNQDDCVAVTS GTMII VSMHYCSGGHG 233     |
|                           | :: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *                   |
| tr  Q8NK97  Q8NK97 _GEOCN | LSI GSVGGRSNNVVSNNVILSSQVVSNDNGVR IKTVS GATG SVTGVKFD 276      |
| tr  Q96WQ1  Q96WQ1 _GEOCN | LSI GSVGGRSDNVTNVQIIMN QVVSNDNGVRIKSVS GTTGNI SGVKFD 278       |
| sp  Q59925  PGLR _PĚMEN   | LSI GSVGGRSNNVVE TVHISSTQVVS QNGVRVKAUS GATG TIKGVTFQD 291     |
| tr  Q53UB0  Q53UB0 _FUSOX | LSI GSVGGRSNNVVMGVQELDS QIVSNGCRKISNS GTTG TIANVTYQN 283       |
|                           | *****:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *              |
| tr  Q8NK97  Q8NK97 _GEOCN | ITL SNI AKY GIDVQQDYENG GPDGKPTNGVKI SGITF SNIHGSIKS SGTG 326  |
| tr  Q96WQ1  Q96WQ1 _GEOCN | ITL SNI AKY GIDVQQDYENG GP TGNPTNGVKI TGIEF INVHGVKS SGTN 328  |
| sp  Q59925  PGLR _PĚMEN   | ITL SGITSQGITIRQBYTNSGYTESPTTGVPITGL TLNNVHGVTVTSKGTD 341      |
| tr  Q53UB0  Q53UB0 _FUSOX | IPL TMI SKYGVWDVQQDYENG GP TEKPTNGVKI SGIEF IKVTGTVAS SQD 333  |
|                           | :: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *                   |
| tr  Q8NK97  Q8NK97 _GEOCN | AYLLCGS-GSCSNFTWKNINLTGKTS GACKNVSPATCNI 366                   |
| tr  Q96WQ1  Q96WQ1 _GEOCN | AYLLCGS-GSCSNWTWSQINVKGGKDS GACKNVPAATCEL 368                  |
| sp  Q59925  PGLR _PĚMEN   | ITIECGSSASCS GWTWTKVAUS GEK-ADVCKNAPS-GTC-- 378                |
| tr  Q53UB0  Q53UB0 _FUSOX | WYLLCGD-GSCSGFTFSGNATGSGKTS CNYPTN--TCPS 371                   |
|                           | :: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *                   |

Obr. 7: Porovnání primárních struktur polygalakturonas Ap2PG1 z *G. candidum* (Q8NK97), *P. expansum* (Q59925) a *F. oxysporum* (Q53UB0) se začleněním nově identifikované sekvence „SNNVVSNNVILSSQVVSNDNGVR“ z peptidu s m/z 2416,2813 (označena modře)

Na základě těchto výsledků lze usoudit, že protein 1 (obr. 6) 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. 2). EndoPGasa Ap2PG1 produkovaná též *G. candidum* (Nakamura a kol. 2002)<sup>58</sup>, 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)<sup>58</sup>. (Barash a kol. 1984)<sup>72</sup> izolovali endoPGasu produkovanou *G. candidum* s využitím afinitní chromatografie. Tento enzym měl molekulovou hmotnost 38 kDa identickou s molekulovou hmotností Ap2PG1, ale izoelektrický 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*<sup>58</sup>. Další endoPGasou produkovanou patogenním druhem *G. candidum* je polygalakturonasa S31PG1<sup>162</sup>. 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.<sup>72</sup> byla stejně jako Ap2PG1 a S31PG1 produkovaná patogenním druhem napadajícím citrusové plody<sup>58,59,72</sup>.



Podobně jak byla vyhodnocená analýza hmotnostní spektrometrií proteinu 1, byla vyhodnocena i pro protein 2 (**obr. 6**). Nalezená sekvence aminokyselin tohoto tryptického štěpu byla „ANASLSIR“. Tato sekvence byla podle podobnostního vyhledávání totožná se sekvencí pektin methylesterasy (PME) *Leptoshaeria maculans* (**E4ZJT9**). **Obr. 8** znázorňuje umístění dané sekvence v molekule PME *Leptoshaeria maculans* (**E4ZJT9**) a porovnání struktury **E4ZJT9** se strukturami nejpodobnějších proteinů z databází, PME z toho samého zdroje (**E4ZHH5**) a PME produkované *Emericella nidulans*, syn. *Aspergillus nidulans* (**Q5B7U0**). Nově nalezená sekvence „ANASLSIR“ (na obrázku označena modře), se nachází v bezprostřední blízkosti „regionu V“ (Markovič a Janeček 2004)<sup>175</sup>, který obsahuje striktně konzervovaný arginin a tryptofan, které jsou součástí aktivního místa enzymu (Jenkins a kol. 2001; Eklund a kol. 2002)<sup>73,74</sup>.

Porovnávání struktury měly 57 identických pozic, podobných bylo 105. Uvedené výsledky naznačují, že protein 2 (**obr. 6**) 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 stanovena při analýze vzorků na Bioanalyzátoru 2010 ve frakci IX (**tab. 2**). Proteiny frakce IX byly uvolňované z kolony s náplní CM Sephadexu C-50 až 1 M NaCl, což naznačuje bazický charakter izoelektrického bodu tohoto proteinu. Z dostupné literatury není produkce PME u druhu *G. candidum* potvrzena, avšak vzhledem na funkci tohoto enzymu se dá očekávat. Pektinmetylerasa totiž demethyluje v pektinu homogalakturnanu a tím připravuje substrát pro PGasy. Protein 3 (**obr. 6**) 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 by se dalo usuzovat, že jde o majoritní PGasu s méně kyselým izoelektrickým bodem, protože endoPGasa se uvolňovala ve frakci VI.

## 4 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.

### 4.1 Studium vlastností komerčního přípravku

#### 4.1.1 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 naočkován 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. 9**.

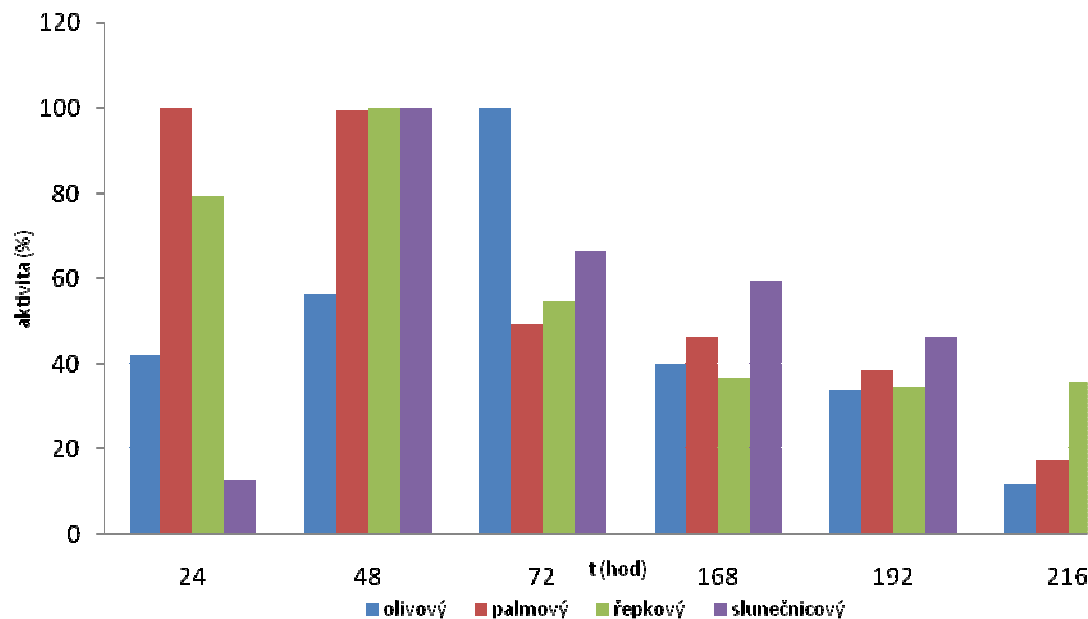


**Obr. 9:** Spirit blue agar indikující důkaz lipolytické aktivity komerčního přípravku

#### 4.1.2 Sledování lipolytické aktivity a uvolněných mastných kyselin

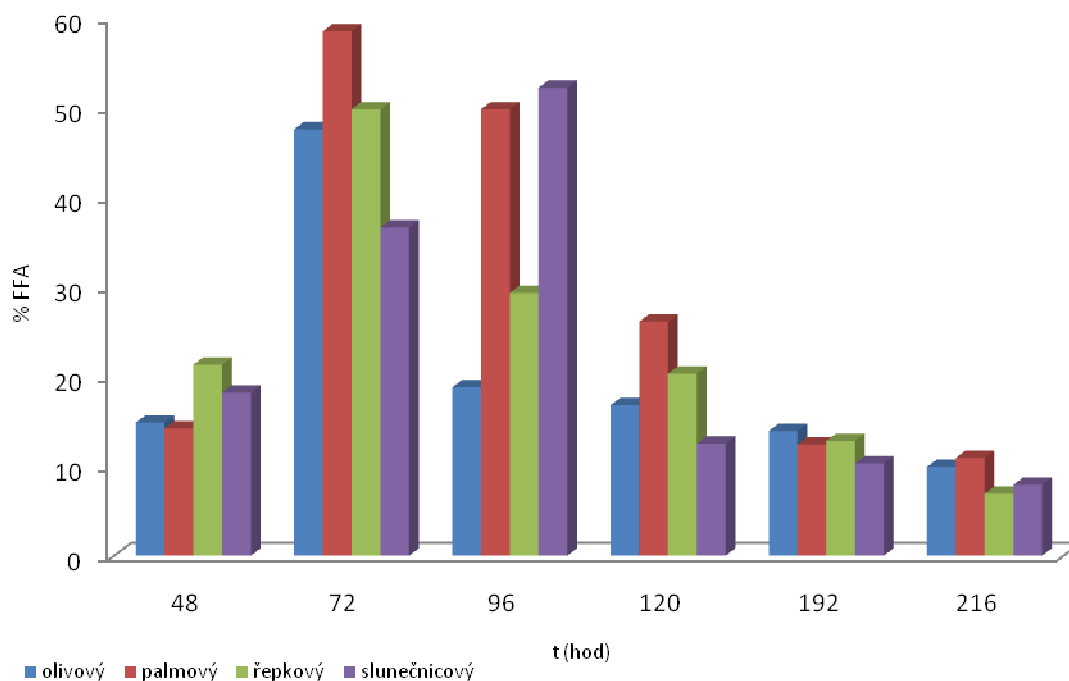
Lipolytická aktivita byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 420 nm. Jako substrát byl využit 2,5 mM p-nitrophenyllaurát v ethanolu. Hydrolytická reakce probíhala při 37 °C po dobu 30 minut. Jako modelová odpadní voda bylo použito kultivační médium o složení: 1,12 g  $K_2HPO_4$ ; 0,48 g  $KH_2PO_4$ ; 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. 10**. 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. 10: Lipolytická aktivita komerčního přípravku s použitím různých substrátů**

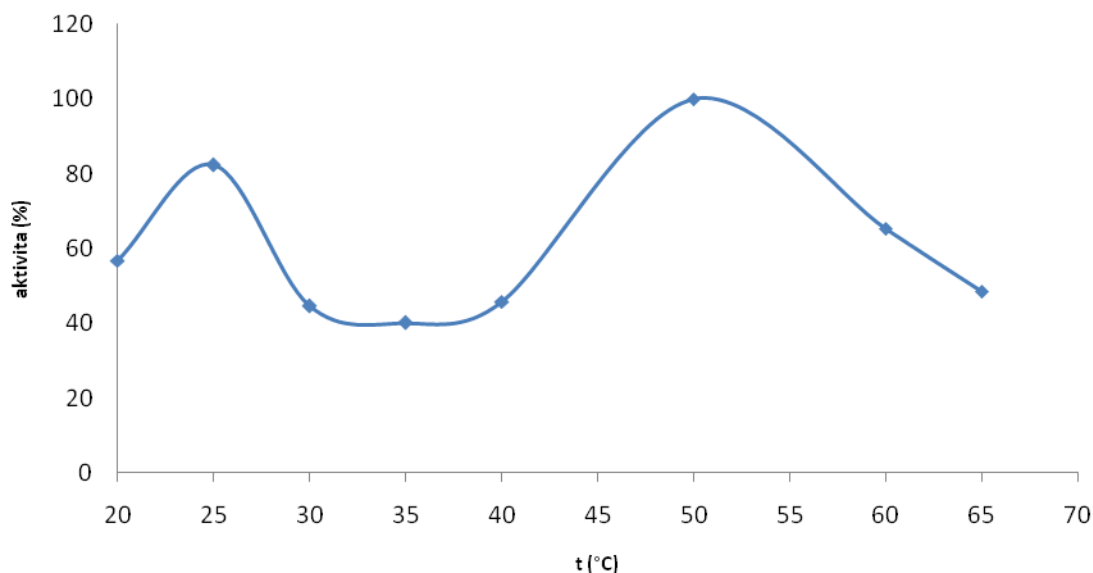
Stanovení uvolněných mastných kyselin bylo provedeno za účelem zjištění schopnosti KP degradovat lipidové substráty a využívat produkty této degradace jako zdroj uhlíku. Olivový, palmový, řepkový a slunečnicový olej byly použity jako lipidový substrát pro modelové odpadní vody. Nejlépe degradovatelným 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. 11**. Z tohoto experimentu lze opět posoudit vliv složení substrátu na odpadní vodu.



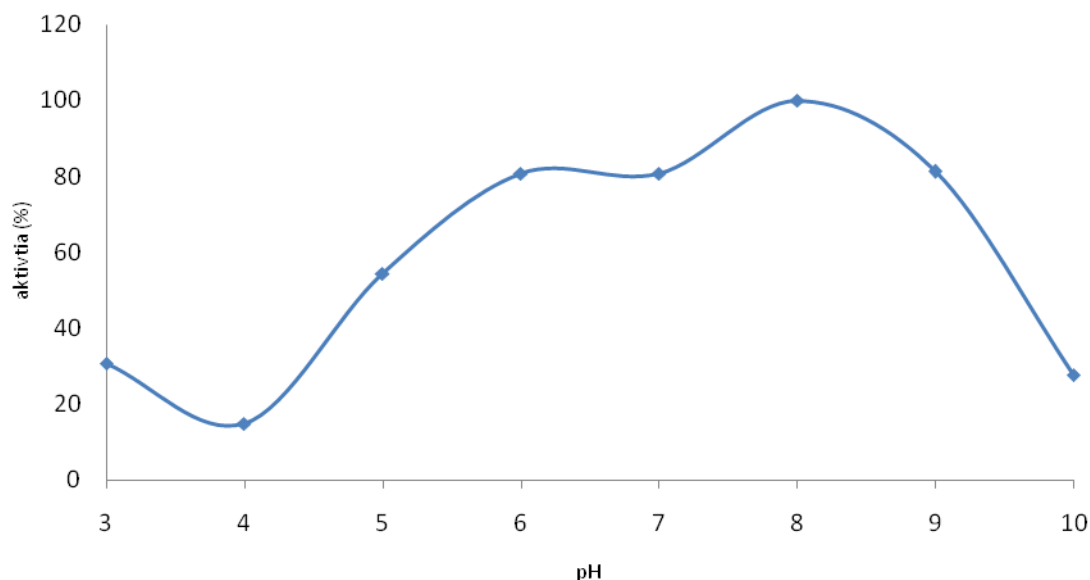
**Obr. 11: % uvolněných mastných kyselin sledovaná při degradaci olejnatých substrátů**

#### 4.1.3 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. 12**). 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. 13**).



**Obr. 12:** Vliv teploty na produkci extracelulárních lipas komerčního přípravku

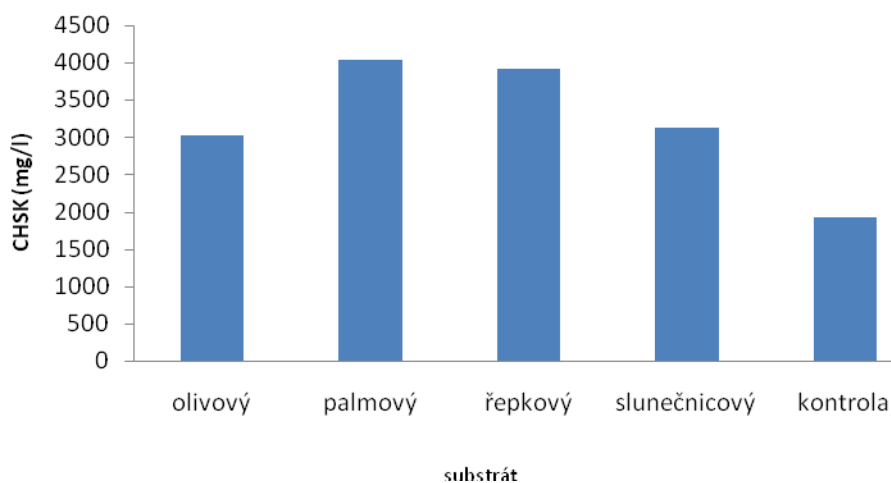


**Obr. 13:** Vliv pH na produkci extracelulárních lipas komerčního přípravku

#### 4.1.4 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. 14** a **tabulce 3** je znázorněn obsah oxidovatelných organických látek v jednotlivých modelových odpadních vodách.

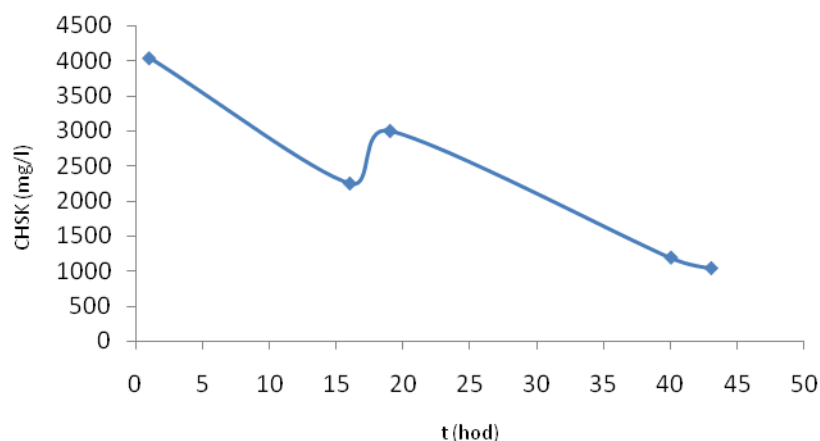


**Obr. 14: Obsah oxidovatelných organických látek v modelových odpadních vodách (mg/l)**

**Tab. 3: 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. 13**. 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. 15**) s přidavkem palmového oleje, který byl vyhodnocen jako nejlépe degradovatelný substrát.



**Obr. 15: Závislost koncentrace organických látek na čase**

Z uvedeného **obr. 15** 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.

#### 4.1.5 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 Odličovače tuků a ropných látek*)<sup>116</sup>. 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 mikroflóry komerčního přípravku proběhla za účelem identifikace druhového mikrobiálního zastoupení pro návrh nového produktu do odličovače tuků.

##### 4.1.5.1 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. 16** (zvětšeno světelným mikroskopem 15 x 100, imersní objektiv, tyčinkovité bakterie G+).



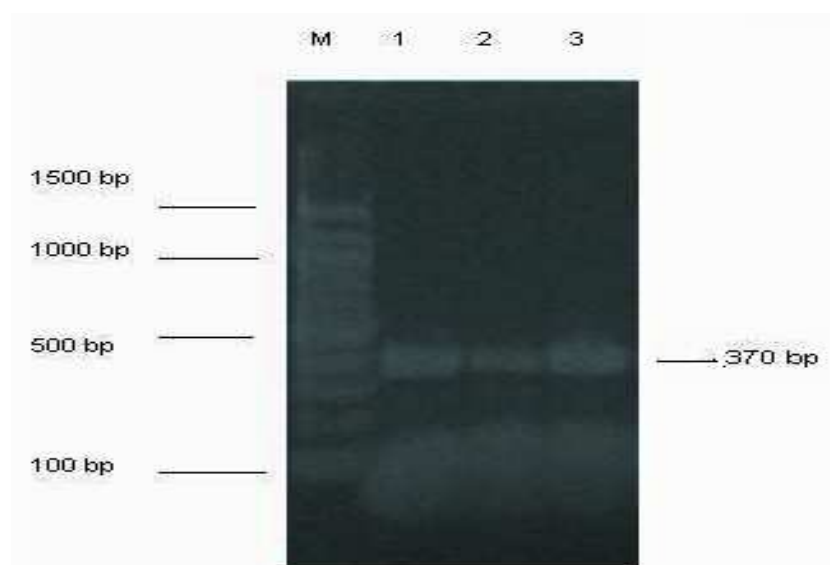
**Obr. 16:** G+ tyčinkovité bakterie komerčního přípravku SanyDuo (Sanytura GmbH), zvětšeno světelným mikroskopem 15 x 100, pozorováno imerzním objektivem)

##### 4.1.5.2 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)<sup>75</sup>. 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. 17**. Pro vyloučení falešně pozitivních výsledků byla jako kontrola použita genomová DNA sbírkového kmene *Bacillus subtilis* CCM 1999 (Czech Collection of Microorganisms, Masarykova Univerzita).



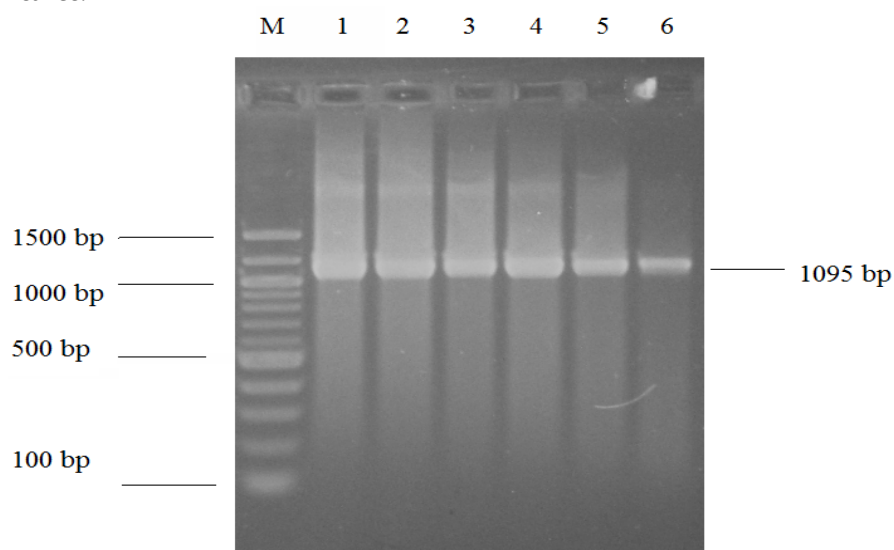


**Obr. 17:** Agarozová gelová elektroforéza amplifikované DNA s využitím doménově specifických primerů DG74 a RW01 (370 bp): M – DNA standard; 1, 2 – bakterie izolované z komerčního přípravku; 3 – kontrola *B. subtilis* CCM 1999

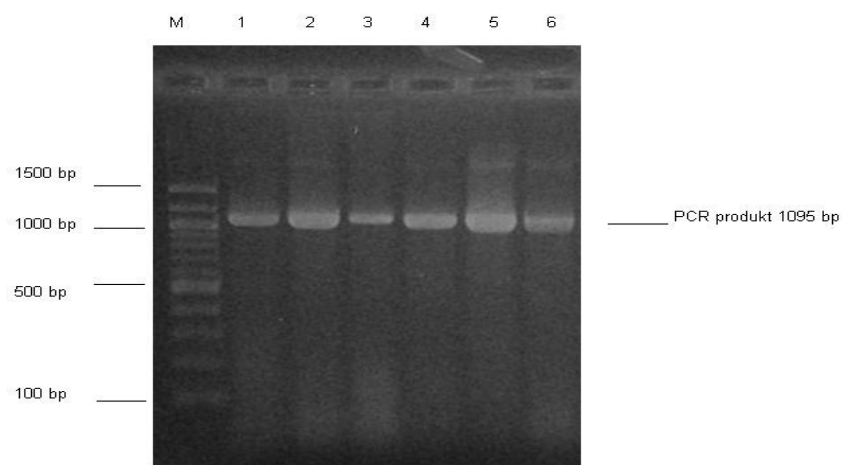
#### 4.1.5.3 Rodově specifická polymerázová řetězová reakce

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) <sup>76</sup>.

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) <sup>77</sup>. Specifita rodově specifických primerů *Bacillus* byla potvrzena polymerázovou řetězovou reakcí s detekcí agarozovou gelovou elektroforézou. Na **obr. 18** je uvedena rodově specifická PCR s DNA izolovanou metodou fenolové extrakce, na **obr. 19** 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.



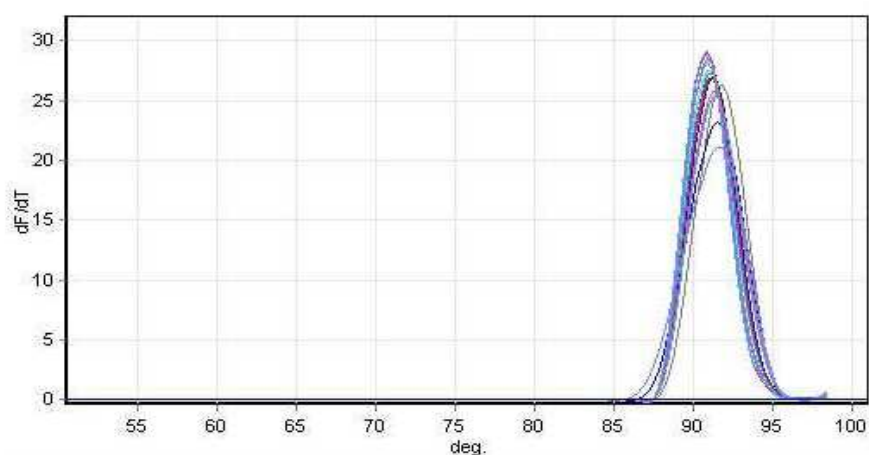
**Obr. 18:** Detekce PCR produktů pomocí agarózové gelové elektroforézy. S využitím rodově specifických primerů BK1/F a BK1/R byla amplifikována DNA izolovaná fenolovou extrakcí: M – DNA standard; 1, 2 – bakterie komerčního přípravku; 3 – *B. subtilis* CCM 1999, 4 – *B. licheniformis* CCM 2145<sup>T</sup>; 5 – *B. megaterium* CCM 2037; 6 – *B. cereus* CCM 2010<sup>T</sup>



**Obr. 19:** 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<sup>T</sup>; 5 – *B. megaterium* CCM 2037; 6 – *B. cereus* CCM 2010<sup>T</sup>

#### 4.1.5.4 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)<sup>77</sup>. 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). Měření proběhlo na termocycleru Corbett Rotor-Gene 6000 pomocí vyhodnocovacího softwaru Rotor-Gene 6000 Software 1.7. Na **obr. 20** jsou uvedeny křivky tání, které se používají k ověření specifity amplifikovaných produktů. Specifické produkty se odlišují od nespecifických jinou teplotou tání.



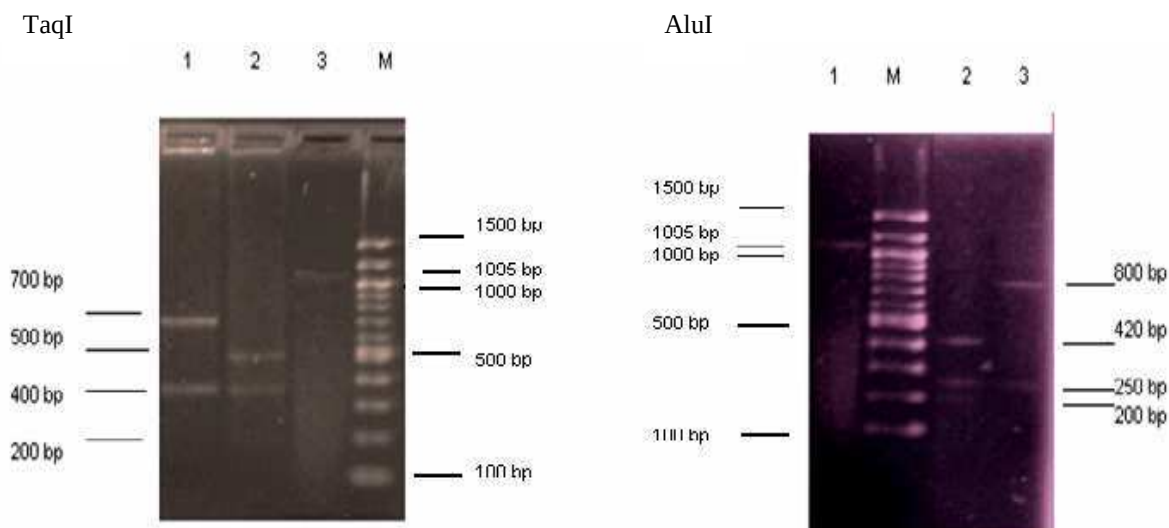
**Obr. 20:** Křivky tání - ověření specifity RT-PCR produktů

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.

#### 4.1.5.5 Amplifikovaná ribozomální DNA restrikční analýza



*Bacillus* sp. izolované z komerčního přípravku byly identifikovány po kultivaci na Brain Heart Infusion Broth s přidavkem agaru. Na agarových plotnách byly pozorovány dva typy morfologicky odlišných kolonií. Kolonie byly přečištěny 3x pomocí křížového roztěru. Identifikace druhů byla provedena metodou ARDRA. Amplikony byly štěpeny restričními 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* restriční 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* restriční endonukleasy: *Bacillus subtilis* (200, 200, 250, 400 bp fragmenty) a *Bacillus licheniformis* (250, 800 bp fragmenty) – **obr. 21**.



**Obr. 21:** *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 restriční 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.

## 4.2 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<sup>T</sup>
- *Geobacillus thermocatenulatus* CCM 2809<sup>T</sup>
- směsná kultura bakterií *Bacillus* a *Thermus*

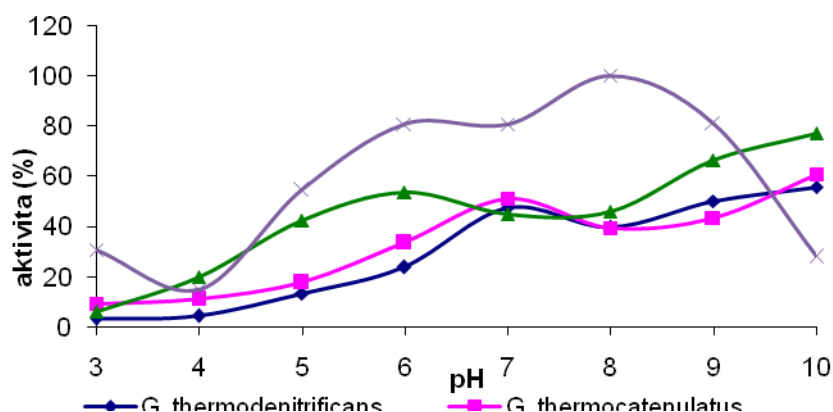
Z kapitoly s názvem Stanovení vlivu pH a teploty na produkci lipas komerčního přípravku viz **obr. 12** a **13** vyplynulo, že bakterie z komerčního přípravku produkovaly lipasy v optimálním rozsahu pH 6,0 – 8,0. Přičemž optimální teplota pro produkci lipas bakteriemi komerčního přípravku byla stanovena při teplotách 25 °C a 50 °C. Tyto stanovené hodnoty pH a teploty 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.

### 4.2.1 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. 4** a na **obr. 22**. 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. 2008<sup>75</sup> 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)<sup>75</sup>.

**Tab. 4: 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                          |



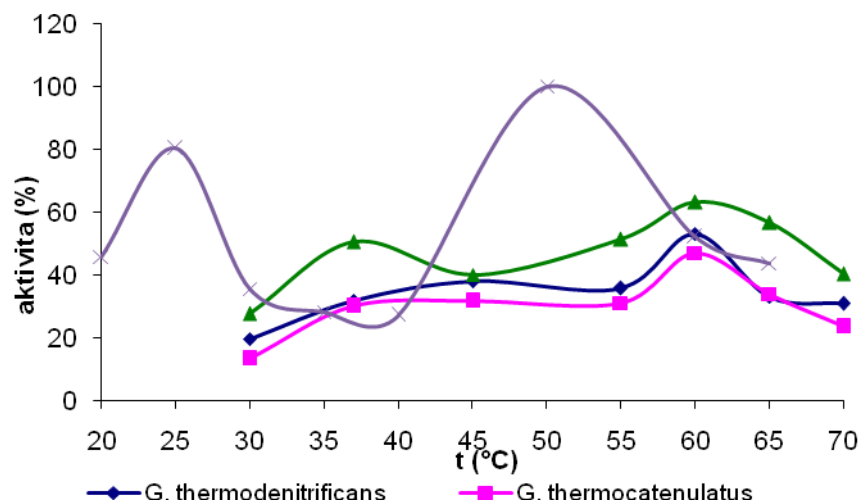
**Obr. 22: Vliv pH na produkci lipas bakteriálními druhy *G. thermodenitrificans*; *G. Thermocatenulatu*, směsnou termofilní kulturou *Bacillus* a *Thermus* a *Bacillus subtilis***

#### 4.2.2 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. 5**. 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. 23**. 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. 2008<sup>75</sup> 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)<sup>76</sup> 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 komerčního přípravku a kmene *B. subtilis* CCM 1999.

**Tab. 5: Vliv teploty na lipasy produkované do prostředí**

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

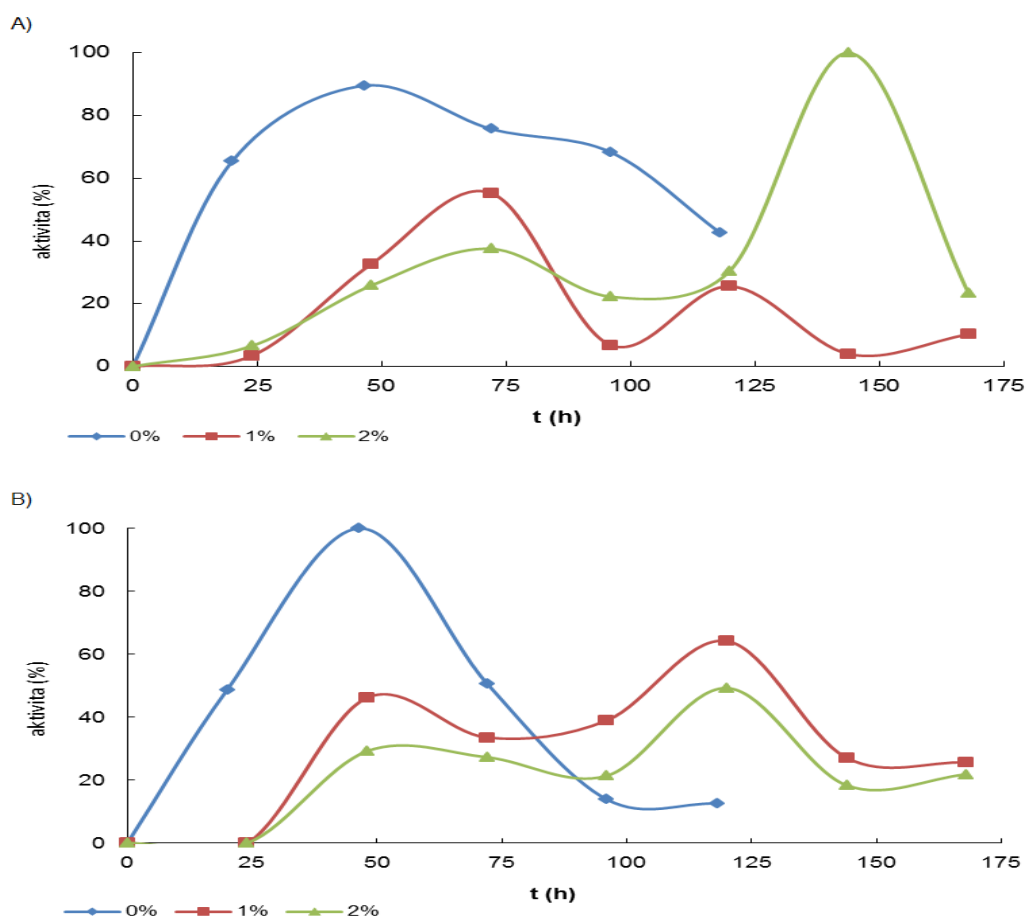


Obr. 23: Vliv teploty na lipasy produkované druhy *G. thermodenitrificans*; *G. Thermocatenulatus*; směsnou termofilní kulturou *Bacillus a Thermus a Bacillus subtilis*

#### 4.2.3 Vliv tenzidů na produkci lipas

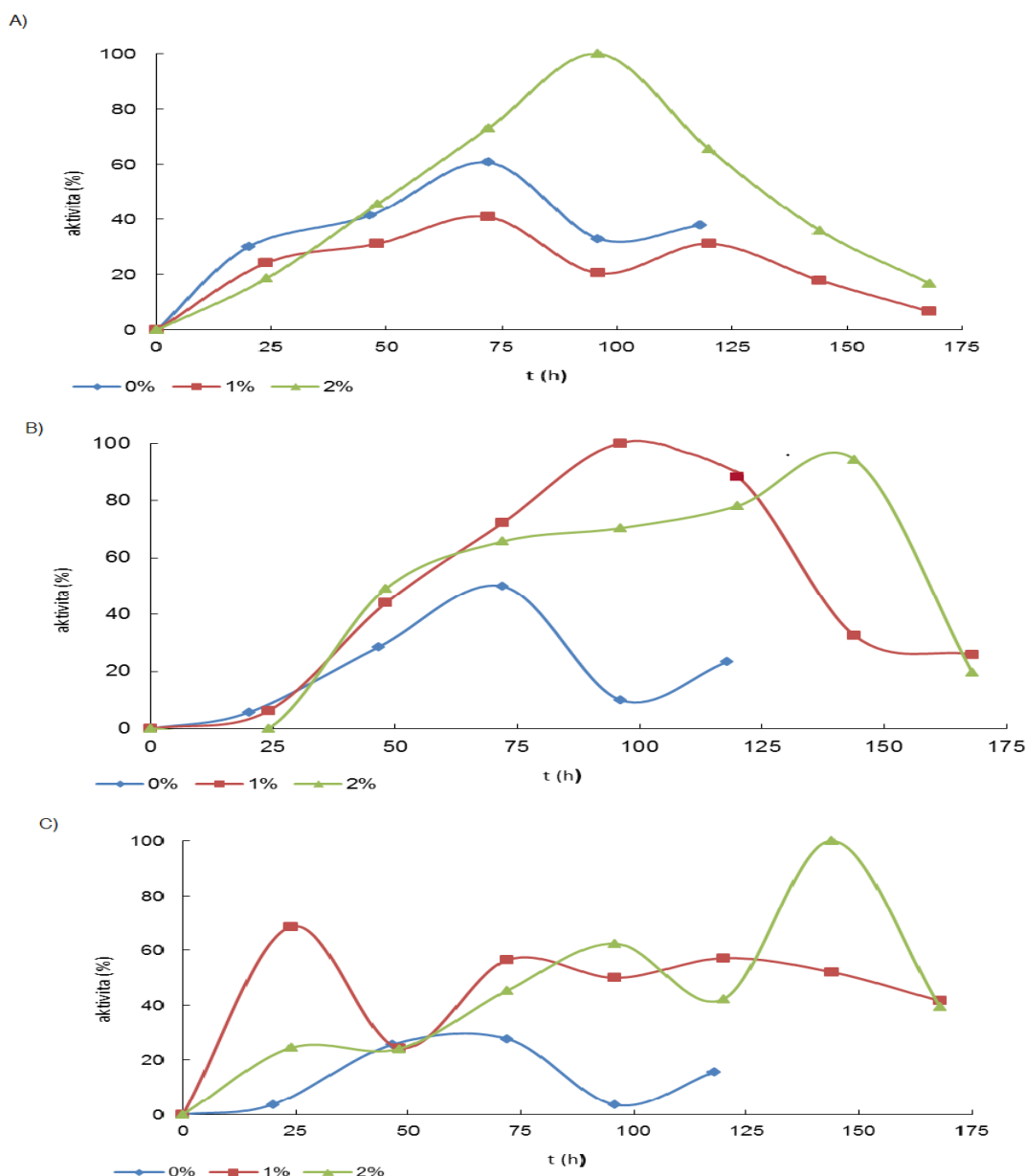
Produkce lipas může být ovlivněna přítomností tenzidů v odpadních vodách. Tyto tenzidy jsou součástí odpadních vod v důsledku aplikace čisticích prostředků a mohou tedy ovlivňovat růst a množení buněk a s tím související produkci lipas (Anjalci a kol. 2010) <sup>77</sup>. Vliv vyšších koncentrací tenzidů v odpadní vodě má v některých případech antimikrobiální účinek, avšak při nízkých koncentracích může být jejich vliv stimulační (Anjalci a kol. 2010) <sup>77</sup>. 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. 24 A, B**. Extracelulární lipasy byly produkovány až po 100 hodinách kultivace.



**Obr. 24: Vliv přidavku 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 projevily vlivy tohoto tenzidu pozitivně již po dvou dnech kultivace, **obr. 25 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. 25: Vliv přidavku Tweenu 20 na produkci lipas: A) *G.thermodenitricans*; B) *G. thermocatenulatus*; C) směsná 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 Anjalci a kol. 2010<sup>77</sup>, 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<sup>78,79</sup> 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)<sup>80</sup>.

## 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 degradace odpadních materiálů potravinářského průmyslu a využití hydrolytických enzymů při tomto procesu. 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. Při studiu těchto pektolytických enzymů se pozornost zaměřila na identifikaci jednotlivě produkovaných polygalakturonas. 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 polygalakturonas. Avšak polygalakturonasy produkované *Aureobasidium* a plísní *Aspergillus foetidus* se po izolaci projeví jako extrémně nestabilní. Z tohoto důvodu byly zmíněné dva kmeny vyloučeny z dalšího testování. Produkce polygalakturonas byla dále studována u kmene *G. candidum* CCY 16-1-29, nejvyšších hodnot polygalakturonasové aktivity bylo dosaženo ve 3. a 7. dni kultivace. Uvedené polygalakturonasy byly purifikovány a charakterizovány použitím několika metod.

Na základě sledování pH optima produkovaných polygalakturonas byla v případě 3. dne zjištěna produkce exopolygalakturonasy s pH optimem 4,6. V případě 7. dne produkce endopolygalakturonasy s pH optimem 4,8. Navíc byla zjištěna exopolygalakturonasa produkovaná ve 3. i 7. dni kultivace, tato forma však byla zřejmě inaktivována. Při studiu mechanismu účinku purifikovaných polygalakturonas bylo zjištěno, že forma produkovaná v 7. dni kultivace vykazovala náhodný způsob účinku a jednalo se o endopolygalakturonasu. Endopolygalakturonasu se podařilo potvrdit i dalšími metodami. Metodou izoelektrické fokusace byl stanoven její izoelektrický bod v kyselé oblasti pI a jednalo se tedy o kyselou formu polygalakturonasy produkovanou kmenem *G. candidum* CCY 16-1-29. Další metodou, která potvrdila přítomnost endopolygalakturonasy, byla SDS-PAGE (36 kDa) s následnou proteomickou identifikací MALDI-TOF/TOF o molekulové hmotnosti 38 kDa.

Náhodně identifikovaným enzymem byl enzym podobný pektinmethylesterase druhu *Leptosphaeria maculans*, který byl zařazen jako EC 3.1.1.11 o molekulové hmotnosti 43 kDa. Tento enzym byl potvrzen jak metodou SDS-PAGE (44 kDa), tak i tryptickým štěpením s následnou analýzou MALDI-TOF/TOF. Z dostupné literatury není produkce pektinmethylesterasy u druhu *G. candidum* potvrzena, avšak se dá předpokládat.

Z uvedených výsledků vyplynulo, že kmen *G. candidum* CCY 16-1-29 i samotný druh *G. candidum* by bylo vhodné na produkci polygalakturonas dále testovat. Doposud získané výsledky potvrdily, že hroznové výlisky bylo možno použít jako odpadní materiál pro produkci pektolytických enzymů, zvláště polygalakturonas, které by bylo možné využít jako technologicky významné enzymy při zpracování ovoce a zeleniny, např. čiření šťáv, 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 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.

Mikroflóra 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 obsahují 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 residua biomass from viticulture production. Článek ve formátu pdf k dispozici online na <http://svt.pi.gin.cz/vuztweb/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](http://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. 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
8. Gente, S., Sohier, 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.
9. Hang, Y. D., Woodams, E. E. Production and characterization of polygalacturonase from *Geotrichum candidum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8, 480-482.
10. Kocková-Kratochvílová, A.: Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov, Vydavateľství ALFA Bratislava, ISBN 80-05-00644-6, 1999.
11. Pandey, A.: Recent process developments in solid-state fermentation *Process Biochem.*, 1992, Vol. 27, Issue 2, pp. 109-117.
12. Manpreet, 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
13. 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.
14. Couto, S. R., Sanromán, M. A.: Application of solid state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal* 22 (2005) 211-219.
15. Couto, S. R., Sanromán, M. A.: Application of solid state fermentation to food industry – A review. *Journal of Food Engineering* 76 (2006) 291-302.
16. 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.
17. Sakai, T., Takaoka, A. Purification, crystallization and some properties of endo-polygalacturonase from *Aureobasidium pullulans*. *Agric. Biol. Chem.* 1984;49:449–58.
18. 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.
19. 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.
20. Manachini, M., Fortina, C., Parini, C.. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnol. Lett.* 1987;9:219–24.
21. 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.
22. Kumar, S. S., Palanivelu, P. Purification and characterization of an exopolysaccharide from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. *World J Microbiol Biotechnol* 1999;15:643–6.)
23. 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 *Peecilomyces clavispurus* 2A. UMIDA.1. *Process Biochem.* 2003; 4:455–8.
24. 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.
25. Rodrigues-Palenzuela P., Burr T. J., Collmer, A. Polygalacturonase is a virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *J. Bacteriol.* 1991;173:6547–52.
  26. 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.
  27. Kobayashi, T., Gigami, N., Tajima, N., Suzumatsu, A., Hagihara, H., Kakai. Purification and properties of a galacturonic acid-releasing exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001; 65:842–7.
  28. Nozaki, K., Miyairi, K., Hizumi, S., Fukui, Y., Okuno, T. Novel exopolygalacturonases produced by *Alternaria mali*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997;61:75–80.
  29. 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.
  30. Huang, Q, Allen, C. An exo-poly- $\alpha$ -D-galacturonosidase, Peh B, is required for wild type virulence of *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.* 1997;179:7369–78.
  31. Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., Vandamme, E. J. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 1993;39:231–94.
  32. 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.
  33. Vinařský slovník online: <http://www.znalecvin.cz/matoliny/>.
  34. 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.
  35. 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.
  36. 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.
  37. 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.
  38. Bitton, G., *Wastewater Microbiology*. 3rd edition by John Wiley & Sons, Inc. (2005), ISBN 0-471-65071-4.
  39. Marek, M.: *Environmentální problémy v podmínkách výroby potravin, příklady řešení*, VŠCHT Praha, skripta online.
  40. Způsoby čištění odpadních vod k dispozici online na [www.rybarstvi.eu/dok%20rybari/chemie/cisten%20prehled.doc](http://www.rybarstvi.eu/dok%20rybari/chemie/cisten%20prehled.doc).
  41. 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).
  42. Wakelin, N. G., Forster, C.F., An Investigation into Microbial Removal of Fats, Oils and Greases. *Bioresource Technology* 59, 3743, (1997).
  43. Pitter, P., *Hydrochemie*. Vydavatelství VŠCHT, 4. vydání Praha (2009), ISBN 978-80-7080-701-9.
  44. online ACO Stavební prvky spol. s.r.o. Odlučovače ropných látek a tuků. Online na <http://www.aco.cz/aco/program/odlucovacitechnika/> [citace 20090331].
  45. Chipasa, K. B., Medrycka, K.: Behaviour of lipids in biological wastewater treatment processes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2006) 33: 635–645.

46. Singh, R., Gupta, N., Goswami, V. K., A simple activity staining protocol for lipases and esterases, *Appl. Microbial Biotechnol.* (2006) 70: 679-682.
47. Nunn, W. D. A molecular view of fatty acid catabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, 50 (1986), 179-192.
48. Ratledge, C. Microbial oxidations of fatty alcohols and fatty acids. *J. Chem. Biotechnol.* 55 (1992), 399-400.
49. Bhumibhamon, O., Phattayakorn, K.: Lipase-producing microorganisms for use in ceontaminated fat and oil kitchen wastewater treatment. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 2002.
50. Bhumibhamon, O., Kopraserstak, A., Funthong, S.: Biotreatment of high fat and oil wastewater by lipase producing microorganisms. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 2002.
51. Larpin, S., Mondoloni, C., Goerges, S., Vernoux, J.-P., Guéguen, M., Desmasure N.: *Geotrichum candidum* dominates in yeast population dynamics in Livarot, a French red-smear cheese. *FEMS Yeast Res* 6 (2006) 1243–1253.
52. 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.
53. Piegza, M., Witkowska, D., Robak, M.: Hydrolases of *Geotrichum candidum* in barley  $\beta$ -glucan degradation. *El. J. Pol. Agr. Univ.* 9 (2006) 17.
54. 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.
55. Mladenoska, I., Dimitrovski, A.: Lipase production by *Geotrichum candidum*-M2. *Bull. Chem. Technol. Mac.* 20, (2001) 39-43.
56. 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.
57. Barash, I., Eyal, Z.: Properties of a polygalacturonases produced by *Geotrichum candidum*. *Phytopathology* 60 (1970), pp. 27-30.
58. 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.
59. Nakamura, M., Iwai, H., Arai, K. Polygaacturonase S31PG1 from *Geotrichum candidum* citrus race S31 expressed in *Schizosaccaromyces pombe* versus S31PG1 regarding soft rot on lemon fruit. *J. Gen. Plant Pathol.* (2003), 69: 283:291.
60. Gowthaman, M. K., Krishna, Ch., Moo-Young, M.: Fungal solid state fermentation – an overview. *App. Mycol. Biotechnol.* 1 (2001).
61. Pandey, A., Soccol, C. R., Mitchell, D.: New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and Products. *Proc. Biochem.* 35 (2000) 1153–1169.
62. Arends, M., Dorokhov, V. V., Turochkina, T. M., Borisova, T. G. *Priklad. Biochem. Microbiol.* 16 (1975) 691.
63. 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.
64. Stratilová, E., Džúrová, 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.
65. 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)
66. Rexová-Benková, L., & Markovič, O. (1976). Pectic enzymes. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 33, 323-385.
67. Stratilová, E., Džúrová, M., Omelková, J. Comparison of oligo-D-galactosiduronate hydrolase produced by microorganism and plants. *Chem. Listy* 99, 344-345 (2005).
68. Stratilová, E., Džúrová, M., Malovíková, A., Omelková, J. Oligogalacturonate Hydrolase from Carrot Roots. *Z. Naturforsch.* 60c, 899-905 (2005).
69. Flodrová, D., Džúrová, 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).
70. 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).
71. Markovič, O., Janeček, Š. Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural

features, specificities and evolution. *Protein Eng.* 14 (2001): 615–631.

72. 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.

73. 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.

74. 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.

75. 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.

76. 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.

77. 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.

78. Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P., Davidson, S. Microbial lipases: production and applications. *ScienceProgress* (1996), 79 (2), 119-157.

79. Korsten, L., Cook, N. Optimizing culturing conditions for *Bacillus subtilis*. South African Avocado Growers' Association Yearbook 1996. 19:54-58.

80. Artýzsková, J. Odbourávání tuků v odpadech. Diplomová práce, Vysoké Učení Technické v Brně, Fakulta Chemická, 2011. 72 s.

## 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. Kysucké Nové Město: 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.