



# 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

## BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKCE SOPHOROLIPIDŮ

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF SOPHOROLIPIDS

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Veronika Šimšová

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2019

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1317/2018 Akademický rok: 2018/19  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Veronika Šimšová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Biotechnologická produkce sophorolipidů

### Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na téma produkce a využití biosurfaktantů
2. Literární rešerše na téma charakterizace mikrobiálního producenta sophorolipidů *Starmerella bombicola* a příbuzných mikroorganismů
3. Experimentálně prostudovat vliv vybraných kultivačních parametrů na proces produkce sophorolipidů pomocí *S. bombicola*

### Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019:

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

-----  
Bc. Veronika Šimšová  
student(ka)

-----  
doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá mikrobiální produkcí sophorolipidů kvasinkami rodu *Starmerella*. Teoretická část obsahuje obecnou charakteristiku biosurfaktantů s podrobnějším zaměřením na sophorolipidy. Jsou zde popsány možnosti biotechnologické produkce těchto látek a také oblasti, ve kterých mohou být využity. Dále se teoretická část práce věnuje popisu kvasinky *Starmerella bombicola*, která je pro biotechnologickou produkci sophorolipidů často využívána.

Šest vybraných kmenů rodu *Starmerella* bylo kultivováno v základním médiu vhodném pro produkci sophorolipidů. Míra produkce sophorolipidů byla u všech kmenů testována pomocí stanovení emulgační aktivity, schopnosti solubilizace antracenu, měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring a stanovením koncentrace sophorolipidů pomocí extrakce ethylacetátem. Čistota vyextrahovaných sophorolipidů byla ověřena pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR).

Na základě dosažených výsledků byly podrobněji studovány kmeny *Starmerella bombicola* CBS 6009 a *Starmerella anomalae* CBS 14178. Tyto kmeny byly kultivovány v několika produkčních médiích o různém složení a byl sledován vliv jednotlivých složek produkčního média na schopnost mikroorganismu produkovat sophorolipidy.

Na základě dosažených výsledků bylo vyhodnoceno, že složení média má velký vliv na produkční schopnosti použitých kmenů. Nejvyšší míry produkce sophorolipidů bylo dosaženo v základním produkčním médiu a také v médiu obsahujícím melasu a indický odpadní olej. Vliv na produkci sophorolipidů má také režim kultivace. Bylo totiž zjištěno, že při kultivaci v bioreaktoru kmeny produkují sophorolipidy ve větším množství a jiné kvalitě než při kultivaci v Erlenmeyerových baňkách.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Biosurfaktanty, sophorolipidy, *Starmerella* sp., *Starmerella bombicola*

## **ABSTRACT**

This diploma thesis deals with the microbial production of sophorolipids by the *Starmerella* genus yeasts. The theoretical part of the thesis includes general characteristics of biosurfactants with the focus on sophorolipids. There are described the options of biotechnological production of sophorolipids and fields of their possible applications. Furthermore, the theoretical part deals with the description of *Starmerella bombicola* yeast, which is often used for biotechnological production of sophorolipids.

Six strains of the *Starmerella* genus were cultured in the basic medium suitable for sophorolipid production. The amount of produced sophorolipids was tested by the emulsification capacity assay, solubilization of crystalline anthracene assay, measuring the surface tension by the Du-Noüy-Ring method and determination of the sophorolipid concentration by extraction with ethyl acetate. The purity of the extracted sophorolipids was inspected by the Fourier Transform infrared spectroscopy (FT-IR)

Based on the results, the *Starmerella bombicola* CBS 6009 and the *Starmerella anomalae* CBS 14178 strains were studied in greater detail. They were cultured in several production media of different composition and the effect of the individual components on the ability of the sophorolipid production was monitored.

Based on the results, it was evaluated that the composition of the medium has a great influence on the production ability of the strains. The highest production rate of sophorolipids was achieved in the basic production medium and so was in the medium containing molasses and Indian waste oil. The cultivation mode has great effect on the sophorolipid production rate. It has been found that when cultured in a bioreactor, the strains produced sophorolipids in a larger amount and of a different quality than in the shaker flasks.

## **KEYWORDS**

Biosurfactants, sophorolipids, *Starmerella* sp., *Starmerella bombicola*

ŠIMŠOVÁ, Veronika. *Biotechnologická produkce sophorolipidů*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113541>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za vstřícný přístup a poskytnutí cenných rad v průběhu řešení této diplomové práce. Poděkování patří také Ing. Ivě Pernicové a Ing. Olze Kratochvílové za poskytnuté konzultace a pomoc při provádění laboratorních experimentů. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým blízkým za jejich podporu poskytovanou po celou dobu studia.

## OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1	Biosurfaktanty .....	10
2.1.1	Fyziologická role.....	11
2.1.2	Chemická struktura .....	11
2.1.3	Klasifikace biosurfaktantů.....	12
2.1.3.1	Lipopeptidy a lipoproteiny.....	12
2.1.3.2	Mastné kyseliny, fosfolipidy a neutrální lipidy .....	12
2.1.3.3	Polymerní biosurfaktanty.....	13
2.1.3.4	Částicové biosurfaktanty.....	13
2.1.3.5	Glykolipidy .....	13
2.1.4	Biotechnologická produkce sophorolipidů.....	15
2.1.5	Biosyntéza sophorolipidů.....	15
2.1.5.1	Faktory ovlivňující produkci sophorolipidů .....	17
2.1.5.2	Produkce s využitím odpadních surovin .....	18
2.1.5.3	Izolace sophorolipidů.....	18
2.1.6	Vlastnosti a využití sophorolipidů.....	19
2.1.6.1	Potravinářství .....	20
2.1.6.2	Kosmetika .....	20
2.1.6.3	Medicína .....	20
2.1.6.4	Zemědělství.....	21
2.1.6.5	Bioremediace .....	21
2.2	Charakterizace kvasinky <i>Starmerella bombicola</i> .....	22
2.2.1	Taxonomické zařazení.....	23
2.2.2	Podmínky kultivace.....	23
2.2.3	Produkční potenciál.....	24
2.2.4	Příbuzné mikroorganismy .....	24
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	25
3.1	Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje .....	25
3.1.1	Mikroorganismy .....	25
3.1.2	Chemikálie .....	25
3.1.3	Přístroje .....	26

3.2	Příprava odpadních substrátů.....	26
3.2.1	Hydrolýza kávové sedliny .....	26
3.2.2	Hydrolýza syrovátky .....	27
3.2.3	Stanovení redukujících sacharidů pomocí kyseliny 3,5-dinitrosalicylové.....	27
3.3	Kultivace.....	27
3.3.1	Oživení lyofilizovaných kultur.....	27
3.3.2	Příprava inokulačních médií.....	28
3.3.3	Složení inokulačních médií .....	28
3.3.4	Příprava produkčních médií .....	28
3.3.5	Složení produkčních médií.....	28
3.3.6	Kultivace v bioreaktoru.....	30
3.4	Test růstu na různých uhlíkových zdrojích.....	30
3.5	Stanovení obsahu biomasy .....	30
3.5.1	Gravimetrické stanovení obsahu biomasy.....	31
3.5.2	Spektrofotometrické stanovení optické hustoty .....	31
3.6	Stanovení emulgační aktivity .....	31
3.7	Solubilizace krystalického antracenu .....	31
3.8	Měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring.....	32
3.9	Extrakce sophorolipidů.....	32
3.10	Infračervená spektroskopie.....	33
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	34
4.1	Optimalizace extrakce sophorolipidů .....	34
4.2	Screening produkčních schopností jednotlivých kmenů .....	35
4.2.1	Stanovení emulgační aktivity .....	35
4.2.2	Solubilizace krystalického antracenu .....	37
4.2.3	Měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring.....	37
4.2.4	Extrakce sophorolipidů ethylacetátem .....	38
4.2.5	Vyhodnocení infračervené spektroskopie .....	39
4.3	Kultivace vybraných kmenů v různých substrátech .....	41
4.3.1	Schopnost utilizace různých zdrojů uhlíku .....	41
4.3.2	Kultivace za použití různých hydrofilních zdrojů uhlíku.....	42
4.3.2.1	Stanovení obsahu biomasy.....	42
4.3.2.2	Stanovení emulgační aktivity.....	42

4.3.2.3	Solubilizace krystalického antracenu.....	43
4.3.2.4	Měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring .....	43
4.3.3	Kultivace za použití různých hydrofobních zdrojů uhlíku.....	44
4.3.3.1	Stanovení obsahu biomasy.....	44
4.3.3.2	Stanovení emulgační aktivity.....	45
4.3.3.3	Solubilizace krystalického antracenu.....	45
4.3.3.4	Měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring .....	46
4.3.4	Kultivace vybraných kmenů na odpadních substrátech .....	47
4.3.4.1	Koncentrace sacharidů v odpadních substrátech .....	48
4.3.4.2	Stanovení obsahu biomasy.....	48
4.3.4.3	Stanovení emulgační aktivity.....	49
4.3.4.4	Solubilizace krystalického antracenu.....	50
4.3.4.5	Měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring .....	50
4.4	Kultivace vybraných kmenů v bioreaktoru .....	52
4.4.1	Stanovení koncentrace sophorolipidů extrakcí ethylacetátem .....	52
4.4.2	Stanovení emulgační aktivity .....	53
4.4.3	Solubilizace krystalického antracenu .....	53
4.4.4	Měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring.....	54
5	ZÁVĚR.....	55
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	57
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	66
8	PŘÍLOHY .....	67



# 1 ÚVOD

Surfaktanty jsou dlouhodobě a ve velkém množství využívány v potravinářském, zemědělském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Většina surfaktantů je v současné době vyráběna chemickou cestou z ropy. S tím je spojena toxicita, špatná biodegradabilita, akumulace surfaktantů v prostředí a tím způsobené ekologické problémy. Z těchto důvodů je velká pozornost věnována alternativnímu způsobu produkce surfaktantů pomocí mikroorganismů.

Biosurfaktanty představují velmi dobrou alternativu k surfaktantům vyrobeným chemickou cestou. Jejich hlavní výhodou je dobrá biodegradabilita, nízká toxicita a možnost produkce s využitím odpadních materiálů. Produkce biosurfaktantů je považována za jednu z klíčových technologií pro vývoj průmyslu ve 21. století. Jedním z významných druhů biosurfaktantů jsou sophorolipidy. Jedná se o látky, které mají povrchovou aktivitu srovnatelnou se syntetickými surfaktanty a navíc jsou stabilní v širším rozpětí teplot, pH nebo při vyšší koncentraci soli. Jsou produkovány nepatogenními druhy kvasinek, jako je například *Starmerella bombicola* nebo *Yarrowia lipolytica*.

*Starmerella bombicola* má velký potenciál pro použití při velkoobjemové produkci sophorolipidů. Produkuje sophorolipidy ve velkém množství a je schopna růst na mnoha odpadních substrátech. Disponuje statusem GRAS a její produkty je tedy možné využít nejen v zemědělství, ale i v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu.

Cílem této diplomové práce byl průzkum schopností produkce sophorolipidů šesti vybraných kmenů rodu *Starmerella* a dále průzkum vlivu složení média na míru produkce sophorolipidů vybranými kmeny.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Biosurfaktanty

Surfaktanty jsou povrchově aktivní látky schopné snižovat mezifázové napětí mezi kapalnými, plynnými a pevnými fázemi a tím napomáhají jejich vzájemnému mísení [1]. Mimo jiné mají široké využití při výrobě detergentů, textilií a také v potravinářském, farmaceutickém, či kosmetickém průmyslu. Zasahují do každodenního života lidí a jsou jednou z nejdůležitějších tříd chemických látek. Celosvětová produkce surfaktantů přesahuje 13 milionů tun ročně [2]. Většina produkce surfaktantů je vyrobena chemickou cestou z ropy, avšak takto získané látky jsou obvykle toxické a těžko rozložitelné [3].

Mikrobiálně produkované surfaktanty (biosurfaktanty) mají i přes vzájemné strukturální odlišnosti mnoho společných vlastností, které jim poskytují výhodu oproti surfaktantům syntetickým. Patří mezi ně:

- Povrchová a mezifázová aktivita: biosurfaktanty poskytují nižší povrchové napětí při nižších koncentracích, čímž prokazují větší efektivitu. CMC (Critical Micelle Concentration) biosurfaktantů se pohybuje v rozmezí 1–2000 mg · l<sup>-1</sup> a mezifázové napětí olej-voda je 1–30 mN · m<sup>-1</sup>.
- Tolerance vůči teplotě, pH a iontové síle: mnoho biosurfaktantů je možné použít při extrémních podmínkách. Některé jsou stabilní i při teplotě 75 °C po dobu 140 hodin, v rozmezí pH 5–12 nebo při koncentraci soli až 10 %, zatímco syntetické surfaktanty přestávají být aktivní už při 2% koncentraci soli.
- Biodegradabilita: biosurfaktanty jsou snadno rozložitelné bakteriemi a dalšími mikroorganismy vyskytujícími se ve vodě nebo v půdě.
- Nízká toxicita: umožňuje použití biosurfaktantů v potravinářských, kosmetických a farmaceutických výrobcích. Do popředí se biosurfaktanty dostávají také z důvodu rostoucích obav spotřebitelů ohledně alergenního potenciálu umělých sloučenin.
- Dostupnost: biosurfaktanty mohou být produkovány z běžně dostupných materiálů nebo z průmyslových odpadů.
- Specifita: jakožto komplexní organické molekuly se specifickými funkčními skupinami mají biosurfaktanty specifické funkce, např. detoxifikace určitého polutantu.
- Biokompatibilita: tato vlastnost dovoluje využití biosurfaktantů v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu [4].

Kromě řady výhod je třeba zmínit i nevýhody biosurfaktantů oproti syntetickým surfaktantům:

- Velkokapacitní produkce biosurfaktantů je finančně velmi náročná. Avšak tento problém lze eliminovat využitím nízkonákladových odpadních substrátů.
- Získávání produktů s vysokou čistotou je obtížné. Je nezbytné použít několik po sobě jdoucích purifikačních kroků pro extrakci čistého produktu z média.
- Druhy mikroorganismů produkující velká množství biosurfaktantů jsou vzácné. Známé druhy vyžadují komplexní růstová média a výtěžnost není velká.
- Regulace syntézy biosurfaktantů dosud nebyla plně popsána. Jedná se pravděpodobně o sekundární metabolity, jejichž produkce je spjata se stresem způsobeným vyčerpáním některého ze zdrojů živin.

- Navýšení produktivity bývá často doprovázeno vznikem pěny. Z toho důvodu musí být použito zředěné médium a pouze imobilizované systémy poskytují větší produktivitu biosurfaktantů [5].

Biosurfaktanty mohou být produkovány bakteriemi (např. *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*), kvasinkami (např. *Starmerella bombicola*, *Yarrowia lipolytica*) i některými plísněmi (např. *Penicillium spiculisporum*, *Talaromyces trachyspermum*). Pro použití v potravinářském či farmaceutickém průmyslu jsou však biosurfaktanty bakteriálního původu většinou nevhodné z důvodu potenciální patogenity produkujících kmenů. Z tohoto hlediska je výhodnější využívat biosurfaktanty produkované kvasinkami disponujícími statutem GRAS (Generally Recognized As Safe), které nepředstavují toxikologické ani zdravotní riziko [3].

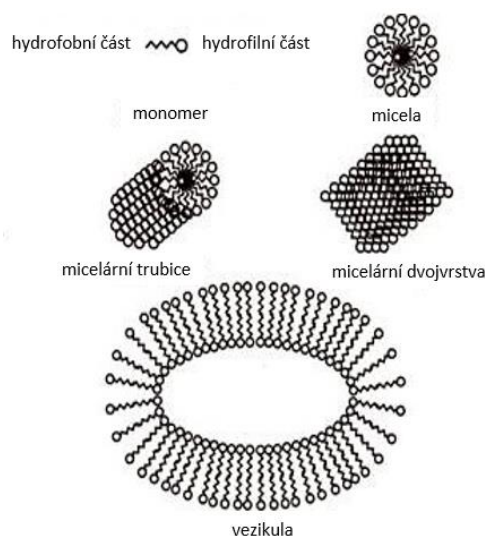
### 2.1.1 Fyziologická role

Mikroorganismy produkují biosurfaktanty extracelulárně nebo intracelulárně při růstu na substrátu nemísitelném s vodou. Hlavní fyziologická role biosurfaktantů je snížení mezifázového napětí a tím zlepšení přístupu k substrátu a jeho využitelnosti. Další rolí biosurfaktantů je jejich antimikrobiální aktivita vůči různým mikroorganismům. Obecně platí, že různé surfaktanty inhibují různé druhy mikroorganismů. Bylo také zjištěno, že se biosurfaktanty podílejí na adhezenci buněk a tím poskytují lepší stabilitu v nepříznivých podmínkách nebo při desorpci buněk, když organismus potřebuje najít nové prostředí pro přežití [6].

### 2.1.2 Chemická struktura

Biosurfaktanty jsou amfifilní molekuly obsahující jak hydrofilní část (sacharidy, peptidy, proteiny apod.), tak hydrofobní část (mastné kyseliny). Díky tomu napomáhají tvorbě emulzí mezi nemísitelnými kapalinami jako jsou uhlovodíky a voda [3].

Hydrofilní a hydrofobní části se také mohou uspořádat na mezifázovém rozhraní mezi tekutinami s různou mírou polaritou a vodíkovými vazbami jako je rozhraní olej-voda nebo vzduch-voda. To umožňuje biosurfaktantům vytvořit micely, micelární trubice, micelární dvojvrstvy nebo vezikuly (Obrázek 1) [7].



Obrázek 1: Typy uskupení monomerů surfaktantů [8]

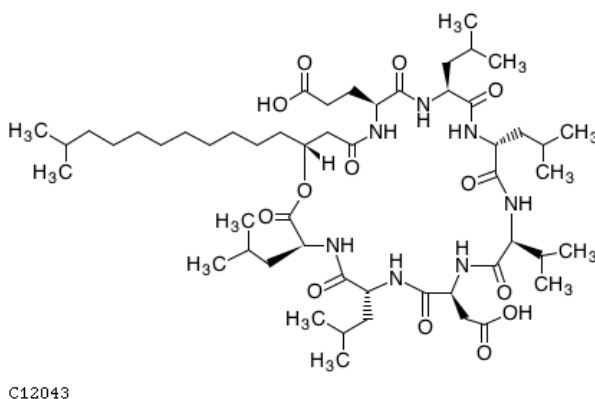
### 2.1.3 Klasifikace biosurfaktantů

Chemicky syntetizované surfaktanty jsou většinou řazeny podle jejich polariry. Biosurfaktanty jsou však klasifikovány podle jejich mikrobiálního původu (bakteriální, kvasinkové, plísňové), velikosti molekul (nízkomolekulární, makromolekulární) nebo chemické kompozice (glykolipidy, lipopeptidy, lipoproteiny, mastné kyseliny, neutrální lipidy, fosfolipidy a polymerní biosurfaktanty) [9, 10].

#### 2.1.3.1 Lipopeptidy a lipoproteiny

Lipopeptidy jsou složeny z lipidu a polypeptidového řetězce. Patří mezi ně řada látek, které nejen že vykazují výbornou povrchovou aktivitu, ale mají také silný antibiotický účinek (např. surfaktin, gramicidin, polymixin nebo daptomycin) [11].

Surfaktin (Obrázek 2) patří do skupiny cyklických lipopeptidů. Je složen ze sedmičlenného cyklu aminokyselin a mastné kyseliny spojených laktonovou vazbou. Významnými producenty surfaktinu jsou bakterie rodu *Bacillus* [12].

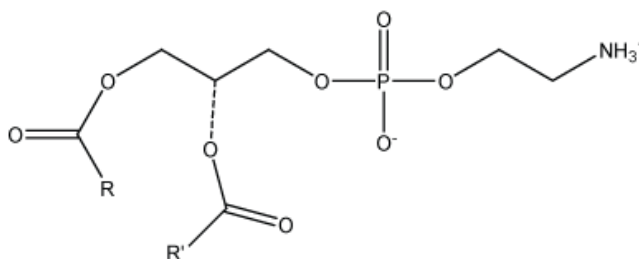


Obrázek 2: Chemická struktura surfaktinu [13]

#### 2.1.3.2 Mastné kyseliny, fosfolipidy a neutrální lipidy

Při růstu na *n*-alkanech některé druhy bakterií a kvasinek produkují velké množství mastných kyselin a fosfolipidů. Hydrofilní a lipofilní rovnováha je přímo úměrná délce uhlovodíkových řetězců v jejich strukturách [14].

Fosfatidylethanolamin (Obrázek 3) produkovaný rodem *Acinetobacter* ve formě vezikul umožňuje tvorbu opticky čistých mikroemulzí alkanů a vody [14]. Fosfatidylethanolamin produkovaný druhem *Rhodococcus erythropolis* výrazně snižuje mezifázové napětí, například mezi vodou a hexadekanem na méně než 1 mN/m (mezifázové napětí hexadekan-voda bez použití surfaktantu je 53,5 mN/m) [15, 16].



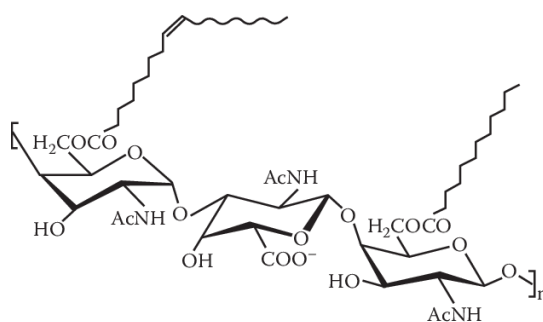
Obrázek 3: Chemická struktura fosfatidylethanolaminu [17]

### 2.1.3.3 Polymerní biosurfaktanty

Jedná se o biosurfaktanty s vysokou molekulovou hmotností. Skelet většiny polymerních biosurfaktantů je tvořen třemi nebo čtyřmi opakujícími se cukernými jednotkami a k nim připojenými mastnými kyselinami [18]. Mezi nejlépe prostudované látky z této kategorie patří emulsan a liposan [19].

Liposan je extracelulární ve vodě rozpustný emulgátor syntetizovaný kvasinkou *Candida lipolytica* a je složen z 83 % sacharidy a z 17 % proteiny. Napomáhá tvořit stabilní emulze typu olej ve vodě, povrchové napětí vody však výrazně nesnižuje [20].

Emulsan (Obrázek 4) je komplexní extracelulární acylovaný polysacharid syntetizovaný gramnegativní bakterií *Acinetobacter calcoaceticus*. I při velmi nízké koncentraci (0,001–0,01 %) se jedná se o velmi účinný emulgátor pro uhlovodíky ve vodě. Velmi dobře také odolává inverzi při poměru voda-olej až 1:4 [19].



Obrázek 4: Chemická struktura emulsanu [21]

### 2.1.3.4 Částicové biosurfaktanty

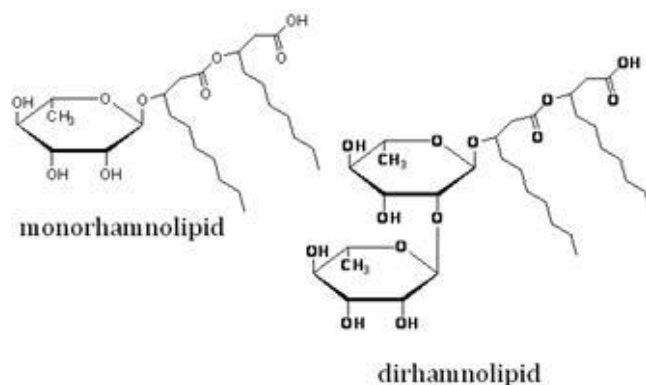
Existují dva typy částicových biosurfaktantů: extracelulární vezikuly a celé mikrobiální buňky. Extracelulární membránové vezikuly umožňují tvorbu mikroemulzí, což hraje důležitou roli při využití uhlovodíkových sloučenin mikroorganismy. Vezikuly bývají složeny z proteinů, fosfolipidů a lipopolysacharidů. Jsou produkovány např. bakteriemi rodu *Acinetobacter* nebo *Pseudomonas* [22].

V některých případech mají mikrobiální buňky silnou afinitu k rozhraní uhlovodík-voda a vzduch-voda. Většinou se jedná o mikroorganismy degradující uhlovodíkové řetězce, některé druhy rodu *Cyanobacteria* nebo patogenní mikroorganismy. V takových případech působí jako biosurfaktant celá buňka [23].

### 2.1.3.5 Glykolipidy

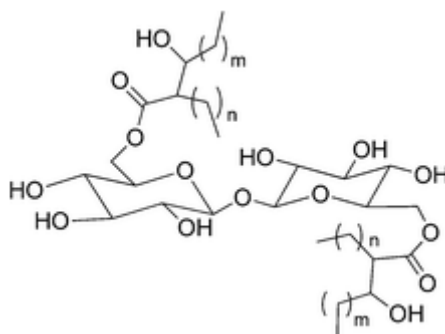
Většina biosurfaktantů, které známe, jsou glykolipidy. Skládají se z cukru a dlouhého řetězce alifatické kyseliny nebo hydroxykyseliny spojených etherovou nebo esterovou vazbou. Mezi nejznámější glykolipidy patří rhamnolipidy, trehalolipidy a sophorolipidy [24].

Rhamnolipidy (Obrázek 5) jsou nejlépe prostudované glykolipidy. Jejich strukturu tvoří jedna nebo dvě molekuly rhamnosy, která je připojena k jedné nebo dvěma molekulám kyseliny  $\beta$ -hydroxydekanové. Zatímco -OH skupina jedné kyseliny je zapojena do glykosidické vazby s redukujícím koncem disacharidu rhamnosy, -OH skupina druhé kyseliny je zapojena do esterové vazby. Rhamnolipidy jsou produkovány např. druhem *Pseudomonas aeruginosa* [23].



Obrázek 5: Chemická struktura rhamnolipidů [25]

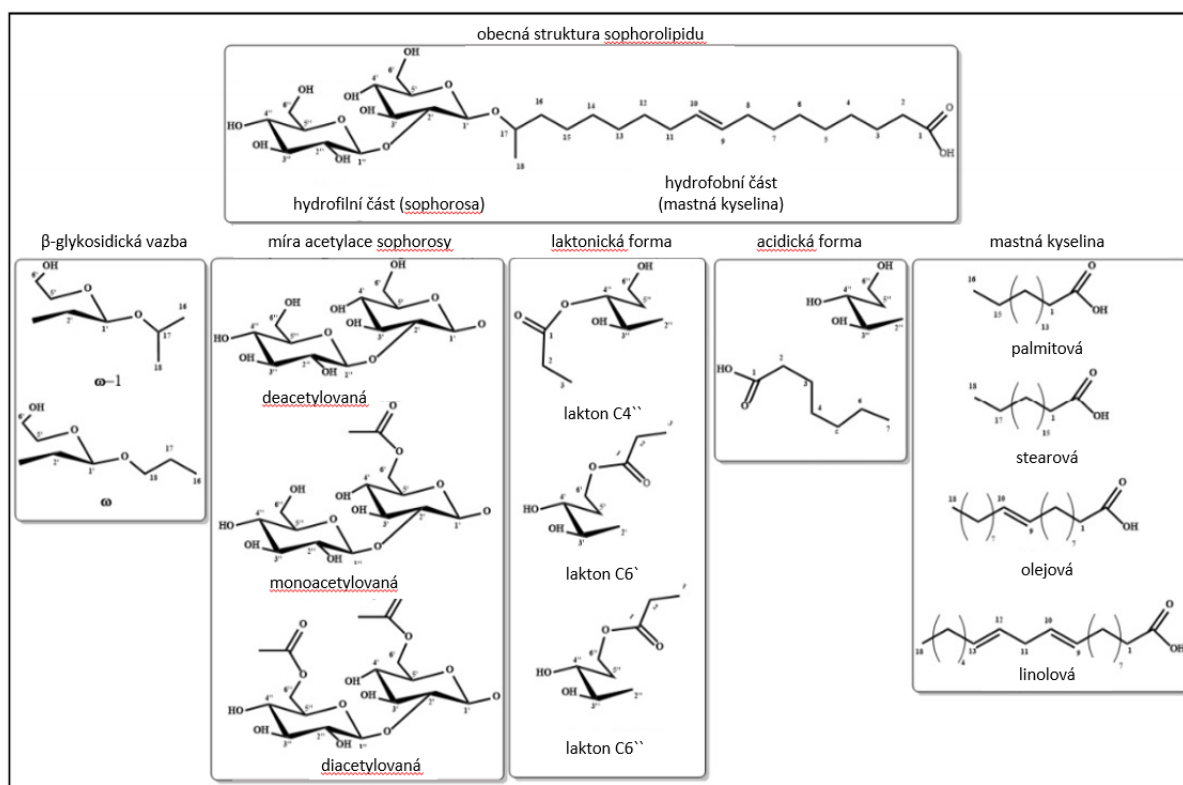
Trehalolipidy (Obrázek 6) obsahují disacharid trehalosu napojenou uhlíkem C-6 a C-6' na kyselinu mykolovou. Jsou spojeny s rody *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, a *Nocardia*. Trehalolipidy s různým původem se liší ve velikosti a struktuře kyseliny mykolové (počet uhlíků a stupeň nasycení) [24].



Obrázek 6: Obecná chemická struktura trehalolipidů [26]

Sophorolipidy jsou extracelulární glykolipidy produkované kvasinkami [21]. Skládají se z disacharidu sophorosy (2'-O- $\beta$ -D-glukopyranosyl- $\beta$ -D-glukopyranosa), která je spojena glykosidickou vazbou s dlouhým řetězcem mastné kyseliny. Jsou produkovány ve formě směsi strukturně podobných molekul, která může obsahovat až 40 různých isomerů [27]. Velké množství různých struktur (viz Obrázek 7) je dáno následujícími možnostmi kombinací:

- a)  $\beta$ -glykosidická vazba vzniká spojením anomerického uhlíku sophorosy (C1') a koncového ( $\omega$ ) nebo téměř koncového ( $\omega$ -1) hydroxylovaného uhlíku mastné kyseliny [28, 29].
- b) Acetylace hydroxylové skupiny cukerné části: C6' a C6'' uhlíky sophorosy mohou být deacetylované, monoacetylované nebo diacetylované [28, 30].
- c) Přítomnost laktonických a acidických forem:
  - laktonická forma – karboxylová skupina mastné kyseliny je esterifikována na sophorosu na uhlíku C4'', C6' nebo C6'' (nejčastější je esterifikace na C4'')
  - acidická forma – karboxylová skupina mastné kyseliny není esterifikována [28]
- d) Řetězce mastných kyselin se mohou velikostně lišit (většinou C16 až C18) a mít různou míru nasycenosti (nasycené, mononenasycené nebo polynenasycené) [31].
- e) Přítomnost stereoizomerů a polymerních forem sophorolipidů (dimery nebo trimery) [32, 33].



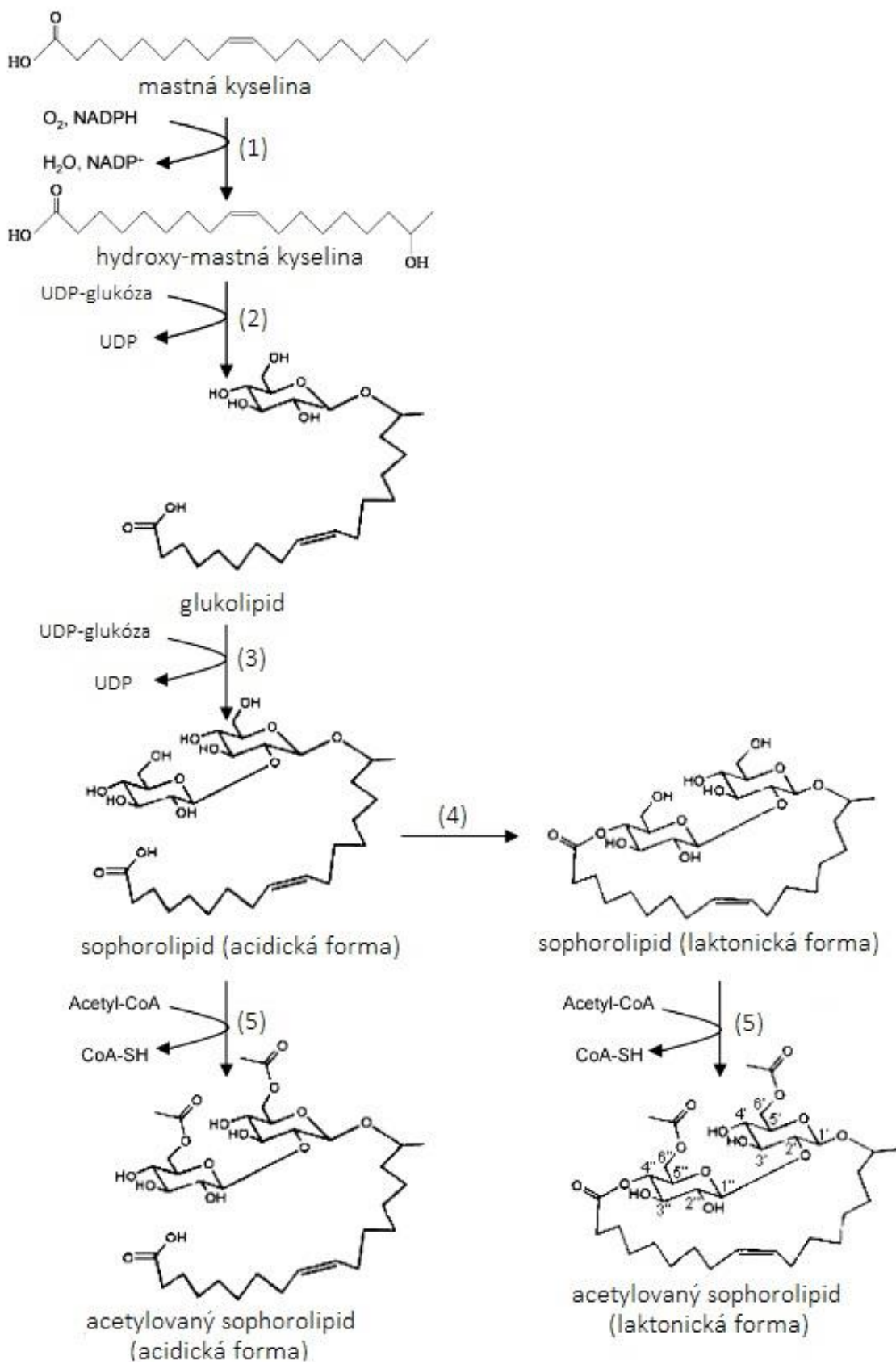
Obrázek 7: Strukturální variace sophorolipidů [34]

## 2.1.4 Biotechnologická produkce sophorolipidů

Sophorolipidy jsou produkovány mnoha mikroorganismy, např. *Starmerella bombicola*, *Candida apicola* a dalšími druhy rodu *Candida*, *Rhodotorula bogoriensis*, *Pichia anomala*, *Wickerhamiella domercqiae* nebo rodem *Cryptococcus sp.* Nejvíce prozkoumaným druhem z výše uvedených je kvasinka *Starmerella bombicola*, která poskytuje největší výtěžnost sophorolipidů. *Starmerella bombicola* je fylogeneticky velmi vzdálena patogenním kvasinkám, jako je *Candida albicans*, je zařazena mezi technologicky příznivé mikroorganismy a disponuje statusem GRAS [34].

## 2.1.5 Biosyntéza sophorolipidů

Základními kameny běžné syntézy sophorolipidů je glukóza a mastná kyselina. V ideálním případě jsou již obě složky přítomny v produkčním médiu. Místo mastných kyselin mohou být použity jejich methyl- nebo ethyl-estery, případně triglyceridy. V tom případě je postupné uvolňování mastných kyselin zajištěno esterasami. Mikroorganismy produkující sophorolipidy mohou růst také na alkanech. Disponují enzymy potřebnými pro terminální oxidaci alkanů a mohou tak vytvářet mastné kyseliny. Pokud hydrofobní substrát není v médiu přítomen, mastné kyseliny mohou být syntetizovány *de novo* z acetyl-CoA. Biochemickou cestu syntézy sophorolipidů schématicky znázorňuje obrázek 8 [35].



Obrázek 8: Biosyntéza sophorolipidů; (1) cytochrom P450 monooxygenasa; (2) glukosyltransferasa I; (3) glukosyltransferasa II; (4) laktonesterasa; (5) acetyltransferasa [35]



Příčiny produkce sophorolipidů dosud nejsou zcela objasněny. Jednou z nich je pravděpodobně fyziologická role popsaná v kapitole 2.1.1. Avšak důvod produkce může být také zcela odlišný zejména proto, že mikroorganismy tyto látky produkují v množství značně přesahujícím koncentraci potřebnou pro emulgaci a také v případech, kdy není přítomen žádný hydrofobní substrát. Syntéza sophorolipidů je spojena s deficitem dusíku a je možné, že produkce glykolipidů je druh metabolismu určený pro produkci extracelulárních zásob živin [36]. Bylo dokázáno, že sophorolipidy mohou být využity jako zdroj uhlíku [37]. Jelikož se mikroorganismy, které je produkují, přirozeně vyskytují v prostředí s velkým osmotickým tlakem, produkce sophorolipidů může být způsob, jakým se vyrovnávají s vysokou koncentrací cukru, prostřednictvím jejich přeměny, uložení a ztížení dostupnosti pro jiné organismy. Sophorolipidy také vykazují antimikrobiální aktivitu vůči určitým kvasinkám (*Candida*, *Pichia*) a gram-pozitivním bakteriím. Největší inhibiční účinek mají mono a diacetylované laktonové formy sophorolipidů [35].

### **2.1.5.1 Faktory ovlivňující produkci sophorolipidů**

Optimální teplota pro růst nejčastěji využívané kvasinky *Starmerella bombicola* je 28,8 °C. Pro tvorbu sophorolipidů je optimální teplota 21 °C, avšak kvůli snazší manipulaci při odebrání vzorků nebo přidávání oleje je většina fermentací vedena při teplotě 25–30 °C. Při těchto teplotách je výtěžek sophorolipidů téměř identický, avšak při 25 °C je nárůst biomasy nižší a spotřeba glukózy vyšší než při 30 °C [37, 38].

Během exponenciální fáze růstu rapidně klesá pH a pro optimální produkci sophorolipidů musí být udržováno na hodnotě 3,5 pomocí přídavku NaOH. Nízké pH a přirozené antimikrobiální účinky sophorolipidů chrání kulturu před kontaminací i při fed-batch kultivaci trvající více než 200 hodin. Syntéza sophorolipidů začíná ve stacionární fázi růstu při limitaci dusíku nebo fosfátu [38, 39].

Velmi důležité je zajištění přístupu kyslíku během celé kultivace. Kvasinky jsou citlivé na snížení koncentrace kyslíku během exponenciální fáze a dobrá aerace je nezbytná také pro produkci sophorolipidů. Optimální rychlost přenosu kyslíku pro vysoké výtěžky sophorolipidů je 50–80 mM · l · h<sup>-1</sup> [40].

Sophorolipidy jsou produkovány, pokud je v médiu přítomen alespoň jeden zdroj uhlíku, např. glukóza nebo *n*-alkany. Mnohem větší výtěžnosti je však dosaženo, pokud médium obsahuje dva typy zdroje uhlíku – hydrofilní a hydrofobní. Jako hydrofilní zdroj je často využívána glukóza. Je možné použít i sacharózu, avšak výtěžnost sophorolipidů je pak nižší. Jako hydrofobní zdroj je možno použít mnoho substrátů – oleje, mastné kyseliny a jejich estery nebo alkany [35].

K syntéze sophorolipidů dochází poté, co je dosaženo stacionární fáze, a je pravděpodobně spuštěna nedostatkem dusíku v médiu. Při výrobním procesu je třeba udržovat vysoký poměr C/N, jelikož, jak je zmíněno v kapitole 2.1.5, sophorolipidy pravděpodobně slouží pro extracelulární uložení živin. Pokud by došlo k limitaci kultury koncentrací uhlíku, začaly by mikroorganismy vyprodukované sophorolipidy metabolizovat [2].

Složení produkované směsi sophorolipidů a poměr obsahu acidické a laktonické formy ovlivňuje mnoho faktorů: produkující kmen, složení média (zdroje uhlíku, dusíku a solí),

kultivační podmínky (teplota, pH, aerace a rychlost míchání) a typ kultivace (batch, fed-batch nebo kontinuální) [34].

### 2.1.5.2 *Produkce s využitím odpadních surovin*

Pro snížení nákladů produkce sophorolipidů mohou být použity jako zdroje uhlíku různé odpadní materiály. Hydrofobním zdrojem uhlíku může být odpadní fritovací olej, zbytky průmyslově využívaných mastných kyselin, tmavý sójový olej nebo vedlejší produkty z výroby bionafty. Sophorolipidy byly úspěšně produkovány také při použití média s použitím surové ropy, což může být využito pro vyčištění reziduí ropy z vytěžených ropných polí [2, 41].

Jako hydrofilní zdroj uhlíku může sloužit např. řepná, třtinová nebo sójová melasa. Melasa obsahuje především sacharózu a další sacharidy, ne všechny však mohou mikroorganismy využít. Dále melasa obsahuje proteiny a další dusíkaté látky a minerály které mohou nahradit nákladný kvasničný extrakt a další zdroje dusíku v médiu [42, 43]. Dále je možné jako hydrofilní zdroj uhlíku použít glycerol, který je odpadním produktem při výrobě bionafty [44]. Zajímavým hydrofilním zdrojem uhlíku může být deproteinizovaný koncentrát syrovátky. V provedených experimentech bylo zjištěno, že i když laktóza přítomná v koncentrátu nebyla využívána a nebyla pozorována aktivita  $\beta$ -galaktosidázy, bylo dosaženo velké výtěžnosti sophorolipidů. Ještě lepších výsledků bylo dosaženo dvoufázovou kultivací, kdy jako první byl použit oleogenní druh kvasinky *Cryptococcus curvatus* rostoucí na syrovátce. Buňky byly po kultivaci sklizeny a rozrušeny a byly použity jako hydrofobní zdroj uhlíku pro kulturu *Starmerella bombicola* [45, 46].

Ve většině experimentů využívajících odpadní substráty bylo dosaženo produkce sophorolipidů, avšak často s menší výtěžností než při použití tradičních zdrojů uhlíku. Je tedy nutno vždy pro konkrétní případ vyhodnotit, zda je kultivace s použitím odpadních substrátů skutečně výhodnější [2].

### 2.1.5.3 *Izolace sophorolipidů*

Biosurfaktanty mohou být z média izolovány konvenčními metodami jako je kyselé srážení, extrakce rozpouštědlem, krystalizace, srážení síranem amonným nebo centrifugace. V dnešní době jsou uváděny i jiné metody izolace, např. frakcionace pěny, ultrafiltrace, sorpce na polystyrenovou pryskyřici a iontoměničová chromatografie. Tyto metody využívají vlastností biosurfaktantů, jako je povrchová aktivita nebo schopnost tvořit micely nebo vezikuly, a jsou využitelné zejména pro velkoobjemovou kontinuální izolaci extracelulárních biosurfaktantů. Biosurfaktanty izolované těmito metodami navíc vykazují velkou čistotu [47].

V laboratorních podmínkách je separace sophorolipidů od média většinou prováděna extrakcí organickým rozpouštědlem, jako je např. ethylacetát. Spolu se sophorolipidy jsou však extrahovány i zbytky hydrofobních zdrojů uhlíku, což může působit potíže při následném využití sophorolipidů. Proto je často prováděna dodatečná extrakce zbytkových látek n-hexanem. Pro účely této extrakce je možno využít i n-pentan nebo směs ethylacetátu a isopropanolu v poměru 4:1 [47, 48].

Jelikož jsou sophorolipidy těžší než voda, je možné je z média oddělit centrifugací nebo i pouhou dekantací po zahřátí média. Tato metoda je výhodná při práci s velkými objemy a výtěžky sophorolipidů [48].

Pokud následné využití vyžaduje vysokou čistotu a určitou formu sophorolipidů, je možné pro izolaci použít chromatografickou purifikaci s použitím silikagelu nebo preparativní kolonu s reverzní fází [2]. Izolované sophorolipidy zobrazuje obrázek 9.



Obrázek 9: Izolované sophorolipidy; (a) krystaly sophorolipidů v produkčním médiu, 100x zvětšeno; (b) sedimentace sophorolipidů jakožto tmavé viskózní kapaliny [2]

### 2.1.6 Vlastnosti a využití sophorolipidů

Jako většina biosurfaktantů si sophorolipidy zachovávají svou povrchovou aktivitu i při vysokých koncentracích soli, a navíc jsou povrchově aktivní v širokém rozmezí teplot. Faktorem, který vlastnosti sophorolipidy velmi ovlivňuje, je pH. Při dlouhodobém uchování při pH vyšším než 7–7,5 může dojít k ireverzibilní hydrolýze acetylových skupin a esterových vazeb. Toho však může být také využito pro přeměnu směsi různých izoform sophorolipidů na jejich neacetylovanou acidickou formu. Při pH menším než 5 se sophorolipidy nerozpouští a jsou pouze rozptýleny. V rozmezí pH 5,6–5,8 se rozpustnost zlepšuje a při pH 6 jsou již plně rozpustné i ve velkých koncentracích. Dále jsou sophorolipidy výborně rozpustné v ethanolu, methanolu, ethylacetátu a dalších polárních rozpouštědlech [2, 49].

V závislosti na složení směsi jsou sophorolipidy schopny snížit povrchové napětí vody z  $72,8 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  na  $30\text{--}40 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  při hodnotách CMC  $11\text{--}250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Jedná se o surfaktanty s nízkou aktivitou tvorby pěny, mohou proto být využity pouze pro účely, které tvorbu pěny nevyžadují nebo ji přímo vylučují. Sophorolipidy jsou navíc dobrým smáčedlem, např. dokáží i při nízké koncentraci snížit kontaktní úhel vody na PVC z  $110^\circ$  na  $80^\circ$  [49, 50].

Jak je uvedeno výše, sophorolipidy jsou produkovány ve směsi strukturně podobných látek (acidická nebo laktonická forma). Poměr jednotlivých forem ve směsi závisí na několika faktorech, jako například produkující kmen, složení média nebo podmínky kultivace. Vlastnosti a využití sophorolipidů závisí na složení této směsi. Laktonické formy jsou více hydrofobní a vykazují lepší biocidní a protirakovinné účinky. Acidické formy mají naopak lepší pěnicí účinky, jsou lépe rozpustné ve vodě a využívají se spíše v potravinářství či kosmetice [34].

### 2.1.6.1 *Potravinářství*

Povrchově aktivní látky jsou v potravinářství využívány po staletí. Přírodní surfaktanty, které napomáhají tvorbě pěny, gelů a emulzí jsou např. lecitin z vaječného žloutku nebo mléčné proteiny. Používají se při výrobě dresinků, dezertů, margarínů apod. Přispívají také k lepším vlastnostem potravin, jako je textura, stabilita, reologické vlastnosti, vzhled a chuť. Konkrétně mohou být emulgační vlastnosti sophorolipidů využity ke zlepšení textury, viskozity, stability a objemu produktů živočišného původu i produktů vyrobených z rostlinných tuků, které jsou založeny na bázi emulze. Pečivo vyrobené z mouky s přídavkem sophorolipidů má lepší vzhled a trvanlivost [34, 51].

Kromě emulgačních vlastností lze sophorolipidy v potravinářství využít i pro jejich antimikrobiální aktivitu. Germicidy, které jsou využívány při čištění ovoce, zeleniny, přístrojů pro zpracování potravin, povrchů a nádob, obsahují směs surfaktantu (např. laurylsulfát sodný nebo právě sophorolipid) a organických kyselin (např. kyselina glykolová, mléčná, jablečná, citronová nebo vinná). Je dokázáno, že 1% koncentrace sophorolipidů v germicidní směsi je dostatečná pro 100% likvidaci mikrobiální kontaminace *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* nebo *Shigella dysenteriae* do 30 sekund po aplikaci germicidu. Germicidní přípravky obsahující sophorolipidy jsou účinné proti většině gram-negativních mikroorganismů ovlivňujících produkci a trvanlivost ovoce a zeleniny. Kontaminace potravin může být způsobena také tvorbou biofilmu gram-pozitivními i gram-negativními bakteriemi. Sophorolipidy jsou schopny tento biofilm narušit, případně jeho tvorbu inhibovat. Sophorolipidy také inhibují klíčení spor, šíření mycelia a proliferaci patogenních hub, jako je *Penicillium*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* apod., které jsou hlavní příčinou nemocí a kažení ovoce při jeho transportu a skladování [34, 52, 53].

### 2.1.6.2 *Kosmetika*

V kosmetice mohou být sophorolipidy využity v produktech ošetřujících pokožku. Bývají použity jako emulgátory, pěnicí činidla, solubilizátory, smáčedla a čisticí prostředky [54]. Kromě vlastností nezbytných pro použití v kosmetice vykazují sophorolipidy nízkou cytotoxicitu vůči lidským keratinocytům a fibroblastům [55, 56]. Navíc podporují metabolismus fibroblastů a neosyntézu kolagenu ve škáře, čímž napomáhají obnově kůže. Sophorolipidy také inhibují aktivitu elastázy a tím i vznik volných radikálů a tvorbu vrásek. Mohou působit jako aktivátor makrofágů, fibrinolytické činidlo, deskvamační činidlo a depigmentační činidlo. Díky jejich baktericidní aktivitě mohou být využity při léčbě akné, ošetření vlasů s lupy a jako aktivní složka deodorantů [34].

### 2.1.6.3 *Medicína*

Velký potenciál má také využití sophorolipidů v medicíně. Sophorolipidy mají obecně antimikrobiální, antivirové a protirakovinné účinky. Tyto účinky mají pravděpodobně díky schopnosti destabilizovat buněčné membrány, ovlivnit propustnost membrány a změnit povrch buňky tak, že to vede k její lýzi [57, 58, 59].

Antimikrobiální aktivita sophorolipidů závisí na jejich chemické struktuře a také na struktuře membrány konkrétního mikroorganismu. Například diacetylovaná a monoacetylovaná laktonická forma sophorolipidů je účinnější při inhibici gram-pozitivních bakterií než

deacetylovaná laktonická nebo monoacetylovaná acidická forma [60]. Sophorolipidy produkované kvasinkou *Starmerella bombicola* v médiu obsahujícím lauryl-myristyl alkohol vykazují antimikrobiální aktivitu proti gram-negativním i gram-pozitivním bakteriím a kvasinkám. Sophorolipidy a jejich strukturní analogy vykazují také spermicidní aktivitu a jsou účinné proti viru HIV nebo HSV [34, 61].

Kromě vlastní antimikrobiální aktivity mohou sophorolipidy působit synergicky s antibiotiky, např. zlepšují účinnost tetracyklinu nebo cefacloru [57].

Sophorolipidy jsou potenciálně využitelné také při léčbě některých typů rakoviny. Například *Wickerhamiella domercqiae* produkuje sophorolipidy, které mají cytotoxický účinek na rakovinné buňky jater nebo jícnu. Cytotoxicita sophorolipidů je specifická vůči maligním buňkám, což minimalizuje obvykle se vyskytující vedlejší účinky léčby rakoviny [62].

Díky amfifilní povaze je sophorolipidy možno použít pro snazší přenos účinných látek. Vytvářejí totiž vezikuly, které umožňují účinným látkám snazší průchod pokožkou a tím napomáhají lepšímu vstřebávání léčiva [34].

#### **2.1.6.4 Zemědělství**

Sophorolipidy mohou být díky biocidní aktivitě využity v zemědělství pro omezení výskytu fytopatogenů (např. *Phytophthora* sp. a *Pythium* sp.), které se pomocí vody snadno šíří v půdě v podobě zoospor a infikují semena, listy i stonky rostlin. Sophorolipidy efektivně inhibují motilitu i lýzi zoospor a růst mycelií [63].

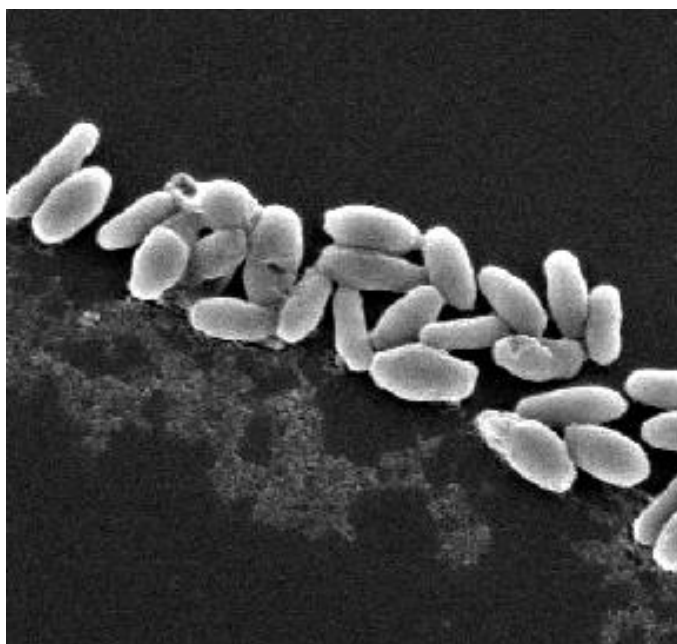
Povrchová aktivita a emulgační schopnosti sophorolipidů mohou být využity při výrobě postemergentních herbicidů. Ty obsahují adjuvans napomáhající lepšímu uchycení přípravku na povrch rostliny a snazšímu průniku kutikulou. Sophorolipidy mohou v tomto případě nahradit dosud používaný surfaktant polyethoxylovaný tallowamin (POEA), který je vyráběn z ropy a je toxický pro velké množství organismů. Směsi obsahující sophorolipidy mohou mít dokonce lepší herbicidní účinky než směsi s přídatkem POEA. Díky zmíněným vlastnostem, biodegradabilitě a nízké toxicitě sophorolipidy disponují velkým potenciálem jakožto ekologicky kompatibilní biokontrolní činidlo [64].

#### **2.1.6.5 Bioremediace**

Bioremediace je proces, který využívá mikroorganismy k urychlení degradace kontaminantů životního prostředí. Biosurfaktanty při bioremediaci zlepšují rozpustnost ve vodě a dostupnost hydrofobních substrátů, čímž napomáhají růstu mikroorganismů, které jsou schopny tyto substráty využít [18]. Jedním z řešených problémů je dekontaminace půdy znečištěné málo rozpustnými polycyklickými aromatickými uhlovodíky (PAH), jako je antracen, fluoren, fenanthren a pyren. Sophorolipidy zlepšují rozpustnost PAH a usnadňují mikrobiální biodegradaci např. pomocí *Sphingomonas yanoikuyae* [65]. Dalším často řešeným problémem je přítomnost těžkých kovů v půdě. Zde sophorolipidy vytvářejí komplexy s těžkými kovy, které je pak snazší z půdy vymýt. Sophorolipidy je také možné využít při znečištění moře ropou nebo při nebezpečném přemnožení řas v moři jako je rudý příliv [66, 67].

## 2.2 Charakterizace kvasinky *Starmerella bombicola*

*Starmerella bombicola* byla objevena v medu čmeláků v Kanadě a v koncentrované hroznové šťávě v Jižní Africe. Původně byla pojmenována *Torulopsis bombicola*. Přestože není schopna vytvářet pseudohyfy, byla následně přerazena do rodu *Candida*. Kvasinka *Candida bombicola* byla nejdříve považována za nesporulující druh (anamorf) a tato vlastnost byla využívána při její identifikaci [68]. Později však byly izolovány kmeny, u kterých bylo pozorováno spojování a tvorba askospor. Dalším zkoumáním bylo zjištěno, že se jedná o telemorf kvasinky *Candida bombicola*, který byl následně pojmenován *Starmerella bombicola* [69].



Obrázek 10: *Starmerella bombicola* [70]

Přirozený výskyt kvasinky je velmi různorodý. Je možné ji najít na mnoha územích v Severní Americe, Evropě, Asii, Jižní Africe nebo na tichomořských ostrovech. Kromě medu byla také izolována přímo z květů a vyskytuje se i v trávicím ústrojí čmeláků a jiných druhů hmyzu navštěvujících květiny [71].

Tento druh kvasinky se rozmnožuje mnohostranným pučením. Vegetativní buňky mají elipsovité tvar (Obrázek 10). Vřecka jsou konjugovaná a tvoří jednu kulovitou askosporu se spletítm povrchem a s membránou bazální lištou. Vřecka postupně mizí, až jsou nakonec askospory uvolněny a mají tendenci se aglutinovat. *Starmerella bombicola* nevytváří pseudomycelium ani pravé mycelium. Jedná se o fermentativní typ mikroorganismu [69].

Vzhledem k přirozenému prostředí výskytu má tato kvasinka dlouhou historii spojenou s potravinářstvím. Je dokonce cíleně využívána při fermentaci vína pro zlepšení aroma. *Starmerella bombicola* je považována za dobře prozkoumaný druh a není známé žádné onemocnění, které by způsobovala [68].

### 2.2.1 Taxonomické zařazení

**Doména:** Eukaryota

**Říše:** Houby (Fungi)

**Oddělení:** Houby vřeckovýtrusné (Ascomycota)

**Pododdělení:** Saccharomycotina

**Třída:** Saccharomycetes

**Řád:** Kvasinkotvaré (Saccharomycetales)

**Čeleď:** Saccharomycetales incertae sedis

**Rod:** *Starmerella*

**Druh:** *Starmerella bombicola* [68]

### 2.2.2 Podmínky kultivace

*Starmerella bombicola* je stejně jako většina kvasinek rodu *Starmerella* fakultativně aerobní a osmotolerantní druh. Dokáže růst při velmi vysoké koncentraci cukru (až 500 g/l) [68].

Kromě glukózy dokáže *Starmerella bombicola* využít pouze několik dalších hydrofilních uhlíkových zdrojů jako je sacharóza, mannitol nebo glycerol. Zato dokáže růst na mnoha hydrofobních uhlíkových zdrojích jako jsou mastné kyseliny, mastné alkoholy, alkany, methyl- a ethylestery mastných kyselin nebo rostlinné a živočišné tuky [68]. Míra růstu na vybraných zdrojích uhlíku je uvedena v tabulce 1.

Tabulka 1: Růst na vybraných zdrojích uhlíku: růst (+), žádný růst (-), proměnlivý růst (+/-) [69]

zdroj uhlíku	růst	zdroj uhlíku	růst	zdroj uhlíku	růst
glukóza	+	celobióza	-	erythritol	-
inulin	-	salicin	-	ribitol	-
sacharóza	+/-	L-sorbóza	+/-	galaktitol	-
rafinóza	+/-	L-rhamnóza	-	mannitol	+
melibióza	-	D-xylóza	-	D-glucitol	+
galaktóza	+/-	L-arabinóza	-	DL-laktát	-
laktóza	-	D-arabinóza	-	sukcinát	-
trehalóza	-	D-ribóza	+/-	citrát	+/-
maltóza	-	methanol	-	D-glukonát	+/-
melezitóza	-	ethanol	+	D-glukosamin	-
rozpustný škrob	-	glycerol	+	hexadekan	-

Rozsah teplot, při kterých je *Starmerella bombicola* schopna růst, je překvapivě široký. Pokud byl kmen izolován v oblastech chladného podnebí, byl pozorován růst mezi 4 °C až 29–32 °C. U kmenů izolovaných v oblastech teplého podnebí byl růst pozorován při 8–10 °C až 32–34 °C. Doba zdvojení není známa, stacionární fáze růstu je však obvykle dosaženo po 48 hodinách kultivace [71, 72].

### 2.2.3 Produkční potenciál

Nejznámější látky produkované pomocí *Starmerella bombicola* jsou sophorolipidy. Dále *Starmerella bombicola* produkuje řadu extracelulárních proteinů, které se běžně nacházejí u jiných hub. Nebyla zjištěna žádná lipolytická aktivita ani produkce škrobu či kyselin [68].

Stejně jako *Yarrowia lipolytica* je *Starmerella bombicola* schopna produkovat velké množství intracelulárních lipidů. Ty jsou produkovány, pokud je produkce sophorolipidů držena na minimu (produkční médium obsahuje  $40 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  glukózy a žádný lipofilní substrát). Z dostupných dat lze vyvodit, že *Starmerella bombicola* by mohla být potenciálně oleogenní kvasinkou, jelikož u ní byla prokázána přítomnost ATP-citrát lyázy a genů *acl1* i *acl2*. Zatím však nebyly provedeny studie, které by oleogenní vlastnosti přímo prokázaly [68].

### 2.2.4 Příbuzné mikroorganismy

Do rodu *Starmerella* je zařazeno více než 30 druhů mikroorganismů, které jsou si většinou z fyziologického hlediska velmi podobné a často využívají stejné uhlíkové zdroje používané v identifikačních testech. Proto je doporučeno jednotlivé druhy identifikovat na základě porovnávání genové sekvence. Většina kvasinek tohoto rodu byla izolována z hmyzu, květin a nebo ze substrátů s vysokou koncentrací cukru [73].



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje

#### 3.1.1 Mikroorganismy

Pro experimentální práci byly použity kmeny kvasinek získané z německé sbírky Leibnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures a z nizozemské sbírky CBS-KNAW Collections. Seznam těchto kmenů je uveden v tabulce 2 společně s jejich zkratkami použitými pro účely této práce.

Tabulka 2: Seznam použitých kmenů kvasinek a jejich zkratek

kmen	zkratka	optimální teplota kultivace
<i>Starmerella bombicola</i> DSM 27465	SB1	25–30 °C
<i>Starmerella bombicola</i> CBS 6009	SB2	25–30 °C
<i>Starmerella anomalae</i> CBS 14178	SA	25–30 °C
<i>Starmerella jiningensis</i> CBS 11864	SJ	25–30 °C
<i>Starmerella caucasica</i> CBS 12650	SC	25–30 °C
<i>Starmerela roubikii</i> CBS 15148	SR	25–30 °C

#### 3.1.2 Chemikálie

D-glukóza monohydrát, p.a., LachNer (ČR)  
Yeast Extract Powder, HiMedia (IND)  
Malt Extract HiMedia (IND)  
Agar Powder, Bacteriological, HiMedia (IND)  
Močovina, Sigma-Aldrich (USA)  
Soya Peptone, HiMedia (IND)  
Peptone, Bacteriological, HiMedia (IND)  
Slunečnicový olej, Ceresol (ČR)  
Odpadní fritovací olej (ČR)  
Odpadní olej (IND)  
Odpadní olej (Čína)  
Odpadní olej (Švédsko)  
Kávový olej, extrahován v laboratoři FCH VUT (ČR)  
Sacharóza, p.a., LachNer (ČR)  
D(+)-manóza, Lachema (ČR)  
D-galaktóza, Lachema (ČR)  
D-fruktóza, p.a., LachNer (ČR)  
D-xylóza, Lachema (ČR)  
Laktóza, p.a. LachNer (ČR)  
Glycerol, p.a. LachNer (ČR)  
Syravátka (ČR)  
Vysušená kávová sedlina (ČR)  
Melasa (ČR)

Kyselina chlorovodíková 35 %, p.a., LachNer (ČR)  
Kyselina sírová 96 %, p.a., LachNer (ČR)  
Viscozyme® L, Sigma-Aldrich (DNK)  
Cellulase from *Trichoderma reesei* ATCC 26921, Sigma Aldrich (DNK)  
 $\beta$ -glucosidase, Sigma-Aldrich (DNK)  
Kyselina 3,5-dinitrosalicylová, Sigma-Aldrich (USA)  
Vinan sodno-draselný, LachNer (ČR)  
Hydroxid sodný, LachNer (ČR)  
Uhlíčan vápenatý srážený, p.a., Penta (ČR)  
Antracen, Sigma-Aldrich (USA)  
Ethylacetát, p.a., LachNer (ČR)  
n-hexan, p.a., LachNer (ČR)  
Triton X-100, Sigma-Aldrich (SRN)  
Lactonic (di-acetylated) Sophorolipids, Carbosynth Ltd (UK)  
Acidic Sophorolipids mix-acetylated mixture, Carbosynth Ltd (UK)

### 3.1.3 Přístroje

Váhy Kern EW 620-3NM (SRN)  
Analytické váhy, Boeco (SRN)  
Autokláv, Systec  
Magnetická míchačka, Kartell, TKO (USA)  
Laminární box Aura mini, Bio-Air-Euroclone (USA)  
Centrifuga, Hettich Zentrifugen (SRN)  
Centrifuga vysokorychlostní chlazená, HERMLE, Z 36 HK (SRN)  
Vortex, Benchmark  
Temperovaná třepačka ES20, BioSan  
ELISA reader EL808, BioTek  
Bioreaktor BioFlo/CelliGen 115, New Brunswick (USA)  
Rotátor Multi-Bio RS-24, BioSan  
Nanofotometr P 300, Implen (UK)  
Rotační vakuová odparka Laborota 4000, Heidolph  
FTIR spektrometr, Nicolet iS50  
Tenziometr, KSV, Sigma 701  
Běžné laboratorní sklo a vybavení

## 3.2 Příprava odpadních substrátů

### 3.2.1 Hydrolýza kávové sedliny

Do reagenční lahve s plastovým uzávěrem bylo naváženo 150 g vysušené kávové sedliny. Poté byl do lahve přilít 0,5% roztok kyseliny sírové o objemu 1 l. Připravená směs byla vložena do autoklávu, kde byl spuštěn program na 121 °C, 20 minut. Po zchlazení bylo pomocí uhličitanu vápenatého upraveno pH hydrolyzátu na hodnotu 5. Následně bylo do směsi přidáno 3,5 ml celulasy, 0,35 ml Viskozymu L a 0,35 ml  $\beta$ -glukosidasy. Směs byla umístěna na třepačku

a při 55 °C třepána rychlostí 150 rpm po dobu 24 hodin. Poté byla směs přefiltrována za sníženého tlaku.

### **3.2.2 Hydrolýza syrovátky**

Do reagenční lahve s plastovým uzávěrem bylo nalito 500 ml syrovátky a přidána kyselina chlorovodíková do koncentrace  $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Směs byla inkubována ve vodní lázni při teplotě 60 °C po dobu 2 hodin. Po zchladnutí bylo pomocí hydroxidu sodného upraveno pH hydrolyzátu na hodnotu 7.

### **3.2.3 Stanovení redukcí sacharidů pomocí kyseliny 3,5-dinitrosalicylové**

Činidlo pro stanovení koncentrace redukcí sacharidů v hydrolyzátech odpadních surovin bylo připraveno smícháním 0,1 g kyseliny 3,5-dinitrosalicylové, 30 g vinanu sodno-draselného a 20 ml hydroxidu sodného o koncentraci  $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Tato směs byla v odměrné baňce doplněna destilovanou vodou na 100 ml.

Do zkumavek bylo pipetováno 0,1 ml vzorku hydrolyzátu, 0,4 ml destilované vody a 0,5 ml činidla. Vzorky byly inkubovány ve vodní lázni při 70 °C po dobu 10 minut a poté byly umístěny do tmy ke zchladnutí. Následně bylo do zkumavek přidáno 9 ml destilované vody. Po promíchání byla u vzorků spektrofotometricky měřena absorbance při vlnové délce 540 nm. Jako blank sloužil vzorek obsahující 0,5 ml destilované vody a 0,5 ml činidla připravený společně s ostatními vzorky.

Pro vytvoření kalibrační křivky byl připraven roztok glukózy o koncentraci  $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Do zkumavek bylo napipetováno 0,1; 0,6; 1,2; 1,8 a 2,4 ml tohoto roztoku. Objem roztoku ve zkumavkách byl doplněn destilovanou vodou na 3 ml. Do čistých zkumavek bylo pipetováno 0,5 ml vzorku kalibrační řady a 0,5 ml destilované vody. Směs byla inkubována ve vodní lázni při 70 °C po dobu 10 minut, poté byla ponechána ve tmě ke zchladnutí. Následně bylo do zkumavek napipetováno 9 ml destilované vody. Po promíchání byla spektrofotometricky měřena absorbance vzorků při 540 nm.

## **3.3 Kultivace**

### **3.3.1 Oživení lyofilizovaných kultur**

Jednotlivé kvasinkové kultury byly kultivovány z lyofilizované formy. Vysušená suspenze kultury byla sterilně rozmíchána v inokulačním médiu vhodném pro danou kulturu (viz kapitola 3.2.2). Rozmíchaná suspenze byla rozdělena do dvou připravených 100 ml Erlenmeyerových baňek obsahujících 50 ml inokulačního média. Kultury byly kultivovány na třepače při 180 rpm a 30 °C po dobu 48–96 hodin v závislosti na rychlosti růstu jednotlivých kmenů.

Připravená inokula byla následně použita pro vytvoření kryokonzerv. Do kryozkumavek bylo napipetováno 0,5 ml 30% glycerolu a poté byly vysterilovány. Následně byl do každé v laminárním boxu sterilně napipetován 1 ml inokula. Kryokonzervy byly uloženy do hlubokomrazícího boxu a při teplotě -80 °C uchovány pro pozdější použití.

### 3.3.2 Příprava inokulačních médií

Inokulační média byla připravena podle pokynů doprovázejících lyofilizované kultury. Pro kultivaci kultury SB1 bylo použito inokulační médium UMY, pro kultivaci kultur SB2, SA, SJ, SC a SR bylo použito inokulační médium GPY. Složení médií je uvedeno v kapitole 3.3.3.

Do 100 ml Erlenmeyerových baněk bylo vždy připraveno 50 ml příslušného inokulačního média. Připravená média byla vysterilována a poté sterilně očkována jednotlivými kulturami v laminárním boxu. Takto připravená inokula byla kultivována 48 hodin na třepačce při 180 rpm a 30 °C.

### 3.3.3 Složení inokulačních médií

Pro kultivaci kvasinky SB1 bylo německou sbírkou doporučeno médium Universal Medium for Yeast (UMY). Jeho složení je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 3: Složení inokulačního média UMY

látká	hmotnost (g)	objem (ml)
D-glukóza	10	
Yeast Extract	3	
Malt Extract	3	
Soya Peptone	5	
Destilovaná voda		1000

Nizozemská sbírka doporučila pro kultivaci kvasinek SB2, SA, SJ, SC a SR médium Glucose-Peptone-Yeast Extract (GPY), jehož složení je uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4: Složení inokulačního média GPY

látká	hmotnost (g)	objem (ml)
D-glukóza	40	
Yeast Extract	5	
Peptone, Bacteriological	5	
Destilovaná voda		1000

### 3.3.4 Příprava produkčních médií

Do 500 ml Erlenmeyerových baněk bylo vždy připraveno 100 ml produkčního média (složení viz kapitola 3.3.5) bez složky oleje. Připravené médium bylo vysterilováno, poté byl v laminárním boxu přidán samostatně vysterilovaný olej a 10 ml inokula připraveného podle kapitoly 3.3.2. Takto připravená média byla kultivována na třepačce při 180 rpm a 30 °C po dobu 120 hodin.

### 3.3.5 Složení produkčních médií

Složení základního produkčního média (viz Tabulka 5) bylo pro všechny kmeny stejné. Toto médium bylo využito pro screening schopnosti produkce sophorolipidů jednotlivými kmeny a také jako srovnávací médium při experimentech s jinými substráty.

Tabulka 5: Základní složení produkčního média

látka	hmotnost (g)	objem (ml)
D-glukóza	100	
Yeast Extract	5	
Močovina	1	
Slunečnicový olej	20	
Destilovaná voda		1000

Na základě výsledků screeningu byly vybrány dva kmeny vhodné pro podrobnější studium. Jednalo se o kmeny SB2 a SA.

Vybrané kmeny byly kultivovány v produkčních médiích, ve kterých byla obměněna vždy jedna složka podle tabulky 6 tak, aby koncentrace zdroje uhlíku byla stejná jako v původním produkčním médiu. Hydrolyzáty nebyly z důvodu nízké koncentrace sacharidů ředěny vodou.

Tabulka 6: Alternativní zdroje uhlíku

původní složka	nahrazující složka
D-glukóza	D(+)-manóza
	D-fruktóza
	Sacharóza
	D-galaktóza
	Hydrolyzát kávové sedliny
	Hydrolyzát syrovátky
	Melasa
Slunečnicový olej	Odpadní fritovací olej
	Odpadní indický olej
	Odpadní čínský olej
	Odpadní švédský olej
	Kávový olej

Na základě výsledků kultivací s alternativními zdroji uhlíku bylo vybráno vhodné produkční médium složené z odpadních substrátů (složení viz Tabulka 7).

Tabulka 7: Produkční médium z odpadních složek

látka	hmotnost (g)	objem (ml)
Melasa	200	
Yeast Extract	5	
Močovina	1	
Odpadní indický olej	20	
Destilovaná voda		do 1000 ml

### 3.3.6 Kultivace v bioreaktoru

Pro vybrané kmeny kvasinek (SB2 a SA) byly provedeny experimenty kultivace v bioreaktoru o objemu 1,5 l (viz Obrázek 11)

Do bioreaktoru bylo přidáno 1,5 l připraveného produkčního média (složení viz Tabulka 5) a byly do něj umístěny potřebné elektrody a čidla. Takto připravený bioreaktor byl vysterilován. Poté bylo do bioreaktoru vpraveno 150 ml inokula připraveného podle kapitoly 3.3.2. Teplota byla nastavena na 30 °C, pH na hodnotu 6, míchání na 200 rpm a provzdušňování na 20 %. Po 24 hodinách bylo pomocí H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sníženo pH na hodnotu 3,5. Kultivace v bioreaktoru probíhala po dobu 144–168 hodin v závislosti na technických možnostech. V intervalech 24 hodin byly odebrány vzorky pro stanovení přítomnosti sophorolipidů.



Obrázek 11: Bioreaktor

### 3.4 Test růstu na různých uhlíkových zdrojích

Do jamek mikrotitrační destičky bylo ve třech paralelních řadách sterilně napipetováno 100  $\mu$ l 1,5x koncentrovaného produkčního média připraveného bez uhlíkového zdroje, 50  $\mu$ l roztoku testovaného uhlíkového zdroje o koncentraci 60 g  $\cdot$  l<sup>-1</sup> a 20  $\mu$ l inokula připraveného podle kapitoly 3.3.2. Do tří jamek bylo jako blank napipetováno 170  $\mu$ l fyziologického roztoku. Jako zdroje uhlíku byly testovány D-glukóza, D-fruktóza, D-xylóza, sacharóza, D-laktóza, D-galaktóza, olej a glycerol. Takto připravené vzorky byly proměřeny pomocí ELISA readeru při vlnové délce 630 nm. Následně byly kultivovány po dobu 72 hodin při 30 °C a poté znovu proměřeny pomocí ELISA readeru při vlnové délce 630 nm.

### 3.5 Stanovení obsahu biomasy

Po kultivaci vybraných kmenů v různých produkčních médiích bylo stanoveno množství biomasy, které vypovídá o schopnosti mikroorganismů využít dostupné zdroje živin. Stanovení bylo provedeno dvěma metodami: gravimetrickým stanovením obsahu biomasy a spektrofotometrickým stanovením optické hustoty.

### 3.5.1 Gravimetrické stanovení obsahu biomasy

Do centrifugačních zkumavek bylo po kultivaci v produkčním médiu napipetováno 10 ml média ve dvou paralelních sadách. Vzorky byly centrifugovány při 6000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl vylit a do zkumavek bylo napipetováno 5 ml destilované vody. Směs byla promíchána pomocí vortexu a poté znovu vložena do centrifugy na 6000 rpm po dobu 5 minut. Po vylití supernatantu byly zkumavky umístěny do termostatu a vzorky byly vysušeny do konstantní hmotnosti. Vysušená biomasa byla zvážena na analytických vahách a aritmetickým průměrem dvou odebraných vzorků byla stanovena koncentrace biomasy v médiu.

### 3.5.2 Spektrofotometrické stanovení optické denzity

Ihned po ukončení kultivace v produkčním médiu byl z Erlenmeyerovy baňky odebrán vzorek pro stanovení optické denzity. Do semimikrokyvety bylo kvůli dostatečnému zředění napipetováno 10  $\mu$ l vzorku a 990  $\mu$ l destilované vody a směs byla řádně promíchána. Pomocí spektrofotometru byla měřena absorbance vzorku při 630 nm, jako blank byla použita destilovaná voda.

### 3.6 Stanovení emulgační aktivity

Do stejně velkých skleněných zkumavek byly napipetovány 3 ml n-hexanu a 3 ml vzorku. Obsah zkumavek byl jednu minutu promícháván na vortexu. Stejným způsobem byla připravena pozitivní kontrola s 5% roztokem tritonu X-100 a negativní kontrola s destilovanou vodou. Zkumavky byly ponechány při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Poté byla změřena výška stabilizované emulzní vrstvy a pomocí uvedené rovnice (1) byl vypočítán emulgační index  $E_{24}$ :

$$E_{24} = \frac{h_e}{h_k} \cdot 100 \% \quad (1)$$

kde:

$h_e$  je výška emulzní vrstvy (mm)

$h_k$  je celková výška kapaliny (mm)

Koncentrace přítomného biosurfaktantu většinou koreluje s vypočteným emulgačním indexem. V případě vytvoření emulgované vrstvy je přítomnost biosurfaktantu prokázána. Emulgační aktivita však nemusí vždy korelovat s povrchovou aktivitou zkoumaného vzorku [74].

### 3.7 Solubilizace krystalického antracenu

Do centrifugačních zkumavek bylo vloženo malé množství krystalů hydrofobního antracenu, napipetováno 5 ml zkoumaného vzorku a směs byla krátce promíchána na vortexu. Stejným způsobem byl připraven srovnávací vzorek s čistým kultivačním médiem, pozitivní kontrola s 5% roztokem tritonu X-100 a negativní kontrola s destilovanou vodou. Připravené vzorky byly inkubovány na rotátoru při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Následně byly zkumavky zcentrifugovány při 6000 rpm po dobu 5 minut.

Pomocí spektrofotometru byla při vlnové délce 354 nm v křemenné kyvetě měřena absorbance připravených vzorků. Jako blank byla použita negativní kontrola. Výsledné hodnoty

absorbance byly získány odečtením hodnot srovnávacích vzorků s čistým médiem od hodnot zkoumaných vzorků.

Schopnost solubilizovat antracen koreluje s množstvím surfaktantu ve vzorku [75].

### 3.8 Měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring

Do nízké kádinky bylo nalito přibližně 30 ml vzorku. Měření povrchového napětí vzorku bylo provedeno pomocí automatizovaného tenziometru (viz Obrázek 12). Pro nastavení dílčích parametrů experimentu byl použit aplikační software SGSERVER. Minimální doba měření byla nastavena na 10 minut a minimální požadovaný počet měření na 10 hodnot. Následně byl vypočten aritmetický průměr naměřených hodnot.



Obrázek 12: Automatizovaný tenziometr

Měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring je založeno na stanovení síly potřebné k protažení platinového kroužku skrz mezifázové rozhraní kapalina-vzduch [76]. Pro zamezení kontaminace vzorku a zkreslení výsledků byl platinový kroužek vždy před použitím vyžítán. Za důkaz přítomnosti biosurfaktantu je považováno, když dojde ke snížení povrchového napětí média na  $40 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  nebo méně [77]. Jako pozitivní kontrola byl použit 5% roztok tritonu X-100, jako negativní kontrola byla použita čistá produkční média.

### 3.9 Extrakce sophorolipidů

Sophorolipidy byly z média extrahovány pomocí ethylacetátu. Do dělicí nálevky bylo přelito 200 ml vzorku z produkční kultivace a stejné množství ethylacetátu. Obsah byl řádně protřepán a po úplném ustálení vrstev byla odebrána horní fáze. Se spodní fází byl celý proces zopakován. Odebrané horní fáze byly slity a na vakuové odparce byla odpařena všechna kapalina. Získané sophorolipidy byly následně promyty malým množstvím hexanu.

Při podrobnějším studiu kmenů SB2 a SA bylo pro extrakci použito pouze 40 ml vzorku média a tomu odpovídající množství ethylacetátu.



### 3.10 Infračervená spektroskopie

Přítomnost a čistota sophorolipidů ve vzorku získaném extrakcí byla zkoumána pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR) metodou zeslabeného úplného odrazu na jednodrazovém diamantovém ATR nástavci. Měření spektra bylo provedeno v rozsahu  $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$  [78]. Spektra byla naměřena i pro komerčně dostupné standardy acidické a laktonické formy sophorolipidů. Získaná spektra vzorků byla porovnána se spektry těchto standardů.

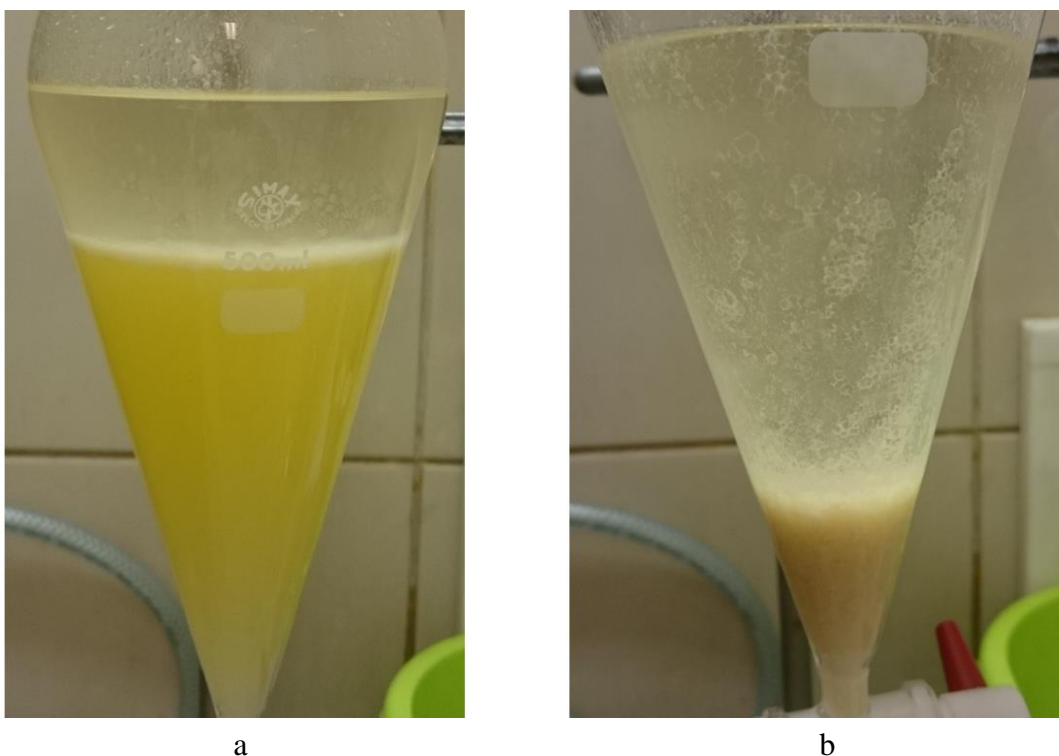
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Experimentální část této diplomové práce byla zaměřena na průzkum produkce sophorolipidů různými kmeny kvasinek rodu *Starmerella*. Ten byl proveden pomocí kultivačních, separačních, spektroskopických a screeningových metod, které jsou popsány v kapitole 3. Vybrané screeningové metody byly použity proto, že separační metoda pro extrakci sophorolipidů byla shledána příliš náročnou z hlediska potřebného množství materiálu a času a často také poskytovala nepřesné výsledky. Z těchto důvodů byly v diplomové práci využity tři screeningové metody, kterými byla testována přítomnost biosurfaktantu efektivněji.

### 4.1 Optimalizace extrakce sophorolipidů

Jedním z hlavních cílů práce byla izolace sophorolipidů z kultivačního média, na jejíž bázi by byla vyhodnocena výtěžnost jednotlivých kultivací. Extrakce organickým rozpouštědlem je ve vědeckých člancích zabývajících se sophorolipidy poměrně dobře popsána, avšak reálné provedení bylo obtížnější, a proto bylo nutné provést jeho optimalizaci.

V literatuře [41] je uvedeno, že po přidání ethylacetátu ke kultivačnímu médiu, řádném protřepání a následném rozdělení vrstev je třeba odebrat horní fázi a s tou dále pracovat. Při realizaci se však ukázalo, že v dělicí nálevce se směs rozdělí na tři fáze (viz Obrázek 13 a) a pro úspěšnou extrakci sophorolipidů je nutné odebrat horní fázi tvořenou organickým rozpouštědlem a také mezifázi, která obsahuje velké množství emulgujících látek (především sophorolipidů) a také vodu. (viz Obrázek 13 b).



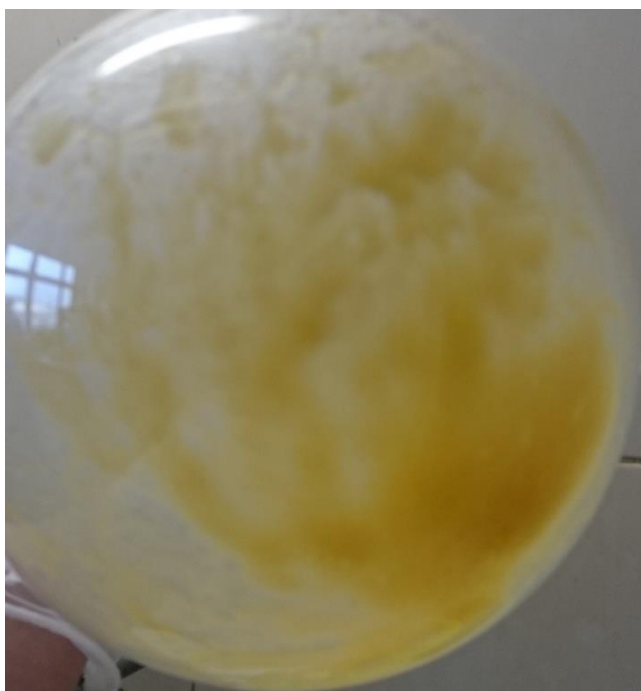
Obrázek 13: Extrakce ethylacetátem; (a) rozdělení směsi na tři fáze; (b) horní fáze a mezifáze odebrané pro další použití

Následně měla být ze vzorku odpařena všechna kapalina při 40 °C na rotační vakuové odparce. Z důvodu přítomnosti zbytkové vody se však ukázalo jako výhodnější odpařit nejdříve

ethylacetát při 40 °C a následně odpařit vodu při 70 °C pro dosažení co nejlepší konzistence vzorku pro další manipulaci. Po odpaření vody měly vzorky konzistenci velmi viskózní kapaliny srovnatelné s medem.

Poté měly být vzorky sophorolipidů promyty malým množstvím n-hexanu. To však nebylo možné provést, pokud v předchozím kroku ze vzorku nebyla zcela odpařena veškerá voda a vzorek byl kapalný kvůli přítomnosti zbytkové vody.

Po promytí měly být sophorolipidy opět rozpuštěny v ethylacetátu a přelity na odpařovací misku, kde by byl ethylacetát opět odpařen a čisté sophorolipidy by byly připraveny pro další použití. Získaný extrakt se však v ethylacetátu rozpouštěl velmi špatně, proto byly sophorolipidy z baňky vyjmuty a přeneseny do mikroskopické Eppendorf pomocí špachtle. Sophorolipidy získané extrakcí zobrazuje obrázek 14.



*Obrázek 14: Vyextrahované sophorolipidy*

Uvedená metoda extrakce sophorolipidů byla z důvodu nízké efektivity využita pouze při screeningu produkčního potenciálu jednotlivých kmenů a pro získání vzorků pro identifikaci sophorolipidů pomocí infračervené spektroskopie.

## **4.2 Screening produkčních schopností jednotlivých kmenů**

Pro screening schopností produkce sophorolipidů jednotlivými kmeny kvasinek byly použity supernatanty získané po kultivaci těchto kmenů v základním produkčním médiu. Postup kultivace a složení média je uvedeno v kapitolách 3.3.4 a 3.3.5.

### **4.2.1 Stanovení emulgační aktivity**

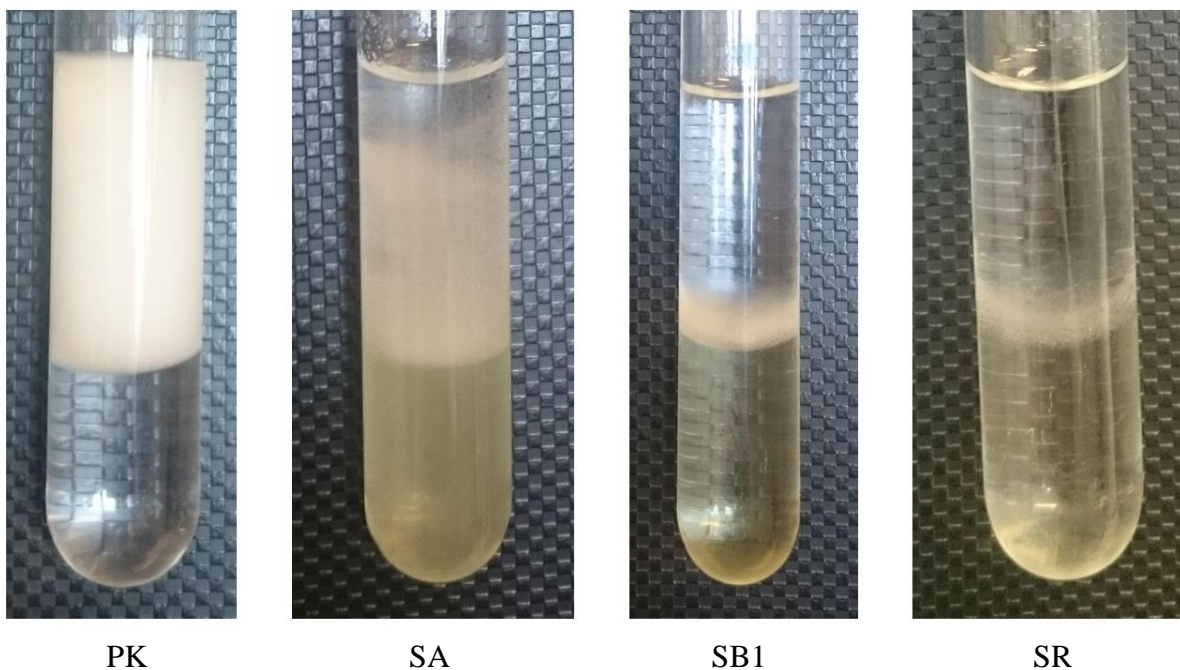
Emulgační aktivita supernatantů byla vyhodnocena pomocí emulgačního indexu vypočteného podle rovnice (1) a vizuálního popisu emulgované vrstvy. Emulgovaná vrstva pozitivní kontroly byla v celém objemu homogenní a velmi kompaktní, až gelovitá. Emulgační index pozitivní kontroly byl stanoven na 60,0 %. Naopak u negativní kontroly nebyla emulgační

vrstva vůbec vytvořena, emulgační index byl tedy stanoven na 0,0 %. Hodnoty emulgačního indexu pro jednotlivé kmeny a vizuální popisy emulgovaných vrstev jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Emulgační indexy jednotlivých kmenů a popis emulgovaných vrstev

kmen	E <sub>24</sub> (%)	popis emulgované vrstvy
SB1	9,1	kompaktní, homogenní, bíle zbarvená
SB2	0,0	emulgovaná vrstva nebyla vytvořena
SA	52,9	kompaktní, homogenní, gelovitá, bíle zbarvená, průsvitná
SJ	2,0	nehomogenní, nekompaktní, viditelné velké bubliny, průhledná
SC	0,0	emulgovaná vrstva nebyla vytvořena
SR	8,0	nekompaktní, patrné bublinky, bez zbarvení
NK	0,0	emulgovaná vrstva nebyla vytvořena
PK	60,0	kompaktní, homogenní, gelovitá, bíle zbarvená

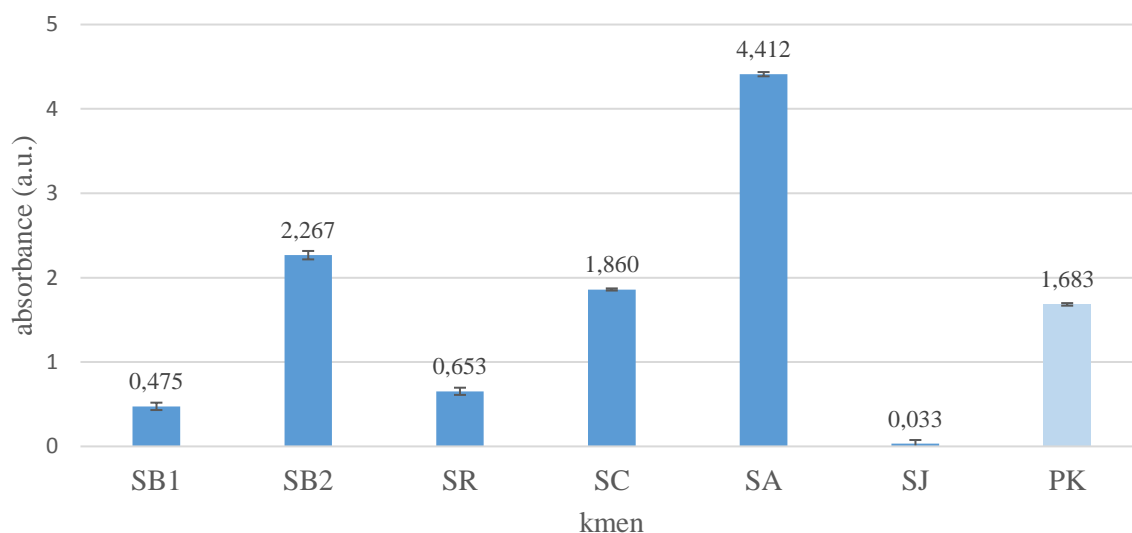
Z výsledků je patrné, že supernatanty kmenů SB2 a SC nevykazují žádnou emulgační aktivitu. Supernatant kmene SJ emulgační aktivitu vykazoval, avšak pouze v malé míře při porovnání s negativní kontrolou i s jinými kmeny. Nejvyšší emulgační aktivitu vykazoval vzorek kmene SA, který se hodnotou emulgačního indexu i vzhledem emulgované vrstvy velmi blížil pozitivní kontrole. Emulze vytvořená supernatantem kmene SA byla velmi kompaktní, homogenní a neprůhledná. Hodnoty emulgačních indexů kmenů SB1 a SR jsou si velmi blízké, avšak při pozorování vzhledu emulgované vrstvy je jasné, že z těchto dvou kmenů vykazuje lepší emulgační vlastnosti kmen SB1. Emulze vytvořená supernatantem tohoto kmene byla kompaktní a homogenní na rozdíl od supernatantu kmene SR, který vytvořil emulzi nehomogenní a hodně perforovanou. Obrázek 15 zobrazuje emulgované vrstvy vybraných vzorků.



Obrázek 15: Vybrané vzorky emulgovaných vrstev

#### 4.2.2 Solubilizace krystalického antracenu

Míra solubilizace antracenu v supernatantech byla měřena spektrofotometricky při 354 nm. Pokud bylo nutno vzorek ředit, byla naměřená hodnota vynásobena faktorem zředění. Od naměřených hodnot vzorků po kultivaci byla odečtena hodnota naměřená pro čisté produkční médium. Tento odečet byl proveden z toho důvodu, že i v čistém kultivačním médiu může být antracen do určité míry solubilizován. Výsledné hodnoty absorbance jednotlivých vzorků znázorňuje obrázek 16.



Obrázek 16: Hodnoty absorbance získané při testu solubilizace antracenu pro jednotlivé kmeny

Z naměřených hodnot je patrné, že pouze supernatant kmenu SJ antracen nesolubilizoval. Supernatanty kmenů SB1 a SR antracen solubilizovaly, avšak v mnohem menší míře než pozitivní kontrola. Nejvyšší míru solubilizace vykazoval supernatant kmenu SA, jehož naměřená hodnota absorbance byla více než dvakrát vyšší než hodnota absorbance pozitivní kontroly. To je v souladu s výsledky testu emulgační aktivity a lze tedy tvrdit, že kmen SA při kultivaci vyprodukoval biosurfaktanty ve značné koncentraci. Značná míra solubilizace antracenu byla zjištěna i u supernatantu kmenu SB2, jehož naměřená hodnota absorbance je o třetinu vyšší než hodnota absorbance pozitivní kontroly. Supernatant kmenu SC vykazoval schopnost solubilizace antracenu srovnatelnou s pozitivní kontrolou.

#### 4.2.3 Měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring

Měření povrchového napětí supernatantů získaných po kultivaci jednotlivých kmenů bylo měřeno pomocí automatizovaného tenziometru. Dle dostupné literatury jsou surfaktanty v supernatantu přítomny, pokud je naměřeno povrchové napětí  $40 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  nebo méně [77]. Naměřené hodnoty povrchového napětí jednotlivých supernatantů včetně porovnání s naměřenými hodnotami čistého média a pozitivní kontroly zobrazuje obrázek 17.



Obrázek 17: Hodnoty povrchového napětí supernatantů jednotlivých kmenů

Z obrázku je patrné, že většina kmenů dokázala snížit povrchové napětí produkčního média pod hodnotu  $40 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ . Nejvíce bylo povrchové napětí sníženo v případě SC, kde bylo povrchové napětí sníženo dokonce mírně pod hodnotu pozitivní kontroly. Výborných výsledků dosáhly také kmeny SB2, SJ a SB1, jejichž supernatanty vykazovaly výrazné snížení povrchového napětí v porovnání s čistým médiem, což dokazuje značnou produkci biosurfaktantů při kultivaci těchto kmenů v produkčním médiu. Hodnoty naměřené pro supernatanty kmenů SA a SR nebyly nižší než  $40 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ , avšak byly této hranici poměrně blízké, zvláště v případě kmene SA. Při porovnání s hodnotami pro čisté médium je patrné, že kultivace těchto kmenů povrchové napětí média také snížila. Dá se tedy předpokládat, že kmeny SA a SR biosurfaktanty produkují, avšak ne v dostatečné koncentraci nebo kvalitě potřebné pro výrazné snížení povrchového napětí média.

#### 4.2.4 Extrakce sophorolipidů ethylacetátem

Po kultivaci jednotlivých kmenů v základním produkčním médiu byla stanovena koncentrace vyprodukovaných sophorolipidů pomocí extrakce ethylacetátem. Stanovené koncentrace sophorolipidů jsou uvedeny v tabulce 9.

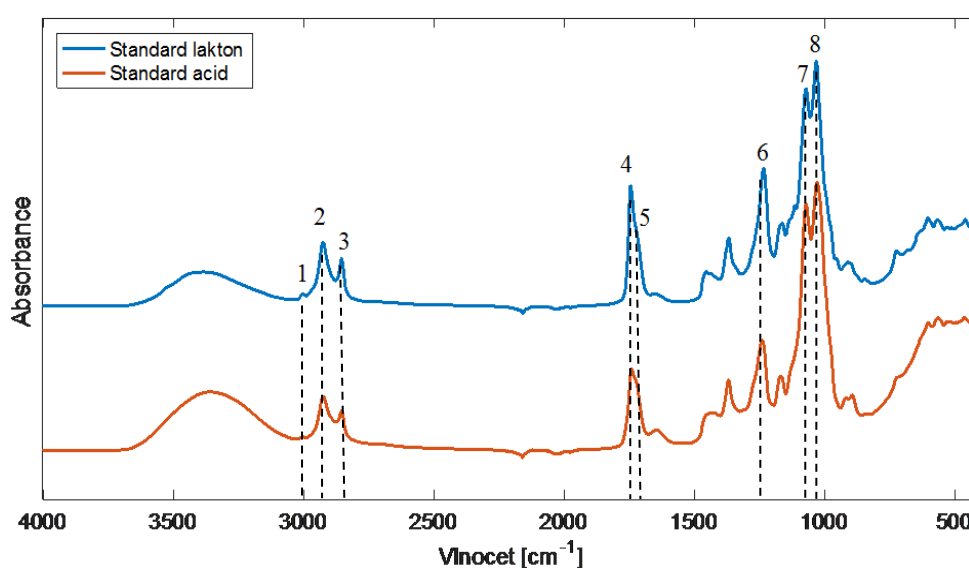
Tabulka 9: Koncentrace sophorolipidů vyprodukovaných jednotlivými kmeny

kmen	koncentrace SL ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ )
SB1	20,1
SB2	21,4
SA	29,9
SJ	16,5
SC	4,6
SR	4,5

Jak je ze získaných hodnot zřejmé, nejvíce sophorolipidů vyprodukoval kmen SA. Značnou produkci sophorolipidů vykázaly také kmeny SB1 a SB2, jejichž výsledky řádově odpovídají výtěžkům uvedeným v literatuře [28]. Významné množství sophorolipidů bylo produkováno kmenem SJ, avšak jednalo se pouze o poloviční koncentraci oproti kmenu SA. Kmeny SC a SR produkovaly sophorolipidy v zanedbatelném množství v porovnání s ostatními kmeny.

#### 4.2.5 Vyhodnocení infračervené spektroskopie

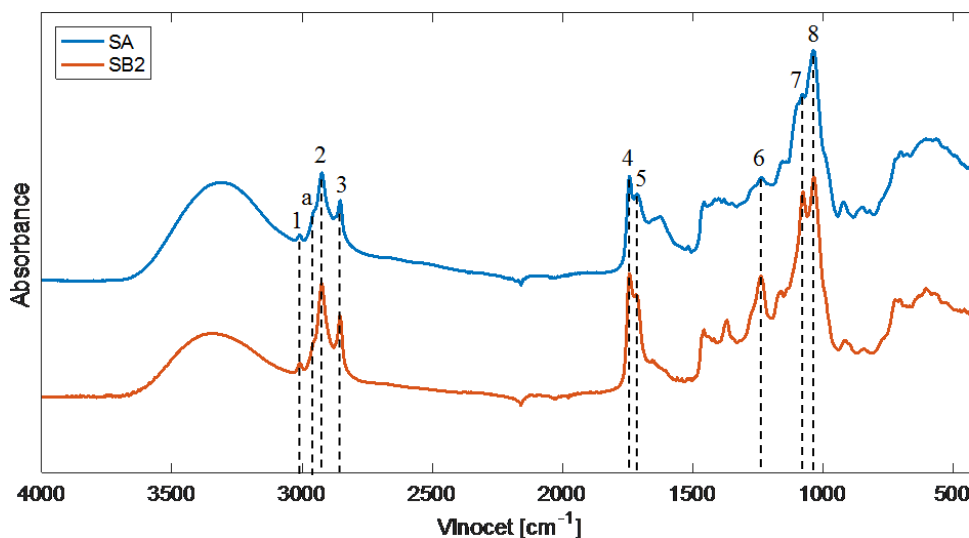
Extrakty získané z kultivačních médií byly analyzovány pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Měření bylo provedeno v rozsahu  $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$  a získaná spektra vzorků byla porovnána se spektry komerčně dostupných standardů acidické a laktonické formy sophorolipidů. Spektrum těchto standardů je zobrazeno na obrázku 18.



Obrázek 18: FTIR spektra standardů sophorolipidů

Široký absorpční pás v oblasti  $3600\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$  značí především přítomnost vody, ale také jiných  $\text{--OH}$  vazeb. Málo zřetelný pík v hodnotě  $3005\text{ cm}^{-1}$  označený číslem 1 náleží dvojně vazbě  $\text{C}=\text{C}$ , která se vyskytuje v molekule sophorolipidu pouze jednou. Píky 2 a 3 v hodnotě  $2924\text{ cm}^{-1}$  a  $2852\text{ cm}^{-1}$  značí přítomnost asymetrických a symetrických vazeb  $\text{--CH}_2\text{--}$  v hydrofobní části molekuly. Výrazný pík 4 v  $1741\text{ cm}^{-1}$  odpovídá vazbě  $\text{C}=\text{O}$  v esteru a sotva patrné rozšíření tohoto píku v hodnotě  $1709\text{ cm}^{-1}$  označené číslem 5 odpovídá vazbě  $\text{C}=\text{O}$  v karboxylové funkční skupině. Pík 6 s hodnotou  $1232\text{ cm}^{-1}$  odpovídá esterové vazbě  $\text{C--O}$ . Píky 7 a 8 v hodnotách  $1074\text{ cm}^{-1}$  a  $1030\text{ cm}^{-1}$  jsou charakteristické pro sacharidy. První jmenovaný pík odpovídá glykosidické vazbě a druhý značí velké množství přítomných  $\text{R--OH}$  vazeb.

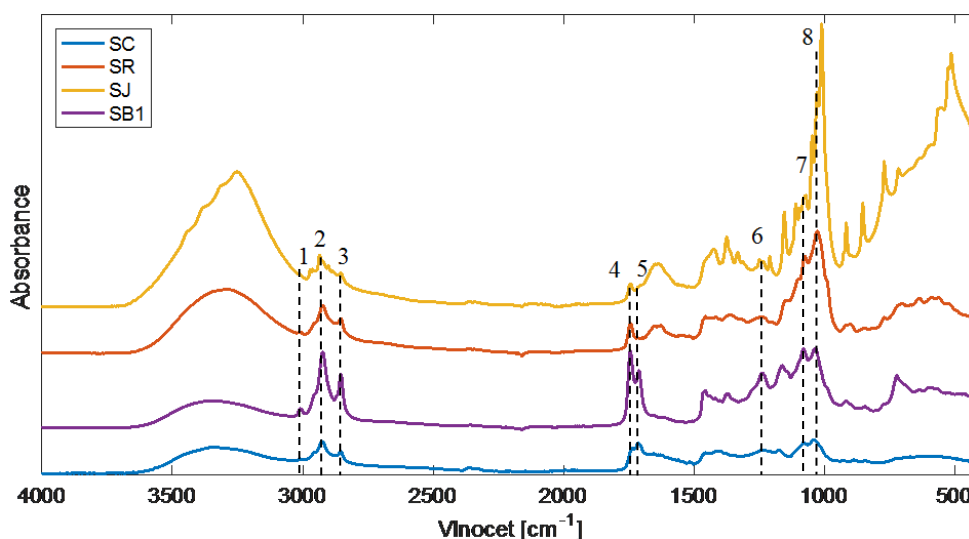
Mezi spektry standardů jsou jen malé rozdíly. Největším rozdílem je vyšší pík absorpčního pásu v oblasti  $3600\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$  a vyšší píky 7 a 8 ve spektru acidické formy, což potvrzuje větší množství  $\text{--OH}$  skupin v molekule. Laktonická forma má naopak vyšší píky 4 a 6, které odpovídají většímu množství esterových vazeb.



Obrázek 19: FTIR spektra extraktů z médií kmenů SB2 a SA

Spektra kmenů SA a SB2 na obrázku 19 jsou spektrům standardů velmi podobná. Píky 1 a 3 jsou podobné standardům, u píky 2 je však u obou kmenů na rozdíl od spekter standardů patrné rozšíření (a), které odpovídá asymetrické  $-\text{CH}_3$  vazbě. Píky 4 a 5 je od sebe možné v obou spektrech snáze rozeznat v porovnání se spektry standardů, což může být způsobeno větším množstvím  $\text{C}=\text{O}$  vazeb karboxylových skupin. Píky 6 a 7 jsou ve spektru kmene SA poměrně nezřetelné, avšak stále jednoznačně rozpoznatelné. Ve spektru kmene SB2 jsou píky 6, 7 a 8 velmi zřetelné a podobné odpovídajícím píkům spekter standardů.

Vyprodukované sophorolipidy se v případě těchto kmenů podařilo vyextrahovat ve velmi čisté podobě. Na základě vyhodnocení spekter lze říci, že kmeny SA a SB2 produkují sophorolipidy ve formě podobné standardům. Spektrum kmene SA je spíše podobné spektru standardu acidické formy a spektrum kmene SB2 standardu laktonické formy.



Obrázek 20: FTIR spektra extraktů z médií kmenů SB1, SC, SJ a SR

Spektra extraktů ostatních kmenů zobrazená na obrázku 20 již nejsou standardům tak podobná. Nejpodobnější standardům je spektrum kmene SB1, které je poměrně ostré a poloha



výrazných píků odpovídá charakteristickým absorpčním pásům sophorolipidů. Poměr výšky píků 7 a 8 k výšce píků 2, 3, 4 a 5 však není tak velký, jako je tomu ve spektrech standardů. To může být způsobeno větším znečištěním vzorku zbytkovým olejem nebo rozpouštědlem, jelikož píky 2, 3, 4 a 5 mohou odpovídat i přítomnosti samotných hydrofobních látek a píky 7 a 8 naznačující přítomnost sacharidů ve vzorku nejsou v tomto případě dostatečně vysoké.

Naměřená spektra extraktů kmene SC a SR jsou spektrům standardů podobná jen z části. Extrakt kmene SC pravděpodobně obsahoval sophorolipidy ve velmi malé koncentraci a vzhledem k poměru výšky píků 7 a 8 k výšce píků 2, 3, 4 a 5 byl nejspíše stejně jako extrakt SB1 znečištěn zbytkovým olejem nebo rozpouštědlem. Vzorek extraktu SR pravděpodobně také obsahoval jen malou koncentraci sophorolipidů. Znečištění olejem nebo rozpouštědlem zde není tak výrazné, jako u extraktů kmene SC a SB1. Spektrum je však poměrně neostré, což naznačuje kontaminaci jinými látkami.

Spektrum nejméně podobné standardům bylo naměřeno pro kmen SJ. Toto spektrum je velmi neostré, což naznačuje velkou míru kontaminace jinými látkami a velmi vysoký pík absorpčního pásu v oblasti 3600–3100 cm<sup>-1</sup> naznačuje přítomnost velkého množství vody ve vzorku. Základní charakteristické absorpční pásy sophorolipidů jsou však ve spektru stále patrné, je tedy možné předpokládat, že extrakt sophorolipidy obsahoval.

### 4.3 Kultivace vybraných kmenů v různých substrátech

Na základě předchozích výsledků byly pro další experimenty použity pouze kmeny SB2 a SA. Kmen SB2 byl vybrán proto, že druh *Starmerella bombicola* je předmětem mnoha vědeckých výzkumů a bývá také využíván při průmyslové výrobě sophorolipidů. Kmen SB2 produkuje značné množství sophorolipidů a také dosáhl velmi dobrých výsledků v testu solubilizace antracenu a měření povrchového napětí. Kmen SA byl vybrán na základě výborných výsledků v testu emulgate, solubilizace antracenu a také proto, že sophorolipidy produkuje ve velkém množství.

#### 4.3.1 Schopnost utilizace různých zdrojů uhlíku

Vybrané kmeny byly nejdříve kultivovány v malém objemu média v jamkách mikrotitračních destiček. Byla použita kultivační média s různými zdroji uhlíku (fruktóza, glukóza, sacharóza, galaktóza, xylóza, laktóza, olej a glycerol), aby mohlo být pomocí stanovení optické denzity zjištěno, který uhlíkový zdroj je vybranými kmeny nejlépe využíván. Optická denzita byla měřena pomocí ELISA readeru při 630 nm ihned po připravení destiček a poté po ukončení kultivace v čase 72 h. Hodnota OD v čase 0 h byla od hodnoty v čase 72 h odečtena. Výsledné hodnoty OD jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10: Výsledná hodnota optické denzity kultivačních médií

kmen	fruktóza	glukóza	sacharóza	galaktóza
SB2	0,671 ± 0,029	0,628 ± 0,021	0,690 ± 0,044	0,275 ± 0,020
SA	0,922 ± 0,033	0,900 ± 0,022	0,918 ± 0,021	0,445 ± 0,021
kmen	xylóza	laktóza	olej	glycerol
SB2	0,247 ± 0,037	0,245 ± 0,027	0,284 ± 0,028	0,354 ± 0,039
SA	0,429 ± 0,046	0,405 ± 0,038	0,687 ± 0,034	0,580 ± 0,025

Z naměřených hodnot je patrné, že vzorky kmene SA mají obecně vyšší optickou denzitu než vzorky kmene SB2. To může být způsobeno rychlejším množením buněk. Oba kmeny vykazovaly nejvyšší růst buněk, a tedy nejlepší využití zdroje uhlíku v médiu obsahujícím fruktózu, sacharózu a glukózu. Poměrně dobře byl oběma kmeny využíván také olej a glycerol. Nejhorší schopnost využití byla zjištěna u média obsahujícího laktózu. To je zřejmě způsobeno tím, že tyto kmeny kvasinek nedisponují enzymem laktázou, díky kterému by byly schopny laktózu efektivně štěpit. Kmeny také velmi neochotně využívaly galaktózu a xylózu. Díky tomuto testu bylo zjištěno, že jednotlivé kmeny se od sebe ve schopnostech využití základních uhlíkových zdrojů příliš neliší, avšak kmen SA je obecně růstově dynamičtější.

#### 4.3.2 Kultivace za použití různých hydrofilních zdrojů uhlíku

V 500 ml Erlenmeyerových baňkách byl proveden experiment sledující vliv druhu hydrofilního uhlíkového zdroje na schopnost mikroorganismu produkovat sophorolipidy. Na základě výsledků předchozího testu, kde byly sledovány schopnosti využití základních uhlíkových zdrojů jednotlivými kmeny, byl pro kultivaci s různými hydrofilními uhlíkovými zdroji použit pouze kmen SB2.

##### 4.3.2.1 Stanovení obsahu biomasy

Schopnost růstu kmene SB2 v různém složení produkčního média byla vyhodnocena pomocí gravimetrického stanovení koncentrace biomasy a měření optické denzity média po ukončení kultivace. Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11: Koncentrace biomasy a optická denzita stanovená v médiích po ukončení kultivace

zdroj uhlíku	biomasa ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ )	OD
glukóza	$4,95 \pm 0,18$	$0,449 \pm 0,009$
manóza	$7,22 \pm 0,46$	$0,542 \pm 0,006$
sacharóza	$6,90 \pm 0,31$	$0,589 \pm 0,003$
galaktóza	$5,47 \pm 0,12$	$0,475 \pm 0,014$
fruktóza	$9,12 \pm 0,21$	$0,605 \pm 0,008$

Z hodnot uvedených v tabulce 11 je vidět, že nejlépe kmen SB2 rostl v produkčním médiu obsahujícím fruktózu. Značný růst buněk byl pozorován také v médiu obsahujícím manózu a sacharózu. Nejslabší růst byl zjištěn v médiích obsahujících galaktózu a glukózu. V některých případech hodnoty OD příliš nekorelují se stanovenou koncentrací biomasy. To může být způsobeno nedostatečným vymytím složky oleje z média při gravimetrickém stanovování koncentrace biomasy. Z tohoto důvodu lze považovat výsledky OD za přesnější.

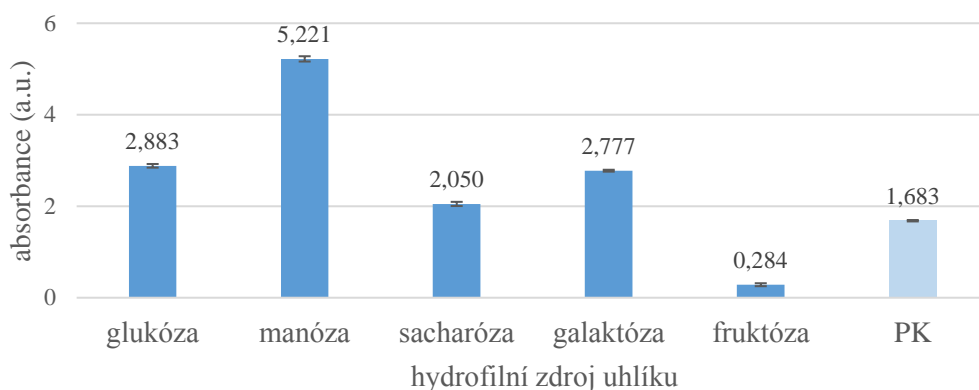
##### 4.3.2.2 Stanovení emulgační aktivity

Již při screeningu produkčních schopností jednotlivých kmenů bylo zjištěno, že kmen SB2 pravděpodobně produkuje biosurfaktanty, které nedisponují výraznými emulgačními schopnostmi. Je tedy pravděpodobné, že kmen SB2 produkuje téměř výhradně laktonickou formu sophorolipidů, která má spíše biocidní vlastnosti. Jako emulgační činidlo je využívána spíše acidická forma sophorolipidů [34]. Při kultivaci kmene SB2 v produkčních médiích

obsahujících různé hydrofilní zdroje uhlíku bylo zjištěno, že tato změna složení nemá vliv na emulgační vlastnosti produkovaných sophorolipidů. Žádný z testovaných supernatantů nevykazoval emulgační aktivitu.

#### 4.3.2.3 Solubilizace krystalického antracenu

Supernatant kmene SB2 vykazoval dobré výsledky v testu solubilizace antracenu již při počátečním screeningu. V tomto případě bylo testováno, jaký vliv má na míru solubilizace antracenu hydrofilní uhlíkový zdroj. Výsledné hodnoty absorbance jsou vyneseny v grafu na obrázku 21.

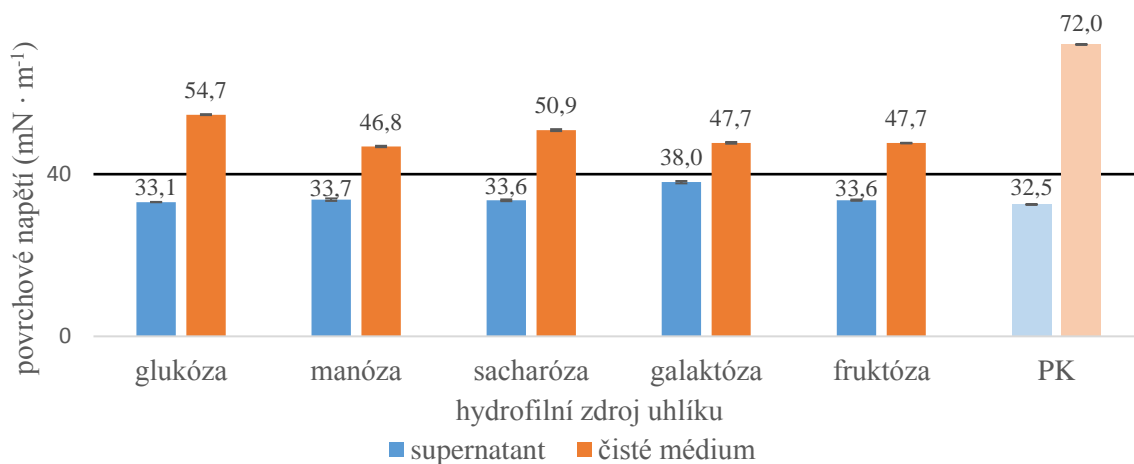


Obrázek 21: Naměřená absorbance vzorků

Na základě naměřených hodnot bylo zjištěno, že míra solubilizace antracenu v supernatantu je závislá na hydrofilním uhlíkovém zdroji použitým při kultivaci. Vzorek s obsahem fruktózy antracenu nesolubilizoval téměř vůbec. Naopak nejvyšší míru solubilizace antracenu, téměř dvakrát větší než ostatní vzorky, vykazoval vzorek s obsahem manózy. Avšak i vzorky obsahující glukózu, galaktózu a sacharózu byly schopny solubilizovat antracenu více než pozitivní kontrola.

#### 4.3.2.4 Měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring

Povrchové napětí supernatantů je hydrofilním zdrojem uhlíku ovlivněno velmi málo. Hodnoty naměřené pro supernatanty i čistá média znázorňuje obrázek 22.



Obrázek 22: Naměřené hodnoty povrchového napětí supernatantů a čistých médií

Naměřené povrchové napětí jednotlivých supernatantů je téměř stejné až na vzorek obsahující galaktózu, kde byla naměřená hodnota mírně vyšší. Za zmínku však stojí hodnoty naměřené v čistých médiích, které jsou samy o sobě poměrně nízké a relativně blízké hodnotě  $40 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ . Je tedy zřejmé, že složení produkčního média výrazně ovlivňuje jeho počáteční povrchové napětí. V porovnání s čistým médiem byl největší pokles povrchového napětí pozorován u vzorku s obsahem glukózy. K významnému poklesu povrchového napětí došlo také u vzorku obsahujícího sacharózu. Vzorky s obsahem manózy a fruktózy si byly v tomto ohledu podobné.

### 4.3.3 Kultivace za použití různých hydrofobních zdrojů uhlíku

Další experiment byl proveden s obměnou hydrofobního uhlíkového zdroje v produkčním médiu. Jako alternativa slunečnicového oleje (SO) byl použit olej kávový (KO) a dále odpadní olej indický (IO), švédský (ŠvO), čínský (ČO) a český fritovací (FO). Vzhledem k tomu, že se ve většině případů jedná o odpadní oleje, nelze předpokládat uniformitu jejich chování v různých podmínkách. Proto byly v upravených produkčních médiích kultivovány oba vybrané kmeny kvasinek (SB2 i SA).

#### 4.3.3.1 Stanovení obsahu biomasy

Obsah biomasy je použitým hydrofobním zdrojem uhlíku výrazně ovlivněn. Naměřené hodnoty také naznačují, že každý kmen je různými oleji ovlivněn jinak. Všechny hodnoty získané při stanovení obsahu biomasy v kultivačních médiích jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12: Koncentrace biomasy a optická denzita stanovená v médiích po ukončení kultivace: (SO) slunečnicový olej; (KO) kávový olej; (IO) indický olej; (ŠvO) švédský olej; (FO) fritovací olej; (ČO) čínský olej

kmen	zdroj uhlíku	biomasa ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ )	OD
SB2	SO	$4,95 \pm 0,18$	$0,449 \pm 0,009$
	KO	$4,74 \pm 0,06$	$0,498 \pm 0,008$
	IO	$4,89 \pm 0,11$	$0,431 \pm 0,009$
	ŠvO	$4,31 \pm 0,12$	$0,510 \pm 0,012$
	FO	$5,66 \pm 0,11$	$0,314 \pm 0,014$
	ČO	$5,01 \pm 0,16$	$0,411 \pm 0,011$
SA	SO	$8,78 \pm 0,21$	$0,266 \pm 0,007$
	KO	$10,47 \pm 0,15$	$0,576 \pm 0,008$
	IO	$9,13 \pm 0,04$	$0,268 \pm 0,016$
	ŠvO	$8,73 \pm 0,47$	$0,295 \pm 0,009$
	FO	$8,35 \pm 0,25$	$0,453 \pm 0,005$
	ČO	$7,89 \pm 0,24$	$0,398 \pm 0,005$

U kmene SB2 bylo nejvyššího obsahu biomasy dle OD dosaženo při použití švédského a kávového oleje. Nejmenší růst buněk byl podle OD pozorován při použití čínského oleje.

V případě kmene SA bylo nejvyššího nárůstu buněk dosaženo použitím kávového oleje. Nejmenší obsah biomasy byl stanoven v médiu s obsahem slunečnicového a indického oleje.

Získané hodnoty koncentrace biomasy mohou sloužit pouze jako orientační vzhledem k obtížně proveditelnému dokonalému promytí vzorků od zbytků použitých olejů.

#### 4.3.3.2 Stanovení emulgační aktivity

V tomto experimentu bylo opět potvrzeno, že kmen SB2 neprodukuje sophorolipidy s emulgačními vlastnostmi. U žádného vzorku kmene SB2 nebyla pozorována tvorba emulze. Naopak sophorolipidy produkované kmenem SA emulze tvoří velmi ochotně. Z výsledků testu je zřejmé, že použitý hydrofobní zdroj uhlíku má velký vliv na povahu vytvořené emulze. Stanovené emulgační indexy a popisy emulzí vytvořených supernatanty kmene SA jsou shrnuty v tabulce 13.

Tabulka 13: Emulgační indexy jednotlivých vzorků a popis emulgovaných vrstev: (SO) slunečnicový olej; (KO) kávový olej; (IO) indický olej; (ŠvO) švédský olej; (FO) fritovací olej; (ČO) čínský olej

kmen	zdroj uhlíku	E <sub>24</sub> (%)	popis emulgované vrstvy
SA	SO	43,6	kompaktní, homogenní, gelovitá, bíle zbarvená
	KO	28,0	velmi kompaktní, gelovitá, homogenní, nažloutle zbarvená
	IO	41,7	kompaktní, patrné malé bublinky, gelovitá
	ŠvO	20,0	méně kompaktní, patrné malé bublinky, bíle zbarvená
	FO	23,4	nekompaktní, velké bubliny, nehomogenní, bíle zbarvená
	ČO	25,5	nekompaktní, nehomogenní, velké bubliny
	NK	0,0	emulgovaná vrstva nebyla vytvořena
	PK	60,0	kompaktní, homogenní, gelovitá, bíle zbarvená

Největší emulgační aktivitu vykazovaly vzorky média se slunečnicovým a indickým olejem. Jejich emulze byly kompaktní až gelovité a měly homogenní strukturu v celém objemu. Velmi kompaktní, avšak nižší emulze byla vytvořena supernatantem média s obsahem kávového oleje. Emulgační aktivity ostatních vzorků si byly velmi podobné. Došlo u nich k tvorbě nižších nekompaktních a nehomogenních emulzí s patrnými bublinkami naznačujícími menší stabilitu emulzí.

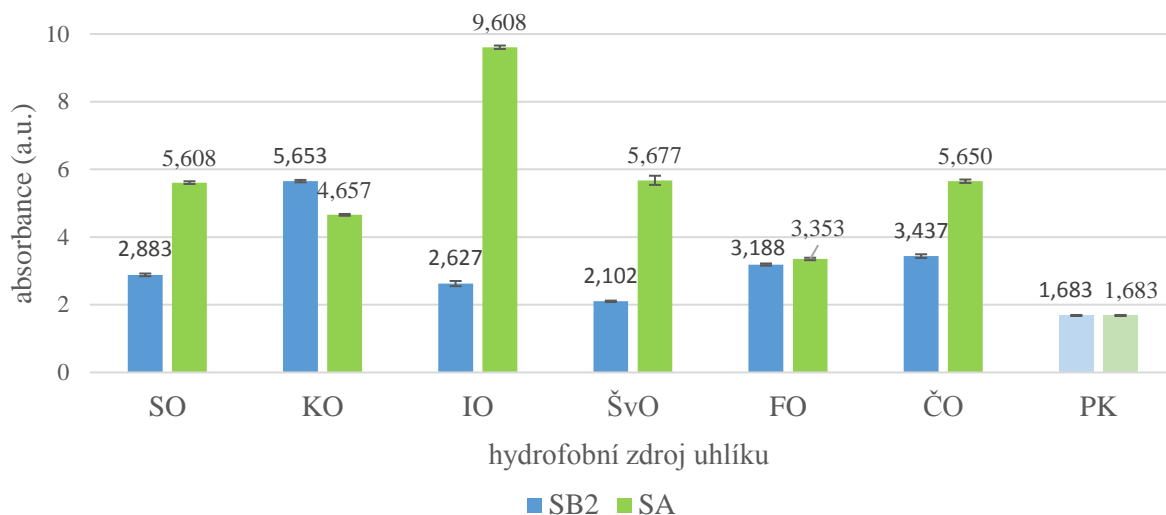
#### 4.3.3.3 Solubilizace krystalického antracenu

Supernatanty kmene SA mají obecně lepší schopnost solubilizace antracenu než supernatanty kmene SB2. Na každý kmen mělo obměněné složení produkčního média jiný vliv. Naměřené hodnoty jsou vyneseny do grafu na obrázku 23.

V případě kmene SB2 antracen jednoznačně nejlépe solubilizoval supernatant s obsahem kávového oleje. Naměřená hodnota v tomto vzorku byla přibližně dvakrát vyšší než u ostatních vzorků. Velmi dobře byl antracen solubilizován i v případě vzorků s čínským a fritovacím olejem, jejichž naměřené hodnoty byly vyšší než u referenčního vzorku s obsahem slunečnicového oleje.

Nejlepšího výsledku pro kmen SA bylo dosaženo při použití indického oleje. Naměřená hodnota v tomto vzorku byla opět téměř dvojnásobná oproti jiným vzorkům. Vysoká míra solubilizace antracenu byla zjištěna také ve vzorcích se švédským a čínským olejem, jejichž hodnoty byly srovnatelné s referenčním vzorkem obsahujícím slunečnicový olej.

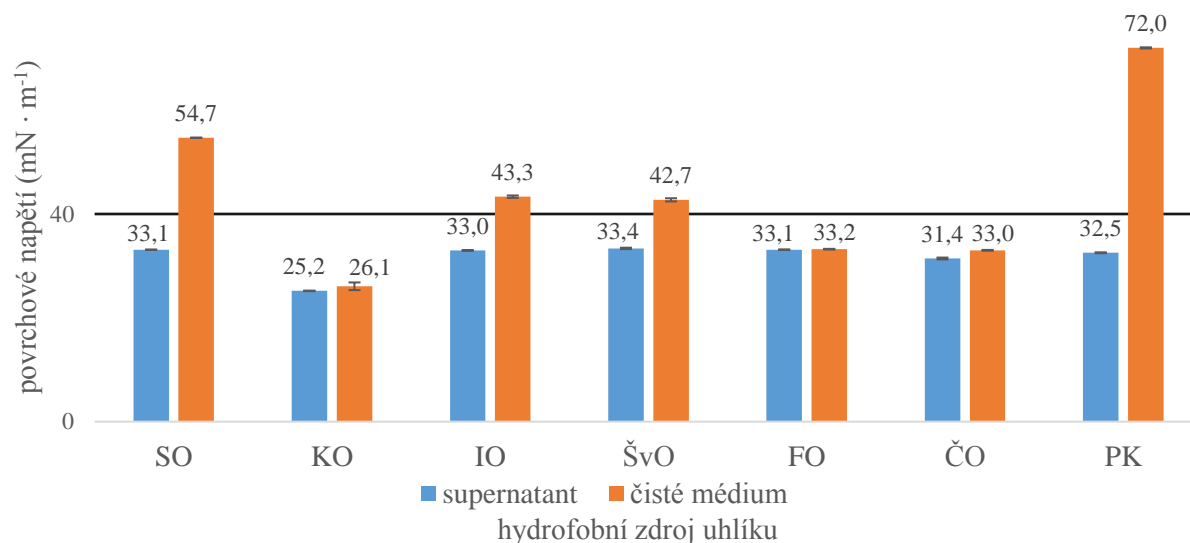
Ve všech vzorcích kmene SB2 i SA byla naměřena větší míra solubilizace než v pozitivní kontrole, což poukazuje na významnou koncentraci biosurfaktantů v kultivačních médiích.



Obrázek 23: Naměřená absorbance vzorků: (SO) slunečnicový olej; (KO) kávový olej; (IO) indický olej; (ŠvO) švédský olej; (FO) fritovací olej; (ČO) čínský olej

#### 4.3.3.4 Měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring

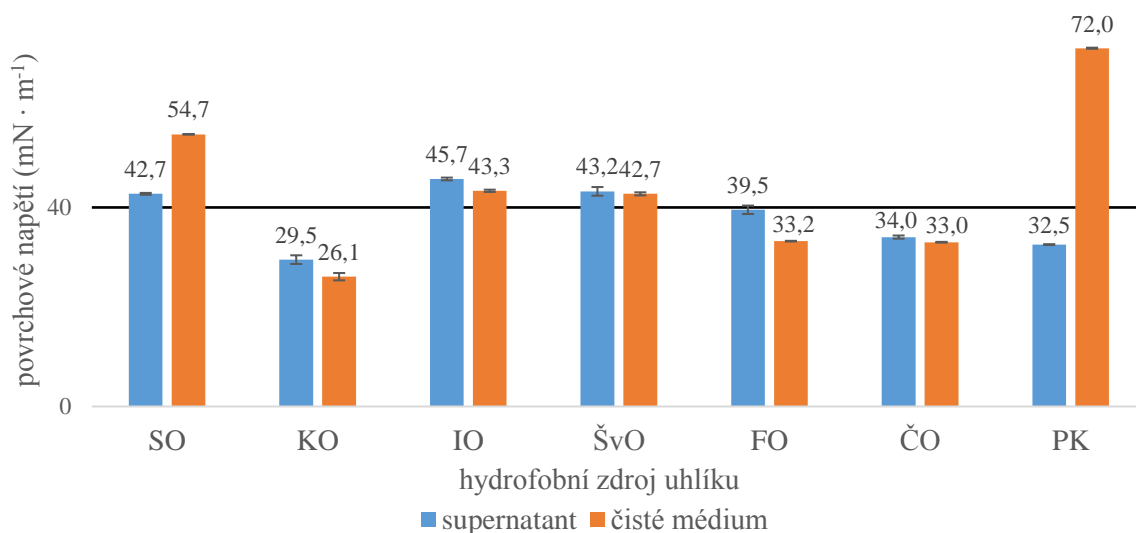
Druh hydrofobního uhlíkového zdroje značně ovlivňuje povrchovou aktivitu čistého média i supernatantu získaného po kultivaci mikroorganismu. Naměřené hodnoty povrchového napětí zobrazuje obrázek 24 pro vzorky kmene SB2 a obrázek 25 pro vzorky kmene SA.



Obrázek 24: Naměřené hodnoty povrchového napětí supernatantů kmene SB2 a čistých médií: (SO) slunečnicový olej; (KO) kávový olej; (IO) indický olej; (ŠvO) švédský olej; (FO) fritovací olej; (ČO) čínský olej

Při pohledu na obrázek 24 a obrázek 25 si můžeme všimnout, že druh použitého hydrofobního zdroje uhlíku má velký vliv na povrchové napětí čistých médií. Ve vzorcích s obsahem fritovacího, čínského a kávového oleje bylo povrchové napětí čistého média výrazně menší než  $40 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ . Tyto média proto nejsou vhodná pro testování produkce biosurfaktantů. V případě indického a švédského oleje bylo povrchové napětí vyšší než  $40 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ , avšak naměřené hodnoty byly této hranici velmi blízké. Z těchto výsledků lze usuzovat, že již samotné oleje obsahují velmi účinné povrchově aktivní látky a s výjimkou indického a švédského oleje nejsou pro další experimenty sledující produkci biosurfaktantů vhodné.

Kultivací kmene SB2 v médiích bylo ve všech případech dosaženo snížení povrchového napětí. Nejvíce bylo povrchové napětí supernatantu oproti čistému médiu sníženo při použití slunečnicového oleje. Z odpadních materiálů bylo významné snížení povrchového napětí zaznamenáno u vzorků obsahujících indický a švédský olej. V případě kávového, fritovacího a čínského oleje bylo povrchové napětí sníženo jen velmi málo, což je způsobeno tím, že povrchové napětí čistých médií je samo o sobě velmi nízké.



Obrázek 25: Naměřené hodnoty povrchového napětí supernatantů kmene SA a čistých médií: (SO) slunečnicový olej; (KO) kávový olej; (IO) indický olej; (ŠvO) švédský olej; (FO) fritovací olej; (ČO) čínský olej

Vzorky kmene SA mají obecně vyšší povrchové napětí než vzorky kmene SB2. Ke snížení povrchového napětí došlo pouze u vzorku obsahujícím slunečnicový olej. U tohoto vzorku však nedošlo ke snížení hodnoty pod  $40 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ , což je pravděpodobně způsobeno nízkou povrchovou aktivitou vyprodukovaných sophorolipidů. U ostatních vzorků nebyla patrná změna povrchového napětí nebo byly v supernatantech naměřeny vyšší hodnoty než v čistých médiích. Ke zvýšení povrchového napětí mohlo dojít proto, že mikroorganismy využily složky čistého média, které povrchové napětí výrazně snižovaly, a samy produkovaly surfaktanty, které nemají tak velkou povrchovou aktivitu.

#### 4.3.4 Kultivace vybraných kmenů na odpadních substrátech

Kmeny SB2 a SA byly v následujícím experimentu kultivovány v produkčních médiích obsahujících kombinaci odpadních zdrojů uhlíku. Jako hydrofilní zdroj uhlíku byl použit hydrolyzát syrovátky (SH), hydrolyzát kávové sedliny (KH) a roztok melasy (M). Jako nejlepší

hydrofobní zdroj uhlíku byl na základě předchozích výsledků vybrán indický odpadní olej (IO). Pro lepší vyhodnocení výsledků byla použita také média obsahující slunečnicový olej (SO).

#### 4.3.4.1 Koncentrace sacharidů v odpadních substrátech

Metodou stanovení redukujících sacharidů pomocí kyseliny 3,5-dinitrosalicylové bylo zjištěno, že připravený hydrolyzát syrovátky obsahuje redukující sacharidy v koncentraci  $23,14 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  a hydrolyzát kávové sedliny v koncentraci  $16,04 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Na základě informací z literatury bylo předpokládáno, že melasa sacharidy obsahuje přibližně z 50 % [79].

Pro další experimenty tedy byly jako hydrofilní zdroj uhlíku použity nezředěné hydrolyzáty a dále roztoky melasy zředěné tak, aby byl obsah sacharidů v roztoku přibližně  $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  (M 25) pro srovnání s hydrolyzáty a  $100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  (M 100) pro srovnání se základním produkčním médiem.

#### 4.3.4.2 Stanovení obsahu biomasy

Díky stanovení biomasy bylo zjištěno, jestli jsou kvasinky schopny využít použité odpadní substráty a jakého růstu jsou v konkrétním médiu schopny. Kmen SA opět vykazoval větší nárůst biomasy než kmen SB2. Výsledky stanovení obsahu biomasy jsou uvedeny v tabulce 14.

Tabulka 14: Koncentrace biomasy a optická densita stanovená v médiích po ukončení kultivace: (SO) slunečnicový olej; (IO) indický odpadní olej; (SH) hydrolyzát syrovátky; (KH) hydrolyzát kávové sedliny; (M 25) melasa  $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ; (M 100) melasa  $100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

kmen	substrát	biomasa ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ )	OD
SB2	SO + SH	$7,98 \pm 0,33$	$0,237 \pm 0,006$
	SO + KH	$4,54 \pm 0,08$	$0,303 \pm 0,005$
	SO + M 25	$7,20 \pm 0,05$	$0,378 \pm 0,006$
	IO + M 25	$8,06 \pm 0,07$	$0,369 \pm 0,008$
	SO + M 100	$6,21 \pm 0,35$	$0,585 \pm 0,006$
	IO + M 100	$10,77 \pm 0,11$	$0,599 \pm 0,011$
SA	SO + SH	$7,38 \pm 0,26$	$0,389 \pm 0,004$
	SO + KH	$9,71 \pm 0,13$	$0,492 \pm 0,006$
	SO + M 25	$9,94 \pm 0,23$	$0,511 \pm 0,004$
	IO + M 25	$10,76 \pm 0,23$	$0,497 \pm 0,010$
	SO + M 100	$9,99 \pm 0,18$	$0,866 \pm 0,005$
	IO + M 100	$13,83 \pm 0,14$	$0,877 \pm 0,004$

Jednoznačně nejvyšší růst biomasy obou použitých kmenů byl stanoven v médiu obsahujícím melasu o koncentraci  $100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  a indický olej. Dá se tedy říci, že toto složení je z testovaných kombinací pro kultivaci vybraných kmenů nejvhodnější. Velmi dobrých výsledků bylo dosaženo s použitím média obsahujícím melasu o koncentraci  $100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  a slunečnicový olej. Z těchto výsledků je zřejmé, že melasa použitá v dostatečné koncentraci je velmi slibný substrát pro kultivaci těchto kmenů. V médiích obsahujících melasu v koncentraci  $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  byl také zjištěn lepší růst buněk než v médiích obsahujících hydrolyzát syrovátky a kávové sedliny. To může být způsobeno mírně vyšší koncentrací zdroje uhlíku, pravděpodobněji však je, že uhlíkové zdroje obsažené v melase mohou kmény lépe využít. Při porovnání růstu kmenů v médiích využívajících hydrolyzáty bylo lepší výsledků



dosaženo u hydrolyzátu kávové sedliny, a to i přes fakt, že v něm byla stanovena menší koncentrace redukcí sacharidů než v hydrolyzátu syrovátky.

#### 4.3.4.3 Stanovení emulgační aktivity

Na rozdíl od všech ostatních testů emulgačních schopností, které byly v této práci provedeny, byla zjištěna emulgační aktivita supernatantu kmene SB2 kultivovaného v hydrolyzátu kávové sedliny. Vzhledem k tomu, že žádný jiný supernatant kmene SB2 nevykazoval emulgační aktivitu, je vysoce pravděpodobné, že značnou emulgační aktivitou disponuje samotný hydrolyzáte kávové sedliny. To potvrzuje i výsledek získaný pro supernatant kmene SA kultivovaného ve stejném médiu, který je výsledku vzorku kmene SB2 velmi podobný a zároveň poměrně odlišný od výsledků jiných vzorků kmene SA. Výsledné emulgační indexy a popisy vytvořených emulzí jsou shrnuty v tabulce 15.

Tabulka 15: Emulgační indexy jednotlivých vzorků a popis emulgovaných vrstev: (SO) slunečnicový olej; (IO) indický odpadní olej; (SH) hydrolyzáte syrovátky; (KH) hydrolyzáte kávové sedliny; (M 25) melasa 25 g · l<sup>-1</sup>; (M 100) melasa 100 g · l<sup>-1</sup>

kmen	substrát	E <sub>24</sub> (%)	popis emulgované vrstvy
SB2	SO + SH	0,0	emulgovaná vrstva nebyla vytvořena
	SO + KH	58,0	homogenní, kompaktní, gelovitá, světle hnědě zbarvená
	SO + M 25	0,0	emulgovaná vrstva nebyla vytvořena
	IO + M 25	0,0	emulgovaná vrstva nebyla vytvořena
	SO + M 100	0,0	emulgovaná vrstva nebyla vytvořena
	IO + M 100	0,0	emulgovaná vrstva nebyla vytvořena
SA	SO + SH	3,9	nehomogenní, nekompaktní, patrné malé bublinky
	SO + KH	60,0	homogenní, kompaktní, gelovitá, světle hnědě zbarvená
	SO + M 25	12,0	nehomogenní, nekompaktní, patrné malé bublinky, hnědě zbarvená
	IO + M 25	9,3	nehomogenní, nekompaktní, patrné velké bublinky, hnědě zbarvená
	SO + M 100	38,0	kompaktní, patrné malé bublinky, světle hnědě zbarvená
	IO + M 100	41,9	nehomogenní, nekompaktní, hnědě zbarvená, patrné velké bublinky
	NK	0,0	emulgovaná vrstva nebyla vytvořena
	PK	60,0	kompaktní, homogenní, gelovitá, bíle zbarvená

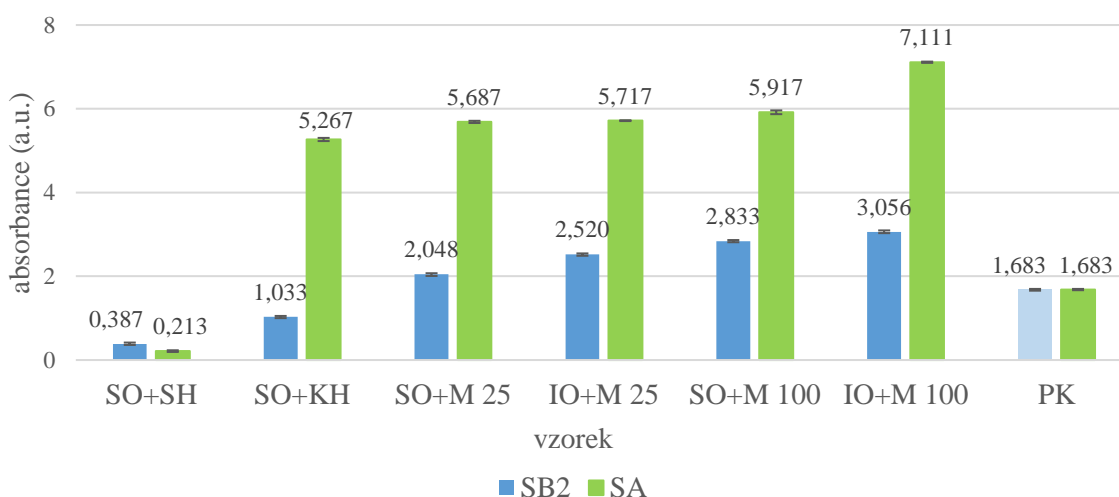
Pokud vyloučíme výsledky supernatantů obsahujících hydrolyzáte kávové sedliny, byl nejvyšší emulgační index stanoven u vzorků obsahujících melasu v koncentraci 100 g · l<sup>-1</sup>, přičemž lepší emulgační aktivitu vzhledem k charakteru vytvořené emulze vykazoval supernatant s obsahem slunečnicového oleje. Malou emulgační aktivitu vykazovaly také vzorky obsahující melasu v koncentraci 25 g · l<sup>-1</sup>. Míra emulgační aktivity vzorku s hydrolyzátem

syrovátky byla velmi malá. Z těchto výsledků lze usuzovat, že melasa je velmi vhodným substrátem pro produkci sophorolipidů.

#### 4.3.4.4 Solubilizace krystalického antracenu

Výsledky měření schopnosti vzorků solubilizovat antracen znázorňuje graf na obrázku 26.

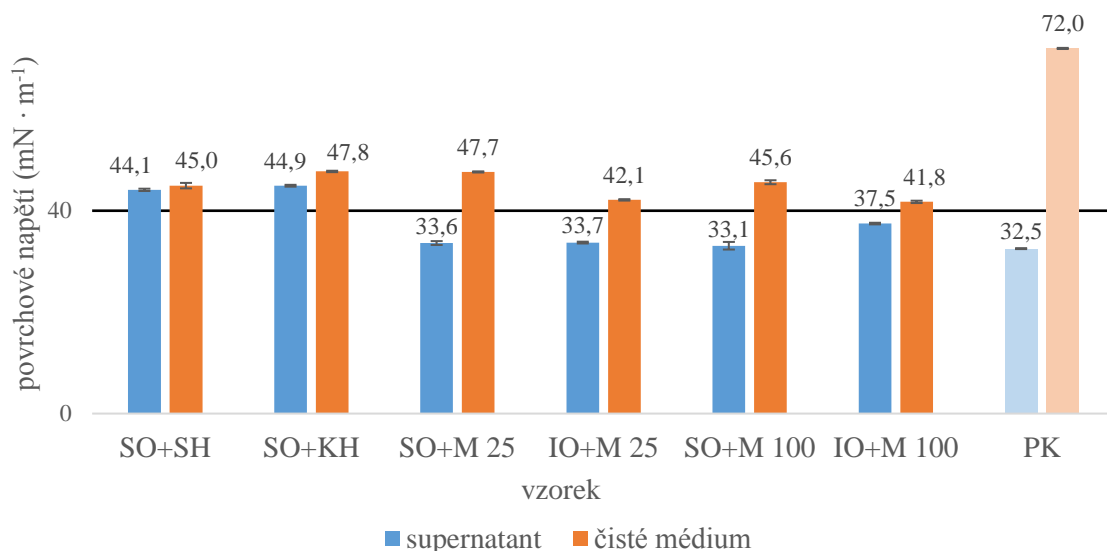
Vzorky kmene SB2 opět vykazují obecně menší míru solubilizace antracenu než vzorky kmene SA, avšak supernatant obsahující hydrolyzát syrovátky není schopen antracen solubilizovat téměř vůbec v případě obou kmenů. Největší koncentrace antracenu byla naměřena v supernatantech s obsahem melasy o koncentraci  $100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  a indického oleje. Také vzorky obsahující  $100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  melasy a slunečnicový olej dosahovaly velmi dobrých výsledů. Supernatanty obsahující  $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  melasy prokázaly značnou míru solubilizace antracenu i přes nízkou koncentraci hydrofilního zdroje uhlíku. Supernatant kmene SB2 s hydrolyzátem kávové sedliny byl schopen solubilizace antracenu, avšak v menší míře než pozitivní kontrola. Naopak v případě kmene SA bylo dosaženo výborného výsledku i u tohoto vzorku. Kmen SA tedy pravděpodobně snáze metabolizuje sacharidy obsažené v hydrolyzátu kávové sedliny než kmen SB2.



Obrázek 26: Naměřené hodnoty absorbance: (SO) slunečnicový olej; (IO) indický odpadní olej; (SH) hydrolyzát syrovátky; (KH) hydrolyzát kávové sedliny; (M 25) melasa  $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ; (M 100) melasa  $100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

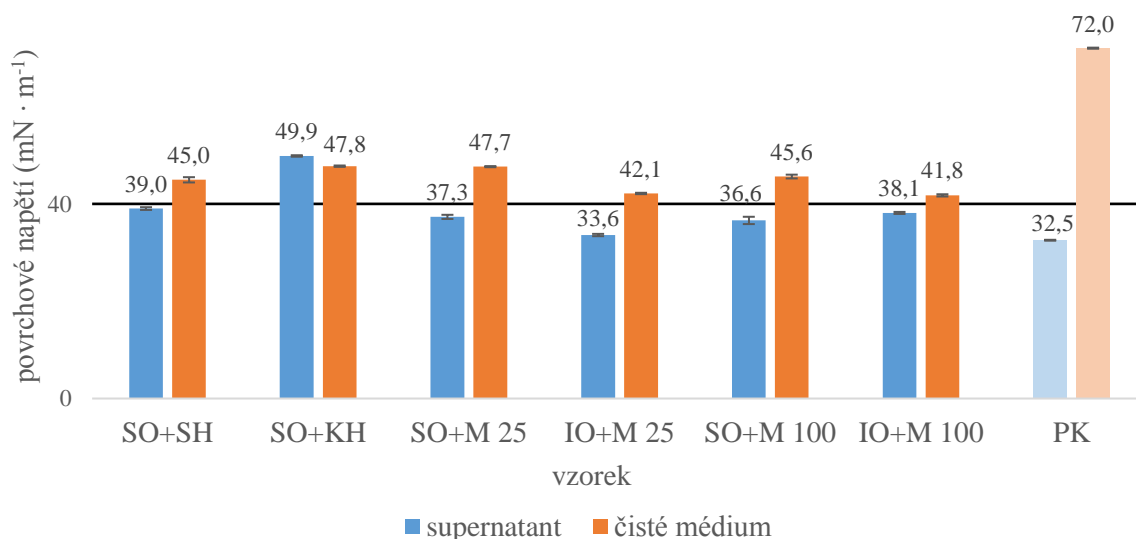
#### 4.3.4.5 Měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring

Výsledky měření povrchového napětí supernatantů kmene SB2 jsou vyneseny do grafu na obrázku 27. V případě médií obsahujících hydrolyzát syrovátky a kávové sedliny bylo povrchové napětí sníženo jen velmi málo a nedosáhlo pod hranici  $40 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ . Nejvíce bylo povrchové napětí oproti čistému médiu sníženo v případě kombinace melasy o koncentraci  $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  a slunečnicového oleje, ale výsledky všech vzorků obsahujících melasu jsou si velmi podobné vyjma média se  $100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  melasy a indickým olejem. V tomto médiu bylo povrchové napětí sníženo méně. Povrchová napětí čistých médií jsou však sama o sobě velmi nízká, je tedy obtížné ze získaných výsledků vyvodit jednoznačné závěry.



Obrázek 27: Naměřené hodnoty povrchového napětí supernatantů kmene SB2: (SO) slunečnicový olej; (IO) indický odpadní olej; (SH) hydrolyzát syrovátky; (KH) hydrolyzát kávové sedliny; (M 25) melasa 25 g · l<sup>-1</sup>; (M 100) melasa 100 g · l<sup>-1</sup>

Obrázek 28 zobrazuje výsledky měření povrchového napětí vzorků kmene SA. Jeho kultivace na rozdíl od kmene SB2 snížila povrchové napětí v médiu s hydrolyzátem syrovátky pod hodnotu 40 mN · m<sup>-1</sup>. V případě média s hydrolyzátem syrovátky však bylo povrchové napětí v supernatantu vyšší než v čistém médiu, což bylo pravděpodobně způsobeno metabolizací povrchově aktivních látek, které byly obsaženy již v čistém médiu. Podobně jako u kmene SB2 bylo největšího snížení povrchového napětí dosaženo v médiu obsahujícím melasu o koncentraci 25 g · l<sup>-1</sup> a slunečnicový olej. Nejnižší povrchové napětí pak bylo naměřeno ve vzorku s obsahem melasy o koncentraci 25 g · l<sup>-1</sup> a indickým olejem. Stejně jako pro kmen SB2 i zde platí, že rozdíly mezi jednotlivými výsledky jsou velmi malé a neumožňují jednoznačné určení nejlepšího produkčního média.



Obrázek 28: Naměřené hodnoty povrchového napětí supernatantů kmene SA: (SO) slunečnicový olej; (IO) indický odpadní olej; (SH) hydrolyzát syrovátky; (KH) hydrolyzát kávové sedliny; (M 25) melasa 25 g · l<sup>-1</sup>; (M 100) melasa 100 g · l<sup>-1</sup>

#### 4.4 Kultivace vybraných kmenů v bioreaktoru

Při kultivaci v bioreaktoru byl podrobněji zkoumán pouze kmen SA, a to v intervalech 24 hodin. Bylo tak učiněno z důvodu, že při použití supernatantů kmene SA bylo dosahováno lepší schopnosti solubilizace antracenu a emulgační aktivity a vyšších výtěžků při extrakci sophorolipidů. Bylo tedy předpokládáno, že rozdíly mezi odebranými vzorky budou výraznější. U kmene SB2 byly testy provedeny pouze pro vzorek odebraný po ukončení kultivace v bioreaktoru.

Vzhledem k tomu, že sophorolipidy jsou sekundární metabolity, byl první vzorek odebrán až po dosažení stacionární fáze růstu, tedy po 48 h.

##### 4.4.1 Stanovení koncentrace sophorolipidů extrakcí ethylacetátem

V každém odebraném vzorku byla pomocí extrakce ethylacetátem stanovena koncentrace sophorolipidů. Tímto způsobem byl zkoumán vliv doby kultivace v bioreaktoru na množství vyprodukovaných sophorolipidů. Pro snížení náročnosti experimentu na množství potřebného vzorku byla extrakce provedena pouze s 40 ml odebraného kultivačního média. Stanovené hodnoty koncentrací jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16: Koncentrace sophorolipidů v jednotlivých vzorcích

kmen	čas (h)	c SL ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ )
SA	48	7,9
	72	32,5
	96	31,7
	120	32,8
	144	31,9
	168	32,2
SB2	144	23,5

Ze stanovených hodnot je patrné, že vliv doby kultivace kmene SA na množství vyprodukovaných sophorolipidů není při použitém nastavení experimentu výrazný. Jak se dalo předpokládat, nejmenší koncentrace byla naměřena ve vzorku odebraném po 48 hodinách. Maximální koncentrace sophorolipidů bylo dosaženo již po 72 hodinách kultivace. V dalších vzorcích je pak stanovena koncentrace sophorolipidů velmi podobná a dá se předpokládat, že rozdíly mezi hodnotami jsou pravděpodobně způsobeny nepřesností použité metody. Použitá metoda poskytuje pouze orientační výsledky vzhledem k obtížím při vymývání zbytků oleje a také z důvodu použití relativně malého množství vzorku.

Při kultivaci kmene SB2 bylo dosaženo menší výtěžnosti než v případě kmene SA, avšak koncentrace sophorolipidů v médiu stále dosahuje vysokých hodnot. U obou kmenů bylo kultivací v bioreaktoru dosaženo větší výtěžnosti sophorolipidů než při kultivaci v Erlenmeyerových baňkách.

#### 4.4.2 Stanovení emulgační aktivity

V tomto testu bylo nejvíce patrné, že při kultivaci kvasinek v bioreaktoru je produkována směs sophorolipidů v jiném složení než při kultivaci v Erlenmeyerových baňkách. Výsledky testu jsou shrnuty v tabulce 17.

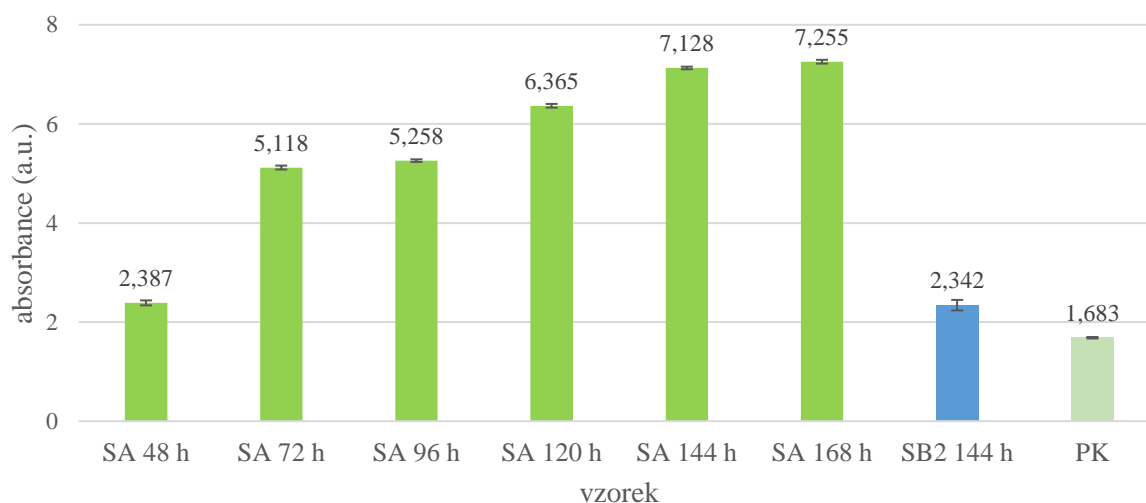
Tabulka 17: Emulgační indexy jednotlivých vzorků a popis emulgovaných vrstev

kmen	čas (h)	E <sub>24</sub> (%)	popis emulgované vrstvy
SA	48	8,2	nehomogenní, nekompaktní, značně perforovaná
	72	32,7	nekompaktní, nehomogenní, perforovaná
	96	31,0	nekompaktní, nehomogenní, patrné bubliny
	120	30,9	nekompaktní, nehomogenní, patrné malé bublinky
	144	30,6	nekompaktní, nehomogenní, patrné bubliny
	168	31,4	nekompaktní, nehomogenní, patrné bublinky
SB2	144	0,0	emulgovaná vrstva nebyla vytvořena
NK		0,0	emulgovaná vrstva nebyla vytvořena
PK		60,0	kompaktní, homogenní, gelovitá, bíle zbarvená

Kmen SB2 ani při kultivaci v bioreaktoru neprodukoval sophorolipidy, které by byly aktivní v tvorbě emulzí. Kmen SA, který při kultivaci v Erlenmeyerových baňkách dosahoval výsledků téměř totožných s pozitivní kontrolou, však při kultivaci v bioreaktoru produkoval sophorolipidy s velmi odlišnými vlastnostmi. Již po 48 hodinách kultivace byla zjištěna emulgační aktivita supernatantu a po 72 hodinách bylo dosaženo maximálního emulgačního indexu. Vytvořené emulze však byly poměrně nízké, nehomogenní a značně perforované. Lepší emulgační aktivity nebylo dosaženo ani po delší době kultivace. Tyto výsledky potvrzují, že podmínky kultivace mají značný vliv na vlastnosti vyprodukovaných sophorolipidů.

#### 4.4.3 Solubilizace krystalického antracenu

Bylo pozorováno, zda míra solubilizace antracenu závisí na době kultivace v bioreaktoru. Výsledky jsou zobrazeny v grafu na obrázku 29.

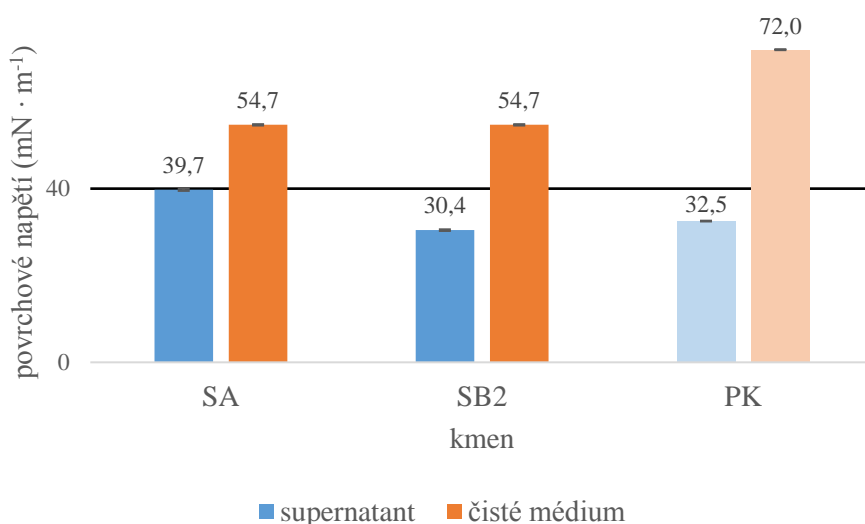


Obrázek 29: Naměřené hodnoty absorbance jednotlivých vzorků

Výsledky dokazují, že doba kultivace má vliv na schopnost supernatantu solubilizovat antracen. Čím déle kultivace probíhala, tím vyšší míry solubilizace antracenu bylo dosaženo. Po 168 hodinách kultivace kmene SA byla naměřena třikrát větší absorbance vzorku než v čase 48 hodin. Z výsledků je také patrné, že kmen SB2 má výrazně nižší schopnost solubilizace antracenu než kmen SA i při kultivaci v bioreaktoru. Po 144 hodinách kultivace kmene SB2 byla naměřena téměř stejná koncentrace solubilizovaného antracenu jako po kultivaci kmene SA trvajících pouhých 48 hodin.

#### 4.4.4 Měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring

Měření povrchového napětí bylo provedeno pouze u vzorků odebraných po ukončení kultivace v bioreaktoru. Bylo tak učiněno z důvodu větší náročnosti měření na množství vzorku. Pokud by mělo být odebráno dostatečné množství vzorku každých 24 h, došlo by postupně k významnému snížení objemu média v bioreaktoru, což by mohlo mít vliv na celý experiment. Naměřené hodnoty jsou vyneseny do grafu na obrázku 30.



Obrázek 30: Naměřené hodnoty povrchového napětí supernatantů jednotlivých kmenů

Kultivací kmene SA v bioreaktoru bylo sníženo povrchové napětí média mírně pod hranici 40 mN · m<sup>-1</sup>, což je lepší výsledek, než jakého bylo dosaženo kultivací ve stejném médiu v Erlenmeyerových baňkách. Je tedy možné předpokládat, že došlo k produkci většího množství sophorolipidů nebo alespoň k produkci směsi s jiným složením jednotlivých forem sophorolipidů.

Mnohem lepšího výsledku však bylo dosaženo kultivací kmene SB2, kde bylo povrchové napětí sníženo výrazně pod hranici 40 mN · m<sup>-1</sup> a dokonce i pod hodnotu naměřenou pro pozitivní kontrolu. I zde je tedy možné se domnívat, že došlo k vyšší produkci sophorolipidů než při kultivaci v baňkách.

## 5 ZÁVĚR

Cílem práce bylo prozkoumat schopnost produkce sophorolipidů u vybraných mikroorganismů a na základě provedených testů posoudit jak produkční potenciál jednotlivých kmenů, tak vliv složení produkčního média na kvalitu a kvantitu vyprodukovaných sophorolipidů.

V první části experimentální práce bylo kultivováno šest kmenů kvasinek rodu *Starmerella* a byl testován jejich produkční potenciál. Schopnost produkce sophorolipidů jednotlivými kmeny byla vyhodnocena na základě výsledků testování emulgační aktivity, schopnosti solubilizovat krystalický antracen, měření povrchového napětí metodou Du-Nouy-Ring a stanovení koncentrace sophorolipidů pomocí extrakce ethylacetátem. Poslední jmenovanou metodu bylo nutno nejprve optimalizovat a až poté ji bylo možné zahrnout do použitých testů. Čistota vyextrahovaných sophorolipidů byla analyzována pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací.

Největší produkční potenciál vykázal kmen *Starmerella bombicola* CBS 6009 a *Starmerella anomalae* CBS 14178. Oba kmeny produkovaly velké množství sophorolipidů a dosáhly výborných výsledků při testování vlastností vyprodukovaných biosurfaktantů. Sophorolipidy vyprodukované kmenem *Starmerella bombicola* CBS 6009 výrazně snižovaly povrchové napětí kultivačního média a významně napomáhaly solubilizaci krystalického antracenu, nevykazovaly však žádnou emulgační aktivitu. Sophorolipidy produkované kmenem *Starmerella anomalae* CBS 14178 naopak vykazovaly výbornou emulgační aktivitu a schopnost solubilizace antracenu, avšak povrchové napětí média snižovaly jen velmi málo. Je tedy zřejmé, že každý kmen produkoval směs sophorolipidů s odlišným poměrem laktonických a acidických forem a s různou mírou acetylace. Na základě porovnání infračervených spekter vzorků se spektry standardů je možné říci, že kmen *Starmerella bombicola* produkoval spíše laktonickou formu a kmen *Starmerella anomalae* spíše acidickou formu sophorolipidů.

Druhá část experimentální práce byla věnována kultivaci dvou vybraných kmenů s nejlepším produkčním potenciálem v médiích s různým složením, kdy byl pozorován vliv jednotlivých složek médií na míru produkce sophorolipidů. V produkčním médiu byl obměňován jak hydrofilní, tak hydrofobní zdroj uhlíku a testovány byly také různé odpadní materiály. Při použití odpadních substrátů však bylo zjištěno, že některé pravděpodobně samy obsahují povrchově aktivní látky, a proto jsou nevhodné pro testování mikrobiální produkce biosurfaktantů. Bylo zjištěno, že povaha uhlíkových zdrojů má významný vliv na kvalitu produkovaných biosurfaktantů. Nejlepších celkových výsledků bylo dosaženo při použití základního produkčního média obsahujícího glukózu a slunečnicový olej. Výborných celkových výsledků však bylo dosaženo také při použití odpadních substrátů, konkrétně melasy jako hydrofilního zdroje uhlíku a odpadního oleje původem z Indie jako hydrofobního zdroje uhlíku. Je však obtížné posoudit, do jaké míry jsou dobré výsledky způsobeny látkami obsaženými v samotných odpadních substrátech.

Testována byla také kultivace vybraných kmenů v bioreaktoru s použitím základního produkčního média. Díky těmto experimentům bylo možné prozkoumat, jaký vliv na produkci sophorolipidů mají kontrolované podmínky a dlouhotrvající kultivace. Při kultivaci kmenů v bioreaktoru bylo dosaženo vyšší koncentrace sophorolipidů. Maximální koncentrace sophorolipidů bylo dosaženo již po 72 hodinách kultivace. Sophorolipidy vyprodukované

v bioreaktoru ve většině případů dosahovaly lepších výsledků v provedených testech než sophorolipidy produkované v Erlenmeyerových baňkách.

U kmene *Starmerella anomalae* nebyla nikdy dříve produkce biosurfaktantů testována. Z dostupných výsledků lze usoudit, že je to velmi zajímavý producent sophorolipidů, který v mnoha ohledech dosahuje lepších výsledků než standardně používaný kmen *Starmerella bombicola*. Kmen *Starmerella anomalae* se zdá být růstově dynamičtější a produkuje větší množství sophorolipidů, které mají vynikající emulgační aktivitu a jsou velmi dobře schopny napomáhat solubilizaci antracenu.

V navazujících experimentech by bylo vhodné zkoumat další alternativy zdrojů uhlíku při kultivaci, a to zejména v oblasti hydrofobních látek. Například by bylo možné testovat produkci sophorolipidů v médiích obsahujících různé tuky živočišného původu. Zkoumání by mohl být podroben také vliv koncentrace hydrofobního uhlíkového zdroje na míru produkce sophorolipidů. Dále by bylo přínosné provést experimenty kultivace kvasinek v bioreaktorech v jiném režimu než vsádkovém, který byl zkoumán v této práci. Za režim s velkým potenciálem považuji fed-batch systém, ve kterém by byly do bioreaktoru po dosažení stacionární fáze přidávány oba typy zdrojů uhlíku, čímž by mohlo být dosaženo lepší výtěžnosti procesu. Dalším předmětem zkoumání by mohl být vliv jednotlivých parametrů kultivace na složení směsi vyprodukovaných sophorolipidů.



## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BANAT, I. M., R. S. MAKKAR a S. S. CAMEOTRA. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2000, **53**(5), 495-508 [cit. 2018-12-11]. DOI: 10.1007/s002530051648. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530051648>
- [2] VAN BOGAERT, Inge N.A., Jinxin ZHANG a Wim SOETAERT. Microbial synthesis of sophorolipids. *Process Biochemistry* [online]. 2011, **46**(4), 821-833 [cit. 2018-12-11]. DOI: 10.1016/j.procbio.2011.01.010. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135951131100016X>
- [3] SANTOS, Danyelle, Raquel RUFINO, Juliana LUNA, Valdemir SANTOS a Leonie SARUBBO. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2016, **17**(3) [cit. 2018-12-11]. DOI: 10.3390/ijms17030401. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/3/401>
- [4] NITSCHKE, M. a S.G.V.A.O. COSTA. Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2007, **18**(5), 252-259 [cit. 2018-12-17]. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.01.002. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224407000362>
- [5] RAHMAN, Pattanathu K.S.M. a Edward GAKPE. Production, Characterisation and Applications of Biosurfactants-Review. *Biotechnology(Faisalabad)* [online]. 2008, **7**(2), 360-370 [cit. 2018-12-17]. DOI: 10.3923/biotech.2008.360.370. ISSN 1682296X. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=biotech.2008.360.370>
- [6] MD, Fakruddin. Biosurfactant: Production and Application. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology* [online]. 2012, **03**(04) [cit. 2018-12-11]. DOI: 10.4172/2157-7463.1000124. ISSN 21577463. Dostupné z: <https://www.omicsonline.org/biosurfactant-production-and-application-2157-7463-3-124.php?aid=7497>
- [7] Biosurfactants: Definition, Classification, Production and Applications | Industrial Biotechnology. *Bio Technology* [online]. 2018 [cit. 2018-12-17]. Dostupné z: <http://www.biotechnologynotes.com/industrial-biotechnology/biosurfactants/biosurfactants-definition-classification-production-and-applications-industrial-biotechnology/14024>
- [8] Types of surfactant monomers formation. In: *Bio Technology* [online]. b.r. [cit. 2018-12-17]. Dostupné z: [http://www.biotechnologynotes.com/wp-content/uploads/2018/07/clip\\_image002-3.jpg](http://www.biotechnologynotes.com/wp-content/uploads/2018/07/clip_image002-3.jpg)
- [9] VIGNESHWARAN, C., M.Jerold, K. VASANTHARAJ a V. SIVASUBRAMANIAN. A Review on Biosurfactants and its Environmental Applications. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology* [online]. 2016, **10**(08), 152-160 [cit. 2018-12-11]. DOI: 10.9790/2402-100802152160. ISSN 23192399. Dostupné z: <http://iosrjournals.org/iosr-jestft/papers/vol10-issue8/Version-2/S100802152160.pdf>

- [10] VIJAYAKUMA, S. a V. SARAVANAN. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Research Journal of Microbiology* [online]. 2015, **10**(5), 181-192 [cit. 2018-12-11]. DOI: 10.3923/jm.2015.181.192. ISSN 18164935. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=jm.2015.181.192>
- [11] BALTZ, Richard H., Vivian MIAO a Stephen K. WRIGLEY. Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics. *Natural Product Reports* [online]. 2005, **22**(6) [cit. 2018-12-15]. DOI: 10.1039/b416648p. ISSN 0265-0568. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b416648p>
- [12] ARIMA, Kei, Atsushi KAKINUMA a Gakuzo TAMURA. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1968, **31**(3), 488-494 [cit. 2018-12-15]. DOI: 10.1016/0006-291X(68)90503-2. ISSN 0006291X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006291X68905032>
- [13] COMPOUND: C12043. In: *KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* [online]. Kyoto, 1995-2019 [cit. 2019-02-25]. Dostupné z: [https://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?C12043](https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?C12043)
- [14] GAUTAM, K.K. a V.K. TYAGI. Microbial Surfactants: A Review. *Journal of Oleo Science* [online]. 2006, **55**(4), 155-166 [cit. 2018-12-16]. DOI: 10.5650/jos.55.155. ISSN 1345-8957. Dostupné z: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/55/4/55\\_4\\_155/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/55/4/55_4_155/_article)
- [15] KRETSCHMER, Axel, Hans BOCK a Fritz WAGNER. Chemical and Physical Characterization of Interfacial-Active Lipids from *Rhodococcus erythropolis* Grown on n-Alkanes. *Applied and Environmental Microbiology*. [online]. 1982, **44**(4), 864-870 [cit. 2018-12-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC242110/>
- [16] WU, Dongmin a Vladimir HORNOF. Dynamic Interfacial Tension in Hexadecane/Water Systems Containing Ready-Made and *in-situ*-formed Surfactants. *Chemical Engineering Communications* [online]. 2007, **172**(1), 85-106 [cit. 2018-12-16]. DOI: 10.1080/00986449908912765. ISSN 0098-6445. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00986449908912765>
- [17] Phosphatidylethanolamine, bovine. In: *Matreya LCC: Lipids and Biochemicals* [online]. State College, 2015 [cit. 2019-02-25]. Dostupné z: [https://www.matreya.com/products/phosphatidylethanolamine-bovine\\_\\_1069.aspx](https://www.matreya.com/products/phosphatidylethanolamine-bovine__1069.aspx)
- [18] RON, Eliora Z a Eugene ROSENBERG. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2002, **13**(3), 249-252 [cit. 2018-12-16]. DOI: 10.1016/S0958-1669(02)00316-6. ISSN 09581669. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166902003166>
- [19] CHAKRABARTI, S. *Bacterial Biosurfactant: Characterization, Antimicrobial and Metal Remediation Properties*. 2012. Ph.D. thesis. National Institute of Technology.

- [20] CIRIGLIANO, Michael C. a George M. CARMAN. Purification and Characterization of Liposan, a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1985, **50**(4), 846. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/content/50/4/846.abstract>
- [21] SOMASUNDARAN, Ponisseril, Partha PATRA, John Albino DOMINIC a Indumathi NAMBI. Microbially Derived Biosurfactants: Sources, Design and Structure-Property Relationships. *Surfactant Science and Technology*. CRC Press Taylor & Francis Group, 2014, s. 593. ISBN 9781439882955.
- [22] KÄPPELI, O. a W. R. FINNERTY. Partition of Alkane by an Extracellular Vesicle Derived from Hexadecane-Grown *Acinetobacter*. *Journal of Bacteriology* [online]. 1979, **140**(2), 707-712 [cit. 2018-12-16]. Dostupné z: <https://jb.asm.org/content/jb/140/2/707.full.pdf>
- [23] KARANTH, N. G. K., P. G. DEO a N. K. VEENANADIG. Microbial production of biosurfactants and their importance. *Current Science* [online]. 1999, **77**(1), 116-126 [cit. 2018-12-16]. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/24102919>
- [24] ROY, Arpita. A Review on the Biosurfactants: Properties, Types and its Applications. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications* [online]. 2018, **08**(01) [cit. 2018-12-11]. DOI: 10.4172/2090-4541.1000248. ISSN 20904541. Dostupné z: <https://www.omicsonline.org/open-access/a-review-on-the-biosurfactants-properties-types-and-its-applications-2090-4541-1000248-98695.html>
- [25] MAIER, Raina M. Maier. Microbial Surfactants (Biosurfactants). In: *Environmental Microbiology Group* [online]. 2009 [cit. 2019-02-25]. Dostupné z: [https://cals.arizona.edu/swes/maier\\_lab/surfactants.html](https://cals.arizona.edu/swes/maier_lab/surfactants.html)
- [26] FOLEY, Patrick, Azadeh KERMANSHAHI POUR, Evan S. BEACH a Julie B. ZIMMERMAN. Derivation and synthesis of renewable surfactants. *Chem. Soc. Rev* [online]. 2012, **41**(4), 1499-1518 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1039/C1CS15217C. ISSN 0306-0012. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C1CS15217C>
- [27] SMYTH, T. J. P., A. PERFUMO, R. MARCHANT a I. M. BANAT. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. London: Springer, 2010, s. 3705-3724. ISBN 9783540775881.
- [28] ASMER, Hans-Joachim, Siegmund LANG, Fritz WAGNER a Victor WRAY. Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 1988, **65**(9), 1460-1466 [cit. 2018-10-14]. DOI: 10.1007/BF02898308. ISSN 0003-021X. Dostupné z: <https://link-springer-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/article/10.1007/BF02898308>
- [29] TULLOCH, A. P., A. HILL a J. F. T. SPENCER. Structure and reactions of lactonic and acidic sophorosides of 17-hydroxyoctadecanoic acid. *Canadian Journal of Chemistry* [online]. 1968, **46**(21), 3337-3351 [cit. 2018-12-17]. DOI: 10.1139/v68-551. ISSN 0008-4042. Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/v68-551>

- [30] OTTO, R. T., H. J. DANIEL, G. PEKIN, K. MÜLLER-DECKER, G. FÜRSTENBERGER a C. SYLDATK. Production of sophorolipids from whey. II. Product composition, surface active properties, cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 1999, **52**(4), 495-501 [cit. 2018-12-17]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10570796>
- [31] HU, Yongmei a Lu-Kwang JU. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2001, **29**(10), 593-601 [cit. 2018-12-17]. DOI: 10.1016/S0141-0229(01)00439-2. ISSN 01410229. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022901004392>
- [32] NUÑEZ, A. a R. ASHBY. Analysis and characterization of sophorolipids by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization. *Chromatographia* [online]. 2001, **53**(11-12), 673-677 [cit. 2018-12-17].
- [33] PRICE, Neil P.J., Karen J. RAY, Karl E. VERMILLION, Christopher A. DUNLAP a Cletus P. KURTZMAN. Structural characterization of novel sophorolipid biosurfactants from a newly identified species of *Candida* yeast. *Carbohydrate Research* [online]. 2012, **348**, 33-41 [cit. 2018-12-17]. DOI: 10.1016/j.carres.2011.07.016. ISSN 00086215. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621511003740>
- [34] Review: Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it's Applications. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research (IJBR)* [online]. 2015, **6**(2), 161-174 [cit. 2018-11-2]. ISSN 2278-599X. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/276270446\\_Review\\_Sophorolipids\\_A\\_Promising\\_Biosurfactant\\_and\\_it's\\_Applications](https://www.researchgate.net/publication/276270446_Review_Sophorolipids_A_Promising_Biosurfactant_and_it's_Applications)
- [35] VAN BOGAERT, Inge N. A., Karen SAERENS, Cassandra DE MUYNCK, Dirk DEVELTER, Wim SOETAERT a Erick J. VANDAMME. Microbial production and application of sophorolipids. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2007, **76**(1), 23-34 [cit. 2018-12-11]. DOI: 10.1007/s00253-007-0988-7. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-007-0988-7>
- [36] HOMMEL, R.K., L. WEBER, A. WEISS, U. HIMMELREICH, O. RILKE a H.-P. KLEBER. Production of sophorose lipid by *Candida* (*Torulopsis*) *apicola* grown on glucose. *Journal of Biotechnology* [online]. 1994, **33**(2), 147-155 [cit. 2018-12-17]. DOI: 10.1016/0168-1656(94)90107-4. ISSN 01681656. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168165694901074>
- [37] CASAS, JoséA. a Félix GARCÍA-OCHOA. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: Medium composition and culture methods. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 1999, **88**(5), 488-494 [cit. 2018-12-17]. DOI: 10.1016/S1389-1723(00)87664-1. ISSN 13891723. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172300876641>
- [38] GOBBERT, U., S. LANG a F. WAGNER. Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*. *Biotechnology Letters* [online]. 1984, **6**(4), 225-230 [cit.

- 2019-01-29]. DOI: 10.1007/BF00140041. ISSN 0141-5492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00140041>
- [39] DAVILA, Anne-Marie, Romy MARCHAL a Jean-Paul VANDECASTEELE. Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorose lipid production by *Candida bombicola*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 1992, **38**(1), 6-11 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1007/BF00169410. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00169410>
- [40] GUILMANOV, Vladimir, Alberto BALLISTRERI, Giuseppe IMPALLOMENI a Richard A. GROSS. Oxygen transfer rate and sophorose lipid production by *Candida bombicola*. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2002, **77**(5), 489-494 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1002/bit.10177. ISSN 0006-3592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.10177>
- [41] SHAH, Mansoor Ul Hassan, Magaret SIVAPRAGASAM, Muhammad MONIRUZZAMAN, Md. Mahabubur Rahman TALUKDER, Suzana Bt YUSUP a Masahiro GOTO. Production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* yeast using new hydrophobic substrates. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2017, **127**(2017), 60-67 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1016/j.bej.2017.08.005. ISSN 1369703X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X17302085>
- [42] SOLAIMAN, Daniel K. Y., Richard D. ASHBY, Jonathan A. ZERKOWSKI a Thomas A. FOGLIA. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. *Biotechnology Letters* [online]. 2007, **29**(9), 1341-1347 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1007/s10529-007-9407-5. ISSN 0141-5492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-007-9407-5>
- [43] DAVEREY, Achlesh a Kannan PAKSHIRAJAN. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. *Food Research International* [online]. 2009, **42**(4), 499-504 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.01.014. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996909000192>
- [44] ASHBY, Richard D., Daniel K. Y. SOLAIMAN a Thomas A. FOGLIA. The Use of Fatty Acid Esters to Enhance Free Acid Sophorolipid Synthesis. *Biotechnology Letters* [online]. 2006, **28**(4), 253-260 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1007/s10529-005-5527-y. ISSN 0141-5492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-005-5527-y>
- [45] DANIEL, Hans-J., Ralf T. OTTO, Matthias REUSS a Christoph SYLDATK. Sophorolipid Production with High Yields on Whey Concentrate and Rapeseed Oil without Consumption of Lactose. *Biotechnology Letters* [online]. 1998, **20**(8), 805-807 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1023/B:BILE.0000015927.29348.1a. ISSN 0141-5492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/B:BILE.0000015927.29348.1a>
- [46] DANIEL, Hans-Joachim, Matthias REUSS a Christoph SYLDATK. Production of sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola* ATCC 22214 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. *Biotechnology Letters* [online]. 1998, **20**(12), 1153-1156 [cit.

- 2019-01-29]. DOI: 10.1023/A:1005332605003. ISSN 01415492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1005332605003>
- [47] RIBEIRO, Isabel A. C., M. Rosário BRONZE, Matilde F. CASTRO a Maria H. L. RIBEIRO. Selective recovery of acidic and lactonic sophorolipids from culture broths towards the improvement of their therapeutic potential. *Bioprocess and Biosystems Engineering* [online]. 2016, **39**(12), 1825-1837 [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.1007/s00449-016-1657-y. ISSN 1615-7591. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00449-016-1657-y>
- [48] SOBERÓN-CHÁVEZ, Gloria. *Biosurfactants: from genes to applications*. New York: Springer-Verlag, 2011. ISBN 978-3-642-14490-5.
- [49] HIRATA, Yoshihiko, Mizuyuki RYU, Yuka ODA, Keisuke IGARASHI, Asami NAGATSUKA, Taro FURUTA a Masaki SUGIURA. Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2009, **108**(2), 142-146 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.03.012. ISSN 13891723. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172309001546>
- [50] DEVELTER, Dirk W. G. a Luc M. L. LAURYSSSEN. Properties and industrial applications of sophorolipids. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2010, **112**(6), 628-638 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1002/ejlt.200900153. ISSN 14387697. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.200900153>
- [51] KRALOVA, Iva a Johan SJÖBLOM. Surfactants Used in Food Industry: A Review: A Review. *Journal of Dispersion Science and Technology* [online]. 2009, **30**(9), 1363-1383 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1080/01932690902735561. ISSN 0193-2691. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01932690902735561>
- [52] YUAN, Bingbing, S. YANG a Jing CHEN. Antimicrobial Activity of Sophorolipids on Pathogenic Fungi Isolated from Fruits. *Chinese Journal of Applied Environmental Biology* [online]. 2011, **17**(3), 330-333 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.3724/SP.J.1145.2011.00330. ISSN 1006-687X. Dostupné z: <http://pub.chinasciencejournal.com/article/getArticleRedirect.action?doiCode=10.3724/SP.J.1145.2011.00330>
- [53] RIENZO, Mayri Alejandra Diaz De, Ben DOLMAN, Fernando GUZMAN, Candice KAISERMANN, James WINTERBURN, Ibrahim M. BANAT a Peter MARTIN. Antimicrobial properties of sophorolipids produced by *Candida Bombicola* ATCC 22214 against gram positive and Gram-negative bacteria. *New Biotechnology* [online]. 2014, **31**(6), 66-67 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1016/j.nbt.2014.05.1764. ISSN 18716784. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678414018305>
- [54] LOURITH, N. a M. KANLAYAVATTANAKUL. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2009, **31**(4), 255-261 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1111/j.1468-2494.2009.00493.x. ISSN 01425463. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-2494.2009.00493.x>

- [55] OTTO, R. T., H.-J. DANIEL, G. PEKIN, K. MÜLLER-DECKER, G. FÜRSTENBERGER, M. REUSS a C. SYLDATK. Production of sophorolipids from whey. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 1999, **52**(4), 495-501 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1007/s002530051551. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530051551>
- [56] HIRATA, Yoshihiko, Mizuyuki RYU, Keisuke IGARASHI, Asami NAGATSUKA, Taro FURUTA, Shigenori KANAYA a Masaki SUGIURA. Natural Synergism of Acid and Lactone Type Mixed Sophorolipids in Interfacial Activities and Cytotoxicities. *Journal of Oleo Science* [online]. 2009, **58**(11), 565-572 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.5650/jos.58.565. ISSN 1345-8957. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jos/58.565?from=CrossRef>
- [57] JOSHI-NAVARE, Kasturi, Poonam KHANVILKAR a Asmita PRABHUNE. Jatropha Oil Derived Sophorolipids: Production and Characterization as Laundry Detergent Additive. *Biochemistry Research International* [online]. 2013, **2013**(2013), 1-11 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1155/2013/169797. ISSN 2090-2247. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bri/2013/169797/>
- [58] KIM, K., Y. KIM, D. YOO a B. LEE. Characteristics of sophorolipid as an antimicrobial agent. *Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2002, **12**(2), 235-241 [cit. 2019-01-28]. Dostupné z: <http://www.jmb.or.kr/journal/download.php?FileDir=./submission/Journal/012/&num=1711>
- [59] BANAT, Ibrahim M., Andrea FRANZETTI, Isabella GANDOLFI, Giuseppina BESTETTI, Maria G. MARTINOTTI, Letizia FRACCHIA, Thomas J. SMYTH a Roger MARCHANT. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2010, **87**(2), 427-444 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1007/s00253-010-2589-0. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-010-2589-0>
- [60] LANG, S., Eleftheria KATSIWELA a F. WAGNER. Antimicrobial Effects of Biosurfactants. *Fett Wissenschaft Technologie/Fat Science Technology* [online]. 1989, **91**(9), 363-366 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1002/lipi.19890910908. ISSN 09315985. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/lipi.19890910908>
- [61] SHAH, V., G. F. DONCEL, T. SEYOUM, K. M. EATON, I. ZALENSKAYA, R. HAGVER, A. AZIM a R. GROSS. Sophorolipids, Microbial Glycolipids with Anti-Human Immunodeficiency Virus and Sperm-Immobilizing Activities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2005, **49**(10), 4093-4100 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1128/AAC.49.10.4093-4100.2005. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.49.10.4093-4100.2005>
- [62] CHEN, Jing, Xin SONG, Hui ZHANG, Yin-bo QU a Jun-ying MIAO. Sophorolipid produced from the new yeast strain *Wickerhamiella domercqiae* induces apoptosis in H7402 human liver cancer cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2006, **72**(1), 52-59 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1007/s00253-005-0243-z. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-005-0243-z>

- [63] YOO, D. S., B. S. LEE a E. K. KIM. Characteristics of Microbial Surfactants as Antifungal Agent Against Plant Pathogenic Fungus. *Journal of Microbiological Methods*. 2005, **15**(6), 1164-1169. ISSN 1017-7825.
- [64] VAUGHN, S.F., R.W. BEHLE, C.D. SKORY, C.P. KURTZMAN a N.P.J. PRICE. Utilization of sophorolipids as biosurfactants for postemergence herbicides. *Crop Protection* [online]. 2014, **59**, 29-34 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1016/j.cropro.2014.01.014. ISSN 02612194. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261219414000568>
- [65] SCHIPPERS, C., K. GEßNER, T. MÜLLER a T. SCHEPER. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. *Journal of Biotechnology* [online]. 2000, **83**(3), 189-198 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00304-7. ISSN 01681656. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165600003047>
- [66] MULLIGAN, Catherine N, Raymond N YONG a Bernard F GIBBS. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2001, **85**(1-2), 111-125 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1016/S0304-3894(01)00224-2. ISSN 03043894. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389401002242>
- [67] KANG, Seok-Whan, Young-Bum KIM, Jae-Dong SHIN a Eun-Ki KIM. Enhanced Biodegradation of Hydrocarbons in Soil by Microbial Biosurfactant, Sophorolipid. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. 2010, **160**(3), 780-790 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1007/s12010-009-8580-5. ISSN 0273-2289. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-009-8580-5>
- [68] DE GRAEVE, Marilyn, Sofie L DE MAESENEIRE, Sophie L K W ROELANTS a Wim SOETAERT. *Starmerella bombicola*, an industrially relevant, yet fundamentally underexplored yeast. *FEMS Yeast Research* [online]. 2018, **18**(7) [cit. 2019-03-17]. DOI: 10.1093/femsyr/foy072. ISSN 1567-1364. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsyr/article/doi/10.1093/femsyr/foy072/5049474>
- [69] ROSA, C. A. a M.A. LACHANCE. The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola*. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. 1998, **48**(4), 1413-1417 [cit. 2019-03-17]. DOI: 10.1099/00207713-48-4-1413. ISSN 0020-7713. Dostupné z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-48-4-1413>
- [70] GUMIENNA, Małgorzata, Maria CZARNECKA a Zbigniew CZARNECKI. Effect of Selected Lipid Substrates on the Process of Biosynthesis of Surface-Active Compounds by the *Candida Bombicola* Yeast. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* [online]. b.r., **8**(2) [cit. 2019-03-26]. ISSN 1505-0297. Dostupné z: <http://www.ejpau.media.pl/volume8/issue2/art-12.html>
- [71] LACHANCE, Marc-André, Tishara M. WIJAYANAYAKA, Joanna D. BUNDUS a Dilini N. WIJAYANAYAKA. Ribosomal DNA sequence polymorphism and the delineation of two ascosporic yeast species: *Metschnikowia agaves* and *Starmerella*

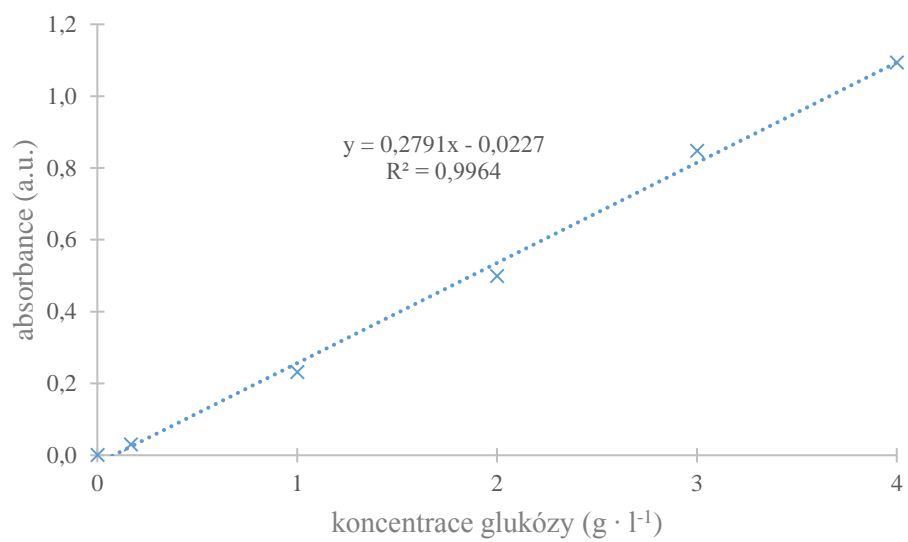


- bombicola. *FEMS Yeast Research* [online]. 2011, **11**(4), 324-333 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2011.00718.x. ISSN 15671356. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2011.00718.x>
- [72] ALCON, Almudena, Victoria E. SANTOS, Jose.A. CASAS a Felix GARCÍA-OCHOA. Use of flow cytometry for growth structured kinetic model development. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2004, **34**(5), 399-406 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2003.10.016. ISSN 01410229. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022903003910>
- [73] ZHANG, Cai-Ying, Xiao-Jing LIU, Ze-Hao YI, Yong-Cheng REN, Ying LI a Feng-Li HUI. *Starmerella anomalae* f.a., sp. nov., *Starmerella asiatica* f.a., sp. nov., *Starmerella henanensis* f.a., sp. nov. and *Starmerella scarabaei* f.a., sp. nov., four yeast species isolated from scarab beetles. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2017, **67**(5), 1600-1606 [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.1099/ijsem.0.001795. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.001795>
- [74] SEN, Ramkrishna. *Biosurfactants*. Austin, Tex.: Landes Bioscience, 2010. Advances in experimental medicine and biology, v. 672. ISBN 14-419-5978-5.
- [75] WILLUMSEN, Pia A. a Ulrich KARLSON. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation* [online]. 1997, **7**(5), 415-423 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1007/BF00056425. ISSN 0923-9820. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00056425>
- [76] YALÇIN, Hüsnüye T., Gülşah ERGIN-TEPEBAŞI a Ebru UYAR. Isolation and molecular characterization of biosurfactant producing yeasts from the soil samples contaminated with petroleum derivatives. *Journal of Basic Microbiology* [online]. 2018, **58**(9), 782-792 [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.1002/jobm.201800126. ISSN 0233111X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jobm.201800126>
- [77] COOPER, D. G. Biosurfactants. *Microbiol Sci.* 1986, **3**(5), 145-149.
- [78] MOUSAVI, Fereshteh, Keivan BEHESHTI-MAAL a Ahmadreza MASSAH. Production of Sophorolipid from an Identified Current Yeast, *Lachancea thermotolerans* BBMCZ7FA20, Isolated from Honey Bee. *Current Microbiology* [online]. 2015, **71**(2), 303-310 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1007/s00284-015-0841-7. ISSN 0343-8651. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-015-0841-7>
- [79] HASHIZUME, Takeshi, Shinkichi HIGA, Yukiko SASAKI, Hajime YAMAZAKI, Hajime IWAMURA a Hirotaka MATSUDA. Constituents of Cane Molasses. *Agricultural and Biological Chemistry* [online]. 2014, **30**(4), 319-329 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1080/00021369.1966.10858603. ISSN 0002-1369. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00021369.1966.10858603>

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CMC	kritická micelární koncentrace (Critical Micelle Concentration)
GRAS	všeobecně považovaný za bezpečný (Generally Recognized As Safe)
sp.	species
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human Immunodeficiency Virus)
HSV	herpes simplex virus
POEA	polyethoxylovaný tallowamin
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
p.a.	pro analýzu
např.	například
apod.	a podobně
E <sub>24</sub>	emulgační index
$h_e$	výška emulzní vrstvy
$h_k$	celková výška kapaliny
OD	optická denzita
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
ATR	zeslabený úplný odraz
SL	sophorolipid
SB1	<i>Starmerella bombicola</i> DSM 27465
SB2	<i>Starmerella bombicola</i> CBS 6009
SA	<i>Starmerella anomalae</i> CBS 14178
SJ	<i>Starmerella jiningensis</i> CBS 11864
SC	<i>Starmerella caucasica</i> CBS 12650
SR	<i>Starmerella roubikii</i> CBS 15148
UMY	univerzální médium pro kvasinky (Universal Medium for Yeast)
GPY	médium Glucose-Peptone-Yeast Extract
PK	pozitivní kontrola
NK	negativní kontrola
c	koncentrace
SO	slunečnicový olej
KO	kávový olej
IO	indický odpadní olej
ŠvO	švédský odpadní olej
FO	fritovací odpadní olej
ČO	čínský odpadní olej
KH	hydrolyzát kávové sedliny
SH	hydrolyzát syrovátky
M	melasa

## 8 PŘÍLOHY



Obrázek 31: Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace redukujících sacharidů pomocí kyseliny 3,5-dinitrosalicylové