



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**CHARAKTERIZACE EXTRACELULÁRNÍCH ENZYMŮ A
DALŠÍCH METABOLITŮ KAROTENOGENNÍCH KVASINEK**

CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR ENZYMES AND OTHER METABOLITES OF CAROTENOGENIC YEASTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Karolína Těšíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1320/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Karolína Těšíková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název diplomové práce:

Charakterizace extracelulárních enzymů a dalších metabolitů karotenogenních kvasinek

Zadání diplomové práce:

Cílem práce je studium produkce lipolytických enzymů a dalších extracelulárních metabolitů kvasinek kultivovaných na odpadním tuku.

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše zaměřená na produkci lipáz a biosurfaktantů karotenogenními kvasinkami
- 2) kultivace vybraných druhů kvasinek na surovém odpadním tuku a sledování indukce produkce lipáz v průběhu růstu
- 3) molekulární charakterizace lipáz z karotenogenních kvasinek
- 4) komplexní vyhodnocení produkovaných extracelulárních metabolitů v průběhu růstu kvasinek na odpadním tuku.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Karolína Těšíková
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Lipázy jsou enzymy katalyzující především hydrolytické štěpení vazeb triacylglycerolů. Produkce lipolytických enzymů je známa u mnoha mikroorganismů, obzvláště u těch, kteří jsou způsobilí využít tukový uhlíkatý substrát. Touto schopností se vyznačují i některé rody karotenogenních kvasinek. Karotenogenní kvasinky se vyznačují především tvorbou buněčných karotenoidů, lipidů a lipidických látek. Vedle těchto metabolitů mohou produkovat i určité množství biosurfaktantů.

Tato práce se zabývá studiem produkce extracelulárních lipolytických enzymů a biosurfaktantů karotenogenních kvasinek *Rhodotorula glutinis*, *Cystofilobasidium macerans*, *Rhodotorula mucilaginosa* a *Sporidiobolus pararoseus* kultivovaných především na odpadním živočišném tuku v různém C/N poměru (13, 25, 50, 100). Lipázová aktivita byla detekována u všech studovaných kmenů. Aktivity enzymu byly naměřeny spektrofotometrickou metodou. Indukce lipáz byla také pozorována v průběhu růstu buněk, kde bylo zaznamenáno několik vrcholů lipázových aktivit, což naznačuje tvorbu lipázy asociované s buňkou a lipázy vylučované do prostředí. Lipázové aktivity byly naměřeny také u kultivací na glukózovém a glycerolovém uhlíkatém substrátu. V neposlední řadě byla provedena i molekulová charakterizace lipolytických enzymů pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. Tvorba biosurfaktantů byla rovněž detekována u všech kmenů. Emulgační a solubilizační vlastnosti mají zejména biosurfaktanty u kvasinek *C. macerans* a *S. pararoseus*. V této práci byla souběžně s produkcí lipáz a biosurfaktantů na odpadním tuku sledována také produkce intracelulárních metabolitů, které jsou významné u kvasinek *S. pararoseus* a *R. mucilaginosa*.

KLÍČOVÁ SLOVA

karotenogenní kvasinky, extracelulární lipolytické enzymy, biosurfaktanty, intracelulární metabolity

ABSTRACT

Lipases are enzymes catalyzing primarily the hydrolytic cleavage of triacylglycerol bonds. The production of lipolytic enzymes is known in many microorganisms, especially those who are able to utilize a fatty carbon substrate. Some genera of carotenogenic yeasts are characterized by this ability. Carotenogenic yeasts are characterized primarily by the formation of intracellular carotenoids, lipids and lipid-soluble substances. In addition to these metabolites, they may also produce some biosurfactants.

This work deals with the production of extracellular lipolytic enzymes and biosurfactants by carotenogenic yeasts *Rhodotorula glutinis*, *Cystofilobasidium macerans*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Sporidiobolus pararoseus* cultivated mainly on animal waste fat at various C/N ratios (13, 25, 50, 100). Lipase activity was detected in all strains studied. Enzyme activities were measured by spectrophotometric method. Lipase induction has also been observed during cell growth, where several peaks of lipase activity have been reported, suggesting cell-associated lipase and lipase secreted into the environment. Lipase activities have also been found in cultures on glucose and glycerol carbon substrates. Further, the molecular characterization of lipolytic enzymes was performed using polyacrylamide gel electrophoresis. The formation of biosurfactants is to some extent formed by all strains. In particular, the biosurfactants of *C. macerans* and *S. pararoseus* yeast have emulsifying and solubilizing properties. Simultaneously with the production of lipase and biosurfactants, the production of characteristic high value added intracellular metabolites in *S. pararoseus* and *R. mucilaginosa* was evaluated too.

KEYWORDS

carotenogenic yeasts, extracellular lipolytic enzymes, biosurfactants, intracellular metabolites

CITACE

TĚŠÍKOVÁ, Karolína. *Charakterizace extracelulárních enzymů a dalších metabolitů karotenogenních kvasinek* [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-08]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115840>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat prof. Ivaně Márové za odborné vedení a cenné rady při zpracování této práce. Dále mé poděkování patří Ing. Martinu Szotkowskému za ochotnou pomoc, trpělivost a vstřícnost, kterou mi po celou dobu věnoval. V neposlední řadě chci poděkovat rodině a přátelům, kteří mě podporovali po celé studium.

OBSAH

1	Úvod	9
2	Teoretická část.....	10
2.1	Karotenogenní kvasinky	10
2.1.1	Rod <i>Rhodotorula</i>	10
2.1.2	Rod <i>Sporidiobolus</i>	11
2.1.3	Rod <i>Cystofilobasidium</i>	11
2.2	Extracelulární lipolytické enzymy	12
2.2.1	Struktura a vlastnosti lipáz.....	13
2.2.2	Enzymová aktivita lipáz.....	14
2.2.3	Reakce lipáz	15
2.2.4	Aplikace lipáz.....	17
2.3	Lipidy.....	17
2.3.1	Rozdělení lipidů.....	17
2.3.2	Metabolismus lipidů	17
2.4	Karotenoidy a karotenoidní látky.....	20
2.4.1	Struktura a funkce karotenoidů	21
2.4.2	Syntéza karotenoidů.....	22
2.5	Ergosterol	24
2.6	Ubichinon	25
2.7	Biosurfaktanty	25
2.7.1	Glykolipidy.....	26
2.7.2	Vlastnosti a fyziologická role PEFA	27
2.7.3	Metabolismus a produkce PEFA	27
2.7.4	Aplikace biosurfaktantů	28
2.8	Metody stanovení	28
2.8.1	Absorpční spektrofotometrie.....	28
2.8.2	Elektroforéza	29
2.8.3	Chromatografické techniky.....	30
3	Cíle práce	33
4	Experimentální část.....	34
4.1	Použité chemikálie.....	34
4.2	Použité přístroje a pomůcky.....	35

4.3	Použité kmeny mikroorganismů.....	36
4.4	Kultivace mikroorganismů.....	36
4.4.1	Základní kultivace kmenů karotenogenních kvasinek	36
4.4.2	Kultivace kmenů karotenogenních kvasinek v mechanicky emulgovaných médiích	37
4.4.3	Velkoobjemové kultivace kmenů karotenogenních kvasinek s časovými odběry.....	38
4.4.4	Velkoobjemové kultivace kmenů karotenogenních kvasinek s intenzivním provzdušováním.....	39
4.4.5	Kultivace karotenogenních kmenů zaměřené ke zjištění produkce biosurfaktantů	39
4.5	Izolace, stanovení, analýza kvasinkové biomasy a sledovaných metabolitů	40
4.5.1	Zpracování a gravimetrické stanovení biomasy	40
4.5.2	Stanovení aktivity extracelulárních lipolytických enzymů	40
4.5.3	Izolace a transesterifikace intracelulárních lipidů	41
4.5.4	Analýza methylesterů mastných kyselin na GC	41
4.5.5	Extrakce karotenoidů a lipidických metabolitů	42
4.5.6	Analýza karotenoidů a lipidických metabolitů na HPLC.....	43
4.5.7	Stanovení molekulové hmotnosti extracelulárních lipolytických enzymů pomocí vertikální PAGE-SDS.....	44
4.5.8	Základní screening extracelulárních biosurfaktantů	46
5	Výsledky a diskuze	47
5.1	Vyhodnocení kalibrační závislosti aktivity lipáz a optimalizace prostředí	47
5.2	Výsledky stanovení aktivity lipolytických enzymů a dalších metabolitů základních kultivací karotenogenních kvasinek	48
5.2.1	Výsledky základních kultivací kmenů karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 13.....	49
5.2.2	Výsledky základních kultivací kmenů karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 25.....	51
5.2.3	Výsledky základních kultivací kmenů karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 50.....	54
5.2.4	Výsledky základních kultivací kmenů karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 100.....	56
5.2.5	Výsledky kultivací kmenů karotenogenních kvasinek v mechanicky emulgovaných médiích	58

5.3	Výsledky velkoobjemových kultivací kmenů karotenogenních kvasinek s časovými odběry	61
5.3.1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	61
5.3.2	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	65
5.3.3	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	68
5.4	Výsledky velkoobjemových kultivací kmenů karotenogenních kvasinek s intenzivním provzdušňováním	76
5.5	Výsledky stanovení molekulové hmotnosti extracelulárních lipolytických enzymů pomocí vertikální PAGE-SDS	78
5.6	Výsledky základního screeningu extracelulárních biosurfaktantů	79
5.6.1	Výsledky metody rozšiřování olejové skvrny.....	79
5.6.2	Výsledky metody stanovení emulgační aktivity a solubilizace krystalického anthracenu	80
6	Závěr	89
7	Seznam použité literatury	91
8	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	100
9	Seznam příloh	101
10	Přílohy.....	102

1 ÚVOD

Enzymy jsou biokatalyzátory hrající důležitou roli v metabolických a biochemických procesech. Primárním zdrojem průmyslových enzymů jsou mikroorganismy. Jejich kultivace jsou časově úsporné a mohou být realizovány ve větším měřítku. Většina průmyslových mikrobiálních enzymů patří do třídy hydroláz. Za jedny z předních průmyslových biokatalyzátorů jsou považovány lipázy. Díky své stabilitě v širokém rozmezí pH, v extrémních teplotách a v organických rozpouštědlech se staly důležitým biotechnologickým produktem.

Lipázy jsou všudypřítomné hydrolázy katalyzující širokou škálu reakcí, jako jsou hydrolytické reakce, esterifikační reakce, alkoholýzy apod. Mikrobiální lipázy mohou být intracelulární i extracelulární. Hlavními substráty těchto enzymů jsou lipidy, resp. triacylglyceroly, které jsou štěpeny na mastné kyseliny a glycerol.

Lipidy jsou heterogenní sloučeniny rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. V buňkách slouží jako zdroj a rezerva energie a plní strukturní a ochranné funkce. Potenciálním zdrojem lipidů jsou tzv. oleogenní mikroorganismy. V jejich suché biomase je obsaženo 20 % hm a více lipidů. Mikrobiální lipidy vykazují značný potenciál, např. při výrobě biopaliv třetí generace.

Mezi oleogenní mikroorganismy patří také karotenogenní, neboli červené kvasinky. Tento název získaly kvůli červenému zbarvení biomasy a schopnosti produkovat karotenoidní látky. Karotenoidy jsou lipofilní sloučeniny, jejichž hlavní úlohou je chránit nenasycené mastné kyseliny umístěné v buněčné membráně před fotooxidací a peroxidací. Karotenogenní mikroorganismy jsou schopny produkovat i další biotechnologicky významné látky, jako je ergosterol a ubichinon.

Vedle intracelulárních metabolitů produkují i určitého množství extracelulárních detergentů, neboli biosurfaktantů. Biosurfaktanty jsou snadno biologicky odbouratelné a téměř netoxické. Tyto unikátní vlastnosti umožňují jejich potencionální využití v mnoha průmyslových odvětvích. Biosurfaktanty se skládají z hydrofilních i hydrofobních molekul. Mikrobiálních surfaktantů existuje celá řada. Jedním z nich jsou polyolové estery mastných kyselin, neboli PEFA.

Cílem této práce je studium produkce extracelulárních lipolytických enzymů a biosurfaktantů u karotenogenních kvasinek *Rhodotorula glutinis*, *Cystofilobasidium macerans*, *Rhodotorula mucilaginosa* a *Sporidiobolus pararoseus* kultivovaných primárně, v rámci mezinárodního projektu „LipoFungi“, na odpadním živočišném tuku. K lepšímu porozumění produkce lipolytických enzymů, byla sledována indukce lipáz i v průběhu růstu buněk. Dále byla provedena molekulární charakterizace lipolytických enzymů. V této práci byla pozorována také souvislost mezi produkcí extracelulárních a intracelulárních metabolitů, jako jsou lipidy, karotenoidy, ergosterol a ubichinon.

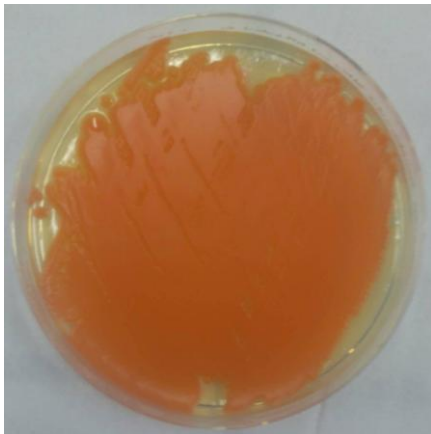
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Karotenogenní kvasinky

Karotenogenní kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní mikroorganismy, které jsou schopny produkovat karotenoidní látky. Tyto látky slouží zejména jako ochrana před UV zářením resp. před volnými kyslíkovými radikály. Díky přítomnosti různých složek karotenoidů jsou zbarveny do červené, růžové, oranžové až žluté barvy. Tyto kvasinky jsou významné produkcí β -karotenu, γ -karotenu, torulenu, torularhodinu a lykopenu. Poměr a výskyt jednotlivých druhů karotenoidních látek je závislý na prostředí, podmínkách kultivace a na druhu samotné kvasinky. Některé rody jsou také známy produkcí velkého množství lipidů. Biosyntéza karotenoidů je významná zejména u rodů *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, *Cystofilobasidium* a *Rhodospiridium* patřících do třídy *Basidiomycetae* [1–4].

2.1.1 Rod *Rhodotorula*

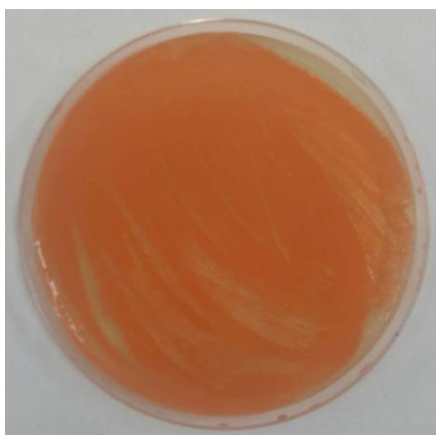
Rod *Rhodotorula* patří mezi striktně aerobní mikroorganismy. Kvasinky tohoto rodu bývají zbarveny do korálově červené, růžové, až pomerančové barvy v závislosti na použitém médiu (Obr. 1). Povrch kolonií je hladký, vlhký a lesklý. Jejich buňky mají elipsoidní tvar o průměru 3–5 μm a mohou dorůst až do 16 μm . Optimální růstová teplota těchto kvasinek bývá 31 °C. Rozmnožují se vegetativně polárním a multilaterálním pučením. Jejich kultivace bývají nenáročné. Dokážou se rozmnožovat i v půdách s malým množstvím dusíkatého zdroje. Během exponenciální růstové fáze produkují glykogen. Velké množství lipidů a karotenoidů jsou schopny akumulovat až při stacionární růstové fázi. Pro rod *Rhodotorula* je typická syntéza β -karotenu, torulenu, γ -karotenu a torularhodinu. Některé druhy tohoto rodu jsou schopny transportovat proti koncentračnímu gradientu přes buněčnou membránu D-ribózu, D-xylózu, D-ribitol, D-arabitol, polyoly apod. Pro tyto kvasinky je typická absence enzymatického aparátu pro kvašení cukrů. Uhlíkaté zdroje tedy využívají pomocí hexosamonofosfátového zkratu. Do nejznámějších druhů rodu *Rhodotorula* patří *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* a *Rhodotorula graminis*. Za normálních podmínek jsou tyto rody izolovány ze vzduchu, z fytoplánu, z rozkládajícího se rostlinného materiálu, z mléka a mléčných výrobků [3–5].



Obr. 1: Nátěr kvasinky *Rhodotorula glutinis*

2.1.2 Rod *Sporidiobolus*

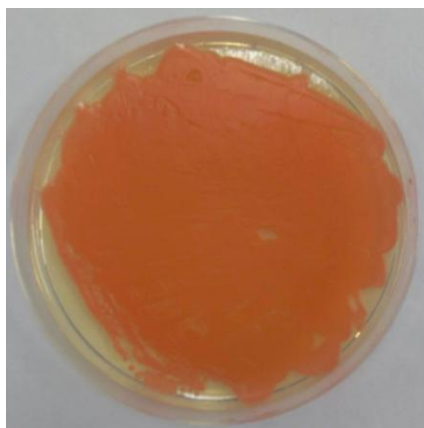
Tyto striktně aerobní kvasinky se vyznačují lososovou, korálově červenou, anebo broskvovou barvou (Obr. 2). Typickým znakem pro rod *Sporidiobolus* je tvorba balistokonídií, převážně asymetrických. *Sporidiobolus* se považuje za perfektní stádium rodu *Sporobolomyces*. Jeho buňky mají elipsoidní tvar o průměru 3–9 μm a o délce až 21 μm . Povrch kolonií bývá kožovitý. Rod *Sporidiobolus* se také vyznačuje tvorbou karotenoidů, zejména β -karotenu, torulenu, torularhodinu a γ -karotenu. Dále patří mezi kvasinky se zvýšenou produkcí lipidů. Uhlíkaté zdroje, jako jsou sacharidy, využívají pomocí hexosamonofosfátového zkratu. Nejvýznamnějšími zástupci tohoto rodu je *Sporidiobolus pararoseus*, *Sporidiobolus salmonicolor* a příbuzný *Sporobolomyces roseus*. Výskyt těchto kvasinek je běžný ve vzduchu, na fytoplánu, v mořské a sladkovodní vodě [1, 3, 6, 7].



Obr. 2: Nátěr kvasinky *Sporidiobolus pararoseus*

2.1.3 Rod *Cystofilobasidium*

Pro rod *Cystofilobasidium* je charakteristická tvorba nedělených basidií tzv. holobasidií. V závislosti na kultivačních podmínkách a na jednotlivém druhu mají tyto kvasinky růžové až krémové zbarvení (Obr. 3). Povrch kolonií je hladký a lesklý. Buněčné stěny *Cystofilobasidium* obsahují xylózu, jsou schopné produkovat amylázové polysacharidy a využívat glukuronát. Pro tyto kvasinky je také charakteristická tvorba karotenoidních pigmentů. Mezi nejznámější druhy *Cystofilobasidium* patří *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Cystofilobasidium capitatum* a *Cystofilobasidium macerans*. Dříve se druhy kvasinek tohoto rodu řadili do rodu *Rhodosporidium*. *Cystofilobasidium* se obvykle izoluje z rostlinného materiálu a ze sladkovodních vod [3, 8, 9, 10].



Obr. 3: Nátěr kvasinky *Cystofilobasidium macerans*

2.2 Extracelulární lipolytické enzymy

Enzymy jsou biokatalyzátory hrající důležitou roli v metabolických a biochemických procesech. Primárním zdrojem průmyslových enzymů jsou mikroorganismy. Jejich použití nese řadu výhod. Jednou z nich je možnost genetické manipulace ke zvýšení produkce enzymů, zvláště u bakterií. Dále jejich kultivace probíhají v krátké době a ve velkých množstvích. Mikrobiální enzymy jsou využívány zejména v potravinářském, farmaceutickém, chemickém a energetickém průmyslu [11–13].

V biotechnologických aplikacích jsou nejpoužívanější hydrolázy. Hydrolázy jsou třída enzymů vykazující širokou substrátovou specifitu. Mechanismus jejich účinku spočívá v hydrolytickém štěpení vazeb vzniklých kondenzací tj. vazby peptidů, amidů, esterů, triacylglycerolů apod. [14, 15].

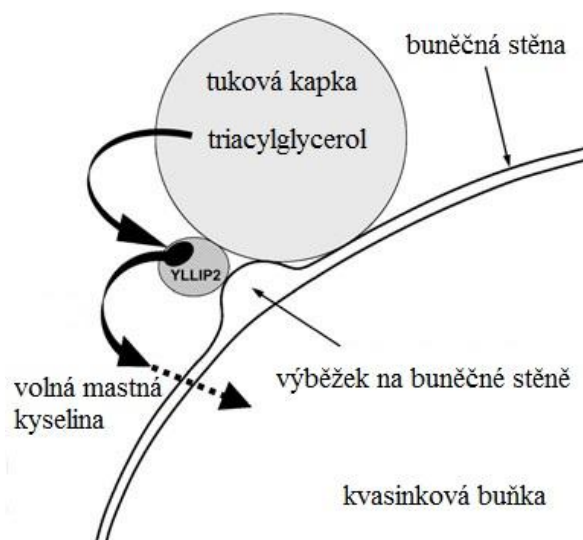
Lipolytické enzymy patří do hydroláz katalyzujících štěpení a tvorbu esterových vazeb. Dělí se na dvě hlavní skupiny – karboxyl-esterové hydrolázy, neboli „pravé“ esterázy (EC 3.1.1.1.) a lipázy (EC 3.1.1.3.). Karboxyl-esterové hydrolázy přednostně hydrolyzují „jednoduché“ estery a triacylglyceroly obsahující mastné kyseliny s kratším řetězcem než C6. Lipázy jsou účinné zejména proti látkám nerozpustným ve vodě, jako jsou triacylglyceroly s dlouhým řetězcem mastných kyselin. Většina lipáz štěpících triacylglyceroly působí primárně v polohách sn1 a sn3 [16–18].

Přestože je uhlíkatý metabolismus u mikroorganismů založený převážně na zdroji sacharidů, přítomnost lipáz umožňuje zpracovávat nekonvenční uhlíkové substráty, jako jsou například tuky. Přírodním substrátem lipáz jsou triacylglyceroly. Triacylglyceroly jsou velké molekuly a nemohou pasivně přecházet přes buněčnou stěnu. Aby jejich transport byl možný, musí být nejdříve rozloženy na částečné glyceridy a volné mastné kyseliny. Tento proces zajišťují lipázy nacházející se v mimobuněčném prostředí. Mnoho mikroorganismů produkujících lipázy bylo izolováno právě z prostředí bohatého na lipidy, nejčastěji z mléčných výrobků, z ropného a tukového průmyslu [19, 20].

2.2.1 Struktura a vlastnosti lipáz

Velikost kvasinkové lipázy se pohybuje v rozmezí 20–60 kDa. Její struktura je trojrozměrná a charakterizována α/β foldem. Enzym obsahuje segment, který slouží jako víko zakrývající aktivní místo. Jestliže se v blízkosti enzymu vyskytne hydrofobní substrát, víko se ihned otevře a aktivita enzymu vzroste. Centrální oblast enzymu je tvořena paralelním β -skládaným listem, ve kterém se nachází aktivní místo enzymu obsahující katalytickou triádu zahrnující nukleofilní zbytek (serin), katalytický zbytek kyseliny (glutamát/aspartát) a histidinový zbytek. Dle nukleofilního zbytku v aktivním centru jsou lipázy řazeny mezi serinové hydrolázy. Geometrie aktivních míst lipáz se značně liší a má dopad na biochemické vlastnosti enzymu. Obecně se jedná o hlubokou hydrofobní kapsu, do které přesně zapadá mastná kyselina substrátu. Podle tvaru vazebného centra rozlišujeme tři typy aktivních míst: tunelové (*Candida rugosa*, *Geotrichum candidum*), nálevkovité (pankreatická lipáza, lipáza B *Candida antarctica*, *Pseudomonas*) a štěrbínovité (*Rhizomucor*, *Rhizopus*). Společnou charakteristikou primární struktury lipáz je opakující se konsenzuální sekvence Gly-X-Ser-X-Gly (X = aminokyselina) [20–22].

Intracelulární i extracelulární lipázy jsou stereospecifické a regiospecifické tj. působí na určitou vazbu v molekule triacylglycerolu. Kvůli opačné polaritě enzymu (hydrofobní) a substrátu (hydrofilní) probíhá lipázová reakce na rozhraní fází olej-voda. Extracelulární lipáza se vyskytuje volně v médiu, nebo je lokalizována na výběžku vnější strany buněčné membrány (Obr. 4). Tento výběžek tukovou kapku zadrží a následně dochází ke kontaktu s enzymem. Lipázy asociované s buňkou mohou mít inducibilní i konstitutivní charakter. Pokud se v kultivačním prostředí nacházejí detergenty, bývá lipáza z buněčné stěny snadno odstraněna. Oba typy extracelulárních lipáz jsou nejaktivnější v jiném časovém rozmezí. Aktivita lipázy umístěné na buněčné membráně velmi úzce souvisí s růstem biomasy. Například u kvasinky *Yarrowia lipolytica* dosahuje aktivita lipázy asociované s buňkou nejvyššího maxima kolem 20. hodiny. Lipolytická aktivita extracelulární volné lipázy významně stoupá po 80. hodině kultivace. U 50. hodiny nastává výrazný propad aktivit obou enzymů. Aktivitu volného enzymu pozitivně stimulují triacylglycerolové tuky, kapalné mastné kyseliny a myristová kyselina. Naopak u kultivací za použití sacharidů jako uhlíkatého zdroje je aktivita lipázy výrazně potlačena, nebo nedosahuje významných hodnot. Nicméně u kvasinky *Rhodotorula glutinis* může být lipázová aktivita indukována i přítomným sacharidem [19, 20, 23–26].



Obr. 4: Extracelulární lipáza YLLIP2 (*Yarrowia lipolytica*) asociovaná s buňkou [19]

2.2.2 Enzymová aktivita lipáz

Většina kvasinkových lipáz je aktivních v teplotním rozmezí mezi 40–50 °C. Na rozdíl od bakteriálních nebývají kvasinkové lipázy termotolerantní. K jejich denaturaci dochází již při 60 °C. Teplotní stabilita lipázy *Rhodotorula glutinis* vázané na buňku je mnohem vyšší, než u lipázy vylučované do prostředí. Pro udržení lipázové aktivity je také nutné nastavení optimálního pH prostředí. Optimální pH se může lišit v závislosti na daném mikroorganismu. Lipolytická aktivita kvasinky *Rhodotorula glutinis* je nejvyšší v prostředí s pH 7,5 při teplotě 35 °C. U kmene *Rhodotorula mucilaginosa* je naopak enzym nejaktivnější kolem pH 5 a teplotě 30 °C [23–25].

Jak už bylo zmíněno, lipázové reakce probíhají na rozhraní olej-voda. Na rozdíl od esteráz se lipázy neřídí kinetikou Michaelis-Mentenové. K vysoké aktivitě enzymu je zapotřebí pouze minimální množství substrátu [20].

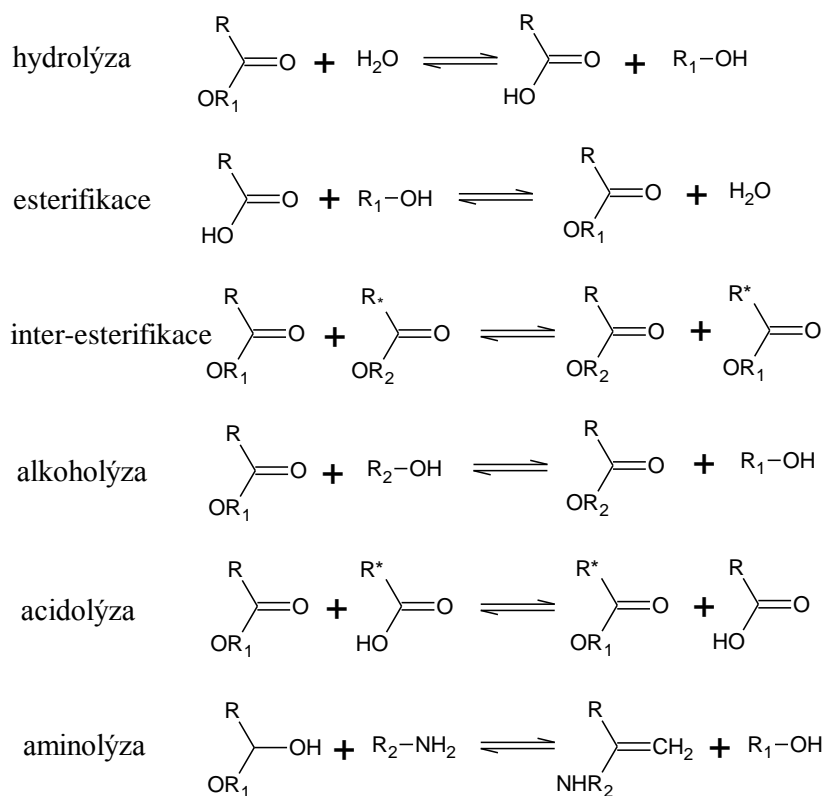
Pro správnou funkci enzymu je zapotřebí udržet systém v emulgované formě. Aktivita enzymu je v takovém prostředí značně zvýšena. Rozptýlené substráty jsou v kultivačním prostředí emulgovány pomocí surfaktantů, nebo neustálým mícháním. Studie lipázové aktivity u *Y. lipolytica* ukazují, že udržení emulgovaného systému podporuje účinek enzymu tím, že mnohonásobně zvětší mezifázové rozhraní a substrát se tedy stává dostupnějším. Efekt aktivátorů a inhibitorů lipáz je odlišný v emulgovaném a neemulgovaném prostředí. Žlučové soli v emulgovaném prostředí pozitivně stimulují aktivitu lipázy *Y. lipolytica*, naopak v neemulgovaném prostředí ji inhibují. Obecným aktivátorem lipáz v neemulgovaném prostředí je kyselina olejová. V emulgovaném kultivačním prostředí se její vliv neprojevuje. V neemulgovaných systémech lze působení olejové kyseliny nahradit kteroukoliv mastnou kyselinou v tekutém stavu. Pozitivně stimulační efekt byl pozorován i u Ca^{2+} iontů. V případě Ca^{2+} iontů lze podobných účinků dosáhnout při použití Sr^{2+} iontů a méně efektivních Ba^{2+} iontů [23, 27].

Z hlediska použitých emulgátorů se k pozitivní stimulaci lipázové aktivity používají neiontové povrchově aktivní látky. Na rozdíl od iontových surfaktantů, neiontové povrchově aktivní látky interagují s lipázou jen prostřednictvím hydrofobních interakcí. Iontové detergenty se vážou na enzym kombinací hydrofobních a elektrostatických sil a tím podporují konformační změnu enzymu a snížení jeho aktivity. Významná lipázová aktivita může probíhat v přítomnosti neiontových polyoxyethylenových detergentů (Triton X-100, Tween 20, Tween 80), neiontových detergentů složených z mastných kyselin a sorbitolu (Span 60). Pozitivní účinek na tvorbu extracelulárních lipáz mají některé emulgátory pouze spolu s kyselinou olejovou. Výraznější lipázová aktivita může být způsobena lepší propustností buněčné membrány v důsledku přítomnosti detergentů zejména Tween 80, Triton X-100 a Trioleinu. Všeobecnými inhibitory lipázové aktivity jsou těžké kovy, které působí na enzym bez ohledu na emulgovaný, či neemulgovaný systém. U některých kvasinek může docházet také k inhibici produktem [23, 25, 28, 29].

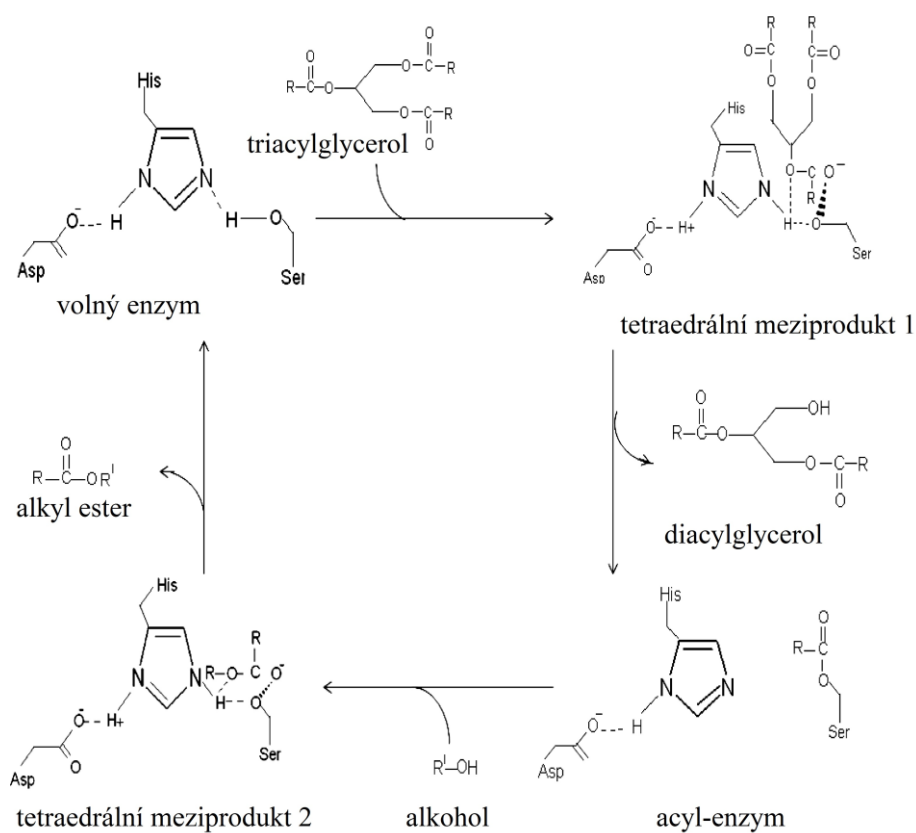
2.2.3 Reakce lipáz

Vedle schopnosti hydrolýzy esterových vazeb triacylglycerolů, katalyzují lipázy i reakce syntetického charakteru – transesterifikace a esterifikace. V průběhu transesterifikace dochází k výměně esterově vázaných substituentů. Reakce může probíhat v přítomnosti alkoholu (alkoholýza), kyseliny (acidolýza), aminu (aminolýza) a jiného esteru (interesterifikace). Mechanismy jednotlivých dějů jsou zobrazeny na Obr. 5. Lipázové reakce jsou obvykle popisovány ping-pongovým modelem. V případě transesterifikace byl model popsán dvěma způsoby. První způsob zahrnuje výměnu substituentů v jednom kroku. Příkladem je přímá alkoholizace triacylglycerolů. Ve druhém způsobu nejdříve dochází k hydrolýze daného esteru – triacylglycerolu a k následné esterifikaci vzniklé mastné kyseliny [30, 31].

Mechanismus hydrolýzy a transesterifikace (Obr. 6) je téměř stejný pro lipázy i pro esterázy. Katalýza těchto reakcí probíhá ve čtyřech krocích. Nejdříve dojde k navázání substrátu (triacylglycerol) na aktivní místo resp. na aktivní serin. Zde dochází ke tvorbě tetraedráního meziprojektu stabilizovaného katalytickými zbytky aminokyselin histidinu a kyseliny asparagové. Po uvolnění diacylglycerolu vznikne komplex acyl-enzym. Po navázání nukleofilu se opět vytvoří tetraedrání meziprojekt, ze kterého se uvolní produkt a vznikne původní enzym. Při hydrolýze bývá nukleofilem voda a při transesterifikaci alkohol, ester, kyselina, nebo amin. Výslednými produkty jsou volné mastné kyseliny, glycerol, nebo estery mastných kyselin. Lipáza může fungovat i za nízkého množství vody. Tehdy dochází k reverzní hydrolýze (esterifikaci), kdy vzniká opět triacylglycerol [20, 32, 33].



Obr. 5: Přehled lipázových reakcí [22]



Obr. 6: Mechanismus lipolytické transesterifikace (alkoholyzy) [33]

2.2.4 Aplikace lipáz

Lipolytické enzymy jsou nedílnou součástí řady průmyslových odvětví. Komerčně jsou využívány jak lipázy bakterií (*Pseudomonas*, *Bacillus*, atd.), tak lipázy plísní a kvasinek (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Candida*, atd.). Úprava tuků a olejů je jedna z hlavních disciplín potravinářského průmyslu. Lipáza se používá na změnu vlastností tuku záměnou polohy řetězců mastných kyselin v molekule triacylglycerolu, nebo odstranění fosfolipidů z rostlinných olejů. Lipázy se také používají ke zlepšení sensorických vlastností potravin zejména v sýrařství, kde syntetizují tuky s krátkými řetězci mastných kyselin nesoucí aromatický charakter. Svůj potenciál nalézají i v oblasti čištění odpadních vod a tukem kontaminovaných míst. Lipázy mohou být využívány také ke stanovení triacylglycerolů v krevním séru. U kardiovaskulárních diagnostik mohou sloužit jako biosenzory. Své uplatnění nalézají v neposlední řadě i v papírenském, kosmetickém a petrochemickém průmyslu [22].

2.3 Lipidy

Oleogenní mikroorganismy jsou mikrobiální druhy známé pro svou schopnost akumulovat vysoké množství lipidů uvnitř buněk. Obsah jejich intracelulárních lipidů převyšuje 20 % hm. suché biomasy. Lipidy vyprodukované těmito druhy jsou označovány jako „single cell oil“ a vykazují značný potenciál např. při výrobě biopaliv třetí generace. Pro výrobu bionafty jsou využívány hlavně lipidy s vysokým podílem kyseliny olejové a stearové zvyšující oxidační stabilitu [34–36].

2.3.1 Rozdělení lipidů

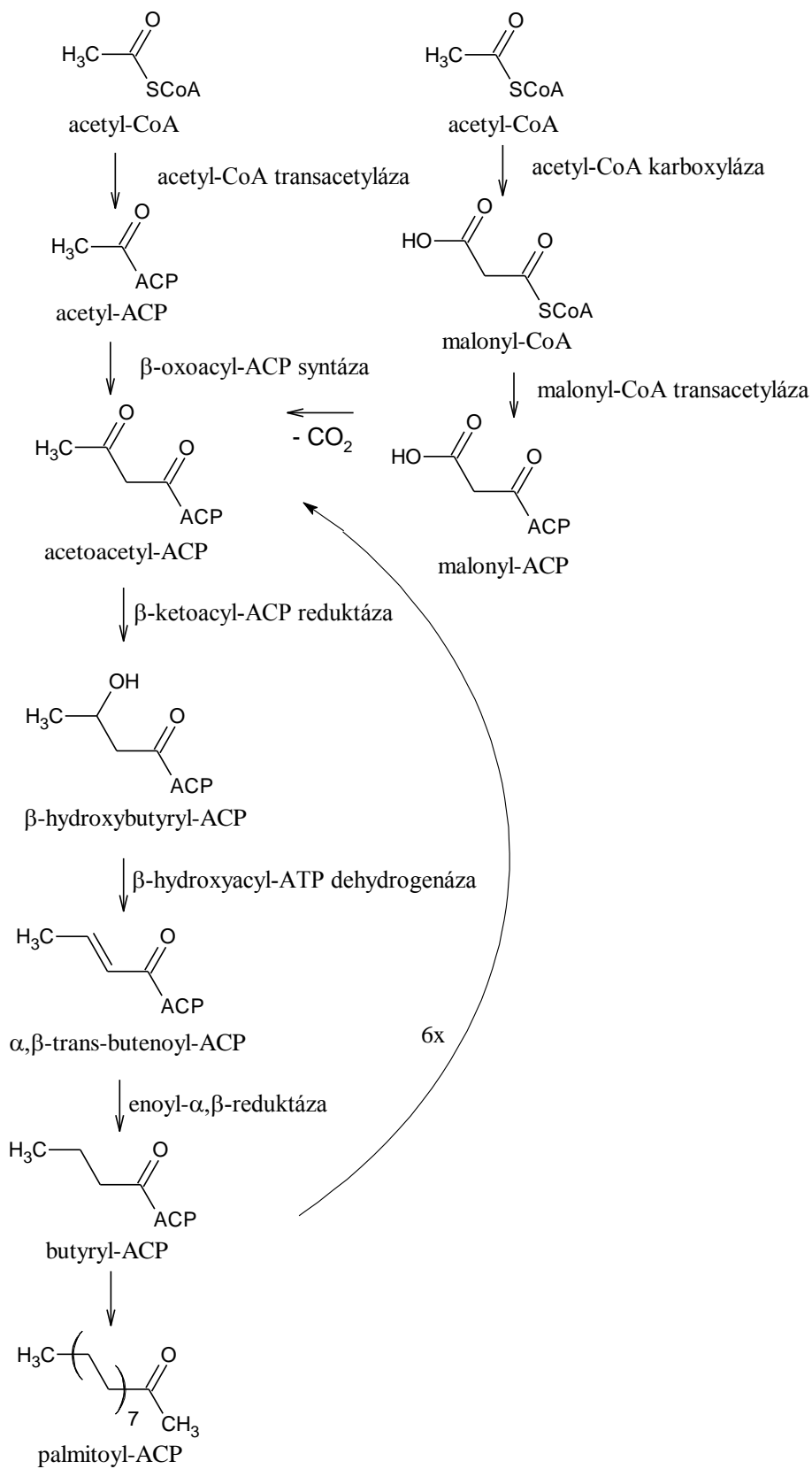
Lipidy jsou heterogenní sloučeniny vyznačující se dobrou rozpustností v nepolárních rozpouštědlech. Tyto látky slouží jako zdroj a rezerva energie, dále plní strukturní a ochranné funkce. Lipidy rozdělujeme na jednoduché a složené. Do jednoduchých lipidů patří tuky a vosky. Jsou to estery mastných kyselin a různých alkoholů, nejčastěji glycerolu. Složené lipidy obsahují kromě mastné kyseliny a alkoholu i zbytek kyseliny fosforečné, dusíkatou bázi apod. Do této skupiny lipidů se řadí fosfolipidy, glykolipidy, sulfolipidy, aminolipidy a odvozené lipidy [37].

Hlavní součástí lipidů jsou mastné kyseliny. Mastné kyseliny jsou alifatické karboxylové kyseliny obsahující nasycené i nenasyčené vazby. V buňkách se mohou vyskytovat i ve volné, tj. v neesterifikované formě. Další skupinu tvoří cyklické kyseliny a kyseliny s hydroxylovou funkční skupinou [15, 37, 38].

2.3.2 Metabolismus lipidů

Biosyntéza lipidů ze sacharidů a podobných substrátů je výsledek primární anabolické aktivity. Tvorba lipidů je závislá na nadbytku uhlíku v růstovém médiu a deficitu některých živin, jako je dusík. Uhlík je následně akumulován v podobě kyseliny citrónové, která slouží jako donor acetyl-CoA v cytoplasmě. Z acetyl-CoA jsou následně tvořeny buněčné mastné kyseliny, které jsou převedeny do formy triacylglycerolů. Triacylglyceroly jsou bohaté na polynenasycené mastné kyseliny s řetězcem C16 a C18 [36].

2.3.2.1 Biosyntéza mastných kyselin



Obr. 7: Mechanismus syntézy mastných kyselin [15, 38]

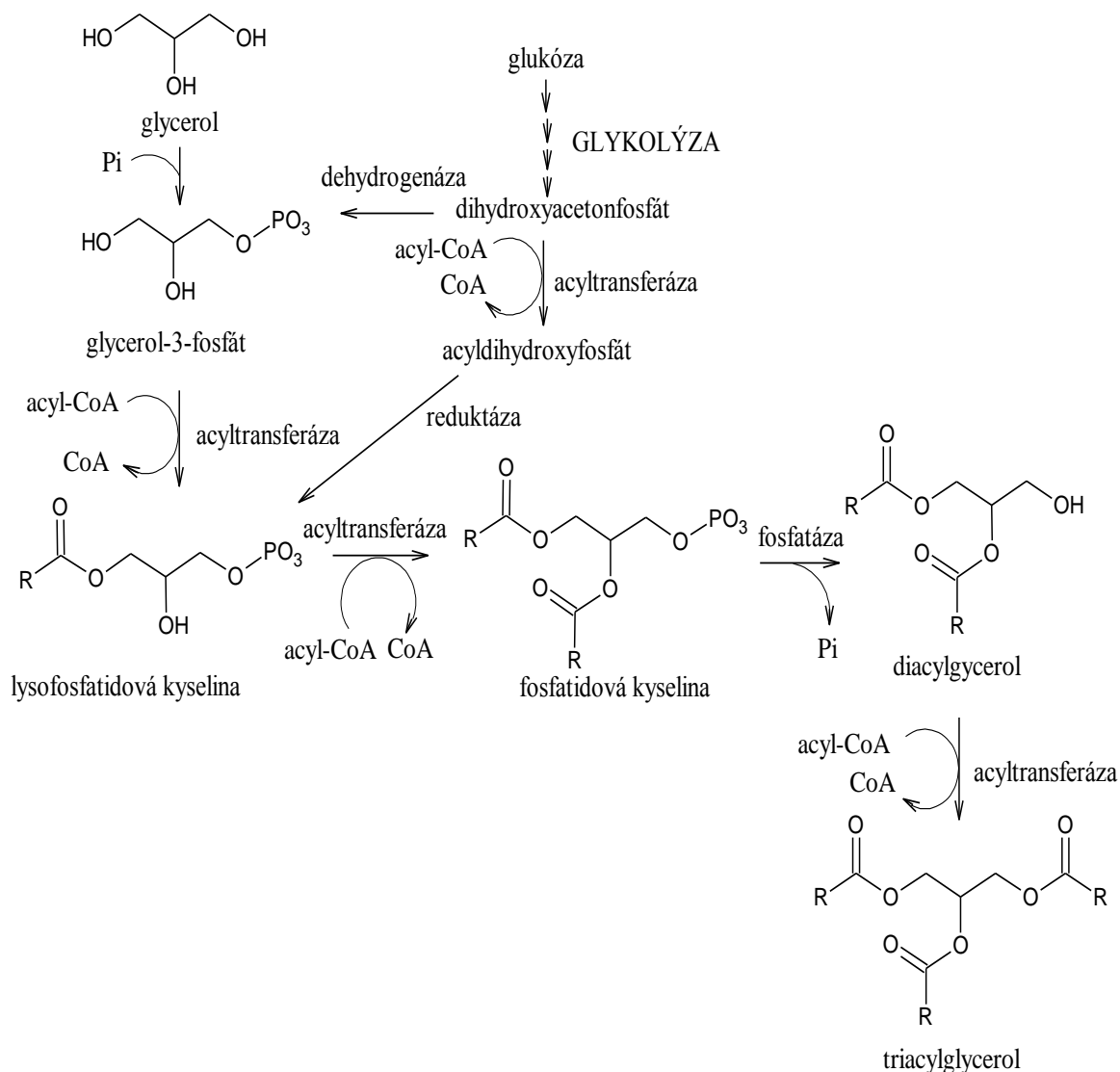
Základním stavebním kamenem pro biosyntézu mastných kyselin je acetyl-CoA. Acetyl-CoA vzniká zejména v mitochondriích, jako produkt oxidační dekarboxylace, β -oxidace mastných kyselin a metabolismu některých aminokyselin. Pro biosyntézu mastných kyselin (Obr. 7) probíhající v cytosolu je nutný transport acetyl-CoA přes mitochondriální membránu. Ten bývá zajištěn přeměnou acetyl-CoA na citrát pomocí citrátsyntázy. V cytosolu vzniká opět acetyl-CoA, který je následně převeden na energeticky bohatší formu malonyl-CoA enzymem acetyl-CoA-karboxylázou. Samotná syntéza mastných kyselin je zprostředkována multienzymovým komplexem syntázy mastných kyselin. Kvasinková cytosolová syntáza mastných kyselin se skládá ze dvou podjednotek: FAS I (β -podjednotka) a FAS II (α -podjednotka), které jsou uspořádány do hexamerového $\alpha\beta\beta$ komplexu. Celý cyklus biosyntézy mastných kyselin probíhá ve sledu reakcí (kondenzace, redukce, dehydratace, redukce), ve kterých je molekula mastné kyseliny prodlužována o dva atomy uhlíku. Ukončení biosyntézy probíhá alosterickou inhibicí a konečným produktem bývá kyselina palmitová s C16. Buňka aktivovanou kyselinu palmitovou dále používá pro výrobu lipidů, nenasycených mastných kyselin, hydroxykyselin, nebo mastných kyselin s delším řetězcem [15, 38].

2.3.2.2 *Biosyntéza triacylglycerolů*

Hlavní výchozí sloučeninou biosyntézy triacylglycerolů je glycerol-3-fosfát a dihydroxyaceton pocházející především z metabolismu sacharidů. Tyto sloučeniny jsou postupně esterifikovány pomocí acyltransferáz a acylů mastných kyselin až do vzniku fosfatidové kyseliny. Za účasti specifické fosfatázy je vzniklá kyselina fosfatidová zbavena fosfátu a přeměněna na diacylglycerol. Následnou acylací diacylglycerolu vzniká triacylglycerol (Obr. 8) [39].

Vyprodukované triacylglyceroly se nachází v buňkách převážně v kapalně formě. Shlukují se do větších, či menších kapének ve vakuolách, nebo ve funkčních strukturách. Lipidové kapénky jsou pokryty fosfolipidovou monovrstvou. V kapénkách mohou být přítomné i některé bílkoviny. Triacylglyceroly patří mezi hlavní energetické zdroje eukaryotních mikroorganismů. Přítomnost většího množství tuku může být indikátorem stárnutí kvasinky [39, 40].

Kvasinka *Rhodotorula glutinis* má podobné složení tuku jako živočichové a může v sobě hromadit až 43 % lipidů obsahujících ve velkém množství např. kyselinu olejovou, linolovou, staerovou, palmitovou a v malém množství kyselinu arachidovou. Na biosyntézu lipidů má velký vliv i teplota. Bylo zjištěno, že se snižováním teploty dochází i ke snížení produkce lipidů [40].



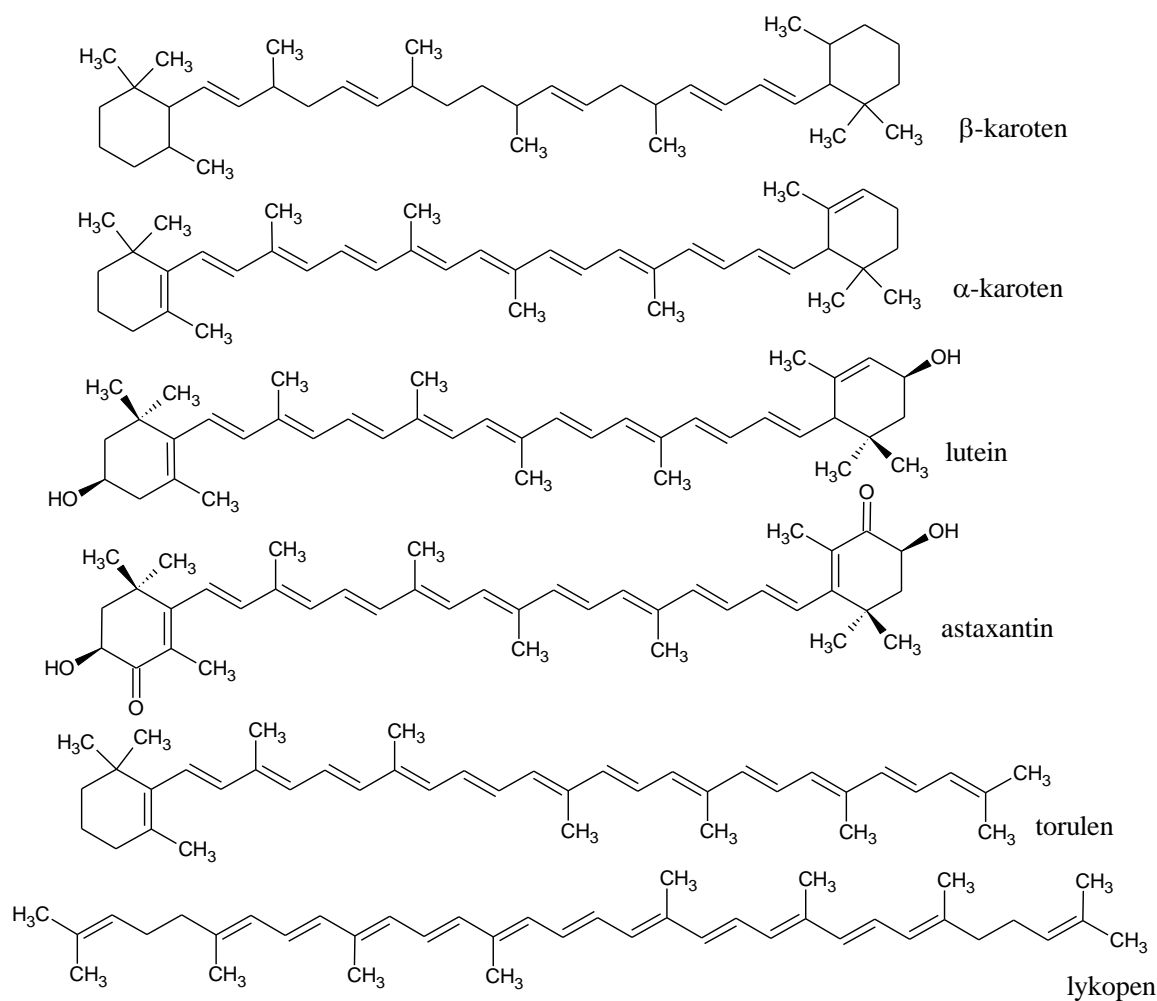
Obr. 8: Biosyntéza triacylglycerolů [39]

2.4 Karotenoidy a karotenoidní látky

Karotenoidy patří k nejdůležitějším složkám potravy. Jsou to přírodní barviva žluté až červené barvy, proto jsou komerčně využívány jako potravinářské a krmné aditiva. Některé karotenoidy jsou také označovány jako prekurzory vitamínu A. Patří mezi tzv. bioaktivní fytochemikálie snižující riziko výskytu degenerativních onemocnění, jako je rakovina a onemocnění kardiovaskulárního systému. Díky těmto aspektům jsou hojně využívány ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Karotenoidy jsou získávány především z mikrobiálních zdrojů. Jejich produkce závisí na vybraném kmenu, typu uhlíkatého a dusíkatého zdroje, zvolené kultivační teplotě apod. Oproti rostlinnému pěstování nejsou mikrobiální kultivace vázány na sezónní změny počasí ani na zeměpisnou polohu. Při použití levných uhlíkatých substrátů jsou náklady spojené s jejich produkcí výrazně nižší, než je tomu u rostlin [5, 35, 41].

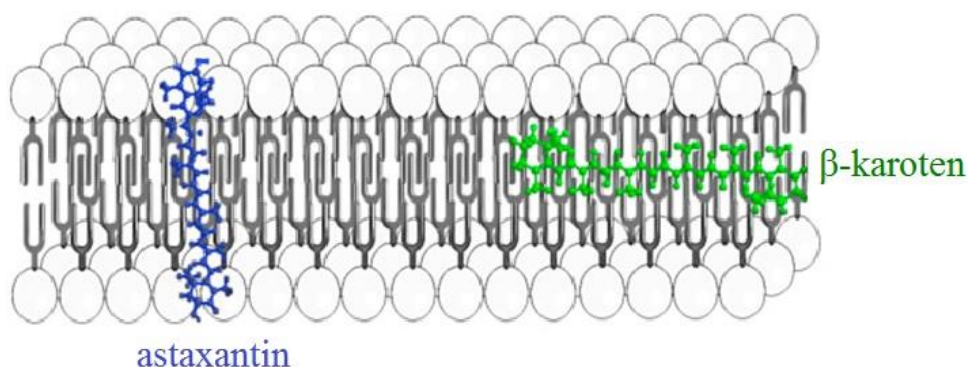
2.4.1 Struktura a funkce karotenoidů

Karotenoidy jsou terpenoidní látky rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Jejich struktura vychází z 8 izoprenoidních jednotek kondenzovaných do lineárního tetra-terpenového řetězce. Struktura karotenoidů představuje systém konjugovaných dvojných vazeb. Jejich nejdůležitějším strukturním prvkem jsou delokalizované polyenové p-elektrony umožňující absorpci světla o vlnové délce 400–500 nm. Tato schopnost vytváří pigmentový charakter. Z důvodu přítomnosti dvojných vazeb se karotenoidy vyskytují v konfiguracích *cis* a *trans*. Vedle systému konjugovaných dvojných vazeb a methylových zbytků obsahují některé skelety karotenoidů hydroxylové a ketonové skupiny. V průběhu syntézy karotenoidů může docházet k cyklizaci jejich řetězců. Rozlišujeme tedy karotenoidy acyklické (lykopen, fytoen, fytofluen), monocyklické (torulen, torularhodin, γ -karoten) a dicyklické (α -karoten, β -karoten, lutein, astaxantin). Dnes je více než 700 karotenoidů rozděleno do dvou hlavních skupin: karoteny a xantofyly. Karoteny mají ve své struktuře pouze uhlík a vodík, zatímco xantofyly ve svém skeletu obsahují i kyslík. Struktury vybraných karotenoidů jsou zobrazeny na Obr. 9 [3, 15, 41–44].



Obr. 9: Struktury vybraných karotenoidů

Karotenoidy patří mezi lipofilní látky vyskytující se volně, nebo v lipidových kapénkách v cytoplasmatické membráně. Jsou velmi citlivé na extrémní hodnoty pH a na světlo. Pokud se nacházejí v lipidových dvojvrstvách, mají tendenci se agregovat. Většina karotenoidů slouží jako ochrana před fotooxidací a peroxidací nenasycených mastných kyselin umístěných v buněčné membráně. Díky systému dvojných vazeb mohou karotenoidy zhášet singletový kyslík a inhibovat tvorbu peroxylových radikálů v reakčním médiu. V přítomnosti oxidativního stresu je přednostně produkován β -karoten. Vliv na antioxidační vlastnosti má i orientace karotenoidů v biologických membránách. Molekuly pigmentu vedoucí napříč membránou (astaxantin) vykazují lepší antioxidační ochranu, než molekuly umístěny paralelně s povrchem membrány (β -karoten, lutein), viz. Obr. 10 [43–47].



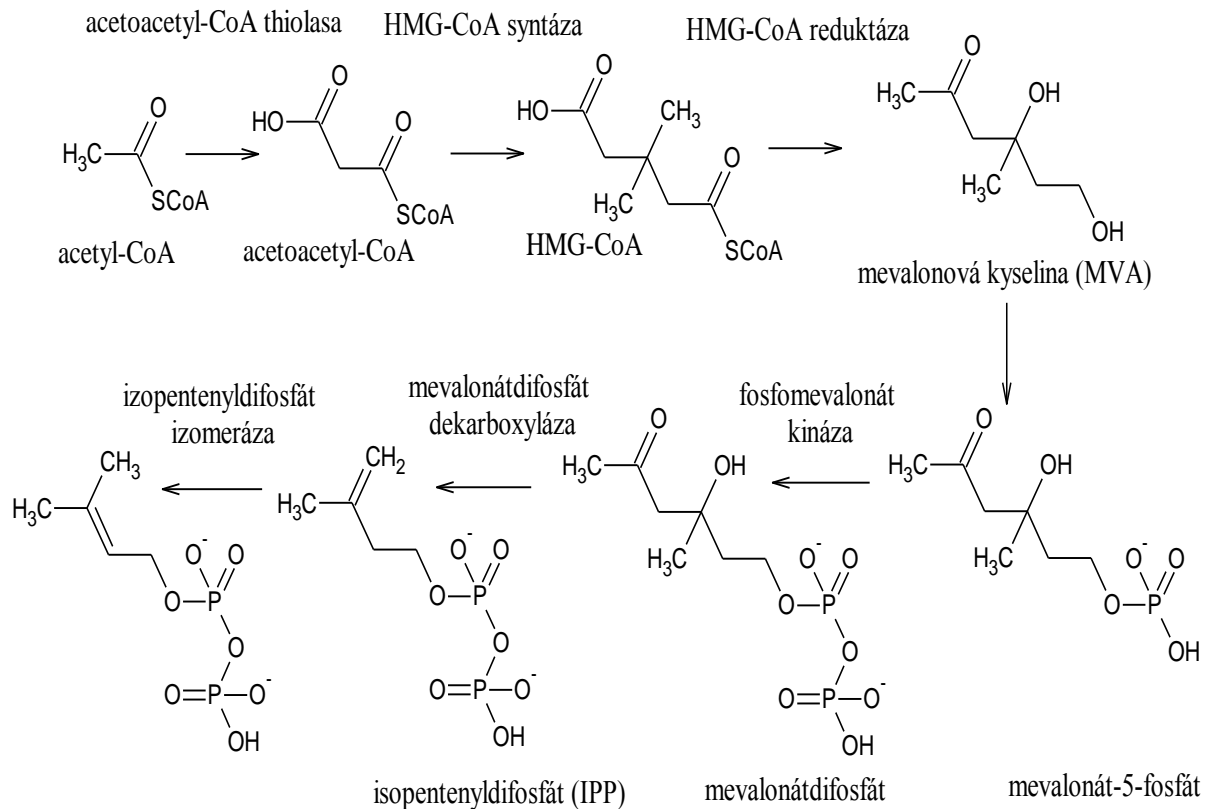
Obr. 10: Umístění karotenoidů ve fosfolipidové membráně [43]

2.4.2 Syntéza karotenoidů

Biosyntéza karotenoidů probíhá na konci exponenciální fáze v přítomnosti kyslíku a světla za účasti flavinu, nebo flavoproteinu, který je schopen fotooxidace. Oproti rostlinám, některým bakteriím a řasám probíhá u karotenogenních kvasinek biosyntéza karotenoidů, resp. biosyntéza jejich prekursoru isopentenylidifosfátu, (IPP) výhradně mevalonátovou dráhou v cytosolu [3, 40, 41, 48].

2.4.2.1 Biosyntéza IPP mevalonátovou dráhou

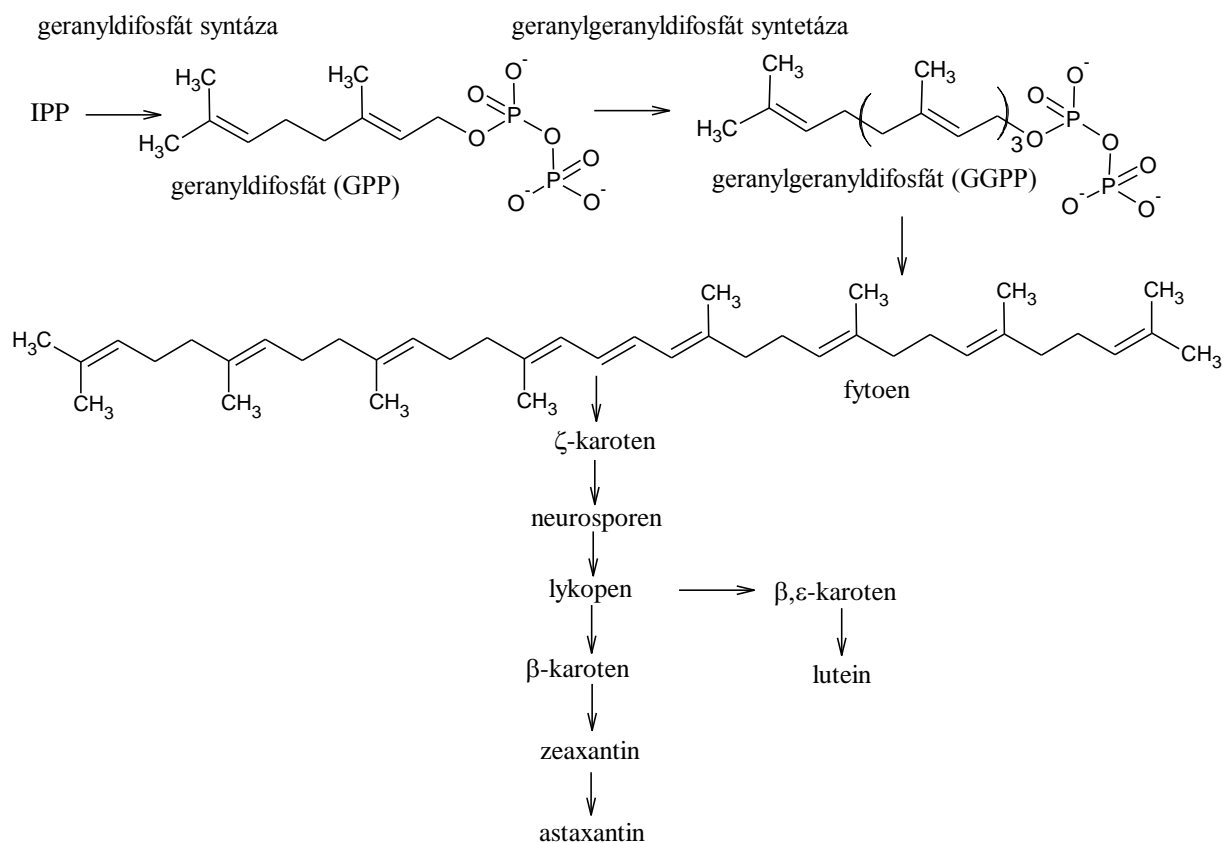
Výchozí látkou pro biosyntézu karotenoidů je acetyl-CoA, který je syntetizován přímo z kyseliny octové, nebo jako produkt oxidace sacharidů a mastných kyselin. Prvním krokem biosyntézy je konverze acetylu-CoA na 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) pomocí HMG-CoA syntázy. Následně je HMG-CoA pomocí regulačního enzymu HMG-CoA reductázy převeden na mevalonovou kyselinu (MVA). MVA je dále fosforylována a dekarboxylována až do vzniku izopentenylidifosfátu (IPP). Aktivovaný izopren IPP je v izomerační reakci převeden na dimethylallyldifosfát (DMAPP). Mechanismus mevalonátové dráhy je uveden na Obr. 11 [5, 42, 49].



Obr. 11: Mechanismus mevalonátové dráhy [5, 42, 49]

2.4.2.2 Biosyntéza karotenoidů

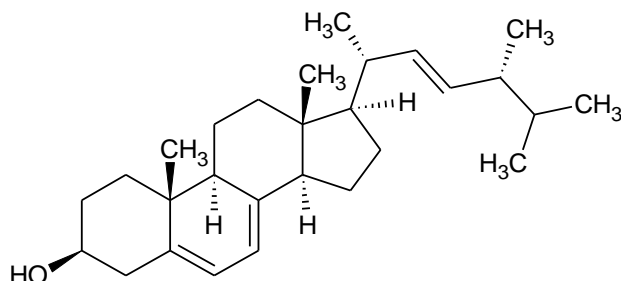
Syntézou tří molekul IPP a jedné molekuly DMAPP vzniká 20C meziprodukt geranyl-geranyldifosfát (GGPP). Kondenzací „hlava k hlavě“ dvou molekul GGPP za účasti fytoensyntázy dochází ke vzniku bezbarvého fytoenu, jakožto prvního karotenoidu (Obr. 12). Tato molekula může být prostřednictvím fytoendesaturázy převedena na neurosporen, který je prekurzorem lykopenu a β -zeakarotenu. Reakce vedoucí ke vzniku β -zeakarotenu probíhá zvláště u kmene *Rhodotorula glutinis* v přítomnosti inhibitorů např. difenylaminu, nebo ve stresových podmínkách. Cyklizací lykopenu a dalšími reakcemi za účasti specifických enzymů vznikají karoteny a toruleny. Karoteny jsou také prekurzory xantofylů, jako je astaxantin a lutein [5, 42, 49].



Obr. 12: Schéma biosyntézy karotenoidů [5, 42, 49].

2.5 Ergosterol

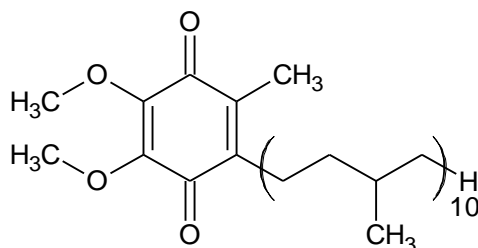
Ergosterol (Obr. 13) je organická steroidní molekula vyskytující se v buněčných membránách hub a prvoků. Ergosterol má velmi podobnou strukturu a funkci jako cholesterol v živočišných buňkách. Jeho hlavní úlohou je udržení fluidity, permeability a stability biomembrán. Patří do skupiny provitaminů D. Ergosterol je využívaným produktem zvláště v oblasti zdravotnictví. Jako sterol vykazuje antioxidační a protizánětlivé vlastnosti. Peroxidová forma ergosterolu prokázala potencionální protirakovinné účinky [50, 51].



Obr. 13: Ergosterol

2.6 Ubichinon

Ubichinon (Obr. 14), neboli koenzym Q (CoQ) je izoprenylovaný benzochinon vyskytující se v mitochondriích. Slouží jako nosič elektronů z komplexu I nebo II do komplexu III v dýchacím řetězci. CoQ je také antioxidant, který specificky zabraňuje oxidaci lipoproteinů a plazmatické membrány. Protože CoQ je nezbytný pro oxidační fosforylaci při vzniku ATP, používá se jako suplement pro pacienty v počátečním stádiu kongestivního srdečního selhání. Pro své antioxidační vlastnosti se používá také v kosmetickém průmyslu a k zabránění oxidace LDL cholesterolu [52, 53].

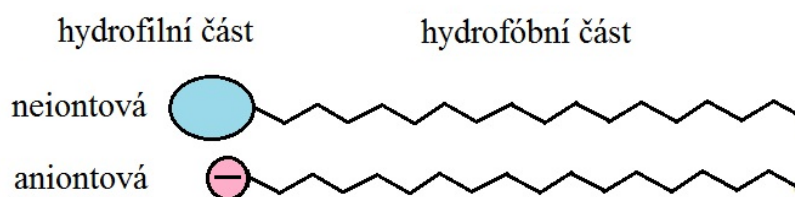


Obr. 14: Ubichinon

2.7 Biosurfaktanty

Surfaktanty, neboli povrchově aktivní látky, jsou amfipatické sloučeniny, skládající se z hydrofilních i hydrofobních součástí či molekul. Obecná struktura surfaktantů je zobrazena na Obr. 15. Akumulací na rozhraní dvou nemísitelných fází (voda/olej, voda/vzduch apod.) pomáhají snižovat jejich povrchové a mezifázové napětí. Na základě této vlastnosti stabilizují emulze a zvyšují rozpustnost hydrofobních a nerozpustných organických látek ve vodném prostředí. Povrchové napětí se ve vodném roztoku snižuje s rostoucí koncentrací povrchově aktivní látky. Snižování povrchového napětí vyvolává tvorbu micel. Tento jev se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC). Po dosažení této koncentrace se povrchové napětí již nesnižuje, nicméně dochází k dalšímu rozpouštění hydrofobních látek v důsledku zakotvení do micel tvořených surfaktantem [54, 55].

Povrchově aktivní látky mohou být syntetické, nebo vzniklé biologickou cestou – biosurfaktanty. Díky jejich nízké toxicitě, vysoké biodegradabilitě a zvýšené aktivitě v extrémních podmínkách jsou biosurfaktanty důležitým biotechnologickým produktem. Molekulová hmotnost biosurfaktantů se pohybuje v rozmezí 500–1500 Da. Biosurfaktanty mohou být aniontového, nebo neiontového charakteru, ovšem obsahuje-li surfaktant dusík, může nabývat určitých kationových vlastností. Mikrobiální biosurfaktanty se také rozdělují podle jejich původu a chemické struktury. Hydrofilní část molekuly je většinou tvořena z aminokyselin, karboxylových kyselin, fosfátové skupiny, peptidů, polysacharidů, nebo z cukerných alkoholů, na které jsou navázány nasycené, nenasycené, nebo mastné kyseliny hydrofobního charakteru (Obr. 15) [54–56].



Obr. 15: Obecná struktura surfaktantů

Většina mikrobiálních biosurfaktantů se vyskytuje v podobě, glykolipidů, lipopeptidů, lipoproteinů, fosfolipidů, mastných kyselin, polymerů a částicových sloučenin. Schopnost produkce biosurfaktantů mají zejména bakterie, nicméně řada povrchově aktivních látek jsou metabolity lipofilních kvasinek a vláknitých hub. Kvasinky žijící ve vodném prostředí se schopností využít uhlíkaté zdroje nepolárního charakteru, využívají vlastní povrchově aktivní látky k překonání fázového rozhraní mezi polárním prostředím a nepolárním substrátem. Díky této dispozici mohou lépe metabolizovat hydrofobní substráty jako ropu a tuk. Jednotlivé typy mikrobiálních surfaktantů, jejich kvalita a kvantita je závislá nejen na zdroji uhlíku, koncentraci dusíku, fosforu, hořčíku, železa a manganových iontů v médiu, ale také na kultivačních podmínkách zahrnujících hodnotu pH, teplotu apod. [57, 58].

2.7.1 Glykolipidy

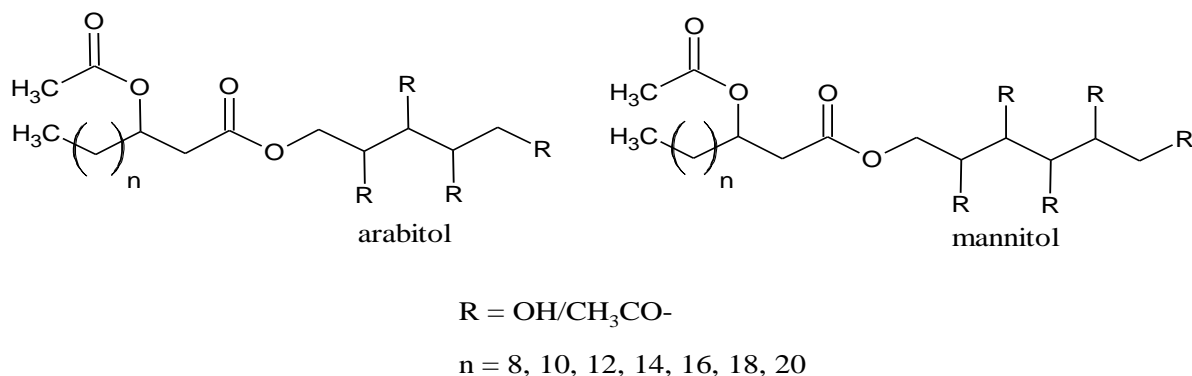
Kvasinkové glykolipidy jsou skupina látek obsahující sophorolipidy (*Candida bombicola*), mannosylerythritolové lipidy (*Candida antarctica*), cellobiosové lipidy, polyolové lipidy (*Ascomycota*, *Basidiomycota*) apod. Patří mezi nejrozšířenější nízkomolekulární biosurfaktanty. Jejich struktura je tvořena sacharidem a dlouhou mastnou kyselinou s alifatickým, hydroxylovým, nebo s nasyceným řetězcem. Díky přítomnému sacharidu zvyšují glykolipidické biosurfaktanty hydrofóbnost buněčné membrány v průběhu růstové fáze [58, 59].

Polyolové lipidy, na rozdíl od jiných extracelulárních glykolipidů, neobsahují sacharidovou složku. Polárnější část jejich skeletu tvoří cukerný alkohol. Polyolové lipidy se dále dělí na liamociny a polyolové estery mastných kyselin (PEFA). U kvasinek rodu *Rhodotorula* je významná zejména produkce PEFA. Výjimkou je kvasinka *Rhodotorula bogoriensis*, která jako jediná ze třídy *Basidiomycetes* produkuje sophorolipidy [60, 61].

2.7.1.1 Struktura PEFA

PEFA jsou amfifilní sloučeniny skládající se z acetylovaných (*R*)-3-hydroxy mastných kyselin navázaných esterovou vazbou na pátém, nebo šestém uhlíku cukerného alkoholu. Z cukerných alkoholů je v PEFA přítomný především D-arabitol a D-mannitol s různým stupněm acetylace. Acetylované (*R*)-3-hydroxy mastné kyseliny bývají nasycené s obvyklou délkou 16 až 18 uhlíků. Méně časté jsou PEFA s 14 a 20 uhlíkatým koncem. Doposud bylo identifikováno až devatenáct strukturálních forem. U většiny skeletů je polyolová hlavička plně acetylovaná, nebo obsahuje jednu volnou hydroxy- skupinu. Některé PEFA mohou mít na cukerném alkoholu dvě až tři volné hydroxylové skupiny [60, 62].

Profil PEFA velmi závisí na vybraném mikroorganismu. Do určité míry jej u některých kmenů mohou ovlivnit i kultivační podmínky včetně zdroje uhlíku. Struktura PEFA je zobrazena na Obr. 16 [61].



Obr. 16: Struktura PEFA [61]

2.7.2 Vlastnosti a fyziologická role PEFA

PEFA se vyskytuje v podobě amorfních kapének s různorodým zbarvením od oranžové až po červenohnědou. Hustota biosurfaktantu byla stanovena na 1,08 g·ml⁻¹. PEFA hrají v přežití kvasinek významnou roli, zejména v extrémních podmínkách po vyčerpání uhlíkatého substrátu. U kmenů *Basidiomycetae* izolovaných z fylosféry se předpokládá, že přítomnost PEFA má vliv na rozložení rostlinné kutikuly. Rozkladem rostlinné ochranné vrstvy se zvýší propustnost látek a to umožní lepší mikrobiální růst [61].

2.7.3 Metabolismus a produkce PEFA

Úplná dráha biosyntézy PEFA není dosud objasněna. Protože u některých kmenů existuje koprodukce triacylglycerolů s PEFA, očekává se, že biosyntéza PEFA probíhá společně s biosyntézou triacylglycerolů. Vylučování PEFA je pravděpodobně vyvoláno na počátku stacionární fáze limitací některým z nutrietů, např. dusíku. Dusík je přidáván do růstového média ve formě síranu amonného, kvasničného extraktu apod. Forma, kterou je dusík do media přidáván, obvykle neovlivňuje samotnou produkci biosurfaktantu. Omezení dusíku pravděpodobně způsobuje pokles specifických aktivit NAD- a NADP-dependentní isocitrátdehydrogenázy, která katalyzuje oxidaci isocitrátu na 2-oxoglutarát v citrátovém cyklu. Isocitrát se hromadí v mitochondriích a poté je transportován do cytosolu, kde je přeměněn na citrát a následně štěpen citrátlyázou za vzniku acetyl-CoA. Před samotnou sekrecí PEFA byla naměřena vysoká hladina acetyl-CoA. Pro lepší výtěžky je důležité zvolit růstové médium s vyšším obsahem uhlíkatého zdroje. Významné množství PEFA bývá v kultivačním prostředí s C/N poměrem vyšším než 30. Jako základní zdroj uhlíku pro kultivační média se převážně používá glukóza a glycerol. Předpokládá se, že u kmenů produkujících PEFA probíhá tvorba polyolů redukcí glukózy pomocí enzymu malátdehydrogenázy s kofaktorem NADP. Produkce PEFA je významná nejen při použití výše uvedených substrátů, ale také při kultivaci na mannitolu a arabitolu. Lepší výtěžky glykolipidů byly zaznamenány při přidání druhého zdroje uhlíku po exponenciální fázi [54, 61].

Z průmyslových odpadních produktů se pro výrobu PEFA používá především sacharóza dostupná ve formě melasy. Teplota, přítomnost kyslíku a pH prostředí má do značné míry také vliv na produkci PEFA. Dobrých výtěžků může být dosaženo kultivací nejen při 18°C, ale i při pokojové teplotě 24–27°C. Tvorba PEFA je výraznější v dostatečně arovaném prostředí. Naopak u vysoké aerace dochází ke tvorbě pěny, která snižuje tvorbu biosurfaktantů odstraněním lipidů a části biomasy z kultivačního média. Optimální produkce biosurfaktantů nastává při pH v rozmezí 5,5–6,5. U nestabilizovaných kultivací hodnota pH klesá a s ní klesá i tvorba glykolipidů [54, 61].

2.7.4 Aplikace biosurfaktantů

Většina povrchově aktivních látek je vyráběna synteticky. V důsledku široké škály funkčních vlastností je věnována velká pozornost právě mikrobiálním biosurfaktantům. Oproti syntetickým, jsou biosurfaktanty snadno biologicky odbouratelné a téměř netoxické. Tyto unikátní vlastnosti umožňují jejich potencionální využití v mnoha průmyslových odvětvích. Jedno z nejvýznamnějších využití biosurfaktantů je bioremediace. Jedná se např. o odstraňování těžkých kovů a uhlovodíků ze znečištěných míst. Biosurfaktanty mohou zvýšit bioremediaci prostřednictvím interakce s buněčným povrchem a následným zvýšením jeho hydrofobnosti k lepšímu příjmu nevodných substrátů. Biologické povrchově aktivní látky se používají i při regeneraci olejů v ropném průmyslu. Ve farmaceutickém průmyslu by mohly mít široké uplatnění v oblasti přenosu genů a v antimikrobiální, protivirové a protirakovinové aktivitě apod. Biosurfaktanty mohou mít i v potravinářském průmyslu řadu využití, například jako emulgátory v pekárenství, kde ovlivňují reologické vlastnosti mouky. V masném průmyslu emulgují částečně rozbité tukové tkáně [61].

2.8 Metody stanovení

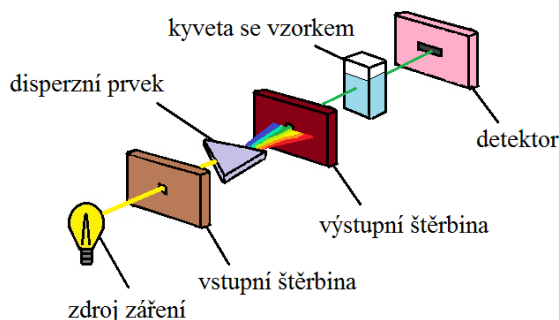
2.8.1 Absorpční spektrofotometrie

Absorpční spektrometrie je jednou z nejrozšířenějších metod pro stanovení koncentrace látek absorbující světelné záření. Patří mezi nedestruktivní techniky. Principem absorpční spektrometrie je absorpce viditelného a ultrafialového záření o vlnových délkách 200–800 nm. Zdrojem viditelného záření je wolframová a halogenová žárovka. Pro měření v ultrafialové oblasti se využívá deuteriové a vodíkové výbojky. Prostor, kde dochází k absorpci záření, je tvořeno vzorkem umístěným v kyvetě. Kyvety bývají plastové, nebo z křemičitého skla. Při absorpci pohltí molekula sledované analytu část záření, které vyvolá excitaci elektronů ve valenční vrstvě. Množství pohlceného záření je posléze vyhodnoceno detektorem. Z absorbovaného záření lze pomocí Lambert-Beerova zákona určit koncentraci c (1) analyzovaného vzorku:

$$A = \varepsilon_{\lambda}lc, \quad (1)$$

kde A je absorbance, ε_{λ} je molární absorpční koeficient a l značí tloušťku kyvety.

Absorpční spektrometrie může mít horizontální, nebo vertikální uspořádání. Základní schéma absorpčního spektrofotometru je znázorněno na Obr. 17 [63].



Obr. 17: Základní schéma molekulově absorpčního spektrofotometru

2.8.2 Elektroforéza

Elektroforetické metody patří k nerozšířenějším metodám separace a stanovení proteinů. Elektroforéza je obecný termín pro popis migrace a separace nabitých částic (iontů) v přítomnosti elektrického pole. Separační systém obsahuje dvě elektrody (anoda a katoda) umístěné naproti sobě v prostředí elektrolytu. Samotná separace iontů závisí na jejich elektroforetické mobilitě m a na intenzitě elektrického pole E . Rychlost v , jakou se budou ionty pohybovat, je dána vztahem (2):

$$v = mE. \quad (2)$$

Elektroforetická mobilita iontových částic je určena jejich velikostí, nábojem a teplotou. Pohyb iontů v elektrickém poli je také určen viskozitou roztoku, iontovou silou, hodnotou pH, velikostí pórů matrice atd. [64].

Elektroforéza probíhá nejčastěji v úzké kapiláře, nebo v gelu. Pro stanovení proteinů se používá zejména elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným PAGE-SDS (*Sodium Dodecylsulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Separace proteinů může probíhat jen tehdy, jestliže použitý elektrolyt má takové pH, při kterém nedochází k dosažení jejich izoelektrického bodu. Při těchto podmínkách mají proteiny náboj a mohou se pohybovat v elektrickém poli. Migrační rychlost je úměrná poměru náboje a hmotnosti bílkoviny [65].

2.8.2.1 PAGE-SDS

Gelová elektroforéza patří k nejpoužívanějším technikám pro separaci makromolekul. Použitá matrice by měla mít pravidelné a nastavitelné velikosti pórů. Neměla by nijak interagovat s analyzovaným vzorkem. Matrice působí jako molekulární síto, ve kterém hraje důležitou roli nejen elektroforetická mobilita, ale také velikost procházejících částic. Menší částice zpravidla procházejí nosičem rychleji. Realizace gelové elektroforézy probíhá převážně v matrici z agarózy, nebo z polyakrylamidu. Některé elektroforézy využívají škrobový nosič. Polyakrylamidové gely vznikají polymerací akrylamidu se síťovacím činidlem N,N'-metylenbisakrylamidem. Reakce probíhá principem radikálové polymerace v přítomnosti iniciátoru persíranu amonného (BIS) a katalyzátoru N,N,N',N'-tetramethylethylendiaminu (TEMED). Vzniklé methylenové můstky umožňují vytvoření gelu s vysoce řízenou porézností [65].

Polyakrylamidový gel je pevný a chemicky inertní. Na separaci proteinů se obvykle používá akrylamid a N,N'-metylenbisakrylamid v poměru 40:1. Systém elektroforézy v polyakrylamidovém gelu může probíhat kontinuálně, nebo diskontinuálně. Zatímco kontinuální separace probíhá na určitém pufru a gelu, diskontinuální uspořádání využívá různé koncentrace matric, iontovou sílu a pufrů s gradientem pH. Oproti kontinuální elektroforéze má diskontinuální systém lepší rozlišení i citlivost. Uspořádání elektroforézy může být rozděleno i dle orientace. Rozlišujeme vertikální a horizontální elektroforézu. V průběhu elektroforézy vytváří putující molekuly zóny. K jejich detekci se používají různá barviva, stříbro, nebo autoradiografie v případě detekce radioaktivních proteinů [65].

U analýzy proteinů probíhá elektroforéza za použití aniontového detergentu dodecylsírany sodného (SDS), který udává molekulám uniformní záporný náboj. Proteiny se mohou separovat jen podle velikosti. SDS je zároveň i redukční činidlo rozkládající disulfidové vazby proteinů, které tím ztrácí svou terciální strukturu. K vytvoření záporně nabitého komplexu se přidává 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny [65].

2.8.3 Chromatografické techniky

Chromatografie je fyzikálně-chemická metoda umožňující separaci, identifikaci a purifikaci složek směsi určených pro kvantitativní a kvalitativní analýzu. Princip této techniky je založen na interakci složek analytu s nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní) fází. Analyzovaná látka se rozpouští v mobilní fázi proudící tzv. kolonou, ve které je umístěna stacionární fáze. Podle míry interakce analyzovaných složek k oběma fázím dochází k jejich distribuci a následné separaci [66, 67].

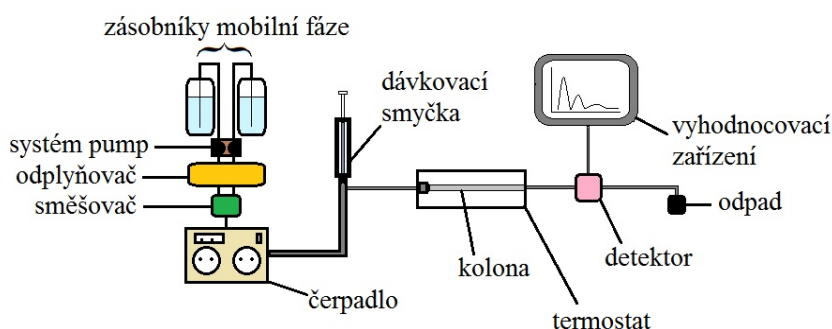
Během separace dochází k mnohonásobnému a opakovanému vytváření rovnovážných stavů mezi analytem a stacionární fází, analytem a mobilní fází a mezi stacionární a mobilní fází. V systému se mohou uplatňovat hydrofobní, hydrofilní, elektrostatické síly, dipól-dipól, ion-dipól interakce apod. Na základě mechanismu separace rozdělujeme chromatografii na adsorpční, rozdělovací, gelovou permeační, iontově výměnnou a afinitní chromatografii [67].

Sledované metabolity jsou analyzovány pomocí vysoko-účinné kapalinové chromatografie s detektorem fotodiodového pole (HPLC/PDA) a plynové chromatografie s plamenovou ionizační detekcí (GC/FID).

2.8.3.1 HPLC/PDA

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*High Performance Liquid Chromatography*) patří mezi nejpoužívanější analytické separační techniky. Důvodem je její vysoká citlivost, rozlišení a v neposlední řadě schopnost analýzy netěkavých a termicky labilních sloučenin. HPLC se používá převážně na stanovení aminokyselin, proteinů, nukleových kyselin, steroidů, sacharidů, pesticidů, terpenoidů, antibiotik, metalo-organických a anorganických sloučenin. Obecné schéma kapalinového chromatografu zobrazuje Obr. 18 [68].

V HPLC se jako mobilní fáze používá kapalina, která je z důvodu udržení konstantního průtoku vháněna na kolonu pod velkým tlakem. Pro HPLC se nejčastěji používají kovové, nebo skleněné náplňové kolony odolné proti vysokým tlakům. Náplňové kolony bývají 30–250 mm dlouhé s vnitřním průměrem 2,1–5 mm. Kolona je tvořena stacionární fází polárního, či nepolárního charakteru v závislosti na opačné polaritě mobilní fáze. Stacionární fáze bývá vyrobena ze sférických mikročástic o průměru 2–5 μm , nebo z porézního monolitického materiálu. Pro stanovení karotenoidů se používá nepolární stacionární a polární mobilní fáze. U většiny analýz je zapotřebí pracovat v módu gradientové eluce (složení mobilní fáze se mění s časem). Pomocí systému pump je přístroj schopný kompenzovat změny tlaku se změnou rozpouštědel v mobilní fázi. Pro správné fungování HPLC je nezbytné bezpulsní dávkování mobilní fáze. K detekci složek směsi se nejčastěji používají spektrofotometrické detektory. Jsou robustní, mají nízké pořizovací náklady a nízké detekční limity. Detektor fotodiodového pole (PDA) patří mezi univerzální detektory obsahující více než tisíc fotodiod. K ozáření analytu se používá kombinace wolframových a deuteriových lamp. Záření prochází průtokovou celou se vzorkem a následně štěrbinou. Pomocí holografické mřížky je rozděleno na pásy jednotlivých vlnových délek. Každá fotodioda měří jiný rozsah vlnových délek v průběhu celé analýzy [63, 67, 68].



Obr. 18: Schéma HPLC

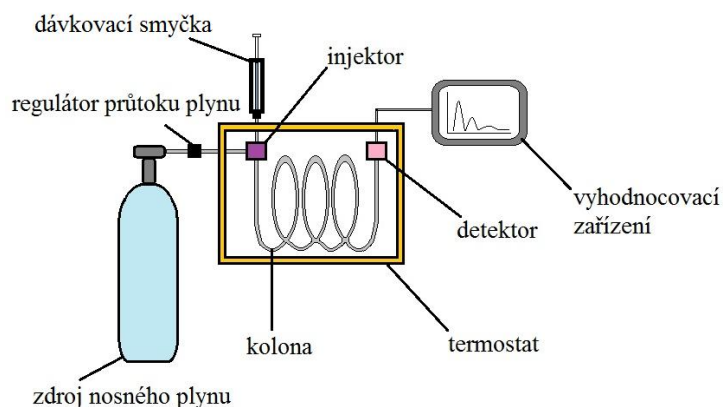
2.8.3.2 GC/FID

Plynová chromatografie (*Gas Chromatography*) se používá zejména pro analýzu složitějších směsí těkavých látek a organických sloučenin s vysokým bodem varu. Plynová chromatografie se vyznačuje přesnou kvantitativní analýzou, vysokým rozlišením a citlivostí. Nevýhodou plynové chromatografie je analýza termicky labilních a netěkavých látek. Analyty s vyšším bodem tání je potřeba před separací derivatizovat na těkavější sloučeniny. Příkladem je transesterifikace mastných kyselin na methylestery mastných kyselin [69, 70].

Oproti kapalinové chromatografii se v plynové chromatografii používá jako mobilní fáze vysoce čistý inertní plyn (helium, vodík, dusík). Mezi nosným plynem a analytem neprobíhají žádné interakce. Dělení složek směsi tedy závisí na reakci se stacionární fází. U plynové chromatografie se používají kolony dvojího typu: náplňové a kapilární [70].

Náplňové kolony bývají většinou z nerezové oceli. Skleněné materiály se používají převážně ke stanovení pesticidů a biomedicínských analýz. Pro adsorpční chromatografii se jako stacionární fáze používá silikagel, alumina apod. Náplň pro rozdělovací chromatografii je tvořena nosičem z křemeliny s nanesenou vrstvou netěkavé kapaliny. Podle způsobu nanesení stacionární fáze může být několik typů kapilárních kolon. Rozlišujeme kolony s kapalnou stacionární fází WCOT (*Wall-Coated Open Tubular*); kolony s nánosem vrstvy pevného sorbentu na vnitřním povrchu kapiláry (PLOT – *Porous-Layer Open Tubular*) a kolony s kapalnou stacionární fází zakotvenou na určitém nosiči (SCOT – *Support-Coated Open Tubular*). Kapilární kolony jsou vyráběny z kovového, skleněného, křemenného a plastového materiálu s délkou až 100 m. Vnitřní průměr těchto kolon se pohybuje v rozmezí 100–700 μm . Díky rozměrům umožňují kapilární kolony lepší separaci složek vzorku. Pro správnou separaci sledovaných metabolitů je nezbytná stabilní teplota celého systému [70].

Plamenově ionizační detektor (FID) patří mezi nejpoužívanější detektory plynové chromatografie. Používá se pro detekci sloučenin s C-H vazbami, kde poskytuje rychlou lineární odezvu v širokém rozmezí koncentrací. Nevýhodou FID je nemožnost analýzy permanentních plynů. Podstatou FID je spalování separovaných složek směsi pomocí plamene za přítomnosti nosného a pomocného plynu. Spalování probíhá v blízkosti dvou elektrod. Anodu tvoří kovová část hořáku a katoda je umístěna nad plamenem. Při tomto procesu dochází ke vzniku radikálů přenášející určité množství náboje. Přenesený náboj mezi dvěma elektrodami vytváří měřitelný signál. Schéma plynového chromatografu je zobrazeno na Obr. 19 [70].



Obr. 19: Schéma GC

3 CÍLE PRÁCE

Cílem práce je studium produkce lipolytických enzymů a dalších extracelulárních metabolitů kvasinek kultivovaných na odpadním tuku. V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- literární rešerše zaměřená na produkci lipáz a biosurfaktantů karotenogenními kvasinkami,
- kultivace vybraných druhů kvasinek na surovém odpadním tuku a sledování indukce produkce lipáz v průběhu růstu,
- molekulární charakterizace lipáz z karotenogenních kvasinek,
- komplexní vyhodnocení produkovaných extracelulárních metabolitů v průběhu růstu kvasinek na odpadním tuku.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Chemikálie použité pro kultivaci karotenogenních kvasinek

Kvasničný autolyzát (Himedia, Indie)
Bakteriologický pepton, (Himedia, India)
D-glukóza monohydrát p.a. (Lach-Ner s r.o., ČR)
Síran amonný p.a., (Lachema, ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a. (Lach-ner, S.r.o., ČR)
Síran horečnatý heptahydrát p.a. (Chemapol, ČR)
Glycerol (Lach-Ner, ČR)
Polysorbát 80 (Tween 80) (Lach-Ner, ČR)
Triton X-100 (Lach-Ner, ČR)
Tuk – směsný živočišný (Norilia, Norsko)
Hexan p.a. (Sigma-Aldrich, SRN)

Chemikálie použité pro stanovení molekulární velikosti a aktivity a lipolytických enzymů

p-nitrofenol (Sigma Aldrich, SRN)
p-nitrofenylpalmitát (Sigma Aldrich, SRN)
Dodecylsíran sodný (SDS) (Lach-Ner, ČR)
Triton X-100 (Lach-Ner, ČR)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-180 kDd (Sigma Aldrich, SRN)
Glycin (Lach-Ner, ČR)
Persíran amonný p.a. (Lach-Ner, ČR)
Kyselina chlorovodíková 37%, p.a. (Merci, ČR)
Glycerol (Lach-Ner, ČR)
 β -merkapt ethanol (Serva, SNR)
Bromfenolová modř (Serva, SNR)
Akrylamid (Serva, SNR)
N,N'-metylenbisakrylamid (Serva, SNS)
N,N'-tetramethylendiamin (Sigma-Aldrich, SRN)
Kyselina octová ledová, p.a. (Sigma-Aldrich, SRN)
Formaldehyd 35% (Lach-Ner, ČR)
Pentahydrát thiosíranu sodného, p.a. (Lachema, ČR)

Chemikálie použité pro extrakci a transesterifikaci a pro měření na HPLC a GC

Aceton p.a. (Lach-ner, S.r.o., ČR)
Ethylacetát pro HPLC (Sigma-Aldrich, SRN)
Kyselina sírová 96 %, p.a. (Merci, ČR)
Methanol pro HPLC (Sigma-Aldrich, SRN)
Hexan pro HPLC (Sigma-Aldrich, SRN)
Heptadekanová kyselina (Sigma-Aldrich, SRN)
Acetonitril pro HPLC (Sigma-Aldrich, SRN)

Chemikálie použité pro screening biosurfaktantů

Anthracen (Sigma-Aldrich, SRN)
Hexan p.a. (Sigma-Aldrich, SRN)
Triton X-100 (Lach-Ner, ČR)
Slunečnicový olej (ČR)

Ostatní použité chemikálie byly vesměs čistoty p.a. a byly získány od běžných distributorů.

4.2 Použité přístroje a pomůcky

Přístroje a pomůcky pro kultivace buněk

Mikroskop L II ooA (Intraco Micro, SRN)
GKB Color Digital CCD kamera (Tchaiwan)
Lucia Image active 5.0 (Laboratory Imaging spol. s r.o. ,ČR)
Třepačka Yellow line, (SRN)
Centrifuga (Sigma Laborzentrifugen, SRN)
Analytické váhy (Boeco, SRN)
Box Aura mini (BioTech, ČR)

Přístroje a pomůcky pro izolaci a analýzu vybraných metabolitů

HPLC/PDA sestava:

Sestava HPLC/MS (Thermo Fischer Scientific, USA)
Termostat - LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)
Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR
Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR
Vyhodnocovací systém Xcalibur
Kolona Kinetex C18, 5 μ m, 4,6 x 150 mm,
Phenomenex Držák předkolony - KJ0 - 4282, (ECOM, ČR)
Předkolona - C18,AJ0 - 4287, Phenomenex
TRACE™ 1300 GC/FID (ThermoQuest S.p.A., IT)
Kapilární kolona DB-23 o rozměrech 60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m
Filtry pro HPLC, PRE-CUT (Alltech, GB)
Vakuová odparka RV 06 (IKA, SRN)
Spektrofotometr UV/VIS Helios Delta, (Thermospectronic,GB)
Centrifuga U-32R (Boeco, DE)
Termostat blokový s 2 20místními bloky (VWR, ČR)
Vodní lázeň EL-20 (Merci a.s., ČR)
Vortex genius 3 (IKA, SRN)
Homogenizátor Disruptor Genie Digi (Scientific Industries, USA)
ELISA Reader BioTek ELx808
Ultrazvuková lázeň PS02000 (ČR)
Ultrafiltrační aparatura KrosFlo (Spectrum Labs, GRC)
Elektroforetická aparatura, Mini-PROTEAN (BioRad, USA)
Elektroforetický zdroj SH 300 (Shelton Scientific, USA)

4.3 Použité kmeny mikroorganismů

<i>Rhodotorula glutinis</i>	CCY 20-2-26
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	CCY 10-1-2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CCY 19-4-6
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	CCY 19-9-6

Uvedené kmeny byly získány ze sbírky Culture Collection of Yeasts, Chemického ústavu SAV v Bratislavě, Slovensko.

4.4 Kultivace mikroorganismů

4.4.1 Základní kultivace kmenů karotenogenních kvasinek

Vybrané mezofilní mikroorganismy byly kultivovány aerobně za neustálého třepání (120 rpm) při laboratorní teplotě. Z důvodu produkce karotenoidů probíhaly kultivace kmenů za nepřetržitého osvětlení. Použitá média byla před zahájením kultivace sterilována v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 45 minut. K manipulaci s mikrobiální kulturou docházelo pouze ve sterilním prostředí. Kultivace kvasinek probíhaly ve 3 fázích. Studované kmeny byly kultivovány paralelně dvakrát.

4.4.1.1 Inokulace

Na začátku každé kultivace bylo připraveno inokulační médium I. a II. Inokulace probíhala zaočkováním 3 kliček vybraného kvasinkového kmene ze zásobní kultury na Petriho misce do 30 ml inokulačního média I. Po kultivaci trvající 24 hodin, bylo inokulum I přeočkováno do inokulačního média II. K přeočkování inokula I do inokulačního média II byl volen objem vždy v poměru 1:5. Složení inokulačních médií I a II je uvedeno v Tab. 1.

Tab. 1: Složení inokulačních (YPD) médií

složení	množství (g)
bakteriologický pepton	20
kvasničný autolyzát	10
glukóza	20
voda	1000 ml

4.4.1.2 Produkční médium

Ve třetí fázi kultivace bylo přeočkováno nestočené inokulum II do sterilního produkčního média se zachováním poměru 1:5. Kultivace kvasinek v produkčním médiu trvala 96 hodin. Podmínky kultivace posledního stupně byly totožné s podmínkami kultivace inokula I a II. Pro kultivaci vybraných kmenů byly zvoleny 4 média s C/N poměry 13, 25, 50 a 100. V rámci každého C/N poměru probíhala kultivace kvasinek ve čtyřech médiích na čtyřech různých uhlíkatých substrátech: glukóza, glycerol, odpadní živočišný tuk a odpadní živočišný tuk s přidavkem emulgátoru TWEEN 80. Celkový objem produkčního média byl 42 ml. Vybrané kmeny byly kultivovány v Erlenmayerových baňkách o objemu 100 ml. Složení jednotlivých médií je uvedeno v Tab. 2.

Tab. 2: Složení produkčních médií

C/N poměr	uhlíkatý zdroj	množství (g)
13	glukóza	30,00
	glycerol	30,67
	odpadní živočišný tuk	18,70
	odpadní živočišný tuk + TWEEN 80	18,70 + 1,87
25	glukóza	49,50
	glycerol	46,00
	odpadní živočišný tuk	35,00
	odpadní živočišný tuk + TWEEN 80	35,00 + 3,50
50	glukóza	99,90
	glycerol	93,00
	odpadní živočišný tuk	70,00
	odpadní živočišný tuk + TWEEN 80	70,00 + 7,00
100	glukóza	199,80
	glycerol	186,00
	odpadní živočišný tuk	140,00
	odpadní živočišný tuk + TWEEN 80	140,00 + 14,00
síran amonný		4,00
dihydrogenfosforečnan draselný		4,00
heptahydrát síranu hořečnatého		0,69
voda		1000 ml

4.4.2 Kultivace kmenů karotenogenních kvasinek v mechanicky emulgovaných médiích

Ke zvýšení lipolytické aktivity byla provedena kultivace vybraných kvasinkových kmenů v médiu s odpadním živočišným tukem o C/N poměru 50, s přidavkem emulgátorů: TWEEN 80, Triton X-100 a vápenatých iontů jako lipázových induktorů. Pro zvýšení aktivity enzymů bylo každé produkční médium před zahájením kultivace mechanicky emulgováno. Produkční média byla po celou dobu kultivace protřepávána (120 rpm) a vystavena umělému světlu. Doba kultivace trvala 96 hodin při laboratorní teplotě. Příprava a průběh inokulace byl shodný jako u předchozích kultivací, viz. kapitola 4.4.1.1. Množství inokula II očkovaného do produkčního média bylo ponecháno na poměru 1:5. Celkový objem produkčního média byl 42 ml. Vybrané kmeny byly kultivovány v Erlenmayerových baňkách o objemu 100 ml. Studované kmeny byly kultivovány paralelně dvakrát. Složení jednotlivých produkčních médií je uvedeno v Tab. 3.

Tab. 3: Složení produkčních médií

složení	množství (g)
TWEEN 80	7,14
TWEEN 80 + CaCl ₂	7,14 + 0,40
Triton X-100	6,86
Triton X-100 + CaCl ₂	6,86 + 0,40
odpadní živočišný tuk	70,00
síran amonný	4,00
dihydrogenfosforečnan draselný	4,00
heptahydrát síranu hořečnatého	0,69
voda	1000 ml

4.4.3 Velkoobjemové kultivace kmenů karotenogenních kvasinek s časovými odběry

K prostudování lipolytické aktivity v průběhu celé kultivace byla provedena velkoobjemová kultivace s patnácti odběry po 0, 3, 6, 9, 12, 24, 30, 36, 48, 54, 60, 72, 78, 84, 96 hodinách. Pro produkční média byl zvolen C/N poměr 13. V rámci tohoto poměru probíhaly kultivace na čtyřech uhlíkatých substrátech: glykóza, glycerol, odpadní živočišný tuk a odpadní živočišný tuk s přídatkem emulgátoru TWEEN 80. Produkční média byla po celou dobu kultivace protřepávána (120 rpm) a vystavena umělému světlu. Doba kultivace trvala 96 hodin při laboratorní teplotě. Příprava a průběh inokulace byl shodný jako u předchozích kultivací, viz. kapitola 4.4.1.1. Množství inokula II očkovaného do produkčního média bylo ponecháno v poměru 1:5. Celkový objem produkčního média byl 500 ml. Vybrané kmeny byly kultivovány v Erlenmayerových baňkách o objemu 1000 ml. Odebíráno bylo vždy 10 ml kultivačního média. Studované kmeny byly kultivovány paralelně dvakrát. Složení jednotlivých produkčních médií je uvedeno v Tab. 4.

Tab. 4: Složení produkčního média

složení	množství (g)
glukóza	99,90
glycerol	93,00
odpadní živočišný tuk	70,00
odpadní živočišný tuk + TWEEN 80	70,00 + 7,00
síran amonný	4,00
dihydrogenfosforečnan draselný	4,00
heptahydrát síranu hořečnatého	0,69
voda	1000 ml

4.4.4 Velkoobjemové kultivace kmenů karotenogenních kvasinek s intenzivním provzdušováním

K získání vyššího množství lipolytických enzymů byla provedena velkoobjemová kultivace vybraných kvasinkových kmenů v médiu s odpadním živočišným tukem o C/N poměru 13. Pro zvýšení výtěžku biomasy a produkce biosurfaktantů byl celý systém nepřetržitě provzdušňován. Ke zkrácení adaptační fáze na počátku kultivace v produkčních médiích byla část odpadního živočišného tuku nahrazena jednodušším uhlikatým substrátem ve formě glycerolu. Produkční média byla po celou dobu kultivace vystavena umělému světlu. Doba kultivace trvala 96 hodin při laboratorní teplotě. Příprava a průběh inokulace byl shodný jako u předchozích kultivací, viz. kapitola 4.4.1.1. Množství inokula II očkovaného do produkčního média bylo ponecháno v poměru 1:5. Celkový objem produkčního média byl 1000 ml. Vybrané kmeny byly kultivovány v lahvích Pyrex o objemu 2000 ml. Studované kmeny byly kultivovány paralelně dvakrát. Složení produkčních médií je uvedeno v Tab. 5.

Tab. 5: Složení produkčního média

složení	množství (g)
odpadní živočišný tuk	20,00
glycerol	4,25
síran amonný	4,00
dihydrogenfosforečnan draselný	4,00
heptahydrát síranu hořečnatého	0,69
voda	1000 ml

4.4.5 Kultivace karotenogenních kmenů zaměřené ke zjištění produkce biosurfaktantů

Ke zjištění produkce povrchově aktivních látek byla provedena kultivace vybraných druhů karotenogenních kvasinek s indukcí rostlinným olejem na médiu s C/N poměrem 40. Jako kontrolní médium bylo připraveno médium bez přídavku rostlinného oleje. Produkční média byla po celou dobu kultivace protřepávána (120 rpm) a vystavena umělému světlu. Doba kultivace trvala 96 hodin při laboratorní teplotě. Příprava a průběh inokulace byl shodný jako u předchozích kultivací, viz kapitola 4.4.1.1. Množství inokula II očkovaného do produkčního média bylo ponecháno na poměru 1:5. Celkový objem produkčního média byl 42 ml. Vybrané kmeny byly kultivovány v Erlenmayerových baňkách o objemu 100 ml. Složení jednotlivých produkčních médií je uvedeno v Tab. 6.

Tab. 6: Složení produkčního média

	složení	množství (g)
kontrolní médium	glukóza	20,98
	kvasničný extrakt	2,00
	dihydrogenfosforečnan draselný	4,00
	heptahydrát síranu hořečnatého	0,69
médium s induktorem	glukóza	13,64
	kvasničný extrakt	2,00
	dihydrogenfosforečnan draselný	4,00
	heptahydrát síranu hořečnatého	0,70
	slunečnicový olej	42,60
voda		1000 ml

4.5 Izolace, stanovení, analýza kvasinkové biomasy a sledovaných metabolitů

4.5.1 Zpracování a gravimetrické stanovení biomasy

Ke gravimetrickému stanovení biomasy bylo odebráno 10 ml kultivačního média. Odebrané množství média bylo centrifugováno při 6000 rpm po dobu 2 minut a promyto směsí destilované vody s hexanem v poměru 1:1. Oddělený supernatant byl uschován pro analýzu extracelulárních metabolitů do mrazicího zařízení o teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pročištěná biomasa byla suspendována v 1 ml destilované vody, poté kvantitativně převedena do předem zvážených plastových zkumavek typu Eppendorf a následně vysušena lyofilizací. Hmotnost lyofilizovaných buněk odpovídala rozdílu hmotnosti zkumavky s biomasou a zkumavky bez biomasy. Vážení probíhalo na analytických vahách. Z hmotností biomas paralelních kultur bylo vypočítáno průměrné množství sušiny v $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.5.2 Stanovení aktivity extracelulárních lipolytických enzymů

Aktivita lipolytických enzymů v supernatantu byla stanovena kolorimetrickou metodou použitím p-nitrofenylpalmitátu, který je enzymaticky štěpen na žlutě zbarvený p-nitrofenol. Tento produkt je měřen spektrofotometricky při vlnové délce 405 nm. Pro zajištění maximální lipázové aktivity byla provedena optimalizace reakčního prostředí. K optimalizaci stanovení lipázové aktivity byla použita série pufrů: 0,1M tris HCl pufr o pH = 7,2; 0,1M tris HCl pufr o pH = 8,4 a 0,1M fosfátový pufr o pH = 7,2. Aktivita enzymu byla vyhodnocena jako průměr absorbancí ze dvou paralelních kultur.

4.5.2.1 Kalibrační křivka

Ke stanovení lipázové aktivity byla sestrojena kalibrační řada ze základního roztoku p-nitrofenolu o koncentraci $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Roztok p-nitrofenolu byl naředěn příslušným pufrům na koncentrace v rozmezí od $0,005 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ do $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. V rámci optimalizace byla kalibrační řada sestrojena pro všechny výše uvedené pufrů. Měření absorbance roztoků probíhalo na spektrofotometru ELISA reader při vlnové délce 405 nm.

4.5.2.2 Příprava substrátu

Do odměrné baňky o objemu 100 ml bylo naváženo 0,0135 g p-nitrofenylpalmitátu, 0,0170 g SDS a 1,0000 g Tritonu X-100. Odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou a uchovávána při teplotě $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 3 dní.

4.5.2.3 Stanovení enzymatické aktivity

Před stanovením lipolytické aktivity byl supernatant centrifugován při 6000 rpm po dobu 2 minut. Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150 μl pufru, 50 μl supernatantu a 100 μl substrátu. Enzymatická reakce byla sledována spektrofotometricky pomocí nárůstu absorbance prostřednictvím ELISA readeru po dobu 60 minut při teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Absorbance byla měřena každých 5 minut. Výsledná lipázová aktivita byla vypočítána pomocí vztahu (3):

$$a = \frac{A_{405} + d}{cVt}, \quad (3)$$

kde A_{405} je naměřená absorbance vzorku, c a d jsou koeficienty regresní rovnice kalibrační křivky $A = cx + d$; V je objem supernatantu a t je doba nárůstu absorbance.

4.5.3 Izolace a transesterifikace intracelulárních lipidů

Do kryplovací vialky o objemu 2 ml bylo naváženo 10 mg lyofilizované biomasy a přidáno 1,8 ml transesterifikační směsi. Transesterifikační směs se skládala z 15% methanolickeho roztoku kyseliny sírové a z kyseliny heptadekanové v koncentraci $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Po uzavření byla kryplovací vialka vložena do blokového termostatu k inkubaci při $85 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 120 minut. Obsah vialky ochlazené na laboratorní teplotu byl kvantitativně převeden do vialky o objemu 4 ml. Ke vzorku bylo následně přidáno 0,5 ml 0,1M roztoku NaOH a 1 ml hexanu. Směs byla intenzivně protřepávána pomocí vortexu po dobu 1 minuty. Po oddělení fází bylo odebráno 0,1 ml horní hexanové vrstvy obsahující methylestery mastných kyselin. Odebrané množství bylo smícháno s 0,9 ml čistého hexanu ve vialkách se závitkem o objemu 2 ml. Takto upravený vzorek byl připraven ke chromatografické analýze. Vzorky byly dočasně uchovávány při teplotě $-40 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.5.4 Analýza methylesterů mastných kyselin na GC

Ke chromatografické analýze methylesterů mastných kyselin byl použit systém TRACETM 1300 Gas Chromatograph od společnosti Thermo Fischer Scientific. Výstupní chromatogramy a data byly zpracovávány pomocí softwaru Chromeleon.

Samotná analýza probíhala při následujících podmínkách:

- Al 1310 Autosampler s děličem toku,
- Vstup:
 - teplota injektoru: 250 °C,
 - dělicí poměr: 10,
- Nosný plyn: vodík s průtokem 1 ml·min⁻¹,
- Kapilární kolona Zebron ZB-FAME,
 - rozměry: 30 m x 0,25 mm x 0,20μm,
- Oven teplotní program, viz. Tab. 7,
- Plamenový ionizační detektor:
 - teplota detektoru: 260 °C,
 - průtok vzduchu: 350 ml·min⁻¹,
 - průtok vodíku: 35 ml·min⁻¹,
 - make-up dusíku: 30 ml·min⁻¹.

Tab. 7: Oven teplotní program

	retenční čas (min)	vzestupný gradient (°C·min ⁻¹)	teplota (°C)	výdrž (min)
1	0,000	start	—	—
2	1,000	0,000	80,000	1,000
3	5,000	15,000	140,000	0,000
4	21,667	3,000	190,000	0,000
5	25,467	25,000	260,000	1,000
6	25,467	stop	—	—

Identifikace methylesterů mastných kyselin ve vzorku proběhla na základě porovnání jejich retenčních časů s retenčními časy methylesterů mastných kyselin ve standardu. Množství stanovovaných methylesterů bylo vyhodnoceno prostřednictvím plochy integrovaných píků výstupního chromatogramu. Pro úplnost analýzy bylo vyhodnoceno i celkové množství methylesterů mastných kyselin. Celkové množství methylesterů mastných kyselin bylo vyhodnoceno jako průměr ze dvou naměřených hodnot paralelních kultivací.

4.5.5 Extrakce karotenoidů a lipidických metabolitů

Ke stanovení karotenoidů, ubichinonu a ergosterolu bylo do Eppendorf zkumavky naváženo 20 mg lyofilizované biomasy. Z důvodu rehydratace bylo k navážené biomase přidáno 50–100 μl destilované vody. K rozrušení buněk byla rehydratovaná biomasa smíchána s množstvím skleněných kuliček odpovídajícím pětinasobku objemu biomasy. Následně byla biomasa extrahována v 1 ml acetonu za použití vortexu po dobu 15 minut.

Vzniklý extrakt byl kvantitativně převeden do slzičkové baňky. Posléze byl do extrahované biomasy přidán 1 ml acetonu a extrakce byla zopakována. Dvojnásobně extrahovaná biomasa byla poté promyta v 1 ml acetonu. Vzniklé extrakty byly spojeny a vysušeny na vakuové rotační odparce při 40 °C. Extrakt byl rozpuštěn v 1 ml ethylacetátu a přefiltrován do vialky se závitkem o objemu 2 ml. Takto upravený vzorek byl připraven ke chromatografické analýze. Vzorky byly dočasně uchovávány při teplotě -40 °C.

4.5.6 Analýza karotenoidů a lipidických metabolitů na HPLC

Ke chromatografické analýze karotenoidů, ubichinonu a ergosterolu byla použita HPLC sestava od společnosti Thermo Fischer Scientific. Výstupní chromatogramy a data byly zpracovávány pomocí softwaru Xcalibur. Samotná analýza probíhala při následujících podmínkách:

- Kolona C18 nepolární náplňová Kinetex Core Shell:
 - rozměry kolony: 4,6 mm x 150 mm,
 - rozměry částic: 5 μm,
- Složení mobilní fáze A: acetonitril:methanol:tris HCl pufr (pH=8) v poměru 84:2:14,
- Složení mobilní fáze B: methanol:ethylacetát v poměru 60:40,
- Průtok obilní fáze: 1 ml·min⁻¹,
- Délka analýzy: 19 min,
- Teperace systému: 25 °C,
- Detektor diodového pole (PDA):
 - vlnová délka pro analýzu karotenoidů: 445 nm,
 - vlnová délka pro analýzu ubichinonu a ergosterolu: 285 nm,
- Mód: gradientová eluce, viz. Tab. 8

Tab. 8: Eluční prgram

čas (min)	mobilní fáze A (%)	mobilní fáze B (%)
0,0	100,0	0,0
10,0	0,0	100,0
14,0	0,0	100,0
15,3	100,0	0,0
19,0	100,0	0,0

Identifikace metabolitů proběhla na základě porovnání retenčních časů sledovaných analytů s retenčními časy standardů: ergosterolu, ubichinonu a β -karotenu. Množství stanovovaných složek bylo vyhodnoceno prostřednictvím plochy integrovaných píků výstupního chromatogramu. Pro úplnost analýzy bylo vyhodnoceno i celkové množství karotenoidů. Celkové množství karotenoidů a lipidických látek bylo vyhodnoceno jako průměr ze dvou naměřených hodnot paralelních kultivací.

4.5.7 Stanovení molekulové hmotnosti extracelulárních lipolytických enzymů pomocí vertikální PAGE-SDS

Ke stanovení molekulové hmotnosti extracelulárních lipolytických enzymů byla použita aparatura P9DS (16 × 14 cm). Matricí byl polyakrylamidový gel a k vizualizaci proteinů bylo použito barvení stříbrem. K určení velikosti fragmentů byl použit standard Prestained Protein Ladder 10–180 kDa. K separaci proteinů byly použity supernatanty z velkoobjemových kultivací s intenzivním provzdušňováním, které byly před samotným stanovením zkoncentrovány ultrafiltrací o velikosti membránových pórů 1–10 kDa.

4.5.7.1 Použité roztoky

K provedení elektroforézy byly připraveny následující roztoky:

- **elektrodotový pufr (pH 8,3):** 3 g Tris, 14,4 g glycinu, 1 g dodecylsírany sodného v 1 litru ultra čisté vody,
- **iniciační činidlo:** 100 mg persíranu amonného v 1 ml ultra čisté vody,
- **separační pufr (1,5 M, pH 8,8):** 18,2 g Tris ve 100 ml ultra čisté vody, úprava pH pomocí 6M HCl,
- **vzorkovací pufr:** 5 ml glycerolu, 1 g dodecylsírany sodného, 2,56 ml β -merkaptóethanolu, 2,13 ml zaostřovacího pufru, 1 mg bromfenolové modři doplněno ultra čistou vodou do 10 ml,
- **zaostřovací pufr (0,5 M, pH 6,8):** 6 g Tris ve 100 ml ultra čisté vody, úprava pH pomocí 6M HCl,
- **zásobní roztok AA/BIS:** akrylamid/BIS (29:1), tj. 40 % akrylamid : 3,3 % BIS.

4.5.7.2 Příprava polyakrylamidového gelu

Pro separaci proteinových fragmentů byl použit 8% polyakrylamidový gel. Gelová matrice se skládala z 16,2 ml zásobního roztoku AA/BIS, 15 ml separačního pufru, 0,6 ml 10% dodecylsulfátu sodného, 300 μ l iniciačního činidla, 30 μ l TEMED a 28,2 ml ultra čisté vody. Vzniklá směs byla opatrně zamíchána a nadávkována do prostoru mezi dvě skla v nalévacím stojanu. Po ztuhnutí separačního gelu byl zbytek prostoru mezi skly vyplněn zaostřovacím gelem složeným z 2,7 ml zásobního roztoku AA/BIS, 2,5 ml zaostřovacího pufru, 0,1 ml 10% dodecylsulfátu sodného, 50 μ l iniciačního činidla, 50 μ l TEMED a 4,7 ml ultra čisté vody. Po vyplnění byl do tuhajícího gelu vnořen plastový hřeben pro vytvoření jamek pro nanášení vzorků.

4.5.7.3 *Příprava vzorků a provedení elektroforézy*

Zkoncentrované supernatanty byly smíchány se vzorkovacím pufrem v poměru 1:1 a denaturovány varem po dobu 4 minut. Po vyjmutí plastového hřebínku ze ztuhlého gelu byla skla s gelovou maticí upevněna do aparatury a do elektrodového prostoru byl nalit elektrodový pufr. Poté bylo nadávkováno do jamek v gelové matici 30 μ l vzorku a 5 μ l standardu. Následně byla celá aparatura pečlivě uzavřena víkem a připojena ke zdroji napětí (65mA) podobu 120 minut.

4.5.7.4 *Barvení stříbrem*

K vizualizaci proteinových fragmentů bylo zvoleno barvení stříbrem pomocí následujících roztoků:

- **fixační roztok:** 120 ml ledové kyseliny octové, 500 ml methanolu, 500 μ l 35% formaldehydu doplněno ultra čistou vodou do 1 litru,
- **promývací roztok:** 364 ml 96% ethanolu doplněno ultra čistou vodou do 1 litru,
- **senzibilizační roztok:** 200 mg pentahydrátu thiosíranu sodného v 1 litru ultra čisté vody,
- **barvicí roztok:** 2 g dusičnanu stříbrného, 760 μ l 35% formaldehydu doplněno ultračistou vodou do 1 litru,
- **vyvíjecí roztok:** 60 g uhličitanu sodného, 500 μ l 35% formaldehydu, 4 mg pentahydrátu thiosíranu sodného doplněno ultra čistou vodou do 1 litru,
- **ukončovací roztok:** 120 ml ledové kyseliny octové, 500 ml methanolu doplněno ultra čistou vodou do 1 litru.

Po skončení elektroforézy byla gelová matrice omyta destilovanou vodou a převedena do fixačního roztoku za stálého třepání (120 rpm) po dobu 30 minut. Poté byla matrice vyjmuta a vložena do promývacího roztoku za stálého třepání (120 rpm) po dobu 20 minut. V průběhu pomývání byl promývací roztok vyměněn dvakrát za čerstvý. Posléze byl gel 2 minuty protřepáván (120 rpm) v senzibilizačním roztoku a následně dvakrát promyt ultra čistou vodou. Pro obarvení byla matrice 20 minut vystavena studenému barvicímu roztoku a poté byla opět promyta ultra čistou vodou. Následně byl gel ponořen do 300 ml vyvíjecího roztoku a po 5 minutách byla vyvíjecí reakce zastavena ukončovacím roztokem o objemu 50 ml. Takto upravená gelová matrice byla přenesena mezi dvě fólie a naskenována. Velikost proteinových fragmentů byla určena pomocí standardů o známé molekulové hmotnosti.

4.5.8 Základní screening extracelulárních biosurfaktantů

Pro zjištění a důkaz produkce extracelulárních surfaktantů u vybraných kmenů byla zvolena metoda rozšiřování olejové skvrny – „*Oil spreading assay*“. Metoda rozšiřování olejové skvrny byla použita u kultivací s indukci rostlinným olejem. V rámci projektu byla provedena metoda stanovení aktivity emulze – „*Emulsification capacity assay*“ a metoda solubilizace krystalického anthracenu – „*Solubilization of crystalline anthracene*“ u velkoobjemových kultivací s intenzivním provzdušňováním a u základních kultivací, vyjma kultivací, kde byl použit emulgátor TWEEN 80.

4.5.8.1 Metoda rozšiřování olejové skvrny – „*Oil spreading assay*“

Do Petriho misky o průměru 15 cm bylo nadávkováno 40 ml ultra čisté vody a doprostřed 100 μ l oleje s přídavkem činidla. Na olejovou kapku bylo nadávkováno 10 μ l supernatantu. Mírou roztržení olejové kapky byla prokázána přítomnost surfaktantu. Obdobně byla testována pozitivní i negativní kontrola.

4.5.8.2 Stanovení emulgační aktivity – „*Emulsification capacity assay*“

Do skleněné zkumavky byl pipetován 1 ml supernatantu a 1 ml hexanu. Zkumavka byla pečlivě uzavřena, aby nedocházelo k odpaření rozpouštědla. Po 1 min intenzivního míchání na vortexu byla zkumavka ponechána při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Obdobným způsobem byla připravena negativní i pozitivní kontrola. Po 24 hodinách byla změřena pomocí šuplery výška emulzní vrstvy (h_e) a výška celkové kapaliny (h_{tot}). Z naměřených hodnot byl pomocí vztahu (4) byl spočítán emulgační index I_{24} :

$$I_{24} = \frac{h_e}{h_{tot}} \cdot 100 \% \quad (4)$$

Emulgační index I_{24} koreluje s množstvím přítomného surfaktantu.

4.5.8.3 Solubilizace krystalického anthracenu – „*Solubilization of crystalline anthracene*“

Do centrifugační zkumavky bylo pipetováno 5 ml supernatantu a přidáno malé množství hydrofóbního anthracenu. Obdobným způsobem byla připravena pozitivní i negativní kontrola. Zkumavka byla při laboratorní teplotě intenzivně míchána na třepačce po dobu 24 hodin. Posléze byl její obsah centrifugován 5 minut při 6000 rpm. Takto připravený vzorek byl podroben spektrofotometrickému měření v křemenných kyvetách při vlnové délce 354 nm. Naměřená absorbance odpovídá koncentraci anthracenu rozpuštěného v přítomném surfaktantu. Jako blank byla použita negativní kontrola. Pro vyloučení interference média byla změřena absorbance i u zkumavek obsahující pouze čistá kulturační média.

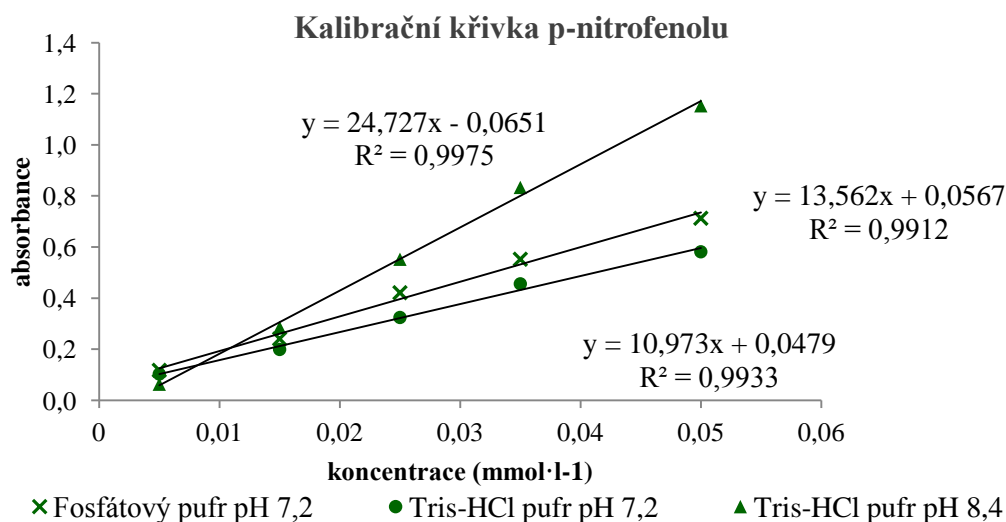
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Vyhodnocení kalibrační závislosti aktivity lipáz a optimalizace prostředí

Pro stanovení lipolytické aktivity byla sestrojena kalibrační řada ze základního roztoku p-nitrofenolu. P-nitrofenol byl naředěn příslušným pufrům na koncentrace v rozmezí 0,005–0,05 mmol·l⁻¹. V rámci optimalizace prostředí enzymové reakce byla kalibrační řada sestrojena i pro testované pufrů. Výsledky kalibračních závislostí jsou uvedeny v Tab. 9 a na Obr. 20.

Tab. 9: Kalibrační závislost p-nitrofenolu

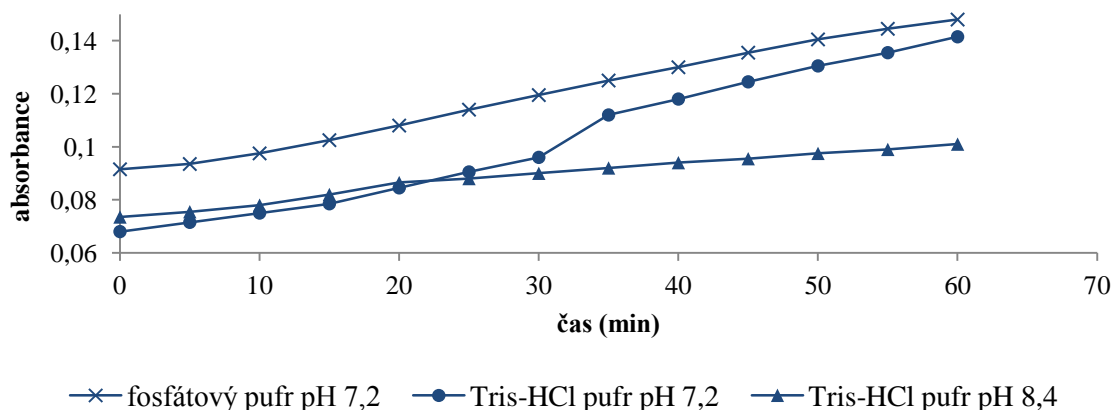
	koncentrace (mmol·l ⁻¹)				
	0,005	0,015	0,025	0,035	0,050
	absorbance při 405 nm				
fosfátový pufr pH 7,2	0,118	0,241	0,422	0,553	0,713
Tris-HCl pufr pH 7,2	0,103	0,199	0,325	0,456	0,582
Tris-HCl pufr pH 8,4	0,063	0,286	0,553	0,834	1,154



Obr. 20: Grafické znázornění kalibrační křivky p-nitrofenolu

Pro optimalizaci reakčního prostředí lipolytických enzymů, byla na základě literárních údajů vybrána série pufrů: 0,1M Tris HCl pufr o pH = 7,2; 0,1M Tris HCl pufr o pH = 8,4 a 0,1M fosfátový pufr o pH = 7,2. Aktivita lipáz byla vyhodnocena jako množství p-nitrofenolu (v U·ml⁻¹) uvolněného z p-nitrofenylpalmitátu enzymatickou reakcí v daném objemu supernatantu za určitý čas. Optimalizace prostředí byla provedena u základních kultivací karotenogenních kmenů. Pro zobrazení výsledků (Obr. 21) byla vybrána kultivace kvasinky *R. glutinis* v médiu s odpadním živočišným tukem s C/N poměrem 25.

Kultivace *R. glutinis* v tukovém médiu, C/N poměr 25



Obr. 21: Grafické znázornění optimalizace reakčního prostředí u kultivace kvasinky *R. glutinis* v tukovém médiu s C/N poměrem 25

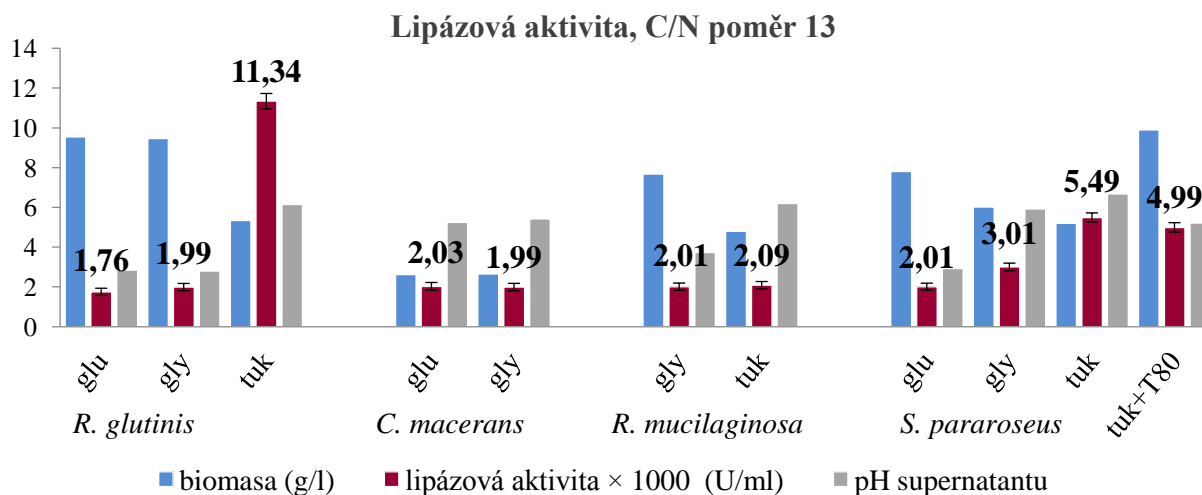
Nejvyšší lipázová aktivita této kultivace byla pozorována v prostředí s Tris-HCl pufrům o pH 7,2. Aktivita enzymu byla v tomto prostředí stanovena na $4,20 \pm 0,19 \cdot 10^{-3} \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$. Ve srovnání s lipázovou aktivitou v Tris-HCl pufru o pH = 8,4 ($2,40 \pm 0,58 \cdot 10^{-3} \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) je tato hodnota téměř dvojnásobně vyšší. Lipázová aktivita za použití fosfátového pufru o pH 7,2 činila $3,16 \pm 0,25 \cdot 10^{-3} \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$. Na základě vypočítaných lipázových aktivit základních kultivací bylo pro stanovení lipázových aktivit nadcházejících kultivací zvoleno prostředí s Tris-HCl pufrům o pH 7,2. Lipázové aktivity naměřené v prostředí všech použitých pufrů jsou uvedeny v Příloha 1 a v Příloha 2.

5.2 Výsledky stanovení aktivity lipolytických enzymů a dalších metabolitů základních kultivací karotenogenních kvasinek

Koncentrace uhlíku a dusíku (C/N poměr) v kultivačních médiích je jedním z nejdůležitějších parametrů, které ovlivňují mikrobiální produkci extracelulárních lipáz. Dalším důležitým parametrem je volba uhlíkatého substrátu. Ke zjištění optimálního prostředí byly experimenty prováděny v médiích s C/N poměry 13, 25, 50 a 100. Lipolytická aktivita byla sledována v rámci mezinárodního projektu „LipoFungi“ přednostně v médiích s odpadním živočišným tukem a v tukových médiích s přidávkou emulgátoru TWEEN 80, který byl měl pozitivně stimulovat aktivitu enzymu. Ačkoliv jsou tuky hlavním substrátem lipolytických enzymů, byly v rámci tohoto experimentu otestovány i uhlíkaté substráty, jako je glukóza a glycerol. Lipázová aktivita byla sledována u kmenů *Rhodotorula glutinis*, *Cystofilobasidium macerans*, *Rhodotorula mucilaginosa* a *Sporidiobolus pararoseus*. Přesné podmínky kultivace jsou uvedeny v kapitole 4.4.1. V rámci hlubšího porozumění metabolismu kvasinek bylo pozorováno i množství a zastoupení intracelulárních metabolitů a biomasy.

5.2.1 Výsledky základních kultivací kmenů karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 13

5.2.1.1 Stanovení aktivity lipolytických enzymů



Obr. 22: Výsledky stanovení lipázové aktivity u základních kultivací s C/N poměrem 13

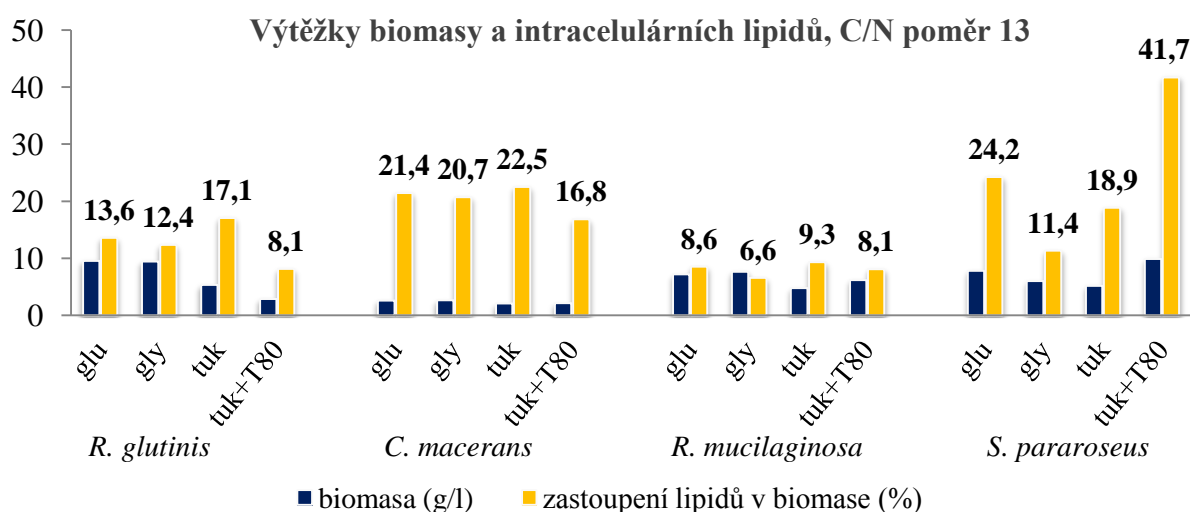
Z výsledků aktivity lipolytických enzymů zobrazených na Obr. 22 je patrná lipázová aktivita nejen v médiích s obsahem tuku jako přirozeného substrátu lipáz, ale i v médiích s glukózou a glycerolem. Z tohoto výsledku lze usoudit, že lipolytické enzymy studovaných kmenů kvasinek jsou produkovány v malých množstvích i na jiných médiích a indukce jejich produkce je vyvolána přítomností příslušného substrátu. Indukce enzymu může být pravděpodobně vyvolána i jinými faktory.

Nejvyšší hodnoty lipázových aktivit byly pozorovány v samostatných tukových médiích. U kvasinky *R. glutinis* byla hodnota aktivity enzymu stanovena až na $11,34 \pm 0,39 \cdot 10^{-3} \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$. V tukových médiích s emulgátorem byla lipázová aktivita naměřena pouze u kvasinky *S. pararoseus*. U ostatních kvasinkových kmenů mohl přídavek emulgátoru enzym inhibovat. U kmene *S. pararoseus* aktivita enzymu v emulgovaném médiu ve srovnání se samostatným tukovým médiem poklesla. Lipáza tohoto kmene mohla být mírně inhibována samotnou molekulou emulgátoru, nebo produkce lipolytických enzymů nebyla tak výrazná, díky zlepšené dostupnosti substrátu v emulgovaném systému. Velmi zajímavý je výsledek lipázových aktivit u kvasinky *C. macerans*, u které aktivita enzymu byla stanovena pouze v glycerolovém a glukózovém médiu. Přesný popis stanovení lipázových aktivit je uveden v kapitole 4.5.2.

5.2.1.2 Stanovení výtěžků biomasy a intracelulárních metabolitů

Z výsledků uvedených na Obr. 23 je patrné, že nejvyšší množství biomasy bylo stanoveno v glukózovém a glycerolovém médiu. Glukóza a glycerol je považován za jednoduchý uhlíkatý substrát, což umožňuje rychlejší utilizaci a tím i vyšší nárůst buněčné kultury [71]. Nicméně samotná schopnost využít a posléze valorizovat surový živočišný tuk je biotechnologicky zajímavou vlastností karotenogenních kvasinek. V tukových médiích jsou ale pozorovány velmi nízké výtěžky, zřejmě dochází k obtížnějšímu využití tohoto substrátu. Kvasinka *S. pararoseus* vykazuje v emulgovaném tukovém médiu vyšší výtěžek biomasy, což odpovídá zlepšené dostupnosti substrátu. U kvasinky *C. macerans* byl zaznamenán výrazný pokles výtěžku biomasy ve všech médiích. Přesný postup gravimetrického stanovení biomasy je popsán v kapitole 4.5.1.

Buněčné lipidy byly stanoveny plynovou chromatografií jako methylestery mastných kyselin. Přesný postup stanovení je popsán v kapitole 4.5.3 a 4.5.4. Z profilů mastných kyselin studovaných kvasinkových kmenů bylo vyhodnoceno procentuální zastoupení buněčných lipidů.

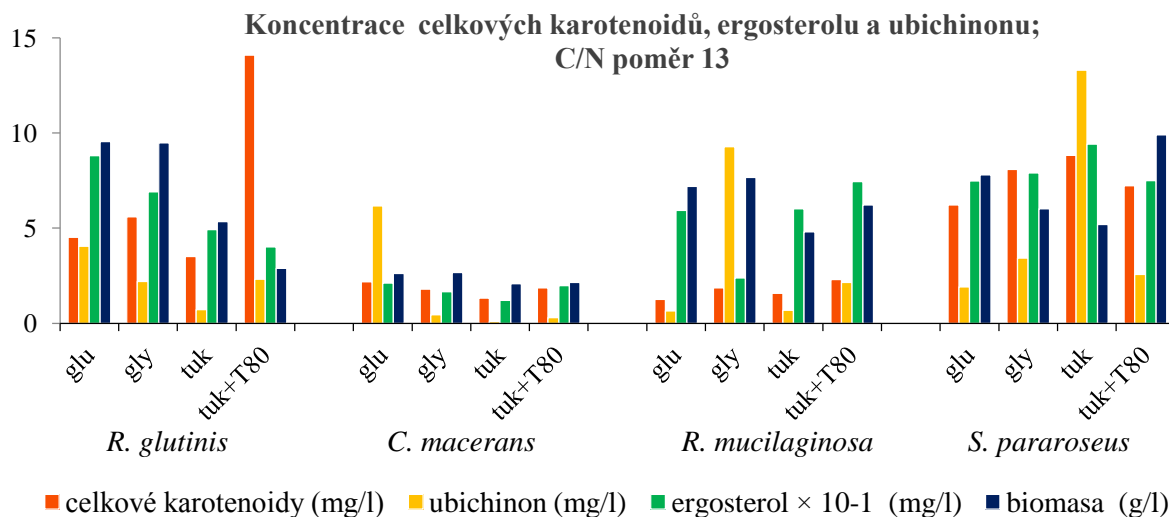


Obr. 23: Grafické znázornění výtěžků biomasy a procentuálního zastoupení intracelulárních lipidů u základní kultivace kmenů karotenogenních kvasinek v médiu s C/N poměrem 13

Kultivace v médiích s C/N poměrem 13 prospívala z hlediska procentuálního zastoupení buněčných lipidů na Obr. 23 nejvíce kvasinkám *C. macerans* a *S. pararoseus*. Ukázka kultivace kvasinky *C. macerans* je zobrazena v Příloha 3. Vyšší hodnoty byly u většiny kmenů naměřeny zejména v tukových a v glukózových médiích. Nižší zastoupení buněčných lipidů bylo pozorováno v médiích s glycerolem a v tukovém médiu s emulgátorem. Výjimkou je kvasinka *S. pararoseus*, u které bylo zastoupení buněčných lipidů v tukovém médiu s emulgátorem přes 40 %.

Koncentrace celkových karotenoidů, ubichinonu a ergosterolu byla stanovena pomocí kapalinové chromatografie. Podmínky a postup stanovení je popsán v kapitole 4.5.5. a 4.5.6.

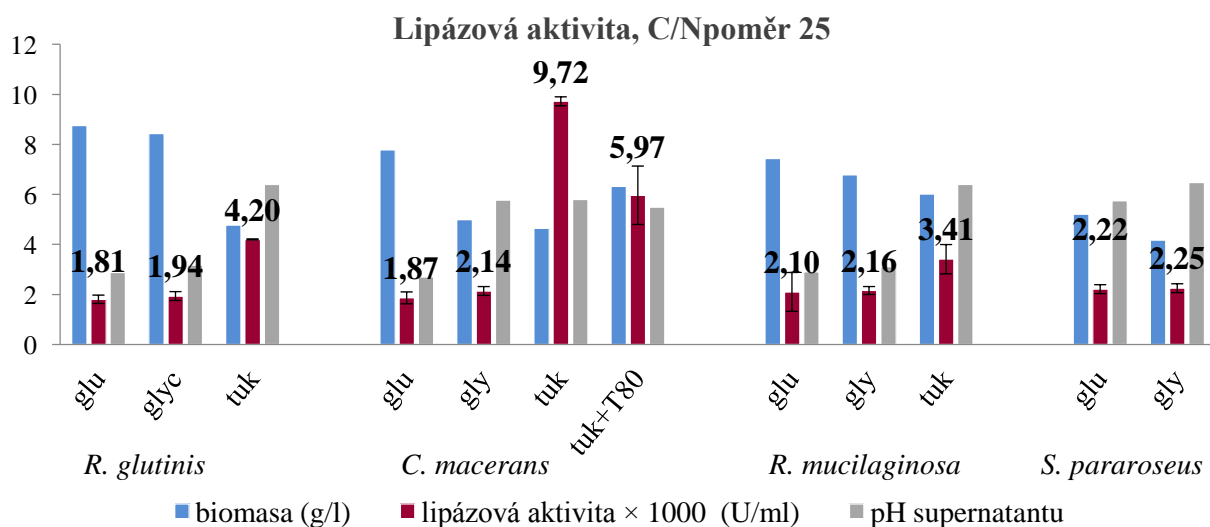
Z Obr. 24 je patrné, že množství karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu bylo významné u kvasinek *R. glutinis* a *S. pararoseus*, u kterých bylo pozorováno i vysoké výtěžky biomasy. U kvasinky *C. macerans* byly koncentrace sledovaných metabolitů, kromě koncentrace ubichinonu v glukózovém médiu nízké, nicméně také odpovídaly nárůstu biomasy. Produkce karotenoidů a ubichinonu u kvasinky *R. mucilaginosa* byla malá, avšak v glycerolovém médiu se množství ubichinonu výrazně zvýšilo. Obsah ergosterolu u tohoto kmene odpovídal vyššímu nárůstu biomasy, v glycerolovém médiu vidíme výrazný pokles výtěžku tohoto metabolitu.



Obr. 24: Výsledky stanovení koncentrací karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu u základních kultivací s C/N poměrem 13

5.2.2 Výsledky základních kultivací kmenů karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 25

5.2.2.1 Stanovení aktivity lipolytických enzymů



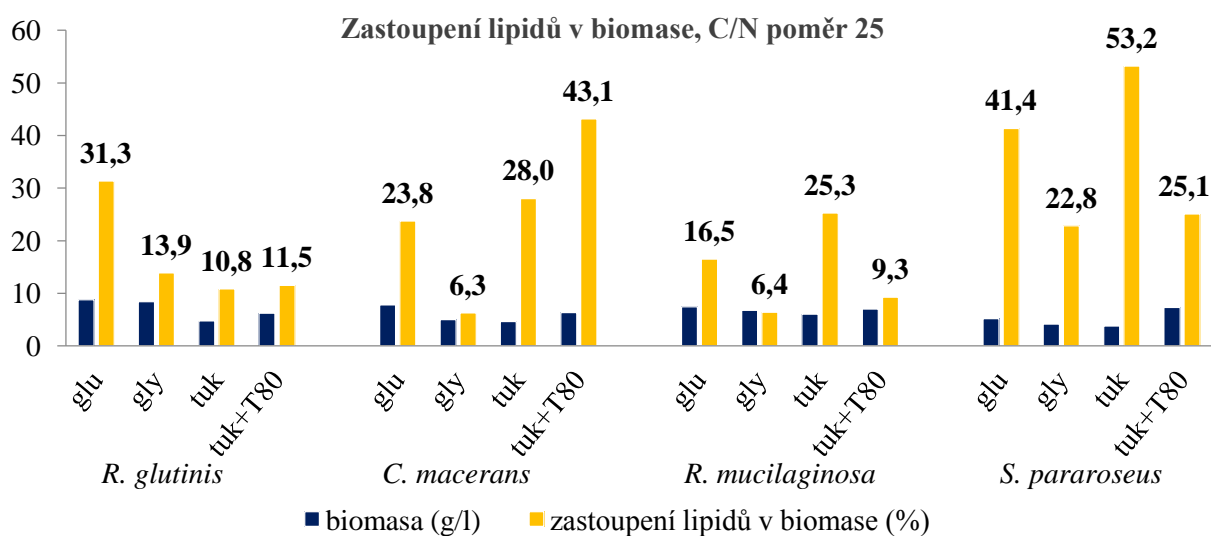
Obr. 25: Výsledky stanovení lipázové aktivity u základních kultivací s C/N poměrem 25

Z grafického zobrazení výsledků lipázových aktivit z kultivací o C/N poměru 25 (Obr. 25) je zřejmé, že aktivita enzymu byla naměřena v menší míře i v médiích s glukózou a glycerolem. V tukových médiích s emulgátorem byla aktivita enzymu naměřena pouze u kultivace kvasinky *C. macerans*. Ve srovnání s lipázovou aktivitou u tukového média, zde můžeme opět pozorovat pokles.

Lipáza tohoto kmene mohla být mírně inhibována samotnou molekulou emulgátoru, nebo produkce lipolytických enzymů nebyla tak výrazná, díky zlepšené dostupnosti substrátu v emulgovaném systému, což se projevuje zvýšeným nárůstem biomasy. Z hlediska kmenů jsou výsledky lipázových aktivit kvasinek rodu *Rhodotorula* téměř totožné. Zajímavé jsou výsledky aktivit u kmene *S. pararoseus*, u kterého byly lipázové aktivity naměřeny pouze v glukózovém a glycerolovém médiu. Nejvyšší lipázová aktivita byla naměřena v tukovém médiu kvasinky *C. macerans* ($9,72 \pm 0,18 \cdot 10^{-3} \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$).

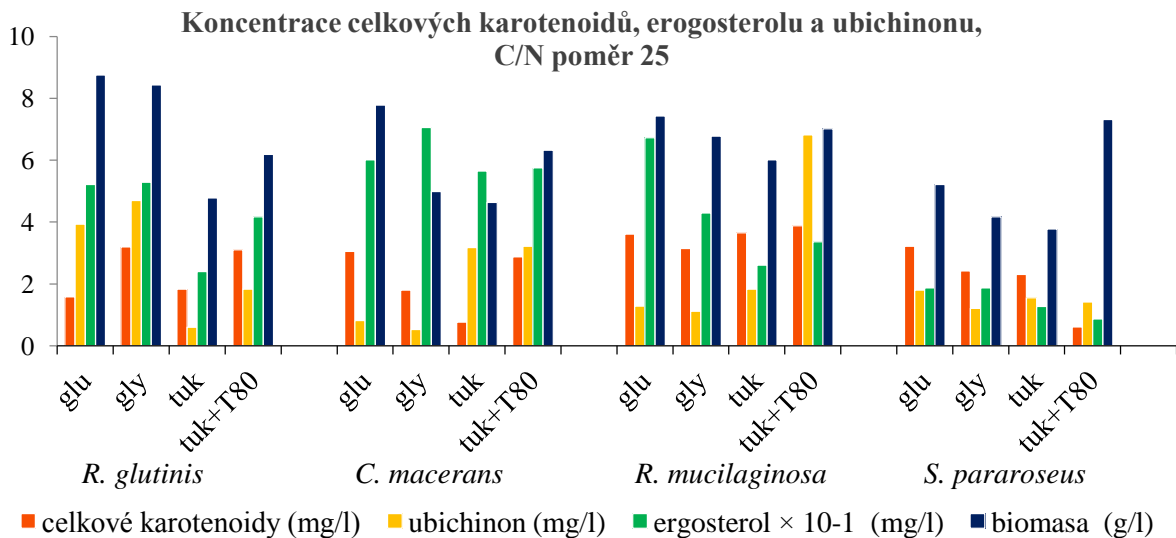
5.2.2.2 Stanovení výtěžků biomasy a intracelulárních metabolitů

Nejvyšší množství biomasy bylo izolováno z glukózového a glycerolového média (Obr. 26). V rámci tukových médií byl výtěžek biomasy vyšší v kultivaci v přítomnosti emulgátoru. Přídavek emulgátoru (TWEEN 80) tedy umožňuje lipolytickým enzymům lépe využít hydrofobní substráty [72].



Obr. 26: Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase u základní kultivace kmenů karotenogenních kvasinek v médiu s C/N poměrem 25

Z výsledků uvedených na Obr. 27 je zastoupení buněčných lipidů nejvyšší u kmene *S. pararoseus* v glukózovém a tukovém médiu, kde jejich zastoupení překračuje hodnotu 40 %. Nad 40 % intracelulárních lipidů je produkováno i v tukovém médiu s přídavkem emulgátoru u kvasinky *C. macerans*. Nižší výtěžky jsou pozorovány v glycerolových médiích.



Obr. 27: Výsledky stanovení koncentrací karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu u základních kultivací s C/N poměrem 25

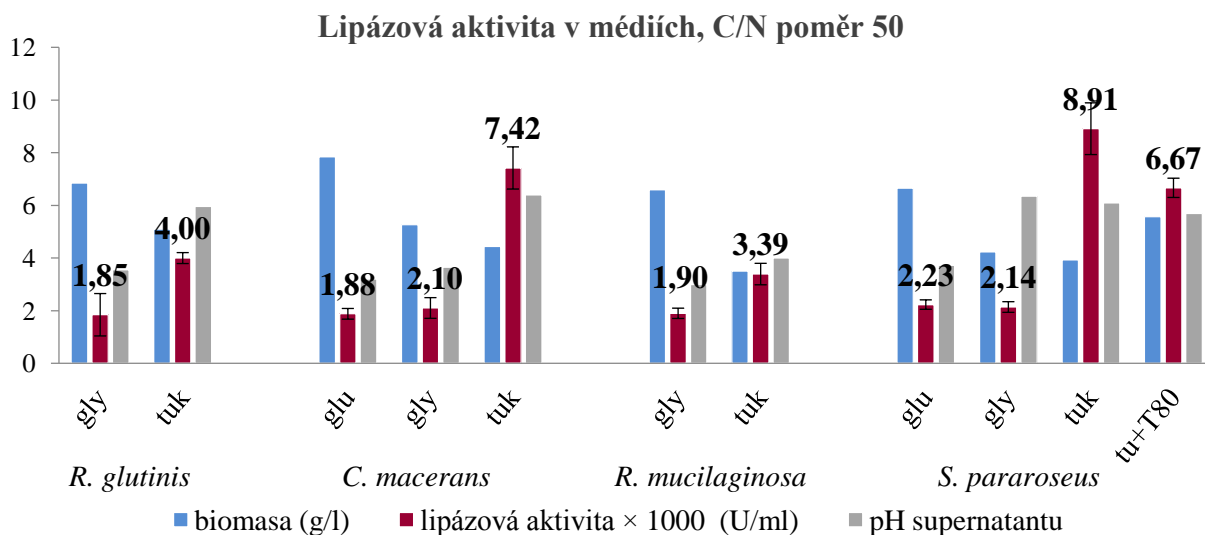
Dle výsledků na Obr. 27. je u kvasinek *R. glutinis* a *S. pararoseus* patrný výrazný pokles koncentrace celkových karotenoidů ve srovnání s koncentracemi těchto metabolitů u kultivace s C/N poměrem 13 (Obr. 24). Pouze u kvasinky *R. mucilaginosa* byl obsah karotenoidů vyšší. Ukázka kultivace kvasinky *R. mucilaginosa* je zobrazena v Příloha 4. Obsah karotenoidů byl u kvasinky *C. macerans* srovnatelný s předchozí kultivací.

Nejvyšší koncentrace ergosterolu byly naměřeny v glukózových a v glycerolových médiích. Velmi vysoké hodnoty byly naměřeny u kvasinky *C. macerans*, zejména v glycerolovém médiu ($c = 70,62 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$).

Vysoké koncentrace ubichinonu byly u kvasinky *R. glutinis* v glycerolovém a glukózovém médiu. Vysoká koncentrace tohoto metabolitu byla naměřena v tukových médiích u kvasinek *C. macerans*. Nejvyšší koncentrace ubichinonu byla naměřena u kvasinky *R. mucilaginosa* v tukovém médiu s emulgátorem ($c = 6,82 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Kvasinka *S. pararoseus* vykazovala ve všech médiích podobné výtěžky ubichinonu.

5.2.3 Výsledky základních kultivací kmenů karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 50

5.2.3.1 Stanovení aktivity lipolytických enzymů



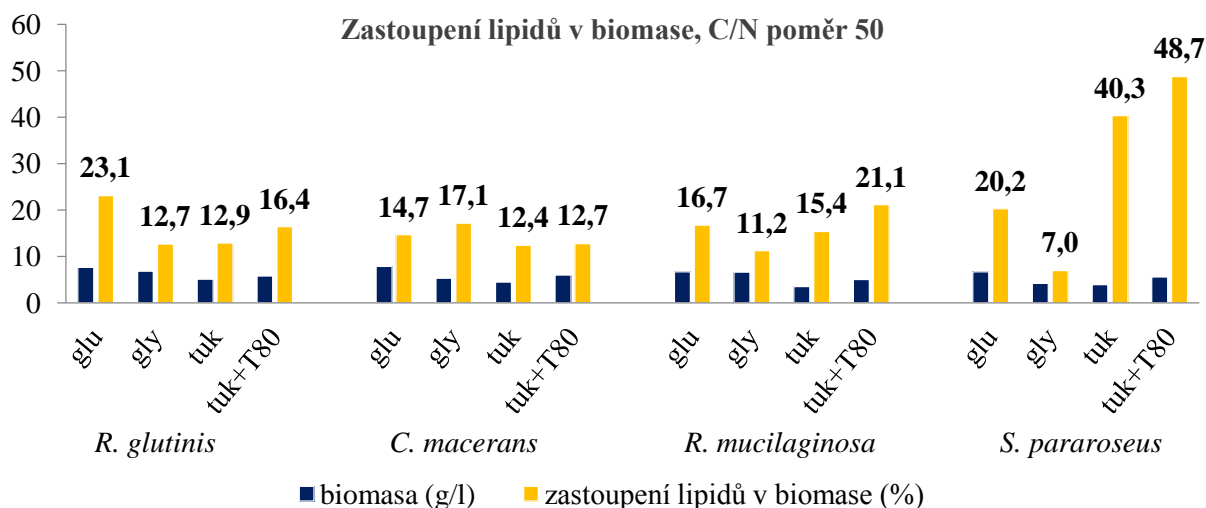
Obr. 28: Výsledky stanovení lipázové aktivity u základních kultivací s C/N poměrem 50

Z výsledků lipázových aktivit na Obr. 28 je parné, že aktivita enzymu byla naměřena v menší míře i v médiích s glukózou a glycerolem. V tukových médiích, kde je přítomnost lipolytických enzymů očekávána, byla naměřena nejvyšší lipázová aktivita u kvasinek *C. macerans* ($7,42 \pm 0,79 \cdot 10^{-3} \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) a *S. pararoseus* ($8,91 \pm 0,98 \cdot 10^{-3} \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$). U kvasinky *S. pararoseus* byla naměřena lipázová aktivita i v médiu s emulgátorem. Vysoký nárůst biomasy značí lepší utilizaci substrátu a tím nižší potřebné množství enzymu. U kvasinek rodu *Rhodotorula* byly v tukových médiích naměřené lipázové aktivity relativně nízké.

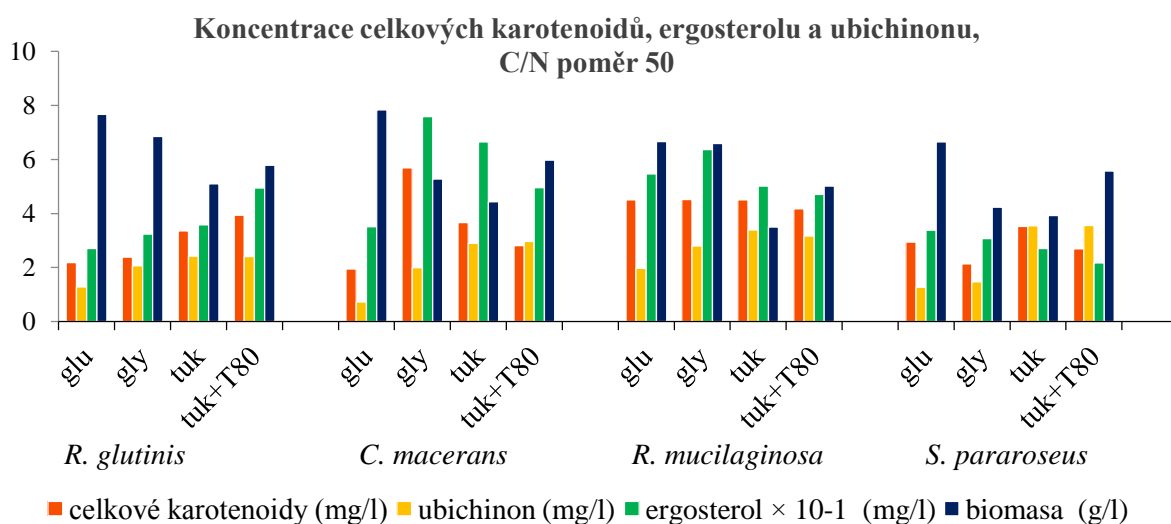
5.2.3.2 Stanovení výtěžků biomasy a intracelulárních metabolitů

Výtěžky biomasy z kultivací s C/N poměrem 50 jsou téměř srovnatelné s výtěžky předešlé kultivace (Obr. 29). Nejvyšší množství jsou pozorovány v médiu s glukózou, glycerolem a v tukovém médiu s přidavkem emulgátoru.

U kultivací s C/N poměrem 50 (Obr. 29) dosahuje vysokého množství intracelulárních lipidů pouze kvasinka *S. pararoseus*. Procentuální zastoupení lipidů činí v tukových médiích přes 40 %. Ostatní kvasinkové kmeny nevykazují v rámci této kultivace výraznou produkci buněčných lipidů.



Obr. 29: Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase u základní kultivace kmenů karotenogenních kvasinek v médiu s C/N poměrem 50



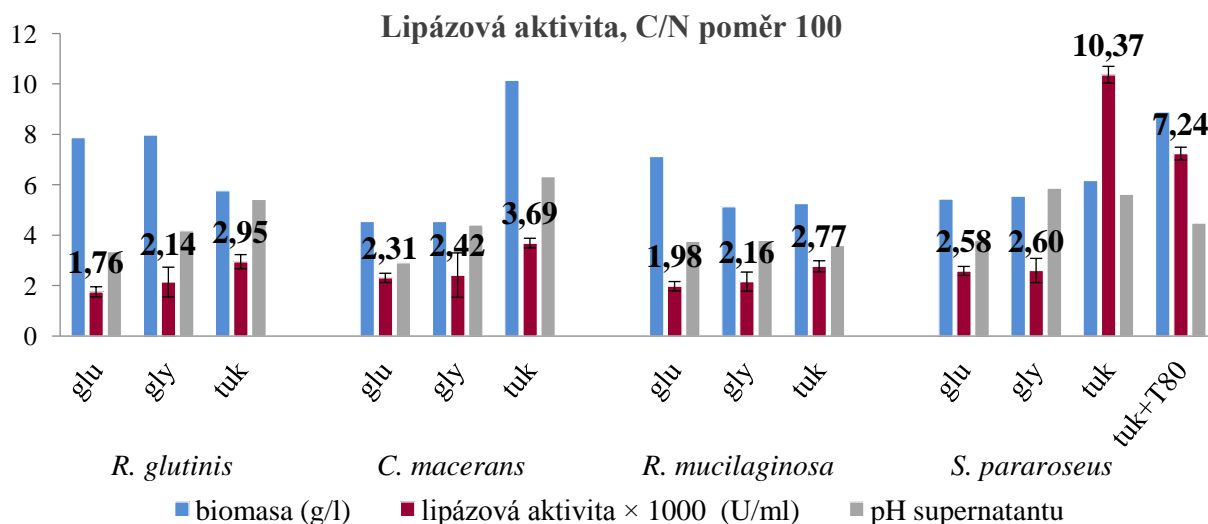
Obr. 30: Výsledky stanovení koncentrací karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu u základních kultivací s C/N poměrem 50

Z výsledků na Obr. 30 můžeme pozorovat vyšší koncentraci celkových karotenoidů u kvasinky *R. mucilaginoso*, která je ve všech médiích přibližně stejná. Nejvyšší koncentrace celkových karotenoidů byla stanovena v glycerolovém médiu u kvasinky *C. macerans* ($c = 5,70 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Ukázka kultivace kvasinky *C. macerans* je zobrazena v Příloha 5. Koncentrace karotenoidů u kvasinky *R. glutinis* byla nejvyšší v tukových médiích. U kvasinky *S. pararoseus* bylo pozorováno zvýšení karotenoidů v biomase u glukózového a tukového média.

Koncentrace ergosterolu byla téměř ekvivalentní s koncentrací celkových karotenoidů. Nejvyšší obsah ergosterolu byl naměřen v biomase kvasinky *C. macerans* ($c = 75,82 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Nejvyšší koncentrace ubichinonu byla naměřena v tukových médiích u všech studovaných kmenů, zejména u kvasinky *S. pararoseus*.

5.2.4 Výsledky základních kultivací kmenů karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 100

5.2.4.1 Stanovení aktivity lipolytických enzymů



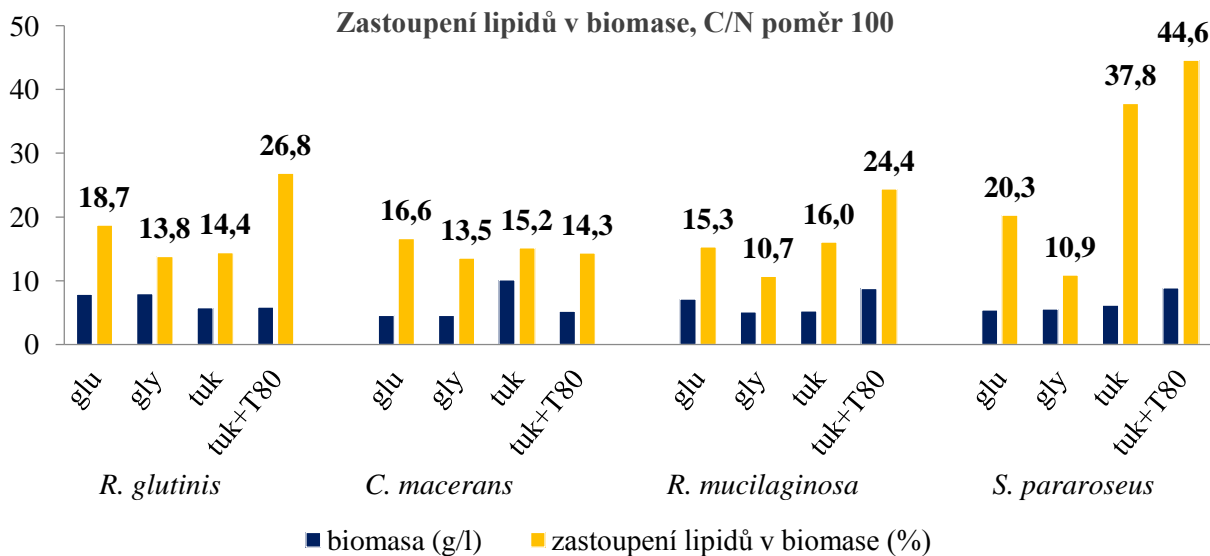
Obr. 31: Výsledky stanovení lipázové aktivity u základních kultivací s C/N poměrem 100

Nejvyšší lipázová aktivita (Obr. 31) byla stanovena v tukovém médiu kvasinky *S. pararoseus* ($10,37 \pm 0,33 \cdot 10^{-3} \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$). V médiu s emulgátorem aktivita enzymu klesla. U ostatních kmenů nebyla v médiích s emulgátorem pozorována vůbec. Lipolytické aktivity ostatních kmenů byly nízké, srovnatelné s aktivitami lipolytických enzymů glukózy a glycerolu. Zvláště u kvasinky *C. macerans* byla vzhledem k vysoké biomase tukového média očekávána zvýšená aktivita enzymu.

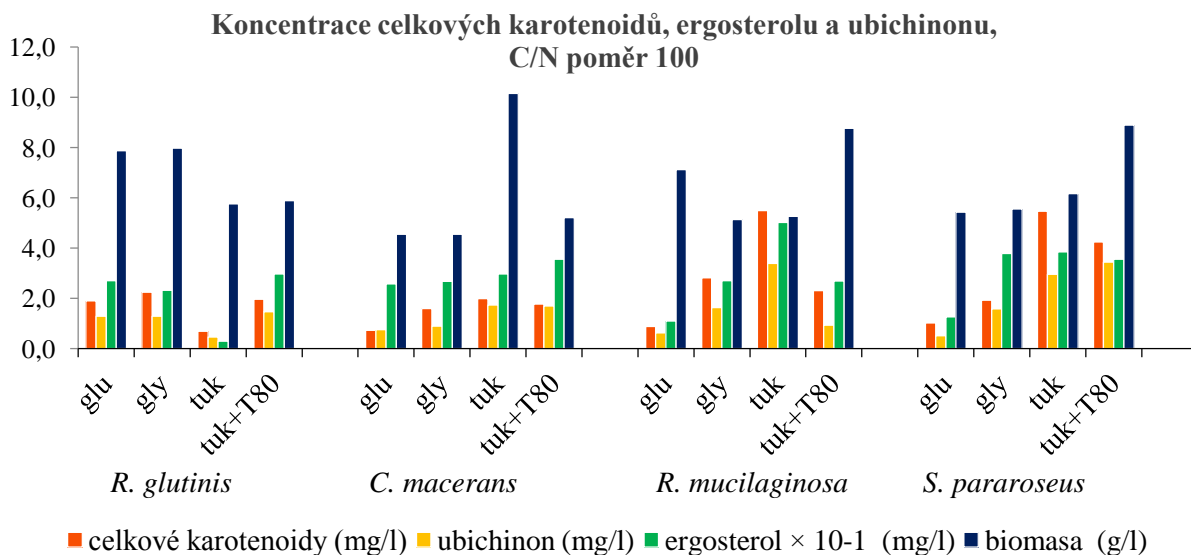
5.2.4.2 Stanovení výtěžků biomasy a intracelulárních metabolitů

Výtěžky biomas (Obr. 32) v rámci médií jsou velmi proměnlivé. U kvasinky *R. glutinis* je pozorován nejvyšší nárůst biomasy v glukózovém a glycerolovém médiu. Kvasinka *C. macerans* vykazuje nejvyšší nárůst v samotném tukovém médiu. V glukózovém a v tukovém médiu s emulgátorem bylo nejvíce biomasy izolováno u kvasinky *R. mucilaginosa*. U kvasinky *S. pararoseus* byly nejvyšší výtěžky pozorovány v tukových médiích.

Výsledky kultivací v médiích s C/N poměrem 100 (Obr. 32) jsou velmi podobné výsledkům předchozí kultivace (Obr. 29). Z Obr. je patrné, že nejvyšší zastoupení buněčných lipidů bylo stanoveno v tukových médiích s přidavkem emulgátoru. Výjimkou je kvasinka *C. macerans*, u které bylo zastoupení lipidů ve všech médiích téměř stejné. U kvasinky *S. pararoseus* bylo stanoveno v médiu s emulgátorem až přes 40 % intracelulárních lipidů. Vyšší množství je pozorováno i v samotném tukovém médiu. Nejnižší procentuální obsahy buněčných lipidů byly pozorovány v glycerolových médiích.



Obr. 32: Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase u základní kultivace kmenů karotenogenních kvasinek v médiu s C/N poměrem 100



Obr. 33: Výsledky stanovení koncentrací karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu u základních kultivací s C/N poměrem 100

Z výsledků celkových karotenoidů uvedených na Obr. 33 je patrný výrazný pokles obsahu karotenoidů u kvasinek *R. glutinis* a *C. macerans* v porovnání s předchozí kultivací (Obr. 30). Z hlediska této kultivace vyšší obsahy karotenoidů byly stanoveny u kvasinek *R. mucilaginosa* a *S. pararoseus*. Ukázka kultivace kvasinky *S. pararoseus* je zobrazena v Příloha 6. V rámci uhlíkatého substrátu byla nejvyšší koncentrace karotenoidů naměřena v tukovém médiu, vyjma kvasinky *R. glutinis*, kde bylo množství karotenoidů naopak nejnižší. Nejvyšší koncentrace karotenoidů byla naměřena v tukovém médiu kvasinky *R. mucilaginosa* ($c = 5,50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) a v tukovém médiu kvasinky *S. pararoseus* ($c = 5,46 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$).

Koncentrace ergosterolu byla velmi kolísavá. Nevyšší koncentrace ergosterolu byla naměřena v biomase kvasinky *R. mucilaginosa* v tukovém médiu ($c = 50,14 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Při vyšších C/N poměrech může být tento projev u tohoto kmene způsoben zvýšenou produkcí ergosterolu na výstavbu lipidových vakuol. U kvasinky *R. glutinis* byla zaznamenán výrazný pokles ergosterolu v biomase tukového média.

Koncentrace ubichinonu byly téměř ekvivalentní s koncentracemi celkových karotenoidů, výjimkou je kvasinka *S. pararoseus*, u které bylo nejvyšší množství ubichinonu naměřeno v tukovém médiu s emulgátorem.

5.2.5 Výsledky kultivací kmenů karotenogenních kvasinek v mechanicky emulgovaných médiích

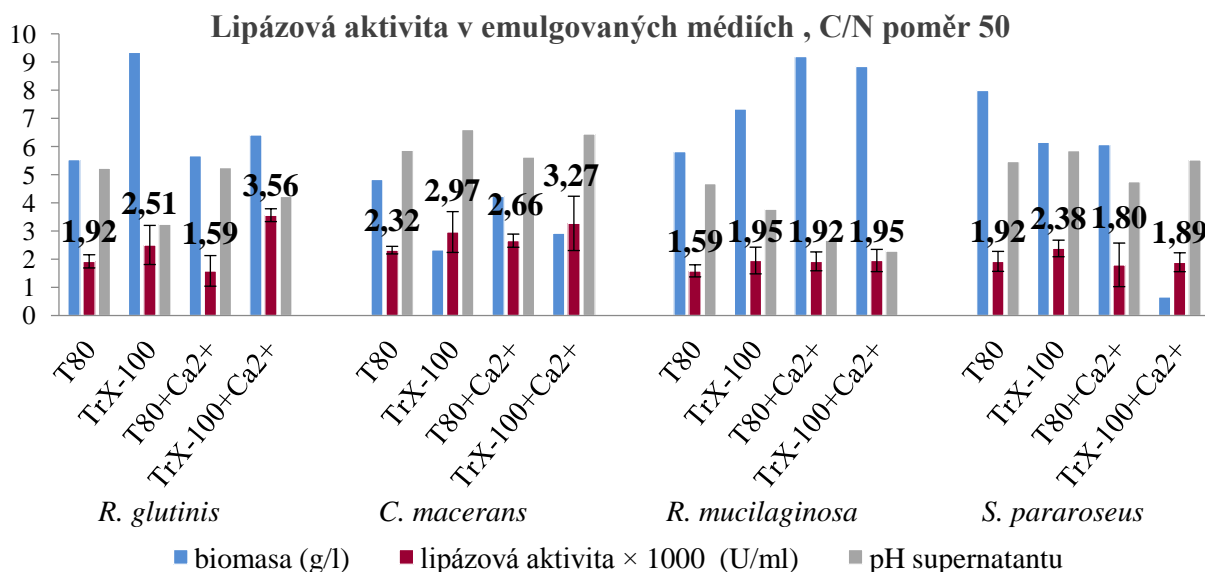
Přítomnost neionogenních surfaktantů snižuje mezifázové napětí dvou nemísitelných látek. V tomto experimentu je ve vodném prostředí nemísitelnou látkou odpadní živočišný tuk. Snížení mezifázového napětí způsobí vznik tukové emulze a pro lipolytické enzymy se tukový substrát stává dostupnějším [72].

V rámci této kultivace byl na aktivitu lipolytických enzymů studovaných kmenů testován účinek dvou komerčních surfaktantů TWEEN 80 a Triton X-100. Na základě literárních údajů byl sledován i účinek vápenatých iontů jako lipázových aktivátorů. Ke zlepšení tvorby emulze byly média před očkováním dodatečně mechanicky míchaná. Na základě výsledků lipolytických aktivit ze základních kultivací (kapitola 5.2), byl pro tuto sérii kultivací vybrán C/N poměr 50. Při tomto poměru byla aktivita lipolytických enzymů naměřena v tukových médiích všech studovaných kmenů. Přesný popis kultivace je popsán v kapitole 4.4.2. K hlubšímu porozumění metabolismu karotenogenních kvasinek byly analyzovány i intracelulární metabolity.

5.2.5.1 Stanovení aktivity lipolytických enzymů

V porovnání se základními kultivacemi karotenogenních kvasinek (kapitola 5.2), byly lipázové aktivity (Obr. 34) naměřeny ve všech médiích s neionogenními emulgátory. Tento výsledek naznačuje, že mechanické promíchání před samotným očkováním kvasinkové kultury může pozitivně ovlivňovat aktivitu enzymu. Z použitých emulgátorů se jevil jako účinnější Triton X-100, který v průběhu kultivace tvořil stabilnější emulzi.

Přídavek vápenatých iontů jako aktivátorů lipolytických enzymů nezpůsobil žádný výrazný nárůst lipázové aktivity, pouze v případě kultivace *R. glutinis* a *C. macerans* v médiu s emulgátorem Triton X-100. Ukázka kultivace kvasinky *R. glutinis* je zobrazena v Příloha 7. U těchto kultivací byla naměřena také nejvyšší lipázová aktivita. Ačkoliv dostupná literatura uváděla neionogenní emulgátory jako pozitivní stimulanty lipolytických enzymů, v této práci spíše docházelo v jejich přítomnosti k poklesu lipázových aktivit.



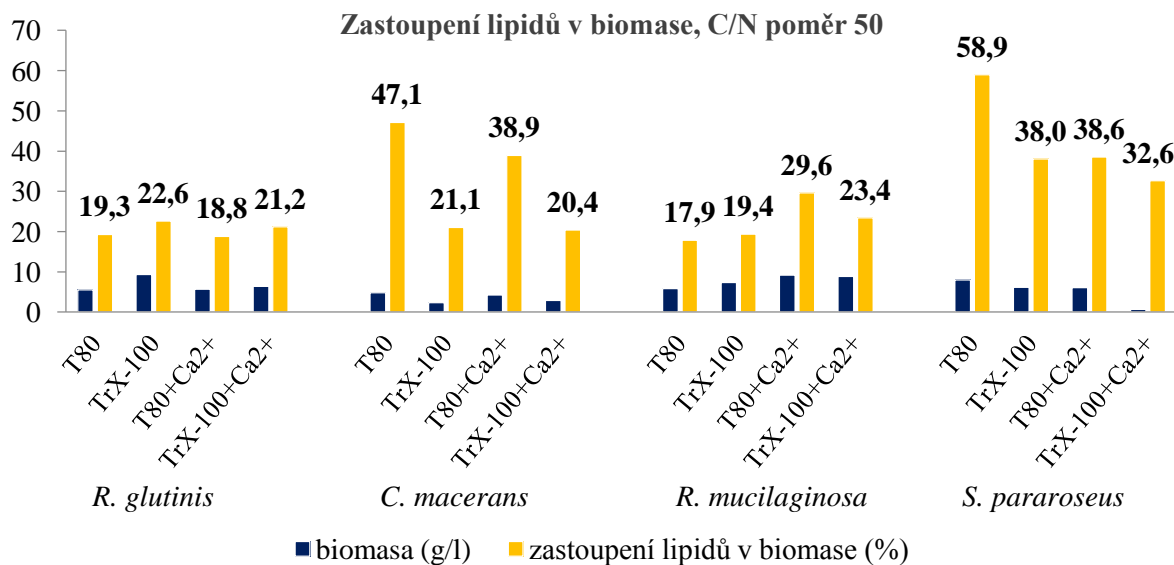
Obr. 34: Výsledky stanovení lipázové aktivity u emulgovaných kultivací s C/N poměrem 50

5.2.5.2 Stanovení výtěžků biomasy a intracelulárních metabolitů

Z výsledků na Obr. 35 je patrné, že každý studovaný kmen preferuje jiné složení kultivačního média. Vyšší nárůsty biomasy u kvasinky *R. glutinis* byly stanoveny v médiích s emulgátorem Triton X-100. Kvasinka *R. mucilaginosa* nejlépe rostla v médiích s emulgátorem TWEEN 80. Nejvyšší množství biomasy bylo stanoven u kvasinky *C. macerans* za použití tukových médií s přidavky vápenatých iontů. Kvasinky *S. pararoseus* více prospívaly v médiu bez přidavky vápenatých iontů.

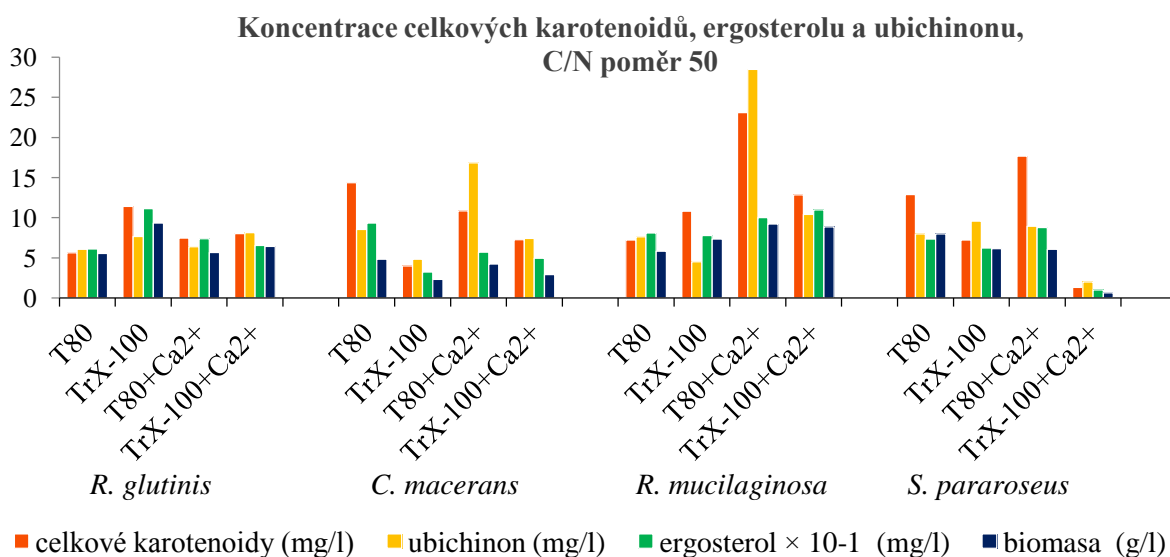
Z výsledků uvedených na Obr. 35 je patrné, že nejvyšší výtěžky buněčných lipidů byly převážně u kultivací s emulgátorem TWEEN 80. Přidání vápenatých iontů vedlo k mírnému poklesu produkce lipidů. Výjimkou je kvasinka *R. mucilaginosa*, u které byl v přítomnosti vápenatých iontů pozorován až 10% nárůst intracelulárního tuku. V médiích s emulgátorem TWEEN 80 bylo nejvyšší zastoupení buněčných lipidů stanoven u kvasinek *S. pararoseus* (58,9 %) a *C. macerans* (47,1 %).

Zastoupení buněčných lipidů v médiích s emulgátorem Triton X-100 se pohybovalo u většiny kmenů kolem 20 %. Výjimkou je kvasinka *S. pararoseus*, u které byly výtěžky nad 30 %.



Obr. 35: Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase u kultivací kmenů karotenogenních kvasinek v mechanicky emulgovaných médiích s C/N poměrem 50

Koncentrace karotenoidů (Obr. 36) u většiny kultivací korelovala s nárůstem biomasy. Výjimkou je kvasinka *S. pararoseus*, u které byla zaznamenána v médiu s emulgátorem TWEEN 80 a s vápenatými ionty velmi vysoká produkce karotenoidů ($c = 17,66 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Možné je jisté zkreslení výsledků vzhledem k nevýznamnému nárůstu biomasy. Nejvyšší koncentrace karotenoidů byla naměřena u kvasinky *R. mucilaginosa* v médiu s emulgátorem TWEEN 80 a s přidavkem vápenatých iontů ($c = 23,10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Kultivace s emulgátorem Triton X-100, vyjma kvasinky *R. mucilaginosa*, neposkytovaly významné množství karotenoidů. Koncentrace ergosterolu a ubichinonu byly téměř ekvivalentní s nárůstem biomasy. Nejvyšší nárůst ubichinonu byl pozorován v médiu s emulgátorem TWEEN 80 a vápenatými ionty u kvasinek *C. macerans* a *R. mucilaginosa*.



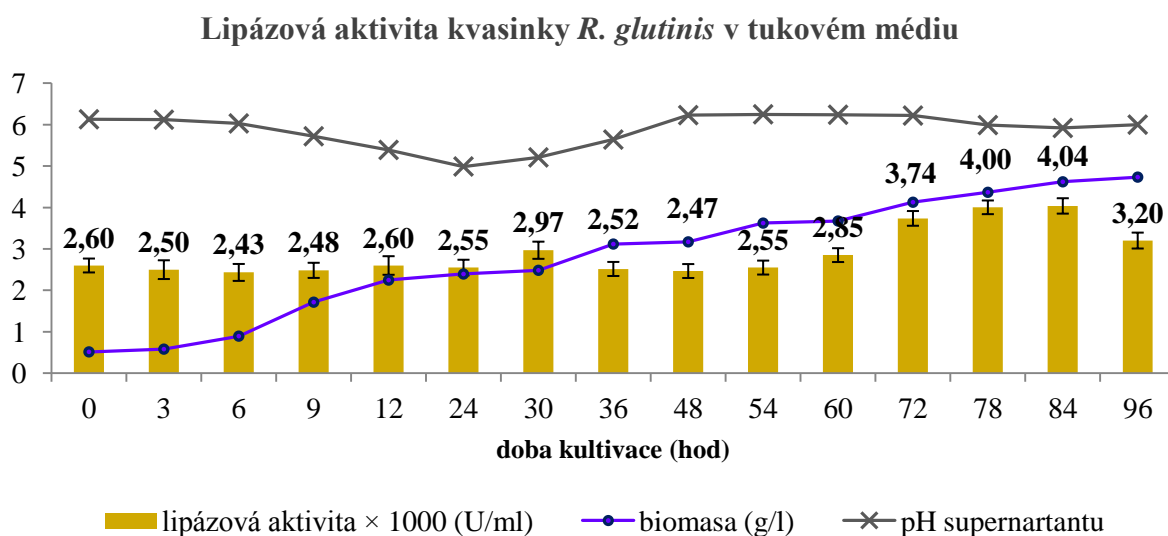
Obr. 36: Výsledky stanovení koncentrací karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu u emulgovaných médií s C/N poměrem 50

5.3 Výsledky velkoobjemových kultivací kmenů karotenogenních kvasinek s časovými odběry

Produkce lipolytických enzymů bývá většinou indukována přítomností lipidového uhlíkatého zdroje. Z výsledků stanovení lipázových aktivit ze základních kultivací (kapitola 5.2) můžeme pozorovat produkci lipáz i v případě glukózového a glycerolového uhlíkatého substrátu. K detailnějšímu prozkoumání produkce lipáz v průběhu buněčného růstu byly provedeny velkoobjemové kultivace s časovými odběry. Kvůli dostatečnému množství dusíku ke tvorbě enzymů byl zvolen C/N poměr 13. Přesný popis a podmínky kultivace jsou uvedeny v kapitole 4.4.3. Lipázová aktivita byla sledována u kmenů *Rhodotorula glutinis*, *Cystofilobasidium macerans*, *Rhodotorula mucilaginosa* a *Sporidiobolus pararoseus*. V rámci hlubšího porozumění metabolismu kvasinek bylo pozorováno od 60. hodiny kultivace také množství a zastoupení intracelulárních metabolitů. Podmínky stanovení sledovaných metabolitů a biomasy jsou uvedeny v kapitole 4.5. Ukázky kultivací v 96. hodině jsou uvedeny v Příloha 8 až Příloha 11.

5.3.1 *Rhodotorula glutinis*

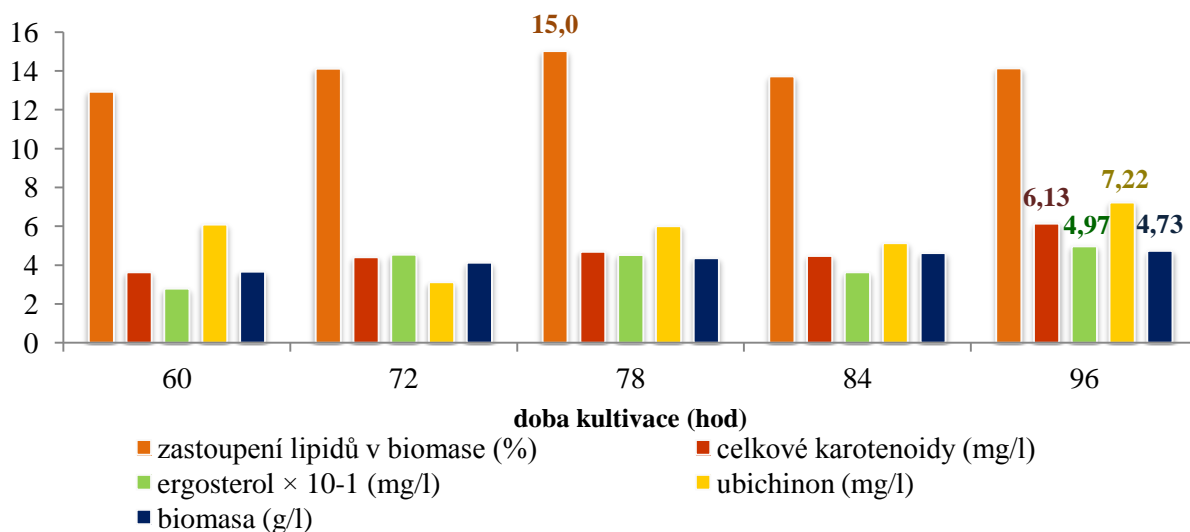
U kvasinky *R. glutinis* byla lipázová aktivita naměřená v médiu s odpadním živočišným tukem, glukózou a glycerolem. V médiu s emulgátorem TWEEN 80 k detekci lipolytického enzymu nedošlo.



Obr. 37: Výsledky lipázové aktivity kvasinky *R. glutinis* v tukovém médiu (C/N poměr 13)

Lipázová aktivita kvasinky *R. glutinis* v tukovém médiu (Obr. 37) je poněkud nižší, než bylo předpokládáno. První maximum lipázové aktivity je pozorováno ve 30. hodině kultivace, nicméně aktivita enzymu v tomto čase výrazně nepřevyšuje enzymové aktivity dřívějších odběrů. Důvodem může být využití vzniklého glycerolu z lipázové reakce jako primárního uhlíkatého substrátu. Druhé maximum bylo stanoveno v 84. hodině kultivace, které je v porovnání s předchozím maximem mnohem vyšší. Vyšší lipázová aktivita může souviset se zvýšenou produkcí enzymu v důsledku vysokého nárůstu biomasy.

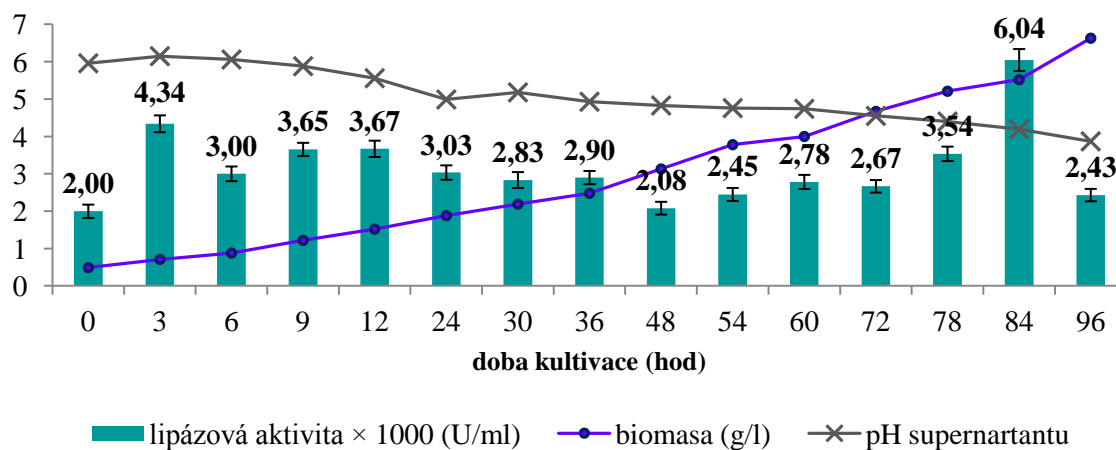
Koncentrace a zastoupení intracelulárních metabolitů a biomasy v tukovém médiu kvasinky *R. glutinis*



Obr. 38: Výsledky koncentrace a zastoupení intracelulárních metabolitů a biomasy v tukovém médiu kvasinky *R. glutinis* (C/N poměr 13)

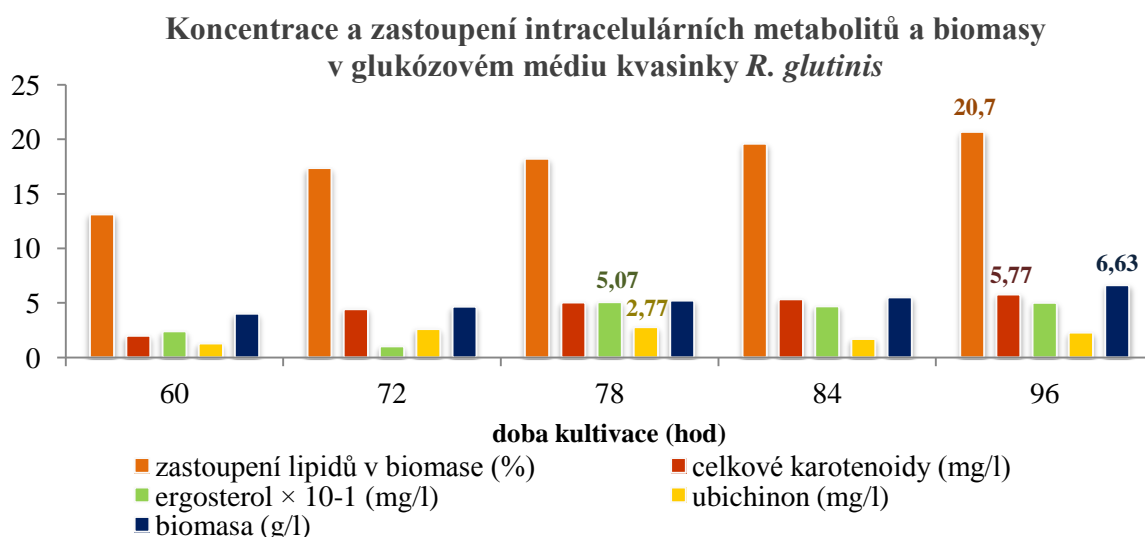
Z výsledku na Obr. 38 je viditelný kolísavý průběh výtěžků všech intracelulárních metabolitů. Procentuální zastoupení lipidů je nižší a koncentrace ubichinonu vyšší, než u následujících kultivací. Koncentrace celkových karotenoidů a ergosterolu jsou srovnatelné. Maximum výtěžků sledovaných metabolitů, vyjma intracelulárních lipidů, je v 96. hodině kultivace. Procentuální zastoupení buněčných lipidů je nejvyšší v 78. hodině kultivace.

Lipázová aktivita kvasinky *R. glutinis* v glukózovém médiu



Obr. 39: Výsledky lipázové aktivity kvasinky *R. glutinis* v glukózovém médiu (C/N poměr 13)

U kvasinky *R. glutinis* byl v glukózovém médiu průběh lipázových aktivit na Obr. 39 kolísavější, než v médiu s odpadním tukem (Obr. 37). Nejvyšší aktivity enzymů byly naměřeny ve 3., 12. a 84. hodině kultivace. Naopak minimální lipázová aktivita byla stanovena v 48. hodině. Podle literatury může takový průběh naznačovat přítomnost dvou forem lipáz: lipáza asociovaná s buňkou a lipáza vylučovaná do prostředí. Obě formy mohou dosáhnout nejvyšších aktivit v různém čase kultivace [19]. Ve 12. hodině jsou zřejmě buňky adaptovány na prostředí a dochází k počátku exponenciální fáze. K jejich růstu je zapotřebí dostatečný přísun energie, kterou si zajišťují zvýšenou produkcí asociovaných enzymů. V 84. hodině pravděpodobně exponenciální fáze končí a dochází k nahromadění lipolytických enzymů v důsledku maximálního nárůstu biomasy. Určité množství asociované lipázy se mohlo objevit v supernatantu v důsledku neúmyslného převedení enzymu v průběhu manipulace s biomasou.

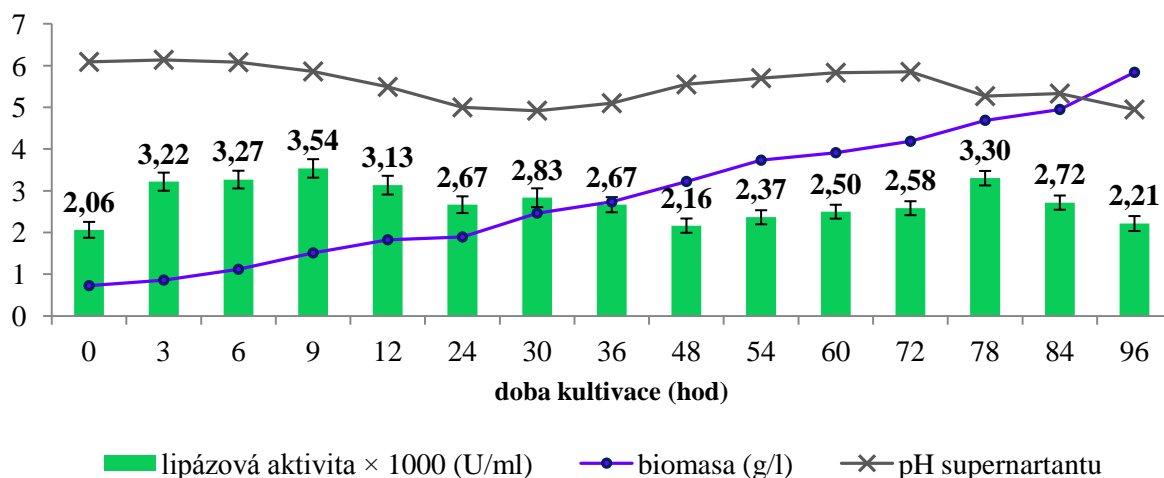


Obr. 40: Výsledky koncentrace a zastoupení intracelulárních metabolitů a biomasy v glukózovém médiu kvasinky *R. glutinis* (C/N poměr 13)

Z výsledků koncentrací a zastoupení intracelulárních metabolitů v glukózovém médiu (Obr. 40) je patrný lineární nárůst karotenoidů a lipidů. Maxima těch metabolitů jsou v 96. hodině kultivace. Koncentrace ergosterolu a ubichinonu jsou kolísavé a dosahují maxima v 78. hodině kultivace.

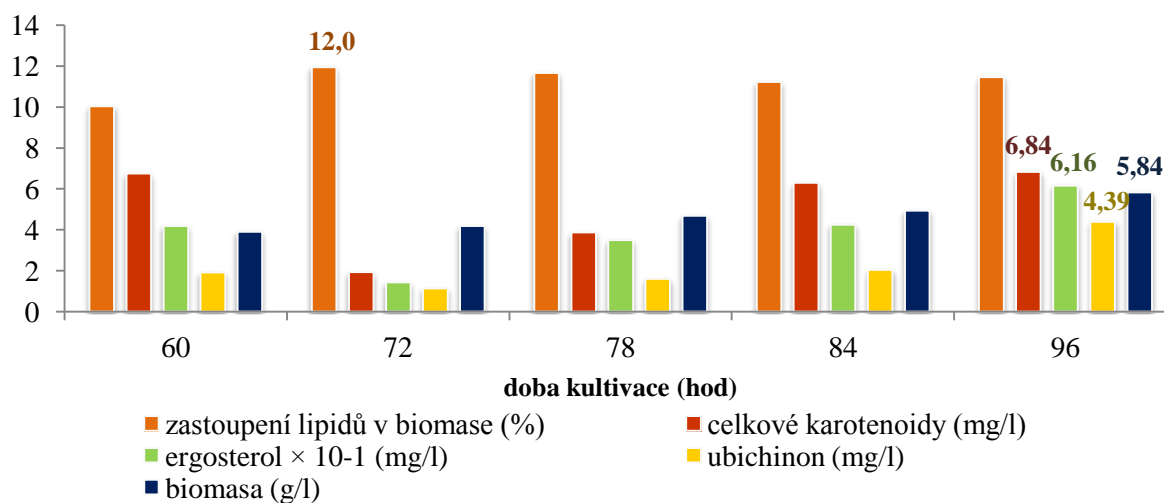
Výsledky lipolytických aktivit jsou v glycerolovém médiu (Obr. 41) poměrně srovnatelné s výsledky enzymových aktivit v glukózovém médiu (Obr. 39). Nicméně maxima naměřených lipázových aktivit jsou podstatně nižší. Nejvyšší hodnoty lipázové aktivity byla naměřeny v 9. a 78. hodině. Podle průběhu kolísání aktivit enzymu lze opět usuzovat přítomnost obou forem lipáz.

Lipázová aktivita kvasinky *R. glutinis* v glycerolovém médiu



Obr. 41: Výsledky lipázové aktivity kvasinky *R. glutinis* v glycerolovém médiu (C/N poměr 13)

Koncentrace a zastoupení intracelulárních metabolitů a biomasy v glycerolovém médiu kvasinky *R. glutinis*

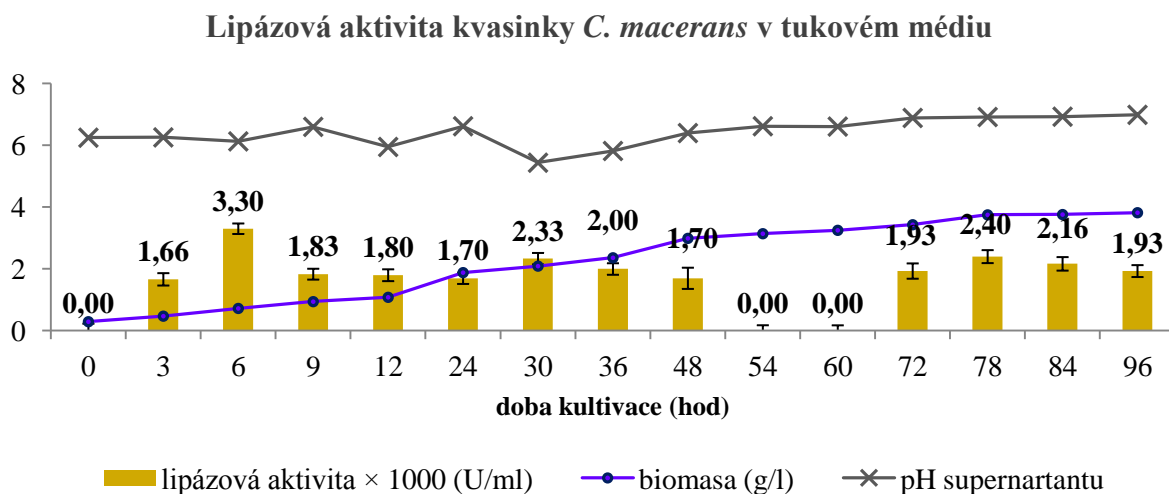


Obr. 42: Výsledky koncentrace a zastoupení intracelulárních metabolitů a biomasy v glycerolovém médiu kvasinky *R. glutinis* (C/N poměr 13).

Oproti kultivaci v glukózovém médiu (Obr. 40) jsou výtěžky buněčných lipidů z kultivace na glycerolu nižší (Obr. 42). Maximum procentuálního zastoupení pozorujeme v 72. hodině, poté se procentuální zastoupení nepatrně snižuje. Naměřené koncentrace karotenoidů, ubichinonu a ergosterolu se liší od koncentrací těchto metabolitů z kultivace na glukóze jen velmi málo. Nicméně u koncentrace karotenoidů a ergosterolu dochází v 72. hodině kultivace k výraznému poklesu. Následně se jejich výtěžky zvyšují, až do maxima v 96. hodině. Koncentrace ubichinonu lineárně roste s dobou kultivace.

5.3.2 *Cystofilobasidium macerans*

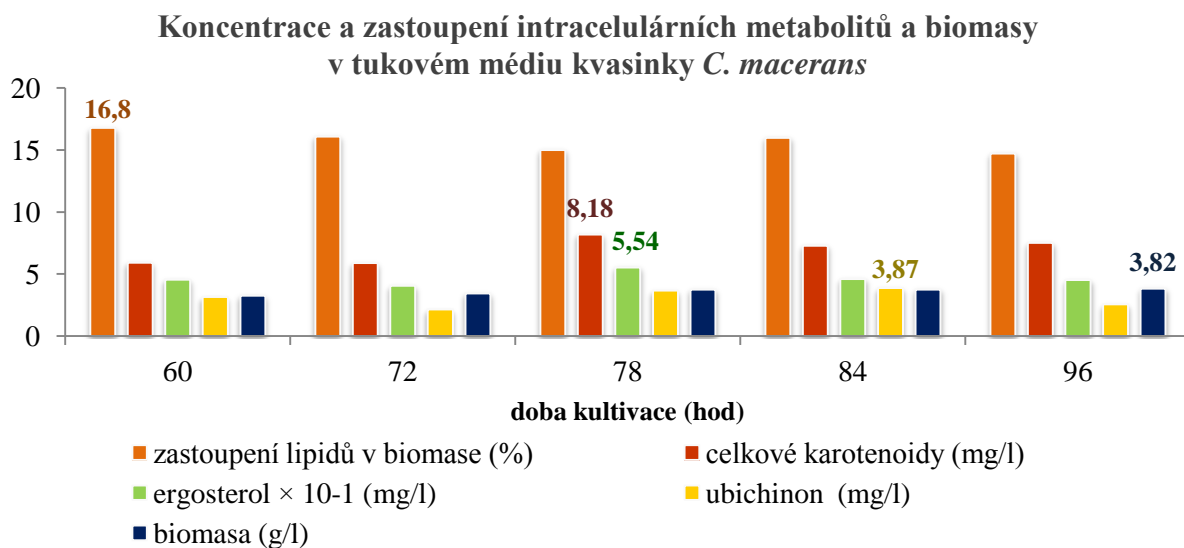
U kvasinky *C. macerans* byla lipázová aktivita naměřená v médiu s odpadním živočišným tukem, glukózou a glycerolem. V médiu s emulgátorem TWEEN 80 k detekci lipolytického enzymu nedošlo.



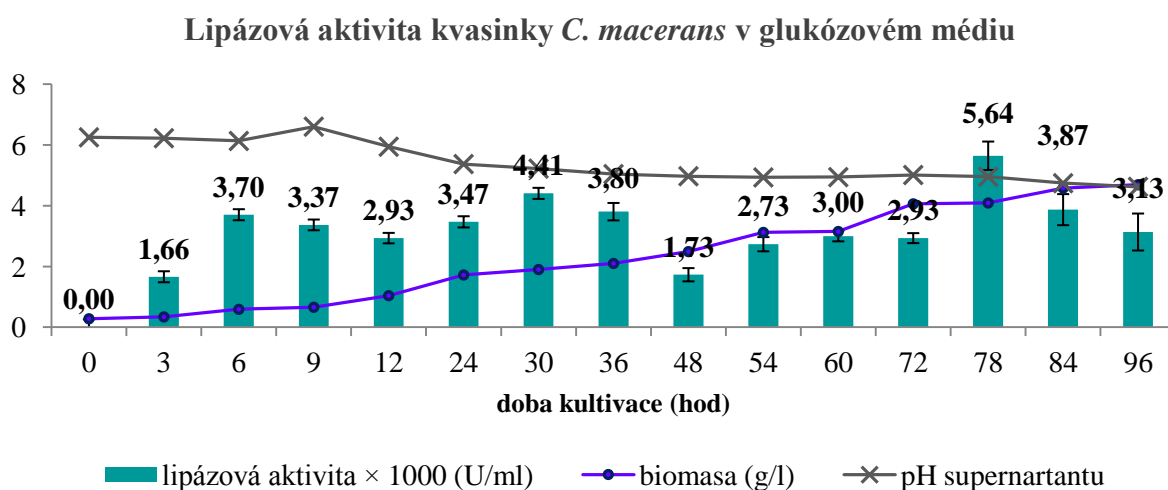
Obr. 43: Výsledky lipázové aktivity kvasinky *C. macerans* v tukovém médiu (C/N poměr 13)

Průběh lipázových aktivit v tomto médiu (Obr. 43) je velmi kolísavý. Oproti kvasince *R. glutinis* (Obr. 37), zde pozorujeme tři maxima lipázových aktivit, v 6. 30. a 78. hodině kultivace, což odpovídá lag fázi (6. hodina), průběhu exponenciální fáze (30. hodina) a vrcholu exponenciální fáze (78. hodina). Naměřené lipázové aktivity jsou v tukovém médiu poněkud nižší, srovnatelné s kultivací *R. glutinis*. V 0., 54., a v 60. hodině kultivace nebyla aktivita enzymu naměřená vůbec. Nejvyšší enzymová aktivita byla naměřena v 6. hodině kultivace. Zvýšení aktivit v lag fázi a na začátku exponenciální fáze může vypovídat o nadměrné produkci asociované lipázy pro potřebu dostatečné energie k buněčnému růstu. Pozdější ustálení lipázových aktivit by mohlo být způsobeno upřednostněnou utilizací vzniklého glycerolu. Vzhledem k nižšímu nárůstu biomasy ke konci kultivace, nemuselo docházet k tak výrazné produkci lipolytických enzymů jako u kultivace *R. glutinis*. Lipáza asociovaná s buňkou se mohla převést do supernatantu v průběhu zpracování biomasy.

Z výsledků na Obr. 44. je patrné lineární klesání výtěžku intracelulárních lipidů. Nejvyššího výtěžku bylo dosaženo v 60. hodině. Koncentrace karotenoidů a ergosterolu jsou víceméně kolísavé. Nejvyšší výtěžky celkových karotenoidů a ergosterolu byly stanoveny v 78. hodině kultivace. Koncentrace ubichinonu jsou v tukovém médiu vyšší, než v médiu s glukózou (Obr. 46). Maximální výtěžek byl stanoven v 84. hodině kultivace.

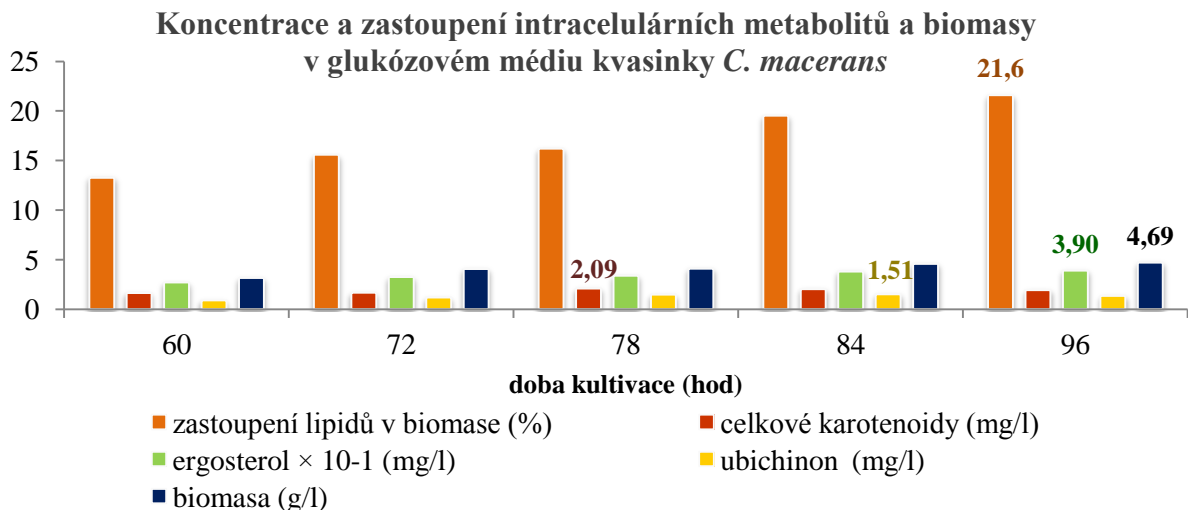


Obr. 44: Výsledky koncentrace a zastoupení intracelulárních metabolitů a biomasy v tukovém médiu kvasinky *C. macerans* (C/N poměr 13)



Obr. 45: Výsledky lipázové aktivity kvasinky *C. macerans* v glukózovém médiu (C/N poměr 13)

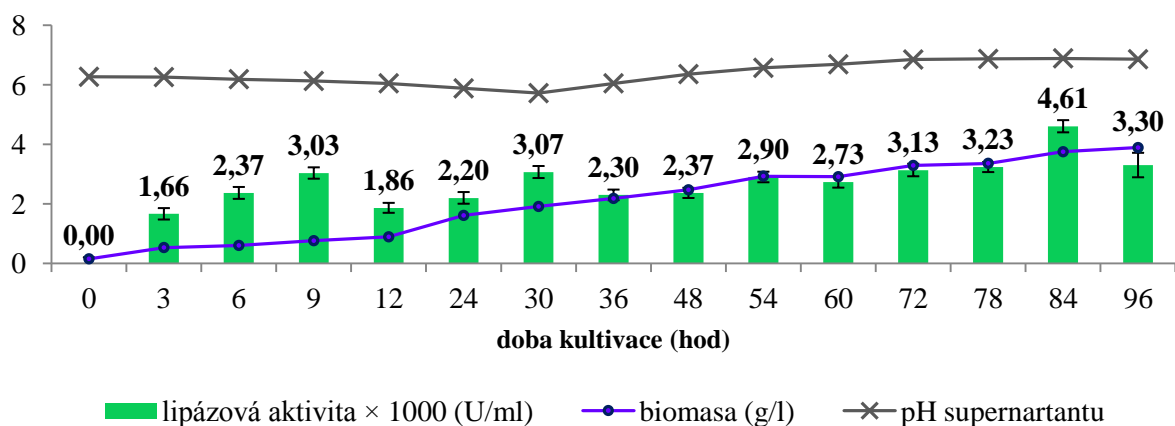
Jako u předchozí velkoobjemové kultivace v tukovém médiu, tak i zde (Obr. 45) pozorujeme průběh lipázových aktivit se třemi vrcholy v 6., 30, 78. hodině kultivace. Naměřené maxima lipázových aktivit jsou poněkud výraznější, než v tukovém médiu. Nejvyšší lipázová aktivita byla naměřena v 78. hodině kultivace, která odpovídá konci exponenciální fáze a vrcholu růstu buněčné biomasy.



Obr. 46: Výsledky koncentrace a zastoupení intracelulárních metabolitů a biomasy v glukózovém médiu kvasinky *C. macerans* (C/N poměr 13)

Hodnoty procentuálního zastoupení intracelulárních lipidů na Obr. 46 jsou srovnatelné s hodnotami výtěžků buněčného tuku z kultivace na tuku (Obr. 44). Ovšem lipidové výtěžky zde nemají lineární klesající charakter, ale naopak lineárně rostou. Jejich maximum je tedy v 96. hodině kultivace. Lineární růst je také pozorován u koncentrací celkových karotenoidů a ergosterolu. U koncentrace ubichinonu je průběh jeho produkce kolísavý. Nejvyššího množství dosahuje v 84. hodině. Výtěžky karotenoidů a lipidických látek jsou v tomto médiu veskrze nízké.

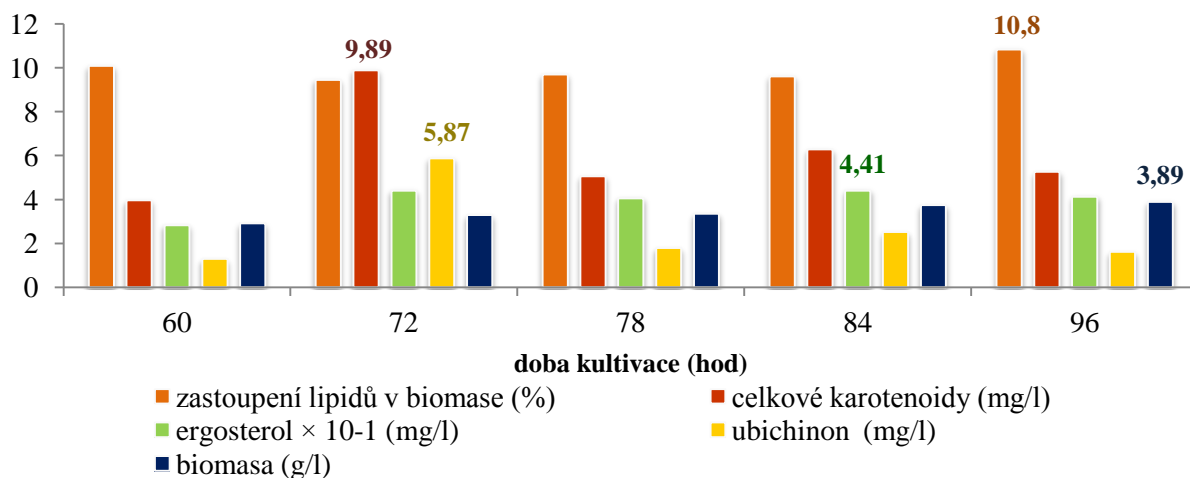
Lipázová aktivita kvasinky *C. macerans* v glycerolovém médiu



Obr. 47: Výsledky lipázové aktivity kvasinky *C. macerans* v glycerolovém médiu (C/N poměr 13)

U kultivace *C. macerans* v glycerolovém médiu (Obr. 47) pozorujeme obdobný průběh enzymových aktivit jako u kultivace v médiu s glukózou (Obr. 45). Vrcholných lipázových aktivit je dosaženo v 9., 30. a 84. hodině kultivace. Naměřené lipázové aktivity v glycerolovém médiu jsou ovšem nižší, než v glukózovém médiu. Na základě průběhu aktivit enzymu lze opět podotknout na přítomnost obou forem lipáz.

Koncentrace a zastoupení intracelulárních metabolitů a biomasy v glycerolovém médiu kvasinky *C. macerans*



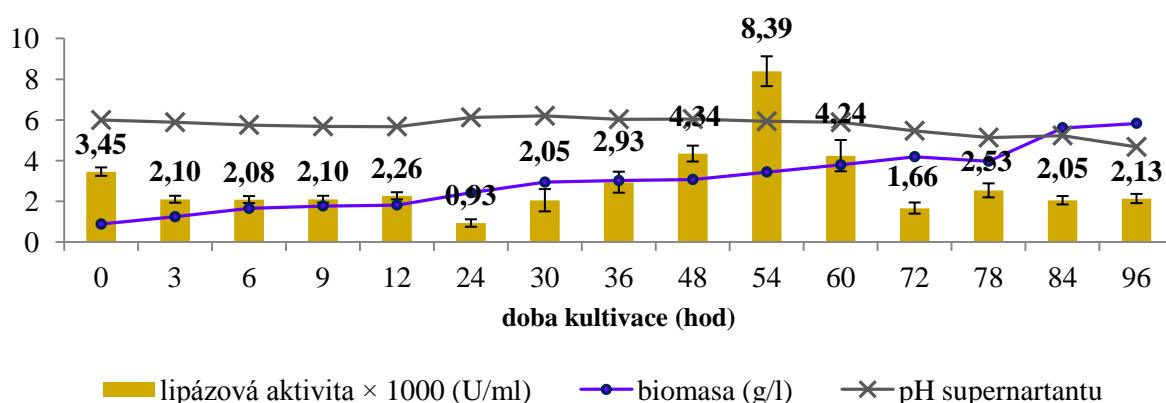
Obr. 48: Výsledky koncentrace a zastoupení intracelulárních metabolitů a biomasy v glycerolovém médiu kvasinky *C. macerans* (C/N poměr 13)

Na Obr. 48 lze vidět výrazné snížení výtěžků intracelulárních lipidů oproti kultivaci na glukóze (Obr. 46) a na tuku (Obr. 44). Charakter zastoupení buněčných lipidů je ke konci kultivace velmi kolísavý, ovšem maximum bylo naměřeno až v 96. hodině. Velmi kolísavé jsou i výtěžky karotenoidů a lipidických látek. V 72. hodině kultivace pozorujeme výrazný nárůst koncentrace celkových karotenoidů a ubichinonu. Koncentrace ergosterolu se od 72. hodiny téměř nemění.

5.3.3 *Rhodotorula mucilaginosa*

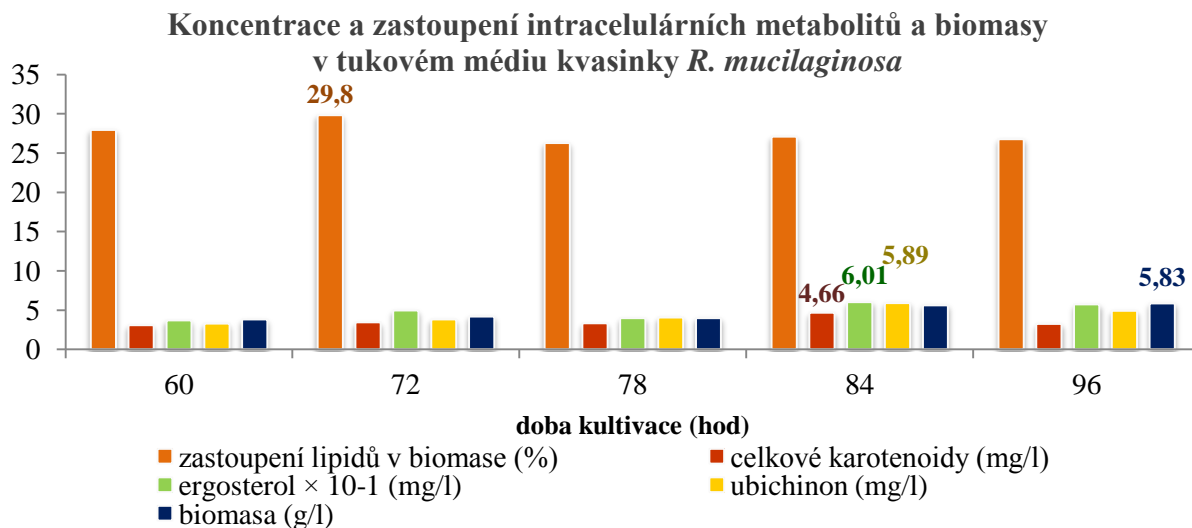
U kvasinky *R. mucilaginosa* byla lipázová aktivita naměřená v médiu s odpadním živočišným tukem, glukózou a glycerolem. V médiu s emulgátorem TWEEN 80 k detekci lipolytického enzymu nedošlo.

Lipázová aktivita kvasinky *R. mucilaginosa* v tukovém médiu



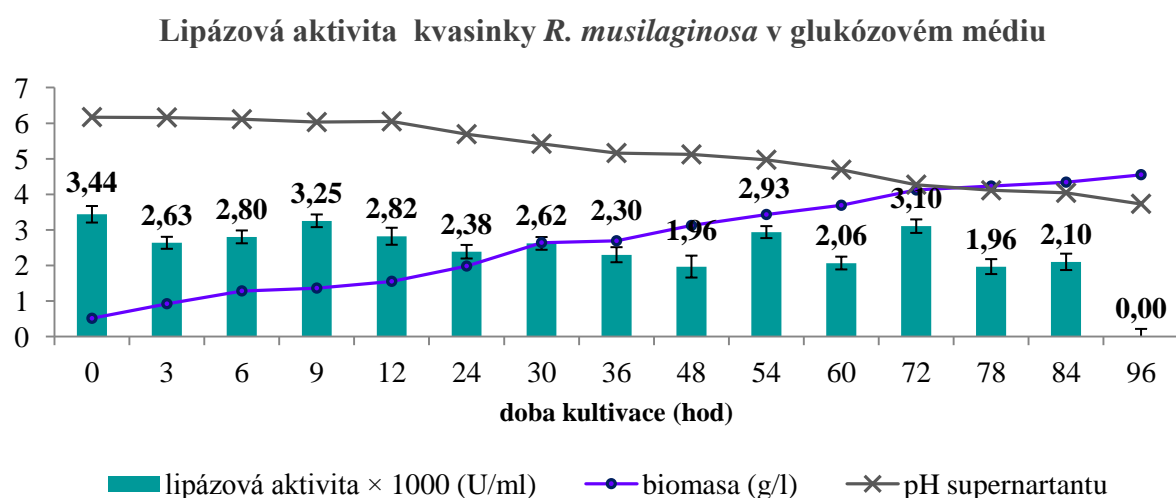
Obr. 49: Výsledky lipázové aktivity kvasinky *R. mucilaginosa* v tukovém médiu (C/N poměr 13)

Z výsledků na Obr. 49 pozorujeme v tukovém médiu velmi výraznou kolísavost lipázových aktivit. Na počátku kultivace pozorujeme nepatrné maximum ve 12. hodině. Velmi vysokou lipázovou aktivitu ovšem pozorujeme v 54. hodině kultivace. Mírně zvýšená aktivita enzymu byla i v 78. hodině. Naopak výrazný propad lipázové aktivity nastal ve 24. hodině a 72. hodině.



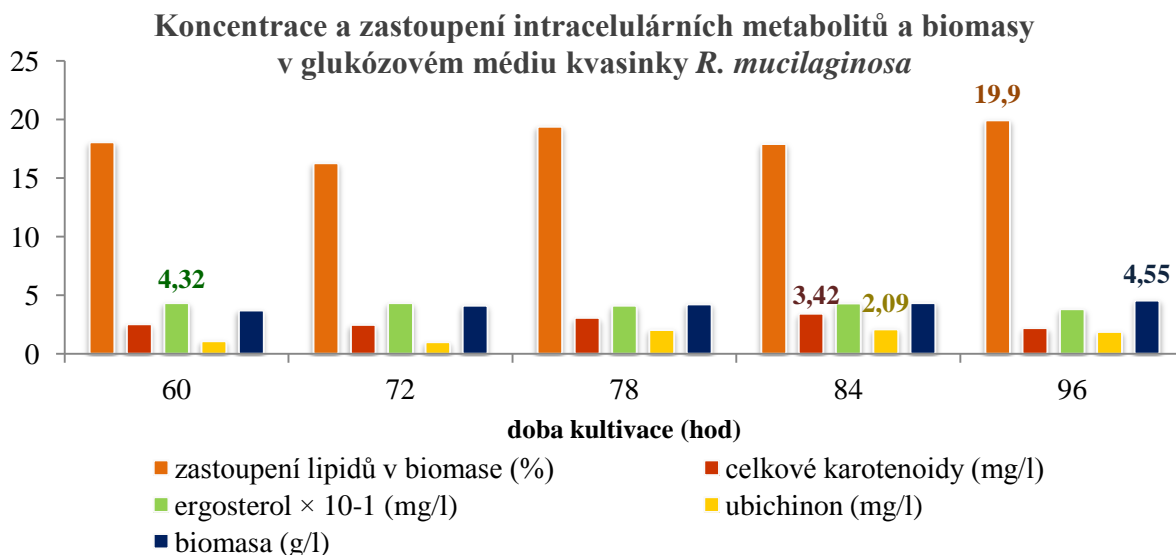
Obr. 50: Výsledky koncentrace a zastoupení intracelulárních metabolitů a biomasy v tukovém médiu kvasinky *R. mucilaginosa* (C/N poměr 13)

Z výsledků na Obr. 50 je patrný výrazný nárůst výtěžků intracelulárních lipidů. Maximální výtěžek byl stanoven v 72. hodině kultivace. Koncentrace karotenoidů a lipidických látek byly velmi proměnlivé. Nejvyšší výtěžky celkových karotenoidů a ergosterolu byly stanoveny v 84. hodině kultivace. Výtěžek ubichinonu byl nejvyšší v 96. hodině.



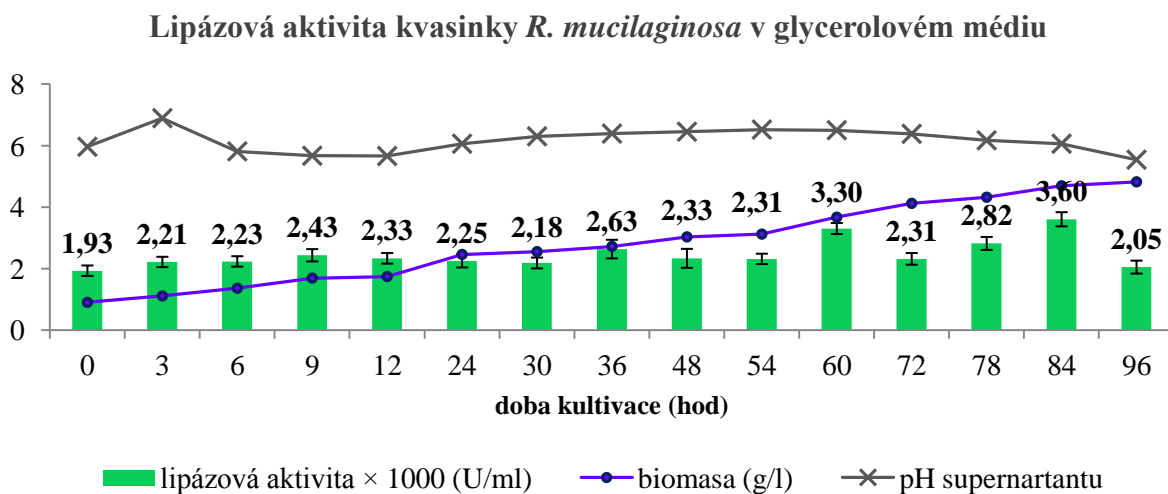
Obr. 51: Výsledky lipázové aktivity kvasinky *R. mucilaginosa* v glukózovém médiu (C/N poměr 13)

Charakteristika průběhu lipázových aktivit (Obr. 51) je velmi kolísavá a dosahuje čtyř nevýrazných maxim v 9., 30., 54. a v 72. hodině kultivace. V 96. hodině nebyla lipázová aktivita naměřená vůbec. Vyšších hodnot bylo dosaženo spíše v první polovině kultivace, kdy je buňka naprogramována k produkci enzymu pro zajištění dostatečné energie.



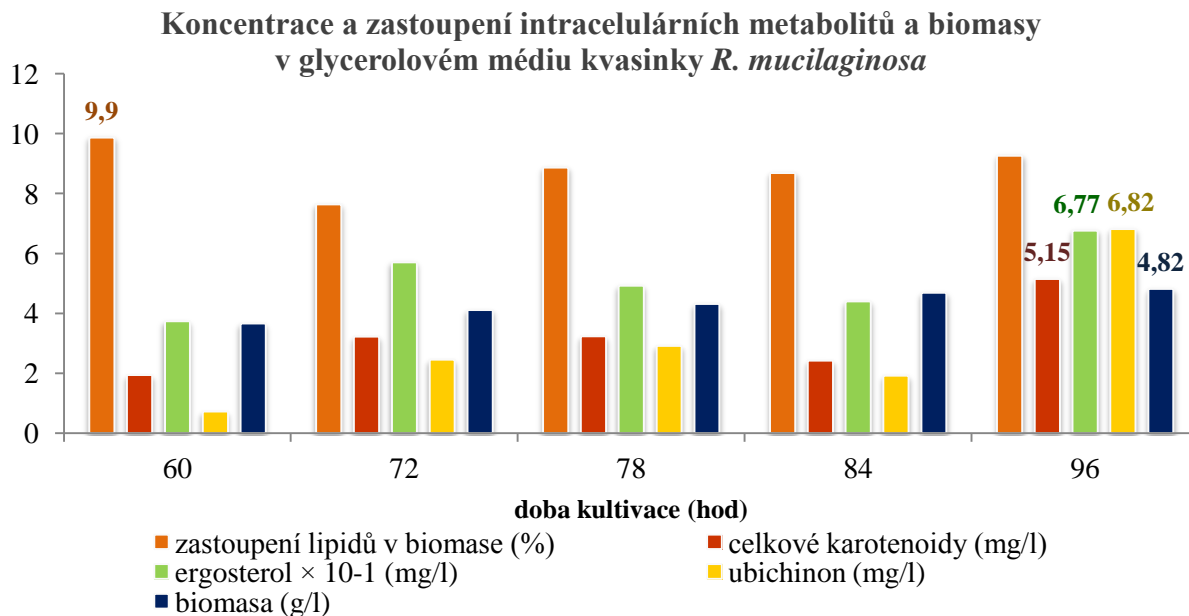
Obr. 52: Výsledky koncentrace a zastoupení intracelulárních metabolitů a biomasy v glukózovém médiu kvasinky *R. mucilaginosa* (C/N poměr 13)

Procentuální zastoupení intracelulárních lipidů na Obr. 52 má proměnlivý charakter dosahující maxima v 96. hodině. Výtěžky intracelulárních lipidů jsou zde nižší, než v případě kultivace na tuku. Kolísavý charakter je pozorován i u koncentrace celkových karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu. Výtěžky karotenoidů a ubichinonu dosahují maxima v 84. hodině kultivace. Výtěžek ergosterolu je nejvyšší v 60. hodině kultivace.



Obr. 53: Výsledky lipázové aktivity kvasinky *R. mucilaginosa* v glycerolovém médiu (C/N poměr 13)

Naměřené hodnoty lipázových aktivit v glycerolovém médiu (Obr. 53) jsou nízké. I když lze pozorovat maximum v 9., 36., 60. a v 84. hodině kultivace, jsou si lipázové aktivity velmi podobné. Výraznější aktivita enzymu byla stanovena v 60. a 84. hodině kultivace.



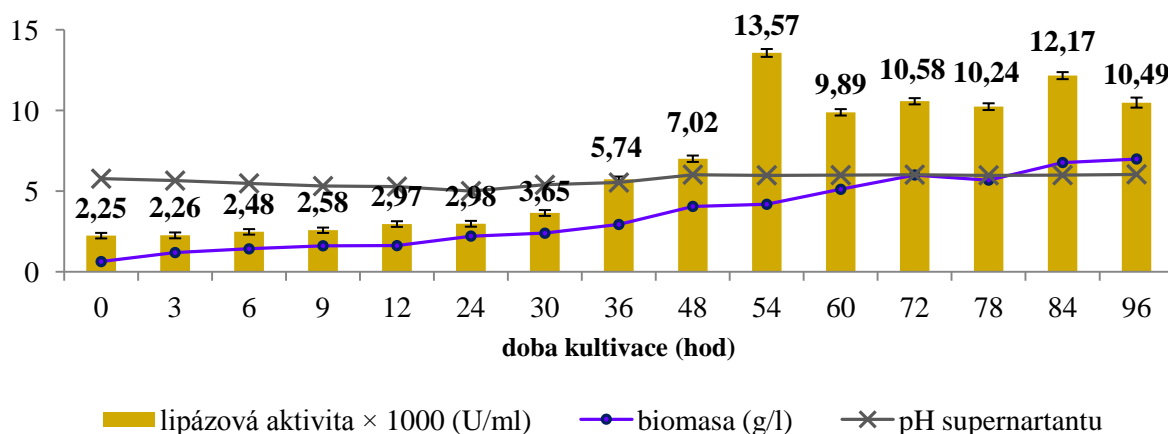
Obr. 54: Výsledky koncentrace a zastoupení intracelulárních metabolitů a biomasy v glycerolovém médiu kvasinky *R. mucilaginosa* (C/N poměr 13)

Oproti kultivaci kvasinky *R. mucilaginosa* v glukózovém (Obr. 52) a tukovém médiu (Obr. 50) pozorujeme v kultivaci v glycerolovém médiu (Obr. 54) výrazný pokles výtěžků buněčných lipidů, který má kolísavý charakter. Nejvyšší výtěžek byl stanoven v 60. hodině kultivace. Koncentrace karotenoidů a lipidických látek má taktéž kolísavé chování, nicméně nejvyšší výtěžky jsou vždy pozorovány v 96. hodině kultivace. V 84. hodině je u všech sledovaných metabolitů zaznamenán pokles.

5.3.3.1 *Sporidiobolus pararoseus*

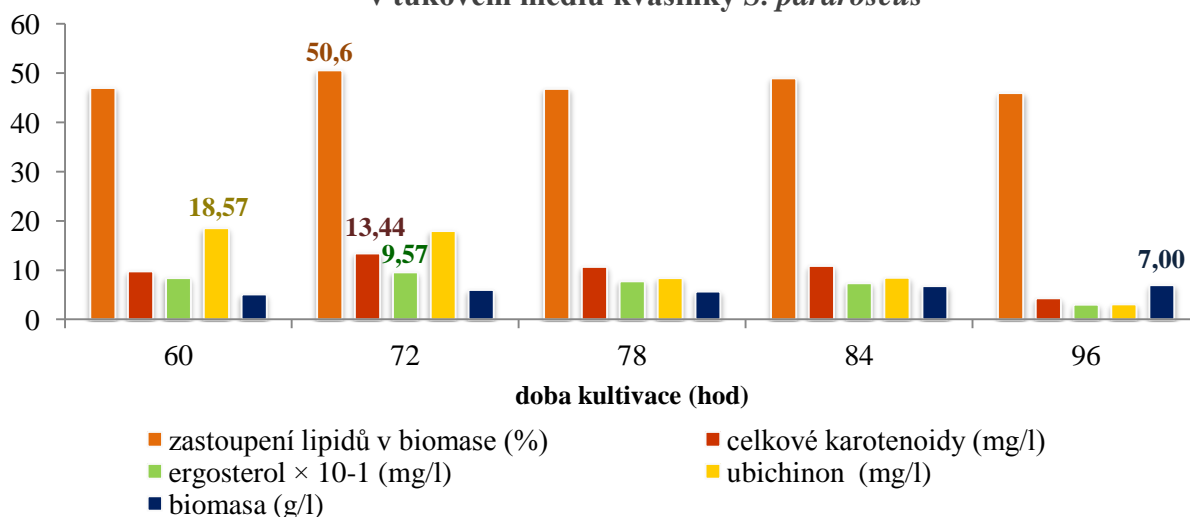
Velmi výrazný nárůst lipázové aktivity na Obr. 55 pozorujeme od 36. hodiny kultivace. Nejvyšší aktivity enzymu byly naměřeny v 54. a v 84. hodině. Na počátku kultivace mohlo přednostně dojít ke spotřebě nahromaděného glycerolu. Vysoké lipázové aktivity v druhé polovině kultivace mohou souviset s vysokým nárůstem biomasy.

Lipázová aktivita kvasinky *S. pararoseus* v tukovém médiu



Obr. 55: Výsledky lipázové aktivity kvasinky *S. pararoseus* v tukovém médiu (C/N poměr 13)

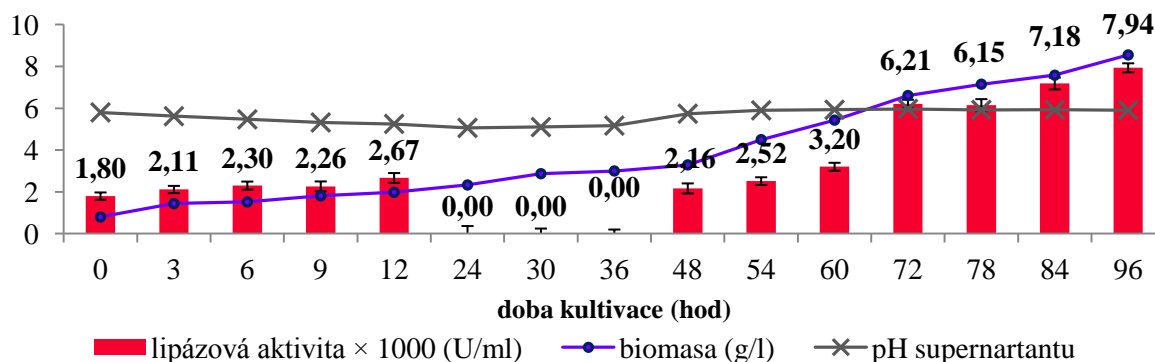
Koncentrace a zastoupení intracelulárních metabolitů a biomasy v tukovém médiu kvasinky *S. pararoseus*



Obr. 56: Výsledky koncentrace a zastoupení intracelulárních metabolitů a biomasy v tukovém médiu kvasinky *S. pararoseus* (C/N poměr 13)

Výtěžky intracelulárních lipidů v biomase tukového média (Obr. 56) jsou velmi vysoké. Svého maxima dosahují v 72. hodině kultivace. Velmi vysoké jsou i koncentrace karotenoidů a lipidických látek. Nejvyšší výtěžky celkových karotenoidů a ergosterolu byly stanoveny v 72. hodině kultivace. Koncentrace ubichinonu lineárně klesala od 60. hodiny kultivace.

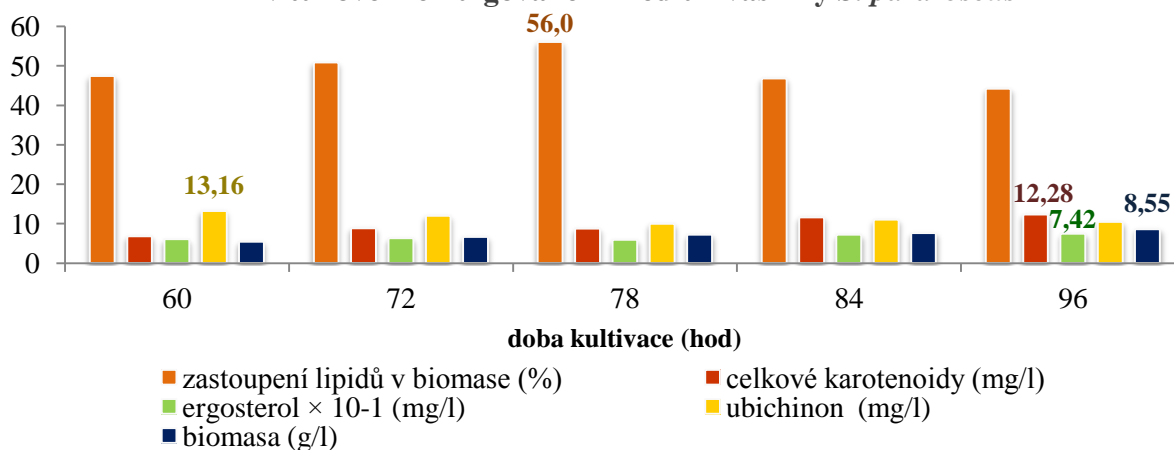
**Lipázová aktivita kvasinky *S. pararoseus*
v tukovém emulgovaném médiu**



Obr. 57: Výsledky lipázové aktivity kvasinky *S. pararoseus* v tukovém emulgovaném médiu (C/N poměr 13)

Z grafu na Obr. 57. je patrné naměření lipázových aktivit pouze v intervalech od 0. až 12. hodiny kultivace a od 48. až 96. hodiny kultivace. V rozmezí 0. až 12. hodiny pozorujeme mírný nárůst aktivity enzymu. V rozmezí od 48. do 96. hodiny se lipázová aktivita výrazně zvýšila až do maxima v 96. hodině kultivace. Oproti tukovému médiu (Obr. 55) jsou lipázové aktivity ke konci kultivace nižší. Důvodem může být snížená produkce enzymu v důsledku snazšího využití tuku způsobenou emulgovaným systémem, což je velmi pravděpodobné v souvislosti s výtěžky intracelulárních metabolitů a biomasy.

**Koncentrace a zastoupení intracelulárních metabolitů a biomasy
v tukovém emulgovaném médiu kvasinky *S. pararoseus***

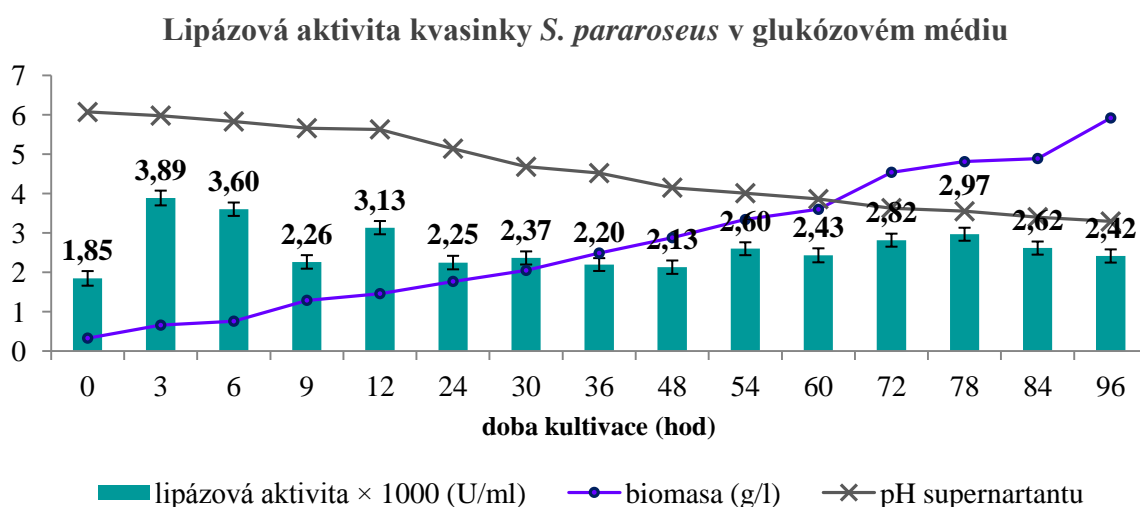


Obr. 58: Výsledky koncentrace a zastoupení intracelulárních metabolitů a biomasy v tukovém emulgovaném médiu kvasinky *S. pararoseus* (C/N poměr 13)

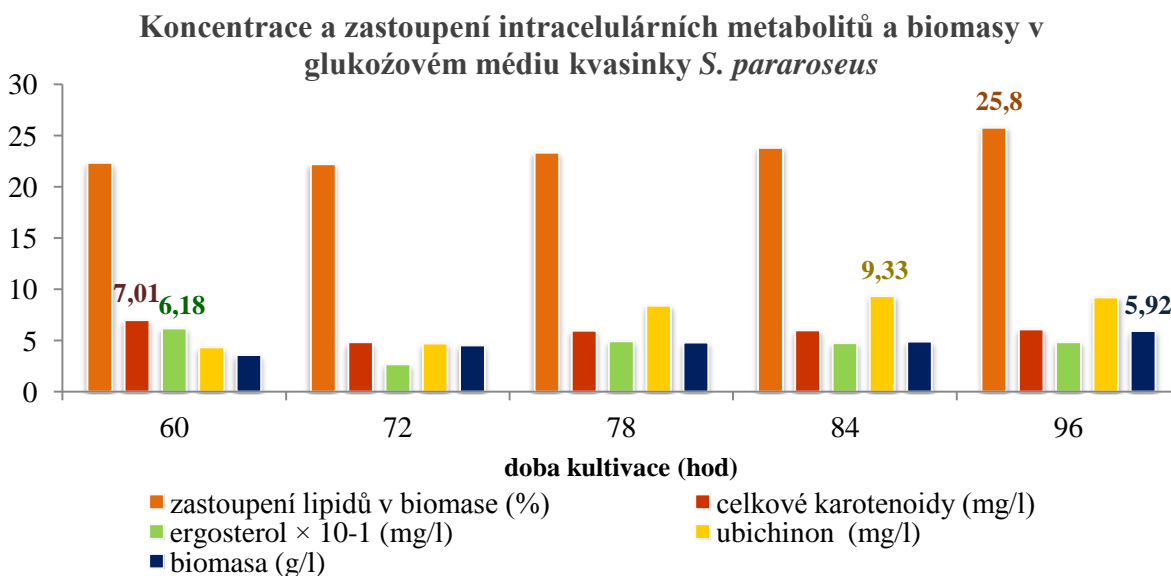
Ze všech studovaných kmenů a použitých médií byly pozorovány nejvyšší výtěžky intracelulárních lipidů u kultivace kvasinky *S. pararoseus* v tukovém médiu s emulgátorem TWEEN 80 (Obr. 58). Maximální výtěžek byl stanoven v 78. hodině kultivace.

Koncentrace karotenoidů kolísavě rostla do maxima v 96. hodině kultivace. Obdobný průběh byl sledován i u koncentrace ergosterolu. Výťažky ubichinonu spíše kolísavě klesaly. Maximum naměřeného ubichinonu bylo v 60. hodině kultivace.

Maxima lipázových aktivit v glukózovém médiu (Obr. 59) byly pozorovány ve 3., 12. a v 78. hodině kultivace. Na počátku kultivace byly pozorovány vyšší aktivity enzymu, což může být způsobeno v glukózovém médiu lepším nárůstem biomasy resp. vyšší produkcí enzymů. Z kolísavé charakteristiky můžeme usoudit přítomnost lipázy asociované s buňkou a lipázy uvolněné do prostředí. Lipáza asociovaná s buňkou se mohla převést do supernatantu v průběhu zpracování biomasy.



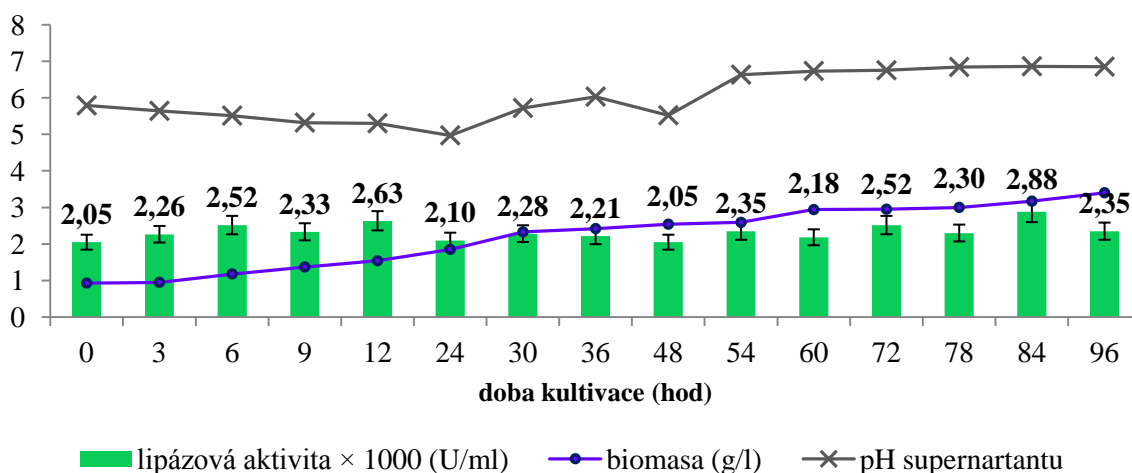
Obr. 59: Výsledky lipázové aktivity kvasinky *S.pararoseus* v glukózovém médiu (C/N poměr 13)



Obr. 60: Výsledky koncentrace a zastoupení intracelulárních metabolitů a biomasy v glukózovém médiu kvasinky *S. pararoseus* (C/N poměr 13)

Výtěžky intracelulárních lipidů v biomase glukózového média jsou téměř dvojnásobně nižší, než v případě tukových médiích. Na Obr. 60 je patrný mírný lineární nárůst výtěžku intracelulárních lipidů. Z předchozích základních kultivací je kvasinka *S. pararoseus* považována ze studovaných kmenů jako nejlepší producent sledovaných metabolitů. Výtěžky buněčných lipidů jsou i zde vyšší. Maximum bylo stanoveno v 96. hodině. Koncentrace celkových karotenoidů a ergosterolu mají kolísavý charakter. Nejvyšší výtěžky karotenoidů a ergosterolu byly pozorovány v 60. hodině. Koncentrace ubichinonu lineárně roste s nejvyšší hodnotou na konci kultivace v 84. hodině.

Lipázová aktivita kvasinky *S. pararoseus* v glycerolovém médiu

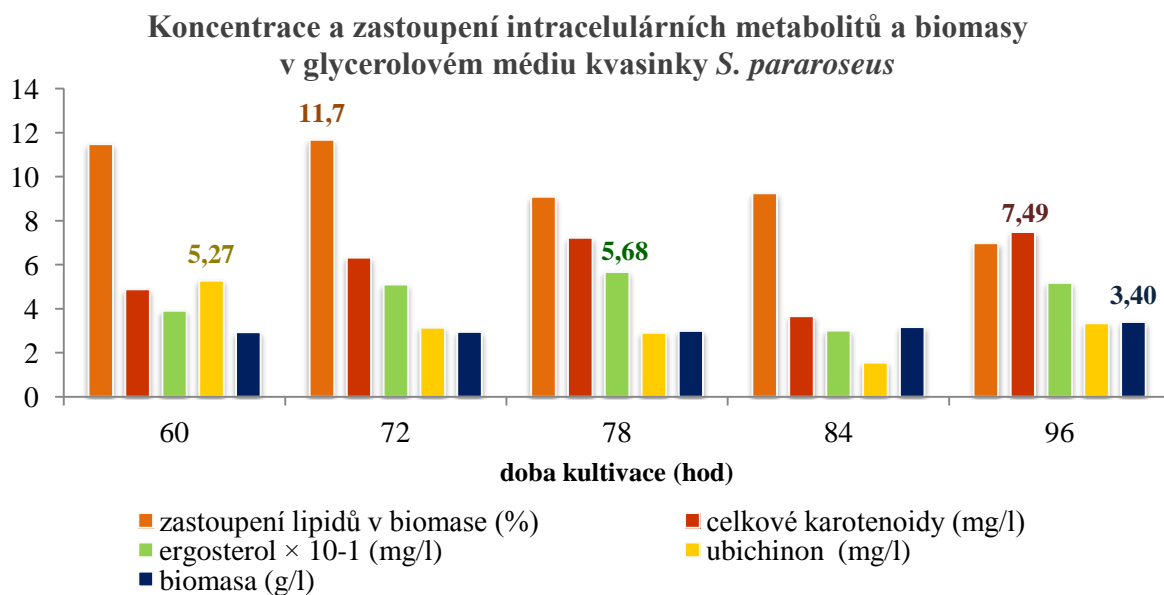


Obr. 61: Výsledky lipázové aktivity kvasinky *S. pararoseus* v glycerolovém médiu (C/N poměr 13)

Lipázové aktivity v glycerolovém médiu (Obr. 61) jsou velmi nízké. Z jejich hodnot nelze jednoznačně určit maxima. Nepatrné zvýšení lze pozorovat mezi 3. a 24. hodinou a mezi 54. až 96. hodinou.

Z výsledků na Obr. 62 je patrný výrazný pokles intracelulárního tuku ve srovnání se zastoupením buněčných lipidů v glukózovém médiu (Obr. 60). S časem výtěžky intracelulárních lipidů klesají. Maxima dosahují v 72. hodině kultivace.

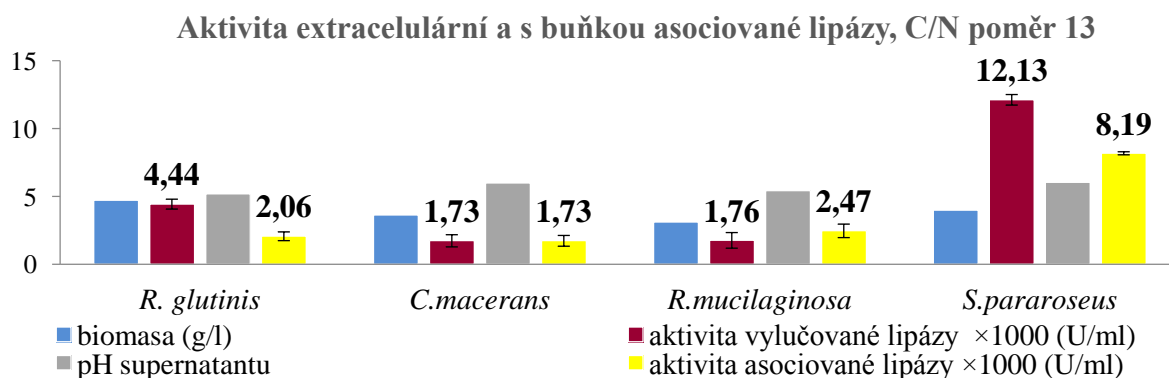
Koncentrace karotenoidů a ergosterolu lineárně rostou až do 78. hodiny, poté byl pozorován výrazný propad koncentrací těchto metabolitů, nicméně maximálních výtěžků dosahují až na konci kultivace. Výtěžky ubichinonu jsou velmi kolísavé a nižší, než u kultivace s glukózou. Nejvyšší koncentrace byla stanovena v 60. hodině.



Obr. 62: Výsledky koncentrace a zastoupení intracelulárních metabolitů a biomasy v glycerolovém médiu kvasinky *S. pararoseus* (C/N poměr 13)

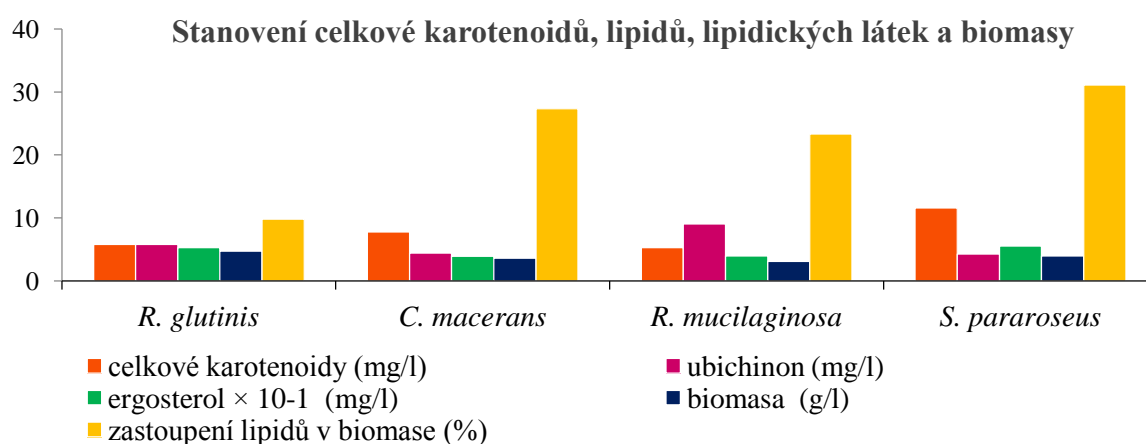
5.4 Výsledky velkoobjemových kultivací kmenů karotenogenních kvasinek s intenzivním provzdušňováním

Na základě předpokladu produkce lipolytického enzymu asociovaného s buňkou (kapitola 5.3) bylo provedeno u karotenogenních kmenů detailnější studium lipázových aktivit. Protože produkce lipázy asociované s buňkou závisí do jisté míry na růstu buněčné kultury, pro urychlení růstu kvasinek bylo do média přidáno i malé množství glycerolu, jako snáze utilizovatelného substrátu. K vyššímu nárůstu biomasy byl systém intenzivně provzdušňován. Pro odstranění intaktní lipázy z biomasy byl použit ultrazvuk. V rámci zachování podmínek, byla tato kultivace provedena v médiích o stejném C/N poměru jako u velkoobjemových kultivací s časovými odběry. Podrobný popis kultivačních podmínek je uveden v kapitole 4.4.4. V rámci hlubšího porozumění metabolismu kvasinek byly stanoveny také intracelulární metabolity.



Obr. 63: Výsledky stanovení extracelulární a s buňkou asociované lipolytické aktivity v médiích s intenzivním provzdušňováním s C/N poměrem 13

Z grafu (Obr. 63) je patrné, že asociovaná lipáza je produkována všemi studovanými kmeny. U kultivace kvasinky *S. pararoseus* byla její aktivita několikanásobně vyšší, než u ostatních kmenů ($8,19 \pm 0,11 \cdot 10^{-3} \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$). U tohoto kmene byla velmi vysoká také extracelulární lipolytická aktivita vylučovaného enzymu, která byla stanovena na $12,13 \pm 0,39 \cdot 10^{-3} \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$. Aktivity vylučovaných a asociovaných lipáz u ostatních kmenů byly velmi nízké. Z toho vyšší hodnota byla pozorována pouze u kultivace kvasinky *R. glutinis*. Aktivita vylučovaného enzymu byla téměř dvojnásobná, než aktivita asociované lipázy. Zajímavý je výsledek aktivit enzymů kvasinky *R. mucilaginosa*. Asociovaná lipáza zde vykazovala vyšší aktivitu, než vylučovaná, které by mělo být na konci kultivace více. Enzymové aktivity obou lipáz kvasinky *C. macerans* byly totožné.



Obr. 64: Grafické znázornění výsledků stanovení intracelulárních metabolitu a gravimetrického stanovení biomasy u kultivace s intenzivním provzdušňováním s C/N poměrem 13

Intenzivní provzdušňování kultivačního média vede u aerobních kvasinek ke zvýšenému nárůstu mikrobiálních buněk až o 10 %. Vlivem přenosu kyslíku dochází k lepší distribuci nutrietů a rozptýlení vzniklých produktů [73].

Z výsledků uvedených na Obr. 64. je patrné, že nejvyšší množství biomasy bylo stanoveno u kvasinky *R. glutinis*. I když systém byl intenzivně provzdušňován a do lipidových médií bylo přidáno malé množství glycerolu jako snáze utilizovatelného uhlíkatého substrátu, k významnému nárůstu biomasy oproti kultivacím bez intenzivního provzdušňování nedocházelo, a to zřejmě z důvodu nedostatečné aktivity lipáz, které nebyly schopné vytvořit v průběhu růstu dostatečnou koncentraci snáze utilizovatelných uhlíkatých zdrojů, které by mohly být za podmínek aerace maximálně využity. Ukázky intenzivně provzdušňovaných kultivací jsou uvedeny v Příloha 12.

Z výsledků na Obr. 64 je patrné, že nejvyšší procentuální zastoupení intracelulárních lipidů (31,1 %) se nachází v biomase kvasinky *S. pararoseus*, která se jeví i z předešlých kultivací jako výborný producent těchto metabolitů. Podobné výsledky výtěžků lipidů byly pozorovány i u kvasinek *C. macerans* a *R. mucilaginosa*.

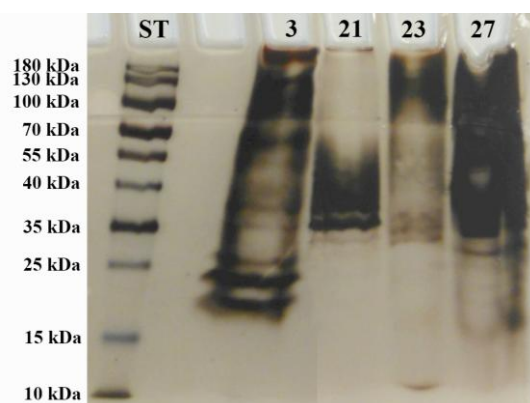
Nejvyšší koncentrace karotenoidů a ergosterolu byla naměřena u kmene *S. pararoseus*. Vysoký obsah ergosterolu byl pozorován i v biomase *R. glutinis*. Obsah ubiquinonu byl nejvyšší u kvasinky *R. mucilaginosa*.

5.5 Výsledky stanovení molekulové hmotnosti extracelulárních lipolytických enzymů pomocí vertikální PAGE-SDS

Ke stanovení molekulové hmotnosti extracelulárních lipolytických enzymů byla zvolena metoda vertikální PAGE-SDS. Pro separaci proteinů byly použity supernatanty kvasinek *R. glutinis*, *C. macerans*, *R. mucilaginosa* a *S. pararoseus* z velkoobjemových kultur s intenzivním provzdušňováním (kapitola 4.4.4.). Přesný postup a podmínky stanovení molekulové hmotnosti extracelulárních lipolytických enzymů jsou uvedeny v kapitole 4.5.7.

Separace probíhala v 8% polyakrylamidovém gelu po dobu 120 min a při napětí 65 V. K určení velikosti fragmentů byl použit standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10–180 kDa. Testované supernatanty byly před elektroforetickou separací 150× zkoncentrovány ultrafiltrací. Do jamek bylo nanášeno 5 µl standardu a 30 µl vzorku.

Velikost kvasinkové lipázy se pohybuje v rozmezí 20–60 kDa. Podle výsledků PAGE-SDS na Obr. 65 je u kmene *R. glutinis* zjevné, že v tomto rozmezí se nachází 3 jasně viditelné zóny o velikosti cca 20–25 kDa a 3 slabě viditelné zóny o velikosti 35–40 kDa. U kvasinky *C. macerans* se nachází jeden jasně viditelný fragment o velikosti cca 35 kDa. Viditelnost zón kvasinky *R. mucilaginosa* je velmi slabá. V požadovaném rozmezí se nacházejí pouze 3 nepatrně viditelné zóny. U kvasinky *S. pararoseus* většina zón navzájem splývá, nicméně v rozmezí 25–35 kDa se nachází jeden dobře viditelný fragment.



Obr. 65: Výsledek PAGE-SDS standardu (ST) a extracelulárních proteinů kvasinky *R. glutinis* (3), *C. macerans* (21), *R. mucilaginosa* (24) a *S. pararoseus* (27)

5.6 Výsledky základního screeningu extracelulárních biosurfaktantů

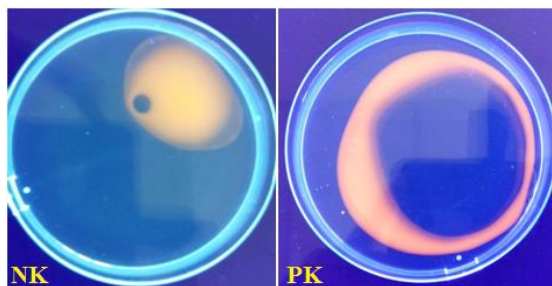
Pro základní screening produkce extracelulárních biosurfaktantů byly vybrány tyto metody: metoda rozšiřování olejové skvrny, stanovení emulgační aktivity a solubilizace krystalického anthracenu. Ke zjištění možné produkce extracelulárních biosurfaktantů studovaných kvasinek *R. glutinis*, *C. macerans*, *R. mucilaginosa* a *S. pararoseus*, byla provedena metoda rozšiřování oleje. Touto metodou byly testovány supernatanty z kultivace karotenogenních kmenů zaměřené ke zjištění produkce biosurfaktantů (kapitola 4.4.5.)

Ke zjištění emulgačních schopností (metoda stanovení emulgační aktivity) a vlastnosti rozpouštět ve vodě nerozpustné látky (solubilizace krystalického anthracenu) byly v rámci projektu „LipoFungi“ použity supernatanty ze základních kultur karotenogenních kmenů kvasinek (kapitola 4.4.1) vyjma kultur na tukových médiích s přídavkem emulgátoru TWEEN 80. Screening biosurfaktantů v supernatantech s externím emulgátorem by mohl poskytovat zkreslené výsledky.

5.6.1 Výsledky metody rozšiřování olejové skvrny

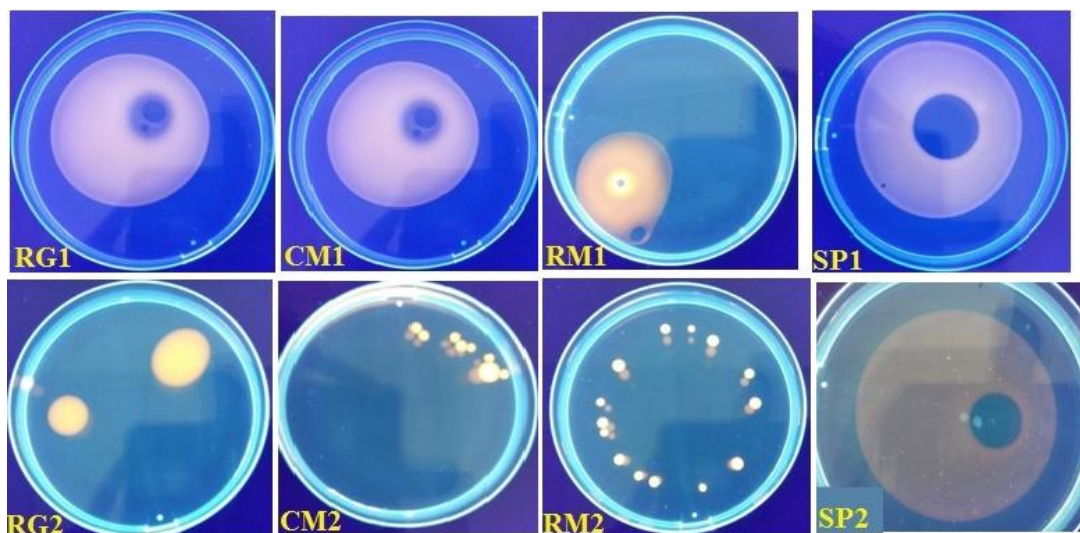
Metoda rozšiřování olejové skvrny je jednou ze základních a účinných metod sloužících k detekci povrchově aktivní látky v médiu. Podstatou této metody je měření povrchové aktivity přítomného surfaktantu v prostředí vody s malou dávkou oleje. Míra roztržení olejové vrstvy pak odpovídá množství povrchově aktivní látky [74].

V rámci této metody byla připravena negativní kontrola s destilovanou vodou a pozitivní kontrola obsahující saponát v koncentraci $c = 6,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (Obr. 66). Přesný popis metody je uveden v kapitole 4.5.8.1.



Obr. 66: Výsledky metody rozšiřování olejové skvrny u negativní kontroly (NK) a pozitivní kontroly (PK)

Z Obr. je patrné, že přídavek supernatantu z indukovaného média kvasinek *R. glutinis*, *C. macerans* a *R. mucilaginosa* do systému olej – voda způsobilo úplné roztržení olejové kapky. U supernatantů z kontrolního média k tomuto jevu v takové míře nedocházelo. Přídavek malého množství oleje tedy může výrazně podporovat vysokou produkci povrchově aktivních látek u těchto kmenů. U kvasinky *S. pararoseus* (Obr. 67) je patrné, že supernatanty z kontrolního i indukovaného média zůstaly nadávkované na povrchu olejové kapky, nebo vytvořily pouze malou čirou zónu. Tato skutečnost může být způsobena malým množstvím povrchově aktivní látky v supernatantu, nebo sníženou schopností povrchové aktivity biosurfaktantu.

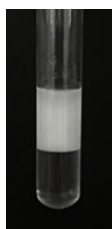


Obr. 67: Výsledek metody rozšiřování olejové skvrny u kultivace kvasinky *R. glutinis* v kontrolním médiu (RG1) a v indukovaném médiu (RG2), *C. macerans* v kontrolním médiu (CM1) a v indukovaném médiu (CM2), *R. mucilaginosa* v kontrolním médiu (RM1) a v indukovaném médiu (RM2) a *S. pararoseus* v kontrolním médiu (SP1) a v indukovaném médiu (SP2)

5.6.2 Výsledky metody stanovení emulgační aktivity a solubilizace krystalického anthracenu

Vysokomolekulární biosurfaktanty jsou obecně lepšími emulgátory, než biosurfaktanty s nízkou molekulovou hmotností. Biosurfaktanty resp. bioemulgátory ovšem nemusí disponovat schopnostmi jiných detergentů, jako je schopnost snížení povrchového napětí [74]. Metodou stanovení aktivní emulze byly srovnávány typy emulzí jak u jednotlivých médií (zdroj uhlíku, C/N poměr), tak mezi jednotlivými kvasinkovými kmeny. Detailní popis metody je uveden kapitole 4.5.8.2.

Emulgační aktivita byla stanovena na základě vypočítaného emulgačního indexu (4). Sledované emulze byly porovnány s pozitivní (destilovaná voda-5% Triton X-100-hexan) a negativní (destilovaná voda-hexan) kontrolou. Emulgační index pozitivní kontroly činil 58 %. Vrstva emulze byla kompaktní, neprůhledná a bílá (Obr. 68). V negativní kontrole se nenacházela žádná emulgující látka, nedocházelo ke tvorbě emulze a emulgační index se tedy rovnal 0 %. Hodnoty emulgačních indexů a popisy emulzí vrstev jednotlivých kultivací jsou v přehledných tabulkách (Tab. 10–Tab. 14).



Obr. 68: Emulgační aktivita emulgátoru Triton X-100 (pozitivní kontrola)

Solubilizace krystalického anthracenu je metoda, ve které dochází k rozpuštění, resp. včlenění ve vodě nerozpustného anthracenu do jádra micel biosurfaktantů. Platí tedy, že čím je vyšší koncentrace surfaktantu, tím je vyšší i naměřená absorbance. Absorbance jednotlivých supernatantů byly porovnány s pozitivní kontrolou, která obsahovala surfaktant Triton X-100. Absorbance pozitivní kontroly byla 1,476. Negativní kontrola (destilovaná voda) sloužila jako blank. Pro vyloučení interference složek média byla změřena absorbance i u připravené série vzorků s čistými médii pro každý C/N poměr. Přesný popis metody je uveden v kapitole 4.5.8.3.

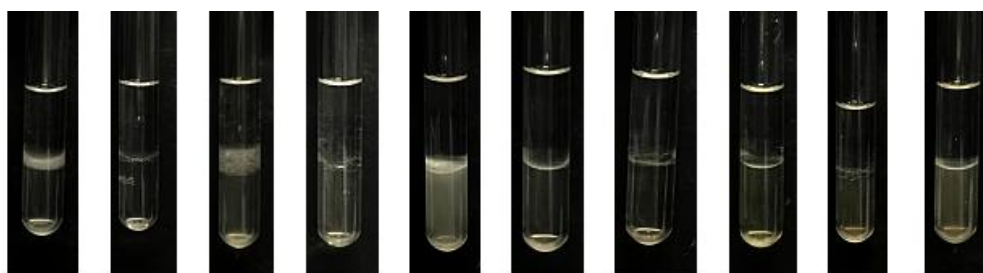
5.6.2.1 Základní kultivace karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 13

Z emulgačních indexů I_{24} uvedených v Tab. 10 je zjevné, že nejvyšší hodnoty této veličiny jsou pozorovány v supernatantech kvasinek *R. glutinis*, *C. macerans* a *R. mucilagiosa* z kultivací v glukózovém médiu. Výjimkou je kvasinka *S. pararoseus*, u které emulgační index, dosahuje nejvyšších hodnot v glycerolovém supernatantu. Tento výsledek může být zavádějící, neboť samotný glycerol může mít do jisté míry emulgační účinky. Nejvyšší hodnota I_{24} je pozorována v glukózovém supernatantu *C. macerans* (13,33 %). Vrstva této emulze je bílá a perforovaná.

V tukových supernatantech byly hodnoty I_{24} velmi nízké. U kvasinek rodu *Rhodotorula* ke vzniku emulzní vrstvy v tukovém supernatantu nedocházelo vůbec. Nízkým emulgačním indexům v tukových médiích odpovídají i výtěžky biomas. Zřejmě při tomto poměru nedocházelo k vylučování dostatečného množství biosurfaktantů ke tvorbě emulze zajišťující efektivnější využití tukového substrátu příslušnými lipázami. Ukázky emulzí jsou zobrazeny na Obr. 69.

Tab. 10: Výsledky stanovení emulgační aktivity u základních kultivací karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 13

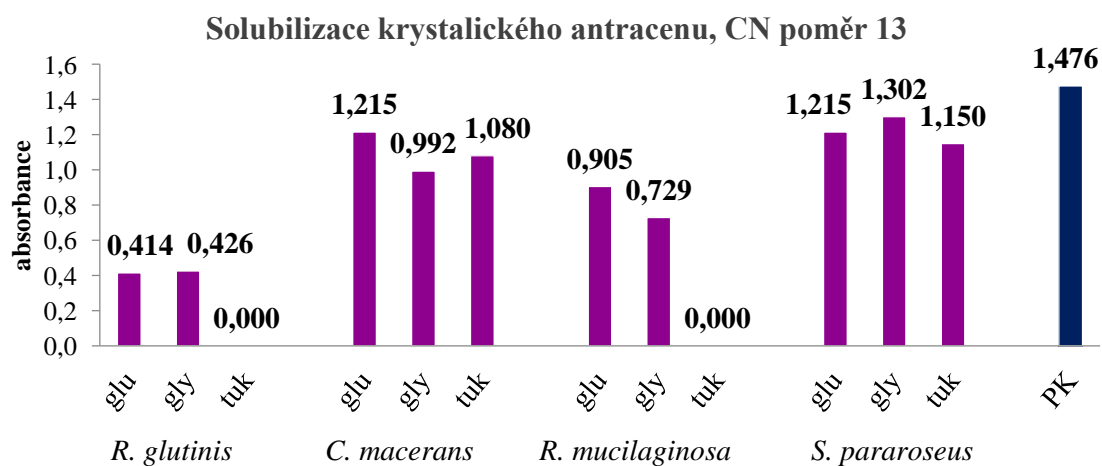
kmen	médium	I 24 (%)	popis emulzní vrstvy
<i>R. glutinis</i>	glukóza	9,73	bílá, kompaktní vrstva podobající se pění
	glycerol	5,52	úzká, perforovaná vrstva na rozhraní
	tuk	0,00	nedošlo ke vzniku emulze
<i>C. macerans</i>	glukóza	13,33	bílá, perforovaná vrstva
	glycerol	5,18	perforovaná vrstva podobající se pění
	tuk	3,45	úzká, bílá, kompaktní vrstva
<i>R. mucilagiosa</i>	glukóza	7,16	kompaktní vrstva na rozhraní podobající se pění
	glycerol	4,91	úzká, perforovaná vrstva na rozhraní
	tuk	0,00	nedošlo ke vzniku emulze
<i>S. pararoseus</i>	glukóza	3,66	kompaktní úzká vrstva na rozhraní
	glycerol	9,43	perforovaná vrstva
	tuk	2,69	kompaktní úzká vrstva na rozhraní
PK		57,83	kompaktní, bílá vrstva



Obr. 69: Emulgační aktivita testovaných supernatantů ze základních kultivací o C/N poměru 13 (zleva): *R. glutinis* – glukóza, glycerol; *C. macerans* – glukóza, glycerol, tuk; *R. mucilaginosa* – glukóza, glycerol; *S. pararoseus* – glukóza, glycerol, tuk

Výsledky metody solubilizace krystalického anthracenu zobrazené na Obr. 70 ukazují, že nejvyšší hodnoty absorbancí byly naměřeny v supernatantech kvasinky *S. pararoseus*. Supernatanty této kvasinky přesahují hodnotu absorbance 1,000, což naznačuje vysokou koncentraci biosurfaktantů. Velmi vysoké hodnoty absorbance jsou pozorovány i u kvasinky *C. macerans*, kde glukózový i glycerolový supernatant také přesáhl hodnotu absorbance 1,000.

Vyšší absorbance byly naměřeny i u kvasinky *R. mucilaginosa*, naopak u kvasinky *R. glutinis* byly absorbance v porovnání s ostatními kmeny až dvojnásobně nižší. U kmenů rodu *Rhodotorula* byly hodnoty absorbance v tukových supernatantech nulové.



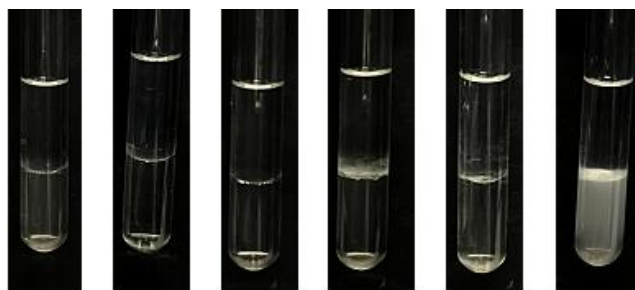
Obr. 70: Výsledky metody solubilizace krystalického anthracenu u základních kultivací karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 13

5.6.2.2 Základní kultivace karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 25

Z výsledků uvedených v tab. je patrné, že emulzní vrstva byla pozorována u kvasinek *R. glutinis* a *C. macerans* jen v glukózových supernatantech. V supernatantech kvasinek *R. mucilaginosa* a *S. pararoseus* v Tab. 11 byla prokázána přítomnost emulze pouze u kultivací za použití glycerolového a tukového uhlíkatého substrátu. Nejvyšší hodnota I_{24} byla pozorována v tukovém supernatantu kvasinky *R. mucilaginosa*. Vzniklá emulze byla bílá, podobající se pění s emulgačním indexem I_{24} 7,35 %. Vzniklá emulze v tukovém médiu může být ovšem způsobena volnými mastnými kyselinami, které vznikly v průběhu lipázové reakce s tukem. Ukázky emulzí jsou zobrazeny na Obr. 71.

Tab. 11: Výsledky stanovení emulgační aktivity u základních kultivací karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 25

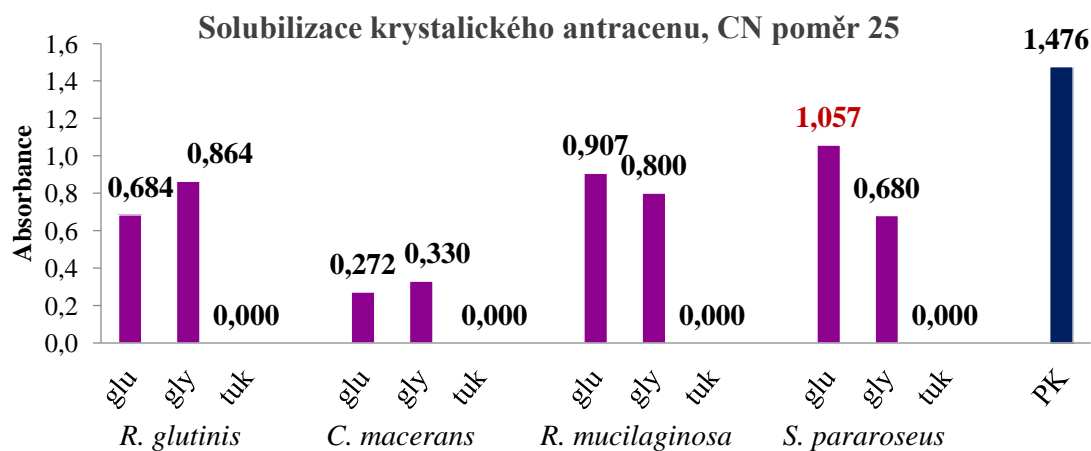
kmen	médium	I 24	popis emulzní vrstvy
<i>R. glutinis</i>	glukóza	6,49	perforovaná vrstva na rozhraní
	glycerol	0,00	nedošlo ke vzniku emulze
	tuk	0,00	nedošlo ke vzniku emulze
<i>C. macerans</i>	glukóza	5,89	perforovaná vrstva na rozhraní
	glycerol	0,00	nedošlo ke vzniku emulze
	tuk	0,00	nedošlo ke vzniku emulze
<i>R. mucilaginosa</i>	glukóza	0,00	nedošlo ke vzniku emulze
	glycerol	3,11	velmi úzká, perforovaná vrstva na rozhraní
	tuk	7,35	bílá vrstva podobající se pění
<i>S. pararoseus</i>	glukóza	0,00	nedošlo ke vzniku emulze
	glycerol	4,29	perforovaná vrstva
	tuk	4,98	úzká, bílá, kompaktní vrstva
PK		57,83	kompaktní, bílá vrstva



Obr. 71: Emulgační aktivity testovaných supernatantů ze základních kultivací o C/N poměru 25 (zleva): *R. glutinis* – glukóza; *C. macerans* – glukóza; *R. mucilaginosa* – glycerol, tuk; *S. pararoseus* – glycerol, tuk

Z výsledků solubilizace krystalického anthracenu uvedených na Obr. 72 je zřejmé, že nejvyšší absorbance u kvasinek *R. mucilaginosa* a *S. pararoseus* byly naměřeny v glukózových supernatantech, což je zajímavé, neboť v těchto supernatantech byla hodnota emulgačních indexů nulová. Glycerolové supernatanty těchto kmenů vykazují také vysoké hodnoty absorbancí. Nejvyšší naměřená hodnota absorbance byla v glukózovém supernatantu kvasinky *S. pararoseus* s hodnotou 1,057.

U kvasinek *R. glutinis* a *C. macerans* byly nejvyšší hodnoty absorbancí naměřeny v glycerolových supernatantech. Absorbance supernatantů kvasinky *C. macerans* vykazovala nejnižší hodnoty ze studovaných kmenů. V tukových supernatantech všech kvasinkových kmenů nebyla naměřena žádná absorbance.



Obr. 72: Výsledky metody solubilizace krystalického anthracenu u základních kultivací karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 25

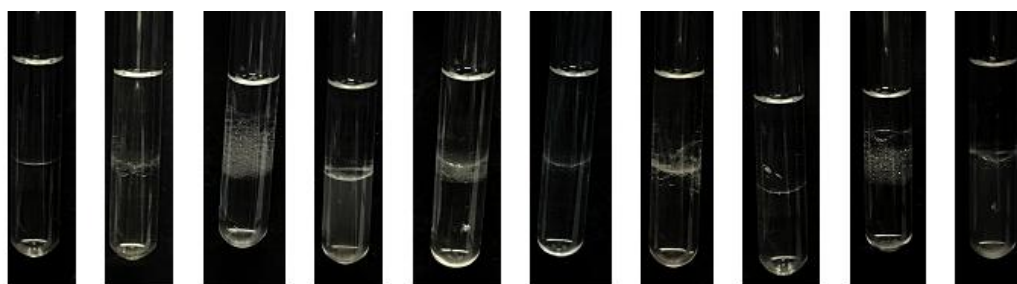
5.6.2.3 Základní kultivace karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 50

Z emulgačních indexů a popisu emulzní vrstvy v Tab. 12 je zřejmé, že emulze byly pozorovány u všech supernatantů, vyjma supernatatu kvasinky *R. glutinis* z tukové a *C. macerans* z glukózové kultivace. Kvasinky *R. glutinis*, *C. macerans* a *S. pararoseus* vykazují nejvyšší hodnoty emulgačních indexů v glycerolových supernatantech.

Oproti předcházejícím kultivacím (C/N poměr 13 a 25) docházelo v těchto médiích u kvasinek *C. macerans* (36,74 %) a *S. pararoseus* (26,00 %) k výraznému zvýšení emulgačního indexu I_{24} . Obě emulze byly perforované podobající se pění s bílou barvou. Vyšší produkce biosurfaktantů je v tomto případě způsobena vyšším C/N poměrem [54]. Supernatant kvasinky *R. mucilaginosa* má nejlepší emulgační vlastnosti z kultivací na tuku a na glukóze. Ukázky emulzí jsou zobrazeny na Obr. 73.

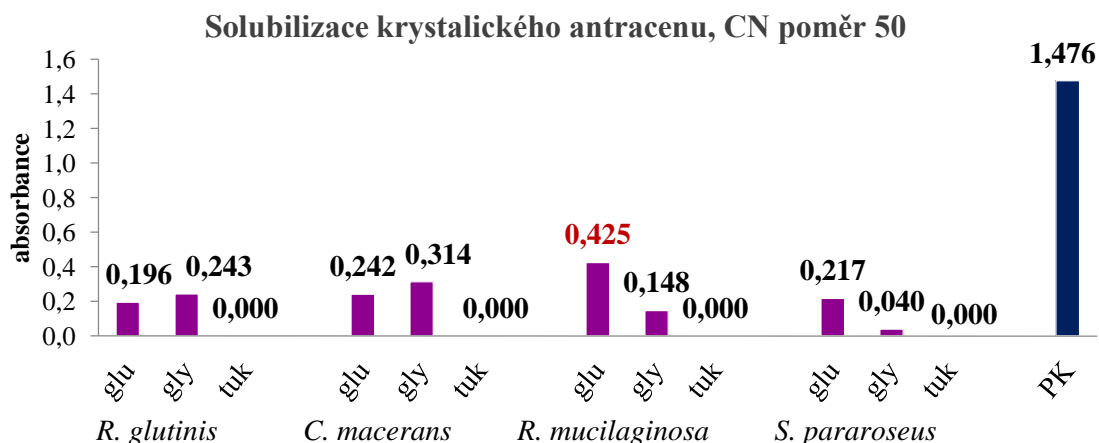
Tab. 12: Výsledky stanovení emulgační aktivity u základních kultivací karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 50

kmen	médium	I 24 (%)	popis emulzní vrstvy
<i>R. glutinis</i>	glukóza	4,86	perforovaná vrstva
	glycerol	10,07	perforovaná vrstva podobající se pění
	tuk	0,00	nedošlo ke vzniku emulze
<i>C. macerans</i>	glukóza	0,00	nedošlo ke vzniku emulze
	glycerol	36,74	bílá, perforovaná vrstva podobající se pění
	tuk	4,27	kompaktní vrstva na rozhraní podobající se pění
<i>R. mucilagiosa</i>	glukóza	12,25	kompaktní vrstva na rozhraní podobající se pění
	glycerol	8,02	perforovaná vrstva na rozhraní
	tuk	10,98	bílá, perforovaná vrstva podobající se pění
<i>S. pararoseus</i>	glukóza	3,55	úzká, perforovaná vrstva na rozhraní
	glycerol	26,00	bílá, perforovaná vrstva podobající se pění
	tuk	6,43	perforovaná vrstva na rozhraní
PK		57,83	kompaktní, bílá vrstva



Obr. 73: Emulgační aktivity testovaných supernatantů ze základních kultivací o C/N poměru 50 (zleva): *R. glutinis* – glukóza, glycerol; *C. macerans* – glycerol, tuk; *R. mucilagiosa* – glukóza, glycerol, tuk; *S. pararoseus* – glukóza, glycerol, tuk

Z výsledků metody solubilizace krystalického anthracenu uvedených na Obr. 74 lze pozorovat výrazné snížení absorbancí, a to u všech kvasinkových kmenů. U kvasinek *R. glutinis* a *C. macerans* byla naměřena nejvyšší hodnota absorbancí v glycerolových supernatantech, což odpovídá i hodnotám emulgačních indexů. Kvasinky *R. mucilagiosa* a *S. pararoseus* vykazují nejvyšší hodnotu absorpance v glukózovém supernatantu. Nejvyšší naměřená absorpance byla v glukózovém supernatantu *R. mucilagiosa*, jejíž hodnota činila 0,425.



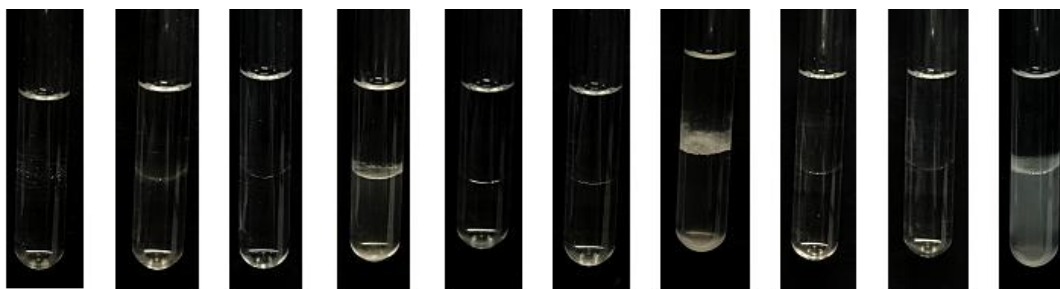
Obr. 74: Výsledky solubilizace krystalického antracenu u základních kultivací karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 50

5.6.2.4 Základní kultivace karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 100

V rámci kultivace s C/N poměrem 100 (Tab. 13) ke tvorbě emulze nedocházelo pouze v případě supernatantu kvasinky *R. glutinis* kultivované v glukózovém a v tukovém médiu. Naopak v glycerolovém médiu vykazuje tato kvasinka nejvyšší hodnotu emulgačního indexu (22,25 %). Emulze byla perforovaná, podobající se pění. U kvasinky *C. macerans* byla pozorována nejvyšší hodnota I_{24} také v glycerolovém supernatantu. U kvasinek *R. mucilaginosa* a *S. pararoseus* byla změřena nejvyšší hodnota I_{24} v tukových supernatantech. Ukázky emulzí jsou zobrazeny na Obr. 75.

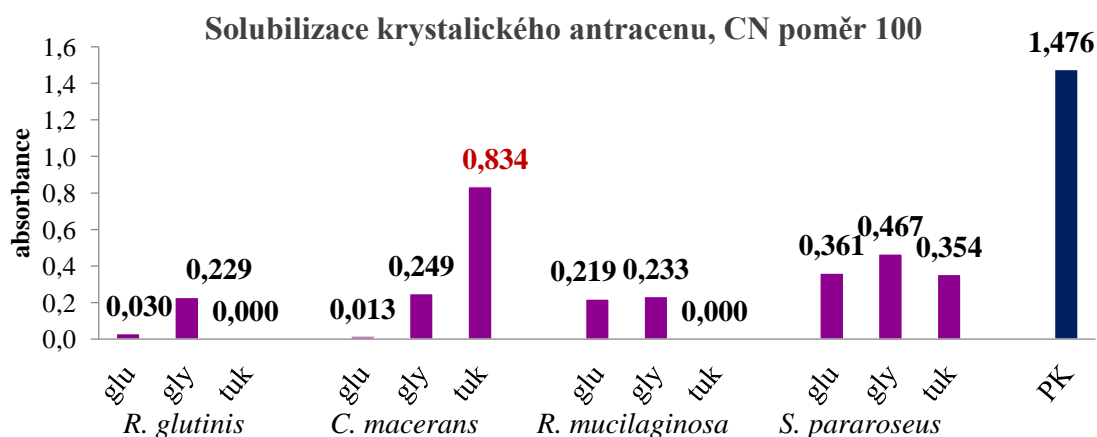
Tab. 13: Výsledky stanovení emulgační aktivity u základních kultivací karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 100

kmen	médium	I_{24} (%)	popis emulzní vrstvy
<i>R. glutinis</i>	glukóza	0,00	nedošlo ke vzniku emulze
	glycerol	22,25	perforovaná vrstva podobající se pění
	tuk	0,00	nedošlo ke vzniku emulze
<i>C. macerans</i>	glukóza	6,66	úzká, perforovaná vrstva na rozhraní
	glycerol	9,16	perforovaná vrstva
	tuk	7,27	bílá, kompaktní vrstva podobající se pění
<i>R. mucilaginosa</i>	glukóza	4,33	perforovaná vrstva
	glycerol	2,49	úzká, perforovaná vrstva na rozhraní
	tuk	9,72	bílá, kompaktní vrstva podobající se pění
<i>S. pararoseus</i>	glukóza	3,69	perforovaná vrstva
	glycerol	2,64	perforovaná vrstva
	tuk	6,85	bílá, kompaktní vrstva podobající se pění
PK		57,83	kompaktní, bílá vrstva



Obr. 75: Emulgační aktivity testovaných supernatantů ze základních kultivací o C/N poměru 100 (zleva): *R. glutinis* – glycerol; *C. macerans* – glukóza, glycerol, tuk; *R. mucilaginosa* – glukóza, glycerol, tuk; *S. pararoseus* – glukóza, glycerol, tuk

Z výsledků metody solubilizace krystalického anthracenu uvedených na Obr. 76 lze pozorovat nízké absorbance a to u všech kvasinkových kmenů. Výjimkou je kvasinka *C. macerans*, u které byla v tukovém supernatantu naměřena hodnota absorbance 0,834. V tomto supernatantu byla také pozorována vyšší hodnota I_{24} . Mírně zvýšené absorbance, zvláště v glycerolovém supernatantu, lze pozorovat u kvasinky *S. pararoseus*. Hodnoty absorbancí kvasinek rodu *Rhodotorula* jsou velmi podobné. Výjimkou tvoří glukózový supernatant kvasinky *R. glutinis*, jehož absorbance se blíží nule. V tukových supernatantech u tohoto rodu nebyla naměřena žádná absorbance. U kvasinky *R. glutinis* byla nejvyšší hodnota absorbance naměřena v glycerolovém médiu, což odpovídá i vysoké hodnotě emulgačního indexu.



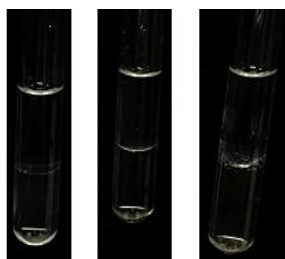
Obr. 76: Výsledky solubilizace krystalického anthracenu u základních kultivací karotenogenních kvasinek v médiích s C/N poměrem 100

5.6.2.5 Kultivace kmenů karotenogenních kvasinek s intenzivním provzdušňováním

Z hodnot emulgačních indexů u kultivací karotenogenních kvasinek s intenzivním provzdušňováním uvedených Tab. 14 je patrné, že v případě kvasinky *R. glutinis* nedocházelo ke tvorbě žádné emulzní vrstvy. V supernatantu kvasinky *C. macerans* byla pozorována jen velmi úzká emulzní vrstva. O něco vyšší emulgační index byl pozorován u kvasinky *R. mucilaginosa*. Nejvyšší emulgační index vykazoval supernatant kvasinky *S. pararoseus*. V rámci metody solubilizace anthracenu nedošlo k nárůstu absorbance ani u jednoho kmene. Ukázky emulzí jsou zobrazeny na Obr. 77.

Tab. 14: Výsledky stanovení emulgační aktivity u kultur karotenogenních kvasinek s intenzivním provzdušňováním v médiích s C/N poměrem 13

kmen	médium	I 24 (%)	popis emulzní vrstvy
<i>R. glutinis</i>	tuk + glycerol	0,00	nedošlo ke vzniku emulze
<i>C. macerans</i>	tuk + glycerol	2,43	velmi úzká, perforovaná vrstva na rozhraní
<i>R. mucilaginosa</i>	tuk + glycerol	4,09	perforovaná vrstva na rozhraní
<i>S. pararoseus</i>	tuk + glycerol	7,79	perforovaná vrstva
PK		57,83	kompaktní, bílá vrstva



Obr. 77: Emulgační aktivity testovaných supernatantů z intenzivně provzdušňovaných kultur o C/N poměru 13 (zleva): *C. macerans*, *R. mucilaginosa*, *S. pararoseus*

6 ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce bylo studium produkce extracelulárních enzymů a dalších extracelulárních metabolitů karotenogenních kvasinek *Rhodotorula glutinis*, *Cystofilobasidium macerans*, *Rhodotorula mucilaginosa* a *Sporidiobolus pararoseus*. kultivovaných na odpadním živočišném tuku. K lepšímu porozumění produkce lipolytických enzymů, byla sledována indukce lipáz i v průběhu růstu buněk. Dále byla provedena molekulární charakterizace extracelulárních lipolytických enzymů těchto kvasinkových kmenů. V této práci byla pozorována také souvislost mezi produkcí extracelulárních a intracelulárních metabolitů, jako jsou lipidy, karotenoidy, ergosterol a ubiquinon.

V rámci stanovení lipolytické aktivity byla provedena optimalizace reakčního prostředí. Reakce enzymu s p-nitrofenylpatmitátem byla pozorována ve třech pufrch: 0,1M Tris HCl pufr o pH = 7,2; 0,1M Tris HCl pufr o pH = 8,4 a 0,1M fosfátový pufr o pH = 7,2. Nejlepší výsledky lipázových aktivit byly pozorovány u pufru 0,1M Tris HCl pufr o pH = 7,2. Aktivity lipolytických enzymů byly stanoveny pomocí spektrofotometru ELISA Reader.

V experimentální části byla pozorována produkce lipolytických enzymů studovaných kmenů v kultivacích s různými poměry uhlíku a dusíku: 13; 25; 50; 100. Kultivace byly provedeny nejen na odpadním živočišném tuku, ale i na glukóze a glycerolu. Dále byl sledován vliv přídavku emulgátoru TWEEN 80 na indukci lipáz. Z výsledků produkce lipolytických enzymů nelze souhrnně určit optimální C/N poměr kultivace. U kvasinky *R. glutinis* byla nejvyšší lipázová aktivita naměřena u kultivací s C/N poměrem 13. Lipázová aktivita byla u kvasinek *C. macerans* a *R. mucilaginosa* vyšší u kultivací při C/N poměrech 25 a 50. Kvasinka *S. pararoseus* vykazovala nejvyšší aktivitu u kultivací o C/N poměrech 50 a 100. U všech kmenů byla dále pozorována lipolytická aktivita u kultivací na glukóze a glycerolu. Naopak u většiny tukových kultivací s přídavkem emulgátoru k naměření lipázové aktivity nedošlo. Použitý emulgátor TWEEN 80 zřejmě snižoval účinek lipázové reakce.

Ke zvýšení lipolytické aktivity byla provedena série kultivací studovaných kvasinkových kmenů v médiích s odpadním živočišným tukem o C/N poměru 50, s přídavkem emulgátorů: TWEEN 80, Triton X-100 a vápenatých iontů jako lipázových induktorů. Před samotnou kultivací byla všechna média nejdříve mechanicky emulgována. Lipázové aktivity byly naměřeny ve všech médiích. Je tedy pravděpodobné, že samotný krok mechanické emulgace měl pozitivní účinek. Vyšší lipázové aktivity byly pozorovány u kvasinek *R. glutinis* a *C. macerans*, zvláště v médiích s přídavkem emulgátoru Triton X-100 a s vápenatými ionty.

K detailnějšímu prozkoumání produkce lipáz byla aktivita těchto enzymů sledována i v průběhu buněčného růstu. Pro kultivace studovaných kmenů karotenogenních kvasinek byl zvolen C/N poměr 13. Aktivita lipolytických enzymů byla naměřena v tukovém, glukózovém a glycerolovém médiu. V tukovém médiu s přidavkem emulgátoru TWEEN 80 enzymová aktivita naměřená nebyla. V průběhu buněčného růstu se zpravidla objevovalo několik vrcholů naměřených lipázových aktivit. Tento výsledek naznačuje přítomnost lipázy asociované s buňkou a lipázy vylučované do prostředí.

K detailnějšímu prozkoumání produkce obou forem lipáz byla provedena velkoobjemová kultivace s intenzivním provzdušňováním s CN poměrem 13. Lipolytická aktivita asociovaného enzymu a enzymu vylučovaného do prostředí byla naměřena u všech studovaných kmenů. Nejvyšší aktivity obou forem byly pozorovány u kvasinky *S. pararoseus*.

Molekulární charakterizace lipolytických enzymů byla stanovena pomocí metody PAGE-SDS. Z výsledků této metody lze usoudit, že velikost lipáz studovaných kvasinkových kmenů se pohybuje v rozmezí 20–40 kDa.

Z hlediska zastoupení intracelulárních lipidů se jeví jako nejlepší producent kvasinka *S. pararoseus*. Nejvyšší hodnoty celkových karotenoidů a lipidických látek byly naměřeny u kvasinek *R. mucilaginosa* a *S. pararoseus*.

V této práci byla také sledována produkce extracelulárních biosurfaktantů. Pro základní screening byly zvoleny tři metody: metoda rozšiřování olejové skvrny, stanovení emulgační aktivity a solubilizace krystalického anthracenu. Z výsledků metody rozšiřování oleje můžeme usoudit produkci určitého množství biosurfaktantů u všech studovaných kvasinkových kmenů. Metody stanovení aktivní emulze a solubilizace krystalického anthracenu byly provedeny u kultivací s různými poměry uhlíku a dusíku: 13; 25; 50; 100. Testovány byly kultivace s glukózou, glycerolem a s odpadním živočišným tukem. Z výsledků těchto metod nelze souhrnně určit optimální C/N poměr kultivace pro produkci extracelulárních biosurfaktantů. Vyšší hodnoty emulgačního indexu I_{24} byly převážně pozorovány u kultivací s C/N poměrem 13 v glukózových médiích. U kultivací s C/N poměrem 50 a 100 byly emulgační indexy vysoké z velké části v tukových a glycerolových médiích. Nejvyšší emulgační indexy byly pozorovány u kvasinek *C. macerans* a *S. pararoseus* v glycerolovém médiu s C/N poměrem 50. U solubilizace krystalického anthracenu byly nejvyšší absorbance naměřeny v médiích s C/N poměrem 13, zejména u kvasinky *C. macerans* a *S. pararoseus*. Nižší hodnoty absorbancí byly naměřeny v médiích s CN poměrem 50 a 100.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 DAVOLI, Paolo, Victor MIERAU a Roland WEBER. Carotenoids and Fatty Acids in Red Yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemistry and Microbiology* [online]. 2004, 40(4), 392-397 [cit. 2018-12-16]. DOI: 10.1023/B:ABIM.0000033917.57177.f2. ISSN 0003-6838. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/B:ABIM.0000033917.57177.f2>
- 2 BUZZINI, Pietro, Marta GORETTI, Eva BRANDA a Benedetta TURCHETTI. Basidiomycetous Yeasts for Production of Carotenoids. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology* [online]. Hoboken (USA), 2009, 2009-12-15 [cit. 2018-12-16]. DOI: 10.1002/9780470054581.eib065. ISBN 9780471799306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470054581.eib065>
- 3 KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov. Bratislava: Alfa, 1990, 699 s. Edícia potravinárskej literatúry (Alfa). ISBN 80-05-00644-6.
- 4 MANNAZZU, Ilaria, Sara LANDOLFO, Teresa Lopes DA SILVA a Pietro BUZZINI. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2015, 31(11), 1665-1673 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1007/s11274-015-1927-x. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-015-1927-x>
- 5 HERNÁNDEZ-ALMANZA, Ayerim, Julio CESAR MONTANEZ, Miguel AGUILAR-GONZÁLEZ, Cristian MARTÍNEZ-ÁVILA, Raúl RODRÍGUEZ-HERRERA a Cristóbal AGUILAR. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience* [online]. 2014, 5, 64-72 [cit. 2018-12-16]. DOI: 10.1016/j.fbio.2013.11.007. ISSN 22124292. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212429213000849>
- 6 ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- 7 VALERIO, Elisabete, Mário GADANHO a Jose Paulo SAMPAIO. Reappraisal of the *Sporobolomyces roseus* species complex and description of *Sporidiobolus metaroseus* sp. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. 2008, 58(3), 736-741 [cit. 2018-12-17]. DOI: 10.1099/ijs.0.65580-0. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.65580-0>
- 8 SAMPAIO, Jose Paulo, Mário GADANHO a Robert BAUER. Taxonomic studies on the genus *Cystofilobasidium*: description of *Cystofilobasidium ferigula* sp. nov. and clarification of the status of *Cystofilobasidium lari-marini*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2001, 51(1), 221-229 [cit. 2018-12-18]. DOI: 10.1099/00207713-51-1-221. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-51-1-221>

- 9 FELL, Jack, Henri ROEIJMANS a Teun BOEKHOUT. Cystofilobasidiales, a new order of basidiomycetous yeasts. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. 1999, 49(2), 907-913 [cit. 2018-12-18]. DOI: 10.1099/00207713-49-2-907. ISSN 0020-7713. Dostupné z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-49-2-907>
- 10 BUZZINI, Pietro, Marc Andre LACHANCE a Andrey YURKOV, ed. *Yeasts in natural ecosystems: ecology*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2017. ISBN 978-331-9615-745.
- 11 NIGAM, Poonam. *Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications*. *Biomolecules* [online]. 2013, 3(4), 597-611 [cit. 2018-11-16]. DOI: 10.3390/biom3030597. ISSN 2218-273X. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2218-273X/3/3/597>
- 12 ANBU, Periasamy, Subash C. B. GOPINATH, Bidur Prasad CHAULAGAIN a Thangavel LAKSHMIPRIYA. *Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine 2016*. *BioMed Research International* [online]. 2017, 2017, 1-3 [cit. 2018-11-16]. DOI: 10.1155/2017/2195808. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/2195808/>
- 13 SINGH, Rajendra, Manoj KUMAR, Anshumali MITTAL a Praveen Kumar MEHTA. *Microbial enzymes: industrial progress in 21st century*. *3 Biotech* [online]. 2016, 6(2) [cit. 2018-11-16]. DOI: 10.1007/s13205-016-0485-8. ISSN 2190-572X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-016-0485-8>
- 14 RAMNATH, Lucretia, Bruce SITHOLE a Roshini GOVINDEN. *Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry*. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. 2017, 63(3), 179-192 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1139/cjm-2016-0447. ISSN 0008-4166. Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/cjm-2016-0447>
- 15 VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2., opr. vyd. Praha: Academia, c1996, 508 s. ISBN 978-80-200-0600-4.
- 16 LOPES, Danielle Branta, Laira Priscila FRAGA, Luciana Francisco FLEURI a Gabriela Alves MACEDO. *Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately?*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* [online]. 2011, 31(3), 603-613 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1590/S0101-20612011000300009. ISSN 0101-2061. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612011000300009
- 17 BORNSCHEUER, Uwe. *Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis*. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2002, 26(1), 73-81 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00599.x. ISSN 1574-6976. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00599.x>

- 18 GILHAM, Dean a Richard LEHNER. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*. 2005, 36(2), 139-147. DOI: 10.1016/j.ymeth.2004.11.003. ISBN 10.1016/j.ymeth.2004.11.003. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202305000447>
- 19 NAJJAR, Amal, Sylvie ROBERT, Clémence GUÉRIN, Michèle VIOLET-ASTHER a Frédéric CARRIÈRE. Quantitative study of lipase secretion, extracellular lipolysis, and lipid storage in the yeast *Yarrowia lipolytica* grown in the presence of olive oil: analogies with lipolysis in humans. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2011, 89(6), 1947-1962 [cit. 2018-11-10]. DOI: 10.1007/s00253-010-2993-5. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-010-2993-5>
- 20 ANDUALEMA, Berhanu a Amare GESSESSE. Microbial Lipases and Their Industrial Applications: Review. *Biotechnology*[online]. 2012, 11(3), 100-118 [cit. 2018-11-12]. DOI: 10.3923/biotech.2012.100.118. ISSN 1682296X. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=biotech.2012.100.118>
- 21 VAKHLU, Jyoti a Avneet KOUR. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 2006, 9(1), 69-85 [cit. 2018-11-10]. DOI: 10.2225/vol9-issue1-fulltext-9. ISSN 07173458. Dostupné z: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue1/full/9/index.html>
- 22 PRIJI, Prakasan, et al. MICROBIAL LIPASES - PROPERTIES AND APPLICATIONS. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* [online]. 2016, 6(2), 799-807 [cit. 2019-02-27]. DOI: 10.15414/jmbfs.2016.6.2.799-807. ISSN 13385178. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/311107937_Microbial_Lipases-Properties_and_Applications
- 23 VERACHTERT, Hubert a René de MOT. *Yeast: biotechnology and biocatalysis*. New York: M. Dekker, c1990, 536 s. ISBN 978-082-4781-422.
- 24 HATZINIKOLAOU, Dimitris, Ekaterini KOURENTZI, Haralambos STAMATIS, Paul CHRISTAKOPOULOS, Fragiskos N. KOLISIS, Dimitris KEKOS a Basil J. MACRIS. A novel lipolytic activity of *Rhodotorula glutinis* cells: Production, partial characterization and application in the synthesis of esters. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 1999, 88(1), 53-56 [cit. 2019-02-17]. DOI: 10.1016/S1389-1723(99)80175-3. ISSN 13891723. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172399801753>
- 25 PAPAPARASKEVAS, Dimitris, Paul CHRISTAKOPOULOS, Dimitris KEKOS a Basil MACRIS. Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnology Letters* [online]. 1992, 14(5), 397-402 [cit. 2019-02-17]. DOI: 10.1007/BF01021254. ISSN 0141-5492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01021254>

- 26 CSUTAK, Ortansa, Viorica CORBU, Ileana STOICA a Tatiana VASSU. Fatty Acids Effect on Lipase and Biosurfactant Induction in *Rhodotorula Glutinis* CMGB-RG5. *Agriculture for Life, Life for Agriculture: Conference Proceedings* [online]. 2018, 1(1), 515-522 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.2478/alife-2018-0081. ISSN 2601-6222. Dostupné z: <http://content.sciendo.com/view/journals/alife/1/1/article-p515.xml>
- 27 HERTADI, Rukman a Henny WIDHYASTUTI. Effect of Ca²⁺ Ion to the Activity and Stability of Lipase Isolated from *Chromohalobacter japonicus* BK-AB18. *Procedia Chemistry* [online]. 2015, 16, 306-313 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.1016/j.proche.2015.12.057. ISSN 18766196. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876619615002053>
- 28 RIOS, Nathalia Saraiva, Bruna Bandeira PINHEIRO, Máisa Pessoa PINHEIRO, Rayanne Mendes BEZERRA, José Cleiton Sousa DOS SANTOS a Luciana Rocha BARROS GONÇALVES. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. *Process Biochemistry* [online]. 2018, 75, 99-120 [cit. 2019-02-09]. DOI: 10.1016/j.procbio.2018.09.003. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135951131831081X>
- 29 TASKIN, Mesut, Muhammed Hanifi UCAR, Yagmur UNVER, Ayse Aydan KARA, Mustafa OZDEMIR a Serkan ORTUCU. Lipase production with free and immobilized cells of cold-adapted yeast *Rhodotorula glutinis* HL25. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* [online]. 2016, 8, 97-103 [cit. 2019-02-13]. DOI: 10.1016/j.bcab.2016.08.009. ISSN 18788181. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878818116301748>
- 30 STOYTCHEVA, Margarita, Gisela MONTERO, Roumen ZLATEV, Jose LEON a Velizar GOCHEV. Analytical Methods for Lipases Activity Determination: A Review. *Current Analytical Chemistry* [online]. 2012, 8(3), 400-407 [cit. 2019-02-17]. DOI: 10.2174/157341112801264879. ISSN 15734110. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Margarita_Stoytcheva/publication/258222492_Analytical_methods_for_lipases_activity_determination_A_review/links/00b7d529f68a075c28000000/Analytical-methods-for-lipases-activity-determination-A-review.pdf
- 31 AMINI, Zeynab, Zul ILHAM, Hwai Chyuan ONG, Hoorah MAZAHARI a Wei-Hsin CHEN. State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. *Energy Conversion and Management* [online]. 2017, 141, 339-353 [cit. 2019-02-10]. DOI: 10.1016/j.enconman.2016.09.049. ISSN 01968904. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196890416308391>
- 32 BORNSCHEUER, Uwe a Romas KAZLAUSKAS. *Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, c2006, 368 s. ISBN 978-352-7310-296.
- 33 JEGANNATHAN, Kenthorai Raman, Sariah ABANG, Denis PONCELET, Eng Seng CHAN a Pogaku RAVINDRA. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase—A Critical Review. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2008, 28(4), 253-264 [cit. 2018-11-10]. DOI: 10.1080/07388550802428392. ISSN 0738-8551. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388550802428392>

- 34 ATHENAKI, Maria, Cristina GARDELI, Panagiota DIAMANTOPOULOU, Sidoine Sadjeu TCHAKOUTEU, Dimitris SARRIS, Antonios PHILIPPOUSSIS a Seraphim PAPANIKOLAOU. Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. *Journal of Applied Microbiology*[online]. 2018, 124(2), 336-367 [cit. 2018-11-21]. DOI: 10.1111/jam.13633. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.13633>
- 35 SCHNEIDER, Teresa, Simone GRAEFF-HÖNNINGER, Todd FRENCH, Rafael HERNANDEZ, Nicolaus MERKT, Wilhelm CLAUPEIN a Mary HETRICK. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. *Energy*[online]. 2013, 61, 34-43 [cit. 2018-11-21]. DOI: 10.1016/j.energy.2012.12.026. ISSN 03605442. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S036054421200953X>
- 36 KAMAL, Ibtisam. YEASTS AND LIPIDS PRODUCTION [online]. march 2012 [cit. 2018-11-22]. DOI: 10.13140/2.1.4614.7366. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/271829914_YEASTS_AND_LIPIDS_PRODUCTION
- 37 VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002, 344 s. ISBN 80-866-5900-3.
- 38 MURRAY, Robert K, Daryl K GRANNER, Peter A MAYES a Victor W RODWELL. *Harperova Biochemie*. 4. Jinočany: Nakladatelství H+H, 2002, 872 s. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- 39 AGEITOS, Jose Manuel, Juan Andres VALLEJO, Patricia VEIGA-CRESPO a Tomas G. VILLA. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2011, 90(4), 1219-1227 [cit. 2019-03-09]. DOI: 10.1007/s00253-011-3200-z. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-011-3200-z>
- 40 KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. Bratislava: Alfa, 1982, 488 s. Edícia potravinárskej literatúry (Alfa).
- 41 MATA-GÓMEZ, Luis, Julio MONTAÑEZ, Alejandro MÉNDEZ-ZAVALA a Cristóbal AGUILAR. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories* [online]. 2014, 13(1) [cit. 2018-12-31]. DOI: 10.1186/1475-2859-13-12. ISSN 1475-2859. Dostupné z: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-13-12>
- 42 CVETKOVIC, Dragan, ed. *Carotenoids* [online]. London: InTechOpen, c2017 [cit. 2019-01-01]. ISBN 978-953-51-3212-7. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/carotenoids>

- 43 RIBEIRO, Daniela, Marisa FREITAS, Artur M.S. SILVA, Félix CARVALHO a Eduarda FERNANDES. Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2018, 120, 681-699 [cit. 2018-12-31]. DOI: 10.1016/j.fct.2018.07.060. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691518305052>
- 44 HUANG, Jim Junhui, Shaoling LIN, Wenwen XU a Peter Chi Keung CHEUNG. Occurrence and biosynthesis of carotenoids in phytoplankton. *Biotechnology Advances* [online]. 2017, 35(5), 597-618 [cit. 2018-12-31]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.05.001. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975017300538>
- 45 PAZNOCHT, Luboš, Zora KOTÍKOVÁ, Matyáš ORSÁK, Jaromír LACHMAN a Petr MARTINEK. Carotenoid changes of colored-grain wheat flours during bun-making. *Food Chemistry* [online]. 2019, 277, 725-734 [cit. 2019-01-16]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.11.019. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618319460>
- 46 HEMPEL, Judith, Christopher SCHÄDLE, Sebastian LEPTIHN, Reinhold CARLE a Ralf SCHWEIGGERT. Structure related aggregation behavior of carotenoids and carotenoid esters. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*[online]. 2016, 317, 161-174 [cit. 2018-12-31]. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2015.10.024. ISSN 10106030. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1010603015301544>
- 47 MADHOUR, Abderrahim, Heidrun ANKE, Adele MUCCI, Paolo DAVOLI a Roland WEBER. Biosynthesis of the xanthophyll plectanixanthin as a stress response in the red yeast *Dioszegia* (Tremellales, Heterobasidiomycetes, Fungi). *Phytochemistry* [online]. 2005, 66(22), 2617-2626 [cit. 2019-01-16]. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.09.010. ISSN 00319422. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942205004577>
- 48 MOISE, Alexander, Salim AL-BABILI a Eleanore WURTZEL. Mechanistic Aspects of Carotenoid Biosynthesis. *Chemical Reviews* [online]. 2013, 114(1), 164-193 [cit. 2019-01-16]. DOI: 10.1021/cr400106y. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr400106y>
- 49 KOT, Anna, Stanisław BŁAŻEJAK, Agnieszka KURCZ, Iwona GIENKA a Marek KIELISZEK. *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2016, 100(14), 6103-6117 [cit. 2019-01-16]. DOI: 10.1007/s00253-016-7611-8. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7611-8>

- 50 KOZAJDA, Anna, Karolina JEŽAK, Małgorzata SOWIAK, Beata GUTAROWSKA a Irena SZADKOWSKA-STANČZYK. Assessment of exposure to fungi in the heavily contaminated work environment (a solid waste sorting plant) based on the ergosterol analysis. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* [online]. 2015, 28(5), 813-821 [cit. 2019-03-09]. DOI: 10.13075/ijomeh.1896.00455. ISSN 1232-1087. Dostupné z: <http://www.journalssystem.com/ijomeh/ASSESSMENT-OF-EXPOSURE-TO-FUNGI-IN-THE-HEAVILY-CONTAMINATED-WORK-ENVIRONMENT-WASTE-SORTING-PLANT-BASED-ON-ERGOSTEROL-ANALYSIS-.58541,0,2.html>
- 51 VILLARES, Ana, Laura MATEO-VIVARACHO, Ana GARCÍA-LAFUENTE a Eva GUILLAMÓN. Storage temperature and UV-irradiation influence on the ergosterol content in edible mushrooms. *Food Chemistry* [online]. 2014, 147, 252-256 [cit. 2019-03-09]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.09.144. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461301409X>
- 52 GONZÁLEZ-MARISCAL, Isabel, et al. Regulation of coenzyme Q biosynthesis in yeast: A new complex in the block. *IUBMB Life*[online]. 2014, 66(2), 63-70 [cit. 2019-03-09]. DOI: 10.1002/iub.1243. ISSN 15216543. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/iub.1243>
- 53 CHOI, Jin-Ho, Yeon-Woo RYU a Jin-Ho SEO. Biotechnological production and applications of coenzyme Q10. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2005, 68(1), 9-15 [cit. 2019-03-09]. DOI: 10.1007/s00253-005-1946-x. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-005-1946-x>
- 54 Biosurfactants from Yeasts: Characteristics, Production and Application. SEN, Ramkrishna, et al. *Biosurfactants* [online]. New York: Springer, c2010, s. 236-249 [cit. 2018-10-27]. *Advances in experimental medicine and biology*, v. 672. ISBN 978-1-4419-5979-9. Dostupné z: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4419-5979-9#about>
- 55 CAMPOS, Jenyffer Medeiros, Tânia Lúcia MONTENEGRO STAMFORD, Leonie Asfora SARUBBO, Juliana Moura DE LUNA, Raquel Diniz RUFINO a Ibrahim M. BANAT. Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology Progress* [online]. 2013, 29(5), 1097-1108 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.1002/btpr.1796. ISSN 87567938. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.1796>
- 56 BOGNOLO, Giulio. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 1999, 152(1-2), 41-52 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.1016/S0927-7757(98)00684-0. ISSN 09277757. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775798006840>
- 57 KATEMAI, Wichuda. Biosurfactants from Yeasts. *Walailak Journal of Science and Technology* [online]. 2012, 9(1), 8 [cit. 2018-10-27]. DOI: 10.2004/wjst.v9i1.24. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/307652877_Biosurfactants_from_Yeasts

- 58 SHEKHAR, Sudhanshu, Arumugam SUNDARAMANICKAM a Tangavel BALASUBRAMANIAN. Biosurfactant Producing Microbes and their Potential Applications: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* [online]. 2014, 45(14), 1522-1554 [cit. 2018-10-28]. DOI: 10.1080/10643389.2014.955631. ISSN 1064-3389. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10643389.2014.955631>
- 59 MARCHANT, Roger a Ibrahim BANAT. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in Biotechnology* [online]. 2012, 30(11), 558-565 [cit. 2018-10-30]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.07.003. ISSN 01677799. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779912001138>
- 60 GARAY, Luis, Irnayuli SITEPU, Tomas CAJKA, et al. Discovery of synthesis and secretion of polyol esters of fatty acids by four basidiomycetous yeast species in the order Sporidiobolales. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2017, 44(6), 923-936 [cit. 2018-10-29]. DOI: 10.1007/s10295-017-1919-y. ISSN 1367-5435. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-017-1919-y>
- 61 GARAY, Luis, Irnayuli SITEPU, Tomas CAJKA, et al. Extracellular fungal polyol lipids: A new class of potential high value lipids. *Biotechnology Advances* [online]. 2018, 36(2), 397-414 [cit. 2018-10-27]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.01.003. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073497501830003X>
- 62 CAJKA, Tomas, Luis GARAY, Irnayuli SITEPU, Kyria BOUNDY-MILLS a Oliver FIEHN. Multiplatform Mass Spectrometry-Based Approach Identifies Extracellular Glycolipids of the Yeast *Rhodotorula babjevae* UCDFST 04-877. *Journal of Natural Products* [online]. 2016, 79(10), 2580-2589 [cit. 2018-11-02]. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00497. ISSN 0163-3864. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.6b00497>
- 63 ROUESSAC, Francis a Annick ROUESSAC. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. 2nd ed. Chichester: Wiley, 2007, 574 s. ISBN 978-0-470-85903-2.
- 64 KRAUSE, I. ELECTROPHORESIS. CABALLERO, Benjamin. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* [online]. 2nd. Amsterdam: Elsevier Science, c2003, s. 2055-2062 [cit. 2019-01-29]. ISBN 978-0-12-227055-0. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B012227055X014097?via%3Dihub>
- 65 MAGDELDIN, Sameh, ed. *Gel Electrophoresis – Principles and Basics* [online]. Croatia: InTech, c2012, 366 s. [cit. 2019-01-29]. ISBN 978-953-51-0458-2. Dostupné z: <http://library.umac.mo/ebooks/b28050459.pdf>
- 66 COSKUN, Ozlem. Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. *Northern Clinics of Istanbul* [online]. 2016, 3(2), 156-160 [cit. 2019-01-25]. DOI: 10.14744/nci.2016.32757. ISSN 21484902. Dostupné z: https://www.journalagent.com/nci/pdfs/NCI_3_2_156_160.pdf

- 67 SKOOG, Douglas A. Principles of instrumental analysis. 4th ed. Fort Worth: Harcourt Brace College Publishers, c1992, 700 s. ISBN 00-307-5398-8.
- 68 VARZAKAS, Theodoros a Sotirios KIOKIAS. HPLC Analysis and Determination of Carotenoid Pigments in Commercially Available Plant Extracts. Current Research in Nutrition and Food Science Journal [online]. 2016, 4(1), 01-14 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.12944/CRNFSJ.4.Special-Issue1.01. ISSN 2347467X. Dostupné z: <http://www.foodandnutritionjournal.org/vol4nospl-issue-carotenoids-2016/hplc-analysis-and-determination-of-carotenoid-pigments-in-commercially-available-plant-extracts/>
- 69 WANG, Jun, Weiwei WU, Xudong WANG, Min WANG a Fuan WU. An effective GC method for the determination of the fatty acid composition in silkworm pupae oil using a two-step methylation process. Journal of the Serbian Chemical Society [online]. 2015, 80(1), 9-20 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.2298/JSC140401073W. ISSN 0352-5139. Dostupné z: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0352-51391400073W>
- 70 MC/NAIR, Harold Monroe a James M. MILLER. Basic gas chromatography. 2nd ed. Hoboken, N.J.: John Wiley, 2009. ISBN 978-0-470-43954-8.
- 71 JIRU, Tamene Milkessa, Marizeth GROENEWALD, Carolina POHL, Laurinda STEYN, Nicholas KIGGUNDU a Dawit ABATE. Optimization of cultivation conditions for biotechnological production of lipid by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn, *Rhodospiridium kratochvilovae*) SY89 for biodiesel preparation. 3 Biotech [online]. 2017, 7(2) [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.1007/s13205-017-0769-7. ISSN 2190-572X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-017-0769-7>
- 72 DELORME, Vincent, Rabeb DHOUIB, Stéphane CANAAN, Frédéric FOTIADU, Frédéric CARRIÈRE a Jean-François CAVALIER. Effects of Surfactants on Lipase Structure, Activity, and Inhibition. Pharmaceutical Research [online]. 2011, 28(8), 1831-1842 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1007/s11095-010-0362-9. ISSN 0724-8741. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-010-0362-9>
- 73 AKSU, Zümriye. a Ayse Tuğba EREN. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. Process Biochemistry [online]. 2005, 40(9), 2985-2991 [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.1016/j.procbio.2005.01.011. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511305001157>
- 74 FRACCHIA, Letizia, Massimo CAVALLO, Maria GIOVANNA a Ibrahim M. Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications – Present Status and Future Potentials. Biomedical Science, Engineering and Technology [online]. InTech, 2012, 2012-01-20, , 326-370 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.5772/23821. ISBN 978-953-307-471-9. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/biomedical-science-engineering-and-technology/biosurfactants-and-bioemulsifiers-biomedical-and-related-applications-present-status-and-future-pote>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ATP	adenosintrifosfát
BIS	N,N'-methylenbisakrylamid
CMC	kritická micelární koncentrace
CoA	koenzym A
CoQ	koenzym Q
DMAPP	dimethylalyldifosfát
FID	plamenový ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
GC/FID	plynová chromatografie s plamenovou ionizační detekcí
GGPP	geranyl-geranyldifosfát
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HPLC	vysoko-účinná kapalinová chromatografie
HPLC/PDA	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem fotodiodového pole
IPP	isopentenyldifosfát
LDL	nízkohustotní lipoproteiny
MVA	mevalonová kyselina
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PAGE	elektroforéza v polyakrylaamidovém gelu
PAGE-SDS	elektroforéza v polyakrylaamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným
PEFA	polyolové estery mastných kyselin
PDA	detektor diodového pole
PLOT	kolony s vrstvou pevného sorbentu na vnitřním povrchu kapiláry
SCOT	kolony s nosičem pro zakotvení kapalné stacionární fáze
SDS	dodecylsulfát sodný
TEMED	N,N'-tetramethylendiamin
UV	ultrafialové záření
WCOT	kolony s kapalnou stacionární fází

9 SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1 Výsledky lipázových aktivit u optimalizace prostředí (C/N poměr 13 a 25)
- Příloha 2 Výsledky lipázových aktivit u optimalizace prostředí (C/N poměr 50 a 100)
- Příloha 3 Ukázka produkčního média základní kultivace (C/N poměr 13) kvasinky *C. macerans*
- Příloha 4 Ukázka produkčního média základní kultivace (C/N poměr 25) kvasinky *R. mucilaginosa*
- Příloha 5 Ukázka produkčního média základní kultivace (C/N poměr 50) kvasinky *C. macerans*
- Příloha 6 Ukázka produkčního média základní kultivace (C/N poměr 100) kvasinky *S. pararoseus*
- Příloha 7 Ukázka mechanicky emulgovaného produkčního média (C/N poměr 50) kvasinky *R. glutinis*
- Příloha 8 Ukázka velkoobjemové kultivace kvasinky *R. glutinis* v 96. hodině
- Příloha 9 Ukázka velkoobjemové kultivace kvasinky *C. macerans* v 96. hodině
- Příloha 10 Ukázka velkoobjemové kultivace kvasinky *R. mucilaginosa* v 96. hodině
- Příloha 10 Ukázka velkoobjemové kultivace kvasinky *S. pararoseus* v 96. hodině
- Příloha 12 Ukázka intenzivně provzdušňovacích kultivací (C/N poměr 13)

10 PŘÍLOHY

Příloha 1: Výsledky lipázových aktivit (U/ml) u optimalizace prostředí (C/N poměr 13 a 25)

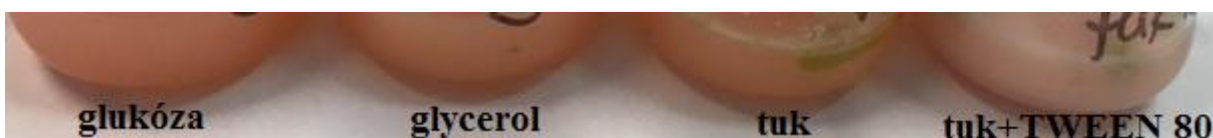
CN 13				
kmen	médium	fosf. pufr pH 7,2	Tris-HCl pufr pH 7,2	Tris HCl pufr pH 8,4
<i>R. glutinis</i>	glukóza	$1,69 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$1,76 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$1,21 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$
	glycerol	$1,75 \pm 0,17 \cdot 10^{-3}$	$1,99 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$1,31 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$
	tuk	$9,58 \pm 0,21 \cdot 10^{-3}$	$11,34 \pm 0,39 \cdot 10^{-3}$	$1,88 \pm 0,21 \cdot 10^{-3}$
	tuk+TWEEN 80	—	—	—
<i>C. macerans</i>	glukóza	$1,76 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$	$2,03 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$	$1,33 \pm 0,20 \cdot 10^{-3}$
	glycerol	$1,83 \pm 0,17 \cdot 10^{-3}$	$1,99 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$	$1,39 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$
	tuk	—	—	$1,16 \pm 0,24 \cdot 10^{-3}$
	tuk+TWEEN 80	—	—	—
<i>R. mucilaginosa</i>	glukóza	$1,89 \pm 0,20 \cdot 10^{-3}$	—	$1,30 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$
	glycerol	$1,73 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$	$2,01 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$1,34 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$
	tuk	$1,73 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$2,09 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$	$1,38 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$
	tuk+TWEEN 80	—	—	$1,33 \pm 0,48 \cdot 10^{-3}$
<i>S. pararoseus</i>	glukóza	$1,92 \pm 0,20 \cdot 10^{-3}$	$2,01 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$1,38 \pm 0,21 \cdot 10^{-3}$
	glycerol	$2,13 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$3,01 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$	$1,73 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$
	tuk	$4,09 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$	$5,49 \pm 0,23 \cdot 10^{-3}$	$1,42 \pm 0,22 \cdot 10^{-3}$
	tuk+TWEEN 80	$6,69 \pm 0,21 \cdot 10^{-3}$	$4,99 \pm 0,24 \cdot 10^{-3}$	$1,12 \pm 0,20 \cdot 10^{-3}$
CN 25				
kmen	medium	fos. pufr pH 7,2	Tris-HCl pufr pH 7,2	Tris HCl pufr pH 8,4
<i>R. glutinis</i>	glukóza	$1,75 \pm 0,17 \cdot 10^{-3}$	$1,81 \pm 0,17 \cdot 10^{-3}$	$1,42 \pm 0,52 \cdot 10^{-3}$
	glycerol	$1,72 \pm 0,17 \cdot 10^{-3}$	$1,94 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$1,50 \pm 0,44 \cdot 10^{-3}$
	tuk	$3,16 \pm 0,25 \cdot 10^{-3}$	$4,20 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$	$2,40 \pm 0,58 \cdot 10^{-3}$
	tuk+TWEEN 80	$2,54 \pm 0,31 \cdot 10^{-3}$	—	—
<i>C. macerans</i>	glukóza	—	$1,87 \pm 0,24 \cdot 10^{-3}$	$1,50 \pm 0,89 \cdot 10^{-3}$
	glycerol	$1,81 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$2,14 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$1,94 \pm 0,94 \cdot 10^{-3}$
	tuk	$7,82 \pm 0,22 \cdot 10^{-3}$	$9,72 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$3,26 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$
	tuk+TWEEN 80	$3,27 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$	$5,97 \pm 1,17 \cdot 10^{-3}$	$4,66 \pm 0,34 \cdot 10^{-3}$
<i>R. mucilaginosa</i>	glukóza	$1,75 \pm 0,17 \cdot 10^{-3}$	$2,10 \pm 0,78 \cdot 10^{-3}$	$1,90 \pm 0,25 \cdot 10^{-3}$
	glycerol	$1,78 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$2,16 \pm 0,16 \cdot 10^{-3}$	$1,98 \pm 0,39 \cdot 10^{-3}$
	tuk	$4,46 \pm 0,22 \cdot 10^{-3}$	$3,41 \pm 0,59 \cdot 10^{-3}$	$2,54 \pm 6,47 \cdot 10^{-3}$
	tuk+TWEEN 80	—	—	$1,46 \pm 3,47 \cdot 10^{-3}$
<i>S. pararoseus</i>	glukóza	$1,97 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$2,22 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$2,78 \pm 0,33 \cdot 10^{-3}$
	glycerol	$1,86 \pm 0,17 \cdot 10^{-3}$	$2,25 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$2,38 \pm 0,28 \cdot 10^{-3}$
	tuk	—	—	—
	tuk+TWEEN 80	—	—	—

Příloha 2: Výsledky lipázových aktivit (U/ml) u optimalizace prostředí (C/N poměr 50 a 100)

CN 50				
kmen	medium	fosf. pufr pH 7,2	Tris-HCl pufr pH 7,2	Tris HCl pufr pH 8,4
<i>R. glutinis</i>	glukóza	—	—	$1,58 \pm 0,23 \cdot 10^{-3}$
	glycerol	—	$1,85 \pm 0,80 \cdot 10^{-3}$	$1,71 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$
	tuk	$4,01 \pm 0,16 \cdot 10^{-3}$	$4,00 \pm 0,21 \cdot 10^{-3}$	$1,96 \pm 0,20 \cdot 10^{-3}$
	tuk+TWEEN 80	—	—	—
<i>C. macerans</i>	glukóza	$1,74 \pm 0,15 \cdot 10^{-3}$	$1,88 \pm 0,20 \cdot 10^{-3}$	$1,98 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$
	glycerol	$1,76 \pm 0,16 \cdot 10^{-3}$	$2,10 \pm 0,39 \cdot 10^{-3}$	$2,01 \pm 0,23 \cdot 10^{-3}$
	tuk	$8,31 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$	$7,42 \pm 0,80 \cdot 10^{-3}$	$7,94 \pm 0,21 \cdot 10^{-3}$
	tuk+TWEEN 80	—	—	—
<i>R. mucilaginosa</i>	glukóza	$1,61 \pm 0,15 \cdot 10^{-3}$	—	$1,73 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$
	glycerol	$1,58 \pm 0,15 \cdot 10^{-3}$	$1,90 \pm 0,20 \cdot 10^{-3}$	$1,82 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$
	tuk	$2,00 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$	$3,39 \pm 0,41 \cdot 10^{-3}$	$2,61 \pm 0,27 \cdot 10^{-3}$
	tuk+TWEEN 80	—	—	—
<i>S. pararoseus</i>	glukóza	$1,57 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$2,23 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$1,90 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$
	glycerol	$1,69 \pm 0,16 \cdot 10^{-3}$	$2,14 \pm 0,20 \cdot 10^{-3}$	$2,07 \pm 0,22 \cdot 10^{-3}$
	tuk	$5,12 \pm 0,16 \cdot 10^{-3}$	$8,91 \pm 0,98 \cdot 10^{-3}$	$1,67 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$
	tuk+TWEEN 80	$5,30 \pm 0,20 \cdot 10^{-3}$	$6,67 \pm 0,37 \cdot 10^{-3}$	$4,02 \pm 0,55 \cdot 10^{-3}$
CN 100				
kmen	medium	fosf. pufr pH 7,2	Tris-HCl pufr pH 7,2	Tris HCl pufr pH 8,4
<i>R. glutinis</i>	glukóza	—	$1,76 \pm 0,20 \cdot 10^{-3}$	$1,77 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$
	glycerol	—	$2,14 \pm 0,59 \cdot 10^{-3}$	$1,96 \pm 0,20 \cdot 10^{-3}$
	tuk	$2,64 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$	$2,95 \pm 0,28 \cdot 10^{-3}$	$2,17 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$
	tuk+TWEEN 80	—	—	—
<i>C. macerans</i>	glukóza	$1,83 \pm 0,17 \cdot 10^{-3}$	$2,31 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$2,23 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$
	glycerol	$1,90 \pm 0,17 \cdot 10^{-3}$	$2,42 \pm 0,88 \cdot 10^{-3}$	$2,36 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$
	tuk	$4,69 \pm 0,17 \cdot 10^{-3}$	$3,69 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$	$3,03 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$
	tuk+TWEEN 80	—	—	—
<i>R. mucilaginosa</i>	glukóza	—	$1,98 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$	$1,92 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$
	glycerol	$1,73 \pm 0,17 \cdot 10^{-3}$	$2,16 \pm 0,38 \cdot 10^{-3}$	$2,05 \pm 0,20 \cdot 10^{-3}$
	tuk	$2,57 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$	$2,77 \pm 0,22 \cdot 10^{-3}$	—
	tuk+TWEEN 80	—	—	—
<i>S. pararoseus</i>	glukóza	$1,84 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$2,58 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$2,23 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$
	glycerol	$2,02 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$	$2,60 \pm 0,48 \cdot 10^{-3}$	$2,42 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$
	tuk	$7,02 \pm 0,17 \cdot 10^{-3}$	$10,37 \pm 0,33 \cdot 10^{-3}$	$1,83 \pm 0,33 \cdot 10^{-3}$
	tuk+TWEEN 80	$12,84 \pm 0,30 \cdot 10^{-3}$	$7,24 \pm 0,25 \cdot 10^{-3}$	$2,91 \pm 0,43 \cdot 10^{-3}$



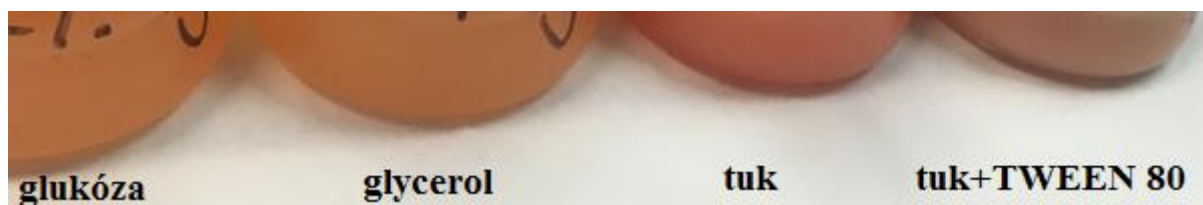
Příloha 3: Ukázka produkčního média základní kultivace (C/N poměr 13) kvasinky *C. macerans*



Příloha 4: Ukázka produkčního média základní kultivace (C/N poměr 25) kvasinky *R. mucilaginosa*



Příloha 5: Ukázka produkčního média základní kultivace (C/N poměr 50) kvasinky *C. macerans*



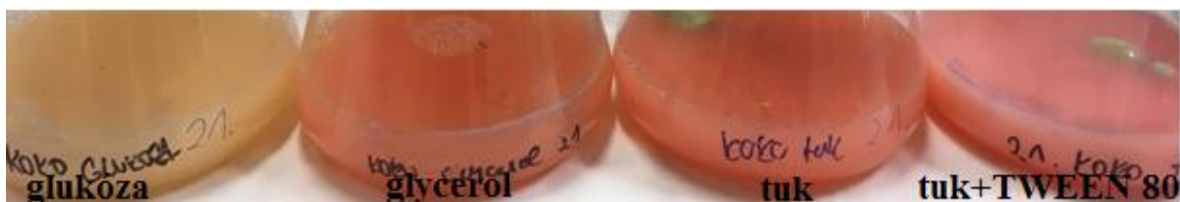
Příloha 6: Ukázka produkčního média základní kultivace (C/N poměr 100) kvasinky *S. pararoseus*



Příloha 7: Ukázka mechanicky emulgovaného produkčního média (C/N poměr 50) kvasinky *R. glutinis*



Příloha 8: Ukázka velkoobjemové kultivace kvasinky *R. glutinis* v 96. hodině



Příloha 9: Ukázka velkoobjemové kultivace kvasinky *C. macerans* v 96. hodině



Příloha 10: Ukázka velkoobjemové kultivace kvasinky *R. mucilaginosa* v 96. hodině



Příloha 11: Ukázka velkoobjemové kultivace kvasinky *S. pararoseus* v 96. hodině



Příloha 12: Ukázka intenzivně provzdušňovacích kultivací (C/N poměr 13)