

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MIKROORGANIZMY S LIPOLYTICKOU AKTIVITOU A JEJICH VYUŽITÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

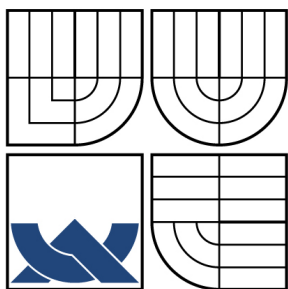
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

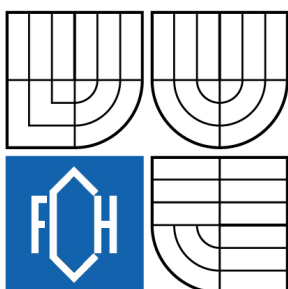
AUTHOR

JANA PAVLAČKOVÁ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MIKROORGANIZMY S LIPOLYTICKOU AKTIVITOU A JEJICH VYUŽITÍ

MICROORGANISMS WITH LIPOLYTIC ACTIVITY AND THEIR APPLICATIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

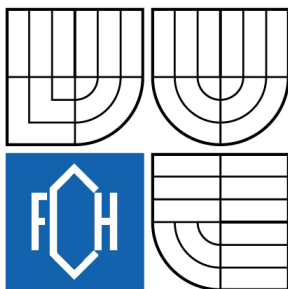
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

JANA PAVLAČKOVÁ

VEDOUcí PRÁCE
SUPERVISOR

doc. Ing. JIŘINA OMELKOVÁ, CSc.

BRNO 2008



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce

FCH-BAK0194/2007

Akademický rok: **2007/2008**

Ústav

Ústav chemie potravin a biotechnologií

Student(ka)

Pavlačková Jana

Studijní program

Chemie a technologie potravin (B2901)

Studijní obor

Potravinářská chemie (2901R021)

Vedoucí bakalářské práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.

Konzultanti bakalářské práce

Název bakalářské práce:

Mikroorganismy s lipolytickou aktivitou a jejich využití

Zadání bakalářské práce:

1. Enzymy- lipolytické enzymy.
2. Rozdělení mikroorganismů, které vykazují lipolytickou aktivitu.
3. Technologické využití mikroorganismů s lipolytickou aktivitou.
4. Závěr

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.5.2008

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Jana Pavlačková
student(ka)

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Lipasy jsou hydrolytické enzymy produkované řadou mikroorganismů. Tato práce popisuje nejen samotné mikroorganismy, které lipasy produkují, ale také různé možnosti průmyslového využití lipas. Lipasy nacházejí široké uplatnění v reakcích, ve kterých je nutná kombinace lipofilního substrátu s hydrofilním – při syntézách mastných esterů kyseliny askorbové nebo esterů cukru, při syntézách lipoaminokyselin nebo při lypolýze derivátů fenolu. Význam mají také vzhledem k ochraně životního prostředí, např. při čištění odpadních vod. V této práci byla lipolytická aktivita testována na pěti různých komerčních preparátech obsahujících mikroorganismy s lipolytickou aktivitou. Na stanovení lipolytické aktivity existuje řada různých metod. Příkladem může být spektrofotometrické stanovení lipolytické aktivity, při kterém se využívá schopnosti lipas štěpit p-nitrofenyllaurát na barevný produkt p-nitrofenol. Přičemž p-nitrofenol je detekován spektrofotometricky.

ABSTRACT

Lipases are hydrolytic enzymes that are produced by many types of microorganisms. This thesis describes not only the microorganisms which produce lipases but also different possibilities for the industrial utilization of lipases. Lipases are widely used in reactions where the combination of a lipophilic substrate with a hydrophilic one is necessary – in the synthesis of ascorbic acid fatty esters, sugar esters, lipoaminoacids and in the lipophilization of phenolic derivatives. Lipases are also important in relation to environmental protection. For example, they are used for the purification of waste water. In this thesis, five different preparations containing microorganisms with lipolytic activity were tested for lipolytic activity. There are many ways of determining lipolytic activity. The spectrophotometric determination of lipolytic activity that uses the ability of lipases to divide p-nitrophenyllaurate to p-nitrophenol may serve as an example. After this p-nitrophenol is detected spectrophotometrically.

KLÍČOVÁ SLOVA

lipasy, lipolytické reakce, bakterie, houby, technologické využití lipas

KEYWORDS

lipases, lipolytic reactions, bacteria, fungi, technological utilization of lipases

PAVLAČKOVÁ, J. *Mikroorganismy s lipolytickou aktivitou a jejich využití*. Brno, 2008. 54 s. Bakalářská práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně, ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská 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

*Děkuji vedoucí mé bakalářské práce
doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc.
za pomoc a podnětné rady při psaní
bakalářské práce.*

OBSAH

1 Úvod	7
2 Enzymy – lipolytické enzymy	8
2.1 Charakteristika enzymů	8
2.2 Lipidy	8
2.2.1 β -oxidace mastných kyselin	9
2.3 Lipolytické enzymy	10
2.3.1 Mikrobiální lipasy	11
2.3.2 Živočišné lipasy	12
3 Mikroorganismy vykazující lipolytickou aktivitu	13
3.1 Bakterie	13
3.1.1 Stavba bakteriální buňky	13
3.1.2 Bakterie s lipolytickou aktivitou	14
3.1.2.1 Rod Pseudomonas	14
3.1.2.2 Rod Streptomyces	16
3.1.2.3 Rod Bacillus	17
3.2 Houby	18
3.2.1 Stavba buňky hub	18
3.2.2 Kvasinky s lipolytickou aktivitou	20
3.2.2.1 Rod Yarrowia van der Walt et von Arx	20
3.2.2.2 Rod Saccharomyces Reess	21
3.2.2.3 Rod Candida Berkhout	22
3.2.3 Plísně s lipolytickou aktivitou	23
3.2.3.1 Rod Aspergillus	23
3.2.3.2 Rod Mucor	24
3.2.3.3 Rod Penicillium	25
3.2.3.4 Rod Rhizopus	26
3.2.3.5 Rod Rhizomucor	27
4 Technologické využití lipolytických enzymů a mikroorganismů s lipolytickou aktivitou	28
4.1 Lipasy v lipolytických reakcích	28
4.1.1 Lipasami katalyzované reakce	28
4.1.1.1 Vliv rozpouštědla	28
4.1.1.2 Iontové roztoky jako rozpouštědla	29
4.1.1.3 Úprava lipas a vliv vodní aktivity	29
4.1.1.4 Vliv substrátu a typu reakce	29
4.1.2 Příklady lipasami katalyzovaných reakcí nepřírodních substrátů	30
4.1.2.1 Syntéza mastných esterů kyseliny askorbové	30
4.1.2.2 Příklady syntézy esterů cukru nebo kyselých esterů cukru katalyzované lipasami	31
4.1.2.3 Lipolýza aminokyselin a jejich derivátů	31
4.1.3 Lipasami katalyzovaná lipolýza derivátů fenolu	32
4.1.3.1 Příklady lipolýzy chlorogenových a fenolových kyselin ze zeleného kávového extraktu	32
4.1.3.2 Příklady lipolýzy dalších fenolických sloučenin a jejich derivátů	32
4.1.3.3 Lipasami katalyzovaná lipolýza flavonoidů a jejich derivátů	33
4.2 Lipasy aktivní při nízkých teplotách	34
4.3 Odlučovače tuků	35
5 Experimentální část - ověření lipolytické aktivity u komerčních přípravků	37

5.1 Seznam použitých přístrojů a chemikálií	37
5.1.1 Použité přístroje	37
5.1.2 Použitý software	37
5.1.3 Použité chemikálie	37
5.1.4 Použitá živná média	38
5.2 Pracovní postupy	39
5.2.1 Stanovení počtu buněk nepřímou metodou	39
5.2.2 Stanovení kalibrační křivky p-nitrofenolu	39
5.2.3 Stanovení kalibrační křivky albuminu	39
5.2.4 Stanovení lipolytické aktivity nakultivovaných mikroorganismů	40
5.2.5 Časová závislost	41
5.2.6 Stanovení bílkovin ve vzorcích	41
6 Výsledky – důkaz lipolytické aktivity komerčních preparátů	43
6.1 Vyhodnocení kultivace mikroorganismů nepřímou metodou	43
6.2 Stanovení lipolytické aktivity u kultur mikroorganismů po sedmi dnech kultivace v jednotlivých komerčních preparátech	44
6.3 Stanovení lipolytické aktivity u kultur mikroorganismů po pěti dnech kultivace v jednotlivých komerčních preparátech	47
7 Diskuze	50
8 Závěr	51
9 Seznam použitých zdrojů	52
10 Seznam použitých zkratk	54

1 ÚVOD

Řada druhů bakterií, kvasinek a plísní produkuje enzymy, které jsou schopné katalyzovat hydrolýzu triacylglycerolů na glycerol a mastné kyseliny, ale také katalyzovat reverzní reakce a esterifikace. Tyto enzymy se označují jako lipasy.

Zájem o lipasy v posledních letech stále roste především kvůli lepším vlastnostem, než mají klasické chemické katalyzátory, a také kvůli jejich širokým možnostem použití. Lipasy se účastní řady biokatalytických reakcí přírodních i nepřírodních substrátů, používají se při syntézách řady chemických látek, otevírají nové možnosti reakcím, při kterých je nutné kombinovat hydrofilní a hydrofobní molekuly. Mají význam také při degradaci lipidů obsažených v odpadní vodě. Využívají se v odlučovačích tuků, kde štěpí tuky obsažené v odpadní vodě před tím, než se dostanou do kanalizace a následně i do životního prostředí.

Nové možnosti využití představují lipasy produkované psychrofilními a termofilními mikroorganismy. Díky své stabilitě při nízkých nebo naopak vysokých teplotách nacházejí uplatnění v různých biotechnologických aplikacích.

2 ENZYMY – LIPOLYTICKÉ ENZYMY

2.1 Charakteristika enzymů

Enzymy jsou bílkovinné makromolekuly s katalytickou funkcí, nacházející se ve všech živých systémech. Katalytickou funkci může vykonávat buď jednoduchá, nebo častěji složená molekula. Nebílkovinná část enzymů povahy složených bílkovin se označuje jako kofaktor. Je-li kofaktor pevně vázán na bílkovinnou složku enzymu a považuje se tedy za stabilní součást molekuly, označuje se jako prostetická skupina. Jindy je kofaktor s bílkovinnou složkou vázán jen slabě a může se od ní lehce oddělit, takový kofaktor se označuje jako koenzym [1].

Enzymy vykazují značnou specifitu jak co do typu katalyzované reakce (reakční specifita), tak co do struktury přeměňovaných substrátů (substrátová specifita) [1].

Enzymová reakce probíhá v relativně malé oblasti enzymové molekuly, která se označuje jako aktivní centrum. Aktivní centrum obsahuje určité, přesně rozmístěné funkční skupiny. Tyto funkční skupiny jsou součástí postranních řetězců aminokyselinových zbytků, které bývají v polypeptidovém řetězci vestavěny na různých místech. Jeho svinutím do prostorové struktury se však dostávají do bezprostřední blízkosti [1].

Enzymově katalyzované reakce probíhají různou rychlostí. Rychlost enzymově katalyzované reakce je závislá na koncentraci substrátu, množství enzymu, fyzikálně chemických vlastnostech prostředí a přítomnosti efektorů [1].

Z fyzikálně chemických vlastností prostředí ovlivňují rychlost reakce především teplota a pH. S růstem teploty roste i rychlost enzymově katalyzované reakce. Současně však také dochází k inaktivaci enzymu v důsledku denaturace jeho bílkovinné části a případně i odštěpení kofaktoru. Dochází tak ke vzniku teplotního optima, při kterém je enzymová reakce nejrychlejší. Katalytická aktivita enzymu je také závislá na pH prostředí. Většina enzymů pracuje nejúčinněji jen v určité oblasti pH. pH, při kterém je aktivita enzymu největší, se označuje jako pH optimum. Katalytickou účinnost enzymů také výrazně ovlivňuje řada látek – efektorů. Zvyšují-li tyto látky aktivitu enzymu, mluvíme o aktivátorech (ionty některých kovů, organické látky), snižují-li účinek enzymu, označují se jako inhibitory (ionty těžkých kovů, organické i anorganické látky nízkomolekulové povahy) [1].

Enzymy se rozdělují do šesti hlavních tříd podle typu katalyzované reakce – oxidoreduktasy, transferasy, hydrolasy, lyasy, isomerasy a ligasy [1].

2.2 Lipidy

Lipidy, estery vyšších mastných kyselin a alkoholů nebo jejich derivátů, jsou důležitou součástí buněk a důležitou skupinou látek nerozpustných ve vodě, ale dobře rozpustných v polárních rozpouštědlech. Patří k významným složkám potravin a ve výživě člověka tvoří jednu z hlavních živin nezbytných pro zdraví a vývoj organismu [1, 2].

Základní součástí molekul lipidů jsou alifatické monokarboxylové kyseliny s dlouhým, až na výjimky nevětveným řetězcem, tvořeným 4 až 26 atomy uhlíku – mastné kyseliny. Molekuly přírodních mastných kyselin jsou tvořeny většinou sudým počtem atomů uhlíku. Mohou být nasycené nebo nenasycené, které převládají [1].

Některé mastné kyseliny, jako např. olejová nebo palmitová, jsou běžné v lipidech všech přírodních materiálů. Jiné mastné kyseliny jsou specifické pro mikroorganismy, rostliny nebo živočichy a jen pro určité rody, čeledi nebo řády. Mají proto význam v taxonomii [2].

2.2.1 β -oxidace mastných kyselin

Mastné kyseliny se nejčastěji odbourávají mechanismem zvaným β -oxidace, kdy se z molekuly postupně odštěpuje acetyl-CoA a řetězec se zkrátí o dva atomy uhlíku [2].

Prvním krokem odbourání tuků je jejich hydrolytické štěpení, při kterém se přerušují esterové vazby a uvolňuje se glycerol a mastné kyseliny. Hydrolýzu katalyzují karboxylesterasy – lipasy. Lipasy jsou specifické pro příslušný organismus nebo jeho část, takže složení triacylglycerolů je jimi ovlivněno. [1, 2]

Uvolněné mastné kyseliny se používají buď na resyntézu lipidů, nebo se odbourávají. Hlavní energeticky nejvýhodnější cestou je u živočichů, rostlin i mikroorganismů β -oxidace [1].

β -oxidace je cyklický pochod, který postupně zkracuje řetězec mastné kyseliny vždy o dva atomy uhlíku. Odbourávání se tedy děje po spirále nazývané podle svého objevitele Lynenova spirála. Proces β -oxidace se opakuje tak dlouho, dokud se celá mastná kyselina nerozloží na acetylové zbytky vázané na CoA. Vznikající acetyl-CoA může být dále oxidován v citrátovém cyklu nebo může vstoupit do biosyntetických dějů [1].

Mechanismus β -oxidace lze rozdělit na tři fáze [1]:

1. Aktivace mastné kyseliny [1]:

Převedením mastné kyseliny na makroergické thioestery se zvýší reaktivita mastných kyselin. Tuto aktivaci provádí lipasa - acetyl-CoA-synthetasa za součinnosti CoA a ATP [1].



V eukaryotických buňkách probíhá β -oxidace v matrix mitochondrií. Volné mastné kyseliny však neprocházejí mitochondriální membránou. Proto jejich aktivace probíhá v cytosolu na vnější straně mitochondriální membrány. Aktivovaná mastná kyselina je do mitochondrie přenesena po vazbě na derivát máselné kyseliny karnitin. Nejprve dojde k vazbě acyl-CoA na karnitin za uvolnění CoA do cytosolu. Acylkarnitin je transportován do mitochondriální matrix a acyl je přenesen na CoA z mitochondriální rezervy. Karnitin se poté vrací do cytosolu a acyl-CoA vstupuje do Lynenovy spirály [1, 3].

2. Vlastní β -oxidace [1]:

Při vlastní β -oxidaci dochází ke třem po sobě následujícím reakcím, které se opakuji v každé obrátce spirály: dehydrogenaci, hydrataci, dehydrogenaci [1].

Při první dehydrogenaci, probíhající za účasti acyl-CoA-dehydrogenasy, dochází ke vzniku dvojné vazby mezi C_α a C_β . Následně dochází k adici molekuly vody na vytvořenou dvojnou vazbu za tvorby β -hydroxyacyl-CoA. Reakce je katalyzovaná enoyl-CoA-hydratasou. Ve třetím kroku, katalyzovaném 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasou, vzniká β -oxoacyl-CoA [1].

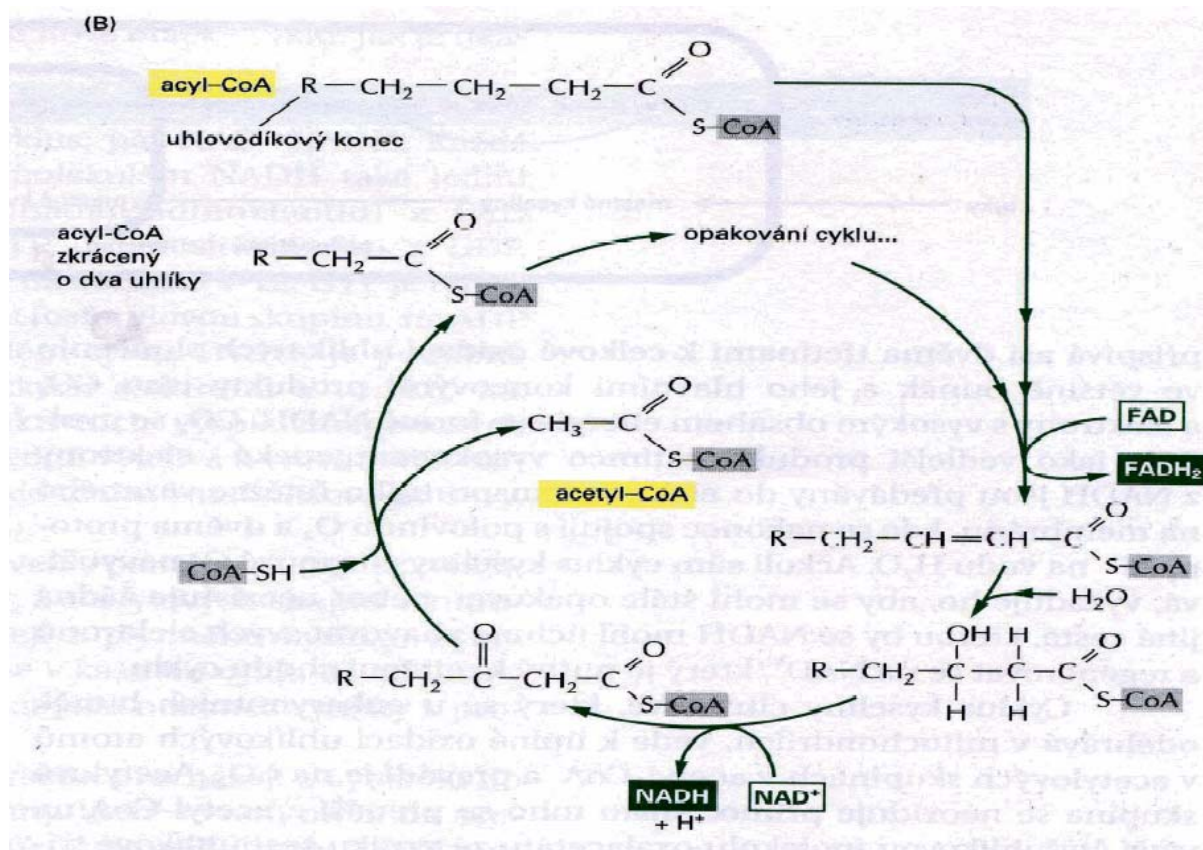
3. Thiolysa:

Vzniklý β -oxoacyl-CoA je jako thioester velmi labilní a může se thiolyticky štěpit, přičemž mezi C_α a C_β původní mastné kyseliny vstoupí nová molekula CoA a z řetězce se uvolní dvouuhlíkatá jednotka jako acetyl-CoA. Tento krok je katalyzovaný β -oxoacyl-CoA-thiolasou [1, 3].

β -oxidace je pro buňku velmi významný proces, umožňující získat mnoho molekul ATP. Postupně odštěpované molekuly acetyl-CoA mohou ihned vstoupit do citrátového cyklu.

Při jednom proběhnutí cyklu β -oxidace se také získává jedna molekula FADH_2 a jedna molekula NADH , jejichž reoxidací v dýchacím řetězci lze získat 5 molekul ATP. Dalších 12 molekul ATP se vytvoří při aerobním odbourávání odštěpené molekuly acetyl-CoA [1].

Méně běžná je tzv. α -oxidace, kdy se odštěpuje karboxyl a řetězec se zkrátí o jeden atom uhlíku, přičemž vznikají mastné kyseliny s lichým počtem atomů uhlíku. Popsána byla také ω -oxidace, kdy se nejprve oxiduje methylová skupina na konci řetězce a tvoří se dikarboxylové kyseliny [2].



Obr. 1 Průběh β -oxidace [4]

2.3 Lipolytické enzymy

Lipolytické enzymy jsou karboxylesterasy, které hydrolyzují acylglyceroly na mastné kyseliny a glycerol. Lipolytické enzymy, které hydrolyzují acylglyceroly s uhlíkatým řetězcem mastných kyselin kratším než 10 C, jsou považovány za esterasy nebo karboxylasy. Enzymy, které hydrolyzují acylglyceroly obsahující řetězce mastných kyselin s počtem uhlíků větším než 10, jsou označovány jako lipasy nebo také jako triacylglycerol acylhydrolasy. Esterasy jsou aktivní ve vodných roztocích, zatímco „pravé“ lipasy jsou aktivnější spíše na rozhraní voda-lipid než ve vodné fázi [5].

Lipasy jsou serinové hydrolasy, obsahující shodnou sekvenci $\text{G-X}_1\text{-S-X}_2\text{-G}$ jako katalytickou část, kde G = glycin, S = serin, X_1 = histidin a X_2 = glutamová nebo asparátová kyselina [6].

Lipolytické enzymy jsou děleny do tří skupin [5]:

První skupina je nespecifická. Lipolytické enzymy této skupiny uvolňují mastné kyseliny ze všech tří pozic acylglycerolu a kompletně hydrolyzují triacylglyceroly na mastné kyseliny a glycerol [5].

Druhá skupina lipolytických enzymů je 1,3-specifická. Uvolňuje mastné kyseliny z vnějších pozic triacylglycerolu a dává vznik 1,2-diacylglycerolům, 2,3-diacylglycerolům a 2-monoacylglycerolům za uvolnění mastných kyselin. Dlouhá inkubace triacylglycerolu s 1,3-specifickými lipasami vede většinou k úplné hydrolýze triacylglycerolů na mastné kyseliny a glycerol [5].

Třetí skupina zahrnuje lipolytické enzymy, které preferují určité mastné kyseliny. Jde například o lipasu B izolovanou z kvasinkovité houby *Geotrichum candidum*. Tyto lipasy se však nevyskytují u bakterií [5].

2.3.1 Mikrobiální lipasy

Většina bakteriálních lipas patří mezi extracelulární enzymy. Většina mikroorganismů může produkovat více než jeden typ extracelulárních lipas, které hydrolyzují různě dlouhé řetězce mastných kyselin [5].

Enzymy produkované mikroorganismy jsou využívány častěji, než enzymy získávané z rostlin nebo živočichů, především kvůli větší katalytické aktivitě, větším výtěžkům, jednoduché genetické manipulaci, pravidelnému zásobení bez sezónního kolísání a rychlému růstu mikroorganismů na levném médiu. Mikrobiální enzymy jsou také stálejší než jim odpovídající rostlinné a živočišné enzymy a jejich produkce je výhodnější a bezpečnější [7].

Produkci lipas ovlivňuje celá řada vnějších faktorů, zejména teplota, pH prostředí, zdroje dusíku a tuků, koncentrace anorganických solí a dostupnost kyslíku [5].

Lipolytické enzymy přitahují v dnešní době značnou pozornost kvůli svému biotechnologickému potenciálu. Představují nejvýznamnější skupinu biokatalyzátorů pro biotechnologické aplikace, které je úspěšně využívají při syntézách biopolymerů, při produkci agrochemikálií a aromatických sloučenin. Mikroorganismy spolu s lipasami, které produkují, mohou být součástí detergentů, dále mohou být využity v sýrařství nebo při výrobě potravinových doplňků [7].

Stanovení lipolytické aktivity u některých bakterií je důležitý diagnostický test. Kvantitativní stanovení aktivity lipas je možné provádět titrimetricky, fotometricky nebo fluorescenčními metodami, např. s využitím 4-metyl-umbelliferon heptanoátu. Fotometrické stanovení je založeno na uvolnění chromogenní složky substrátu, např. 4-nitrofenylpalmitátu, po působení enzymu. Základem titrimetrického důkazu lipolytické aktivity je přesné stanovení množství uvolněných mastných kyselin. Jako substrát je obvykle používán olivový olej nebo jiné přirozené tuky. Důležitým faktorem ovlivňujícím přesnost stanovení je příprava dokonale emulgovaného a stabilního substrátu [5].

I některé druhy kvasinek a plísň jsou schopné produkovat lipasy. Produkce lipas se dokazuje podle štěpení tuku. K tomuto účelu se využívá hovězí tuk, který se rozlije do Petriho misek a nechá se v lednici ztuhnout. Potom se opatrně převrství Gorodkovej agar P6, do kterého se vmíchá 0,1 % vysterilizované křídý. Nátěrem v přímé linii se očkují na povrch dva až tři kmeny. V místech, kde se tuk štěpí, se půda mléčně zakaluje. Kvasinky přitom štěpí zejména řetězce mastných kyselin, a proto tento test koreluje i s využíváním uhlovodíků, vosků apod. [22].

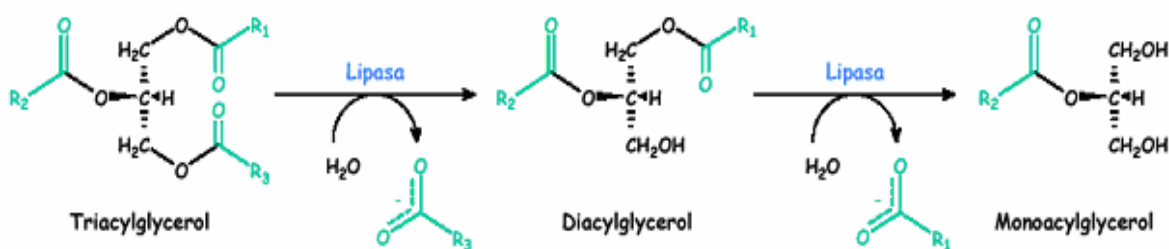
2.3.2 Živočišné lipasy

Nejdůležitější součásti tuků přijímané v potravě jsou triacylglyceroly. Trávení a vstřebávání hydrofilních sloučenin (proteiny, sacharidy) je ve vodném prostředí organismu poměrně jednoduché, trávení a vstřebávání lipofilních složek je však procesem velmi komplikovaným [8].

Živočišné lipasy štěpí lipidy obsažené v přijímané potravě na absorbovatelnou formu. Většina tělních lipas je vyráběna pankreatem, některé jsou však obsažené i ve slinách [10].

Trávení lipidů tedy začíná již v ústní dutině, kde lipasy obsažené ve slinách začínají katalyzovat hydrolýzu tuků. V ústech se tuky částečně emulgují, aby mohla snadněji proběhnout další fáze trávení [9].

Působením pankreatické lipasy ve dvanáctníku se nejprve odštěpí mastná kyselina vázaná na krajní skupině glycerolového zbytku a vznikne směs 1,2- a 2,3-diacylglycerolů. Ty se štěpí dále tak, že se opět oddělí jedna krajní skupina, a vznikají monoacylglyceroly. Při obou reakcích se uvolní mastné kyseliny. V lačníku jsou přítomny intestinální lipasy, kterými se odštěpuje z malé části monoacylglycerolů poslední vázaná mastná kyselina, a vzniká molekula glycerolu [8].



Obr.2 Hydrolytické štěpení triacylglycerolu pankreatickými lipasami [11]

3 MIKROORGANISMY VYKAZUJÍCÍ LIPOLYTICKOU AKTIVITU

3.1 Bakterie

Bakterie jsou prokaryotické organismy, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí od 1 μm do 5 μm délky a od 0,2 μm do 1 μm šířky. Buňky bakterií se rozmnožují příčným dělením, pučením, pomocí konidií a hormogonií. Po rozdělení mohou buňky zůstat ve shlucích a tvořit charakteristická seskupení. Některé bakterie mohou tvořit termorezistentní spory, tzv. endospory (spory uvnitř buněk), mikrocyty (klidové buňky obalené rezistentním obalem), nebo konidie odškrabované z vláken [12].

Tvarově nejsou bakterie příliš rozmanité, rozeznávají se bakterie kulovité tzv. koky a bakterie tyčinkovité. Kulovité bakterie se mohou vyskytovat samostatně nebo jako diplokoky, tetrády, streptokoky, stafylokoky a sarciny. Tyčinkovité bakterie mohou být válcovité rovné (bakterium, bacillus), rohlíčkovitě zahnuté (vibrio), spirálově stočené a neohebné (spirillum) nebo spirálovitě s mnoha závity a ohebné (spirochéta) [12].

3.1.1 Stavba bakteriální buňky

Prokaryotická buňka je charakteristická svou jednoduchou stavbou. Všechny bakterie mají v cytoplazmě přítomný jaderný materiál a ribozomy a od okolí jsou odděleny cytoplazmatickou membránou a buněčnou stěnou [12].

Jaderný materiál je tvořený jedinou dvouřetězcovou kružnicovou molekulou DNA, která není od okolí oddělena membránou. V bakteriální buňce mohou být dále přítomny plasmidy, které nesou doplňkovou genetickou informaci [12].

Prostor bakteriální buňky zcela zaplňuje cytoplazma. Cytoplazma je koloidní roztok obsahující enzymy, meziprodukty metabolismu, rezervní látky a některé ionty. Kromě těchto složek může obsahovat i barviva, nejčastěji karotenoidní nebo melanoidního typu [12, 13].

V různých počtech se v bakteriální buňce vyskytují ribozomy se sedimentačním koeficientem 70S. Ribozom je tvořen dvěma podjednotkami, malou podjednotkou 30S a velkou podjednotkou 50S. Podjednotky jsou tvořené z molekuly RNA a bílkovin. Ribozomy se podílejí na překládání bílkovin [12].

Osmotické rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím tvoří jemná a tenká cytoplazmatická membrána složená z fosfolipidů a proteinů. Hlavním úkolem cytoplazmatické membrány je selektivní transport iontů a molekul prostřednictvím membránových proteinů. Dále je cytoplazmatická membrána sídlem dýchacích enzymů, systému oxidační fosforylace, enzymů syntézy a hydrolýzy fosfolipidů a konečné fáze syntézy složek buněčné stěny a pouzdrových obalů [12, 14].

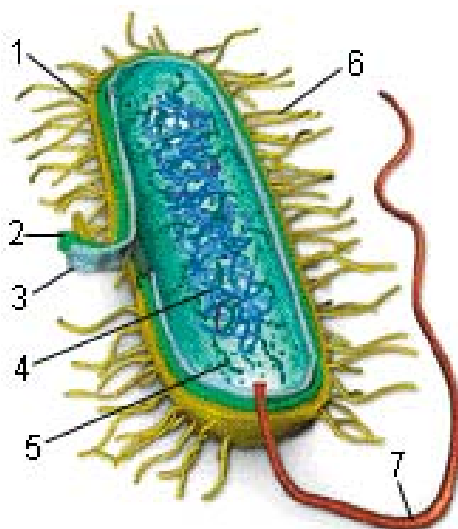
Výsledný tvar bakterií dává buněčná stěna, která je pevná a neohebná díky přítomnosti peptidoglykanů a chrání buňku před mechanickými vlivy a před účinkem osmotického tlaku. Působením enzymu lysozymu se peptidoglykany rozkládají, a v izotonickém prostředí tak vzniká protoplast [12, 14].

Další složky buněčné stěny jsou rozdílné u grampozitivních a gramnegativních bakterií. Hlavní složkou buněčné stěny u grampozitivních bakterií je silná peptidoglykanová vrstva a kyselina teichoová. Kromě kyseliny teichoové jsou na peptidoglykany vázány ještě polysacharidy, složené především z glukosy, galaktosy a mannosy. Složení těchto polysacharidů je specifické pro jednotlivé skupiny bakterií a je zodpovědné za imunochemické reakce. Stěna gramnegativních bakterií se skládá z tenké vrstvy peptidoglykanů bez teichoové kyseliny a z tzv. vnější membrány, jež obsahuje fosfolipidy,

strukturní a enzymové proteiny, lipoproteidy a lipopolysacharidy. Ve fosfolipidové vrstvě jsou hydrofilní tunely tvořené triméry bílkovin, zvané póry [14].

Na vnějším obvodu některých bakteriálních buněk může být přítomna slizová vrstva, pouzdro, kapsle, která je v bezprostředním styku s vnějším okolím. Pouzdra mohou být polysacharidová nebo polypeptidová. Pouzdro chrání bakterie proti vyschnutí a má význam při příjmu potravy [12].

Na povrchu bakteriální buňky mohou být dále přítomny fimbrie a bičíky. Fimbrie jsou krátká, rovná, jemná a křehká vlákna, která trčí z povrchu bakterie, a bakterie má díky nim schopnost adhezovat na různé povrchy. Bičíky jsou cytoplazmatické vláknité dlouhé výběžky, díky kterým je bakterie schopná samostatného prostorového pohybu [12].



Obr. 3 Prokaryotická buňka [15]

1 – pouzdro, 2 – buněčná stěna, 3 – cytoplazmatická membrána, 4 – jaderný materiál,
5 – ribozomy, 6 – fimbrie, 7 – bičík

3.1.2 Bakterie s lipolytickou aktivitou

3.1.2.1 Rod *Pseudomonas*

Říše: Eubacteria

Třída: Gammaproteobacteria

Rod: *Pseudomonas*

Rod *Pseudomonas* je zastoupený gramnegativními tyčinkovitými bakteriemi, které se pohybují pomocí monotrichálních nebo lofotrichálních bičíků. Patří mezi chemoorganotrofní nefermentující striktní aeroby, za nepřítomnosti kyslíku velmi rychle hynou. Nevytvářejí spory ani klidová stádia. Vyskytují se v říční a mořské vodě, v půdě, na povrchu rostlin a v potravinách [12].

Jako zdroje uhlíku a energie využívají nejrozličnější organické sloučeniny. Nutriční přizpůsobivost pseudomonád je dána přítomností řady indukčních operonů, které jsou v případě potřeby přepisovány, a tak zajišťují buňce přítomnost širokého spektra často neobvyklých enzymů. Široké enzymové vybavení způsobilo, že se některé druhy tohoto rodu

používají pro průmyslové oxidace různých organických sloučeniny. Řada druhů tvoří fenazinová barviva žlutých, zelených, modrých nebo červených odstínů, která uvolňují do růstového prostředí, a tím způsobují nežádoucí zbarvení potravin. Některé druhy uvolňují do prostředí fluoreskující žlutozelené barvivo. Určité druhy vyvolávají v potravinách cizí vůně nebo pachy (ovocné, rybí) nebo pachuti (mýdlovou, hořkou). Významnou vlastností je výrazná proteolytická a lipolytická aktivita (*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. putina*, *P. fragi*) [14, 12, 16].

Pseudomonady jsou většinou psychrofilní povahy, takže jejich nežádoucí činnost v potravinách probíhá i při nízkých skladovacích teplotách (4°C). Některé druhy vyvolávají onemocnění u člověka (zánět středního ucha nebo průjmy u novorozenců), zvířat i rostlin (*P. aeruginosa*), některé druhy jsou patogenní jen pro rostliny [14, 12, 16].

Na purifikaci a popis lipas produkovaných *Pseudomas* spp. je zaměřena řada výzkumů. Byla sledována produkce exo- a endolipas produkovaných *P. fragi* CRDA 037 při růstu na syrovátce. Srážením síranem amonným byly získány částečně purifikované lipasové extrakty [6].



Obr. 4 *Pseudomonas fluorescens* [17]

3.1.2.2 Rod *Streptomyces*

Říše: Eubacteria

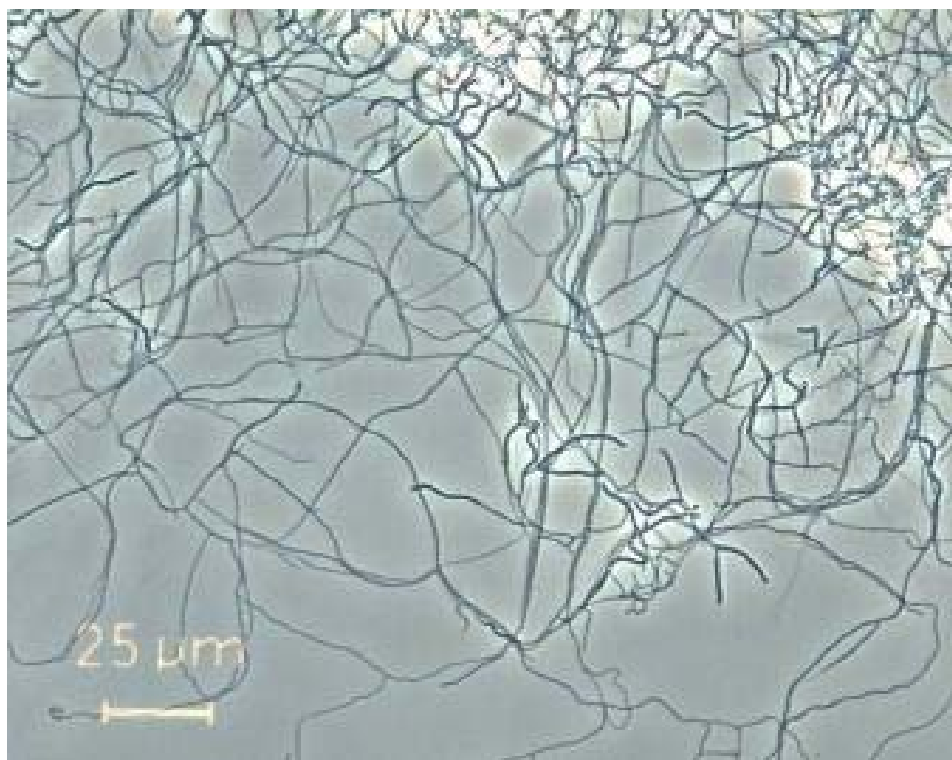
Třída: Actinobacteria

Rod: *Streptomyces*

Rod *Streptomyces* tvoří bohatě větvená dlouhá vlákna a kulaté až dlouze elipsoidní spory v rovných řetězcích na koncích hyf. Zástupci rodu *Streptomyces* jsou chemoorganotrofní obligátně aerobní mikroorganismy vyskytující se především v provzdušněných půdách, z kterých se rozšiřují do ostatních ekosystémů, a to převážně prostřednictvím spor. Většina streptomycet je mesofilní, jen malá část je termofilní [16, 17].

Druhové zastoupení je dáno typem přítomného organického substrátu a obsahem vody. Streptomycety jsou častou součástí přírodních mikrobiálních společenství kolonizujících a degradujících organický materiál, což je dáno širokým spektrem využívaných zdrojů uhlíku [16, 17].

Streptomycety jsou vynikajícími producenty antibiotik (streptomycin, tetracykliny), produkují též enzymy degradující polymery – lipasy (*S. cinnamomeus*), proteasy, pektinasy, xylanasy, dextranasy a amylasy [14, 16].



Obr. 5 *Streptomyces* sp. – vzdušné mycelium [18]

3.1.2.3 Rod *Bacillus*

Říše: Bacteria

Třída: Bacilli

Rod: *Bacillus*

Rod *Bacillus* je reprezentován širokou skupinou tyčinkovitých grampozitivních bakterií. Zástupci rodu bacilů jsou obligátně aerobní, případně fakultativně nebo obligátně anaerobní. Většina zástupců je pohyblivá pomocí laterálních nebo peritrichálních bičků. V buňce vytváří vždy jen jednu endosporu. Spory se vyznačují velkou odolností k vysokým teplotám, záření a jiným nepříznivým podmínkám. Bacily mají bohaté enzymové vybavení, takže mohou rozkládat nejrůznější organický materiál. Většina druhů má velmi aktivní amylolitické, pektolytické a proteolytické enzymy, řada druhů produkuje antibiotika [14, 16].

Velká část bacilů patří mezi saprofyty, osídlující především půdní prostředí, někteří zástupci jsou vzhledem k produkci toxinů patogenní. Některé druhy, zejména *B. cereus*, kontaminují potraviny a jsou příčinou jejich kažení. Rezistence spor k vysušení jim umožňuje přežít dlouhou dobu i ve vysušených potravinách (obiloviny, mouka) [16].

Lipolytickou aktivitu vykazují *B. subtilis*, *B. termocatenulatus*, *B. stearothermophilus*, *B. pumilus* a *B. alcalophilus* [6].

V přírodě nejrozšířenější je *B. subtilis*. Tvoří malé peritrichální buňky a produkuje několik polypeptidových antibiotik [14].

Extracelulární lipasy druhu *B. subtilis* byly purifikovány z růstového prostředí srážením síranem amonným a následnou sloupcovou chromatografií na phenyl-Sepharose a hydroxyapatitu. Purifikované lipasy mají silnou tendenci vytvářet agregáty [6].



Obr. 6 *Bacillus subtilis* [19]

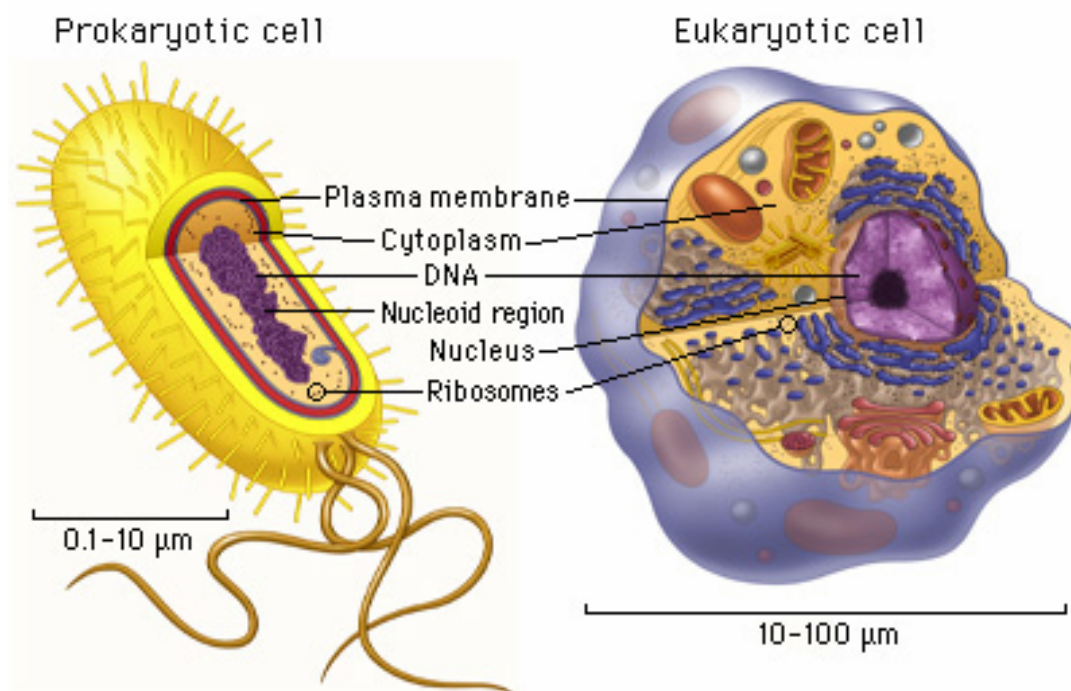
3.2 Houby

Houby jsou zástupci eukaryotických organismů, které mají v porovnání s bakteriemi složitější stavbu buněk. Jedná se o heterotrofní organismy bez plastidů, proto u nich neprobíhá fotosyntéza [12].

Jejich tělo, stélka, může být jednoduchá i vícebuněčná, jednojaderná i vícejaderná. Buňky vláknitých hub tvoří typické řetězce, které se označují jako hyfy. Hyfy se rozrůstají a tvoří mycelium, které může být se septy nebo bez sept. U kvasinek je možné pozorovat tzv. pseudomycelium tvořené pučícími, navzájem spojenými buňkami [12].

Ve vztahu ke zdroji živin houby vystupují jako saprotrofové živící se odumřelým materiálem organického původu, nebo paraziti rostlin, živočichů, hub i prvoků. Houby jsou také schopny vstupovat do symbiózy s jinými organismy [20].

Z hlediska mikrobiologie mají význam skupiny hub, které se vyskytují ve vodách povrchových, pitných a v odpadních kalech, sedimentech a exkrementech, či jsou součástí těl živočichů. Dále jsou významné skupiny hub, které jsou původci onemocnění, či mají biotechnologické využití [12].



Obr. 7 Porovnání prokaryotické a eukaryotické buňky [21]

3.2.1 Stavba buňky hub

Buňka hub má morfologicky diferencované jádro, obsahuje mitochondrie, Golgiho aparát a membránový systém endoplazmatického retikula. V cytoplasmě jsou dále přítomny inkluze krystalického a lipidového charakteru. Hlavními zásobními látkami jsou glykogen a tuky. U starších hub je možné pozorovat přítomnost většího množství vakuol [12].

Jádro eukaryotické buňky je od cytoplazmy odděleno dvojitou jadernou membránou s velkými póry, které slouží k aktivnímu transportu molekul, či částic. Uvnitř jádra, v karyoplasmě, se vyskytuje většinou jedno jádérko, které mizí při dělení jádra [12].

Vnitřní prostor buňky je vyplněný cytoplazmou. V cytoplazmě je přítomno množství cytoskeletálních systémů, podílejících se na transportu látek a migraci částic v buňce. Charakteristickou strukturou eukaryotních buněk jsou mikrotubuly a mikrofilamenty [12].

V cytoplazmě je dále přítomno endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát a mitochondrie. Endoplazmatické retikulum je sítí trubic a cisteren, které prostupují cytoplazmou. Dle struktury lze rozlišit hladké a drsné retikulum. Na drsné retikulum nasedají ribozomy, a tedy zde probíhá biosyntéza bílkovin. Endoplazmatické retikulum se také podílí na ukládání a transportu meziproduktů látkového metabolismu [12].

Dalším membránovým útvarem je Golgiho aparát, který má tvar plochého měchýřku nebo několika cisteren uložených rovnoběžně vedle sebe. Předpokládá se, že funkcí tohoto aparátu je transportovat prekurzory buněčné stěny z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu [14].

Dále jsou v cytoplazmě přítomny mitochondrie, útvary rozmanitého tvaru, které jsou obklopené dvěma membránami. Mitochondrie obsahují vlastní kruhovou DNA, RNA a ribozomy. V matrix jsou lokalizovány enzymy vstupující do citrátového cyklu a katabolického řetězce mastných kyselin, na výběžcích vnitřní membrány jsou vázány enzymy dýchacího řetězce a systém oxidační fosforylace [12, 14].

K nejvýznamnějším složkám cytoplazmy patří vakuola. Jedná se většinou o kulovitý útvar obklopený jednoduchou membránou. U mladých buněk jsou obvykle přítomny menší vakuoly ve větším počtu, zralé klidové buňky obsahují jednu velkou vakuolu. Uvnitř vakuoly mohou být obsaženy kapénky tuku, bílkovin a polysacharidů. Vakuoly jsou velmi důležitou zásobárnou vody. Obsahují řadu hydrolytických enzymů a jsou tedy místem, kde dochází k rozpadu těch struktur buňky, které se neustále v buňce rozkládají a obnovují. Vnitřní obsah vakuol je osmoticky aktivní, tudíž se vakuoly podílejí na vzniku tlaku působícího na buněčnou stěnu zevnitř buňky [12, 14].

Osmotické rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím tvoří cytoplazmatická membrána. Membrána je složená z lipidů a proteinů a je propustná pro malé molekuly bez náboje. Podobně jako u bakterií je sídlem transportních mechanismů, na rozdíl od bakterií však neobsahuje dýchací enzymy a systém oxidační fosforylace [14].

Ochranu před mechanickými vlivy zajišťuje vícevrstevná buněčná stěna, která také udává buňce tvar. Velkými póry stěny mohou volně procházet všechny sloučeniny kromě sloučenin vysokomolekulárních. Buněčná stěna je většinou z chitinu, může obsahovat i celulózu, β -glukan, D-glukozamin, fukan a mannan. Kvasinky obsahují v buněčné stěně lipidy, polysacharidy a mannan [12, 14].

3.2.2 Kvasinky s lipolytickou aktivitou

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní mikroorganismy náležející mezi houby. Český název dostaly pro schopnost většiny druhů zkvašovat monosacharidy a některé disacharidy, případně i trisacharidy na ethanol a oxid uhličitý. [14]

3.2.2.1 Rod *Yarrowia van der Walt et von Arx*

Říše: Fungi

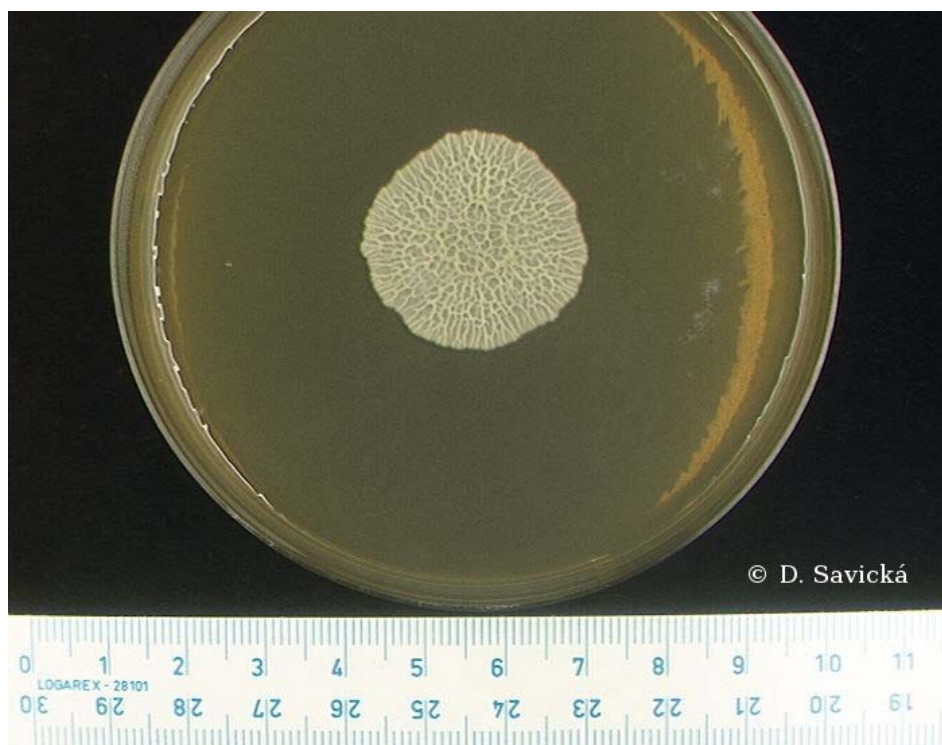
Třída: Ascomycetes

Rod: *Yarrowia* van der Walt et von Arx

Tento rod vytvořili roku 1980 VAN DER WALT a VON ARX na základě anamorfního druhu *Candida lipolytica* [17].

Yarrowia lipolytica je heterothalická askosporogenní kvasinka, která za podmínek vegetativního růstu může vytvářet pseudomycelium, případně i septované mycelium. Rozmnožuje se buď vegetativně pučením, a nebo pohlavně - tvorbou asků. Asky jsou jednotlivé, vyrůstají laterálně nebo terminálně, jsou vejcovité, kyjovité, elipsoidní, kulovité, jen zřídka válcovité. Obvykle obsahují jednu až dvě spory. Kolonie jsou kučeravé, bílé až krémové [14, 16, 17].

Y. lipolytica je využívána zejména pro schopnost produkce extracelulárních enzymů (proteasy, lipasy). Významnou vlastností je také produkce ubichinonu Q₈. *Y. lipolytica* byla také úspěšně použita pro produkci biomasy z n-alkanů a produkci kyseliny citrónové ve spojitosti s růstem na těchto uhlovodících [14, 16, 17].



Obr.8 Kolonie *Yarrowia lipolytica* na sladinovém agaru po 3 týdnech při 25°C [17]

3.2.2.2 Rod *Saccharomyces* Reess

Říše: Fungi

Třída: Ascomycetes

Rod: *Saccharomyces* Reess

Rod *Saccharomyces* byl zavedený roku 1838 MEYENEM, avšak definovaný byl až roku 1870 REESSEM [23].

Druhy rodu *Saccharomyces* mají kulovitý, elipsoidní nebo cylindrický tvar buňky. Vegetativně se rozmnožují multilaterálním pučením, méně časté je pohlavní rozmnožování vedoucí k tvorbě askospor. Askospory jsou kulovité až oválné, s hladkou stěnou. Rod *Saccharomyces* bouřlivě zkvašuje sacharidy, a proto se hojně využívá při kvašení v potravinářském průmyslu. Nejdůležitějším druhem a zároveň nejprostudovanější kvasinkou je *Saccharomyces cerevisiae*. Rozděluje se na dva poddruhy - *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae* a *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *uvarum* - které se odlišují svými fyziologickými vlastnostmi. Kolonie *S. cerevisiae* subsp. *cerevisiae* vytvářejí krémové, světle hnědé, hladké, lesklé kolonie, ale mohou vznikat i kolonie skládané, kráterovité, drsné. *S. cerevisiae* subsp. *uvarum* vytváří vždy krémové hladké kolonie [14, 16, 17].



Obr. 9 Kolonie *Saccharomyces cerevisiae* na sladinném agaru po 3 týdnech při 25°C [17]

3.2.2.3 Rod *Candida* Berkhout

Říše: Fungi

Třída: Deuteromycetes

Rod: *Candida* Berkhout

Rod *Candida* Berkhout obsahuje na 160 druhů kvasinek, které se vyznačují rozmanitými tvary buněk – kulovitými, elipsoidními, cylindrickými, lahvovitými, trojhrannými atd. [14, 23].

Lipasy produkované různými druhy rodu *Candida* sp. patří mezi enzymy nejvíce využívané pro biokatalytické účely. Obrovské možnosti využití má především *C. antarctica* [24].

C. antarctica byla izolována z permanentně zamrzlého jezera Vanada v Antarktidě. Díky množství využití lipas *C. antarctica* a jejich velkému významu pro biokatalýzy byla jejich produkce optimalizována a byly popsány a purifikovány dva enzymy (lipasa A a B) [24].

Lipolytickou aktivitu vykazuje také *Candida rugosa* Diddens at Lodder [23].

C. rugosa byla popsána roku 1917 Andersonem. Vytváří primitivní pseudomycelium složené z řetízků různě velkých válečkovitých buněk, bohatě větvené s ojedinělými blastokonidiemi. Nátěr je krémový až světle žlutý, místy hladký, matně lesklý. Rozmnožuje se vegetativně multilaterálním pučením. V přírodě je rozšířená např. ve vodách, na potravinách (másle a mléčných výrobcích). *C. rugosa* neasimiluje maltosu, sacharosu, laktosu, rafinosu ani melezitosu [17].

C. rugosa produkuje dvě odlišné lipasy, k jejichž separaci byla nejprve využita extrakce ethanolem a poté vysokorozlišovací iontově výměnná sloupcová chromatografie. Při komerční přípravě lipas rodu *Candida* byly identifikovány dokonce tři odlišné formy lipolytických enzymů [6].



Obr. 10 Kolonie *Candida rugosa* na sladinovém agaru po 3 týdnech při 25°C [17]

3.2.3 Plísňe s lipolytickou aktivitou

Jako plísňe se označují mikroskopické vláknité eukaryotní mikroorganismy, náležející mezi houby [14].

3.2.3.1 Rod *Aspergillus*

Říše: Fungi

Třída: Deuteromycetes

Rod: *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* patří k nejrozšířenějším a nejhojněji se vyskytujícím rodům plísní, jednotlivé druhy mohou být izolovány z půdy, vzduchu, potravin, organických zbytků a mnoha dalších zdrojů [16].

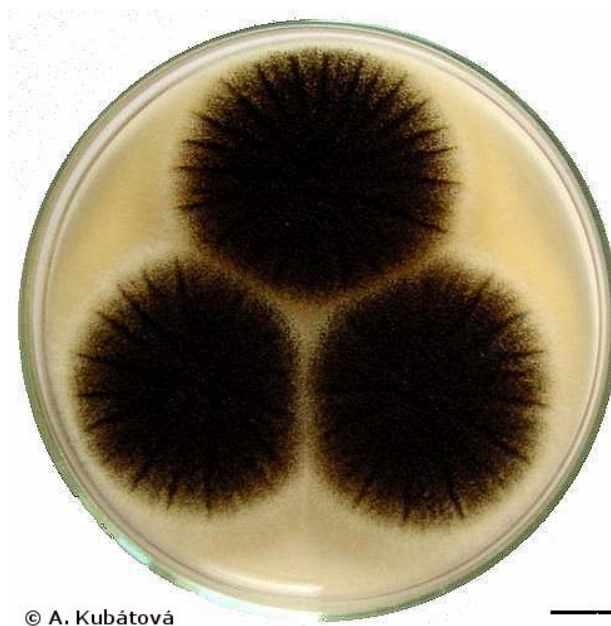
Mezi nejrozšířenější druhy patří *Aspergillus niger*, který má bohaté enzymové vybavení. Vytváří rychle rostoucí hrubě zrnité kolonie hnědočerné až černé barvy, jejichž spodní strana je světlá nebo žlutá. Rozmnožování probíhá nepohlavně konidii, které jsou kulovité nebo téměř kulovité, bradavčité, o průměru 3,5 – 5 µm. Konidiofory jsou různě dlouhé, často i 1 – 3 mm, s hladkou nezbarvenou stopkou. Měchýřek je kulovitý, pokrytý po celém povrchu vrstvou metul a fialid [17].

Lipolytickou aktivitu vykazují kromě *A. niger* také *A. oryzae*, *A. terreus*, *A. carneus* a *A. nidulans* [6].

Lipasy produkované druhem *A. niger* byly purifikovány srážením síranem amonným, hydrofobní interakcí, gelovou filtrací, iontově výměnnou chromatografií a adsorpcí na hydroxylapatit [6].

Purifikace lipas byla provedena i u *A. terreus* metodou, skládající se ze srážení lipas síranem amonným a acetonem, gelové filtrace a ionově výměnné chromatografie [6].

Lipasy *A. carneus* byly purifikovány využitím jednoduchého dvoustupňového procesu zahrnujícího srážení síranem amonným a hydrofobní chromatografií na octyl-Sepharose [6].



Obr.11 Kolonie *Aspergillus niger* na CYA po 5 dnech při 25 °C [17]

3.2.3.2 Rod *Mucor*

Říše: Fungi

Třída: Zygomycetes

Rod: *Mucor*

Nejrozsáhlejším rodem třídy *Zygomycetes* je rod *Mucor*. Na různých potravinách (chlebu, másle, mase, ovoci, zelenině) tvoří volně vláknitý, většinou bělavý porost s kulovitými nahnědlými sporangii. Sporangia jsou vakovité útvary, ve kterých vznikají endospory – sporangiospory. Část sporangioforu zasahuje do sporangia a označuje se jako kolumela. Někteří příslušníci rodu *Mucor* dehydrogenují sukcinát vzniklý glyoxylátovým cyklem na fumarát, čehož se průmyslově využívá při tzv. fumarovém kvašení [14].

Mucor způsobuje řadu onemocnění nejen u člověka (onemocnění sluchového ústrojí), ale i u hovězího nebo vepřového dobytka [12, 25].

Lipolytickou aktivitu vykazuje *M. javanicus*, produkující také amylolytické enzymy a zkvašující sacharidy za anaerobních podmínek na ethanol a oxid uhličitý. Z tohoto důvodu se v Japonsku a Číně používá pro výrobu alkoholických nápojů ze sóji [14].

Extracelulární glykoproteinové lipasy částečně purifikované ve dvou formách, A a B, produkuje *M. miehei* [6].



Obr. 12 *Mucor* spp. [25]

3.2.3.3 Rod *Penicillium*

Říše: Fungi

Třída: Deuteromycetes

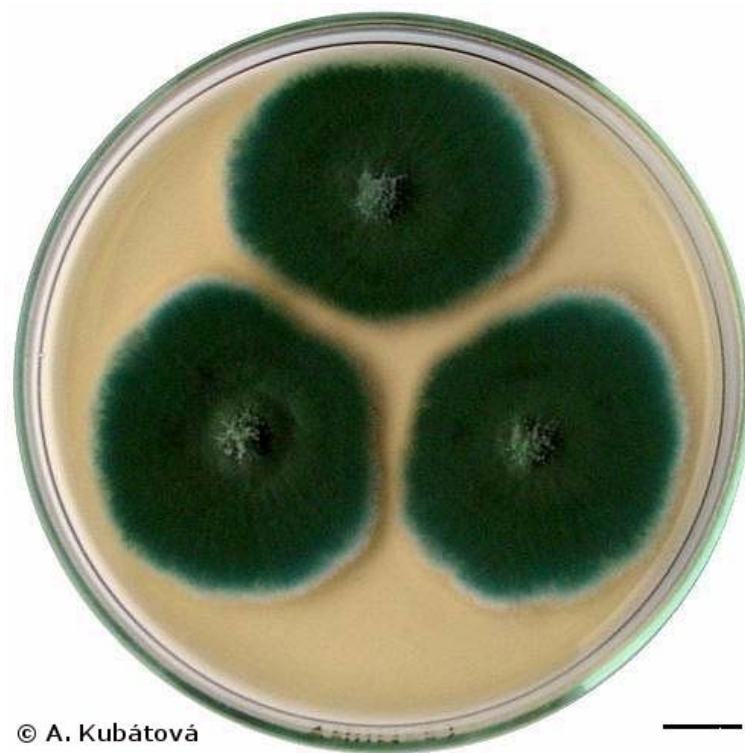
Rod: *Penicillium*

Rod *Penicillium* je nejrozsáhlejším a nejrozšířenějším rodem plísní, obsahující asi 150 druhů. Patří mezi vláknité houby vyskytující se v půdě, vzduchu a na nejrůznějších potravinách. Zástupci tohoto rodu se využívají v technologiích např. při produkci antibiotik nebo výrobě sýrů. Při výrobě sýrů se využívá např. *P. roqueforti* (výroba sýrů typu Roquefort) [16, 17].

P. roqueforti vytváří sametové kolonie většinou bez rýh, tmavozelené, často s bílým třásnitým okrajem. Spodní strana kolonie je olivově zelená až tmavě černozeleňá. Rozmnožování probíhá nepohlavně konidiemi. Konidie vyrůstají z fialid v řetězcích, jsou kulovité, hladké, o průměru 3,5 – 4(–6) μm . Konidiofory se silně bradavčitou stopkou jsou štětcovitě větvené, s přitisklými větvemi a metulami, na nichž vyrůstají lahvičkovité fialidy s krátkým krčkem [17].

Lipolytickou aktivitu vykazují také *P. camembertii*, *P. citrinum* a *P. cyclopium* [6].

Lipasy druhu *P. camembertii* U-150 byly purifikovány na čtyři aktivní frakce procesem zahrnujícím srážení ethanolom, frakcionaci síranem amonným a sloupcovou chromatografií na hydroxyapatitu a aminoocetyl-Sepharose [6].



© A. Kubátová

Obr. 13 Kolonie *Penicillium roqueforti* na CYA po 7 dnech při 25 °C [17]

3.2.3.4 Rod *Rhizopus*

Říše: Fungi

Třída: Zygomycetes

Rod: *Rhizopus*

Rod *Rhizopus* patří mezi vláknité houby, které se nacházejí v půdě, na hnilém ovoci a zelenině, starém chlebu a výkalech zvířat. Způsobuje řadu infekcí u lidí, některé druhy jsou rostlinné patogeny [25].

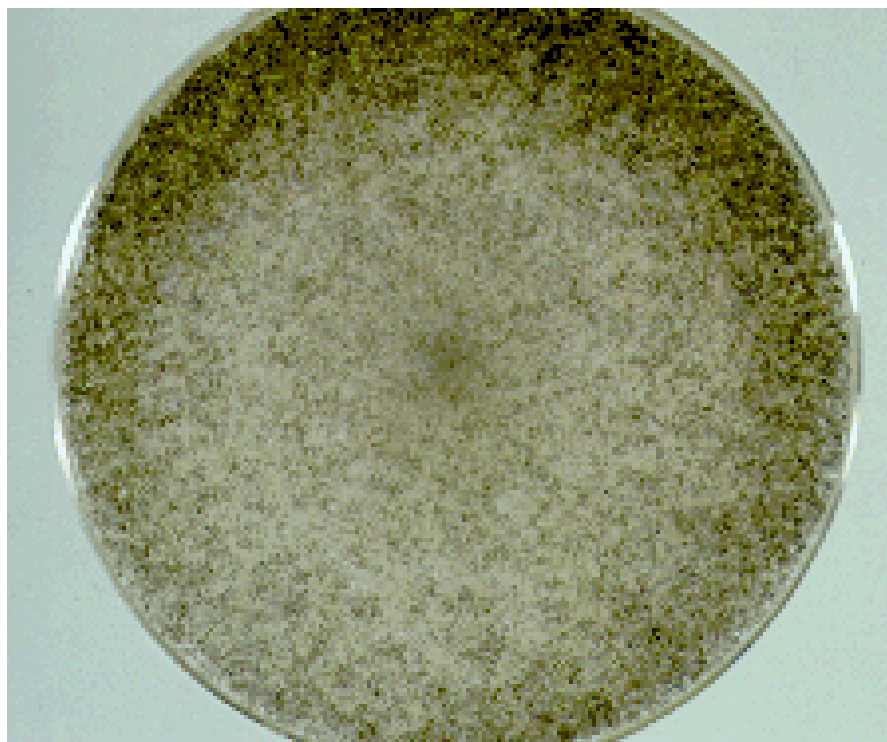
Tvoří dlouhé sporangiofory vyrůstající po 2 až 3 ze šlahounovitých hyf neboli stolonů v místech, kde vznikají kořínkovité hnědavé útvary zvané rhizoidy. Konec sporangioforu pod sporangiem je rozšířený v tzv. apofýzu a přechází spojitě v čočkovitou kalumelu [14].

Řada morfologických znaků jako délka rhizoidy a sporangioforu, velikost sporangia, tvar kalumely a velikost, tvar a povrch sporangiospor jsou však u jednotlivých druhů obvykle odlišné stejně tak, jako maximální teplota růstu [25].

Lypolytickou aktivitu lze sledovat u druhů *R. oryzae*, *R. niveus*, *R. delemar*, *R. japonicus*, *R. arrhizus* a *R. chinensis* [6].

R. oryzae vytváří nejprve bílé, postupně hnědočerné až černošedé kolonie. Sporangiofory jsou hladké, bez sept, jednoduché nebo rozvětvené. Sporangia jsou kulovitá s průměrem větším než 175 µm, s množstvím spor. Sporangiospory jsou elipsoidní s rýhami na povrchu. Optimální teplota pro růst je 40°C [26].

Při studiu tří lipas, A, B a C, produkovaných druhem *R. delemar*, byla nejprve odfiltrována mycelia z živného média. Promytá a usušená mycelia byla rozmačkána s pískem promytým kyselinou a extrahována acetátovým puforem. Koncentrovaný protein byl poté purifikován na sloupci Ultrogelu a Sephadexu G-150 [6].



Obr. 14 Kolonie *Rhizopus oryzae* [26]

3.2.3.5 Rod *Rhizomucor*

Říše: Fungi

Třída: Zygomycetes

Rod: *Rhizomucor*

Rod *Rhizomucor* je vláknitá houba vyskytující se v půdě, na hnilém ovoci a zelenině. Zahrnuje tři druhy – *R. pusillus*, *R. miehei* a *R. variabilis*. Ačkoliv je často izolována z kvasícího organického materiálu, zřídka je zdrojem infekcí pro člověka [25].

Tvoří nepravidelně rozvětvené sporangiofory. Sporangium je hnědé, kulatého tvaru. Apofýza není přítomna, naproti tomu kalumely jsou nápadné, hruškovitého tvaru. Sporangiospory jsou malé, jednobuněčné, kulaté nebo elipsoidní [25].

Lipasy produkované druhem *R. miehei* byly purifikované srážením síranem amonným a iontově výměnnou chromatografií na phenyl-Sephadexu a DEAE-Sephrose [6].



Obr. 15 *Rhizomucor miehei* [25]

4 TECHNOLOGICKÉ VYUŽITÍ LIPOLYTICKÝCH ENZYMŮ A MIKROORGANISMŮ S LIPOLYTICKOU AKTIVITOU

4.1 Lipasy v lipolytických reakcích

Poptávka po enzimech v posledních letech stále roste. Enzymy jsou využívány v různých odvětvích průmyslu, jako je průmysl farmaceutický, kosmetický nebo potravinářský [27].

Lepší porozumění enzymům a jejich katalytickému chování spolu s pokrokem molekulárního inženýrství vedlo v posledních letech k novým možnostem využití různých typů enzymů jako například proteas, amylas, oxidas, glykosida, celulas nebo lipas [27].

Pokud jde o poslední jmenované, lipasy jsou využívány v průmyslu farmaceutickém, potravinářském nebo průmyslu čistících přípravků. Jejich výhodou oproti klasickým chemickým katalyzátorům je jejich lepší substrátová specifita a fungování v mírných reakčních podmínkách. Jejich možnosti využití navíc rozšiřuje i skutečnost, že si ponechávají svoji aktivitu i v organických rozpouštědlech. Ve farmaceutickém průmyslu mohou být lipasy využívány na rozlišení racemických směsí nebo jako biokatalyzátory při syntézách chirálních meziproduktů. V potravinářském průmyslu jsou tyto enzymy využitelné hlavně v procesech změny struktury olejů a tuků, ve kterých lipasová regioselektivita a typoselektivita poskytují produkci specifických triacylglycerolů s předem určeným složením a rozložením mastných kyselin. Lipasy jsou také využívány v lipolytických reakcích, při kterých dochází k přenášení lipofilní části na hydrofilní, jako jsou cukry, aminokyseliny a proteiny nebo fenolické sloučeniny [27].

4.1.1 Lipasami katalyzované reakce

Hlavním problémem, který musí být v reakcích katalyzovaných lipasami překonán, je kombinace lipofilního substrátu s hydrofilním. Aby se dosáhlo reakcí s dostatečnou rychlostí a výtěžností a aby se překonal velký rozdíl v odlišné polaritě a afinitě substrátů k rozpouštědлу, musely být zváženy různé reakční parametry [27].

4.1.1.1 Vliv rozpouštědla

Nejlepším způsobem provedení reakce je její uskutečnění v podmínkách bez rozpouštědla. Pokud to však není možné, má volba vhodného rozpouštědla rozhodující význam. Musí být vybráno takové rozpouštědlo, které je netoxické, ve kterém enzym zůstane aktivní a nebude rychle inaktivován. To je případ rozpouštědel s hodnotou $\log P > 3$, například n-hexanu nebo n-heptanu. Tato rozpouštědla jsou využívána v reakcích jako je lipasami katalyzovaná restrukturalizace olejů a tuků, při kterých vznikají nové tuky s lepšími fyzikálními a/nebo nutričními vlastnostmi. Obvykle však tato rozpouštědla nejsou vhodná při reakcích, ve kterých se dva substráty značně liší svoji polaritou. Příkladem, objasňujícím tento problém, je enzymově katalyzovaná syntéza esterů cukru a tuku, ve které se hydrofilní molekula musí slučovat s lipofilní částí. V tomto případě není rozpouštědlo s hodnotou $\log P > 3$ vhodné, protože rozpustnost cukru v tomto médiu je malá nebo nulová. Musí být proto použita rozpouštědla s nižší hodnotou $\log P$ jako například acetonitril, terc-butanol nebo ethyl-methylketon [27].

Při výběru rozpouštědla je také rozhodující zvážení jeho toxicity. Příkladem může být pyridin, který byl dříve často používán jako rozpouštědlo při různých reakcích. I když užití tohoto média vede často k lepší výtěžnosti a rychlosti reakce, je snahou jej omezovat právě kvůli toxicitě [27].

Byly také hledány různé způsoby, jak zlepšit aktivitu enzymu v organických rozpouštědlech. Na zlepšení enzymové aktivity je možné využít například aditiva. Jako první byla provedena adice solí, především chloridu draselného, který ve výsledku zvětšil lipasovou aktivitu v organických rozpouštědlech. Zlepšení lipasové aktivity bylo zjištěno také užitím Crownových etherů [27].

4.1.1.2 Iontové roztoky jako rozpouštědla

V současné době je zaznamenán vzrůstající zájem o iontová rozpouštědla užívaná jako média pro biokatalytické procesy. Iontová rozpouštědla jsou netěkavá a tepelně stabilní a navíc jejich hydrofobní/hydrofilní rovnováha může být přizpůsobena povaze základních kationů a anionů. Jsou také považovány za netoxická rozpouštědla. Iontové roztoky jsou přednostně používány při rozpouštění mnoha polárních a nepolárních molekul. Dovolují při lipasové katalýze dobrý kontakt mezi různě polárními substráty. Enzymy v těchto médiích také často vykazují, ve srovnání s běžnějšími organickými rozpouštědly, rostoucí selektivitu a stabilitu. Příkladem může být využití iontových rozpouštědel v lipasami katalyzovaných syntézách esterů cukrů a tuků nebo v lipolýze fenolických sloučenin [27].

Užívání iontových rozpouštědel v průmyslových biokatalytických reakcích je však doposud limitováno nejen vysokou cenou těchto sloučenin, ale také jejich použitelností pouze při produkcích využívajících vysokých objemů přidaných molekul [27].

4.1.1.3 Úprava lipas a vliv vodní aktivity

Další významné parametry reakcí katalyzovaných lipasami se týkají samotných enzymů, především jejich úpravy. Během posledních deseti let se zlepšily různé techniky na úpravu lipas, především v oblasti enzymové imobilizace, chemických modifikací nebo chemickém inženýrství. Cílem je modifikovat vybrané lipasy, zlepšit jejich vlastnosti jako je katalytická aktivita, substrátová specifita a stabilita (v určité oblasti pH nebo teploty) a možnost recyklace [27].

Nejdůležitějším parametrem v enzymově katalyzovaných reakcích je teorie optimální termodynamické vodní aktivity enzymu (a_w). Určuje efekt působení vody v hydrolytické rovnováze a rozložení vody mezi různé fáze, které mohou o navázání vody soutěžit. Katalytická aktivita enzymů je pravděpodobně ovlivněna jejich hydratačním stavem a a_w , které určují neměnní se optimum, zatímco jiné aspekty systému jsou změněny. Proto jsou rychlosti enzymových reakcí a výtěžky reakcí lépe popsány a předvíhány u vodní aktivity než u obsahu vody v médiu. Rozvoj esterifikací, interesterifikací nebo transesterifikací katalyzovaných lipasami vyžaduje studium vlivu vodní aktivity na katalyzovanou reakci. Studie tohoto parametru určuje, zda je na enzym vázaný dostatek vody, který by zabezpečil jeho optimální aktivní strukturu. Na druhé straně nadbytek vody u lipasové katalýzy může mít za následek konkurenční hydrolytické reakce. Studium obsahu vody musí být provedeno tak, aby definovalo optimální reakční podmínky, které dovolí enzymu katalyzovat přenos acylu a zabrání hydrolýze. Optimálnější hodnoty a_w jsou pro většinu lipas mezi 0,25 - 0,45, což odpovídá obsahu vody od 0,5 % do 1 % [27].

4.1.1.4 Vliv substrátu a typu reakce

Mnoho dalších parametrů může přímo ovlivnit rychlost a výtěžek esterifikace. Enzymově katalyzované reakce jsou reversibilní, často je ale výhodné posunout rovnováhu reakce směrem k syntéze. To se dá provést různými způsoby. Prvním způsobem je přizpůsobení

molárního poměru mezi dvěma reagujícími sloučeninami tak, aby byl nadbytek jednoho z těchto substrátů. V těchto podmínkách je upřednostněna esterifikace a reverzní hydrolýza je omezena. Obecně platí, že když se připojuje lipofilní podíl na hydrofilní, je obvykle lipidový substrát ten, který je v nadbytku. Povaha donoru acylu jako takového také ovlivňuje efektivnost reakce. Například použití volných mastných kyselin v přímé esterifikaci vede k tvorbě vody. Ta musí být kontinuálně odstraňována, aby byla reakce posunuta směrem k tvorbě esteru a vyhnulo se tak reverzní hydrolýze. Odstranění vody se děje vypařovacími a pervaporačními metodami, adsorpcí na iontoměničové pryskyřice nebo užitím molekulových sít [27].

Hlavní problém v lipasami katalyzovaných lipolytických reakcích spočívá ve velmi rozdílné polaritě dvou reagujících substrátů. Proto jsou některé postupy zlepšující rychlost a výtěžnost založené na předběžné modifikaci jednoho ze substrátů. Je tak regulována jeho polarita a kontakt s jiným substrátem a enzymem ve vybraném organickém médiu. Například hydrofilní substrát může být chemicky modifikován v předběžném kroku. Dojde tak ke snížení jeho hydrofilní povahy a následkem toho se zvětší jeho rozpustnost ve vybraném rozpouštědle. V literatuře jsou popsány různé způsoby modifikace, které jsou užívané především při syntéze derivátů esterů cukrů a tuků. Nejběžnější je předběžná alkylace hydrofilní sloučeniny, jejímž výsledkem je vytvoření etherové vazby [27].

I další parametry však mohou ovlivnit efektivitu reakce. Důležitý je vliv experimentálních podmínek jako je teplota, tlak, množství enzymu, povaha bioreaktoru [27].

4.1.2 Příklady lipasami katalyzovaných reakcí nepřírodních substrátů

Kromě využívání reakcí katalyzovaných lipasami v oblasti restrukturalizace olejů a tuků jsou lipasy také používány při esterifikacích, kterých se účastní nepřírodní substráty [27].

4.1.2.1 Syntéza mastných esterů kyseliny askorbové

Estery kyseliny askorbové, široce používané v potravinářském průmyslu jako antioxydanty, jsou ve srovnání s nemodifikovanou kyselinou askorbovou (vitamin C) zvýhodněné díky zvýšené rozpustnosti v olejích. Výhoda biokatalýzy oproti chemické katalýze může být ukázána na produkci 6-O-palmitoyl-L-askorbové kyseliny. Chemický proces zahrnuje kyselé katalyzovanou esterifikaci askorbové kyseliny, která vede k vytvoření směsi produktů. Naopak, enzymově katalyzovaná syntéza umožňuje tvorbu pouze jednoho produktu. Pokud jde o typ enzymu, reakce jsou většinou prováděny výhradně s imobilizovanými lipasami, produkovanými především druhy *Candida antarctica B* a *Rhizomucor mihei* [27].

Vzácně se používají při lipolýze askorbové kyseliny i jiné lipasy, např. druhu *Bacillus stearothermophilus SB1*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida rugosa* [27].

Dalším příkladem lipasy, kterou je možné využít při esterifikaci askorbové kyseliny, je lipasa produkovaná druhem *Burkholderia cepacia* [27].

Na průběh reakce má vliv molární podíl substrátu. S ojedinělými výjimkami jsou reakce vedeny s nadbytkem lipofilního substrátu z důvodu posunutí rovnováhy směrem k syntéze [27].

Různorodé výsledky reakcí byly získány v různých reakčních podmínkách (např. povaha rozpouštědla, povaha donoru acylu) a zdůrazňují důležitost enzymového prostředí na účinnost reakce. Rozhodující význam při dosažení uspokojivého konečného výtěžku mají zejména odstranění vedlejších produktů a kontrola vodní aktivity/obsahu vody v systému. Tvorba

vedlejších produktů je závislá na povaze použitého donoru acylu, kterým může být volná mastná kyselina, alkylester nebo ireverzibilní donor acylu, jako je vinylester. Důležité je potom monitorování tvorby těchto vedlejších produktů, které jsou nejčastěji vychytávány (např. adsorpce vody na molekulová síta) nebo odstraněny z reakční směsi [27].

Vychytávání vody molekulovými síty je také efektivní při dosahování uspokojivé reakční rychlosti a konečného výtěžku. Použití těchto sít je důležité na optimální kontrolu tvořící se vody a jejího vlivu na vodní aktivitu. Obecně se ale striktní kontrola vodní aktivity jeví efektivnější než adsorpce vytvořené vody na molekulová síta [27].

4.1.2.2 Příklady syntézy esterů cukru nebo kyselých esterů cukru katalyzované lipasami

Lipolýza cukerných substrátů je příkladem modifikace, která může být provedena s hydrofilním substrátem před esterifikací donorem mastného acylu v lipasami katalyzované reakci a která zlepšuje rozpustnost tohoto cukru ve vybraném rozpouštědle [27].

Příkladem předběžné chemické hydrofobizace hydrofilního substrátu je lipolýza dvou cukerných kyselin, glukuronové a chinonové [27].

Stejně jako při lipolýze vitaminu C, tak i při lipolýze derivátů cukru, je pro dosažení uspokojivých výsledků nezbytná kontrola obsahu vody a vodní aktivity [27].

Při syntéze esterů cukru se můžeme setkat i s použitím ionizovaných kapalin. Kim et al. jako první zhodnotili výhody iontového rozpouštědla oproti klasickým organickým rozpouštědlům při esterifikaci 6-O-chráněných cukrů vinylacetátem použitím lipasy *Candida rugosa* [27].

Reakce probíhající v iontových rozpouštědlech byly rychlejší a dávaly větší výtěžky než stejné reakce probíhající v organických rozpouštědlech [27].

4.1.2.3 Lipolýza aminokyselin a jejich derivátů

Aminokyseliny a jejich deriváty jsou také nepřírodními substráty, které mohou být hydrofobizovány lipasami. Řada publikací se zabývá enzymatickou syntézou N-acylaminokyselin, které se také označují jako lipoaminokyseliny. Lipoaminokyseliny jsou povrchově i biologicky aktivní, čehož se využívá v kosmetických aplikacích. Obvykle se tyto sloučeniny získávají Schotten-Baumanovým procesem, který vyžaduje použití chloridů mastných kyselin a organických rozpouštědel [27].

Při syntézách těchto lipoaminokyselin byly popsány i některé případy použití enzymů, zejména lipas. Problém lipolýzy aminokyselin nebo jejich derivátů enzymovou cestou je ještě složitější než v případě substrátů cukru. Kromě nízké rozpustnosti v organických rozpouštědlech vykazují aminokyseliny amfoterní vlastnosti. Ty musejí být překonány v případě, že se uvažuje o esterifikaci nebo amidaci jejich α -aminoskupiny nebo karboxylové skupiny. Aminokyseliny mají také různá místa možné lipolýzy. V případě lipolýzy postranních skupin mohou být mastné kyseliny použity jako donor acylu pro acylaci hydroxy, amino nebo thiolové skupiny za vzniku O-, N- nebo S-acyl lipolýzovaných sloučeniny. Na druhé straně lipolýza může nastat také na boční karboxylové skupině vytvořením buď mastného alkoholu nebo aminu [27].

Pro lipolýzu aminokyselin je také velmi důležité zvolit vhodnou kombinaci enzymu a rozpouštědla [27].

Mezi reakce, při kterých vznikají lipolýzou deriváty aminokyselin, může být zařazena také syntéza mastných esterů pyroglutamové kyseliny. Pyroglutamová kyselina je zbytek aminokyseliny, vznikající při kondenzaci omega karboxylových funkčních skupin glutamové

kyseliny se svými aminoskupinami. Její deriváty jsou velmi atraktivní pro kosmetické aplikace především kvůli schopnosti hydratovat. Díky ní je možné udržovat vysoký obsah vlhkosti v rohovité vrstvě kůže [27].

Tyto reakce aminokyselin mohou být rozšířeny i na makromolekuly, jakými jsou proteiny. Příkladem může být lipasami katalyzovaná lipolýza izolace sojových proteinů. Tato reakce byla provedena při 60 °C s použitím i bez použití rozpouštědla. Při reakci byly využity lipasy produkované druhem *Mucor miehei* nebo *Rhizopus arrhizus*, připojující různě dlouhé mastné kyseliny a měnící tak délku řetězce [27].

4.1.3 Lipasami katalyzovaná lipolýza derivátů fenolu

Doposud uvedené příklady ukázaly, že různé typy substrátů mohou inhibovat lipasy při jejich esterifikaci mastnými alifatickými skupinami. Pokud jde o lipolýzu komplexů molekul jako jsou polyfenoly nebo jejich deriváty, stále více publikací se zabývá použitím lipas na jejich modifikaci tak, aby byly regulovány jejich biologické a fyzikálně-chemické vlastnosti [27].

4.1.3.1 Příklady lipolýzy chlorogenových a fenolových kyselin ze zeleného kávového extraktu

V závislosti na druhu kávy obsahují *Coffea arabica* nebo *Coffea robusta* 5,5 – 12 % fenolových kyselin v zeleném kávovém suchém materiálu. Jedná se o hydroxy nebo methoxy deriváty kyseliny skořicové. Vyskytují se buď volné nebo vázané ve formě esterů nebo diesterů 1,3,4,5-tetrahydroxycyklohexankarboxylové kyseliny a díky skupinám tvořícím tyto sloučeniny se označují jako chlorogenové kyseliny. Tyto sloučeniny, které jsou částečně rozpustné ve vodě, vykazují silnou antioxidační aktivitu a baktericidní vlastnosti. Někteří autoři se zabývali možností připojit lipolytický alifatický řetězec k chlorogenové kyselině, aby modifikovali její hydrofilně-lipofilní rovnováhu. Získali by tak novou molekulu, která by měla emulzní vlastnosti i antioxidační aktivitu. Ačkoli bylo obtížné dosáhnout chemické esterifikace karboxylové skupiny chlorogenové kyseliny různými mastnými alkoholy kvůli tepelné citlivosti fenolických kyselin a možné oxidaci pod určitou hodnotou pH, rozhodli se autoři provedením lipolýzy chlorogenové kyseliny zhodnotit možnosti biokatalýzy [27].

4.1.3.2 Příklady lipolýzy dalších fenolických sloučenin a jejich derivátů

V poslední době byla také publikována esterifikace fenolických kyselin, především kyseliny skořicové a jejích derivátů. Jako první studoval esterifikaci funkčních fenolů Buisma et al., s cílem získat antioxidanty s emulzními vlastnostmi, které by byly využitelné v hydrofobních médiích. Byly provedeny dva způsoby syntézy těchto nových druhů molekul. Prvním způsobem bylo doplnění práce, která pojednává o esterifikaci kyseliny skořicové mastnými alkoholy a která odpovídá studii o aromatických sloučeninách s primární hydroxylovou skupinou. Tato skupina by mohla být esterifikována alifatickými kyselinami. Pokud jde o esterifikaci derivátů kyseliny skořicové a kyseliny benzoové, byla esterifikace provedena s butanolem a s lipasami, produkovanými různými mikroorganismy (*Candida antarctica*, *Humicola lanuginosa*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas sp.* a *Geotrichum candidum*) [27].

Druhý způsob syntézy, studovaný těmito autory, sestával z lipolýzy fenolů nesoucích primární hydroxylovou skupinu na aromatickém jádře. Při esterifikaci hydroxytyrosolu

a 3,5-di-*t*-butyl-4-hydroxybenzylalkoholu byla použita lipasa produkovaná druhem *Candida antarctica* [27].

Dále byla zkoumána schopnost lipasy produkované *Pseudomonas cepacia* katalyzovat transesterifikaci derivátů kyseliny skořicové různými alkoholy. V první studii byly tyto lipasy použity v transesterifikačních reakcích ethylhydroskořicanů s různými alkoholy, např. *n*-butanolem, isoamylalkoholem, benzylalkohol *n*-oktanolem a 1-fenylethanolem. Mezi těmito testovanými alkoholy poskytoval pouze *n*-butanol transesterifikační produkt [27].

Zkoumána byla také schopnost lipasy *Candida antarctica* a *Rhizopus miehei* katalyzovat syntézu lipolytických derivátů přírodních antioxydantů odvozených od kyseliny skořicové. Hydrofilní charakter přírodních antioxydantů, jako jsou fenolické kyseliny, redukuje účinnost lipas ve stabilizovaných olejích a tucích. Proto se autoři zabývali modifikací těchto antioxydantů esterifikací lipofilním řetězcem tak, aby změnili jejich rozpustnost v olejích a emulzích. První esterifikace kyseliny skořicové oktanolem byla uskutečněna jako modelová reakce s dvěma imobilními lipasami v různých netoxických rozpouštědlech jako je aceton, 2-methyl-2-propanol a 2-methyl-2-butanol. Bylo zjištěno, že výtěžek reakce je závislý na použitém rozpouštědle a použité lipase. Dobrý výtěžek (více než 80 %) byl získán při použití lipasy *Candida antarctica*, zatímco *Rhizopus miehei* prokázal střední až nízkou účinnost závislou na použitém rozpouštědle [27].

4.1.3.3 Lipasami katalyzovaná lipolýza flavonoidů a jejich derivátů

Flavonoidy jsou přírodní molekuly, které se nacházejí v mnoha druzích rostlin. Jsou velmi atraktivní vzhledem ke svým silným antioxidačním vlastnostem. Nacházejí se v různých druzích ovoce a zeleniny nebo v bylinách. Avšak hydrofilní povaha těchto antioxydantů snižuje jejich antioxidační ochranu pro tuky a oleje. K modifikaci flavonoidů a zvýšení jejich lipofility se mohou využít například lipasy. Bylo provedeno několik lipasami katalyzovaných acylací flavonoidních glykosidů s využitím lipas, které umožnily vysoce regioselektivní esterifikaci. V této studii byla provedena enzymatická acylace rutinu a naringinu mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem. Jako biokatalyzátory byly použity lipasy *Candida antarctica* a byly hodnoceny různé reakční parametry. Enzymově katalyzovaná acylační syntéza rutinu a narindinu byla již popsána, ale většina práce byla provedena s toxickými organickými rozpouštědly. Proto se autoři rozhodli testovat méně toxická média jako aceton, THF a *tert*-butanol na esterifikaci rutinu nebo naringinu použitím mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem [27].

Hodnocen byl také vliv vodní aktivity použitím *tert*-butanolu jako rozpouštědla. Nejvyšší přeměna byla zjištěna pro hodnotu vodní aktivity 0,11 nebo méně. Dále byly testovány parametry jako je vliv množství lipasy nebo efekt koncentrace dekanové kyseliny [27].

4.2 Lipasy aktivní při nízkých teplotách

S rostoucím zájmem o možnosti využití psychrofilních mikroorganismů roste i zájem o lipasy produkované těmito mikroorganismy a jejich využití v průmyslových aplikacích [7].

Lipasy aktivní při nízkých teplotách nabízejí nové příležitosti biotechnologického využití, které je založené na jejich katalytické aktivitě při nízké teplotě [7].

Za chladu aktivní enzymy spolu s mikroorganismy, které je produkují, pokrývají široké spektrum biotechnologických aplikací. Jsou součástí detergentů, potravinových aditiv (fermentace, sýrařství, pekařství), účastní se biotransformací a genové exprese, mohou být alternativou mezofilním enzymům v pivovarnictví a vinařství, při výrobě sýrů a potravinových doplňků [7].

Medicínské a farmaceutické aplikace

Lipasy mají také význam ve farmacii při transesterifikacích a hydrolýzách. Hrají primární roli v produkci speciálních lipidů. Mají význam při modifikacích monoglyceridů a jejich následném využití jako emulgátorů ve farmacii [7].

Syntéza některých chemikálií

Některé průmyslově významné chemikálie vyráběné chemickými procesy z tuků a olejů mohou být produkované i lipasami s mnohem větší a lepší specifitou. Využití průmyslových enzymů dovoluje technologům rozvíjet procesy, které jsou bližší procesům probíhajícím v přírodě [7].

Využití v potravinářství

V potravinářském průmyslu je nutné, aby reakce probíhaly při nízké teplotě tak, aby se vyhnulo změnám ve složkách potravy způsobeným nevhodnými vedlejšími reakcemi, které jinak probíhají za vyšší teploty. Proto se v potravinářském průmyslu využívají psychrofilní a psychotropní mikroorganismy produkující lipasy. Lipasy se staly nedílnou součástí moderního potravinářství. Používání enzymů, které zlepšuje tradiční chemické procesy výroby potravin, se rozvinulo v několika posledních letech [7].

Ačkoli jsou mikrobiální lipasy využívány při výrobě potravin, některé z nich, obzvláště lipasy produkované psychotropními bakteriemi *Pseudomonas* sp. a několika formami *Rhizopus* sp. a *Mucor* sp., způsobují kažení mléka, mléčných produktů a ovoce [7].

Detergenty

Komerčně důležitým polem pro aplikaci hydrolytických lipas je jejich přidávání do detergentů, které jsou používány především v domácnostech, průmyslových prádelnách a myčkách nádobí. Každý rok je na výrobu detergentů prodáno asi 1000 t lipas. Používání za chladu aktivních lipáz v detergentech má velkou výhodu při praní ve studené vodě, při kterém se snižuje spotřeba energie a zabraňuje se trhání textilních vláken [7].

Enzymy tedy mohou snižovat zatížení životního prostředí detergenty, protože šetří energií tím, že umožňují umývání a praní při nižších teplotách [7].

Lipasy také rozkládají mastné skvrny za vzniku hydrofilních látek, které jsou lépe odstranitelné než podobné nehydrolyzované skvrny [7].

Jinou běžnou komerční aplikací detergentů je jejich využití v myčkách nádobí, při čištění odpadů ucpaných lipidy v potravinářství nebo při čištění odpadních vod vznikajících v průmyslu a domácnostech.

4.3 Odlučovače tuků

V Japonsku se vyprodukuje každý rok více než 400 000 t odpadní vody kontaminované lipidy a asi 75 % této odpadní vody pochází z potravinářského průmyslu a restaurací. Lipidy přítomné ve vodě jsou obtížně odstranitelné a rozložitelné, protože jsou těžko rozpustné ve vodě. Metabolismus lipidů zahrnuje několik kroků. Lipidy jsou nejprve emulgovány a rozloženy na glycerol a mastné kyseliny. Následně jsou mastné kyseliny přeměněny β -oxidací na acetyl-CoA a nakonec vstupují do citrátového cyklu. Avšak odbourávání lipidů využitím metabolismu mikroorganismů trvá poměrně dlouho [28].

Lipidy mohou vytvářet olejový film na povrchu vody, bránit difúzi kyslíku ze vzduchu do vody a vést ke smrti mnoha forem vodního života. Agregáty tvořící se z kapek oleje a dalších odpadních látek přítomných ve vodě mohou také ucpávat kanalizační potrubí [29].

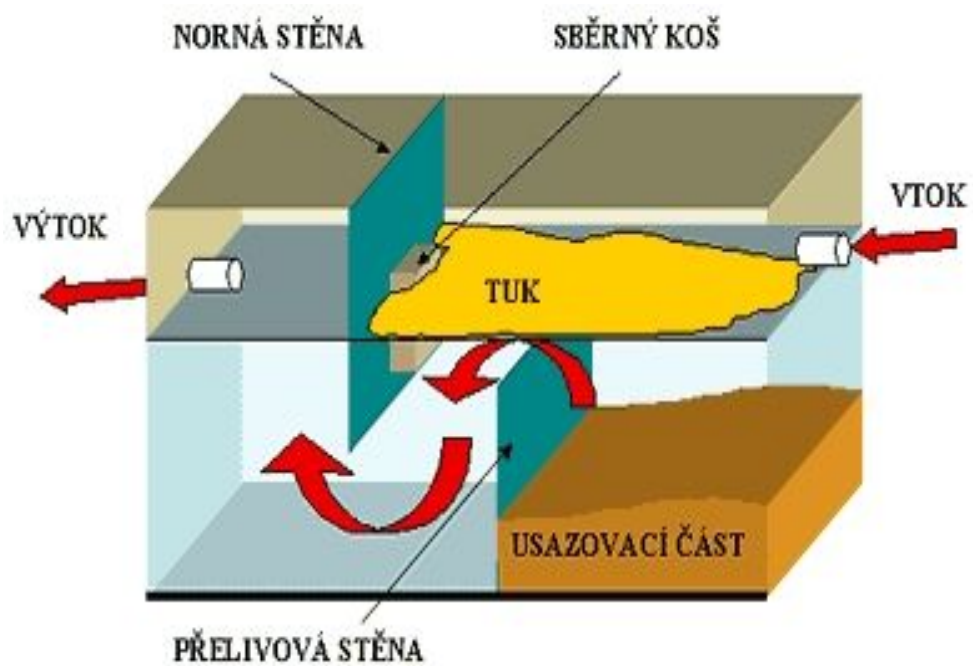
Kvůli ochraně životního prostředí byla zkoumána funkce lipas s ohledem na jejich využití v lipidy kontaminované vodě. Kvůli zlepšení biodegradace lipidů v odpadní vodě byly studovány mikroorganismy jako *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* sp. a kvasinky kvůli jejich schopnosti odbourávat lipidy. Avšak tyto druhy projevují svoji schopnost odbourávat lipidy v závislosti na aktuálních podmínkách jako je teplota. Neumí také degradovat řadu lipidů a působí negativně na bakterie vyskytující se přirozeně v odpadních vodách [28].

Odlučovače tuků jsou určeny k zachycení tuků obsažených v odpadních vodách. Používají se zejména u připravených jídel, v potravinářském průmyslu, v průmyslu zpracování masa a masných výrobků, u fritovacích linek, úpraven brambor apod. Zařazují se jako čistící zařízení před malými čistírnami odpadních vod nebo před zaústěním do kanalizace. Do odlučovače tuků nesmí být sveden ostatní komunální odpad a vody obsahující oleje minerálního původu [30, 31].

Rozpuštěné tuky obsažené v odpadních vodách z potravinářských provozů mají tendenci vlivem ochlazení v kanalizačním systému změnit skupenství z kapalného na tuhé a vlivem menší měrné hmotnosti než má voda vyplavat na vodní hladinu. Tím se zvyšuje nebezpečí zanášení odpadních kanalizačních vedení. S prodlužováním doby zdržení v těchto systémech roste rovněž nebezpečí biologického zatížení životního prostředí [30].

Odlučovače využívají fyzikálních zákonů, zejména gravitace. Horká odpadní voda přiváděná do odlučovače tuků je uklidněna usměrňovací přepážkou, což umožňuje sedimentaci kalů a oddělení vzlínavých tukových částic, které vystupují k hladině. Předčištěná voda odtéká pod normou stěnou do odtokového potrubí. Odloučené tuky se shromažďují na hladině sedimentačního prostoru. Odloučené a zachycené látky se vyvážejí k zneškodnění [32].

Fyzikální separace lipidů použitím odlučovačů tuků je efektivní na odstranění většiny lipidů z odpadní vody. Odstraněné lipidy jsou spalovány nebo vyhozeny na skládky odpadů. Avšak skládky a spalování lipidů obsahujících těžké oleje způsobuje řadu problémů životního prostředí. Navíc odlučovače a separátory tuků způsobují nepříjemný zápach [28].



Obr.16 Schéma odlučovače tuků [33]

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - OVĚŘENÍ LIPOLYTICKÉ AKTIVITY U KOMERČNÍCH PŘÍPRAVKŮ

Pět komerčních preparátů (KP) bylo testováno na schopnost rozkládat tuky za laboratorních podmínek na pevném živném médiu.

Tab. 1 Dostupné údaje o testovaných KP

Označení přípravku	Výrobce (dovozce)	Informace o složení
Sanytura	SANYTURA GmbH	---
CPL 50	EVERSTAR s.r.o.	směs bakterií, enzymů, detergentů a živin
XP 2001	SANBIEN s.r.o.	---
Neznámý přípravek	---	---
ACO Clear	ACO Fulbora	směs bakterií a enzymů

Ověření přítomnosti lipolytických enzymů bylo realizováno na dvou kultivačních médiích – Tributyrin Agar Base a Spirit Blue Agar. Každý z pěti preparátů byl zaočkován vždy dvakrát do stejného druhu média. Bylo tedy připraveno 20 agarových ploten, vždy dvě agarové plotny se stejným vzorkem a stejným kultivačním médiem. Kultivace poté proběhla u jedné poloviny vzorků aerobně, u druhé části vzorků anaerobně. Vyroslé kultury byly otestovány spektrofotometricky na lipolytickou aktivitu a dále byl stanoven počet mikroorganismů nepřímou metodou.

5.1 Seznam použitých přístrojů a chemikálií

5.1.1 Použité přístroje

- Očkovací box Fatran
- Spektrofotometr UV/VIS HELIOS DELTA – Thermospectronic England
- Ultracentrifuga Eppendorf centrifuge 5417R
- Váhy Scaltec, SAS 50 - USA
- Světelný mikroskop s kamerou – Merci s.r.o.
- Vodní lázeň

5.1.2 Použitý software

- Microsoft Word 2002 SP3
- Microsoft Excel 2002 SP3
- Lucia Net

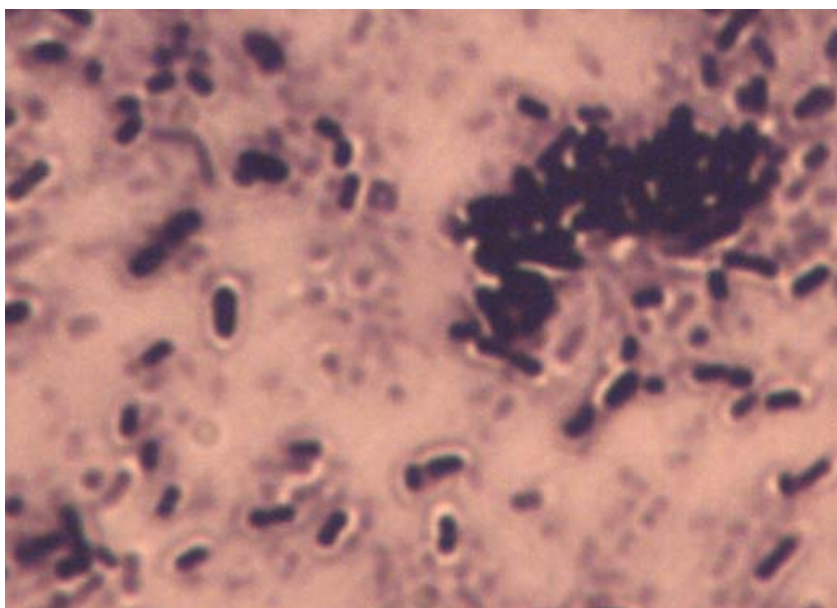
5.1.3 Použité chemikálie

- Tributyrin
- Kyselina trichlorocetová
- Fyziologický roztok
- p-nitrofenol
- Fosfátový pufr
- Uhličitan sodný 0,1M
- Fosfátový pufr 0,05M (pH 7,2)

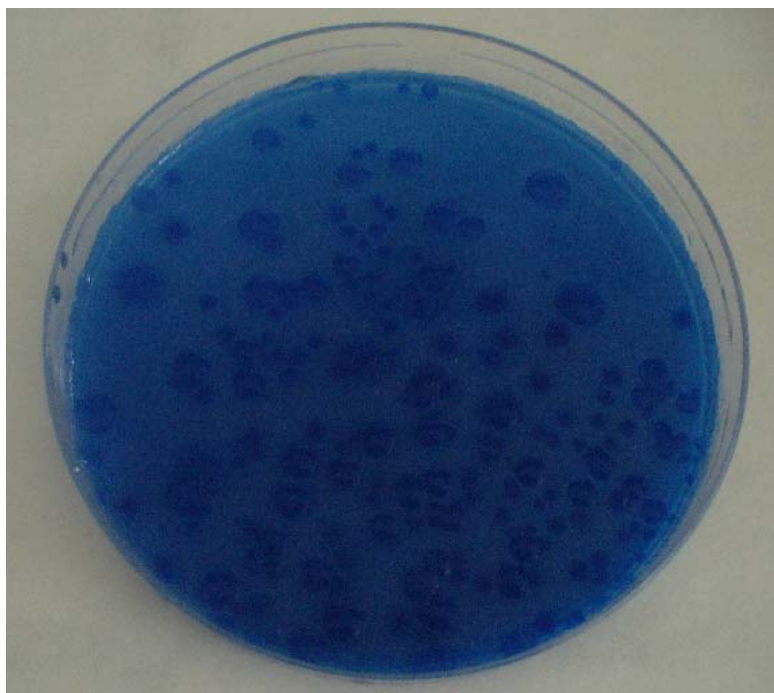
- p-nitrofenyllaurát v absolutním ethanolu – Fluka, CH-9471 Buchs
- Albumin Fraktion V (aus Rinderserum) – MERCH, D-6100 Darmstadt, F. R., Germany
- Hydroxid sodný 10M
- Síran měďnatý – pentahydrát p.a. – Lach-Ner, s.r.o.

5.1.4 Použitá živná média

- Tributyrin Agar Base w/o Tributyrin – HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd.
- Spirit Blue Agar – HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd.



***Obr.17** Aerobní kultivace, barvení dle Grama, komerční preparát č. 2*



***Obr.18** Anaerobní kultivace na Spirit Blue Agar, komerční preparát č. 5*

5.2 Pracovní postupy

5.2.1 Stanovení počtu buněk nepřímou metodou

Na stanovení počtu mikroorganismů nepřímou kultivační metodou bylo připraveno dvacet agarových ploten s Tributyrin Agar Base. Deset Petriho misek bylo kultivováno aerobně, deset anaerobně.

Počet mikroorganismů byl vypočítán podle vztahu:

$$x = MO \cdot z \cdot X \quad (1)$$

kde: MO – průměrný počet kolonií ze dvou paralelních Petriho misek

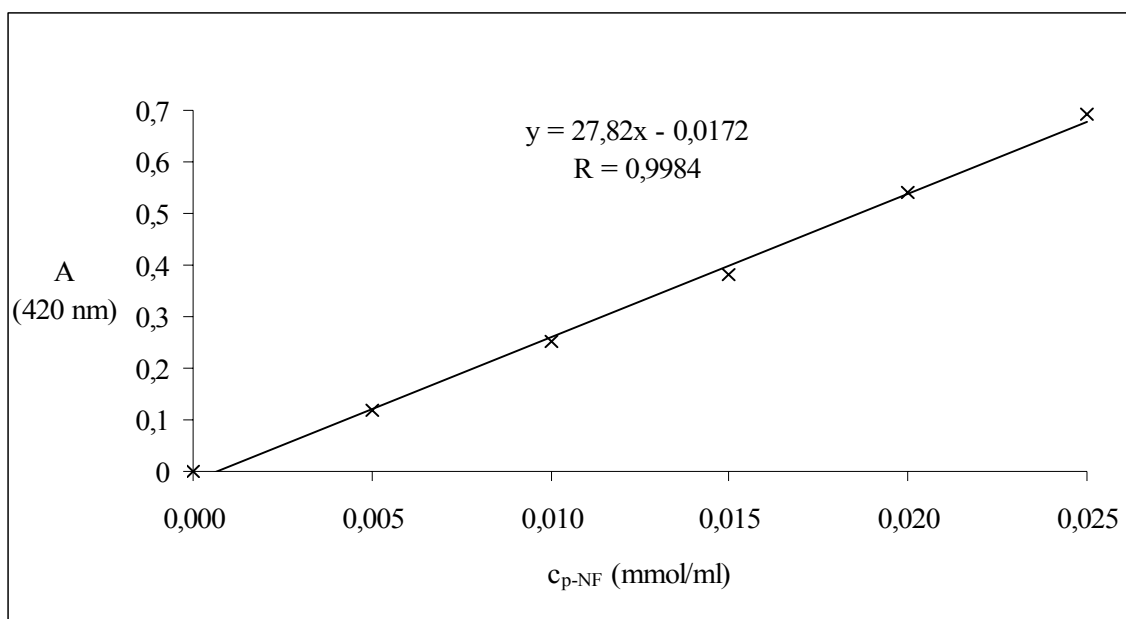
z – použité zředění (10^3)

X – přepočet na 1 ml

5.2.2 Stanovení kalibrační křivky p-nitrofenolu

Z 0,025 M p-nitrofenolu byla připravena kalibrační řada s koncentracemi v jednotlivých vzorcích 0,005; 0,010; 0,015; 0,020; 0,025. K vzorkům bylo přidáno 0,65 ml 0,05 M fosfátového pufru (pH 7,2) a 0,25 ml 0,1 M uhličitanu sodného. Po promíchání a doplnění objemu destilovanou vodou na 10 ml byla měřena absorbance proti blanku při 420 nm.

Blank byl připraven z 0,65 ml 0,05 M fosfátového pufru (pH 7,2), 0,1 ml destilované vody a 0,25 ml 0,1 M uhličitanu sodného, promíchán a doplněn destilovanou vodou na objem 10 ml.

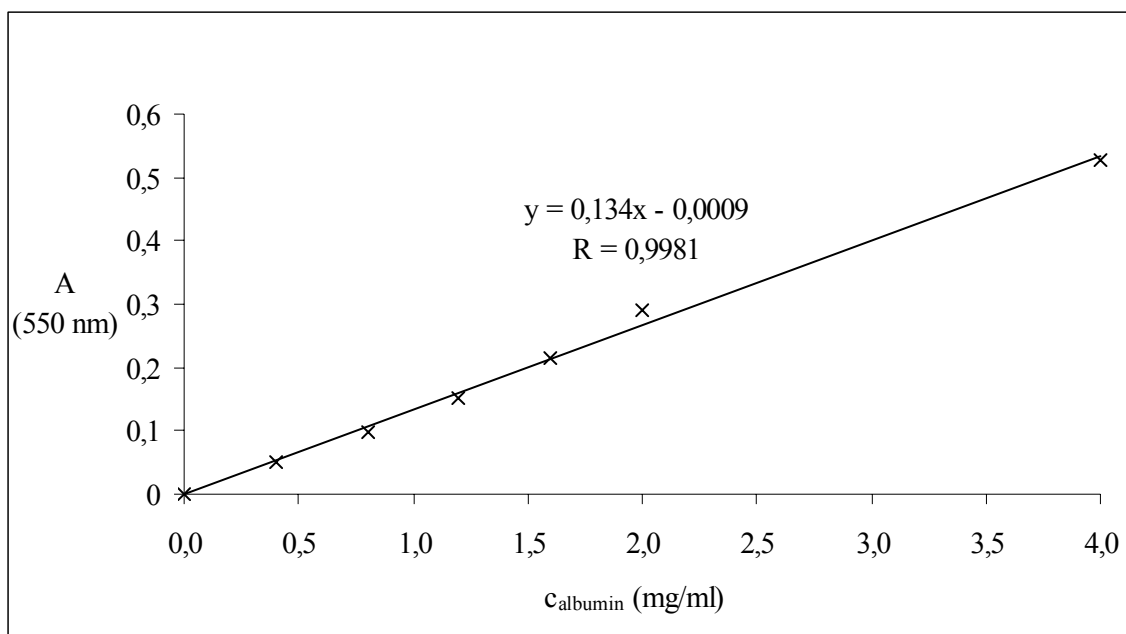


Graf 1 Kalibrační křivka p-nitrofenolu

5.2.3 Stanovení kalibrační křivky albuminu

Ze základního roztoku albuminu o koncentraci 4 mg/ml byla připravena kalibrační řada s koncentracemi albuminu v jednotlivých vzorcích 0,0 (blank); 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 4,0 mg/ml. K vzorkům bylo přidáno 0,5 ml 10 M hydroxidu sodného a objem vzorků byl

doplňen destilovanou vodou na 4,5 ml. Vzorky byly 10 minut povařeny, ochlazeny a ke každému bylo přidáno 0,25 ml 25% roztoku pentahydrátu síranu měďnatého. Po promíchání byly roztoky zfiltrvány a byla měřena jejich absorbance při 550 nm.



Graf 2 Kalibrační křivka albuminu

5.2.4 Stanovení lipolytické aktivity nakultivovaných mikroorganismů

Kultura buněk byla rozsuspensována v 650 μ l 0,05 M fosfátového pufru (pH 7,2) a následně centrifugována 10 minut při 1600 ot./min. Supernatant i sediment byly použity ke stanovení lipolytické aktivity.

K 0,65 ml supernatantu bylo přidáno 0,1 ml 0,025 M p-nitrofenyllaurátu v absolutním ethanolu a roztok byl uložen na 30 minut do termostatu (37 °C). Poté bylo přidáno 0,25 ml 0,1 M uhličitanu sodného a po promíchání byla fotometricky stanovena aktivita při 420 nm.

Sediment byl rozsuspensován v 0,65 ml fosfátového pufru a k suspenzi bylo přidáno 0,1 ml 0,025 M p-nitrofenyllaurátu v absolutním ethanolu. Další postup byl shodný s přípravou supernatantu.

Blank byl připraven z 0,65 ml 0,05 M fosfátového pufru (pH 7,2), 0,1 ml 0,025 M p-nitrofenyllaurátu v absolutním ethanolu a 0,25 ml 0,1 M uhličitanu sodného.

Lipolytická aktivita vyjádřená v mmol/ml byla vypočítána podle vztahu:

$$a = f_x \cdot A_{420} \quad (2)$$

kde: f_x – přepočítávací faktor koncentrace lipolytických enzymů pro absorbanci rovnou 1, určený z regresní přímky p-nitrofenolu,

A_{420} – absorbance naměřená u jednotlivých vzorků.

5.2.5 Časová závislost

Pracovní postup stanovení závislosti změny absorbance vzorků na čase byl stejný jako v případě stanovení lipolytické aktivity u kultury mikroorganismů. Vzorky však nebyly uloženy 30 minut v termostatu, ale absorbance byla měřena v pětiminutových intervalech po dobu 30 minut.

Lipolytická aktivita vyjádřená v mmol/ml byla vypočítána podle vztahu:

$$a = f_x \cdot A_{420} \quad (3)$$

kde: f_x – přepočítávací faktor koncentrace lipolytických enzymů pro absorbanci rovnou jedné, určený z regresní přímky p-nitrofenolu,

A_{420} – absorbance naměřená u jednotlivých vzorků po pěti minutách inkubace.

5.2.6 Stanovení bílkovin ve vzorcích

Kultura buněk byla rozsuspendována v 500 μ l fyziologického roztoku a 1 ml 10% kyseliny trichloroctové a následně centrifugována 3 minuty při 3000 ot./min. Na stanovení byl použitý sediment i supernatant. Ke každému vzorku bylo přidáno 0,5 ml 10 M hydroxidu sodného a 3,8 ml destilované vody. Suspenze byla umístěna na 10 minut do vroucí lázně, poté ochlazená a bylo přidáno 0,25 ml 25% roztoku pentahydrátu síranu měďnatého. Po promíchání a filtraci byla měřena absorbance vzorků při 550 nm proti blanku. Blank byl připraven přidáním 0,5 ml hydroxidu sodného a 0,25 ml pentahydrátu síranuměďnatého ke 4 ml destilované vody.

Obsah bílkovin v mg v jednom ml vzorku byl vypočítán ze vztahu:

$$y = f_y \cdot A_{550} \quad (4)$$

kde: f_y – přepočítávací faktor koncentrace bílkovin pro absorbanci rovnou 1, určený z regresní přímky albuminu,

A_{550} – absorbance naměřená u jednotlivých vzorků bílkovin.

Ze zjištěného obsahu bílkovin ve vzorcích byla vypočítána lipolytická aktivita vztažená na bílkoviny v mmol/min·mg dle vztahu:

$$a_{spec.} = \frac{A_{420} \cdot f_x}{t \cdot y} \quad (5)$$

kde: A_{420} – absorbance naměřená u jednotlivých vzorků,

f_x – přepočítávací faktor koncentrace lipolytických enzymů pro absorbanci rovnou jedné určený z regresní přímky p-nitrofenolu,

t – doba kultivace

y – obsah bílkovin v mg v jednom ml vzorku.

Příklad výpočtu lipolytické aktivity a přepočtu lipolytické aktivity na obsah bílkovin

Výpočet přepočítávacího faktoru f_x z regresní rovnice kalibrační křivky p-nitrofenolu:

$$y = 27,82x - 0,0172$$

kde: $x = c_{p-NP}$ a $y = A_{420}$

$$x = f_x = \frac{1 + 0,0172}{27,82} = 0,0366 \text{ mmol/ml}$$

Výpočet přepočítávacího faktoru f_y z regresní rovnice kalibrační křivky albuminu:

$$y = 0,134x - 0,0009$$

kde: $x = c_{\text{albumin}}$ a $y = A_{550}$

$$c_{\text{albumin}} = f_y = \frac{1 + 0,0009}{0,134} = 7,4694 \text{ mmol/ml}$$

Výpočet lipolytické aktivity na ml reakční směsi podle vztahu (2), aerobní kultivaci – sediment, vzorek 1:

$$a = 0,0366 \cdot (2 \cdot 0,744) = \underline{54,41 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/ml}}$$

Výpočet specifické aktivity v jednom ml vzorku podle vztahu (4), aerobní kultivaci – sediment, vzorek 1:

$$y = 7,4694 \cdot 0,017 = 0,1270 \text{ mg/ml}$$

Přepočet lipolytické aktivity na obsah bílkovin podle vztahu (5):

$$A = \frac{(2 \cdot 0,744) \cdot 0,0366}{30 \cdot 0,1270} = \underline{14,28 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/min} \cdot \text{mg}}$$

6 VÝSLEDKY – DŮKAZ LIPOLYTICKÉ AKTIVITY KOMERČNÍCH PREPARÁTŮ

Nepřímou kultivační metodou byl nejprve stanoven počet živých buněk mikroorganismů (MO) v jednotlivých komerčních přípravcích (KP). Poté byla spektrofotometricky ověřena lipolytická aktivita.

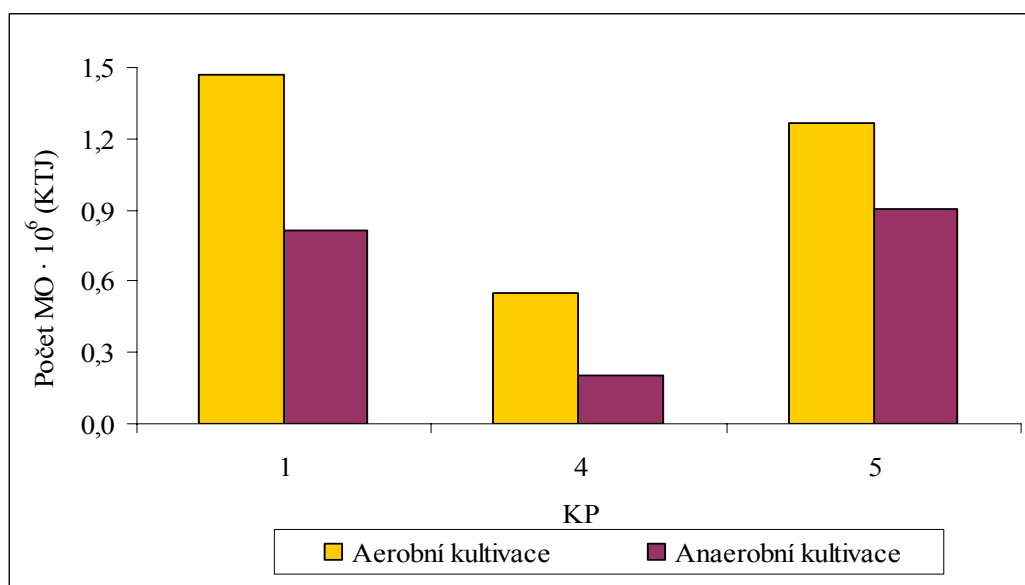
6.1 Vyhodnocení kultivace mikroorganismů nepřímou metodou

Stanovení počtu buněk bylo provedeno nepřímou metodou. U jednotlivých KP byl sledovaný počet MO po kultivaci za aerobních a anaerobních podmínek. Získané výsledky jsou uvedeny v Tabulce 2 a Grafu 3.

Tab. 2 Stanovení počtu buněk mikroorganismů

Komerční preparát	Aerobní kultivace		Anaerobní kultivace	
	Vyrostlé kolonie	Výsledný počet buněk MO (KTJ)	Vyrostlé kolonie	Výsledný počet buněk MO (KTJ)
1	156/138	$1,470 \cdot 10^6$	82/81	$0,815 \cdot 10^6$
2	0/0	0,0	0/0	0,0
3	0/0	0,0	0/0	0,0
4	59/51	$0,550 \cdot 10^6$	23/17	$0,200 \cdot 10^6$
5	121/132	$1,265 \cdot 10^6$	106/75	$0,905 \cdot 10^6$

Z Tabulky 2 vyplývá, že preparáty č. 2 a 3 při zvoleném ředění neobsahovaly žádné živé buňky lipolytických MO. Proto byla pro ověření lipolytické aktivity zaočkována nová média vyšší koncentrací.



Graf 3 Počet buněk mikroorganismů v testovaných preparátech kultivovaných za aerobních a anaerobních podmínek

Z Grafu 3 vyplývá, že nejvíce živých buněk obsahoval preparát č. 1.

6.2 Stanovení lipolytické aktivity u kultur mikroorganismů po sedmi dnech kultivace v jednotlivých komerčních preparátech

Bylo provedeno spektrofotometrické stanovení lipolytické aktivity s využitím p-nitrofenyllarátu, které je založené na schopnosti lipolytických enzymů štěpit tuto sloučeninu na barevný p-nitrofenol, který se stanoví spektrofotometricky.

Z pevného živného média byly odebrány kolonie MO, které byly získány při testování jednotlivých KP a byla připravena jejich suspenze. Po centrifugaci byly supernatant i sediment otestovány na enzymovou aktivitu.

V Tabulce 3 jsou uvedeny naměřené hodnoty absorbancí pro výpočet lipolytické aktivity. V Tabulce 4 jsou uvedeny naměřené hodnoty absorbancí pro výpočet specifické aktivity. V tabulce 5 a 6 jsou uvedeny vypočítané hodnoty lipolytické a specifické aktivity. Příklad výpočtu je uveden v kapitole 5.

Tab. 3 Naměřené hodnoty absorbancí (420 nm) vzorků mikroorganismů

KP	Absorbance A ₄₂₀			
	Aerobní kultivace		Anaerobní kultivace	
	Supernatant	Sediment	Supernatant	Sediment
1	0,138	0,744 (ředění 1:1)	0,196	0,827 (ředění 1:1)
2	0,054	0,760 (ředění 1:2)	0,0	0,898 (ředění 1:1)
3	0,061	0,724 (ředění 1:2)	0,182	0,797 (ředění 1:1)
4	0,298	0,855 (ředění 1:1)	0,332	0,697 (ředění 1:2)
5	0,433	0,715 (ředění 1:1)	0,393	0,874 (ředění 1:2)

Tab 4 Naměřené hodnoty absorbancí (550 nm) pro stanovení obsahu bílkovin ve vzorcích

KP	Absorbance A ₅₅₀			
	Aerobní kultivace		Anaerobní kultivace	
	Supernatant	Sediment	Supernatant	Sediment
Blank	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,000	0,017	0,000	0,016
2	0,000	0,020	0,020	0,000
3	0,000	0,066	0,000	0,000
4	0,000	0,080	0,012	0,000
5	0,009	0,145	0,075	0,000

Tab. 5 Vypočítané hodnoty lipolytické aktivity podle hodnot v Tabulce 4 – aerobní kultivace

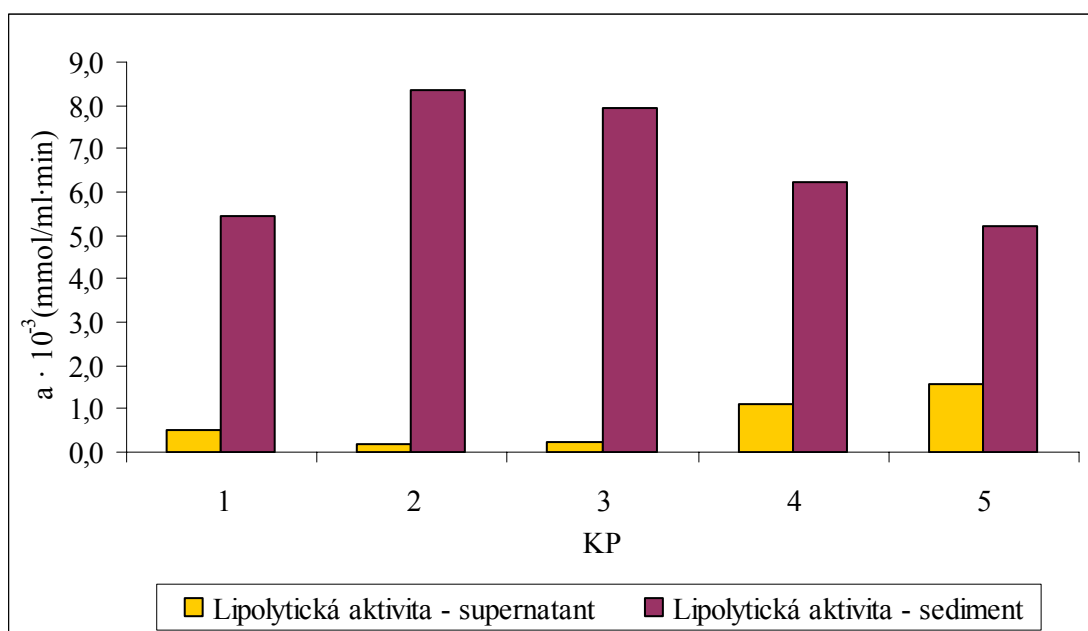
Aerobní kultivace				
KP	Supernatant		Sediment	
	a (mmol/ml·min)	a _{spec} (mmol/mg·min)	a (mmol/ml·min)	a _{spec} (mmol/mg·ml)
1	$5,05 \cdot 10^{-3}$	—	$54,41 \cdot 10^{-3}$	$14,28 \cdot 10^{-3}$
2	$1,97 \cdot 10^{-3}$	—	$83,37 \cdot 10^{-3}$	$18,60 \cdot 10^{-3}$
3	$2,23 \cdot 10^{-3}$	—	$7,94 \cdot 10^{-3}$	$5,37 \cdot 10^{-3}$
4	$10,90 \cdot 10^{-3}$	—	$6,25 \cdot 10^{-3}$	$3,49 \cdot 10^{-3}$
5	$15,83 \cdot 10^{-3}$	$7,85 \cdot 10^{-3}$	$5,23 \cdot 10^{-3}$	$1,61 \cdot 10^{-3}$

Tab. 6 Vypočítané hodnoty lipolytické aktivity podle hodnot v Tabulce 4 – anaerobní kultivace

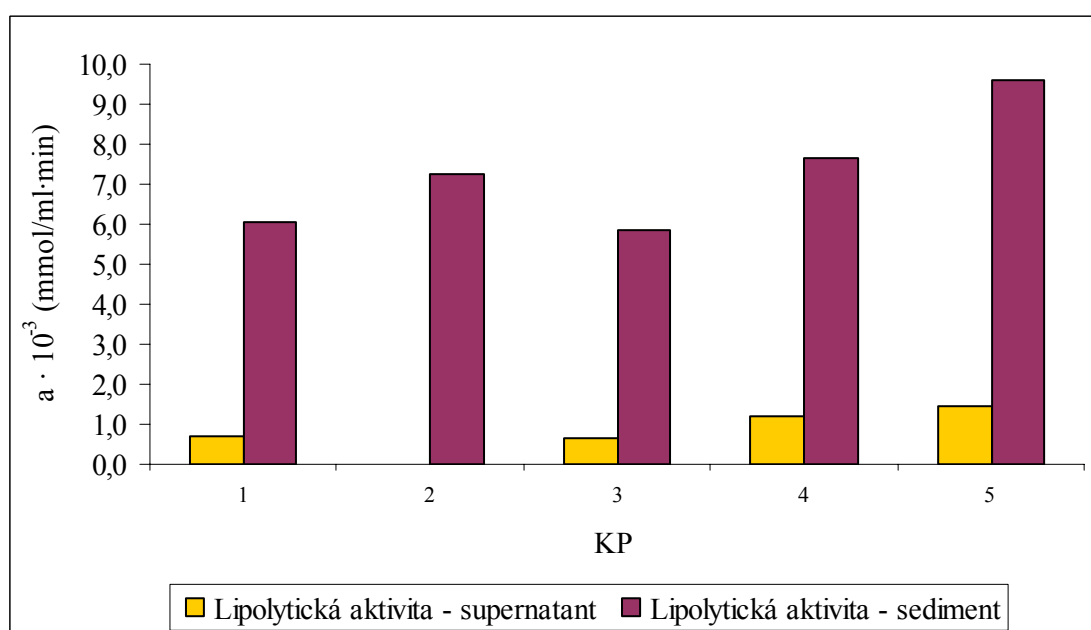
Anaerobní kultivace				
KP	Supernatant		Sediment	
	a (mmol/ml·min)	a _{spec} (mmol/mg·min)	a (mmol/ml·min)	a _{spec} (mmol/mg·min)
1	$7,17 \cdot 10^{-3}$	—	$60,48 \cdot 10^{-3}$	$16,87 \cdot 10^{-3}$
2	0,0	0,0	$72,32 \cdot 10^{-3}$	—
3	$6,65 \cdot 10^{-3}$	—	$58,28 \cdot 10^{-3}$	—
4	$12,14 \cdot 10^{-3}$	$4,51 \cdot 10^{-3}$	$76,45 \cdot 10^{-3}$	—
5	$14,37 \cdot 10^{-3}$	$0,86 \cdot 10^{-3}$	$95,87 \cdot 10^{-3}$	—

Ve vzorcích byl sledován i obsah bílkovin (Tabulka 4). Pouze u sedimentu při aerobní kultivaci bylo možné kvantitativně stanovit bílkoviny a proto jenom v tomto případě bylo možné vypočítat specifickou aktivitu (Tabulka 5 a 6).

Srovnání lipolytické aktivity u jednotlivých KP je zobrazeno v Grafech 4 a 5.



Graf 4 Lipolytická aktivita aerobní kultivace



Graf 5 Lipolytická aktivita anaerobní kultivace

Z Grafů 4 a 5 vyplývá, že lipolytické enzymy jsou vázány na buněčnou stěnu, protože sediment vykazuje mnohem vyšší lipolytickou aktivitu než supernatant. Lipolytická aktivita byla stanovena po sedmi dnech kultivace.

6.3 Stanovení lipolytické aktivity u kultur mikroorganismů po pěti dnech kultivace v jednotlivých komerčních preparátech

Z nově zaočkovaného pevného živného média byly po pěti dnech kultivace odebrány kolonie MO a byla připravena jejich suspenze. Po centrifugaci byly supernatant i sediment testovány na enzymovou aktivitu v pětiminutových intervalech po dobu třiceti minut.

Tab. 7 Naměřené hodnoty absorbancí pro časovou závislost

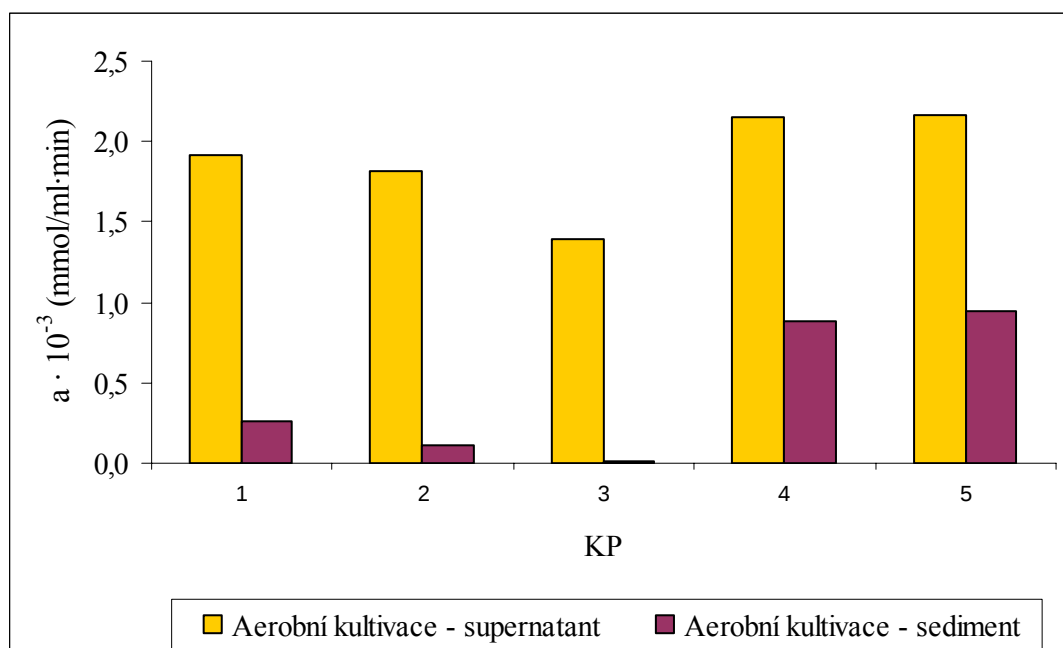
Absorbance A ₄₂₀					
Aerobní kultivace					
KP	1	2	3	4	5
supernatant					
0 min.	0	0	0	0	0
5 min.	0,525	0,495	0,380	0,588	0,591
10 min.	0,655	0,707	0,482	0,754	0,770
15 min.	0,664	0,770	0,556	0,755	0,784
20 min.	0,682	0,787	0,570	0,758	0,795
25 min.	0,789	0,759	0,613	0,766	0,797
30 min.	0,687	0,720	0,583	0,785	0,752
sediment					
0 min.	0	0	0	0	0
5 min.	0,070	0,032	0,003	0,243	0,258
10 min.	0,158	0,095	0,005	0,253	0,298
15 min.	0,164	0,152	0,006	0,254	0,299
20 min.	0,462	0,151	0,019	0,378	0,291
25 min.	0,331	0,216	0,026	0,448	0,296
30 min.	0,280	0,183	0,011	0,350	0,360
Anaerobní kultivace					
supernatant					
0 min.	0	0	0	0	0
5 min.	0,586	0,475	0,474	0,640	0,609
10 min.	0,659	0,590	0,706	0,774	0,678
15 min.	0,729	0,611	0,761	0,841	0,710
20 min.	0,766	0,621	0,783	0,873	0,735
25 min.	0,837	0,630	0,795	0,807	0,793
30 min.	0,747	0,597	0,749	0,730	0,746
sediment					
0 min.	0	0	0	0	0
5 min.	0,147	0,140	0,114	0,173	0,125
10 min.	0,185	0,182	0,133	0,180	0,181
15 min.	0,290	0,185	0,218	0,379	0,182
20 min.	0,294	0,215	0,234	0,223	0,222
25 min.	0,335	0,234	0,338	0,320	0,329
30 min.	0,310	0,230	0,315	0,318	0,289

Z hodnot uvedených v Tabulce 7 byla stanovena $A_{420} \cdot \text{min}^{-1}$. Tato hodnota pak byla dosazena do vzorce (3) pro výpočet lipolytické aktivity vyjádřené na ml suspenze nebo sedimentu (Tabulka 8).

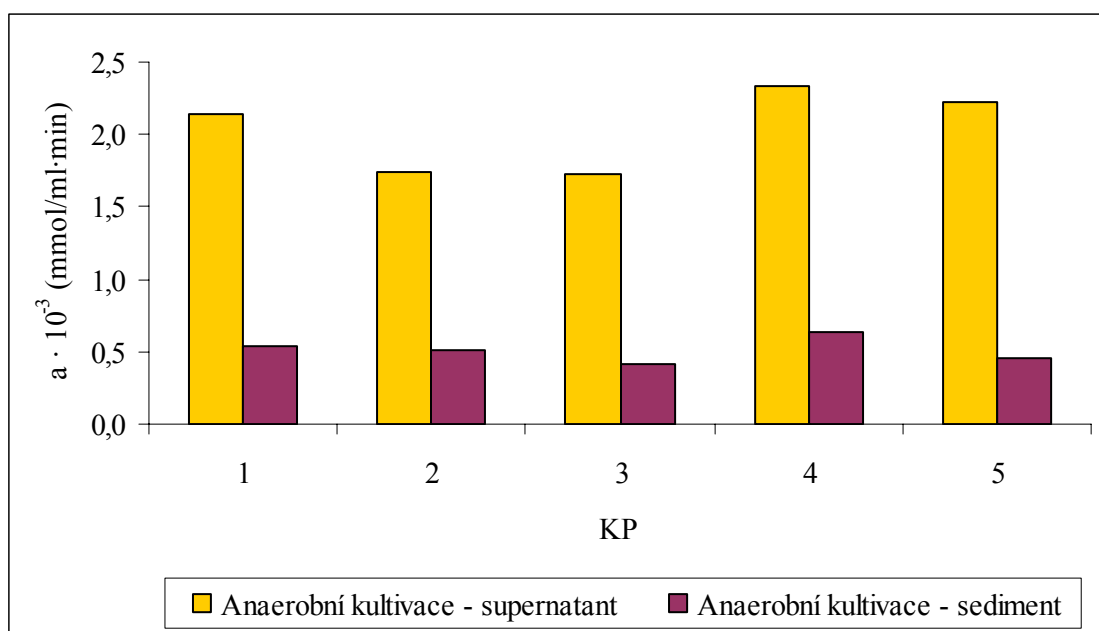
Tab. 8 Vypočítané hodnoty lipolytické aktivity z Tabulky 7 pro hodnoty absorbancí naměřených v čase 5 minut – aerobní a anaerobní kultivace

KP	Aerobní kultivace		Anaerobní kultivace	
	Supernatant	Sediment	Supernatant	Sediment
	a (mmol/ml·min)	a (mmol/ml·min)	a (mmol/ml·min)	a (mmol/ml·min)
1	$19,20 \cdot 10^{-3}$	$2,56 \cdot 10^{-3}$	$21,43 \cdot 10^{-3}$	$5,38 \cdot 10^{-3}$
2	$18,10 \cdot 10^{-3}$	$1,17 \cdot 10^{-3}$	$17,37 \cdot 10^{-3}$	$5,12 \cdot 10^{-3}$
3	$13,89 \cdot 10^{-3}$	$0,11 \cdot 10^{-3}$	$17,33 \cdot 10^{-3}$	$4,17 \cdot 10^{-3}$
4	$21,50 \cdot 10^{-3}$	$8,89 \cdot 10^{-3}$	$23,40 \cdot 10^{-3}$	$6,33 \cdot 10^{-3}$
5	$21,61 \cdot 10^{-3}$	$9,43 \cdot 10^{-3}$	$22,27 \cdot 10^{-3}$	$4,57 \cdot 10^{-3}$

V tomto případě nebyla vypočítána specifická aktivita, protože při tomto stanovení nebyl stanovován obsah bílkovin ve vzorcích.



Graf 6 Lipolytická aktivita aerobní kultivace



Graf 7 Lipolytická aktivita anaerobní kultivace

Grafy 6 a 7 zobrazují lipolytickou aktivitu, kterou vykazují MO v jednotlivých KP. Lipolytická aktivita byla stanovena u nově vypěstovaných kultur po 5 dnech kultivace, přičemž stanovená lipolytická aktivita se vyskytovala ve vyšší míře v supernatantu na rozdíl od kultivace po sedmi dnech, kdy byla vázána na buněčnou stěnu. Z toho vyplývá, že na lokalizaci lipolytických enzymů má vliv doba kultivace.

7 DISKUZE

Kultury mikroorganismů obsažené v komerčních preparátech (KP) byly kultivovány na dvou kultivačních médiích – Tributyrin Agar Base a Spirit Blue Agar a byla stanovována jejich lipolytická aktivita.

Kultivací mikroorganismů (MO) na médiu Spirit Blue Agar lze vizuálně dokázat jejich lipolytickou aktivitu. Spirit Blue Agar je modře zabarvené médium, které se v přítomnosti lipolytických enzymů odbarvuje.

Kultivace na Tributyrin Agar Base byla použita pro nepřímé stanovení počtu MO a na spektrofotometrické stanovení lipolytické aktivity.

Nepřímým stanovením počtu MO bylo zjištěno, že v testovaných KP převládají aerobní, popř. fakultativně anaerobní mikroorganismy (Graf 3). Ze zjištěných hodnot počtu mikroorganismů vyplývá, že nejvíce živých buněk MO je obsaženo v preparátu č. 1.

Lipolytická aktivita pěti KP byla stanovována spektrofotometrickou metodou, která využívá štěpení p-nitroellaurátu na barevný produkt. Aktivita byla stanovována u kultur MO po aerobní i anaerobní kultivaci, a to v sedimentu i supernatantu.

Z Grafu 4 a z Grafu 5 je patrné, že podstatně vyšší lipolytickou aktivitu vykazuje sediment, což znamená, že lipolytické enzymy jsou vázány na buněčnou stěnu a nedošlo k jejich uvolnění do supernatantu.

Z vypočítané specifické aktivity v Tabulce 5 vyplývá, že nejvyšší aktivitu vykazují kultury MO v KP 2 a nejnižší v KP 5. Pro ostatní KP nebyla přepočítaná specifická aktivita, protože použitá metoda na stanovení bílkovin nebyla dostatečně citlivá na to, aby jejich obsah zaznamenala (Tabulka 4).

Při stanovení lipolytické aktivity má pravděpodobně také vliv doba kultivace před vlastním stanovením lipolytické aktivity. To je patrné při porovnání Grafů 4 a 5, ve kterých je lipolytická aktivita vázána na sediment (kultivace 7 dní), s Grafy 6 a 7, ve kterých vyšší lipolytickou aktivitu vykazuje supernatant (kultivace 5 dní). Vliv doby kultivace na výskyt lipolytické aktivity i přesnější specifikace MO obsažených v KP proto bude předmětem dalšího zkoumání.

8 ZÁVĚR

Lipasy jsou mnohostranné enzymy, které mohou být využity v mnoha biokatalytických reakcích.

Cílem práce bylo ověřit pět komerčních přípravků, které obsahují mikroorganismy s lipolytickou aktivitou.

Lipolytická aktivita byla prokázána u všech testovaných preparátů, avšak nejvyšší lipolytickou aktivitu vykazují mikroorganismy přítomné v komerčním preparátu 2.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Vodrážka, Z.: *Biochemie*. vyd. 2. Praha: ACADEMIA, 1999. 506 s. ISBN 80-200-0600-1
- [2] Velíšek, J.: *Chemie potravin I*. Tábor: OSSIS, 2002. 344 s. ISBN 80-86659-00-3.
- [3] Márová, I.: *Přednášky z biochemie II*. FCH VUT Brno. 2007. Nepublikované.
- [4] Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing, Ústí nad Labem: Espero Publishing, c1998. 630 s. ISBN 80-902906-0-4.
- [5] Horáková, D., Němec M., Szostková M.: *Laboratorní cvičení z fyziologie bakterií*. [online]. Brno, Masarykova univerzita, únor 2007 [cit. 16. 12. 2007]. Dostupné z: <http://is.muni.cz/elportal/estud/prif/ps06/3074288/Labor.cv.z_fyziol.bakterii_upravene.pdf>.
- [6] Saxena, R. K., Sheoran A., Giri B., Davidson W. S.: Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, vol. 52, pp. 1-18.
- [7] Joseph, B., Ramteke P. W., Thomas, G., Shrivastava, N.: Standard Review Cold-active microbial Lipases: a versatile tool for industrial applications. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, June 2007, vol. 2, pp. 39-48. ISSN 1538/2273.
- [8] Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta [online]. [cit. 2. 3. 2008]. Dostupný z: <http://home.zf.jcu.cz/public/departments/koz/vyz/pred_03b.pdf>.
- [9] Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta [online]. [cit. 2. 3. 2008]. Dostupný z: <http://home.zf.jcu.cz/public/departments/koz/vyz/pred_10.pdf>.
- [10] PCC Natural Markets [online]. c2001-2008, [cit. 2. 3. 2008]. Dostupný z: <<http://www.pccnaturalmarkets.com/health/2874007/>>.
- [11] *Základy biochemie – Metabolismus lipidů* [online]. [cit. 2. 3. 2008]. Dostupný z: <<http://ibiochemie.upol.cz/WebGraphics/biochemie/download/Modul-04.pdf>>.
- [12] Ambrožová, J.: *Mikrobiologie v technologii vod*. Praha: VŠCHT Praha, 2004. 244 s. ISBN 80-7080-534-X.
- [13] Omelková, J.: *Přednášky z mikrobiologie*. FCH VUT Brno. 2007. Nepublikované.
- [14] Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [15] Vrtiška, O.: Neviditelní kouzelníci. *Časopis ABC* [online]. 9. 7. 2001, č. 14 [cit. 10. 12. 2007]. Dostupné z: <<http://www.iabc.cz/scripts/detail.php?id=2267>>.
- [16] *Fyziologie průmyslových mikroorganismů* [online]. [cit. 14. 12. 2007]. Dostupný z: <http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/fyziolII.pdf>.
- [17] Chumchalová, J., Němec M., Kotoučková, L., Páčová, Z., Savická, D., Kubátová, A., Patáková, P. : *Miniatlas mikroorganismů* [online]. c2007, poslední revize 11. 11. 2007 [cit. 20. 12. 2007]. Dostupný z: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/>>.
- [18] *The Biotech* [online]. [cit. 2. 2. 2008]. Dostupný z: <<http://www.bio-pro.de/en/region/ulm/magazin/02402/index.html>>.
- [19] *Visual Unlimited* [online]. [cit. 2. 2. 2008]. Dostupný z: <<http://www.visualsunlimited.com/browse/vu901/vu901040.html>>.

- [20] Rosypal S.: *Nový přehled biologie*. vyd. 1. Praha: Scientia, 2003. 797 s. ISBN 80-7183-268-5.
- [21] *BioCoach Activity* [online]. [cit. 2. 2. 2008]. Dostupný z: <http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/cells/common.html>.
- [22] Kocková-Kratochvílová, A.: *Kvasinky ve výzkumu a praxi*. vyd. 1. Praha: Academia, 1986. 376 s. ISBN 21-023-86.
- [23] Kocková-Kratochvílová, A.: *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. vyd. 1. Bratislava: Alfa, 1990. 699 s. ISBN 80-05-00644-6.
- [24] de María, P. D., Carboni-Oerlemans, Ch., Tiun, B., Bargeman, G., van der Meer, A., van Gemert, R.: Biotechnological applications of Candida Antarctica lipase A: State-of-the-art. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2005, vol. 37, pp. 36-46.
- [25] *Doktor Fungus* [online]. c2007 [cit. 29. 1. 2008]. Dostupný z: <<http://www.doctorfungus.org/thefungi/>>.
- [26] *Mycology online* [online]. c2006 [cit. 29. 1. 2008]. Dostupný z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Zygomycetes/Rhizopus/R_oryzae.html>.
- [27] Villeneuve, P.: Lipases in lipophilization reaction. *Biotechnology Advances*, 2007, vol. 25, pp. 515-536.
- [28] Matsumya, Y., Wakita, D., Kimura, A., Sanpa, S., Kubo, M.: Isolation and characterization of a lipid-degrading bacterium and its application to lipid-containing wastewater treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, vol. 103, no. 4, pp. 325-330.
- [29] Mongkolthanaruk, W., Dharmsthiti, S.: Biodegradation of lipid-rich wastewater by mixed bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2002, vol. 50, pp. 101-105.
- [30] *Hauraton* [online]. [cit. 27. 2. 2008]. Dostupný z: <http://www.hauraton.cz/pdf_odluc/hauraton_odlucovace.pdf>.
- [31] *BMTO VÝSTAVBA* [online]. [cit. 27. 2. 2008]. Dostupný z: <<http://www.euroregion.cz/prezentace/liberecky/liberec/bmto/obrazky/pdf/ltpproj.pdf>>.
- [32] *EKO Pardubice* [online]. [cit. 27. 2. 2008]. Dostupný z: <<http://www.ekopardubice.cz/cs/15-odlucovace-tuku/>>.
- [33] *CDP Plast* [online]. [cit. 27. 2. 2008]. Dostupný z: <<http://www.cdpplast.cz/index.php?menu=odlucovace>>.

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

apod.	a podobně
ATP	adenosintrifosfát
CoA	koenzym A
CYA	Czapkův agar s kvasničným extraktem
č.	číslo
DEAE	aniontový iontoměnič obsahující diethylaminoethylové funkční skupiny, používaný k chromatografickému dělení některých enzymů a dalších bílkovin
DNA	deoxyribonukleová kyseliny
FADH ₂	redukováná forma flavinadenindinukleotidu
KP	komerční přípravek
log P	rozdělovací koeficient
MO	mikroorganismus
NADH ₂	redukováná forma nikotinadenindinukleotidu
např.	například
popř.	popřípadě
tzv.	takzvaně