



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIE AKTIVITY EXTRACELULÁRNÍCH ENZYMŮ PRODUKOVANÝCH RŮZNÝMI DRUHY KVASINEK

**THE STUDY OF EXTRACELLULAR ENZYMES PRODUCED BY DIFFERENT
SPECIES OF YEAST**

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE Bc. MARTINA VRŠANSKÁ
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE Mgr. STANISLAVA VOBĚRKOVÁ, Ph.D.
SUPERVISOR

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP 0852/2013** Akademický rok: **2013/2014**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Bc. Martina Vršanská**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)
Vedoucí práce: **Mgr. Stanislava Voběrková, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Studie aktivity extracelulárních enzymů produkovaných různými druhy kvasinek

Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité metody hodnocení
3. Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
4. Zhodnoťte získané výsledky formou diskuze

Termín odevzdání diplomové práce: **9.5.2014**

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Martina Vršanská
Student(ka)

Mgr. Stanislava Voběrková, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

Tato práce vznikla za podpory projektu BiochemNet - Vytvoření sítě pro podporu spolupráce biomedicínských pracovišť a zvýšení uplatnitelnosti absolventů biochemických oborů v praxi (registrační číslo CZ.1.07/2.4.00/31.0133). Projekt je realizován v rámci Operačního programu vzdělávání pro konkurenceschopnost, který je spolufinancovaný z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu ČR.

BiochemNet



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá studiem různých kmenů kvasinek z hlediska produkce extracelulárních lipolytických enzymů.

První část této práce spočívající ve výběru vhodných kvasinek byla vypracována v rámci studijních pobytů na Chemickém ústavu SAV, oddělení Glykomiky v Bratislavě. Z daných deseti kmenů byly vybrány tři kvasinky, a to *Pseudozyma fusiformata*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica*, které vykazovaly nejvyšší lipolytickou aktivitu a růst buněk na bazálním médiu s Tweenem 80. Tyto kmeny byly použity pro optimalizaci podmínek kultivace a charakterizaci lipolytických enzymů. Dané kvasinky byly kultivovány v médiích s odlišným zdrojem uhlíku, kde se jako nejvhodnější médium jevílo bazální médium s Tweenem, který působil jako induktor produkce lipáz. Na základě měření substrátové specifity za použití tří *p*-nitrofenylesterů mastných kyselin s různou délkou postranních řetězců se ukázalo, že se pravděpodobně jedná o lipázy, které patří mezi triacylglycerol-acyl-hydrolázy vykazující maximální aktivitu vůči ve vodě nerozpustným substrátům se středně dlouhými řetězci.

Stanovením pH optima a teplotního optima bylo zjištěno, že testované lipázy vykazovaly nejvyšší aktivitu v neutrální až mírně kyselé oblasti při teplotě kolem 30°C. Na základě měření tepelné stability bylo prokázáno, že extracelulární lipázy jsou relativně termostabilní enzymy. U lipáz byla dále stanovena skladovací stabilita, která byla měřena po dobu 5 týdnů, kdy supernatant byl uskladněn v lednici při 4°C a v mrazicím boxu při -20°C. Výsledky ukázaly, že v obou případech vykazovaly testované lipázy vysokou skladovací stabilitu, což umožňuje uchovávat vzorky po delší dobu bez ztráty aktivity.

Na závěr byly u kvasinky *Y. lipolytica* srovnány výsledky lipolytické a proteolytické aktivity, růstu buněk a pH prostředí u vsádkové kultivace v L-zkumavkách s kontinuální kultivací v bioreaktoru. Díky možnosti nastavení podmínek kontinuálního procesu, regulovat enzymatickou produkci a stabilitu enzymu bylo vyšší produkce lipáz dosaženo při kultivaci v bioreaktoru.

KLÍČOVÁ SLOVA

Pseudozyma fusiformata, *Meyerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica*, kvasinka, lipolytická aktivita

ABSTRACT

The thesis deals with the study of the different yeast strains from the point of view of extracellular lipolytic enzyme production.

First part of this work consisting of appropriate yeasts was developed within study interships in Slovak Academy of Sciences, department of Glycomics in Bratislava. From ten given strains three yeasts such as *Pseudozyma fusiformata*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica* were chosen, these strains showed the highest lipolytic activity and cell growth on basal medium with Tween 80. These yeasts were used for optimization of cultivation conditions and characterization of lipolytic enzymes. The yeasts were cultivated on media with different carbon sources, which appeared to be a most suitable medium the basal medium with Tween. Tween acted as and inducer of lipase production. The substrate specificity was determined using three *p*-nitrophenylester substrates with varying sizes of the fatty acid side chains. The results showed that tested lipases are probably triacylglycerol-acyl-hydrolases which has the highest activity towards in the water insoluble substrates with medium long chains.

The pH optimum and temperature optimum were measured. The results showed that the tested lipases had the highest activity in neutral and mild acid region around 30°C. By measuring of thermal stability has been demonstrated that extracellular lipases are relatively thermostable enzymes. Afterwards the storage stability was measured for 5 weeks when supernatant was kept in fridge at 4°C and in freezing box at -20°C. The results showed that in both cases tested lipases exhibited high storage stability which allows to store the samples without loss of activity for a longer time.

Finally, the results of lipolytic and proteolytic activity, cell growth and pH of the medium of yeast *Y. lipolytica* were compared between the batch cultivation in L-tubes with the continual cultivation in the bioreactor. The highest lipases production was achieved in bioreactor due to the setting conditions of the continual proces to regulate the production and enzymatic stability.

KEYWORDS

Pseudozyma fusiformata, *Meyerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica*, yeast, lipolytic activity

VRŠANSKÁ, M. *Studie aktivity extracelulárních enzymů produkovaných různými druhy kvasinek* Brno:

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 89 s. Vedoucí diplomové práce
Mgr. Stanislava Voběrková, Ph.D.

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

Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Stanislavě Voběrkové, Ph.D. za odborné vedení a Ing. Evě Stratilové, Ph.D. za konzultace, ochotu a cenné rady při zpracování této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc. zejména za umožnění práce a měření na Slovenské akademii věd. Mé poděkování dále patří celému výzkumnému týmu z Ústavu glykomiky a mikrobiologie na Slovenské akademii věd za poskytnutí potřebných přístrojů, kvasinek a chemikálií pro experimenty.

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	CÍL PRÁCE	11
3	TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1	Kvasinky	12
3.1.1	Využití kvasinek	13
3.1.2	Výskyt a význam kvasinek v přírodě	15
3.2	Enzymy produkované kvasinkami	16
3.2.1	Produkce extracelulárních a intracelulárních enzymů	16
3.2.2	Enzymová aktivita	17
3.2.3	Vsádková a kontinuální kultivace	18
3.2.4	Lipázy	19
3.2.5	Proteázy	21
3.3	Vybrané kmeny kvasinek	22
3.3.1	<i>Pseudozyma fusiformata</i>	22
3.3.2	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	22
3.3.3	<i>Yarrowia lipolytica</i>	23
3.3.4	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	24
3.3.5	<i>Rhodotorula glutinis</i>	24
3.3.6	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	25
3.3.7	<i>Cryptococcus magnus</i>	25
3.3.8	<i>Cryptococcus flavescens</i>	26
3.3.9	<i>Galactomyces candidum</i>	26
3.3.10	<i>Aureobasidium pullulans</i>	27
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
4.1	Materiály a přístroje	28
4.1.1	Chemikálie	28
4.1.2	Biologický materiál	29
4.1.3	Přístrojové vybavení	29
4.1.4	Pracovní pomůcky	30
4.2	Použité roztoky a jejich příprava	30
4.2.1	Roztoky pro stanovení lipolytické aktivity	30

4.2.2	Tlumivé roztoky pro stanovení pH optima	31
4.2.3	Roztoky pro stanovení bílkovin podle Lowryho	32
4.2.4	Roztoky pro stanovení proteolytické aktivity	32
4.2.5	Živná média	33
4.3	Metody	33
4.3.1	Příprava inokula	33
4.3.2	Počítání buněk v Bürkerově komůrce	34
4.3.3	Stanovení kalibračních křivek	35
4.3.3.1	<i>Stanovení kalibrační křivky p-nitrofenolu</i>	35
4.3.3.2	<i>Stanovení kalibrační křivky albuminu</i>	36
4.3.3.3	<i>Stanovení kalibrační křivky tyrosinu</i>	37
4.3.4	Spektrometrické stanovení lipolytické aktivity	38
4.3.4.1	<i>Stanovení optimálního živného média pro produkci lipolytických enzymů</i>	40
4.3.4.2	<i>Substrátová specifita</i>	40
4.3.4.3	<i>Stanovení pH optima a pH stability</i>	40
4.3.4.4	<i>Stanovení teplotního optima a tepelné stability</i>	41
4.3.4.5	<i>Stanovení skladovací stability</i>	41
4.3.5	Spektrometrické stanovení bílkovin podle Lowryho	41
4.3.6	Spektrometrické stanovení proteolytické aktivity	42
4.3.7	Měření pH kvasinek	44
4.3.8	Kontinuální kultivacev bioreaktoru	44
4.3.8.1	<i>Příprava inokula pro kultivaci v bioreaktoru</i>	44
4.3.8.2	<i>Kontinuální kultivace kvasinky Y. lipolytica</i>	44
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	45
5.1	Srovnání produkce lipolytických enzymů u vybraných druhů kvasinek	45
5.2	Testování vhodného kultivačního média pro produkci lipolytických enzymů ...	47
5.3	Stanovení proteolytické aktivity	53
5.4	Stanovení koncentrace extracelulárních bílkovin podle Lowryho	54
5.5	pH prostředí	57
5.6	Charakterizace produkovaných lipolytických enzymů	58
5.6.1	Substrátová specifita	58
5.6.2	pH optimum a pH stabilita	59
5.6.3	Teplotní optimum a tepelná stabilita	61

5.6.4 Skladovací stabilita	63
5.7 Kontinuální kultivace YL v bioreaktoru	66
5.7.1 Srovnání lipolytické aktivity při kontinuální a vsádkové kultivaci YL.....	66
5.7.2 Srovnání proteolytické aktivity při kontinuální a vsádkové kultivaci YL	68
5.7.3 Změna pH v průběhu kontinuální a vsádkové kultivace	68
6 ZÁVĚR	70
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	71
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	84
9 PŘÍLOHA	85

1 ÚVOD

Kvasinkovité populace se neustále vyvíjejí a tvoří významnou skupinu mikroorganismů na Zemi, kde vytvářejí společenstva s viry, houbami a řasami. Díky jejich bohatému enzymatickému vybavení a schopnosti růst v extrémních podmínkách, jako jsou například extrémně nízké nebo vysoké teploty, významně kyselé či naopak zásadité pH, vysoká koncentrace ethanolu nebo omezené množství živin a vody, mohou přežívat v různých částech světa (1). Některé druhy se specifikují na určité prostředí, jiné jsou ubikvitní (2). Produkce hydrolytických enzymů hraje důležitou roli při osídlování různých prostředí.

Mikroorganismy obecně disponují širokým enzymatickým vybavením se schopností produkovat celou řadu enzymů degradujících organický materiál, jako například tuky, oleje, celulózu, xylany, pektiny, škrob, proteiny a další. Produkují zejména hydrolytické enzymy podílející se na štěpení polymerních řetězců na menší fragmenty, které mohou být dále využívány buňkami jako zdroj energie. Hydrolytické enzymy nachází stále větší uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích, především v potravinářství, papírenském průmyslu, při výrobě detergentů, odstraňování toxických odpadů a olejů. Tyto enzymy mohou být produkovány různými kvasinkami v závislosti na podmínkách kultivace. Průmyslově připravované enzymy mikrobiálního původu nacházejí stále širší uplatnění. Mikrobiální enzymové reakce probíhají většinou úzce specificky, nevyžadují vysoké teploty ani tlaky, čímž se snižují náklady na provozní zařízení a energii (3).

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo vypracování literární rešerše zabývající se problematikou vlivu různých růstových faktorů (pH, teplota, způsob kultivace, složení kultivačních médií, doba skladování) na produkci lipáz u vybraných kmenů kvasinek, stanovení lipolytické a proteolytické aktivity a srovnání vsádkové kultivace s kontinuální kultivací v bioreaktoru. V experimentální části byla provedena série experimentů zaměřených na optimalizaci kultivačních podmínek pro produkci lipolytických enzymů. Byl sledován vliv teploty, pH, skladování, složení živného média na lipolytickou aktivitu, která byla stanovena spektrofotometricky za použití *p*-nitrofenyllaurátu jako substrátu.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Kvasinky

Kvasinky patří mezi eukaryotní organismy, neobsahují chloroplasty ani chlorofyl a nejsou tedy schopny fotosyntetizovat. Kvasinky tvoří jak pravé mycelium (podhoubí), tak pseudomycelium (soubor nepravých hyf) (4). Jejich klasifikace i názvosloví se průběžně mění (5, 6).

Velikost buněk kvasinek je asi 3–15 μm a souvisí především s rodovou příslušností a způsobem kultivace. Chemické složení, stavba a funkce buněčných komponent bývají obvykle podobné jako u ostatních eukaryot. Hlavní rozdíl spočívá v přítomnosti silné a pevné buněčné stěny, která chrání buňku před vnějšími vlivy a dává jí tvar. Některé kvasinky mohou tvořit i pouzdro.

Vzhled kolonií jednotlivých druhů kvasinek kultivovaných na pevných médiích se liší a rozdíly lze pozorovat i pouhým okem (Obr. 1 a 2). Kvasinky s kulatými či oválnými buňkami, například zástupci rodu *Saccharomyces*, tvoří kolonie s hladkým povrchem. Pokud jsou kolonie drsné, lze předpokládat přítomnost kvasinek s protáhlými buňkami, například rod *Pichia*. Naproti tomu slizovité kolonie jsou znakem kvasinek tvořících pouzdra, rod *Lipomyces*. Barva kolonií většiny druhů kvasinek je obvykle krémová, ale mohou být i červené (*Rhodotolula*) nebo černé (*Aureobasidium*), což souvisí s produkcí pigmentů jako sekundárních metabolitů (7). Černá barva je způsobena barvivem melanin (8).

V tekutém médiu je růst kultury kvasinek disperzní a projevuje se jako zákal média. Po delší době kultivace se buňky kvasinek shlukují a klesají ke dnu kultivační nádoby. Pokud kvasinky potřebují ke svému růstu více kyslíku, rozprostírají se těsně pod hladinou média, a tak vytváří na povrchu vrstvu - mázdru, která může být tenká či tlustá, suchá nebo slizovitá (8).

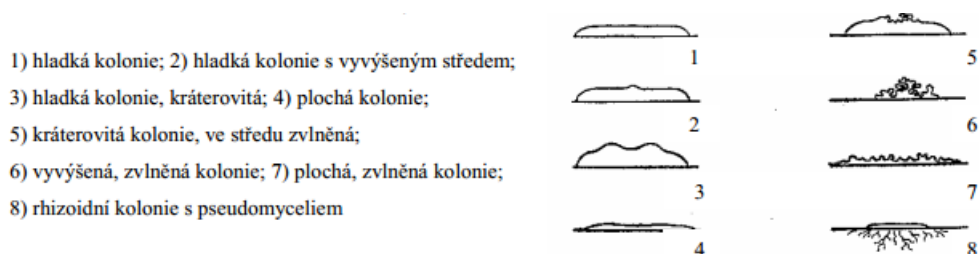
Vzhled kolonií je ovlivněn hlavně složením živného média, nejen koncentrací zdroje uhlíku, dusíku a fosforu, ale také jejich poměrem, současně závisí na složení živné půdy, kultivačních podmínkách a do jisté míry je druhově a rodově specifický. Nejčastěji se kolonie označují jako hladké, drsné nebo slizovité. Kultivací v čistých kulturách se tvorba slizu snižuje a časem se může dokonce vytratit úplně. Kolonie jsou méně odolné než přírodní biofilm a tvoří jakýsi přechod mezi ním a nechráněnou jednotlivou buňkou (8).



1) centrálně pruhovaný; 2) radiálně pruhovaný; 3) ucelený okraj; 4) lalokovitý okraj; 5) pilovitý okraj; 6) cípovitý okraj; 7) rhizoidní okraj

(Kocková-Kratochvílová, 1982, upraveno)

Obr. 1: Různé povrchy a okraje kolonií kvasinek.



1) hladká kolonie; 2) hladká kolonie s vyvýšeným středem;
3) hladká kolonie, kráterovitá; 4) plochá kolonie;
5) kráterovitá kolonie, ve středu zvlňená;
6) vyvýšená, zvlňená kolonie; 7) plochá, zvlňená kolonie;
8) rhizoidní kolonie s pseudomyceliem

(Kocková-Kratochvílová, 1982, upraveno)

Obr. 2: Různé typy průřezu kolonie.

3.1.1 Využití kvasinek

Kvasinky patří mezi jedny z nejstarších a biotechnologicky nejvyužívanějších mikroorganismů vůbec. Některé druhy kvasinek byly zkoumané jako producenti enzymů pro potenciální průmyslové využití, avšak v porovnání s houbami a bakteriemi nejsou považovány za obzvlášť užitečné zdroje průmyslově důležitých enzymů. I přesto patří kvasinky mezi mikroorganismy s velkým biotechnologickým potenciálem pro využití v různých oblastech např. v oblasti vědy a technologie, v potravinářském, zemědělském a farmaceutickém průmyslu, na přípravu různých chemikálií a léčiv (9, 10, 11, 12, 13, 14). Řada studií také zdůrazňuje, že i přes pokroky v genetice a mikrobiální fyziologii související s produkcí enzymů, jsou skriningové programy pro výběr kvasinek schopných produkovat bioaktivní molekuly stále důležitou součástí biotechnologie s ohledem na produkci odlišného množství a typu enzymu v rámci různých izolátů jednoho druhu (15, 16).

Technologicky nejdůležitějším katabolickým procesem, který u kvasinek probíhá, je fermentace neboli kvašení. V dnešní době mají kvasinky nezastupitelný význam mezi průmyslovými mikroorganismy, a to především v potravinářském průmyslu pro výrobu kynutého pečiva, alkoholických nápojů, potravinářské a krmné biomasy (*Candida utilis*). Doposud jsou však poměrně málo využívány jako zdroj bílkovin a jiných biologicky cenných látek v potravinářském průmyslu. Mají bohatý obsah dobře stravitelných bílkovin, cukrů a zejména komplexu vitamínu B, což platí zvláště pro pivovarské kvasinky, které se využívají i při léčbě nervových onemocnění, při zánětlivých kožních chorobách, při poruchách zažívacího traktu a jaterních chorobách.

Významné jsou především z hlediska produkce biologicky aktivních látek a biodegradční aktivity, čehož se využívá na štěpení škrobu amylolytickými enzymy (*Saccharmycopsis fibuligera*, *Schwanniomyces occidentalis*), štěpení dřevní hmoty - štěpí xylózu přímo na ethanol za aerobních podmínek (*Aureobasidium*, *Candida utilis*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* a *Pichia stipitis*), dále odbourávání ropných produktů (*Yarrowia lipolytica*) a také se používají na sorpci těžkých kovů během likvidace znečištěné vody (17). Některé kmeny kvasinek ovšem patří mezi patogenní mikroorganismy a mohou vyvolávat různá onemocnění.

Objev moderních sekvenovacích principů umožnil v roce 1996 sekvenování genomu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (18). V současnosti je osekvenovaných více jak 35 druhů kvasinek. Díky relativně jednoduché stavbě buňky, snadné manipulaci a kultivaci patří kvasinky k nejdůležitějším eukaryotickým modelovým organismům. Byly objeveny shody mezi kvasinkami a savčími buňkami, například gen *CDC2*, který má funkci v buněčném cyklu (6). V současné době nacházejí kromě tradičních technologií stále větší uplatnění i v řadě dalších aplikací, např. výroba organických kyselin, vitamínů, enzymů, antibiotik atd. (6). S rozvojem genového inženýrství roste i počet heterologních bílkovin produkovaných kvasinkami. Získávání nových a vylepšování stávajících vlastností kvasinek technikami rekombinantní DNA je i nadále předmětem mnoha studií a výzkumů. Geneticky modifikované kvasinky jsou obvykle nepatogenní. Genové manipulace se v největší míře provádí na kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* a v posledních letech výrazně i na *Yarrowia lipolytica* (19). Rekombinantní proteiny jsou získány s malými náklady v relativně velkém množství. Pozměněné či umělé kombinace genů mění či doplňují genovou výbavu kvasinek, a to především metabolické dráhy, které se týkají tvorby průmyslově významných sloučenin např. enzymů, antibiotik. Dochází tedy k produkci bílkovin, které se přirozeně vytvářejí v nepříbuzných organismech (6).

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* se využívá jako modelový organismus při studiu metabolismu drog a xenobiotik, které jsou transformovány v organismu (6). Kvasinky produkující hydroxycinamát dekarboxylázu se používají na dekarboxylaci kyseliny skořicové na vinylfenoly, které mohou být následně redukovány až na ethylfenoly. Vinylfenoly se srážejí s anthokyaniny ve víně a ovoci, čímž dochází k produkci barevně stálých vinylfenolových pyranoanthokyaninových produktů, které dodávají vínu barvu, aroma a zamezují tvorbě kalů (20).

3.1.2 Výskyt a význam kvasinek v přírodě

Kvasinky se přirozeně vyskytují ve vodě, důležitými faktory pro jejich růst je čistota, pH a teplota vody, přítomnost živin, proudění vody, salinita atd. Například v arktických vodách se vyskytuje *Leucosporidium*, v odpadních vodách *Candida parapsilosis*, *S. exiguus*, fekální znečištění indikuje *Hansenula anomala*, *C. albicans*, v olejem znečištěných vodách přežívá *Yarrowia lipolytica*, *C. tropicalis*, v planktonu v závislosti na řasách žije např. *Rhodotorula* (21).

V půdě se kvasinkovité mikroorganismy nacházejí mnohem méně než bakterie. Do houbky 15 cm pod zemský povrch se vyskytují převážně druhy *Schwanniomyces*, *Lipomyces*, *Cryptococcus*, které jsou schopny hydrolyticky štěpit celobiózu, lignin nebo produkty bakteriálního metabolismu. Naproti tomu v Antarktidě jsou kvasinky dominantní oproti bakteriím (21).

Z ekologického hlediska řadíme kvasinky mezi destruenty (rozkladače), kteří převádějí organické sloučeniny na anorganické, a proto je jejich výskyt v půdě velmi významný. Provádí transformaci živin, během které dochází ke koloběhu uhlíku, dusíku, síry a fosforu, aerobní respiraci a fermentaci živin. Také se podílí na nitrifikaci, kdy je amoniak přeměněn na dusičnany (rody *Candida*, *Geotrichum*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Williopsis*) a sulfurikaci, při které se síra oxiduje na sírany, thiosírany (rody *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Williopsis*). Také slouží jako stimulatory růstu a biohnojiva, kdy rozpouštějí těžko rozložitelné fosforečnany (rody *Rhodotorula* a *Williopsis*), čímž je podpořen růst kořenů rostlin.

Kvasinky také mohou kolonizovat trávicí trakt savců a hmyzu, kde byly nalezeny ve střevě mouchy *Drosophila* (22). Nejčastěji je z gastrointestinálního traktu savců izolována *C. albicans* (*C. dubliensis*). Kvasinky tvoří v trávicím traktu člověka jen malou část stálé mikroflóry ve střevě - méně než 0,1% mikroflóry. Do gastrointestinálního traktu se především

dostávají například při konzumaci burčáku nebo nefiltrovaného piva. Pro zdravého jedince jsou neškodné.

3.2 Enzymy produkované kvasinkami

Enzymy se nachází ve všech živých systémech a předpokládá se, že i nejjednodušší buňky obsahují přes 3000 enzymů. Kvasinky disponují širokým enzymatickým vybavením, čehož se využívá v řadě biotechnologických procesů. *Saccharomyces cerevisiae* disponuje bohatě vybaveným celulótickým enzymatickým systémem, který je klíčový při hydrolýze krystalické celulózy (23), dále se využívá na přeměnu lignocelulózové biomasy na ethanol. Celulóza a lignocelulová biomasa je do budoucna potenciální zdroj produkce paliv a chemikálií (24). Kvasinka *Trichoderma reesei* produkuje směs celulólytických enzymů, a to dvě celobiohydrolázy (CBH1-2), pět endoglukanáz (EG1-5) a β -glukosidázu (25, 26). β -glukosidázová aktivita byla pozorována i u kmenů *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniospora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* (27). Některé kvasinky produkují pektolytické enzymy, jako je polygalakturonáza, pektin lyáza, pektin esteráza a pektát lyáza. Například *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* a *Candida* produkují pouze polygalakturonázu, kdežto *Rhodotorula* produkuje polygalakturonázu a polyesterázu. Který z enzymů bude produkován, závisí na teplotě, pH a dostupnosti substrátu (28).

3.2.1 Produkce extracelulárních a intracelulárních enzymů

Mikrobiální enzymy lze rozdělit do čtyř skupin, a to na konstitutivní enzymy, které jsou přítomny v buňce za jakýchkoliv vnějších podmínek. Indukovatelné enzymy, které se v buňce syntetizují jen tehdy, je-li v živném médiu přítomný tzv. induktor, jehož přeměnu tyto enzymy uskutečňují. Dále indukovatelné enzymy podléhající represí. A v neposlední řadě reprimovatelné enzymy, které buňka syntetizuje pouze, není-li ve vnějším prostředí přítomna sloučenina produkovaná metabolickým řetězcem, jehož součástí jsou tyto enzymy (3).

Podle místa působení rozdělujeme enzymy na intracelulární, kterých je většina a extracelulární. Mezi kvasinky produkující intracelulární enzymy patří *Kluyveromyces fragilis*, která produkuje alkohol dehydrogenázu, β -galaktosidázu, glukóza-6-fosfát dehydrogenázu, aspartázu a hexokinázu, které byly nalezeny ve vyšší koncentraci v permeabilizovaných buňkách (29). Tyto enzymy zůstávají uvnitř buňky, kde vznikly, a tam vykonávají své specifické funkce. Vyskytují se buď v rozpuštěné formě, nebo vázané v rů-

ných biologických strukturách a tvoří většinou organizované funkční komplexy, multienzymové jednotky nebo multifunkční enzymy (30). Mnohé z intracelulárních enzymů jsou v buňkách lokalizovány pouze v některých jejich částech (organelách). U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byly studovány důležité intracelulární enzymy glyoxylátového cyklu citrát syntáza a izocitrát lyáza, které jsou lokalizovány v mitochondriích, mají podobnou hustotu jako mitochondrie a lze je oddělit gelovou elektroforézou (31). Menší část intracelulárních enzymů naopak není specificky lokalizována a vyskytuje se prakticky v celé buňce kvasinky. Extracelulární enzymy se vylučují a uvolňují do kultivačního prostředí. Jedná se zejména o hydrolytické enzymy, které katalyzují přeměnu živin, podílejí se na mikrobiálním růstu a ovlivňují metabolické cykly. Obecně jsou lokalizovány vně cytoplazmatické membrány (30). Mohou také vzniknout z autolytických procesů (32).

Qingxiang Y. a kol. (33) studoval schopnost kvasinek produkovat různé extracelulární enzymy během fermentačních procesů a jejich možné využití při čištění odpadních vod a biodegradaci odpadů. Výsledky studie ukázaly, že nejvyšší aktivity extracelulárních enzymů vykazovaly kvasinky *Candida rugosa* (AA-M17), *Pseudozyma* sp. (PH-M15), *Candida* sp. (MO-Y11) a *Trichosporon montevidense* (MO-M16). Jednalo se o lipázy, proteázy, mangan dependentní peroxidázy a lignin peroxidázy (33). Zatímco extracelulární enzymy kvasinek mají široké využití zejména v průmyslu, intracelulární enzymy se téměř nevyužívají kvůli jejich obtížné extrakci a purifikaci (34).

3.2.2 Enzymová aktivita

Enzymy určují povahu i rychlost chemických reakcí a řídí většinu biochemických procesů v těle všech živých organismů. Základní složkou enzymů jsou proteiny, na něž se velmi často vážou další přídatné molekuly, kofaktory nebo prostetické skupiny, které se podílí na katalýze. Enzymy se získávají zejména za podmínek „solid-state fermentation“ nebo submerzní fermentace (35), přičemž důležitou úlohu má při produkci enzymů výběr vhodného substrátu a kultivačních podmínek. Účinnost hydrolytických enzymů je pak ovlivněna několika faktory, a to pH, teplotou nebo druhem kvasinky, dále také cenou a dostupností zvoleného substrátu (35).

3.2.3 Vsádková a kontinuální kultivace

Téměř 90% průmyslově používaných mikrobiálních enzymů je produkováno prostřednictvím submerzní kultivace, při které se využívají předem optimalizované podmínky a geneticky modifikované mikroorganismy, které rostou v kapalném živném médiu (36). Zpravidla bývá prováděna v uzavřené nádobě, např. Erlenmayerově baňce za současné aerace, kde je obsah promícháván vhněním vzduchu (37). Díky míchání a provzdušňování je růst populace mikroorganismů homogenní v celém objemu kultivačního média, čímž nastává intenzivnější rozmnožování, maximálně se využívají živiny a zvyšuje se množství produktů, které se získávají za kratší dobu. V průběhu kultivace se plynule mění složení kultivačního média, hmotnost a morfologie buněk (38).

Vsádkovou (batch) kultivací se označuje jednorázová kultivace, během které buňky rostou z inokula do požadované denzity a poté je kultivační médium odstředěno a produkt je izolován buď z biomasy v peletě, nebo ze supernatantu, v případě že se jedná o extracelulární produkt. Výhodou této kultivace je možnost udržovat hladinu koncentrace substrátu na nízké úrovni a vyhnout se tak inhibičnímu efektu. Výťažnost jednorázových kultivací zásadně ovlivňuje velikost inokula a k nejvyššímu přírůstku biomasy dochází až k závěru kultivace (39).

Dalším typem submerzí fermentace je kontinuální kultivace v bioreaktoru, u které se udržuje rovnováha mezi vtokem substrátu a odběrem kultury, která zůstává v exponenciální fázi růstu. Konstantní je i složení média a koncentrace produktů. Potenciální výkyvy z rovnováhy jsou kontrolovány limitovaným přívodem živin. Tento systém tedy poskytuje konstantní podmínky pro růst a zajišťuje standardní kvalitu i koncentraci produktu. Výhodou kontinuálních kultivací oproti jednorázovým je jejich produktivita a konstantní přírůstek biomasy, který je po celou dobu na svém maximu. Naopak jejich nevýhodou je náročnost na přípravu a obsluhu, zajištění sterility vstupních a výstupních látek, genetická nestabilita, fakt, že některé produkty nejsou syntetizovány v exponenciální fázi a ekonomické nároky. Pokud se jedná o zavedený proces kontinuálních kultivací, kdy odpadá nutnost jej optimalizovat, jeho jedinou nevýhodou je riziko kontaminace (39).

Mezi enzymy, které jsou nejvíce produkovány pomocí submerzní kultivace, patří celulózy, které se využívají pro textilní, papírenský a potravinářský průmysl a pro agrotechnologické aplikace, kde jsou vhodné surové enzymové komplexy obsahující celulózy, hemicelulózy, ligninázy a pektinázy produkováné např. kvasinkou *Galactomyces candidum* (40). Většinu enzymů produkováných za podmínek submerzní kultivace lze produkovat i za podmínek

„solid-state fermentation“, avšak kvasinky rostou na pevných substrátech jen zřídka, zpravidla bývají kultivovány pomocí submerzní fermentace (41). Průmyslově se pomocí submerzní kultivace produkují také další enzymy, a to amylolytické, proteolytické, lipolytické (42).

3.2.4 Lipázy

Lipolytické enzymy patří mezi esterové hydrolázy, které katalyzují ve dvoufázovém systému voda-lipid, rozklad mono-, di- a triacylglycerolů na vyšší mastné kyseliny, alkohol a glycerol mechanismem ovlivněným mnoha faktory (43). Jako lipolytické enzymy označujeme lipázu (EC 3.1.1.3 triacylglycerolacylhydroláza) a esterázu (EC 3.1.1.1 karboxylesterhydroláza), které hydrolyzují dlouhé (EC 3.1.1.3) i krátké (EC 3.1.1.1) řetězce esterů karboxylových kyselin (44). Existují živočišné, rostlinné i mikrobiální lipázy, přičemž mnoho z nich vykazuje substrátovou specifitu, vysokou regio- a stereospecifitu. Význam těchto enzymů spočívá ve skutečnosti, že nevyžadují kofaktory a současně jsou vysoce stabilní v organických rozpouštědlech (45). Specifita lipolytických enzymů je kontrolována pomocí molekulárních vlastností enzymu, struktury substrátu a faktorů ovlivňujících vazbu enzymu k substrátu (46).

Mezi lipázami různého původu jsou značné rozdíly ve specifitě vzhledem k poloze hydrolyzované esterové vazby, vázané mastné kyselině i rychlosti štěpení. Dosáhnout úplné hydrolýzy triacylglycerolů na glycerol a mastnou kyselinu je velmi obtížné.

Většina lipáz patří mezi extracelulární enzymy, které se uvolňují do média skrze buněčnou stěnu během pozdní exponenciální a časně stacionární růstové fáze. Většina mikroorganismů může produkovat i více než jeden typ extracelulárních lipáz, které hydrolyzují různě dlouhé řetězce mastných kyselin (34). Produkce lipáz závisí na celé řadě faktorů, např. na teplotě, pH prostředí, zdrojích dusíku a tuků, koncentraci anorganických solí a dostupnosti kyslíku (47). Ke své aktivaci potřebují emulgující látku a vápenaté ionty (48). Chang a kol. (49) studoval různé druhy lipáz u kmene *C. rugosa* a zjistil, že při použití média obohaceného o Tween 80 se produkují jiné lipázy než za použití média obsahující Tween 20. Tyto lipázy se lišily vlastnostmi, molekulovou hmotností a délkou řetězce (49).

Aktivita lipáz bývá u kvasinek v rozmezí teplot od -20°C až do 65°C . Optimální teplota pro produkci lipáz se většinou uvádí nižší než teplota nutná pro mikrobiální růst, a tak buněčný růst nelze brát jako jednoznačný ukazatel produkce lipáz. U kvasinek je produkce lipáz nejvyšší mezi teplotami $25\text{--}30^{\circ}\text{C}$. Optimální pH většiny lipáz produkovaných

kvasinkami se uvádí v rozmezí hodnot 6,8 až 9. Jako nejvhodnější pro stanovení aktivity lipáz jsou fosfátové pufrы, protože mají kolem hodnoty pH 6,8–7,4 největší pufrací sílu (37, 51).

Mezi kvasinky, které produkují lipázy, patří řada druhů, jako jsou *Candida rugosa*, *C. tropicalis*, *C. cylindracea*, *C. parapsilosis*, *C. deformans*, *C. curvata*, *C. valida*, *C. antarctica*, *Galactomyces candidum*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *R. pilimornae*, *Pichia bispora*, *P. maxicana*, *P. sivicola*, *P. xylosa*, *P. burtonii*, *S. crataegenesis*, *Torulaspóra globosa*, *Trichosporon asteroides*, *Sporidiobolus* spp., *Tr. beigeli*, *Tr. fermentans* (52). Mnoho z těchto kvasinek roste také na *n*-alkanech a substrátech obsahujících tuky a oleje, které lipolytické enzymy vyžadují (53). Štěpí molekuly substrátu na menší fragmenty, které jsou dále využívány buňkami jako zdroj energie. Lipázy mohou být produkovány různými kvasinkami v závislosti na podmínkách kultivace. Lipázy jsou více produkovány v médiích obohacených o oleje, mastné kyseliny, glycerol nebo Tween než v médiích, kde je hlavním zdrojem uhlíku sacharid (glukóza, fruktóza) (54). Použití triglyceridů jako zdroj uhlíku je postačující jak pro růst buněk, tak pro produkci enzymů, i když zde může dojít k přerušení biosyntézy lipáz volnými mastnými kyselinami. Stejněho efektu je dosaženo, když je jako zdroj uhlíku použita glukóza, tzv. katabolická represe. Upřednostňována je submerzní kultivace a přítomnost organického zdroje dusíku a esenciálních mikroelementů zajišťujících růst. Přítomnost těchto látek může být zabezpečena přidávkem komplexních komponent jako kvasničný extrakt, pepton či kukuřičný výluh (55).

Extracelulární lipázy z kvasinek *Candida*, *Geotrichum*, *Trichosporon* a *Y. lipolytica* se purifikovaly, charakterizovaly a byly s nimi prováděny genové manipulace a klonování. Lipázy katalyzují širokou škálu reakcí, jako jsou hydrolýza, esterifikace, alkoholýza, acidolýza nebo aminolýza (56). Lipázy z *C. rugosa* a *C. antarctica* jsou využívány v mnoha aplikacích, např. na organické syntézy, jako potravinová aditiva, kde upravují chuť potravin, chemická činidla, jež hydrolyzují glyceridy, jako přísady do čisticích prostředků a detergentů, v kosmetice, farmacii, v průmyslu zpracovávajícím oleje a tuky. Lipázy se s výhodou využívají tam, kde je potřeba získat čisté chemikálie, které se obtížně připravují chemickou cestou. Dále se začínají používat k rozlišení racemických směsí, k produkci opticky aktivních sloučenin a při biodegradaci plastů, jako jsou polyhydroxyalkanáty (PHA) a polykaprolaktony (PCL) (57, 58). Díky rozšíření průmyslových aplikací se zájem o lipázy zvyšuje, ale rozsah aplikací a objem výroby je omezen (59).

3.2.5 Proteázy

Proteolytické enzymy katalyzují hydrolýzu peptidových vazeb v proteinech a peptidech. V závislosti na místě působení na polypeptidovém řetězci se peptidázy dělí na endopeptidázy, které hydrolyticky štěpí peptidové vazby uvnitř řetězce a tvoří štěpné peptidy o různé délce, a exopeptidázy, které katalyzují hydrolytické odštěpení koncové aminokyseliny. Mohou být proto klasifikovány jako N-koncové exopeptidázy (aminopeptidázy) nebo C-koncové exopeptidázy (karboxypeptidázy). Podle struktury aktivního místa se proteázy člení do čtyř skupin, a to serinové, cysteinové (thiolové), asparátové, peptidázy s kovovým iontem jako kofaktorem (60).

Bakterie, vláknité houby a kvasinky produkují různé druhy proteáz, které se využívají v potravinářském, mlékárenském, medicínském průmyslu nebo při výrobě pracích prášků a při zpracování odpadu (61, 62).

Z přírody se izolovalo velké množství kmenů, které produkují proteolytické enzymy, např. *Debaryomyces hansenii*, *C. laurentii*, *Pseudozyma* sp., *R. glutinis*, *C. stellata*, *C. pulcherrima*, *K. apiculata* (63, 64). Mikrobiální proteázy jsou nejčastěji rozdělovány podle jejich pH optima na kyselé, neutrální a alkalické proteázy. Z hlediska mechanismu působení nepoužívanější alkalické proteázy (s optimálním pH 6–12) patří mezi serinové proteázy. Kvasinka *Y. lipolytica* produkuje kyselé i alkalické extracelulární proteázy v závislosti na pH prostředí. Obecně platí, že v neutrálním a vysokém pH se produkují alkalické proteázy a v nízkých hodnotách pH kyselé proteázy (3, 65). Neutrální proteázy s pH optimumem působení při 7–8 jsou většinou metalloenzymy, které mají v aktivním místě zinek. Kyselé (aspartátové) proteázy mají pH optimum mezi 3–5. Pro stanovení proteázové aktivity lze využít různé substráty jako kasein, azokasein, želatinu, peptidy, albuminy. Mikroorganismy produkují řadu proteáz, které jsou aktivní v širokém rozmezí pH (4 až 11) a vykazují širokou substrátovou specifitu. Jejich velkou předností je snadnost výroby ve velkých množstvích a možnost volby vhodných vlastností enzymu použitím jiného kmene kvasinky (3).

3.3 Vybrané kmeny kvasinek

3.3.1 *Pseudozyma fusiformata*

Synonymum: *Candida fusiformata*, *Apiotrichum fusiformata*

Rod *Apiotrichum* patří mezi slizovité bazidiomycetové organismy. Vyznačuje se tvorbou rychle se šířících hyf, které se větví podélně nebo průběžně a jsou často vzdušné a zapletené do svazků.

P. fusiformata se poprvé izolovala ze zeleniny rodu *Brassica* v Anglii (66). Má elipsoidní až protáhlé buňky různých tvarů, vyznačující se oboustrannými výběžky jako zbytky po pučení. Buňky mají rozměry (1,5–3) x (3–11,5) μm . V kapalném médiu vytváří vedle sedimentu i tenkou táhlou mázdru. Nátěr na agaru je těstovitý, místy slizovitý, hladký nebo vlnitý. Vytváří i pseudomycelium i pravé mycelium, které se skládá z dlouhých vlnovitých filamentů. Podobá se *Apiotrichum humicola*, odlišuje se však v některých fyziologických vlastnostech, např. využívá KNO_3 , neutilizuje škrob a nevytváří amylózový polysacharid (6).

Produkuje esterázy, které mohou být využity v biotechnologii nebo průmyslu (67). Studie s kvasinkou *P. fusiformata* BKM Y-2821 ukázala, že tato kvasinka produkuje extracelulární nízkomolekulární proteázy vykazující rezistenci vůči termostabilním fungicidům, které inhibovaly více než 80% z 280 testovaných kvasinek. Kvasinka byla kultivována za podmínek submerzní kultivace, na glukózo-peptonovém agarovém médiu obohaceném o olivový olej, za teploty 20°C a pH 4,5. *P. fusiformata* BKM Y-2821 může být použita jako potenciální producent antifungicidního glykolipidu (68).

3.3.2 *Meyerozyma guilliermondii*

Synonymum: *Candida guilliermondii*

Tento druh je anamorfním stádiem *Pichia guilliermondii* Wickerham. Vyskytuje se často v klinickém materiálu při různých lidských a zvířecích chorobách a je rozšířená ubikvitně. Buňky jsou krátké, elipsoidní s rozměry (2–4,5) x (2,5–7) μm . V kapalném prostředí vytváří shluky. Nátěr na agaru je krémový, hladký, může být i matný a vlnitý. Pseudomycelium má dlouhé články a blastokonidie jsou uspořádány do krátkých přeslenů. Od ostatních druhů skupiny se odlišuje tím, že využívá inulin. V biotechnologii se *M. guilliermondii* stala předmětem výzkumu a využívá se na produkci riboflavinu, kyseliny citronové, polyolů (např. xylitol, arabitól), proteinové biomasy, na transformaci steroidů nebo jako předmět genového inženýrství na vypracování různých testů (6). Byly prováděny studie s různými druhy cukrů,

pomocí kterých byla vyvolána xylóza reduktázová a xylitol dehydrogenázová aktivita u *M. guilliermondii*. Výsledky ukázaly, že utilizace D-xylózy pomocí *M. guilliermondii* je nepostradatelná pro regulaci iniciace a katabolickou represi (69). Další studie ukázala, že *M. guilliermondii* UFMG-Y65 lze za určitých kultivačních podmínek využít na enzymovou hydrolýzu nitrilů a může být do budoucna používána na bioprodukcí amidů a organických kyselin a pro odstraňování nitrilů kontaminujících životní prostředí (70). Tato kvasinka také produkuje acetyl esterázu při fermentaci xylózy, čehož se využívá při degradaci hemicelulózy (71). Vykazuje také lipolytickou aktivitu (67), která je podmíněna přítomností lipidového substrátu. *M. guilliermondii* produkuje lipázy v médiích obsahujících oleje, mastné kyseliny nebo Tween (54).

3.3.3 *Yarrowia lipolytica*

Synonymum: *Candida lipolytica*

Rod *Yarrowia* má pučící buňky, pseudohyfy i pravé hyfy. Produkuje elipsoidní, hruškovité až válcovité konidie, které mají velmi zřetelnou jizvu a přiléhají k hyfám nebo vyrůstají na konidiogenních buňkách. Asky jsou jednotlivé, vrůstají laterálně nebo terminálně a obsahují 1 až 2 spory, někdy i 4 spory.

Pro studium kvasinek žijících na *n*-alkanech je *Y. lipolytica* výborným modelem. Tato kvasinka byla také studována z hlediska produkce kyseliny citronové ve spojitosti s těmito uhlovodíky. Chemická analýza ukázala, že jejich buněčná stěna obsahuje 70% sacharidů a 5% lipidů (6). Bývá využívána jako zdroj proteinů z lipidových směsí, jako jsou oleje, ropa a uhlovodíky. V přírodě obvykle kolonizuje hydrofobní substráty, kde hraje důležitou roli při jejich degradaci (72). Tato kvasinka vykazuje odlišné fyziologické, metabolické a genomické znaky, netypické pro jiné druhy kvasinek (73). *Y. lipolytica* sekretuje velké množství intracelulárních a extracelulárních lipolytických enzymů s pH optimum 6,0–9,0 a teplotním optimum 25–55°C (37, 51, 74, 75, 76), které se hojně využívají v průmyslu, k biotransformaci steroidů, lipidů, k produkci chemikálií (organické kyseliny, polyalkoholy, γ -dekalakton) a meziproduktů, terapeutik, detergentů a drog (77), dále na degradaci odpadů z potravinářského průmyslu. Také produkuje řadu proteinů (zásadité nebo kyselé proteázy, RNázy) do média v množství, které je využitelné pro průmyslové aplikace. Byla navržena jako modelový systém pro studium dimorfismu, mitochondriálního komplexu, peroxizomů, akumulace lipidů, produkce lipáz a byla použita jako obecný model pro pochopení molekulárního uspořádání dalších enzymů (73). Díky specifickým vlastnostem a užití

genových manipulací je vhodná také pro studium metabolických drah. Pro studium sekrečních drah a zpracování proteinů se nejvíce využívá alkalická extracelulární proteáza, která je u této kvasinky hlavní vylučovanou proteázou (78, 79). Dalšími produkovanými enzymy jsou například esteráza nebo fosfatáza, které se mohou vytvářet za odlišných kultivačních podmínek. Díky své vysoké lipolytické a proteolytické aktivitě přispívá k utváření textury a aroma během procesu zrání sýrů (73). Hydrolýza kaseinu, související se zráním sýru, vyžaduje činnost proteáz, které jsou obvykle získávány právě z *Y. lipolytica* (73).

3.3.4 *Metschnikowia pulcherrima*

Synonymum: *Rhodotorula pulcherrima*, *Candida pulcherrima*

Vegetativní buňky tvoří kulovitý až elipsoidní tvar. Po delší době tvoří ve sladině kulovité chlamydospory s velkou kapkou olejovité refraktilní látky, která se nazývá pulcherrimae a slouží jako spolehlivý identifikační znak. Na tuhých půdách má kolonie krémovou barvu, těstovité konzistence, hladký a lesklý povrch s uceleným okrajem. Na povrchu kolonie se často tvoří záhyby. *M. pulcherrima* bývá velmi často izolována z plodů rostlin s anthokyanovým barvivem nebo z kvasných moštů ve vinohradnických oblastech jako dominující společenstvo, kde tvořila 1 až 2% ze všech mikroorganismů (6). *M. pulcherrima* produkuje celou řadu extracelulárních enzymů, a to pektinázy, amylázy, lipázy, proteázy a β -glukosidázy, které se využívají při výrobě vína (80). Proteázy snižují koncentraci dusíkatých zdrojů, což má pozitivní vliv na růst žádoucích mikrobů, a také zlepšují kvalitu vína a redukuje kaly (81, 82).

3.3.5 *Rhodotorula glutinis*

Synonymum: *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodosporidium sphaerocarpum*

Druhy *Rhodotorula* patří mezi ubikvitní kvasinky rozšířené po celém světě a jsou izolovány ze vzduchu, z půdy, sladké i slané vody, z vinařských produktů, z povrchu rostlin nebo z různých orgánů živočišného těla. Tyto kvasinky se vyznačují tvorbou pigmentů karotenoidů. Mají malé buňky s rozměry (2,5–5) x (6–13) μm . V kapalném prostředí vytvářejí sediment a prsteneček zpravidla světlé, krémové až světle růžové barvy. Barva nátěru na agaru závisí od složení živného média a bývá červená, lososová až pomerančová. Povrch nátěru je hladký, slizovitý, lesklý a na povrchu může být zvlněný. Okraj kolonie je ucelený, jen zřídka má primitivní pseudomycelium. Všechny druhy *Rhodotorula* se vyznačují tím, že jsou lipidotvorné (lipogenní), hromadí v buňkách tuk, v určitých podmínkách až nadměrně,

s čímž souvisí schopnost produkovat lipázy. *Rhodotorula* patří do skupiny Basidiomycetes a je haploidní stádium v životním cyklu rodu *Rhodosporidium* (83). *Rhodotorula* a *Cryptococcus* mají společných mnoho fyziologických a morfologických vlastností. Oba kmeny produkují enzym ureázu a nejsou schopné fermentovat uhlovodíky. *Rhodotorula* vykazuje esterázovou a lipázovou aktivitu (67). Kvasinka *R. glutinis* produkuje β -glukosidázu, která se využívá na produkci ethanolu z celulóзовých zbytků, jako jsou kukuřičná stébla, sláma atd. (84). Papaparaskevas a kol. (27) srovnával produkci extracelulární lipázy u kvasinky *R. glutinis* na médiu obohaceném o fruktózu a na médiu s palmitovým olejem jako hlavním zdrojem uhlíku. Výsledky ukázaly, že vyšší produkce lipáz byla prokázána na médiu s palmitovým olejem. pH optimum těchto lipáz bylo 7,5.

3.3.6 *Rhodotorula mucilaginosa*

Synonymum: *Rhodotorula rubra*

Buňky této kvasinky jsou elipsoidní s rozměry 2,5 x (2,5–14) μm . V kapalném prostředí vytváří sediment a vlhkou mázdru. Nátěr bývá slizovitý, hladký, ale i drsný, červené nebo růžové barvy (6). *R. mucilaginosa* produkuje lipázy vázané na buněčnou stěnu. Také vykazuje esterázovou aktivitu, hlavně acetyl esterázy, které se využívají při degradaci hemicelulózy (85).

3.3.7 *Cryptococcus magnus*

Má elipsoidní až protáhlé buňky s rozměry (3,5–15) x (4,5–45) μm . V kapalném prostředí tvoří bohatou usazeninu. Nátěr na tuhých půdách je velmi skládaný, slizovitý, hladký a často stéká na dno zkumavky. Pseudomycelium nevytváří, ale tvoří kapsuly s fibrilární strukturou (6). Enzymy, které *C. magnus* obsahuje, účinně degradují plasty vyrobené z polybutylen sukcinátu a polybutylen sukcinát-co-adipátu (86). Enzymy z *C. magnus* MG-27 se využívají na selektivní odstranění glukuronidu z glycyrhizinu, čímž je dosaženo kvantitativní produkce monoglukuronidu kyseliny glycyrhetinové z glycyrhizinu. Monoglukuronid kyseliny glycyrhetinové je více než 5x sladší než glycyrhizin a do budoucna je možným potenciálním sladidlem (87). Byly prováděny studie, které dokazují, že *C. magnus* kolonizuje povrch ovoce rychleji než patogenní mikroorganismy, zejména díky produkci extracelulárních enzymů, jako jsou β -glukanáza a chitináza, které chrání integritu buněčné stěny před vstupem patogenů (88).

3.3.8 *Cryptococcus flavescens*

Buňky jsou elipsoidní až protáhlé, velké (2–5,5) x (3–7) μm v párech, řetězcích nebo malých skupinách. V kapalných prostředích vytváří slizový sediment, prstenec, mázdro až kožku. Tvoří krémový hladký do žluta zbarvený nátěr na tuhých půdách. Netvoří pseudomycelium ani pravé mycelium (6). Tato kvasinka produkuje mnoho druhů enzymů, xylanázy, pektinázy, kutinázy, lipázy, proteázy a lakázy, schopné degradovat různé části rostlin (89). Prováděla se studie s lipázou produkovanou *C. flavescens* 39-A. Purifikovaná lipáza se srážela pomocí $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, teplotní optimum měla 30°C, pH optimum 7,0 a velikost této lipázy byla 34 kDa. Byla přidávána do sýru mozzarella během zrání, kde vytvářela příjemné sýrové aroma, a proto může do budoucna nahradit dosud využívanou esterázu v mlékárenském průmyslu (90).

3.3.9 *Galactomyces candidum*

Synonymum: *Geotrichum candidum*

Tvoří pravé mycelium a je rozšířená převážně ubikvitně. Vyskytuje se v mléčných výrobcích, mléku, smetaně, tvarohu, sýru, na škrobu, ale i v půdě, ve vodě, v aktivovaných kalech z odpadních vod z výroby plastů, vláken, organických chemikálií atd. (91, 92). Tato lipolytická kvasinka se používá na degradaci odpadních produktů při zpracování tučných ryb (93), tučných mléčných produktů (94) a na neutralizovaných záparách z rafinace olejů (95).

Na médiu obohaceném o olivový olej produkuje lipolytické enzymy s pH optimem 5,6–7,0 a teplotním optimem 40°C (32), které se využívají v různých odvětvích průmyslu, v biotransformacích, při čištění odpadních vod nebo do pracích prostředků. Tyto lipázy jsou velmi selektivní vůči dlouhým řetězcům mastných kyselin obsahujících *cis*-9 dvojné vazby (96) a využívají se na esterifikaci fenolů pro syntézu lipofilních antioxidantů ve slunečnicovém oleji (58, 97). Studovala se produkce laktát dehydrogenázy, která byla objevena u kvasinky izolované z odpadních vod po zpracování kysaného zelí. pH tohoto enzymu bylo 7,5 a teplotní optimum 30°C. Laktát dehydrogenáza může být využita pro stanovení kyseliny mléčné v potravinách, nápojích a dalších biologických materiálech (98). Dále byla purifikována a charakterizována peroxidáza z *G. candidum* Dec 1, která může být využívána na odbarvování a degradaci syntetických barviv, která se hromadí v životním prostředí. Peroxidáza byla produkována za aerobních podmínek ve stacionární fázi a teplotní optimum měla při 30°C (99).

3.3.10 *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans se velmi jednoduše pěstuje na minimálním médiu s glukózou a biotinem. Za použití různých sacharidových substrátů je schopno syntetizovat směs extracelulárních polysacharidů jako je např. pululan. *Aureobasidium* je bohaté na různé hydrolytické enzymy, dokáže rozložit celulózu, hemicelulózu, xylany, lignin, škrob, kaprolaktam a rozmnožuje se na rostlinných a živočišných odpadech a produkuje přitom pululan a melanin. Jeho enzymatická aktivita je často škodlivá, protože například rozkládá barviva, narušuje elektrické vedení. Vytváří blastokonidie různého tvaru a pučící na asexuální promycelium, z něhož vznikají hyfy, které se vytváření na povrchu, jsou tenké a směřují do vzduchu. Povrchové útvary produkují i chlamydospory, které bývají dvojbuňkové s velmi hrubou stěnou a na povrchu hustě posety melaninem. Zralá chlamydospora uvolňuje buňku, která klíčí na blastokonidii.

A. pullulans produkuje extracelulární enzymy, například fruktofuranosidázu neboli invertázu, xylanázu a glukoamylázu. Invertáza se používá při výrobě invertního cukru pro konzervářské a cukrovinkářské účely. Glukoamyláza se využívá při zpracování škrobu na škrobové sirupy. Dále produkuje pektolytické enzymy, celulózy a lakázu. Celulózy se používají v konzervářství při zpracování ovoce a zeleniny, jsou součástí pracích prostředků a přidávají se do krmných směsí. Lakáza slouží k biodegradaci ligninu a využívá se v papírenském a textilním průmyslu (21, 100, 101). *A. pullulans* NH 2,3, izolovaná z moře, produkuje lipázy, které se využívají na hydrolýzu jedlých olejů (102).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiály a přístroje

4.1.1 Chemikálie

- D-glukóza $C_6H_{12}O_6$ – Lachema, Brno
- Destilovaná voda H_2O – Fakulta chemická VUT, Brno
- Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4 – Lach Ner, Neratovice
- Dihydrogenfosforečnan sodný $NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$ – Lach Ner, Neratovice
- Ethanol C_2H_5OH – Mercí s.r.o, Brno
- Folin-Ciocalteovo činidlo – fa RNDR. Jan Kulich, Hradec Králové/Říčany
- Glycin – Lachema, Brno
- Heptahydrát fosforečnanu sodného $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ – Lach Ner, Neratovice
- Hydrogenfosforečnan draselný K_2HPO_4 – Lachema Brno
- Hydrogenfosforečnan sodný $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ – Lachema, Brno
- Hydroxid sodný $NaOH$ – Lach Ner, Neratovice
- Hovězí sérový albumin – Sigma-Aldrich, Německo
- Chlorid sodný $NaCl$ – Lach Ner, Neratovice
- Kasein – Merck, Německo
- Kyselina chlorovodíková p.a. HCl – Lachema Brno
- Kyselina trichloroctová CCl_3COOH – Sigma – Aldrich
- Kvasničný extrakt – Himedia Laboratories Limited
- Olivový olej: směs kyseliny olejové, linolové a linoleové – Fluka, Německo
- Pentahydrát síranu měďnatého $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ – ML chemica; Troubsko
- Pepton – Himedia Laboratories Limited
- *p*-nitrofenol $C_6H_5NO_3$ – Lach Ner, Neratovice
- *p*-nitrofenylbutyrát $C_{10}H_{11}NO_4$ – Sigma Aldrich
- *p*-nitrofenyllaurát $C_{18}H_{27}NO_4$ – Fluka Chemische Fabrik, Německo
- *p*-nitrofenylpalmitát $C_{22}H_{35}NO_4$ – Sigma Aldrich
- Síran hořečnatý $MgSO_4$ – Lachema, Brno
- Triton X-100 – Sigma-Aldrich, Německo
- Tween 20 – Sigma-Aldrich, Německo
- Tween 60 – Sigma-Aldrich, Německo
- Tween 80 – Sigma-Aldrich, Německo

- Uhličitan sodný Na_2CO_3 – Lachema, Brno
- Vinan draselno-sodný tetrahydrát $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ – Lachema, Brno

4.1.2 Biologický materiál

Mezi studované kvasinky patřily *Pseudozyma fusiformata* (PF) CCY 89-1-1, *Meyerozyma guilliermondii* (MG) CCY 39-23-5, *Yarrowia lipolytica* (YL) CCY 29-26-52, *Metschnikowia pulcherrima* (MP) CCY 29-2-129, *Rhodotorula glutinis* (RG) CCY 20-2-41, *Rhodotorula mucilaginosa* (RM) CCY 20-1-35, *Cryptococcus magnus* (CM) CCY 17-4-39, *Cryptococcus flavescens* (CF) CCY 17-3-33, *Galactomyces candidum* (GC) CCY 16-1-29, *Aureobasidium pullulans* (AP) CCY 27-1-119. Kvasinky pocházejí ze Zbierka kultúr kvasiniek, SAV, ze Slovenska.

4.1.3 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy, AND GR-202-EC; Japonsko
- Autokláv, Vaspoteri, Brněnská medicínská technika a.s.
- Automatické pipety, Hirschmann, Biohit Proline
- Bioreaktor, VWR International
- Centrifuga, Eppendorf Concentrator 5301, Hamburg, Německo 29
- Chladicí box
- Inkubátor, Heidolph; Německo
- Kuchyňský vaříč, ETA
- Laminární box AURA mini, Biotech a.s
- LEXT OLS 3000, OLYMPUS
- Mikrocentrifuga, Eppendorf centrifuge 5417R, Německo
- pH metr, inoLab pH 720, Merci .s.r.o, Brno
- Předvážky, Scaltec, USA
- Spektrofotometr UV/VIS HELIOS DELTA, Thermospectronic, Anglie
- Sušárna, Memmert
- Termostat, Huber
- Termostat, LTE SCIENTIFIC LTD, Anglie
- Vodní lázeň, Polystat cc1, Merci s.r.o., Česká republika
- Vortex, Heidolph, REAX top; Německo

4.1.4 Pracovní pomůcky

- mikrozkušavky eppendorf čirá s uzávěrem (objem 1,5 ml a 2 ml)
- špičky (objem 200–1000 μ l modré)
- špičky (objem 10–200 μ l žluté)
- mikropipety Labopette, HIRSCHMANN Laborgeräte (objem 100–1000 μ l)
- mikropipety Bioth proline (objem 100–1000 μ l, 20–200 μ l)
- stojan s držákem
- stojan na zkumavky
- stojan na mikrozkušavky eppendorf
- odměrné a běžné laboratorní sklo
- Bürkerova komůrka
- krycí a podložní skla

4.2 Použité roztoky a jejich příprava

4.2.1 Roztoky pro stanovení lipolytické aktivity

Fosforečnanový pufr pH 7,2 (50 mM)

1,431 g hydrogenfosforečnanu sodného $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ a 0,549 g hydrogenfosforečnanu draselného KH_2PO_4 bylo rozpuštěno ve 240 ml destilované vody. pH bylo upraveno na hodnotu 7,2 pomocí roztoku NaOH.

Roztok p-nitrofenylbutyrátu (2,5 mM)

0,013 g resp. 11 μ l p-nitrofenylbutyrátu bylo rozpuštěno ve 25 ml ethanolu.

Roztok p-nitrofenyllaurátu (2,5 mM)

0,02 g p-nitrofenyllaurátu bylo rozpuštěno ve 25 ml ethanolu.

Roztok p-nitrofenylpalmitátu (2,5 mM)

0,024 g p-nitrofenylpalmitátu bylo rozpuštěno ve 25 ml ethanolu.

Roztok uhličitanu sodného (0,1M)

1,06 g uhličitanu sodného Na_2CO_3 bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody.

4.2.2 Tlumivé roztoky pro stanovení pH optima

Fosforečnanový pufr (pH 5,7–8,0)

Byly připraveny zásobní roztoky 0,2 M středního fosforečnanu sodného (71,63 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ /1000 ml) a 0,2 M kyselého fosforečnanu sodného (31,20 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ /1000 ml). Podle následujícího schématu byly naředěny pufrы o pH 5,8 až 8,0.

X ml kys.fosf.sodného + Y ml stř. fosf. sodného ředit na 200 ml vody

X	Y	pH
92,0	8,0	5,8
87,7	12,3	6,0
81,5	18,5	6,2
73,5	26,5	6,0
62,5	37,5	6,6
51,0	49,0	6,8
39,0	61,0	7,0
28,0	72,0	7,2
19,0	81,0	7,4
13,0	87,0	7,6
8,50	91,5	7,8
5,30	94,7	8,0

Glycin – hydroxid sodný pufr (pH 8,6–10,4)

Byly připraveny zásobní roztoky 0,2 M glycinu (15,01 g /1000 ml) a 0,2 M hydroxidu sodného (8 g NaOH/1000 ml). Podle následujícího schématu byly naředěny pufrы o pH 8,6 až 10,4.

50 ml glycinu + X ml NaOH

X	pH
4,0	8,6
6,0	8,8
8,8	9,0
12,0	9,2
16,8	9,4
22,4	9,6
27,2	9,8
32,0	10,0
38,6	10,2
45,5	10,4

4.2.3 Roztoky pro stanovení bílkovin podle Lowryho

Roztok hovězího sérového albuminu (1mg/ml): 0,05 g albuminu/50 ml destil. vody

Roztok A: 2% Na₂CO₃ (20 g/1000 ml), 0,05% vinan sodný (0,05 g/1000ml),

0,1 M NaOH (4g/1000 ml)

Roztok B: 0,1% CuSO₄·5H₂O (1 g/1000 ml)

Roztok C: 45 ml roztoku A + 5 ml roztoku B (vždy čerstvý, ředění 9:1)

Roztok D: Folin-Ciocalteovo činidlo (1 ml FC + 1,6 ml H₂O)

4.2.4 Roztoky pro stanovení proteolytické aktivity

50 mM draselno fosfátový pufr, pH 7,5

11,4 mg/ml K₂HPO₄·3H₂O, pH upraveno pomocí 1M HCl. Před použitím byl tento roztok uchován při 37°C.

Roztok kaseinu

0,65% roztok kaseinu byl připraven smícháním 6,5 mg/ml kaseinu v 50 mM draselno-fosfátovém pufru. Roztok byl pozvolna zahříván na 80–85°C asi 10 minut a mírně promícháván, až bylo docíleno homogenní suspenze. Bylo důležité, aby roztok nezačal vařit. pH se upravilo pomocí NaOH nebo HCl.

110 mM trichloroctová kyselina TCA

TCA byla připravena rozpuštěním 17,97 mg/ml v destilované vodě.

0,5 mM Folin-Ciocalteuovo činidlo (F-C činidlo)

500 mM Na₂CO₃

53 mg/ml Na₂CO₃ bylo rozpuštěno v destilované vodě. Pro rozpuštění enzymu (proteázy) nebo pro zředění roztoku enzymu byl použit roztok, který obsahoval 10 mM sodno-octanový pufr s 5 mM octanem vápenatým, s pH 7,5 při 37°C.

1,1 mM L-tyrosin

0,2 mg/ml L-tyrosinu se rozpustilo v destilované vodě za mírného zahřívání, dokud se tyrosin nerozpustil. Stejně jako v případě kaseinu, roztok nesměl vařit. Následně byl roztok ochlazen na pokojovou teplotu a poté byl použitý pro přípravu kalibrační křivky.

4.2.5 Živná média

Bazální médium (BM): pepton (5 g/l), MgSO₄ (0,1 g/l), K₂HPO₄ (1 g/l)

Bazální médium s glukózou (BM+G): glukóza (2 g/l), pepton (5g/l), MgSO₄ (0,1 g/l), K₂HPO₄ (1 g/l)

Bazální médium s olivovým olejem (BM+OO): pepton (5 g/l), MgSO₄ (0,1 g/l), K₂HPO₄ (1 g/l), olivový olej se přidává, aby ho bylo 2 obj.% v médiu, tj. 0,4 ml oleje na 20 ml média

Bazální médium s Tweenem 20 (BM+TW 20): pepton (5 g/l), MgSO₄ (0,1 g/l), K₂HPO₄ (1 g/l), Tween 20 se přidává, aby ho bylo 2 obj.% v médiu, tj. 0,4 ml Tween na 20 ml média

Bazální médium s Tweenem 60 (BM+TW 60): pepton (5 g/l), MgSO₄ (0,1 g/l), K₂HPO₄ (1 g/l), Tween 60 se přidává, aby ho bylo 2 obj.% v médiu, tj. 0,4 ml Tween na 20 ml média

Bazální médium s Tweenem 80 (BM+TW 80): pepton (5 g/l), MgSO₄ (0,1 g/l), K₂HPO₄ (1 g/l), Tween 80 se přidává, aby ho bylo 2 obj.% v médiu, tj. 0,4 ml Tween na 20 ml média

Bazální médium s Tritonem X-100 (BM+TR): pepton (5 g/l), MgSO₄ (0,1 g/l), K₂HPO₄ (1 g/l), Triton X-100 se přidává, aby ho bylo 2 obj.% v médiu, tj. 0,4 ml Triton X-100 na 20 ml média

4.3 Metody

4.3.1 Příprava inokula

Kvasinková kultura byla z šikmého masopeptonového agaru převedena do zkumavky se sterilní vodou pomocí vyžíhané očkovací kličky. Poté byla zkumavka protřepána, aby došlo k homogenizaci suspenze a posléze bylo odebráno 20–25 µl na Bürkerovu komůrku (Obr. 3), kde se pod světelným mikroskopem počítalo množství buněk. Podle vzorce se přepočítalo množství suspenze, potřebné pro naočkování daného živného média o objemu 10 ml.



Obr. 3: Bürkerova komůrka. Upraveno (<http://www.optingservis.cz/index.php/nabidka-zboi/344-cyrusova-bkerova-komka-a-dalc>)

4.3.2 Počítání buněk v Bürkerově komůrce

Počítací síť Bürkerovy komůrky je tvořena 9 velkými čtverci (každý o ploše 1 mm^2), které jsou dále rozděleny do 16 menších čtverců (jejich plocha je $0,04 \text{ mm}^2$) (Obr. 4, Tab. 1). Při počítání buněk pomocí počítací komůrky je nejprve nanesen malý objem testované suspenze ($20\text{--}25 \mu\text{l}$) mezi krycí a podložní sklo. Takto připravená počítací komůrka se vloží do zorného pole světelného mikroskopu a po zaostření se může přistoupit k samotnému počítání buněk. Při počítání mikroskopických částic pomocí počítacích komůrek se započítávají pouze ty, které se nacházejí uvnitř čtverce a částice, které se z vnitřní nebo vnější strany dotýkají dvou námi zvolených stran (např. horní a levá). Tím se zabrání dvojímu počítání částic a minimalizuje se chyba.

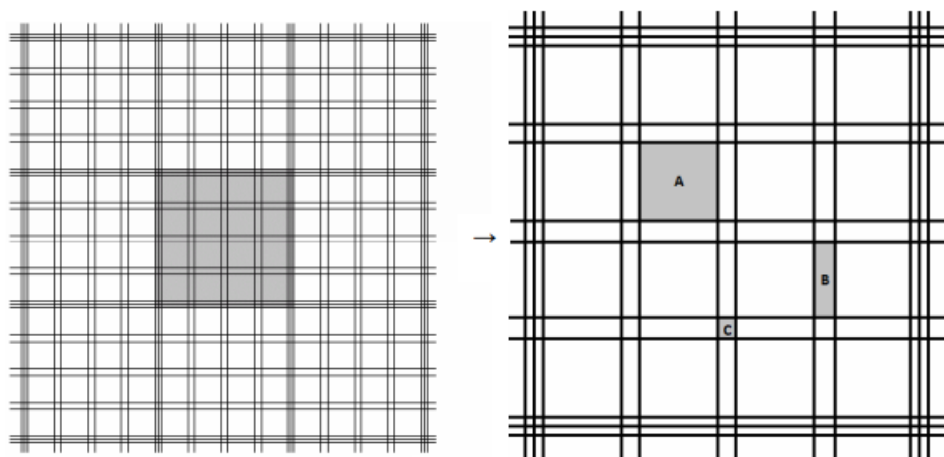
Pro stanovení koncentrace částic v 1 ml suspenze se používá výpočet:

$$X = \frac{a \cdot 10^4}{n}$$

X.....koncentrace buněk v suspenzi

a.....stanovený počet buněk

n.....počet opakování (počet spočítaných čtverců)



Obr. 4 : Počítací síť Bürkerovy komůrky.

Tab. 1: Velikost útvarů v počítací síti Bürkerovy komůrky.

	Rozměry	Plocha	Hloubka	Objem
Velký čtverec	1 x 1 mm	1 mm ²	0,1 mm	0,1 mm ³
Čtverec A	0,2 x 0,2 mm	0,04 mm ²	0,1 mm	0,004 mm ³
Obdélník B	0,05 x 0,2 mm	0,01 mm ²	0,1 mm	0,001 mm ³
Čtverec C	0,05 x 0,05 mm	0,0025 mm ²	0,1 mm	0,00025 mm ³

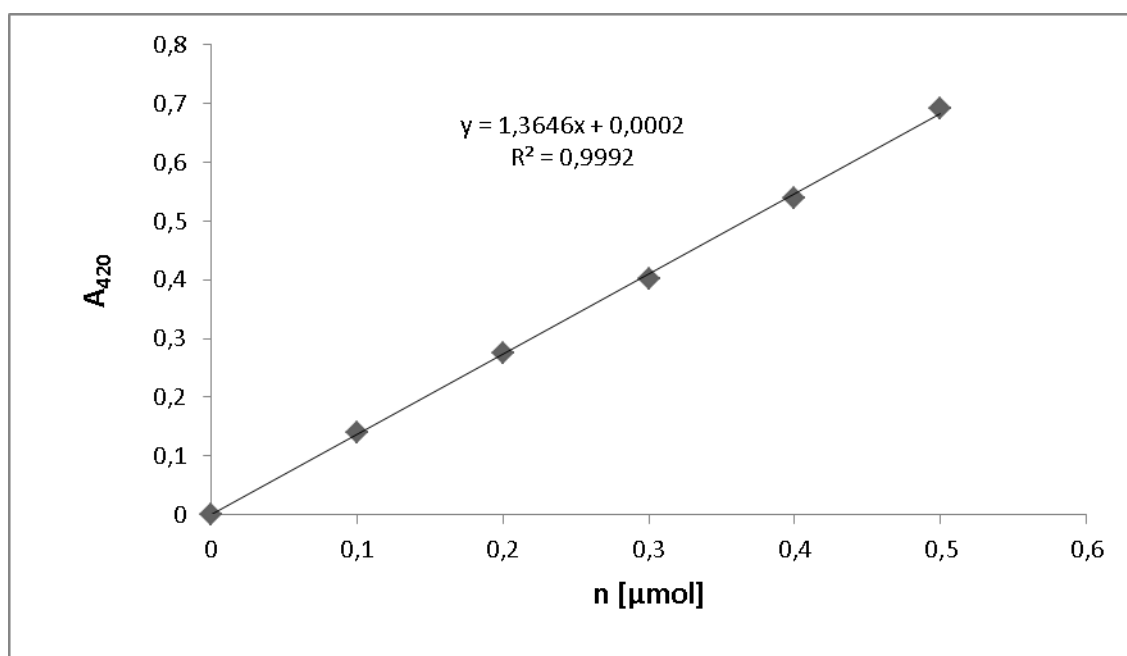
4.3.3 Stanovení kalibračních křivek

4.3.3.1 Stanovení kalibrační křivky *p*-nitrofenolu

Pro sestavení kalibrační křivky *p*-nitrofenolu (*p*-NF) byl použit základní roztok *p*-nitrofenolu o koncentraci 1,0 mM ($\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$). Z tohoto roztoku byla příslušným naředěním připravena kalibrační řada *p*-nitrofenolu o látkovém množství 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 μmol (Tab. 2). K roztokům bylo přidáno 0,65 ml 50 mM fosfátového pufru (pH 7,2). Obsah zkumavek byl promíchán a inkubován při 37°C v termostatu po dobu 10 minut. Poté k nim bylo přidáno 0,1 ml 0,1 M Na₂CO₃. Následně byla spektrometricky měřena absorbance při 420 nm.

Tab. 2: Kalibrační křivka *p*-nitrofenolu.

Zkumavka	1	2	3	4	5	Blank
<i>p</i> -NF [ml]	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,0
fosf.pufr [ml]	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65
voda [ml]	0,4	0,3	0,2	0,1	0,0	0,5
Na ₂ CO ₃ [ml]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
n <i>p</i> -NF [μmol]	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,0



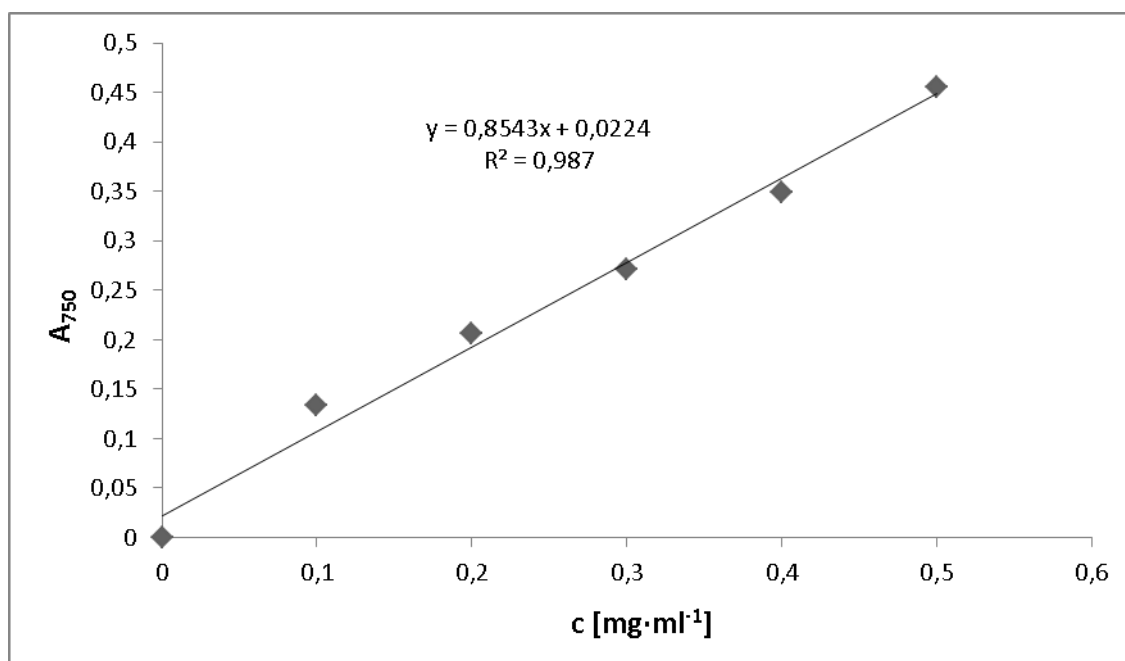
Graf 1: Kalibrační křivka *p*-nitrofenolu.

4.3.3.2 Stanovení kalibrační křivky albuminu

Ředěním zásobního roztoku hovězího sérového albuminu o koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla připravena kalibrační řada s koncentracemi albuminu 0,0 (blank); 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Tab. 3). K takto naředěným vzorkům albuminu bylo přidáno 5 ml roztoku C, směs se nechala 10 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku D a po 30 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla spektrometricky měřena absorpance vzorků při 750 nm.

Tab. 3: Kalibrační křivka albuminu.

Zkumavka	1	2	3	4	5	Blank
V _{alb} [ml]	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,0
V H ₂ O [ml]	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	1,0
roztok C [ml]	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
roztok D [ml]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
C _{alb} [mg·ml ⁻¹]	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,0

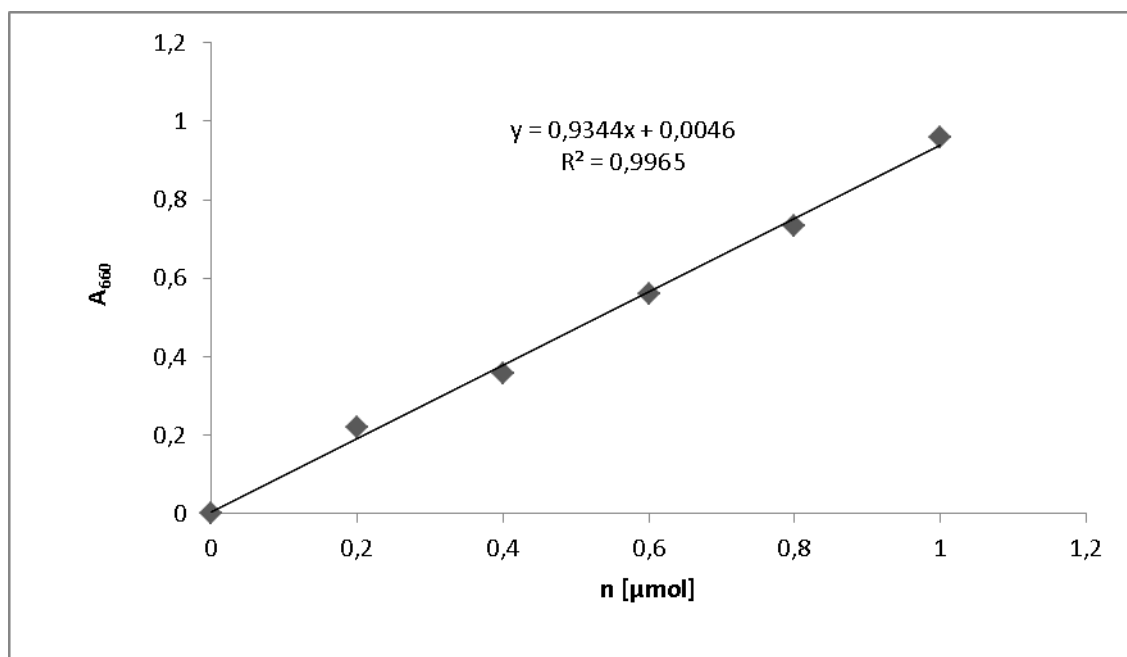


Graf 2: Kalibrační křivka albuminu.

4.3.3.3 Stanovení kalibrační křivky L-tyrosinu

Pro stanovení kalibrační křivky L-tyrosinu se použilo 6 zkumavek, do kterých se napipetovalo 1,1 mM standartního roztoku tyrosinu v objemech: 0,025; 0,05; 0,10; 0,20 a 0,25 ml. Do blanku tyrosin přidán nebyl. Celkový objem ve zkumavkách byl upraven na objem 1 ml destilovanou vodou (Tab. 4). Do všech zkumavek bylo dále přidáno 2,50 ml Na₂CO₃ a 0,50 ml F-C činidla. Všechny zkumavky byly promíchány a inkubovány při 37°C po dobu 30 minut. Absorbance vzorků byla měřena na spektrofotometru při vlnové délce 660 nm. Pro každou koncentraci byly provedeny 3 paralelní měření.

Tab. 4: Kalibrační křivka L-tyrosinu.



Zkumavka	1	2	3	4	5	Blank
tyrosin [ml]	0,025	0,05	0,10	0,20	0,25	0,00
dest.voda [ml]	0,975	0,95	0,90	0,80	0,75	1,00
Na ₂ CO ₃ [ml]	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
F-C [ml]	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
n tyrosin [μmol]	0,055	0,111	0,221	0,442	0,553	0,00

Graf 3: Kalibrační křivka L-tyrosinu.

4.3.4 Spektrometrické stanovení lipolytické aktivity

Princip:

Principem spektrometrického měření lipolytické aktivity je měření množství uvolněného *p*-nitrofenolu v důsledku štěpení *p*-nitrofenylesteru mastné kyseliny působením enzymu po určitou dobu. Intenzita vzniklého žlutého zbarvení je přímo úměrná aktivitě enzymu a měří se při 420 nm.

Postup:

Lipolytická aktivita byla stanovena spektrometricky měřením absorbance při 420 nm. Jako substrát byl použit 2,5 mM roztok *p*-nitrofenyllaurátu (C12:0) v ethanolu. Byla měřena lipolytická aktivita enzymů vázaných na povrch buněk a lipolytická aktivita extracelulárních enzymů.

Vzorek pro stanovení extracelulární enzymatické aktivity byl odebrán z buněčné suspenze a zcentrifugován (10 000 ot/min, 4°C, 2 min), čímž se oddělily extracelulární produkty od vlastní buněčné hmoty. Poté byl supernatant naředěn vodou v poměru 1:10 a bylo odebráno 0,05 ml naředěného roztoku, k němu bylo přidáno 0,65 ml 50 mM fosfátového pufru (pH 7,2) a 0,05 ml substrátu *p*-nitrofenyllaurátu (C12:0) v ethanolu. Reakční směs byla promíchána a inkubována při 37°C po dobu 10 minut v termostatu. V případě stanovení lipolytické aktivity na povrchu buněk byla centrifugace provedena až po inkubaci reakční směsi 10 minut v termostatu. Poté bylo k reakční směsi přidáno 0,1 ml 0,1 M roztoku Na₂CO₃, směs byla opět promíchána a byla změřena absorbance při 420 nm. Jako blank byl použit vzorek, který místo 0,05 ml *p*-nitrofenyllaurátu (C 12:0) obsahoval stejné množství destilované vody.

Vyjádření aktivity:

Enzym má aktivitu 1 jednotka (U), jestliže dojde k uvolnění 1 μmolu *p*-nitrofenolu za minutu (za přesně definovaných podmínek).

Výpočet lipolytické aktivity:

Při výpočtu lipolytické aktivity se vychází z rovnice lineární regrese získané vyhodnocením kalibrační křivky *p*-nitrofenolu.

Vzorec pro výpočet lipolytické aktivity:

$$x = \frac{A_{420} + b}{a \cdot V \cdot t}$$

xlipolytická aktivita enzymu [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1} = \text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$]

A_{420}absorbance naměřená u jednotlivých vzorků

tdoba inkubace [min]

Vobjem enzymu [ml]

b, ahodnoty z rovnice lineární regrese potřebné pro výpočet

4.3.4.1 Stanovení optimálního živného média pro produkci lipolytických enzymů

Pro stanovení optimálního zdroje uhlíku na produkci lipolytických enzymů bylo použito bazální médium obohacené o různé zdroje uhlíku jako glukóza, olivový olej, Tween 20, Tween 60, Tween 80 a Triton X-100. Výsledky byly srovnány s bazálním médiem bez přidaného zdroje uhlíku s ohledem na dosaženou lipolytickou aktivitu.

4.3.4.2 Substrátová specifita

Substrátová specifita byla testována u kmenů *Pseudozyma fusiformata*, *Meyerozyma guilliermondii* a *Yarrowia lipolytica* a média byla zvolena na základě výsledků lipolytické aktivity. V případě kmene *Pseudozyma fusiformata* bylo použito bazální médium s Tweenem 60, v případě kmenů *Meyerozyma guilliermondii* a *Yarrowia lipolytica* bylo použito bazální médium s Tweenem 80. Testovány byly tři substráty, a to *p*-nitrofenylbutyrát (C4:0), *p*-nitrofenyllaurát (C12:0), *p*-nitrofenylpalmitát (C16:0). Pro další testování byl vybrán substrát, vůči kterému vykazovaly testované lipázy nejvyšší substrátovou specifitu.

4.3.4.3 Stanovení pH optima a pH stability

pH optimum bylo stanoveno podle bodu 4.3.4, ale při různých hodnotách pH pufru, a to od 5,8 do 10,4 (měřeno po 0,2). Pro stanovení byl použit zcentrovaný supernatant. Pro měření v oblastech pH 5,2–8,0 byl použit fosforečnanový pufr, pro stanovení pH optima při pH 8,6–10,4 byl použit glycin - hydroxid sodný pufr.

Hodnota pH, při které byla aktivita nejvyšší, byla poté použita při měření teplotního optima. V případě stanovení pH stability byl zcentrovaný supernatant přidán k různým hodnotám pH pufru (5,8–10,4) po dobu 24 hodin a ponechán v chladicím boxu při 4°C, poté byla stanovena lipolytická aktivita jako v bodě 4.3.4.

4.3.4.4 Stanovení teplotního optima a tepelné stability

Při stanovení teplotního optimum bylo postupováno stejně jako při stanovování lipolytické aktivity v bodě 4.3.4, ale inkubace probíhala při různých teplotách: 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 a 70 °C. Byl použit supernatant.

Měření tepelné stability probíhalo ve vodní lázni při 40°C, kdy supernatant byl naředěn vodou v poměru 1:4 a inkubován po dobu 11 dní. Odběry se prováděly dvakrát denně a měření probíhalo stejně jako při stanovení lipolytické aktivity v bodě 4.3.4.

4.3.4.5 Stanovení skladovací stability

Skladovací stabilita byla měřena po dobu 5 týdnů, kdy supernatant byl uskladněn v lednici při 4°C a v mrazicím boxu při -20°C. Každý týden byly odebrány vzorky a probíhalo měření skladovací stability jako v bodě 4.3.4.

4.3.5 Spektrometrické stanovení bílkovin podle Lowryho

Princip:

Stanovení je založeno na spojení biuretové reakce (vazba Cu^{2+} na peptidové vazby v alkalickém prostředí) s redukcí Folin-Ciocalteova činidla (směs fosfowolframové a fosfomolybdenanové kyseliny) bílkovinami na komplexy molybdenanové modři. Redukce je způsobena především oxidací tyrosinu a tryptofanu, které jsou vázané v peptidovém řetězci. Intenzita modrého zbarvení je přímo úměrná množství těchto aminokyselin a měří se při 750 nm.

Postup:

Ze zředěného supernatantu, který byl použit i na stanovení lipolytické aktivity, bylo odebráno 0,2 ml vzorku. K vzorku byl přidán 1 ml roztoku C a směs nechána 10 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 0,1 ml roztoku D a po 30 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla měřena absorbance při 750 nm.

Výpočet množství bílkovin:

Při výpočtu množství bílkovin ve vzorku se vychází z rovnice lineární regrese získané vyhodnocením kalibrační křivky z Lowryho metody.

Vzorec pro výpočet celkového množství bílkovin:

$$c = \frac{A_{750} - b}{a} \cdot f$$

c.....množství bílkovin [mg·ml⁻¹]

*A*₇₅₀.....absorbance naměřená u jednotlivých vzorků

f.....ředicí faktor

b, a.....hodnoty z rovnice lineární regrese potřebné pro výpočet

Vzorec pro výpočet specifické aktivity:
(Jedná se o aktivitu vyjádřenou v U·mg⁻¹):

$$a_{sp} = \frac{a}{c}$$

*a*_s.....specifická aktivita enzymu [U·mg⁻¹]

a.....lipolytická aktivita enzymu [μmol·min⁻¹·ml⁻¹= U·ml⁻¹]

c.....množství bílkovin [mg·ml⁻¹]

4.3.6 Spektrometrické stanovení proteolytické aktivity

Princip:

Proteolytická aktivita se stanovuje pomocí standardizované metody za použití kaseinu jako substrátu. V průběhu reakce se uvolňuje aminokyselina tyrosin, popřípadě další aminokyseliny a části peptidů. Folin-Ciocalteuovo činidlo (F-C činidlo) reaguje s uvolněným tyrosinem a vzniká modře zbarvený chromofor, který je spektrofotometricky kvantifikován a měřen na spektrofotometru jako hodnota absorbance. Čím více tyrosinu je uvolňováno z kaseinu, tím více chromoforu je tvořeno a je silnější aktivita proteáz. Hodnota absorbance je srovnávána s kalibrační křivkou, která je stanovena reakcí známého množství tyrosinu s F-C činidlem (změny absorbance korelují s množstvím tyrosinu v μmolech). Aktivita proteáz je

stanovena z kalibrační křivky jako U, což je množství v μ molech tyrosinu uvolněného z kaseinu za minutu (23).

Postup:

Pro každý testovaný vzorek byly zapotřebí 3 zkumavky. Jedna zkumavka se použila jako blank a dvě zbývající sloužily ke stanovení aktivity dvou různě zředěných proteáz. Dvě ředění byla vhodná pro kontrolu konečného výpočtu pro srovnání mezi sebou. Do každé zkumavky se napipetovalo 2,5 ml 0,65% kaseinu, který byl nejprve ponechán ve vodní lázni při 37°C po dobu 5 minut. Poté se do 2 zkumavek přidal různý objem roztoku enzymu (0,5 a 0,25 ml), třetí zkumavka byla použita jako blank. Směs se rozmíchala a inkubovala při 37°C přesně 10 minut. Aktivita proteáz a následné uvolnění tyrosinu během inkubace bylo měřeno a srovnáno mezi testovanými vzorky. Po 10 minutách inkubace se do každé zkumavky včetně blanku přidalo 2,5 ml TCA pro zastavení reakce. Poté byl doplněn objem roztoku enzymu do každé zkumavky včetně blanku tak, aby celkový objem enzymu v každé zkumavce byl 0,5 ml, což sloužilo pro zjištění hodnoty absorbance samotného enzymu a pro zajištění stejného konečného objemu ve všech zkumavkách. Roztok se inkuboval při 37°C 30 minut. Po inkubaci se suspenze kvasinek centrifugovala (15 000 rpm, 4°C, 5 min) a supernatant byl použit pro následující krok. Do dvou čistých zkumavek byl napipetován 1 ml supernatantu a do třetí zkumavky 1 ml zcentrifugovaného blanku. Do každé zkumavky bylo přidáno 2,5 ml roztoku 500 mM Na_2CO_3 a 0,5 ml F-C činidla. Testované vzorky byly promíchány a inkubovány při teplotě 37°C 30 minut. Absorbance byla měřena jako modré zbarvení při 660 nm. Výpočet koncentrace proteinů byl založený na rovnici lineární regrese získané z vyhodnocení kalibrační křivky L-tyrosinu.

Výpočet proteolytické aktivity:

Při výpočtu proteolytické aktivity se vychází z rovnice lineární regrese získané vyhodnocením kalibrační křivky L-tyrosinu.

Vzorec pro výpočet proteolytické aktivity:

$$y = V_c \cdot \frac{A_{660} - b}{a \cdot V_e \cdot t}$$

yproteolytická aktivita enzymu [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1} = \text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$]
 A_{660} ...absorbance naměřená u jednotlivých vzorků
 tdoba inkubace [min]
 V_eobjem enzymu [ml]
 V_ccelkové množství roztoku [ml]
 b, ahodnoty z rovnice lineární regrese potřebné pro výpočet

4.3.7 Měření pH kvasinek

pH bylo měřeno ze suspenze kvasinek na pH metru v časových intervalech 0, 3, 6, 9, 24, 48, 72 a 96 hodin při teplotě 25°C.

4.3.8 Kontinuální kultivace v bioreaktoru

4.3.8.1 Příprava inokula pro kultivaci v bioreaktoru

Příprava inokula, potřebného pro zaočkování živného média v bioreaktoru o objemu 600 ml, byla provedena stejně jako v bodě 4.3.1.

4.3.8.2 Kontinuální kultivace kvasinky *Y. lipolytica*

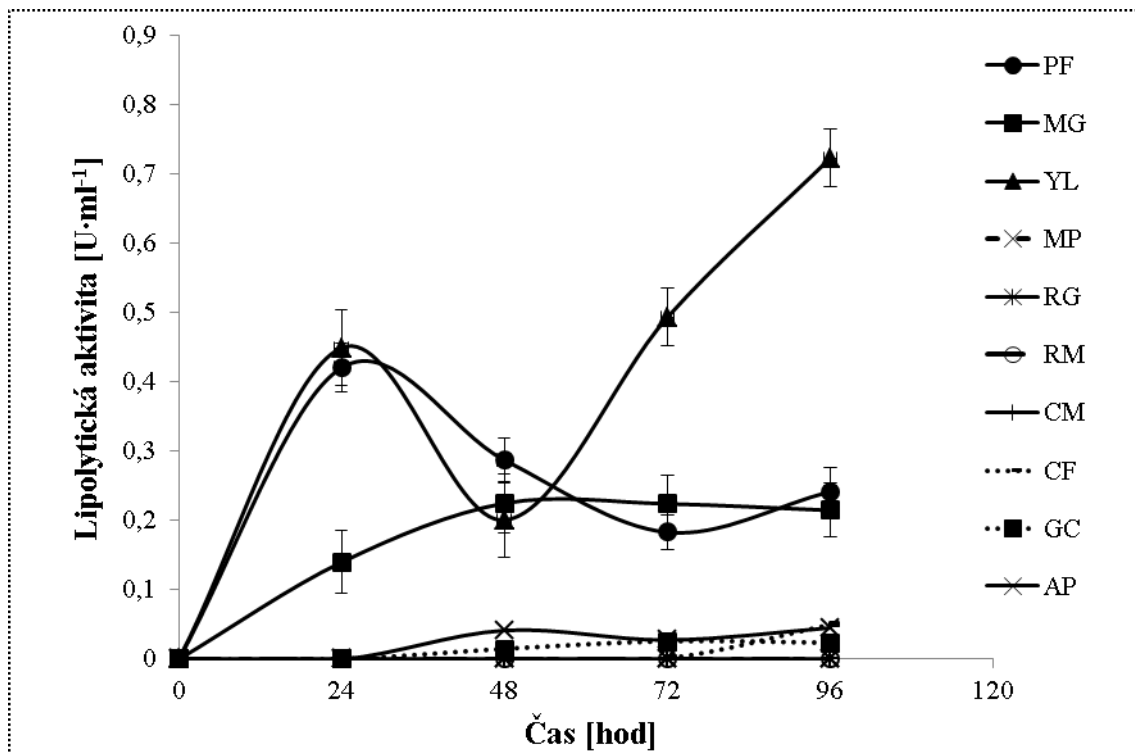
Byla provedena kultivace kvasinky *Y. lipolytica* v bioreaktoru, kde byl po dobu 96 hodin zajištěn kontinuální průtok živného média 5 ml za hodinu, teplota 25°C a rychlost míchání 160 rpm. Vzorky enzymu byly odebrány po 3, 6, 9, 24, 48 a 96 hodinové kultivaci. Byla stanovena lipolytická a proteolytická aktivita, množství buněk a pH a tyto výsledky byly srovnány s výsledky submerzní kultivace v L-zkumavkách.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

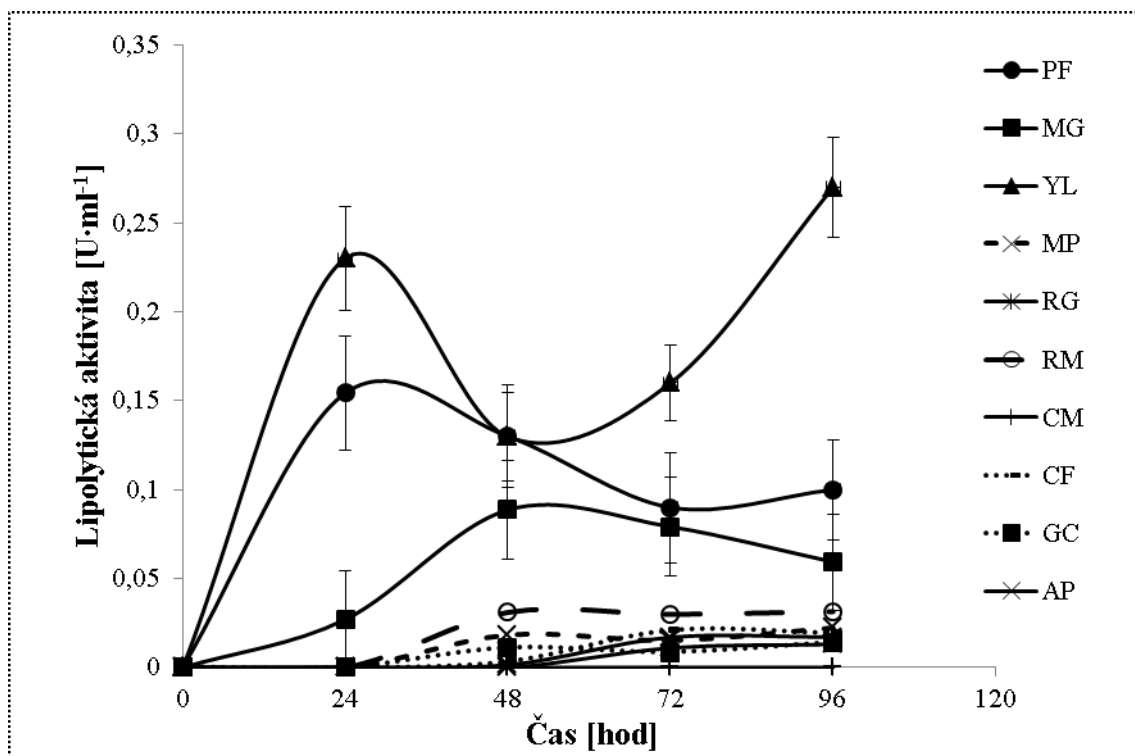
5.1 Srovnání produkce lipolytických enzymů u vybraných druhů kvasinek

Produkcí lipáz ovlivňuje celá řada vnějších faktorů, zejména druh mikroorganismu, teplota, pH prostředí, složení média, koncentrace anorganických solí nebo dostupnost kyslíku, proto se studie zabývá problematikou vlivu vnějších faktorů, výběrem kmene a optimalizací kultivačních podmínek pro produkci lipolytických enzymů.

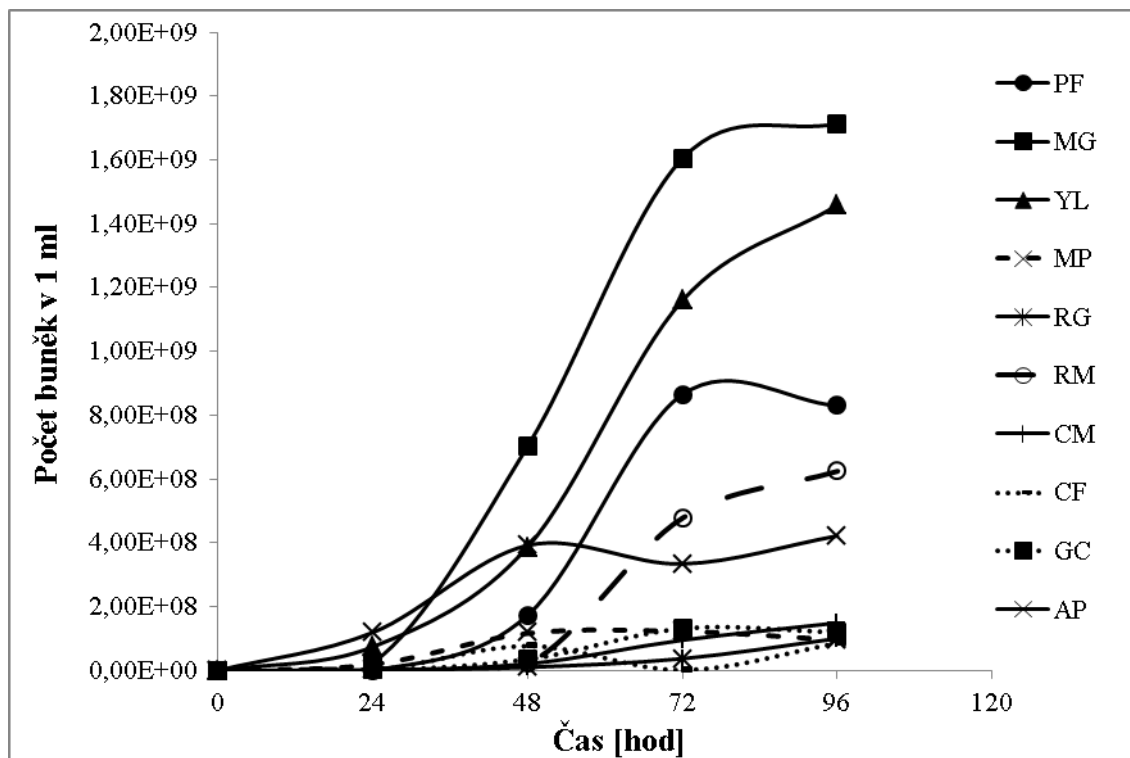
Na základě výsledků předběžné studie zabývající se produkcí lipolytických enzymů u různých druhů kvasinek bylo vybráno 10 kmenů kvasinek, a to *Pseudozyma fusiformata* (PF), *Meyerozyma guilliermondii* (MG), *Yarrowia lipolytica* (YL), *Metschnikowia pulcherrima* (MP), *Rhodotorula glutinis* (RG), *Rhodotorula mucilaginosa* (RM), *Cryptococcus magnus* (CM), *Cryptococcus flavescens* (CF), *Galactomyces candidum* (GC), *Aureobasidium pullulans* (AP). Zvolené kmeny byly zaočkovány do bazálního média obohaceného o Tween 80 a byla u nich sledována lipolytická aktivita jednak extracelulárních enzymů a jednak enzymů vázaných na povrch buněk (Graf 4, 5). Nejvyšší lipolytickou aktivitu vykazovaly, jak v případě extracelulárních enzymů, tak i u enzymů vázaných na povrch buněk, tři kmeny, a to *Pseudozyma fusiformata*, *Meyerozyma guilliermondii* a *Yarrowia lipolytica*, a proto byly vybrány pro další studie. V případě enzymů vázaných na povrch buněk byly hodnoty aktivit nižší zhruba o 35%, což se shoduje se studiemi Kakebeeke P.I.J. a kol. (103) a Pereira-Meirelles a kol. (76), ve kterých enzymy vázané na povrch buněk také vykazovaly nižší aktivitu ve srovnání s enzymy extracelulárními. V další části práce byla tedy dále sledována pouze aktivita extracelulárních lipáz. Růst kvasinek byl charakterizován na základě počítání buněk pomocí Bürkerovy komůrky. Ačkoliv je počítání buněk v komůrce jednoduchá a přesná metoda pro stanovení počtu buněk, nelze brát buněčný růst jako jednoznačný ukazatel produkce lipáz (51). V této studii však růst buněk koreloval s produkcí extracelulárních lipáz a nejvyšší počet buněk v 1 ml byl stanoven za daných experimentálních podmínek taktéž u kvasinek *P. fusiformata*, *M. guilliermondii* a *Y. lipolytica* (Graf 6).



Graf 4: Stanovení lipolytické aktivity extracelulárních enzymů u 10 kmenů kvasinek kultivovaných v bazálním médiu s Tweenem 80.



Graf 5: Stanovení lipolytické aktivity enzymů vázaných na povrch buněk u 10 kmenů kvasinek kultivovaných v bazálním médiu s Tweenem 80.



Graf 6: Růstová křivka u 10 kmenů kvasinek kultivovaných v bazálním médiu s Tweenem 80. Výsledky jsou průměrem ze 2 paralelních měření. Chyba měření byla do 2%.

5.2 Testování vhodného kultivačního média pro produkci lipolytických enzymů

Na základě literární rešerše byla zvolena různá živná média pro stanovení nejvyšší lipolytické aktivity: **BM** (bazální médium), **BM+G** (bazální médium s glukózou), **BM+OO** (bazální médium s olivovým olejem), **BM+TW 20** (bazální médium s Tweenem 20), **BM+TW 60** (bazální médium s Tweenem 60), **BM+TW 80** (bazální médium s Tweenem 80), **BM+TR** (bazální médium obohacené o Triton X-100).

Tato nutriční média se lišila zejména různými zdroji uhlíku. Z pohledu celkového nutričního složení se jednalo o základní médium (BM), které se běžně používá pro kultivaci kvasinek (104). Z důvodu stimulace produkce lipáz bylo bazální médium obohaceno o lipidické zdroje uhlíku, jako byl olivový olej nebo různé detergenty (Tween 20, Tween 60, Tween 80 a Triton X-100). Pro srovnání byl použit také monosacharid glukóza.

Kultivace prováděná submerzním způsobem byla zvolena za účelem dosažení intenzivní aerace po celou dobu experimentu a homogenního rozptýlení kmene v kultivačním médiu, což zajistilo maximální využití živin a intenzivní rozmnožování kvasinek. Submerzní způsob kultivace rovněž umožňuje udržení konstantní teploty a její regulaci po celou dobu

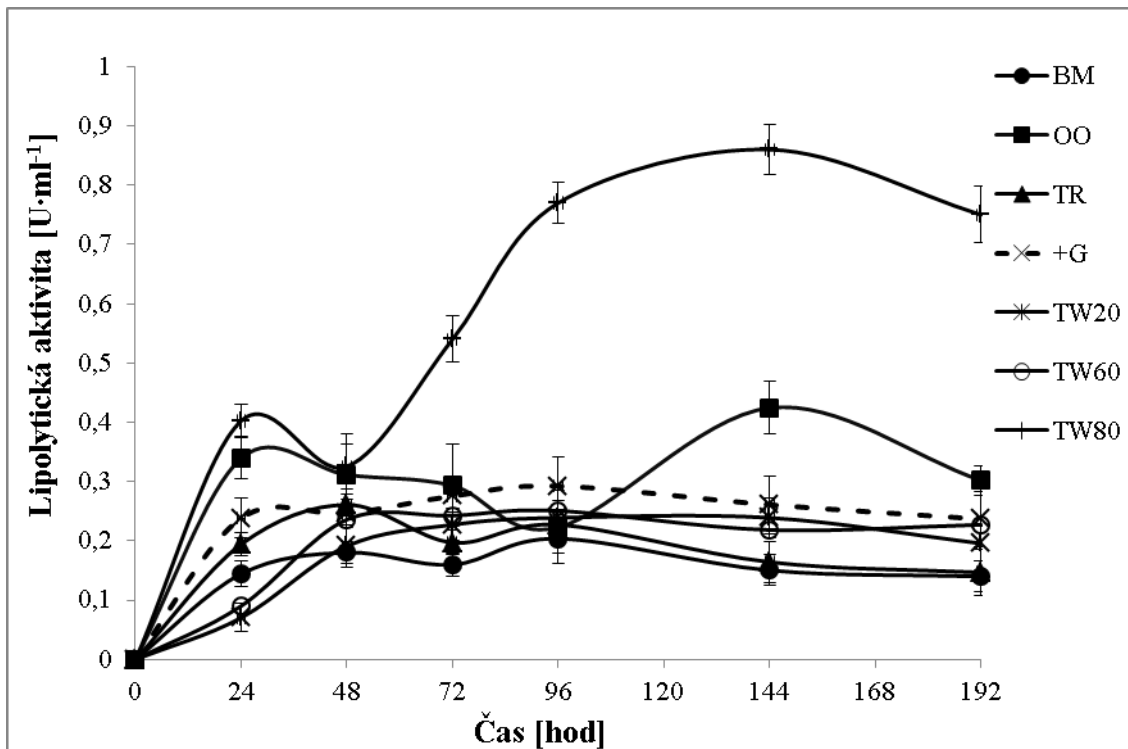
experimentu. Kultivace byla prováděna při 25°C, rychlosti míchání 160 rpm, po dobu 192 hodin a každý den byla měřena lipolytická aktivita za použití *p*-NFL jako substrátu. Na základě vyhodnocených výsledků byla zvolena nejvhodnější živná média pro produkci lipolytických enzymů u kmenů *Yarrowia lipolytica*, *Pseudozyma fusiformata* a *Meyerozyma guilliermondi*.

Z grafu 7 je patrné, že jako nejvhodnější médium pro produkci lipolytických enzymů u kmene *Y. lipolytica* se ukázalo být bazální médium s Tweenem 80. Nárůst lipolytické aktivity byl pozorován v exponenciální fázi růstu po 24 hodinové kultivaci (Graf 7 a 8). Po 96 hodinách, kdy se buňky nacházely již ve stacionární fázi, se aktivita prudce zvýšila, což nejspíš souviselo s tím, že kromě konstitutivních enzymů, které se produkují do média vždy nezávisle na vnějších podmínkách, se začaly produkovat i indukovatelné enzymy. Podobný trend jako při přidavku Tweenu 80 bylo možné pozorovat i u olivového oleje, který lze také považovat za induktora produkce lipolytických enzymů a za dobrý zdroj uhlíku pro produkci lipáz touto kvasinkou (75). Tween 80 a olivový olej působí jako výhradní zdroj uhlíku potřebný pro produkci lipolytických enzymů (105), zatímco pepton a kvasniční extrakt je využíván spíše jako zdroj dusíku (47). Ačkoliv lipidický zdroj uhlíku je důležitý pro produkci lipáz, je potřebný také dusíkatý zdroj (106). Pepton je vhodný pro vysokou produkci extracelulárních lipáz ve srovnání s anorganickými sloučeninami, které syntézu lipáz nevyvolávají (75, 107).

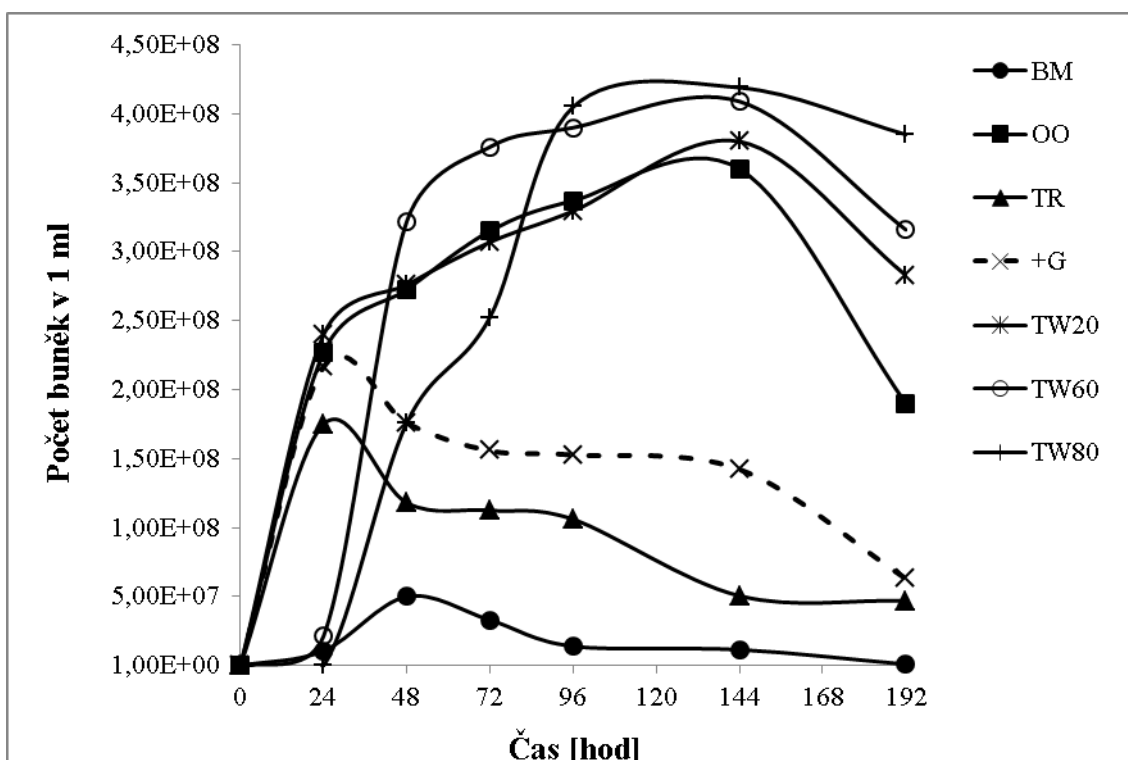
Pokud byla jako zdroj uhlíku použita glukóza, byla detekovaná nižší produkce lipáz než u médií obohacených o Tween 80 a olivový olej, nicméně poměrně vyrovnaná v průběhu celé kultivace. Výsledky odpovídají experimentům, které prováděli Fickers P. a kol. (75), kde byla lipolytická aktivita kmene *Y. lipolytica* LgX64-81 na médiu obohaceném o kyselinu olejovou vyšší (1,5 U.ml⁻¹) než na médiu s glukózou (0,3 U.ml⁻¹) a její hodnota se také začala zvyšovat po 24 hodinové kultivaci.

Nejnižší aktivita i nárůst buněk byly pozorovány u základního bazálního média pravděpodobně z důvodu rychlého vyčerpání hlavních zdrojů uhlíku i dusíku (pepton, kvasniční extrakt). V základním bazálním médiu, kde není přítomný induktor, tak dochází pravděpodobně k produkci pouze konstitutivních enzymů a k rychlejšímu poklesu lipolytické aktivity vlivem snížení buněčného růstu.

Y. lipolytica produkuje širokou škálu lipolytických enzymů, v přírodě kolonizuje hydrofobní substráty (oleje, ropa), kde hraje důležitou roli při degradaci těchto substrátů (72), takže lze očekávat, že tato kvasinka bude mít vysokou lipolytickou aktivitu na bazálních médiích s olivovým olejem nebo Tweenem, což potvrdily i výsledky této studie.

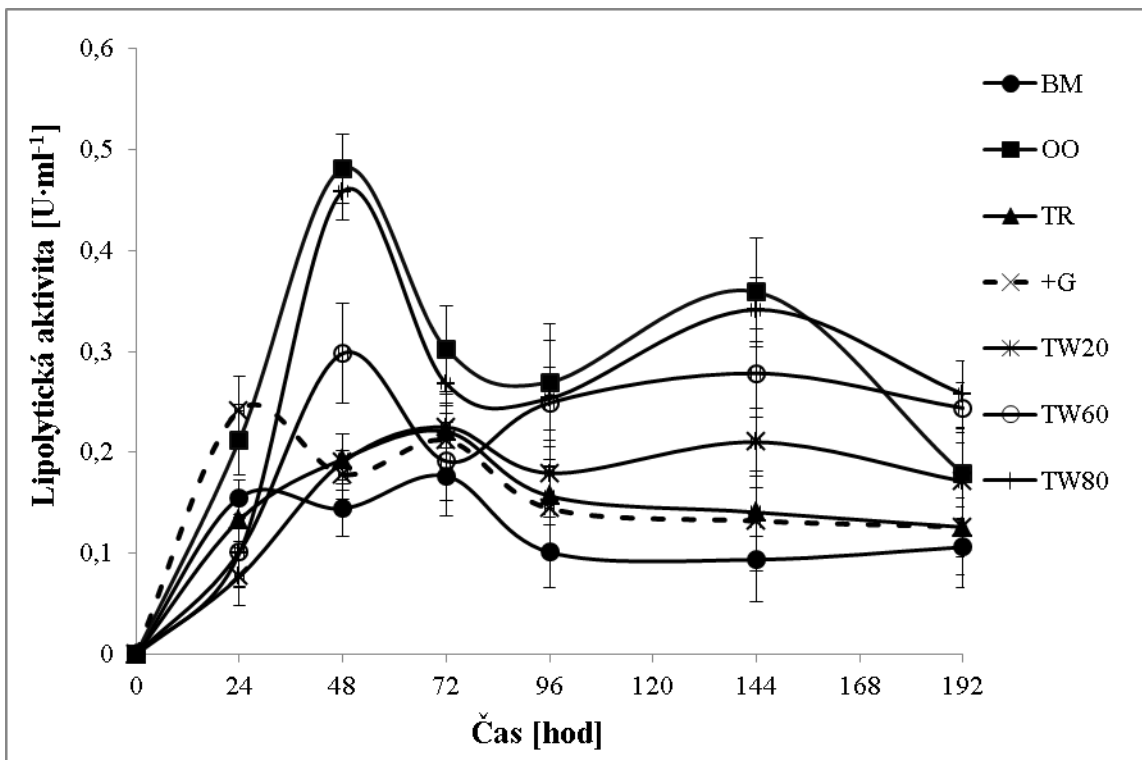


Graf 7: Stanovení lipolytické aktivity extracelulárních enzymů u kmene *Yarrowia lipolytica* kultivovaném v různých médiích.

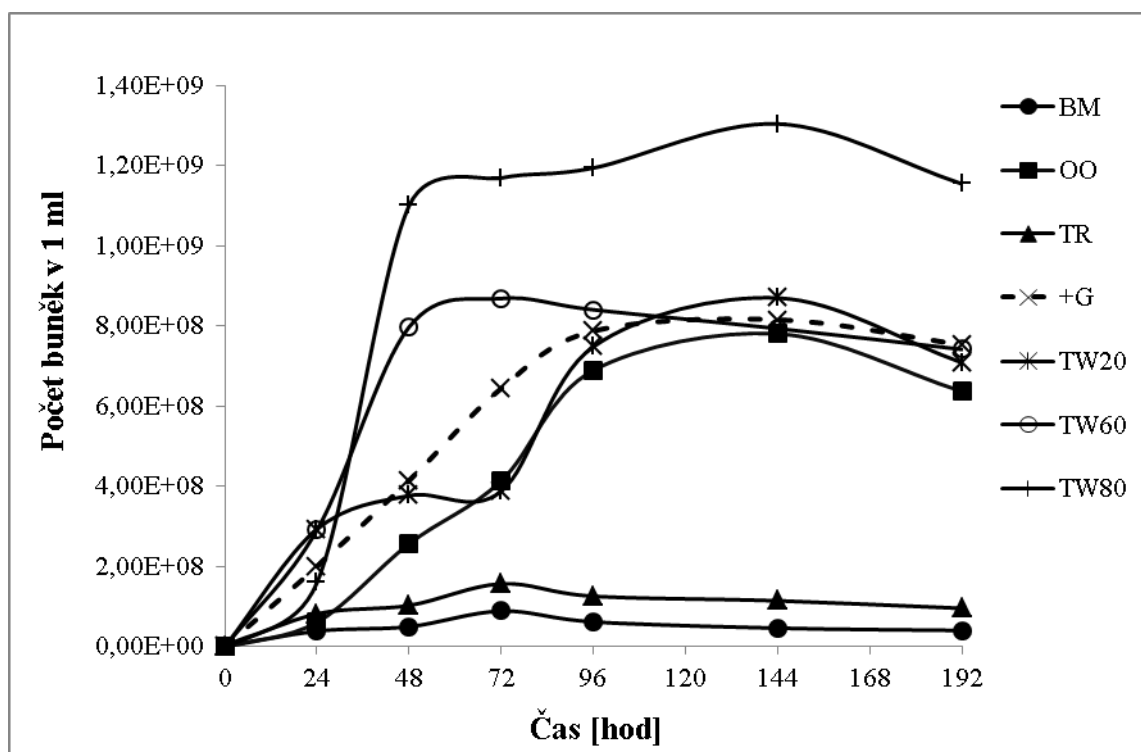


Graf 8: Růstová křivka kmene *Yarrowia lipolytica* kultivovaném v bazálním médiu obohaceném o různé zdroje uhlíku. Průměrná hodnota byla zjištěna na základě dvou paralelních měření. Chyba měření byla do 2%.

V případě produkce lipolytických enzymů kvasinkou *M. guilliermondii* se také jako nejvhodnější jevila bazální média obohacená o Tween 80 a olivový olej (Graf 9 a 10). Tato média vykazovala velmi podobný trend. Lipolytická aktivita byla nejvyšší po 48 hodinách, v průběhu exponenciální fáze růstu. Nejnižší počet buněk stejně jako nízké hodnoty lipolytických aktivit byly opět u základního média, které není obohaceno o žádný přídatný zdroj uhlíku, a proto zde kvasinky rostou pomalu. Podobný průběh jako u základního média má i křivka s bazálním médiem obohaceném o Triton X-100.

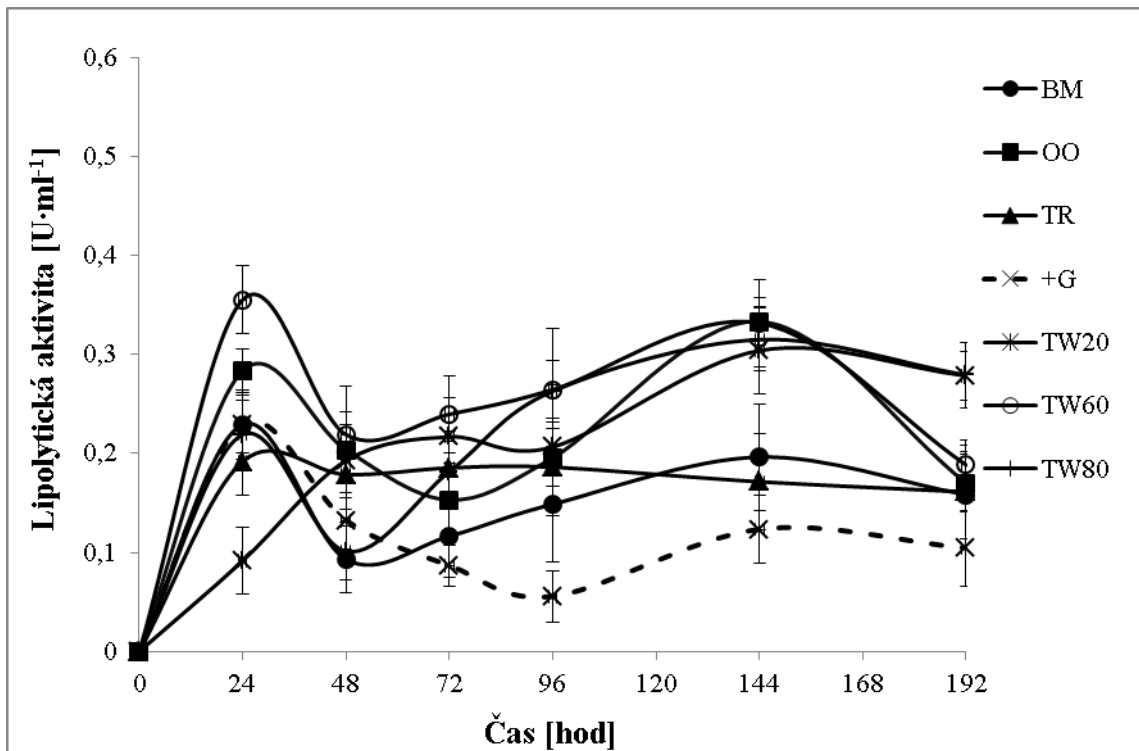


Graf 9: Stanovení lipolytické aktivity extracelulárních enzymů u kmene *Meyerozyma guilliermondii* kultivovaném v různých médiích.

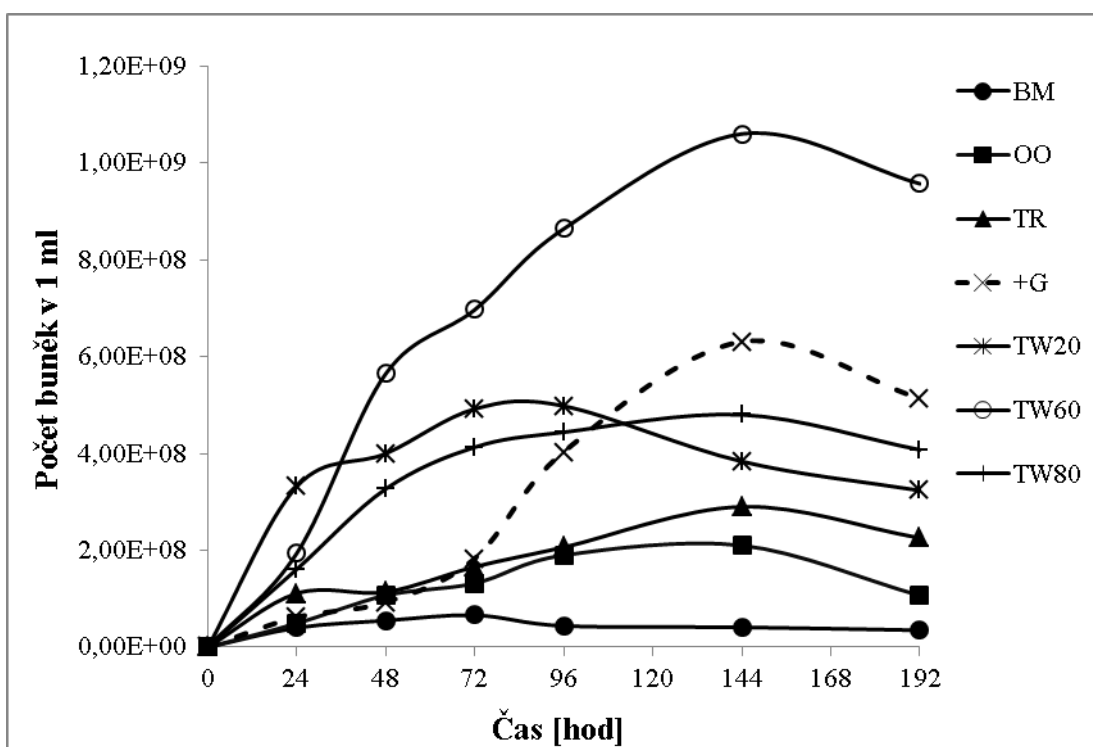


Graf 10: Růstová křivka kmene *Meyerozyma guilliermondii* kultivovaném v bazálním médiu obohaceném o různé zdroje uhlíku. Byla provedena 2 paralelní měření, ze kterých byl udělán průměr. Chyba měření byla do 2%.

Třetím testovaným kmenem byla *P. fusiformata*, u které se jako nejvhodnější jevílo bazální médium obohacené o Tween 60 (Graf 11). Vysoké hodnoty aktivit zde byly zřejmé po 24 a 144 hodinách. Současně byl v tomto médiu detekován i nevyšší buněčný růst (Graf 12). V základním bazálním médiu opět docházelo k výrazně nižší produkci enzymů a nárůstu buněk ve srovnání s médiem, ve kterých byl obsažen Tween.



Graf 11: Stanovení lipolytické aktivity extracelulárních enzymů u kmene *Pseudozyma fusiformata* kultivovaném v různých médiích.



Graf 12: Růstová křivka kmene *Pseudozyma fusiformata* kultivovaném v bazální médium obohaceném o různé zdroje uhlíku. Byla provedena 2 paralelní měření, ze kterých byl udělán průměr. Chyba měření byla do 2%.

U všech testovaných kmenů se pro produkci lipáz jevílo jako optimální použití bazálního média obohaceného o Tween 80 respektive 60 popřípadě olivový olej.

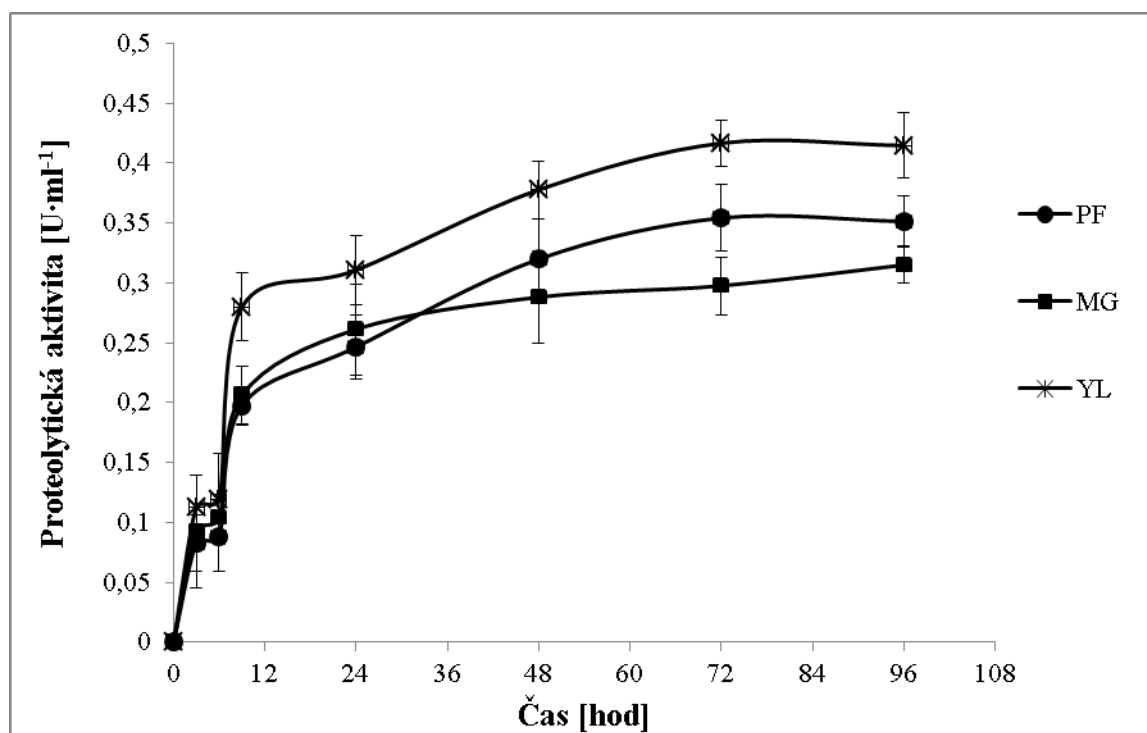
Využití detergentů jako Tween nebo Triton pro stimulaci produkce lipáz je poměrně známý fakt, nicméně výsledky získané v jednotlivých studiích nejsou jednoznačné. K podobným výsledkům jako v naší studii dospěl také Yadav S. a kol. (108), v jehož práci bylo bazální médium s 2% Tweenem 80 vyhodnoceno jako nejlepší médium pro produkci lipolytických enzymů ve srovnání s Tweenem 20 a kultivační médium s Tritonem X-100 dokonce inhibovalo jak růst buněk tak i produkci lipáz. Ve studii Dominguez a kol. (109), byly také surfaktanty, zejména Tween 80 použity pro produkci lipolytických enzymů u *Y. lipolytica*, stejně jako ve studii Zeng X. a kol. (110), který také stanovil Tween 80 a Tween 20 jako nejlepší induktory produkce lipáz kmenem *Pseudoalteromonas* sp. WP37 při 25°C.

V případě základního bazálního média, obsahujícího pouze pepton a kvasničný extrakt byla u všech testovaných kmenů pozorována nejnižší produkce lipáz. Tento trend koreloval i s výrazně nízkým buněčným růstem. Navíc produkce lipolytických enzymů byla více méně konstantní po celou dobu kultivace, což naznačuje možnost produkce pouze konstitutivních enzymů, které jsou buňkami produkovány nezávisle na vnějších podmínkách. Podobné výsledky jako u bazálního média byly pozorovány i u média obohaceného o glukózu, ve kterém byly hodnoty aktivit i nárůstů nízké a pravděpodobně také zde byly produkovány pouze konstitutivní enzymy. Navíc v případě *P.fusiformata* došlo ke katabolické represi, kdy glukóza způsobila potlačení syntézy lipolytických enzymů.

5.3 Stanovení proteolytické aktivity

Na sekreci lipolytických enzymů i extracelulárních proteinů mohou mít vliv proteolytické enzymy, které katalyzují hydrolytické štěpení proteinů. Jejich produkce byla detekována u všech testovaných kmenů kvasinek. Nejvyšší proteolytická aktivita byla měřena u kmene *Y. lipolytica*, ačkoliv trend křivek u všech tří kvasinek byl podobný a po celou dobu kultivace aktivita rostla (Graf 13). Vzhledem k tomu, že pH prostředí se pohybovalo u kvasinky *Y. lipolytica* v rozmezí 4,6 až 5,4 a u kvasinek *P. fusiformata* a *M. guilliermondii* v rozmezí 6,0 až 6,8 (Graf 17), lze předpokládat, že se jednalo především o kyselé až neutrální extracelulární proteázy, které jsou produkovány při nižších hodnotách pH (3, 103). Vzhledem k tomu že proteázy štěpí peptidovou vazbu v bílkovinách, lze předpokládat, že s rostoucí aktivitou proteáz bude koncentrace bílkovin klesat, což je patrné i při porovnání grafu 13 s koncentrací bílkovin (Graf 14), kde po 24 hodinách začala

proteolytická aktivita růst, zatímco koncentrace bílkovin klesla. V literatuře je také často spojován pokles produkce lipáz s rostoucí sekrecí proteáz, což se v této studii nepotvrdilo.



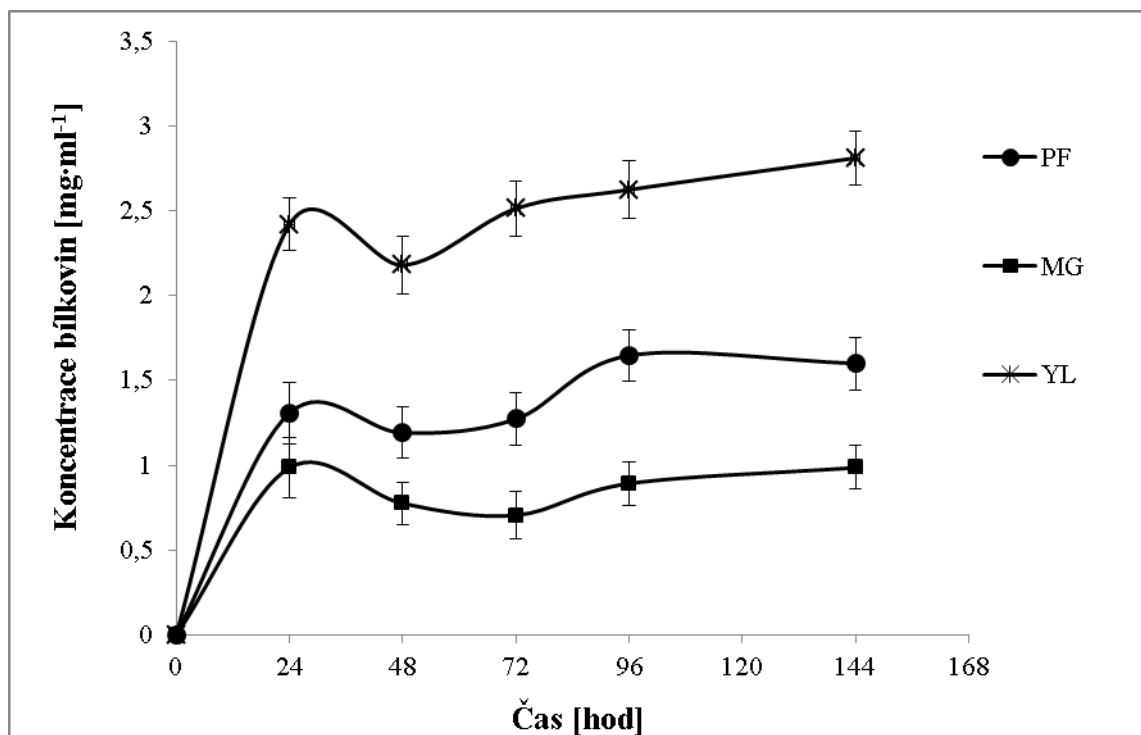
Graf 13: Stanovení proteolytické aktivity *P. fusiformata*, *M. guilliermondii* a *Y. lipolytica*.

5.4 Stanovení koncentrace extracelulárních bílkovin podle Lowryho

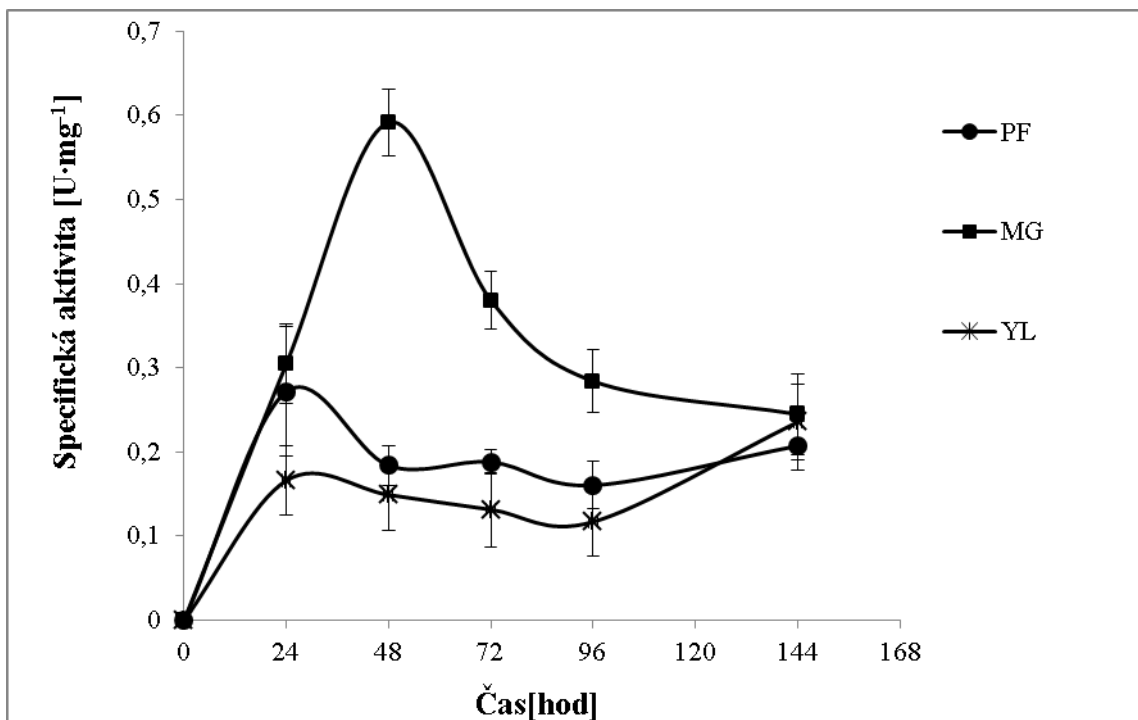
Koncentrace extracelulárních bílkovin stanovená Lowryho metodou byla měřena u kvasinek *P. fusiformata*, *Y. lipolytica* a *M. guilliermondii*. Na základě zjištěného množství proteinů byla stanovena specifická aktivita enzymu. V grafu 14 je zobrazena koncentrace bílkovin v průběhu celé kultivace. Je vidět, že největší množství bílkovin bylo produkováno kvasinkou *Y. lipolytica*, přičemž trend byl velmi podobný u všech tří kvasinek po celou dobu kultivace.

Po přepočítání lipolytické aktivity na specifickou aktivitu (Graf 15 a 16), tedy lipolytickou aktivitu vztáženou na koncentraci bílkovin, byla specifická aktivita po 24 hodinách kultivace nejvyšší u kmene *M. guilliermondii* a naopak nejnižší u kvasinky *Y. lipolytica*. Z tohoto je patrné, že kvasinka *Y. lipolytica* produkovala kromě lipolytických enzymů i velké množství jiných bílkovin (např. glykoproteiny, fosfoproteiny, glutatiol) (50) na rozdíl od kvasinek *P. fusiformata* a *M. guilliermondii*. K celkovému množství proteinů přispívaly i proteolytické enzymy, jejichž aktivita byla nejvyšší u kmene *Y. lipolytica* a rostla po 24 hodinové kultivaci. Po 96 hodinách kultivace je vidět, že specifická aktivita u kvasinky *M. guilliermondii* klesala,

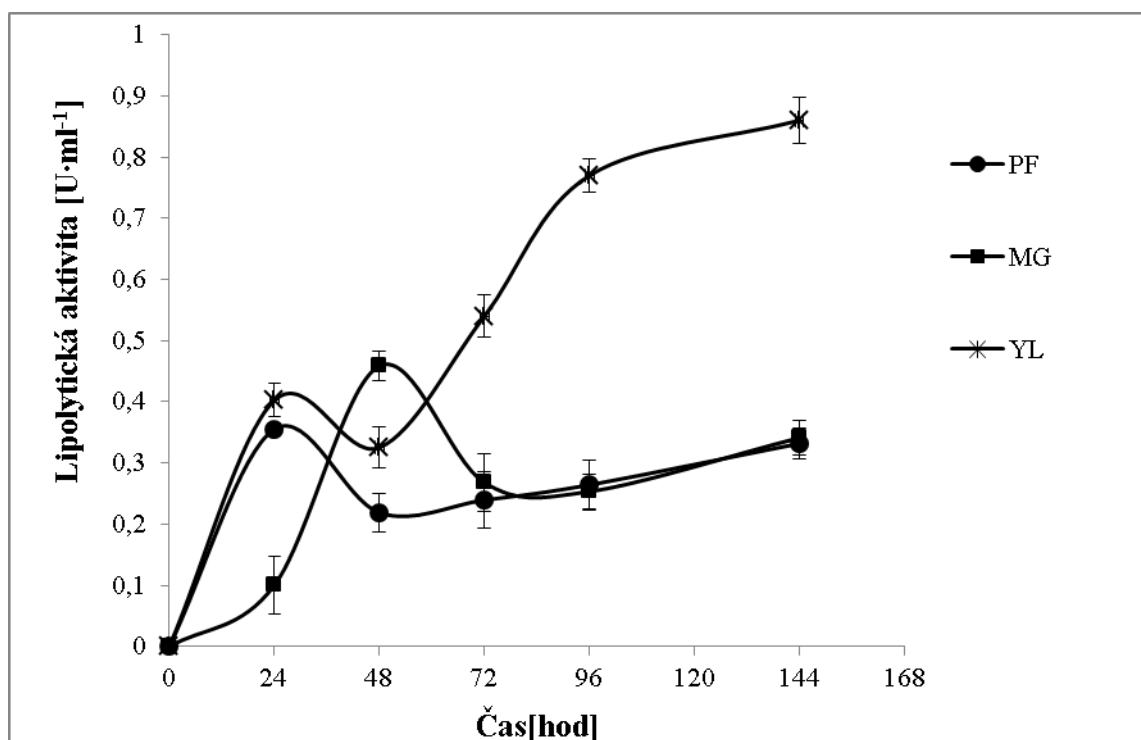
zatímco celkové množství bílkovin zůstávalo u všech kmenů stejné. To znamená, že po 96 hodinách množství produkovaných lipolytických enzymů u kvasinek *Y. lipolytica* a *P. fusiformata* zůstávalo téměř neměnné.



Graf 14: Koncentrace bílkovin u kvasinek *P. fusiformata*, *M. guilliermondii* a *Y. lipolytica*.



Graf 15: Stanovení specifické aktivity u kvasinek *P. fusiformata*, *M. guilliermondii* a *Y. lipolytica*.



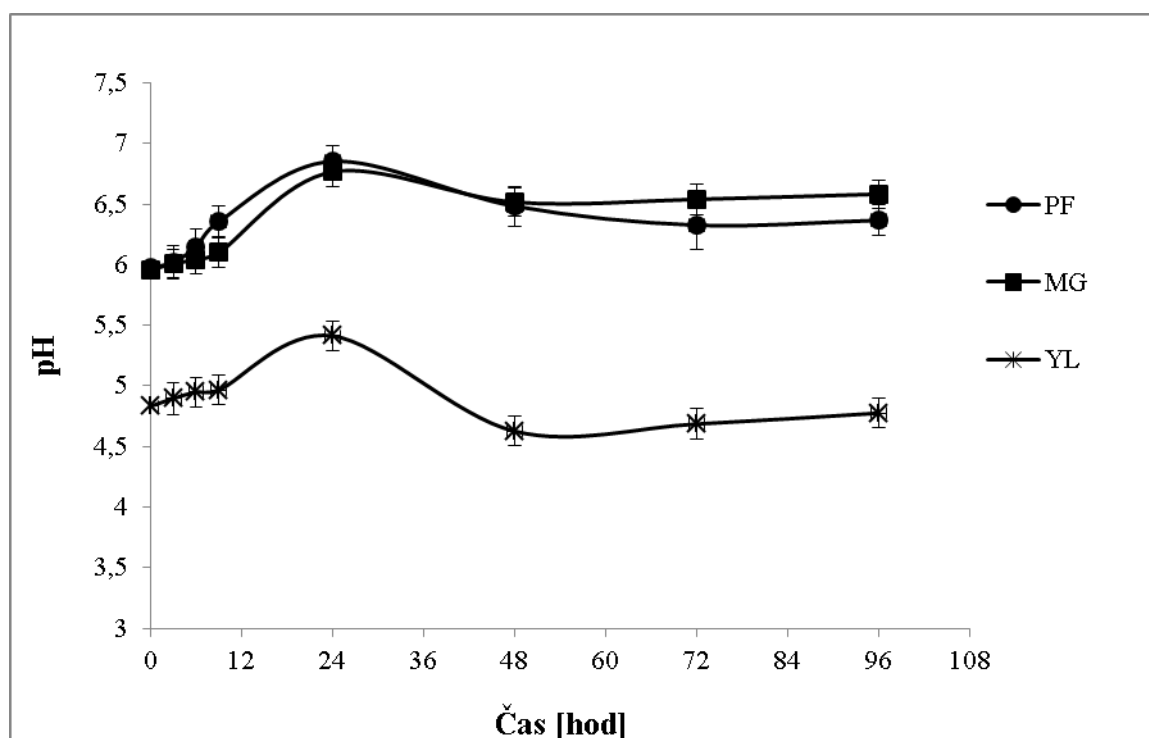
Graf 16: Stanovení lipolytické aktivity u kvasinek *P. fusiformata*, *M. guilliermondii* a *Y. lipolytica*.

5.5 pH prostředí

pH vnějšího prostředí je jedním z faktorů, který ovlivňuje růst kvasinek i produkci enzymů. Kyselé pH vnějšího prostředí je způsobeno membránovými pochody probíhajícími v kvasinkách metabolizujících substráty. Tyto membránové pochody zahrnují činnost ATPáz, tvorbu řady metabolitů například slabých organických kyselin (kyselina octová) vznikajících během metabolických pochodů a transmembránové pohyby iontů (H^+) (111).

Y. lipolytica a *M. guilliermondii* byly kultivované v bazálním médiu s Tweenem 80 a *P.fusiformata* na bazálním médiu s Tweenem 60. Podle grafu 17 je patrné, že pH u kvasinky *Y. lipolytica* je nejnižší a pohybuje se v rozmezí 4,6 až 5,4. U kvasinek *P. fusiformata* a *M. guilliermondii* je hodnota pH podobná a pohybuje se v rozmezí 6,0 až 6,8. Kyselé pH je nejspíš způsobeno vznikem slabých kyselin, které se tvoří v médiu jako produkty buněčného metabolismu.

U kvasinky *Y. lipolytica*, která vykazovala nejvyšší lipolytickou aktivitu ve srovnání s ostatními kvasinkami, by pokles pH po 24 hodinách kultivace mohl souviset s rostoucí lipolytickou aktivitou, kdy štěpením esterových vazeb dochází k uvolňování uhlíkatých řetězců zakončených kyselými karboxylovými skupinami do živného média a k poklesu hodnoty pH.



Graf 17: Stanovení pH prostředí v průběhu kultivace *P. fusiformata*, *M. guilliermondii* a *Y. lipolytica*.

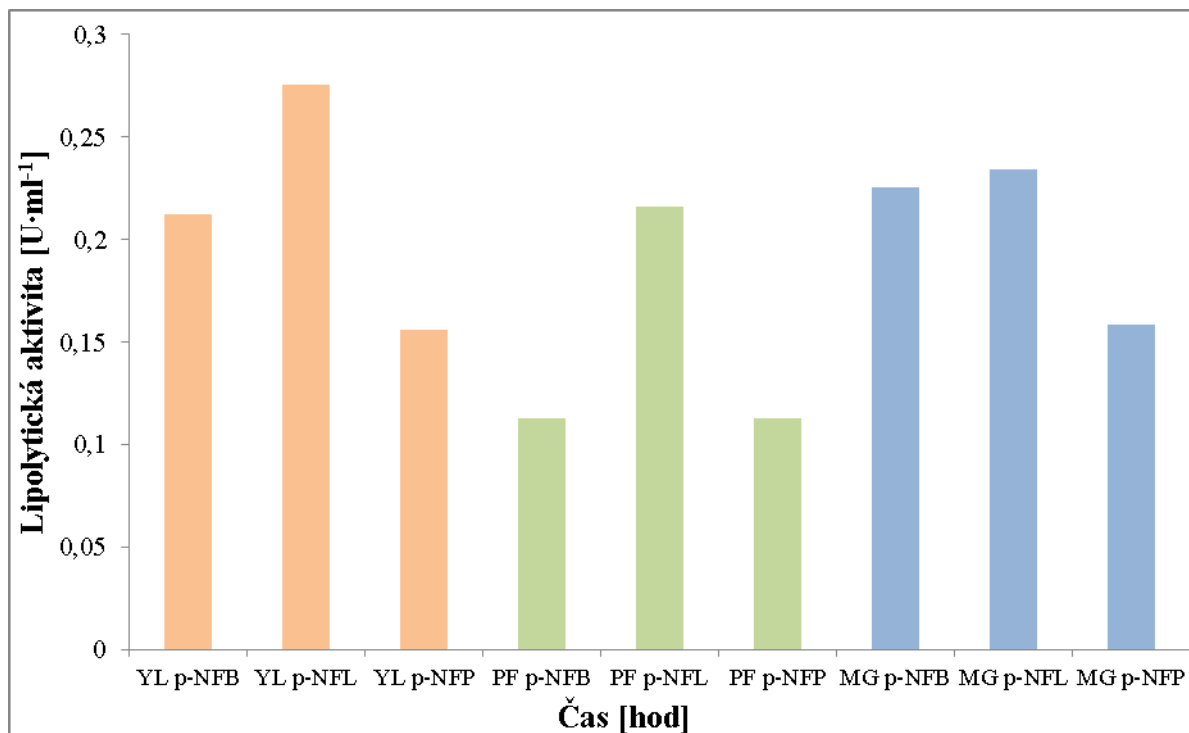
5.6 Charakterizace produkovaných lipolytických enzymů

Lipolytické enzymy kvasinek *P. fusiformata*, *M. guilliermondii* a *Y. lipolytica* byly dále charakterizovány. Byla u nich stanovena substrátová specifita a to za použití *p*-nitrofenylesterů mastných kyselin s různou délkou postranních řetězců, jednalo se o *p*-nitrofenylbutyrát (C4:0), *p*-nitrofenyllaurát (C12:0) a *p*-nitrofenylpalmitát (C16:0). Bylo měřeno pH optimum a pH stabilita v rozmezí pH 5,8–10,4. Dále bylo stanoveno teplotní optimum v rozmezí teplot 25–70°C, tepelná stabilita při teplotě 40°C a skladovací stabilita, kdy byly vzorky enzymu ponechány lednici a v mrazicím boxu po dobu 180 hodin. Výsledné hodnoty jsou průměrem ze dvou paralelních měření, chyba byla do 2%.

5.6.1 Substrátová specifita

Substrátová specifita byla měřena po 24 hodinové kultivaci u kmene *Y. lipolytica* a *P. fusiformata* a 48 hodinové kultivace u kmene *M. guilliermondii*, kdy bylo dosaženo nejvyšší aktivity (Graf 18). Nejvyšší lipolytická aktivita u všech tří kmenů byla pozorována v bazálním médiu s Tweenem za použití substrátu *p*-nitrofenyllaureátu (C12:0), což pravděpodobně souvisí s produkcí triacylglycerol-acyl-hydroláz. Jedná se o lipázy vykazující maximální aktivitu vůči substrátům, obsahujícím ve vodě nerozpustné střední a dlouhé řetězce acylglycerolů (C8:0–C18:0). Pro srovnání esterázy hydrolyzují zčásti ve vodě rozpustné substráty esterů s krátkými řetězci (menší než C8:0) (108). Tyto výsledky korelují se studií Yadav S. (108), kdy kvasinka *Y. lipolytica* vykazovala nejvyšší lipolytickou aktivitu vůči středně dlouhým řetězcům esterů mastných kyselin - *p*-nitrofenylkaprylátu (C8:0). K podobným výsledkům dospěl i Yu M. (112), který stanovil nejvyšší aktivitu za použití *p*-nitromethylmyristátu (C14:0).

Výsledky substrátové specifity po 24 hodinách kultivace v případě kmenů *P. fusiformata* a *Y. lipolytica* a 48 hodinách kultivace u kmene *M. guilliermondii* se shodovaly s výsledky kultivace po 144 hodinách (Příloha, Graf 30), z čehož vyplývá, že doba kultivace neměla na substrátovou specifitu vliv.



Graf 18: Stanovení lipolytické aktivity extracelulárních enzymů za použití různých substrátů (*p*-NFL, *p*-NFB, *p*-NFP) u kmenů *Y. lipolytica*, *P. fusiformata*, které byly kultivovány 24 hodin, a *M. guilliermondii* 48 hodin v bazálním médiu s Tweenem 80.

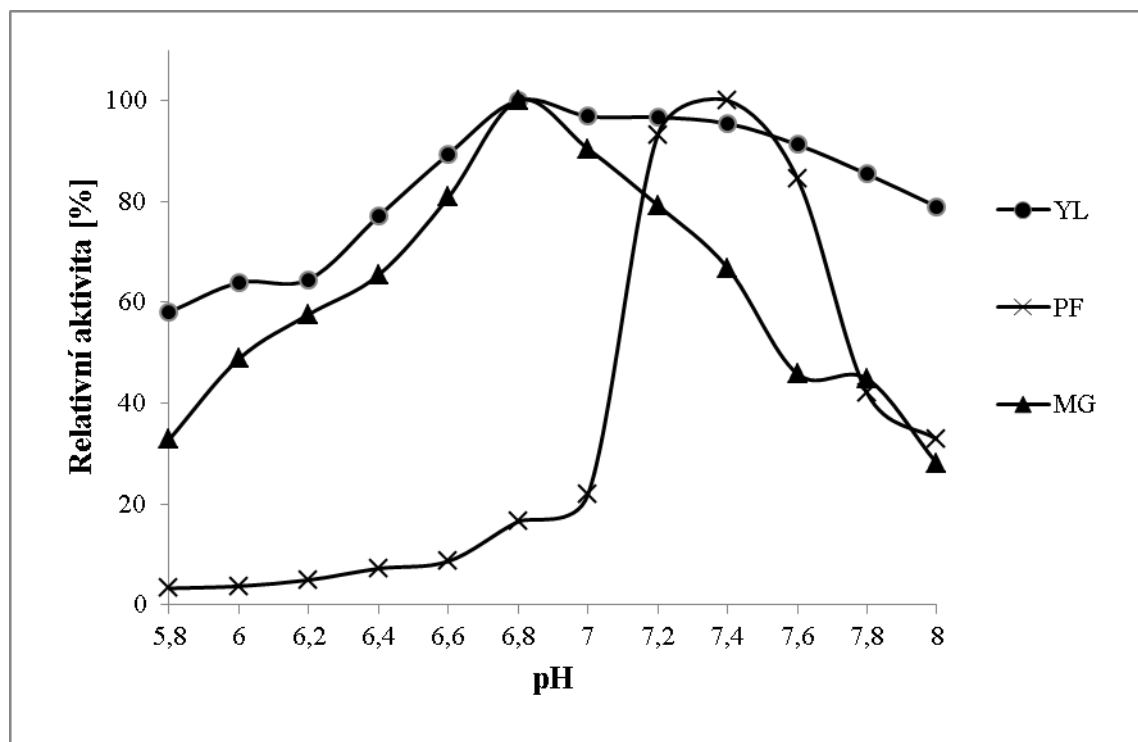
5.6.2 pH optimum a pH stabilita

Enzymy díky svému bílkovinnému původu jsou ovlivnitelné změnou pH, kdy může být ovlivněna jednak rychlost enzymové reakce disociací funkčních skupin substrátu a současně i stabilita enzymu. Každý enzym vykazuje nejvyšší aktivitu jen při určité koncentraci H⁺, tedy ve svém pH optimu. U reakcí, které probíhají mimo pH optimum se aktivita snižuje, molekula enzymu může zaujmout jinou konformaci a tím změnit svoje vlastnosti. Účinek vodíkových iontů na enzym je podmíněn amfoterním charakterem bílkovinné části enzymu. Hodnota pH optima a stability pro komplex enzym-substrát závisí především na pK ionizujících skupin v aktivním centru enzymu a pK funkčních skupin substrátu.

Lipolytická aktivita byla měřena v rozmezí hodnot pH 5,8–8, protože při pH nad 8 byla již hodnota aktivity pod hranicí měřitelnosti. Pro kmeny *Y. lipolytica* a *M. guilliermondii* bylo stanoveno pH optimum 6,8, pro kmen *P. fusiformata* bylo změřeno pH optimum 7,4 (Graf 19). V rozmezí pH 6,8–8 vykazovala kvasinky *Y. lipolytica* stále vysoké hodnoty aktivit (80–90%). Výsledky pH optima odpovídají výsledkům studie Fickers a kol. (75), ve které bylo pH optimum u kmene *Y. lipolytica* stanoveno mezi 6,0 až 7,5 v závislosti na použitých

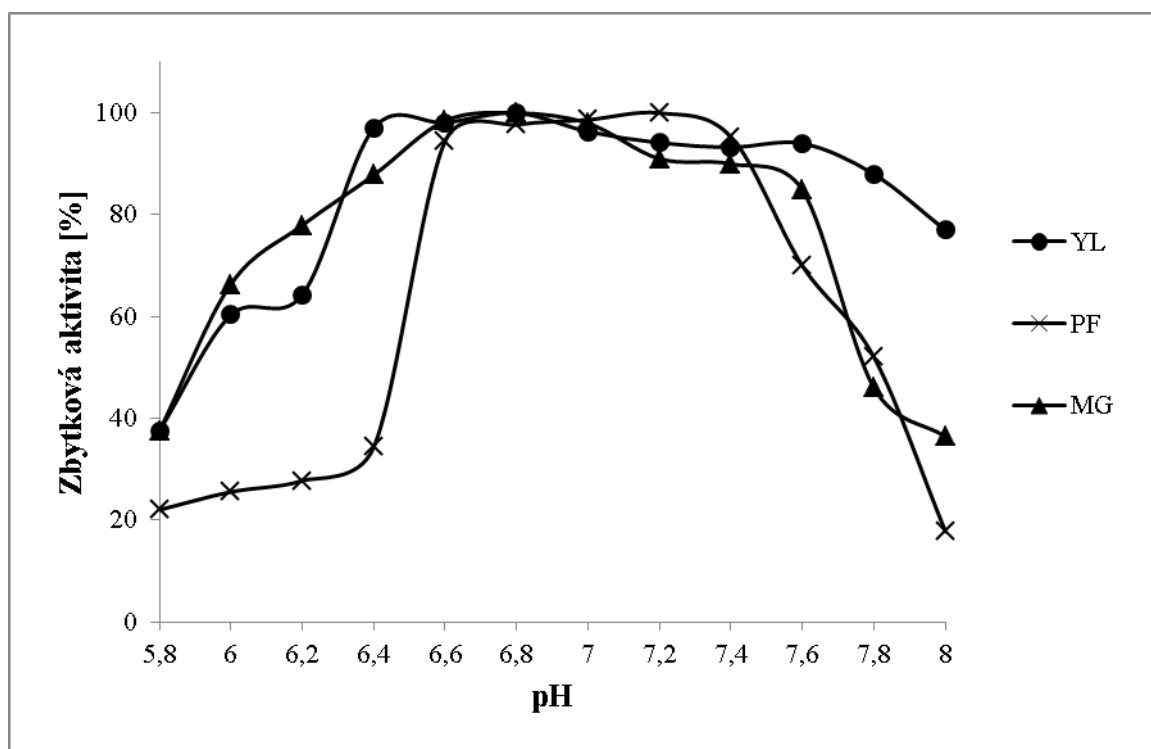
substrátech. Kumari A. a Gupta P. (113) objevili nedávno dvě nové extracelulární lipázy Lip14p a Lip18p s optimální aktivitou při pH 7,0 a teplotě 40°C. pH optimum v kyselé oblasti (pH 5,0) vykazovala lipáza z *Y. lipolytica* ve studii Yadav S. a kol. (108)

Lipázy produkované v této studii vykazují pH optimum v neutrální až mírně kyselé oblasti, což koreluje s publikovanými pH optimy u většiny kvasinek (37, 51).



Graf 19: Stanovení pH optima u kmene *Y. lipolytica*, *P. fusiformata* a *M. guilliermondii*.

Měření pH stability bylo provedeno za stejných experimentálních podmínek jako při stanovení pH optima. Hodnoty pH nad 8,0 byly taktéž pod hranicí měřitelnosti. Všechny tři kmeny vykazovaly podobnou pH stabilitu (Graf 20). Lipáza u kmene *Y. lipolytica* vykazovala stabilitu v oblasti 6,4–8,0, kdy si enzym zachoval vysokou aktivitu (80-90%). Aktivity lipolytických enzymů u kmenů *P. fusiformata* a *M. guilliermondii* byly velmi podobné, a to v intervalu hodnot 6,6–7,6. Podle výsledků studie Aloulou A. a kol. a Rodriguez J. a kol. (114, 115) byla lipáza z kmene *Y. lipolytica* stabilní mezi pH 3,5 až 9,0. V extrémních hodnotách pH došlo k nevratné inaktivaci enzymu. Naopak ve studii Yadav S. (108) vykazuje lipáza z kmene *Y. lipolytica* NCIM 3639 pH stabilitu v oblasti pH 4–6 a ztrátu aktivity při pH 7,0. Na základě výsledků lze tedy říci, že lipázy jsou stabilní v oblasti 6–8.



Graf 20: Stanovení pH stability u kmene *Y. lipolytica*, *P. fusiformata* a *M. guilliermondii*.

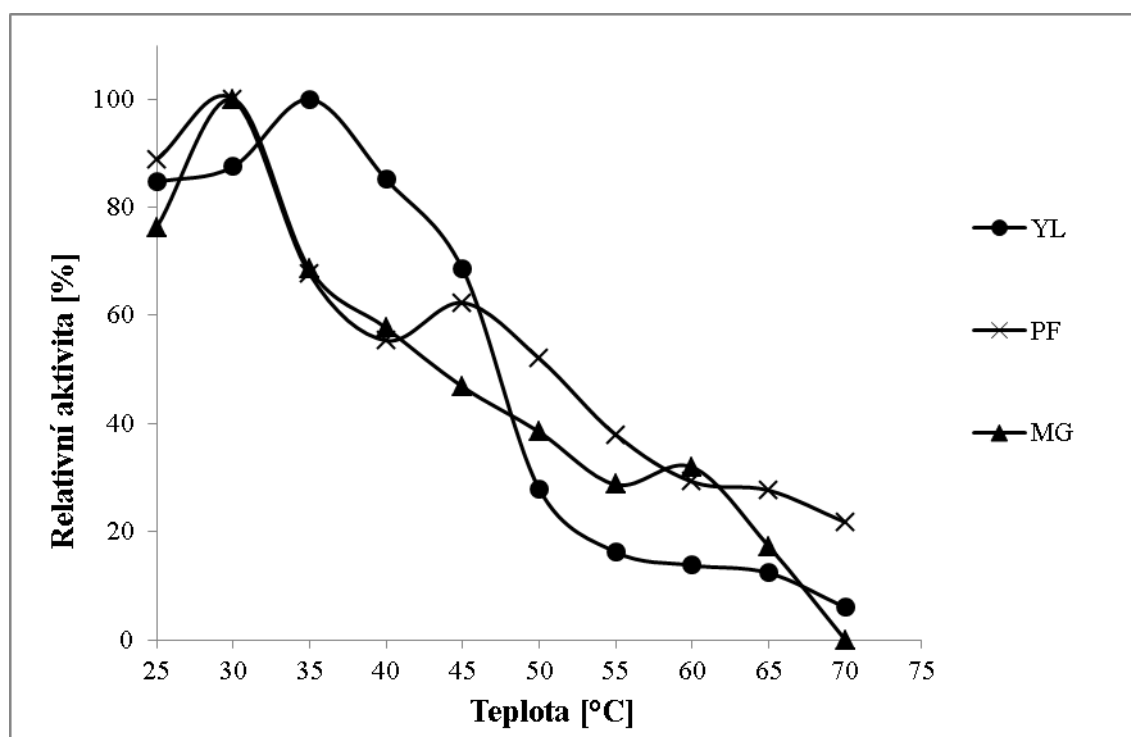
5.6.3 Teplotní optimum a tepelná stabilita

Aktivita enzymů, spočívající v ovlivnění rychlosti chemických reakcí snižováním jejich aktivační energie, je kromě pH závislá i na teplotě. Obvykle hodnota aktivity s rostoucí teplotou roste, až se dostane do teplotního optima, tj. teploty, při níž má enzym nejvyšší aktivitu. Poté však aktivita prudce klesá, neboť dochází ke ztrátě nativní struktury enzymu, který denaturuje. Hodnota zjištěného teplotního optima silně závisí na experimentálních podmínkách, např. na době, po níž enzymová reakce probíhá. Určení vhodné teploty reakce má velký význam při všech praktických aplikacích enzymů.

V rámci této studie byl testován vliv teploty na produkci lipolytických enzymů v rozmezí teplot 25–70°C. Pro kmen *Y. lipolytica* bylo stanoveno teplotní optimum 35°C, což koreluje se studií Brígida A.I.S. a kol. (116), kde bylo teplotní optimum 37°C. Nicméně důležitou úlohu při stanovení teplotního optima hraje i prostředí, ze kterého byl kmen kultivován. Proto např. Yu M. a kol. (117) stanovil teplotní optimum 40°C pro lipázu Lip2 z kmene *Y. lipolytica*, získaného z ropy, zatímco Pereira-Meirelles a kol. (76) stanovil u stejného kmene, který byl však kultivován z půdy, teplotní optimum při 55°C.

Podle grafu 21 bylo teplotní optimum pro kmeny *M. guilliermondii* a *P. fusiformata* 30°C. U všech testovaných mikroorganismů byl pozorován stejný trend, kdy došlo k výraznému poklesu aktivity při teplotách nad 35–45°C, kdy se pravděpodobně enzym postupně inaktivoval.

Obecně je u kvasinek produkce lipáz nejvyšší v rozmezí teplot 25–35°C (37, 51). Enzymy s teplotním optimem kolem 30°C mají širokou škálu využití, protože mají řadu ekonomických výhod, šetří energii a minimalizují nežádoucí chemické reakce, které se často vyskytují při vysokých teplotách (116).

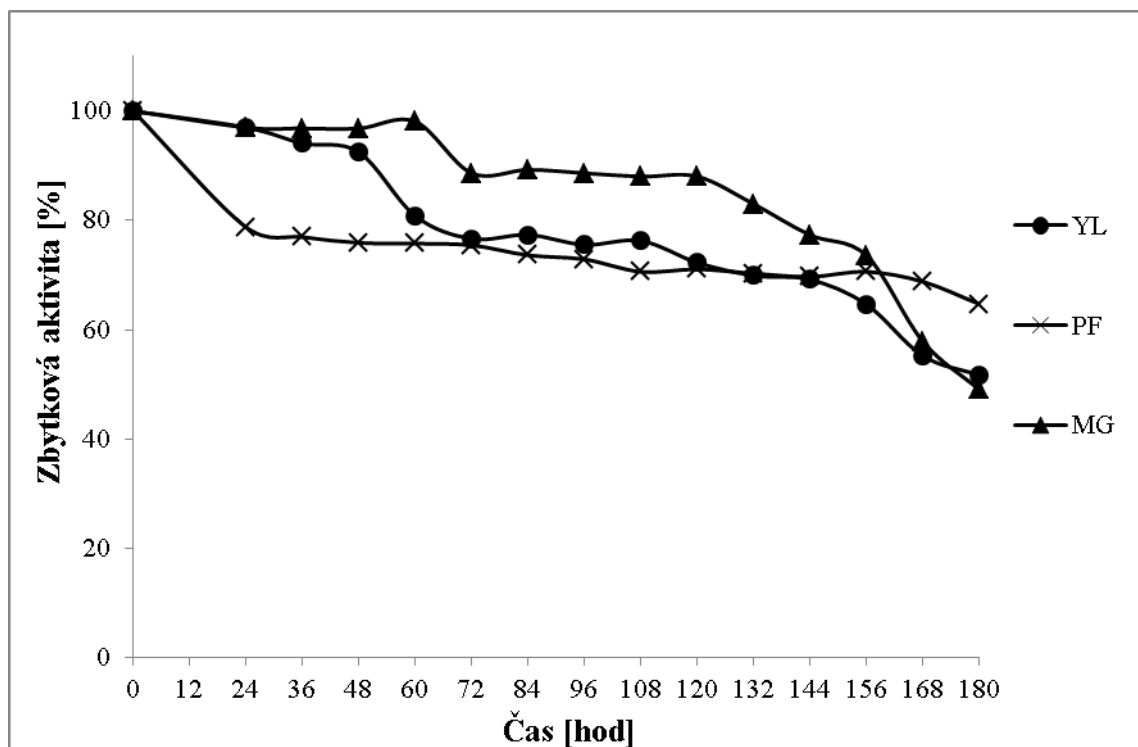


Graf 21: Stanovení teplotního optima u kmene *Y. lipolytica*, *P. fusiformata* a *M. guilliermondii*.

Tepelná stabilita enzymů závisí na řadě faktorů jako je pH, iontová síla prostředí a přítomnost ligandů. Také je známo, že substráty chrání enzymy před tepelnou denaturací (118).

Tepelná stabilita byla stanovena za stejných kultivačních podmínek jako v případě teplotního optima. Kvasinky byly inkubovány při teplotě 40°C po dobu 180 hodin. Stabilita byla vysoká po celou dobu kultivace, kdy si kvasinky po 156 hodinách inkubace zachovaly cca 70% aktivity a teprve poté došlo u kmene *Y. lipolytica* a *M. guilliermondii* k poklesu

na cca 50% původní aktivity (Graf 22). Studie Feller G. a Gerday C. (119) ukázala podobné výsledky, kdy lipáza z kmene *Y. lipolytica* byla stabilní při teplotě 10 a 30°C, avšak ke ztrátám aktivity okolo 40% došlo již po 6 hodinách inkubace při 35°C a enzym byl kompletně inaktivován při 45°C po 4 hodinách inkubace, zatímco v naší studii měl enzym aktivitu stále okolo 90% při 40°C i po 48 hodinách, z čehož plyne, že lipázy produkované námi testovanými kmeny kvasinek lze považovat za teplotně stabilní.



Graf 22: Stanovení tepelné stability u kmene *Y. lipolytica*, *P. fusiformata* a *M. guilliermondii*.

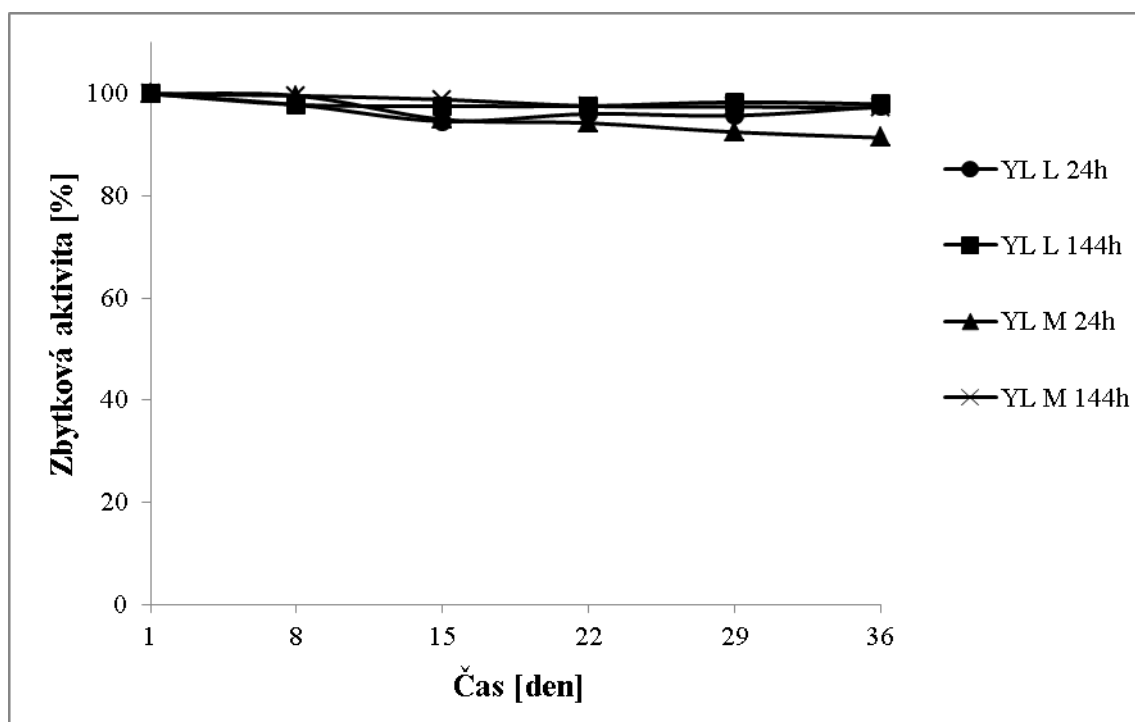
5.6.4 Skladovací stabilita

Běžný problém při produkci komerčních enzymů je jejich nízká skladovací stabilita. Proteiny snadno ztrácejí funkčnost a stabilitu, která je ovlivněna mnoha faktory, nejvíce teplotou, pH, koncentrací enzymu a přítomností solí. Vysoká skladovací stabilita umožňuje uchovávat vzorky delší dobu bez ztráty aktivity.

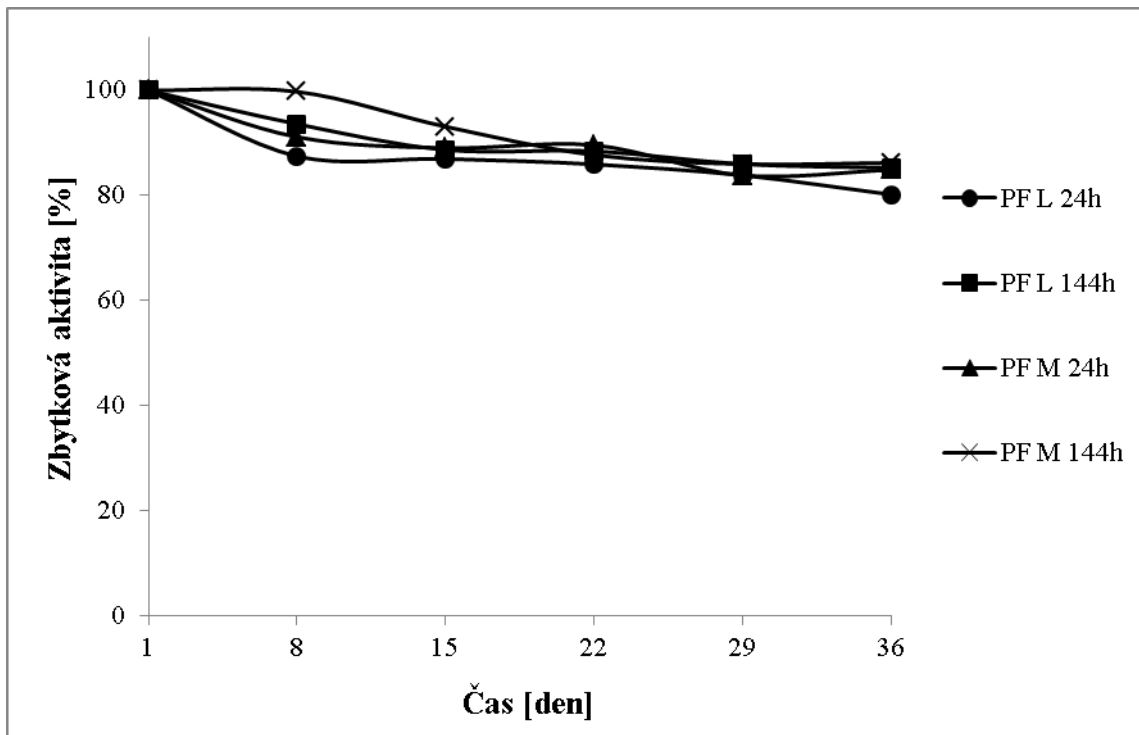
Nejvyšší skladovací stabilitu ze všech testovaných kmenů vykazovala kvasinka *Y. lipolytica*, jejíž aktivita neklesla po celou dobu experimentu (36 dní) jak v lednici, tak i v mrazicím boxu pod 90% (Graf 23). Ke stejným výsledkům dospěl i Darvishi F. a kol.

(107), kdy testovaná lipáza z kmene *Y. lipolytica* byla stabilní při 4 a 25°C po dobu 30 dní. I další studie ukázaly, že lyofilizovaná lipáza z kmene *Y. lipolytica* má velmi dobrou stabilitu při uchovávání (76, 116).

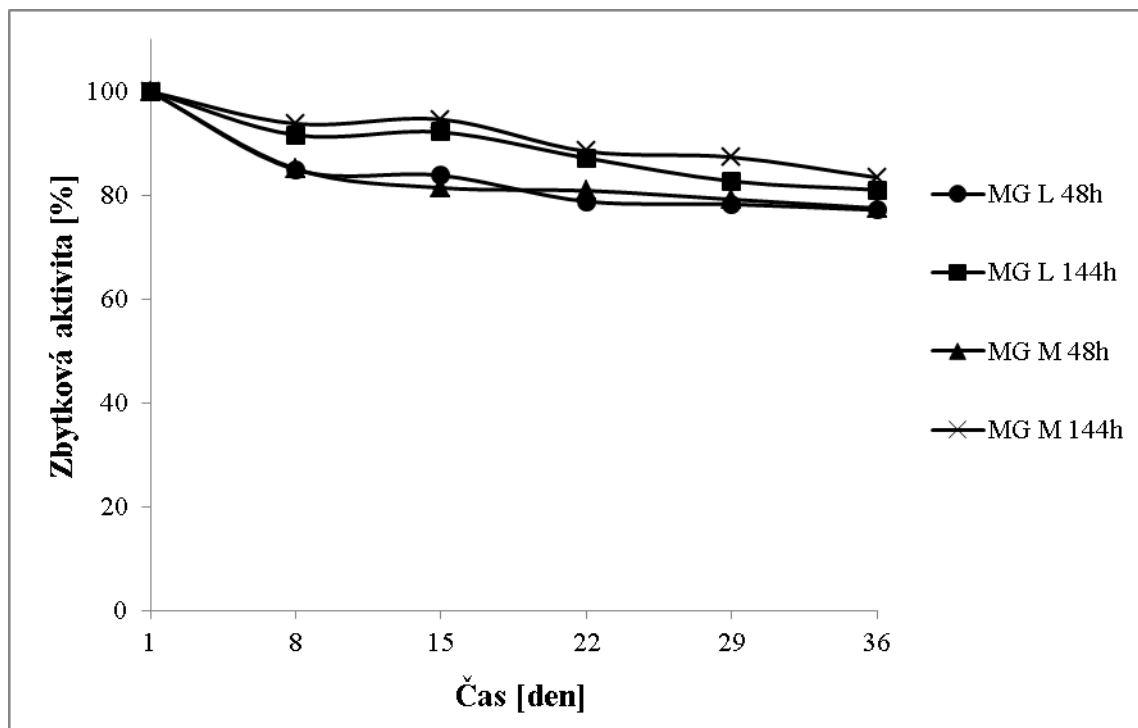
Trend křivek u kmenů *P. fusiformata* a *M. guilliermondii* byl velmi podobný, kdy lipáza skladovaná v mrazicím boxu po 144 hodinové kultivaci vykazovala nejvyšší aktivitu, která neklesla pod 86%. Pokles stability byl nejvýraznější u enzymu skladovaného v lednici po 24 hodinové kultivaci, kdy aktivita klesla na 80,2% (Graf 24, 25).



Graf 23: Stanovení skladovací stability u kmene *Y. lipolytica*.



Graf 24: Stanovení skladovací stability u kmene *P. fusiformata*.



Graf 25: Stanovení skladovací stability u kmene *M. guilliermondii*.

5.7 Kontinuální kultivace YL v bioreaktoru

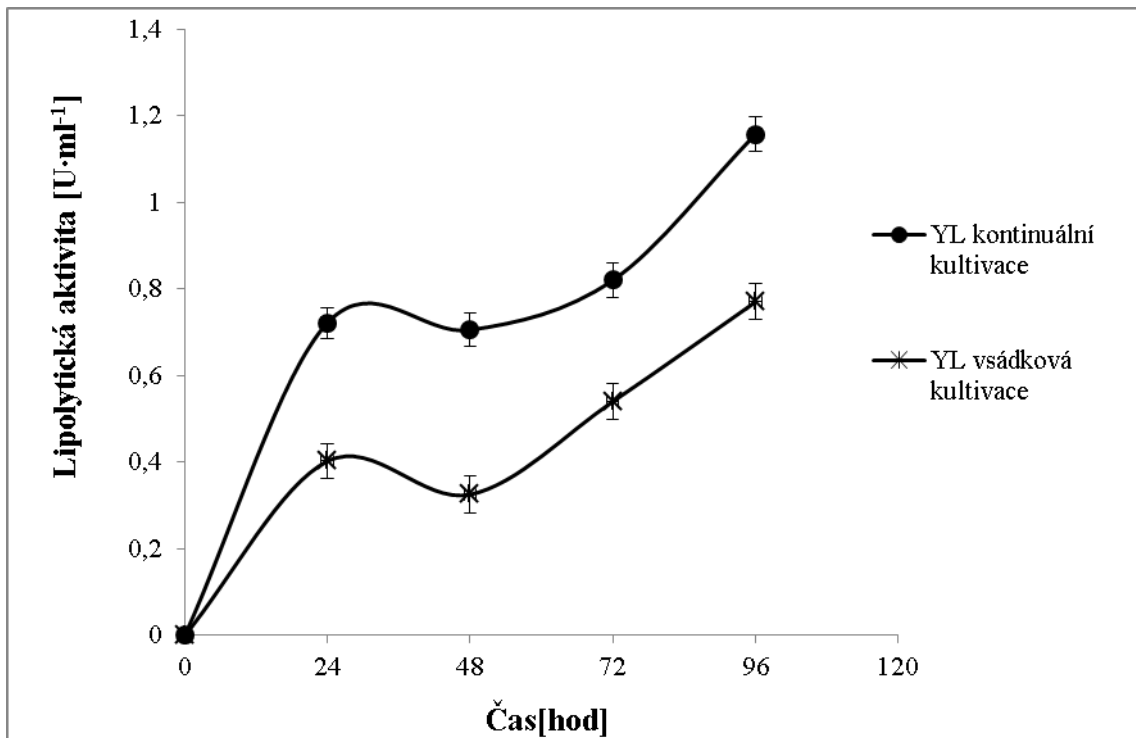
Výhodou kontinuální kultivace oproti vsádkové je její produktivita a konstantní přírůstek biomasy, který je po celou dobu na svém maximu (39). Pomocí bioreaktoru lze nastavit a měnit podmínky kontinuálního procesu, regulovat enzymatickou produkci a stabilitu enzymu, což může vést k vyšším produkcím enzymů ve srovnání s kultivací vsádkovou.

Kmen *Y. lipolytica* byl kultivován v bioreaktoru za stejných podmínek jako byla provedena vsádková kultivace v L-zkumavkách. U kontinuální kultivace byla stanovena lipolytická, proteolytická aktivita, růst buněk a pH kvasinek. Výsledky byly poté srovnány se vsádkovou kultivací v L-zkumavkách.

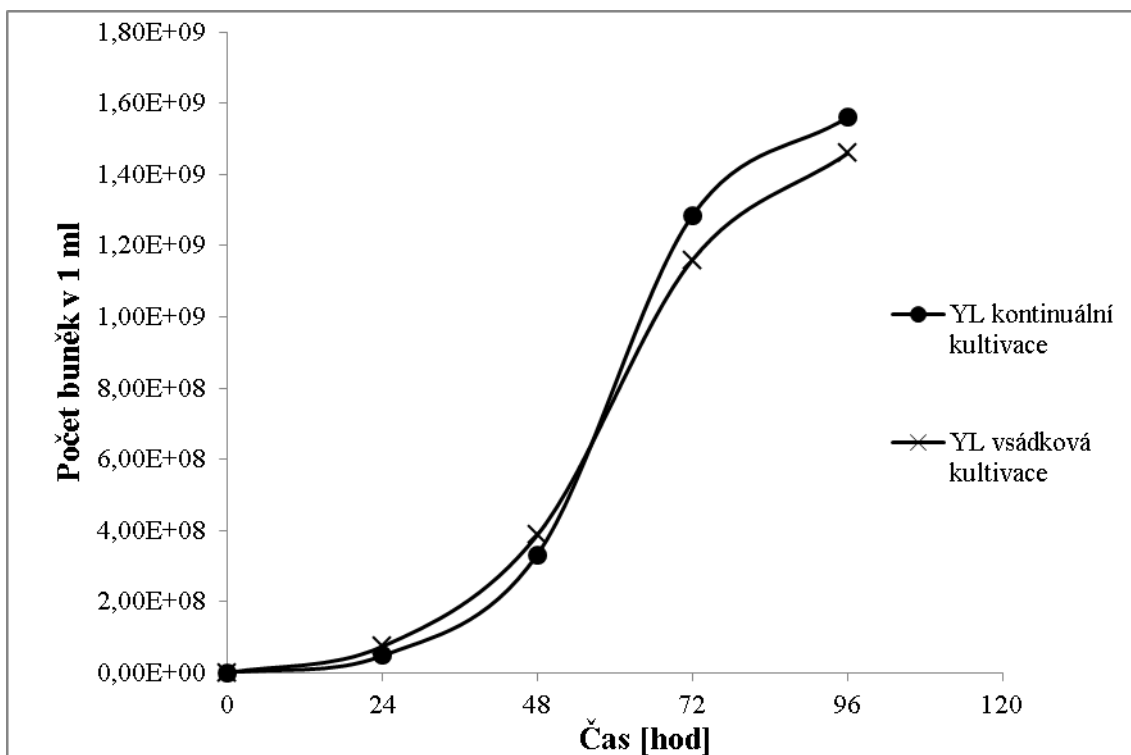
5.7.1 Srovnání lipolytické aktivity při kontinuální a vsádkové kultivaci YL

Lipolytická aktivita u kvasinky *Y. lipolytica* v případě kontinuální kultivace rostla po celou dobu experimentu a byla vyšší zhruba o 47% než u vsádkové kultivace v L-zkumavce (Graf 26). Buňky se nacházely v exponenciální fázi růstu, kdy probíhalo jejich intenzivní množení a výrazný rozdíl mezi vsádkovou a kontinuální kultivací v nárůstu pozorován nebyl (Graf 27).

Tyto výsledky jsou však v rozporu se studií Fickers a kol. (75), kde byla produkce lipolytických enzymů srovnatelná se vsádkovou kultivací, což mohlo být způsobeno intenzivnější aerací v případě vsádkové kultivace. Ke stejným výsledkům jako v případě této studie však dospěl Deive a kol. (120), u něž vyšší produkci extracelulárních lipáz vykazovala kultivace v bioreaktoru (více než $0,7 \text{ U. ml}^{-1}$) oproti kultivaci vsádkové, kde maximální hodnoty dosahovaly $0,6 \text{ U. ml}^{-1}$.



Graf 26: Srovnání lipolytické aktivity u kmene *Y. lipolytica*.

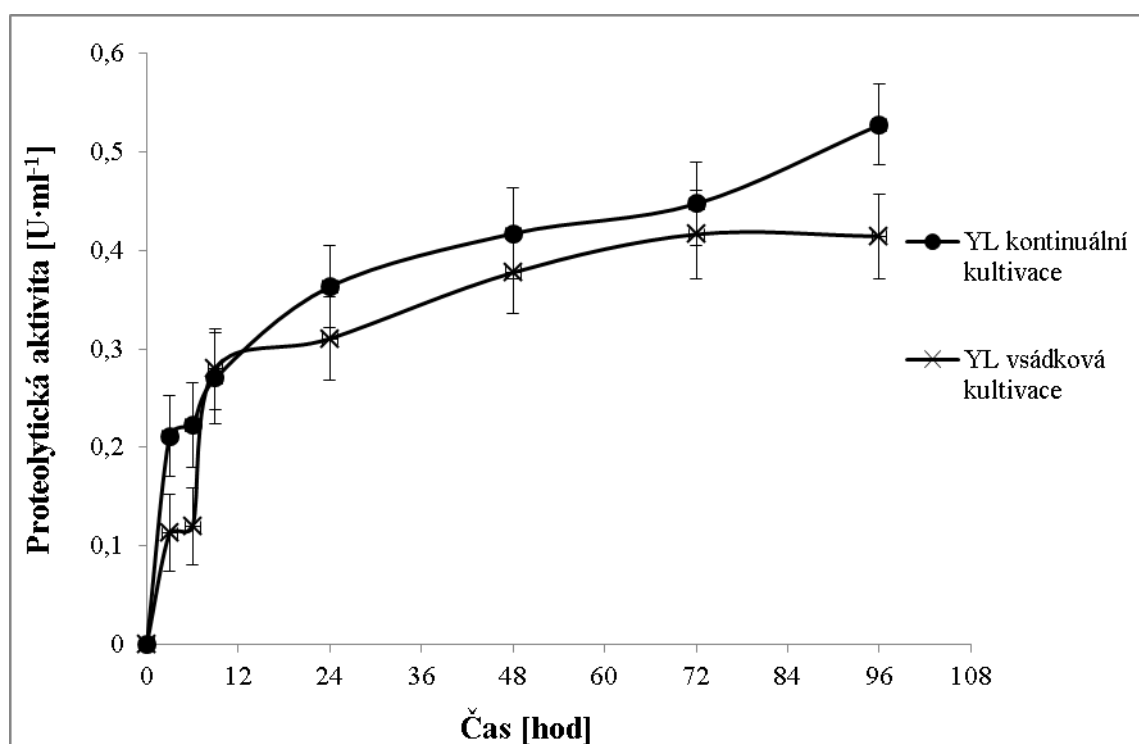


Graf 27: Srovnání růstové křivky u kmene *Y. lipolytica*. Byla provedena 2 paralelní měření, ze kterých byl udělán průměr. Chyba měření byla do 2%.

5.7.2 Srovnání proteolytické aktivity při kontinuální a vsádkové kultivaci YL

Kromě lipolytické aktivity byla stanovena i proteolytická aktivita. Podobně jako v případě lipáz i proteázy dosahovaly vyšší aktivity při kultivaci v bioreaktoru, ačkoliv rozdíl aktivit mezi kontinuální a vsádkovou kultivací nebyl tak velký jako v případě lipolytických enzymů.

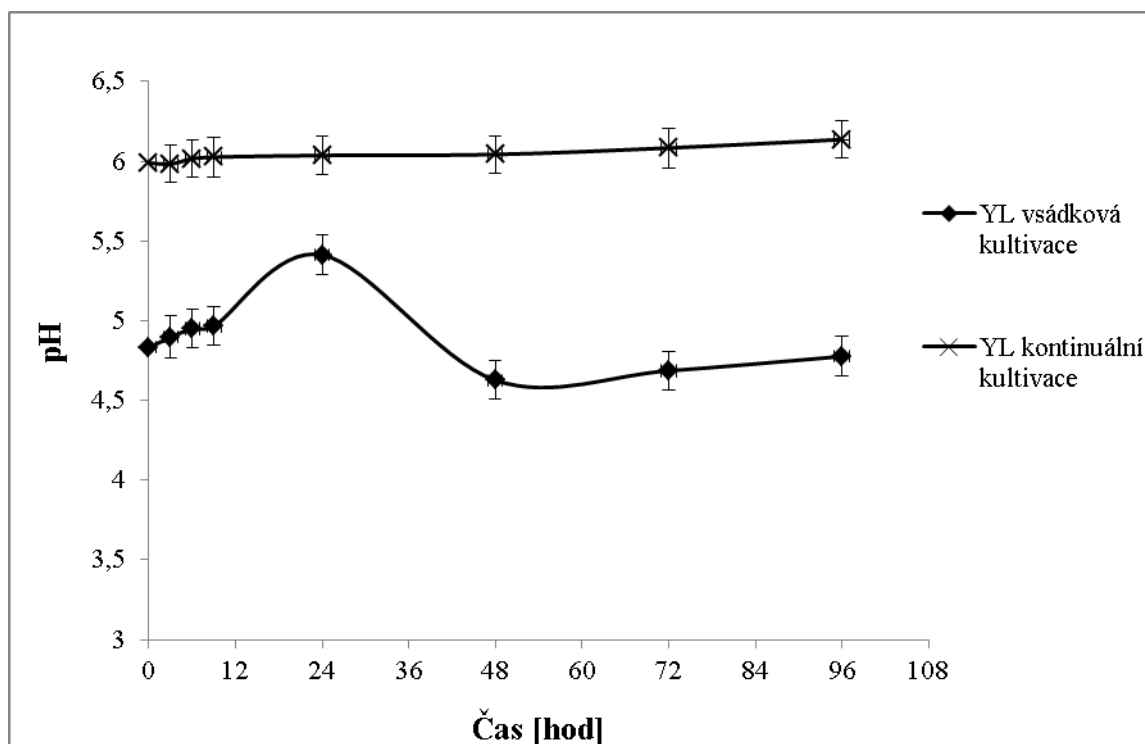
Kvasinka *Y. lipolytica* vykazovala zhruba o 17% vyšší proteolytickou aktivitu v případě kontinuální kultivace (Graf 28). Trend obou křivek je velmi podobný, kdy po celou dobu proteolytická aktivita rostla. Studie Lopes M. a kol. (121) ukázala také vyšší hodnoty produkce proteáz u kvasinky *Y. lipolytica* W29 v případě kultivace v bioreaktoru ($1,3 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$) než v případě submerzní vsádkové kultivace ($0,5 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$).



Graf 28: Srovnání proteolytické aktivity u kmene *Y. lipolytica*.

5.7.3 Změna pH v průběhu kontinuální a vsádkové kultivace

V případě kvasinky *Y. lipolytica* kultivované kontinuálním způsobem je patrné, že hodnota pH zůstávala konstantní po celou dobu kultivace a pohybovala se kolem hodnoty pH 6, což je vyšší než v případě vsádkové kultivace kvasinky v L-zkumavce, kde se hodnota pohybovala 4,6 až 5,4 (Graf 29). Vyšší pH v případě kultivace v bioreaktoru nejspíše souvisí s kontinuálním procesem, kdy v průběhu odvodu kultivačního média se současně odstraňovaly i kyselé produkty metabolismu.



Graf 29: Srovnání pH v průběhu kontinuální a vsádkové kultivace u kmene *Y. lipolytica*.

Díky možnosti nastavit a měnit podmínky kontinuálního procesu, regulovat enzymatickou produkci a stabilitu enzymu, byly vyšší produkce enzymů i růst buněk pozorovány v případě kultivace v bioreaktoru oproti kultivaci v L-zkumavkách. Kontinuální kultivace je vhodnější pro vyšší produkci enzymů, i proto jsou bioreaktory a fermentory hojně využívány v biotechnologických procesech.

6 ZÁVĚR

Kvasinky jsou významné především z hlediska produkce biologicky aktivních látek (enzymy, antibiotika, vitaminy) a biodegradační aktivity enzymů, čehož se využívá při štěpení a odbourávání různých látek. Lipolytické enzymy přitahují značnou pozornost kvůli svému biotechnologickému potenciálu. Představují jednu z nejvýznamnějších skupin biokatalyzátorů pro biotechnologické aplikace a díky rozšiřování průmyslových odvětví se zájem o lipázy bude stále zvyšovat. Proto se zkoumají nové kmeny schopné produkovat lipolytické enzymy a jejich možné využití.

V této práci byla studována aktivita extracelulárních lipolytických enzymů produkovaných různými druhy kvasinek. Z deseti testovaných kvasinek vykazovaly nejvyšší lipolytickou aktivitu kmeny *P. fusiformata*, *M. guilliermondii* a *Y. lipolytica* na médiu obohaceném o Tween, který indukoval produkci lipáz oproti základnímu bazálnímu médiu, kde byla produkce lipáz velmi nízká. Byla provedena série experimentů zaměřených na optimalizaci kultivačních podmínek pro produkci lipolytických enzymů. Jako nejvhodnější substrát se jevil *p*-nitrofenyllaurát (C12:0), čímž se ukázalo, že se pravděpodobně jedná o lipázy, které patří mezi triacylglycerol-acyl-hydrolázy vykazující maximální aktivitu vůči ve vodě nerozpustným substrátům se středně dlouhými řetězci. Testované lipázy vykazovaly nejvyšší aktivitu kolem 30°C v neutrální až mírně kyselé oblasti a měly vysokou skladovací stabilitu, což umožňuje uchovávat vzorky po delší dobu bez ztráty aktivity. Nejvyšší produkce lipáz bylo dosaženo v bioreaktoru, kde byla kvasinka *Y. lipolytica* kultivována kontinuálně, a proto lze tento proces považovat za technologicky vhodnější díky vyšší produkci enzymů.

Z provedených měření a zpracovaných výsledků vyplývá, že kmeny *P. fusiformata*, *M. guilliermondii* a *Y. lipolytica* jsou kvasinky nenáročné na kultivace a schopné produkovat vysoké množství lipolytických enzymů vylučovaných do živného média po poměrně dlouhou dobu. Tyto kmeny se jeví jako velmi vhodné pro produkci enzymů a pro potenciální využití v různých biotechnologických aplikacích.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) **Tanghe A., Prior B., Thevelein J.M. (2006):** *Yeast Responses to Stresses*. In: **Rosa C., Péter G. (eds.):** *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 175-195. ISBN 35-402-6100-1
- (2) **Hagler A.N. (2006):** Yeasts as Indicators of Environmental Quality. In: **Rosa C., Péter G. (eds.):** *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 515-532. ISBN 35-402-6100-1
- (3) **Vodrážka Z., Rauch P., Káš J. (1998):** *Enzymologie*. Praha: VŠCHT, p. 171. ISBN 80-7080-330-4
- (4) **Bendová O., Janderová B. (1989):** *Základy biologie kvasinek*. 1. vyd. Praha: SPN, p. 88. ISBN 80-706-6029-5
- (5) **Kalina T., Váňa J. (2005):** *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Karolinum, Praha, p. 606
- (6) **Kocková-Kratochvílová A. (1990):** *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. Alfa, Bratislava, p. 704. ISBN 80-05-00644-6
- (7) **Hernández-Almanza A., Montanez J.C., Aguilar-González M.A., Martínez-Ávila C., Rodríguez-Herrera R., Aguilar N.C. (2014):** *Rhodotorula glutinis as source of pigments and metabolites for food industry*. Food Bioscience, Vol. 5, p. 64-72
- (8) **Kocková-Kratochvílová A. (1982):** *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. Alfa, Bratislava, p. 396
- (9) **Buzzini P., Vaughan-Martini A. (2006):** *Yeast biodiversity and biotechnology*. In: Rosa C., Péter G. (eds.): *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 533-559. ISBN 3-540-26100-1

- (10) **Birgisson H., Delgado O., Arroyo L.G., Hatti-Kaul R., Mattiasson B. (2003):** *Coldadapted yeasts as producers of cold active polygalacturonases.* Extremophiles, 7, p. 185-193
- (11) **Margesin R., Gander S., Zacke G., Gounot A.M., Schinner F. (2003):** *Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts.* Extremophiles, 7, p. 451-458
- (12) **Pazgier M., Turkiewicz M., Kalinowska H., Bielecki S. (2003):** *The unique cold-adapted extracellular subtilase from psychrophilic yeast Leucosporidium antarcticum.* J. Mol. Catal. B. Enzym, 21, p. 39-42
- (13) **Nakagawa T., Yamada K., Fujimura S., Ito T., Miyaji T., Tomizuka N. (2005):** *Pectin utilization by the methylotrophic yeast Pichia methanolica.* Microbiology, 151, p. 2047-2052
- (14) **Rosa M.M., Tauk-Tornisielo S.M., Rampazzo P.E., Ceccato-Antonini S.R. (2010):** *Evaluation of the biological control by the yeast Torulaspora globosa against Colletotrichum sublineolum in sorghum.* World J. Microbiol. Biotechnol., 26, p. 1491-1502
- (15) **Steel D.B., Stowers M.D. (1991):** *Techniques for selection of industrially important microorganisms.* Ann. Rev. Microbiol., 4, p. 589-106
- (16) **Bull A.T., Goodfellow M., Slater J.H. (1992):** *Biodiversity as a source of innovation in biotechnology.* Annu. Rev. Microbiol., 46, p. 219-252
- (17) **Lu G., Hupp J.T. (2010):** *Metal-Organic Frameworks as Sensors: A ZIF-8 Based Fabry-Pérot Device as a Selective Sensor for Chemical Vapors and Gases.* J. Am. Chem. Soc., 132, p. 7832-7833
- (18) **Liti G., et al. (2009):** *Population genomics of domestic and wild yeasts.* K dispozici online na:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19212322>

- (19) **Rosypal S., Doškař J., Petrzik K., Růžičková V. (2002):** *Úvod do molekulární biologie*. 4.díl. Brno, p. 1141-1152
- (20) **Mendes-Ferreira A., Chmáco M.C., Mendes Faia A. (2001):** *The role of non-Saccharomyces species in releasing glycosidic fraction of grape aroma components-A preliminary study*. Journal of Applied Microbiology, 91, p. 67-71
- (21) **Connell L., et al. (2008):** *Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land*. Antarctica, Microbial Ecology, p. 448-459
- (22) **Sandhu S., Dhanwant K., Manjit K. Waraich (1985):** *Yeasts associated with pollinating bees and flower nectar*. Microbial Ecology, p. 51-58
- (23) **Wood T.M. (1992):** *Fungal cellulases*. Biochem. Soc. Trans., 20, p. 46-53
- (24) **Stehpanopoulos G. (2007):** *Challenges in engineering microbes for biofuels production*. Science, 315, p. 801-804
- (25) **Vinzant T.B., Adney W.S., Decker S.R., Baker J.O., Kinter M.T., Sherman N.E., et al. (2001):** *Fingerprinting Trichoderma reesei hydrolases in a commercial cellulase preparation*. Appl. Biochem. Biotechnol., 93, p. 99-107
- (26) **Herpoel-Gimbert I., Margeot A., Dolla A., Jan G., Molle D., Lignon S., et al. (2008):** *Comparative secretome analyses of two Trichoderma reesei RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains*. Biotechnol. Biofuels, 1, p. 18
- (27) **Papaparaskevas D., Christakopoulos P., Kekos D., Macris B.J. (1992):** *Optimizing production of extracellular lipase from Rhodotorula glutinis*. Biotechnol Letters, 14, p. 397-440
- (28) **Blanco P, Sieiro C., Villa T.G. (1999):** *Production of pectic enzymes in yeasts*. FEMS Microbiol. Letters, 175, p. 1-9

- (29) **Gowda L.R., Joshi M.S., Bhat S.G. (1988):** *In situ assay of intracellular enzymes of yeast (Kluyveromyces fragilis) by digitonin permeabilization of cell membrane.* Analytical Biochemistry, Vol. 175, Issue 2, p. 531-536
- (30) **Vodrážka, Z. (1999):** *Biochemie.* Praha, p. 26, 47-48, 101, 105-106, 120, 124, 134. ISBN 80-200-0600-1
- (31) **Philip S. Perlman, H.R. Mahler (1970):** *Intracellular localization of enzymes in yeast.* Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 136, Issue 1, p. 245-259
- (32) **Tsujisaka Y., Iwai M., Tominasa Y. (1973):** *Purification, crystallization and some properties of lipase from Geotrichum candidum link.* Agric. Biol. Chem., 37, p. 1457-1464
- (33) **Qingxiang Y., Hao Z., Xueling L., Zhe W., Ying X., Siwei R., Xuanyu C., Yuanyuan X., Hongxin H., Hailei W. (2013):** *Extracellular enzyme production and phylogenetic distribution of yeasts in wastewater treatment systems* Bioresource Technology, Vol. 129, p. 264-273
- (34) **Adamczak M., Bednarski W. (2004):** *Enhanced activity of intracellular lipases from Rhizomucor miehei and Yarrowia lipolytica by immobilization on biomass support particles.* Process Biochemistry, 39, p. 1347-1361
- (35) **Pandey A., Selvakumar P., Soccol C.R., Nigam P. (1999):** *Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes.* Current Science, 77, p. 149-162
- (36) **Vodrážka Z., Rauch P., Káš J. (2001):** *Enzymologie.* 1. vydání Praha VŠCHT: Firma – JK. ISBN 98-242-16/97
- (37) **Jensen R.G. (1983):** *Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources.* Department of Nutritional Sciences., Vol. 18, Issue 9, p. 650-657

- (38) **Betina V. (1988):** *Mikrobiologické laboratorne metódy*. Bratislava: Alfa, vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, p. 544
- (39) **Stanbury P.F., Whitaker A., Hall S.J. (1995):** *Principles of Fermentation technology*. Elsevier Science Ltd., p. 376
- (40) **Piepera I., Wechlerb K., Katzbergb M., Brusche L., Sørensend P.G., Mensonidese F., Bertaua M. (2008):** *Biosimulation of drug metabolism-A yeast based model*. Science Direct
- (41) **Couto S. R., Sanromán M.A. (2005):** *Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production*. Biochem. Eng. J., 22, p. 11-219
- (42) **Banerjee G., Scott-Craig S.J., Walton D.J. (2010):** *Improving Enzymes for Biomass Conversion: A Basic Research Perspective*. Bioenerg. Res., 3, p. 82-92
- (43) *β-oxidation of FFA* k dispozíci online na:
<http://www.lipidlibrary.aocs.org/animbio/faoxid/index.htm>
- (44) **Jaeger K.E., Ransac S., Dijkstra B.W., Colson C., Heuvel M., Misset O. (1994):** *Bacterial lipases*. FEMS Microbiology reviews, 15, p. 2963
- (45) **Singh R., Gupta N., Goswani V.K. (2006):** *A simple activity staining protocol for lipases and esterases*. Appl. Microbial Biotechnol., 70, p. 679-682
- (46) **Horáková D., Němec M. (2003):** *Laboratorní cvičení z fyziologie bakterií*. (citace 2007-05-09), k dispozíci online na:
is.muni.cz/elportal/estud/prif/ps06/3074288/Labor.cv.z_fyziol.bakterii_upravene.pdf
- (47) **Wang Z., Srivastava K.C., Shen J.G, H.Y., Wang H.Y. (1995):** *Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic Bacillus, strain A30-1 (ATCC53841)*. J. Ferment. Bioeng., 79, p. 433-438

- (48) **Matsumiya Y., Wakita D., Kimura A., Sanpa S., Kubo M. (2007):** *Isolation and characterization of lipid-degrading bacterium and its application to lipid containing wastewater treatment.* J. of Bioscience and Bioengineering, Vol. 103, Issue 4, p. 325-330
- (49) **Chang R.C., Chou S.J., Shaw J.F. (1994):** *Multiple forms and functions of Candida rugosa lipase.* Biotechnol. Appl. Biochem., 19, p. 93-97
- (50) K dispozici online na:

http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:vrR6vMPkZHEJ:is.muni.cz/th/223187/prif_b/Bak_Jana_hotovo.pdf+&cd=2&hl=cs&ct=clnk&gl=cz
- (51) **Anderson R.E. (1980):** *Microbial lipolysis at low temperatures.* Applied and Environmental Microbiology., Vol. 39, Issue 1, p. 36-40
- (52) **Vakhlu J., Kour A. (2006):** *Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning.* Eur. J. Biotechnol., 9, p. 1-17
- (53) **Breuer M., Ditrich K., Habicher T., Hauer B., Kessler M., Stuermer R., Zelinski T. (2004):** *Industrial methods for the production of optically active intermediates.* Angew. Chem. Int. Ed., 43, p. 788-824
- (54) **Gupta R., Gupta N., Rathi P. (2004):** *Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties.* Appl. Microbiol. Biotechnol., p. 763-781
- (55) **Freire D.M., Teles E.M.F., Bon E.P.S., Sant` Anna G.L. (1997):** *Lipase production by penicillium restrictum in a bench-scale fermenter.* Applied Biochemistry and Biotechnology, p. 409-421
- (56) **Hasan F., Shah A.A., Hameed A. (2006):** *Industrial applications of microbial lipases.* Enzyme Microb. Technol., 39, p. 235-251
- (57) **Cammarota M.C., Freire D.M.G. (2006):** *A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content.* Bioresource Technology, 97, p. 2195-210

- (58) **Jaeger K.E., Reetz M.T. (1998):** *Microbial lipases from versatile tools for biotechnology.* *Tibtech*, 16, p. 396-403
- (59) **Nawani N., Dosanjh N.S., Kaur J. (1998):** *A novel thermostable lipase from a thermophilic Bacillus sp.: characterization and esterification studies.* *Biotechnology letters.*, Vol. 20, Issue 10, p. 997-1000
- (60) **Štosová T., Havliš J., Lenobl R. (2005):** *Proteolytické enzymy: význam pro proteomiku.* *Chem. listy (online).* Roč. 99 (cit. 2009-03-03), p. 896-905. ISSN 1213-710
- (61) **Chi Z., Zhang T., Liu G., Li J., Wang X. (2009):** *Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications.* *Biotechnol. Advances*, 27, p. 236-255
- (62) **Chi Z., Ma C., Wang P., Li H.F. (2007):** *Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast Aureobasidium pullulans.* *Bioresour. Technol.*, 98, p. 534-538
- (63) **Middelhoven W.J. (1997):** *Identity and biodegradative abilities of yeast isolated from plants growing in an arid climate.* *Antonie van Leeuwenhoek*, 72, p. 81-89
- (64) **Brizzio S., Turchetti B., de García V., Libkind D., Buzzini P., van Broock M. (2007):** *Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia.* *Can. J. Microbiol.*, 53, p. 519-525
- (65) **Ogrydziak D.M. (1993):** *Yeast extracellular proteases.* *Crit. Rev. Biotechnol*, p. 13
- (66) **Buhagiar R.W.M. (1979):** *Candida fusiformata sp. nov., a new yeast from cabbages and cauliflowers.* *J. Gen. Microbiol.*, p. 91-97
- (67) **Buzzini P., Martini A. (2002):** *Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments* *Journal of Applied Microbiology*, 93, p. 1020-1025
- (68) **Golubew V.I., Kulakovskaia T.V., Golubeva E.V. (2001):** *Pseudozyma fusiformata BKM Y-2821-a producer of antifungal glykolipid.* *Microbiology*, 70, p. 642-646

- (69) **Lee H., Sopher C.R., Yau K.Y.F. (1999):** *Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities on mixed sugars in Candida guilliermondii.* Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Vol. 65, Issue 4, p. 375-379
- (70) **Dias J.C., Rezende R.P., Rosa C.A., Lachance M.A., Linardi V.R.(2000):** *Enzymatic degradation of nitriles by a Candida guilliermondii UFMG-Y65.* Can. J. Microbiol., 46, p. 523-535
- (71) **Basaran P., Hang Y.D. (2000):** *Purification and characterization of acetyl esterase from Candida guilliermondii.* Letters in Applied Microbiology, 30, p. 167-171
- (72) **Fukuda R. (2013):** *Metabolism of hydrophobic carbon sources and regulation of it in n-alkane-assimilating yeast Yarrowia lipolytica.* Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 77, p. 1149-1154
- (73) **Zinjarde S.S. (2013):** *Food-related applications of Yarrowia lipolytica.* Institute of Bioinformatics and Biotechnology, University of Pune
- (74) **Ota Y., Gomi K., Kato S., Sugiura T., Minoda Y. (1982):** *Purification and some properties of cell bound lipase from Saccharomycopsis lipolytica.* Agric. Biol. Chem., 46, p. 2885-2893
- (75) **Fickers P., Nicaud J.M., Gaillardin C., Destain J., Thonart P. (2004):** *Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast Yarrowia lipolytica.* J. Appl. Microbiol., 96, p. 742-749
- (76) **Pereira-Meirelles F.V., Rocha-Leão M.H.M., Sant'Anna G.L. (1997):** *A stable lipase from Candida lipolytica: cultivation and crude enzyme characteristics.* Appl. Biochem. Biotechnol., p. 63-85
- (77) **Cohen C., Ratledge C. (2005):** *Single Cell Oils.* AOCS Press, Champaign, IL

- (78) **Beckerich J., Boisramé-Baudevin A., Gaillardin C. (1998):** *Yarrowia lipolytica: A model organism for protein secretion studies.* Internat. Microbiol., 1, p. 123-130
- (79) **Gonzalez-Lopez C.I., Szabo R., Blanchin-Roland S., Gaillardin C. (2002):** *Genetic control of extracellular protease synthesis in the yeast Yarrowia lipolytica.* Genetics, 160, p. 417-427
- (80) **Hung L., To R.J.B., Latta R.K., Biely P., Scheider H. (1987):** *Some Properties of Extracellular Acetylxyln Esterase Produced by the Yeast Rhodotorula mucilaginosa.* Division of Biological Sciences, National Research Council of Canada
- (81) **Jolly N.P., Augustyn O.P.H., Pretorius I.S. (2006):** *The role and use of non-Saccharomyces yeasts in wine production.* S. Afr. J. Enol. Vitic, 27, p. 15-39
- (82) **Lagace L.S., Bisson L.F. (1990):** *Survey of yeast acid proteases for effectiveness of wine haze reduction.* Am. J. Enol. Vitic, 41, p. 147-155
- (83) **Banno I. (1963):** *Preliminary report on cell conjugation and mycelial stage in Rhodotorula yeasts.* J.Gen. Microbiol., p. 249-251
- (84) **Mostafa E.E., Saad M.M., Hassan H.M., Selim M.H. (2013):** *Production and some characterization of β -glucosidase from Rhodotorula glutinis isolate.* Journal of Applied Sciences Research, p. 2708-2715. ISSN 1819-544X
- (85) **Charoenchai C., Fleet G.H., Henschke P.A., Tood B.E.N.T. (1997):** *Screening of non-Saccharomyces wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes.* Australian Journal of Grape and Wine Research, Vol. 3, p. 2-8
- (86) **Suzuki K., Sakamoto H., Shinozaki Y., Tabata J., Watanabe T., Mochizuki A., Koitabashi M., Fujii T., Tsushima S., Kitamoto K.H. (2013):** *Affinity purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from a yeast isolated from the larval midgut of a stag beetle.* Aegus laevicollis, Vol. 97, p. 7679-7688
- (87) **Amin H.A., El- Menoufy H.A., El-Mehalawy A.A., Mostafa E.E. (2010):** *Microbial production of glycyrrhetic acid 3-O-mono- β -D-glucuronide from glycyrrhizin by Aspergillus terreus.* Malaysian Journal of Microbiology, Vol. 6, p. 209-216

- (88) **Chan Z., Tian S. (2005):** *Interaction of antagonistic yeast against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action.* Postharvest Biology and Technology, Vol. 36, p. 215-223
- (89) **Ikeda R., et al. (2002):** *Laccase and Melanization in Clinically Important Cryptococcus Species other than Cryptococcus neoformans.* J. Clin. Microbiol., 40, p. 1214-1218
- (90) **Mase T., Asano K., Ykeda Y., Kato Y., Esaki H., Isshik S. (2013):** *Characterization and Application of Lipase 39-A from Cryptococcus flavescens for Cheese Flavoring.* Food Science and Technology Research, p. 89-95
- (91) **Meyers A.J. (1984):** *Bulking in an industrial wastewater treatment system due to Geotrichum candidum.* Can. J. Microbiol., p. 966-970
- (92) **Gueho E., Buisnière J. (1975):** *Méthode d'identification biochimique de champignons filamenteux arthrosporés appartenant au genre Geotrichum Link ex Pers.* Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 126, p. 483-500
- (93) **Green A. J., Paskell S. L., Goldmintz D. (1967):** *Lipolytic fermentation of stickwater by yeasts.* Appl. Environ. Microbiol., 31, p. 569-575
- (94) **Arpai J., Bartl V. (1977):** *Potravinářská mikrobiologie*, 1. vyd. Bratislava
- (95) **Laborne M.J., Rieu Y., Ratomahenina R., Galzy P., Montet D., Pina M., Graille J. (1986):** *Geotrichum candidum cell multiplication trials on soapstocks.* Oléagineux, Vol 42, p. 83-86
- (96) **Phillips A., Pretorius G.H.J. (1991):** *Purification and characterization of an extracellular lipase of Galactomyces geotrichum.* Biotechnology Letters, Vol. 13, p. 833

- (97) **Xu H., Li M., He B. (1995):** *Immobilization of Candida cylindracea lipase on methyl acylatedivinyl benzene copolymer and its derivatives.* Enzyme Microbiol. Technol., Vol 17, p. 194-199
- (98) **Hang Y.D., Woodams E.E. (1991):** *Purification and characterization of lastatedehydrogenase from Geotrichum candidum.* Food chemistry, p. 15-17
- (99) **Kim S.J., Shoda M. (1999):** *Purification and Characterization of a Novel Peroxidase from Geotrichum candidum Dec 1. Involved in Decolorization of Dyels.* Appl. Environ. Microbiol., Vol. 65, p. 1029-1035
- (100) **Taragano M.V., Pilosof R.M.A. (1999):** *Application of Doehlert designs for water activity, pH and fermentation time optimization for Aspergillus niger pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation.* Enzyme and Microbial Technology, Vol. 25, p. 411-419
- (101) **Deshpande S.M., Rale B.V., Lynch M.J. (1992):** *Aureobasidium pullulans inapplied mikrobiology: A status report.* Enzyme Microb. Technol., Vol. 14
- (102) **Liu Z., Chi Z., Wang L., Li J. (2007):** *Production, purification and characterization of an extracellular lipase from Aureobasidium pullulans HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils.* UNESCO Chinese Center of Marine Biotechnology, Ocean University of China, Qingdao, Shandong, p. 266-303
- (103) **Kakebeeke P.I.J., Wit R.J.W., Konijn T.M. (1980):** *Folic Acid Deaminase Activity During Development in Dictyostelium discoideum.* J. of Bacteriology, p. 307-312
- (104) **Guilliermond A. (2003):** *Yeasts: Culture, Identification and Microbiology.*, p. 148. ISBN-10: 1929148143
- (105) **Hun C.J., R. Rahman R.N.Z.A, Salleh A.B., Basri M. (2003):** *A newly isolated organic solvent tolerant Bacillus sphaericus 205y producing organic solvent-stable lipase.* Biochem. Eng. J., Vol. 15, p. 147-151

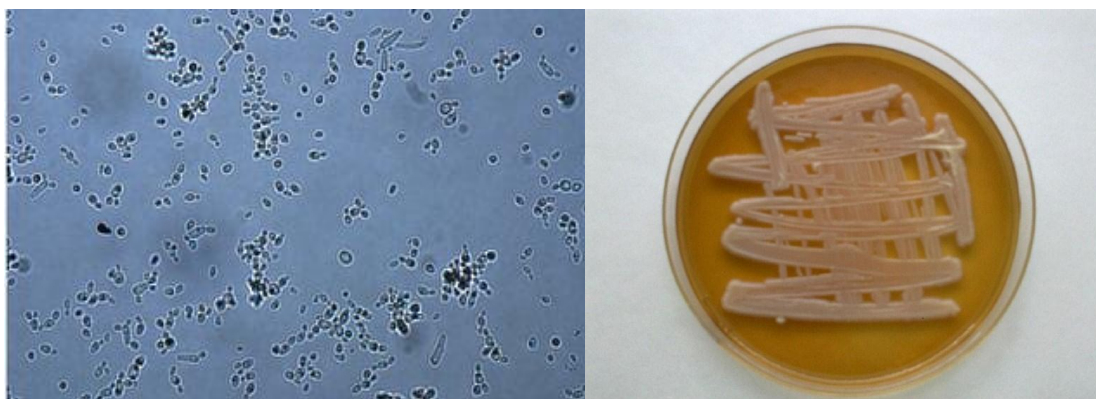
- (106) **Treichel H., Oliveira D., Mazutti M.A., Luccio M.D., Oliveira J.V. (2010):** *A Review on Microbial Lipases Production.* Food Bioprocess Technol., Vol. 3, p. 182-196
- (107) **Darvishi F., Nahvi I., Zarkesh-Esfahani H., Momenbeik F., (2009):** *Effect of Plant Oils upon Lipase and Citric acid Production in Y.lipolytica Yeast.* J. of Biomed. And Biotechnol., p. 7
- (108) **Yadav K.N.S., Adsul M.G., Bastawde K.B., Jadhav D.D., Thulasiram H.V., Gokhale D.V. (2011):** *Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from Yarrowia lipolytica NCIM 3639.* Bioresource Technol., p. 10663-10670
- (109) **Dominguez A., Deive F.J., Sanroman M.A., Longo M.A. (2003):** *Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by Yarrowia lipolytica.* J. Chem.Technol. Biotechnol. p. 1166-1170
- (110) **Zeng X., Xiao X., Wang P., Wang F.P. (2004):** *Screening and characterization of psychrotrophic, lipolytic bacteria from deep-sea sediments.* J. Microbiol.Biotechnol., p. 952-958
- (111) **Sigler K. and Hofer M. (1991):** *Mechanisms of acid extrusion of yeast.*Bioch. et Biophys. Acta, p. 375-391
- (112) **Yu M., Qin S., Tan T. (2007):** *Purification and characterisation of the extracellular lipase Lip2 from Yarrowia lipolytica.* Process Biochemistry, p. 384-391
- (113) **Kumari A., Gupta R. (2012):** *Extracellular expression and characterization of thermostable lipases, LIP 8, LIP 14 and LIP 18 from Yarrowia lipolytica.* Biotechnol. Lett., p. 1733-1739
- (114) **Aloulou A., Puccinelli D., Caro A., Leblond Y., Carrière F. (2007):** *A comparative study on two fungal lipases from Thermomyces lanuginosus and Yarrowia lipolytica shows the combined effects of detergents and pH on lipase adsorption and activity.* Biochim. Biophys. Acta, p. 1446-1456

- (115) **Rodriguez J., Aloulou A., Puccinelli D., Mouz N., Leclarine J., Leblond Y., Carrière F. (2007):** *Purification and biochemical characterization of the LIP2 lipase from Yarrowia lipolytica.* Biochim. Biophys. Acta, p. 228-237
- (116) **Brígida A.S., Amaral P.F.F, Coelho M.A.Z., Goncalves L.R.B. (2013):** *Lipase from Yarrowia lipolytica: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst.* J. of Molecular Catalysis, p. 148-158
- (117) **Yu M., Qin S., Tan T. (2007):** *Purification and characterisation of the extracellular lipase Lip2 from Yarrowia lipolytica.* Process Biochemistry, p. 384-391
- (118) K dispozici online na:
<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:43ftw8BIIfEJ:ibiochemie.upol.cz/WebGraphics/biochemie/download/Modul-02A.ppt+&cd=4&hl=cs&ct=clnk&gl=cz>
- (119) **Feller G., Gerday C. (2003):** *Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation.* Nat. Rev. Microbiol., p. 200-208
- (120) **Deive F.J., Sanromán M.A., Longo M.A. (2010):** *Biodegradation and utilization of waste cooking oil by Yarrowia lipolytica CECT 1240.* J. Chem. Technol. Biotechnol., Vol. 85, p. 258-266
- (121) **Lopes M., Gomes N., Goncalves C., Coelho M.A.Z., Mota M., Belo I. (2007):** *Yarrowia lipolytica lipase production enhanced by increased air pressure.* Lett. In Applied Microb. ISSN 0266-8254

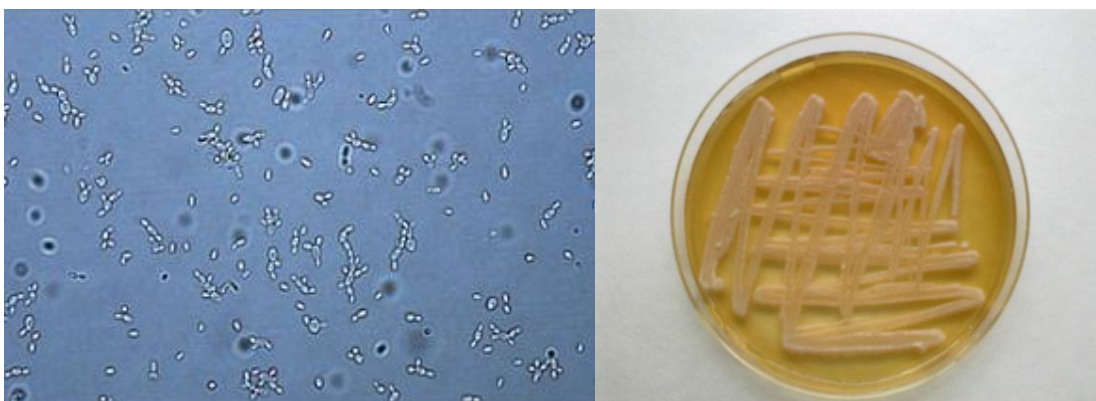
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

YL	<i>Yarrowia lipolytica</i>
PF	<i>Pseudozyma fusiformata</i>
MG	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
MP	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
RG	<i>Rhodotorula glutinis</i>
RM	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
CM	<i>Cryptococcus magnus</i>
CF	<i>Cryptococcus flavescens</i>
GC	<i>Galactomyces candidum</i>
AP	<i>Aureobasidium pullulans</i>
BM	bazální médium
+G	bazální médium s glukózou
OO	bazální médium s olivovým olejem
TR	bazální médium s Tritonem X-100
TW20	bazální médium s Tweenem 20
TW60	bazální médium s Tweenem 60
TW80	bazální médium s Tweenem 80
F-C	Folin-Ciocalteovo činidlo
TCA	trichloroctová kyselina
<i>p</i> -NF	<i>p</i> -nitrofenol
<i>p</i> -NFB	<i>p</i> -nitrofenylbutyrát (C4:0)
<i>p</i> -NFL	<i>p</i> -nitrofenyllaurátu (C12:0)
<i>p</i> -NFP	<i>p</i> -nitrofenylpalmitát (C16:0)
L	lednice
M	mrazicí box

9 PŘÍLOHA



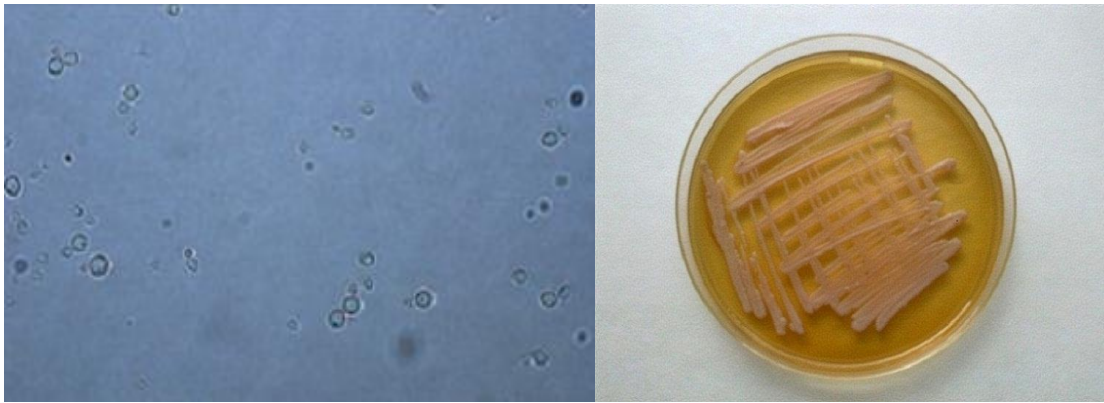
Obr. 4: Pseudozyma fusiformata pod světelným mikroskopem, zvětšeno 100x a nárůst kolonie na Petriho misce po 24 hodinové kultivaci.



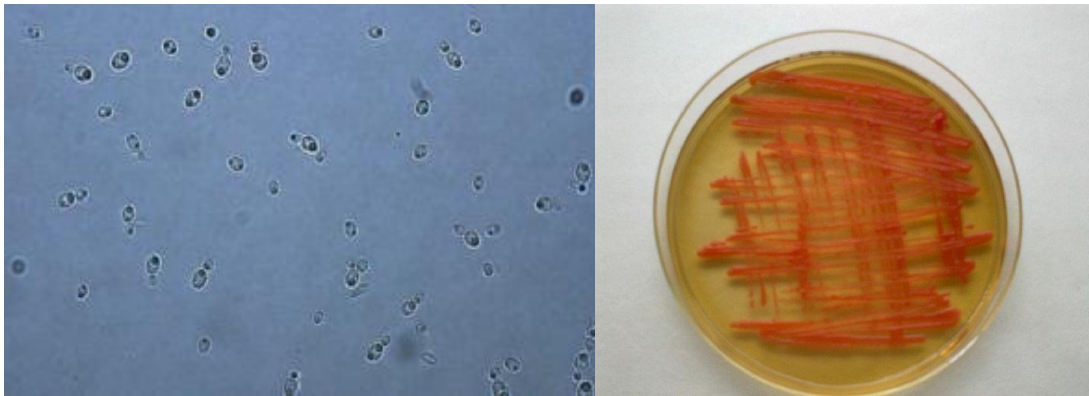
Obr. 5: Meyerozyma guilliermondii pod světelným mikroskopem, zvětšeno 100x a nárůst kolonie na Petriho misce po 24 hodinové kultivaci.



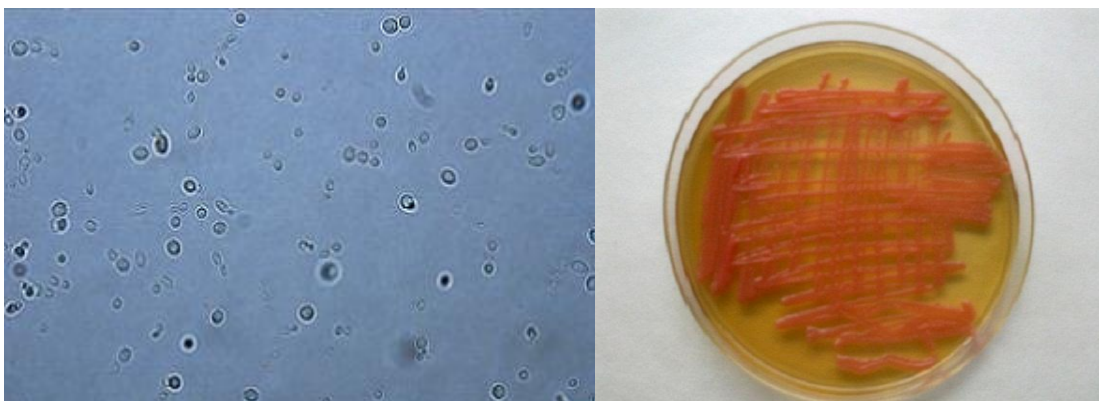
Obr. 6: Yarrowia lipolytica pod světelným mikroskopem, zvětšeno 100x a nárůst kolonie na Petriho misce po 24 hodinové kultivaci.



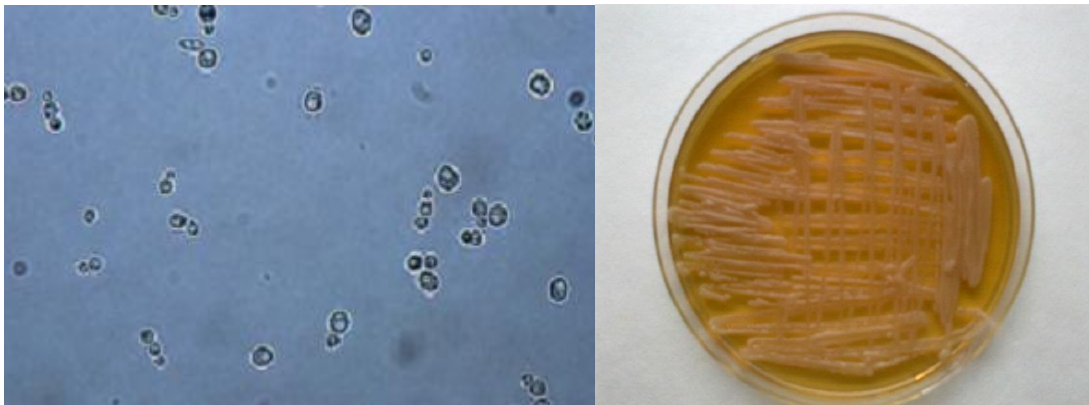
Obr. 7: Metschnikowia pulcherrima pod světelným mikroskopem, zvětšeno 100x a nárůst kolonie na Petriho misce po 24 hodinové kultivaci.



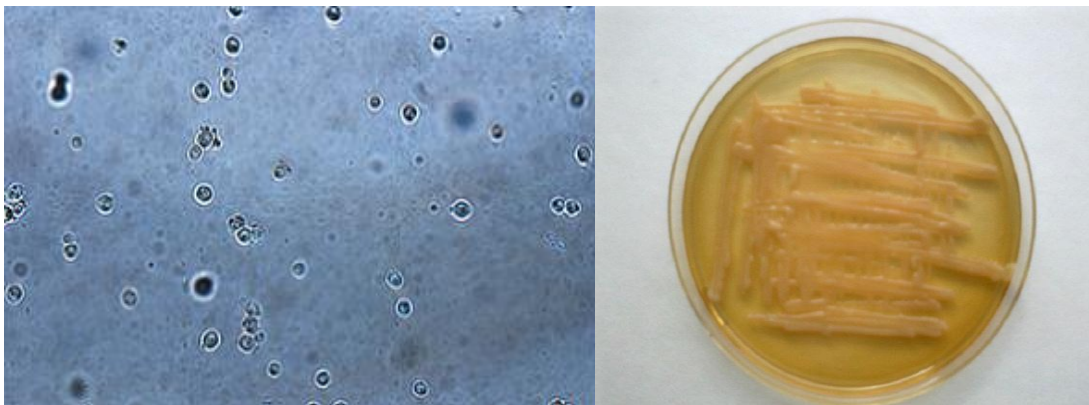
Obr. 8: Rhodotorula glutinis pod světelným mikroskopem, zvětšeno 100x a nárůst kolonie na Petriho misce po 24 hodinové kultivaci.



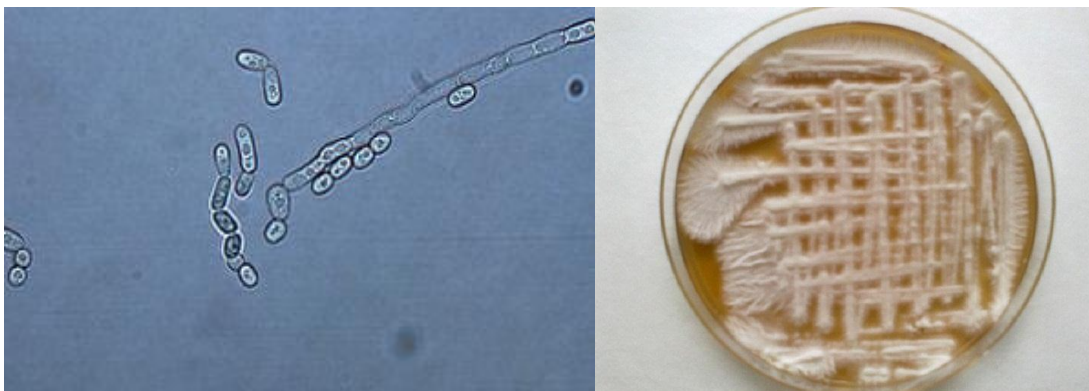
Obr. 9: Rhodotorula mucilaginosa pod světelným mikroskopem, zvětšeno 100x a nárůst kolonie na Petriho misce po 24 hodinové kultivaci.



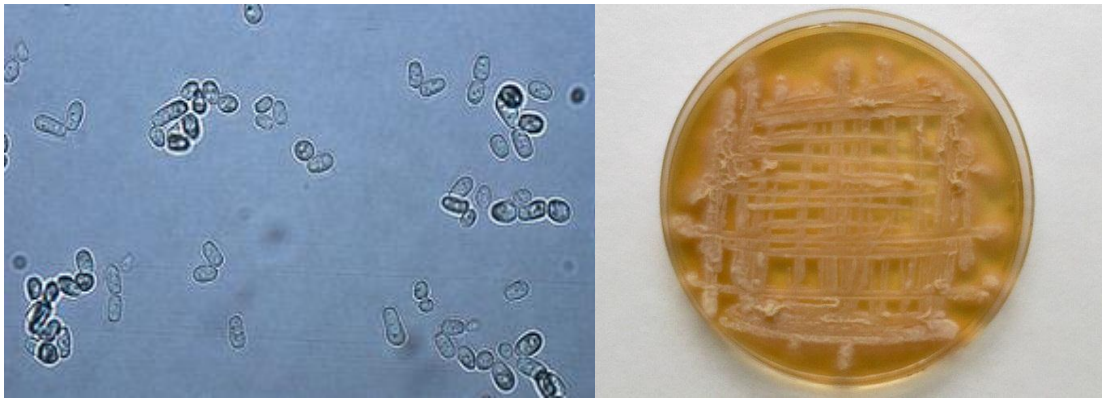
Obr. 10: Cryptococcus magnus pod světelným mikroskopem, zvětšeno 100x a nárůst koloniena Petriho misce po 24 hodinové kultivaci.



Obr. 11: Cryptococcus flavescens pod světelným mikroskopem, zvětšeno 100x a nárůst kolonie na Petriho misce po 24 hodinové kultivaci.



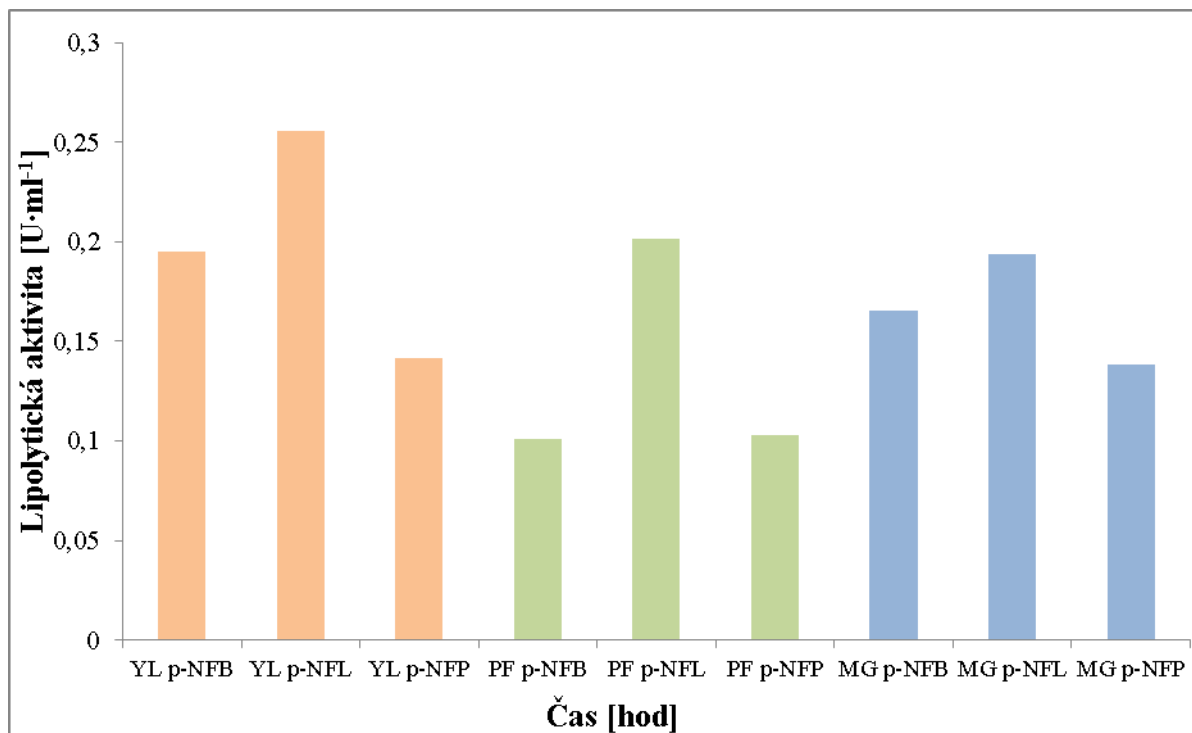
Obr. 12: Galactomyces candidum pod světelným mikroskopem, zvětšeno 100x a nárůst kolonie na Petriho misce po 24 hodinové kultivaci.



Obr. 13: Aureobasidium pullulans pod světelným mikroskopem, zvětšeno 100x a nárůst kolonie na Petriho misce po 24 hodinové kultivaci.



Obr. 14: Bioreaktor.



Graf 30: Stanovení lipolytické aktivity extracelulárních enzymů za použití různých substrátů (*p*-NFL, *p*-NFB, *p*-NFP) u kmenů *Yarrowia lipolytica*, *Pseudozyma fusiformata* a *Meyerozyma guilliremondii*, které byly kultivovány 144 hodin v bazálním médiu s Tweenem 80.