

Lipolytická aktivita potravinářsky významných bakterií

Bc. Vladěna Miklíčková

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Vladěna Mikličková**
Osobní číslo: **T13416**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Lipolytická aktivita potravinářsky významných bakterií**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část

- 1. Lipolytická aktivita mikroorganismů.**
- 2. Lipolytické mikroorganismy významné v potravinářském průmyslu a jejich význam pro výrobu, vlastnosti a bezpečnost potravin.**

Praktická část

- 1. Kultivace mikroorganismů v živných médiích a vzorcích mléka obsahujících acylglyceroly.**
- 2. Sledování lipolytické aktivity mikroorganismů pomocí stanovení volných mastných kyselin ve vzorcích plynovou chromatografií.**
- 3. Srovnání a vyhodnocení lipolytické aktivity vybraných potravinářsky významných bakterií.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Doporučená literatura

1. BATT, C. A., TORTORELLO, M. Encyclopedia of Food Microbiology. 2nd Edition. Academic Press, 2014.
2. HANDLEY, A. J., ADLARD, E. R. Gas chromatographic techniques and applications. Sheffield Academic Press, Ltd., 2001.
3. GUNSTONE, F. D. The Chemistry of Oils and Fats. Sources, Composition, Properties and Uses. Blackwell Publishing, 2004. ISBN 1-4051-1626-9
4. O'BRIEN, RICHARD D. Fat and Oils : Formulating and Processing for Applications (3rd Edition). CRC Press, 2009. ISBN 978-1-4200-6166-6.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

20. ledna 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

18. května 2015

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Martina Černeková, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: MIKLÍČKOVÁ VLADĚNA

Obor: T.V.T.K.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 16.5.2015

Mikličková Vladěna

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací.

(1) Vysoká škola nevydávalečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá lipolytickou aktivitou bakterií, které jsou významné v potravinářství. Teoretická část je věnována lipolytickým enzymům, jejich mechanismu účinku, faktorům, jež ovlivňují jejich aktivitu a jejich klasifikaci. Dále jsou zde charakterizovány metody, pomocí nichž lze lipolytickou aktivitu stanovit. Další část je zaměřena na potravinářsky významné bakterie, které lipolytickou aktivitu vykazují.

Praktická část je zaměřena na testování lipolytické aktivity deseti vybraných mikroorganismů, nejdříve kultivačně pomocí Spirit Blue Agar a poté plynovou chromatografií. Lipolytická aktivita vybraných bakterií byla sledována ve vzorcích smetany a byla vyvíjena metodika pro extrakci tukové fáze, přípravu methylesterů volných a vázaných mastných kyselin a jejich stanovení plynovou chromatografií.

Klíčová slova: lipolytická aktivita, bakterie, mastné kyseliny, methylestery mastných kyselin, plynová chromatografie

ABSTRACT

This diploma thesis deals with bacteria lipolytic activity which is important in food processing industry. The theoretical part is dedicated to lipolytic enzymes, to the mechanism of their action, and to the factors that influence their activity and classification. Further, the methods that enable the lipolytic activity determination are characterized here. The next part is focused on significant bacteria in food processing industry. The bacteria that display lipolytic activity.

The practical part is aimed for the lipolytic activity testing of ten chosen microorganisms. At first, lipolytic activity was examined by cultivation on Spirit Blue Agar and then by the gas chromatography. Lipolytic activity of chosen bacteria was observed in samples of cream. The methodology for lipid extraction, for fatty acid methyl esters preparation and their gas chromatography determination was developed.

Keywords: lipolytic activity, bacteria, fatty acids, fatty acid methyl esters, gas chromatography

Touto cestou bych velmi ráda poděkovala všem, kteří mi přispěním svými radami pomohli při zpracování mé diplomové práce. Velké poděkování však patří RNDr. Ivě Hauerlandové, PhD. za umožnění zpracování tohoto tématu, za vedení mé práce a za pomoc a rady při zpracování praktické části mé diplomové práce. Poděkování také patří laborantkám za jejich pomoc, rodině a blízkým.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 LIPOLYTICKÁ AKTIVITA	12
1.1 LIPOLYTICKÉ ENZYMY	12
1.1.1 Mechanismus účinku enzymů	12
1.1.2 Kinetika enzymových reakcí.....	13
1.1.3 Faktory ovlivňující aktivitu enzymů	15
1.1.3.1 Teplota	15
1.1.3.2 pH.....	15
1.1.3.3 Absolutní množství enzymu	16
1.1.3.4 Poměr aktivní a neaktivní části enzymu	16
1.1.3.5 Koncentrace substrátu	17
1.1.3.6 G-proteiny	17
1.1.4 Enzymová specifita	17
1.1.5 Klasifikace a nomenklatura enzymů	18
1.1.5.1 Základní skupiny enzymů.....	19
1.1.6 Lipázy.....	20
1.1.6.1 Dělení lipolytických enzymů	20
1.1.6.2 Mikrobiální lipázy.....	20
1.1.7 Izolace enzymů.....	22
1.2 LIPIDY	22
1.2.1 Mastné kyseliny	23
1.2.1.1 Klasifikace MK.....	24
1.2.1.2 Izomerie MK.....	24
1.2.1.3 Názvosloví MK.....	25
1.3 METODY VYUŽÍVANÉ KE STANOVENÍ LIPOLYTICKÉ AKTIVITY	25
1.3.1 Metody pro vznik methylesterů	26
1.3.1.1 Rychlá metoda	26
1.3.1.2 Obecná metoda	26
1.3.1.3 Metoda transmethylace využívající jako katalyzátor trifluorid boritý.....	26
1.3.1.4 Metoda kyselí katalyzované transesterifikace pomocí glyceridů.....	27
1.3.2 Plynová chromatografie	27
1.3.2.1 Kyselí katalyzované esterifikace a transesterifikace.....	27
1.3.2.2 Bazicky katalyzovaná esterifikace a transesterifikace.....	28
1.3.2.3 Stanovení methylesterů plynovou chromatografií	28
1.3.3 Kapalinová chromatografie	31
1.3.4 Tenkovrstevná chromatografie.....	33
1.3.5 Hmotnostní spektroskopie.....	33
1.3.6 Nukleární magnetická rezonance	34
2 BAKTERIE S LIPOLYTICKOU AKTIVITOU.....	35

2.1	BAKTERIE RODU <i>LACTOCOCCUS</i>	35
2.2	BAKTERIE RODU <i>LACTOBACILLUS</i>	36
2.3	BAKTERIE RODU <i>BREVIBACTERIUM</i>	37
2.4	BAKTERIE RODU <i>PROPIONIBACTERIUM</i>	37
2.5	BAKTERIE RODU <i>PSEUDOMONAS</i>	37
2.6	BAKTERIE RODU <i>BACILLUS</i>	38
2.7	BAKTERIE RODU <i>STREPTOMYCES</i>	38
2.8	BAKTERIE RODU <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	39
2.9	BAKTERIE RODU <i>STREPTOCOCCUS</i>	40
II	PRAKTICKÁ ČÁST	41
3	MATERIÁLY A PŘÍSTROJE.....	42
3.1	POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE	42
3.2	POUŽITÉ MIKROORGANIZMY A KULTIVAČNÍ PŮDY.....	42
3.3	POUŽITÉ PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY	44
3.4	DEKONTAMINACE POUŽITÉHO MATERIÁLU	44
3.5	METODIKA	44
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	54
4.1	LIPOLYTICKÁ AKTIVITA TESTOVANÁ KULTIVAČNĚ.....	54
4.2	TEST RŮSTU MIKROORGANISMŮ	55
4.3	PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	58
4.3.1	Zastoupení MK v nezaočkované smetaně.....	58
4.3.2	Zastoupení MK ve vzorcích připravených kyselou katalýzou	61
4.3.3	Zastoupení MK ve vzorcích připravených bazickou katalýzou	62
4.3.4	Zastoupení MK mezi vzorky S a S19	64
4.4	KVANTITATIVNÍ ANALÝZA	65
4.5	SHRNUTÍ A DOPORUČENÍ	67
	ZÁVĚR	69
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	70
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	76
	SEZNAM OBRÁZKŮ	77
	SEZNAM TABULEK.....	78

ÚVOD

Lipolytická aktivita je schopnost daného organismu štěpit triacylglyceroly na glycerol a volné mastné kyseliny. Látky, které tuto vlastnost zajišťují, jsou lipolytické enzymy.

Enzym je látka, která snižuje aktivační energii při reakcích, a proto je označována jako biokatalyzátor. Skládá se z několika složek a pracuje na principu zámku a klíče. Kinetika enzymových reakcí spočívá ve vytvoření přechodného komplexu enzym-substrát. Působení enzymů je dáno jejich specifitou. Ta může být substrátová nebo funkční. Enzymy je možno také klasifikovat do několika skupin, patří mezi ně oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, ligázy a isomerázy, každá skupina se dále dělí do několika podskupin. Enzymy schopné štěpit tuk, jsou označovány jako lipázy. Lipázy jsou děleny na esterázy, někdy označované jako karboxylázy a pravé lipázy neboli triacylglycerol acylhydrolázy. Lipázy mohou být získávány jak z mikroorganismů, tak i z rostlin a živočichů.

Lipidy jsou estery vyšších mastných kyselin a glycerolu. Dělí se na jednoduché, jež jsou složeny jen z mastné kyseliny a alkoholu a složené, které kromě dvou základních složek obsahují i složku další. Mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny s alifatickým řetězcem. Mohou se vyskytovat jako volné nebo vázané v esterech.

Mezi metody, které je možno využít pro stanovení lipolytické aktivity, patří plynová chromatografie, kapalinová chromatografie, tenkovrstevná chromatografie, hmotnostní spektroskopie, či nukleární magnetická rezonance.

Mezi bakterie s lipolytickou aktivitou jsou řazeny bakterie rodu *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus*, *Brevibacterium*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* a další.

Tato diplomová práce je zaměřena na testování lipolytické aktivity mikroorganismů. Cílem je stanovit, zda deset vybraných mikroorganismů je schopno štěpit lipidy a tvořit volné MK. Zároveň je cílem práce ověřit zda lze lipolytickou aktivitu mikroorganismů stanovit pomocí rozdílného postupu přípravy methylesterů mastných kyselin. Stanovení lipolytické aktivity plynovou chromatografií vychází z předpokladu, že při bazicky katalyzované esterifikaci dochází k esterifikaci vázaných mastných kyselin, zatímco volné mastné kyseliny na methylestery stanovitelné plynovou chromatografií převedeny nejsou. Kyselí katalyzovaná esterifikace naopak umožňuje vznik methylesterů jak z vázaných, tak i z volných mastných kyselin.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 LIPOLYTICKÁ AKTIVITA

V přírodě existuje velké množství různých mikroorganismů, které mají lipolytickou aktivitu. Mezi tyto mikroorganismy se řadí některé druhy bakterií, kvasinek a plísní. Lipolytická aktivita je schopnost mikroorganismů produkovat enzymy, které katalyzují hydrolýzu tuků, neboli triacylglycerolů na glycerol a mastné kyseliny. Enzymy s touto funkcí jsou označovány jako lipázy. [1, s. 8 – 12]

1.1 Lipolytické enzymy

Enzymy jsou látky, jejichž úkolem je katalyzovat veškeré reakce probíhající v živých soustavách. Pro průběh veškerých biochemických reakcí je zapotřebí velké množství energie a enzymy tuhle energii snižují. Jsou proto označovány jako biokatalyzátory. Enzymy jsou látky, které ovlivňují rychlost chemických reakcí, typické je, že při těchto procesech nedochází ke spotřebování enzymu, ten je po ukončení reakce uvolněn v původním stavu. Enzymy mohou být jednoduché nebo složené. Jednoduchý enzym je pouze bílkovinná makromolekula, zatímco složený enzym je kromě bílkovinné části tvořen také částí nebilkovinnou. Bílkovinná část enzymu je označována apoenzym, nebilkovinná část molekuly je kofaktor. Je-li kofaktor navázán na bílkovinnou část molekuly pevnou kovalentní vazbou, jedná se o prostetickou skupinu, ale pokud je připojen pouze pomocí slabých vazebných interakcí, označuje se jako koenzym. Typickým rozdílem mezi apoenzymem a koenzymem je, že apoenzym slouží jako přenašeč například elektronů nebo funkčních skupin, ale koenzym účastní se chemických reakcí, se při těchto reakcích mění, proto po jejich ukončení musí dojít k jeho regeneraci, aby se vrátil do původního stavu a mohl se opět účastnit při regulaci metabolismu. Proto se také koenzym někdy označuje jako kosubstrát neboli druhý substrát. [2, s. 478], [3, s. 45 – 47] [4, s. 21], [5], [6, s. 8 – 10]

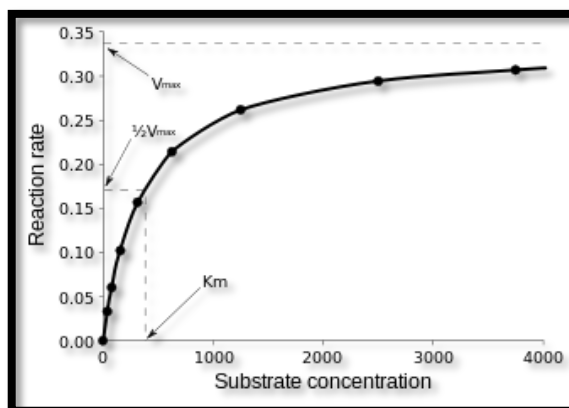
1.1.1 Mechanismus účinku enzymů

Enzymy pracují na principu zámku a klíče. Každá molekula enzymu má v určitém místě přesně uspořádané molekuly aminokyselin. Tohle místo je označováno jako aktivní místo a odpovídá za katalytickou funkci enzymu. Do aktivního místa se váže ligand substrátu, což je látka, která se působením enzymu mění, dojde k vytvoření komplexu ligand-substrát. Tohle uskupení je pouze přechodné, trvá krátkou dobu a následně se rozpadá na původní enzym a nově vzniklý produkt. [3, s. 45], [7, s. 87]

1.1.2 Kinetika enzymových reakcí

Účinek enzymu spočívá v tom, že již zmíněný vzniklý komplex enzym-substrát snižuje aktivační energii, což dává možnost zahájení chemické reakce. Čím je aktivační energie nižší, tím rychleji může daná reakce probíhat. Rychlost probíhající reakce je mimo jiné ovlivněna i koncentrací přítomného enzymu. Rychlost reakce se může zvyšovat až do okamžiku, než dojde k nasycení všech molekul enzymu, poté k dalšímu zvyšování již dojít nemůže. Také koncentrace substrátu rozhoduje o tom, jak bude enzymatická reakce probíhat, tedy jestli poběží podle kinetiky 1. řádu nebo podle kinetiky nulového řádu. Kinetika prvního řádu říká, že rychlost reakce je přímo úměrná koncentraci substrátu, naopak kinetika nulového řádu tvrdí, že rychlost reakce není závislá na koncentraci substrátu. [4, s. 22]

Měření kinetiky enzymových reakcí jako první provedl A. Brown v roce 1902. Na jeho práci navázali v roce 1913 L. Michaelis a M.L. Mentonová. A právě Michaelisova konstanta je velmi důležitá pro každý enzym, je pro něj charakteristická a vyplývá právě z kinetiky enzymových reakcí. Označována je pod zkratkou K_m . Tato konstanta vyjadřuje koncentraci substrátu, při které je rychlost reakce rovna polovině maximální rychlosti. Tuhle závislost právě vyjadřuje rovnice Michaelise a Mentonové. Jedná se o rovnici, která se řadí mezi základní rovnice enzymové kinetiky vůbec. Podle této rovnice má závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu tvar hyperboly. Ze závislosti plyne, že při zvyšující se koncentraci substrátu dochází ke zvyšování rychlosti enzymatické reakce, ale to jen do určité doby, poté se reakční rychlost přestane téměř zvyšovat a její hodnota limitně dosahuje rychlost maximální. Křivka této závislosti je někdy označována také jako saturační křivka a to právě proto, že jinými slovy popisuje sycení enzymu substrátem. Michaelisova konstanta je na koncentraci enzymu nezávislá. Ale závisí na řadě jiných faktorů. Mezi tyto faktory můžeme zařadit pH, teplotu, přítomnost aktivátorů, či inhibitorů. Pokud má tato konstanta vysokou hodnotu, značí to, že má daný enzym nízkou afinitu k substrátu. Pokud je ale hodnota konstanty nízká, enzym je velmi aktivní. Podle K_m je tedy možno zjistit maximální rychlost reakce pro jakoukoliv koncentraci studovaného substrátu. Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu je možno vidět na níže uvedeném Obr. 1. [4, s. 23], [8, s. 106 – 109]



Obr. 1. Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu [8]

Matematické vyjádření rovnice Michaelise a Mentonové je ukázáno v následující rovnici:

$$v = \frac{V[S]}{K_M + [S]} \quad (1.1)$$

kde: v – počáteční rychlost enzymové reakce

V – mezní (limitní) rychlost

K_M – Michaelisova konstanta

$[S]$ – rovnovážná koncentrace substrátu [8, s. 107]

Rovnice Michaelise a Mentonové platí pro ideální případ, ve skutečnosti má tato rovnice několik nepřesností. Jako první můžeme zmínit to, že vzniklý komplex enzym-substrát se ve skutečnosti nerozpadá hned na produkt a nezměněný enzym, ale tato přeměna probíhá ve více stupních se vznikem více komplexních meziproductů. Jako další nepřesnost této rovnice lze zmínit to, že je schopna zjistit jen počáteční rychlost reakce a že popisuje situaci, kdy do reakce vstupuje jen jeden substrát, což je ve skutečnosti velmi výjimečný případ, protože reakce se většinou účastní dva a více substrátů najednou. [7, s. 90]

Některé enzymy mají na svém povrchu kromě aktivního místa i alosterické centrum. Tohle místo slouží k navázání ligandu neboli alosterického efektoru, čímž dojde ke konformační změně celé molekuly, což znamená, že se změní i aktivní centrum. To má za následek změnu vlastností daného enzymu. Změna může mít jak aktivační, tak také inhibiční účinek. [3, s. 45]

1.1.3 Faktory ovlivňující aktivitu enzymů

Aktivita enzymu je hodně ovlivněna řadou faktorů, které na daný enzym působí. Mezi tyto faktory můžeme zařadit především teplotu a pH.

1.1.3.1 Teplota

Zvyšující se teplota prostředí, ve kterém probíhá enzymově katalyzovaná reakce, zvyšuje rychlost této reakce. Tato závislost platí jen ve vymezeném rozsahu teplot. Vzrůstání rychlosti reakce je dána zvyšováním kinetické energie reagujících molekul. Při dosažení určité teploty kinetická energie překročí určitou hladinu a dochází k zániku slabých vazebných interakcí, které jsou zodpovědné za sekundární a terciární strukturu. Při této teplotě tedy dojde k denaturaci bílkovinné části enzymu, následné precipitaci a tím k zániku funkce enzymu. Z toho plyne, že každý enzym má určitou optimální teplotu. Také ale platí, že čím déle je enzym vystaven vyšším teplotám, které jsou na hranici s teplotami denaturace, tím větší je pravděpodobnost denaturace enzymu. Zvýšíme-li teplotu o 10 °C, dojde ke zvýšení rychlosti reakce a násobek, o který se rychlost zvětší, se nazývá teplotní koeficient, označuje se symbolem Q_{10} . Rozsah změny rychlostí enzymově katalyzovaných procesů jako například zvýšení, či snížení tělesné teploty, je velmi důležité u živočichů, kteří nejsou schopni si samotní udržet svou stálou tělesnou teplotu (ještěrky), tato vlastnost je nedílnou součástí podmínek na přežití těchto organismů. Není již tak důležitá u živočichů, kteří si svou teplotu jsou schopni udržet, může se však uplatnit při horečce nebo hypotermii (podchlazení). Za optimální teplotu enzymů můžeme považovat teplotu stejnou nebo o něco málo vyšší, než je teplota buněk, ve kterých se enzymy nachází, což znamená, že optimální teplota pro enzymy termofilních buněk bude vyšší než u buněk mezofilních. [10, s. 83 – 84], [11, s. 58 – 59]

1.1.3.2 pH

Enzym je aktivní jen v určitém rozsahu pH. Pro zjišťování aktivity se obvykle používá rozmezí pH 5,0 až 9,0. Existují ale enzymy, které mají optimální hodnotu pH velmi vzdálenou od tohoto rozsahu, jako třeba pepsin, který ji má mnohem nižší. Aktivita enzymů v daném pH je mimo jiné ovlivněna denaturací enzymu při vysokém nebo nízkém pH a změnami nabitého stavu jak enzymu, tak i reagujícího substrátu. Změny pH ovlivňují i konformaci enzymu. K tomu, aby byla zachována terciární a kvartérní struktura enzymu je nezbytná přítomnost nabitých iontů v blízkosti vazebného místa substrátu. Při zániku toho-

to náboje nebo při jeho změně, dojde k rozpletení, disociaci nebo přechodu na kompaktnější formu enzymu, což vede k zániku aktivity enzymu. Schopnost obnovení aktivní formy je někdy umožněno po návratu enzymu do optimálního pH. [10, s. 84]

Dále aktivitu enzymu ovlivňuje absolutní množství enzymu a poměr mezi aktivní a neaktivní formou, koncentrace substrátu a G-proteiny.

1.1.3.3 Absolutní množství enzymu

Tento faktor je dán poměrem rychlosti syntézy a degradace studovaného enzymu. Syntéza enzymu je závislá na indukci genu pomocí transkripčních faktorů, které jsou ovlivněny mnoha faktory. Mezi tyto faktory patří rozsáhlé skupiny signálních molekul, hormony, metabolity, základní složky živin (glukóza, mastné kyseliny, aminokyseliny). Enzymy, které jsou výše zmíněným způsobem ovlivňovány, jsou označovány jako indukční, či induktivní. Jejich příkladem mohou být enzymy ornitinového cyklu. [4, s. 23 - 24]

Opakem syntézy je degradace. Aby mohlo k degradaci dojít, musí být nejdříve enzym rozpoznán, což je ovlivněno konformací molekuly, kterou ovlivňuje řada látek (ionty, aminokyseliny, kyslíkaté radikály). Pravdou je, že mechanismy degradace nejsou v dnešní době příliš známy. [4, s. 24]

1.1.3.4 Poměr aktivní a neaktivní části enzymu

Poměr těchto dvou částí je závislý na prostorovém uspořádání molekuly, kterou mohou ovlivňovat změny pH, teploty, záření, iontové síly prostředí. Kromě těchto fyzikálně-chemických faktorů sem můžeme zařadit následující regulační mechanismy:

Kompetitivní inhibice – mechanismus, kdy inhibitor soutěží o aktivní místo spolu se substrátem. Kompetitivní inhibitor má chemickou strukturu velmi podobnou substrátu. Pokud se ale dostatečně zvýší koncentrace substrátu, je možno dosáhnout maximální rychlosti reakce i za přítomnosti tohoto inhibitoru.

Nekompetitivní inhibice – i v tomto případě se do reakce zapojuje inhibitor, ale tentokrát jeho účinek nelze ovlivnit koncentrací substrátu, protože se váže na jiné než aktivní místo enzymu.

Allosterická regulace – jedná se o reverzibilní (vratnou) změnu konformace aktivního centra po navázání inhibitoru mimo toto centrum. Místo, kde se inhibitor navázal, se označuje jako allosterické centrum.

Kovalentní regulace – tato regulace je zprostředkována pomocí fosforylace, defosforylace, adenylace nebo deadenylace enzymu a to pomocí specifických fosfotransferáz.

Regulace proteolýzou – jedná se o mechanismus úmyslného odštěpení peptidu z molekuly proenzymu (látka, z níž se enzym tvoří). Tímto způsobem vzniká třeba pepsin z pepsinogenu, trypsin a trypsinogenu a další.

Regulace vytvořením komplexu s kovovými ionty – vlastností kovových iontů je sdílení elektronového páru, proto se mohou podílet na interakcích mezi enzymem a substrátem.

Regulace vytvořením –S-S-můstků –disulfidický můstek vzniká spojením dvou thiolových skupin a ovlivňuje přístup k aktivnímu centru enzymu. [4, s. 24 – 25]

1.1.3.5 Koncentrace substrátu

Jak již bylo výše zmíněno, rychlost enzymaticky katalyzované reakce lze ovlivnit zvyšováním koncentrace substrátu. Tato závislost platí až do okamžiku, kdy je enzym plně nasycen substrátem a počáteční rychlost dosahuje maximální hodnoty. Při dalším zvyšování koncentrace již ke zvyšování rychlosti nedochází, protože se zde substrát vyskytuje ve velkém molárním nadbytku. [10, s. 85]

1.1.3.6 G-proteiny

Jedná se o tzv. molekulární přepínače. Navázáním signální molekuly na receptor dojde k aktivaci G-proteinu, tím k odštěpení GDP a místo něj navázání GTP, čímž se G-protein aktivuje. Posunem tohoto proteinu po cytoplazmatické membráně může dojít k aktivaci enzymu. Hydrolýzou GTP opět na GDP dojde k obnovení původní konformace G-proteinu. [3, s. 46]

1.1.4 Enzymová specifita

Enzymy se vyznačují různými druhy specifity, především specifitou substrátovou a funkční. Substrátová specifita spočívá v tom, že katalyzovaná reakce probíhá na určitém druhu substrátu na rozdíl od specifity funkční, kdy dochází ke katalýze určité chemické reakce, to může být například oxidace, fosforylace, dehydrogenace nebo třeba hydrolýza. Kromě těchto dvou typů specifity existuje ještě specifita optická. Příkladem této funkce může být enzym maltáza, která je schopna katalyzovat hydrolýzu α -glukozidů, ale již není schopna stejným způsobem účinkovat na β -glukozidy. [3, s. 45], [12, s. 155]

Každý enzym může katalyzovat jen malý počet reakcí, v mnoha případech ale dochází ke katalýze pouze jedné reakce, proto se specifita řadí k nejdůležitějším vlastnostem enzymů. Vzhledem k tomu, že všechny biochemické reakce jsou katalyzovány, musí existovat velké množství různých enzymů. A skutečně prakticky pro každou organickou sloučeninu v přírodě, ale i pro mnoho anorganických sloučenin existuje v nějakém organismu enzym, který chemickou změnu katalyzuje. Takové řízení organismu prostřednictvím enzymů je nezbytně nutné k tomu, aby buď jen samotná buňka, tkáň nebo celý organismus fungoval normálně. [3, s. 45], [12, s. 149, 155]

1.1.5 Klasifikace a nomenklatura enzymů

První pokusy o nomenklaturu enzymů byly nepřesné, protože označení bylo matoucí, někdy i dvojnásobné. Později byly enzymy označeny podle skupiny substrátu, na kterou působí společně s přidáním koncovky -áza. Což znamená, že enzym štěpící škrob (amylon) se nazývá amyláza, enzym štěpící tuk (lipos) je lipáza a enzym rozkládající proteiny je proteáza. Enzymy můžeme tedy rozdělovat do několika skupin. Názvy skupin jsou odvozeny od substrátu nebo reakce, která je katalyzována. V současné době máme šest základních skupin, do kterých patří oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, ligázy a isomerázy. Každá skupina se dále rozděluje do dalších 4 až 13 podskupin. [5, s. 8 – 9], [12, s. 153]

Později byla pro klasifikaci enzymů zavedena speciální mezinárodní nomenklatura. Ačkoli je systém Mezinárodní biochemické unie (IUB = International Union of Biochemistry) dosti složitý, je přesný, informativní a popisný. Hlavní rysy tohoto systému jsou následující:

- Reakce – enzymy, jak již bylo zmíněno, jsou rozděleny do šesti tříd a několika podtříd
- Název enzymu se skládá ze dvou částí – první část je odvozena od katalyzovaného substrátu nebo substrátů a druhá část je tvořena koncovkou -áza
- Doplňující informace – používají se jen v případě, kdy je zapotřebí objasnit povahu reakce, tyto informace jsou uváděny v závorkách za názvem enzymu
- Základem každého názvu enzymu je kódové číslo – je tvořeno zkratkou E. C. a čtyřmístným číselným kódem. Jednotlivá čísla v názvu vyjadřují číslo jedné z hlavních tříd, do kterých enzym spadá, skupinu, podskupinu a také pořadí enzymu v dané podskupině. [4, s. 22], [12, s. 153]

1.1.5.1 Základní skupiny enzymů

Existuje šest základních skupin enzymů:

1. Oxidoreduktázy

Jedná se o enzymy, které katalyzují oxidačně-redukční reakce přenosem vodíkových atomů, či elektronů mezi dvěma substráty nebo katalyzují zavedení kyslíkového atomu do substrátu. Do této třídy spadá velké množství enzymů, jež byly dříve označovány jako dehydrogenázy, či jako oxidázy.

2. Transferázy

Do této skupiny spadají enzymy katalyzující přenos funkční skupiny mezi dvěma substráty. Může docházet k přenosu jak jednonuhlíkových skupin, tak i zbytků aldehydů, ketonů nebo acylu, alkylu, glykosylu, či skupin obsahující síru a fosfor.

3. Hydrolázy

Skupina zahrnující enzymy katalyzující hydrolýzu chemických vazeb. Tyto vazby mohou být součástí esterů, etherů, peptidů, glykosylů, anhydridů kyselin, ale také vazby C – C, C – halid, P – N. Patří sem většina trávicích enzymů zažívacího ústrojí živočichů.

4. Lyázy

Lyázy jsou enzymy, které katalyzují štěpení chemických vazeb, a to jiným způsobem než hydrolýzou, při čemž se od substrátu odštěpují malé skupiny atomů, jako jsou H₂O, CO₂, NH₃, nebo naopak se do molekuly mohou tyto skupiny vnášet. Vzniklý produkt obsahuje dvojnou vazbu.

5. Isomerázy

Patří sem všechny enzymy, které jsou schopny katalyzovat přenos funkčních skupin v rámci jedné molekuly, což znamená, že dochází k tvorbě optických, geometrických nebo polohových isomerů.

6. Ligázy

Jedná se o enzymy, které katalyzují sloučení dvou molekul do jednoho výchozího substrátu. Vzniklá vazba je kovalentní a energie, potřebná na vznik této vazby, je uvolněna z ATP, které se současně rozštěpí. [3, s. 46], [12, s. 153 - 155], [13, s. 12 – 14]

1.1.6 Lipázy

Lipolytické enzymy jsou řazeny do skupiny karboxylesteráz, jejichž funkce je hydrolyzovat acylglyceroly na glycerol a mastné kyseliny. Podle délky řetězce acylglycerolu, který hydrolyzují, se dělí na dvě skupiny. První skupinou jsou esterázy nebo karboxylázy (EC 3.1.1.1). Jsou to enzymy, které štěpí acylglyceroly s délkou řetězce mastných kyselin do deseti uhlíků. Typické pro ně je, že jsou aktivní ve vodném prostředí. Do druhé skupiny spadají tzv. pravé lipázy, které katalyzují rozklad acylglycerolů a řetězcem mastných kyselin delším než deset uhlíků. Někdy mohou být označeny jako triacylglycerol acylhydrolázy (EC 3.1.1.3). Tyto enzymy na rozdíl od esteráz jsou aktivní spíše na rozhraní voda-lipid než přímo ve vodném prostředí. Jedná se o charakteristickou vlastnost této skupiny lipáz, nazývá se mezifázová aktivace, což znamená, že dojde k prudkému nárůstu aktivity lipáz v okamžiku, kdy substrát přejde do formy emulze. V důsledku toho, kinetika takových lipáz nespĺňuje klasický model dle Michaelise a Mentonové. Specifitu lipolytického enzymu lze kontrolovat pomocí molekulárních vlastností enzymu, struktury substrátu a pomocí faktorů ovlivňujících vazbu enzymu k substrátu. [14, s. 8], [15, s. 48], [16, s. 29]

1.1.6.1 Dělení lipolytických enzymů

Lipolytické enzymy může rozdělovat do tří skupin:

První skupina jsou enzymy nespecifické. Řadí se sem lipolytické enzymy, které odštěpují mastné kyseliny ze všech tří pozic v acylglycerolu, tím pádem úplně hydrolyzují triacylglyceroly na glycerol a tři mastné kyseliny.

Druhá skupina jsou enzymy 1,3-specifické. Jejich úkolem je uvolnění mastných kyselin z vnějších pozic triacylglycerolů, čímž dojde ke vzniku 1,2-diacylglycerolu, 2,3-diacylglycerolu a 2-monoacylglycerolu za současného uvolnění mastných kyselin.

Třetí skupina lipolytických enzymů zahrnuje enzymy takové, které odštěpují jen určité mastné kyseliny. Můžeme sem zařadit například lipázu B, která se získává z kvasinkové houby *Geotrichum candidum*. Tento druh lipáz ale u bakterií nenajdeme. [15, s. 48], [17, s. 20]

1.1.6.2 Mikrobiální lipázy

Mikrobiální enzymy jsou v průmyslu využívány častěji oproti enzymům z rostlin a živočichů kvůli jejich dobrému výtěžku, dobré katalytické aktivitě, jednoduché manipulaci a

hlavně rychlému růstu mikroorganismů na půdách. Enzymy jsou stálé, produkce je výhodná a bezpečná. [18]

Většina lipáz bakteriálního původu jsou lipázy extracelulární, to znamená, že bakterie vzniklý enzym uvolňují do okolí buňky. Velká řada mikroorganismů je schopna produkovat více než jen jeden typ extracelulárních lipáz, kde tyto lipázy hydrolyzují různé typy mastných kyselin. Produkce těchto enzymů je ovlivněna řadou vnějších faktorů působící na mikroorganismy, můžeme mezi ně zařadit teplotu, pH prostředí, zdroj dusíku a tuků, koncentraci anorganických solí a dostupnost kyslíku. [15, s. 48]

Lipolytické enzymy jsou v současné době dosti studovány pro svou funkci biokatalyzátorů. Jsou velmi často využívány při výrobě biopolymerů, agrochemikálií, bionafty, aromatických sloučenin, léčiv a detergentů, při kterých je použito až 1000 tun lipáz ročně. Jejich funkce se využívá také v sýrařství nebo při výrobě potravinových doplňků. [18], [19, s. 390]

V porovnání s klasickými chemickými katalyzátory mají lipázy obecně nižší stabilitu a jejich využití je často spojeno s vyššími náklady. V důsledku toho je předmětem zájmu zlepšení katalytických vlastností lipáz využívaných v biotechnologických aplikacích. Je snaha o zlepšení jejich aktivity, stability v širším rozmezí pH, zlepšení teplotní stability a možnost jejich recyklace. Takové zlepšení je možno provádět chemickou, či fyzikální cestou nebo genetickou modifikací nativního enzymu. [20, s. 113]

Lze sledovat rostoucí zájem o bakteriální lipázy a to především z důvodu jejich využití v technologických aplikacích. Jsou schopné nejenom katalyzovat hydrolýzu, ale také syntézu různých průmyslově hodnotných produktů. Mezi sloučeniny, které lze syntetizovat pomocí bakteriálních lipáz patří různé estery a laktony a opticky aktivní sloučeniny. V poslední době se bakteriální lipázy začaly přidávat do čisticích prostředků, z důvodu snížení nebo úplného nahrazení syntetických detergentů, které způsobují značné problémy v oblasti životního prostředí. [16, s. 29]

Bakteriální lipázy jsou klasifikovány do šesti tříd na základě sekvence aminokyselin. Příkladem lze uvést IV. třídu, do které patří lipázy aktivní za nízkých teplot (cold-active lipases), tato skupina je také známá jako HSL (hormonálně senzitivní lipázy), protože vykazují nápadnou podobnost aminokyselinové sekvence se savčími hormony. [21, s. 56]

Prokázání lipolytické aktivity u některých druhů bakterií je důležité. Aktivitu lipáz můžeme prokázat více metodami, mezi které řadíme titrimetrii, fotometrii, či fluorescenční me-

tody. Jako substrát se v těchto metodách používá většinou olivový olej. Podstatné je, aby došlo k dokonalé emulgaci. Čím menší budou kapičky tuku rozptýlené ve vodném prostředí, tím rychleji bude reakce probíhat. [15, s. 48]

Lipolytické enzymy produkují nejenom bakterie, ale i kvasinky a plísně. Mikrobiální lipázy – jejich sekvence, strukturu a funkce můžeme nalézt v databázi, která je přístupná jako elektronický zdroj. [22], [23, s. 491]

1.1.7 Izolace enzymů

Některé mikroorganismy produkují enzymy do okolního prostředí (exoenzymy), ale ostatní zůstávají uvnitř v buňce daného mikroorganismu (endoenzymy). Proto pro jejich získání musí dojít k narušení buňky. Existuje několik metod, které jsou schopny buněčnou stěnu a membránu porušit. Nejčastěji se využívá vysušení, či autolýza. Získaný surový extrakt je nutné vyčistit, protože obsahuje mnoho složek. Malé molekuly lze odstranit pomocí dialýzy, nukleové kyseliny adsorpcí na dřevěné uhlí, problém je ale s bílkovinami, které jsou svým složením a fyzikálními vlastnostmi podobné enzymům. Vhodné metody jsou precipitace proměnnými koncentracemi solí nebo rozpouštědel, diferenciální denaturací teplem nebo pH, gelová filtrace nebo elektroforéza a chromatografie. Kombinací těchto metod se získává stále čistší produkt až čistý roztok, respektive krystalický preparát. [12, s. 157], [11, s. 60]

Pro průmyslové použití se připravují enzymatické produkty o různých stupních čistoty. Stupeň čistoty se vyjadřuje nejčastěji pomocí specifické aktivity, to je počet jednotek na mg sušiny nebo na mg dusíku daného preparátu. Jednotkou je množství enzymu, který je za předem stanovených podmínek schopný katalyzovat přeměnu jednoho mikromolu substrátu za minutu. [11, s. 60]

1.2 Lipidy

Název lipidy je odvozen z řeckého slova *lipos* neboli tuk. Jedná se o estery vyšších mastných kyselin a glycerolu, jinak řečeno jsou to látky se vztahem k mastným kyselinám. Jsou špatně rozpustné až nerozpustné ve vodě, ale dobře se rozpouští v rozpouštědlech s lipofilním charakterem, např. ether, chloroform, benzen. Existují také látky označované jako lipoidy (látky podobné tukům), které nemají přímý vztah k mastným kyselinám. [3, s. 31], [12, s. 30]

Lipidy mají pro živočichy velký význam. Mezi jejich nejvýznamnější funkce můžeme zařadit to, že se v nich rozpouští vitaminy rozpustné v tucích, hormony, léčiva a barviva, slouží jako zásoba energie, jsou potřebné pro stavbu buněčných struktur a tkání, slouží také jako ochranný materiál v podkožních tkáních a další. [2, s. 481], [3, s. 31], [12, s. 30]

Lipidy můžeme také klasifikovat do několika skupin:

- A. Jednoduché lipidy – jsou tvořeny pouze mastnými kyselinami a alkoholem. Mohou být označovány jako homolipidy. Tato skupina se dále dělí:
 - a. Tuky a oleje – jedná se o estery vyšších mastných kyselin s glycerolem, tuk je většinou živočišného původu a má pevné skupenství, olej pochází z rostlin a je kapalný.
 - b. Vosky – jsou to estery vyšších mastných kyselin s vyššími jednosytnými alkoholy (jiný alkohol než glycerol).
- B. Složené lipidy – látky, které kromě mastných kyselin a alkoholu obsahují i další složky. Tyto druhy lipidů jsou také označovány jako heterolipidy. Patří mezi ně např.:
 - a. Fosfolipidy – jejich součástí je zbytek kyseliny fosforečné, ale také dusíkaté báze a jiné substituenty. Alkoholem v jejich struktuře může být glycerol (látky jako glycerofosfolipidy) nebo sfingosin (sfingofosfolipidy).
 - b. Glykolipidy – do jejich struktury je zabudována cukerná složka.
 - c. Jiné složené lipidy – obsahují jinou složku nelipidového charakteru, např. proteiny, dusík, síru, apod. [12, s. 30], [17, s. 10]

1.2.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) jsou alifatické karboxylové kyseliny. Mastné kyseliny se mohou v přírodě vyskytovat buď jako volné (neesterifikované) nebo jako vázané ve formě esterů. Volné mastné kyseliny tvoří významnou složku lipidů. Vznikají hydrolýzou lipidů za současného působení hydroláz. Některé MK je možno nalézt ve všech přírodních lipidech, ale jiné MK jsou typické pouze pro určité zdroje, jako např. mikroorganismy, rostliny, či živočichy. Mastné kyseliny, které se vyskytují v přírodních tucích a olejích mají většinou sudý počet uhlíků v řetězci a často jsou nevětvené (lineární). Jejich typickou vlastností je, že

mají amfipatickou strukturu. To znamená, že ve své molekule mají jak hydrofobní, tak i hydrofilní část. Hydrofilní část je tvořena karboxylovou skupinou a hydrofobní část je tvořena právě různě dlouhým uhlíkatým řetězcem. Čím je řetězec delší, tím je MK méně rozpustná ve vodě a lépe rozpustná v nepolárních rozpouštědlech. [4, s. 117], [10, s. 148], [24, s. 24 – 25]

1.2.1.1 Klasifikace MK

Mastné kyseliny můžeme dělit podle několika hledisek, a to podle délky řetězce nebo podle nasycenosti. Podle počtu uhlíků v řetězci dělíme MK na: MK s krátkým řetězcem – MK obsahující méně než 6 uhlíků, MK se středně dlouhým řetězcem – počet uhlíků se pohybuje mezi 6 až 12, MK s dlouhým řetězcem – 12 a více atomů uhlíku v řetězci. Typickou vlastností krátkých mastných kyselin je jejich zápach na rozdíl od vyšších MK, které se zápachem neprojevují. [25, s. 5 – 13], [26, s. 63 – 64]

Mastné kyseliny můžeme rozdělit na nasycené a nenasycené. Nasycené MK mají ve své struktuře pouze jednoduché vazby. Tyto MK se označují jako SAFA (saturated fatty acids). Tuky obsahující právě tyto MK jsou při pokojové teplotě tuhé, můžeme mezi ně zařadit například sádlo a máslo. Druhým typem MK jsou kyseliny nenasycené. Ty mají v molekule kromě vazeb jednoduchých i vazby násobné. Pokud MK obsahují pouze jednu dvojnou vazbu, jedná se o kyseliny monoenové (MUFA, monounsaturated fatty acids), pokud obsahují dvě a více dvojných vazeb, hovoříme o kyselinách polyenových (PUFA, polyunsaturated fatty acids). Přítomnost násobných vazeb v MK v tučích způsobuje, že při pokojové teplotě mají kapalnou konzistenci. Velké množství těchto kyselin je právě v rostlinných olejích. Mastné kyseliny mohou obsahovat i vazby trojné a řadu dalších substituentů (kyslíkaté, siřné, dusíkaté funkční skupiny, mohou mít i cyklické či rozvětvené řetězce). [4], [10], [25, s. 5 – 13]

1.2.1.2 Izomerie MK

Pokud je v molekule přítomna právě dvojná vazba, může se MK vyskytovat ve dvou izomeriích – v izomerii *cis* a *trans*. Tyto izomerie mohou být někdy označovány jako E-/Z-. V *cis* izomerii jsou atomy vodíku na dvojně vazbě blíže k sobě na rozdíl od izomerie *trans*, kde jsou atomy na opačných polohách. I tento malý rozdíl ve struktuře molekuly má velký význam. Izomerie ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti MK, dále má vliv na funkci struktur, ve kterých se MK nachází. V přírodě mají MK převážně konformaci *cis*, *trans*

izomerii můžeme najít např. u mikroorganismů, v semenech některých rostlin nebo třeba v tuku a mléce přežvýkavců. [4, s. 117 – 118], [25, s. 5]

1.2.1.3 Názvosloví MK

Mastné kyseliny mohou být pojmenovány několika druhy názvosloví. Atomy uhlíků jsou číslovány vždy od karboxylové skupiny a název MK vychází z počtu uhlíků v řetězci. Poslední uhlík v řetězci – methylový uhlík je označován jako ω -uhlíkový atom. Tyto systematické názvy jsou v praxi velmi často nahrazovány názvy triviálními. Příkladem může být kyselina butanová (MK se čtyřmi atomy uhlíku v řetězci), která je v praxi označována jako kyselina máselná. Triviální názvy vyjadřují konkrétní izomer MK s určitou polohou dvojných vazby a s konkrétní sterickou konfigurací. Někdy se název MK vyjadřuje pomocí CN:M zkratky, kde N je počet uhlíků v řetězci a M je počet dvojných vazeb, kde pomocí dalších symbolů mohou být vyjádřeny i polohy dvojných vazeb. V některých případech lze polohy dvojných vazeb označovat i od posledního – methylového uhlíku, který má v tomto případě číslo jedna. Tyto dvojně vazby v MK jsou poté označovány jako ω – číslo uhlíku. Např. známé kyseliny ω – 3 mají dvojnou vazbu na třetím uhlíku od methylového konce. Symbol ω je někdy nahrazován symbolem N. [25, s. 5 – 6]

1.3 Metody využívané ke stanovení lipolytické aktivity

Lipolytickou aktivitu mikroorganismů je možno stanovit několika různými metodami. Všechny metody jsou ale založeny na stanovení volných mastných kyselin, které vznikají právě při rozkladu lipidů na parciální acylglyceroly, či až na samotný glycerol a volné MK. Před tím, než je možné analýzu provést, je nutné převést mastné kyseliny na těkavé methylestery. Vhodná metoda pro jejich stanovení je plynová chromatografie (GC), ale mohou být použity i metody jiné, např. vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), tenkovrstevná chromatografie (TLC), hmotnostní spektroskopie, infračervená spektroskopie, nukleární magnetická rezonance (NMR) a mnohé další. [27, s. 25 – 26], [28, s. 29 – 36]

Metody, které je možno využít na stanovení lipolytické aktivity přímo v mléce nebo mléčných výrobcích, zahrnují titrační, kolorimetrické, fluorimetrické, turbidimetrické, chromatografické, radiometrické, enzymatické, fyzikální a imunologické postupy. [29, s. 153]

1.3.1 Metody pro vznik methylesterů

Některé z metod, kterými lze mastné kyseliny převést na jejich methylestery jsou mimo jiné popsány v ISO normě ES ISO 12966-2:2012. Jsou zde popsány konkrétně čtyři metody.

1.3.1.1 Rychlá metoda

Jedná se o metodu sloužící k transmethylaci mastných kyselin za použití alkalického katalyzátoru. Tato metoda je vhodná na analýzu běžných jedlých tuků a olejů. Připravené methylestery je možné analyzovat pomocí plynové chromatografie za použití vnitřního standardu.

Principem metody je vytvoření methylesterů pouze z mastných kyselin, které jsou navázány v acylglycerolech. Tímto způsobem provedení není možno získat methylestery z volných mastných kyselin. [30, s. 2]

1.3.1.2 Obecná metoda

Methylace mastných kyselin prováděná touto metodou využívá alkalické a následně kyselé katalýzy. Je vhodná pro všechny tuky a oleje včetně destilátu a kyselých olejů s výjimkou olejů s kyselinou laurovou, protože ta má příliš krátký řetězec a její methylestery by mohly být při varu pod zpětným chladičem ztraceny. Pro tyto oleje je vhodnější použít výše zmíněnou rychlou metodu.

Použitím alkalického činidla dojde k transmethylaci esterů glycerolu na methylestery mastných kyselin. Volné mastné kyseliny jsou převedeny do vznikajícího mýdla a následně kyselý katalyzátor způsobí převedení mýdla na methylestery mastných kyselin. [30, s. 4]

1.3.1.3 Metoda transmethylace využívající jako katalyzátor trifluorid boritý

Prvním krokem při provádění této metody je alkalická katalýza, kdy jsou triacylglyceroly transmethylací pomocí methanolického roztoku hydroxidu sodného převedeny na methylestery mastných kyselin. Všechny přítomné volné mastné kyseliny (FFA, free fatty acids) jsou převedeny do mýdla. V druhém kroku, při kyselé katalýze, je mýdlo převedeno na methylestery reakcí s metanol-trifluorid boritým komplexem. Při přípravě methylesterů mastných kyselin přímo z čistých mastných kyselin a mýdla je první krok této metody zbytečný, kdy stačí provést pouze reakci s roztokem trifluoridu boritého.

Tato metoda by měla být prováděna s velkou opatrností, protože je použito nebezpečné činidlo. Trifluorid boritý je totiž jedovatý. Musí být přijata taková opatření, aby byly chráněny oči, mohlo by dojít k nebezpečnému poleptání.

Tento způsob přípravy methylesterů mastných kyselin je možné využít pro mnoho olejů, tuků a jejich derivátů (mastné kyseliny, mýdla) s výjimkou mléčných tuků a tuků obsahujících mastné kyseliny se specifickými skupinami. Během methylace, látky obsahující následující uskupení mohou být úplně nebo jen částečně rozloženy – keto, epoxy, hydroxy, hydroperoxy skupiny, cyklopropyl a cyklopropenyl skupiny, acetylenické mastné kyseliny. V případě, že použitý materiál obsahuje tyto látky jen ve velmi malém množství, může být tato metoda použita, ale v opačném případě je nutné použít jinou metodu – například rychlou metodu nebo obecnou metodu.

Pro analýzu připravených methylesterů pomocí plynové chromatografie je vhodné methylestery oddělit z reakční směsi použitím isooktanu. Nicméně výtěžnost je pouze kolem 75 %. [30, s. 6]

1.3.1.4 Metoda kyselé katalyzované transesterifikace pomocí glyceridů

Principem této metody je, že kyselá methylační činidlo způsobí transmethylaci esterů glycerolu na methylestery mastných kyselin. Methylační činidlo současně také převádí volné mastné kyseliny na jejich methylestery. [30, s. 9]

Připravené methylestery lze následně stanovit několika různými metodami.

1.3.2 Plynová chromatografie

Metoda plynové chromatografie je jednou z nejpoužívanějších metod pro stanovení MK. Analyzovaný vzorek je dávkován do proudu plynu, který jej unáší kolonou. Jako mobilní fáze je využíván nosný plyn a vzorek musí být velmi rychle schopen se přeměnit také na plyn. Proto je nutné mastné kyseliny převést na jejich methylestery. Způsob jejich přípravy je možný více postupy. [31, s. 10]

1.3.2.1 Kyselá katalyzovaná esterifikace a transesterifikace

Esterifikace mastných kyselin a transesterifikace O-acyl lipidů probíhá v prostředí bezvodého methanolu za přítomnosti kyselého katalyzátoru za současného zahřívání. Jako kyselý katalyzátor může být použito více sloučenin. Jednou z nich je chlorovodík v bezvodém methanolu. Ten se využívá v 5% koncentraci a připravuje se buď probubláváním plynného

chlorovodíku v bezvodém methanolu nebo postupným přidáváním acetyl chloridu do chlazeného bezvodého methanolu. Lipidy je také možno transesterifikovat 1 – 2% roztokem koncentrované kyseliny sírové v metanolu. Jako další kyselý katalyzátor pro transesterifikaci lipidů a esterifikaci volných mastných kyselin může být použit fluorid boritý. Tato látka se využívá v koncentraci 12 – 14 % a pro správnou funkci je nutno využít čerstvě připravený roztok. [27, s. 26]

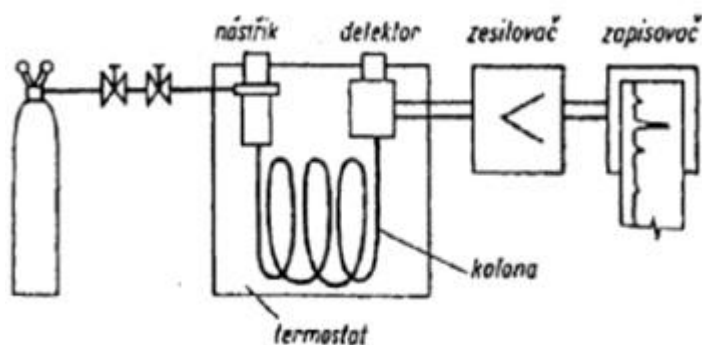
1.3.2.2 Bazicky katalyzovaná esterifikace a transesterifikace

Mezi nejpoužívanější bazické katalyzátory pro transesterifikaci patří roztok methoxidu sodného v bezvodém methanolu nebo methoxid a hydroxid draselný. Na rozdíl od kyselého katalyzátoru fluoridu boritého jsou tyto bazické katalyzátory velmi stabilní i při pokojové teplotě a reakce transesterifikace probíhá velmi rychle. [27, s. 27]

1.3.2.3 Stanovení methylesterů plynovou chromatografií

Plynová chromatografie je jedna ze separačních metod, u které po nástřiku analyzovaného vzorku dojde k rozdělení jednotlivých složek, které jsou ve vzorku obsaženy, mezi mobilní a stacionární fázi. Stacionární fáze je uložena pevně v koloně a mobilní fáze jí prochází. Složky nastříknutého vzorku se na stacionární fázi naváží různě pevně a podle toho jsou také zadržovány různě dlouhou dobu, podle čehož dochází k jejich separaci. Složky se z kolony dostávají do detektoru, který daný signál vyhodnotí. [27, s. 27]

Plynový chromatograf se skládá z několika částí – zásobník nosného plynu, čisticí zařízení, regulační systém, dávkovač, kolona, detektor, vyhodnocovací zařízení a termostat. Obecné schéma plynového chromatografu je možno vidět na obr. 2. [31, s. 11 – 12]



Obr. 2. Schéma plynového chromatografu [32]

Zdroj nosného plynu – jako zásobník nosného plynu se používá tlaková lahev, která obsahuje dusík, vodík, helium nebo argon. Nosný plyn musí být vždy vůči analyzovanému vzorku inertní, nesmí s ním nijak reagovat, vzhledem k bezpečnosti nesmí být toxický. Často se jako nosný plyn využívá vodík, který má ale tu nevýhodu, že je hořlavý, výbušný a někdy může hydrogenovat vzorek a při analýze pak dochází k identifikaci takovýchto látek. [31, s. 11]

Čistící zařízení – tato část plynového chromatografu je umístěna hned za tlakovou lahvi. Její úkol je zbavit nosný plyn nečistot, vlhkosti a zbylých stop nežádoucích plynů, které by mohly poškodit kolonu. [31, s. 11]

Regulační zařízení - tato část slouží k regulaci tlaku nosného plynu. Tlak může být po celou dobu analýzy konstantní nebo se může měnit dle nastavených parametrů. [31, s. 11]

Dávkovač – dávkovací zařízení slouží k aplikaci vzorku do nosného plynu. Vzorky se nanášejí pomocí injekční stříkačky. Pro nastříknutí je možno použít několik metod. Základní metodou je nastříknutí do kolony, někdy označované jako on column. Tato metoda se využívá u náplňových kolon, ale lze ji uplatnit i v kapilárních kolonách. Přední část kolony je zahřívána na teplotu, která je nižší než teplota varu použitého rozpouštědla. Nanesený vzorek tak vytvoří film na stěně kolony. Po krátké době však dojde k prudkému nárůstu teploty a vzorek se přemění na plyn. [31, s. 11]

Další metoda využívaná k dávkování je nastříknutí vzorku pomocí děliče toku, označovaná jako split injection. Tato metoda se hojně využívá u kapilárních kolon, kde kvůli malé kapacitě kolony dojde k oddělení vzorku od části nosného plynu za pomoci děliče toku neboli splitteru. [31, s. 11], [9, s. 9 – 10]

Metoda dávkování bez děliče toku je vhodná pro analýzu, kde je potřeba velké množství vzorku, protože vzorek je příliš málo koncentrovaný. Využívá se stejné zařízení jako u dávkování s děličem toku s tou změnou, že odvod děliče je uzavřen. Vzorek se nejdříve nachází v trubici, ve které dochází k jeho odpařování, mezi tím dojde k oplachu septa, následnému zvýšení teploty, čímž je zahájena analýza. [31, s. 11], [9, s. 9 – 10]

Pro analýzu mastných kyselin se nejčastěji využívá metoda dávkování on column a to i přes to, že je tato metoda nevhodná pro látky s vysokou nebo naopak s nízkou teplotou varu. Mastné kyseliny se běžně vyskytují s 4 až 24 atomy uhlíků v řetězci, délka řetězce silně ovlivňuje bod varu a proto mají MK širokou škálu teploty varu. A právě proto, aby mohla být tato metoda pro analýzu MK použita je nutno při dávkování vzorku využít au-

tomatické dávkování, dávkovat jen malé množství, vzorek musí být málo koncentrovaný, teplota nástřiku musí být dostatečně vysoká. [27, s. 27 – 28]

Kolona – kolona je část chromatografu, ve které se nachází stacionární fáze, na které dochází k rozdělení složek analytu. Kolony používané v plynové chromatografii jsou buď náplňové a nebo kapilární. Náplňové kolony mohou být vyrobeny ze skla nebo oceli, jsou vyplněny sorbentem nebo nosičem společně s kapalnou fází. Jako sorbent se používá silikagel, alumina nebo třeba grafitizované saze. Separace v této koloně probíhá pomocí rozdělovacího principu. Druhým typem kolony je kolona kapilární. Je vyrobena z křemene, na který je přímo aplikována stacionární fáze, není zde potřeba žádného nosiče. Průměry kolon mohou být různé, širší kolony umožňují separaci více složek, ale užší kolony jsou více účinné.

Jak již bylo řečeno, v koloně se nachází stacionární fáze. Na tuto fázi se váže analyzovaný vzorek, kde se jeho složky zdržují na různě dlouhou dobu, což umožňuje jejich separaci. Proto musí být dobře uchycena na správný nosič, nesmí být těkavá a nesmí se z kolony v průběhu separaci vymývat. Pro danou analýzu musí být stacionární fáze správně zvolená, velmi důležitá je i její polarita. [31, s. 12], [33, s. 11 – 12]

Pro separaci methylesterů mastných kyselin jsou vhodné kolony kapilární. Parametry, jako jsou vnitřní průměr a délka kolony, polarita a tloušťka vrstvy stacionární fáze, se mohou lišit. Lze použít nepolární, polární, ale i vysoce polární stacionární fáze. Jejich rozdílem je různá účinnost a tepelná odolnost. [27, s. 28]

Detektor – je zařízení, které slouží k detekci složek v analytu. Můžeme mít několik typů, které se liší pracovním principem. Mezi v praxi používané detektory se řadí tepelně vodivostní detektor, anglicky označovaný jako Thermal Conductivity Detector TCD, ionizační detektory, mezi něž řadíme plamenový ionizační detektor (Flame ionization Detector FID), plamenový ionizační detektor s alkalickým kovem (AFID), bezplamenný detektor s alkalickým kovem (bezplamenný TID), detektor elektronového záchytu (Electron Capture Detector ECD), fotoionizační detektor (PhotoIonization Detector PID), dále se jako detektory v plynové chromatografii uplatňují hmotnostní spektrometry (MS) a atomový emisní detektor (AID). [31, s. 13 – 14], [34, s. 28 – 29]

Zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve formě jejich methylesterů je možno analyzovat pomocí GC porovnáním analýz GC/MS (plynová chromatografie s hmotnostním detek-

torem) a GC/FID (plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem). [35, s. 316]

Vyhodnocovací zařízení – jedná se o část chromatografu, který slouží ke zpracování signálu z daného detektoru, kdy vytvoří chromatografickou křivku ve formě chromatogramu. [31, s. 12]

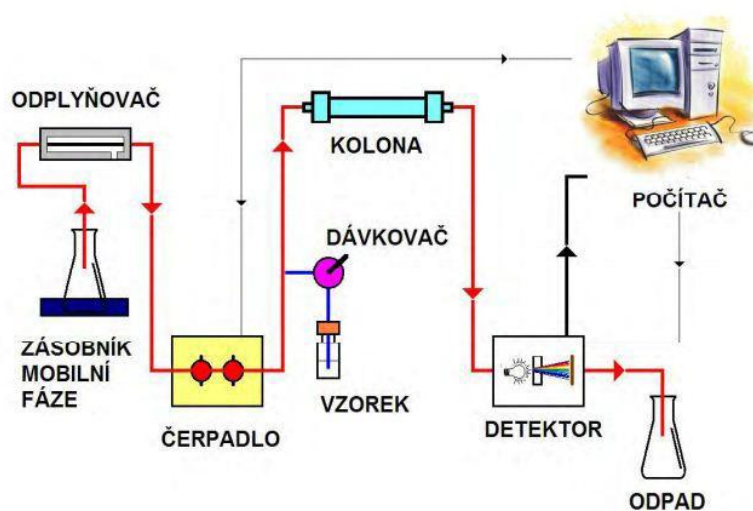
Termostat – slouží k udržení stálé teploty dávkovače, kolony a detektoru tak, aby byl vzorek stále v plynném stavu. [31, s. 12]

Plynovou chromatografii je možno provádět několika různými pracovními technikami, patří mezi ně eluční metoda, frontální metoda a metoda vytěšňovací. Tyto metody se vzájemně liší rozdílnými postupy při separaci složek v analyzovaném vzorku.

1.3.3 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je jedna z dalších metod, kterými je možno stanovit mastné kyseliny. Separace pomocí této metody probíhá na základě navázání složek vzorku na stacionární nebo mobilní fázi. To je základní rozdíl mezi plynovou a kapalinovou chromatografií, protože separace u GC byla závislá pouze na stacionární fázi a mobilní fáze byla k analytu inertní, zatímco u kapalinové chromatografie separaci ovlivňují obě fáze. Mechanizmy, podle kterých dochází k rozdělení látek, mohou být adsorpční, rozdělovací dle rozpustnosti, iontově výměnný, molekulově síťový efekt a specifické interakce. [31, s. 25]

Kapalinový chromatograf se skládá z několika částí, tvoří jej zásobník mobilní fáze, odplyňovač, čerpadlo, směšovací zařízení, dávkovací zařízení, kolona, detektor a vyhodnocovací zařízení. Obecné schéma takového zařízení můžeme vidět na obrázku 3. [31, s. 25 – 26], [28, s. 32 – 33]



Obr. 3. Schéma kapalinového chromatografu [28, s. 33]

Čerpadlo – vzhledem k tomu, že kolona je naplněna stacionární fází, která klade velký odpor pro průchod mobilní fáze touto kolonou, musí být použity dostatečně výkonná čerpadla pro zajištění průtoku mobilní fáze. Požadavky na čerpadla jsou stálý průtok, dostatečně velký tlak, bez kolísání průtoku a také musí odolávat působení organických rozpouštědel přítomných v mobilní fázi. Právě proto jsou tato čerpadla vyráběna z odolného materiálu (nerezová ocel, PEEK). Jako alternativní možnost nahrazení čerpadla je levnější varianta v podobě zařízení, které pracuje na principu injekční stříkačky. Jeho nevýhodou je ale omezené množství mobilní fáze, která může být vstříknuta do kolony. [31, s. 25], [36 s. 81]

Směšovací zařízení – toto zařízení umožňuje měnit složení mobilní fáze v průběhu procesu analýzy. Pokud je směs po celou dobu analýzy stejná, jedná se o izotaktickou eluci, ale pokud se v průběhu analýzy mění, hovoříme o eluci gradientové. [31, s. 25]

Dávkovací zařízení – slouží k nadávkování vzorku do kolony. Za tímto účelem může být použito dávkování injekční stříkačkou, šesticestný ventil se smyčkou, dnes i sedmicestný ventil se smyčkou nebo autosampler. Autosampler je automatické zařízení, které je schopno velmi přesně nadávkovat velké množství vzorků a standardů. [31, s. 25 – 26], [36, s. 81]

Kolona – vhodná kolona by měla poskytovat při separaci složek dobrou selektivitu a vysokou účinnost. Měla by být mechanicky i chemicky odolná vůči tlakům a jednotlivým chemikáliím v mobilní fázi. V kapalinové chromatografii jsou využívány kolony jen náplňového typu. Může se lišit jejich délka, vnitřní průměr a náplň. Z důvodu ochrání hlavní

kolony jsou používány i předkolony, které mají zachytit veškeré nečistoty, jež by mohly kolonu poškodit. [31, s. 26], [34, s. 31]

Detektor – u kapalinové chromatografie může být použito více typů detektorů, které se mohou lišit principem stanovení. Základem výběru vhodného detektoru je to, že při detekci dojde ke stanovení pouze analyzovaného vzorku a nikoliv použité mobilní fáze. Mezi detektory používané v kapalinové chromatografii se řadí refraktometrický detektor, fluorescenční detektor, FTIR detektor, vodivostní detektor, voltametrický detektor, hmotnostní spektrometry, elektrochemický a fotometrický detektor. [31, s. 26], [36, s. 81], [34, s. 31 – 32]

1.3.4 Tenkovrstevná chromatografie

Jedná se o typ chromatografie, označované jako TLC, která probíhá na tenké vrstvě. Tato vrstva představuje stacionární fázi. Ta je nanášena na hliníkovou nebo skleněnou destičku. Často používané stacionární fáze v TLC jsou oxid hlinitý, hydroxid hlinitý nebo oxid křemičitý známý jako silikagel. Mobilní fáze je kapalná.

Vzorek je na stacionární fázi nanášen pomocí automatické pipety a celá destička je vložena do vyvíjecí komory. Mobilní fáze začne díky kapilárním silám vzlínat po destičce směrem vzhůru, kde současně unáší nanášené vzorky. Rozdělení analyzovaných látek je umožněno adsorpcí na stacionární fázi a potřebnou dobou pro rozpuštění v mobilní fázi, čímž dojde k postupnému opožďování ve vzlínání jednotlivých složek. Z tohoto důvodu jsou po ukončení analýzy vzorky v různé výšce destičky. Po porovnání látek se standardem za daných podmínek je analyzovaná látka rozpoznána. [28, s. 34 – 35], [37, s. 27]

1.3.5 Hmotnostní spektroskopie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je metoda řadící se mezi separační analytické metody. Je založena na principu převedení molekul na ionty a identifikace iontů podle jejich poměru hmotnosti a náboje. Tím je umožněno stanovit složení molekuly a tedy i analyzovaného vzorku. Přístroj, pomocí kterého je umožněno tuto metodu provádět, je hmotnostní spektrometr, což je iontově-optické zařízení. Základní části tohoto přístroje jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor, vakuový systém, iontová optika a počítač jako vyhodnocovací zařízení. [28, s. 34], [38], [39, s. 448], [40, s. 9], [54]

1.3.6 Nukleární magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance (NMR) patří mezi jednu z nejsložitějších analytických metod. Tato metoda je založena na odezvách jader atomů umístěných v silném magnetickém poli a interakcí s elektromagnetickým vlněním. Absorpce elektromagnetického vlnění jádrem způsobí přechod jádra do vyšší energetické hladiny. Za objev této metody byla roku 1952 udělena Nobelova cena. [28, s. 36], [41]

2 BAKTERIE S LIPOLYTICKOU AKTIVITOU

V přírodě existuje velké množství různých mikroorganismů, které mají lipolytickou aktivitu. Mezi tyto mikroorganismy se řadí některé druhy bakterií, kvasinek a plísní. Lipolytická aktivita, jak již bylo řečeno, je schopnost mikroorganismů produkovat enzymy, které katalyzují hydrolýzu tuků neboli triacylglycerolů na glycerol a mastné kyseliny. Enzymy s touto funkcí jsou označovány jako lipázy.

V potravinářství se využívá celá řada bakterií s lipolytickou aktivitou, která je potřebná pro výrobu některých potravin. Mezi tyto bakterie můžeme zařadit bakterie rodu *Lactococcus*, rodu *Lactobacillus*, dále rodu *Brevibacterium* a rodu *Propionibacterium* a další.

2.1 Bakterie rodu *Lactococcus*

Rod *Lactococcus* byl vytvořen roku 1986, kdy došlo k vyčlenění některých druhů bakterií z rodu *Streptococcus* a *Lactobacillus*. Bakterie rodu *Lactococcus* jsou grampozitivní koky, které mají sférický až ovoidní tvar. Bakterie netvoří spory ani pouzdra. Jsou nepohyblivé a vzhledem ke vztahu ke kyslíku fakultativně anaerobní. Optimální teplota růstu pro tyto bakterie se pohybuje mezi 30 °C až 38 °C. Rostou ale i při teplotách nižších. Nejsou schopny růst v prostředí s koncentrací NaCl 6,5 % a vyšší. Tyto bakterie jsou nutričně náročné na prostředí, ve kterém se nacházejí, vyžadují komplexní kultivační média, přítomnost aminokyselin, vitaminů. [42], [43, s. 25]

V současné době je známo šest druhů, patří mezi ně *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus chuangangensis*. Druh *Lactococcus lactis* obsahuje tři poddruhy bakterií *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* a *L. lactis* subsp. *hordniae*. [43, s. 25]

Bakterie rodu *Lactococcus* patří mezi bakterie mléčného kvašení, konkrétně tento rod bakterií se řadí mezi homofermentativní bakterie, což znamená, že jsou schopny fermentovat sacharidy. Hlavním produktem fermentace je kyselina mléčná. Proto jsou tyto bakterie velmi často celosvětově využívány v mlékárenském průmyslu. Některé kmeny jsou schopny produkovat i jiné látky, jako např. kyselinu listovou, biogenní aminy či antimikrobní látky. Některé laktokoky jsou však podmíněně patogenní pro živočichy. *Lactococcus garvieae* způsobuje bovinní mastitidu a septické infekce sladkovodních ryb, *Lactococcus piscium* způsobuje infekce lososovitých ryb. Ve výjimečných případech mohou laktokoky

způsobovat i humánní infekce a to převážně u lidí se sníženou obranyschopností. Riziko infekce těmito bakteriemi je však nízké, zatím nebyla prokázána přímá souvislost mezi infekcí a konzumací fermentovaných potravin. [42], [44, s. 11 – 12], [43, s. 25]

2.2 Bakterie rodu *Lactobacillus*

Jedná se také o grampozitivní bakterie, jsou to nesporelující delší tyčinky, jen zřídka jsou pohyblivé. Lactobacily se řadí mezi mikroaerofilní až anaerobní mikroorganismy. Jejich optimální teplota pro růst se pohybuje mezi 30 °C až 40 °C, optimální hodnota pH prostředí je 5,5 – 6,2. Stejně jako rod *Lactococcus* jsou nutričně náročné na prostředí. V současnosti je známo přes 70 druhů, které jsou široce rozšířené. Mohou se nacházet na slizničním povrchu tělních dutin živočichů i člověka, na rostlinných materiálech, ve fermentovaných i kazících se potravinách, ve výkalech a v odpadních vodách. Jejich výskyt je ovlivněn řadou faktorů – pH, dostupnost kyslíku, typ substrátu, přítomnost sekretů, vzájemná interakce s jinými bakteriemi. Jen velmi zřídka jsou původci infekcí. Mnohé z nich jsou nepatogenní. [42], [44, s. 16 – 20], [45, s. 7]

Dle konečného produktu fermentace sacharidů můžeme laktobacily rozdělit do tří skupin. Některé druhy spadají do obligátně homofermentativních bakterií, tyto bakterie při fermentaci produkují kyselinu mléčnou. Druhou skupinou jsou fakultativně heterofermentativní bakterie a třetí skupinou jsou obligátně heterofermentativní bakterie, ty při fermentaci tvoří kyselinu mléčnou jen z 50 %, dále tvoří kyselinu octovou, CO₂ a ethanol. [42], [45, s. 6 – 7]

Laktobacily se v potravinářském průmyslu využívají pro výrobu fermentovaných potravin. Jsou součástí startovacích kultur na výrobu sýrů – jako primární kultury se používají na výrobu kyseliny mléčné a ve formě přídatných kultur slouží na urychlení zrání sýrů. Také mohou být použity jako non-startérové kultury, které se využívají na zrání mnoha typu sýrů a tvorbu aroma. Mimo výroby sýrů se tyto bakterie používají i při výrobě jogurtů, kefirů či, jiných mléčných výrobků, jako jsou kumys, kwerionik a iben, ale také jsou využívány na výrobu fermentovaných masných výrobků. Mnohé laktobacily mají vlastnosti probiotik. Mimo jiné bylo prokázáno, že tento rod bakterií je rezistentní vůči některým antimikrobním látkám. [42], [44, s. 16 – 20]

2.3 Bakterie rodu *Brevibacterium*

Bakterie tohoto rodu jsou grampozitivní, ale starší kultury se mohou barvit gramnegativně. V životním cyklu se mění tvar buněk. Buňky mladých kultur tvoří nepravidelné tyčinky, ty se mohou vyskytovat samostatně nebo ve dvou, kdy jsou ve tvaru „V“, někdy mohou být větvené. Naopak buňky starších kultur jsou rozděleny do malých koků. Jsou nepohyblivé. Optimální teplota pro jejich růst je 20 až 35 °C, jsou nesporulující, acidorezistentní a striktně aerobní. Jsou součástí kultur, které se používají na výrobu sýrů. [42]

2.4 Bakterie rodu *Propionibacterium*

Bakterie rodu *Propionibacterium* jsou velmi pleomorfní grampozitivní tyčinky, které mají kyjovitý tvar (to znamená, že jeden konec je zúžený a druhý zakulacený). Buňky jsou podobné buňkám bifidobakterií. Vyskytují se buď jednotlivě nebo po dvou nebo v malých řetězcích. Buňky jsou nepohyblivé a nesporulující. Vzhledem ke vztahu ke kyslíku jsou fakultativně anaerobní a variabilní v toleranci ke kyslíku. Z výživového a energetického hlediska jsou chemoorganotrofní, jsou kultivačně náročné a vyžadují komplexní média. [42]

Jsou heterofermentativní. Mezi hlavní produkty jejich fermentace patří kyselina propionová, kyselina octová a oxid uhličitý. Proto je tento proces nazýván propionovým kvašením. Díky kyselině propionové mají sýry ementálového typu typickou chuť a vznikající oxid uhličitý je zodpovědný za bubliny v sýrové struktuře. Propionové bakterie jsou schopny fermentovat velké množství uhlíkatých látek a také celou řadu organických kyselin. Z toho důvodu se dráhy přeměny musí alespoň na začátku lišit. Ať už je ale na kvašení využita jakákoliv látka, produkt fermentace je vždy stejný. [46, s. 74]

2.5 Bakterie rodu *Pseudomonas*

Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou gramnegativní tyčinky, které se mohou pohybovat pomocí bičíků (monotrichální, lofotrichální). Jsou striktně aerobní, chemoorganotrofní a nejsou schopny fermentace. Jako zdroj uhlíku a energie mohou tyto bakterie využívat řadu různých organických sloučenin, což jim umožňuje individuální operony, které jsou tyto bakterie schopny přepisovat a díky tomu mají k dispozici mnoho enzymů. Některé druhy pseudomonád jsou schopny produkovat barviva (žluté, zelené, modré, červené, fluoreskující žlutozelené), která uvolňují do prostředí, ve kterém se nachází a tím způsobují nežádoucí barvení potravin. V potravinách jsou také původcem nežádoucích chutí a pachutí. Lipoly-

tická aktivita pseudomonád byla pravděpodobně studována jako první. Vzhledem k tomu, že některé druhy pseudomonád, které produkují důležité lipázy, byly přeřazeny do rodu *Burkholderia* a některé pochází z různých jiných rodů, bylo důležité zavést klasifikaci lipáz na základě jejich podčeledí. Enzymy produkované pseudomonádami mají převažující roli v průmyslu. Jejich proteolytická a lipolytická aktivita je velmi výrazná. [1, s. 14 – 15], [14, s. 16], [47, s. 178]

Pseudomonády můžeme nalézt ve vodě říční i mořské, v půdě, na rostlinách, na kůži i v potravinách. Jsou schopny růst i za nízkých chladírenských teplot. Mohou způsobovat u člověka různá onemocnění – zánět středního ucha, novorozenecké průjmy, infekce ran a popálenin, infekce očí. [1, s. 15], [48]

2.6 Bakterie rodu *Bacillus*

Bakterie rodu *Bacillus* tvoří velkou skupinu mikroorganismů, jedná se o grampozitivní bakterie, které mají tyčinkový tvar. Vztah ke kyslíku je různý, některé druhy jsou obligátně anaerobní, některé fakultativně aerobní a jiné obligátně aerobní. Jsou schopny se pohybovat, protože na povrchu buňky mají bičíky. Také vytváří spory, které jsou velmi odolné vůči vnějšímu prostředí – odolávají vysokým teplotám, zářením, apod. Některé bacily patří mezi významné kontaminanty potravin, jsou schopny vytvářet mnoho různých enzymů, které následně působí na organický materiál a rozkládají ho. Jiné vytváří patogenní toxiny či antibiotika. [1, s. 17], [14, s. 14 – 15]

Lipázy produkované *B. subtilis* a *B. pumilus* jsou odlišné od ostatních lipáz tohoto rodu bakterií, jsou nejmenší, jejich velikost je jen kolem 20 kDa a mají asi jen 15 % sekvence společné s ostatními lipázami bacilů. Naopak společná vlastnost pro lipázy produkované *B. thermocatenulatus* a *B. stearothermophilus* je, že jejich velikost je kolem 45 kDa a maximální účinnost vykazují při pH 9,0 a teplotě 65 °C. [47, s. 178]

2.7 Bakterie rodu *Streptomyces*

Jedná se bakterie, které pro svůj růst vyžadují přístup ke kyslíku. Jedná se mikroorganismy, které tvoří přechod mezi bakteriemi a houbami. Jejich buňky jsou vláknité, větvcí se. Vytváří spory. Nejčastějším prostředím, ve které se vyskytují, je půda, ze které se mohou šířit do okolí a to převážně pomocí spor. Patří mezi výborné producenty antibiotik a enzymů, které jsou schopny rozložit polymery. To, že existuje podobnost mezi lipázami produkované jedním rodem bakterií, je pravděpodobné, ale i bakterie *Streptomyces cinnamoneus*

a *Propionibacterium acnes* produkují lipolytické enzymy, které jsou si významně blízké, z 39 % jsou identické a z 50 % jsou si podobné. [1, s. 16], [14, s. 16], [47, s. 178], [49, s. 5 – 6]

2.8 Bakterie rodu *Staphylococcus*

Bakterie tohoto rodu jsou grampozitivní bakterie, nesporulující, nepohyblivé a vzhledem ke vztahu ke kyslíku jsou fakultativně anaerobní. Tento rod zahrnuje kolem 50 druhů bakterií. Jsou přirozenou součástí kůže a sliznic, a to jak u člověka, tak také i u zvířat. Můžeme je najít i v půdě a v potravinách. [48]

Stafylokoky mohou být diagnostikovány pomocí plazmokoagulázy. Mezi stafylokoky koaguláza negativní patří *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. warneri* a *S. haemolyticus*. Do druhé skupiny, koaguláza pozitivní stafylokoky, se řadí *S. aureus* a *S. lugdunensis*. *S. epidermidis* je nepatogenní, popř. oportunně patogenní. Naproti tomu *S. aureus* patří mezi neúspěšnější lidské patogeny, jedná se o nejdůležitější původce bakteriálních kožních onemocnění. Stafylokoky jsou bakterie, které jsou spojovány se vznikem nozokomiálních infekcí, endokarditid, sepsí, pneumonií, stafylokokových enterotoxikóz a dalších nemocí, mohou být i původci syndromu toxického šoku. Jsou považovány za hrozbu pro lidské zdraví. Přestože i některé kmeny *S. epidermidis* mohou způsobit nozokomiální infekce, na rozdíl od zlatých stafylokoků neprodukují tak agresivní faktory virulence. Naopak, tvoří faktory, které za normálních okolností udržují stálý stav na povrchu kůže. Stafylokoky jsou totiž přirozenými komenzály kůže. Zájem o stafylokoky se v poslední době výrazně zvýšil především díky rostoucí odolnosti těchto bakterií vůči antibiotikům. [48], [50, s. 679], [51, s. 1 – 15]

Stafylokokové lipázy jsou poměrně velké, jejich hmotnost je kolem 75 kDa. Jsou vylučovány jako prekurzory a v extracelulárním prostředí jsou štěpeny za pomoci specifických proteáz, čímž je získán protein s cca 400 aminokyselinovými zbytky. Propeptid pravděpodobně působí jako chaperon a usnadňuje translokaci lipáz přes buněčnou membránu. Zajímavé je, že lipázy produkované bakterií *S. hyicus* mají pozoruhodnou fosfolipázovou aktivitu, což je mezi lipázami unikátní. [47, s. 178]

Lipázy produkované *S. epidermidis*, ale také *Propionibacterium acnes* mohou být zapojeny do kolonizace kůže a jsou schopny přetrvávat na jejím povrchu. Lipázy z *S. aureus* a *P. aeruginosa* jsou produkovány v průběhu bakteriální infekce a zhoršují funkci různých slo-

žek buněčné imunity, jako jsou makrofágy nebo krevní destičky. Současné poznatky umožňují zařadit tyto lipázy mezi důležité bakteriální faktory virulence, které uplatňují své škodlivé účinky v kombinaci s jinými bakteriálními enzymy, zejména s fosfolipázou C. [16, s. 29]

2.9 Bakterie rodu *Streptococcus*

Bakterie tohoto rodu jsou grampozitivní. Jejich buňky mají kokovitý tvar. Jsou fakultativně anaerobní a někteří zástupci se také řadí mezi bakterie mléčného kvašení, přesněji mezi BMK s homofermentativním kvašením. V potravinářství jsou využívány bakterie *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, slouží na výrobu zákysů, jogurtů a sýrů ementálského typu. [52, s. 21]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE

3.1 Použité materiály a chemikálie

Pro kultivaci mikroorganismů ve vzorcích smetany za účelem stanovení jejich lipolytické aktivity, pro extrakci tuku ze smetany, přípravu methylesterů a následnou plynovou chromatografii byly použity následující materiály a chemikálie:

- Smetana OLMA 33 %
- Olivový olej
- Petrolether (Penta)
- Diethylether (Penta)
- Amoniak (Penta)
- Ethanol (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- Hexan (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- Chlorid sodný (Penta)
- Bezvodý síran sodný (Penta)
- Methylalkohol (Penta, Ing. Petr Švec)
- Kyselina sírová (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- Hydroxid draselný (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

3.2 Použité mikroorganismy a kultivační půdy

Lipolytická aktivita byla sledována u následujících mikroorganismů, které byly získány z České sbírky mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms, CCM):

- *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955
- *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798
- *Serratia marcescens* CCM 303
- *Staphylococcus aureus* CCM 3953

- *Bacillus subtilis* CCM 4062
- *Bacillus cereus* CCM 2010
- *Bacillus sphaericus* CCM 1615
- *Bacillus subtilis* CCM 2216
- *Escherichia coli* CCM 3954
- *Salmonella enterica subsp. enterica ser. Enteritidis* CCM 4420

Pro pomnožení mikroorganismů byl použit tekutý bujón Nutrient Broth, pro uchování zásobních kultur mikroorganismů byl použit Nutrient agar a na předběžné zjištění lipolytické aktivity byl použit Spirit Blue Agar. K přípravě inokula byl použit sterilní fyziologický roztok. Mikroorganismy byly uchovávány v ledničce při teplotě 4 ± 2 °C.

Kultivační média byla připravena následovně:

Nutriet Broth (HiMedia)

Na digitálních vahách bylo naváženo 2,6 g směsi, ke které bylo přidáno 200 ml destilované vody. Směs byla řádně promíchána a rozpipetována automatickými pipetami do zkumavek v objemu 4,5 ml. Takto připravené zkumavky byly sterilizovány v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 132 °C.

Nutriet agar (HiMedia)

Pomocí digitálních vah bylo naváženo 11,2 g směsi a doplněno destilovanou vodou do 400 ml. Poté byl roztok sterilizován v autoklávu 20 min při 132 °C. Takto připravený agar byl rozlit do sterilních Petriho misek.

Spirit Blue Agar (HiMedia)

Na přípravu tohoto agaru bylo pomocí digitálních vah naváženo 6,43 g směsi, ke které bylo doplněno 200 ml destilované vody. Následovala sterilizace po dobu 20 min při teplotě 132 °C. Agar byl rozlit do sterilních Petriho misek.

Fyziologický roztok

K přípravě tohoto roztoku bylo naváženo 3,6 g chloridu sodného, který byl doplněn destilovanou vodou do objemu 400 ml. Následovala sterilizace při 132 °C po dobu 20 minut.

3.3 Použité přístroje, zařízení a pomůcky

- Digitální váhy
- Vortex, (Heidolph REAX top), Německo
- Autokláv Variokláv H+P, Německo
- Biohazard box EUROFLOW (Clean air), Holandsko
- Biologický termostat BT 120, Česká Republika
- Dezilametr Emo Brno
- Automatické pipety Biohit
- Laboratorní sklo (Petriho misky, zkumavky, kádinky, válce, pipety, tyčinky, odměrné baňky, varné baňky, dělicí baňky, nálevky)
- Laboratorní plasty (špičky pro automatické pipety, hokejky, očkovací kličky)
- Ostatní běžné laboratorní pomůcky a vybavení

3.4 Dekontaminace použitého materiálu

Veškerý materiál, jako je laboratorní sklo a kultivační půdy, který byl při praktické části diplomové práce v rámci mikrobiologické části použit, byl dekontaminován v autoklávu při teplotě 132 °C po dobu 20 minut.

3.5 Metodika

Praktická část mé diplomové práce byla prováděna následujícím postupem.

Příprava kultur bakterií

Nejdříve musely být oživeny bakterie, které byly zvoleny pro testování lipolytické aktivity, protože použité kultury mikroorganismů byly pro jejich uchování zamrazeny. Byl připraven tekutý bujón Nutrien Broth o objemu 200 ml, který byl rozpipetován do zkumavek po 4,5 ml. Takto připravené zkumavky byly vysterilizovány v autoklávu při teplotě 132 °C po

dobu 20 minut. Poté, co bujón vychladl na laboratorní teplotu, mohly být pomocí sterilních kliček bakterie zaočkovány do bujónu. Připravené kultury byly kultivovány v termostatu po dobu 24 hodin při teplotě příslušné pro daný mikroorganismus. Mikroorganismy *Escherichia coli*, *Salmonella* a *Staphylococcus aureus* byly kultivovány při teplotě 37 °C, zbylých sedm druhů bakterií bylo kultivováno při teplotě 30 °C.

Následující den bylo připraveno 200 ml Nutrient agaru, byl vysterilizován a rozdělen do deseti Petriho misek. Jakmile agar na miskách zatuhl, byl pomocí křížového roztěru zaočkován bakteriemi, které byly po dobu 24 hodin kultivovány v termostatu v bujónu. Misky s mikroorganismy byly opět vloženy do termostatů s patřičnou teplotou, kde byly opět kultivovány do druhého dne.

Lipolytická aktivita mikroorganismu při kultivaci na Spirit Blue Agar

Test lipolytické aktivity pomocí Spirit Blue Agarů byl prováděn dvěma různými postupy. Prvním způsobem byl připraven Spirit Blue Agar v objemu 400 ml, který byl vysterilizován v autoklávu, následně byl ochlazen na 50 °C, kde do něj bylo přidáno 12 ml substrátu. Substrát pro lipolýzu byl získán rozpuštěním 0,09 ml Tweenu 80 v 36 ml destilované vody. Z důvodu špatného rozpouštění Tweenu 80 ve vodě bylo využito i zahřívání roztoku. Poté bylo do roztoku přidáno 9 ml olivového oleje. Substrát byl míchán tak dlouho, až byla vytvořena emulze typu olej ve vodě. Takto připravený agar s obsahem substrátu byl rozdělen na Petriho misky, kde byl ponechán vychladnout a vytuhnout. Následně byly misky rozděleny na dvě poloviny, kde na obě její části byl zaočkován stejný mikroorganismus. Očkování bylo prováděno křížovým roztěrem. Takto připravené půdy byly vloženy do termostatu, půdy s bakteriemi *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis a *Staphylococcus aureus* byly kultivovány opět při teplotě 37 °C 24 až 48 hodin, půdy s bakteriemi *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* byly kultivovány při teplotě 30 °C stejně dlouhou dobu. Po uplynutí doby kultivace byly odečteny výsledky. Prokázání lipolytické aktivity u testovaných mikroorganismů bylo hodnoceno pomocí vzniku modrého zbarvení agarů.

Druhý způsob přípravy Spirit Blue Agarů byl následující. Agar byl připraven běžným postupem v objemu 200 ml. Půda byla vysterilizována v autoklávu společně i s odměrným válcem. Poté bylo na každou Petriho misku odměřeno přesně 20 ml půdy. Následně byl k agaru pomocí automatické pipety přidán 1 ml inokula bakterií ve fyziologickém roztoku.

Inokulum bylo připraveno tak, že do sterilních plastových zkumavek byl napipetován fyziologický roztok o objemu cca 4 ml, do kterého byly pomocí sterilních kliček přidány bakterie. Suspenze byla promíchána na Vortexu a na dezilametri, byl změřen zákal. Požadovaná hodnota zákalu byla vždy 1 McFarland. Do takto připravených zaočkovaných ploten byly pomocí sterilních špiček udělány čtyři rovnoměrně rozmístěné jamky, do kterých byl napipetován olivový olej v objemu 50 μ l. Takto připravené půdy byly dány do termostatu ke kultivaci, která probíhala při stejných podmínkách jako předtest lipolytické aktivity připravený předchozím způsobem. Po uplynutí kultivační doby byly opět odečteny výsledky.

Test růstu mikroorganismů ve vzorcích smetany

Před samotným testem na lipolytickou aktivitu daných bakterií, bylo nutno provést zkoušku růstu a množení bakterií ve smetaně. Zkouška byla provedena následujícím způsobem.

První den bylo vysterilizováno 40 kusů skleněných zkumavek spolu s víčkem. Bylo připraveno 200 ml sterilního fyziologického roztoku, který posléze sloužil na přípravu inokula bakterií. Toto inokulum bylo připraveno ve sterilních plastových zkumavkách. Pro každou bakterii odpovídala jedna zkumavka inokula se zákalem 1 McFarland. Zákal byl opět měřen na denzilametri.

Dále bylo připraveno 200 ml smetany, do které byla přidána glukóza na výslednou koncentraci 5 g/l. Tato smetana byla rozpipetována do 20 kusů vysterilizovaných zkumavek po 5 ml. Stejným způsobem byla rozpipetována i smetana bez přídavku glukózy. Bylo tak tedy připraveno celkově 40 kusů zkumavek se smetanou. Tyto zkumavky byly dále zaočkovány testovanými bakteriemi. Očkování bylo provedeno připraveným inokulem bakterií ve fyziologickém roztoku, kdy do každé zkumavky bylo napipetováno 100 μ l inokula tak, aby pro každý mikroorganismus byly zaočkovány vždy dvě zkumavky se smetanou bez glukózy a dvě zkumavky se smetanou s obsahem glukózy.

Kultivace takto připravených vzorků smetany probíhala při dvojích podmínkách. Polovina vzorků byla nechána při laboratorní teplotě a polovina vzorků byla dána do termostatu, ve kterém byla ideální teplota pro daný mikroorganismus. Tzn, že polovina vzorků smetany s glukózou, kdy každá zkumavka byla zaočkována jiným mikroorganizmem, byla kultivována při laboratorní teplotě a druhá polovina, která byla zaočkována stejnými mikroorganismy, byla kultivována v termostatu, z čehož zkumavky obsahující *Escherichia coli*, *Salmonella* a *Staphylococcus aureus* byly v termostatu při 37 °C a zbylých sedm zkumavek

bylo kultivováno při 30 °C. Vzorky byly kultivovány do druhého dne. Stejným způsobem byly rozděleny a kultivovány i vzorky smetany bez glukózy.

Druhý den bylo připraveno 800 ml Nutrient agaru, který byl po sterilizaci v autoklávu rozdělen do 40 sterilních Petriho misek. Každá ze 40 zkumavek připravených předcházející den byla vyočkována vždy na jednu Petriho misku. Z každé zkumavky bylo pipetou odebráno 100 µl vzorku, který byl napipetován na misku a sterilní plastovou jednorázovou hokejkou rozhojekován po celé plotně. Takto získané misky byly nechány na kultivaci za podmínek vhodných pro daný mikroorganismus po dobu 24 hodin.

Zkumavky se zaočkovanou smetanou byly po odběru vzorku opět kultivovány při stejných podmínkách jako předcházejících 24 hodin. Stejným postupem byly odebírány vzorky i třetí, čtvrtý a pátý den testu. Současně byly hodnoceny připravené vzorky a bylo sledováno, zda jednotlivé mikroorganismy rostou a v jaké míře. Kultivace smetany ve všech čtyřiceti zkumavkách byla pátý den ukončena a zkumavky byly zlikvidovány.

Test lipolytické aktivity ve vzorcích smetany

Samotný test na lipolytickou aktivitu bakterií byl proveden následovně. Do 30 ml smetany o tučnosti 33 % bylo přidáno 600 µl inokula bakterií. Test byl proveden ve velkých 50ml plastových sterilních zkumavkách. Inokulum bylo připraveno ze sterilního fyziologického roztoku, ke kterému byly sterilní kličkou přidány bakterie, výsledná hodnota zákalu vzniklé suspenze byla 1 McFarland. Zákal byl opět kontrolován na denzilometru.

Takto zaočkovaná smetana byla nechána při kultivaci 48 hodin v termostatu při teplotě 30 °C. Ke vzorkům smetany s bakteriemi byl také přidán jeden vzorek samotné nezaočkované smetany, který byl po dobu kultivace ponechán při stejných podmínkách jako zaočkované vzorky.

Při orientačním stanovení lipolytické aktivity bakterií na Spirit blue agaru bylo použito všech deset výše zmíněných mikroorganismů, na základě výsledků těchto testů bylo vybráno pouze pět bakterií, které byly použity k dalšímu testování. Patří mezi ně *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*.

Po 48 hodinách kultivace vzorků, bylo ze všech vzorků odebráno potřebné množství smetany na extrakci tuku a následné stanovení lipolytické aktivity testovaných mikroorganismů.

Extrakce tuku ze smetany

Pro vyextrahování tuku ze vzorků smetany bylo nutno odvážit 10 g smetany. Ta byla vytemperována na teplotu 38 ± 1 °C. Smetana byla převedena do dělicí nálevky, kde k ní bylo přidáno 3 ml amoniaku, 10 ml ethanolu a 25 ml diethyletheru. Celá směs byla řádně protřepána po dobu jedné minuty. Následně bylo ke směsi přidáno 25 ml petroletheru a obsah dělicí nálevky byl opět protřepán po dobu 1,5 minuty. Směs v děličce byla ponechána při laboratorní teplotě po dobu třiceti minut, během této doby došlo k oddělení fází.

Po uplynutí půl hodiny byla spodní zakalená část přepuštěna do kádinky a vrchní čirá část byla odpuštěna do baňky s kulatým dnem. Zakalená část byla opět vrácena do dělicí nálevky, kde k ní bylo přidáno 5 ml ethanolu a 15 ml diethyletheru. Směs byla řádně protřepána. Bylo k ní přidáno dalších 15 ml petroletheru. Dále došlo ke třepání směsi po dobu jedné a půl minuty. Obsah dělicí nálevky byl opět ponechán třicet minut při laboratorní teplotě. Čirá část v baňce s kulatým dnem byla dána na vakuovou odparku a za podtlaku byl odpařen obsah rozpouštědel. V baňce tak zůstal pouze vyextrahovaný tuk.

Zakalená část v děličce byla odpuštěna do kádinky a čirá vrchní část byla přidána do baňky s kulatým dnem k vyextrahované části tuku. Tato baňka byla znovu nasazena na vakuovou odparku, ve které byl odpařen zbytek rozpouštědel. Baňka s vyextrahovaným tukem byla vložena do sušárny, kde byla ponechána při teplotě 50 – 60 °C do druhého dne. Tento vzorek tuku byl přichystán na přípravu methylesterů.

Tímto způsobem byla extrakce tuku provedena jak u všech pěti zaočkovaných vzorků smetany, tak i u jednoho nezačkovaného vzorku.

Příprava methylesterů mastných kyselin

Aby bylo možné zjistit, zda mají bakterie požadovanou vlastnost, která byla studována, bylo nutno připravit methylestery, protože právě tyto látky bylo možno analyzovat pomocí plynového chromatografu. Methylestery byly připravovány dvěma různými způsoby a to jak kyselou, tak i bazickou katalýzou. Tyto dva způsoby přípravy byly vybrány proto, že

při kysele katalyzované esterifikaci jsou na methylestery převedeny mastné kyseliny jak volné, tak i vázané. U bazicky katalyzované esterifikace jsou však na methylestery převedeny pouze vázané mastné kyseliny. Tenhle předpoklad byl popsán také v normě ES ISO 12966.

Kysele katalyzovaná esterifikace tuku ve vzorcích smetany

Do 100ml odměrné baňky bylo s přesností 0,001 g naváženo 0,5 g vzorku vyextrahovaného tuku. Ke vzorku bylo přidáno 15 ml methanolu a 0,25 ml kyseliny sírové. Ke směsi byly také přidány varné kamínky, aby nedošlo k utajenému varu. Baňka byla vložena do varného hnízda a pod zpětným chladičem byla směs vařena po dobu alespoň 45 minut.

Izolace methylesterů mastných kyselin

Po ukončení varu byla baňka ochlazená a její obsah byl převeden do dělicí nálevky. Prázdňá varná baňka byla promyta 5 ml hexanu, který byl posléze přidán ke směsi v děličce spolu s 10 ml 20% roztoku chloridu sodného. (Roztok chloridu sodného byl připraven navážením a rozpuštěním 40 g NaCl ve 200 ml destilované vody. Roztok byl připraven do 200ml odměrné baňky). Celý obsah v dělicí nálevce byl řádně protřepán a potřebnou dobu byl ponechán v klidu, kdy došlo k oddělení vrstev. Došlo k oddělení vodné a hexanové fáze, vodná fáze byla spodní a hexanová fáze byla nahoře. Spodní vodná fáze byla přepuštěna do druhé dělicí nálevky, kde k ní bylo přidáno 2,5 ml hexanu a směs byla znovu řádně protřepána. Opět bylo vyčkáno na oddělení vrstev, spodní vodná fáze byla odpuštěna a horní hexanová fáze byla přidána k hexanové fázi v první dělicí nálevce. K hexanovým extraktům bylo dále přidáno 7,5 ml 20% NaCl a směs byla protřepána. Po dalším oddělení vodní a hexanové fáze byla vodná fáze odpuštěna a hexanová fáze byla vysušena pomocí filtrace přes bezvodý síran sodný, který byl nanesen na filtrační papír v nálevce. Takto připravené methylestery byly při filtraci zachyceny do 5ml odměrných baněk. Tímto způsobem přichycený vzorek byl připraven k analýze na plynovém chromatografu.

Bazicky katalyzovaná esterifikace tuku ve vzorcích smetany

Příprava methylesterů bazickou katalýzou byla provedena obdobně, jako výše popsaná kysele katalyzovaná esterifikace tuku.

Do 100ml varné baňky byl s přesností 0,001 g odvážen 1 g vzorku vyextrahovaného tuku ze smetany. K tuku bylo přidáno 10 ml methanolu a 0,25 ml 1M methanolického roztoku

hydroxidu draselného. (1M – KOH byl připraven navážením a rozpuštěním 0,2805 g KOH v 5 ml methanolu. Roztok byl připraven do 5ml odměrné baňky.) Do varné baňky byly přidány varné kamínky a baňka se směsí byla vložena do varného hnízda, kde byla pod zpětným chladičem udržována ve varu alespoň po dobu 30 minut. Po ukončení vaření byla směs ochlazena a dále bylo postupováno stejným způsobem, jako je popsáno výše u izolace methylesterů mastných kyselin.

Tímto způsobem byly připraveny všechny vzorky smetany, které byly dříve zaočkovány testovanými bakteriemi i spolu s jedním nezaočkovaným vzorkem, tzn. že celkově bylo připraveno dvanáct vzorků methylesterů – pět vzorků zaočkované smetany bakteriemi esterifikovaných kyselé, pět vzorků zaočkované smetany esterifikovaných bazickou katalýzou, jeden vzorek nezaočkované smetany připravený kyselou katalýzou a jeden vzorek nezaočkované smetany připravený bazickou katalýzou esterifikace.

Plynová chromatografie připravených methylesterů

Připravené methylestery byly analyzovány pomocí plynové chromatografie. Sledován byl profil mastných kyselin ve vzorku, tedy typ přítomných mastných kyselin a jejich procentuální zastoupení ve vzorku. Analýza probíhala s využitím plynového chromatografu GC 14A Shimadzu a postup analýzy byl následující:

Jako první byl zapnut plynový chromatogram GC 14A Shimadzu a na displeji byly nastaveny následující parametry pro analýzu – teplota nástřiku (INJ) byla 225 °C, teplota detektoru (DET) byla 230 °C, teplota kolony (COL) byla naprogramována na: COL INIT TEMP byla 110 °C, COL INIT TIME byla 3,0 min., COL PROG RATE byla 15 min., COL FINAL TEMP byla 220 °C a COL FINAL TIME byl 10 min. Dále bylo zmáčknuto tlačítko „start“ a byl zapnut HEATER, v zápětí byl zapnut i detektor FID. Také byly nastaveny tlaky plynů – dusík jako nosný plyn byl nastaven na tlak 2,5 kg.cm⁻², tlak pro dusík na oplachování byl 0,5 kg.cm⁻², tlak vzduchu byl 0,3 – 0,5 kg.cm⁻² a tlak pro vodík byl 0,5 kg.cm⁻². Následovalo zapálení FID detektoru pomocí zapalovače. To, zda plamen hořel, bylo zjišťováno pomocí mikroskopického sklíčka. Vzorek pro analýzu byl dávkován pomocí mikrostřikačky Hamilton a nástřikový objem byl 2 µl.

Před tím, než byl vzorek nastříknut, bylo nutno spustit program na PC. Na monitoru byla otevřena ikona CSW software, dále byla spuštěna ikona Shimadzu GC14 a byla otevřena správná metoda pro analýzu a to CSW32_laboratoře_TUKY II.met. Bylo kliknuto na iko-

nu „Waiting“ a na ikonu vialky se stříkačkou, kde bylo nachystáno dialogové okno, ve kterém byly vyplněny informace o nastříkovaném vzorku. V případě, že byla základní linie dostatečně stabilní, mohlo být přistoupeno k vlastní analýze.

Naplněnou mikrostříkačku do objemu 2 μ l bylo nutno nabrat tak, aby v celém naplněném objemu nebyla žádná bublinka, stříkačka byla přes septum zasunuta do injektoru a v co nejkratším časovém intervalu byl obsah stříkačky vypuštěn dovnitř, na ovládacím panelu od plynového chromatografu bylo co nejdříve zmáčknuto tlačítko „start“ a ihned na monitoru bylo kliknuto na tlačítko „run“, které sloužilo pro zahájení sběru dat pomocí SW. Tímto způsobem byla spuštěna analýza, která běžela dvacet minut.

Při analýze bylo nejdříve nastříknuto čisté rozpouštědlo – hexan, aby bylo zajištěno vypláchnutí kolony. V opačném případě by detektor ukazoval signály, které by nepocházely z našeho vzorku. Po pročištění kolony mohlo být přistoupeno k nastříknutí vlastních vzorků methylesterů připravených ze vzorků smetany. Každý jednotlivý vzorek byl nastříknut minimálně třikrát po sobě. V neposlední řadě byl také nastříknut standard, který sloužil pro porovnání MK a pro přesné zjištění o jakou MK se jedná. Z důvodu časové náročnosti nebylo možno proměřit všechny vzorky methylesterů v jeden den, a proto byly vzorky uchovávány v 5ml odměrných baňkách v lednici.

Výsledkem každé analýzy byl chromatogram, byly zaznamenávány hodnoty ploch a výšek píků a podle retenčních časů jednotlivých píků bylo možno rozpoznat, o jakou mastnou kyselinu se jednalo. Retenční časy byly porovnávány s hodnotami v následující tabulce 1.

Tab. 1. Retenční časy pro methylestery MK ve standardu SUPELCOTM 37 Component FAME Mix (1. část)

Číslo píku	Retenční čas	MK	Číslo píku	Retenční čas	MK
1	-	Máselná	6	6,33	Laurová
2	1,32	Kapronová	7	7,20	Tridekanová
3	2,24	Kaprylová	8	8,04	Myristová
4	4,31	Kaprinová	9	8,34	Myristolejová
5	5,36	Undekanová	10	8,8	Pentadekanová

Tab. 2. Retenční časy pro methylestery MK ve standardu SUPELCOTM 37 Component FAME Mix (2. část)

Číslo píku	Retenční čas	MK	Číslo píku	Retenční čas	MK
11	9,1	Pentadecenová	19	11,80	Gama-linolenová
12	9,52	Palmitová	20	12,40	Alfa-linolenová
13	9,72	Palmitolejová	21	12,80	Arachová
14	10,20	Heptadekanová	22	13,06	Eikosanová
15	10,39	Heptadecenová	23	13,71	Eikosadienová
16	10,90	Stearová	24	14,13	Eikosatrienová, henei- kosanová
17	11,10	Olejová	25	14,55	Eikosatrienová cis 11, 14, 17
18	11,50	Linolová, linoelajdová	26	14,73	Arachidonová

Stanovení koncentrace kyseliny palmitové metodou kalibrační přímky

Kromě profilu mastných kyselin, tedy procentuálního zastoupení jednotlivých kyselin, byly stanoveny i přesné koncentrace kyseliny palmitové ve všech testovaných vzorcích. Vzhledem k tomu, že vzorky jsou poměrně komplexní a obsahují více než 10 různých mastných kyselin, byla zvolena jedna mastná kyselina, jejíž obsah byl ve vzorcích sledován. Kyselina palmitová byla vybrána vzhledem k jejímu vysokému obsahu v analyzovaných vzorcích.

Pro tuto kyselinu byla tedy sestrojena kalibrační přímka. Tato přímka byla vytvořena proměřením několika různých koncentrací methylesterů kyseliny palmitové. Vzhledem k tomu, že čistý methylester této kyseliny nebyl v laboratořích k dispozici, bylo nutno si jej připravit. Příprava byla prováděna na základě kyseliny katalyzované esterifikace MK. Postup byl shodný s postupem výroby methylesterů všech předcházejících vzorků vyextrahovaného tuku ze smetany. Lišil se pouze tím, že na přípravu nebyl použit tuk, ale pouze čistá

kyselina palmitová. Po dostatečně dlouhé době varu a správné izolaci vytvořených methylesterů byl tento vzorek proměřen plynovou chromatografií, aby bylo zjištěno, zda byl čistý a zda jej bylo možno na sestrojení kalibrační přímky použít.

V tomto případě byl vzorek naředěn, koncentrace byly následující – 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % a 6,25 %. Ředění bylo prováděno na základě zředovací rovnice. Vždy bylo ve správném poměru smícháno potřebné množství 100% roztoku methylesterů kyseliny palmitové s daným množstvím čistého hexanu jako rozpouštědla. Jednotlivé objemy roztoků jsou uvedeny v tabulce 2. Jednotlivé vzorky byly opět proměřeny na plynovém chromatografu vícekrát.

Tab. 3. Množství roztoku methylesteru a hexanu pro roztoky na kalibrační přímku

Výsledná koncentrace [%]	100% roztok methylesteru [ml]	Hexan [ml]
100	2	0
50	1	1
25	0,5	1,5
12,5	0,25	1,75
6,25	0,125	1,875

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tématem práce je lipolytická aktivita bakterií, tedy jejich schopnost štěpit tuky, ve kterých jsou mastné kyseliny vázány. Cílem práce bylo stanovit lipolytickou aktivitu za pomoci metody kultivační a dále ověřit, zda lze lipolytickou aktivitu sledovat pomocí dvojího způsobu přípravy methylesterů mastných kyselin s následným stanovením plynovou chromatografií.

Kultivace na Spirit Blue Agar byla zvolena jako metoda spíše orientační, vzhledem k její nižší citlivosti a spolehlivosti. Na základě této kultivační metody byly však zvoleny mikroorganismy pro další fázi práce - tedy pro stanovení plynovou chromatografií.

Stanovení lipolytické aktivity plynovou chromatografií vychází z předpokladu, že při bazicky katalyzované esterifikaci dochází k esterifikaci vázaných mastných kyselin, zatímco volné mastné kyseliny na methylestery stanovitelné plynovou chromatografií převedeny nejsou. Kyselou katalyzovaná esterifikace naopak umožňuje vznik methylesterů jak z vázaných, tak i z volných mastných kyselin [30, s. 9]. V předkládané práci byly stejné vzorky podrobeny oběma metodám přípravy methylesterů. Analýza plynovou chromatografií by tedy měla umožnit detekovat lipolýzu, během které jsou vázané mastné kyseliny uvolňovány - jejich množství klesá ve prospěch mastných kyselin volných.

V první fázi byla provedena kvalitativní analýza vzorků s cílem zjistit, zda se jednotlivé vzorky smetany nezaočkované a vzorky smetany zaočkované různými mikroorganismy liší z hlediska profilu mastných kyselin a jejich poměrného zastoupení a zda se liší vzorky připravené bazickou a kyselou katalýzou. V další fázi bylo provedeno kvantitativní stanovení kyseliny palmitové v testovaných vzorcích.

4.1 Lipolytická aktivita testovaná kultivačně

Testováním lipolytické aktivity pomocí kultivace mikroorganismů na Spirit Blue Agar bylo prokázáno, že ne všechny studované bakterie byly schopny tuk rozložit. Tato metoda není příliš citlivá, a proto to, že u některých mikroorganismů nebyla lipolytická aktivita prokázána, neznamenal, že tyto bakterie schopnost rozkládat tuk nemají vůbec. Pouze tuto schopnost nebylo možné prokázat za použití této metody.

Jak bylo popsáno v metodice, test na Spirit Blue Agar byl prováděn dvěma způsoby. První způsob byl ten, kdy olivový olej byl přidán přímo do půdy před jejím ztuhnutím. Olej sloužil v médiu jako substrát pro lipolytické enzymy bakterií. Pozitivní výsledek na lipolytickou aktivitu byl prokázán změnou zbarvení agarů. V okamžiku, kdy došlo k rozložení tuku, došlo ke změně barvy půdy na modrou nebo byl agar na pohled transparentní. Tímto způsobem byla lipolytická aktivita prokázána u bakterie *Pseudomonas fluorescens* a *Pseudomonas aeruginosa*. V obou případech došlo k částečnému modrému zbarvení agarů. Tento výsledek byl shodný i s literaturou, která uvádí, že bakterie rodu *Pseudomonas* mají dostatečně velkou lipolytickou aktivitu.

Výsledky tohoto testu navíc mohou být ovlivněny dostupností substrátu pro lipázy, vzhledem k tomu, že je nutné zabudování tukové složky do vodního prostředí. Mohlo by tudíž docházet k oddělení tukové fáze, což pochopitelně může výsledek testu ovlivnit. Z toho důvodu byla provedena i úprava metody a test byl tedy proveden ve dvou verzích.

Druhý způsob provedení, kdy byl olivový olej dávkován v přesně definovaném objemu do děr vytvořených v půdě a mikroorganismy byly přidávány přímo do média, poskytoval podobné výsledky jako první způsob s tím rozdílem, že lipolytická aktivita byla zjištěna u většího počtu mikroorganismů. Byla stanovena, tak jako v prvním případě, u bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a *Pseudomonas fluorescens* a dále u bakterie *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*. U obou bakterií rodu *Pseudomonas* byla lipolytická aktivita zjištěna modrým zbarvením půdy na celé plotně. V případě mikroorganismů *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus* byla tato aktivita dokázána také modrým zbarvením, ale to bylo pouze v okolí jamek, ve kterých byl olivový olej. U zbylých mikroorganismů nebyla lipolytická aktivita kultivací na Spirit blue agaru prokázána.

Ze získaných výsledků kultivačního testu bylo vybráno pět bakterií (*Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*), kterými byly dále zaočkovány vzorky smetany a jejich schopnost rozkládat tuk byla zjišťována i další metodou.

4.2 Test růstu mikroorganismů

Test růstu mikroorganismů byl proveden s cílem zjistit, zda jsou mikroorganismy ve vzorcích smetany schopny růstu a množení a také zjistit, jaká doba inkubace vzorku by byla

optimální pro další práci se vzorkem. Bylo sledováno, po jakou dobu jsou mikroorganismy ve smetaně schopny růstu vzhledem k tomu, že prostředí smetany se vlivem množení kultury mění, dochází k vyčerpání živin a hromadění metabolitů. Vzorky smetany byly zaočkovány inokulem bakterií a po dobu pěti dnů byly v pravidelných intervalech odebírány vzorky, které byly očkované na pevnou půdu. Cílem testu nebylo stanovit přesný počet životaschopných buněk ve vzorku, ale spíše orientačně odhadnout na základě nárůstu, v jaké fázi růstové křivky se kultura nachází.

První den odečtů bylo zjištěno, že mikroorganismy rostou velmi dobře. Na všech miskách byl dobře viditelný souvislý nárůst kultur bakterií. Nebylo možno jednotlivé kolonie spočítat a určit jejich množství v jednotkách CFU/ml. Tento výsledek byl shodný jak pro kultury, které byly kultivovány v termostatu při jejich ideální teplotě, tak i pro kultury kultivované při laboratorní teplotě. Také nebyl pozorován žádný rozdíl mezi vzorky, které obsahovaly jen smetanu, a mezi vzorky, ke kterým byla přidána i glukóza jako další zdroj živin pro bakterie.

U vzorků odebraných druhý den byl již rozdíl mezi jednotlivými druhy bakterií a také podmínkami jejich kultivace. V případě bakterie *Escherichia coli* byl pozorován slabší nárůst kultury, na plotně bylo možné sledovat izolované kolonie. Výsledek byl obdobný pro všechny sledované vzorky s *E. coli*, tedy ve smetaně i ve smetaně s glukózou za obou teplot. U mikroorganismu *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis byl i druhý den růst ve všech vzorcích velmi intenzivní. U bakterie *Staphylococcus aureus* byl nárůst ve srovnání s předcházejícím dnem o něco slabší. Výrazný růst byl zaznamenán ve vzorcích smetany s přidavkem glukózy. U vzorku smetany s MO *Pseudomonas aeruginosa* kultivovaném při optimální teplotě byl pozorován jen mírný růst, ale ve vzorku s přidavkem glukózy byl růst mnohem výraznější. Výrazný růst *Pseudomonas fluorescens* byl druhý den sledován u všech vzorků bez ohledu na podmínky kultivace. Typické pro tento MO bylo zelené fluorescentní zbarvení kolonií na všech miskách. Bakterie *Serratia marcescens* dobře rostla při laboratorní teplotě u vzorků s glukózou i bez glukózy, při kultivaci v termostatu při 37 °C byl růst slabší oproti laboratorní teplotě. Kolonie *S. marcescens* měly růžové až červené zbarvení.

I když se v případě bakterie *Bacillus subtilis* jednalo o stejný druh, který však pocházel z jiného zdroje, zjištěné výsledky nebyly totožné. *B. subtilis* (CCM 4062) rostl pouze u vzorku smetany s přidavkem glukózy při kultivaci v termostatu. *B. subtilis* (CCM 2216) naopak nerostl jen v jednom případě a to ve smetaně při laboratorní teplotě. Bakterie *Bacil-*

lus cereus rostla ve všech vzorcích velmi dobře, růst byl na miskách velmi intenzivní. *Bacillus sphaericus* také rostl u všech testovaných vzorků, ale ve vzájemném porovnání růstu ve smetaně a ve smetaně s glukózou při optimální teplotě růstu byl růst bakterie s přidavkem živin mnohem výraznější.

Po třech dnech kultivace by se dalo říci, že nebyly zjištěny velké rozdíly v růstu bakterií mezi vzorky smetany, ke kterým byla nebo nebyla přidána glukóza. Bakterie *E. coli* nerostla v žádném ze vzorků. Naopak mikroorganismy *Salmonella*, *Bacillus subtilis* (CCM 4062), *Bacillus subtilis* (CCM 2216), *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* a *Pseudomonas aeruginosa* rostly dobře. U všech těchto MO byl pozorován růst kolonií na miskách jak u smetany, u smetany s přidavkem glukózy kultivující se v laboratorních podmínkách, tak i v termostatu při optimální teplotě.

Růst bakterie *Serratia marcescens* byl i po třech dnech inkubace vzorků stejný jako při odečtech výsledků předchozích, tedy po dvou dnech. Růst *Staphylococcus aureus* byl viditelný na všech miskách vzorků, ale v porovnání růstu vzorků smetany bez přidavku a s přidavkem glukózy bylo patrné, že mikroorganizmům ve vzorcích s přidavkem živin se dařilo lépe. Na půdách se nacházelo větší množství kolonií, ale ani v případě vzorků čisté smetany je nebylo možno pro jejich velké množství spočítat. U *Pseudomonas fluorescens* byl i po třech dnech růst na miskách výrazný, kolonie byly opět krásně zeleně fluorescentní. U vzorků skladovaných při laboratorní teplotě rostly tyto bakterie o něco méně než při kultivaci v termostatu.

Další a zároveň poslední hodnocení růstu bakterií proběhlo čtvrtý den po zaočkování. Bylo zjištěno, že bakterie *Escherichia coli* nerostla ani v jednom ze vzorků. Opačně tomu bylo u salmonely, jejíž růst byl viditelný u všech vzorků. Jedná se o bakterii, u které nebyl pozorován žádný rozdíl v růstu a to jak při obou teplotách kultivace, tak i v obou případech složení vzorku. Mikroorganismus *Staphylococcus aureus* byl tak jako *Salmonella* schopný růstu ve všech čtyřech vzorcích smetany. Podobně na tom byly i vzorky zaočkované bakteriemi *Bacillus sphaericus* a *Bacillus subtilis* (CCM 2216). Druhý kmen *B. subtilis* (CCM 4062) nerostl ani v jednom ze vzorků. Což poukazuje na to, že i když se jedná se shodný druh bakterií, tak jejich nároky na růst jsou přesto odlišné. Růst bakterie *Bacillus cereus* byl sice pozorován u všech zaočkovaných vzorků, ale v případě vzorku kultivovaného při třiceti stupních celsia byl růst slabý.

U vzorků smetany obsahující *Pseudomonas aeruginosa* byl také růst patrný ve všech čtyřech vzorcích. Bakterie *Pseudomonas fluorescens* byla po čtyřech dnech kultivace stále schopna růst ve všech vzorcích, ale zaočkovaná smetana kultivovaná při laboratorní teplotě a smetana s glukózou při vyšší teplotě nebyla natolik vyhovující pro *P. fluorescens* jako zbylé dva vzorky, protože množství kolonií vyrostlých na misce bylo nižší. U bakterie *Serratia marcescens* byl zřejmý růst ve všech vzorcích, kromě zaočkované smetany skladované při optimální teplotě růstu. I zde u vyrostlých kolonií bylo viditelné růžové zbarvení.

Při testu bylo prokázáno, že studované mikroorganismy jsou schopny růstu v prostředí smetany, přestože výsledky se u jednotlivých bakterií lišily. Podle zjištěných výsledků růstu jednotlivých testovaných bakterií bylo stanoveno, že vhodné bakterie pro test jejich schopnosti rozkládat tuk na volné mastné kyseliny a parciální acylglyceroly, či až samotný glycerol jsou *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis* (CCM 2216). Stanovená optimální doba pro kultivaci MO ve vzorcích smetany byla určena na 48 hodin. Po delší době kultivace totiž docházelo k menšímu výskytu bakteriálního růstu.

4.3 Plynová chromatografie

Ze vzorků zaočkované i nezačkované smetany bylo odebráno potřebné množství vzorku a byla provedena extrakce tuku, ze kterého byly následně připraveny methylestery dvěma způsoby, jež vychází z normy ISO 12966-2:2011. Takto vyrobené vzorky byly následně proměřeny na plynovém chromatografu, kde bylo posléze hodnoceno zastoupení jednotlivých mastných kyselin v daných vzorcích.

4.3.1 Zastoupení MK v nezačkované smetaně

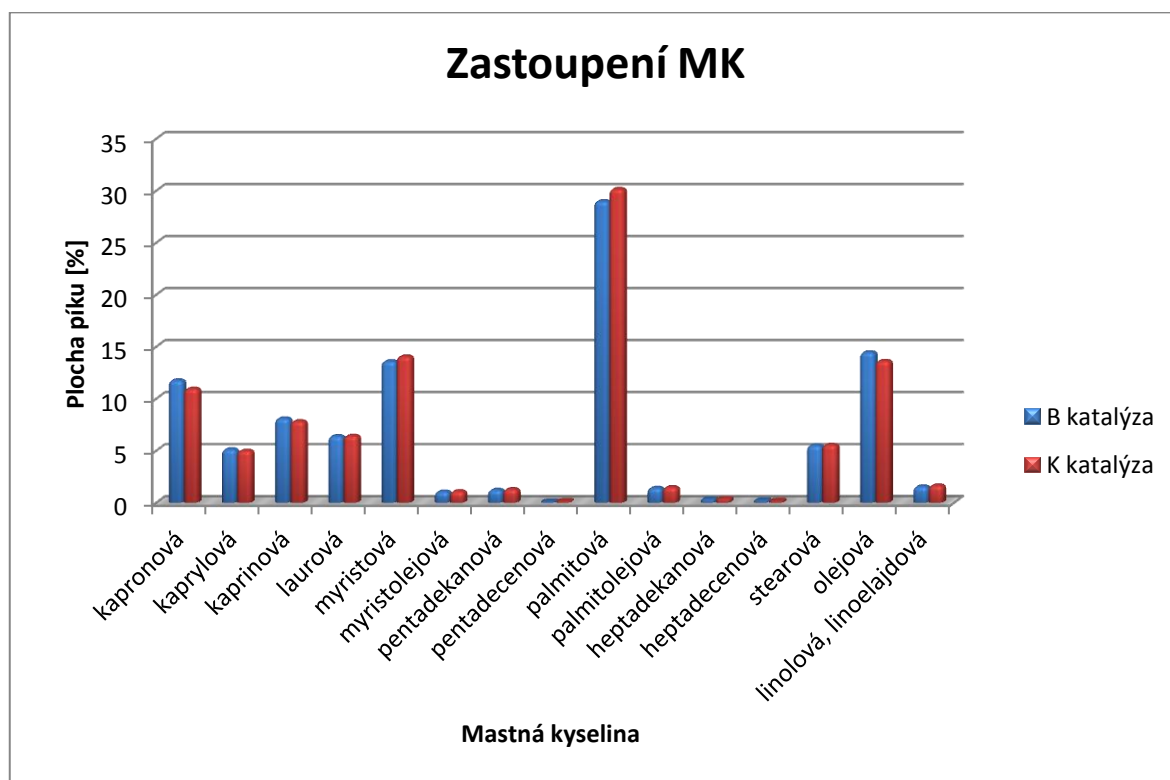
Nejprve byly připraveny methylestery z nezačkované smetany, která představovala profil MK ve smetaně jako ve výchozí surovině, což bylo následně využito ke srovnání se vzorky, které byly zaočkovány některým z testovaných mikroorganismů. Vzorky čisté nezačkované smetany byly podrobeny extrakci tuku a následně oběma metodám přípravy methylesterů - tedy bazicky katalyzované esterifikaci a kyselou katalyzovanou esterifikaci.

Tab. 4. Vzorčky methylesterů nezaočkované smetany - plochy píků

MK	B katalýza		K katalýza	
	Průměr ploch píků [%]	Smodch	Průměr ploch píků [%]	Smodch
Kapronová	11,77	1,68	10,97	0,12
Kaprylová	5,13	0,56	5,00	0,36
Kaprinová	8,10	0,78	7,83	0,33
Laurová	6,40	0,36	6,43	0,12
Myristová	13,60	0,22	14,07	0,29
Myristolejová	1,07	0,09	1,10	0,08
Pentadekanová	1,23	0,04	1,30	0,00
Pentadecenová	0,10	0,00	0,17	0,05
Palmitová	29,00	1,16	30,17	0,33
Palmitolejová	1,43	0,09	1,50	0,08
Heptadekanová	0,33	0,05	0,40	0,00
Heptadecenová	0,23	0,05	0,20	0,00
Stearová	5,50	0,54	5,57	0,33
Olejová	14,47	1,18	13,63	0,17
Linolová, Linoelajdová	1,57	0,29	1,67	0,21

V tabulce 3 jsou uvedeny mastné kyseliny, které byly ve vzorcích identifikovány a jejich poměrné zastoupení vypočtené procentuálně z hodnot ploch jednotlivých píků. Každý vzorek byl analyzován minimálně třikrát a výsledky v tabulce uvádí i vypočtené směrodatné odchylky. V obou vzorcích (získaných bazickou i kyselou katalýzou) byly identifikovány stejné mastné kyseliny. Z tabulky je dále patrné, že v případě bazické katalýzy byly odchylky v rámci opakovaných měření vyšší u mastných kyselin s nízkým počtem uhlíků, což by naznačovalo problematické převádění MK s kratším řetězcem na methylestery.

Pro přehlednější srovnání jsou profily MK získané bazickou a kyselou katalýzou zpracovány i graficky na obrázku 4. V porovnání zastoupení jednotlivých MK u obou vzorků bylo zjištěno, že jejich obsah je srovnatelný. Mezi množstvím jednotlivých mastných kyselin byl tak zanedbatelný rozdíl, že se dalo říci, že v obou vzorcích je stejný obsah MK a to z pohledu jak kvalitativního, tak i kvantitativního. Ve vzorku tuku z nezaočkované smetany by měl být obsah volných MK velice nízký. Mléčný tuk obsahuje více než 98 % triacylglycerolů a pouze asi 0,1 % volných mastných kyselin. [55] Při bazické katalýze jsou esterifikovány pouze vázané MK, při kyselé katalýze jsou vázané i volné MK. Při tak nízkém obsahu volných MK by však mezi výsledky získanými bazickou a kyselou katalýzou neměl být téměř žádný rozdíl. Tento předpoklad byl tedy výsledky získanými v této části experimentální práce potvrzen.



Obr. 4. Zastoupení MK ve vzorcích methylesterů nezaočkované smetany

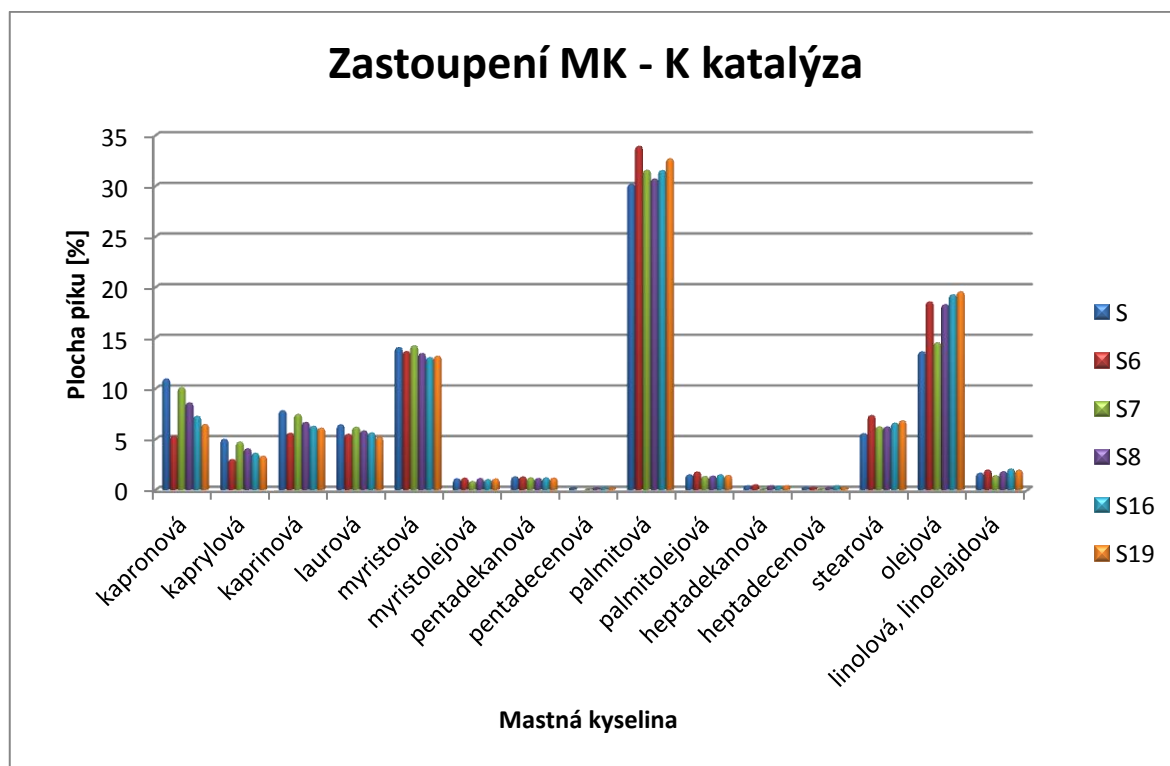
Legenda: (B katalýza – vzorek methylesteru připravený bazickou katalýzou, K katalýza – vzorek methylesteru připravený kyselou katalýzou)

Největší zastoupení bylo ve vzorcích palmitové mastné kyseliny, která tvořila až třetinu veškerého množství. Dále bylo zjištěno, že ve vzorcích je i poměrně velké množství mastné kyseliny myristové a olejové. Jejich procentuální zastoupení bylo srovnatelné. Další MK, která byla více zastoupena, byla MK kapronová. Mastné kyseliny myristolejová, pentadekanová, pentadecenová, palmitolejová, heptadekanová a heptadecenová, které byly detektorem při plynové chromatografii také zachyceny, byly obsaženy v tuku smetany jen minimálně. Jejich procentuální zastoupení bylo velmi malé. Podobné zastoupení MK v mléčném tuku je uváděno i v odborné literatuře. [55], [56]

4.3.2 Zastoupení MK ve vzorcích připravených kyselou katalýzou

Při srovnání procentuálního zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vzorcích nezaočkované smetany bylo patrné, že žádný velký rozdíl mezi vzorky připravenými kyselou a bazickou katalýzou není.

V další fázi experimentální práce bylo sledováno zastoupení mastných kyselin ve vzorcích smetany zaočkované mikroorganismy a výsledky byly srovnány s MK profilem smetany nezaočkované. Ve vzorcích zaočkovaných mikroorganismy, které jsou schopny produkovat lipázy, lze předpokládat, že díky růstu a množení mikroorganismů a produkci lipolytických enzymů, bude docházet k hydrolyze esterových vazeb v přítomném tuku za současného uvolňování volných mastných kyselin. Mezi zaočkovanými vzorky a vzorky čisté smetany by tedy mohl být rozdíl v profilu MK. V následujícím textu jsou nejprve uvedeny výsledky pro vzorky připravené kyselou katalýzou (pro všechny mikroorganismy a čistou smetanu), dále pak pro vzorky připravené bazickou katalýzou a poté je na vybraném mikroorganismu provedeno srovnání výsledků odlišně připravených vzorků.



Obr. 5. Zastoupení MK ve vzorcích methylesterů připravených kyselou katalýzou

Legenda: (S – smetana nezaočkovaná, S6 – smetana zaočkovaná *Serratia marcescens*, S7 – smetana zaočkovaná *Pseudomonas aeruginosa*, S8 – smetana zaočkovaná *Staphylococcus aureus*, S16 – smetana zaočkovaná *Bacillus subtilis* CCM 2216, S19 – smetana zaočkovaná *Pseudomonas fluorescens*)

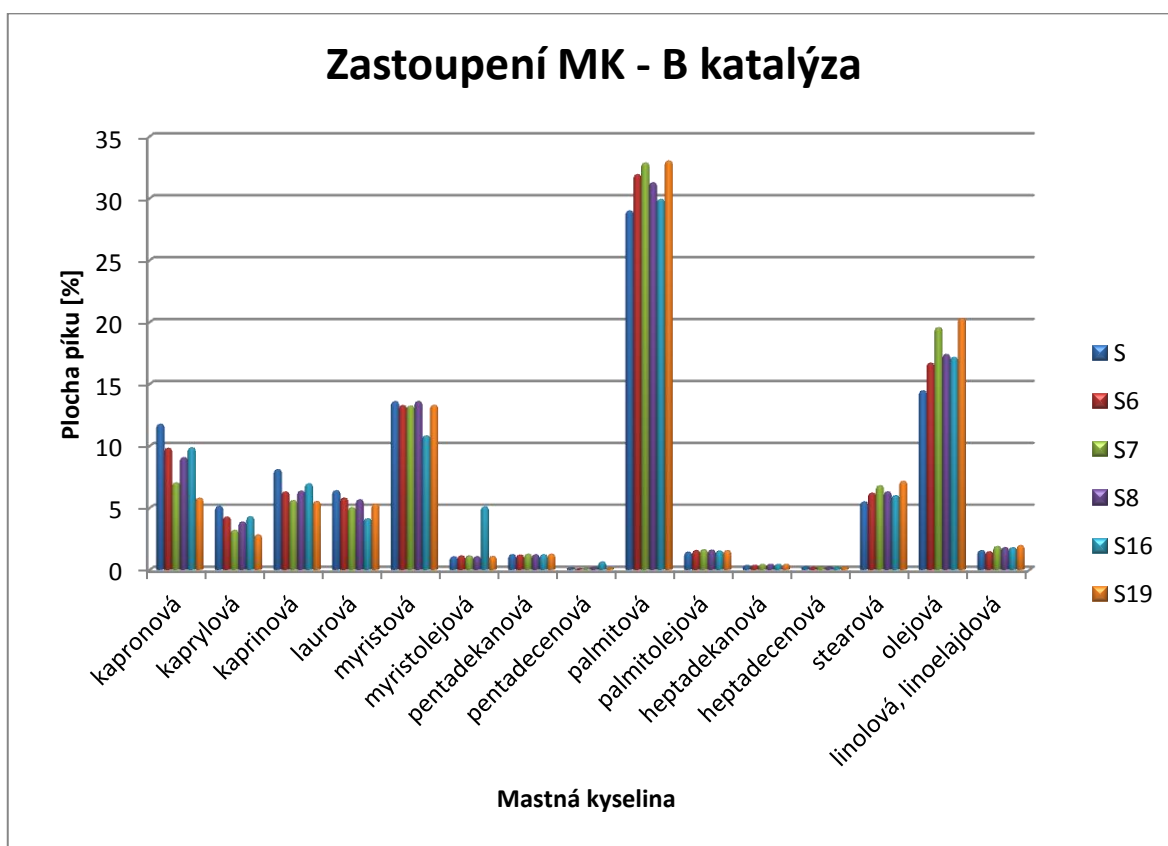
Při porovnání vzorku methylesteru nezaočkované smetany se vzorky zaočkovaných smetan bylo zjištěno, že profil mastných kyselin není výrazně odlišný. U některých kyselin byly zjištěny rozdíly v zastoupení, například u kyseliny kapronové, ale i zde se jedná o rozdíly v jednotkách procent. Vzhledem k tomu, že kyselá katalýza umožňuje esterifikaci volných i vázaných MK, získaný profil MK by neměl být výrazně odlišný ani v případě, že by ve vzorku proběhla lipolýza. Suma mastných kyselin (volná plus vázaná forma) by totiž měla zůstat stejná a mělo by tudíž zůstat přibližně stejné i jejich vzájemné poměrné zastoupení. Tento předpoklad byl získanými výsledky potvrzen.

4.3.3 Zastoupení MK ve vzorcích připravených bazickou katalýzou

Ve srovnání s kyselou katalýzou lze z grafického zpracování výsledků kyselé katalýzy vidět, že rozdílnost v profilech MK jednotlivých vzorků je o něco větší. Přesto však stále nelze hovořit o změnách výrazných.

Při bazické katalýze jsou esterifikovány pouze vázané mastné kyseliny. Lipolytické enzymy mají svou specifitu, mohou přednostně štěpit tuky určitých mastných kyselin nebo štěpit přednostně kyseliny v určitých polohách vazby na glycerol. Je tedy možné, že by se zastoupení vázané formy určité MK mohlo vlivem lipolýzy snížit. Na rozdíl od kyselé katalýzy, zde by k určité změně profilu MK mohlo dojít.

U některých vzorků lze určitý posun v zastoupení pozorovat, i když je třeba opět připomenout, že se jedná o změny velice malé. Například u vzorků zaočkovaných oběma druhy pseudomonád se ve srovnání z nezačkovaným vzorkem snížilo zastoupení MK s krátkým řetězcem a naopak vyšší je zastoupení některých MK s řetězcem dlouhým. To by mohlo naznačovat, že se ve vzorcích zaočkovaných pseudomonádami mění obsah volné formy některých MK, což by mohlo souviset s lipolytickými procesy.



Obr. 6. Zastoupení MK ve vzorcích methylesterů připravených bazickou katalýzou

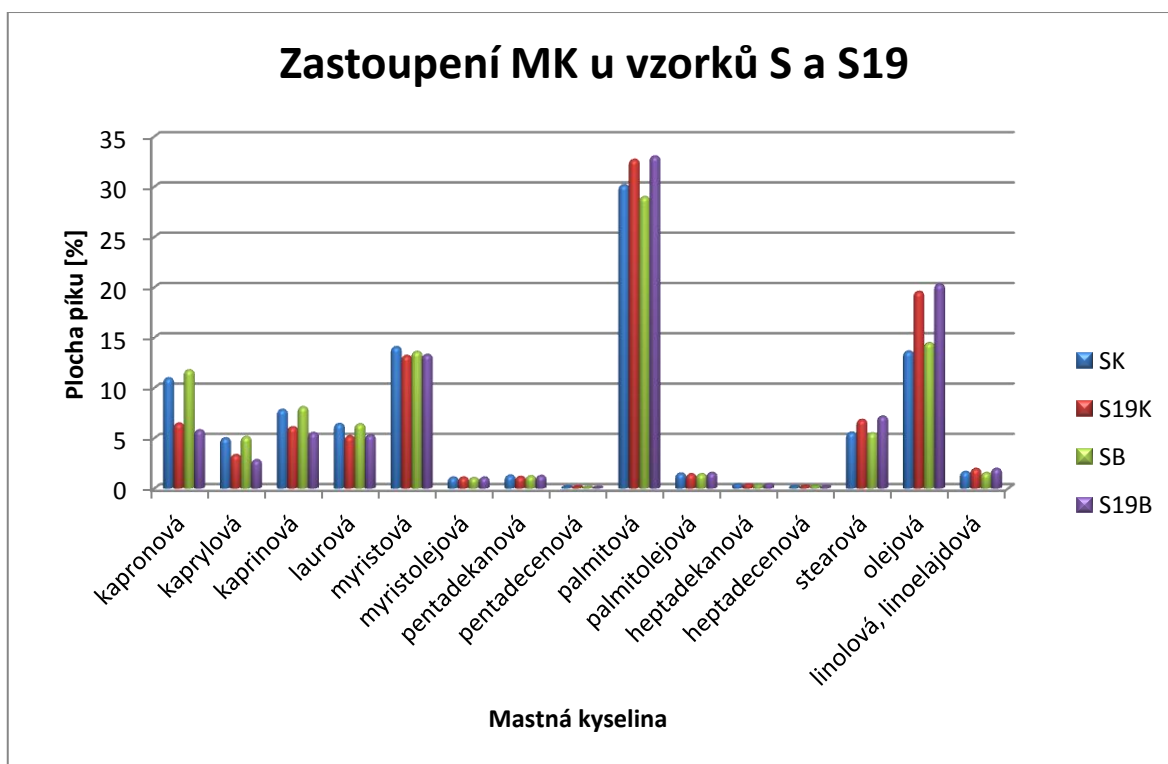
Legenda: (S – smetana nezačkovaná, S6 – smetana zaočkovaná *Serratia marcescens*, S7 – smetana zaočkovaná *Pseudomonas aeruginosa*, S8 – smetana zaočkovaná *Staphylococcus aureus*, S16 – smetana zaočkovaná *Bacillus subtilis* CCM 2216, S19 – smetana zaočkovaná *Pseudomonas fluorescens*)

4.3.4 Zastoupení MK mezi vzorky S a S19

V předchozím textu byly srovnány vzorky zaočkované a nezačkované smetany připravené pouze jednou metodou přípravy - tedy buď kyselou, nebo bazickou katalýzou. V této části bude provedeno srovnání obou metod přípravy. Pro lepší přehlednost byl pro grafické srovnání zvolen pouze jeden z mikroorganismů, konkrétně bakterie *Pseudomonas fluorescens*, u které byl pozorován určitý posun v profilu MK.

Dříve již bylo zmíněno, že profil MK pro nezačkovanou smetanu by neměl být významně odlišný díky velice nízkému obsahu volných mastných kyselin ve vzorku. Z grafu na obrázku 7 je patrné, že profily jsou skutečně téměř shodné. Stejně tak se ale velice málo liší profil vzorků smetany zaočkované pseudomonádou získaných kyselé a bazicky.

Pokud bychom však srovnali výsledky zaočkovaného a nezačkovaného vzorku, lze konstatovat, že zde již jakési rozdíly jsou. Zastoupení MK s krátkým řetězcem je u zaočkovaných vzorků nižší, a to jak při kyselé, tak při bazické katalýze. Zastoupení některých vyšších MK (kyselina palmitová a olejová) je naopak u zaočkovaných vzorků vyšší.



Obr. 7. Zastoupení MK ve vzorcích methylesterů nezačkované smetany a smetany zaočkované bakterií *Pseudomonas fluorescens*

Legenda: (SK – methylester nezaočkované smetany připravené kyselou katalýzou, S19K - methylester smetany zaočkované *Pseudomonas fluorescens* připravené kyselou katalýzou, SB – methylester nezaočkované smetany připravené bazickou katalýzou, S19B - methylester smetany zaočkované *Pseudomonas fluorescens* připravené bazickou katalýzou)

4.4 Kvantitativní analýza

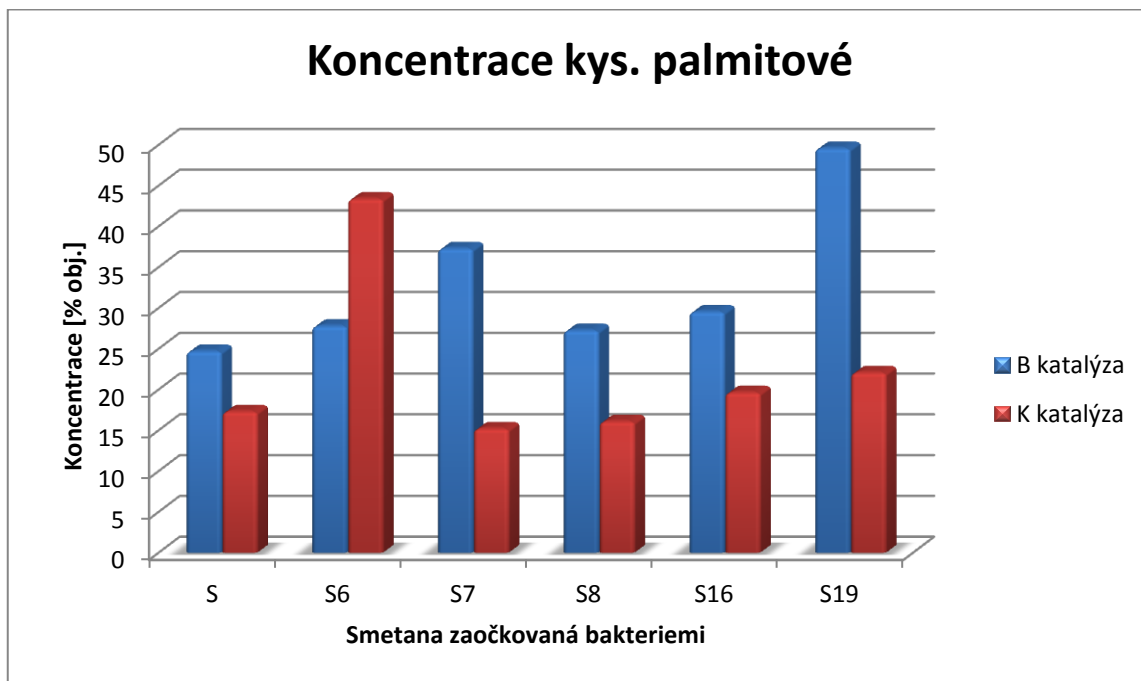
Výsledky kvalitativní analýzy naznačují, že u vzorků smetany zaočkovaných některými mikroorganismy se po kultivaci mírně změnil profil mastných kyselin, zastoupení některých MK bylo nižší. Tyto změny v procentuálním zastoupení by mohly souviset s produkcí lipolytických enzymů a s přeměnou některých mastných kyselin z formy vázané na formu volnou. Pro získání konkrétního závěru o lipolytické aktivitě je však třeba provést analýzu kvantitativní, která vyjádří přímo množství (koncentraci) volné a vázané formy určité kyseliny ve vzorku. Vzhledem k přítomnosti velkého množství kyselin ve vzorku byla zvolena jedna konkrétní kyselina, pro kterou byla provedena kvantitativní analýza metodou kalibrační přímky. Touto kyselinou byla kyselina palmitová, jejíž obsah ve vzorcích smetany je nejvyšší, a u které byly pozorovány rozdíly v zastoupení i při kvalitativní analýze.

Množství volné formy kyseliny palmitové lze vyjádřit jako rozdíl mezi koncentrací zjištěnou ve vzorku získaném kyselou katalýzou (připraví methylesery kyseliny palmitové volné i vázané) a koncentrací ve vzorku připraveném bazickou katalýzou (připraví methylestery kyseliny palmitové pouze ve vázané formě).

Proto, aby bylo zjištěno skutečné množství kyseliny palmitové ve vzorcích, bylo provedeno vyhodnocení na základě kalibrační přímky. Pro získání měřitelného vzorku kyseliny palmitové na GC musel být vyroben její methylester, na jehož přípravu bylo použito 1,003 g čisté kyseliny palmitové. Ten byl připraven na základě metody kyselé katalýzy. Výsledný produkt byl následně proměřen na plynovém chromatografu a jakmile bylo zjištěno, že uvažený methylester byl čistý, tzn. neobsahoval žádné jiné složky, které by byl schopen zachytit detektor GC, tak z něj byly připraveny další čtyři roztoky o různých koncentracích. Koncentrace i jednotlivé pipetované objemy methylesteru a rozpouštědla hexanu jsou uvedeny v metodické části této práce.

Po přípravě jednotlivých vzorků o různých koncentracích kyseliny palmitové, byly tyto vzorky postupně proměřeny. Byla sestrojena kalibrační přímka, do jejíž rovnice byly vloženy hodnoty vzorků smetany a byla vypočítána koncentrace kyseliny palmitové ve všech

vzorcích. Ze získaných výsledků byl sestrojen graf, který byl vyobrazen na Obr. 7. V tomto grafu byly uvedeny výsledky pro vzorky připravené bazickou i kyselou katalýzou.



Obr. 8. Koncentrace kyseliny palmitové ve vzorcích smetany

Legenda: (S – smetana nezaočkovaná, S6 – smetana zaočkovaná *Serratia marcescens*, S7 – smetana zaočkovaná *Pseudomonas aeruginosa*, S8 – smetana zaočkovaná *Staphylococcus aureus*, S16 – smetana zaočkovaná *Bacillus subtilis* CCM 2216, S19 – smetana zaočkovaná *Pseudomonas fluorescens*, B katalýza – vzorek methylesteru připravený bazickou katalýzou, K katalýza – vzorek methylesteru připravený kyselou katalýzou)

Z grafu na obrázku 8 je patrné, že u zaočkovaných vzorků získaných bazickou katalýzou byla zjištěna vyšší koncentrace kyseliny palmitové než u vzorku, který nebyl zaočkován. Východiskem pro tuto práci byla norma EN ISO 12966-2:2012, která uvádí, že při bazické katalýze by neměly být esterifikovány volné MK, ale pouze vázané. Pokud by tomu tak bylo, znamenalo by to, že obsah kyseliny palmitové ve vázané formě se v zaočkovaných vzorcích zvyšuje, což není pravděpodobné.

Ve stejné normě je uvedeno, že při kyselé esterifikaci by mělo dojít k převedení volných i vázaných MK na příslušné methylestery. Pokud by tomu tak bylo, musel by být zjištěný obsah kyseliny palmitové při kyselé katalýze vyšší, než při katalýze bazické. U všech vzorků, s výjimkou vzorku zaočkovaného *S. marcescens*, je ale výsledek opačný.

4.5 Shrnutí a doporučení

Po celkovém zhodnocení dosažených výsledků by se dalo říci, že za těchto podmínek přípravy a analýzy vzorků smetany, není tato metoda optimální pro zjišťování lipolytické aktivity mikroorganismů. A to především proto, že v průběhu testování nebylo dosaženo jednoznačných výsledků a zjištěné hodnoty mnohdy neodpovídaly předpokladům, které je možno najít v literatuře. Metodika práce vychází z normy EN ISO 12966-2:2012, která říká, že příprava methylesterů pomocí bazické esterifikace (v normě se jedná o metodu obecnou – General method) váže pouze mastné kyseliny vázané, ale kyselá esterifikace (z normy vycházející metoda kyselého katalyzovaného transmethylation glyceridů – Acid-catalysed transmethylation of glycerides) na methylestery převádí jak vázané, tak i volné mastné kyseliny. Získané výsledky, především při kvantitativní analýze, jsou však v rozporu s tímto předpokladem.

Následovat by tedy mělo prověření a úprava jednotlivých kroků metody. Zásadní vliv na výsledek může mít už samotný postup extrakce mléčného tuku a bylo by vhodné jej ověřit jak pro vzorky samotné smetany, tak i pro vzorky, které byly zaočkovány mikroorganismy. Ověření tohoto kroku by mělo být založeno na opakované extrakci tuku stejného vzorku, zjištění výtěžnosti a charakterizaci získaného extraktu. Dále by bylo možné sledovat vliv vlastností výchozího vzorku (např. stáří smetany, homogenizace apod.) nebo vliv podmínek skladování vzorku. Podle získaných výsledků by bylo možné metodu upravit, případně použít jiný postup extrakce. Jedna z dalších možností extrakce tuku, může být také pomocí kyseliny chlorovodíkové, která se provádí pomocí Soxhletova přístroje. [53, s. 286]

Taktéž by mohly být zkoušeny i další způsoby přípravy methylesterů, mohlo by se jednat i o další metody popsány v ISO normě, kdy by se obecná metoda nahradila metodou rychlou (Rapid method) nebo metodou využívající k esterifikaci fluorid boritý (Transmethylation using boron trifluoride BF_3 catalyst). V neposlední řadě by bylo vhodné připravené vzorky proměřit i na plynovém chromatografu, který vzorky dávkuje pomocí autosampleru, aby byla vyloučena i lidská chyba při dávkování vzorků, jelikož se jedná o velmi malé množství, u kterého se lidská chyba projeví výrazněji.

Pro důkladnější kontrolu, jakým způsobem metoda funguje, by bylo dobré připravit médium o přesně definovaném složení, které by bylo zpracováno a analyzováno stejným postupem jako smetana, která představuje poměrně hodně složitý systém. Médium by se připravovalo z definovaných přesně známých acylglycerolů a mastných kyselin. V tomto oka-

mžiku by však bylo nutno vyřešit problém, jakým způsobem by byl tuk do média zapracován. S největší pravděpodobností by byla vhodná emulgace, případně příprava ve vodě rozpustných esterů mastných kyselin. Definované médium, ve kterém by probíhala mikrobiální lipolýza, by navíc umožnilo bližší popis lipolytických dějů. Dalo by se například zjistit, v jakých polohách nebo jaké mastné kyseliny daný MO štěpí, tzn., jakou mají jeho enzymy polohovou nebo substrátovou specifitu.

ZÁVĚR

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, zda mají bakterie lipolytickou aktivitu. Tato vlastnost byla sledována u deseti bakterií. Práce byla prováděna nejprve na základě kultivace bakterií na Spirit Blue Agar. Tato metoda byla realizována dvěma postupy, které se lišily způsobem přidání olivového oleje. Dle zjištěných výsledků bylo vybráno pět z původních deseti bakterií, u nichž byla lipolytická aktivita následně sledována i plynovou chromatografií. Jako zdroj tuku sloužila smetana. Nejdříve došlo k jejímu zaočkování mikroorganismy a po dvoudenní kultivaci byl vyextrahován tuk, ze kterého byly připraveny methylestery. Ty byly vyrobeny dvěma odlišnými metodami. Tyto methylestery byly následně analyzovány na plynovém chromatografu, kde bylo sledováno zastoupení mastných kyselin ve vzorcích smetany zaočkovaných různými mikroorganismy.

Lipolytická aktivita by byla prokázána, pokud by byl zjištěn zvýšený obsah volných mastných kyselin.

Lipolytická aktivita byla kultivační metodou prokázána u bakterií *Pseudomonas fluorescens* a *Pseudomonas aeruginosa*. Druhý postup přípravy prokázal lipolytickou aktivitu také u bakterií *P. fluorescens* a *P. aeruginosa*, ale ještě u *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*.

Před samotným testováním lipolytické aktivity pomocí GC byl proveden test růstu mikroorganismů. Byl učiněn proto, aby byla zjištěna optimální doba pro kultivaci vzorků smetany. Ta byla stanovena na dobu 48 hodin. Mikroorganismy použité v další části práce byly schopny růstu a množení v prostředí smetany.

Schopnost bakterií rozkládat tuk nebyla plynovou chromatografií jednoznačně prokázána u žádné z pěti bakterií. GC analýza téměř ve všech vzorcích zaznamenala patnáct druhů mastných kyselin. Bylo zjištěno, že při bazické katalýze může být problematické převedení mastných kyselin na methylestery v případě kyselin s kratším uhlíkovým řetězcem.

Také byla sestrojena kalibrační přímka kyseliny palmitové pro určení koncentrace této kyseliny ve vzorcích. Ze získaných výsledků vyplývá potřeba ověření metodiky a její následná optimalizace. V závěru práce byly navrženy jednotlivé kroky, kterými by se mohl postup stanovení lipolytické aktivity ověřit a upravit. Mělo by dojít k ověření extrakce tuku, vyzkoušení jiných metod pro přípravu methylesterů, případně testovat lipolytickou aktivitu mikroorganismů v přesně definovaném kultivačním médiu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PAVLAČKOVÁ, Jana. *Mikroorganizmy s lipolytickou aktivitou a jejich využití*. Brno, 2008. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Vedoucí práce Jiřina OMELKOVÁ.
- [2] BERAN, Z. a kol. *Ilustrovaná encyklopedie lidské vzdělanosti*. 1. vyd. Praha: Reader's Digest Výběr, 2001, 606 s. ISBN 80-861-9629-1.
- [3] MIŠURCOVÁ, Ladislava. *Základy biochemie*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně Academia centrum, 2010. 159 s. ISBN 978-80-7318-434-6.
- [4] HOLEČEK, Milan. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 286 s. ISBN 8024715627.
- [5] VODRÁŽKA, Z.: *Biochemie*. 2. vyd. Praha: ACADEMIA, 1999. 506 s. ISBN 80-200-0600-1.
- [6] MASÁK, Jan, PELECHOVÁ, Jana, PLACHÝ, Jiří. *Speciální mikrobiální technologie*. 1. vyd. Praha: Ediční středisko VŠCHT, 1992. 301 s. ISBN 80-7080-142-5.
- [7] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie: [určeno pro posl. VŠCHT]*. 2., přeprac. vyd. Praha: Mezinárodní organizace novinářů, 1990, 217 s. ISBN 80-7080-081-X.
- [8] VODRÁŽKA, Zdeněk, KÁŠ, Jan a RAUCH, Pavel. *Enzymologie*. 3. přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 1998, 171 s. ISBN 80-7080-330-4
- [9] ROMANSKÝ, Lukáš. *Mastné kyseliny a možnosti jejich stanovení v rostlinném materiálu pomocí plynové chromatografie*. Brno 2011. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Fakulta přírodovědecká. Vedoucí práce Miroslava BITTOVÁ.
- [20] MURRAY, Robert K., GRANNER, Daryl K., MAYES, Peter A., RODWELL, Victor W. *Harperova biochemie*. 4. čes. vyd. Jinočany: Nakladatelství a vydavatelství H&H, 2002. 872 s. ISBN 80-7319-013-3.
- [31] HALAMA, D. a kol. *Technická mikrobiologie*. 1. vyd. Bratislava: Slovenské Vydavateľstvo Technickej Literatúry, 1963. 332 s. ISBN 63-004-68.
- [42] HARPER, H. A. *Přehled fyziologické chemie*. 1. čes. vyd. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 1977. 640 s. ISBN 08-051-77.
- [53] ZAVADILOVÁ, Šárka. *Antimikrobiální účinky lysozymu*. Zlín, 2006. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. Vedoucí práce Leona BUŇKOVÁ.

- [64] PAVLAČKOVÁ, Jana. *Mikrobiální lipázy a jejich využití*. Brno, 2010. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Vedoucí práce Jiřina OMELKOVÁ.
- [75] HORÁKOVÁ, Dana, NĚMEC, Miroslav. *Laboratorní cvičení z fyziologie bakterií*. Brno, 2003. Masarykova univerzita v Brně. Přírodovědecká fakulta. Katedra mikrobiologie.
- [86] JAEGER, Karl-Erich, RANSAC, Stéphane, DIJKSTRA, Bauke W., COLSAN, Charles, HEUVEL, van Margreet, MISSET, Onno. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*. 1994. r. 15, s. 29 – 63. ISSN 0168-6445/94
- [97] GOJKOVIC, Živan. *Studium přípravků do odlučovačů tuků*. Brno 2009. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Vedoucí práce Jiřina OMELKOVÁ
- [108] JOSEPH, B., RAMTEKE, P. W., THOMAS, G., SHRIVASTAVA, N. Standard Review Cold-active microbial Lipases: a versatile tool for industrial applications. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 2007. r. 2, s. 39-48. ISSN: 1538/2273.
- [119] JAEGER, Karl-Erich, EGGERT, Thorsten. Lipases for biotechnology. *Current Opinion In Biotechnology*. 2002. r. 13, s. 390 – 397. ISSN 0958-1669/02.
- [20] VILLENEUVE, Pierre, MUDERHWA, Jean M., GRAILLE, Jean, HAAS, Michael J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2000. r. 9, s. 113 – 148. ISSN 1381-1177.
- [212] PARRA, Ioreto P., ESPINA, Giannina, DEVIA, Javier, SALAZAR, Oriana, ANDREWS, Barbara, ASENJO, Juan A. Identification of lipase encoding genes from Antarctic seawater bacteria using degenerate primers: Expression of a cold-active lipase with high specific activity. *Enzyme and Microbial Technology*. 2015. r. 68, s. 56 – 61. ISSN 0141-0229.
- [22] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Kvasinky ve výzkumu a praxi*. 1 vyd. Praha: Academia, 1986. 376 s. ISBN 21-023-86
- [23] PLEISS, Jurgen, FISCHER, Marcus, PEIKER, Marcus, THIELE, Claudia, SCHMID, Rolf D. Lipase engineering database. Understanding and exploiting

- semence – structure – fiction relationships. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2000. r. 10, s. 491 – 508. ISSN 1381-1177
- [24] PLANETOVÁ, Tereza. *Charakteristika tuků v potravinách*. Zlín, 2011. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. Vedoucí práce Vladimíra ZEMANOVÁ
- [25] KAŠPÁRKOVÁ, Věra. *Chemie a technologie tuků II*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. s. 138. (učební text)
- [26] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie 2*. 1. vyd. Praha: Československé akademie věd, 1992. 136 s. ISBN 80-200-0441-6.
- [27] CVRRKOVÁ, Jana. *Stanovení lipidů a zastoupení mastných kyselin v obilce ječmene*. Brno 2010. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Vedoucí práce Zdeněk SVOBODA.
- [28] KNOTEK, Jan. *Stanovení volných mastných kyselin v jogurtech v závislosti na skladování*. Zlín 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. Vedoucí práce Markéta ŠÍPALOVÁ
- [29] DEETH, Hilton C, TOUCH, Visalsok. Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. *Australian Journal of Dairy Technology*. 2000. r. 55, č. 3, s. 153 – 168.
- [30] ES ISO 12966–2: 2012 – Rostlinné a živočišné tuky a oleje – Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin – Část 2: Příprava methylesterů mastných kyselin.
- [313] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [32] *Schéma plynového chromatografu* [cit. 28. 2. 2015] https://www.google.cz/search?q=plynov%C3%A1+chromatografie&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ei=aezqVLPdPMHcUrC2gOAC&ved=0CCwQsAQ&biw=1600&bih=738#imgdii=_&imgrc=LvZIVtoS8kti-M%253A%252Fwww.eldiag.cz%252Fcz%252Fget.php%253Fid%253D98%2526s%253DI%253Bhttp%253A%252Fwww.eldiag.cz%252Fcz%252Ftexty%252Fseznameni-s-plynovou-chromatografi%253B386%253B215.

- [33] HODEK, Ondřej. *Stanovení vybraných analytů metodou plynové chromatografie*. Plzeň 2013. Bakalářská práce. Západočeská univerzita v Plzni. Fakulta pedagogická. Vedoucí práce Jan HRDLIČKA.
- [34] BUKÁČKOVÁ, Monika. *Multireziduální metody pro stanovení pesticidů ve vodách*. Brno, 2010. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Vedoucí práce Milada VÁVROVÁ.
- [35] SVOBODA, Z., MIKULÍKOVÁ, R., BĚLÁKOVÁ, S., BENEŠOVÁ, K., NESVADBA, Z. Stanovení obsahu lipidů a zastoupení mastných kyselin v obilkách ječmene a ve sladu. *Kvasný průmysl*. 2009. r. 55, č. 11 – 12, s. 315 – 320.
- [36] *Analýza tuků a kosmetických přípravků*. Zlín, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. (učební text)
- [37] ŠTEFKA, Michal. *Využití chemie v kriminalistickém expertizním zkoumání*. Zlín, 2011. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta aplikované informatiky. Vedoucí práce Stanislav ZELINKA.
- [38] HOLČAPEK, Michal. *Hmotnostní spektrometrie. Experimentální metody strukturního výzkumu*. [cit. 6. 3. 2015] <http://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek_EMSV_MS.pdf>.
- [39] HAVLIŠ, Jan. *Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF*. Vesmír. 1999. r. 78, č. 8, s. 448.
- [40] VLČKOVÁ, Lenka. *Analýza reziduí toxických látek ve vodě metodou „spray and trap“*. Brno, 2009. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Vedoucí práce Jiří KADLČÁK.
- [414] NEZVAL, Jakub. *Nukleární magnetická rezonance*. [cit. 2. 4. 2015] http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCFjAA&url=http%3A%2F%2Fartemis.osu.cz%2Fbiofyzika%2Fstudium%2Fstudmat%2Fmaterial%2FNMR.pptx&ei=j51QVeL1AauqygPDIIcoBA&usq=AFQjCNE4BSAn8a_Kmh83fIQsjUekiThEHw&bvm=bv.92885102,d.bGQ.
- [42] BUŇKOVÁ, Leona. *Přednášky Mikrobiologie potravin a KP*. (2013).
- [43] PODEŠVOVÁ, Tereza. *Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů u vybraných kmenů *Lactococcus lactis**. Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. Vedoucí práce Leona BUŇKOVÁ.

- [44] MEŠKOVÁ, Ivana. *Úloha a význam bakterií mléčného kysání v mlékařství*. Brno, 2013. Bakalářská práce. Mendelova univerzita v Brně. Fakulta agronomická. Vedoucí práce Květoslava ŠUSTOVÁ.
- [45] DUŠKOVÁ, Marta. *Identifikace vybraných genů probatických bakterií mléčného kvašení pomocí PCR*. Brno, 2006. Diplomová práce. Masarykova univerzita. Fakulta přírodovědecká. Vedoucí práce Alena ŠPANOVA
- [46] KAPRÁLEK, František, KOUTECKÁ, Eva. *Obecná mikrobiologie II*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1968. 92 s. ISBN 17-148-68.
- [47] ARPIGNY, Jean Louis, JAEGER, Karl-Erich. *Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties*. Biochemical Society. 1999. r. 25, č. 343, s. 177 – 183.
- [48] HAUERLANDOVÁ, Iva. *Přenášky Kosmetika a kosmetologie*. (2014).
- [49] OTTOVÁ, Vlasta, HAUSLER, Jiří, KUNC, František. *Mikrobiologie pro posluchače studijního oboru technologie vody*. 2. vyd. Praha: Ediční středisko VŠCHT, 1991. 120 s. ISBN 80-7080-136-0.
- [50] MELO, Luis D. R., SILLANKORVA, Sanna, ACKERMANN, Hans-Wolfgang, KROPINSKI, Andrew M., AZEREDO, Joana, CERCA, Nuno. Characterization of Staphylococcus epidermidis phage vB_SepS_SEP9 e a unique member of the Siphoviridae family. *Research in Microbiology*. 2014. r. 165, s. 679 – 685. ISSN 0923-2508.
- [515] GRANILLO, A.R., CANALES, M.G.A., ESPINDOLA, M.E.S., RIVERA, M.A.M., BAUTISTA DE LUCIO, V.M., TOVAR, A.V.R. Antibiosis interaction of Staphylococcus aureus on Aspergillus fumigatus assessed in vitro by mixed biofilm formativ. *BMC Microbiology*. 2015. r. 15, č. 33, s. 1 – 15.
- [52] ŠEBKOVÁ, Hana. *Mikrobiologická jakost mléka a mléčných výrobků*. Brno, 2010. Bakalářská práce. Mendelova univerzita v Brně. Fakulta agronomická. Vedoucí práce Olga CWIKOVÁ.
- [53] PETROVIC, Marinko, KEZIC, Nataša, BOLANČA, Vesna. Optimalization of the GC method for routine analysis of the fatty acid profile in several food samples. *Food Chemistry*. 2010. r. 122. č. 1, s. 285 – 291. ISSN: 0308-8146
- [54] HERNYCHOVÁ, Lenka. *Základy hmotnostní spektrometrie*. Univerzita obrany, Hradec Králové. Fakulta vojenského zdravotnictví.

- [55] NOLLET, Leo M a Fidel TOLDRÁ. *Handbook of dairy foods analysis* [online]. Boca Raton, FL: CRC Press, c2010, xviii, 900 p. [cit. 2015-02-23]. ISBN 14-200-4631-4. Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=UPEGQsTbjQYC&pg=PA432&dq=lipolytic+activity&hl=cs&sa=X&ei=jy7jU4SFMMyO7Qakq4DYCw&ved=0CDUQ6AEwAw#v=onepage&q=lipolytic%20activity&f=false>.
- [56] ZEGARSKA, Zofia. Milk Lipids. [online]. [cit. 2015-03-19]. DOI: 10.1201/9781420031997.ch13. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420031997.ch13>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

MK	Mastná kyselina.
E	Enzym.
S	Substrát.
ES	Komplex enzym-substrát.
P	Produkt.
GDP	Guanosindifosfát.
GTP	Guanosintrifosfát.
GC	Plynová chromatografie.
FFAs	Fatty free acids.
TCD	Tepelně vodivostní detektor.
FID	Ionizační detektor.
AFID	Plamenový ionizační detektor.
TID	Bezplamenný detektor s alkalickým kovem.
ECD	Detektor elektronového záchytu.
PID	Fotoionizační detektor.
AID	Atomový emisní detektor.
FTIR	Detektor založený na Fourierově transformaci infračervené spektroskopie.
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie.
TLC	Tenkvrstevná chromatografie.
NMR	Nukleární magnetická rezonance.
MS	Hmotnostní spektrometrie.
BMK	Bakterie mléčného kvašení.

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu [8].....</i>	14
<i>Obr. 2. Schéma plynového chromatografu [32]</i>	28
<i>Obr. 3. Schéma kapalinového chromatografu [28, s. 33].....</i>	32
<i>Obr. 4. Zastoupení MK ve vzorcích methylesterů nezaočkované smetany</i>	60
<i>Obr. 5. Zastoupení MK ve vzorcích methylesterů připravených kyselou katalýzou</i>	62
<i>Obr. 6. Zastoupení MK ve vzorcích methylesterů připravených bazickou katalýzou</i>	63
<i>Obr. 7. Zastoupení MK ve vzorcích methylesterů nezaočkované smetany a smetany zaočkované bakterií <i>Pseudomonas fluorescens</i></i>	64
<i>Obr. 8. Koncentrace kyseliny palmitové ve vzorcích smetany.....</i>	66

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Retenční časy pro methylestery MK ve standardu SUPELCO™ 37</i>	
<i>Component FAME Mix (1. část).....</i>	<i>51</i>
<i>Tab. 1. Retenční časy pro methylestery MK ve standardu SUPELCO™ 37</i>	
<i>Component FAME Mix (2. část).....</i>	<i>52</i>
<i>Tab. 2. Množství roztoku methyleseru a hexanu pro roztoky na kalibrační přímku.....</i>	<i>53</i>
<i>Tab. 3. Vzorky methylesterů nezaočkované smetany - plochy piků</i>	<i>59</i>