

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Diana DRAKSLER

**VPLIV GOJIŠČA NA SESTAVO DOLGOVERIŽNIH
MAŠČOBNIH KISLIN IN MAŠČOBNIH ALDEHIDOV
PRI VAMPNIH BAKTERIJAH IZ VRST
BUTYRIVIBRIO FIBRISOLVENS IN
*PSEUDOBUTYRIVIBRIO XYLANIVORANS***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Diana DRAKSLER

**VPLIV GOJIŠČA NA SESTAVO DOLGOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN IN
MAŠČOBNIH ALDEHIDOV PRI VAMPNIH BAKTERIJAH IZ VRST
BUTYRIVIBRIO FIBRISOLVENS IN *PSEUDOBUTYRIVIBRIO XYLANIVORANS***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF GROWTH MEDIA ON THE COMPOSITION OF THE
LONG-CHAIN FATTY ACIDS AND FATTY ALDEHYDES AT RUMEN
BACTERIA FROM THE SPECIES *BUTYRIVIBRIO FIBRISOLVENS* AND
*PSEUDOBUTYRIVIBRIO XYLANIVORANS***

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo predstavlja zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega študija mikrobiologije z dne 05.09.2006 ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Romana Marinšek Logar, za somentorico asist. dr. Maša Zorec in za recenzenta prof. dr. Gorazd Avguštin.

Mentorica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Somentorica: asist. dr. Maša Zorec

Recenzent: prof. dr. Gorazd Avguštin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David Stopar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Romana Marinšek Logar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Gorazd Avguštin
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: asist. dr. Maša Zorec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Diana Draksler

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.26+579.222:636.085.1(043)=163.6
KG vampne bakterije / *Butyrivibrio* / *Pseudobutyrvibrio* / gojišče za vampne bakterije / kemotaksonomija / dolgoverižne maščobne kisline / dolgoverižni maščobni aldehidi
AV DRAKSLER, Diana
SA MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica) / ZOREC, Maša (somentorica) / AVGUŠTIN, Gorazd (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2010
IN VPLIV GOJIŠČA NA SESTAVO DOLGOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN IN MAŠČOBNIH ALDEHIDOV PRI VAMPNIH BAKTERIJAH IZ VRST *BUTYRIVIBRIO FIBRISOLVENS* IN *PSEUDOBUTYRIVIBRIO XYLANIVORANS*
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP X, 46 str., 15 pregl., 3 sl., 7 pril., 79 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Profile celičnih dolgoverižnih maščobnih kislin in maščobnih aldehydov (MKA) lahko uporabljamo za identifikacijo in klasifikacijo mikroorganizmov. Raziskava profilov celičnih MKA v gojišču M2 pri sevih iz vrst *Butyrivibrio fibrisolvens* in *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* je dala podobne rezultate, zato sevov v tem gojišču nismo mogli zanesljivo ločiti. Z ustrežno izbiro gojišča bi lahko izboljšali razlikovanje med njimi. Tipska seva *B. fibrisolvens* 3071^T in *P. xylanivorans* Mz5^T smo gojili v gojišču 330, ki vsebuje v primerjavi z gojiščem M2 več kratkoverižnih MK. Bakterijska seva smo gojili še v gojišču, ki je v primerjavi z osnovnim gojiščem 330 vsebovalo manj kratkoverižnih MK, gojišču, ki je v primerjavi s prejšnjim vsebovalo manj razvejanih kratkoverižnih MK in gojišču, ki je v primerjavi z osnovnim gojiščem 330 vsebovalo manj sladkorjev. Zanimalo nas je tudi, ali se sestava celičnih dolgoverižnih MKA pri teh dveh sevih spreminja s fazo rasti. Ugotovili smo, da pri tipskem sevu *B. fibrisolvens* 3071^T sestava kratkoverižnih MK in vsebnost sladkorjev ne vplivata na profil celičnih dolgoverižnih MKA. Pri *P. xylanivorans* Mz5^T pa smo opazili značilne razlike v profilih celičnih MKA gojenih v spremenjenih gojiščih 330 kot tudi med osnovnim gojiščem 330 in gojiščem M2. Na sestavo celičnih dolgoverižnih MKA pri *P. xylanivorans* Mz5^T je vplivala vsebnost kratkoverižnih MK v gojišču. Odvisnosti sestave celičnih MKA od faze rasti pri obeh sevih nismo ugotovili. Analiza nekaterih drugih sevov iz teh dveh vrst v gojišču 330 nam je pokazala, da so sevi v primerjavi z gojiščem M2 podobno spremenili sestavo MKA kot tipski sev. Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da bi seve iz vrst *B. fibrisolvens* in *P. xylanivorans* lažje ločili v gojišču z večjo vsebnostjo kratkoverižnih MK, na katero bi se odzvali le sevi iz vrste *P. xylanivorans* s povečanim deležem razvejanih MKA. To bi omogočilo njihovo natančno razlikovanje in identifikacijo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.26+579.222:636.085.1(043)=163.6
CX rumen bacteria / *Butyrivibrio* / *Pseudobutyrvibrio* / rumen bacteria medium / chemotaxonomy / long-chain fatty acids / long-chain fatty aldehydes
AU DRAKSLER, Diana
AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor) / ZOREC, Maša (co-advisor) / AVGUŠTIN, Gorazd (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2010
TI THE INFLUENCE OF GROWTH MEDIA ON THE COMPOSITION OF THE LONG-CHAIN FATTY ACIDS AND FATTY ALDEHYDES AT RUMEN BACTERIA FROM THE SPECIES *BUTYRIVIBRIO FIBRISOLVENS* AND *PSEUDOBUTYRIVIBRIO XYLANIVORANS*
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 46 p., 15 tab., 3 fig., 7 ann., 79 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Profiles of the cellular long-chain fatty acids and fatty aldehydes can be used for identification and classification of microorganisms. The cellular profiles of fatty acids and fatty aldehydes in the growth medium M2 for the species *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* were similar, therefore they cannot be unambiguously differentiated. The appropriate selection of growth media can substantially improve classification power of the fatty acids profiles. The strains *B. fibrisolvens* 3071^T and *P. xylanivorans* Mz5^T were cultivated in the growth medium 330, which contains more short-chain fatty acids than growth medium M2. Three additional modifications of growth medium 330 were used, that is, (i) medium containing less short-chain fatty acids, (ii) one containing less branched short-chain fatty acids and (iii) medium with lower content of sugars. The influence of growth phase on cellular fatty acid composition was studied as well. It was found that the presence of sugars and short-chain fatty acids in the growth media has no significant influence on cellular fatty acid and fatty aldehyde profiles of the strain *B. fibrisolvens* 3071^T. On the other hand a strong relationship between short-chain fatty acid content in the growth media and cellular fatty acid and aldehydes profiles was observed for the strain *P. xylanivorans* Mz5^T. The growth phase has no influence on the cellular fatty acid or aldehyde profiles for both species. Analyses of additional strains showed similar results than previously described strains. Based on above mentioned results we can conclude that the growth media with higher short-chain fatty acid content is more suitable for the differentiation between *B. fibrisolvens* and *P. xylanivorans*. Only the later species increases the content of branched fatty acid and fatty aldehyde in the cellular profiles.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	str. III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VII
	KAZALO SLIK	VIII
	KAZALO PRILOG	VIII
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1	UVOD	1
1.1	NAMEN DELA IN HIPOTEZE	1
2	PREGLED OBJAV	2
2.1	MAŠČOBNE KISLINE	2
2.1.1	Maščobne kisline in maščobni aldehidi pri bakterijah	2
2.1.2	Struktura in delitev maščobnih kislin in maščobnih aldehydov	3
2.1.3	Nomenklatura maščobnih kislin in maščobnih aldehydov	4
2.1.4	Analiza dolgoverižnih maščobnih kislin in maščobnih aldehydov v kemotaksonomiji	5
2.2	VAMPNE BAKTERIJE IZ RODOV <i>BUTYRIVIBRIO</i> IN <i>PSEUDOBUTYRIVIBRIO</i>	5
2.2.1	Rod <i>Butyrivibrio</i>	5
2.2.2	Rod <i>Pseudobutyrvibrio</i>	6
2.3	VPLIV RAZMER RASTI NA SESTAVO MAŠČOBNIH KISLIN PRI MIKROORGANIZMIH	6
2.3.1	Vpliv temperature	6
2.3.2	Vpliv pH	7
2.3.3	Vpliv faze rasti	8
2.4	VPLIV SESTAVIN GOJIŠČA NA SESTAVO MAŠČOBNIH KISLIN PRI MIKROORGANIZMIH	9
2.4.1	Vpliv maščobnih kislin v gojišču	9
2.4.1.1	Vpliv kratkoverižnih maščobnih kislin v gojišču na vsebnost nerazvejanih maščobnih kislin	9
2.4.1.2	Vpliv razvejanih kratkoverižnih maščobnih kislin in aminokislin v gojišču na vsebnost razvejanih maščobnih kislin	10
2.4.2	Vpliv sladkorjev (ogljikovih hidratov)	11
3	MATERIALI IN METODE	13
3.1	KEMIKALIJE	13
3.2	BAKTERIJSKI SEVI	14
3.3	GOJENJE ANAEROBNIH BAKTERIJ	15
3.3.1	Gojišča	15
3.3.1.1	Gojišče 330 za vampne bakterije	15
3.3.1.2	Gojišče 330A (manj kratkoverižnih MK)	15

3.3.1.3	Gojišče 330B (manj razvejanih kratkoverižnih MK)	15
3.3.1.4	Gojišče 330C (manj sladkorjev)	15
3.3.2	Tehnike gojenja in shranjevanje anaerobnih bakterij	15
3.4	PRIPRAVA VZORCEV	16
3.5	ANALIZA DOLGOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN IN MAŠČOBNIH ALDEHIDOV	16
3.5.1	Priprava metilnih estrov maščobnih kislin in maščobnih aldehydov	16
3.5.2	Analiza FAME in DMA	16
3.5.3	Identifikacija FAME in DMA s faktorji ekvivalentne dolžine verige (ECL)	17
3.5.4	Analiza in prikaz rezultatov FAME in DMA	18
4	REZULTATI	19
4.1	VPLIV VRSTE GOJIŠČA NA SESTAVO MAŠČOBNIH KISLIN IN MAŠČOBNIH ALDEHIDOV	20
4.1.1	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> 3071 ^T	20
4.1.2	<i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> Mz5 ^T	22
4.2	VPLIV FAZE RASTI NA SESTAVO MAŠČOBNIH KISLIN IN MAŠČOBNIH ALDEHIDOV	24
4.2.1	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> 3071 ^T	24
4.2.2	<i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> Mz5 ^T	26
4.3	SESTAVA MAŠČOBNIH KISLIN IN MAŠČOBNIH ALDEHIDOV PRI SEVIH IZ VRST <i>B. FIBRISOLVENS</i> IN <i>P. XYLANIVORANS</i>	27
4.3.1	Sestava maščobnih kislin in maščobnih aldehydov pri sevih iz vrste <i>B. fibrisolvens</i>	27
4.3.2	Sestava maščobnih kislin in maščobnih aldehydov pri sevih iz vrste <i>P. xylanivorans</i>	29
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	33
6	POVZETEK	38
7	VIRI	40
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Seznam tipskih sevov	14
Preglednica 2: Seznam sevov iz vrste <i>P. xylanivorans</i>	14
Preglednica 3: Seznam sevov iz vrste <i>B. fibrisolvens</i>	14
Preglednica 4: Delež (% celotne površine) posameznih MKA pri sevu <i>B. fibrisolvens</i> 3071 ^T po rasti v gojiščih 330, 330A, 330B in 330C	21
Preglednica 5: Skupni deleži (% celotne površine) MK, MA, nerazvejanih nasičenih, nerazvejanih nasičenih s sodim in lihim številom C atomov, razvejanih, izo in anteizo razvejanih in nenasičenih MKA pri sevu <i>B. fibrisolvens</i> 3071 ^T po rasti v gojiščih 330, 330A, 330B in 330C	22
Preglednica 6: Delež (% celotne površine) posameznih MKA pri sevu <i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T po rasti v gojiščih 330, 330A, 330B in 330C	23
Preglednica 7: Skupni deleži (% celotne površine) MK, MA, nerazvejanih nasičenih, nerazvejanih nasičenih s sodim in lihim številom C atomov, razvejanih, izo in anteizo razvejanih in nenasičenih MKA pri sevu <i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T po rasti v gojiščih 330, 330A, 330B in 330C	24
Preglednica 8: Delež (% celotne površine) posameznih MKA pri sevu <i>B. fibrisolvens</i> 3071 ^T po inkubaciji 12, 24 ali 48 ur v gojišču 330	25
Preglednica 9: Skupni deleži (% celotne površine) MK, MA, nerazvejanih nasičenih, nerazvejanih nasičenih s sodim in lihim številom C atomov, razvejanih, izo in anteizo razvejanih in nenasičenih MKA pri sevu <i>B. fibrisolvens</i> 3071 ^T po inkubaciji 12, 24 ali 48 ur v gojišču 330	25
Preglednica 10: Delež (% celotne površine) posameznih MKA pri sevu <i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T po inkubaciji 12, 24 ali 48 ur v gojišču 330	26
Preglednica 11: Skupni deleži (% celotne površine) MK, MA, nerazvejanih nasičenih, nerazvejanih nasičenih s sodim in lihim številom C atomov, razvejanih, izo in anteizo razvejanih in nenasičenih MKA pri sevu <i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T po inkubaciji 12, 24 ali 48 ur v gojišču 330	27
Preglednica 12: Delež (% celotne površine) posameznih MKA pri sevih iz vrste <i>B. fibrisolvens</i> po rasti v gojišču 330	28
Preglednica 13: Skupni deleži (% celotne površine) MK, MA, nerazvejanih nasičenih, nerazvejanih nasičenih s sodim in lihim številom C atomov, razvejanih, izo in anteizo razvejanih in nenasičenih MKA pri sevih iz vrste <i>B. fibrisolvens</i> po rasti v gojišču 330	29
Preglednica 14: Delež (% celotne površine) posameznih MKA pri sevih iz vrste <i>P. xylanivorans</i> po rasti v gojišču 330	30
Preglednica 15: Skupni deleži (% celotne površine) MK, MA, nerazvejanih nasičenih, nerazvejanih nasičenih s sodim in lihim številom C atomov, razvejanih, izo in anteizo razvejanih in nenasičenih MKA pri sevih iz vrste <i>P. xylanivorans</i> po rasti v gojišču 330	32

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Kemijske strukture nasičene MK, cis in trans nenasičene MK, izo in anteizo razvejane MK, hidroksi MK in MK s ciklopropanskim obročem (Denich in sod., 2003)	4
Slika 2: Primer kromatograma celičnih MKA pri <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> 3071 ^T po rasti v gojišču 330	20
Slika 3: Primer kromatograma celičnih MKA pri <i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> Mz5 ^T po rasti v gojišču 330	22

KAZALO PRILOG

- Priloga A1: Primer kromatograma celičnih MKA pri *Butyrivibrio hungatei* JK615^T po rasti v gojišču 330
- Priloga A2: Delež (% celotne površine) posameznih MKA pri sevu *B. hungatei* JK615^T po rasti v gojiščih 330, 330A, 330B in 330C
- Priloga A3: Skupni deleži (% celotne površine) MK, MA, nerazvejanih nasičenih, nerazvejanih nasičenih s sodim in lihim številom C atomov, razvejanih, izo in anteizo razvejanih in nenasičenih MKA pri sevu *B. hungatei* JK615^T po rasti v gojiščih 330, 330A, 330B in 330C
- Priloga A4: Primer kromatograma celičnih MKA pri *Pseudobutyrvibrio ruminis* 9787^T po rasti v gojišču 330
- Priloga A5: Delež (% celotne površine) posameznih MKA pri sevu *P. ruminis* 9787^T po rasti v gojiščih 330, 330A, 330B in 330C
- Priloga A6: Skupni deleži (% celotne površine) MK, MA, nerazvejanih nasičenih, nerazvejanih nasičenih s sodim in lihim številom C atomov, razvejanih, izo in anteizo razvejanih in nenasičenih MKA pri sevu *P. ruminis* 9787^T po rasti v gojiščih 330, 330A, 330B in 330C
- Priloga B: Seznam v raziskavi omenjenih MKA s sistematskim in trivialnim poimenovanjem, okrajšavami ter faktorji ECL

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATCC	Ameriška zbirka mikrobnih kultur (American Type Culture Collection)
BAME	standardna kalibracijska mešanica bakterijskih FAME v metil-kaproatu (Bacterial Acid Methyl Ester)
c	cis oblika dvojne vezi v MKA
DMA	dimetilacetal(-i), metilirana oblika maščobnih aldehydov
DSM	Nemška zbirka mikrobnih in celičnih kultur (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)
ECL	faktor ekvivalentne dolžine verige (Equivalent Chain Length)
FAME	metilni estri maščobnih kislin (Fatty Acid Methyl Esters)
FID	plamensko-ionizacijski detektor (Flame-Ionization Detector)
GC	plinska kromatografija (Gas Chromatography)
MA	maščobni aldehyd(-i)
mešanica VFA	mešanica kratkoverižnih maščobnih kislin
MIDI	standardna kalibracijska mešanica FAME v heksanu
MK	maščobna(-e) kislina(-e)
MKA	maščobne kisline in maščobni aldehydi
NCFB	Narodna zbirka prehranskih bakterij (National Collection of Food Bacteria)
Rt	zadrževalni čas
t	trans oblika dvojne vezi v MKA

1 UVOD

Maščobne kisline (MK) so ene od najbolj pomembnih gradnikov celice. Večina dolgoverižnih MK je pri bakterijah vezanih v membranskih lipidih. Najdemo pa jih tudi v lipopolisaharidih (LPS) po Gramu negativnih bakterij in lipoteihojski kislini po Gramu pozitivnih bakterij. Nekaj pa jih je prisotnih tudi v nevezani, prosti obliki. Veliko obligatno anaerobnih bakterij pa, poleg MK, vsebuje tudi pomemben delež maščobnih aldehydov (MA). Ti se sprostijo po kisli hidrolizi iz membranskih lipidov plazmalogenov.

Analiza sestave dolgoverižnih maščobnih kislin in maščobnih aldehydov (MKA) je zelo uporabna kemotaksonomska metoda v mikrobiologiji. Posamezne vrste in pogosto celo sevi bakterij imajo značilne profile MKA, kar omogoča njihovo razlikovanje. Vendar pa se sestava celičnih MKA lahko do določene mere spreminja glede na razmere gojenja. Razmere rasti, kot so sestava gojišča, faza rasti mikrobnih celic, temperatura inkubacije, pri kateri gojimo bakterije, pH, kemikalije in številni drugi, lahko vplivajo na sestavo MKA. Spremembe v razmerah gojenja se lahko kažejo s kvantitativnimi in kvalitativnimi spremembami v sestavi MKA mikroorganizmov.

V diplomski nalogi smo želeli z analizo sestave dolgoverižnih MKA ugotoviti vpliv sestave gojišča in faze rasti na sestavo MKA sevov iz skupine *Butyrivibrio-Pseudobutyrvibrio*.

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, ali na sestavo dolgoverižnih MKA bakterijskih sevov vavnega izvora iz skupine *Butyrivibrio-Pseudobutyrvibrio* vpliva sestava gojišča in faza rasti. Želeli smo ugotoviti, kako sevi spremenijo sestavo dolgoverižnih MKA glede na gojišče in ali prihaja med vrstami do razlik.

V diplomski nalogi smo želeli preveriti sledečo hipotezo: spremenjena količina kratkoverižnih MK (predvsem razvejanih) v gojišču vpliva na skupni delež celičnih razvejanih dolgoverižnih MKA le pri sevih iz vrste *P. xylanivorans*. Pri tipskem sevu *B. fibrisolvens* so namreč predhodno ugotovili, da v gojišču z večjo količino razvejanih kratkoverižnih MK ni prišlo do spremembe sestave celičnih dolgoverižnih MKA (Moore in sod., 1994).

Z nalogo bi lahko določili najbolj primerno gojišče za ločevanje zelo podobnih vrst in olajšali kemotaksonomsko analizo.

2 PREGLED OBJAV

Bakterije so sestavni del okolja in reagirajo na spremembe v okolju s spremembo lastnih fizioloških funkcij. Membrane predstavljajo mesto prvotnega stika celic z okoljem in kažejo tako lastnosti intracelularnih sestavin kot ekstracelularnih razmer okolja, ločujejo notranjost celice od zunanjega okolja in igrajo pomembno vlogo v transportu snovi v in iz celic (Mrozik in sod., 2004). Membrane mikroorganizmov so zaradi stika z zunanjim okoljem občutljive na fizikalne in kemijske spremembe okolja (temperatura, pritisk, pH, hranila, ioni in drugi). Spremembe v sestavi membranskih lipidov igrajo pomembno vlogo v prilagoditvi različnih organizmov na specifična okolja in omogočajo mikroorganizmom ohraniti membranske in celične funkcije pri soočanju z okoljskimi spremembami.

V mnogih membranah 50 % mase predstavljajo lipidi. Membranski lipidi vsebujejo nasičene in nenasičene MK. Acilne verige imajo različne strukture, lahko so razvejane (izo, anteizo, hidroksi MK) in imajo v svoji strukturi ciklopropanske obročje (Mrozik in sod., 2004). Lipidi so znani kot del učinkovitega prilagoditvenega mehanizma na spremembe v zunajceličnem okolju, saj se mikroorganizmi lahko prilagodijo spremembam v okolju s spreminjanjem njihove sestave. Fluidnost je eden od najbolj pomembnih parametrov citoplazemske membrane, ki omogoča vzdrževanje homeostaze celice. Glavni način, s katerim bakterije ohranjajo idealno fluidnost njihovih membran, je s spreminjanjem njihove sestave MK. Regulacija membranske fluidnosti je mogoča s spremembo razmerja nasičenih proti nenasičenim MK, cis proti trans nenasičenim MK, razvejanim proti nerazvejanim strukturam, spremembo tipa razvejanih MK in dolžino acilnih verig (Mrozik in sod., 2004). Vendar pa se pri vseh živih organizmih v odzivu na prilagoditve okolju fluidnost lahko spremeni le v relativno majhnem obsegu. Ta obseg je genetsko določen in je specifičen za vsak mikroorganizem (Sajbidor, 1997).

2.1 MAŠČOBNE KISLINE

MK v naravi le redko najdemo v prosti obliki, ampak so sestavni del bolj kompleksnih molekul, lipidov. Glavni vir MK v mikrobnih celicah tako predstavljajo lipidi. V bakterijskih celicah je večina MK vezanih v celičnih membranah kot acilna sestavina fosfolipidov. Najdemo pa jih tudi v lipidu A v lipopolisaharidih (LPS) pri po Gramu negativnih bakterijah in lipoteihojski kislini pri po Gramu pozitivnih bakterijah. (Welch, 1991). Poleg MK večina striktno anaerobnih bakterij vsebuje tudi MA, ki se sprostijo po kisli hidrolizi iz posebnih membranskih lipidov plazmalogenov.

2.1.1 Maščobne kisline in maščobni aldehidi pri bakterijah

Večina bakterij sintetizira MK z dolžino verig od 10 do 19 C atomov, prevladujoče pa so MK s 16 ali 18 C atomi. Bakterije vsebujejo nekatere celične MK, ki so edinstvene in jih ne najdemo v evkariontskih celicah. Razvejane in ciklopropanske MK so značilne za številne bakterije. Najdemo jih tudi pri živalih, ne pa pri glivah in ljudeh. Ciklopropanske MK so našli tudi pri nekaterih praživalih (Christie, 2009). Večkrat nenasičene MK, ki jih pogosto najdemo pri višjih organizmih, pa so pri bakterijah redke (Voet in Voet, 2004). Po

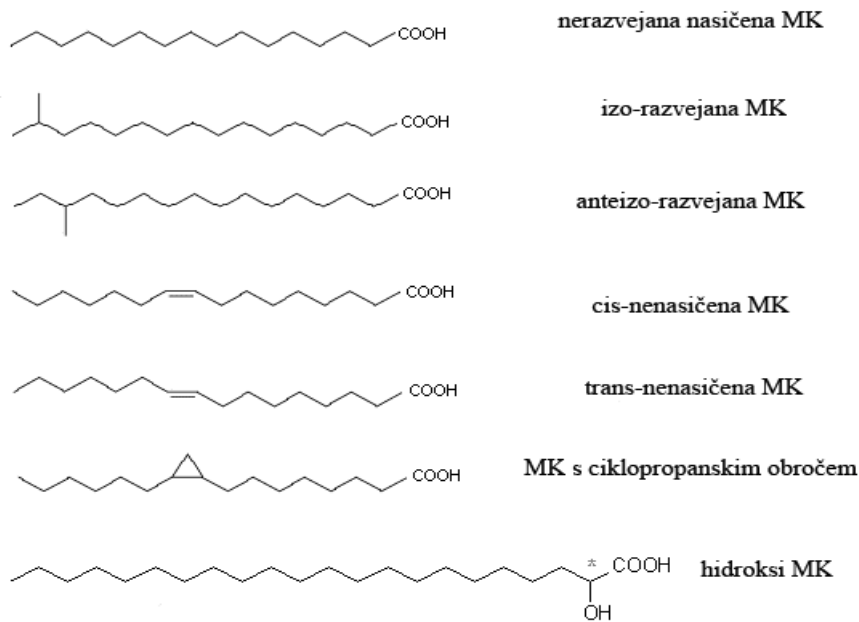
Gramu negativne bakterije imajo običajno večji delež nasičenih in enkrat nenasičenih celičnih MK s sodim številom C atomov kot po Gramu pozitivne bakterije. Poleg lipidov in MK, značilnih za druge bakterije, mnogi anaerobi vsebujejo lipide, imenovane plazmalogeni. To so analogi fosfolipidov, kjer imajo MK namesto običajne estrske vezi z glicerolom etrsko vez. Derivati, ki nastanejo namesto tipičnih metil estrov, so dimetilacetali (DMA) (Welch, 1991).

2.1.2 Struktura in delitev maščobnih kislin in maščobnih aldehydov

MK so karboksilne kisline, ki imajo karboksilno skupino (COOH) na polarnem delu molekule in ogljikovodikovo verigo na nepolarnem repu in so zato amfipatične molekule, saj je karboksilna skupina hidrofilna, ogljikovodikov rep pa hidrofoben (Campbell, 1999).

Za natančen opis sestave molekule MK moramo podati dolžino ogljikove verige (število ogljikovih atomov), število dvojnih vezi in točen položaj teh dvojnih vezi. Dolžine verig MK segajo od 2 do 80 C atomov, najbolj pogosto pa imajo v verigi od 12 do 24 ogljikovih atomov. Glede na število C atomov jih delimo na kratkoverižne, ki imajo v verigi od 2 do 6 C atomov, srednjeverižne, ki imajo od 8 do 10 C atomov in dolgoverižne, ki imajo od 12 do 24 C atomov (Leray, 2009). Glede na vrsto vezi pa MK delimo na nasičene in nenasičene MK. Če ima MK v verigi samo enojne vezi med C atomi, je nasičena, če pa ima v verigi eno ali več dvojnih vezi, je nenasičena (Campbell, 1999). Nenasičene MK pa delimo glede na število dvojnih vezi na enkrat nenasičene (mononenasičene), te imajo v verigi samo eno dvojno vez in večkrat nenasičene (polinenasičene), ki imajo v verigi dve ali več dvojnih vezi (Leray, 2009). Glede na geometrijsko konfiguracijo pa nenasičene MK delimo na cis in trans MK.

Med nerazvejanimi nasičenimi MK so v naravi najbolj razširjene tiste s 14, 16 in 18 C atomi. Nenasičene MK, ki jih najdemo pri bakterijah, so večinoma enkrat nenasičene in imajo sodo število C atomov. Dvojna vez je lahko na različnih položajih in v cis ali trans konfiguraciji, vendar je v trans konfiguraciji redkejša. Redko pa so večkrat nenasičene. Razvejane MK imajo običajno nasičeno verigo in eno metilno skupino. Izo razvejane MK imajo metilno skupino na predzadnjem C atomu (drugem C atomu z metilnega konca), anteizo pa na predpredzadnjem (na tretjem C atomu od metilnega konca). Ciklopropanske MK imajo v verigi ciklopropanski obroč in so sintetizirane direktno iz nenasičenih MK s postsintetsko modifikacijo cis dvojne vezi (Grogan in Cronan, 1997). Pri hidroksi MK je alifatska veriga običajno nerazvejana nasičena, na drugem ali tretjem C atomu pa imajo vezano hidroksi (-OH) skupino (Christie, 2003). Večina striktno anaerobnih bakterij pa vsebuje tudi posebne membranske fosfolipide plazmalogene, iz katerih se po kisli hidrolizi sprostijo MA.



Slika 1: Kemijske strukture nasičene MK, cis in trans nenasičene MK, izo in anteizo razvejane MK, hidroksi MK in MK s ciklopropanskim obročem (Denich in sod., 2003)

2.1.3 Nomenklatura maščobnih kislin in maščobnih aldehydov

MK lahko poimenujemo s sistematičnimi kemijskimi imeni, trivialnimi imeni ali z numeričnimi okrajšavami. Po strogih pravilih nomenklature mora kemijsko ime jasno identificirati in opisati kemijsko strukturo. To dosežemo z uporabo sistematične nomenklature, ki poda natančno strukturo MK in poimenuje MK izključno na osnovi števila C atomov in števila in položaja nenasičenih vezi glede na karboksilno skupino. V praksi pa velikokrat uporabljamo trivialno nomenklaturu, ki npr. poimenuje MK glede na vir, iz katerega izhajajo, vendar pa nam takšno poimenovanje ne pove ničesar o strukturi MK. Pri numeričnih okrajšavah pa za opis položaja dvojnih vezi in stranskih verig lahko uporabimo kemijsko ali Δ (delta)-poimenovanje in biokemijsko ali n-poimenovanje. Pri Δ -poimenovanju številčimo C atome od karboksilnega konca molekule. Pri n-poimenovanju pa v nasprotni smeri, od metilnega proti karboksilnemu koncu (Christie, 2003).

2.1.4 Analiza dolgoverižnih maščobnih kislin in maščobnih aldehydov v kemotaksonomiji

Analiza celičnih dolgoverižnih MKA je zelo uporabna metoda v kemotaksonomiji. Uporabljamo jo za razlikovanje in identifikacijo rodov, vrst in sevov bakterij, saj imajo posamezne vrste in sevi bakterij značilne profile MKA in jih zato lahko identificiramo na osnovi tega. Taksone razločujemo glede na sestavo profila MKA in njihove relativne koncentracije. Raziskave pri bakterijah so pokazale, da so fenotipske sorodnosti med organizmi, ki se kažejo v sestavi MK, običajno skladne z izsledki genotipskih analiz (Stahl in Klug, 1996). Kadar uporabljamo profile MKA za razločevanje ali primerjanje mikroorganizmov, je pomembno, da zmanjšamo variabilnost v sestavi MKA, ki je lahko posledica razmer gojenja. Za analizo dolgoverižne MK pretvorimo v metilne estre MK (FAME), MA pa v dimetil-acetale (DMA) in jih najpogosteje analiziramo s plinsko kromatografijo.

2.2 VAMPNE BAKTERIJE IZ RODOV *BUTYRIVIBRIO* IN *PSEUDOBUTYRIVIBRIO*

Pogosto izolirani bakterijski sevi iz vampa spadajo v rodova *Butyrivibrio* in *Pseudobutyrvibrio*, za katera je značilna podobna morfologija. Po Bergey-evem priručniku sistematske bakteriologije se oba rodova uvrščata v deblo *Firmicutes*, razred *Clostridia*, red *Clostridiales* in družino *Lachnospiraceae* (Garrity in sod., 2005).

2.2.1 Rod *Butyrivibrio*

V rod *Butyrivibrio*, ki sta ga definirala Bryant in Small (1956) in za katerega je značilna velika genotipska in fenotipska heterogenost, uvrščamo anaerobne, po Gramu negativne, nesporulirajoče, rahlo ukrivljene paličaste bakterije, ki imajo en biček in fermentirajo glukozo, pri čemer tvorijo velike količine maslene kisline. Čeprav se barvajo po Gramu negativno, njihova celična stena ni po Gramu negativna. Raziskave z elektronskim mikroskopom so pokazale po Gramu pozitivno strukturo celične stene, ki pa je zelo tanka in ne omogoča, da bi se v celicah ohranil netopni kompleks kristalno vijoličnega barvila (Cheng in Costerton, 1977).

Pomembno vrsto tega rodu predstavlja *Butyrivibrio fibrisolvens*. Celice so zakrivljene paličice široke 0,4-0,6 μm in dolge 2-5 μm . Gibljive so z enojnim polarnim ali subpolarnim bičkom in jih najdemo posamično, v paru ali v obliki dolgih verižic. Rastejo pri 30 in 45 $^{\circ}\text{C}$, ne pa pri 22 ali 50 $^{\circ}\text{C}$. Vrsta fermentira glukozo, pri čimer se tvorijo ogljikov dioksid, vodik, maslena, mravljična in mlečna kislina. Fermentira tudi veliko število ogljikovih hidratov, vključno z heksozami, pentozami, disaharidi, gliceridi in polisaharidi (Bryant in Small, 1956).

B. fibrisolvens velja za eno od metabolno najbolj vsestranskih vrst vampnih bakterij. Uspešno razgrajuje ksilan (Hespell in sod., 1987), izraža proteolitično aktivnost (Cotta in

Hespell, 1986), številni sevi izražajo amilolitično aktivnost (Cotta, 1988), nekateri sevi *B. fibrisolvens* so tudi celulolitični (Chesson in Forsberg, 1997; Weimer, 1996).

Poleg že omenjene vrste *B. fibrisolvens*, ki predstavlja tipsko vrsto rodu in vključuje izolate pridobljene iz živali (Bryant in Small, 1956), je pomemben predstavnik tega rodu tudi *Butyrivibrio crossotus* (Moore in sod., 1976), ki je bil izoliran iz človeškega blata.

2.2.2 Rod *Pseudobutyrvibrio*

Rod *Pseudobutyrvibrio*, ki je fenotipsko zelo podoben rodu *Butyrivibrio*, so opisali van Gylswyk in sodelavci (1996). Pomembna vrsta tega rodu je *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* (Kopečný in sod., 2003) s tipskim sevom Mz5^T, ki je bil izoliran iz vampa črno-bele frizijske krave na Oddelku za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani (Zorec in sod., 1997) in je med najaktivnejšimi razgrajevalci ksilana v vampu. Njegova ksilanolitična aktivnost je vsaj 1,65-krat večja kot aktivnost drugih znanih vampnih ksilanolitičnih bakterij (Marinšek Logar in sod., 2000).

Celice *P. xylanivorans* Mz5^T se barvajo po Gramu negativno, so anaerobne, ravne do rahlo ukrivljene paličice široke 0,4 do 0,6 µm in dolge 1,5 do 3,0 µm in ne tvorijo endospor. Tvorijo butirat in so gibljive z enim polarnim ali subpolarnim bičkom. Rastejo pri 39 °C, ne pa pri 25 ali 45 °C. V prisotnosti kisika ne rastejo, vendar pa izpostavitve tekoče stacionarne kulture aerobnim razmeram za nekaj ur bakterij ne ubije. Bakterije lahko izrabljajo različne ogljikovodike. Glukozo fermentirajo do mravljične, maslene, mlečne in jantarne kisline ter etanola (Kopečný in sod., 2003).

2.3 VPLIV RAZMER RASTI NA SESTAVO MAŠČOBNIH KISLIN PRI MIKROORGANIZMIH

2.3.1 Vpliv temperature

MK imajo pomembno vlogo pri prilagoditvi mikroorganizmov na okolja z različno temperaturo (T). Mikroorganizmi regulirajo sestavo MK v odziv na spremembe fluidnosti, ki nastanejo zaradi sprememb v T. Načini sprememb celičnih MK pri spremembi T okolja so pri mikroorganizmih različni.

Suutari in Laakso (1994) sta opisala tri načine prilagoditve v sestavi MK v odziv na spremembo T, in sicer v tipu razvejitve na metilnemu koncu MK (anteizo proti izo), v dolžini verig in stopnji nenasičenosti MK. Kot prilagoditev na povišanje T, ki povzroči povečanje fluidnosti membran, je opaziti povečanje deleža nasičenih in dolgoverižnih MK v membranah (Denich in sod., 2003). Na znižanje T, ki povzroči zmanjšanje fluidnosti membran, pa se bakterije odzovejo v glavnem s povečanjem vsebnosti nenasičenih in razvejanih MK, skrajšanjem dolžine verig in spreminjanjem razvejanosti MK iz izo v anteizo (Freese in sod., 2008). Anteizo MK imajo nižje temperature tališča kot izo MK. MK s krajšimi dolžinami verig ali nenasičene MK imajo prav tako nižje temperature tališča. (Suutari in Laakso, 1994). Ko se T okolja zniža, so tako v lipide vključene MK z

nižjimi temperaturami tališča, ki imajo nižje temperature faznega prehoda. Ta pojav, ki ga imenujemo homeofazna adaptacija je opisal Sinensky (1974) in je pojav, kjer bakterije idealno fizikalno stanje membranskih lipidov vzdržujejo s spremembami lipidov v odziv na spremembe v temperaturi okolja. V raziskavi Taoka in sodelavci (2009) so dokazali znižanje vsebnosti nasičenih MKA in povečanje količine nenasičenih MKA ob znižanju T pri morskem mikroorganizmu iz rodu *Aurantiochytrium*.

V odziv na spremembo temperature so dokazali tudi spreminjanje razmerja MK s sodim in lihim številom C atomov (Denich in sod., 2003; Zhu in sod., 2007). Vendar pa vse bakterije ne spreminjajo sestave svojih MK v odziv na spremembo temperature okolja. Ivančič in sodelavci (2009) so dokazali, da *Escherichia coli* s povečanjem števila temperaturnih ciklov ($n > 3$) izgubi sposobnost spremembe deleža C18:1 MK kot odgovor na spremembo T.

2.3.2 Vpliv pH

Celice pri nižjih vrednostih pH pogosto vsebujejo večje deleže ciklopropanskih MK. Predvidevajo, da ciklopropanske MK celici zagotovijo odpornost na nižji pH z zmanjšanjem permeabilnosti membrane za protone (Chang in Cronan, 1999; Alvarez-Ordóñez in sod., 2009). Chang in Cronan (1999) sta domnevala, da je prisotnost ciklopropanskih MK v membranah glavni dejavnik, ki ščiti *E. coli* pri nizkem pH. Dokazala sta, da je občutljivost na nizek pH odvisna od ciklopropanskih MK, saj so mutirani sevi CFA, ki niso mogli tvoriti ciklopropanskih MK in so bili občutljivi na nizek pH, postali odporni na nizek pH z vključitvijo ciklopropanskih MK iz gojišča. Odpornost na nizek pH s tvorbo ciklopropanskih MK so ugotovili tudi pri *Salmonella typhimurium*. Ugotovili so, da so celice, ki v membranah vsebujejo ciklopropanske MK, bolj odporne na nizek pH kot celice, ki vsebujejo nenasičene MK. Z zakisanjem gojišča se je znaten delež nenasičenih MK v celicah spremenil v njihove ciklopropanske derivate (Kim in sod., 2005; Alvarez-Ordóñez in sod., 2009). Tudi pri izolatih *Helicobacter pylori* iz želodca so ugotovili, da ti vsebujejo večje količine ciklopropanskih MK, medtem ko jih izolati iz črevesja ne (Haque in sod., 1996). Povečane količine ciklopropanskih MK bi prav tako lahko ščitile celice pred kislim pH v želodcu.

Na znižanje pH se celice odzovejo tudi s povečanjem deleža nenasičenih MK in podaljšanjem verig MK. Pri *Streptococcus mutans* se je profil MK spremenil iz kratkoverižnih nasičenih MK, ki so bile prisotne pri nevtralnem pH, v dolgoverižne mononenasičene MK pri kislem pH. Domnevajo, da je povečanje deleža dolgoverižnih mononenasičenih MK pri tem organizmu lahko potrebno za preživetje organizma v zobnih plakih, kjer je nizek pH (Fozo in Quivey, 2004).

Tudi *Listeria monocytogenes* kaže kvalitativno in kvantitativno različno vsebnost membranskih MK pri različnih vrednostih pH. Pri rasti pri vrednosti pH=8,0 ali 8,5 celice vsebujejo večje deleže razvejanih MK, zlasti anteizo oblik. Sklepajo, da naj bi te spremembe povečale fluidnost membran, saj anteizo razvejane MK povečajo fluidnost. Pri pH=5,5 ali 6,0 pa celice vsebujejo večje deleže MK z ravnimi verigami. Domnevajo, da *L. monocytogenes* spretno uporablja spreminjanje vsebnosti razvejanih MK in relativnih

deležev anteizo in izo MK kot zelo občutljiv in učinkovit način prilagoditve na pH stres (Giotis in sod., 2007).

2.3.3 Vpliv faze rasti

Celice v različnih fazah rasti se lahko razlikujejo v sestavi njihovih MKA. Pri bakterijah je pogosto opaziti pojav ciklopropanskih MK v pozni eksponencialni ali zgodnji stacionarni fazi rasti, njihova količina pa narašča s staranjem kulture. Hkrati s pojavom ciklopropanskih MK pride do ustreznega znižanja vsebnosti nenasičenih MK v celicah. Ugotovili so, da so bakterijske ciklopropanske MK sintetizirane direktno iz nenasičenih (C16 in C18) MK z modifikacijo *cis* dvojne vezi. Sklepajo, da naj bi bila primarna funkcija tvorbe ciklopropanskih MK sprememba kemijskih lastnosti membran brez spreminjanja fizikalnih lastnosti (Grogan in Cronan, 1997). Povečane količine ciklopropanskih MK v stacionarni fazi rasti so opazili pri *E. coli* (Marr in Ingraham, 1962), *S. typhimurium* (Kim in sod., 2005) in drugih.

Tudi celice iz rodu *Pediococcus* so v stacionarni fazi rasti pokažejo značilno povečanje količine cikličnih MK in zmanjšanje količine nenasičenih MK v primerjavi s celicami v srednji eksponencialni fazi. Ko so celice vstopile v stacionarno fazo rasti, se je velik delež nenasičene C18:1 n11c MK spremenil v njeno ciklično obliko (C19:0 Δ9c). Ta MK je najbolj pogosta ciklična MK v bakterijskih membranah in postane ena od glavnih MK, ko celice vstopijo v stacionarno fazo rasti neodvisno od sestave gojišča in T rasti. Pretvorba nenasičenih v ciklične MK, ko celice vstopijo v stacionarno fazo rasti, naj bi služila kot zaščita pred oksidacijo lipidov, nizkim pH in toplotno inaktivacijo. Po drugi strani pa so mutirani sevi bakterij, ki niso bili sposobni sinteze cikličnih MK, bili sposobni rasti in preživeti normalno pri vseh pogojih. Sklepali so, da modifikacija MK ni nujna, lahko pa ima prednost pri določenih razmerah (Annous in sod., 1999).

α -proteobakterije pa so vsebovale redko MK, in sicer razvejano C19:1 MK. Podobno kot pri ciklopropanskih MK je na tvorbo te MK vplivala faza rasti. V visokih količinah jo α -proteobakterije sintetizirajo med pozno logaritsmsko in zgodnjo stacionarno fazo, podobno kot so opazili tudi za tvorbo ciklopropanskih obročev (Grogan in Cronan, 1997). Predvidevali so, da obstaja podoben mehanizem za tvorbo razvejane 19:1 MK kot za tvorbo ciklopropanskih MK (Männistö in Puhakka, 2001).

Pri *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus* pa so s staranjem kulture opazili podaljšanje dolžine verig MK. Opaženo podaljšanje dolžine verig MK bi lahko povzročilo zmanjšanje fluidnosti membranskih lipidov in s tem zmanjšanje prepustnosti celic med rastjo (Veerkamp, 1971).

2.4 VPLIV SESTAVIN GOJIŠČA NA SESTAVO MAŠČOBNIH KISLIN PRI MIKROORGANIZMIH

2.4.1 Vpliv maščobnih kislin v gojišču

Celice lahko iz okolja prevzemajo dolgoverižne in kratkoverižne MK, ki jih uporabijo kot prekursorje za sintezo ustreznih celičnih MK. Prisotnost določenih MK v gojišču lahko tako vpliva na sestavo MK bakterijske celice. Opazili so, da razvejani prekursorji povečajo deleže razvejanih MK, prekursorji z lihimi številom C atomov dajejo produkte z lihimi številom C atomov, tisti s sodim številom C atomov pa povzročijo povečanje produktov s sodim številom C atomov. Domnevajo, da prekursorji služijo kot začetni gradbeni deli, ki se dograjujejo z dodatkom dveh C atomov na karboksilni konec molekul (Wegner in Foster, 1962).

2.4.1.1 Vpliv kratkoverižnih maščobnih kislin v gojišču na vsebnost nerazvejanih maščobnih kislin

Nerazvejane MK s sodim in lihimi številom C atomov bakterije sintetizirajo iz različnih prekursorjev, in sicer acetyl-CoA in propionil-CoA (Suutari in Laakso, 1994). Visoke koncentracije propionske kisline v gojišču v odsotnosti očetne kisline tako povečajo deleže novo sintetiziranih MK z lihimi številom C atomov v bakterijskih celicah, saj celice sintetizirajo propionil-CoA iz propionske kisline. Prisotnost propionske kisline v gojišču tako vpliva na sintezo nerazvejanih MK z lihimi številom C atomov. Vendar pa MK-sintetaze kažejo najvišjo aktivnost v prisotnosti acetyl-CoA, zato se prednostno sintetizirajo MK s sodim številom C atomov, če je v gojišču prisotna očetna kislina (Arai in sod., 1982; Ingram in sod., 1977).

Podobno tudi prisotnost valerenske kisline v gojišču vpliva na večji delež celičnih nerazvejanih MK z lihimi številom C atomov (Vlaeminck in sod., 2006), prisotnost maslene kisline pa na delež celičnih nerazvejanih MK s sodim številom C atomov (Kaneda, 1963).

Kaneda (1963) je pri *Bacillus subtilis* ugotovil, da dodatek propionske ali valerenske kisline v gojišče poveča tvorbo celičnih MK z lihimi številom C atomov (C15:0 in C17:0), in da se več teh kislin tvori ob dodatku propionske kot valerenske kisline. Tvorba celičnih MK s sodim številom C atomov (C14:0 in C16:0) pa je bila povečana ob dodatku maslene kisline v gojišče. Tudi pri *E. coli* so v prisotnosti propionske kisline v gojišče opazili nastanek MK z lihimi številom C atomov (nasičenih C15 in C17 MK in nenasičenih C17 MK). Sklepajo, da je sinteza teh MK verjetno posledica izrabljanja propionil-CoA namesto acetyl-CoA kot prekursorja za sintezo MK (Ingram, 1977). Pri vrstah iz rodov *Mycobacterium*, *Brevibacterium* in *Nocardia*, ki rastejo na propanu ali očetni kislini, so opazili, da so deleži celičnih nerazvejanih MK z lihimi številom C atomov (C15:0, C15:1, C17:0 in C17:1) višji, če ti organizmi rastejo na propanu. Sklepajo, da bi lahko bil izvor visokih količin teh MK z lihimi številom C atomov α -oksidacija propana do propionata, kateri sledijo adicije dveh C atomov. Pri celicah, ki rastejo na očetni kislini, pa so prevladujoče MK s sodim številom C atomov (C16:0 in C18:1). Prisotnost velikih količin C16 in C18 nasičenih in nenasičenih MK pri celicah, ki rastejo na očetni kislini, je bila

večkrat dokazana tudi pri drugih organizmih (Dunlap in Perry, 1967). Tudi pri praživalih so ugotovili, da tvorijo dolgoverižne MK, zlasti C16:0, iz kratkoverižnih prekurzorjev, kot sta oacetna in maslena kislina (Or-Rashid in sod., 2007).

2.4.1.2 Vpliv razvejanih kratkoverižnih maščobnih kislin in aminokislin v gojišču na vsebnost razvejanih maščobnih kislin

Na vsebnost razvejanih MK pri bakterijah lahko vplivajo tako razvejane kratkoverižne MK kot tudi določene aminokisliline v gojišču (Daron, 1973). Ker razvejane MK nastanejo samo s sintezo *de novo*, o njihovem deležu odloča dostopnost ustreznih prekurzorjev v gojišču. Vrsta prekurzorja pa določa tip razvejitve (Russell, 1984).

a) Vpliv razvejanih kratkoverižnih maščobnih kislin

Številne vampne bakterije potrebujejo za rast razvejane kratkoverižne MK, ki jih lahko izrabljajo kot prekurzorje za biosintezo razvejanih dolgoverižnih MKA. Prisotnost razvejanih kratkoverižnih MK (2-metil maslene, izo-valerenske ali izo-maslene) v gojišču lahko poveča sintezo celičnih dolgoverižnih razvejanih MK, ki so strukturno sorodne kratkoverižnim prekurzorjem, če so ti prekurzorji dodani v gojišče (Kaneda, 1991). Razvejane kratkoverižne kisline, dodane v gojišče, bakterije pretvorijo v njihove CoA estre, ki jih nato uporabijo kot prekurzorje za sintezo razvejanih dolgoverižnih MKA (Kaneda, 1991). 2-metil maslena kislina služi kot prekurzor za sintezo anteizo razvejanih MK z lihim številom C atomov, izo-maslena za izo razvejane MK s sodim številom C atomov, izo-valerenska pa za izo razvejane MK z lihim številom C atomov (Zhu in sod., 2005).

Vampne bakterije *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* in *Ruminococcus albus* potrebujejo za rast kratkoverižne MK. Vse bakterije potrebujejo razvejano kislino (izo-masleno, izo-valerensko ali 2-metil masleno), določene vrste pa še eno od C5 do C8 n-kislin (Wegner in Foster, 1962). *F. succinogenes* sintetizira MK kot tudi MA iz kratkoverižnih prekurzorjev kislin in izrablja tako razvejano (izo-masleno ali 2-metil masleno) kot nerazvejano kratkoverižno MK (valerensko) za sintezo dolgoverižnih MKA. Izo-masleno kislino uporabi za sintezo razvejanih C14 in C16 MKA, valerensko pa za C13:0 in C15:0 MKA (Wegner in Foster, 1962). Vrste *Ruminococcus* pa izrabljajo le razvejane, ne pa nerazvejanih kratkoverižnih MK. *R. flavefaciens* sev C-94 izrablja ali izo-masleno ali izo-valerensko MK za sintezo lipidov kot tudi amino kislin. Izo-valerensko uporabi za sintezo leucina in razvejanih višjih MK in MA z lihim št. C atomov (predvsem razvejane C15 in C17 MK in razvejane C15 aldehide), izo-masleno pa za sintezo valina in lipidov (Allison in sod. 1962a). *R. albus* sev 7 pa lahko izrablja izo-masleno, ne pa izo-valerenske kisline, ki jo uporabi za sintezo razvejanih C14 in C16 MK in MA. Podobno kot *F. succinogenes* uporabi kratkoverižne kisline edino za sintezo lipidov (Allison in sod., 1962b).

Tudi pri *B. subtilis* so dokazali, da lahko z dodajanjem razvejanih kratkoverižnih MK v gojišče povečajo vsebnost določenih razvejanih dolgoverižnih MK. Z dodatkom izo-maslene kisline se je povečal delež izo-C14:0 in izo-C16:0, z izo-valerensko kislino izo-C15:0 in izo-C17:0 ter z 2-metil masleno kislino anteizo-C15:0 in anteizo-C17:0

(Kaneda, 1963; Kaneda 1977). Podobno so ugotovili tudi pri *L. monocytogenes* (Zhu in sod., 2005).

b) Vpliv aminokislin

Na vsebnost razvejanih MK pri bakterijah lahko vpliva tudi dodatek aminokislin v gojišče. Kaneda (1991) je pri *B. subtilis* dokazal, da lahko razvejane aminokislone leucin, izoleucin ali valin služijo kot prekursorji za sintezo celičnih dolgoverižnih razvejanih MK, če te prekursorje dodamo v gojišče. L-leucin služi kot prekursor za sintezo izo razvejanih MK z lihim številom C atomov (npr. izo-C15:0), L-izoleucin kot prekursor za sintezo anteizo razvejanih MK z lihim številom C atomov (npr. anteizo-C15:0) in L-valin kot prekursor za sintezo izo razvejanih MK s sodim številom C atomov (npr. izo-C14:0). Anteizo razvejane MK s sodim številom C atomov pa so v naravi zelo redke, saj za njihovo sintezo ni ustrezne aminokislone.

Vpliv dodanih aminokislin kot prekursorjev razvejanih MK so dokazali tudi pri *Corynebacterium acnes* in sevih iz rodu *Propionibacterium*. L-izoleucin je povečal količino anteizo-C15 kisline pri *C. acnes*. L-leucin pa je pri kulturah *Propionibacterium* povečal količino izo-C15 kisline. Povečanje količine teh celičnih kislin je spremljalo ustrezno znižanje količine drugih kislin. Ti podatki kažejo na to, da dodatek aminokislin poveča sintezo specifičnih MK, ki so strukturno sorodne dodanemu substratu in zmanjša sintezo drugih razvejanih kislin (Wayne Moss in sod., 1969). Tudi pri rodu *Bacillus* so ugotovili, da je dodatek L-leucina v gojišče povečal deleže celičnih izo MK z lihim številom C atomov, dodatek L-izoleucina pa anteizo MK z lihim številom C atomov (Daron, 1973).

2.4.2 Vpliv sladkorjev (ogljikovih hidratov)

Na sestavo MKA in njihovo razmerje lahko vplivajo tudi različni ogljikovi hidrati v gojišču. Vpliv ogljikovih hidratov v gojišču na sestavo MKA sta proučevala Moon in Anderson (2001). Dokazala sta, da so se celice *Eubacterium cellulosolvens*, ki so rasle na gojišču s celulozo, razlikovale od celic, ki so rasle na gojišču z dodatkom drugih ogljikovih hidratov (celobioza, glukoza). Izkazalo se je, da pri rasti v gojišču s celulozo celice *E. cellulosolvens* vsebujejo več oleinske kisline (C18:1) kot palmitinske kisline (C16:0), oziroma imajo večje razmerje C18:1/ C16:0 v primerjavi s celicami nagojenimi na topnih ogljikovih hidratih. *E. cellulosolvens* je anaerobna, G+, celulolitična bakterija. Gre za prvo poročilo o G+ bakteriji, ki je kot odgovor na rast na celulozi popolnoma spremenila sestavo MKA.

Vpliv različnih virov sladkorjev na sintezo MKA so prav tako dokazali Ozsahin in sodelavci (2009) pri celičnih kulturah *Saccharomyces cerevisiae*. Kot različen vir sladkorjev so uporabili grozdje in murvo. Sestava MKA pri *S. cerevisiae* je bila 12:0, 12:1, 14:0, 14:1, 16:0, 16:1 n-7, 18:1 n-9 in 18:2 n-6. Njihova količina se je v odvisnosti od sestave gojišča spreminjala. Pri *E. coli* K12 je dodatek saharoze v gojišče povzročil povečanje količine ciklopropanskih MK (McGarrity in Armstrong, 1981). Pri kvasovki *Candida tropicalis* pa so mono in disaharidi v gojišču vplivali na vsebnost MK z lihim

številom C atomov in nenasičenih MK. V gojišču s fruktozo je bilo MK z lihimi številom C atomov največ, v gojiščih s saharozo, glukozo in laktozo pa se je njihova vsebnost zmanjševala (Tahoun in sod., 1988).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 KEMIKALIJE

Pri delu smo uporabili naslednje kemikalije (v oklepaju sta navedena proizvajalec in kataloška številka):

- amonijev sulfat, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sigma, A-5132)
- bakteriološki agar (Biolife, 4110302)
- bakteriološki pepton (Biolife, 4122592)
- BAME standardna kalibracijska mešanica bakterijskih FAME v metil-kaproatu (Supelco, 47080-U)
- celobioza (Sigma, C-7252)
- cistein HCl (Sigma, C-7880)
- DL-2-metil maslena kislina (Merck, 820782)
- glukoza (Kemika, 0705007)
- heksadekanal dimetilacetal - DMA C16:0 (Sigma, H7391)
- hemin (Koch-Light Laboratories Ltd., 60216)
- izo-maslena kislina (Sigma, I-1754)
- izo-valerenska kislina (Sigma, I-7128)
- kalcijev klorid, CaCl_2 (Sigma, C-1016)
- kalijev dihidrogen fosfat, KH_2PO_4 (Merck, 104873)
- kalijev hidrogen fosfat, K_2HPO_4 (Kemika, 1116108)
- klorovodikova kislina, HCl (Merck, 100317)
- kvasni ekstrakt (Biolife, 4122202)
- maltoza (Kemika, 12189-4)
- metanol, za plinsko kromatografijo (Merck, 106011)
- MIDI standardna kalibracijska mešanica FAME v heksanu (Hewlett Packard, 19298-60500)
- n-heksan, za plinsko kromatografijo (Merck, 104371)
- n-maslena kislina (Sigma, B-2503)
- n-valerenska kislina (Sigma, V-9759)
- natrijev karbonat, Na_2CO_3 (Merck, 6392)
- natrijev klorid, NaCl (Merck, 106404)
- Nu-Check 423 standardna kalibracijska mešanica enkrat nenasičenih FAME (Nu-Check Prep, GLC-423)
- očetna kislina (Merck, 100063)
- propionska kislina (Sigma, P-1386)
- resazurin (Fluka, 83560)
- škrob (Sigma, S-9765)

3.2 BAKTERIJSKI SEVI

V raziskavi smo uporabili vampne bakterijske seve, ki spadajo v skupino *Butyrivibrio-Pseudobutyrvibrio*, in sicer tipske seve 4 vrst: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Butyrivibrio hungatei*, *Pseudobutyrvibrio ruminis* in *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* (pregl. 1), 8 sevov vrste *P. xylanivorans* (pregl. 2) in 5 sevov vrste *B. fibrisolvens* (pregl. 3).

Preglednica 1: Seznam tipskih sevov

vrsta	oznaka seva (druge oznake)	izvor	država	izoliral
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	DSM 3071 ^T (ATCC 19171, NCFB 2221, D1)	krava	ZDA	M. P. Bryant
<i>Butyrivibrio hungatei</i>	JK615 ^T (DSM 14810 ^T , ATCC BAA-456 ^T)	ovca	Češka	J. Kopečný
<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>	DSM 9787 ^T (A12-1)	krava	Švedska	N.O.van Gylswyk
<i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i>	Mz5 ^T (DSM 14809 ^T , ATCC BAA-455 ^T)	krava	Slovenija	M. Zorec

Preglednica 2: Seznam sevov iz vrste *P. xylanivorans*

oznaka seva (druge oznake)	izvor	država	izoliral
DSM 10296 (NCFB 2397, JL)	ni znan	ZDA	J. M. Leatherwood
DSM 10317 (NCFB 2399, Bu 21)	ovca	Južna Afrika	N. O. van Gylswyk
CE51	ovca	Južna Afrika	N. O. van Gylswyk
OR38b	jelen	Kanada	R. M. Teather
JK10/1	ovca	Češka	J. Kopečný
JK663	ovca	Češka	J. Kopečný
Mz8	krava	Slovenija	M. Zorec
LFO3	ovca	Slovenija	L. Fanedl

Preglednica 3: Seznam sevov iz vrste *B. fibrisolvens*

oznaka seva (druge oznake)	izvor	država	izoliral
JK623	ovca	Češka	J. Kopečný
JK642	ovca	Češka	J. Kopečný
JK651	ovca	Češka	J. Kopečný
LFO4	ovca	Slovenija	L. Fanedl
LFO5	ovca	Slovenija	L. Fanedl

Pri sevih iz zbirke DSM smo v nadaljnjem delu opustili oznako »DSM«.

3.3 GOJENJE ANAEROBNIH BAKTERIJ

3.3.1 Gojišča

3.3.1.1 Gojišče 330 za vampne bakterije

Vse bakterijske seve smo gojili v delno spremenjenem gojišču 330 (DSMZ, 2004) v sestavi: K_2HPO_4 (0,3 g/L), pepton (2 g/L), kvasni ekstrakt (0,5 g/L), Na_2CO_3 (4 g/L), sladkorji: (glukoza (2 g/L), maltoza (1 g/L), celobioza (1 g/L), škrob (1 g/L)), hemin (1 mg/L), rezazurin (1 mL/L), cistein HCl (0,5 g/L), agar za vbodnike (7,5 g/L), mešanica VFA (3,1 mL/L) v sestavi: očetna kislina (4,25 mL), propionska kislina (1,50 mL), maslena kislina (1,00 mL), n-valerenska kislina (0,25 mL), izo-maslena kislina (0,25 mL), izo-valerenska kislina (0,25 mL), DL-2-metil maslena kislina (0,25 mL); mineralna raztopina 330 (38 mL/L) v sestavi: KH_2PO_4 (6,0 g/L), NaCl (12,0 g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (6,0 g/L), $CaCl_2$ (1,6 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2,5 g/L), destilirana voda 1000 mL; destilirana voda (960 mL/L).

Bakterijske seve smo gojili še v gojiščih 330 s spremenjeno sestavo.

3.3.1.2 Gojišče 330A (manj kratkoverižnih MK)

To gojišče je bilo enako sestavljeno kot gojišče 330, le da je vsebovalo polovico manj kratkoverižnih MK. Vsebovalo je 1,55 mL/L mešanice VFA.

3.3.1.3 Gojišče 330B (manj razvejanih kratkoverižnih MK)

Gojišče 330B se je razlikovalo od osnovnega gojišča 330 po tem, da je vsebovalo polovico manj mešanice VFA (1,55 mL/L). Poleg tega pa je vsebovalo polovico manj izo-maslene kisline (0,10 mL), izo-valerenske kisline (0,10 mL) in DL-2-metil maslene kisline (0,10 mL).

3.3.1.4 Gojišče 330C (manj sladkorjev)

Gojišče 330C se je razlikovalo od osnovnega gojišča 330 le v vsebnosti sladkorjev. Vsebovalo je polovico manj glukoze (1 g/L), maltoze (0,5 g/L), celobioze (0,5 g/L) in škroba (0,5 g/L) kot gojišče 330.

Gojišča smo pripravili, tako da smo sestavine zatehtali in odmerili po recepturi, mešali in segrevali do vrenja, nato odstavili in prepihavali s 100 % CO_2 , dokler niso izgubila rožnate barve. Pod zaščitnim plinom smo nato gojišča razlili v epruvete in zaprli s tesnili iz butilne gume. Zaprta gojišča smo avtoklavirali 15 minut pri 121°C.

3.3.2 Tehnike gojenja in shranjevanje anaerobnih bakterij

Bakterijske seve smo gojili v anaerobnih razmerah, kot jih zagotavlja Bryantova modifikacija Hungateove tehnike (Bryant, 1972). Kulture smo precepljali in gojili pod

zaščitnim plinom (100 % CO₂). Za poskuse smo uporabili kulture stare 12, 24 ali 48 ur, ki smo jih inkubirali pri 37 °C. Testne kulture smo inokulirali s cepilno zanko iz kulture zrasle preko noči. Bakterijske seve smo shranjevali v vbodnikih pri -20 °C.

3.4 PRIPRAVA VZORCEV

Odmrznjene kulture sevov (vbodniki) smo nacepili v tekoče gojišče 330 in inkubirali 24 ur pri 37 °C. Zrasle kulture smo precepili v ustrezna gojišča (330, 330A, 330B, 330C) in v gojišče 330 z agarjem (vbodnike) in inkubirali 24 ur pri 37 °C, vzorce, kjer smo proučevali vpliv faze rasti, pa 12, 24 ali 48 ur pri 37 °C. Zrasle vbodnike smo shranili pri -20 °C, zrasle kulture sevov pa smo pripravili za liofilizacijo, tako da smo jih centrifugirali 10 minut pri 3000 obratih/minuto, odlili supernatant, pelet pa resuspendirali v 500 µL vode miliQ. Resuspendiran pelet smo prenesli v 2 mL stekleničke Wheaton za liofilizacijo, stekleničke napolnili z dušikom in jih do liofilizacije shranili pri -20 °C. Kulture smo liofilizirali 24 ur. Po liofilizaciji smo stekleničke pod pretokom dušika zaprli z gumijastimi zamaški in jih še dodatno fiksirali z aluminijastimi pokrovčki. Tako pripravljene vzorce smo do analize shranili pri 4 °C.

3.5 ANALIZA DOLGOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN IN MAŠČOBNIH ALDEHIDOV

(Nadaljnji postopki so povzeti po Zorec, 2006)

3.5.1 Priprava metilnih estrov maščobnih kislin in maščobnih aldehydov

Za analizo dolgoverižnih MKA s plinsko kromatografijo smo pripravili njihove metilne estre z neposredno metilacijo liofiliziranih celic. Pri postopku smo uporabljali materiale iz stekla in zamaške s teflonskimi tesnili.

Izbrali smo metodo transesterifikacije lipidov s HCl v metanolu (Dionisi in sod., 1999). Liofilizirane celice smo pretresli v epruveto Hach in dodali 500 µL n-heksana, s čimer smo raztopili lipide. Nato smo dodali 1 mL 1,5 M HCl v metanolu (88 mL metanola + 12 mL koncentrirane HCl) in 1 mL metanola. Epruveto smo napolnili z dušikom, jo dobro zaprli in inkubirali 10 minut pri 80 °C. Po končani metilaciji smo reakcijo ustavili z ohlajanjem v ledeni kopeli. Nato smo dodali 2 mL vode miliQ in močno mešali 1 minuto. Epruvete smo nato kratko centrifugirali, da sta se fazi ločili. Zgornjo organsko fazo smo prenesli v 1,5 mL stekleničko za GC analizo, jo napolnili z dušikom, dobro zaprli in do analize shranili pri -20 °C.

3.5.2 Analiza FAME in DMA

Ekstrakte FAME in DMA v heksanu smo analizirali na plinskem kromatografu Shimadzu GC-14A z detektorjem FID. Uporabili smo kapilarno kolono Equity-1 (dolžina 30 m, notranji premer 0,25 mm, debelina filma 0,25 µm; Supelco, 28046-U) z nepolarno stacionarno fazo (100 % poli-dimetil-siloksan). Nosilni plin je bil helij (pretok 30 mL/minuto), detektorska plina pa vodik in zrak (pretok vodika je bil 30 mL/minuto, pretok zraka pa 300 mL/minuto). Temperatura injektorja je bila 250 °C, temperatura detektorja pa 280 °C. Analiza je potekala po temperaturnem programu od 150 °C do 250 °C s hitrostjo

naraščanja temperature 4 °C na minuto. Začetno temperaturo smo ohranjali 4 minute, končno pa 10 minut. Ročno smo vbrizgali po 1µL vzorca ali standardne mešanice. Rezultate smo zabeležili na integratorju Chromatopac C-R6A in jih ročno prenesli v program Microsoft Excel za nadaljnjo obdelavo. Izločili smo sestavine, ki so se eluirale pred C10:0 in za C20:0, za sestavine znotraj tega območja pa smo določili relativne koncentracije iz površine pika.

3.5.3 Identifikacija FAME in DMA s faktorji ekvivalentne dolžine verige (ECL)

Nekatere FAME in DMA v vzorcih smo identificirali s primerjavo zadrževalnih časov (Rt) FAME in DMA v standardnih kalibracijskih mešanicah (BAME, MIDI, Nu-Check 423 in DMA C16:0). Sestava standardnih mešanic je bila:

1. BAME C11:0, C10:0 2OH, C12:0, C13:0, C12:0 2OH, C12:0 3OH, C14:0, i-C15:0, a-C15:0, C15:0, C14:0 2OH, C14:0 3OH, i-C16:0, C16:1 c9, C16:0, i-C17:0, C17:0 cyc-9,10, C16:0 2OH, C18:2 c9,c12, C18:1 c9, C18:1 t9, C18:0, C19:0 cyc-9,10 in C20:0
2. MIDI: C9:0, C10:0, C11:0, C10:0 2OH, C10:0 3OH, C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C14:0 2OH, C14:0 3OH, C16:0, C17:0, C16:0 2OH, C18:0, C19:0 in C20:0
3. Nu-Check 423: C11:1 c10, C12:1 c11, C13:1 c12, C14:1 c9, C15:1 c10, C16:1 c9, C17:1 c10, C18:1 c9, C19:1 c10 in C20:1 c11
4. DMA C16:0

Za identifikacijo ostalih FAME in DMA smo zadrževalne čase pretvorili v faktorje ekvivalentne dolžine verige (ECL) po enačbi (Mjøs, 2003):

$$ECL(x) = \frac{\log Rt(x) - \log Rt(z)}{\log Rt(z+1) - \log Rt(z)} + z \quad \dots(1)$$

kjer je: $Rt(x)$ zadrževalni čas sestavine x

$Rt(z)$ zadrževalni čas ravne nasičene FAME pred sestavino x

$Rt(z+1)$ zadrževalni čas ravne nasičene FAME za sestavino x

z število C atomov v ravni nasičeni FAME, ki se eluira pred sestavino x

Po definiciji imajo ravne nasičene FAME faktor ECL enak številu C atomov v verigi (npr. ECL (C18:0)=18). Ostale MKA smo identificirali po tabelarnih vrednostih ECL (priloga B; Zorec, 2006).

3.5.4 Analiza in prikaz rezultatov FAME in DMA

FAME in DMA smo identificirali po zadrževalnih časih in s faktorji ECL ter jih pri posameznem sevu razvrstili glede na vrstni red izločanja na nepolarni koloni. Določili smo glavne MKA, ki so imele delež nad 5 % in so v preglednicah označene s krepkim tiskom, kot MKA v sledovih pa označili tiste, ki so imele delež manjši od 0,5 % in so v preglednicah označene s »tr«. Pri vsakem sevu smo izračunali vsoto MK in MA, deleže nerazvejanih nasičenih MKA, nerazvejanih nasičenih MKA s sodim in lihim številom C atomov, nenasičenih MKA, razvejanih MKA ter izo in anteizo razvejanih MKA. MKA v sledovih nismo vključili v skupne deleže.

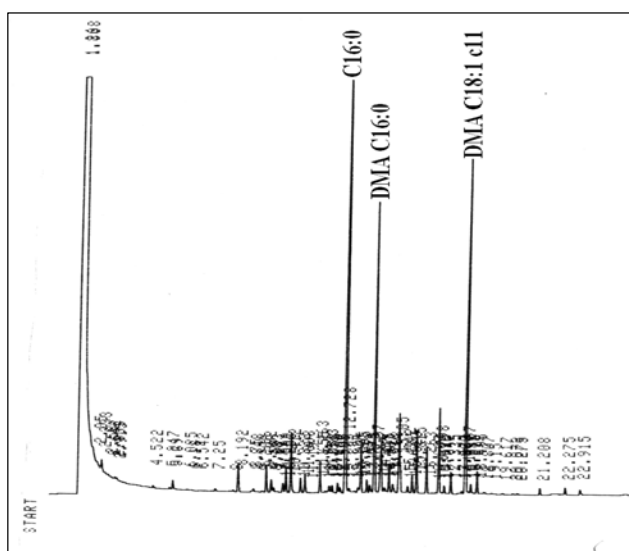
4 REZULTATI

V raziskavi smo proučevali vpliv vrste gojišča na sestavo MKA tipskih sevov *Butyrivibrio fibrisolvens* 3071^T in *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T ter ugotavljali sestavo MKA nekaterih drugih sevov iz teh dveh vrst. Zanimal nas je tudi vpliv faze rasti na sestavo MKA tipskih sevov *B. fibrisolvens* 3071^T in *P. xylanivorans* Mz5^T.

4.1 VPLIV VRSTE GOJIŠČA NA SESTAVO MAŠČOBNIH KISLIN IN MAŠČOBNIH ALDEHIDOV

4.1.1 *Butyrivibrio fibrisolvens* 3071^T

Pri tipskem sev *B. fibrisolvens* 3071^T nas je zanimal vpliv vrste gojišča na sestavo MKA. Analiza in primerjava kromatogramov ni pokazala razlik v profilu MKA po rasti *B. fibrisolvens* 3071^T v osnovnem gojišču 330, gojišču 330 z manj kratkoverižnimi MK, gojišču 330 z manj razvejanimi kratkoverižnimi MK in gojišču 330 z manj sladkorji.



Slika 2: Primer kromatograma celičnih MKA pri *Butyrivibrio fibrisolvens* 3071^T po rasti v gojišču 330

Kot glavne MKA smo pri sev *B. fibrisolvens* 3071^T v vseh štirih gojiščih določili C16:0, DMA C18:1 c11 in DMA C16:0 (pregl. 4). Med njimi je bilo največ C16:0, ki predstavlja dobro tretjino vseh prisotnih MKA, na njen delež pa vrsta gojišča ni imela vpliva. Delež DMA C18:1 c11 je bil med 12,1 % in 14,3 %. Delež DMA C16:0 je bil približno 15 %. Nekoliko nižji delež smo določili v gojišču 330 (11,8 %). Med kulturami, ki so zrastle v teh gojiščih, nismo opazili pomembnih razlik. Zaznane manjše razlike v deležih posameznih MKA pripisujemo analitskim napakam. Deleži ostalih MKA so bili pod 5 %.

Preglednica 4: Delež (% celotne površine) posameznih MKA pri sevu *B. fibrisolvens* 3071^T po rasti v gojiščih 330, 330A, 330B in 330C

okrajšava MKA	ECL	vrsta gojišča			
		330	330A	330B	330C
C14:0	14,00	1,2	0,8	0,8	1,2
DMA C14:0	14,54	1,2	1,0	0,9	1,3
i-C15:0	14,66	0,6	tr	tr	tr
C15:1 c10	14,88	tr	0,6	tr	tr
C15:1 Y	14,91	1,1	1,3	1,3	1,0
C15:0	15,00	2,7	1,8	1,7	2,8
DMA i-C15:0	15,20	0,6	tr	tr	0,6
DMA a-C15:0	15,28	0,9	0,8	0,7	0,8
DMA C15:0	15,54	1,3	1,2	1,1	1,6
C16:1 C	15,87	0,5	tr	tr	tr
C16:0	16,00	35,2	36,4	37,2	35,6
DMA C16:1 c9	16,31	2,3	1,6	1,6	2,1
DMA C16:1 C	16,39	tr	0,6	0,6	0,5
DMA C16:0	16,54	11,8	16,6	16,6	14,2
i-C17:0	16,66	3,3	2,4	2,2	2,3
C17:1 C	16,83	1,2	0,7	0,8	1,0
C17:1 X	16,89	0,6	0,6	0,5	tr
C17:0	17,00	4,7	4,2	4,2	4,6
DMA a-C17:0	17,25	0,9	0,7	0,8	0,8
DMA C17:1 C	17,35	2,6	2,0	2,0	2,6
DMA C17:0	17,54	2,0	2,6	2,4	2,7
?C18:1 c11	17,79	3,6	2,6	3,0	3,2
C18:0	18,00	1,0	1,2	1,4	1,1
?DMA C18:1 c11	18,31	14,3	12,1	12,7	13,5
DMA C18:1 B	18,40	tr	0,5	0,5	tr
DMA C18:0	18,54	1,0	1,9	2,0	1,3

tr-delež je manjši od 0,5%

?- najbolj verjetna MKA

gojišče 330-osnovno gojišče

gojišče 330A-gojišče z manjšo vsebnostjo kratkoverižnih MK

gojišče 330B-gojišče z manjšo vsebnostjo razvejanih kratkoverižnih MK

gojišče 330C-gojišče z manjšo vsebnostjo sladkorjev

Butyrivibrio fibrisolvens 3071^T je imel v vseh gojiščih največ nerazvejanih nasičenih MKA (od 62,0 % do 68,3 %), med katerimi so prevladovali MKA s sodim številom C atomov (približno 5-krat več kot MKA z lihim številom C atomov) (pregl. 5). Po skupnem deležu so jim sledile nenasičene (od 22,6 % do 26,3 %), razvejanih MKA pa je bilo približno 5 %. Od tega je bilo izo razvejanih MKA približno 2-krat več kot anteizo.

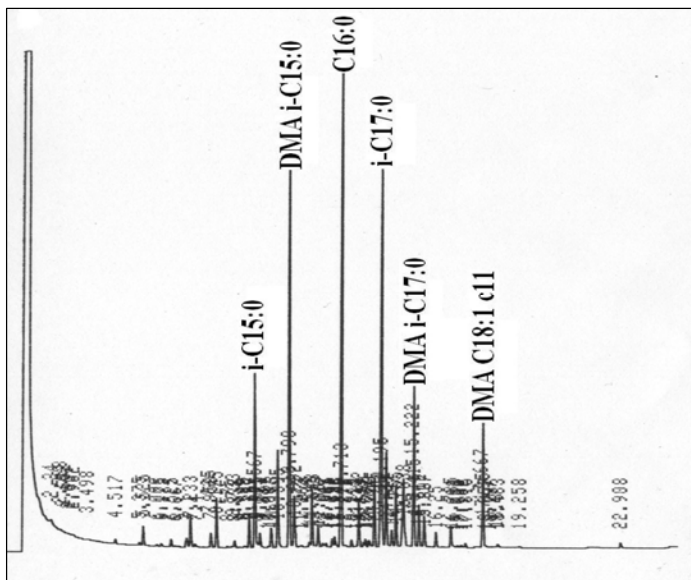
Preglednica 5: Skupni deleži (% celotne površine) MK, MA, nerazvejanih nasičenih, nerazvejanih nasičenih s sodim in lihim številom C atomov, razvejanih, izo in anteizo razvejanih in nenasičenih MKA pri sevu *B. fibrisolvens* 3071^T po rasti v gojiščih 330, 330A, 330B in 330C

skupina MKA	vrsta gojišča			
	330	330A	330B	330C
MK	55,7	52,7	53,1	52,9
MA	39,1	41,6	42,1	41,9
nerazvejane nasičene	62,0	67,7	68,3	66,4
nerazvejane nasičene s sodim št. C atomov	51,3	57,9	58,8	54,6
nerazvejane nasičene z lihimi št. C atomov	10,7	9,8	9,5	11,8
razvejane skupaj	6,5	3,9	3,7	4,4
izo razvejane	4,6	2,4	2,2	2,9
anteizo razvejane	1,9	1,5	1,5	1,5
nenasičene	26,3	22,6	23,2	24,0

Oznake 330, 330A, 330B in 330C iste kot pri pregl. 4.

4.1.2 *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T

Vpliv vrste gojišča na sestavo MKA smo ugotavljali tudi pri sevu *P. xylanivorans* Mz5^T. Analiza in primerjava kromatogramov MKA je pokazala razlike po rasti *P. xylanivorans* Mz5^T v osnovnem gojišču 330, gojišču 330 z manj kratkoverižnimi MK, gojišču 330 z manj razvejanimi kratkoverižnimi MK in gojišču 330 z manj sladkorji.



Slika 3: Primer kromatograma celičnih MKA pri *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T po rasti v gojišču 330

Pri sevu *P. xylanivorans* Mz5^T smo v gojišču 330 kot glavne MKA določili C16:0, i-C17:0, DMA i-C15:0, i-C15:0 in DMA i-C17:0 (pregl. 6). V gojišču 330A je bilo v primerjavi z gojiščem 330 skoraj 2-krat več DMA C18:1 c11, manj pa je bilo i-C15:0 in njenega aldehida. Določili pa smo povečan delež C16:0. Podobno smo v gojišču 330B ugotovili večjo vsebnost DMA C18:1 c11. Njen delež je bil podoben kot v gojišču 330A. V primerjavi z gojiščem 330 pa so se zmanjšali deleži i-C15:0 in i-C17:0 ter njihovih aldehydov. V gojišču 330B je bilo skoraj 2-krat več C16:0 kot v osnovnem gojišču 330. Deleži glavnih MKA v gojišču 330C se niso pomembno razlikovali od deležev v gojišču 330.

Preglednica 6: Delež (% celotne površine) posameznih MKA pri sevu *P. xylanivorans* Mz5^T po rasti v gojiščih 330, 330A, 330B in 330C

okrajšava MKA	ECL	vrsta gojišča			
		330	330A	330B	330C
i-C13:0	12,66	0,7	tr	n	0,8
?DMA C13:1 c12	13,50	0,5	tr	tr	tr
DMA C13:0	13,55	1,2	0,8	0,7	1,2
C14:1 Y	13,91	0,6	tr	tr	0,6
C14:0	14,00	1,8	0,8	1,6	1,4
DMA C14:0	14,54	1,3	1,0	2,0	1,1
i-C15:0	14,66	6,7	3,4	2,1	6,6
C15:1 Y	14,91	0,9	0,8	0,8	0,9
C15:0	15,00	3,6	2,9	4,2	4,8
DMA i-C15:0	15,20	13,7	10,2	6,4	14,2
DMA a-C15:0	15,28	2,2	1,8	1,5	2,0
DMA C15:0	15,54	2,1	1,8	2,4	2,1
i-C16:0	15,66	0,9	0,8	0,5	0,9
C16:1 C	15,87	tr	0,6	0,7	tr
C16:0	16,00	16,8	20,4	27,6	15,7
DMA C16:1 e9	16,31	1,8	2,1	3,7	1,7
DMA C16:1 C	16,39	tr	0,9	1,0	tr
DMA C16:0	16,54	2,6	3,1	4,5	2,0
i-C17:0	16,66	14,4	14,0	7,8	14,2
a-C17:0	16,73	3,6	2,8	1,7	2,9
C17:1 C	16,83	0,7	0,9	0,9	1,1
C17:1 X	16,89	2,4	2,5	1,3	2,7
C17:0	17,00	3,7	4,5	4,8	4,2
DMA i-C17:0	17,17	5,8	5,0	2,6	5,2
DMA a-C17:0	17,25	1,6	1,4	1,2	1,4
DMA C17:1 C	17,35	1,2	1,9	2,4	1,7
DMA C17:0	17,54	0,6	0,8	1,0	0,5
?C18:1 c11	17,79	0,8	1,0	1,0	1,1
?DMA C18:1 c11	18,31	4,4	8,4	10,2	4,9

n-ni prisotna

tr-delež je manjši od 0,5%

?- najbolj verjetna MKA

Oznake 330, 330A, 330B in 330C iste kot pri pregl. 4.

Pri primerjavi skupnih deležev MKA sta bili kulturi, ki sta zrasli v gojiščih 330 in 330C najbolj podobni (pregl.7). Največ je bilo razvejanih MKA (polovica), od katerih je bilo skoraj 6-krat več izo kot anteizo razvejanih. Vse razvejane MKA pa so imele liho število C atomov. Nerazvejanih nasičenih MKA je bila dobra tretjina, od tega 2-krat več tistih s sodim številom C atomov. Nenasičenih MKA je bila dobra desetina. Sestava MKA kultur zraslih v gojiščih 330A in 330B se je razlikovala od prej naštetih. V gojiščih 330A in 330B smo zaznali podobno vsebnost nenasičenih MKA. Njihov delež je bil skoraj 2-krat večji kot v gojiščih 330 in 330C. V obeh gojiščih je bilo v primerjavi z gojiščem 330 in 330C več nerazvejanih nasičenih in manj razvejanih MKA, vendar pa je bilo v gojišču 330B več nerazvejanih nasičenih MKA (predvsem na račun tistih s sodim številom C atomov), v gojišču 330A pa več razvejanih MKA.

Preglednica 7: Skupni deleži (% celotne površine) MK, MA, nerazvejanih nasičenih, nerazvejanih nasičenih s sodim in lihim številom C atomov, razvejanih, izo in anteizo razvejanih in nenasičenih MKA pri sevu *P. xylanivorans* Mz5^T po rasti v gojiščih 330, 330A, 330B in 330C

skupina MKA	vrsta gojišča			
	330	330A	330B	330C
MK	58,0	55,4	54,9	57,9
MA	39,0	39,1	39,6	38,0
nerazvejane nasičene	33,7	36,1	48,8	33,1
nerazvejane nasičene s sodim št. C atomov	22,5	25,2	35,7	20,3
nerazvejane nasičene z lihim št. C atomov	11,2	10,8	13,1	12,8
razvejane skupaj	49,9	39,4	23,9	48,1
izo razvejane	42,4	33,4	19,5	41,8
anteizo razvejane	7,5	6,0	4,4	6,3
nenasičene	13,4	19,0	21,9	14,7

Oznake 330, 330A, 330B in 330C iste kot pri pregl. 4.

4.2 VPLIV FAZE RASTI NA SESTAVO MAŠČOBNIH KISLIN IN MAŠČOBNIH ALDEHIDOV

4.2.1 *Butyrivibrio fibrisolvens* 3071^T

Pri tipskem sevu *B. fibrisolvens* 3071^T smo ugotavljali vpliv faze rasti na sestavo MKA. Analize MKA smo opravili po 12-ih, 24-ih in 48-ih urah inkubacije v gojišču 330. Pri *B. fibrisolvens* 3071^T smo kot glavne MKA določili C16:0, DMA C18:1 c11 in DMA C16:0 (pregl. 8). Njihovi deleži se s časom inkubacije niso pomembno spreminjali. Zaznane manjše razlike v deležih posameznih MKA pripisujemo analitskim napakam. Med njimi je bilo največ C16:0, ki je predstavljala dobro tretjino vseh MKA.

Preglednica 8: Delež (% celotne površine) posameznih MKA pri sevu *B. fibrisolvens* 3071^T po inkubaciji 12, 24 ali 48 ur v gojišču 330

okrajšava MKA	ECL	čas inkubacije		
		12 ur	24 ur	48 ur
C14:0	14,00	1,0	1,0	1,5
DMA C14:0	14,54	1,1	1,1	1,2
i-C15:0	14,66	tr	tr	0,6
a-C15:0	14,74	n	tr	0,7
C15:1 Y	14,91	0,9	0,9	1,0
C15:0	15,00	2,2	2,2	2,6
DMA i-C15:0	15,20	0,6	0,7	0,6
DMA a-C15:0	15,28	0,7	0,7	0,8
DMA C15:0	15,54	1,2	1,3	1,2
C16:0	16,00	35,5	36,3	37,4
DMA C16:1 c9	16,31	2,3	2,0	2,0
DMA C16:1 C	16,39	0,7	0,6	tr
DMA C16:0	16,54	12,4	13,8	11,4
i-C17:0	16,66	2,9	2,6	3,0
a-C17:0	16,73	tr	tr	0,5
C17:1 C	16,83	1,1	0,9	1,2
C17:1 X	16,89	0,6	0,5	tr
C17:0	17,00	4,3	4,4	4,8
DMA a-C17:0	17,25	0,9	0,8	0,8
DMA C17:1 C	17,35	2,6	2,5	2,3
DMA C17:0	17,54	2,1	2,4	1,9
?C18:1 c11	17,79	3,5	3,2	4,1
C18:0	18,00	0,9	1,1	1,2
?DMA C18:1 c11	18,31	16,2	14,6	13,4
DMA C18:1 B	18,40	tr	0,5	tr
DMA C18:0	18,54	1,3	1,4	1,1

n-ni prisotna

tr-delež je manjši od 0,5%

?- najbolj verjetna MKA

Pri *B. fibrisolvens* 3071^T se s časom inkubacije deleži posameznih skupin MKA niso pomembno spreminjali (pregl. 9). Po 48-ih urah smo določili več MK in manj MA ter več razvejanih MKA. S časom inkubacije smo opazili trend zmanjševanja nenasičenih MKA.

Preglednica 9: Skupni deleži (% celotne površine) MK, MA, nerazvejanih nasičenih, nerazvejanih nasičenih s sodim in lihim številom C atomov, razvejanih, izo in anteizo razvejanih in nenasičenih MKA pri sevu *B. fibrisolvens* 3071^T po inkubaciji 12, 24 ali 48 ur v gojišču 330

skupina MKA	čas inkubacije		
	12 ur	24 ur	48 ur
MK	53,0	53,1	58,5
MA	41,9	42,3	36,6
nerazvejane nasičene	61,9	64,9	64,2
nerazvejane nasičene s sodim št. C atomov	52,1	54,7	53,8
nerazvejane nasičene z lihimi št. C atomov	9,8	10,2	10,5
razvejane skupaj	5,1	4,8	6,9
izo razvejane	3,5	3,2	4,1
anteizo razvejane	1,6	1,5	2,7
nenasičene	27,9	25,7	24,0

4.2.2 *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T

Vpliv faze rasti na sestavo MKA smo prav tako ugotavljali pri tipskem sev *P. xylanivorans* Mz5^T. Analize MKA smo opravili po 12-ih, 24-ih in 48-ih urah inkubacije v gojišču 330. Pri *P. xylanivorans* Mz5^T smo kot glavne MKA določili C16:0, DMA i-C15:0, i-C17:0, i-C15:0, DMA i-C17:0 in DMA C18:1 c11 (pregl. 10). S časom inkubacije se njihovi deleži niso pomembno razlikovali. Opazili pa smo nekoliko nižje deleže glavnih MKA pri 24-urni inkubaciji. Pri 24-ih urah se je pojavila ciklična MK (C19:0 cyc 9,10), ki je pred tem (pri 12-ih urah) in kasneje (pri 48-ih urah) nismo določili.

Preglednica 10: Delež (% celotne površine) posameznih MKA pri sevu *P. xylanivorans* Mz5^T po inkubaciji 12, 24 ali 48 ur v gojišču 330

okrajšava MKA	ECL	čas inkubacije		
		12 ur	24 ur	48 ur
?DMA C12:1	12,47	n	1,1	n
i-C13:0	12,66	0,6	1,0	1,1
?DMA C13:1	13,36	n	0,8	n
DMA C13:0	13,55	0,7	0,6	0,8
C14:1 Y	13,91	n	0,6	tr
C14:0	14,00	1,0	1,8	2,4
DMA C14:1 X	14,34	tr	0,8	tr
DMA C14:0	14,54	0,8	1,2	1,3
i-C15:0	14,66	7,1	6,2	8,8
a-C15:0	14,74	0,7	0,8	0,9
C15:1 Y	14,91	1,2	1,2	1,2
C15:0	15,00	3,7	3,3	4,0
DMA i-C15:0	15,19	14,7	11,4	12,2
DMA a-C15:0	15,28	2,4	2,2	2,0
DMA C15:0	15,54	1,7	1,4	1,5
i-C16:0	15,66	0,9	0,7	0,8
C16:1 C	15,87	0,6	0,6	0,6
C16:0	16,00	14,2	11,4	15,5
DMA i-C16:0	16,18	n	0,6	n
DMA C16:1 c9	16,31	2,1	1,9	2,1
DMA C16:1 C	16,39	tr	tr	0,6
?DMA C16:1	16,47	tr	1,2	0,6
DMA C16:0	16,54	2,1	1,8	1,9
i-C17:0	16,66	14,3	9,7	14,2
a-C17:0	16,73	3,5	2,5	3,6
C17:1 C	16,83	1,3	1,0	1,3
C17:1 X	16,89	3,9	2,6	2,8
C17:0	17,00	3,7	2,7	3,5
DMA i-C17:0	17,17	5,8	4,0	4,4
DMA a-C17:0	17,25	1,7	1,2	1,4
DMA C17:1 C	17,35	1,6	1,1	1,3
?C18:1 c11	17,79	1,5	1,0	1,5
neznana	18,12	n	3,5	n
DMA i-C18:0	18,19	n	2,2	n
?DMA C18:1 c11	18,31	5,7	4,0	4,6
DMA C18:1 X	18,46	n	0,7	n
C19:0 cyc 9,10	18,83	n	1,6	n

n-ni prisotna

tr-delež je manjši od 0,5

?- najbolj verjetna MK

Pri sevu *P. xylanivorans* Mz5^T je bil delež razvejanih MKA tekom celotne rastne faze največji (pregl. 11). Pri 24-urni inkubaciji smo opazili skoraj 20 % relativno znižanje njihovega deleža, vendar je bil delež pri 48-urni inkubaciji ponovno enak začetnemu. Med razvejanimi je bilo približno 5-krat več izo kot anteizo razvejanih MKA. Po deležu so jim sledile nerazvejane nasičene MKA, med katerimi smo določili približno 2-krat več MKA s sodim številom C atomov kot tistih z lihimi številom C atomov. Najmanj je bilo nenasičenih MKA.

Preglednica 11: Skupni deleži (% celotne površine) MK, MA, nerazvejanih nasičenih, nerazvejanih nasičenih s sodim in lihimi številom C atomov, razvejanih, izo in anteizo razvejanih in nenasičenih MKA pri sevu *P. xylanivorans* Mz5^T po inkubaciji 12, 24 ali 48 ur v gojišču 330

skupina MKA	čas inkubacije		
	12 ur	24 ur	48 ur
MK	58,2	48,8	62,1
MA	39,2	38,1	34,7
nerazvejane nasičene	27,9	24,1	30,9
nerazvejane nasičene s sodim št. C atomov	18,1	16,2	21,1
nerazvejane nasičene z lihimi št. C atomov	9,7	7,9	9,8
razvejane skupaj	51,7	42,6	49,3
izo razvejane	43,3	35,8	41,6
anteizo razvejane	8,4	6,8	7,8
nenasičene + ciklo	17,9	20,1	16,6

• ciklično MK C19:0 cyc9,10 smo določili le pri 24 urni inkubaciji

4.3 SESTAVA MAŠČOBNIH KISLIN IN MAŠČOBNIH ALDEHIDOV PRI SEVIH IZ VRST *B. FIBRISOLVENS* IN *P. XYLANIVORANS*

4.3.1 Sestava maščobnih kislin in maščobnih aldehydov pri sevih iz vrste *B. fibrisolvens*

Analizirali smo še profile nekaterih drugih sevov vrste *B. fibrisolvens* gojenih v gojišču 330. Pri primerjavi MKA profilov drugih sevov vrste *B. fibrisolvens* smo ugotovili, da so večinoma podobni tipskemu sevu. Kot glavne MKA smo določili C16:0, DMA C18:1 c11 in DMA C16:0 (pregl. 12). Tipskemu sevu je najbolj podoben sev LFO5. Seva JK642 in LFO4 se od tipskega seva razlikujeta po manjši vsebnosti C16:0. Kot glavne MKA pa smo pri njiju določili še C17:0, DMA C17:1 C in C15:0. Delež C15:0 je pri sevu LFO4 2-krat večji kot pri sevu JK642. Pri sevu LFO4 smo kot glavno MKA določili še DMA C17:0. Sev JK651 se od tipskega seva razlikuje po večji vsebnosti DMA C16:0, kot glavno MKA pa smo pri njem določili še C16:1 c9 in njen aldehyd. Sev JK623 se od vseh sevov najbolj razlikuje. Pri njem smo kot glavne MKA določili C15:0, a-C15:0, DMA a-C17:0, DMA C17:1 in C13:0.

Preglednica 12: Delež (% celotne površine) posameznih MKA pri sevih iz vrste *B. fibrisolvens* po rasti v gojišču 330

okrajšava MKA	ECL	oznaka seva					
		3071 ^T	LFO5	JK642	LFO4	JK651	JK623
C11:0	11,00	n	n	n	n	n	1,6
C13:0	13,00	n	n	n	tr	n	5,0
?C14:1	13,96	n	n	tr	tr	tr	0,5
C14:0	14,00	1,2	1,5	0,6	1,4	2,9	0,6
?C13:0 3OH	14,50	n	n	n	n	n	1,2
DMA C14:0	14,54	1,2	1,7	tr	tr	0,9	n
i-C15:0	14,66	0,6	tr	tr	tr	tr	n
a-C15:0	14,74	n	n	tr	tr	0,5	13,6
C15:1 Y	14,91	1,1	0,8	0,8	tr	1,0	n
C15:0	15,00	2,7	3,2	5,2	9,3	1,7	21,1
DMA i-C15:0	15,20	0,6	0,8	n	n	n	n
DMA a-C15:0	15,28	0,9	0,8	0,6	tr	0,6	2,9
DMA C15:0	15,54	1,3	2,2	1,7	3,3	0,6	4,5
i-C16:0	15,66	n	n	0,6	0,7	tr	1,3
a-C16:0	15,74	tr	tr	0,9	tr	tr	1,4
C16:1 c9	15,79	tr	tr	1,4	1,2	5,8	tr
C16:1 C	15,87	0,5	tr	0,9	1,0	0,9	tr
?C16:1	15,91	tr	n	0,9	0,6	0,6	tr
C16:0	16,00	35,2	38,6	21,5	23,2	29,5	1,8
neznana	16,08	tr	tr	0,5	tr	tr	n
DMA a-C16:0	16,26	tr	tr	n	tr	tr	1,5
DMA C16:1 c9	16,31	2,3	3,5	2,5	3,6	9,7	n
DMA C16:1 C	16,39	tr	0,6	tr	tr	tr	n
DMA C16:0	16,54	11,8	14,9	9,4	11,2	16,2	0,7
i-C17:0	16,66	3,3	1,6	2,8	1,7	1,6	tr
C17:1	16,72	n	n	n	n	n	4,4
a-C17:0	16,73	tr	tr	1,3	1,3	tr	4,3
C17:1 C	16,83	1,2	0,8	2,5	1,3	0,7	n
C17:1 X	16,89	0,6	tr	0,6	0,7	tr	n
C17:0	17,00	4,7	3,5	8,2	7,0	2,2	2,6
DMA C17:1	17,23	n	n	n	n	n	9,7
DMA a-C17:0	17,25	0,9	0,7	1,9	2,0	tr	10,1
DMA C17:1 C	17,35	2,6	2,2	5,4	6,6	1,3	tr
DMA C17:0	17,54	2,0	2,3	4,2	5,2	0,9	4,5
?C18:1 c11	17,79	3,6	2,2	4,8	1,0	4,6	n
C18:0	18,00	1,0	0,7	2,1	0,7	0,7	tr
?DMA C18:1 c11	18,31	14,3	11,4	11,1	8,6	11,2	tr
DMA C18:1 B	18,40	tr	tr	0,6	tr	tr	n
DMA C18:0	18,54	1,0	1,2	0,9	0,6	tr	n

n-ni prisotna

tr-delež je manjši od 0,5%

?- najbolj verjetna MKA

Pri primerjavi skupnih deležev MKA so sevi LFO5, JK642, LFO4 in JK651 podobni tipskemu sevu. Vsi imajo največ nerazvejanih nasičenih in zelo malo razvejanih MKA (pregl. 13). Največjo podobnost s tipskim sevom opazimo pri sevu LFO5. Seva JK642 in LFO4 se od tipskega seva razlikujeta po razmerju nerazvejanih nasičenih MKA s sodim in lihim številom C atomov. To razmerje je v tipskem sevu približno 5, pri sevih JK642 in LFO4 pa se zniža pod 2. Sev JK651 ima od tipskega seva skoraj 2-krat manj nerazvejanih nasičenih MKA z lihim številom C atomov, 2-krat manj razvejanih MKA in 40 % več nenasičenih MKA.

Od vseh sevov se sev JK623 najbolj razlikuje. Največjo razliko opazimo v deležu razvejanih MKA, katerih je skoraj 6-krat več kot v tipskem sevu. Povečanje deleža MKA tega tipa je na račun anteizo razvejanih MKA. Nerazvejanih nasičenih MKA je nekoliko manj kot v ostalih sevih, večino pa predstavljajo tiste z lihim številom C atomov. Nenasičenih MKA je 2-krat manj kot v tipskem sevu.

Preglednica 13: Skupni deleži (% celotne površine) MK, MA, nerazvejanih nasičenih, nerazvejanih nasičenih s sodim in lihim številom C atomov, razvejanih, izo in anteizo razvejanih in nenasičenih MKA pri sevih iz vrste *B. fibrisolvens* po rasti v gojišču 330

skupina MKA	oznaka seva					
	3071 ^r	LFO5	JK642	LFO4	JK651	JK623
MK	55,7	52,9	55,2	51,1	52,9	59,4
MA	39,1	42,2	38,2	41,1	41,4	33,9
nerazvejane nasičene	62,0	69,7	53,8	61,8	55,8	42,4
nerazvejane nasičene s sodim št. C atomov	51,3	58,6	34,5	37,1	50,3	3,0
nerazvejane nasičene z lihim št. C atomov	10,7	11,1	19,3	24,7	5,5	39,3
razvejane skupaj	6,5	3,9	8,1	5,7	2,7	35,0
izo razvejane	4,6	2,4	3,5	2,4	1,6	1,3
anteizo razvejane	1,9	1,5	4,6	3,3	1,2	33,7
nenasičene	26,3	21,5	31,6	24,6	35,8	14,6

4.3.2 Sestava maščobnih kislin in maščobnih aldehydov pri sevih iz vrste *P. xylanivorans*

Razlike v sestavi MKA znotraj vrste *P. xylanivorans* smo ugotavljali pri osmih sevih. Sevi LFO3, 10317, 10296, Mz8 in OR38b iz vrste *P. xylanivorans* so po sestavi MKA večinoma zelo podobni tipskemu sevu (pregl. 14). Deleži glavnih MKA so pri njih zelo podobni. Sev OR38b se razlikuje po 2-krat večjem deležu DMA C16:0, več pa ima tudi DMA i-C17:0. Seva CE51 in JK663 sta si po sestavi MKA med seboj bolj podobna, saj imata v primerjavi z ostalimi sevi vsaj 2-krat več C15:0, več imata tudi DMA C15:0, 2-krat manj pa i-C17:0.

Sev JK10/1 se po sestavi MKA najbolj razlikuje od ostalih sevov. Kot glavne MKA smo določili: C16:0, C19:0 cyc11,12, C18:1 c11 in DMA C19:0 cyc11,12. V primerjavi z ostalimi sevi ima 2-krat več C16:0. Velik delež (28,5 %) pa predstavlja tudi C19:0 cyc11,12, ki je pri drugih sevih ne najdemo.

Preglednica 14: Delež (% celotne površine) posameznih MKA pri sevih iz vrste *P. xylanivorans* po rasti v gojišču 330

okrajšava MKA	ECL	oznaka seva								
		Mz5 ^T	CE51	JK663	LFO3	10317	10296	Mz8	OR38b	JK10/1
C12:0	12,00	n	tr	tr	0,7	tr	tr	tr	n	n
DMA C12:0	12,55	n	tr	tr	0,6	tr	tr	tr	n	n
i-C13:0	12,66	0,7	tr	tr	1,3	1,6	1,3	0,9	n	n
C13:0	13,00	n	tr	0,7	tr	tr	tr	n	n	n
DMA i-C13:0	13,21	tr	tr	tr	1,2	0,6	0,9	1,1	tr	n
?DMA C13:1 c12	13,50	0,5	tr	tr	n	tr	tr	tr	tr	n
DMA C13:0	13,55	1,2	0,7	1,0	1,1	2,0	0,7	2,4	tr	n
i-C14:0	13,66	n	tr	n	n	tr	tr	n	0,7	n
C14:1 Y	13,91	0,6	tr	tr	n	1,1	tr	1,2	tr	n
? C14:1	13,96	n	n	0,6	n	n	n	0,6	1,0	1,8
C14:0	14,00	1,8	2,0	2,9	3,5	3,3	2,9	3,3	1,3	4,5
DMA C14:0	14,54	1,3	1,5	1,9	2,4	1,7	1,9	2,4	2,7	n
i-C15:0	14,66	6,7	8,8	8,3	6,9	9,1	8,3	7,0	6,8	n
a-C15:0	14,74	tr	0,7	0,7	n	0,7	0,8	n	0,9	tr
C15:1 Y	14,91	0,9	0,6	0,9	1,0	1,1	0,9	0,9	tr	n
C15:0	15,00	3,6	12,4	11,3	5,4	5,7	5,5	6,5	3,5	1,2
DMA i-C15:0	15,20	13,7	11,0	10,6	19,4	13,4	17,5	19,4	19,8	n
DMA a-C15:0	15,28	2,2	2,2	2,2	1,9	2,3	2,2	2,1	2,4	tr
DMA C15:0	15,54	2,1	5,1	5,2	1,7	2,3	2,0	2,1	4,9	n
i-C16:0	15,66	0,9	tr	tr	tr	1,1	0,6	0,6	0,6	n
C16:1 e9	15,79	n	tr	tr	n	tr	tr	n	tr	4,6
C16:1 t9	15,84	n	n	n	n	n	n	n	n	1,0
? C16:1	15,91	tr	tr	tr	n	0,6	tr	n	tr	n
C16:0	16,00	16,8	16,7	14,2	14,4	14,9	14,4	16,3	12,3	31,3
neznana	16,11	n	n	tr	n	n	n	n	tr	0,7
DMA i-C16:0	16,18	tr	tr	tr	n	tr	tr	n	0,7	tr
DMA C16:1 e9	16,31	1,8	1,5	2,5	1,8	2,0	2,4	1,6	1,8	tr
?DMAC16:1	16,47	tr	tr	tr	tr	tr	tr	n	tr	0,7
DMA C16:0	16,54	2,6	3,4	3,7	1,5	1,9	2,3	1,2	6,5	1,0
i-C17:0	16,66	14,4	6,2	4,6	11,9	11,3	8,8	12,5	13,3	n
a-C17:0	16,73	3,6	1,2	0,9	2,1	2,7	2,2	2,0	2,3	n
C17:1 C	16,83	0,7	1,3	1,3	0,9	1,1	1,0	0,7	tr	n
C17:0cyc-9,10	16,86	n	n	n	n	n	n	n	n	0,7
C17:1 X	16,89	2,4	0,8	1,2	2,4	1,9	1,9	1,6	tr	n
C17:0	17,00	3,7	5,4	4,3	3,2	2,9	2,5	3,5	1,6	0,9
DMA i-C17:0	17,17	5,8	3,0	3,7	3,9	3,5	4,4	3,1	8,6	n
DMA a-C17:0	17,25	1,6	0,6	0,7	1,0	1,1	1,2	0,6	1,3	n
DMA C17:1 C	17,35	1,2	3,9	4,6	1,6	1,0	1,3	1,0	0,8	n
DMA C17:0	17,54	0,6	1,5	1,7	tr	tr	tr	n	0,6	n

se nadaljuje

nadaljevanje pregl. 14

okrajšava MKA	ECL	oznaka seva								
		Mz5 ^f	CE51	JK663	LFO3	10317	10296	Mz8	OR38b	JK10/1
?C18:1 c11	17,79	0,8	tr	tr	0,8	1,1	0,8	0,8	n	6,4
C18:0	18,00	n	tr	tr	n	tr	tr	n	tr	3,5
?DMA C18:1 c11	18,31	4,4	1,6	2,0	5,0	2,6	3,9	3,3	tr	1,0
DMA C18:0	18,54	n	tr	tr	n	n	tr	n	tr	0,7
C19:0 cyc 11,12	18,87	n	n	n	n	n	n	n	n	28,5
DMA C19:0cyc11,12	19,39	n	n	n	n	n	n	n	n	5,8
C18:0 3OH	19,59	n	n	n	n	n	n	n	n	0,8
i-C20:0	19,65	n	n	n	n	n	n	n	n	0,7

n-ni prisotna

tr-delež je manjši od 0,5%

?- najbolj verjetna MKA

Vsi sevi vrste *P. xylanivorans* razen seva JK10/1 imajo zelo veliko razvejanih MKA (pregl.15). Pri tipskem sevu in pri sevih LFO3, 10317, 10296, Mz8 in OR38b predstavljajo razvejane približno polovico vseh MKA, pri sevih CE51 in JK663 pa skoraj tretjino. Pri vseh naštetih sevih najdemo predvsem izo razvejane MKA z lihimi številom C atomov. Nerazvejanih nasičenih MKA je pri sevih CE51 in JK663 približno polovica, pri ostalih sevih, razen JK10/1, pa dobra tretjina. Med njimi je pri sevih CE51 in JK663 polovica tistih s sodim, polovica pa z lihimi številom C atomov. Pri ostalih sevih pa je približno 2-krat več MKA s sodim številom C atomov. V obeh skupinah je približno desetina nenasičenih MKA, razen pri sevu OR38b, kjer je njihov delež 2-krat manjši.

Sev JK 10/1 se od ostalih sevov najbolj razlikuje. Ima velik delež MK in majhen delež MA. Podobno kot ostali sevi ima veliko nerazvejanih nasičenih MKA, ki pa imajo predvsem sodo število C atomov. Za razliko od ostalih sevov ima zelo malo razvejanih MKA (0,7 %).

Preglednica 15: Skupni deleži (% celotne površine) MK, MA, nerazvejanih nasičenih, nerazvejanih nasičenih s sodim in lihimi številom C atomov, razvejanih, izo in anteizo razvejanih in nenasičenih MKA pri sevih iz vrste *P. xylanivorans* po rasti v gojišču 330

okrajšava MKA	oznaka seva								
	Mz5 ^T	CE51	JK663	LFO3	10317	10296	Mz8	OR38b	JK10/1
MK	58,0	56,1	51,8	54,4	60,3	51,7	58,6	44,4	85,9
MA	39,0	35,8	40,6	43,0	34,5	40,8	40,2	50,1	9,3
nerazvejane nasičene	33,7	48,7	46,8	34,5	34,8	32,2	37,7	33,5	43,0
nerazvejane nasičene s sodim	22,5	23,6	22,7	23,0	21,8	21,4	23,3	22,8	41,0
št. C atomov									
nerazvejane nasičene z lihimi	11,2	25,1	24,1	11,5	13,0	10,7	14,4	10,6	2,1
št. C atomov									
razvejane skupaj	49,9	33,6	31,7	49,5	47,5	48,2	49,3	57,5	0,7
izo razvejane	42,4	28,9	27,2	44,5	40,8	41,7	44,5	50,5	0,7
anteizo razvejane	7,5	4,7	4,5	5,0	6,8	6,4	4,8	7,0	0,0
nenasičene + ciklo	13,4	9,6	13,8	13,5	12,5	12,2	11,8	3,6	50,6

• ciklične MKA smo določili le pri sevu JK10/1

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Sestava gojišča lahko vpliva na profile MKA bakterijskih celic. Te profile uporabljamo kot prstne odtise (finger print) posameznih vrst bakterij (Zakhia in sod., 2006) in jih tako lahko uporabljamo za njihovo taksonomsko razlikovanje. Z ustrežno izbiro gojišča lahko izboljšamo zanesljivost ločevanja med posameznimi taksoni. To so ugotovili npr. pri vrstah *Bacillus anthracis* in *Bacillus cereus*. Če sta vrsti rasli na kompleksnem gojišču, sta imeli skoraj identična profila MKA. Pri rasti na sintetičnem gojišču pa so vrsti lahko razlikovali po profilu MKA. Vrsta *B. anthracis* je imela približno enako razmerje izo in anteizo MK z lihim številom C atomov, medtem ko je vrsta *B. cereus* imela vsaj 2-krat več izo kot anteizo razvejanih MK (Lawrence in sod., 1991).

Pri sevih iz vrst *B. fibrisolvens* in *P. xylanivorans*, ki so jih gojili v gojišču M2 z vampnim sokom, so ugotovili, da imajo skoraj enak profil celičnih MKA (Zorec, 2006). Ugotovili so tudi, da uporaba gojišča z večjo vsebnostjo kratkoverižnih MK izboljša ločevanje med omenjenima bakterijskima vrstama po profilu celičnih MKA. Spremenjena vsebnost kratkoverižnih MK (predvsem razvejanih) v gojišču naj bi vplivala na skupni delež celičnih razvejanih dolgoverižnih MKA le pri sevih iz vrste *P. xylanivorans*, pri sevih iz vrste *B. fibrisolvens* pa ne. Moore in sodelavci (1994) so namreč pri tipskem sevu *B. fibrisolvens* ugotovili, da v gojišču z večjo količino razvejanih kratkoverižnih MK ni spremenil sestave celičnih dolgoverižnih MKA.

V naši raziskavi smo tako želeli ugotoviti, ali bi rast tipskih sevov vrst *B. fibrisolvens* 3071^T in *P. xylanivorans* Mz5^T v gojišču z večjo vsebnostjo kratkoverižnih MK omogočila lažje ločevanje vrst. Zanimalo nas je, ali in kako vrsti spremenita sestavo celičnih dolgoverižnih MKA v membranah po rasti v različnih gojiščih in v različnih fazah rasti, in ali prihaja med vrstama do razlik. Tipska seva vrst *B. fibrisolvens* 3071^T in *P. xylanivorans* Mz5^T smo gojili v gojišču 330, ki ima v primerjavi z gojiščem M2 večjo vsebnost kratkoverižnih MK. Oba tipska seva vrst smo gojili še v treh gojiščih 330 z nekoliko spremenjeno kemijsko sestavo. Prvo je v primerjavi z osnovnim gojiščem 330 vsebovalo manj kratkoverižnih MK. V drugem gojišču smo v primerjavi s prvim še dodatno zmanjšali vsebnost razvejanih kratkoverižnih MK. V tretjem gojišču pa smo v primerjavi z osnovnim zmanjšali vsebnost sladkorjev. Predvsem nas je zanimalo, ali in kako se bosta vrsti odzvali na spremenjene količine kratkoverižnih in razvejanih kratkoverižnih MK v teh gojiščih. Povečane količine kratkoverižnih MK v gojišču lahko namreč povečajo vsebnost določenih dolgoverižnih MK v bakterijskih celicah, saj lahko bakterije kratkoverižne MK (nerazvejane in razvejane) uporabijo kot prekursorje za sintezo ustreznih celičnih dolgoverižnih MKA. To so ugotovili pri mnogih vampnih bakterijah (Wegner in Foster, 1962; Allison in sod., 1962a, 1962b) kot tudi pri *B. subtilis* (Kaneda, 1963). Dobljene rezultate smo primerjali z literaturnimi podatki podobne študije v gojišču M2 (Zorec, 2006).

Pri tipskem sevu *B. fibrisolvens* 3071^T, ki je rasel v gojišču M2, so kot glavne MKA določili C16:0, DMA C18:1 c11, DMA C16:0 in C18:1 c11 (Zorec, 2006). Z rastjo seva v gojišču 330, ki vsebuje v primerjavi z gojiščem M2 več kratkoverižnih MK, smo kot glavne MKA določili C16:0, DMA C18:1 c11 in DMA C16:0 (pregl. 4). V obeh gojiščih je bilo največ C16:0, njen delež je bil primerljiv (dobrih 30 %), prav tako je bila primerljiva

vsebnost ustreznega aldehida. Deleža C18:1 c11 in DMA C18:1 c11 sta bila v celicah z gojišča 330 skoraj 2-krat manjša kot ob uporabi gojišča M2. Sestava celičnih MKA se je kvalitativno in približno tudi kvantitativno skladala z analizami drugih laboratorijev (Moore in sod., 1994; Whitford in sod., 2001). *B. fibrisolvens* je bil vključen še v več raziskav sestave celičnih MKA, vendar pa pri njih niso določili maščobnih aldehydov (Ifkovits in Ragheb, 1968; Kunsman, 1970).

Z rastjo seva *B. fibrisolvens* 3071^T v gojišču 330 z manjšo vsebnostjo kratkoverižnih MK, gojišču 330 z manjšo vsebnostjo razvejanih kratkoverižnih MK in gojišču 330 z manjšo vsebnostjo sladkorjev nismo opazili bistvenih razlik v deležih glavnih MKA v primerjavi z osnovnim gojiščem 330 (pregl. 4). Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da vsebnost kratkoverižnih MK v gojišču ne vpliva na profile celičnih MKA pri *B. fibrisolvens* 3071^T. To se sklada z ugotovitvami Moore in sodelavcev (1994), ki so ugotovili, da sev v gojišču z večjo vsebnostjo kratkoverižnih MK ni spremenil sestave celičnih dolgoverižnih MKA. Pri tej vrsti prav tako lahko izključimo vpliv sladkorjev na sestavo MKA. Manjših razlik v profilu MKA pri *B. fibrisolvens* 3071^T gojenem v gojiščih M2 in 330 ne moremo z gotovostjo pripisati razlikam v sestavi kratkoverižnih MK v gojiščih. Enake razlike opazimo v profilih celičnih MKA z gojišč M2 in drugega spremenjenega gojišča 330B z zmanjšano vsebnostjo razvejanih kratkoverižnih MK. Zaznane manjše razlike v profilu celičnih dolgoverižnih MKA se tako lahko pojasnijo z razliko v sestavi drugih sestavin gojišča (vampni sok, pepton, kvasni ekstrakt) ali pa so posledica eksperimentalne napake. Tudi pri analizi skupnih deležev skupin MKA v vseh štirih spremenjenih gojiščih 330 dobimo zelo podobne deleže posameznih skupin MKA (pregl. 5). Glavno skupino predstavljajo nerazvejane MKA, od katerih je 5-krat več tistih s sodim številom C atomov, nato sledijo nenasičene in razvejane MKA. Sestava celičnih MKA v gojišču M2 daje podobno razmerje med MK in MA. Vsebnost nerazvejanih nasičenih MKA pa je manjša na račun povečane vsebnosti nenasičenih MKA v primerjavi z gojišči serije 330. Opažene manjše razlike lahko ponovno pripišemo razliki v sestavi drugih sestavin gojišča ali pa eksperimentalni napaki.

Ker sta se tipska seva vrst *B. fibrisolvens* in *P. xylanivorans* različno odzvala na povečano vsebnost kratkoverižnih MK v gojišču, smo želeli ugotoviti, kako se na povečano vsebnost kratkoverižnih MK odzovejo še nekateri drugi sevi iz teh dveh vrst. V gojišču M2, ki vsebuje v primerjavi z gojiščem 330 manj kratkoverižnih MK, so imeli sevi podobne profile celičnih MKA. Z gojitvijo sevov v gojišču 330 smo opazili, da so se sevi podobno odzvali na povečano vsebnost kratkoverižnih MK v gojišču kot tipski sev. Sklepamo lahko, da bi se tudi v gojiščih 330 s spremenjeno vsebnostjo kratkoverižnih MK odzvali na enak način. Pri primerjavi sestave dolgoverižnih MKA sevov teh dveh vrst gojenih v gojišču 330 in M2 pa smo ugotovili nekoliko drugačno podobnost med njimi.

Pri sevih iz vrste *B. fibrisolvens* gojenih v gojišču 330 smo opazili največje razlike v profilu celičnih MKA med tipskim sevom in sevom JK623 (pregl. 12 in 13). Pri podobni študiji v gojišču M2 (Zorec, 2006) so opazili le manjše razlike med posameznimi sevi. Najbolj podobni so si bili sevi 3071^T, LFO5 in JK623. Drugo skupino sta tvorila JK642 in JK651. Sev LFO4 pa se je po profilu MKA od ostalih sevov najbolj razlikoval. Grupiranje teh sevov v gojišču 330 je bilo drugačno. Prvo skupino so tvorili sevi 3071^T, LFO5 in JK651. V drugo skupino lahko uvrstimo seva LFO4 in JK642. Le sestava celičnih MKA

seva JK623 ni več podobna tipskemu sevu in ga verjetno po sestavi celičnih MKA ne bi uvrstili v to vrsto. Lahko, da je prišlo do zamenjave seva, kontaminacije ali eksperimentalne napake. Analizo bi morali ponoviti, da bi ugotovili, ali se res razlikuje. Opaženo ločevanje med sevi rodu *Butyrivibrio* ni presenetljivo in je v skladu z opažanji drugih avtorjev, ki so opisali večjo nehomogenost v sevih v tem rodu (Marinšek Logar, 2001; Miyagawa, 1982). Iz tega je razvidno, da je potrebno pri taksonomskih študijah opraviti določevanje profilov celičnih MKA v različnih gojiščih, saj nam to lahko omogoča razlikovanje med posameznimi sevi. Tako razlikovanje med sevi je lahko pomembno, saj je znano, da lahko določene seve te vrste uporabljamo kot probiotike pri živalih (Fukuda in sod., 2005 in 2006).

Da bi ugotovili, ali opisane zakonitosti veljajo le za vrsto *B. fibrisolvens*, smo v spremenjenih gojiščih 330 gojili tipski sev vrste *B. hungatei* JK615^T. Profil MKA tipskega seva *B. hungatei* JK615^T se z rastjo v različnih gojiščih prav tako ni razlikoval (pril. A2 in A3). Vrste iz rodu *Butyrivibrio*, kot kaže, ne spreminjajo sestave celičnih dolgoverižnih MKA glede na vsebnost kratkoverižnih MK v gojišču, kar pomeni, da jih verjetno ne uporabljajo kot prekurzorje.

Postopek testiranja vpliva kemijske sestave gojišč na sestavo celičnih dolgoverižnih MKA smo ugotavljali tudi pri tipskem sevu *P. xylanivorans* Mz5^T. Tokrat smo opazili drugačen odziv na spremembe v sestavi gojišča. Vsebnosti razvejanih dolgoverižnih MKA (i-C15:0, DMA i-C15:0, i-C17:0 in DMA i-C17:0) so se zmanjševale z zmanjševanjem njihovih kratkoverižnih prekurzorjev v gojiščih (pregl. 6). Sočasno smo opazili povečevanje vsebnosti C16:0 in DMA C18:1 c11. Z zmanjševanjem vsebnosti kratkoverižnih MK v gojišču se zmanjšuje vsebnost razvejanih dolgoverižnih MKA ter povečuje vsebnost nerazvejanih in nenasičenih MKA (pregl. 7). Različna vsebnost sladkorjev v gojišču ne vpliva na sestavo celičnih MKA pri *P. xylanivorans* Mz5^T, saj gojišče z manjšo vsebnostjo sladkorjev daje zelo primerljive rezultate v primerjavi z osnovnim gojiščem 330.

Rezultate smo primerjali s predhodno študijo (Zorec, 2006), v kateri so opravili analizo istega seva zraslega v gojiščih M2 in 330. Profili celičnih MKA tipskega seva *P. xylanivorans* Mz5^T gojenega v gojišču 330 v naši raziskavi, so zelo podobni profilom celičnih MKA tega seva gojenega v istem gojišču v raziskavi Zorec 2006. Razlika v sestavi celičnih MKA v gojiščih 330 in M2 je očitna. Pri tipskem sevu *P. xylanivorans* Mz5^T je bilo v gojišču 330 v primerjavi z gojiščem M2 približno 5-krat več i-C15:0 in njenega aldehida, skoraj 6-krat več i-C17:0 in 3-krat več DMA i-C17:0. Manj pa je bilo C16:0, DMA C18:1 c11 in DMA C16:0. Pri primerjavi skupnih deležev MKA v obeh gojiščih smo ugotovili, da je bilo v gojišču 330 5-krat več razvejanih MKA, od katerih so bile predvsem izo razvejane. Nerazvejanih nasičenih je bilo 2-krat manj, od tega je bilo 2-krat več tistih s sodim številom C atomov. Delež nenasičenih MKA pa je bil v obeh gojiščih podoben. Kot vidimo, so bili spremenjeni profili posameznih MKA. V seriji spremenjenih gojišč 330 ima gojišče 330B zelo podobno sestavo kratkoverižnih MK kot gojišče M2. Ker sta gojišči 330B in M2 po sestavi kratkoverižnih MK zelo podobni, se tudi sestava celičnih MKA bistveno ne razlikuje.

Postopek določevanja profilov celičnih MKA pri različnih sevih gojenih v gojišču 330 smo napravili tudi pri vrsti *P. xylanivorans*. Primerjali smo naslednje seve: Mz5^T, CE51,

JK663, LFO3, 19317, 10296, Mz8, OR38b in JK10/1, od katerih je bilo za prvega predlagano, da je potencialni probiotik (Čepeljnik in sod., 2003). Znotraj naštetih sevov smo identificirali 3 podskupine (pregl. 14 in 15). Prvo skupino so sestavljali tipski sev, LFO3, 10317, 10296, Mz8 in OR38b. Drugo skupino sta sestavljala CE51 in JK663 z 2-krat večjo vsebnostjo C15:0 in 2-krat manjšo i-C17:0. JK10/1 je tvoril ločeno podskupino. Primerjalna študija v gojišču M2 ni pokazala značilnih razlik med posameznimi sevi. V tej študiji je izstopal le sev JK10/1. Na ta način smo potrdili hipotezo, da ustrezna izbira gojišča omogoča ločevanje celo med posameznimi sevi.

Opisane ugotovitve smo preverili pri tipskem sevu druge vrste rodu *Pseudobutyrvibrio*. Pri eksperimentu v različnih gojiščih smo uporabili tipski sev *P. ruminis* 9787^T. Z rastjo seva v različnih gojiščih smo opazili bistvene spremembe v profilu celičnih MKA (pril. A5 in A6). Podobno kot pri *P. xylanivorans* Mz5^T se je skupni delež razvejanih MKA zmanjševal ustrezno z zmanjševanjem vsebnosti kratkoverižnih MK v gojiščih. Obenem opazimo ustrezno povečevanje nerazvejanih MKA. Profila MKA med vrstama rodu *Pseudobutyrvibrio* se med seboj razlikujeta. Kot kaže, vrste iz rodu *Pseudobutyrvibrio* za sintezo celičnih dolgoverižnih MKA iz okolja aktivno privzemajo kratkoverižne MK, ki jih uporabijo kot prekurzorje.

Znano je, da lahko faza rasti vpliva na sestavo celičnih MKA (Rees in sod., 1995; Martínez in sod., 2003; Matsuno in sod., 2009), kar bi lahko otežilo identifikacijo posameznih vrst, če sevov ne bi primerjali v enaki fazi rasti. Pri tipskih sevih *B. fibrisolvens* 3071^T in *P. xylanivorans* Mz5^T smo zato preverili odvisnost profilov celičnih MKA od faze rasti. Profile celičnih MKA smo določili po 12-ih, 24-ih in 48-ih urah od gojitve v gojišču 330. Pri nobeni vrsti nismo opazili, da bi se profil celičnih MKA v omenjenem časovnem obdobju pomembno spreminjal (pregl. 8, 9, 10, 11), vendar pa se pri *P. xylanivorans* Mz5^T kažejo delne spremembe (pregl. 11), ki pa so lahko posledica neupoštevanja MKA v sledovih v skupnih deležih. V literaturi smo zasledili (Čepeljnik in sod., 2003), da sev *P. xylanivorans* Mz5^T doseže srednjo eksponentno fazo po 10-ih urah in stacionarno fazo po 20-ih urah. Iz tega lahko sklepamo, da smo opisan eksperiment dejansko izvedli v različnih fazah rasti.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je odziv na vsebnost kratkoverižnih MK v gojišču rodovna značilnost. Rast sevov v gojišču 330 lahko bistveno izboljša ločevanje vrst *B. fibrisolvens* in *P. xylanivorans*, ki jih sicer v gojišču z vampnim sokom nismo zadovoljivo ločili.

Na podlagi rezultatov lahko podamo naslednje zaključke:

- vrsta gojišča ni vplivala na sestavo dolgoverižnih MKA *Butyrivibrio fibrisolvens* 3071^T in *Butyrivibrio hungatei* JK615^T
- na sestavo dogoverižnih MKA *Pseudobutyrvibrio ruminis* 9787^T in *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T je vplivala vsebnost kratkoverižnih MK v gojišču. V gojišču z manjšo vsebnostjo kratkoverižnih in razvejanih kratkoverižnih MK smo pri sevih opazili zmanjšanje deleža razvejanih MKA
- s fazo rasti se sestava dolgoverižnih MKA sevov *Butyrivibrio fibrisolvens* 3071^T in *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T ni spreminjala
- ustrezna izbira gojišča omogoča kemotaksonomsko ločevanje sevov vrst *Butyrivibrio fibrisolvens* in *Pseudobutyrvibrio xylanivorans*.

6 POVZETEK

Profili celičnih dolgoverižnih maščobnih kislin in maščobnih aldehydov (MKA) so pomemben kemotaksonomski znak in jih uporabljamo v identifikaciji in klasifikaciji mikroorganizmov. Posamezne vrste in pogosto celo sevi bakterij imajo značilne profile MKA, kar nam omogoča njihovo razlikovanje. Pri sevih iz vrst *Butyrivibrio fibrisolvens* in *Pseudobutyrvibrio xylanivorans*, ki so jih gojili v gojišču M2, so ugotovili, da imajo zelo podoben profil, ki ne omogoča zanesljivega razlikovanja. Z ustrežno izbiro gojišča bi lahko izboljšali razlikovanje med njimi.

Tipska seva *B. fibrisolvens* 3071^T in *P. xylanivorans* Mz5^T smo gojili v gojišču 330, ki vsebuje v primerjavi z gojiščem M2 več kratkoverižnih MK. Poleg gojišča 330 smo seva gojili še v treh spremenjenih gojiščih 330: gojišču, ki je v primerjavi z osnovnim gojiščem 330 vsebovalo manj kratkoverižnih MK, gojišču, ki je v primerjavi s prejšnjim vsebovalo manj razvejanih kratkoverižnih MK in gojišču, ki je v primerjavi z osnovnim gojiščem 330 vsebovalo manj sladkorjev. Drugo spremenjeno gojišče 330 je imelo vsebnost kratkoverižnih MK skoraj enako kot gojišče M2. V raziskavi smo želeli ugotoviti, ali in kako sprememba sestave gojišča vpliva na sestavo celičnih dolgoverižnih MKA, in ali se vrsti različno odzoveta na spremembo v sestavi gojišča.

Ugotovili smo, da se pri tipskem sevu *B. fibrisolvens* 3071^T sestava dolgoverižnih MKA v različnih spremenjenih gojiščih 330 ni bistveno razlikovala. Sklepamo lahko, da vsebnost kratkoverižnih MK in sladkorjev v gojišču ne vplivata na profil celičnih MKA pri sevu *B. fibrisolvens* 3071^T. Opazili smo manjše razlike v profilu celičnih MKA v primerjavi z gojiščem M2, vendar so bile te spremembe bolj verjetno posledica razlike v sestavi drugih sestavin gojišča (vampni sok, pepton, kvasni ekstrakt). Podoben odziv med sestavo gojišča in profili celičnih MKA smo opazili tudi pri *B. hungatei* JK615^T, zato lahko sklepamo, da je neodvisnost profila celičnih MKA od vsebnosti kratkoverižnih MK v gojišču lastnost celotnega rodu.

Raziskavo smo ponovili z rodом *Pseudobutyrvibrio*. Tokrat smo opazili značilne razlike v profilih celičnih MKA za *P. xylanivorans* Mz5^T in *P. ruminis* 9787^T gojenih v gojiščih 330 kot tudi v primerjavi rezultatov z osnovnega gojišča 330 in podatki za gojišče M2 iz literature. Razlik pri različni vsebnosti sladkorjev nismo opazili. Razlike v vsebnostih MKA v obeh vrstah gojenih v gojiščih 330 in M2 ne moremo iskati le v različni vsebnosti kratkoverižnih MK, saj smo opazili značilne razlike tudi ob primerjavi rezultatov z gojišča 330 z manj razvejanimi MK in gojišča M2. Omenili smo že, da ti gojišči vsebujeta skoraj enako sestavo vseh kratkoverižnih MK. Razlike med tema gojiščema lahko tako iščemo le v razliki v sestavi ostalih hranil. Ker sta se obe vrsti znotraj rodu enako odzivali na spremembe v sestavi kratkoverižnih MK v gojišču, lahko sklepamo, da je opisan odziv lastnost rodu.

Pri tipskih sevih *B. fibrisolvens* 3071^T in *P. xylanivorans* Mz5^T smo preverili tudi spremembe v sestavi celičnih dolgoverižnih MKA v odvisnosti od faze rasti. V celotnem obdobju raziskave od 12 do 48 ur nismo zaznali značilnih razlik.

Pri obeh vrstah *B. fibrisolvens* in *P. xylanivorans* smo analizirali profile celičnih MKA v osnovnem gojišču 330 za več sevov. Uporaba gojišča 330 je omogočila razlikovanje sevov znotraj posameznih vrst nekoliko drugače kot v gojišču M2. Sevi iz obeh vrst pa so podobno spremenili profil celičnih MKA kot tipski sev. Sklepamo lahko, da bi se tudi v gojišču z različno vsebnostjo kratkoverižnih MK odzvali na enak način.

Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da bi seve iz vrst *B. fibrisolvens* in *P. xylanivorans* lahko bolj zanesljivo ločili v gojišču z večjo vsebnostjo kratkoverižnih MK, na katero bi se odzvali le sevi iz vrste *P. xylanivorans* s povečanim deležem razvejanih MKA. To bi omogočilo njihovo bolj zanesljivo razlikovanje in identifikacijo.

7 VIRI

- Allison M.J., Bryant M.P., Doetsch R.N. 1962a. Studies on the metabolic function of branched-chain volatile fatty acids, growth factors for ruminococci. I. Incorporation of isovalerate into leucine. *Journal of Bacteriology*, 83: 523:532
- Allison M.J., Bryant M.P., Katz I., Keeney M. 1962b. Metabolic function of branched-chain volatile fatty acids, growth factors for ruminococci. II. Biosynthesis of higher branched-chain fatty acids and aldehydes. *Journal of Bacteriology*, 83: 1084-1093
- Alvarez-Ordóñez A., Fernández A., López M., Bernardo A. 2009. Relationship between membrane fatty acid composition and heat resistance of acid and cold stressed *Salmonella sanftenberg* CECT 4384. *Food Microbiology*, 26: 347-353
- Annous B.A., Kozempel M.F., Kurantz M.J. 1999. Changes in membrane fatty acid composition of *Pediococcus* sp. strain NRRL B-2354 in response to growth conditions and its effect on thermal resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 7: 2857-2862
- Arai K., Kawaguchi A., Saito Y., Koike N., Seyama Y., Yamakawa T., Okuda S. 1982. Propionyl-CoA induced synthesis of even-chain-length fatty acids by fatty acid synthetase from *Brevibacterium ammoniagenes*. *Journal of Biochemistry*, 91, 1: 11-18
- Bryant M.P., Small N. 1956. The anaerobic monotrichous butyric acid-producing curved rod-shaped bacteria of the rumen. *Journal of Bacteriology*, 72: 16-21
- Bryant M.P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*, 25: 1324-1328
- Campbell M.K. 1999. *Biochemistry*. 3rd ed. Philadelphia, Harcourt Brace & Company: 1214 str.
- Chang Y.Y., Cronan J.E.Jr. 1999. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 33: 249-259
- Cheng K.J., Costerton J.W. 1977. Ultrastructure of *Butyrivibrio fibrisolvens*: a Gram-positive bacterium? *Journal of Bacteriology*, 129, 3: 1506-1512
- Chesson A., Forsberg C.W. 1997. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. V: The rumen microbial ecosystem. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Thomas science: 329-381
- Christie W.W. 2003. *Lipid analysis: Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids*. 3rd ed. Bridgewater, The Oily Press: 416 str.
- Christie W.W. 2009. *The lipid library*. Dundee, Scottish Crop Research Institute (november 2009)

- <http://www.lipidlibrary.co.uk/> (12. november 2009): 9 str.
- Cotta M.A. 1988. Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 3: 772-776
- Cotta M.A., Hespell R.B. 1986. Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 1: 51-58
- Čepeljnik T., Zorec M., Kostanjšek R., Nekrep F.V., Marinšek Logar R. 2003. Is *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* strain Mz5^T suitable as probiotic? An *in Vitro* study. *Folia Microbiologica*, 48, 3: 339-345
- Daron H.H. 1973. Nutritional alteration of the fatty acid composition of a thermophilic *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology*, 116, 3: 1096-1099
- Denich T.J., Beaudette L.A., Lee H., Trevors J.T. 2003. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods*, 52: 149-182
- Dionisi F., Golay P.-A., Elli M., Fay L.B. 1999. Stability of cyclopropane and conjugated linoleic acids during fatty acid quantification in lactic acid bacteria. *Lipids*, 34, 10: 1107-1115
- DSMZ. 2004. *Butyrivibrio fibrisolvens* DSM 3071: 330. Rumen bacteria medium. Braunschweig. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium330.pdf (13. februar 2006): 1 str.
- Dunlap K.R., Perry J.J. 1967. Effect of substrate on the fatty acid composition of hydrocarbon-utilizing microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 94, 6: 1919-1923
- Fozo E.M., Quivey R.G.Jr. 2004. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2: 929-936
- Freese E., Sass H., Rutters H., Schledjewski R., Rullkotter J. 2008. Variable temperature-related changes in fatty acid composition of bacterial isolates from German Wadden sea sediments representing different bacterial phyla. *Organic Geochemistry*. 39: 1427-1438
- Fukuda S., Furuya H., Suzuki Y., et al. 2005. A new strain of *Butyrivibrio fibrisolvens* that has high ability to isomerize linoleic acid to conjugated linoleic acid. *Journal of General and Applied Microbiology*, 51, 2: 105-113
- Fukuda S., Suzuki Y., Murai M., et al. 2006. Isolation of a novel strain of *Butyrivibrio fibrisolvens* that isomerizes linoleic acid to conjugated linoleic acid without hydrogenation, and its utilization as a probiotic for animals. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 4: 787-794

- Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T.G. 2005. Appendix 2. Taxonomic outline of the archaea and bacteria. V: Bergey's manual® of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 2. Part A. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (eds.). New York, Springer: 207-220
<http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200310> (3.marec 2004)
- Giotis E.S., McDowell D.A., Blair I.S., Wilkinson B.J. 2007. Role of branched-chain fatty acids in pH stress tolerance in *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology, 73, 3: 997-1001
- Grogan D.W., Cronan J.E.Jr. 1997. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 61, 4: 429-441
- Haque M., Hirai Y., Yokota K., Mori N., Jahan I., Ito H., Hotta H., Yano I., Kanemasa Y., Oguma K. 1996. Lipid profile of *Helicobacter* spp. presence of cholesteryl glucoside as a characteristic feature. Journal of Bacteriology, 178: 2065-2070
- Hespell R.B., Wolf R., Bothast R.J. 1987. Fermentations of xylans by *Butyrivibrio fibrisolvens* and other ruminal bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 53: 2849-2853
- Ifkovits R.W., Ragheb H.S. 1968. Cellular fatty acid composition and identification of rumen bacteria. Applied Microbiology, 16, 9: 1406-1413
- Ingram L.O. 1977. Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives. Applied and Environmental Microbiology, 33, 5: 1233-1236
- Ingram L.O., Chevalier L.S., Gabbay E.J., Ley K.D., Winters K. 1977. Propionate-induced synthesis of odd-chain-length fatty acids by *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 131, 3: 1023-1025
- Ivančič T., Vodovnik M., Marinšek-Logar R., Stopar D. 2009. Conditionong of the membrane fatty acid profile of *Escherichia coli* during periodic temperature cycling. Microbiology, 155: 3461-3463
- Kaneda T. 1963. Biosynthesis of branched-chain fatty acids. II. Microbial synthesis of branched long chain fatty acids from certain short chain fatty acid substrates. Journal of Biological Chemistry, 238, 4: 1229-1235
- Kaneda T. 1977. Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. Bacteriological Reviews, 41, 2: 391-418
- Kaneda T. 1991. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. Microbiological Reviews, 55, 2: 288-302

- Kim B.H., Kim S., Kim H.G., Lee J., Lee I.S., Park Y.K. 2005. The formation on cyclopropane fatty acids in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, 151: 209-218
- Kopečný J., Zorec M., Mrazek J., Kobayashi Y., Marinšek Logar R. 2003. *Butyrivibrio hungatei* sp. nov., and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate-producing bacteria from the rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 201-209
- Kunsman J.E. 1970. Characterization of the lipids of *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Bacteriology*, 103, 1: 104-110
- Lawrence D., Heitefuss S., H.S.H. Seifert. 1991. Differentiation of *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* by gas chromatographic whole-cell fatty acid analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 7: 1508-1512
- Leray C. 2009. Fatty acids. France, Cyberlipid Centre (november 2009) <http://www.cyberlipid.org/> (november 2009): 18 str.
- Männistö M.K., Puhakka J.A. 2001. Temperature- and growth-phase-regulated changes in the lipid fatty acid structures of psychrotolerant groundwater *Proteobacteria*. *Archives of Microbiology*, 177: 41-46
- Marr A.G., Ingraham J.L. 1962. Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 84, 6: 1260-1267
- Marinšek Logar R., Zorec M., Nekrep F.V. 2000. Isolation and characterization of *Butyrivibrio*-like rumen bacteria possessing high xylanolytic activity. *Reproduction, Nutrition, Development*, 40: 191-192
- Marinšek Logar R., Zorec M., Kopečný J. 2001. Reliable identification of *Prevotella* and *Butyrivibrio* spp. from rumen by fatty acid methyl ester profiles. *Folia Microbiologica*, 46, 1: 57-59
- Martínez S., López M., Bernardo A. 2003. Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. *Letters in Applied Microbiology*, 37: 475-481.
- Matsuno Y., Sugai A., Higashibata H., Fukuda W., Ueda K., Uda I., Sato I., Itoh T., Imanaka T., Fujiwara S. 2009. Effect of growth temperature and growth phase on the lipid composition of the archaeal membrane from *Thermococcus kodakaraensis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 73, 1: 104-108
- McGarrity J.T., Armstrong J.B. 1981. The effect of temperature and other growth conditions on the fatty acid composition of *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 27, 8: 835-840

- Mjøs S. A. 2003. Identification of fatty acids in gas chromatography by application of different temperature and pressure programs on a single capillary column. *Journal of Chromatography A*, 1015: 1515-161
- Moon M., Anderson K.L. 2001. *Eubacterium cellulosolvens* alters its membrane protein, lipoprotein, and fatty acid composition in response to growth on cellulose. *Anaerobe*, 7: 227-236
- Moore W.E.C., Johnson J.L., Holdeman L.V. 1976. Emendation of *Bacteroidaceae* and *Butyrivibrio* and descriptions of *Desulfomonas* gen nov. and ten new species in the genera *Desulfomonas*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium*, *Clostridium*, and *Ruminococcus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 26, 2: 238-252
- Moore L.V.H., Bourne D.M., Moore W.E.C. 1994. Comparative distribution and taxonomic value of cellular fatty acids in thirty-three genera of anaerobic Gram-negative bacilli. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 2: 338-347
- Mrozik A., Piotrowska-Seget Z., Łabużek S. 2004. Cytoplasmatic bacterial membrane responses to environmental perturbations. *Polish Journal of Environmental Studies*, 13, 5: 487-494
- Miyagawa E. 1982. Cellular fatty acid and fatty aldehyde composition of rumen bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology*, 28: 389-408
- Or-Rashid M.M., Odongo N.E., McBride B.W. 2007. Fatty acid composition of ruminal bacteria and protozoa, with emphasis on conjugated linoleic acid, vaccenic acid, and odd-chain and branched-chain fatty acids. *Journal of Animal Science*, 85: 1228-1234
- Ozsahin A.D., Guvenc M., Yilmaz O., Aslan A., Tuzcu M. 2009. The effects of different sugar sources on fatty acid biosynthesis in the *Saccharomyces Cerevisiae* cell culture. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8, 3: 424-429
- Rees C.E.D., Dodd C.E.R., Gibson P.T., Booth I.R., Stewart G.S.S.B. 1995. The significance of bacteria in stationary phase to food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 28: 263-275.
- Russell N.J. 1984. Mechanism of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. *Trends in Biochemical Sciences*, 9: 108-112
- Sajbidor J. 1997. Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17, 2: 87-103
- Sinensky M. 1974. Homeoviscous adaptation: a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 2: 522-525
- Stahl P.D., Klug M.J. 1996. Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 11: 4136-4146

- Suutari M., Laakso S. 1994. Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Critical Reviews in Microbiology*, 20: 285-328
- Tahoun M.K., Shata O.H., Mashalley R.I., Abou-Domia S.A. 1988. Influence of selected sugars and temperature on fatty acids composition in *Candida tropicalis*. *Nahrung*, 32, 4: 327-333
- Taoka Y., Nagano N., Okita Y., Izumida H., Sugimoto S., Hayashi M. 2009. Influences of culture temperature on the growth, lipid content and fatty acid composition of *Aurantiochytrium* sp. strain mh0186. *Marine Biotechnology*, 11: 368-374
- van Gylswyk N.O., Hippe H., Rainey F.A. 1996. *Pseudobutyrvibrio ruminis* gen. nov., sp. nov., a butyrate-producing bacterium from the rumen that closely resembles *Butyrivibrio fibrisolvens* in phenotype. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 2: 559-563
- Veerkamp J.H. 1971. Fatty acid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Journal of Bacteriology*, 108, 2: 861-867
- Vlaeminck B., Fievez V., Demeyer D., Dewhurst R.J. 2006. Effect of forage: concentrate ratio on fatty acid composition of rumen bacteria isolated from ruminal and duodenal digesta. *Journal of Dairy Science*, 89: 2668-2678
- Voet D., Voet J.G. 2004. *Biochemistry*. 3rd ed. Hoboken, John Wiley & sons. Inc: 1591 str.
- Zakhia F., de Lajudie P. 2006. Modern bacterial taxonomy: review of techniques-application to the characterization of bacteria nodulants. *Canadian Journal of Microbiology*, 52, 3: 169-181
- Zhu K., Bayles D.O., Xiong A., Jayaswal R.K., Wilkinson B.J. 2005. Precursor and temperature modulation of fatty acid composition and growth of *Listeria monocytogenes* cold-sensitive mutants with transposon-interrupted branched-chain α -keto acid dehydrogenase. *Microbiology*, 151: 615-623
- Zhu L., Zhang X., Ji L., Song X., Kuang C. 2007. Changes of lipid content and fatty acid composition of *Shizochytrium limacium* in response to different temperatures and salinities. *Process Biochemistry*, 42: 210-214
- Zorec M., Marinšek Logar R., Avguštin G. 1997. Isolation of butyric acid producing xylanolytic bacteria from the rumen. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani: Kmetijstvo: Zootehnika*, 70: 21-29
- Zorec M. 2006. Kemotaksonomska analiza dolgoverižnih maščobnih kislin in maščobnih aldehydov v vampnih bakterijah iz rodov *Butyrivibrio* in *Pseudobutyrvibrio*. *Doktorska disertacija*. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 126 str.

Wayne Moss C., Dowell V.R.Jr., Farshtchi D., Raines L.J., Cherry W.B. 1969. Cultural characteristics and fatty acid composition of Propionibacteria. *Journal of Bacteriology*, 97, 2: 561-570

Wegner G.H., Foster E.M. 1962. Incorporation of isobutyrate and valerate into cellular plasmalogen by *Bacteroides succinogenes*. *Journal of Bacteriology*, 85, 1: 53-61

Weimer P.J. 1996. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? *Journal of Dairy Science*, 79: 1496-1502

Whitford M.F., Yanke L.J., Forster R.J., Teather R.M. 2001. *Lachnobacterium bovis* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium isolated from the rumen and faeces of cattle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 1977-1981

Welch D.F. 1991. Applications of cellular fatty acid analysis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4, 4: 422-438

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Romani Marinšek Logar za prevzeto mentorstvo, za vse strokovne nasvete in predvsem za potrpežljivost, ki jo je imela pri nastajanju tega diplomskega dela.

Posebna zahvala gre somentorici asist. dr. Maši Zorec, ki mi je prijazno pomagala, posredovala nasvete in strokovno pomoč.

Zahvaljujem se recenzentu prof. dr. Gorazdu Avguštinu za pregled diplomske naloge.

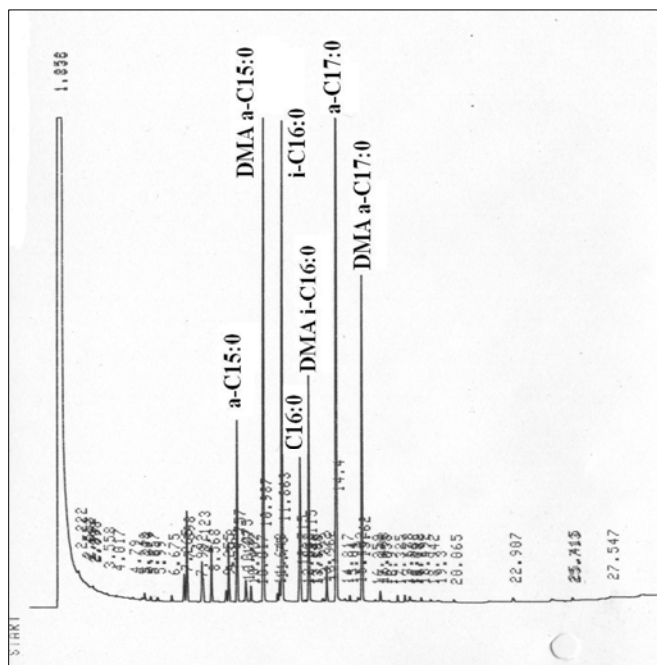
Za vzpodbudne besede in mnoge koristne nasvete pri pisanju diplomske naloge se zahvaljujem Vesni. Hvala!

Prav tako se zahvaljujem svojim najbližjim, prijateljem in vsem tistim, ki so mi kakor koli pomagali in stali ob strani, tako med študijem kot med pisanjem diplomske naloge.

PRILOGE

Priloge A: Vpliv vrste gojišča na sestavo MKA *Butyrivibrio hungatei* JK615^T in *Pseudobutyrvibrio ruminis* 9787^T

***Butyrivibrio hungatei* JK615^T**



Priloga A1: Primer kromatograma celičnih MKA pri *Butyrivibrio hungatei* JK615^T po rasti v gojišču 330

Priloga A2: Delež (% celotne površine) posameznih MKA pri sevu *B. hungatei* JK615^T po rasti v gojiščih 330, 330A, 330B in 330C

okrajšava MKA	ECL	vrsta gojišča			
		330	330A	330B	330C
DMA a-C13:0	13,30	n	tr	tr	0,5
DMA C13:0	13,59	0,9	0,5	tr	0,7
i-C14:0	13,66	2,9	2,8	1,8	3,3
C14:0	14,00	1,8	1,9	1,7	1,8
DMA i-C14:0	14,20	1,6	2,7	1,8	2,5
DMA C14:0	14,56	1,7	1,8	2,2	1,6
a-C15:0	14,74	5,1	5,8	4,0	7,4
C15:1 Y	14,91	0,8	0,6	0,6	0,7
C15:0	15,00	tr	0,7	1,2	0,6
DMA a-C15:0	15,28	17,0	18,4	15,2	14,7
DMA C15:0	15,54	tr	tr	0,8	tr
neznana	15,60	0,6	tr	tr	tr
i-C16:0	15,66	14,5	16,3	13,6	14,4
C16:0	16,00	5,1	5,2	8,7	5,2
DMA i-C16:0	16,18	6,5	7,3	7,8	7,7

se nadaljuje

nadaljevanje pril. A2

okrajšava MKA	ECL	330	vrsta gojišča		
			330A	330B	330C
DMA C16:0	16,54	1,0	1,2	2,4	1,4
a-C17:0	16,73	28,6	23,4	24,0	23,8
DMA a-C17:0	17,25	9,4	7,9	9,8	9,5
i-C18:0	17,64	tr	tr	tr	0,5

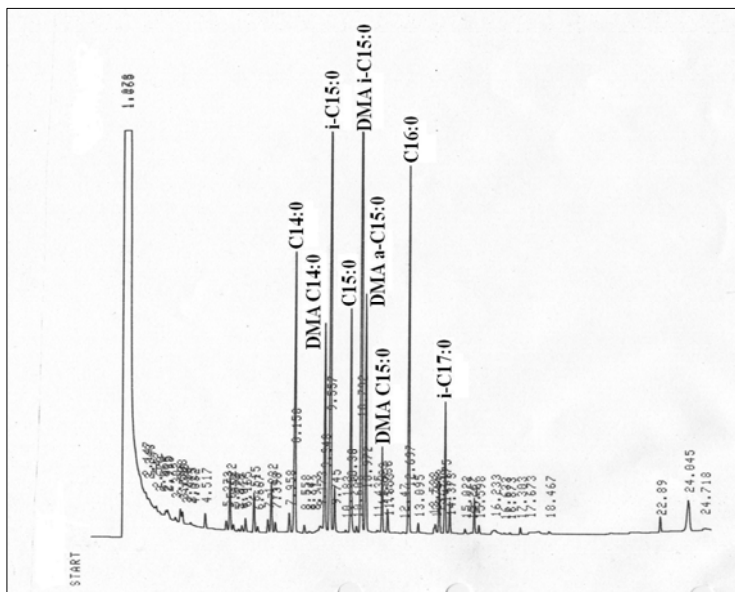
n-ni prisotna

tr-delež je manjši od 0,5%

Priloga A3: Skupni deleži (% celotne površine) MK, MA, nerazvejanih nasičenih, nerazvejanih nasičenih s sodim in lihimi številom C atomov, razvejanih, izo in anteizo razvejanih in nenasičenih MKA pri sevju *B. hungatei* JK615^T po rasti v gojiščih 330, 330A, 330B in 330C

skupina MKA	vrsta gojišča			
	330	330A	330B	330C
MK	58,8	56,8	55,5	57,8
MA	38,1	39,8	40,1	38,7
nerazvejane nasičene	10,5	11,3	17,1	11,3
nerazvejane nasičene s sodim št. C atomov	9,6	10,1	15,0	10,0
nerazvejane nasičene z lihimi št. C atomov	0,9	1,3	2,0	1,3
razvejane skupaj	85,5	84,7	78,0	84,5
izo razvejane	25,4	29,2	25,0	28,5
anteizo razvejane	60,1	55,6	53,0	56,0
nenasičene	0,8	0,6	0,6	0,7

Pseudobutyrvibrio ruminis 9787^T



Priloga A4: Primer kromatograma celičnih MKA pri *Pseudobutyrvibrio ruminis* 9787^T po rasti v gojišču 330

Priloga A5: Delež (% celotne površine) posameznih MKA pri sevu *P. ruminis* 9787^T po rasti v gojiščih 330, 330A, 330B in 330C

okrajšava MKA	ECL	vrsta gojišča			
		330	330A	330B	330C
C12:0	12,00	tr	tr	0,6	tr
DMA C12:0	12,56	tr	tr	0,7	tr
i-C13:0	12,65	1,5	1,0	0,7	1,4
?C13:1	12,84	n	tr	0,5	n
C13:1 c12	12,91	tr	0,9	1,4	tr
DMA i-C13:0	13,20	1,1	0,9	0,7	0,9
DMA a-C13:0	13,27	tr	tr	0,7	tr
?DMA C13:1 c12	13,50	tr	1,0	0,5	0,8
DMA C13:0	13,56	1,4	3,6	2,4	2,8
i-C14:0	13,65	tr	0,6	tr	0,5
C14:1 Y	13,91	0,6	1,9	1,3	1,3
C14:0	14,00	7,6	7,7	10,2	5,4
?DMA C14:1 Y	14,49	0,5	n	tr	n
DMA C14:0	14,57	5,7	7,4	14,2	4,4
i-C15:0	14,66	17,7	11,5	4,4	14,6
a-C15:0	14,74	1,3	0,7	tr	0,9
C15:0	15,00	5,8	7,3	8,5	8,1
DMA i-C15:0	15,19	27,4	22,4	13,4	24,8
DMA a-C15:0	15,28	5,9	3,6	2,6	4,4
DMA C15:0	15,54	2,1	2,4	4,3	2,6
i-C16:0	15,66	0,6	0,6	tr	0,8
C16:0	16,00	9,0	18,1	23,1	15,0
DMA C16:0	16,54	1,4	1,6	2,9	1,6
i-C17:0	16,65	3,2	3,3	1,3	4,6
a-C17:0	16,74	0,8	0,5	tr	0,8
DMA i-C17:0	17,17	0,9	0,6	tr	0,9

n-ni prisotna

tr-delež je manjši od 0,5%

?- najbolj verjetna MKA

Priloga A6: Skupni deleži (% celotne površine) MK, MA, nerazvejanih nasičenih, nerazvejanih nasičenih s sodim in lihim številom C atomov, razvejanih, izo in anteizo razvejanih in nenasičenih MKA pri sevu *P. ruminis* 9787^T po rasti v gojiščih 330, 330A, 330B in 330C

skupina MKA	vrsta gojišča			
	330	330A	330B	330C
MK	48,1	54,0	52,1	53,5
MA	46,5	43,6	42,5	43,1
nerazvejane nasičene	33,1	48,1	66,9	39,9
nerazvejane nasičene s sodim št. C atomov	23,6	34,8	51,7	26,4
nerazvejane nasičene z lihimi št. C atomov	9,4	13,3	15,2	13,5
razvejane skupaj	60,4	45,7	23,8	54,7
izo razvejane	52,5	40,9	20,5	48,5
anteizo razvejane	7,9	4,8	3,3	6,2
nenasičene	1,1	3,8	3,8	2,1

Priloga B: Seznam maščobnih kislin in maščobnih aldehydov s sistematskim in trivialnim poimenovanjem, okrajšavami ter faktorji ECL (Zorec, 2006)

sistematsko ime MKA; trivialno ime MKA	okrajšava MKA	faktorji ECL
nonanojska kislina; pelargonska kislina	C9:0	9,00
nonal	DMA C9:0	9,55
8-metil-nonanojska ali izo-dekanojska kislina	i-C10:0	9,66
dekanojska kislina; kaprična kislina	C10:0	10,00
3-hidroksi-nonanojska kislina	C9:0 3OH	10,43
dekanal	DMA C10:0	10,55
9-metil-dekanojska ali izo-undekanojska kislina	i-C11:0	10,66
8-metil-dekanojska ali anteizo-undekanojska kislina	a-C11:0	10,74
cis-10-undecenojska kislina	C11:1 c10	10,89
undekanojska kislina	C11:0	11,00
2-hidroksi-dekanojska kislina	C10:0 2OH	11,15
9-metil-dekanal, izo-undekanal	DMA i-C11:0	11,21
8-metil-dekanal, anteizo-undekanal	DMA a-C11:0	11,29
3-hidroksi-dekanojska kislina	C10:0 3OH	11,45
undekanal	DMA C11:0	11,55
10-metil-undekanojska ali izo-dodekanojska kislina	i-C12:0	11,66
9-metil-undekanojska ali anteizo-dodekanojska kislina	a-C12:0	11,74
cis-11-dodecenojska kislina	C12:1 c11	11,92
dodekanojska kislina; lavrinska kislina	C12:0	12,00
3-hidroksi-9-metil-dekanojska kislina	i-C11:0 3OH	-
2-hidroksi-undekanojska kislina	C11:0 2OH	12,16
10-metil-undekanal, izo-dodekanal	DMA i-C12:0	12,21
9-metil-undekanal, anteizo dodekanal	DMA a-C12:0	12,29
3-hidroksi-undekanojska kislina	C11:0 3OH	12,47
dodekanal	DMA C12:0	12,55
11-metil-dodekanojska ali izo-tridekanojska kislina	i-C13:0	12,66
10-metil-dodekanojska ali anteizo-tridekanojska kislina	a-C13:0	12,74
cis-12-tridecenojska kislina	C13:1 c12	12,92
tridekanojska kislina	C13:0	13,00
3-hidroksi-10-metil-undekanojska kislina	i-C12:0 3OH	-
2-hidroksi-dodekanojska kislina	C12:0 2OH	13,17
11-metil-dodekanal, izo-tridekanal	DMA i-C13:0	13,21
10-metil-dodekanal, anteizo-tridekanal	DMA a-C13:0	13,29
3-hidroksi-dodecenojska kislina	C12:1 3OH	-
12-metil-tridecenojska kislina izomer E	i-C14:1 E	-
3-hidroksi-dodekanojska kislina	C12:0 3OH	13,49
tridekanal	DMA C13:0	13,55
12-metil-tridekanojska ali izo-tetradekanojska kislina	i-C14:0	13,66
11-metil-tridekanojska ali anteizo-tetradekanojska kislina	a-C14:0	13,74
tetradecenojska kislina izomer X (cis-7?)	C14:1 X	13,80
2-hidroksi-11-metil-dodekanojska kislina	i-C13:0 2OH	-
cis-9-tetradecenojska kislina; miristoleinska kislina	C14:1 c9	13,88
tetradecenojska kislina izomer Y	C14:1 Y	13,91
tetradekanojska kislina; miristinska kislina	C14:0	14,00
3-hidroksi-11-metil-dodekanojska kislina	i-C13:0 3OH	-

se nadaljuje

Nadaljevanje priloga B: Seznam maščobnih kislin in maščobnih aldehydov s sistemskim in trivialnim poimenovanjem, okrajšavami ter faktorji ECL (Zorec, 2006)

sistematsko ime MKA; trivialno ime MKA	okrajšava MKA	faktorji ECL
2-hidroksi-tridekanojska kislina	C13:0 2OH	14,19
12-metil-tridekanal, izo-tetradekanal	DMA i-C14:0	14,20
14-metil-tetradecenojska kislina izomer E	i-C15:1 E	-
14-metil-tetradecenojska kislina izomer F	i-C15:1 F	-
tetradecenal izomer Y	DMA C14:1 Y	14,45
14-metil-tetradecenojska kislina izomer G	i-C15:1 G	-
14-metil-tetradecenojska kislina izomera H in I	i-C15:1 H/I	-
3-hidroksi-tridekanojska kislina	C13:0 3OH	14,50
12-metil-tetradecenojska kislina izomer A	a-C15:1 A	-
tetradekanal	DMA C14:0	14,54
13-metil-tetradekanojska ali izo-pentadekanojska kislina	i-C15:0	14,66
12-metil-tetradekanojska ali anteizo-pentadekanojska kislina	a-C15:0	14,74
pentadecenojska kislina izomer X (cis-6?)	C15:1 X	-
pentadecenojska kislina izomer A	C15:1 A	-
pentadecenojska kislina izomer B	C15:1 B	-
cis-10-pentadecenojska kislina	C15:1 c10	14,88
pentadecenojska kislina izomer Y	C15:1 Y	14,91
pentadekanojska kislina	C15:0	15,00
3-hidroksi-12-metil-tridekanojska kislina	i-C14:0 3OH	-
13-metil-tetradekanal, izo-pentadekanal	DMA i-C15:0	15,20
2-hidroksi-tetradekanojska kislina	C14:0 2OH	15,21
12-metil-tetradekanal, anteizo-pentadekanal	DMA a-C15:0	15,28
pentadecenal izomer X (cis-6?)	DMA C15:1 X	-
pentadecenal izomer Y	DMA C15:1 Y	15,45
14-metil-pentadecenojska kislina izomer F	i-C16:1 F	-
14-metil-pentadecenojska kislina izomer G	i-C16:1 G	-
14-metil-pentadecenojska kislina izomer H	i-C16:1 H	-
14-metil-pentadecenojska kislina izomer I	i-C16:1 I	-
3-hidroksi-tetradekanojska kislina	C14:0 3OH	15,52
Pentadekanal	DMA C15:0	15,54
14-metil-pentadekanojska kislina; izo-palmitinska kislina	i-C16:0	15,66
13-metil-pentadekanojska kislina; anteizo-palmitinska kislina	a-C16:0	15,74
cis-5-heksadecenojska kislina	C16:1 c5	-
cis-7-heksadecenojska kislina	C16:1 c7	15,74
cis-9-heksadecenojska kislina; palmitoleinska kislina	C16:1 c9	15,79
trans-9-heksadecenojska kislina; palmitelaidinska kislina	C16:1 t9	15,84
2-hidroksi-13-metil-tetradekanojska kislina	i-C15:0 2OH	-
heksadecenojska kislina izomer C (cis-11?)	C16:1 C	15,87
heksadekanojska kislina; palmitinska kislina	C16:0	16,00
3-hidroksi-13-metil-tetradekanojska kislina	i-C15:0 3OH	-
14-metil-pentadekanal, izo-heksadekanal	DMA i-C16:0	16,18
2-hidroksi-pentadekanojska kislina	C15:0 2OH	16,22
3-hidroksi-12-metil-tetradekanojska kislina	a-C15:0 3OH	-
13-metil-pentadekanal, anteizo-heksadekanal	DMA a-C16:0	16,26

se nadaljuje

Nadaljevanje priloga B: Seznam maščobnih kislin in maščobnih aldehydov s sistemskim in trivialnim poimenovanjem, okrajšavami ter faktorji ECL (Zorec, 2006)

sistematsko ime MKA; trivialno ime MKA	okrajšava MKA	faktorji ECL
cis-9-heksadecenal	DMA C16:1 c9	16,31
heksadecenal izomer C (cis-11?)	DMA C16:1 C	16,39
15-metil-cis-6-heksadecenojska kislina	i-C17:1 c6	-
15-metil-heksadecenojska kislina izomer E	i-C17:1 E	-
15-metil-heksadecenojska kislina izomer G	i-C17:1 G	-
15-metil-heksadecenojska kislina izomer H	i-C17:1 H	-
15-metil-heksadecenojska kislina izomer I	i-C17:1 I	-
14-metil-heksadecenojska kislina izomer B	a-C17:1 B	-
3-hidroksi-pentadekanojska kislina	C15:0 3OH	16,54
Heksadekanal	DMA C16:0	16,54
14-metil-heksadecenojska kislina izomer C	a-C17:1 C	-
14-metil-heksadecenojska kislina izomer A	a-C17:1 A	-
15-metil-heksadekanojska ali izo-heptadekanojska kislina	i-C17:0	16,65
14-metil-heksadekanojska ali anteizo-heptadekanojska kislina	a-C17:0	16,73
heptadecenojska kislina izomer A	C17:1 A	-
cis-9-heptadecenojska kislina	C17:1 c9	-
cis-10-heptadecenojska kislina	C17:1 c10	16,79
heptadecenojska kislina izomer C (cis-11?)	C17:1 C	16,83
cis-9,10-metilen-heksadekanojska kislina	C17:0 cyc-9,10	16,86
heptadecenojska kislina izomer X	C17:1 X	16,89
heptadekanojska kislina; margarinska kislina	C17:0	17,00
2-hidroksi-heksadecenojska kislina	C16:1 2OH	-
3-hidroksi-14-metil-pentadekanojska kislina	i-C16:0 3OH	-
15-metil-heksadekanal, izo-heptadekanal	DMA i-C17:0	17,17
2-hidroksi-heksadekanojska kislina	C16:0 2OH	17,24
14-metil-heksadekanal, anteizo-heptadekanal	DMA a-C17:0	17,25
cis-10-heptadecenal	DMA C17:1 c10	17,31
heptadecenal izomer C (cis-11?)	DMA C17:1 C	17,35
16-metil-heptadecenojska kislina izomer G	i-C18:1 G	-
16-metil-heptadecenojska kislina izomer H	i-C18:1 H	-
Heptadekanal	DMA C17:0	17,54
3-hidroksi-heksadekanojska kislina	C16:0 3OH	17,56
16-metil-heptadekanojska kislina; izo-stearinska kislina	i-C18:0	17,65
cis-9, cis-12-oktadekadienojska kislina; linolna kislina	C18:2 c9,c12	17,66
15-metil-heptadekanojska ali anteizo-oktadekanojska kislina	a-C18:0	17,73
cis-9-oktadecenojska kislina; oleinska kislina	C18:1 c9	17,73
cis-11-oktadecenojska kislina; cis-vakcenska kislina	C18:1 c11	17,79
trans-9-oktadecenojska kislina; elaidinska kislina	C18:1 t9	17,79
trans-6-oktadecenojska kislina	C18:1 t6	17,79
trans-11-oktadecenojska kislina; vakcenska kislina	C18:1 t11	17,83
oktadecenojska kislina izomer B (cis-13?)	C18:1 B	17,88
oktadecenojska kislina izomer X	C18:1 X	17,91
oktadekanojska kislina; stearinska kislina	C18:0	18,00
3-hidroksi-15-metil-heksadekanojska kislina	i-C17:0 3OH	-
16-metil-heptadekanal, izo-oktadekanal	DMA i-C18:0	18,17
3-hidroksi-14-metil-heksadekanojska kislina	a-C17:0 3OH	-

se nadaljuje

Nadaljevanje priloga B: Seznam maščobnih kislin in maščobnih aldehydov s sistemskim in trivialnim poimenovanjem, okrajšavami ter faktorji ECL (Zorec, 2006)

sistematsko ime MKA; trivialno ime MKA	okrajšava MKA	faktorji ECL
hidroksi-heptadekanojska kislina	C17:0 2OH	18,25
15-metil-heptanal, izo-oktadekanal	DMA a-C18:0	18,25
cis-9-oktadecenal	DMA C18:1 c9	18,25
trans-9-oktadecenal	DMA C18:1 t9	18,31
cis-11-oktadecenal	DMA C18:1 c11	18,31
trans-6-oktadecenal	DMA C18:1 t6	18,31
trans-11-oktadecenal	DMA C18:1 t11	18,35
oktadecenal izomer B (cis-13?)	DMA C18:1 B	18,40
17-metil-oktadecenojska kislina izomer I	i-C19:1 I	-
oktadekanal	DMA C18:0	18,54
3-hidroksi-heptadekanojska kislina	C17:0 3OH	18,57
17-metil-oktadekanojska ali izo-nonadekanojska kislina	i-C19:0	18,65
16-metil-oktadekanojska ali anteizo-nonadekanojska kislina	a-C19:0	18,73
cis-10-nonadecenojska kislina	C19:1 c10	18,73
nonadecenojska kislina izomer X	C19:1 X	-
trans-7-nonadecenojska kislina	C19:1 t7	-
cis-9,10-metilen-oktadekanojska kislina; dihidrosterulna kislina	C19:0 cyc9,10	18,84
cis-11,12-metilen-oktadekanojska kislina; laktobacilna kislina	C19:0 cyc11,12	18,87
nonadekanojska kislina	C19:0	19,00
2-hidroksi-oktadecenojska kislina	C18:1 2OH	-
3-hidroksi-16-metil-heptadekanojska kislina	i-C18:0 3OH	-
17-metil-oktadekanal, izo-nonadekanal	DMA i-C19:0	19,17
16-metil-oktadekanal, anteizo-nonadekanal	DMA a-C19:0	19,25
2-hidroksi-oktadekanojska kislina	C18:0 2OH	19,27
cis-11,12-metilen-oktadekanal	DMAC19:0cyc11,12	19,39
nonadekanal	DMA C19:0	19,54
3-hidroksi-oktadekanojska kislina	C18:0 3OH	19,59
18-metil-nonadekanojska kislina; izo-arahidinska kislina	i-C20:0	19,65
cis-9-eikozenojska kislina; gadoleinska kislina	C20:1 c9	-
cis-11-eikozenojska kislina	C20:1 c11	19,73
trans-11-eikozenojska kislina	C20:1 t11	19,79
cis-13-eikozenojska kislina	C20:1 c13	19,79
eikozanojska kislina; arahidinska kislina	C20:0	20,00

V prilogi A so prikazani faktorji ECL, pridobljeni z delom na koloni Equity-1 (nepolarna stacionarna faza 100 % poli-dimetil-siloksan), s temperaturnim programom od 150 °C do 250 °C s stopnjo naraščanja temperature 4 °C na minuto; krepko so izpisani faktorji ECL izračunani iz retencijskega časa posamezne maščobne kisline in maščobnega aldehyda, normalno izpisani so faktorji ECL izračunani prek faktorjev FCL ali predvideni glede na vrednosti iz literature.