



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PRODUKCE LIPOLYTICKÝCH ENZYMŮ KVASINKAMI

PRODUCTION OF LIPOLYTIC ENZYMES BY YEASTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kristína Bradáčová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: FCH-DIP1233/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Bc. Kristína Bradáčová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**
Akademický rok: 2017/2018

Název diplomové práce:

Produkce lipolytických enzymů kvasinkami

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše – lipázy, produkce kvasinkami
- 2) kultivace vybraných druhů karotenogenních kvasinek na různých typech zdroje uhlíku včetně odpadního tuku
- 3) optimalizace stanovení extracelulární lipázy produkované kvasinkami
- 4) stanovení vybraných růstových a metabolických charakteristik kvasinek
- 5) produkce a charakterizace extracelulární kvasinkové lipázy, srovnání s jinými druhy lipáz

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

Bc. Kristína Bradáčová
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Táto diplomová práca je zameraná na riadenú produkciu lipolytických enzýmov, bioaktívnych látok a lipidov produkovaných karotenoidnými kvasinkami. Teoretická časť práce je zameraná na charakterizáciu lipáz, karotenoidov, lipidov, ich vlastností, možnosti produkcie a aplikácie. V experimentálnej časti boli enzýmy, karotenoidy a lipidy produkované pomocou kvasiniek *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cystofilobasidium macerans* a *Sporidiobolus salmonicolor* submerznou kultiváciou na minerálnych médiách s rôznymi prídavkami: glukóza, glycerol, tuk, tuk s glukózou, tuk s polysorbátom 80, tuk s glycerolom, tuk s polyetylénglykolom, tuk s vyšším a nižším prídavkom kyseliny palmitovej, enzymatický hydrolyzát tuku, kyslý hydrolyzát a bázičný hydrolyzát. Bola sledovaná aktivita extracelulárnej lipázy po 96 hodinovej kultivácii, koncentrácia β -karoténu, celkových karotenoidov, ergosterolu a ubichinónu v bunkách pomocou HPLC, koncentrácia mastných kyselín a množstvo tuku pomocou GC. Produkcia sa líšila v závislosti na použitej kvasinke a použitom substráte. Karotenoidy boli najviac produkované kvasinkou *Cystofilobasidium macerans*, ergosterol kvasinkou *Sporidiobolus salmonicolor*. Ubichinón bol takmer ekvivalentne produkovaný u každej kvasinky. Lipázová aktivita bola najvyššia u kvasinky *Sporidiobolus salmonicolor*. Vybraná vzorka média s vysokou lipolytickou aktivitou bola ďalej separovaná a analyzovaná pomocou ultrafiltrácie a PAGE-SDS elektroforézy. Táto diplomová práca bola robená v rámci medzinárodného projektu „LipoFungi“.

Kľúčové slová: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cystofilobasidium macerans*, *Sporidiobolus salmonicolor*, lipolytický enzým, karotenoidy, lipidy.

Abstract

This diploma thesis is focused on controlled production of lipolytic enzymes, bioactive substances and lipids by carotenogenic yeasts. Theoretical part deals with characterization of lipolytic enzymes, carotenoids, lipids and their properties, possibility of production and application. In experimental part the enzymes, carotenoids and lipids were produced by red yeasts *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cystofilobasidium macerans* and *Sporidiobolus salmonicolor* by submerged cultivation in mineral medium with different additions: glucose, glycerol, fat, fat with glucose, fat with polysorbate 80, fat with glycerol, fat with polyethylene glycol, fat with higher and lower addition of palmitic acid, enzymatic fat hydrolysate, acidic hydrolysate a basic hydrolysate. The activity of extracellular lipase was monitored in medium after 96-hour cultivation. Concentration of β -carotene, total carotenoids, ergosterol and ubiquinone was determined by HPLC, concentration of fatty acids and amount of fat by GC. Production had differed depending on used yeasts and substrate. As the best producer of carotenoids *Cystofilobasidium macerans* was found, ergosterol was highly produced by *Sporidiobolus salmonicolor*. The production of ubiquinone was almost equivalent in all yeasts and lipolytic activity was the highest in *Sporidiobolus salmonicolor*. The particular medium sample with high lipolytic activity was further separated and analysed by ultrafiltration and PAGE-SDS electrophoresis. This diploma thesis was done within the international project „LipoFungi“.

Keywords: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cystofilobasidium macerans*, *Sporidiobolus salmonicolor*, lipolytic enzyme, carotenoids, lipids.

BRADÁČOVÁ, K. *Produkce lipolytických enzymů kvasinkami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 72 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

Týmto by som chcela poďakovať svojej vedúcej diplomovej práce prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc. za odborné vedenie, rady a možnosť spolupracovať na projekte LipoFungi. Ďalej ďakujem svojmu konzultantovi Ing. Martinovi Szotkowskému za pomoc, trpezlivosť a veľkú ochotu v priebehu práce. Veľká vďaka patrí aj mojej rodine za veľkú podporu počas celého štúdia.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1	Karotenoidné kvasinky	9
2.1.1	Rod <i>Rhodotorula</i>	9
2.1.2	Rod <i>Sporidiobolus</i>	10
2.1.3	Rod <i>Cystofilobasidium</i>	11
2.2	Lipolytické enzýmy	12
2.2.1	Priemyslové aplikácie lipáz	13
2.2.2	Mikroorganizmy produkujúce lipázy a podmienky ich produkcie	13
2.2.3	Aktivácia a inaktivácia lipolytického enzýmu	14
2.3	Karotenoidy	14
2.3.1	Karotény	14
2.3.2	Xantofyly	15
2.4	Lipidy	15
2.4.1	Mastné kyseliny	15
2.5	Ergosterol	16
2.6	Ubichinón	16
2.7	Spôsoby kultivácie mikroorganizmov	17
2.7.1	Submerzná kultivácia	17
2.8	Hydrolýza tuku	17
2.9	Analytické metódy	17
2.9.1	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC)	17
2.9.2	Plynová chromatografia	18
2.9.3	Tenkovrstvá kvapalinová chromatografia	19
2.10	Metódy pre izoláciu a purifikáciu enzýmov	19
2.10.1	Ultrafiltrácia	19
2.10.2	PAGE-SDS elektroforéza	19
2.10.3	Lyofilizácia	20
3	Cieľ práce	21
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	22
4.1	Použité chemikálie	22
4.2	Prístroje a pomôcky	23

4.3	Použité kmene mikroorganizmov	23
4.4	Kultivácia kvasiniek	23
4.4.1	Inokulácia	23
4.4.2	Produkčné médium.....	24
4.5	Hydrolýza tuku	26
4.5.1	Kyslá hydrolýza.....	26
4.5.2	Bázická hydrolýza	26
4.5.3	Enzymatická hydrolýza	26
4.6	Gravimetrické stanovenie hmotnosti biomasy	26
4.7	Stanovenie enzýmovej aktivity lipáz	27
4.7.1	Stanovenie kalibračnej krivky p-nitrofenolu.....	27
4.7.2	Príprava substrátu	27
4.7.3	Stanovenie lipolytickej aktivity.....	27
4.8	Extrakcia karotenoidov a lipidov z kvasiniek.....	27
4.8.1	Analýza karotenoidov na HPLC	28
4.9	Transesterifikácia lipidov	28
4.9.1	Analýza lipidov na GC	29
4.10	Tenkovrstvá kvapalinová chromatografia.....	29
4.11	Ultrafiltrácia	29
4.12	PAGE-SDS	30
4.12.1	Roztoky	30
4.12.2	Príprava polyakrylamidového gélu	30
4.12.3	Príprava vzoriek	30
4.12.4	Prevedenie	31
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	32
5.1	Gravimetrické stanovenie biomasy	32
5.2	Stanovenie enzýmovej aktivity lipáz.....	33
5.2.1	Lipázové aktivity kvasinky <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	34
5.2.2	Lipázové aktivity kvasinky <i>Cystofilobasidium macerans</i>	36
5.2.3	Lipázové aktivity kvasinky <i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	37
5.2.4	Lipázové aktivity namerané na médiách s tukovými hydrolyzátmi.....	39
5.3	Vyhodnotenie produkcie bioaktívnych látok kvasinkami kultivovanými na tukových médiách pomocou HPLC	41

5.4	Vyhodnotenie produkcie lipidov kvasinkami pomocou GC	48
5.5	Substrátová špecifickosť lipáz produkovaných karotenogénnymi kvasinkami	56
5.6	Purifikácia lipázy z kvasinky <i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	57
5.6.1	Ultrafiltrácia	59
5.6.2	PAGE-SDS.....	59
6	ZÁVERY.....	62
7	LITERATÚRA.....	65
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	69
9	PRÍLOHY.....	70
9.1	Mikroskopický pohľad na kvasinky kultivované v produkčných médiách.....	70

1 ÚVOD

Lipolytické enzýmy sú dôležitou súčasťou rôznych odvetví priemyslu ako napr. potravinárskeho, farmaceutického alebo kozmetického. Sú schopné štiepiť tuky na mastné kyseliny a glycerol, a preto sú biotechnologicky veľmi významné. Nájdenie vhodného producenta týchto enzýmov môže znateľne znížiť cenu celého biotechnologického procesu, jeho využitie a v neposlednom rade cenu finálneho produktu.

Významnými priemyslovo využívanými producentmi lipáz sú mikroorganizmy, najmä kvasinky a plesne schopné využívať lipidy ako zdroj uhlíka. Niektoré z týchto mikroorganizmov produkujú karotenoidy.

Karotenoidy sú skupinou prírodných farbív, ktoré hrajú nezastupiteľnú rolu v prírode a majú veľké uplatnenie v priemysle v odvetviach potravinárskeho, poľnohospodárskeho a farmaceutického priemyslu. Vyskytujú sa prakticky vo všetkých vývojových stupňoch organizmov na planéte, od jednobunkových prokaryotických siníc, cez eukaryotické nižšie aj vyššie organizmy. Ich vysoká antioxidačná aktivita predurčuje ich využitie v doplnkoch stravy, liečivých prípravkoch alebo krmivách.

Táto práca bola vypracovaná v rámci medzinárodného projektu „LipoFungi“, ktorý sa zaoberá biokonverziou odpadného živočíšneho tuku na kvasinkovú biomasu obohatenú o karotenoidy, nenasýtené mastné kyseliny a iné bioaktívne látky. Karotenoidné kvasinky sú ako producent extracelulárnych lipáz, karotenoidov, lipidov a rady ďalších aktívnych látok ideálnym mikroorganizmom vhodným pre tento typ biotechnologickej aplikácie.

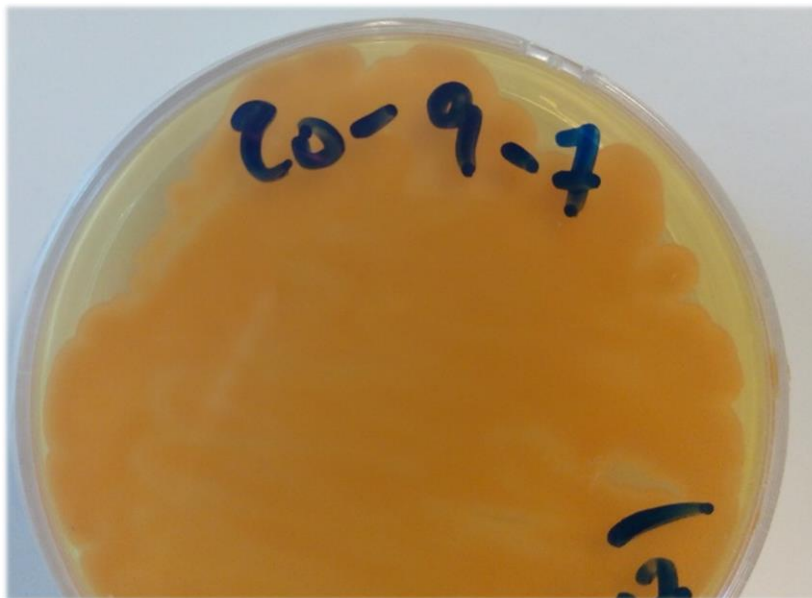
2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Karotenoidné kvasinky

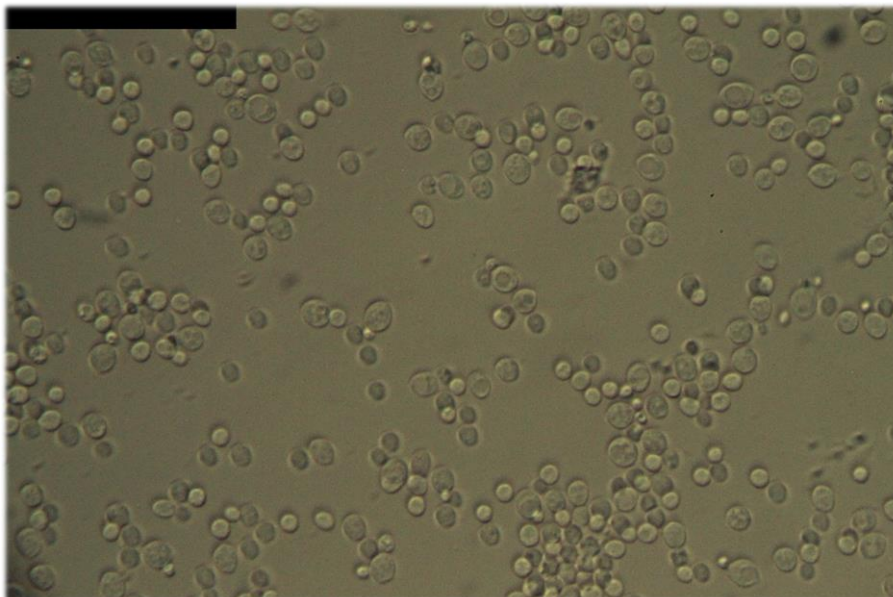
Kvasinky sú heterotrofné eukaryotické mikroorganizmy, ktoré zaraďujeme medzi huby. Významné sú hlavne tým, že väčšina z nich dokáže skvasovať cukry na etanol a oxid uhličitý. Vyskytujú sa buď ako jednobunkové organizmy alebo vo forme vlákien. Rozmnožujú sa pučaním alebo priehradkovým delením a nie sú schopné fotosyntézy [1]. Karotenoidné kvasinky akumulujú karotenogénne pigmenty ako sú β -karotén, torulén a torularhodín. Tieto pigmenty tvoria zafarbenie do červena, žltá alebo oranžova. Karotenoidné kvasinky sa radia do skupiny *Basidiomycetae* [2]. Medzi najdôležitejších a najčastejších producentov karotenoidov z kvasiniek patria rody *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cystofilobasidium* a *Xanthophyllomonas*. Tieto rody sú tiež známe vysokou produkciou lipidov so zvýšeným obsahom polynenasýtených mastných kyselín, ktoré majú široké uplatnenie v potravinárstve alebo priemysle biopalív [1].

2.1.1 Rod *Rhodotorula*

Ich bunky majú guľovitý až elipsoidný tvar. Sú sfarbené červenofialovo, oranžovo až žltá, a to vďaka obsahu karotenoidných farbív. Netvoria endospóry alebo iné spóry, a ani pseudomycélium [1]. Tento rod neskvasuje žiadne cukry a má silno vyvinutý pentózový cyklus využívania glukózy. Medzi najbežnejšie druhy týchto kvasiniek patrí *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* a *Rhodotorula minuta* [3]. Optimálna teplota rastu buniek rodu *Rhodotorula* je 25–40 °C [4].



Obrázok 1: *Rhodotorula mucilaginosa*



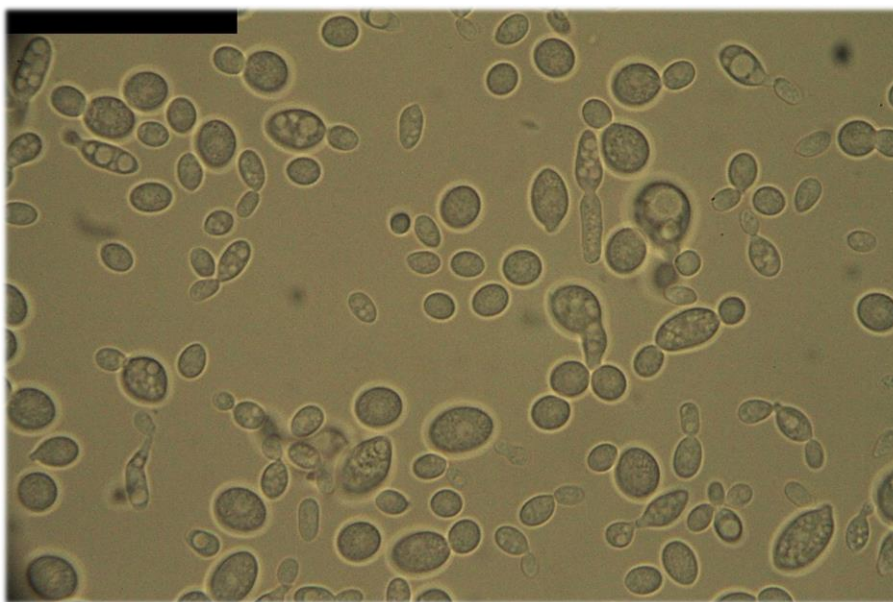
Obrázok 2: *Rhodotorula mucilaginosa* – bunky

2.1.2 Rod *Sporidiobolus*

Bunky rodu *Sporidiobolus* sú vajcovitého až elipsoidného tvaru veľkosti 2–5 x 8–12 μm . Kolónie sú ružovkasté, polomatiné a hladké [5]. Existuje sedem akceptovaných druhov, z ktorých päť produkuje priečne septované bazídiá. Ostatné dva druhy majú krátke hýfy. Rod *Sporidiobolus* je úzko spätý s rodom *Rhodosporidium*. Konkrétne *S. microsporus* a *S. ruineniae* sú viac spojené s rodom *Rhodosporidium* než so *Sporidiobolus* [6].



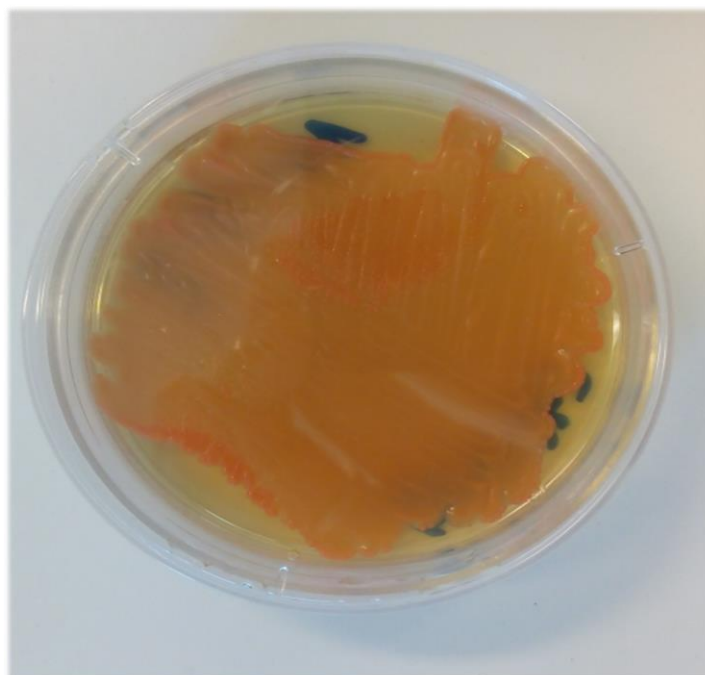
Obrázok 3: *Sporidiobolus salmonicolor* [7]



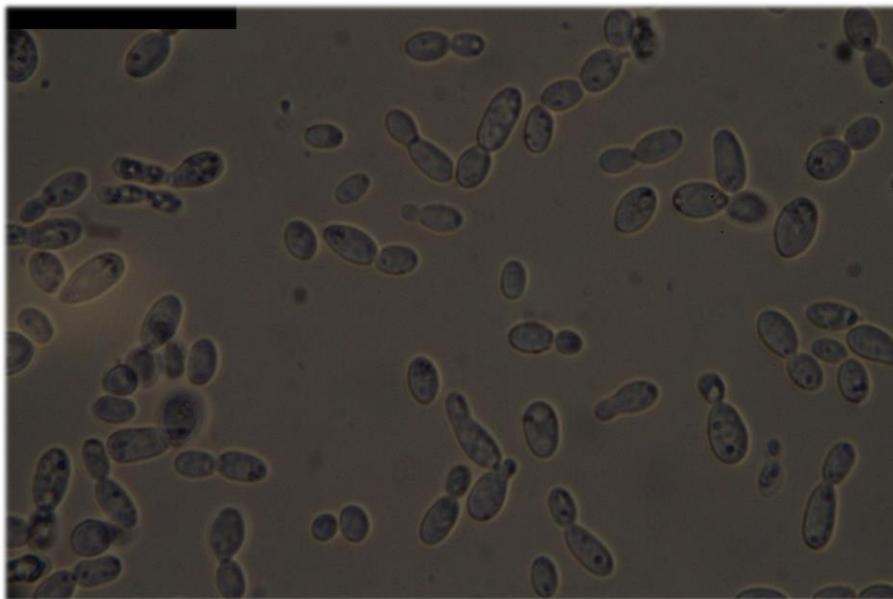
Obrázok 4: *Sporidiobolus salmonicolor* – bunky

2.1.3 Rod *Cystofilobasidium*

Svojimi fyziologickými vlastnosťami sa tento rod veľmi podobá rodu *Rhodotorula*, odlišuje sa však typom bazídia – tvorí tzv. holobazídium, ktoré je jednobunkové a neseptované. Najznámejšími zástupcami sú *Cystofilobasium capitatum*, *C. bisporidii*, *C. infirmominiatum* [8]. Jednotlivé druhy sa odlišujú farbou náteru a tiež životným cyklom. Podľa druhu je sfarbenie červené, oranžové alebo krémové, kolónie majú lesklý a hladký povrch. Všetky tieto druhy, vrátane *Cystofilobasidium ferigula*, obsahujú v bunkovej stene xylózu, sú schopné produkovať látky podobné škrobu a utilizovať glukuronát [9].



Obrázok 5: *Cystofilobasidium macerans*



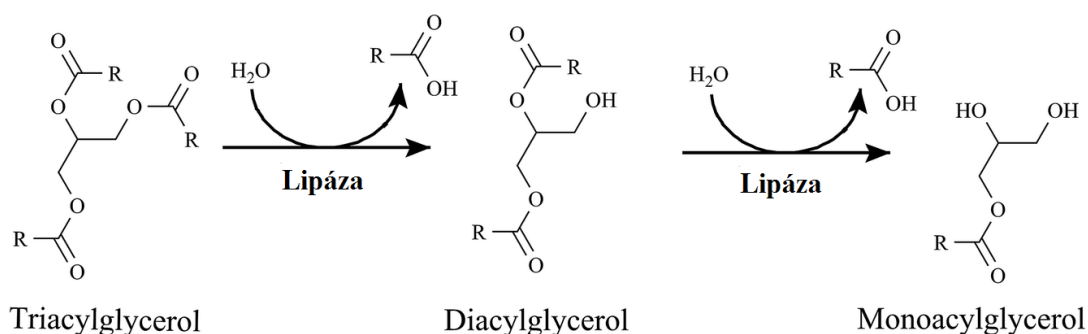
Obrázok 6: *Cystofilobasidium macerans* – bunky

2.2 Lipolytické enzýmy

Sú to enzýmy, ktoré katalyzujú hydrolýzu tukov na mastné kyseliny a glycerol [10]. Lipolytické enzýmy, ktoré hydrolyzujú acylglyceroly s uhlíkatým reťazcom mastných kyselín kratším než 10 C, sa označujú ako esterázy alebo karboxylázy. Tie, ktoré hydrolyzujú acylglyceroly s počtom uhlíkov vyšším ako 10, sú označované ako lipázy alebo triacylglycerol-acylhydrolázy. Rozdiel je ešte v tom, že esterázy sú aktívne vo vodných roztokoch, zatiaľ čo lipázy sú aktívnejšie skôr na rozhraní voda-lipid [11]. Lipázy (EC 3.1.1.3.) sú ubikvitné enzýmy produkované rastlinami, živočíchmi a mikroorganizmami [12]. Lipolytické enzýmy sa delia do 3 skupín:

- *Nešpecifická skupina*: lipolytické enzýmy tejto skupiny uvoľňujú mastné kyseliny zo všetkých troch pozícií acylglycerolu a kompletne hydrolyzujú triacylglyceroly na MK a glycerol.
- *1,3-špecifická skupina*: uvoľňuje mastné kyseliny z vonkajších pozícií triacylglycerolu a vznikajú tak 1,2-diacylglyceroly, 2,3-diacylglyceroly a 2-mono-acylglyceroly za uvoľnenia mastných kyselín. Dlhá inkubácia triacylglycerolu s 1,3-špecifickými lipázami vedie väčšinou k úplnej hydrolýze triacylglycerolov na mastné kyseliny a glycerol.
- Tretia skupina zahŕňa lipolytické enzýmy, ktoré *preferujú len určité mastné kyseliny*.

Väčšina lipáz patrí medzi extracelulárne enzýmy, ktoré sú do prostredia uvoľňované počas neskoršej exponenciálnej a včasnej stacionárnej rastovej fázy. Väčšia časť mikroorganizmov môže tiež produkovať viac než jeden typ extracelulárnych lipáz s rôznou špecifickosťou [11].



Obrázok 7: Mechanizmus lipázovej aktivity

2.2.1 Priemyslové aplikácie lipáz

Lipolytické enzýmy predstavujú najvýznamnejšiu skupinu biokatalyzátorov pre biotechnologické aplikácie, ktoré sa využívajú pri syntézach biopolymérov, bionafty, pri produkcii agrochemikálií a aromatických zlúčenín. Používajú sa tiež v pivovarníctve a vinárstve, pri výrobe syrov a potravinových doplnkov. Vo farmaceutickom priemysle pri transesterifikáciách a hydrolýzach zohrávajú primárnu rolu v produkcii špeciálnych lipidov. Majú význam pri modifikáciách monoglyceridov a ich využití ako emulgátorov. Niektoré priemyslovo významné chemikálie vyrábané chemickými procesmi z tukov a olejov môžu byť produkované aj lipázami s oveľa väčšou a lepšou špecifickosťou [13].

2.2.2 Mikroorganizmy produkujúce lipázy a podmienky ich produkcie

Mikroorganizmy sú obľúbenými zdrojmi priemyselných enzýmov vďaka ich ľahkej dostupnosti a rýchlemu rastu. Často sa prevádzajú genetické manipulácie s rekombinantnou DNA, aby sa cielene zvýšila produkcia enzýmu. Produkcia enzýmov je dôležitá pre priemysel kvôli vysokej účinnosti enzýmov z rôznych mikroorganizmov, ktoré dobre fungujú v širokom rozsahu rôznych chemických a fyzikálnych podmienok.

Významnými kvasinkami, ktoré produkujú lipázy sú napr. *Candida antarctica*, *Candida tropicalis*, rody *Pichia*, *Saccharomyces* alebo *Rhodotorula*. Veľmi často využívanými producentmi lipolytických enzýmov sú tiež plesne, a to napr. *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* alebo *Rhizopus nigricans*.

Väčšina lipáz je extracelulárnych, čiže sú vylučované cez bunkové membrány do prostredia (médiu). Množstvo vytvorenej lipázy závisí na niekoľkých faktoroch, ako napr. teplota, pH, obsah dusíka a uhlíka, zdroj lipidov alebo koncentrácia rozpusteného kyslíka. Optimum lipázovej aktivity u kvasiniek je zvyčajne cca 20 °C, pH 6–9 a molekulová hmotnosť enzýmu sa väčšinou pohybuje v rozmedzí 40–60 kDa.

Vo všeobecnosti, produkcia lipáz je stimulovaná hlavne lipidmi, avšak dôležitú rolu hrajú aj rôzne induktory, ako napr. triacylglyceroly, voľné mastné kyseliny, hydrolyzovateľné estery, glycerol a rôzne emulgátory [14,15].

2.2.3 Aktivácia a inaktivácia lipolytického enzýmu

Na expresiu lipázovej aktivity nie sú potrebné kofaktory. Avšak na stimuláciu enzýmovej aktivity lipázy sa používa kation Ca^{2+} . Naopak, lipázová aktivita môže byť veľmi silno inhibovaná iónmi Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+} alebo jemne inhibovaná iónmi Zn^{2+} , Mg^{2+} , EDTA alebo SDS [15].

2.3 Karotenoidy

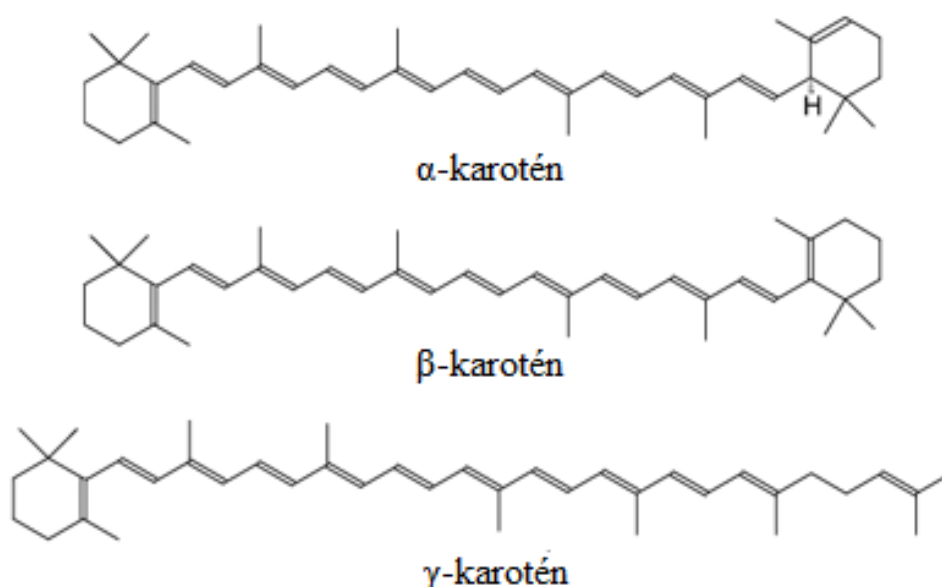
Karotenoidy sú dôležitá skupina prírodných tetraterpénových pigmentov, ktoré sú široko zastúpené v prírode. Je identifikovaných viac ako 700 karotenoidov hlavne v rastlinách, ale aj v živočíchoch, mikroorganizmoch a riasach. Delia sa na dve skupiny – karotény a xantofyly. Karotény sú uhľovodíky tvorené len uhlíkom a vodíkom, zatiaľ čo xantofyly sú oxidované karotenoidy, ktoré obsahujú hydroxylovú, keto- alebo epoxy- skupinu [16].

Karotenoidy sú výborné lapače kyslíkových radikálov v rastlinách, a preto dokážu ochrániť bunkové komponenty, ako sú chlorofyly, lipidy, proteíny a DNA pred oxidačným poškodením [17].

2.3.1 Karotény

Z chemického hľadiska sú to uhľovodíky, ktoré majú aspoň 40 atómov C. Patrí sem najjednoduchší acyklický polynenasýtený uhľovodík lykopén. Ostatné karotény sa tvoria cyklizáciou z acyklických Ψ -karoténov enzýmovou katalyzovanou reakciou. Môžu tak vzniknúť štruktúry β -karoténu a α -karoténu (zacyklenie na oboch koncoch molekuly) alebo γ -karoténu (na jednom konci) [18,19]. Medzi najvýznamnejšie provitamíny A radíme β -karotén, ktorý sa väčšinou vyskytuje v prítomnosti α -karoténu, γ -karoténu, a ďalších provitamínov A [20]. Obsahuje ho hlavne mrkva, marhule alebo čerešne [21].

Medzi karotény patrí tiež torulén a torularodín, ktoré majú podobnú funkciu ako provitamíny A. Môžu byť syntetizované napr. rodmi *Rhodotorula*, *Cystofilobasidium* alebo *Sporobolomyces* [22].



Obrázok 8: Štruktúra vybraných karoténov

2.3.2 Xantofyly

Xantofyly vznikajú primárne biochemickou oxidáciou (hydroxyláciou) karoténov. Patria medzi deriváty odvodené od acyklických karoténov. Jedným zo zástupcov je zeaxantín, ktorý radíme medzi dihydroxysubstituované pigmenty, a ktorého prekursorom je β -karotén. Ďalej sem zaradíme luteín (prekursorom je α -karotén) a astaxantín [19,20].

2.4 Lipidy

Lipidy sú vo vode nerozpustné prírodné látky, ktoré sa však dobre rozpúšťajú v nepolárnych rozpúšťadlách. Ich dôležitá biologická funkcia spočíva v tom, že slúžia ako zdroj a rezerva energie, a tiež majú ochrannú a štruktúrnú funkciu [21].

Hlavnou zložkou tukov a olejov sú triacylglyceroly, kde glycerol je esterifikovaný masnými kyselinami. Okrem produkcie triacylglycerolov dokážu kvasinky syntetizovať fosfolipidy (2–10 % celkových lipidov) s malým množstvom sterolov a ich esterov [23].

S rozvojom ekológie v celosvetovom merítku a daných právnych predpisov vznikol obrovský trh pre využitie lipidov v automobilovom priemysle. S príchodom bionafty rapídne stúpla cena rastlinných surovín bohatých na lipidy a s nimi spojené ceny potravín. A preto bolo potrebné zaviesť nové nekonvenčné zdroje lipidov, ktoré by boli použité na výrobu bionafty. Jedna z variant môže byť využitie oleogénnych mikroorganizmov a odpadných substrátov z potravinárskeho a poľnohospodárskeho priemyslu. Jej potenciál spočíva v schopnosti mikroorganizmov produkovať veľké množstvo biomasy obsahujúcej až 60–70% lipidov s pomerne veľkým zastúpením PUFA a tiež schopnosti utilizovať ako zdroj energie radu odpadných substrátov [24].

2.4.1 Mastné kyseliny

V prírode a potravinách sa nachádzajú tieto skupiny mastných kyselín:

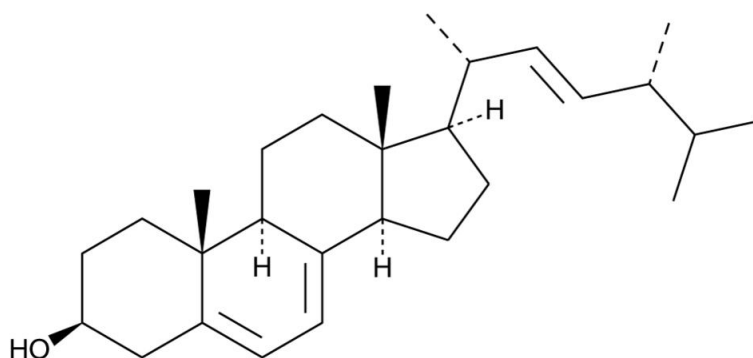
- nasýtené mastné kyseliny
- nenasýtené mastné kyseliny s jednou dvojnou väzbou (MUFA)
- nenasýtené mastné kyseliny s niekoľkými dvojnými väzbami (PUFA)
- mastné kyseliny s trojnými väzbami a s rôznymi substituentami (rozvetvené, cyklické, s kyslíkatými, sírnymi alebo dusíkatými funkčnými skupinami) [25].

Vyššie mastné kyseliny sú alifatické monokarboxylové kyseliny s dlhým reťazcom – 4 až 26 atómov uhlíka. Ako voľné sa v prírode vyskytujú len vzácné, sú prítomné hlavne v esterifikovanej podobe [20]. Okrem genetického základu kvasiniek, je zloženie mastných kyselín v nich veľmi závislé na substráte, dostupnosti živín, dobe kultivácie a pH. Cielená genetická manipulácia môže byť použitá k optimalizácii produkcie lipidov, ktorej cieľom je zvýšenie produkcie omega-3 mastných kyselín. PUFA sú esenciálne, čo znamená, že si ich ľudské telo nemôže syntetizovať, a preto ich musíme prijímať v potrave. Kyselina linolová (omega-6) má pozitívne účinky pre človeka a mononenasýtená masná kyselina palmitoolejová sa zaraduje medzi významné látky so širokým využitím v medicíne a kozmetike [26].

2.5 Ergosterol

Ergosterol patrí medzi steroly, ktoré sa zaraďujú medzi izoprenoidy. Je hlavnou zložkou hubových membrán. Ergosterol má mnoho biologických funkcií ako napr. membránová fluidita, regulácia, aktivita a distribúcia integrálnych membránových proteínov a kontrola bunkového cyklu. Základná úloha sterolov pri udržiavaní bunkových membrán spôsobuje, že ergosterol a jeho biosyntéza sú nevyhnutné pre rast húb a je primárnym cieľom pre väčšinu, v súčasnosti dostupných, antifungálnych liekov na liečbu ťažkých ľudských hubových infekcií [27].

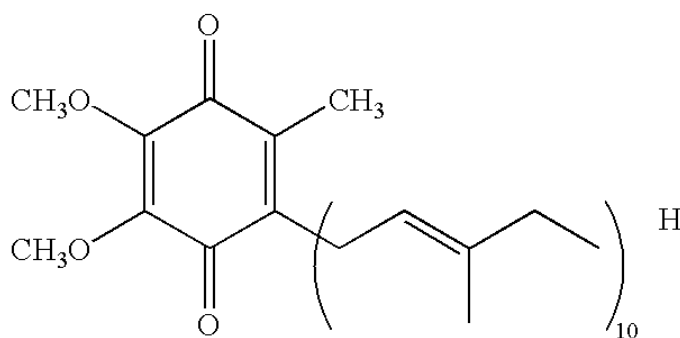
Je tiež provitamínom pre vitamín D₂, ktorý je známy pod menom ergokalciferol. Ergosterol je po expozícii UV žiarením transformovaný fotochemickou reakciou na ergokalciferol [28].



Obrázok 9: Štruktúra ergosterolu

2.6 Ubichinón

Koenzým Q (CoQ, ubiquinón) je izoprenoid produkovaný rôznymi organizmami, ktorý je nenahradiiteľnou zložkou elektrón-transportného reťazca a oxidačnej fosforylácie. Jeho nedostatok spôsobuje rôzne ochorenia. Zohráva kľúčovú úlohu vo veľkom počte biologických procesov, ľudských chorobách a terapeutických režimoch. CoQ bol objavený pred 60 rokmi a ľudstvo malo medzery v znalostiach biosyntézy, metabolizmu a transportu CoQ, a s tým spojené chápanie úlohy CoQ v ľudských ochoreniach a schopnosti liečiť tieto choroby. To sa však v dnešnej dobe rapídne mení vďaka prílivu nových experimentálnych technológií spojených s klasickými biochemickými prístupmi [29].



Obrázok 10: Štruktúra ubichinónu

2.7 Spôsoby kultivácie mikroorganizmov

Na to, aby mikroorganizmy v danom prostredí rástli a rozmnožovali sa, potrebujú dostatočný zdroj živín, vhodný parciálny tlak kyslíka, odpovedajúcu hodnotu pH a teploty. Rast a množenie sú takisto limitované koncentráciou metabolitov, ktoré bunka vylučuje do prostredia [30].

Základné typy kultivácií sú:

- Statická: mikroorganizmus je naočkovaný na povrch tuhého média alebo do určitého objemu tekutého média. Živiny sa postupne vyčerpávajú a dochádza k limitácii rastu, hromadia sa produkty metabolizmu, ktoré môžu mať inhibičný vplyv.
- Submerzná: prebieha v tekutom médiu, ktoré je stále miešané a prevzdušňované. Rast tu prebieha rýchlejšie než u statickej kultivácie. Nevýhodou je, rovnako ako u statickej, nemožnosť presnej špecifikácie aktuálnych rastových podmienok a zaistenie ich konštantnosti.
- Kontinuálna: k rastúcim bunkám mikroorganizmov pritekajú živiny a zároveň je odvádzaný rovnaký objem pôdy s mikroorganizmami a ich produktami. Pri vhodnej rýchlosti prítoku sa dosiahne rovnovážneho stavu a v celom objeme média sa tak udržiava konštantný počet buniek [30].

2.7.1 Submerzná kultivácia

Pri submerznej kultivácii sa dosahuje homogénny rast mikroorganizmov vďaka miešaniu a prevzdušňovaniu v celom objeme kultivačného média. Nastáva tak intenzívnejšie rozmnožovanie, maximálne sa využívajú živiny a zvyšuje sa množstvo produktov, ktoré sa získajú za kratší čas. Plynule sa mení počet buniek, zloženie média a morfológia buniek [1].

2.8 Hydrolýza tuku

Tuky sa zvyčajne rozkladajú hydrolýzou esterových väzieb. Tá môže byť buď kyslá alebo zásaditá. Kyslou hydrolýzou vzniká glycerol a masné kyseliny, zatiaľ čo zásaditá sa používa na výrobu mydla. Inak sa jej preto hovorí saponifikácia alebo zmydelnenie. Pri takejto reakcii vzniká glycerol a soli daných kyselín, ktoré sa používajú ako mydlá. Štruktúra týchto solí závisí na použitej zásade. Ak reaguje triacylglycerol s NaOH, vznikajú sodné mydlá, ktoré sú pevné, zatiaľ čo pri reakcii s KOH vznikajú draselné mydlá, ktoré sú tekuté, gélovité [31].

Ďalší spôsob, ako zhydrolyzovať tuk, je použitie enzymatickej hydrolýzy. Využívajú sa tu lipázy, ktoré katalyzujú hydrolýzu esterových väzieb na masné kyseliny a glycerol [10].

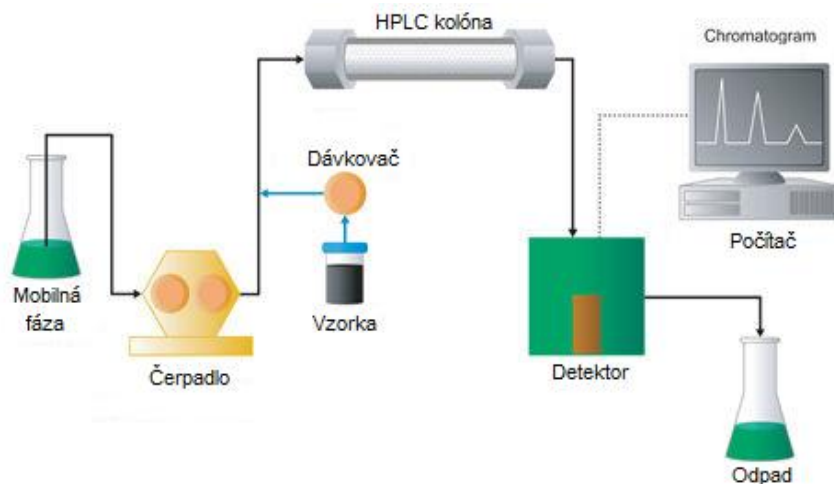
2.9 Analytické metódy

2.9.1 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC)

Chromatografické metódy sú separačné techniky, ktoré fungujú na princípe delenia zložiek medzi mobilnou a stacionárnou fázou. Pri tejto technike dochádza k opakovanému pohybu molekúl zložiek do fázy stacionárnej a následne do fázy mobilnej [32].

Vzorka sa umiestni na začiatok stacionárnej fázy. Pohybom mobilnej fázy cez stacionárnu je vzorka unášaná a jej zložky môžu byť na základe interakcie so stacionárnou fázou zachytené. Týmto mechanizmom sa zložky od seba separujú a skôr sú eluované zložky, ktoré sú menej zadržiavané stacionárnou fázou [33].

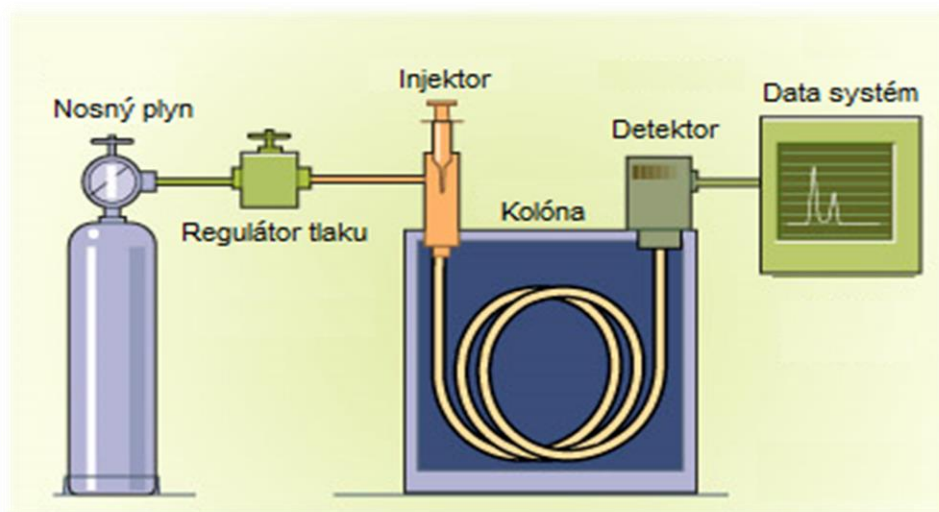
Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia je pokročilou a inštrumentálne náročnou technikou kvapalinovej chromatografie. Uplatňuje sa pri analýzach roztokov neprchavých látok v komplexnej matici. To sa dá využiť v rôznych aplikačných oblastiach ako napr. farmaceutická analýza, analýza životného prostredia, biochemická analýza a iné [34].



Obrázok 11: Schéma HPLC

2.9.2 Plynová chromatografia

Metóda plynovej chromatografie (GC) sa používa na analýzu prchavých látok, ktoré sa dajú previesť do plynného stavu. Má takisto širokospektrálne využitie, a to napr. v analýze životného prostredia, klinickej a toxikologickej analýze, analýze potravín, atď. Na rozdiel od kvapalinovej chromatografie, v plynovej chromatografii sa ako mobilná fáza používa nosný plyn [34]. Základnou požiadavkou nosného plynu je jeho inertnosť voči zložkám vzorky, netoxičita, bezpečnosť práce a cena. Analýza prebieha v niekoľkých krokoch: vstup plynu do čistiaceho zariadenia, nadávkovanie vzorky do prúdu nosného plynu (musí dôjsť k odpareniu vzorky), putovanie vzorky na kolónu, separácia zložiek vzorky pomocou stacionárnej fázy, detekcia látok [33].



Obrázok 12: Schéma GC

2.9.3 Tenkovrstvá kvapalinová chromatografia

Pri použití TLC je výhodou veľké množstvo druhov stacionárnej a mobilnej fázy, ktoré môžu byť použité k oddeleniu zložiek zmesí, ktoré obsahujú látky s rôznou selektivitou. Ďalšou výhodou je, že každá doska je použitá len raz a nie je tak dôvod k obave z deaktivácie adsorbentu pri opakovanej analýze. TLC umožňuje separáciu surového extraktu bez predchádzajúceho čistenia a odpadá tak zložitý postup izolácie frakcie, o ktorú sa zaujímate [35].

TLC je uplatňovaná v potravinárstve pri stanovení zložiek potravín, napr. stanovenie proteínov, tukov, cukrov, vitamínov a organických kyselín [36].

2.10 Metódy pre izoláciu a purifikáciu enzýmov

Izolácia čistého enzýmu je odporúčaná pri teplotách okolo 0–4 °C, pri vyšších teplotách nemusí byť stabilný. Hlavnou časťou čistenia je odstránenie nečistôt z bielkovín. Často sa používa zrážanie síranom amónnym, ultrafiltrácia alebo gélová chromatografia. Frakcia, ktorá obsahuje enzým, sa ďalej čistí napr. ionexovou chromatografiou, gélovou elektroforézou alebo izoelektrickou fokusáciou [35].

2.10.1 Ultrafiltrácia

Rozdiel oproti klasickej filtrácii je vo veľkosti častíc, ktoré separujeme. Metóda sa využíva pre častice o veľkosti 2 až 1000 nm (1 000 000 Da) a slúži k oddeľovaniu makromolekúl a koloidov z roztoku. Vplyvom zvýšeného tlaku sú molekuly rozpúšťadla tlačené cez membránu a častice, ktoré sú väčšie ako póry, membránou neprechádzajú. Ultrafiltračné membrány sa skladajú z dvoch vrstiev – hornej veľmi úzkej vrstvy s pórmi presne definovaných rozmerov a širšej spodnej vrstvy, ktorá má hubovitú štruktúru a podpornú funkciu. Takáto membrána sa nazýva anizotropná. Existujú rôzne kategórie membrán podľa tzv. vylučovacieho limitu – molekulovej hmotnosti molekúl, ktoré už membránou neprejdú. Dnes sa používajú hlavne membrány polyamidové a polysulfónové [37].

2.10.2 PAGE-SDS elektroforéza

Touto metódou sa dajú stanoviť relatívne molekulové hmotnosti separovaných bielkovín. Elektroforéza PAGE-SDS je v prítomnosti dodecylsírnanu sodného (SDS), ktorý sa viaže na bielkoviny v pomere približne 1,4 g SDS/1g bielkoviny a dáva im uniformný, záporný náboj, ktorý prekrýva vlastný náboj proteínu. Súčasne sa bielkoviny čiastočne denaturujú a strácajú podjednotkovú štruktúru. Bielkoviny sa pri PAGE-SDS delia v jednosmernom elektrickom poli na základe pomeru hmotnosti a náboja, v skutočnosti najmä podľa rozdielnych molekulových hmotností. S presnosťou na 5–10 % je možné stanoviť relatívne molekulové hmotnosti bežne veľkých proteínov. Nosičom je polyakrylamidový gél, ktorý vzniká polymerizáciou akrylamidu a N,N'-metylbisakrylamidu (BIS). Takýto gél je inertný, priehľadný a mechanicky pevný [38].

2.10.3 Lyofilizácia

Lyofilizácia je typ enkapsulačnej techniky, ktorý sa používa pri enkapsulácii vo vode rozpustných prírodných aromatických látok, esencií a materiálov citlivých na teplo. Medzi hlavné nevýhody metódy patrí vysoká vstupná energia a dlhá doba prípravy. V priebehu spracovania častíc s otvorenou poréznou štruktúrou dochádza navyše k nedostatočnej ochrane medzi aktívnou látkou a okolím [39].

Nosič a aktívna látka sa najprv rozpustia vo vode a následne zamrazujú. Za zníženého tlaku, vákua, je voda odstránená pomocou sublimácie. V niektorých prípadoch sa používajú aj tzv. kryoprotektanty, ktoré majú za úlohu chrániť a stabilizovať citlivé zložky pri mrazení [40].

3 Cieľ práce

Cieľom tejto diplomovej práce je sledovať produkciu extracelulárnej lipázy karotenogénnymi kvasinkami a možnosti indukcie produkcie enzýmu vplyvom zloženia média. V rámci práce budú riešené tieto úlohy:

1. literárna rešerš – lipázy, produkcia kvasinkami,
2. kultivácie vybraných druhov karotenogénnych kvasiniek na rôznych typoch zdroja uhlíka vrátane odpadného tuku,
3. optimalizácia stanovenia extracelulárnej lipázy produkovanej kvasinkami,
4. stanovenie vybraných rastových a metabolických charakteristík kvasiniek,
5. produkcia a charakterizácia extracelulárnej kvasinkovej lipázy, zrovnanie s inými druhmi lipáz.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité chemikálie

Akrylamid, Serva (SRN)
Bakteriologický peptón, Himedia (India)
Brilantná modrá, Sigma Aldrich (SRN)
Brómfenolová modrá, Serva (SRN)
 β -merkaptotanol, Serva (SRN)
D-glukóza p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Dihydrogénfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Dodecylsírán sodný (SDS), Lach-Ner (ČR)
Glycerol, Lach-Ner (ČR)
Glycín, Lach-Ner (ČR)
Kvasničný autolyzát, Himedia (India)
Kyselina chlorovodíková (37%) p.a., Merci (ČR)
Kyselina fosforečná, Merci (ČR)
Kyselina palmitová, Lach-Ner (ČR)
Lipáza z *Candida rugosa*, Sigma Aldrich (SRN)
Lipáza z *Aspergillus niger*, Sigma Aldrich (SRN)
Lipáza z *Rhizopus oryzae*, Sigma Aldrich (SRN)
Ľadová kyselina octová, Sigma Aldrich (SRN)
Metanol p.a., Lachema (ČR)
N,N'-tetrametyléndiamín (TEMED), Sigma Aldrich (SRN)
Persírán amónny (APS), Serva (SRN)
p-nitrofenol, Sigma Aldrich (SRN)
p-nitrofenylpalmitát, Sigma Aldrich (SRN)
Polyetylénglykol 400, Lach-Ner (ČR)
Polysorbát 80 (Tween 80), Lach-Ner (ČR)
Sírán amónny p.a., Lachema (ČR)
Sírán horečnatý heptahydrát p.a., Chemapol (ČR)
Sírán meďnatý, Lachema (ČR)
Tris((Hydroxymethyl)aminomethan), Lach-Ner (ČR)
Triton X-100, Lach-Ner (ČR)
Tuk – zmesný živočíšny (Norilia, Nórsko)

Ostatné použité chemikálie boli všetky o čistote p.a. a boli získané od bežných dodávateľov.

4.2 Prístroje a pomôcky

HPLC/PDA zostava: Zostava HPLC/MS (Thermo Fischer Scientific, USA)
Termostat - LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)
Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR
Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR
Vyhodnocovací systém Xcalibur
Kolóna Kinetex C18, 5 mm, 4,6 x 150 mm, Phenomenex
Držiak predkolóny - KJ0 - 4282, ECOM (ČR)
Predkolóna - C18,AJ0 - 4287, Phenomenex
TRACE GC/FID (ThermoQuest S.p.A., Taliansko)
Kapilárna kolóna DB-23 o rozmeroch 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Filtre pre HPLC, PRE-CUT, Alltech (GB)
Vákuová odparka RV 06, IKA (SRN)
Vodný kúpeľ EL-20, Merci a.s. (ČR)
Trepáčka Yellow line, (SRN)
Centrifúga Sigma Laborzentrifugen (SRN)
Centrifúga U-32R Boeco (Germany)
Analytické váhy Boeco (SRN)
Box Aura mini BioTech (ČR)
Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)
ELISA Reader BioTek ELx808
Vortex, Ika Vortex genius 3 (SRN)
Ultrazvuková vaňa PS02000 (ČR)
Ultrafiltračná aparátúra KrosFlo, Sprettrum Labs (GRC)
Elektroforetická aparátúra, Mini-PROTEAN, BioRad (USA)
Elektroforetický zdroj SH 300, Shelton Scientific (USA)
Bežné laboratórne sklo

4.3 Použité kmene mikroorganizmov

Rhodotorula mucilaginosa CCY 20-9-7
Sporidiobolus salmonicolor CCY 19-4-25
Cystofilobasidium macerans CCY 10-1-2

4.4 Kultivácia kvasiniek

Vybrané kvasinky boli kultivované pri optimálnych podmienkach za nepretržitého trepania na trepačkách, pri laboratórnej teplote a neustálemu osvetleniu z dôvodu produkcie karotenoidov. Média boli sterilizované po dobu 45 min v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom. Kultivácia prebiehala v 3 fázach.

4.4.1 Inokulácia

Na začiatku kultivácie boli pripravené inokulačné médiá. Kultivácia prebiehala dvojstupňovou inokuláciou tak, že do sterilného YPD média, o objeme 30 ml, boli v očkovačom boxe zaočkované 3 kľučky vybraného kvasinkového kmeňa zo zásobnej Petriho misky. Inokulum bolo kultivované 24 hodín a potom preočkované do druhého YPD média. K preočkovaniu prvého YPD média do druhého YPD média bol vždy volený objem v pomere 1 : 5. Zloženie inokulačného média pre kultiváciu kvasiniek je popísané v *Tabuľke 1*.

Tabuľka 1: Zloženie YPD média

Zložka	Množstvo
Bakteriologický peptón	20 g
Kvasničný extrakt	10 g
Glukóza	20 g
Voda	1000 ml

4.4.2 Produkčné médium

V poslednej fáze kultivácie bolo preočkované YPD médium do produkčného média so zachovaním pomeru 1 : 5, a to buď nestočené alebo stočené na centrifúge po dobu 3 minút pri 5000 otáčkach/min. Zaočkovanie s nestočeným inokulom je štandardný postup pri kultivácii, živiny z inokula tak dodávajú kvasinkám viac výživy. Naopak zaočkovanie so stočeným inokulom bolo prevedené preto, aby kvasinky boli vystavené väčšiemu stresu a prijímali živiny len z produkčného média. Výnimkou boli len hydrolyzátové médiá, ktoré boli zaočkované iba inokulom, ktoré nebolo stočené na centrifúge. Kultivácia v produkčných médiách prebiehala 96 hodín za rovnakých podmienok ako kultivácia v inokulačných médiách. Pre kultiváciu vybraných kmeňov kvasiniek bolo zvolených 12 typov produkčných médií:

- a. glukózové médium,
- b. glycerolové médium,
- c. tukové médium,
- d. tukové médium s prídavkom glukózy,
- e. tukové médium s prídavkom polysorbátu 80 (Tween 80),
- f. tukové s prídavkom glycerolu,
- g. tukové s prídavkom polyetylénglykolu,
- h. tukové s prídavkom 1 g/l kyseliny palmitovej,
- i. tukové s prídavkom 0,5 g/l kyseliny palmitovej,
- j. enzymaticky hydrolyzovaný tuk,
- k. bázicky hydrolyzovaný tuk,
- l. kyslo hydrolyzovaný tuk.

Každé médium obsahovalo všetky zložky pre základné minerálne médium, do ktorého boli potom podľa typu konkrétneho média pridané ďalšie zložky, viď *Tabuľka 2*. Výnimkou boli len hydrolyzátové médiá, kde nebola použitá voda, ale tukový hydrolyzát, do ktorého boli prímiešané soli zo základného minerálneho média.

Tabuľka 2: Zloženie jednotlivých typov médií

Základné minerálne médium	Zložka	Množstvo
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4 g
	KH_2PO_4	4 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,696 g
	Voda	1000 ml
Prídavné látky do jednotlivých typov médií:		
Glukózové	Glukóza	30 g
Glycerolové	Glycerol	30,67 g
Tukové	Tuk	16,7 g
Tuk + glukóza	Tuk	14 g
	Glukóza	5 g
Tuk + Tween 80	Tuk	16,7 g
	Tween 80	10 g
Tuk + glycerol	Tuk	14 g
	Glycerol	5 g
Tuk + PEG	Tuk	18,7 g
	Polyetylén glykol	20 g
Tuk + kys. palmitová ↑	Tuk	17,7 g
	Kyselina palmitová	1 g
Tuk + kys. palmitová ↓	Tuk	18,2 g
	Kyselina palmitová	0,5 g
Hydrolyzátové médiá	Enzymatický	1000 ml
	Kyslý	1000 ml
	Bázický	1000 ml

Postup prípravy a zloženie jednotlivých hydrolyzátov sa nachádza v kapitole 4.5.



Obrázok 13: Ukážky niektorých produkčných médií. Zľava: Tuk s prídavkom 1 g/l kyseliny palmitovej, tuk s glycerolom, tuk s polyetylén glykolom, tuk s prídavkom 0,5 g/l kyseliny palmitovej.

4.5 Hydrolýza tuku

4.5.1 Kyslá hydrolýza

Navážený tuk bol na magnetickej miešačke zahriaty pri 100 °C. Následne bol pridaný Tween 80 o množstve 2 % objemu zahriateho tuku. Do zahriatej zmesi bol pridaný roztok 2,5 % kyseliny sírovej v destilovanej vode a zmes bola miešaná 24 hodín pri teplote 100–110 °C. Reakčná zmes bola po ochladení prevedená do deliaceho lievika, kde bol pridaný hexán a zmes bola pretrepaná. Po oddelení fáz bola horná hexánová fáza odobraná a vodná fáza bola opäť prevedená do deliaceho lievika. K tejto zmesi bol pridaný hydroxid draselný v množstve potrebnom pre neutralizáciu kyseliny sírovej. Po neutralizácii bolo pridané ďalšie množstvo hexánu, zmes bola pretrepaná. Po oddelení fáz bola spodná fáza odobraná a použitá pre HPLC analýzu glycerolu a kultiváciu karotenoidných kvasiniek.

Z takto pripraveného hydrolyzátu boli pripravené kultivačné médiá o objeme 50 ml s pridaním solí, ktoré sa dávajú do základného minerálneho média.

4.5.2 Bázická hydrolýza

Navážené množstvo tuku bolo zahriate pri 80 °C, kde bol potom pridaný roztok hydroxidu draselného v 3-molárnom prebytku v porovnaní s tukom. Reakčná zmes bola premiešavaná až po vznik sivohnedej emulzie. Takto pripravená emulzia bola po ochladení prevedená do deliaceho lievika. Následne bolo pridané množstvo kyseliny sírovej potrebné pre neutralizáciu použitého hydroxidu draselného. Po viditeľnom rozrušení emulzie bol pridaný hexán a po oddelení oboch fáz bola spodná vodná fáza odobraná k analýze na HPLC a kultivácii karotenoidných kvasiniek.

Z takto pripraveného hydrolyzátu boli pripravené kultivačné médiá o objeme 50 ml s pridaním solí, ktoré sa dávajú do základného minerálneho média.

4.5.3 Enzymatická hydrolýza

Bol pripravený tlmivý roztok s pH odpovedajúcemu pH optimu daného enzýmu v koncentrácii 100 mM. Potom bol pridaný enzým kvasinky *Candida rugosa* o množstve 1 g/l a zmes bola zahriata na teplotu odpovedajúcu teplotnému optimu daného enzýmu. Po zahriatí tejto zmesi bol pridaný tuk a zmes bola premiešavaná po dobu 24 hodín na temperovanej trepačke pri 37 °C. Po ukončení reakcie bola zmes prevedená do deliaceho lievika a pretrepaná s hexánom. Po vzniku dvoch fáz bola spodná vodná fáza odobraná pre kultiváciu karotenoidných kvasiniek a stanovenie glycerolu pomocou HPLC.

Enzymový hydrolyzát bol použitý k príprave kultivačného média tak, že sa k hydrolyzátu pridali minerálne soli podľa *Tabuľky 2* tak, aby výsledný objem média bol 50 ml.

4.6 Gravimetrické stanovenie hmotnosti biomasy

Pre stanovenie hmotnosti biomasy bolo odobraných 10 ml kultúry kvasiniek z každého média. Vzorky boli centrifugované pri 5000 otáčkach/min po dobu 3 minút. Supernatant bol zliaty a k sedimentu bolo pridaných 5 ml destilovanej vody. Pomocou vortexu boli vzorky rozsuspendované a potom znova centrifugované za rovnakých podmienok. Supernatant bol zliaty a k sedimentu boli pridané 2 ml destilovanej vody. Následne bola vzorka rozsuspendovaná a vyliata na predtým odváženú hliníkovú misku. Miska s biomasou bola

sušená pri 80 °C po dobu 3 hodín a po vysušení bola odvážená na analytických váhach. Zo získaných hodnôt bola vypočítaná hmotnosť kvasinkovej biomasy.

4.7 Stanovenie enzýmovej aktivity lipáz

K meraniu lipázovej aktivity bola použitá kolorimetrická metóda s p-nitrofenylpalmitátom. Jeho využitie je založené na schopnosti lipolytických enzýmov štiepiť tento substrát za vzniku žltého sfarbeného produktu p-nitrofenolu, ktorý sa stanoví spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 405 nm.

4.7.1 Stanovenie kalibračnej krivky p-nitrofenolu

Pre zostrojenie kalibračnej krivky bol použitý základný roztok p-nitrofenolu o koncentrácii 0,5 mmol/l. Z tohto roztoku bola pripravená kalibračná rada p-nitrofenolu nariadením základného roztoku 0,1 M Tris-HCl pufrum s pH 8,2 na koncentrácie v rozmedzí 0,005 až 0,05 mmol/l. Skúmavky boli centrifugované 2 minúty a na spektrofotometri ELISA reader bola zmeraná absorbancia proti pufru pri vlnovej dĺžke 405 nm.

4.7.2 Príprava substrátu

Bolo navážených 0,0068 g p-nitrofenylpalmitátu, 0,0085 g SDS a 0,5 g Triton-X-100 do odmernej banky a na 50 ml doplnených destilovanou vodou. Roztok bol uchovávaný pri teplote 4 °C po dobu 3 dní.

4.7.3 Stanovenie lipolytickej aktivity

Do mikrotitračnej doštičky bolo napipetovaných 83 µl pufru s pH 8,2, 83 µl substrátu a 34 µl supernatantu. Bol nameraný nárast absorbancie pri 405 nm na zariadení ELISA reader pri teplote 37 °C po dobu 1 hodiny v 3 minútových intervaloch. Jednotka aktivity bola definovaná ako množstvo enzýmu katalyzujúce premenu substrátu sprevádzanú nárastom absorbancie v čase.

4.8 Extrakcia karotenoidov a lipidov z kvasiniek

K zamrzenej vzorke biomasy bolo pridaných 10 ml extrakčného činidla (zmes podľa Folcha) – chloroform: metanol v pomere 2:1. K tejto zmesi boli pridané sklenené guľôčky a vzorka bola 45 minút suspendovaná. Potom bola rozsuspendovaná zmes zliata do druhej skúmavky, aby sa oddelila od sklenených guľôčok. Následne boli pridané 2 ml destilovanej vody a skúmavky boli centrifugované pri 4000 otáčkach po dobu 1 minúty. Z takto pripravenej skúmavky bola odpipetovaná spodná chloroformová fáza a kvantitatívne prevedená do slzičkovej banky a umiestnená do vákuovej odparky. Odparená vzorka bola po odstránení rozpúšťadla a ochladení rozpustená v 2 ml chloroformu HPLC kvality a prefiltrovaná do skúmavky typu Eppendorf. Vzorka bola uchovaná v mrazničke.



Obrázok 14: Názorná ukážka extraktov získaných z kvasinkovej biomasy

4.8.1 Analýza karotenoidov na HPLC

K chromatografickej analýze bola použitá HPLC zostava Thermo Fischer Scientific. K spracovaniu získaných chromatogramov a dát bol použitý chromatografický software Xcalibur. Analýza prebiehala na nepolárnej kolóne C18 od firmy Kinetex v gradientovom móde s mobilnými fázami ACN : metanol : Tris v pomere 84 : 2 : 14 (fáza A) a metanol : etylacetát v pomere 60 : 40 (fáza B) v HPLC kvalite. Prietok mobilnej fázy bol nastavený na 1,0 ml/min a termostat vyhriaty na teplotu 25°C. Detekcia bola prevedená spektrofotometricky s využitím detektoru diódového poľa pre zvolené vlnové dĺžky, ktoré odpovedali absorpčným maximám študovaných látok (285 nm pre ubichinón a ergosterol, 450 nm pre karotenoidy). Výsledné dáta boli spracované a vyhodnotené na základe porovnania so štandardmi ergosterolu, β -karoténu a ubichinónu. Vzorka bola dávkováná dávkovacou sľučkou o objeme 20 μ l. Okrem vyššie zmienených molekúl bola stanovovaná aj celková koncentrácia karotenoidov. Z dôvodu komerčnej nedostupnosti a finančnej náročnosti jednotlivých štandardov karotenoidov, bola pre ich kvantitatívne stanovenie využitá kalibračná krivka β -karoténu na základe podobnosti štruktúr medzi jednotlivými karotenoidmi [41].

Tabuľka 3: Priebeh gradientu mobilných fáz

Čas (min)	Pomer mobilných fáz
0-8	prechod zo 100% A na 100% B
8-13	100 % B
13-14,30	prechod zo 100% B na 100% A
14,30-17	100 % A

4.9 Transesterifikácia lipidov

Do krimplovacej skúmavky bol napipetovaný 1 ml vzorky získanej pri extrakcii lipidov a bolo k nej pridaných 0,8 ml transesterifikačnej zmesi. Takto pripravené vzorky sa inkubujú v termobloku po dobu 3 hodín pri 90 °C. Potom sa skúmavky nechajú voľne vychladnúť. Do vialky bolo napipetovaných 0,5 ml 0,05 M NaOH a bol pridaný celý obsah vialky po transesterifikácii. Zmes bola uzavretá a intenzívne pretrepaná. Po oddelení fáz bola odobraná spodná chloroformová fáza a prevedená do čistej vialky so závitom pre GC. Vialka bola potom doplnená chloroformom a mohla sa analyzovať na GC.

4.9.1 Analýza lipidov na GC

Pre analýzu bunkových lipidov bol použitý plynový chromatograf TRACE GC s automatickým dávkovačom bez deliča toku. Detekcia analytov bola prevedená s plameňovým ionizačným detektorom. Chromatografická analýza prebiehala za týchto podmienok:

- Kapilárna kolóna DB-wax rozmeroch 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m
- Dávkovanie autosamplerom bez deliča toku, objem vzorky 1 μ l
- Teplota injektoru 250 °C
- Nosný plyn dusík s prietokom 0,5 ml/min
- Teplotný program: 50 °C, 1 min, vzostupný gradient 25 °C/min do 200 °C s výdržou 0 min, vzostupný gradient 3 °C/min do 230 °C s výdržou 30 min
- Plameňový ionizačný detektor (FID), 250 °C, prietok vodíku 35 ml/min, prietok vzduchu 350 ml/min, make-up dusíku 30 ml/min
- Celková doba analýzy: 47 minút

Získané dáta boli vyhodnotené v programe TRACE a MS Excel.

4.10 Tenkovrstvá kvapalinová chromatografia

Vzorka lipidov bola nanosená na silikagélovú TLC dosku pomocou pipety. Na doske bol ceruzkou vyznačený rovný úsek o výške 2 cm (štart). Na ňom bolo rovnomerne nanosené vhodné množstvo vzorky. Doska bola ponechaná, pokiaľ škvrna nezaschla.

Vyvíjanie prebiehalo v sklenenej komore so zmesou rozpúšťadiel (hexán:éter:kyselina octová v pomere 70: 30:1), v ktorej bola postavená TLC doštička s nanesenými vzorkami tak, aby vzorky boli nad hladinou rozpúšťadiel.

Po dosiahnutí čela bola doska vybraná, ponechaná v digestore oschnúť, následne bola postriekaná vizualizačnou zmesou o zložení 10 % H_3PO_4 a 10 % CuSO_4 vo vode a uložená na cca 10 minút do sušiarne pri 110 °C, aby spolu látky zreagovali a vykreslili sa jednotlivé odseparované zóny.

4.11 Ultrafiltrácia

K ultrafiltrácii bol použitý supernatant z kvasinky *Sporidiobolus salmonicolor*, ktorá bola kultivovaná na tukovo-glycerolovom médiu. Tento mikroorganizmus na danom médiu bol vybraný na základe vysokej lipázovej aktivity, ktorá bola predtým nameraná. Ultrafiltrácia prebehla cez 5 kDa membránu na oddelenie zmesi enzýmov z média. Potom bola stanovená aktivita lipáz, koncentrácia bielkovín v pôvodnom roztoku, vzorke po ultrafiltrácii a vo filtráte. Následne bola so vzorkami prevedená PAGE-SDS elektroforéza na zistenie veľkosti molekúl enzýmov.



Obrázok 15: Aparatúra pre ultrafiltráciu KrosFlo

4.12 PAGE-SDS

Pri vertikálnej elektroforetickej separácii proteínov bola použitá aparatúra Mini-PROTEAN BioRad, kde ako nosič bol použitý polyakrylamidový gél.

4.12.1 Roztoky

Elektrodový tlmivý roztok obsahuje 3 g Tris + 14,4 g glycín + 1 g SDS a 1000 ml deionizovanej vody.

Gélový tlmivý roztok obsahuje 18,2 g Tris, 2,8 ml 32 % HCl, ktoré boli doplnené destilovanou vodou na 100 ml.

Vzorkovací tlmivý roztok obsahuje 3,55 ml deionizovanej vody + 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 + 2,5 ml glycerolu + 2 ml 10% SDS + 0,2 ml 0,5% brómfenolovej modrej. K 950 μ l tohto tlmivého roztoku bolo pridaných 50 μ l β -merkaptóetanolu a tento výsledný tlmivý roztok sa použil k príprave vzoriek.

Farbiaci roztok obsahuje 25 ml kyseliny octovej + 100 ml metanolu + 125 ml vody + 0,5 g brilantnej modrej.

Odfarbovací roztok obsahuje 25 ml kyseliny octovej + 100 ml metanolu + 125 ml vody.

4.12.2 Príprava polyakrylamidového gélu

Na elektroforézu bol použitý 12 % gél. Do kadičky bolo napipetovaných 3,4 ml redestilovanej vody, 4 ml 30% akrylamidu a 2,5 ml gélového tlmivého roztoku. Roztok bol na 5 minút vložený do ultrazvukového vodného kúpeľa, aby bolo zabránené vzniku bubliniek v géle. Potom sa pridalo 0,1 ml 10% SDS, 5 μ l TEMED-u a 50 μ l 10% APS.

4.12.3 Príprava vzoriek

100 μ l analyzovaných enzýmov bolo zmiešaných so 100 μ l vzorkovacieho tlmivého roztoku. Roztok sa dal na 4 minúty povariť. Po nanesení vzoriek do jamiek gélu, boli tieto uchované pri -20°C .

4.12.4 Prevedenie

12% gél bol napipetovaný medzi dve sklá aparátúry, opatrne bol zvrchu vložený hrebienok na vytvorenie jamiek a bolo to ponechané 1 hodinu tuhnúť. Potom bol do nádoby aparátúry naliaty elektródový tlmivý roztok, hrebienok bol vytiahnutý a boli nanesené vzorky do jamiek (5 μ l štandardu a 20 μ l enzýmových vzoriek). Boli nastavené parametre merania, napätie 120 V a prúd 400 mA. Elektroforéza prebiehala 1 hodinu. Po skončení merania bol gél opláchnutý zo skla stričkou do Petriho misky, kde bol potom naliaty farbiaci roztok. Miska s gélom bola 15 minút na trepačkách, následne bol roztok zliaty. Pridal sa odfarbovací roztok, po 10 minútach sa zliat a opäť bol pridaný odfarbovací roztok, teraz však na dlhšiu dobu. Miska bola prikrytá alobalom, aby sa zabránilo odparovaniu metanolu.

Výsledný gél bol potom prenesený medzi dve fólie a pomocou štandardov Precision Plus Protein™ Dual Color bola určená veľkosť fragmentov separovaných proteínov.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Gravimetrické stanovenie biomasy

Stanovenie biomasy bolo prevedené u všetkých typov kultivácií a pre všetky testované kvasinkové kmene. V *Tabuľkách 4 až 6* sú uvedené výsledky produkcie biomasy na produkčných médiách zaočkovaných priamo inokulom – *Tabuľka 4*, na médiách zaočkovaných centrifugovaným inokulom (za účelom odstránenia zložiek komplexného inokulačného média) – *Tabuľka 5* a na médiách pripravených z tukových hydrolyzátov (*Tabuľka 6*) urobených podľa postupu uvedeného v kapitole 4.5.

Tabuľka 4: Biomasy (g/l) – nestočené inokulá

Médium	R.M.	C.M.	S.Sa.
glukóza	11,22	3,93	7,62
glycerol	9,31	7,36	5,95
tuk	7,29	4,85	2,90
tuk+glukóza	7,09	6,32	4,58
tuk+tween	8,91	3,41	3,52
glycerol+tuk	8,13	7,13	8,57
tuk+kys. palmit. ↑	5,24	2,45	3,67
tuk+PEG	7,09	5,49	2,35
tuk+kys. palmit. ↓	8,43	4,89	4,80

Tabuľka 5: Biomasy (g/l) – stočené inokulá

Médium	R.M.	C.M.	S.Sa.
glukóza	6,62	4,52	6,21
glycerol	2,80	1,96	5,33
tuk	3,86	1,17	4,89
tuk+glukóza	4,74	1,97	5,68
tuk+tween	4,31	0,80	5,46
glycerol+tuk	5,77	2,28	3,62
tuk+kys. palmit. ↑	3,80	0,95	1,81
tuk+PEG	2,66	1,08	1,16
tuk+kys. palmit. ↓	5,23	0,83	1,77

Tabuľka 6: Biomasy (g/l) - hydrolyzátové médiá

Médium	R.M.	C.M.	S.Sa.
enzymatický hydrolyzát	15,35	14,98	18,28
bázický hydrolyzát	4,22	2,27	3,44
kyslý hydrolyzát	3,12	1,42	2,79

Kvasinka *Rhodotorula mucilaginosa* (R.M.) vykazovala najvyššie hodnoty biomasy na glukózovom, glycerolovom, tukovo-tweenovom, tukovo-glycerolovom a tukovom médiu s prídavkom 0,5 g/l kyseliny palmitovej. Všetko to boli médiá s nestočeným inokulom, mohli byť teda využívané aj živiny dodané do produkčného média s inokulačným médiom.

Cystofilobasidium macerans (C.M.) mala najlepšie výsledky na glycerolovom, tukovo-glycerolovom a tukovo-glukózovom médiu s nestočeným inokulom.

Pre kvasinku *Sporidiobolus salmonicolor* (S.Sa.) bola najvyššia výťažnosť biomasy na glukózovom a tukovo-glycerolovom médiu s nestočeným inokulom. Pomerne vysokú biomasu mala kvasinka aj na glukózovom médiu so stočeným inokulom, čo potvrdzuje schopnosť rýchleho využívania glukózy.

Použitý tuk je tiež dobrým, ale pomerne zložitým zdrojom uhlíka pre kvasinky. Preto lepšie rastú na tukových médiách s rôznymi prídavkami jednoduchších látok ako glycerol, kyselina palmitová, Tween 80 alebo glukóza. Všetky uvedené substráty, okrem glukózy, pôsobia zároveň aj ako emulgátory. Glycerol je navyše trojsýtny alkohol, ktorý je základnou zložkou tukov, a teda je veľmi dobrým a jednoduchým zdrojom uhlíka pre kvasinky, ktorý už nie je potrebné ďalej hydrolyzovať ako klasické tuky a zaradí sa priamo do katabolizmu na úrovni trióz. Vysoká výťažnosť biomasy na glukózovom médiu je spôsobená tým, že kvasinky majú dostatok výživy v podobe jednoduchého cukru a tým pádom sú schopné dobre rásť.

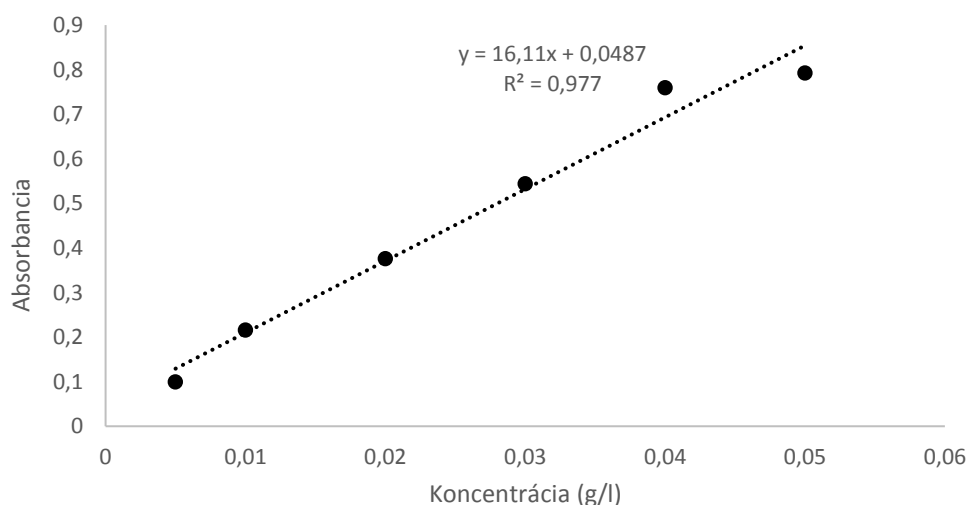
Výrazne vysoké hodnoty nameranej biomasy mali však všetky tri kvasinky aj na enzymatickom hydrolyzáte.

5.2 Stanovenie enzýmovej aktivity lipáz

Pre stanovenie aktivity lipázy bolo potrebné zostaviť kalibračnú krivku. Závislosť bola stanovená pre p-nitrofenol. Aktivita lipázy bola vyjadrená ako množstvo p-nitrofenolu, ktoré sa uvoľnilo z p-nitrofenylpalmitátu pôsobením enzýmu, vzťahnuté na čas a množstvo supernatantu.

Tabuľka 7: Kalibračná krivka lipázy

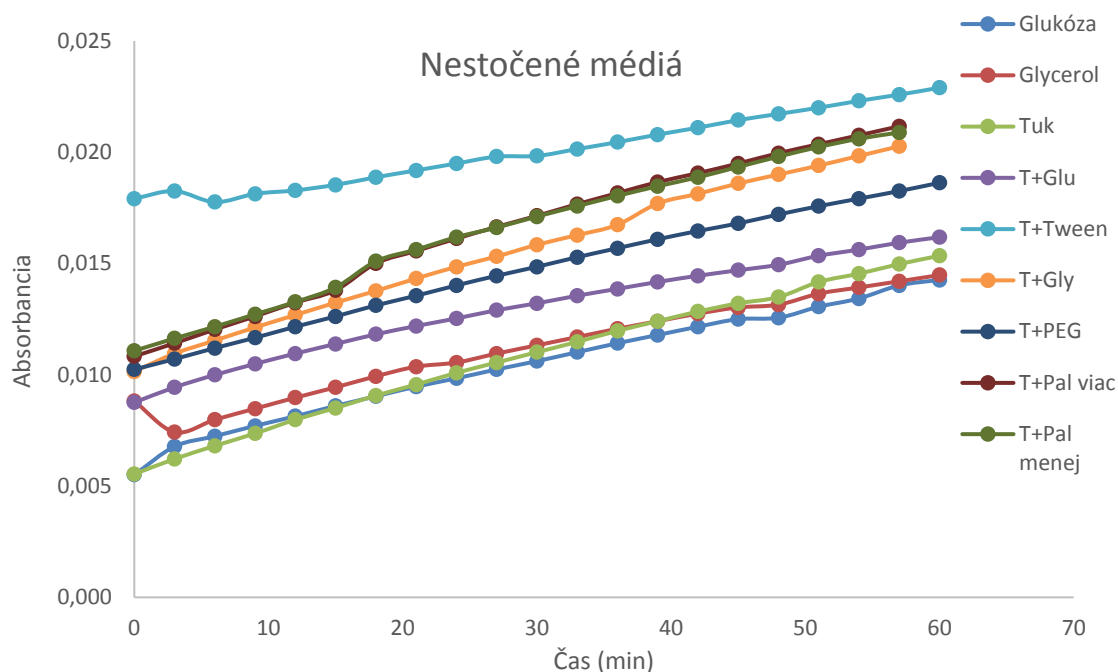
Koncentrácia (g/l)	0,05	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
Absorbancia (405 nm)	0,1	0,216	0,376	0,544	0,76	0,793



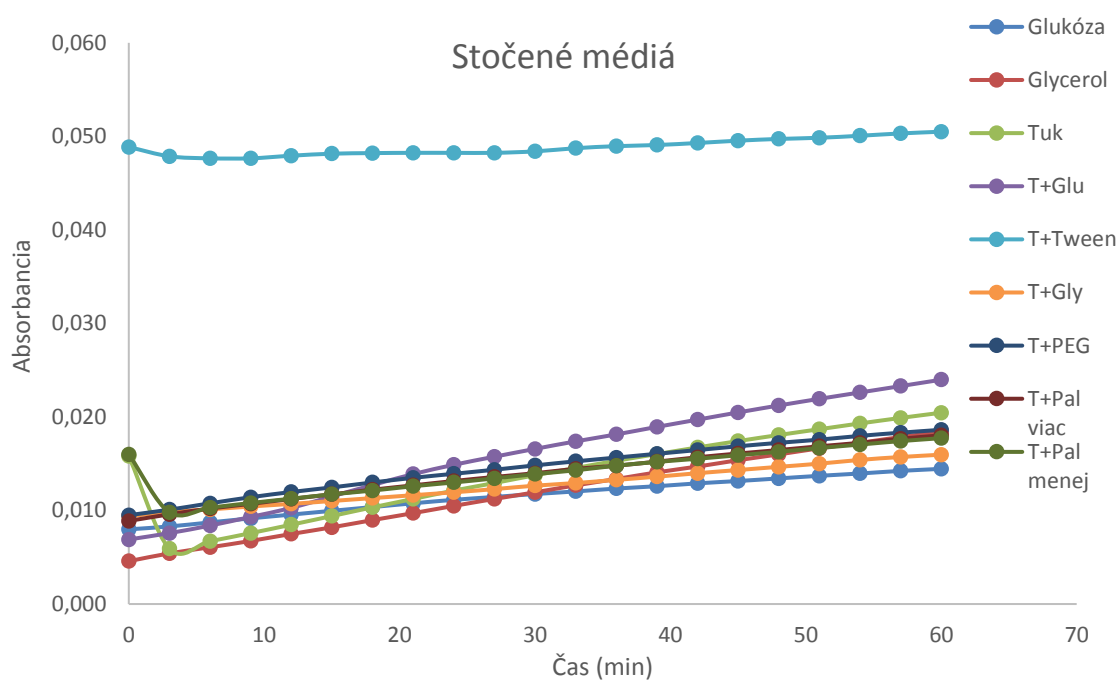
Graf 1: Kalibračná krivka lipázy

5.2.1 Lipázové aktivity kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa*

V *Grafoch 2 a 3* sú uvedené hodnoty absorbancie p-nitrofenolu v priebehu kinetickej závislosti (zmeny koncentrácie produktu na čas). Zo zmeny absorbancie v lineárnej časti závislosti a s použitím kalibrácie pre p-nitrofenol (*Graf 1*) sa vypočítala aktivita lipázy produkovanej kvasinkou *R. mucilaginosa* v jednotlivých médiách.



Graf 2: Graf závislosti absorbancie na čase pre R.M. (nestočené médiá)



Graf 3: Graf závislosti absorbancie na čase pre R.M. (stočené médiá)

Tabuľka 8: Aktivity lipolytického enzýmu pre kvasinku *R.M.* u všetkých médií

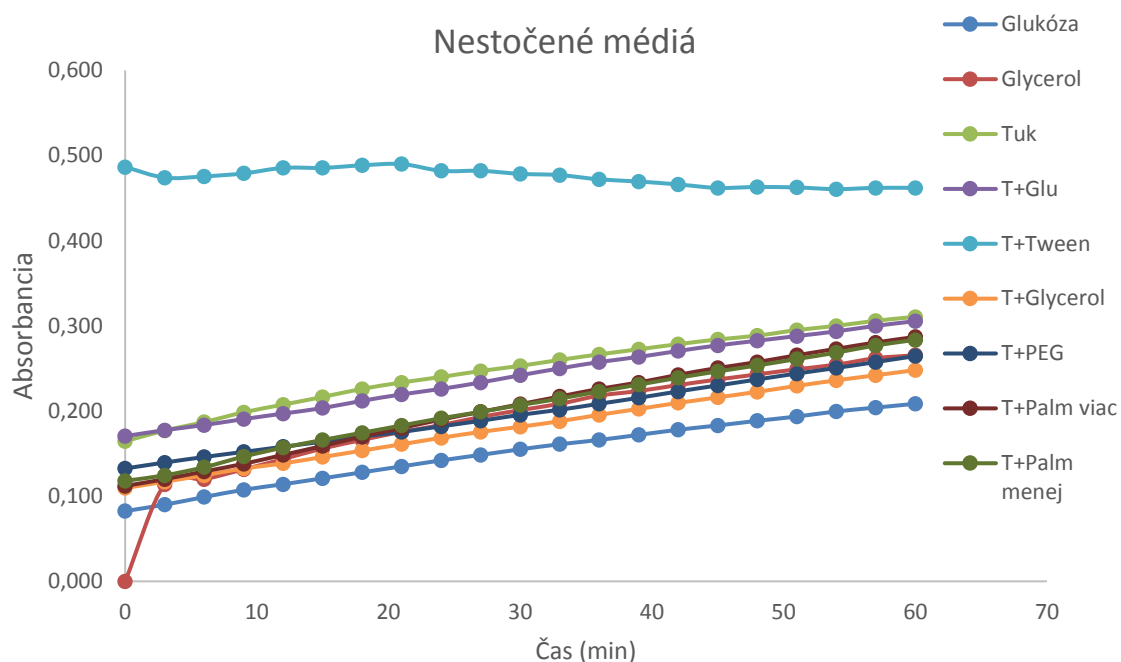
<i>R.M.</i>	Médium (nestočené)								
	Glu	Gly	Tuk	T+Glu	T+Tween	Tuk+Gly	T+PEG	Tuk+Pal ↑	Tuk+Pal ↓
Aktivita enzýmu (nmol/ml·min)	0,859	0,555	0,962	0,728	0,488	0,992	0,822	1,013	0,962
	Médium (stočené)								
	Glu	Gly	Tuk	T+Glu	T+Tween	Tuk+Gly	T+PEG	Tuk+Pal ↑	Tuk+Pal ↓
	0,634	1,356	0,455	1,675	0,161	0,646	0,895	0,898	0,170

Médium (+ nestočené inokulum): Z hodnôt enzýmových aktivít v *Tabuľke 8* je vidieť, že najvyššia lipolytická aktivita bola nameraná na tukovom médiu s obsahom 1 g/l kyseliny palmitovej, ktorá tam mala pôsobiť ako emulgátor. Avšak ukázalo sa, že kyselina palmitová nemala významný vplyv na lipázovú aktivitu, keďže hodnota bola podobná ako u tukového média. Vysoké hodnoty lipázovej aktivity boli takisto namerané na tukovom a tukovo-glycerolovom médiu, kde glycerol pôsobil ako jednoduchý zdroj uhlíka, kvasinky tak viac narástli, a bolo tak k dispozícii viac buniek, ktoré mohli produkovať lipázu. Zaujímavá je aj vysoká lipázová aktivita v glukózovom médiu, kde kvasinky nemali k dispozícii žiadny tuk. Relatívne vysoká hodnota lipázovej aktivity ukazuje, že extracelulárne lipázy sú u karotenogénnych kvasiniek produkované stabilne v určitej minimálnej koncentrácii a v prítomnosti vhodných aktivátorov (tuk) dochádza k indukcií zvýšenej produkcie.

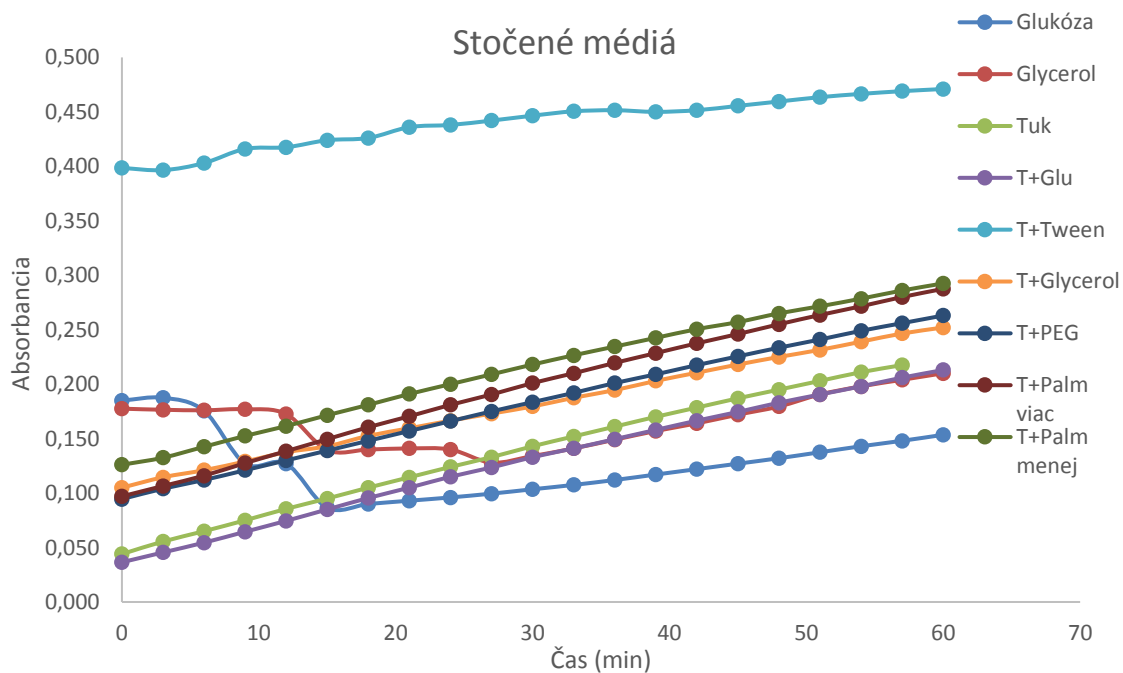
Médium (+ stočené inokulum): V médiách so stočeným inokulom, kde nemali kvasinky prístup k zvyškovej glukóze a iným živinám z YPD média, boli kvasinky vystavené väčšiemu stresu, k dispozícii im zostal len tuk a to sa preukázalo v prospech lipázovej aktivity. Najvyššia nameraná aktivita bola na tukovo-glukózovom médiu, kde kvasinky vďaka glukóze mohli lepšie rásť a produkovať viac lipázy na štiepenie tuku. Druhá významná lipázová aktivita bola nameraná na glycerolovom médiu. Prítomnosť glycerolu slúži ako aktivátor zvýšenej produkcie extracelulárnych lipáz, pretože kvasinky pravdepodobne očakávajú a sú pravdepodobne aj evolučne naučené, že prítomnosť glycerolu znamená zvyčajne aj prítomnosť tuku. Produkcia lipáz by mohla mať súvislosť aj s originálnym miestom pôvodu kvasinky, odkiaľ bola získaná do zbierky.

5.2.2 Lipázové aktivity kvasinky *Cystofilobasidium macerans*

V *Grafoch 4 a 5* sú uvedené základné kinetické dáta potrebné pre výpočet aktivity lipázy produkovanej kvasinkou *C. macerans*.



Graf 4: Graf závislosti absorbancie na čase pre C.M. (nestočené médiá)



Graf 5: Graf závislosti absorbancie na čase pre C.M. (stočené médiá)

Tabuľka 9: Aktivity lipolytického enzýmu pre kvasinku *C.M.* u všetkých médií

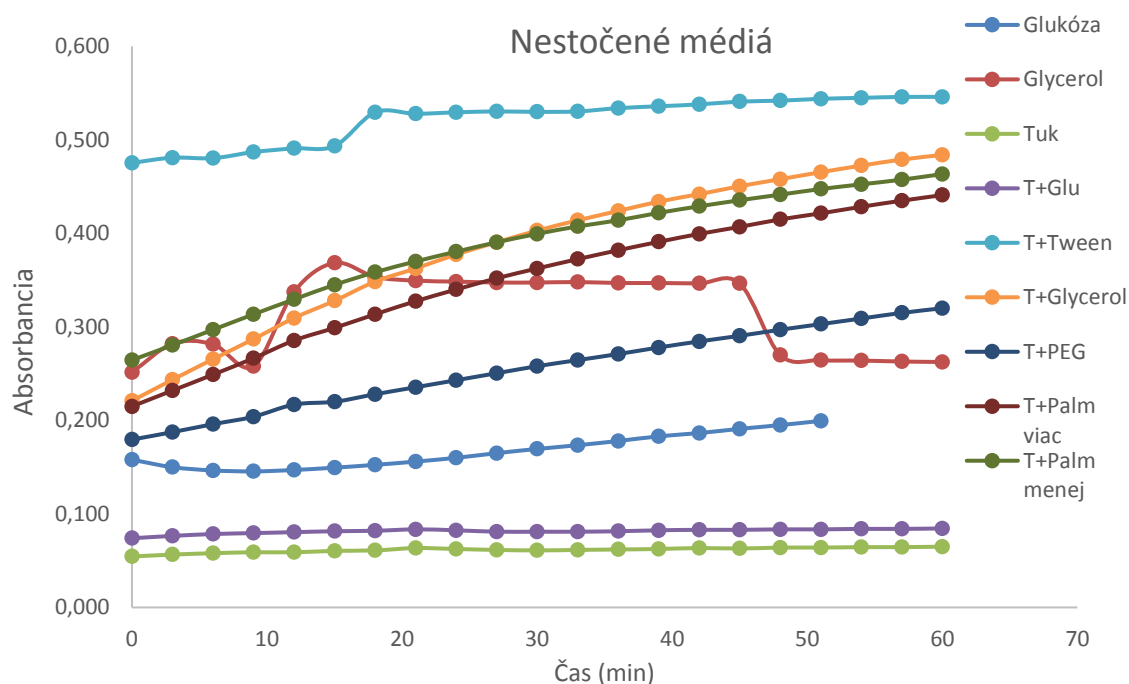
<i>C.M.</i>	Médium (nestočené)								
	Glu	Gly	Tuk	T+Glu	T+Tween	Tuk+Gly	T+PEG	Tuk+Pal ↑	Tuk+Pal ↓
Aktivita enzýmu (nmol/ml·min)	0,764	0,959	0,886	0,819	0	0,840	0,801	1,062	1,004
	Médium (stočené)								
	Glu	Gly	Tuk	T+Glu	T+Tween	Tuk+Gly	T+PEG	Tuk+Pal ↑	Tuk+Pal ↓
	0	0,197	1,098	1,071	0,440	0,892	1,022	1,156	1,010

Médium (+ nestočené inokulum): Najvyššie lipázové aktivity u kvasinky *C.M.* boli namerané na tukovom médiu s prídavkom 1 g/l aj 0,5 g/l kyseliny palmitovej (Tabuľka 9). Tu sa dá konštatovať to isté ako v prípade kvasinky *R.M.*, a teda že kyselina palmitová čiastočne emulgovala tukové médium, viac buniek preto malo prístup k tuku a lipázová aktivita je tak o trochu vyššia. Ďalšia vysoká lipolytická aktivita bola preukázaná v glycerolovom médiu.

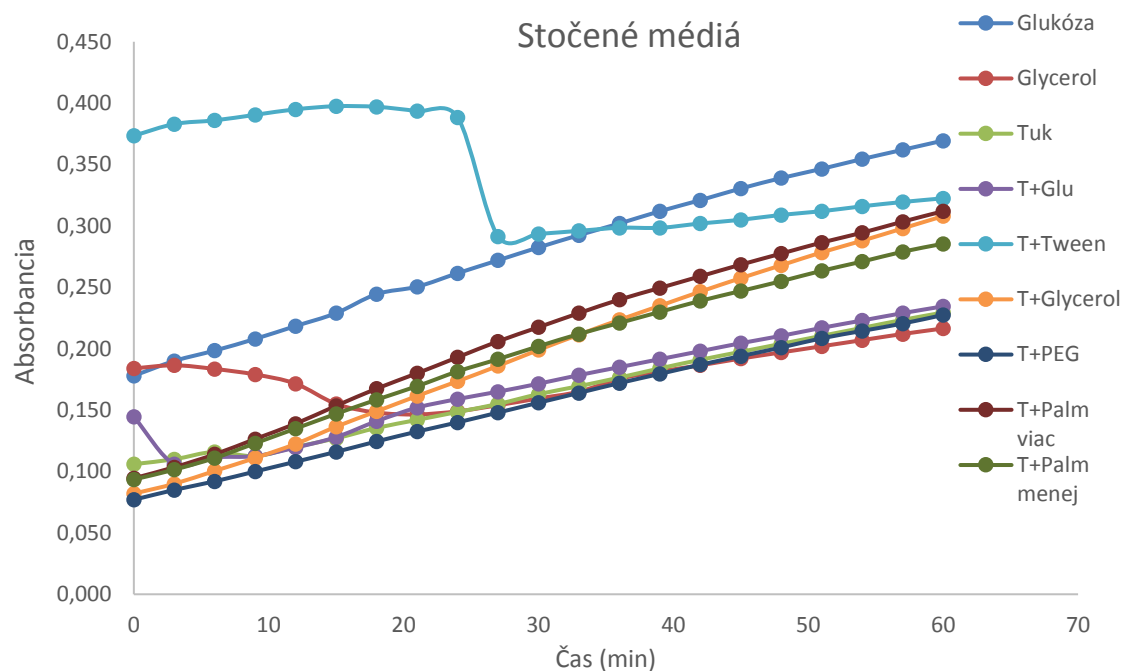
Médium (+ stočené inokulum): Aj v tomto prípade sa médiá so stočeným inokulom preukázali byť lepšie pre produkciu lipázy. Vysoké hodnoty boli namerané na tukovom médiu s prídavkom 1 g/l aj 0,5 g/l kyseliny palmitovej, na tukovom, tukovo-glukózovom a tukovom médiu s prídavkom polyetylén glykolu. PEG bol do média pridávaný za účelom emulgácie tukov v médiu.

5.2.3 Lipázové aktivity kvasinky *Sporidiobolus salmonicolor*

V Grafoch 6 a 7 sú uvedené základné kinetické dáta – zmeny absorbancie p-nitrofenolu v čase, ktoré sú potrebné pre výpočet aktivity lipázy produkovanej kvasinkou *S. salmonicolor*.



Graf 6: Graf závislosti absorbancie na čase pre *S.Sa.* (nestočené médiá)



Graf 7: Graf závislosti absorbancie na čase pre *S.Sa.* (stočené médiá)

Tabuľka 10: Aktivity lipolytického enzýmu pre kvasinku *S.Sa.* u všetkých médií

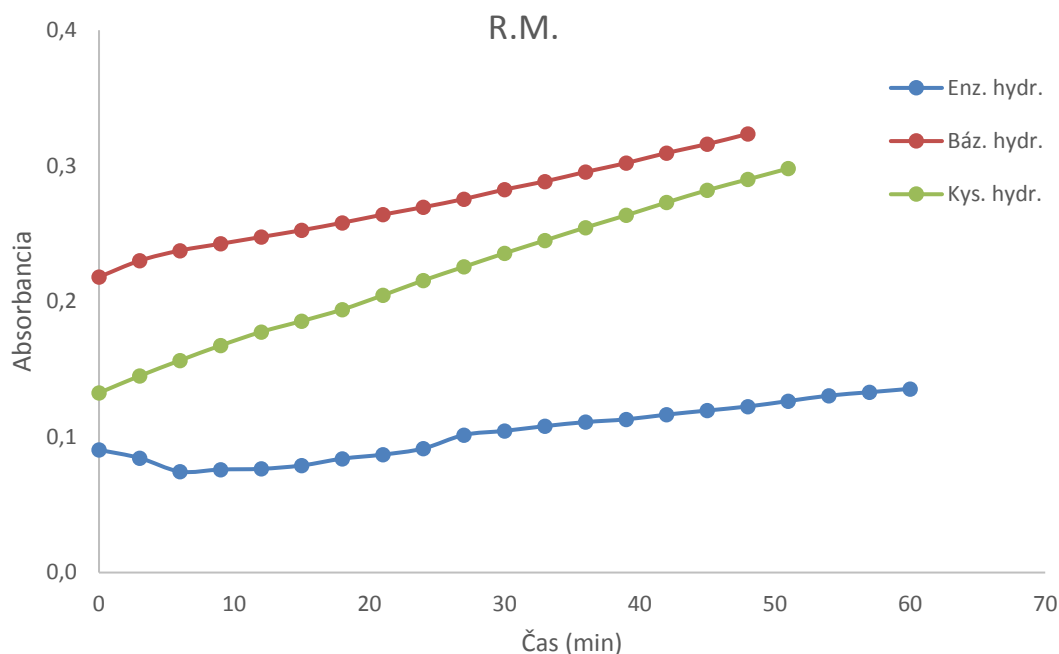
<i>S.Sa.</i>	Médium (nestočené)								
	Glu	Gly	Tuk	T+Glu	T+Tween	Tuk+Gly	T+PEG	Tuk+Pal ↑	Tuk+Pal ↓
Aktivita enzýmu (nmol/ml·min)	0,296	0,067	0,064	0,064	0,428	1,596	0,852	1,371	1,207
	Médium (stočené)								
	Glu	Gly	Tuk	T+Glu	T+Tween	Tuk+Gly	T+PEG	Tuk+Pal ↑	Tuk+Pal ↓
	1,162	0,197	0,749	0,546	0	1,371	0,913	1,320	1,165

Médium (+ nestočené inokulum): Aktivity lipázy kvasinky *S.Sa.* na rôznych médiách sú uvedené v Tabuľke 10. Významné lipázové aktivity u kvasinky *S.Sa.* boli namerané na tukovo-glycerolovom médiu, kde vďaka glycerolu ako jednoduchému zdroju živín, kvasinky dobre rástli a mohli tak viac produkovať lipázu na rozštiepenie tuku. Ďalšie vysoké lipolytické aktivity boli namerané na tukovom médiu s prídavkom 1 g/l aj 0,5 g/l kyseliny palmitovej.

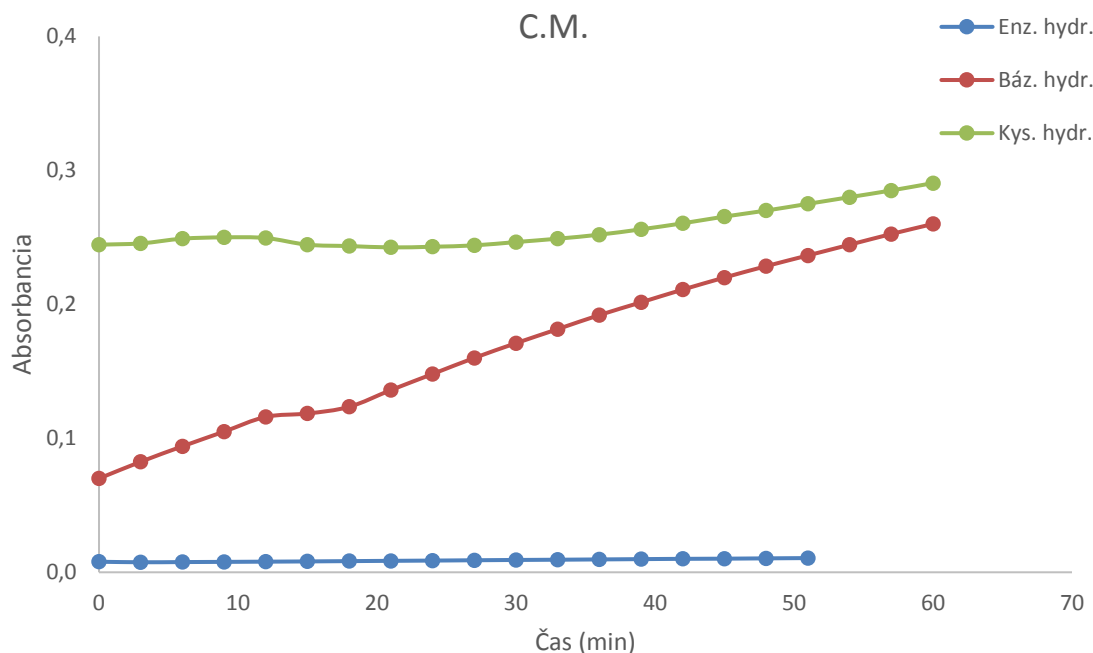
Médium (+ stočené inokulum): Aj u kvasinky *S.Sa.* sa médiá so stočeným inokulom preukázali byť vhodnejšie pre produkciu lipázy. Vysoké hodnoty boli namerané na tukovo-glycerolovom médiu, na tukovom médiu s prídavkom 1 g/l aj 0,5 g/l kyseliny palmitovej a tiež na glukózovom médiu. Kvasinková kultúra v glukózovom médiu bola pravdepodobne v pohodovom stave, dobre narástla a teda dobre produkovala aj lipázu.

5.2.4 Lipázové aktivity namerané na médiách s tukovými hydrolyzátmi

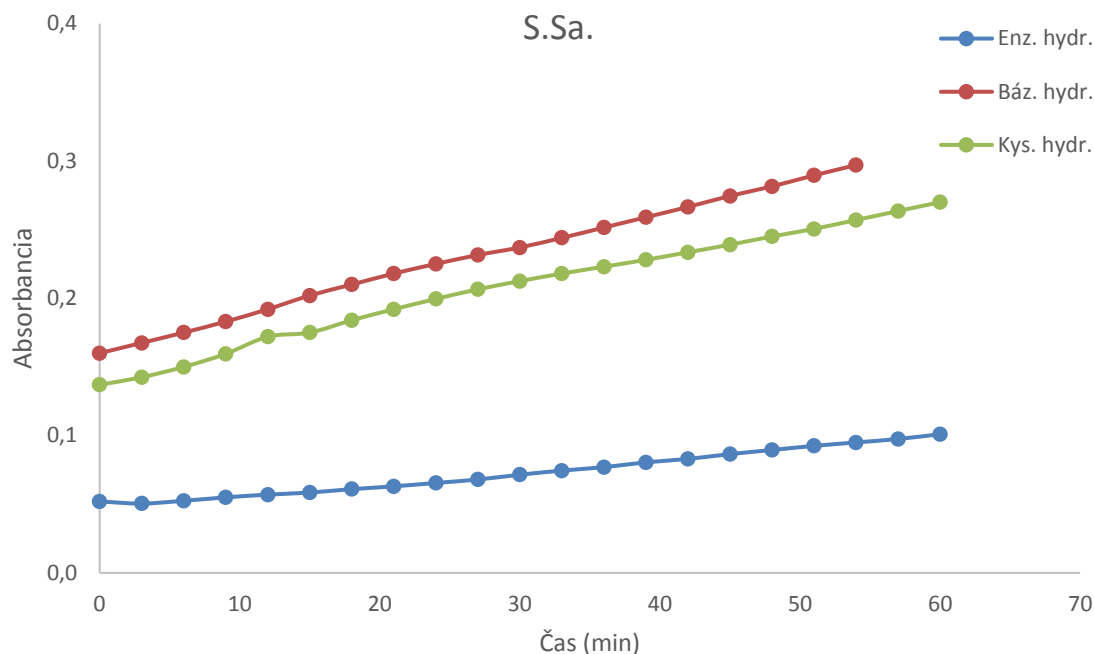
Aktivity lipázy pre všetky testované kmene boli sledované aj na médiách na báze hydrolyzátov. V Grafe 8 sú kinetické dáta pre vyhodnotenie aktivity lipázy u *R. mucilaginosa*, Graf 9 uvádza dáta pre *C. macerans* a Graf 10 pre *S. salmonicolor*.



Graf 8: Graf závislosti absorbancie na čase pre R.M. na hydrolyzátových médiách



Graf 9: Graf závislosti absorbancie na čase pre C.M. na hydrolyzátových médiách



Graf 10: Graf závislosti absorbie na čase pre S.Sa. na hydrolyzátových médiách

Tabuľka 11: Aktivity lipolytického enzýmu pre hydrolyzátové médiá

Aktivita enzýmu (nmol/ml·min)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		
	Enzymatický	Bázický	Kyslý
	0,273	0,800	1,116
	<i>Cystofilobasidium macerans</i>		
	Enzymatický	Bázický	Kyslý
	0,297	1,153	0,279
	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>		
	Enzymatický	Bázický	Kyslý
	0,297	0,924	0,807

Z údajov uvedených v Tabuľke 11 vyplýva, že najvyššiu lipázovú aktivitu vykazovali kvasinky C.M. a S.Sa. na médiu z bázického hydrolyzáta a R.M. na kyslom hydrolyzáte. To mohlo byť spôsobené tým, že aj napriek hydrolyze nebol tuk plne rozštiepený a kvasinky museli naprodukovať lipázu, aby rozštiepili aj zvyšné acyglyceroly.

Slabá lipázová aktivita bola nameraná na enzymatickom hydrolyzáte, a to u všetkých kvasiniek. Tu sa dá konštatovať, že keďže komerčná lipáza z *Candida rugosa*, ktorá bola použitá na rozštiepenie tuku v médiu, bola pomerne vysoko aktívna a tuk dobre zhydrolyzovala, médium bolo pomerne homogénne a nebolo pre kvasinku potrebné vytvárať veľa lipázy na ďalšie štiepenie tuku.

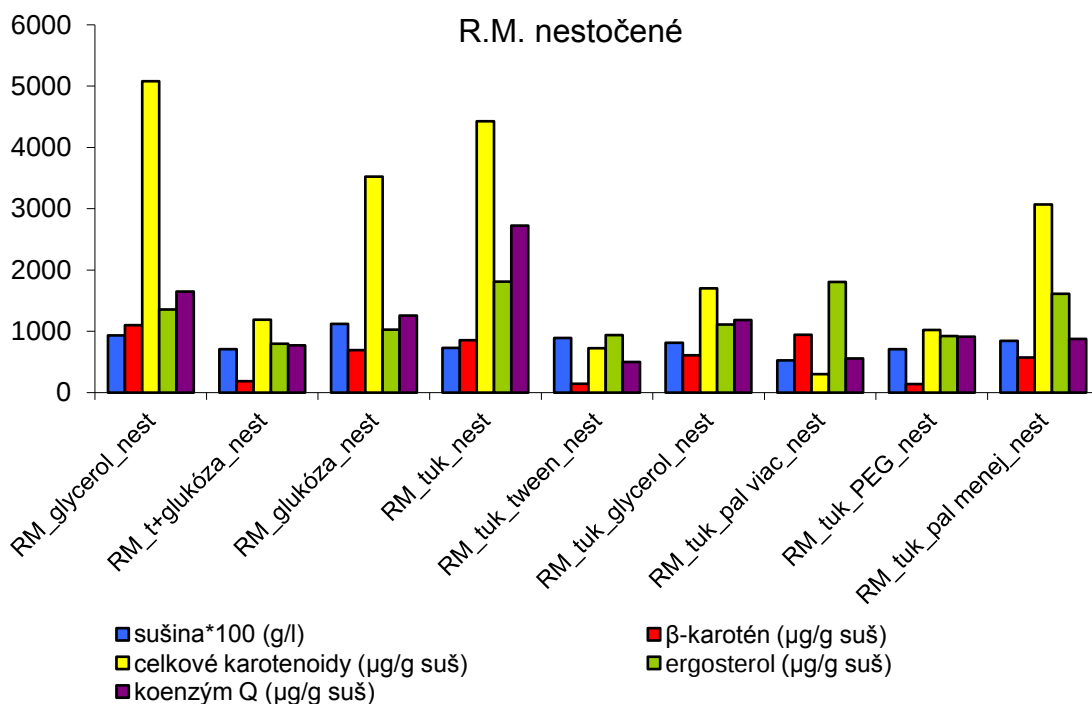
5.3 Vyhodnotenie produkcie bioaktívnych látok kvasinkami kultivovanými na tukových médiách pomocou HPLC

V rámci sledovania bioaktívnych látok v kvasinkovej biomase sa pomocou HPLC stanovoval β -karotén, ergosterol, celkové karotenoidy a CoQ. Ich množstvá sa líšili u rôznych kvasiniek a u rôznych médií. Na *Obrázku 16* sú pre ilustráciu sfarbenia uvedené médiá s bunkami kultivovanými na tukových médiách.

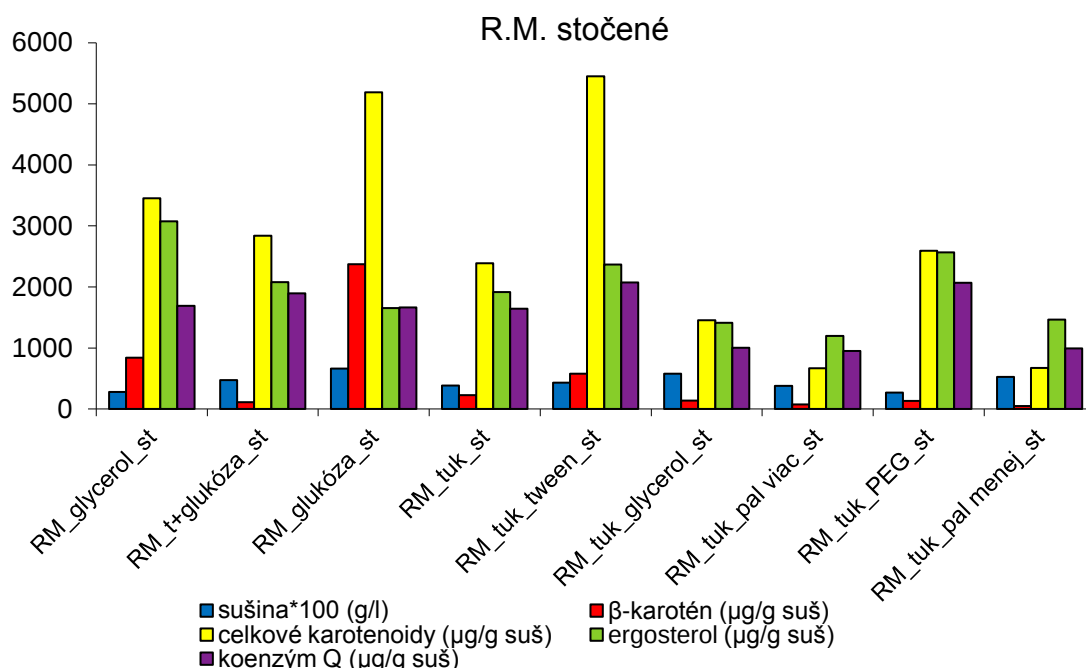
V *Grafoch 11 a 12* sú uvedené koncentrácie metabolitov produkovaných v bunkách *R. mucilaginosa* kultivovaných na tukových médiách.



Obrázok 16: Ukážka produkčných médií s kultivovanými kvasinkami



Graf 11: Vyhodnotenie bioaktívnych látok pre *Rhodotorula mucilaginosa* s nestočeným inokulom



Graf 12: Vyhodnotenie bioaktívnych látok pre *Rhodotorula mucilaginosa* so stočeným inokulom

β-karotén: Kvasinka *Rhodotorula mucilaginosa* kultivovaná na médiách s nestočeným inokulom produkovala najviac β-karoténu na glycerolovom médiu ($c = 1099,338 \mu\text{g/g}$ sušiny), tukovom médiu s prídavkom 1 g/l kyseliny palmitovej ($c = 946,446 \mu\text{g/g}$ sušiny) a tukovom médiu ($c = 853,351 \mu\text{g/g}$ sušiny).

Na médiách so stočeným inokulom bolo najviac β-karoténu vyprodukovaného na glukózovom médiu ($c = 2374,621 \mu\text{g/g}$ sušiny) a glycerolovom médiu ($c = 841,094 \mu\text{g/g}$ sušiny).

Výťažky β-karoténu u tejto kvasinky boli však pomerne nízke, lepšie výsledky boli pozorované u ostatných dvoch kvasiniek.

Ergosterol: Na médiách s nestočeným inokulom bola nameraná najvyššia koncentrácia ergosterolu na tukovom médiu ($c = 1813,097 \mu\text{g/g}$ sušiny), tukovom médiu s prídavkom 1 g/l kyseliny palmitovej ($c = 1807,051 \mu\text{g/g}$ sušiny) a tukovom médiu s prídavkom 0,5 g/l kyseliny palmitovej ($c = 1614,116 \mu\text{g/g}$ sušiny).

Na médiách so stočeným inokulom bola najvyššia koncentrácia ergosterolu v glycerolovom médiu ($c = 3074,363 \mu\text{g/g}$ sušiny), tukovom médiu s polyetylén glykolom ($c = 2567,977 \mu\text{g/g}$ sušiny) a tukovo-tweenovom médiu ($c = 2369,095 \mu\text{g/g}$ sušiny).

Celkové karotenoidy: Množstvo celkových karotenoidov bolo u médií s nestočeným aj stočeným inokulom podobné. U médií s nestočeným inokulom boli však najvyššie koncentrácie namerané na glycerolovom médiu ($c = 5079,805 \mu\text{g/g}$ sušiny), tukovom médiu ($c = 4428,131 \mu\text{g/g}$ sušiny) a glukózovom médiu ($c = 3524,698 \mu\text{g/g}$ sušiny).

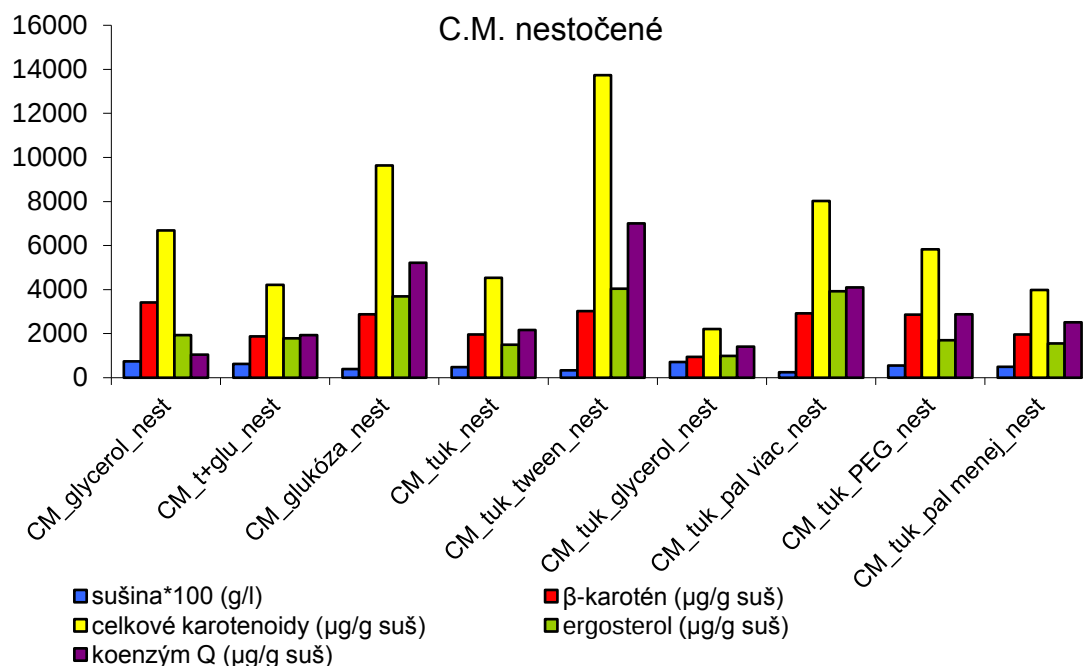
U médií so stočeným inokulom to zase bolo na tukovo-tweenovom médiu ($c = 5454,399 \mu\text{g/g}$ sušiny), glukózovom médiu ($c = 5189,602 \mu\text{g/g}$ sušiny) a glycerolovom médiu ($c = 3453,583 \mu\text{g/g}$ sušiny).

Hodnoty celkových karotenoidov boli niekoľkonásobne vyššie ako hodnoty β-karoténu, zrejme boli produkované vo vysokej koncentrácii oxidované karotenoidy (torulén, torularhodín apod.).

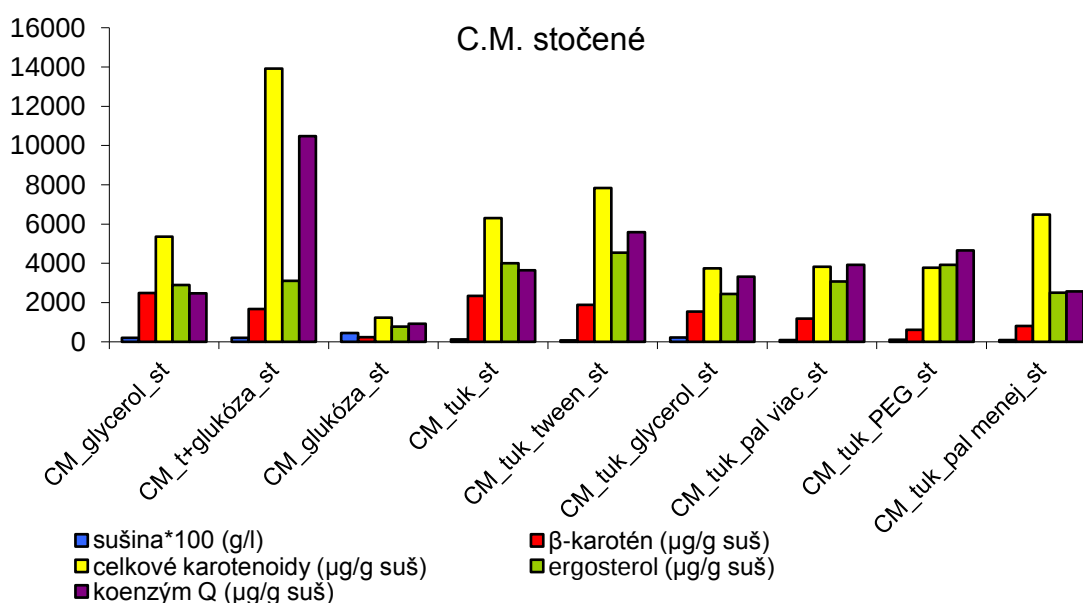
CoQ: Najvyššie koncentrácie CoQ boli u médií s nestočeným inokulom namerané na tukovom médiu ($c = 2722,690 \mu\text{g/g}$ sušiny), glycerolovom médiu ($c = 1650,151 \mu\text{g/g}$ sušiny) a glukózovom médiu ($c = 1255,714 \mu\text{g/g}$ sušiny).

V médiách so stočeným inokulom boli vysoké koncentrácie CoQ namerané na tukovo-tweenovom médiu ($c = 2070,458 \mu\text{g/g}$ sušiny) alebo tukovom médiu s polyetylénglykolom ($c = 2070,323 \mu\text{g/g}$ sušiny).

Grafy 13 a 14 uvádzajú výsledky produkcie bioaktívnych látok kvasinkou *C. macerans*.



Graf 13: Vyhodnotenie bioaktívnych látok pre *Cystofilobasidium macerans* s nestočeným inokulom



Graf 14: Vyhodnotenie bioaktívnych látok pre *Cystofilobasidium macerans* so stočeným inokulom

β-karotén: Kvasinka *Cystofilobasidium macerans* kultivovaná na médiách s nestočeným inokulom produkovala najviac β-karoténu na glycerolovom médiu (c = 3411,079 μg/g sušiny), tukovo-tweenovom médiu (c = 3026,565 μg/g sušiny) a tukovom médiu s prídavkom 1 g/l kyseliny palmitovej (c = 2916,639 μg/g sušiny).

Na médiách so stočeným inokulom bolo najviac β-karoténu vyprodukovaného na glycerolovom médiu (c = 2480,455 μg/g sušiny), tukovom médiu (c = 2343,006 μg/g sušiny) a tukovo-tweenovom médiu (c = 1885,620 μg/g sušiny).

Ergosterol: Na médiách s nestočeným inokulom bola nameraná najvyššia koncentrácia ergosterolu na tukovo-tweenovom médiu (c = 4047,647 μg/g sušiny), tukovom médiu s prídavkom 1 g/l kyseliny palmitovej (c = 3918,012 μg/g sušiny) a glukózovom médiu (c = 3685,141 μg/g sušiny).

Na médiách so stočeným inokulom bola najvyššia koncentrácia ergosterolu na tukovo-tweenovom médiu (c = 4538,580 μg/g sušiny), tukovom médiu (c = 4000,329 μg/g sušiny) a tukovom médiu s polyetylén glykolom (c = 3927,623 μg/g sušiny).

Celkové karotenoidy: Výrazne vyššie koncentrácie celkových karotenoidov boli namerané na nestočenom tukovo-tweenovom médiu (c = 13 740,305 μg/g sušiny) a stočenom tukovo-glukózovom médiu (c = 13 924,529 μg/g sušiny). Ďalšie významné hodnoty u médií s nestočeným inokulom boli preukázané na glukózovom médiu (c = 9629,800 μg/g sušiny) a tukovom médiu s prídavkom 1 g/l kyseliny palmitovej (c = 8017,006 μg/g sušiny).

U médií so stočeným inokulom to zase bolo na tukovo-tweenovom médiu (c = 7833,830 μg/g sušiny) a tukovom médiu s prídavkom 0,5 g/l kyseliny palmitovej (c = 6485,830 μg/g sušiny).

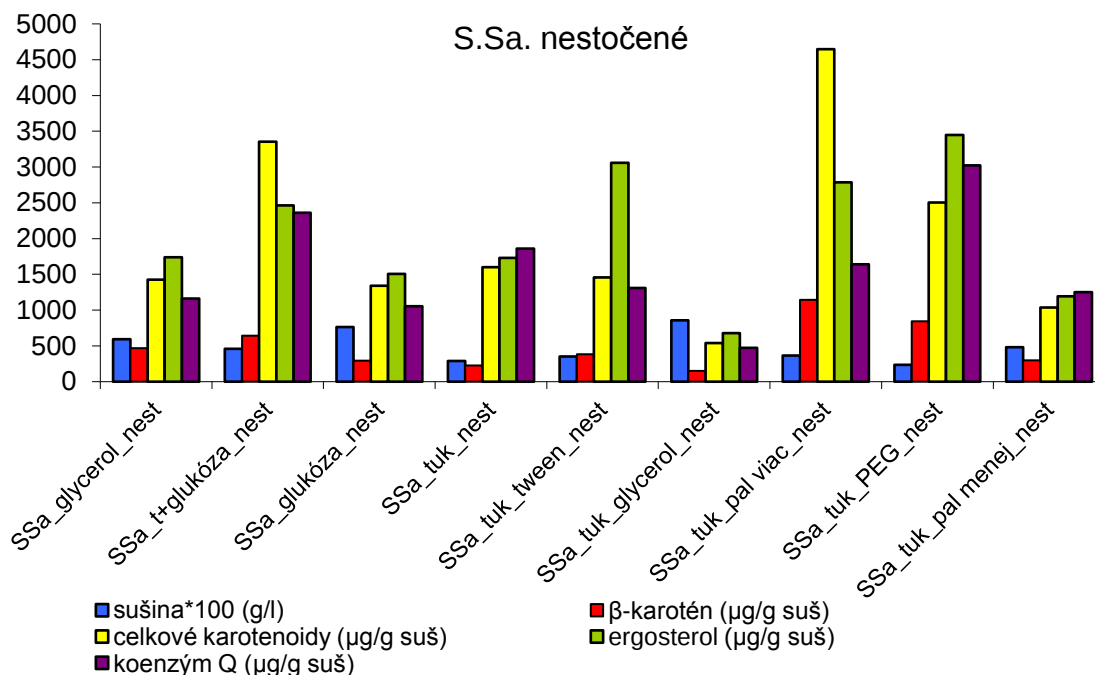
Aj u kvasinky *C. macerans* boli zistené niekoľkonásobne vyššie hodnoty celkových karotenoidov, sú teda produkované vo vysokom množstve oxidované deriváty.

CoQ: Najvyššia koncentrácia CoQ bola nameraná u kvasinky *C. macerans* na tukovo-glukózovom médiu so stočeným inokulom (c = 10 474,311 μg/g sušiny).

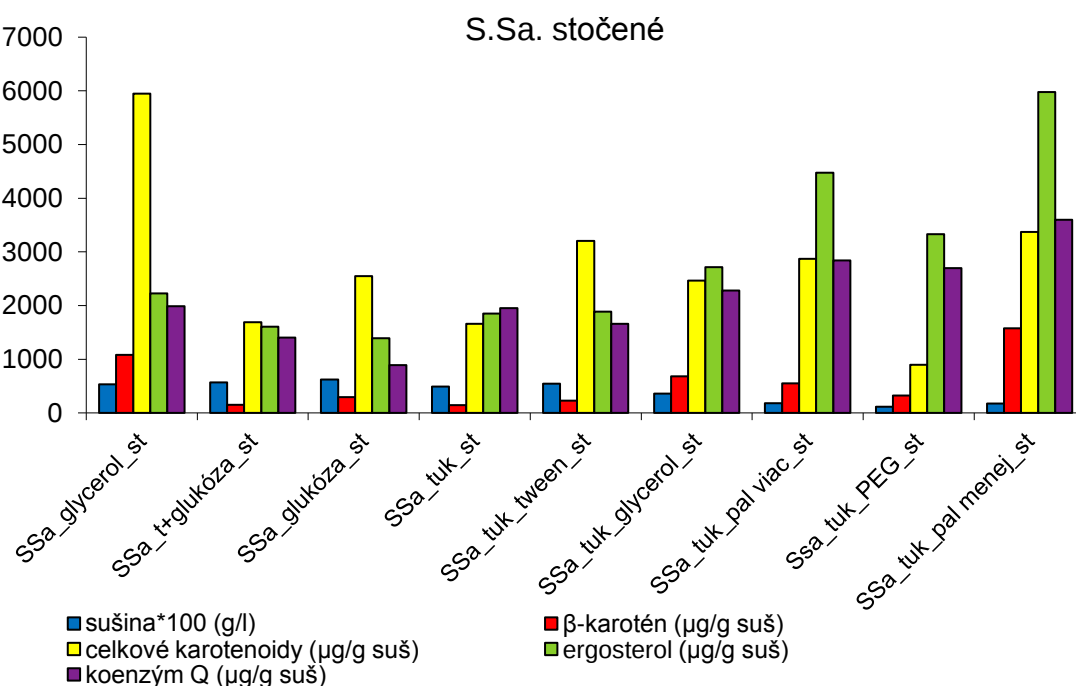
Ďalšie vysoké koncentrácie CoQ boli u médií s nestočeným inokulom namerané na tukovo-tweenovom médiu (c = 7011,397 μg/g sušiny), glukózovom médiu (c = 5225,167 μg/g sušiny) a tukovom médiu s prídavkom 1 g/l kyseliny palmitovej (c = 4097,900 μg/g sušiny).

V médiách so stočeným inokulom boli tiež významné koncentrácie CoQ namerané na tukovo-tweenovom médiu (c = 5583,081 μg/g sušiny) a tukovom médiu s polyetylén glykolom (c = 4661,648 μg/g sušiny).

V Grafoch 15 a 16 sú uvedené hodnoty metabolitov nameraných v bunkách *S. salmonicolor* kultivovaných na tukových médiách.



Graf 15: Vyhodnotenie bioaktívnych látok pre *Sporidiobolus salmonicolor* s nestočeným inokulom



Graf 16: Vyhodnotenie bioaktívnych látok pre *Sporidiobolus salmonicolor* so stočeným inokulom

β-karotén: Kvasinka *Sporidiobolus salmonicolor* kultivovaná na médiách s nestočeným inokulom produkovala najviac β-karoténu na tukovom médiu s prídavkom 1 g/l kyseliny palmitovej ($c = 1145,394 \mu\text{g/g}$ sušiny), tukovovom médiu s polyetylén glykolom ($c = 842,642 \mu\text{g/g}$ sušiny) a tukovo-glukózovom médiu ($c = 644,077 \mu\text{g/g}$ sušiny).

Na médiách so stočeným inokulom bolo najviac β-karoténu vyprodukovaného na tukovom médiu s prídavkom 0,5 g/l kyseliny palmitovej ($c = 1577,377 \mu\text{g/g}$ sušiny) a glycerolovom médiu ($c = 1082,297 \mu\text{g/g}$ sušiny).

Ergosterol: Na médiách s nestočeným inokulom bola nameraná najvyššia koncentrácia ergosterolu na tukovom médiu s polyetylén glykolom ($c = 3447,857 \mu\text{g/g}$ sušiny), tukovo-tweenovom médiu ($c = 3057,257 \mu\text{g/g}$ sušiny) a tukovom médiu s obsahom 1 g/l kyseliny palmitovej ($c = 2786,164 \mu\text{g/g}$ sušiny).

Na médiách so stočeným inokulom bola najvyššia koncentrácia ergosterolu na tukovom médiu s obsahom 0,5 g/l kyseliny palmitovej ($c = 5979,999 \mu\text{g/g}$ sušiny), tukovom médiu s prídavkom 1 g/l kyseliny palmitovej ($c = 4473,305 \mu\text{g/g}$ sušiny) a tukovom médiu s polyetylén glykolom ($c = 3329,730 \mu\text{g/g}$ sušiny).

Celkové karotenoidy: Vysoké hodnoty celkových karotenoidov u médií s nestočeným inokulom boli namerané na tukovom médiu s obsahom 1 g/l kyseliny palmitovej ($c = 4645,361 \mu\text{g/g}$ sušiny), tukovo-glukózovom médiu ($c = 3352,347 \mu\text{g/g}$ sušiny) a tukovom médiu s polyetylén glykolom ($c = 2502,459 \mu\text{g/g}$ sušiny).

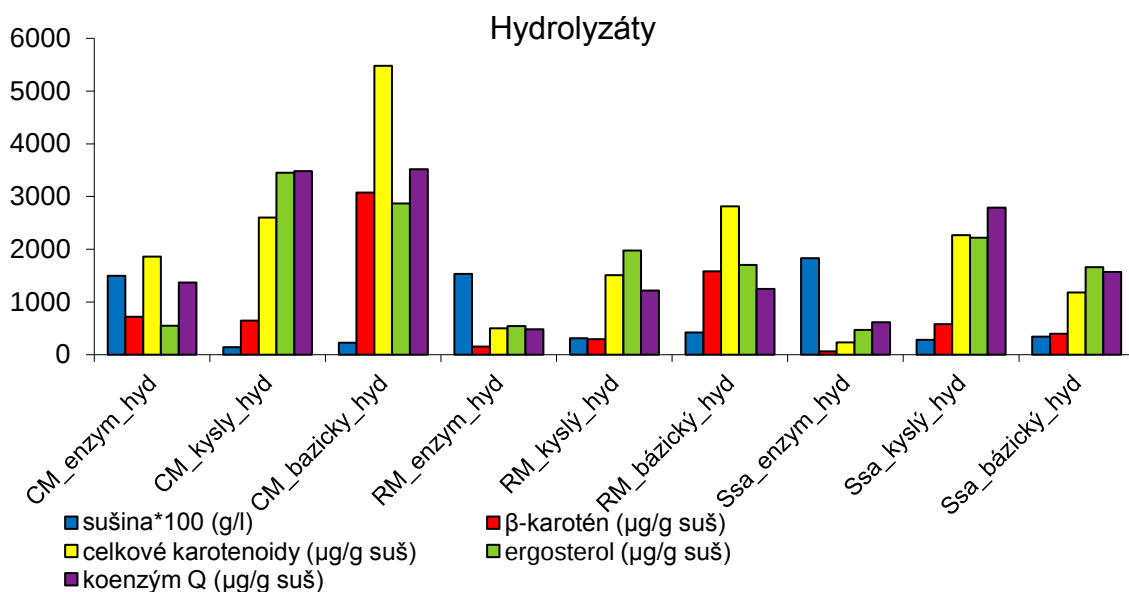
U médií so stočeným inokulom boli vysoké koncentrácie celkových karotenoidov namerané na glycerolovom médiu ($c = 5950,453 \mu\text{g/g}$ sušiny), tukovom médiu s prídavkom 0,5 g/l kyseliny palmitovej ($c = 3374,874 \mu\text{g/g}$ sušiny) a tukovo-tweenovom médiu ($c = 3203,028 \mu\text{g/g}$ sušiny).

U kvasinky *S.Sa.* boli hodnoty celkových karotenoidov iba asi 2x vyššie než β-karoténu, takže sa síce tvoria aj iné pigmenty, ale potvrdilo sa, že β-karotén je majoritným produkovaným pigmentom tejto kvasinky.

CoQ: Vysoké koncentrácie CoQ boli u médií s nestočeným inokulom namerané na tukovom médiu s polyetylén glykolom ($c = 3020,621 \mu\text{g/g}$ sušiny), tukovo-glukózovom médiu ($c = 2361,725 \mu\text{g/g}$ sušiny) a tukovom médiu ($c = 1858,016 \mu\text{g/g}$ sušiny).

V médiách so stočeným inokulom boli významné koncentrácie CoQ namerané na tukovom médiu s obsahom 0,5 g/l kyseliny palmitovej ($c = 3600,415 \mu\text{g/g}$ sušiny), tukovom médiu s obsahom 1 g/l kyseliny palmitovej ($c = 2842,012 \mu\text{g/g}$ sušiny) a tukovom médiu s polyetylén glykolom ($c = 2699,368 \mu\text{g/g}$ sušiny).

Produkcia metabolitov bola sledovaná aj na médiách z hydrolyzovaných tukov. Výsledky analýz sú zhrnuté v *Grafe 17*.



Graf 17: Vyhodnotenie bioaktívnych látok pre všetky kvasinky na hydrolyzátoch médií

β-karotén: Kvasinka *Cystofilobasidium macerans* vykazovala najvyššiu koncentráciu β-karoténu na bázičkom hydrolyzáte ($c = 3072,133 \mu\text{g/g sušiny}$).

Rhodotorula mucilaginosa mala najvyššiu koncentráciu tiež na bázičkom hydrolyzáte ($c = 1582,603 \mu\text{g/g sušiny}$).

U kvasinky *Sporidiobolus salmonicolor* bola zase najvyššia koncentrácia nameraná na kyslom hydrolyzáte ($c = 576,673 \mu\text{g/g sušiny}$).

Ergosterol: Všetky tri kvasinky produkovali najviac ergosterolu na kyslom hydrolyzáte. Konkrétne *Cystofilobasidium macerans* mala $c = 3448,698 \mu\text{g/g sušiny}$, *Rhodotorula mucilaginosa* $c = 1977,367 \mu\text{g/g sušiny}$ a *Sporidiobolus salmonicolor* $c = 2216,646 \mu\text{g/g sušiny}$.

Celkové karotenoidy: Najvyššia koncentrácia celkových karotenoidov u kvasinky *Cystofilobasidium macerans* bola na bázičkom hydrolyzáte ($c = 5481,174 \mu\text{g/g sušiny}$), pre *Rhodotorula mucilaginosa* to bolo tiež na bázičkom hydrolyzáte ($c = 2811,363 \mu\text{g/g sušiny}$) a napokon u kvasinky *Sporidiobolus salmonicolor* bola zase najvyššia koncentrácia nameraná na kyslom hydrolyzáte ($c = 2264,756 \mu\text{g/g sušiny}$).

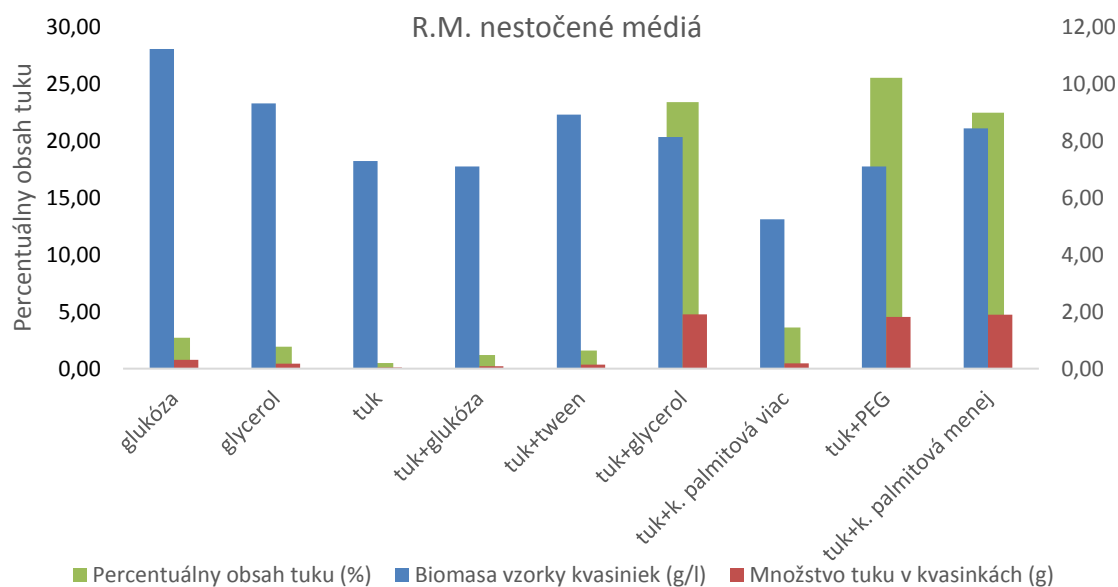
CoQ: Kvasinka *Cystofilobasidium macerans* vykazovala najvyššiu koncentráciu CoQ na bázičkom hydrolyzáte ($c = 3517,208 \mu\text{g/g sušiny}$), *Rhodotorula mucilaginosa* mala najvyššiu koncentráciu tiež na bázičkom hydrolyzáte ($c = 1246,363 \mu\text{g/g sušiny}$) a *Sporidiobolus salmonicolor* mala najvyššiu koncentráciu nameranú na kyslom hydrolyzáte ($c = 2787,860 \mu\text{g/g sušiny}$).

Celkovo sa dá konštatovať, že produkcia metabolitov na tukových médiách môže dosahovať podobné aj vyššie hodnoty ako na jednoduchých sacharidoch. Karotenogénne kvasinky sú teda schopné premeniť živočíšny tuk na obohatenú biomasu s vysokým obsahom karotenoidných pigmentov.

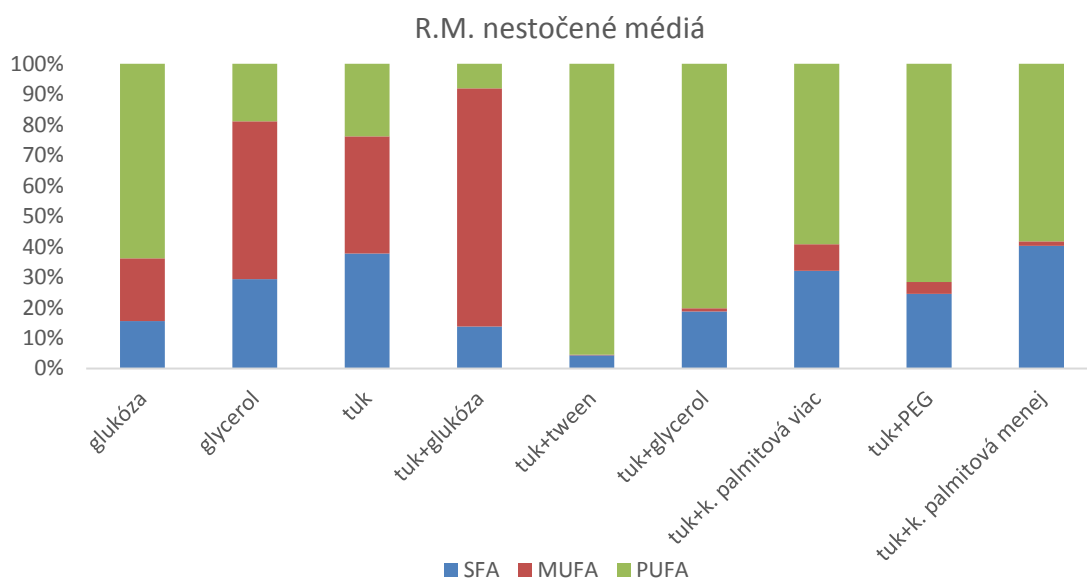
5.4 Vyhodnotenie produkcie lipidov kvasinkami pomocou GC

Pomocou plynovej chromatografie boli u jednotlivých kvasiniek a médií zmerané profily mastných kyselín. Z týchto profilov boli vyhodnotené celkové lipidy (produkcia v g/g biomasy a v % z biomasy), ďalej sumárne nasýtené mastné kyseliny (SFA), mononenasýtené mastné kyseliny (MUFA) a polynenasýtené mastné kyseliny (PUFA). Zároveň boli pre lepšiu prehľadnosť vyhotovené grafy pre jednotlivé kvasinky a médiá s uvedeným percentuálnym obsahom tuku v biomase, produkovanou biomasou vzorky kvasiniek a množstvom tuku v kvasinkách. Výsledky boli vyhodnotené pomocou prehľadných grafov.

Grafy 18 a 19 obsahujú výsledky produkcie intracelulárnych lipidov a MK zistené u kvasinky *R. mucilaginosa*.



Graf 18: Vyhodnotenie obsahu tuku v kvasinkovej biomase pre *R.M.* na nestočených médiách



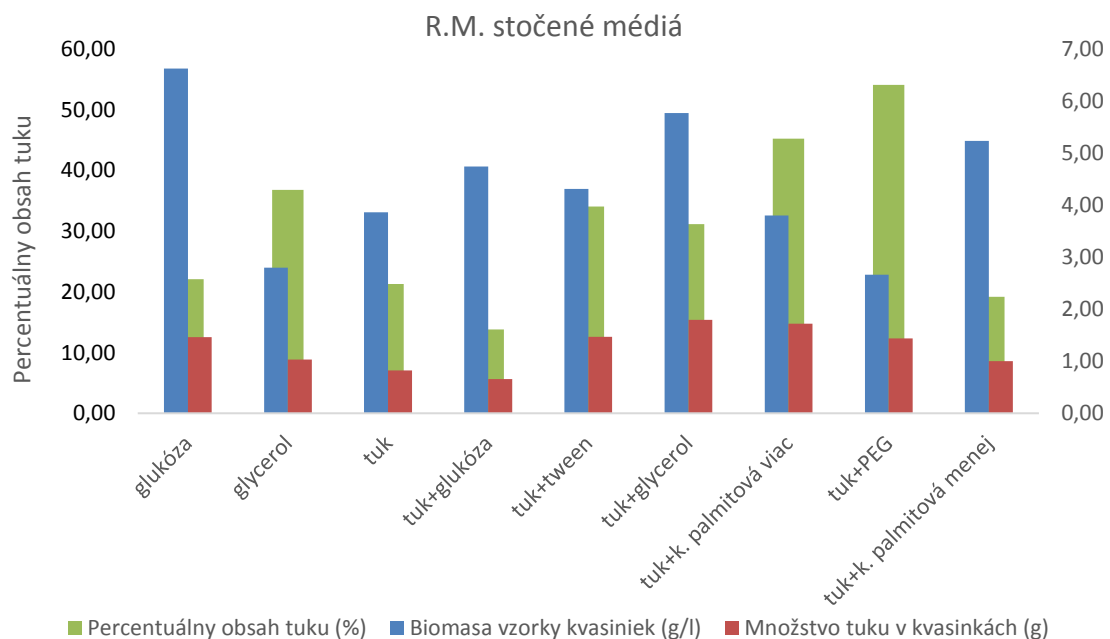
Graf 19: Vyhodnotenie lipidov pomocou GC pre *R.M.* na nestočených médiách

Zloženie mastných kyselín v médiu závisí napr. na genetickom vybavení organizmu, substráte, stresových podmienkach, atď. Podľa toho boli aj vyhodnotené nasledujúce grafy. Podľa *Grafu 19* sa dá povedať, že kvasinka *R.M.* s nestočenými inokulami produkuje hlavne polynenasýtené mastné kyseliny. Najviac PUFA je však na tukovo-tweenovom a tukovo-glycerolovom médiu.

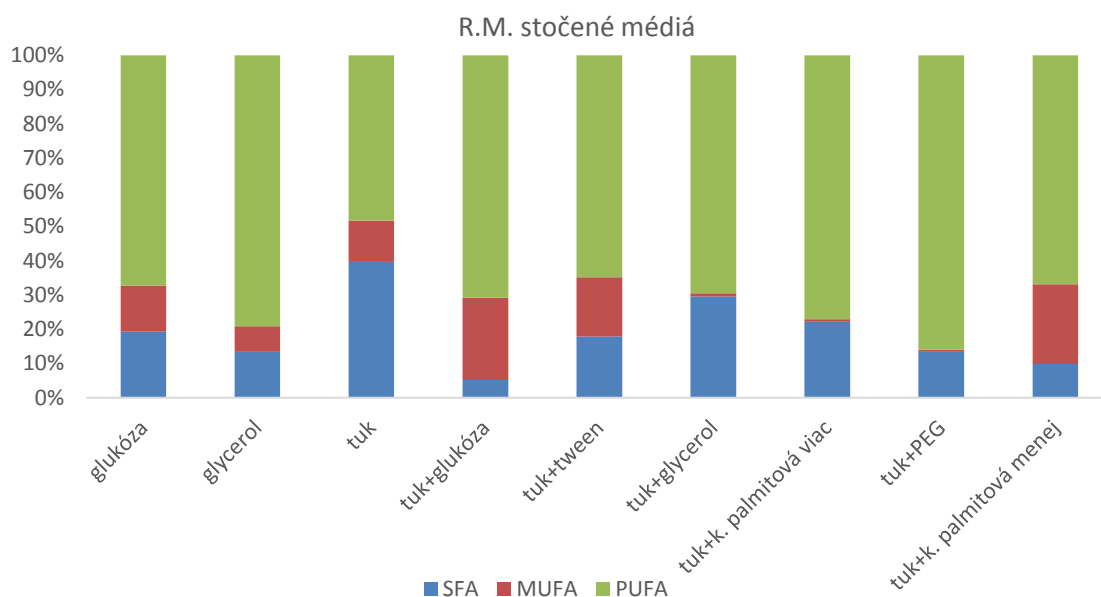
Vysokú produkciu mononenasýtených mastných kyselín vykazuje kvasinka na tukovo-glukózovom médiu a glycerolovom médiu.

Nasýtené mastné kyseliny sa vyskytujú najviac na tukovom médiu a tukovom médiu s obsahom 0,5 g/l aj 1 g/l kyseliny palmitovej.

Z nameraných výsledkov sa teda dá usúdiť, že kvasinka *Rhodotorula mucilaginosa* je dobre vybavená pre produkciu PUFA a čiastočne aj MUFA, čomu samozrejme napomáhajú aj správne zvolené substráty. Skupina PUFA je zastúpená v karotenogénnych kvasinkách najmä kyselinou linolovou (C18:2), skupina MUFA kyselinou olejovou, prípadne palmitolejovou. Vysoký obsah PUFA je vhodný pre prípadnú aplikáciu do potravinových doplnkov a krmív, zatiaľ čo vyšší obsah MUFA (cca 40-50%) je vhodný pre využitie kvasinkového tuku ako zložky biopáliv.

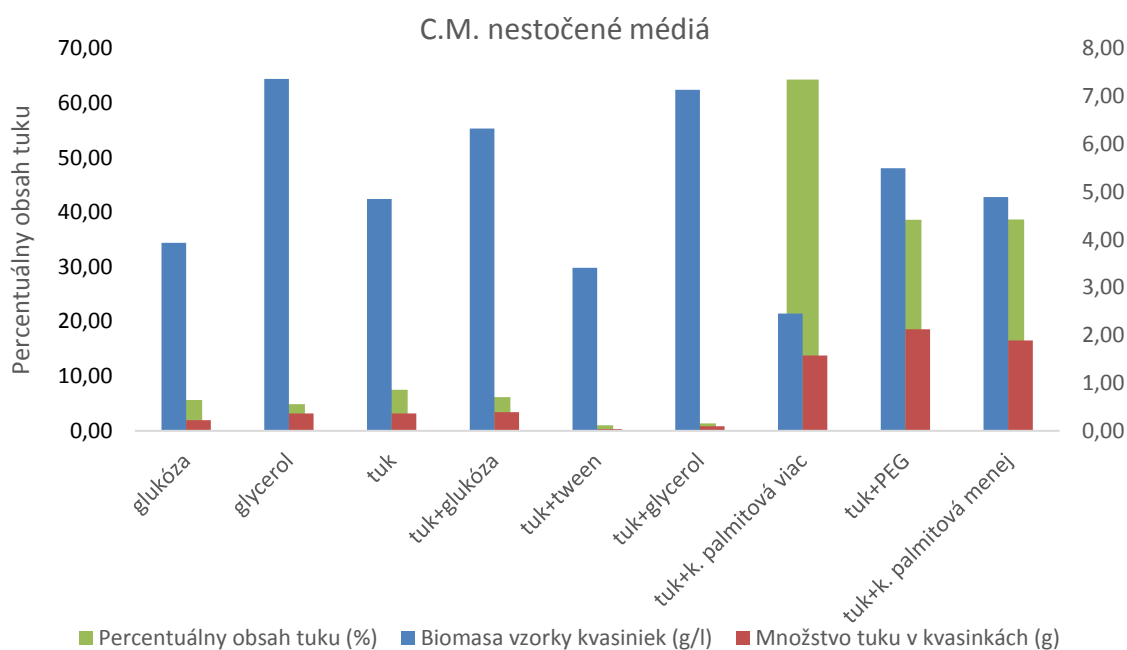


Graf 20: Vyhodnotenie obsahu tuku v kvasinkovej biomase pre R.M. na stočených médiách

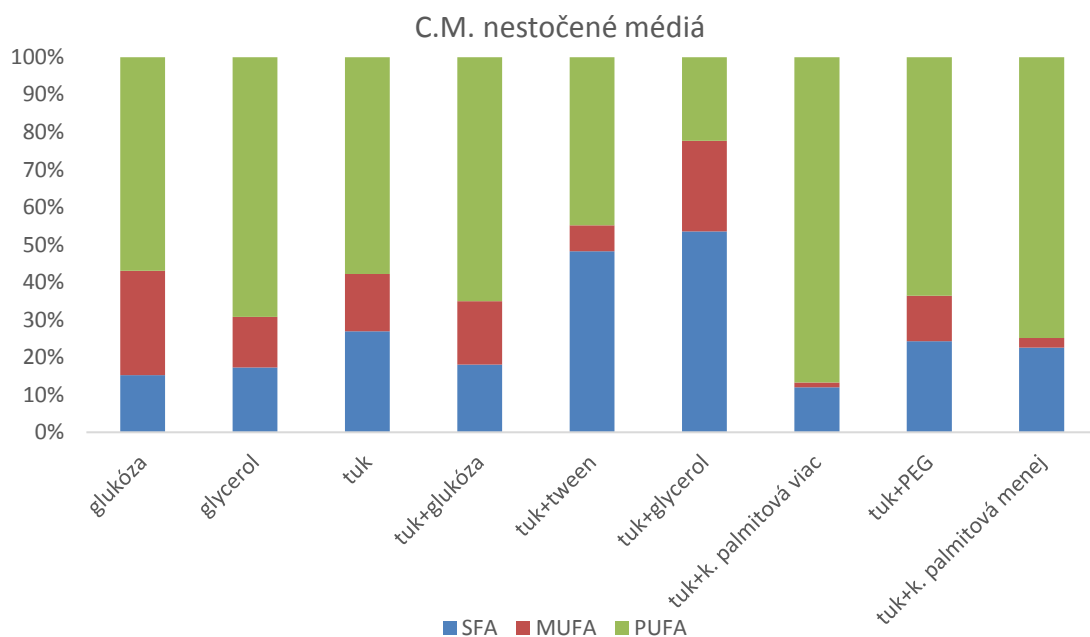


Graf 21: Vyhodnotenie lipidov pomocou GC pre *R.M.* stočené médiá

Z Grafu 21 môžeme vidieť, že sa potvrdilo zistenie u kvasinky *R.M.* s nestočenými inokulami, a síce, že táto kvasinka veľmi dobre produkuje polynenasýtené mastné kyseliny. Pokiaľ pri kultivácii boli použité stočené inokulá, dá sa pozorovať, že stresové podmienky podnietili kvasinku k ešte väčšej produkcii PUFA než v predchádzajúcom prípade (Graf 19). Najväčšie zmeny nastali práve na tukovo-glukózovom médiu, glycerolovom médiu a tukovom médiu, kde boli predtým najvyššie koncentrácie MUFA. V niektorých prípadoch (napr. na tukovo-tweenovom médiu) došlo k menšiemu nárastu MUFA.



Graf 22: Vyhodnotenie obsahu tuku v kvasinkovej biomase pre *C.M.* na nestočených médiách

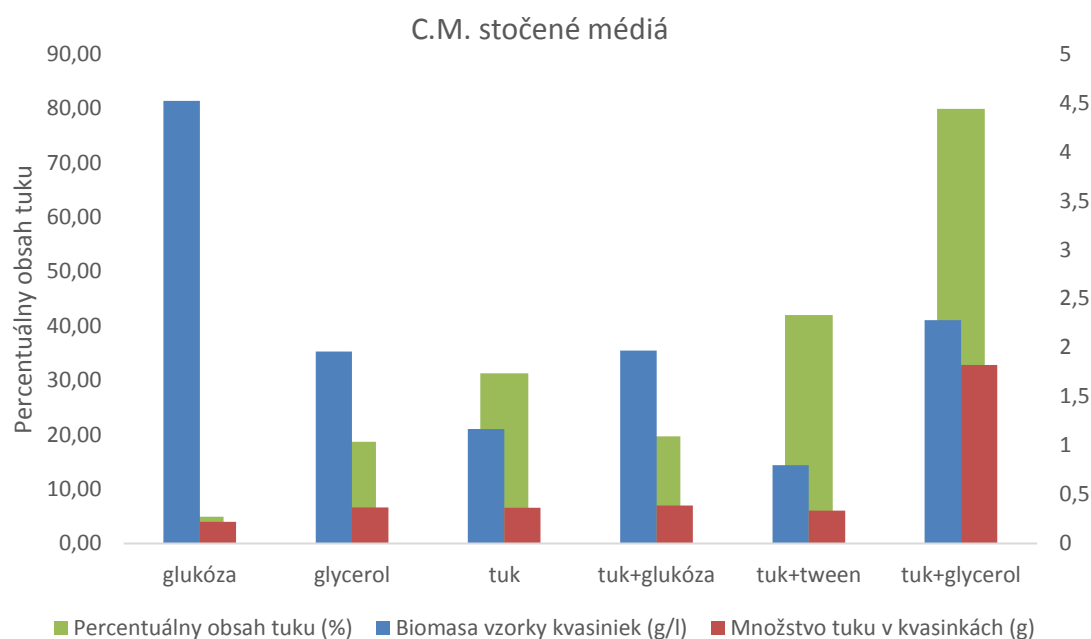


Graf 23: Vyhodnotenie lipidov pomocou GC pre C.M. nestočené médiá

Kvasinka *Cystofilobasidium macerans* sa ukázala, podobne ako v predchádzajúcom prípade, taktiež ako dobrý producent lipidov (Graf 22) aj polynenasýtených mastných kyselín (Graf 23). Najviac PUFA bolo nameraných na tukovom médiu s obsahom 0,5 g/l aj 1 g/l kyseliny palmitovej, tukovom médiu s PEG alebo tukovo-glukózovom médiu.

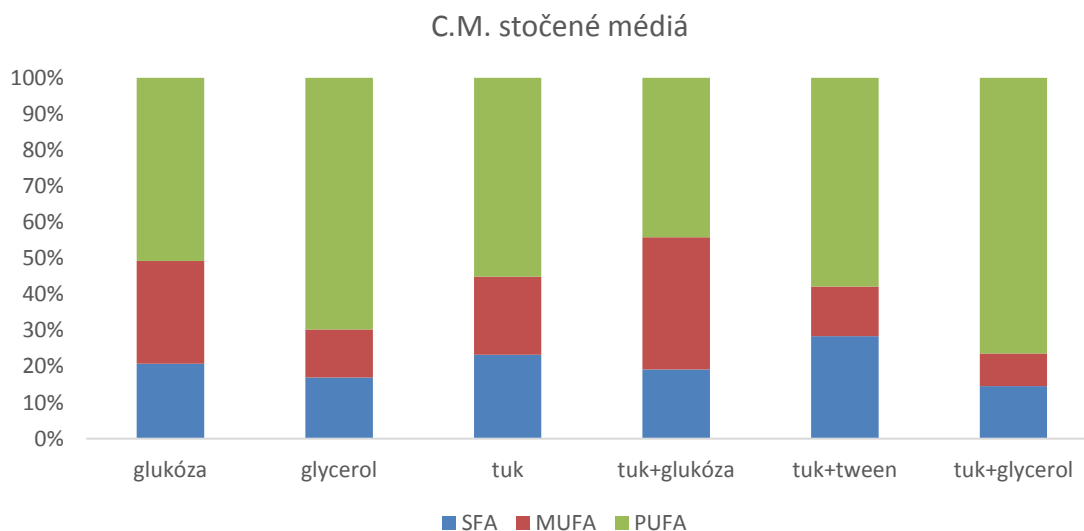
MUFA boli produkované len minoritne, kde najvyššia koncentrácia bola nameraná na glukózovom a tukovo-glycerolovom médiu.

V médiách boli prítomné aj nasýtené mastné kyseliny, a to najviac na tukovo-glycerolovom médiu alebo tukovo-tweenovom médiu. Ich koncentrácia však nebola celkovo taká vysoká ako koncentrácia PUFA.



Graf 24: Vyhodnotenie obsahu tuku v kvasinkovej biomase pre C.M. na stočených médiách

Hodnoty pre niektoré médiá nie sú v Grafe 24 uvedené, pretože došlo k minimálnemu nárastu kultúry a pri analýze lipidov zostala vo vzorke aj určitá minimálna časť tukového substrátu, ktorú sa nepodarilo oddeliť – tá výrazne skresľovala výsledky.

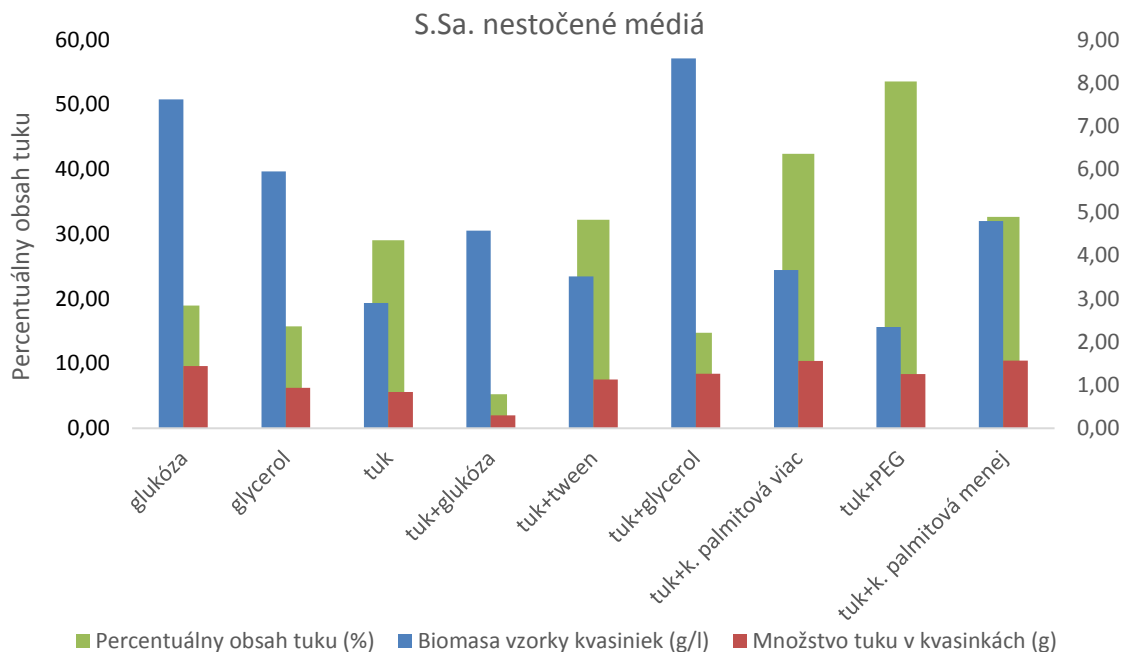


Graf 25: Vyhodnotenie lipidov pomocou GC pre C.M. stočené médiá

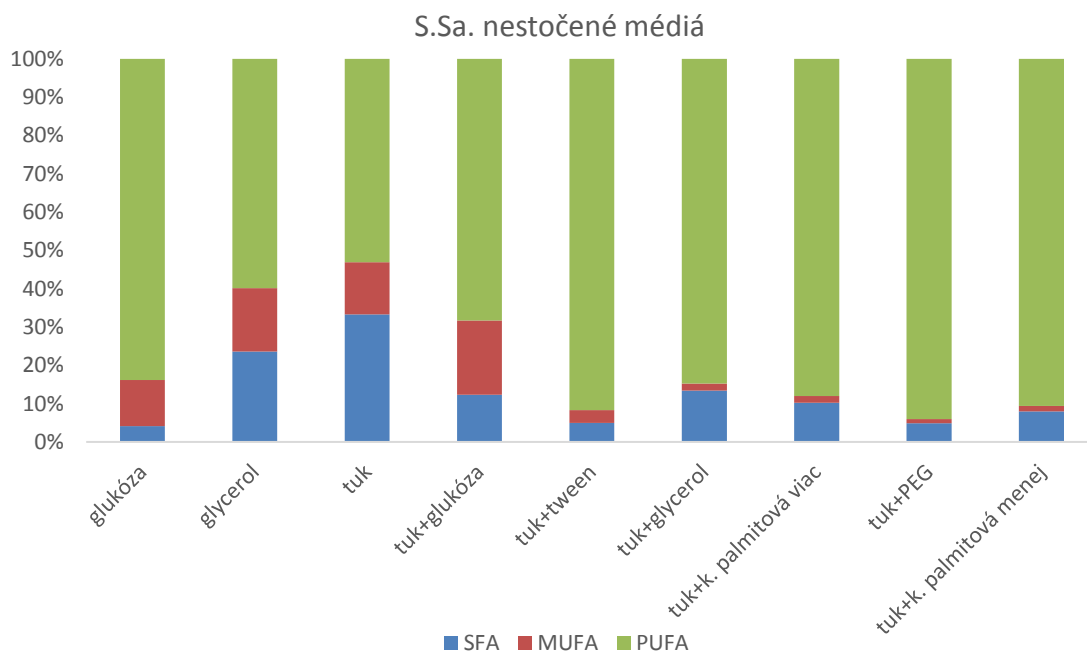
Podľa Grafu 25 sa dá opäť konštatovať, že stresové podmienky podnietili kvasinku C.M. k produkcii PUFA. Vysoká koncentrácia bola nameraná napr. na glycerolovom médiu alebo tukovo-glycerolovom médiu.

V tukovo-glukózovom médiu došlo zase s menšiemu nárastu MUFA.

Produkcia SFA bola celkovo znížená oproti médiám s nestočeným inokulom.

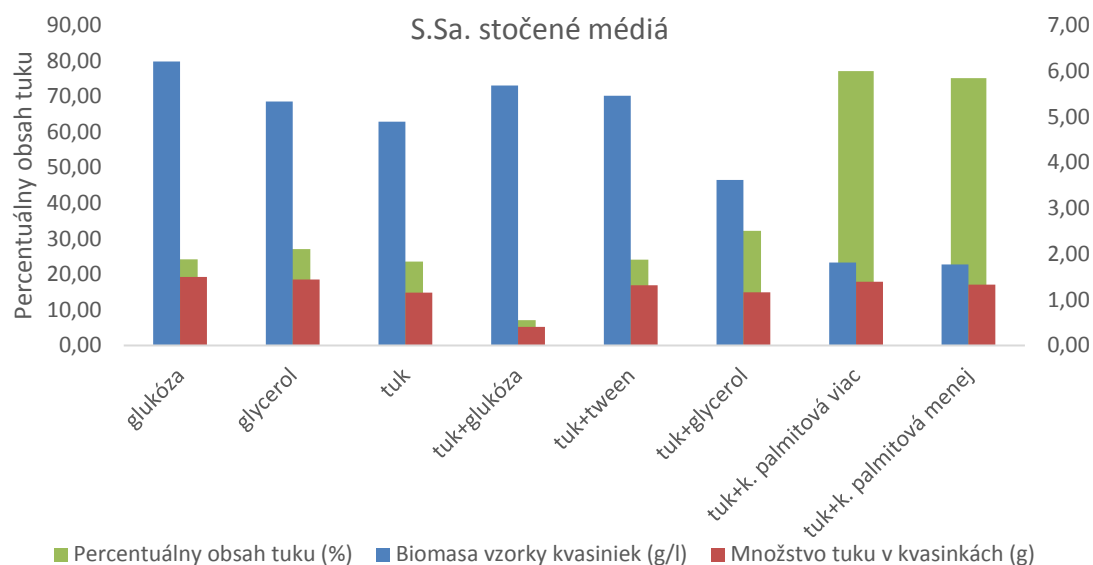


Graf 26: Vyhodnotenie obsahu tuku v kvasinkovej biomase pre S.Sa. na nestočených médiách



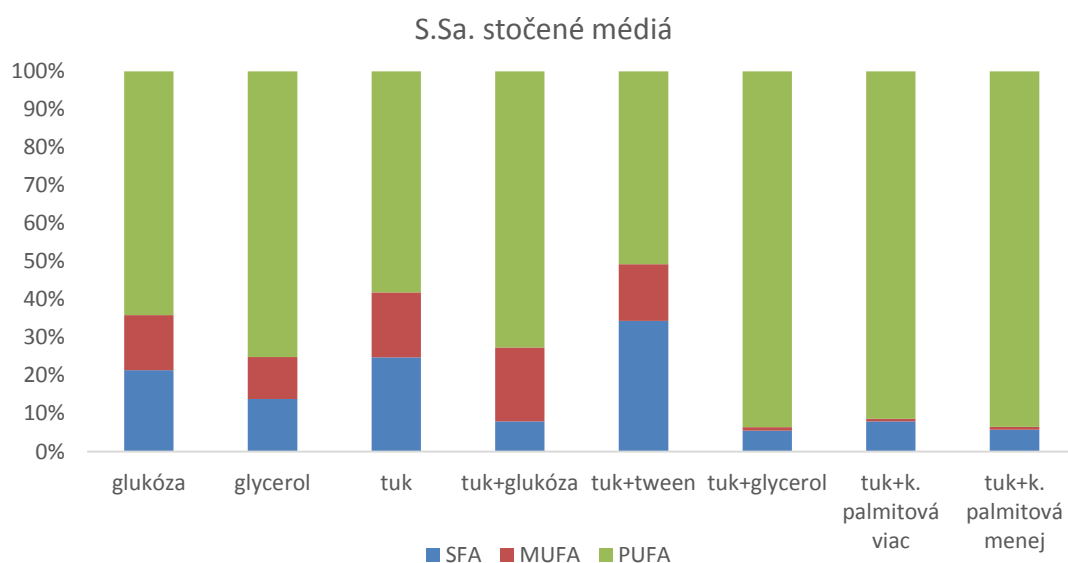
Graf 27: Vyhodnotenie lipidov pomocou GC pre S.Sa. nestočené médiá

Z Grafu 27 je vidieť, že kvasinka *Sporidiobolus salmonicolor* je asi najlepším producentom polynenasýtených mastných kyselín zo všetkých sledovaných kvasiniek. Vo všetkých médiách je vysoká koncentrácia PUFA, len v tukovom, glycerolovom a tukovo-glukózovom je o niečo nižšia. Koncentrácia MUFA je najnižšia spomedzi mastných kyselín. Najvyšší obsah MUFA bol v tukovo-glukózovom médiu. Obsah SFA v médiách je tiež nízky, najviac sa ich nachádza v tukovom a glycerolovom médiu.



Graf 28: Vyhodnotenie obsahu tuku v kvasinkovej biomase pre *S.Sa.* na stočených médiách

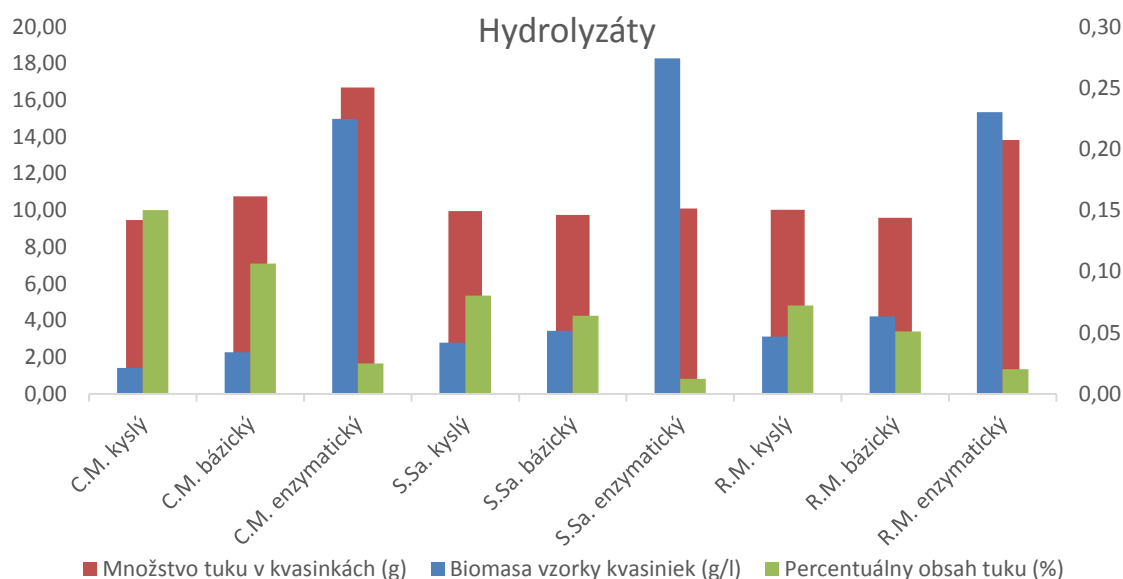
Z rovnakých dôvodov ako pri Grafe 24 nebolo v tomto prípade do Grafu 28 zahrnuté tukové médium s polyetylénglykolom.



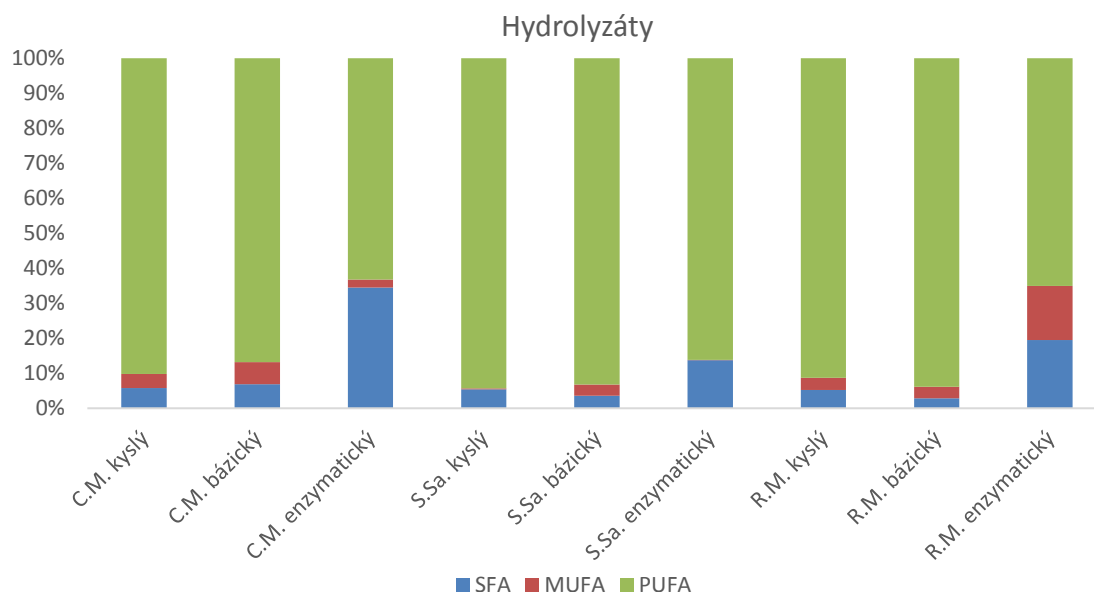
Graf 29: Vyhodnotenie lipidov pomocou GC pre *S.Sa.* stočené médiá

Z Grafu 29 sa dá pozorovať, že kvasinka *S.Sa.* je aj v stresových podmienkach stále dobrým producentom PUFA, avšak nie tak ako v predchádzajúcom prípade s nestočenými inokulami. U jednotlivých médií došlo k nárastu koncentrácií MUFA, a to napr. v tukovo-tweenovom médiu. V niektorých prípadoch, ako napr. v tukovo-tweenovom médiu alebo tukovom médiu, došlo k zvýšeniu koncentrácie SFA. Stále sa však dá kvasinku *Sporidiobolus salmonicolor* považovať za najlepšieho producenta polynenasýtených mastných kyselín spomedzi troch sledovaných kvasiniek.

Grafy 30 a 31 zhŕňajú výsledky produkcie lipidov na hydrolyzátových médiách.



Graf 30: Vyhodnotenie obsahu tuku v kvasinkovej biomase na hydrolyzátových médiách



Graf 31: Vyhodnotenie lipidov pomocou GC pre všetky kvasinky na hydrolyzátových médiách

Cystofilobasidium macerans: u tejto kvasinky boli najviac produkované polynenasýtené mastné kyseliny na kyslom hydrolyzáte. Ekvivalentne dobrým médiom pre produkciu PUFA bol taktiež bázičský hydrolyzát. Najmenšia produkcia PUFA bola na enzymatickom hydrolyzáte – v tomto médiu bola vyššia koncentrácia SFA než u ostatných.

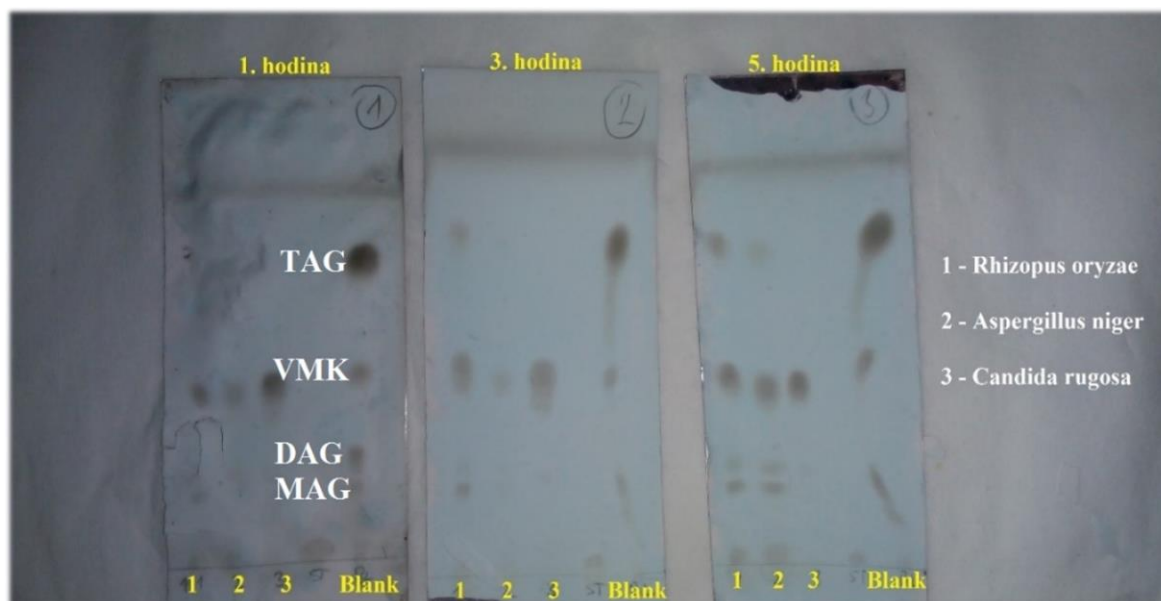
Sporidiobolus salmonicolor: v tomto prípade sa dá tvrdiť to isté ako u predchádzajúcej kvasinky, a teda že najvyššia produkcia PUFA bola na kyslom hydrolyzáte, potom na bázičskom a nakoniec na enzymatickom. Celkovo sa však potvrdilo, že táto kvasinka je najlepším producentom polynenasýtených mastných kyselín zo všetkých troch sledovaných kvasiniek.

Rhodotorula mucilaginosa: kvasinka vykazovala najvyššiu produkciu PUFA na bázičkom hydrolyzáte, potom na kyslom a nakoniec na enzymatickom – v tomto médiu bola nameraná zároveň najvyššia koncentrácia MUFA spomedzi všetkých kvasiniek a hydrolyzáto.

Celkovo sa dá konštatovať, že médiá s obsahom tuku sú použiteľné aj na produkciu lipidov. Množstvo produkovaných lipidov zvyčajne nepresahovalo rozmedzie 10–40% obsahu v biomase (s výnimkou niektorých kultivácií *C.M.*). Pomer nasýtených a nenasýtených mastných kyselín je výrazne ovplyvnený druhom média a môže byť využiteľný biotechnologicky. Produkcia lipidov na hydrolyzátoch bola podstatne nižšia ako na médiách s obsahom surového tuku alebo zmesi tuku s jednoduchým zdrojom a emulgátorom.

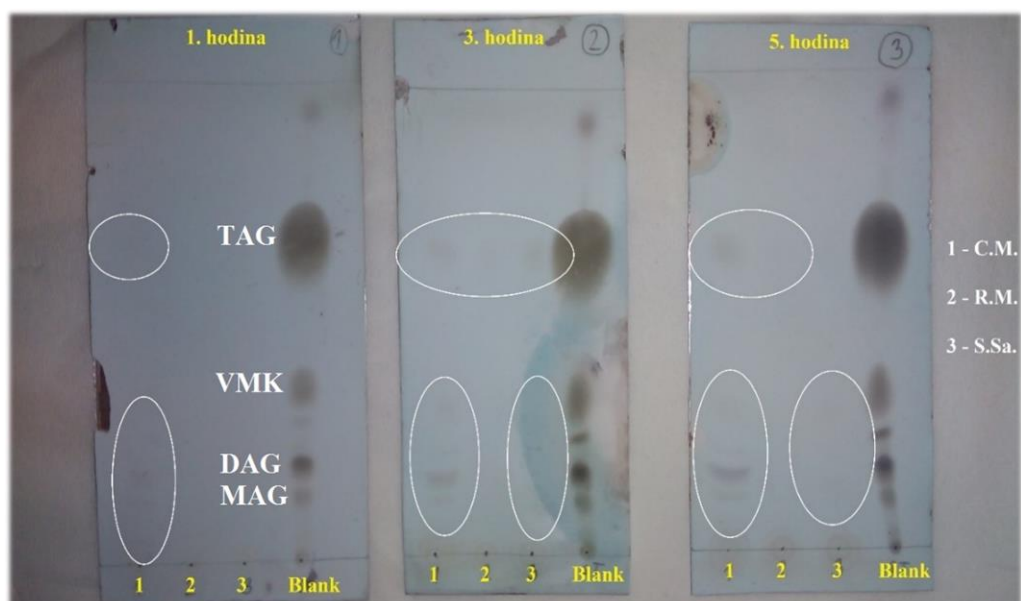
5.5 Substrátová špecifickosť lipáz produkovaných karotenogénnymi kvasinkami

Na zistenie substrátovej špecifickosti lipáz jednotlivých kvasiniek bola prevedená tenkovrstvá chromatografia. Pre porovnanie bolo TLC spravené aj pre komerčné lipázy získané z kvasinky *Candida rugosa* a plesní *Aspergillus niger* a *Rhizopus oryzae*. Kvasinky boli kultivované 5 hodín pri teplote 37°C. Po 1., 3. a 5. hodine boli odobrané vzorky a následne boli vyhodnotené produkty hydrolýzy lipidov pomocou TLC (podľa kapitoly 4.10). Ako blank bol použitý tuk rozpustený v chloroforme.



Obrázok 17: TLC pre hydrolyzáty získané pomocou komerčných lipáz

Na Obrázku 17 sa dá vidieť, že najúčinnnejším hydrolytickým enzýmom je enzým z kvasinky *Candida rugosa*. Na rozdiel od ostatných komerčných enzýmov pochádzajúcich z plesní sa dá pozorovať, že v prípade enzýmu z *Candida rugosa* dochádza k štiepeniu triacylglycerolov (TAG) majoritne na MK a potom minoritne na diacylglyceroly (DAG) a monoacylglyceroly (MAG). V prípade plesňových lipáz dochádza k priebežnej hydrolýze všetkých väzieb.



Obrázok 18: TLC pre hydrolyzáty získané pomocou naprodukovaných lipáz

U kvasiniek, ktoré boli v tejto práci skúmané, bolo zistené (Obrázok 18), že u kvasinky *C.M.* dochádza k postupnej hydrolýze všetkých väzieb, najprv však k štiepeniu na DAG a MAG. Lipáza z kvasinky *R.M.* v priebehu experimentu podľa výsledku TLC štiepila len triacylglyceroly. Lipáza od *S.Sa.* po prvej hodine nevykazovala žiadnu aktivitu. Po tretej hodine však došlo k štiepeniu tri-, di- aj monoacylglycerolov. Po piatej hodine štiepila diacylglyceroly na monoacylglyceroly až na glycerol.

5.6 Purifikácia lipázy z kvasinky *Sporidiobolus salmonicolor*

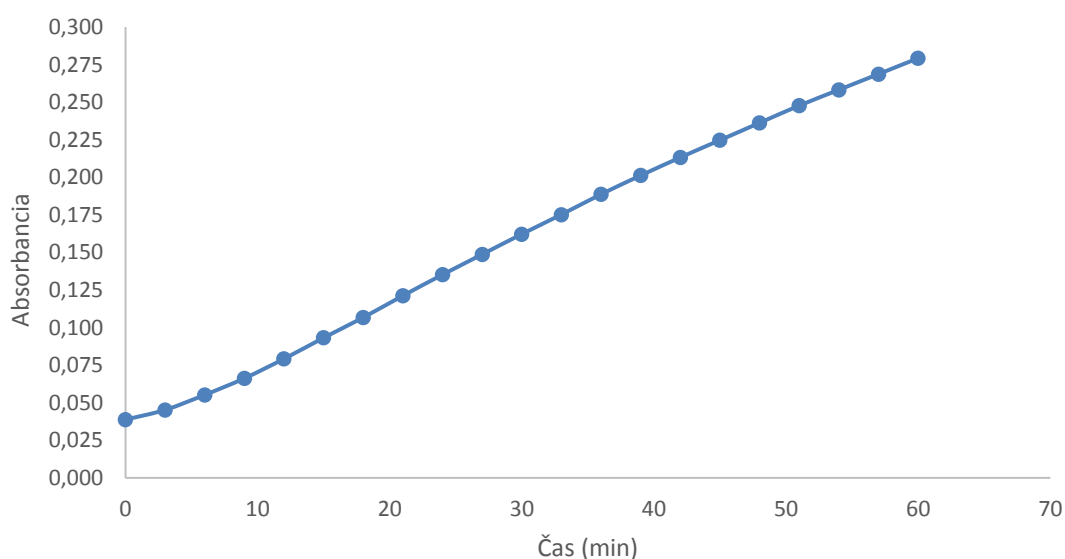
Lipáza bola purifikovaná a izolovaná z tukovo-glycerolového média, v ktorom bola kultivovaná kvasinka *Sporidiobolus salmonicolor*. Tento variant bol vybraný preto, lebo bola na ňom nameraná vysoká lipázová aktivita a navyše kvasinka dobre produkovala biomasu. Na túto kultiváciu bolo pripravených 500 ml média. Postup kultivácie bol zhodný s kultiváciami v kapitole 4.4 až nato, že tentokrát bolo médium naliate do reagenčnej fľaše o objeme 1 liter, ktorá bola neustále prevzdušňovaná.



Obrázok 19: Kultivácia *S.Sa.* na tukovo-glycerolovom médiu v reagenčnej fľaši

Takto pripravené médium bolo po ukončení kultivácie centrifugované po dobu 3 min pri 7000 otáčkach/min. Supernatant bol zliaty a ten bol ešte filtrovaný cez papierový filter, aby bolo médium zbavené nečistôt, ktoré by mohli upchať aparáturu na ultrafiltráciu.

Následne bola vo vzorke pre kontrolu zmeraná lipázová aktivita.



Graf 32: Graf závislosti absorbancie na čase pre *S.Sa.* na tukovo-glycerolovom médiu

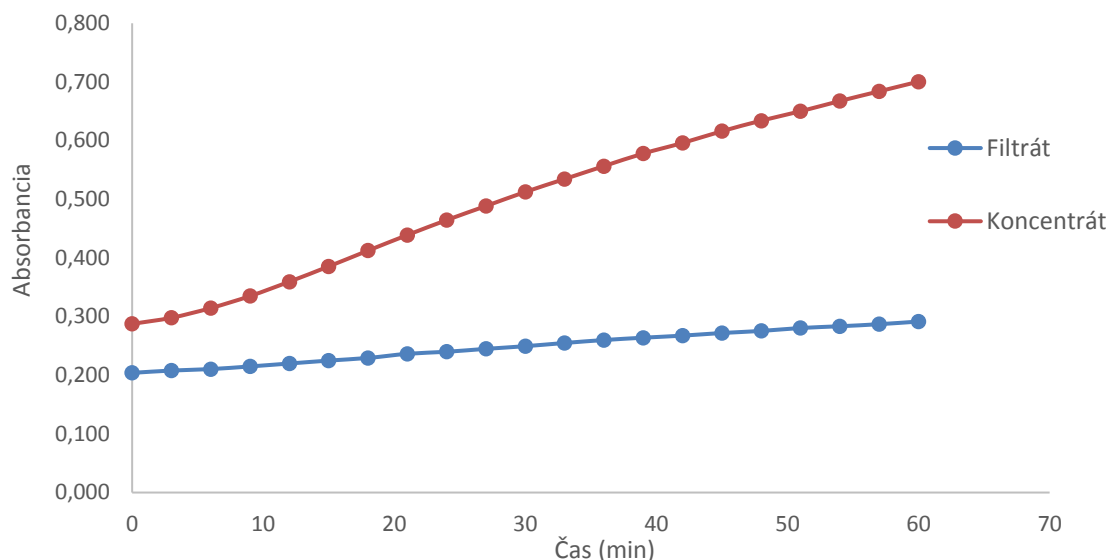
Z Grafu 32 je vidieť, že absorbancia pomerne prudko narastá a teda je v médiu lipáza aktívna. V Tabuľke 12 je vypísaná konkrétna hodnota lipázovej aktivity pre danú vzorku. Vzorka bola ďalej spracovaná ultrafiltráciou.

Tabuľka 12: Aktivity lipolytického enzýmu pre filtrované médium

Aktivita enzýmu (nmol/ml·min)	Vzorka
	23,578

5.6.1 Ultrafiltrácia

Pripravená vzorka z predchádzajúcej kapitoly bola zakoncentrovaná pomocou ultrafiltrácie na aparátúre KrosFlo. Bola použitá 5 kDa membrána a nečistoty z média tak boli odstránené. Následne bola pre kontrolu zmeraná lipázová aktivita vo filtráte a koncentráte.



Graf 33: Graf závislosti absorbancie na čase pre filtrát a koncentrát po ultrafiltrácii cez 5 kDa membránu

Z Grafu 33 je vidieť, že vo filtráte je len veľmi slabá lipázová aktivita. Naopak v koncentráte bola zase nameraná veľmi výrazná lipázová aktivita, čo znamená, že sa podarilo tento enzým zakoncentrovať. Konkrétne hodnoty lipázovej aktivity sú zhrnuté v Tabuľke 13.

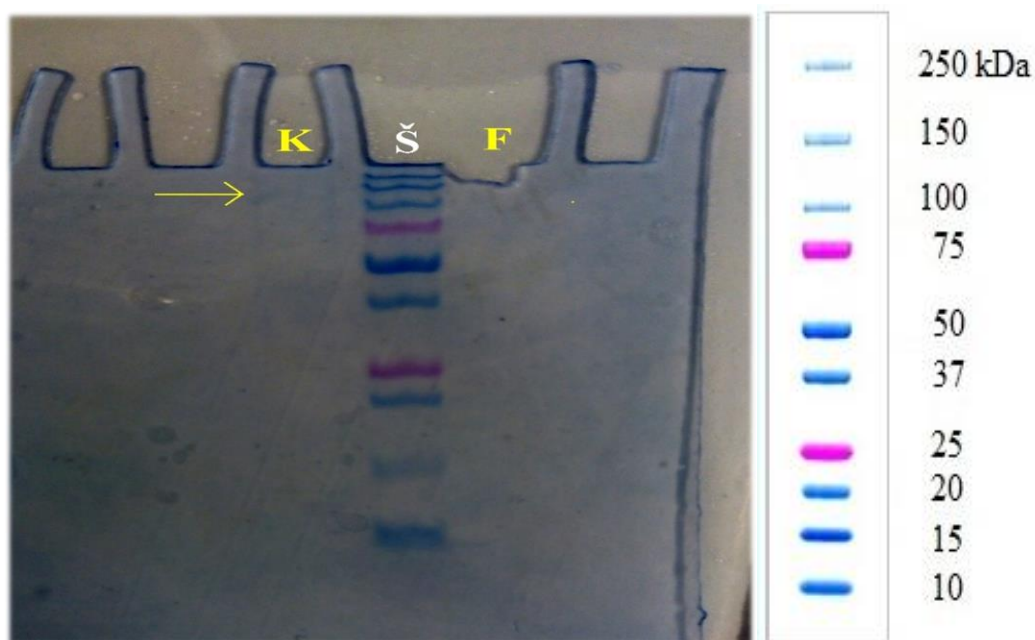
Tabuľka 13: Aktivity lipolytického enzýmu pre ultrafiltrované médium

Aktivita enzýmu (nmol/ml·min)	5 kDa membrána	
	Filtrát	Koncentrát
	0,531	2,506

Pri porovnaní hodnôt lipázovej aktivity koncentrátu a vzorky pred ultrafiltráciou z Tabuľky 12 je vidieť, že lipázová aktivita je výrazne nižšia, čo mohlo byť spôsobené tým, že časť lipázy bola ultrafiltráciou odstránená spolu s filtrátom.

5.6.2 PAGE-SDS

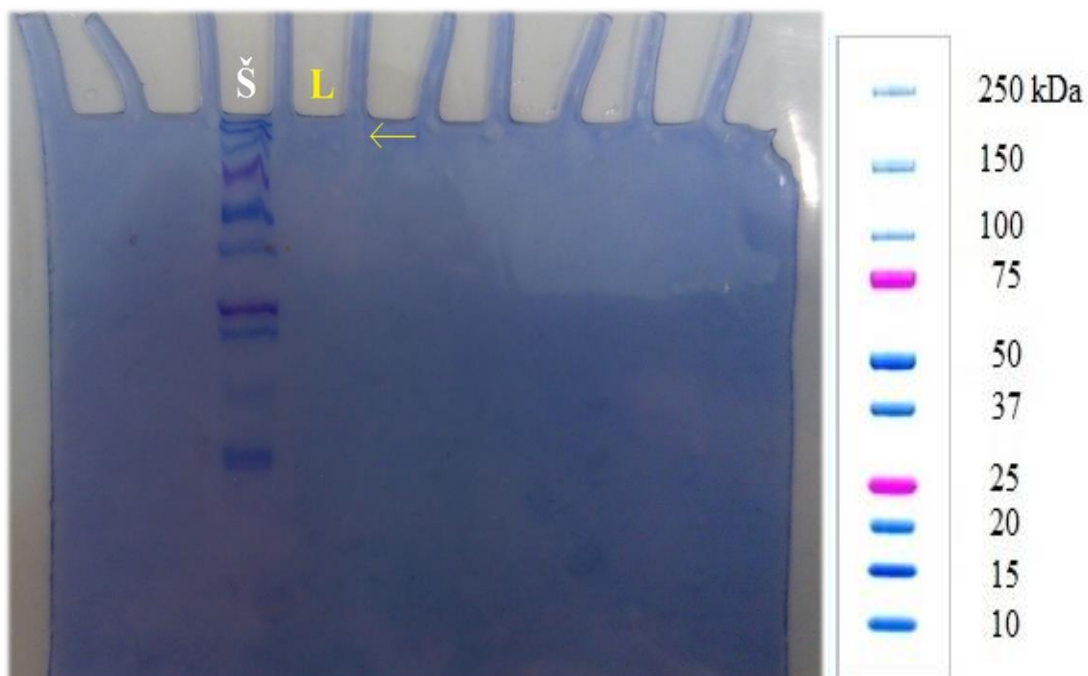
Vzorky získané ultrafiltráciou boli vyhodnotené pomocou PAGE-SDS elektroforézy. Elektroforetická separácia enzýmov bola prevedená na 12% polyakrylamidovom géle za použitia štandardov Precision Plus Protein™ Dual Color podľa postupu uvedenom v kapitole 4.12. Nanesená bola vzorka koncentrátu aj filtrátu.



Obrázok 20: Elektroforetický gél so vzorkami po ultrafiltrácii: koncentrát (K), filtrát (F) a rebríček štandardu (Š)

Z Obrázku 20 je vidieť, že na elektroforetickom géle v jamke pre vzorku koncentráту sa vyobrazila 1 zóna, a to približne o veľkosti 120 kDa. Zóna však bola veľmi slabo viditeľná. Vo vzorke filtrátu sa neobjavila žiadna zóna.

Vzorka koncentráту bola následne lyofilizovaná, aby bol enzým zakonzentrovaný.



Obrázok 21: Elektroforetický gél so vzorkou po lyofilizácii (L) a rebríček štandardu (Š)

Na *Obrázku 21* je vyobrazený elektroforetický gél so vzorkou lyofilizátu a štandardu. Napriek zakoncentrovaniu vzorky lyofilizáciou sa dá pozorovať, že vyobrazená zóna na géle je stále slabo viditeľná. To mohlo byť spôsobené tým, že celková koncentrácia enzýmu bola nízka. Potvrdila sa však veľkosť vyobrazenej zóny, a to cca 120 kDa. Avšak hmotnosť lipolytického enzýmu je štandardne cca 35–65 kDa, čo skúmaná vzorka nespĺňa. Táto skutočnosť môže byť spôsobená tým, že lipáza sa nachádza v komplexe s inými enzýmami, alebo je vyššia koncentrácia ostatných proteínov, a tie lipázu potláčajú. Koncentrácia proteínov bola pre kontrolu nameraná metódou Hartee-Lowry. Z týchto hodnôt bola vypočítaná celková bilancia proteínov a špecifická aktivita enzýmu vztiahnutá na celkové množstvo proteínov vo frakcii. Výsledky sú zhrnuté v *Tabuľke 14*.

Tabuľka 14: Koncentrácia proteínov v médiu nameraná pomocou Hartee-Lowry metódy, celková bilancia proteínov vo frakcii a špecifická aktivita enzýmu

	c ($\mu\text{g/ml}$)	Objem frakcie (ml)	Celkové množstvo proteínov vo frakcii (mg)	Aktivita enzýmu (nkat)	Špecifická aktivita enzýmu (nkat/mg)
Pôvodné médiu	309,39	400	123,76	393,05	3,18
Filtrát (5 kDa)	288,93	360	104,01	8,85	0,09
Koncentrát (5 kDa)	393,48	40	15,74	41,78	2,65

Tento jav bude ďalej sledovaný v nadväzujúcom výskume iným výskumným tímom.

6 ZÁVERY

Cieľom tejto práce bola produkcia lipolytických enzýmov, bioaktívnych látok a mastných kyselín kvasinkami. K produkcii boli použité karotenoidné kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cystofilobasidium macerans* a *Sporidiobolus salmonicolor*. Kultivované boli submerzne v minerálnom médiu s použitím rôznych substrátov sacharidovej a lipidovej povahy. Boli použité médiá s glukózou, glycerolom, tukom, tukom a glukózou, tukom a polysorbátom 80 (Tween 80), tukom a glycerolom, tukom s obsahom 1 g/l kyseliny palmitovej, tukom a polyetylénglykolom, tukom s obsahom 0,5 g/l kyseliny palmitovej, enzymatický, bázičný a kyslý hydrolyzát. Zaočkovanie kultúr do produkčného média bolo prevedené jednak priamo inokulom v YPD médiu a tiež centrifugovaným (stočeným) inokulom bez obsahu zvyškových živín, aby bola kvasinka vystavená väčším stresovým podmienkam a nečerpala tak ďalšie živiny z inokula. Po kultivácii bola gravimetricky stanovená biomasa kvasiniek, spektrofotometricky nameraná aktivita lipáz metódou s p-nitrofenolom. Koncentrácia β -karoténu, celkových karotenoidov, ergosterolu a ubiquinónu (CoQ) bola stanovená pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie, koncentrácia mastných kyselín pomocou plynovej chromatografie. Pre purifikáciu a identifikáciu lipázy bola ďalej prevedená ultrafiltrácia, lyofilizácia a PAGE-SDS elektroforéza.

Produkcia biomasy bola sledovaná u všetkých kmeňov a médií. Medzi produkčné médiá zaočkované nestočeným inokulom *Rhodotorula mucilaginosa* vyznačujúce sa vysokou produkciou biomasy, patrili glukózové (11,22 g/l), glycerolové (9,31 g/l) a tukovo-tweenové médium (8,91 g/l). Na produkčných médiách zaočkovaných so stočeným inokulom bola produkcia biomasy o niečo nižšia, medzi najlepšie produkčné médiá patrilo glukózové (6,62 g/l) a tukovo-glycerolové médium (5,77 g/l). Kvasinka *Cystofilobasidium macerans* mala najvyššie hodnoty biomasy namerané na glycerolovom (7,36 g/l) a tukovo-glycerolovom (7,13 g/l) produkčnom médiu s nestočeným inokulom. Táto kvasinka sa však neosvedčila na médiách so stočeným inokulom, kde boli produkované veľmi nízke výťažky biomasy a jediná vyššia hodnota bola zaznamenaná na glukózovom médiu (4,52 g/l). Najlepšie produkčné médiá zaočkované nestočeným inokulom pre kvasinku *Sporidiobolus salmonicolor* boli tukovo-glycerolové (8,57 g/l) a glukózové médium (7,62 g/l). Glukózové (6,21 g/l) a tukovo-glukózové médium (5,68 g/l) so stočeným inokulom mali spomedzi ďalších médií najlepšie produkcie biomasy. U médií s obsahom tukových hydrolyzátov bolo ako najlepšie médium pre produkciu biomasy vyhodnotené médium pripravené z enzymatického hydrolyzátu, kde hmotnosti biomasy boli 15,35 g/l (pre *R. mucilaginosa*), 14,98 g/l (pre *C. macerans*) a 18,28 g/l (pre *S. salmonicolor*). Podľa sumárnych výsledkov sa teda za najlepšieho producenta biomasy na väčšine testovaných médií dá považovať kvasinka *Rhodotorula mucilaginosa*.

Extracelulárna lipáza bola analyzovaná v produkčných médiách po ukončení kultivácie. Lipázové aktivity boli u kvasinky *R. mucilaginosa* vyššie v produkčných médiách so stočeným inokulom, a to konkrétne na tukovo-glukózovom (1,675 nmol/min·ml) a glycerolovom médiu (1,356 nmol/min·ml). U kvasinky *C. macerans* boli tiež najvyššie lipázové aktivity na médiách so stočeným inokulom a to v tukovom médiu s prídavkom 1 g/l

kyseliny palmitovej (1,156 nmol/min·ml) a tukovom médiu (1,098 nmol/min·ml). Kvasinka *S. salmonicolor* mala najvyššie lipázové aktivity namerané v tukovo-glycerolovom (1,596 nmol/min·ml) a tukovom médiu s prídavkom 1 g/l kyseliny palmitovej (1,371 nmol/min·ml) zaočkovanom nestočeným inokulom. Pomerne ekvivaletné hodnoty lipázových aktivít boli namerané na rovnakých médiách zaočkovaných so stočeným inokulom, čiže v tukovo-glycerolovom (1,371 nmol/min·ml) a tukovom médiu s prídavkom 1 g/l kyseliny palmitovej (1,320 nmol/min·ml). Spomedzi hydrolyzátových médií bola najvyššia lipázová aktivita nameraná u kvasinky *C. macerans* na bázičkom hydrolyzáte (1,153 nmol/min·ml).

Súhrnne sa dá konštatovať, že produkcia extracelulárnej lipázy u karotenogénnych kvasiniek je indukovateľná prítomnosťou tuku v médiu, vyššie hodnoty sa dosiahnu prídavkom emulgátorov a glycerolu. Produkcia lipáz na rôznych médiách vykazuje druhovú špecifickosť.

Na tukových médiách bola ďalej sledovaná produkcia vybraných intracelulárnych metabolitov. Najvyššia koncentrácia β -karoténu u kvasinky *R. mucilaginosa* bola nameraná na glukózovom médiu so stočeným inokulom ($c = 2374,621 \mu\text{g/g}$ sušiny), pre kvasinku *C. macerans* to bolo glycerolové médium s nestočeným inokulom ($c = 3411,079 \mu\text{g/g}$ sušiny) a pre kvasinku *S. salmonicolor* bola najvyššia koncentrácia detegovaná na tukovom médiu s prídavkom 0,5 g/l kyseliny palmitovej zaočkovanom so stočeným inokulom ($c = 1577,377 \mu\text{g/g}$ sušiny). Spomedzi hydrolyzátových médií bola vysoká výťažnosť na bázičkom hydrolyzáte pre *C. macerans* ($c = 3072,133 \mu\text{g/g}$ sušiny).

Celkové karotenoidy mali najvyššiu koncentráciu u kvasinky *R. mucilaginosa* na tukovo-tweenovom médiu ($c = 5454,399 \mu\text{g/g}$ sušiny) so stočeným inokulom, u kvasinky *C. macerans* na stočenom tukovo-tweenovom médiu ($c = 13\,740,305 \mu\text{g/g}$ sušiny) a u kvasinky *S. salmonicolor* na glycerolovom médiu ($c = 5950,453 \mu\text{g/g}$ sušiny) so stočeným inokulom. Spomedzi hydrolyzátových médií bola vysoká výťažnosť na bázičkom hydrolyzáte pre *C. macerans* ($c = 5481,174 \mu\text{g/g}$ sušiny).

U kvasiniek *C. macerans* a *R. mucilaginosa* boli zistené niekoľkonásobne vyššie hodnoty celkových pigmentov oproti β -karoténu, avšak u kvasinky *S. salmonicolor* boli hodnoty celkových karotenoidov iba asi 2x vyššie. U prvých dvoch kmeňov sa zrejme majoritne tvoria oxidované karotenoidy (torulén, torularodín), zatiaľ čo u *S. salmonicolor* sa síce tvoria aj iné pigmenty, ale potvrdilo sa, že β -karotén je majoritným produkovaným pigmentom tejto kvasinky.

Výťažnosť ergosterolu bola najvyššia u kvasinky *R. mucilaginosa* v glycerolovom médiu so stočeným inokulom ($c = 3074,363 \mu\text{g/g}$ sušiny), na tukovo-tweenovom médiu so stočeným inokulom pre *C. macerans* ($c = 4538,580 \mu\text{g/g}$ sušiny) a na tukovom médiu s obsahom 0,5 g/l kyseliny palmitovej so stočeným inokulom pre *S. salmonicolor* ($c = 5979,999 \mu\text{g/g}$ sušiny). Spomedzi hydrolyzátových médií bola vysoká výťažnosť na kyslom hydrolyzáte pre *C. macerans* ($c = 3448,698 \mu\text{g/g}$ sušiny).

Produkcia ubiquinónu dosahovala pre kvasinku *R. mucilaginosa* najvyššiu koncentráciu v nestočenom tukovom médiu ($c = 2722,690 \mu\text{g/g}$ sušiny), pre *C. macerans* v tukovo-glukózovom médiu so stočeným inokulom ($c = 10\,474,311 \mu\text{g/g}$ sušiny) a pre *S. salmonicolor* v tukovom médiu s prídavkom $0,5 \text{ g/l}$ kyseliny palmitovej ($c = 3600,415 \mu\text{g/g}$ sušiny) so stočeným inokulom. Spomedzi hydrolyzátových médií bola vysoká výťažnosť na bázičkom hydrolyzáte pre *C. macerans* ($c = 3517,208 \mu\text{g/g}$ sušiny).

Pomocou GC/FID bola u všetkých kmeňov a médií sledovaná produkcia lipidov a jednotlivých mastných kyselín. Celkovo sa dá konštatovať, že médiá s obsahom tuku sú použiteľné aj na produkciu lipidov. Množstvo produkovaných lipidov zvyčajne nepresahovalo rozmedzie 10–40% obsahu v biomase (s výnimkou niektorých kultívácií *C. macerans*). Pomer nasýtených a nenasýtených mastných kyselín je výrazne ovplyvnený druhom média a môže byť využiteľný biotechnologicky. Produkcia lipidov na hydrolyzátoch bola podstatne nižšia ako na médiách s obsahom surového tuku alebo zmesi tuku s jednoduchým zdrojom a emulgátorom.

Analýza mastných kyselín preukázala, že u všetkých kvasiniek je výrazná hlavne produkcia polynenasýtených mastných kyselín. Najvyššia koncentrácia PUFA je celkovo u kvasinky *Sporidiobolus salmonicolor*. Skupina PUFA je zastúpená v karotenogénnych kvasinkách najmä kyselinou linolovou (C18:2), skupina MUFA kyselinou olejovou, prípadne palmitolejovou. Vysoký obsah PUFA je vhodný pre prípadnú aplikáciu do potravinových doplnkov a krmív, zatiaľ čo vyšší obsah MUFA (cca 40–50%) je vhodný pre využitie kvasinkového tuku ako zložky biopalív.

V rámci purifikácie a charakterizácie lipázy bola najprv spravená substrátová špecifickosť, kde sa ako najúčinnější prejavil enzým z kvasinky *S. salmonicolor*. Preto bola táto kvasinka kultivovaná vo väčšom objeme v tukovo-glycerolovom médiu, z ktorého bola následne purifikovaná ultrafiltráciou cez 5 kDa membránu. Pre zakoncentrovanie bola vzorka lyofilizovaná. Následne boli vzorky z ultrafiltrácie (koncentrát, filtrát) a po lyofilizácii identifikované pomocou PAGE-SDS elektroforézy. V koncentráte aj lyofilizáte boli detegované slabo viditeľné zóny o veľkosti približne 120 kDa . Táto hodnota molekulovej hmotnosti je pre lipázu nezvyčajne veľká, preto je možné, že sa enzým nachádzal v komplexe s inými enzýmami. Tento jav bude ďalej sledovaný v pokračujúcom výskume.

Záverom možno konštatovať, že karotenogénne kvasinky sú biotechnologicky využiteľné ku konverzii menej kvalitného odpadného živočíšneho tuku na obohatenú kvasinkovú biomasu s vysokým obsahom karotenoidov, polynenasýtených mastných kyselín, sterolov a ďalších bioaktívnych látok. Práca bola riešená v rámci medzinárodného projektu „LipoFungi“ financovaného „National Research Council, Norway“. Výsledky práce budú v projekte podkladom pre ďalší výskum.

7 LITERATÚRA

- [1] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vyd., ve VP 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0571-6.
- [2] HÁRONIKOVÁ, A. *Produkce vybraných kvasinkových metabolitů využitelných do potravinových doplňků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 141 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [3] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. Bratislava: Alaa, 1990. ISBN 80-05-00644-6.
- [4] GIENTKA, Iwona, Marta GADASZEWSKA, Stanisław BŁAŻEJAK, Marek KIELISZEK, Anna BZDUCHA-WRÓBEL, Lidia STASIAK-RÓŻAŃSKA a Anna Maria KOT. *Evaluation of lipid biosynthesis ability by Rhodotorula and Sporobolomyces strains in medium with glycerol*. *European Food Research and Technology*. 2017, 243(2), 275-286. DOI: 10.1007/s00217-016-2742-9. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-016-2742-9>
- [5] VALERIO, E., M. GADANHO a J. P. SAMPAIO. *Reappraisal of the Sporobolomyces roseus species complex and description of Sporidiobolus metaroseus sp. nov.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2008, 58(3), 736-741. DOI: 10.1099/ij.s.0.65580-0. ISBN 10.1099/ij.s.0.65580-0. Dostupné také z: <http://ij.s.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ij.s.0.65580-0>.
- [6] SAMPAIO, José Paulo. *Sporidiobolus Nyland (1949). The Yeasts (Fifth Edition)*. 2011, 1576-1564. DOI: 10.1016/B978-0-444-52149-1.00130-0. ISBN 10.1016/B978-0-444-52149-1.00130-0. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444521491001300>
- [7] [online]. [cit. 2017-11-18]. Dostupné z: http://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcmimg_view?jcm=1841&fid=A
- [8] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy*. Bratislava: Bratislava: Alfa, 1982.
- [9] FELL, J.W., H. ROEIJMANS a T. BOEKHOUT. *Cystofilobasidiales, a new order of basidiomycetous yeasts*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Society for General Microbiology, 1999, (49), 907-913. DOI: 10.1099/00207713-49-2-907. ISBN 10.1099/00207713-49-2-907. Dostupné také z: <http://ij.s.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-49-2-907>
- [10] SAXENA, R.K, Anita SHEORAN, Bhoopander GIRI a W.Sheba DAVIDSON. *Purification strategies for microbial lipases*. *Journal of Microbiological Methods*. 2003, 52 (1), 1-18. DOI: 10.1016/S0167-7012(02)00161-6. ISBN 10.1016/S0167-7012(02)00161-6. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701202001616>
- [11] HORÁKOVÁ, D., M. NĚMEC, M. SZOSTKOVÁ.: *Laboratorní cvičení z fyziologie bakterií*. [online]. Brno, Masarykova univerzita, 2007 [cit. 2017-10-13]. Dostupné také

z: https://is.muni.cz/elportal/estud/prif/ps06/3074288/Labor.cv.z_fyziol.bakterii_uprave ne.pdf

- [12] GILHAM, Dean a Richard LEHNER. *Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. Methods.* 2005, 36(2), 139-147. DOI: 10.1016/j.ymeth.2004.11.003. ISBN 10.1016/j.ymeth.2004.11.003. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202305000447>
- [13] JOSEPH, Babu, Pramod W. RAMKETE, George THOMAS, Nitisha SHRIVASTAVA: *Standard Review Cold-active microbial Lipases: a versatile tool for industrial applications. Biotechnology and Molecular Biology Review.* 2007, 2(2), 39-48. ISSN 1538-2273. Dostupné z: http://www.academicjournals.org/article/article1380099667_Babu%20et%20al.pdf
- [14] SINGH, Rajendra, Manoj KUMAR, Anshumali MITTAL a Praveen Kumar MEHTA. *Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech.* 2016, 6(2). DOI: 10.1007/s13205-016-0485-8. ISBN 10.1007/s13205-016-0485-8. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-016-0485-8>
- [15] GOSH, P.K., R.K. SAXENA, Rani GUPTA, R.P. YADAV a Sheba DAVIDSON: *Microbial lipases: production and applications. Science Progress.* 1996, 79(2), 119-157. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/14377768_Microbial_lipases_production_and_applications
- [16] SAINI, Ramesh Kumar, Shivraj Hariram NILE a Se Won PARK. *Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. Food Research International.* 2015, 76(3), 735-750. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.07.047. ISBN 10.1016/j.foodres.2015.07.047. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996915301356>
- [17] RAPOSO, Maria, Alcina DE MORAIS a Rui DE MORAIS. *Carotenoids from Marine Microalgae: A Valuable Natural Source for the Prevention of Chronic Diseases. Marine Drugs.* 2015, 13(8), 5128-5155. DOI: 10.3390/md13085128. ISBN 10.3390/md13085128. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/13/8/5128/>
- [18] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin.* Vyd. 1. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902-3914-5.
- [19] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie.* 23. vyd., (4. české vyd.), v H. Jinočany: H, 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- [20] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin.* Vyd. 2. opr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-866-5901-1.
- [21] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie.* 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [22] ZOZ, Liliana, Julio Cesar CARVALHO, Vanete Thomaz SOCCOL, Thais Costa CASAGRANDE a Ligia CARDOSO. *Torularhodin and Torulene: Bioproduction, Properties and Prospective Applications in Food and Cosmetics - a Review. Brazilian*

- Archives of Biology and Technology*. 2014, 58(2). DOI: 10.1590/S1516-8913201400152. ISBN 10.1590/S1516-8913201400152.
- [23] [TREASTISE] EDITED BY H.-J. REHM AND G. REED a [volume editors] H. Kleinkauf, H. von Döhren. [VOLUME EDITORS] H. KLEINKAUF, H. VON DÖHREN. *Biotechnology*. 2nd ed. Weinheim [Germany]: VCH, 1997. ISBN 978-352-7620-890.
- [24] CHEIRSILP, Benjamas a Yasmi LOUHASAKUL. *Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel*. *Bioresource Technology*. 2013, 142, 329-337. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.012. ISBN 10.1016/j.biortech.2013.05.012. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852413007724>
- [25] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin I*. Tábor: Osis, 1999. 352 s. ISBN 80-902391-3-7.
- [26] KOLOUCHOVÁ, Irena, Olga MATÁTKOVÁ, Karel SIGLER, Jan MASÁK a Tomáš ŘEZANKA. *Production of Palmitoleic and Linoleic Acid in Oleaginous and Nonoleaginous Yeast Biomass*. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2016. DOI: 10.1155/2016/7583684. ISBN 10.1155/2016/7583684. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/ijac/2016/7583684/>
- [27] ALCAZAR-FUOLI, Laura a Emilia MELLADO. *Ergosterol biosynthesis in Aspergillus fumigatus: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance*. *Frontiers in Microbiology*. 2013, 3, 493. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00439. ISBN 10.3389/fmicb.2012.00439. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00439/abstract>
- [28] WEETE, John D., Maritza ABRIL, Meredith BLACKWELL a Geraldine BUTLER. *Phylogenetic Distribution of Fungal Sterols*. *PLoS One*. 2010, 5(5). DOI: 10.1371/journal.pone.0010899. ISBN 10.1371/journal.pone.0010899. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0010899>
- [29] STEFELY, Jonathan A. a David J. PAGLIARINI. *Biochemistry of Mitochondrial Coenzyme Q Biosynthesis*. *Trends in Biochemical Sciences*. 2017, 42(10), 824-843. DOI: 10.1016/j.tibs.2017.06.008. ISBN 10.1016/j.tibs.2017.06.008. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000417301160>
- [30] VESELÁ, Mária a Milan DRDÁK. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 2. vyd. preprac. Brno: VUTUM, 1999. ISBN 80-214-1305-0.
- [31] [online]. [cit. 2018-03-03]. Dostupné z: <http://www.mojechemie.cz/Biochemie:Lipidy>
- [32] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-030-0569-8.
- [33] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.

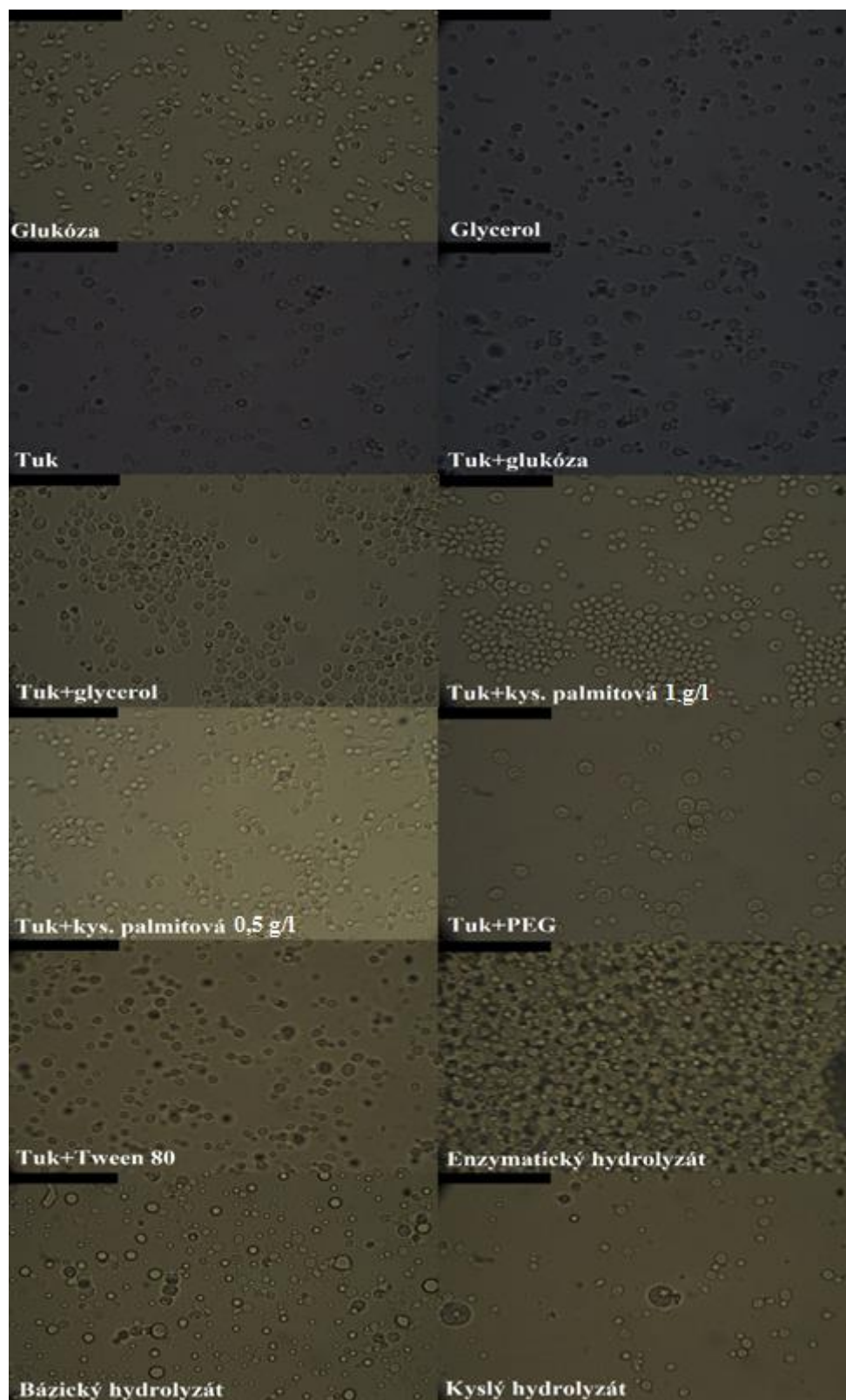
- [34] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie II*. V Brně: Vutium, 2000, 347 s. : il. ; 29 cm. ISBN 80-214-1742-0.
- [35] WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. *Thin-Layer Chromatography*. DOI: 10.1093/chromsci/46.4.289. ISBN 10.1093/chromsci/46.4.289. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/chromsci/article-lookup/doi/10.1093/chromsci/46.4.289>
- [36] JOHNSON, Richard, Gustav TRÄFF, Martin SUNDÉN a Ulf ELLERVIK. *Evaluation of quantitative thin layer chromatography using staining reagents. Journal of Chromatography*. 2007, 1164(1-2),298-305. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.07.029. ISBN 10.1016/j.chroma.2007.07.029. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307012502>
- [37] GALUSZKA, Petr a Lenka LUHOVÁ. *Laboratorní technika pro biochemiky*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2003. ISBN 80-244-0640-3.
- [38] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0586-2.
- [39] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. *An overview of encapsulation technologies for food applications. Procedia Food Science*. 2011, 1, 1806-1815. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265. ISBN 10.1016/j.profoo.2011.09.265. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X11002665>
- [40] ZUIDAM, Nicolaas J., Viktor A. NEDOVIĆ. *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. Online-Ausg. New York: Springer, 2010. ISBN 978-144-1910-080.
- [41] MÁROVÁ, Ivana, Martina ČARNECKÁ, Andrea HALIENOVÁ, Radka KOČÍ, Emília BREIEROVÁ: *Production of carotenoid/ergosterol-supplemented biomass by red yeast Rhodotorula glutinis grown under external stress*. Food Technology and Biotechnology, 48(1), 2010, p.56-61

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

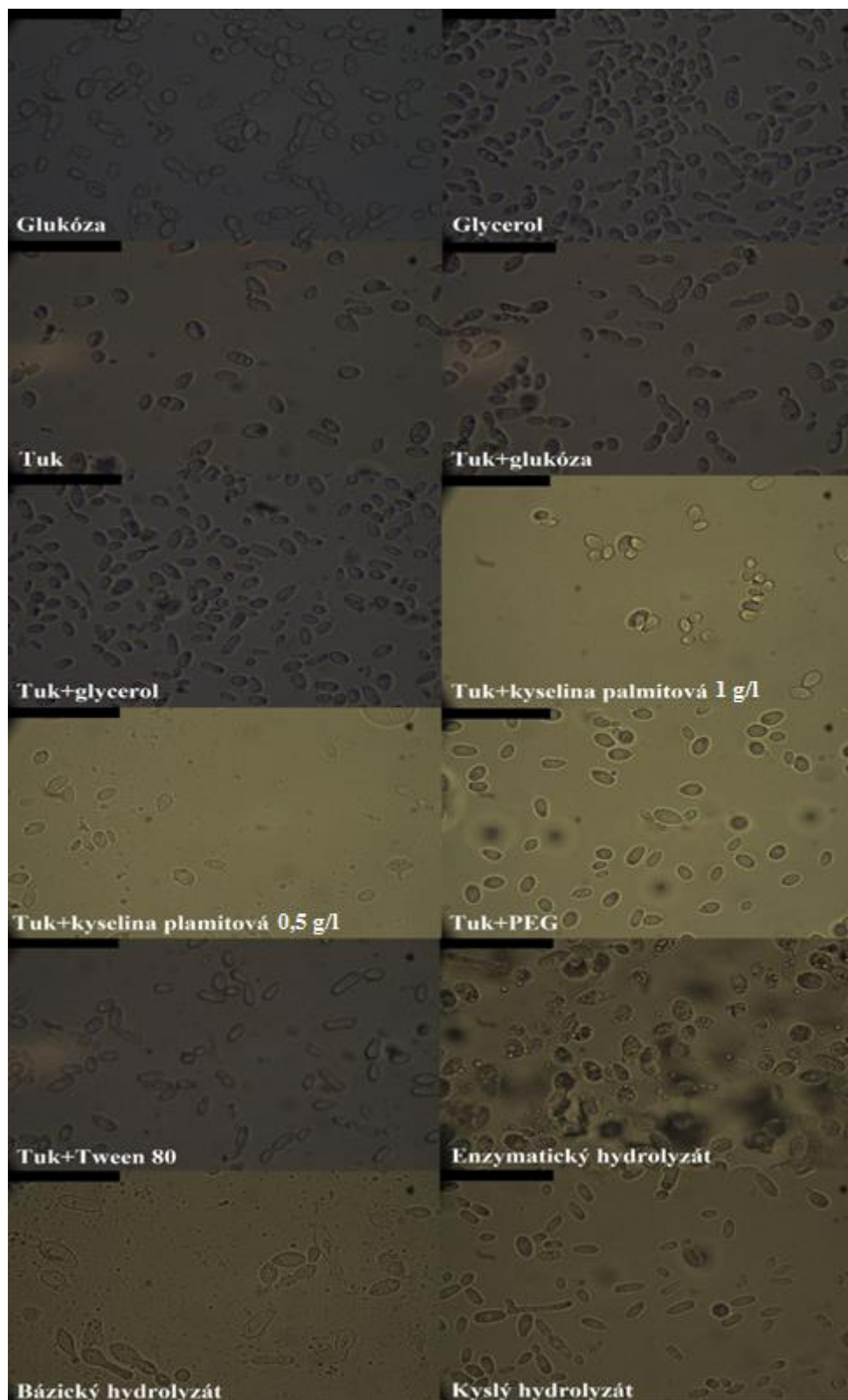
R.M.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
C.M.	<i>Cystofilobasidium macerans</i>
S.Sa.	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>
PEG	polyetylénglykol
Pal ↑	médium s prídavkom 1 g/l kyseliny palmitovej
Pal ↓	médium s prídavkom 0,5 g/l kyseliny palmitovej
GC	plynová chromatografia
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
SFA	nasýtené mastné kyseliny
PUFA	polynenasýtené mastné kyseliny
MUFA	mononenasýtené mastné kyseliny
TAG	triacylglyceroly
VMK	voľné mastné kyseliny
DAG	diacylglyceroly
MAG	monoacylglyceroly

9 PRÍLOHY

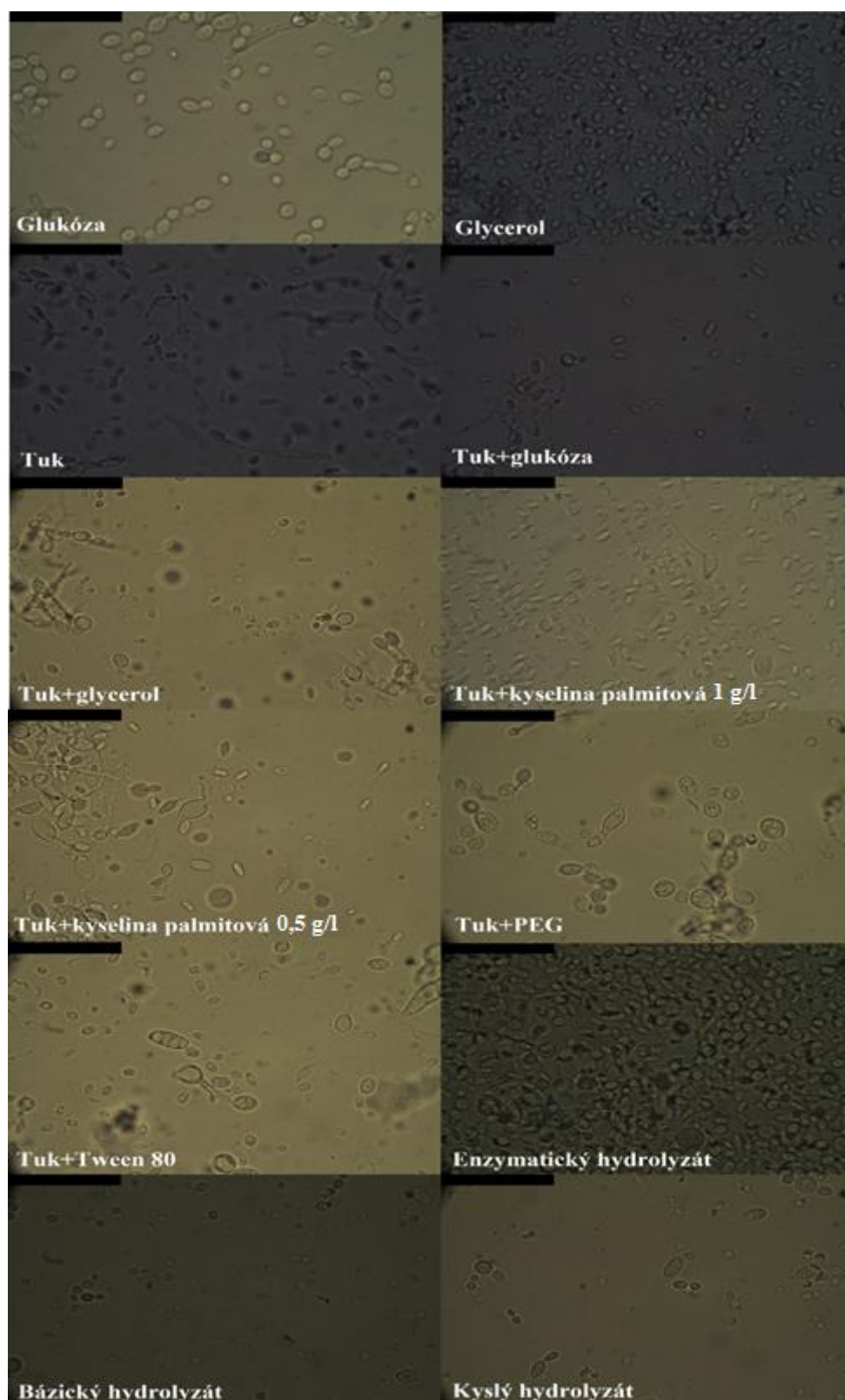
9.1 Mikroskopický pohľad na kvasinky kultivované v produkčných médiách



Obrázok 22: Bunky kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* v produkčných médiách



Obrázok 23: Bunky kvasinky *Cystofilobasidium macerans* v produkčných médiách



Obrázok 24: Bunky kvasinky *Sporidiobolus salmonicolor* v produkčných médiách