



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLASTNOSTI A PRODUKCE MIKROBIÁLNÍCH LIPÁZ

PROPERTIES AND PRODUCTION OF MICROBIAL LIPASES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Patricia Martinková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.

BRNO 2016



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK1023/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Patricia Martinková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Vlastnosti a produkce mikrobiálních lipáz

Zadání bakalářské práce:

Vypracujte literární přehled k zadané problematice
Popište použité metody hodnocení
Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
Zhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

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

Patricia Martinková
Student(ka)

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bakalárska práca je zameraná na testovanie kultivačných médií pre rast rôznych kmeňov kvasiniek produkujúcich lipolytické enzýmy a na štúdium vplyvu zloženia kultivačných médií na produkciu lipolytických enzýmov. Teoretická časť práce uvádza charakteristiku lipolytických enzýmov, ich vlastnosti, zdroje, podmienky pre produkciu a možnosti aplikácie. V experimentálnej časti práce bolo použitých celkom 8 kmeňov kvasiniek a to 2 kmene *Yarrowia lipolytica*, 2 kmene *Kluyveromyces lactis*, *Cryptococcus saitoi*, *Candida intermedia*, *Candida oleophila* a *Debaryomyces hansenii*, ktoré boli kultivované na 4 médiách o rôznom zložení. V priebehu kultivácie bol sledovaný nárast biomasy a na základe toho boli spracované rastové krivky. Vybrané kmene kvasiniek boli testované v priebehu kultivácie na lipolytickú aktivitu, enzýmov viazaných na bunku i extracelulárnych enzýmov, ktorá bola zmeraná spektrofotometricky. Produkcia lipolytických enzýmov sa líšila v závislosti na použitom kultivačnom médiu.

Kľúčové slová: lipolytické enzýmy, kvasinky, lipolytická aktivita, kultivačné médiá

ABSTRACT

Bachelor's thesis is focused on testing the culture media for growing various strains of yeasts, producing lipolytic enzymes and to study the influence of culture media composition on the production of lipolytic enzymes. Theoretical part of this thesis states the characteristics of lipolytic enzymes, their properties, sources, conditions for their production and the possibilities of their application. Together 8 strains of yeasts were used in the experimental part of the thesis, namely 2 strains of *Yarrowia lipolytica*, 2 strains of *Kluyveromyces lactis*, *Cryptococcus saitoi*, *Candida intermedia*, *Candida oleophila* and *Debaryomyces hansenii*, which were cultivated on 4 media with different compounds. During the cultivation the growth of biomass was monitored and growth curves were formed based on these results. Selected strains of yeasts were tested during the process of cultivation for lipolytic activity of two types of enzymes – enzymes bonded to the cellular structure and extracellular enzymes, which were measured by spectrophotometer. Production of lipolytic enzymes varied depending on applied culture medium.

Keywords: Lipolytic enzymes, yeasts, lipolytic activity, culture medium

MARTINKOVÁ, P. *Vlastnosti a produkce mikrobiálních lipáz*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 52 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc..

PREHLÁSENIE

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

.....

podpis študenta

Týmto by som chcela poďakovať svojej vedúcej bakalárskej práce doc. Ing. Jiřine Omelkovej, CSc. za odborné vedenie a rady. Ďalej ďakujem svojmu snúbencovi Miroslavovi Navrátilovi a mojej rodine za veľkú podporu.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČASŤ.....	8
2.1 Enzýmy.....	8
2.1.1 Charakteristika lipolytických enzýmov	9
2.1.2 Kinetika lipolytických enzýmov	9
2.1.2.1 Štruktúra a mechanizmus	10
2.1.3 Lipázami katalyzované reakcie	12
2.1.3.1 Esterifikácia.....	13
2.1.3.2 Interesterifikácia	13
2.1.3.3 Aminolýza	13
2.1.3.4 Alkoholýza	13
2.2 Zdroje lipolytických enzýmov	14
2.2.1 Rastlinné lipázy	14
2.2.2 Živočíšne lipázy	14
2.2.3 Mikrobiálne lipázy	15
2.2.3.1 Kvasinky.....	15
2.2.3.2 Baktérie	15
2.2.3.3 Plesne	16
2.3 Podmienky pre produkciu	17
2.3.1 Vplyv teploty	17
2.3.1.1 Termofilné lipázy	17
2.3.1.2 Psychrofilné lipázy	18
2.3.2 Vplyv pH	18
2.3.3 Vplyv zdrojov uhlíka.....	19
2.3.4 Vplyv zdrojov dusíka	19
2.3.5 Vplyv kovových iónov	20
2.3.6 Vplyv inhibítorov	20
2.4 Kvasinky s lipolytickou aktivitou	20
2.4.1 Rod <i>Yarrowia</i>	20
2.4.2 Rod <i>Debaryomyces</i>	21
2.4.3 Rod <i>Candida</i>	22
2.4.4 Rod <i>Kluyveromyces</i>	22
2.4.5 Rod <i>Cryptococcus</i>	22
2.5 Priemyselné využitie	22
2.5.1 Potravinársky priemysel	23
2.5.2 Farmaceutické aplikácie	23
2.5.3 Priemysel detergentov	23
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	24
3.1 Materiál	24
3.1.1 Kultúry	24
3.1.2 Chemikálie	24
3.1.3 Prístroje a pomôcky	25

3.1.4 Živné médiá	25
3.1.5 Roztoky pre stanovenie lipolytickej aktivity	25
3.2 Metódy	26
3.2.1 Testovanie lipolytickej aktivity	26
3.2.2 Stanovenie rastovej krivky pomocou denzitometru	26
3.2.3 Spektrometrické stanovenie lipolytickej aktivity	26
3.2.3.1 Stanovenie kalibračnej krivky p-nitrofenolu	27
3.2.3.2 Stanovenie lipolytickej aktivity v supernatante	28
3.2.3.3 Stanovenie lipolytickej aktivity v sedimente	28
4 VÝSLEDKY A DISKUSIA	29
4.1 Testovanie lipolytickej aktivity vybraných kvasiniek	29
4.2 Vplyv zloženia kultivačného média na rast vybraných kvasiniek	29
4.3 Vplyv zloženia kultivačného média na produkciu lipolytických enzýmov	33
4.3.1 Bazálne médium	34
4.3.2 Bazálne médium s glukózou	35
4.3.3 Bazálne médium so slnečnicovým olejom	36
4.3.4 Bazálne médium s detergentom	38
4.4 Vplyv testovaných médií na celkovú produkciu lipáz	38
5 ZÁVER	41
6 ZOZNAM LITERATÚRY	42
7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	48
8 PRÍLOHA	49

1 ÚVOD

Lipolytické enzýmy sú jedny s najdôležitejších hydrolytických enzýmov, biokatalyzátorov, s funkciou katalytickej konverzie triacylglycerolov na glycerol a mastné kyseliny. Záujem o lipolytické enzýmy stále rastie hlavne kvôli ich unikátnym vlastnostiam. Lipázy patria medzi vysoko stabilné enzýmy, ktoré zostávajú aktívne aj vo veľmi nepriaznivých podmienkach. Taktiež vykazujú vysokú selektivitu, čo vedie k produktom vysokej čistoty. Lipázy sa získavajú z rastlín, živočíchov a z mikroorganizmov vo vyhovujúcich výťažkoch, ktoré majú nespočetné využitie vo farmaceutickom a potravinárskom priemysle ako biokatalyzátory. V súčasnej dobe predstavujú mikrobiálne lipázy najvýznamnejšiu skupinu enzýmov využívaných v biotechnologických a priemyselných aplikáciách.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Enzýmy

Enzýmy sú špecifické bielkovinové makromolekuly so schopnosťou katalyzovať chemické reakcie. Základné funkčné vlastnosti enzýmov sú spoločné pre všetky katalyzátory, napríklad urýchľujú priebeh biochemických reakcií znižovaním aktivačnej energie, z reakcií vychádzajú nezmenené a neovplyvňujú rovnovážnu konštantu reakcie. Existujú však i dôležité rozdiely, ktorými sa enzýmy líšia od katalyzátorov anorganického povahy. Patrí sem predovšetkým špecifickosť enzýmov. Ak určitý enzým katalyzuje len jeden typ chemickej reakcie ide o funkčnú špecifickosť enzýmu. Špecifickosť enzýmu je založená na tom, že určitý enzým katalyzuje premenu len určitého konkrétneho substrátu alebo chemicky podobných substrátov. Tento jav sa nazýva enzýmová substrátová špecifickosť. Ďalším rozdielom medzi enzýmom a katalyzátorom v neživej prírode je fakt, že aktivitu enzýmov neovplyvňujú len všeobecné faktory ako koncentrácia substrátov, teplota a pH, ale aj špecifické látky do ktorých sa zaraďujú aktivátory a inhibítory enzýmov. Prevažná časť enzýmov je tvorená zloženými bielkovinami, skladajúcimi sa z bielkovinovej a nebielkovinovej časti. Bielkovinová časť enzýmu sa nazýva apoenzým a nebielkovinová časť enzýmu sa označuje ako koenzým. Kompletný účinný enzým zložený s týchto dvoch častí sa nazýva holoenzým [1].

Prvým krokom v reakciách katalyzovaných enzýmom je naviazanie substrátu na určitú špecifickú časť molekuly enzýmu. Táto časť enzýmu sa nazýva aktívne miesto a sú v ňom presne rozmiestnené funkčné skupiny (najmä hydroxylové, aminoskupiny a karboxylové skupiny), umožňujúce vytvorenie väzieb medzi daným substrátom a enzýmom za vzniku komplexu enzým – substrát. Po chemickej reakcii sa komplex rozpadne za uvoľnenia produktov. Podstatou katalytického účinku enzýmov je zníženie aktivačnej energie reakcie. Aktivačná energia, potrebná na vytvorenie komplexu enzým – substrát a na jeho rozpad na produkty reakcie, je menšia ako aktivačná energia nevyhnutná na priamu premenu substrátu na produkty. V súčasnosti poznáme viac ako 1 000 rôznych enzýmov. Základom triedenia enzýmov je typ chemickej reakcie, ktorú enzýmy katalyzujú. V roku 1964 vydala Medzinárodná biochemická únia odporúčania pre jednotnú nomenklatúru a klasifikáciu enzýmov. Enzýmy sú delené do šiestich hlavných tried, podtried a podpodtried. Základné triedy enzýmov sú:

1. oxidoreduktázy katalyzujúce oxidačnoredukčné reakcie,
2. transferázy katalyzujúce prenos určitej skupiny atómov z donora na akceptor,
3. hydrolázy katalyzujúce hydrolytické štiepenie väzby,
4. lyázy katalyzujúce štiepenie kovalentnej väzby v substráte bez prítomnosti vody,
5. izomerázy katalyzujúce vnútrobunkovú premenu substrátu (vznik izomérov),
6. ligázy katalyzujúce zlučovanie dvoch molekúl substrátov za súčasného štiepenia ATP a využitia uvoľnenej chemickej energie [1].

2.1.1 Charakteristika lipolytických enzýmov

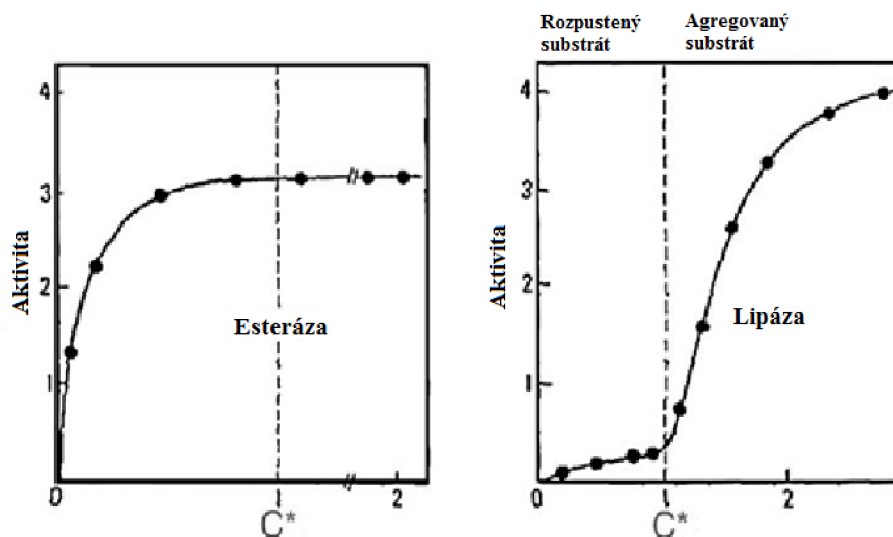
Lipolytické enzýmy sa zaraďujú do skupiny esterových hydroláz. Katalyzujú postupnú hydrolýzu triacylglycerolov na glycerol a voľné mastné kyseliny v dvojfázovom systéme lipid – voda. Taktiež katalyzujú transesterifikačné reakcie a syntézu esterov. Medzi lipolytické enzýmy patria lipázy (EC 3.1.1.3 triacylglycerolacylhydrolázy), ktoré katalyzujú hydrolýzu acylglycerolov s mastnými kyselinami, ktoré majú vo svojom reťazci počet uhlíkov $C \geq 10$ a esterázy (EC 3.1.1.1 karboxylesterhydrolázy), ktoré katalyzujú hydrolýzu acylglycerolov s mastnými kyselinami, ktoré obsahujú vo svojom reťazci počet uhlíkov $C < 10$ [2,3].

Lipolytické enzýmy sú delené do troch skupín podľa pozície väzby v triacylglycerole, na ktorej dochádza k hydrolýze:

1. Nešpecifická skupina – lipolytické enzýmy tejto skupiny katalyzujú hydrolýzu všetkých troch pozícií v triacylglycerole na mastné kyseliny a glycerol.
2. 1,3-špecifická skupina – v tejto skupine dochádza k hydrolýze vonkajších pozícií triacylglycerolu za vzniku 1,2-diacylglycerolov, 2,3-diacylglycerolov a 2-monoacylglycerolov za uvoľnenia mastných kyselín. Pri dlhej inkubácii triacylglycerolov s lipolytickými enzýmami tejto skupiny vedie ku kompletnej hydrolýze triacylglycerolu na mastné kyseliny a glycerol.
3. Do tretej skupiny patria lipolytické enzýmy, ktoré preferujú určité mastné kyseliny na triacylglycerole. Do tejto skupiny sa radí napríklad lipáza B izolovaná z huby *Geotrichum candidum* [3].

2.1.2 Kinetika lipolytických enzýmov

Fyzikálne vlastnosti lipidov všeobecne spôsobili mnoho ťažkostí pri štúdiu vlastností lipolytických enzýmov. Sarda a Desnuelle [4] jasne preukázali zásadný rozdiel medzi aktivitou esteráz a lipáz na základe ich schopnosti byť aktívne na medzifázovom rozhraní. Aktivita esteráz je funkciou koncentrácie substrátu, popísanou pomocou reakčnej kinetiky Michaelis – Mentenovej, kde maximálna reakčná rýchlosť je dosiahnutá pri koncentracii substrátu, ktorý je mnohonásobne menší než je bod nasýtenia, pričom stav emulzie substrát – voda neovplyvňuje túto rýchlosť [4]. Esterázy reagujú iba so substrátmi vo vode rozpustnými [5]. Naproti tomu lipázy nevykazujú takmer žiadnu aktivitu pokiaľ je substrát (lipid) v stave jednotlivých molekúl vo vode. Keď koncentrácia substrátu prevýši bod rozpustnosti dochádza k formovaniu emulzie a reakčná rýchlosť výrazne narastá [4]. Príkladom je pankreatická lipáza, ktorá vykazuje malú aktivitu ak vodou rozpustený krátky reťazec triacetínu je v monomérom stave. Akonáhle koncentrácia substrátu dosiahne limit rozpustnosti, tak sa výrazne zvyšuje hydrolytická reakcia s tým istým substrátom prítomným v micelách alebo kvapkách emulzie [5]. Túto situáciu znázorňuje Obrázok 1, kde vertikálna prerušovaná čiara predstavuje nasýtenie substrátom. Na ľavej strane od tejto čiary je oblasť, kde sa vo vode rozpúšťa substrát triacetín. Na pravej strane od čiary nasýtenia substrát vytvára emulziu s rastúcou medzifázovou oblasťou [4].

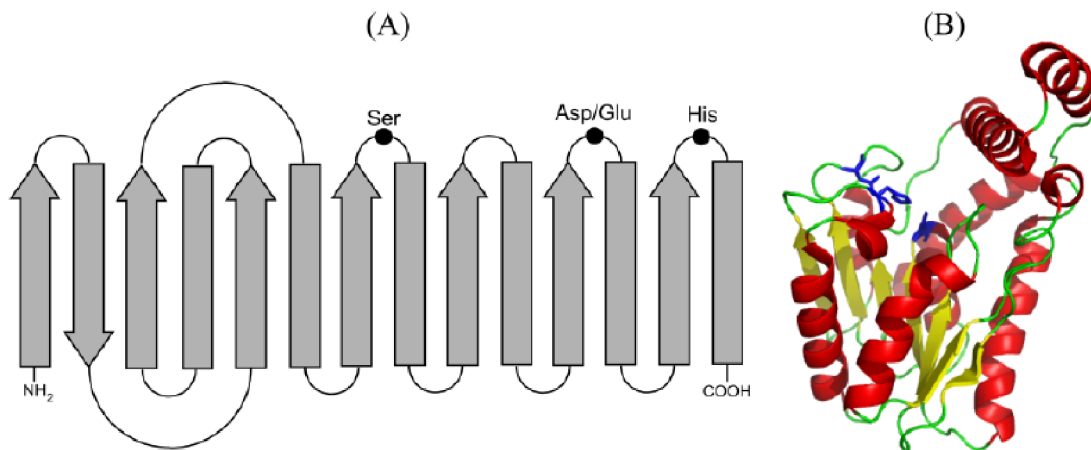


Obrázok 1: Saturačná krivka pankreatickej lipázy a esterázy [4]

2.1.2.1 Štruktúra a mechanizmus

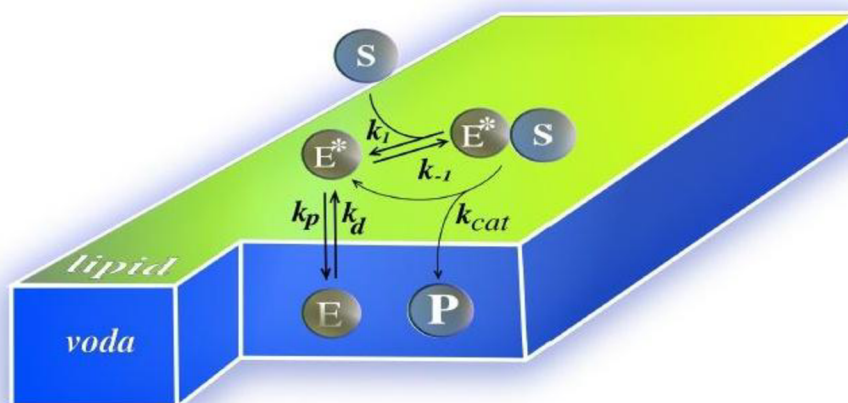
Lipolytické enzýmy sú len málo homologické čo sa týka ich primárnej štruktúry, ale majú rovnaké štruktúrne motívy a katalytický mechanizmus. Patria do skupiny α/β hydroláz, ktoré sa skladajú z ôsmich paralelných β – listov, okrem druhého v poradí, ktorý je anti – paralelný, spojených šiestimi α – helixmi, v ktorých sa nachádza aktívne centrum. Aktívne centrum je tvorené katalytickou triádou Ser-Asp/Glu-His, kde je Ser obvykle vložený v konvenčnej sekvencii k Gly-X-Ser-X-Gly. Tento nukleofilný Ser okamžite nasleduje po 5β liste, zvyšok kyseliny Asp/Glu sa nachádza v ohybe nasledujúcom po 7β liste a zvyšok His je v slučke, ktorá nasleduje po 7β liste. Ostatné dve aminokyseliny, jedna vedľa katalytického Ser a druhá na konci 7β listu, sú súčasťou oxy – aniónovej diery a podieľajú sa na stabilizácii intermediátov enzymatických reakcií (Obrázok 2). Naviac, boli identifikované oblasti zodpovedné za naviazanie enzýmu a substrátovú špecifickosť pomocou mapovania β -listov lokalizovaných v C – terminálnej polovici enzýmu. Poznáme lipolytické enzýmy s rôznymi variantmi skladania, s rozdielmi v konvenčnej sekvencii, ktorá obklopuje katalytický Ser, alebo s vysokou homológiou k ne-lipolytickým enzýmom [25].

Mechanizmus katalýzy lipolytickými enzýmami začína atakom nukleofilného katalytického serínového hydroxylu na karbonyl esterovej väzby. Vzniká tetraedrický intermediát, ktorý je stabilizovaný makro dipólom α C helixu, katalytickými zvyškami His a Asp/Glu a NH skupinami peptidového reťazca, ktorý je súčasťou oxy – aniónovej diery. Potom sa odštiepi alkohol a vzniká acyl – enzýmový komplex. Ďalším krokom je deacylácia a to buď nukleofilným atakom molekuly vody (hydrolýza), alkoholu, esteru (esterifikácia alebo transesterifikácia) za vzniku nového tetraedrického intermediátu, ktorý sa rozpadne na produkt, kyselinu alebo ester a voľný enzým [25].



Obrázok 2: Štruktúra lipolytických enzýmov. (A) Znáznornenie sekundárnej štruktúry skupiny α/β hydroláz s vyznačenými zvyškami, ktoré sa podieľajú na katalýze. α helixy a β vlákna sú vyznačené ako šípky a obdĺžniky, čierne body reprezentujú zvyšky katalytických triád. (B) Kryštalografická štruktúra karboxyesterázy Est30 z *Geobacillus stearothermophilus*, ktorá ukazuje modifikované jadro α/β hydrolázy so siedmimi zapletenými β listami a oblasť pokrievky zahŕňajúca tri α helixy. Žltou farbou sú na časti obrázku (B) vyznačené β vlákna, červenou α helixy a zelenou slučky. Zvyšky katalytických triád sú zobrazené ako modré tyčinky [25].

Kinetika lipolytických reakcií sa neriadi rovnicou Michaelis-Mentenovej, pretože tento model kinetiky platí len pre homogénny jednofázový systém kde vo vode má byť rozpustený substrát i enzým. Kvôli tomu sa uvádza nový predpokladaný model kinetiky lipolytických reakcií ktorý sa skladá z dvoch krokov (Obrázok 3). V prvom kroku dochádza k fyzikálnej adsorpcii lipázy na povrch lipidovej fázy, súbežne s aktiváciou enzýmu. V druhom kroku sa vytvorí komplex enzým-substrát, ktorý je následne hydrolyzovaný na produkt a regenerovaný enzým [6].



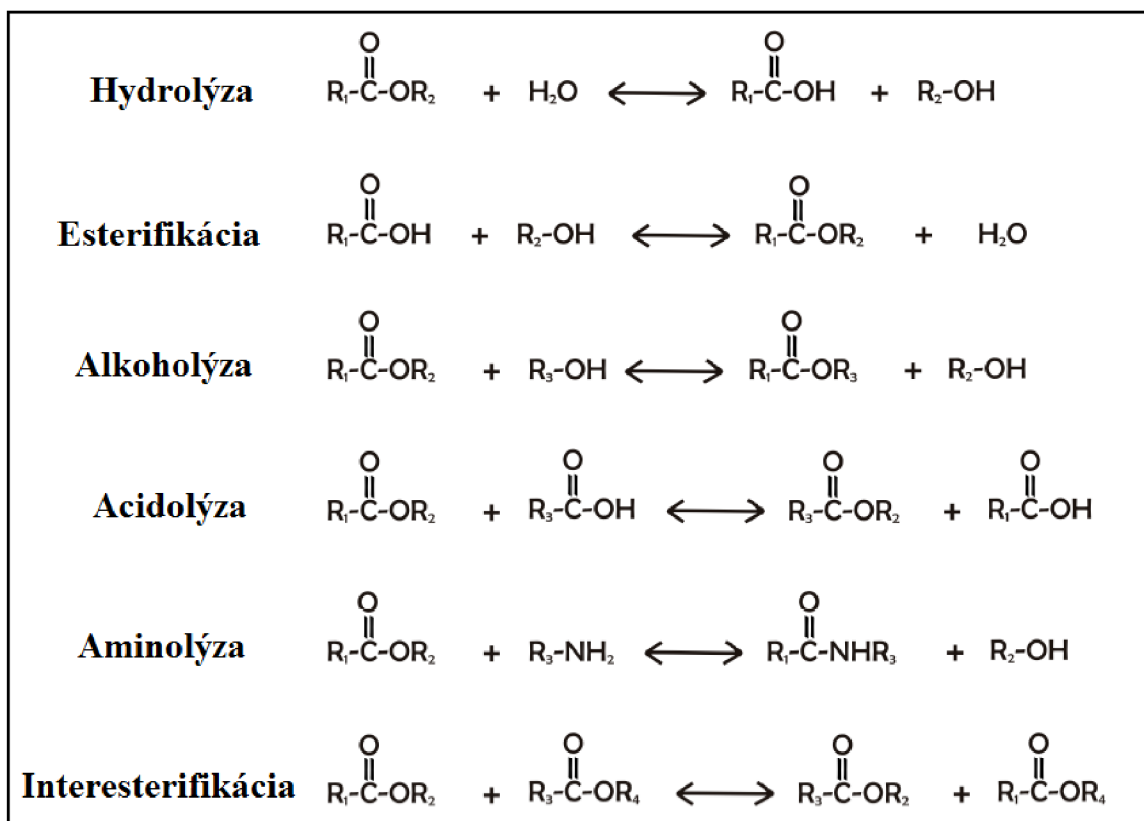
Obrázok 3: Model kinetiky enzýmových reakcií na povrchu rozhraní fází: k_1 , k_{-1} , k_p , k_d , k_{cat} – konštanty reakčnej rýchlosti, E – enzým, E^* - aktivovaný enzým, P – produkt, S – substrát [4]

2.1.3 Lipázami katalyzované reakcie

V prírode prebieha rada enzymatických procesov hlavne vo vodnom prostredí. Prakticky všetky štúdie zaoberajúce sa enzymológiou používajú vodu ako reakčné prostredie. Avšak z biotechnologického hľadiska existuje mnoho výhod vedenia enzymatickej konverzie v organických rozpúšťadlách na rozdiel od vody:

- vysoká rozpustnosť väčšiny organických zlúčenín v nevodnom médiu
- schopnosť uskutočňovať nové reakcie, ktoré by neboli vo vodnom prostredí možné z dôvodu kinetických a termodynamických obmedzení
- väčšia stabilita enzýmov
- nerozpustnosť enzýmov v organických médiách, čo umožňuje ich jednoduchú obnovu a opakovanie a tým sa eliminuje potreba imobilizácie.

Existuje obvyklá predstava, že voda je nutným činidlom pre enzýmovú aktivitu. Toto tvrdenie vyplýva z faktu, že voda sa účastní priamo alebo nepriamo všetkých nekovalentných interakcií, aby sa udržala prirodzená konformácia enzýmu, pri ktorej je daný enzým katalyticky aktívny; preto by malo odstránenie vody drasticky deformovať konformáciu enzýmu a inaktivovať enzým. Ak sa voda nachádza blízko molekúl enzýmu, zvyšok vody môže byť nahradený organickým rozpúšťadlom bez nepriaznivého efektu na enzým. Keďže je celkové množstvo vody veľmi malé, je táto situácia rovná skutočnosti, kedy enzým funguje v takmer bezvodom organickom médiu [7].



Obrázok 4: Prehľad reakcií katalyzovaných lipolytickými enzýmami [15]

Lipázy katalyzujú hydrolýzu vo vode nemiešateľných triglyceridov na rozhraní voda – lipid. Za daných experimentálnych podmienok množstvo vody v reakčnej zmesi určuje smer lipázami katalyzovanej reakcie. Ak bude množstvo vody len v stopových množstvách, budú najlepšie prebiehať esterifikačné a transesterifikačné reakcie (interesterifikácia, acidolýza, aminolýza a alkoholýza). S prebytkom vody bude dochádzať k hydrolýze (Obrázok 4) [8].

2.1.3.1 Esterifikácia

Najdôležitejšou reakciou enzymatickej katalýzy pri nízkom množstve vody v organickom médiu je syntéza esterov katalyzovaná lipázami. Často je táto reakcia reverzným procesom hydrolýzy [9]. Medzi dôležité faktory, ktoré majú vplyv na výťažok esterov sú koncentrácia enzýmu, koncentrácia substrátu, ich molárny pomer, hodnoty pH a teplota [10]. Prípadné inhibičné účinky, ktoré môžu vzniknúť pôsobením kyselín sa upravujú znížením množstva kyseliny a zvýšením koncentrácie enzýmu v reakčnom prostredí. Výťažok esterifikácie taktiež závisí na štruktúre alkoholu. Primárne alkoholy majú maximálnu aktivitu na rozdiel od sekundárnych a terciálnych alkoholov, ktoré znižujú reakčnú rýchlosť o viac ako 40 % [11]. Tento typ reakcie sa používa na výrobu biopalív. Hlavným cieľom esterifikačnej reakcie katalyzovanej lipázami je zjednodušiť a zlepšiť výrobu a výnos. Pri výrobe sa používa veľké množstvo alkoholu za účelom posunutia reakčnej rovnováhy v prospech tvorby esteru. Ďalším dôležitým krokom je odstránenie vody počas priebehu reakcie [10].

2.1.3.2 Interesterifikácia

Interesterifikačné reakcie prebiehajú pri veľmi malom množstve vody alebo emulzie. Pri inkubácii lipáz s triglyceridmi dochádza najskôr k hydrolýze a následne k resyntéze. Táto dvojkroková reakcia spôsobuje migráciu acylových skupín medzi molekulami triglyceridov. Vznik produktov, triglyceridov, závisí na špecifite použitého enzýmu. Príkladom je 1,3 – špecifická lipáza, ktorá katalyzuje interesterifikačné reakcie, ktoré sa využívajú na výrobu náhrad kakaového masla z lacnejšej strednej frakcie palmového oleja [8,10].

2.1.3.3 Aminolýza

Aminolýza patrí medzi transesterifikačné reakcie. Dochádza k výmene skupín medzi esterom a amínom za vzniku alkoholu a amidu. Reakcie s amínmi sú často pomalšie, čo vyžaduje väčšie množstvo katalyzátora alebo dlhšie reakčné časy. Taktiež lipázy katalyzujú chemoselektívnu aminolýzu rôznych aminoalkoholov s masnými kyselinami. Príkladom je *Candida antarctica*, ktorá sa používa pri výrobe masných alkoholamidov bez použitia rozpúšťadla [12,13].

2.1.3.4 Alkoholýza

Lipázami katalyzovaná alkoholýza je reakcia medzi esterom a alkoholom kde dochádza k substitúcií acylovej skupiny esteru za acylovú skupinu alkoholu. Ak je ester triacylglycerol a lipázy špecifické pre extrémne pozície triacylglycerolu (*sn*-1 a *sn*-3), tak reakcia prebehne za vzniku 2-monoacylglycerolu a esterov. Monoacylglyceroly a diacylglyceroly sú v priemysle veľmi využívané kvôli ich vlastnostiam a to, že sú biologicky odbúrateľné, biokompatibilné

a netoxické zlúčeniny. Sú využívané ako emulgátory v potravinách a vo farmaceutickom priemysle. Reakcie sú väčšinou katalyzované lipázami z *Mucor miehei* a lipázy D z *Rhizopus oryzae* [14].

2.2 Zdroje lipolytických enzýmov

Lipolytické enzýmy sú všadeprítomné v prírode vďaka rôznym druhom prírodných zdrojov. Lipázy sú produkované živočíchmi, rastlinami a mikroorganizmami. Medzi mikroorganizmy produkujúce lipázy sú zaradené baktérie, kvasinky a plesne. Vzhľadom k jednoduchým manipuláciám a zvláštnym katalytickým vlastnostiam mikrobiálne lipázy zaujímajú významné postavenie v priemysle ako dôležité biokatalyzátory. Podľa zoznamu enzýmov zostavenom Združením výrobcov a navrhovateľov enzýmových preparátov – AMFEP, aktualizovaným v máji 2015, hlavnými zdrojmi lipáz používaných v priemyselných procesoch sú huby, nasledujú kvasinky, baktérie a živočíchy [15].

2.2.1 Rastlinné lipázy

Rastlinné lipázy sa javia ako veľmi atraktívne vzhľadom k ich vysokej substrátovej špecifite a skutočnosti, že sú široko dostupné z prírodných zdrojov bez potreby zásahu molekulárnej genetickej technológie, čo je dobrou alternatívou pre komerčné využitie [16]. Rastlinné lipázy sa izolujú s olejnatých semien, obilia a semien fazule. V semenách sú lipolytické enzýmy potrebné pre mobilizáciu uložených mastných kyselín, ktoré by mali poskytnúť energiu a uhlík pre klíčenie. Lipázy boli identifikované v chloroplastoch, kde sa pravdepodobne tiež podieľajú na mobilizácii mastných kyselín. Mliečna šťava produkovaná kaučukovníkom známa ako latex obsahuje lipolytické enzýmy [15]. Všeobecne sú lipázy z olejnatých semien viac aktívnejšie s triacylglycerolmi, ktoré obsahujú krátke reťazce mastných kyselín. Lipázy zo semien vykazujú selektivitu pre dominantné mastné kyseliny v semene. Príkladom je kukuričná lipáza, ktorá vykazuje väčšiu aktivitu s triacylglycerolmi ktoré obsahujú olejovú a linolénovú mastnú kyselinu. Lipázy izolované z fazule sú aktívne v prítomnosti krátkych a stredných reťazcov mastných kyselín triacylglycerolu. Výskum lipolytických enzýmov z afrických fazulí preukázal, že lipázy vykazovali väčšiu aktivitu s olejmi, ktoré obsahovali mastné kyseliny s krátkym reťazcom, špeciálne s kokosovým olejom [17]. Optimálne hodnoty pH lipáz izolovaných z rastlín sú v rozmedzí 4,0–8,0 a teplotné optimum sa nachádza v rozmedzí 25–60 °C [13].

2.2.2 Živočíšne lipázy

Živočíchy patria tiež medzi zdroje lipolytických enzýmov a používajú sa v priemyselných procesoch. Sú izolované z mnohých druhov hmyzu, cicavcov a rýb. Medzi najznámejšie priemyselne využívané lipázy patria pankreatická lipáza a žalúdočná lipáza. Claude Bernard [18] v roku 1856 na základe výsledkov hydrolýzy kvapiek nerozpusteného oleja a konverzie na rozpustné produkty, objavil aktivitu lipáz pankreatickej šťavy. Zohrávajú teda v biologických systémoch dôležitú úlohu pri trávení tukov. Malá časť trávenia tukov prebieha v žalúdku a je katalyzovaná žalúdočnou lipázou, ktorá štiepi už vytvorené emulzie tukov [13,15]. Najvyššia špecifická aktivita žalúdočnej lipázy je pri pH 7,4 a teplote 37 °C a tieto

lipázy majú schopnosť hydrolyzovať primárne esterové väzby triacylglycerolu. Podobne prasačia pankreatická lipáza hydrolyzuje ale 1,2,3 tributanoylglycerol a má pH optimum 8,9 a teplotné optimum 40 °C [18].

2.2.3 Mikrobiálne lipázy

Mikrobiálne lipázy sú veľkou skupinou enzýmov využívaných v priemyselných procesoch na rozdiel od rastlinných a živočíšnych lipáz, vďaka ich stabilite, selektivite a substrátovej špecifite. Enzýmami sprostredkované reakcie sú atraktívnou alternatívou pre zdĺhavé a drahé chemické reakcie. Je mnoho známych mikroorganizmov produkujúcich lipolytické enzýmy, patria sem baktérie, kvasinky a huby [19].

2.2.3.1 Kvasinky

Väčšina komerčne významných kvasiniek produkujúcich lipázy patrí do skupiny askomycét. Približne polovica popísaných lipáz z kvasiniek je produkovaná vo forme izoenzýmov. Tieto enzýmy sú extracelulárne monoméne glykoproteíny. Niektoré kvasinkové lipázy sú stereošpecifické. Príkladom sú lipázy produkované kvasinkami rodu *Candida*, ktoré vykazujú čiastočnú stereošpecifitu v hydrolýze triacylglycerolov. Táto vlastnosť sa využíva pri izolácii opticky čistých esterov a alkoholov z racemickej zmesi. Lipáza z kvasinky *Candida rugosa* je špecifická pre stredne dlhé reťazce mastných kyselín, konkrétne C₁₂, na rozdiel od lipáz produkovaných kvasinkami *Candida curvata*, ktoré sú špecifické pre mastné kyseliny s dlhým reťazcom. *Candida parapsilosis* produkuje lipázy špecifické pre dlhé reťazce polynenasýtených mastných kyselín. Kvasinkové lipázy vykazujú rozdiely vo vlastnostiach medzi ktoré patrí teplotné optimum, pH stabilita a substrátová špecifita. Veľký počet lipáz je aktívnych pri teplote 37 °C a pri pH v rozmedzí 6,0–7,0. Medzi najpoužívanejšie kvasinky v priemysle patrí *Candida rugosa*. Vďaka vysokej aktivite sú používané k hydrolýze i syntéze v rôznych procesoch, napríklad k výrobe mastných kyselín z ricínu obyčajného, biotransformácií a v potravinárstve [20,21]. Mikrobiálne lipázy produkované kvasinkami možno rozdeliť podľa miesta pôsobenia na intracelulárne, extracelulárne a viazané na bunku. Intracelulárne lipázy vznikajú vo vnútri bunky, kde aj zostávajú, a vykonávajú svoje špecifické funkcie. Tieto enzýmy sú produkované rôznymi kvasinkami, napríklad rodmi *Kluyveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces* a *Yarrowia*. Extracelulárne lipázy sú produkované kvasinkami vo vnútri bunky a vylučované cez membránu do kultivačného prostredia. Väčšina kvasinkových lipáz je extracelulárneho charakteru a medzi najznámejšie kvasinky produkujúce extracelulárne lipázy patrí *Yarrowia lipolytica*, *Candida antarctica*, *Candida albicans*, *Candida ernobii*, *Kluyveromyces lactis* a *Geotrichum sp.* [20,22].

2.2.3.2 Baktérie

Bakteriálne lipázy boli prvý krát pozorované v roku 1901 v kmeňoch *Serratia marescens* a *Pseudomonas aeruginosa*. Od tej doby sú lipázy produkované z rôznych druhov baktérií dodnes využívané pre účely priemyselného využitia. Bakteriálne lipázy patria do skupiny glykoproteínov. Niektoré extracelulárne bakteriálne lipázy sú zaradené medzi lipoproteíny. Lipázy produkované baktériami môžu byť intracelulárne, viazané na membránu

a extracelulárne. Kmene baktérií, ktoré produkujú len intracelulárne lipázy, potrebujú pre svoj rast glycerol a jednoduché lipidy. Príkladom je kmeň *Bacillus clausii*. U baktérie *Bacillus sp.* bola pozorovaná produkcia intracelulárnych aj extracelulárnych lipáz. Produkcia extracelulárnych lipáz bola popísaná ako dôsledok vylučovania nahromadených intracelulárnych lipáz cez membránu pomocou chaperónov. Baktérie vylučujú lipázy do vonkajšieho prostredia cez sekrečné systémy. Rozoznávame dva typy sekrečných systémov. Prvý typ sekrečného systému (T1SS) umožňuje sekréciu lipáz rôznych molekulárnych hmotností z cytoplazmy do vonkajšieho média v jednom kroku. Podieľa sa na tom komplex, ktorý sa skladá z troch proteínov, lokalizovaný v obale bunky. Tento typ sekrečného systému sa nachádza hlavne u gram-negatívnych baktérií, príkladom je *Pseudomonas fluorescens*. Druhý typ sekrečného systému (T2SS) je dvojkrokový systém. Bakteriálne lipázy sú vylučované v rozloženom stave do periplazmatického priestoru. V tomto priestore sa za pomoci chaperonu lipázy správne zbalia, čo znamená, že nájdu správne priestorové usporiadanie odpovedajúce natívnej konformácii. Zložené lipázy sú potom transportované do externého priestoru pomocou transportného komplexu [22].

Bakteriálne lipázy patria medzi serínové hydrolázy a ich aktivita závisí od katalytickej triády zahŕňajúce serín, histidín, aspartát a od sekundárnej štruktúry obsahujúcej α/β ohyb. Bakteriálne lipolytické enzýmy sú rozdelené do 8 skupín a najväčšia skupina bola rozdelená do 6 podskupín. Táto klasifikácia bola založená na sekvenčných motívoch a biologických vlastnostiach enzýmov. Prvé lipázy patria do skupiny 1, ktorá zahŕňa väčšinu rodov *Pseudomonas*, *Bacillus* a *Staphylococcus*. Tieto lipázy majú konvenčný katalytický pentapeptid Gly-X-Ser-X-Gly. Lipázy skupiny 2 vykazujú Gly-Asp-Ser-Leu motív v aktívnom mieste. Do tejto skupiny patria aj esterázy z baktérií *Streptomyces*, *Aeromonas* a *Salmonella*. Skupina 3 sa skladá z lipáz *Streptomyces sp.* ale na rozdiel od skupiny 2 sem patria extracelulárne lipázy. Lipázy ktoré vykazujú podobnosť s hormónmi cicavcov sa zaraďujú do skupiny 4, kým lipázy z mezofilných baktérií ako napríklad *Pseudomonas oleovorans* alebo *Haemophilus influenza* patria do skupiny 5. Do skupiny 6 patria esterázy s najmenšou molekulovou hmotnosťou, ktoré sú aktívne vo forme dimeru na rozdiel od skupiny 7, kde sa nachádzajú esterázy s najväčšou molekulovou hmotnosťou a ich sekvencia aminokyselín je homologická s eukaryotickými acetylcholín esterázami. Lipázy z 8 skupiny sú podobné β laktamázam, príkladom je *Arthrobacter globiformis* [22].

2.2.3.3 Plesne

Medzi najčastejšie komerčne používané rody plesní produkujúcich lipázy patria *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Geotrichum sp.*, *Mucor sp.*, *Rhizomucor spp.*. Produkcia lipáz sa líši v závislosti od použitého kmeňa, zloženia média, kultivačných podmienok, pH, teploty, zdroja uhlíka a dusíka. Plesne produkujúce lipázy boli nájdené v rôznych lokalitách ako sú priemyselné odpady, továrne na výrobu rastlinných olejov a pôdy znečistené olejom. Teplotné optimum týchto lipáz je v rozmedzí 25–70 °C a pH optimum sa nachádza v rozmedzí od 4–11. Huby sa podieľajú na degradácii nežiaducich materiálov alebo zlúčenín pri ich premene na neškodlivé, stabilné a užitočné produkty. Nežiaduce materiály zahŕňajú odpadové vody, poľnohospodársky odpad a ropné škvry. Rôzne druhy huby *Aspergillus* sú známi producenti

lipáz. Mnoho experimentov sa zaoberá lipázami z huby *Aspergillus niger*, ktoré sú extracelulárne a intracelulárne, 1,3-regiošpecifické lipázy. *Aspergillus terreus* produkuje lipázy 1,3-regiošpecifické, tepelne stabilné, katalyzujúce transesterifikačné a esterifikačné reakcie v organických rozpúšťadlách. Lipázy z *Humicola lanuginosa* sú vhodné ako detergenty kvôli ich termostabilite, vysokej aktivite v alkalickom pH prostredí a stabilite voči povrchovo aktívnym látkam [8,23].

2.3 Podmienky pre produkciu

Mikrobiálne lipázy získali väčší rozsah použitia ako biokatalyzátory v priemysle vďaka ich vlastnostiam medzi ktoré patrí biodegradácia, vysoká špecifickosť a vysoká katalytická účinnosť. Ďalšie unikátne vlastnosti ako teplotné optimum, pH optimum, aktivita v organických rozpúšťadlách a netoxická povaha sú veľkým prínosom v potravinárskom priemysle. Lipázy z rôznych druhov mikrobiálnych zdrojov majú hydrolytickú ako aj syntetickú aktivitu a sú schopné využívať všetky mono-, di- a triacylglyceroly ako aj voľné mastné kyseliny pri transesterifikácií. Medzi požadované vlastnosti lipáz patrí vysoká aktivita/výnos v nevodnom prostredí, nízka reakčná doba, odolnosť k zmenám teploty, pH, alkoholu a znovu použiteľnosť imobilizovaných enzýmov. Navyše, lipázy môžu katalyzovať reakcie za podmienok nižších ako je ich pH a teplotné optimum a tým znižujú aktivačnú energiu potrebnú k priamym reakciám. V biotechnologických procesoch majú mikrobiálne lipázy veľký potenciál vďaka ich stabilite v organických rozpúšťadlách a možnosti byť aktívne a možnosti účinkovať bez kofaktorov [24].

2.3.1 Vplyv teploty

Optimálna aktivita mikrobiálnych lipáz získaných z bežných zdrojov je v rozmedzí od 30 °C do 60 °C. Avšak v súčasnej dobe sa lipázy získavajú z extremofilov, čo sú organizmy prispôbené k životu pri vysokej teplote s maximálnou aktivitou nad 70 °C (*Bacillus thermocatenulatus*) alebo s vysokou aktivitou pri nízkej teplote, ako je tomu v prípade enzýmov produkovaných antarktickými baktériami napríklad rodom *Moraxella sp.* a *Pseudomonas*. Takéto extrémne a nezvyčajné vlastnosti otvárajú možnosti aplikovať tieto enzýmy bez ďalších modifikácií využívajúcich molekulárne prístupy s cieľom prispôbiť ich pre použitie v reakciách realizovaných pri vysokých alebo naopak nízkych teplotách. Lipázy sú delené do troch skupín na základe ich tepelnej stability, a to na psychrofilné, mezofilné a termofilné. Termostabilné enzýmy možno získať z mezofilných a termofilných organizmov, ale len niekoľko termostabilných enzýmov možno získať z psychrofilných organizmov [26].

2.3.1.1 Termofilné lipázy

Dopyt po termostabilných lipázach pre rôzne aplikácie rapídne rastie. Väčšina štúdií bola uskutočnená na produkciu lipáz pomocou mezofilných mikroorganizmov. Proteíny z termofilných organizmov vykazujú väčšiu použiteľnosť v biotechnologických aplikáciách ako proteíny z mezofilných organizmov vzhľadom k ich stabilite pri vyššej teplote. Enzýmy s vysokou termostabilitou sú dôležité kvôli ich vysokej reakčnej rýchlosti pri vysokej teplote, pretože vyššia teplota môže zvýšiť rozpustnosť substrátov a tiež znížiť viskozitu substrátov,

a tým zabrániť kontaminácií životného prostredia. Chemické reakcie katalyzované lipázami majú pri vyšších teplotách nasledujúce výhody: vyššia difúzna rýchlosť, zvýšená rozpustnosť lipidov a iných hydrofóbných substrátov vo vode, zníženie viskozity substrátu, zvýšenie rozpustnosti reaktantov, vyššia teplota a tým vyššia reakčná rýchlosť a znížené riziko mikrobiálnej kontaminácie. V súčasnosti sú termostabilné lipázy izolované z mnohých zdrojov napríklad z *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus sp.*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus cereus*, *Geotrichum sp.*, a *Aeromonas sobria*. Tepelná stabilita lipáz jednoznačne súvisí s ich štruktúrou. Termostabilita je tiež ovplyvnená faktormi prostredia, kam patrí pH a prítomnosť kovových iónov. Mutácie v určitej oblasti štruktúry lipáz môže významne ovplyvniť tepelnú stabilitu. V porovnaní s natívnym enzýmom, tepelná stabilita mnohých lipáz môže byť významne zvýšená imobilizáciou [26,27].

2.3.1.2 Psychrofilné lipázy

Na chlad adaptované lipázy sú z veľkej časti získavané z organizmov rastúcich pri nízkych teplotách okolo 5 °C. Aj keď je celý rad možných mikroorganizmov produkujúcich lipázy, len niekoľko druhov baktérií a kvasiniek bolo využitých na produkciu chladom adaptovaných lipáz. Tieto mikroorganizmy majú vysokú aktivitu pri nízkych teplotách. Rôzne štúdie ukázali, že veľké množstvo baktérií bolo zaznamenaných v ľade. Bakteriálne kmene boli prevažne izolované z Antarktídy a polárnych oblastí, ktoré predstavujú trvalý chlad pri teplote okolo 0 °C. Morská baktéria *Aeromonas hydrophila* rastie pri teplote v rozmedzí 4 až 37 °C. Niekoľko bakteriálnych rodov bolo izolovaných z hlbinných sedimentov, kde je teplota pod 3 °C. Patrí medzi ne *Aeromonas sp.*, *Pseudoalteromonas sp.*, *Psychrobacter sp.* a *Photobacterium lipolyticum*. V trvalo chladných oblastiach, ako sú ľadovce a horské regióny, sa tiež nachádzajú psychrofilné mikroorganizmy produkujúce lipázy. Lipolytické enzýmy sú produkované najviac psychrofilnými baktériami. U kvasiniek bola produkcia za chladu aktívnych lipáz zaznamenaná len u pár druhov. Rozsiahly výskum bol zameraný hlavne na lipázy produkované z *Candida antarctica* v porovnaní s ostatnými psychrofilnými hubami. *Candida lipolytica*, *Geotrichum candidum* a *Penicillium roqueforti* boli izolované zo vzoriek mrazených potravín a boli tiež využité na produkciu chladom aktívnych lipáz. Lipázy aktívne pri nízkych teplotách priťahujú v poslednej dobe veľkú pozornosť kvôli ich využitiu v organických syntézach. Nízke teplotné optimum a vysoká aktivita pri týchto veľmi nízkych teplotách sú priaznivé vlastnosti pre priemyselnú aplikáciu. Lipázy aktívne pri nízkych teplotách sú využívané na výrobu farmaceutických prípravkov, v potravinárskom priemysle (fermentácia, výroba syrov, tenderizácia masa), v domácich a environmentálnych aplikáciách (kompostovanie a degradácia oleja) [26].

2.3.2 Vplyv pH

Enzýmy účinkujúce v alkalickom prostredí predstavujú atraktívne katalyzátory pre mnoho priemyselných aplikácií, najmä vo výrobe detergentov, kde lipázy ako detergenty musia byť aktívne a stabilné v alkalickom prostredí (pH 8–11). Bakteriálne lipázy sú väčšinou alkalickéj povahy. Alkalické lipázy, ktoré vykazujú optimálne aktivitu v rozsahu pH od 9 do 11, boli izolované z kmeňov *Acinetobacter radioresistens*, *Bacillus sp.*, *Chromobacterium viscosum*, *Micrococcus sp.* a rôzne druhy rodu *Pseudomonas*. Alkalické lipázy boli tiež izolované

z kvasiniek *Humicola lanuginosa*, *Trichoderma lanuginosus*, *Trichosporon asahii* a v poslednej dobe z *Rhodosporidium babjevae*. V porovnaní s alkalickými enzýmami, o kyslých enzýmoch nie je toľko štúdií. Bola zistená produkcia kyslých enzýmov z baktérií *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonas fluorescens*, kvasiniek a plesní kde patrí *Aspergillus niger* a *Candida viswanathii*. Všetky tieto enzýmy vykazujú veľmi kyslé pH optimum, ktoré sa pohybuje v rozmedzí pH 1 až 3. Najdôležitejšie aplikácie týchto kyslých lipáz je pri výrobe aromatických esterov, ktoré potrebujú pri syntéze kyslé prostredie a v kožiarskom priemysle [15].

2.3.3 Vplyv zdrojov uhlíka

Produkcia lipáz je všeobecne ovplyvnená lipidmi, ktoré sú hlavným zdrojom uhlíka, a koordinovaná dostupnosťou triacylglycerolov. Hlavné substráty ktoré majú zásadný vplyv na produkciu lipáz sú triacylglyceroly, voľné masné kyseliny, glycerol a hydrolyzovateľné estery. Lipolytická aktivita je silne ovplyvnená širokým rozsahom rozpätia masných kyselín, a dĺžkou reťazca masných kyselín. Niektoré masné kyseliny ako napríklad kyselina olejová, kyselina linolénová a linolová podporujú tvorbu lipáz z rôznych baktérií ako sú *Pseudomonas mephitica*. Avšak produkcia lipáz z *Pseudomonas aeruginosa* a *Acinetobacter calcoaceticus* je potlačená za prítomnosti masných kyselín s dlhým reťazcom. Produkcia lipáz je tiež ovplyvnená aj inými zdrojmi uhlíka, medzi ktoré patria cukry, cukorné alkoholy a polysacharidy. U kvasinky *Candida rugosa* bolo preukázané, že produkuje extracelulárne lipázy, ktorých produkciu možno indukovať prídavkom masnej kyseliny do kultivačného média. Tieto lipázy sú zložené s niekoľkými izofóriami s mierne odlišnými katalytickými vlastnosťami. Polysacharidy, ako glykogén, kyselina hyalurónová, arabská guma a pektín, stimulujú produkciu lipáz v *Serratia marcescens* [28].

2.3.4 Vplyv zdrojov dusíka

Všeobecne je dokázané, že typ zdroja dusíka v médiu ovplyvňuje množstvo produkovanej lipázy. Výhodný je pre rast lipáz organický dusík, kde patrí peptón, kvasničný extrakt, kukuričný výluh a sójový extrakt. Kukuričný výluh a sója stimuluje produkciu lipáz, ale v menšej miere než peptón. Mnohé štúdie ukázali, že vyššia produkcia by mohla byť spôsobená anorganickým zdrojom dusíka, zatiaľ čo rast buniek je ovplyvnený organickým zdrojom dusíka. Medzi anorganické zdroje dusíka patrí chlorid amónny, fosforečnan amónny a dusičnan amónny. Močovina a síran amónny inhibuje produkciu lipáz. Vysoká produkcia lipáz v prípade *Pseudomonas spp.* je podmienená médiom obsahujúcim peptón na rozdiel od *Micrococcus sp.* kde na rast a produkciu peptón vôbec nevlýva. U *Aspergillus wentii*, *Mucor racemosus* a *Rhizopus nigricans* je výťažok lipáz maximálny pri 2% koncentrácii peptónu. Extrakt zo sóji podporuje dobrý rast a produkciu lipáz z *Rhizopus oligosporus*. V niektorých prípadoch bol preukázaný i vplyv aminokyselín ako zdroj dusíka. Kmeň *Penicillium roqueforti* produkuje maximálne množstvo lipáz v prítomnosti 1 % kazitonu a *Pseudomonas aeruginosa* v prítomnosti alanínu. Mlieko je tiež dobrým prostriedkom ako pre rast psychrotrofných baktérií tak i pre produkciu lipáz [28].

2.3.5 Vplyv kovových iónov

Kovové ióny môžu inhibovať alebo stimulovať mikrobiálnu produkciu lipáz. Kovové ióny, najmä Ca^{2+} , hrajú dôležitú úlohu v štruktúre a funkcií niektorých enzýmov. Vápenaté ióny sú schopné zvýšiť mieru a rozsah lipolýzy. Hydrolyza emulgovaných lipidov môže byť inhibovaná akumuláciou voľných mastných kyselín s dlhým reťazcom na povrchu tuku, a tým obmedzuje prístup lipáz k triacylglycerolom. Pomocou vápenatých iónov sa nahromadené mastné kyseliny vyzrážajú a odstránia z povrchu tukovej kvapky a tým umožnia lipázam prístup k emulgovanej časti lipidov. Stimulačné účinky vápenatých iónov boli pozorované u *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermoleovorans* a *Staphylococcus aureus* na rozdiel od lipáz produkovaných *Pseudomonas aeruginosa*, ktoré sú v prítomnosti vápenatých iónov inhibované. Ďalšie kovové ióny Mg^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ majú mierne inhibičné účinky a ióny Ni^{2+} , Co^{2+} , Sn^{2+} a Hg^{2+} silne inhibujú lipázovú aktivitu [28,29].

2.3.6 Vplyv inhibítorov

Nešpecifické vratné inhibítory sú zlúčeniny, ktoré nepôsobia priamo v aktívnom mieste, ale inhibujú lipolytickú aktivitu zmenou konformácie lipáz. Do tejto skupiny inhibítorov patria povrchovo aktívne látky, soli žlčových kyselín a proteíny. V niektorých prípadoch povrchovo aktívne látky a žlčové kyseliny aktivujú lipázy. Špecifické inhibítory sú zlúčeniny, ktoré priamo pôsobia v aktívnom mieste enzýmu. Tieto inhibítory môžu byť vratné alebo nevratné. Špecifické vratné inhibítory zahŕňajú deriváty kyseliny boritej, ktoré vytvoria vratný komplex so serínom v aktívnom mieste lipáz a analógy substrátu, čo môžu byť glyceroltriétery, ktoré sú kompetitívne inhibítory pankreatickej lipázy. Špecifické nevratné inhibítory reagujú s aminokyselinami v aktívnom mieste alebo blízkosti aktívneho miesta. Ďalej tieto inhibítory môžu tiež narušiť tiolové väzby a tým meniť konformáciu proteínu. Lipázy patria do skupiny serínových hydroláz s katalytickou triádou Ser-Asp/Glu-His. Preto serínové inhibítory sú potenciálne nevratné inhibítory aktívneho miesta lipáz. Príkladom je fenylnetylsulfonyl fluorid (PMSF), fenyloboronová kyselina a dietylnitrofenyl fosfát [28].

2.4 Kvasinky s lipolytickou aktivitou

Kvasinky sú heterotrofné eukaryotické mikroorganizmy patriace do ríše Fungi. Rozdeľujú sa podľa druhu pohlavného rozmnožovania do triedy *Ascomycetes* a *Basidiomycetes*. Kvasinky, u ktorých sa nedokázalo sexuálne rozmnožovanie, sa zaraďujú do pomocnej triedy *Deuteromycetes*. Produkcia lipáz je rozšírená medzi kvasinkami, ale len niektoré kvasinky sú schopné produkovať lipázy zo zaujímavými vlastnosťami a v dostatočnom množstve, aby boli priemyselne využiteľné. Väčšina štúdií sa zaoberá kvasinkami *Candida rugosa*, *Yarrowia lipolytica* a *Candida antarctica* [33].

2.4.1 Rod *Yarrowia*

Po nejakú dobu bol tento rod monotypický a obsahoval len jediný druh a to *Yarrowia lipolytica*. Pomocou analýz molekulárnej fylogenetiky boli odhalené ďalšie druhy: *Yarrowia bubula*, *Yarrowia divulgata*, *Yarrowia porcina* a *Yarrowia yakushimensis*. Rod *Yarrowia* má pučiace bunky, pseudohýfy alebo pravé hýfy v závislosti od druhu kmeňa a rastových

podmienok. Na hýfách vyrastajú elipsoidné, hruškovité a valcovité konídie. Asky sú jednotlivé, vyrastajú laterálne alebo terminálne a obsahujú 1 až 2 spóry, niekedy však môže obsahovať aj 4 spóry [33]. *Yarrowia lipolytica* je haploidným anamorfným štádiom heterotalického druhu. Väčšina kmeňov je obligátne aeróbna a schopná rásť nad 32 °C. Prieskum genómu *Y. lipolytica* preukázal 25 údajných lipáz. Hlavná izolovaná a charakterizovaná je extracelulárna LIP2. Ďalšie izolované lipázy z *Y. lipolytica* sú LIP7, LIP8, LIP9, LIP11, LIP12, LIP14 a LIP18. Nekonenčné kvasinky *Y. lipolytica* sú ovplyvnené 16 paralógnymi génmi ktoré kódujú lipázy. Preskúmané sú Lip1p, Lip3p a Lip6p, ktoré patria medzi intracelulárne enzýmy, Lip2p je extracelulárny enzým a ďalšie dve lipázy Lip7p a Lip8p sú enzýmy viazané na bunku. Lip7p, Lip8p a Lip2p patria medzi izoenzýmy. Lipázy z rodu *Yarrowia* najlepšie vykazujú hydrolytickú aktivitu pri pH v rozmedzí 6 až 10. Optimálne hodnoty hydrolytickej aktivity sú pri pH 6,7 a 9 v závislosti od použitého kmeňa. Teplota, pri ktorej sú lipázy aktívne, je v rozmedzí 28 až 55 °C ale za teplotné optimum bola daná teplota 37 °C. Určovanie teplotného optima vyplýva hlavne z akého prostredia boli kvasinky získané. Aktivita lipáz je tiež ovplyvnená iónmi kovov, mierne sa zvyšuje v prítomnosti Ca^{2+} a Mg^{2+} a úplne inhibuje v prítomnosti Zn^{2+} a Ni^{2+} . Kvasinky *Y. lipolytica* sú väčšinou izolované z prostredia obsahujúceho lipidy, ako sú mliečne výrobky, olejom znečistené prostredia, surové mäso, odpadové vody a preto sú tieto enzýmy prispôbené hydrofóbnym substrátom. Zdroje uhlíka resp. hydrofóbne substráty, kde patria n-alkány, mastné kyseliny, tuky a oleje, silne ovplyvňujú lipázovú produkciu, zvyšujú produkciu lipolytických enzýmov. Rôzne minerálne a organické zdroje dusíka boli testované na ich schopnosť podporovať rast kmeňa *Y. lipolytica* a produkciu lipáz. Minerálne zdroje dusíka nepreukázali významný účinok ani na rast buniek ani na produkciu lipáz. Naproti tomu bol pozorovaný výrazný nárast produktivity lipáz v prítomnosti organických zdrojov dusíka. Najvyššia produkcia lipáz bola získaná v prítomnosti kazeínového hydrolyzátu. Na rast buniek najlepšie vplýva peptón a kvasničný hydrolyzát [30,31,33].

2.4.2 Rod *Debaryomyces*

Do tohto rodu patria kvasinky, ktoré sa rozmnožujú multipolárnym pučaním alebo pohlavným rozmnožovaním za tvorby askospór. Tvorbe asku predchádza heterogamné spájanie ale nastáva aj izogamné spájanie nezávislých buniek. Najlepšie preskúmanou kvasinkou tohto rodu je *Debaryomyces hansenii*, u ktorej sa rozlišujú dva druhy, *D. hansenii* var. *fabryi* a *D. hansenii* var. *hansenii*, ktoré sa od seba odlišujú rôznymi vlastnosťami napríklad maximálnou rastovou teplotou. *Debaryomyces hansenii* je osmotolerantná, halotolerantná a xerotolerantná kvasinka, ktorá je schopná rásť pri 10% obsahu chloridu sodného alebo 5% obsahu glukózy, čo sa používa pri rozlíšení tejto kvasinky od iných kvasiniek druhu *Ascomycetes*. Patrí medzi heterogénne, univerzálne kvasinky a jej druhy vykazujú fenotypické rozdiely ako schopnosť asimilovať a fermentovať rôzne zdroje uhlíka a vykazovať odlišnú lipázovú a proteázovú aktivitu. Teplotné optimum tejto kvasinky je 20 až 40 °C, avšak boli zistené aj kvasinky z tohto rodu, ktoré rástli pri teplote 5 °C. pH optimum týchto kvasiniek je v rozmedzí 3 až 10. Ako zdroj dusíka využíva *Debaryomyces hansenii* hlavne anorganický dusík vo forme dusitanov. Medzi zdroje uhlíka patria n-alkány, glukóza, galaktóza, sacharóza, trehalóza, glycerol a ribitol [32,33].

2.4.3 Rod *Candida*

Rod *Candida* patrí do skupiny *Ascomycetes*. Rozmnožuje sa spravidla multilaterálnym pučaním, niekedy tvorí pseudohýfy a pravé hýfy. Za určitých podmienok môže vytvárať chlamydospóry ale nie je známa tvorba pohlavných spór. Bunky tohto rodu sa vyznačujú rozmanitými tvarmi, guľovitými, cylindrickými a elipsoidnými. Bunky *Candida intermedia* sú elipsoidného tvaru. Pseudomycélium vytvárajú retiazkovité a stromčekovito vetvené a vyrastajú na ňom oválne blastokonídie. Optimálna teplota *C. intermedia* je v rozmedzí 20 až 30°C. Zdrojom uhlíka pre tieto kvasinky sú glukóza, galaktóza, rafinóza. Významný pre rast mikroorganizmu je aj obsah chloridu sodného [33,35].

2.4.4 Rod *Kluyveromyces*

Rod *Kluyveromyces* sa rozmnožuje vegetatívne pučaním a často vytvára pseudohýfy. Kmene môžu byť homotalické – haploidné, primitívne druhy a vývojovo pokročilejšie homotalické – diploidné, ktoré produkujú zreteľné množstvo etylacetátu a heterotalické kmene kde patrí *Kluyveromyces lactis*. Pri pohlavnom rozmnožovaní sa vytvárajú asky obsahujúce obličkovité, guľaté a oválne spóry v počte 1–4. *Kluyveromyces lactis* je jediný heterotalický druh v rode *Kluyveromyces*, v ktorom vo vegetatívnej fáze rastu prevláda haploidný stav. V menej výživnom médiu sa lepšie tvoria zygoty na rozdiel od plnohodnotného média kde prevláda vegetatívny rast. *K. lactis* produkuje enzým β -galaktozidázu, ktorý hydrolyzuje laktózu na glukózu a galaktózu. Pri kultivácii kvasinky sa používajú väčšinou médiá, ktoré sú zložené z glukózy, laktózy, kvasničného extraktu, peptónu, hydrogénfosforečnanu amónneho. Optimálna teplota je 30 °C a pH optimum má hodnotu 7 [33,34,36].

2.4.5 Rod *Cryptococcus*

Rod *Cryptococcus* patrí do skupiny *Basidiomycetes*, triedy *Tremellomycetes*. Tento rod je silne heterogénny a polyfyletický. V určitých podmienkach bunky produkujú hlienovité polysacharidové puzdro. Kvasinky tohto rodu niekedy vytvárajú rudimentárne pseudomycélium alebo pravé mycélium. Rozmnožujú sa multilaterálnym pučaním. Typické pre tento rod je, že všetky druhy asimilujú inotizol ako zdroj uhlíka na rast. Vegetatívne bunky *Cryptococcus saitoi* sú takmer guľovité alebo krátko elipsoidné. Pri teplote 37 °C tento druh rastie slabo alebo nerastie vôbec, je to jeho restriktívna teplota, pri ktorej nastávajú morfológické zmeny. Teplotné optimum *Cr. saitoi* je v rozmedzí 20–25 °C [33,34].

2.5 Priemyselné využitie

Mikrobiálne lipázy predstavujú významnú skupinu biotechnologicky hodnotných enzýmov, hlavne kvôli ich univerzálnosti a jednoduchosti veľkovýroby. Lipázy sú po proteázach a glykanohydrolázach považované za tretiu najväčšiu skupinu na svetovom trhu enzýmov, kde tvoria približne 5 %. Lipázy mikrobiálneho pôvodu majú väčší priemyselný význam, pretože sú stabilnejšie v porovnaní s rastlinnými a živočíšnymi lipázami a ich výroba je možná vo veľkom pri nízkych nákladoch [37].

2.5.1 Potravinársky priemysel

V dnešnej dobe je úprava olejov a tukov jednou z hlavných oblastí v potravinárskom priemysle, ktorá vyžaduje nové ekonomické a ekologické technológie. Modifikácia nutrične významných štruktúrnych triacylglycerolov a zmena fyzikálno-chemických vlastností rastlinných olejov má v tomto odvetví veľký význam. Regiošpecifické lipázy a lipázy špecifické na určitú mastnú kyselinu sú často využívané pri procesoch modifikácie olejov. Lacné oleje môžu byť používané za pomoci imobilizovaných lipáz na prípravu náhrady kakaového masla. Technológia výroby náhrad kakaového masla je založená na aplikácii imobilizovanej lipázy z *Rhizomucor miehei*, ktorá vykonáva transesterifikačné reakcie triglyceridov za tvorby požadovaného produktu. Lipolytické enzýmy podporujú syntézu masných kyselín s krátkym reťazcom a alkoholov za vzniku esterov. Tieto estery hrajú dôležitú úlohu v potravinárskych technológiách ako aromatické a vonné zložky. Lipázy sú často používané aj v mliekarenskom priemysle, kde sa používajú na hydrolýzu mliečneho tuku alebo úpravu dĺžky masných kyselín a tým zvýšenie chuti rôznych syrov [26]. Taktiež pekárenský priemysel má veľký záujem o lipolytické enzýmy. Štúdie ukázali, že (fosfo) lipázy môžu byť použité ako náhrady tradičných emulgátorov pri výrobe pekárenských produktov. Lipázy sú primárne využívané pre zvýšenie obsahu chuti pekárenských výrobkov uvoľnením masných kyselín s krátkym reťazcom pomocou esterifikácie. Spolu so zvýšením chuti tiež predlžujú trvanlivosť väčšiny produktov. K týmto účelom sa používajú najčastejšie lipázy z *Aspergillus oryzae*. U všetkých hydrolytických enzýmov, vrátane lipáz, bolo zistené, že sú účinné pri znižovaní počiatocnej pevnosti a zvyšovaní merného objemu chleba [38].

2.5.2 Farmaceutické aplikácie

Mikrobiálne lipázy sa používajú na zlepšenie polynenasýtených masných kyselín – PUFA zo živočíšnych a rastlinných tukov a ich monoglyceridy a diglyceridy sú využívané na výrobu rôznych liečiv. Polynenasýtené masné kyseliny sú stále viac využívané ako prídavné látky v potravinách, v liečivách a nutraceutikách kvôli ich metabolickým výhodám. Nutraceutiká sú prirodzené látky s funkciou výživy a zároveň schopnosťou ovplyvnenia zdravotného stavu. Úspešná syntéza nutraceutík bola uskutočnená za použitia imobilizovaných lipáz, ako sú napríklad lipázy z *Candida antarctica* a *Lactobacillus ruteri*. Lipázy z *Candida rugosa* sa používajú k syntéze Lovastatínu, čo je liečivo ktoré znižuje hladinu cholesterolu v sére [24,38].

2.5.3 Priemysel detergentov

Lipolytické enzýmy predstavujú významnú skupinu biokatalyzátorov, ktoré sa stali v poslednej dobe aj súčasťou pracích a čistiacich prostriedkov. Detergenty na báze enzýmov majú lepšie čistiace vlastnosti v porovnaní so syntetickými detergentmi. Sú ďalej aktívne pri nízkych teplotách čistiacich cyklov a tým i šetrné k životnému prostrediu. Pre detergenty sú lipázy špeciálne vybrané na základe nízkej substrátovej špecifite, stability v zásaditom prostredí (pH 10 až 11) a odolnosť voči povrchovo aktívnym látkam, enzýmom (proteázam) a ďalším zložkám pracích a čistiacich prostriedkov [39].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Kultúry

Tabuľka 1: Použité kmene kvasiniek

Číslo kmeňa (CCY)	Druh	Pôvod
13-4-2	<i>Kluyveromyces lactis</i> 2	sladkovodné jazero, Slovensko
17-3-18	<i>Cryptococcus saitoi</i>	rieka Morava, Slovensko
13-3-1	<i>Kluyveromyces lactis</i> 1	Francúzsko
29-12-8	<i>Candida intermedia</i>	kontaminovaný syr typu camembert
29-26-5	<i>Yarrowia lipolytica</i> 5	olivy, Francúzsko
29-175-3	<i>Candida oleophila</i>	plody hrušky
41-6-12	<i>Debaryomyces hansenii</i>	rieka Morava, Slovensko
29-26-33	<i>Yarrowia lipolytica</i> 33	spracovanie kukurice

3.1.2 Chemikálie

- D-glukóza p.a. – PENTA
- Destilovaná voda – Fakulta chemická VUT Brno, ČR
- Detergent – W5 ECO, Praha
- Dihydrogenfodforečnan draselný p.a. – Lach Ner, ČR
- Dihydrogénfosforečnan sodný p.a. – LachNer, ČR
- Etanol p.a. – Merck s.r.o.
- Hydrogénfosforečnan sodný p.a. – Lach Ner, ČR
- Hydroxid sodný p.a. – Lach Ner, ČR
- *p*-nitrofenol – Lach Ner, ČR
- *p*-nitrofenyllaurát – SIGMA – ALDRICH
- Síran meďnatý pentahydrát p.a. – Lach Ner, ČR
- Slniečnicový olej, Tesco, ČR
- Uhličitan sodný p.a. – Lach Ner, ČR

3.1.3 Prístroje a pomôcky

- Analytické váhy – AND GR-202-EC, Japonsko
- Autokláv
- Automatické pipety BIOHIT
- Laminárny box AURA mini, Biotech a.s.
- McFarlandov denzitometer DEN-1B, Laboserv s.r.o., Brno
- Mikroskúmavky Eppendorf
- Minitrepačka lab dancer vario IKA
- Laboratórne sklo
- pH meter, inoLab 720 SET, Merci s.r.o., Brno
- Predvážky Scaltec, USA
- Skúmavky
- Spektrofotometer UV/VIS HELIOS DELTA – Thermospectronic, Anglicko
- Stojan na skúmavky
- Špičky
- Termostat Memmert
- Trepačka Heidolph Unimax 1010, Nemecko
- Ultracentrifuga Eppendorf 5417R, Nemecko
- Vortex Heidolph, REAX top, Nemecko

3.1.4 Živné média

- Živný mäsopeptónový agar - *Nutrient Agar* MPA : mäsový extrakt 3 g/l, peptón 5 g/l, agar 15-20 g/l, chlorid sodný 5g/l, slnečnicový olej 1 obj.% v médiu.
- Bazálne médium (BM): mäsový extrakt 3 g/l, peptón 5 g/l.
- Bazálne médium so slnečnicovým olejom (BM+SO): mäsový extrakt 3 g/l, peptón 5 g/l, slnečnicový olej 2 obj.% v médiu.
- Bazálne médium s glukózou (BM+G): mäsový extrakt 3 g/l, peptón 5 g/l, glukóza 2 g/l.
- Bazálne médium s detergentom (BM+D): mäsový extrakt 3 g/l, peptón 5 g/l, detergent 2 obj.% v médiu.

3.1.5 Roztoky pre stanovenie lipolytickej aktivity

- Roztok *p*-nitrofenolu: 13,9 mg *p*-nitrofenolu bolo rozpustených v 100 ml destilovanej vody za vzniku roztoku s koncentráciou 1mM.
- Roztok *p*-nitrofenyllaurátu: 20 mg *p*-nitrofenyllaurátu bolo rozpustených v 25 ml etanolu za vzniku roztoku s koncentráciou 2,5 mM.
- Fosforečnanový tlmivý roztok pH 7,5 (50 mM): 0,549 g dihydrogenfosforečnanu draselného a 1,431 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného bolo rozpustených v 240 ml destilovanej vody za vzniku roztoku s koncentráciou 50 mM. pH bolo upravené na hodnotu 7,5 s roztokom hydroxidu sodného.
- Roztok uhličitanu sodného: V 100 ml destilovanej vody bolo rozpustených 1,06 g uhličitanu sodného za vzniku roztoku s koncentráciou 0,1 M.

3.2 Metódy

3.2.1 Testovanie lipolytickej aktivity

Na overenie lipolytickej aktivity vybraných kmeňov kvasiniek bola využitá platňová kultivačná metóda založená na vzniku zrazeniny roztoku síranu meďnatého v okolí kolónií kvasiniek s produktom enzýmovej hydrolýzy substrátu a zmenou farby kolónií. Živný agar s obsahom 1% slnečnicového oleja bol pripravený a sterilizovaný podľa návodu výrobcu. Živný agar bol rozliaty na Petriho misky (PM) a bol následne zaočkovaný vybranými kultúrami kvasiniek. Kultivácia prebiehala pri teplote 27 °C po dobu 48 hodín. Po kultivácii boli platne zaliate koncentrovaným roztokom síranu meďnatého. Lipolytické enzýmy hydrolyzujú slnečnicový olej za vzniku produktov reagujúcich s roztokom síranu meďnatého. Modrozelené kolónie obklopené zrazeninou indikovali prítomnosť lipolytických enzýmov.

3.2.2 Stanovenie rastovej krivky pomocou denzitometru

Na zostrojenie rastových kriviek kvasiniek bol použitý denzitometer McFarlanda, čo je prístroj na meranie zákalu v roztoku v rozmedzí 0–5,0 jednotiek McFarlandovej stupnice (0–180 x 10⁷ buniek/ml). Princípom je meranie optickej absorpcie s digitálnym zobrazením výsledku v McFarlandových jednotkách na displeji prístroja. Denzitometer McFarlanda poskytuje možnosť merania zákalu v roztoku v širšom rozsahu (až 15 McFarland jednotiek), avšak v tomto prípade sa musí brať na vedomie, že sa hodnota štandardnej odchýlky zvyšuje. Do L skúmaviek bolo napipetovaných 5,6 ml vybraných médií (BM, BM+G, BM+D, BM+SO) a 0,4 ml suspenzie kvasiniek. Skúmavky boli pretrepávané na trepačke pri laboratórnej teplote a v určitých časových intervaloch bol meraný zákal na denzitometri McFarland.

3.2.3 Spektrometrické stanovenie lipolytickej aktivity

Princíp spektrofotometrického stanovenia lipolytickej aktivity s využitím *p*-nitrofenyllaurátu (*p*-NFL) je meranie množstva uvoľneného *p*-nitrofenolu (*p*-NF) v dôsledku štiepenia *p*-NFL pôsobením enzýmu po určitú dobu. Intenzita vzniknutého žltého sfarbenia produktu *p*-NF je priamo úmerná aktivite enzýmu a meria sa pri 420 nm. Vzorec (1) pre výpočet lipolytickej aktivity enzýmu vychádza z rovnice lineárnej regresie získanej vyhodnotením kalibračnej krivky *p*-NF.

$$a = \frac{A_{420} \cdot f_x}{V \cdot t} \quad (1)$$

a lipolytická aktivita stanovovaného enzýmu [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} = \text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$]

A_{420} nameraná absorbancia vzoriek

f_x prepočítavací faktor koncentrácie *p*-nitrofenolu pre absorbanciu rovnú 1, ktorý bol určený z kalibračnej priamky *p*-nitrofenolu

V objem vzorky [ml]

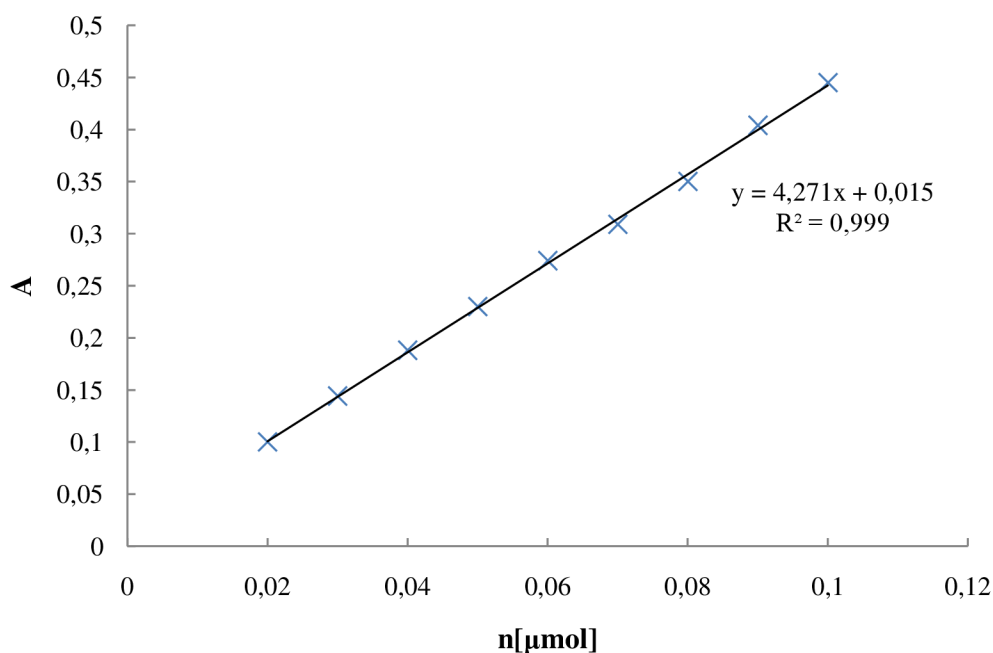
t doba inkubácie [min]

3.2.3.1 Stanovenie kalibračnej krivky *p*-nitrofenolu

Pre zostrojenie kalibračnej krivky *p*-NF bol pripravený zásobný roztok *p*-NF o koncentracii 1 mM. Príslušným nariadením tohto roztoku bola pripravená kalibračná rada *p*-NF o látkovom množstve 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4; 0,45 a 0,5 μmol . V skúmavkách bol vždy zmiešaný roztok *p*-NF o danej koncentracii a 650 μl 50 nM fosfátového tlmivého roztoku (pH 7,5). Obsah skúmaviek bol dobre premiešaný a inkubovaný pri teplote 37 °C po dobu 10 minút. Následne bolo pridaných 100 μl roztoku uhličitanu sodného. Absorbancia bola premeraná spektrofotometricky proti blanku pri vlnovej dĺžke 420 nm. Blank bol pripravený z 500 μl destilovanej vody, 650 μl 50 nM fosfátového tlmivého roztoku (pH 7,5) a 100 μl roztoku uhličitanu sodného. Zloženie blanku a jednotlivých roztokov kalibračnej rady je popísané v Tabuľke 2. Kalibračná priamka s rovnicou regresie je znázornená v Grafe 1.

Tabuľka 2: Zloženie blanku a jednotlivých roztokov kalibračnej rady

Skúmavka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Blank
<i>p</i> -NF [μl]	100	150	200	250	300	350	400	450	500	0
Destilovaná voda [μl]	400	350	300	250	200	150	100	50	0	500
Fosfátový tlmivý roztok [μl]	650	650	650	650	650	650	650	650	650	650
Uhličitan sodný [μl]	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
$n_{p\text{-NF}}$ [μmol]	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	0
$n_{p\text{-NF}}$ [μmol] po 5 násobnom riedení	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,10	0



Graf 1: Kalibračná krivka *p*-nitrofenolu

3.2.3.2 Stanovenie lipolytickej aktivity v supernatante

Z kultivačného média bola odobraná vzorka bunkovej suspenzie pre stanovenie lipolytickej aktivity extracelulárnych enzýmov. Bunková suspenzia bola centrifugovaná pri 13 000 ot/min, teplote 4 °C po dobu 5 minút, čím sa oddelili extracelulárne produkty od bunkovej hmoty. Zo supernatantu bolo odobraných 100 µl vzorky ku ktorej bolo pridaných 350 µl destilovanej vody. K nariadenej vzorke bolo pridaných 650 µl fosfátového tlmivého roztoku (pH 7,5) a 50 µl substrátu *p*-nitrofenyllaurátu (C12:0) v etanole. Reakčná zmes bola dobre premiešaná a inkubovaná pri teplote 37 °C po dobu 10 minút v termostate. Po inkubácii bolo k reakčnej zmesi pridaných 100 µl roztoku uhličitanu sodného. Zmes bola premiešaná a bola premeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 420 nm proti blanku. Ako blank bola použitá zmes fosfátového tlmivého roztoku (pH 7,5), destilovanej vody a uhličitanu sodného.

3.2.3.3 Stanovenie lipolytickej aktivity v sedimente

Pre stanovenie lipolytickej aktivity viazanej na povrchu buniek bol použitý sediment, ktorý zostal v skúmavke po centrifugácii bunkovej suspenzie. Sediment bol najskôr premytý a následne centrifugovaný pri 13 000 ot/min pri teplote 4 °C po dobu 5 minút. Potom bol sediment rozsuspendovaný v 750 µl fosfátového tlmivého roztoku (pH 7,5) a bolo pridaných 50 µl roztoku substrátu *p*-nitrofenyllaurátu v etanole. Reakčná zmes bola dobre premiešaná a inkubovaná v termostate pri teplote 37 °C po dobu 10 minút. Po inkubácii bola zmes centrifugovaná pri 13 000 ot/min pri teplote 4 °C po dobu 5 minút. Do získaného supernatantu bolo pridaných 100 µl roztoku uhličitanu sodného a bola premeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 420 nm proti blanku. Ako blank bola použitá zmes fosfátového tlmivého roztoku (pH 7,5), destilovanej vody a uhličitanu sodného.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe výsledkov štúdií zaoberajúcich sa produkciou lipolytických enzýmov a spracovanej literárnej rešerše bolo vybraných osem kmeňov kvasiniek, a to *Kluyveromyces lactis* 2, *Kluyveromyces lactis* 1, *Yarrowia lipolytica* 5, *Yarrowia lipolytica* 33, *Cryptococcus saitoi*, *Candida intermedia*, *Candida oleophila* a *Debaryomyces hansenii*. Vybrané kmene kvasiniek boli kultivované na štyroch médiách o rôznom zložení a bola u nich sledovaná lipolytická aktivita enzýmov viazaných na povrchu buniek tak i extracelulárnych enzýmov. V priebehu kultivácie bol sledovaný celkový nárast buniek kvasiniek v závislosti od zloženia kultivačného média.

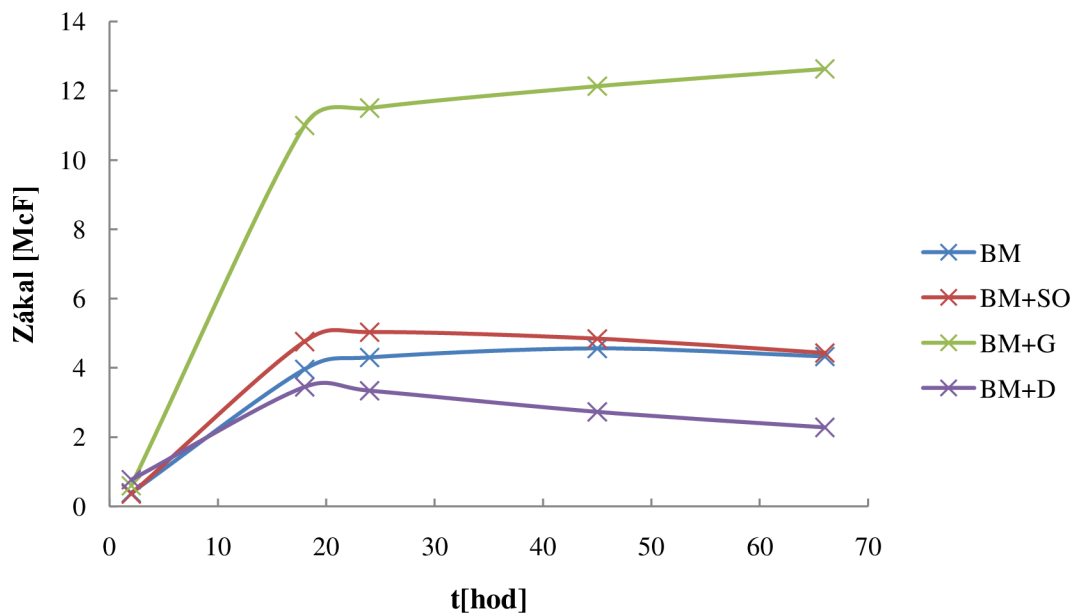
4.1 Testovanie lipolytickej aktivity vybraných kvasiniek

Schopnosť kvasiniek katalyzovať štiepenie lipidického substrátu bola overená platňovou kultivačnou metódou. Kvasinky boli kultivované na živnom mäsopeptónovom agare s obsahom 1% slnečnicového oleja ako lipidového substrátu. Po zaliatí platní koncentrovaným roztokom síranu meďnatého bolo možné pozorovať v okolí kolónií kvasiniek vznik zrazeniny a zmenu sfarbenia roztoku síranu meďnatého v dôsledku enzýmovej hydrolýzy slnečnicového oleja. Modrozelené kolónie obklopené zrazeninou vykazovali pozitívnu reakciu na prítomnosť lipolytickej aktivity kvasiniek a boli pozorované u všetkých vybraných kvasiniek (Obrázok 5–12).

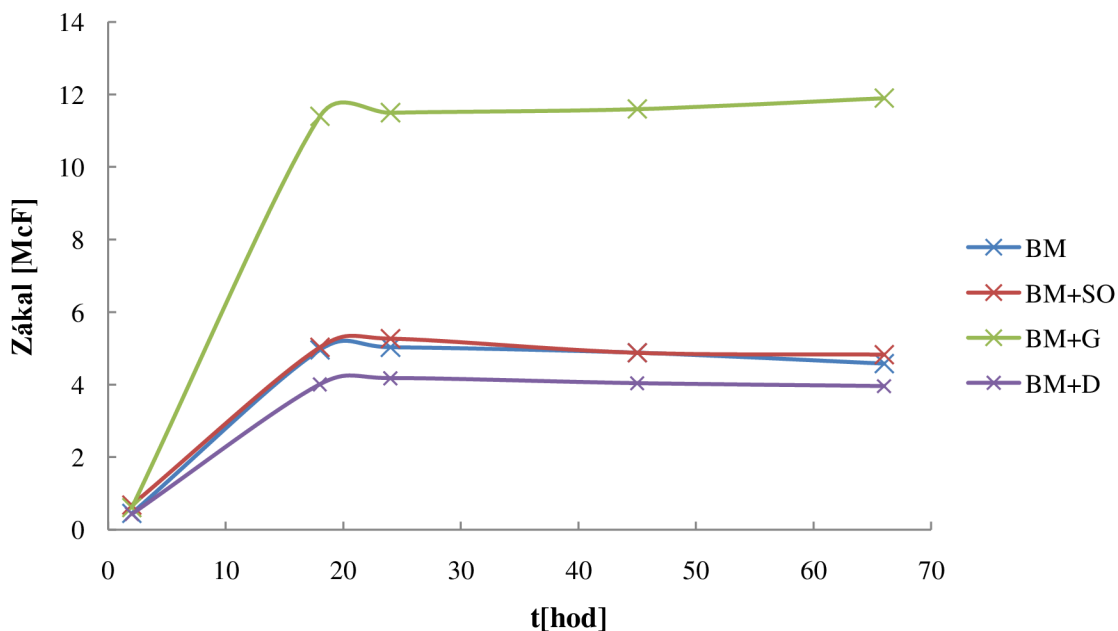
4.2 Vplyv zloženia kultivačného média na rast vybraných kvasiniek

Pre rast a rozmnožovanie kvasiniek je dôležitá správna výživa. Tú kvasinky prijímajú zo živného média, ktoré musí spĺňať určité predpoklady a to hlavne základné zloženie výživy, medzi ktoré patrí voda, zdroj uhlíka, zdroj dusíka, prvky dôležité na výstavbu živej hmoty a rastové látky. Pre kultiváciu boli použité 4 kultivačné médiá. Ako základné médium bolo použité bazálne médium (BM). Ďalšie médiá boli založené na základnom BM a k nemu boli pridané látky sacharidového charakteru a to glukóza (BM+G) a lipidového charakteru a to slnečnicový olej (BM+SO). Posledným médiom, vybraným pre porovnanie, bolo médium s detergentom, taktiež založenom na BM (BM+D). Kultivácia prebiehala počas 66 hodín pri teplote 25 °C. Celkový nárast buniek jednotlivých kvasiniek bol meraný ako zákal/turbidita pomocou denzitometra McFarlanda v časoch 2, 18, 24, 45, 66 hodín. Výsledný zákal bol vypočítaný vždy z dvoch paralelných stanovení a na základe priemerných hodnôt zákalu boli zostavené rastové krivky. Závislosť rastu mikroflóry na zložení kultivačného média bola stanovená na základe zostrojených rastových kriviek. Z Grafov 2-5 a Grafov 8-10 vyplýva, že ako najvhodnejšie médium pre rast vybraných kmeňov kvasiniek s lipolytickou aktivitou je bazálne médium s glukózou v porovnaní iba s bazálnym médiom. V prípade dvoch kmeňov *Yarrowia lipolytica* Graf 6 a 7 sa tento stimulačný efekt prejavil i s prídavkom slnečnicového oleja. V bazálnom médiu s detergentom je možné pozorovať výrazné potlačenie rastu buniek u *Debaryomyces hansenii* Graf 9 a *Candida intermedia* Graf 5.

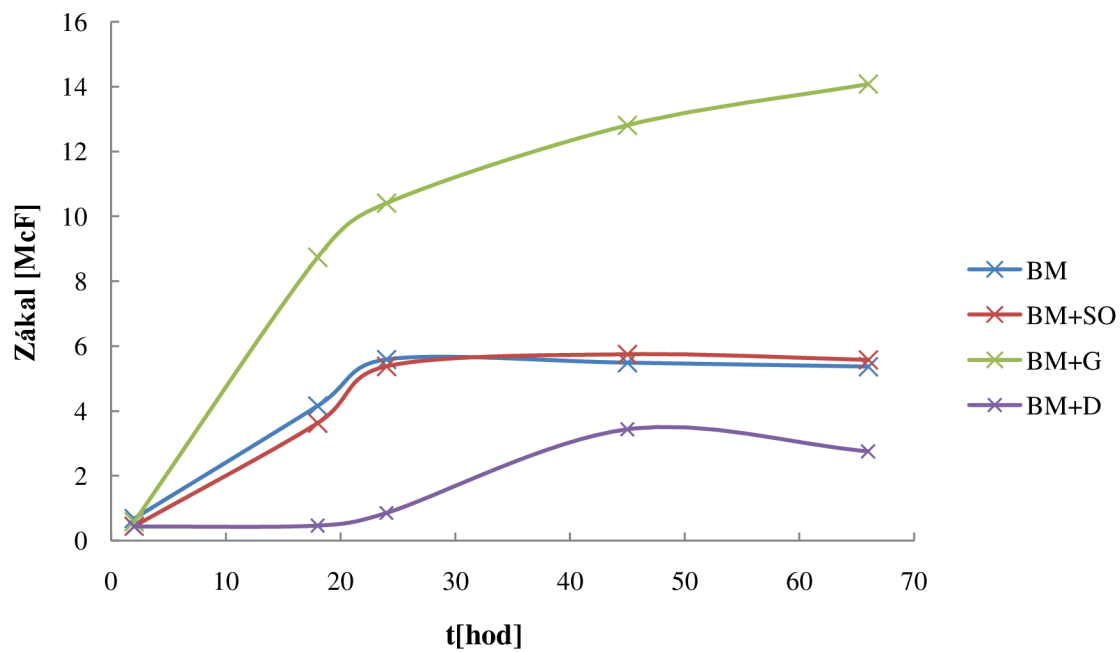
V médiu s detergentom u kvasinky *Cryptococcus saitoi* došlo k posunu počiatku exponenciálnej fáze až do 24 hodiny kultivácie oproti ostatným médiám. V prípade dvoch kmeňov kvasinky *Y. lipolytica* sa javí médium so slnečnicovým olejom ako dobrý substrát pre rast buniek, čo naznačujú i Grafy 6 a 7.



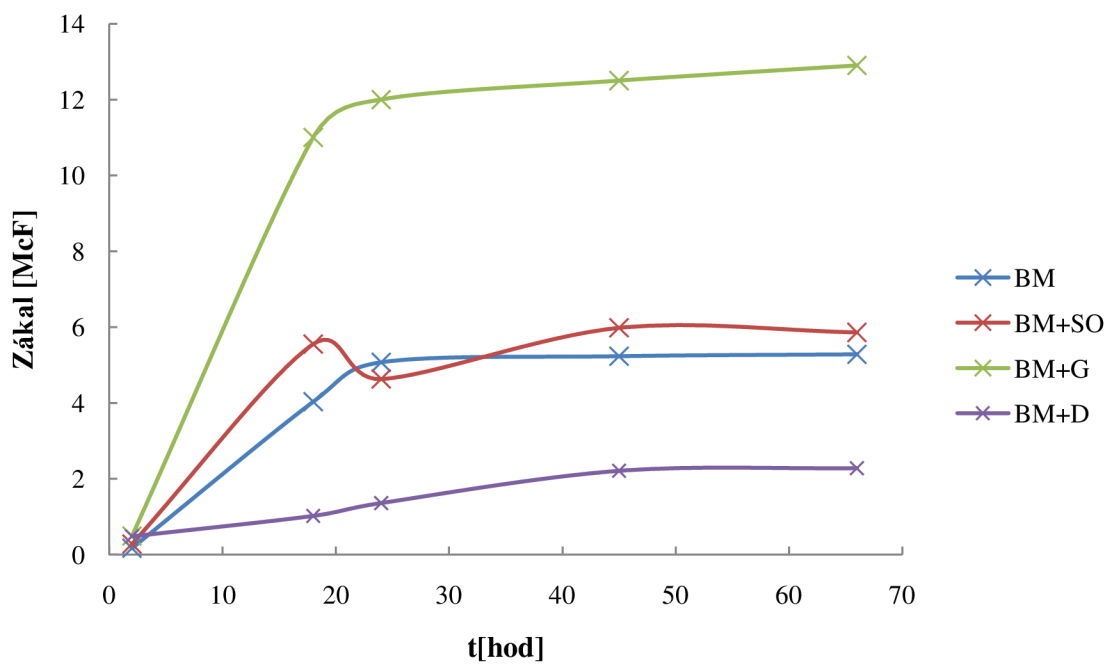
Graf 2: Rastové krivky *Kluyveromyces lactis* 2



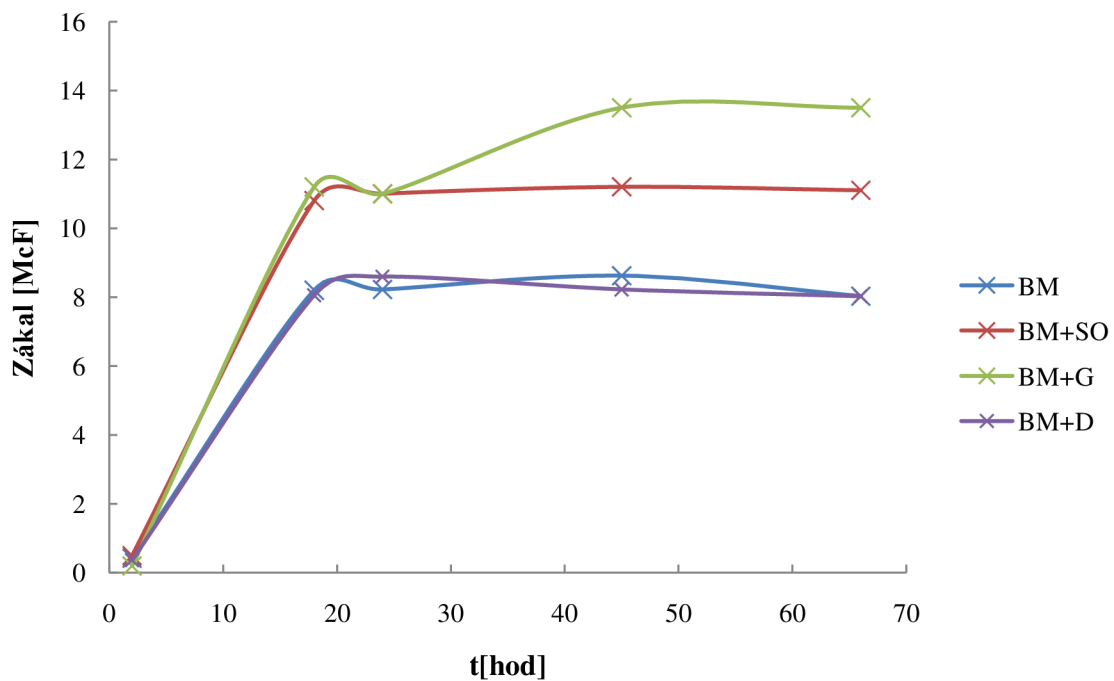
Graf 3: Rastové krivky *Kluyveromyces lactis* 1



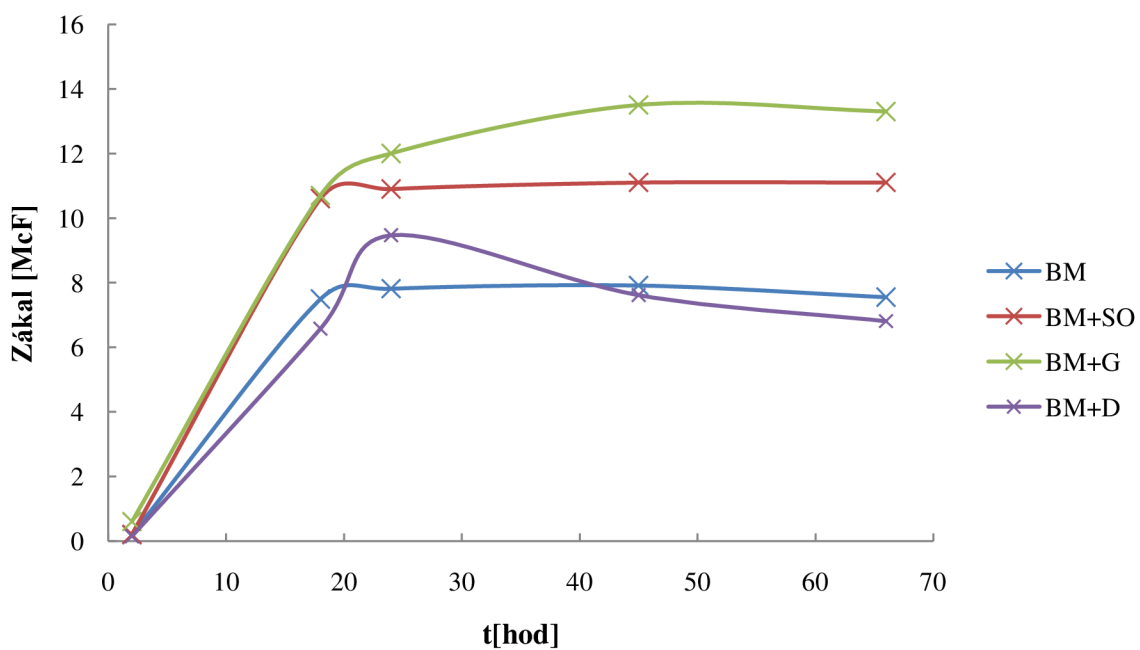
Graf 4: Rastové krivky *Cryptococcus saitoi*



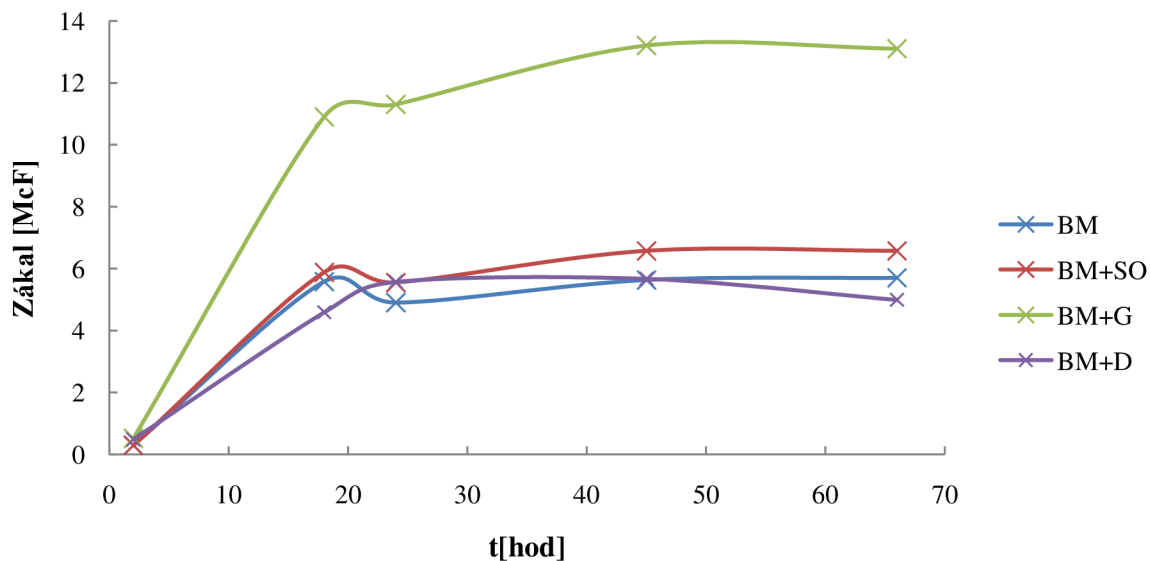
Graf 5: Rastové krivky *Candida intermedia*



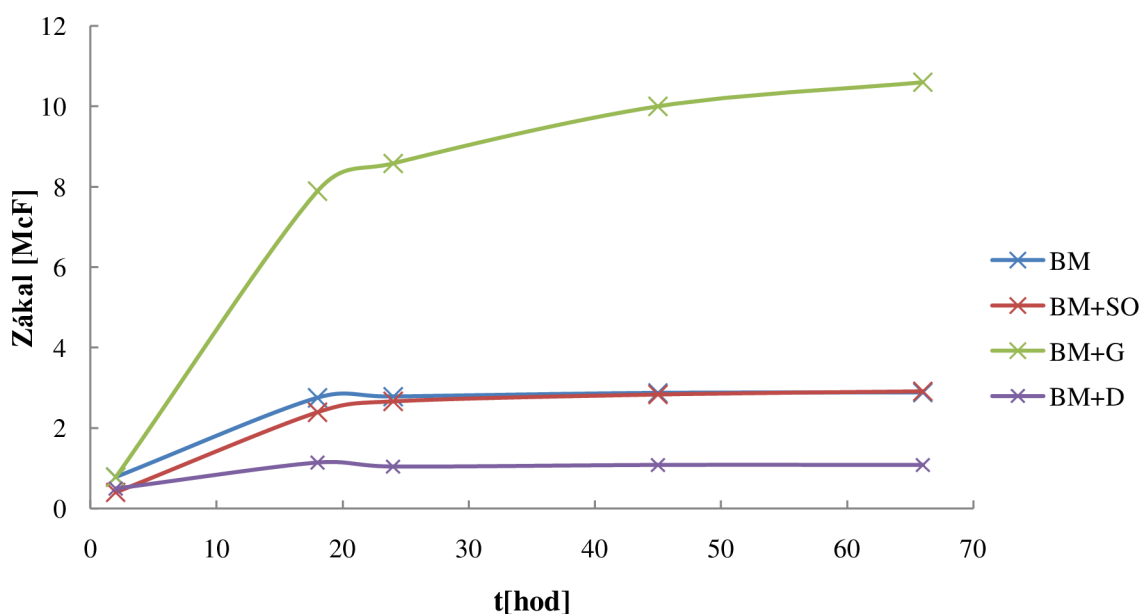
Graf 6: Rastové krivky Yarrowia lipolytica 5



Graf 7: Rastové krivky Yarrowia lipolytica 33



Graf 8: Rastové krivky *Candida oleophila*



Graf 9: Rastové krivky *Debaryomyces hansenii*

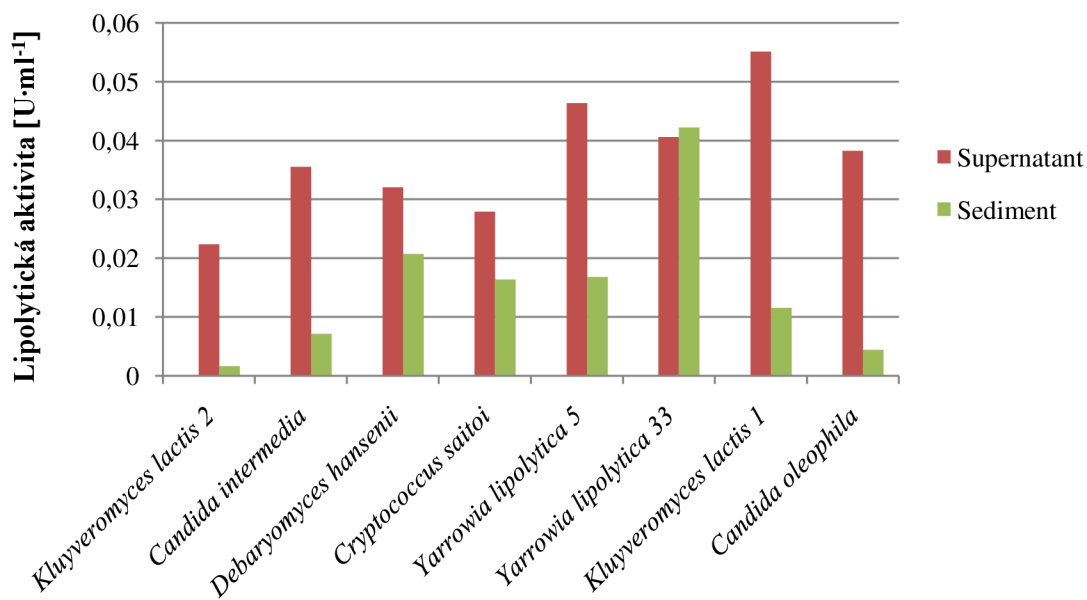
4.3 Vplyv zloženia kultivačného média na produkciu lipolytických enzýmov

Lipolytická aktivita bola testovaná u ôsmich vybraných kmeňov kvasiniek (Tabuľka 1). Na kultiváciu boli použité 4 kultivačné média s rôznym zložením, ktoré boli vybrané na základe výsledkov uvedených v predchádzajúcej podkapitole 4.2. Ako základné médium bolo použité bazálne médium BM. Ďalšie dve kultivačné média, BM+G (bazálne médium s glukózou) a BM+SO (bazálne médium so slnečnicovým olejom). Posledné kultivačné

médium bolo použité BM+D (bazálne médium s detegentom). U zvolených kmeňov kvasiniek bola sledovaná lipolytická aktivita v supernatante (prítomnosť extracelulárnych enzýmov) i v sedimente (prítomnosť enzýmov viazaných na bunku) v 45 hodine kultivácie. Lipolytická aktivita bola stanovená na substrát *p*-nitrofenyllaurát, ktorý bol následne rozložený enzýmom prítomným v suspenzii, za vzniku žltu sfarbeného produktu *p*-nitrofenolu. Na základe nameraných hodnôt prírastku *p*-nitrofenolu bola vypočítaná lipolytická aktivita všetkých testovaných kvasiniek. Získané výsledky sú uvedené v Grafoch 10–15.

4.3.1 Bazálne médium

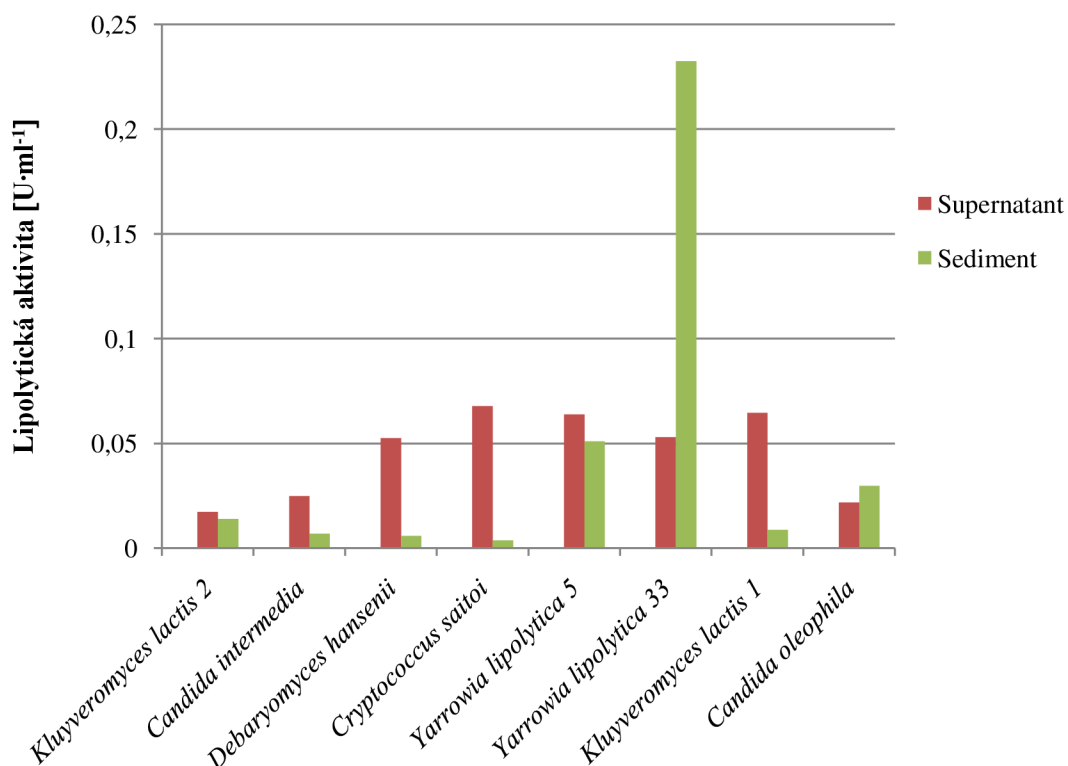
Všetky testované kvasinky, kultivované v bazálnom médiu, vykazovali vyššiu lipolytickú aktivitu v supernatante, až na kvasinku *Yarrowia lipolytica* 33, u ktorej bola pozorovaná vyššia lipolytická aktivita v sedimente Graf 10. Najvyššiu aktivitu vykazovala kvasinka *Kluyveromyces lactis* 1 v supernatante s hodnotou lipolytickej aktivity $0,055 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$. Hodnoty lipolytických aktivít ostatných kvasiniek v supernatante boli v rozmedzí od $0,022$ do $0,046 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$. Lipolytická aktivita v sedimente bola na rozdiel od aktivity v supernatante nižšia, čo znamená, že kvasinky produkovali v prítomnosti základného bazálneho média s obsahom kvasičného extraktu a peptónu, prevažne extracelulárne enzýmy. Pričom kmeň *Yarrowia lipolytica* 5 vykazuje lipolytickú aktivitu vyššiu v supernatante, čo sa zhoduje s výsledkami experimentov, ktoré stanovil Fickers P. a kol. [31], pri štúdiu produkcie extracelulárnych lipáz *Yarrowia lipolytica* v prítomnosti média s organickým zdrojom dusíka. Druhý testovaný kmeň *Yarrowia lipolytica* 33 nekoreluje s výsledkami experimentov uvádzaných v literatúre [31].



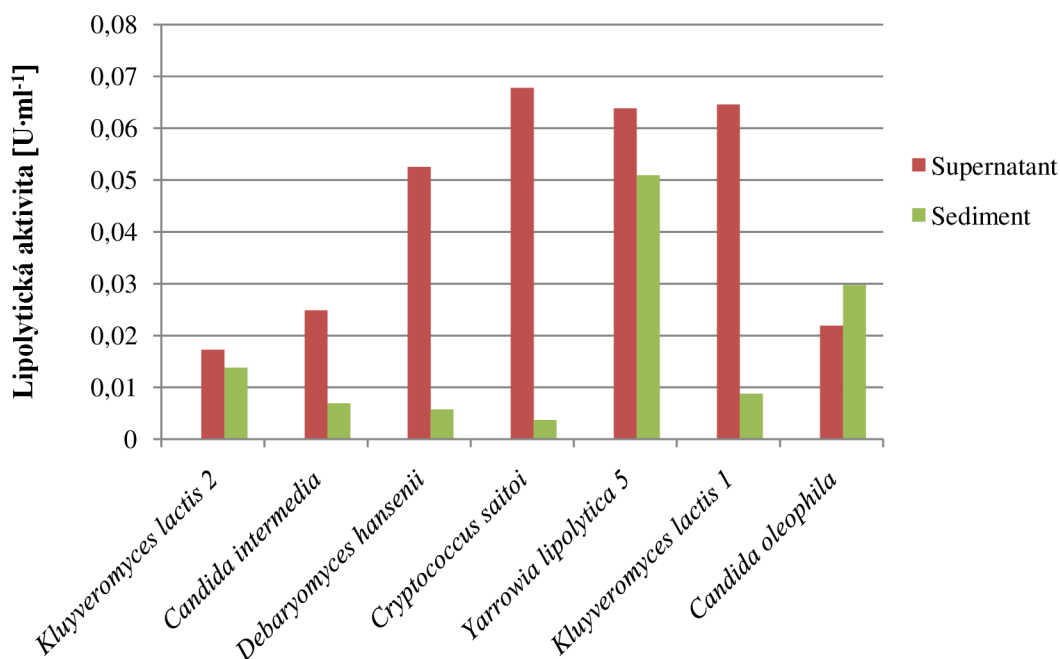
Graf 10: Stanovenie lipolytických aktivít enzýmov vybraných kvasiniek kultivovaných v bazálnom médiu

4.3.2 Bazálne médium s glukózou

U vybraných testovaných kvasiniek bol pozorovaný nárast lipolytickej aktivity pri kultivácii v bazálnom médiu s glukózou v supernatante, avšak u kvasiniek *Yarrowia lipolytica* 33 a *Candida oleophila*, bol vyšší nárast v sedimente v porovnaní so supernatantom (Graf 11). Tento nárast lipolytickej aktivity v prítomnosti glukózy bol zaznamenaný i v experimente, ktorý vykonal Corzo a Revah [41] s kvasinkou *Yarrowia lipolytica* 681. Pre lepšie porovnanie aktivít ostatných kvasiniek bol zostrojený Graf 12, v ktorom je vynechaná aktivita *Yarrowia lipolytica* 33. Z tohto grafu vyplýva, že najvyššia aktivita v supernatante je u *Cryptococcus saitoi*, *Kluyveromyces lactis* a u *Yarrowia lipolytica* 5. Iba u *Candida oleophila* je lipolytická aktivita v sedimente vyššia ako v supernatante.



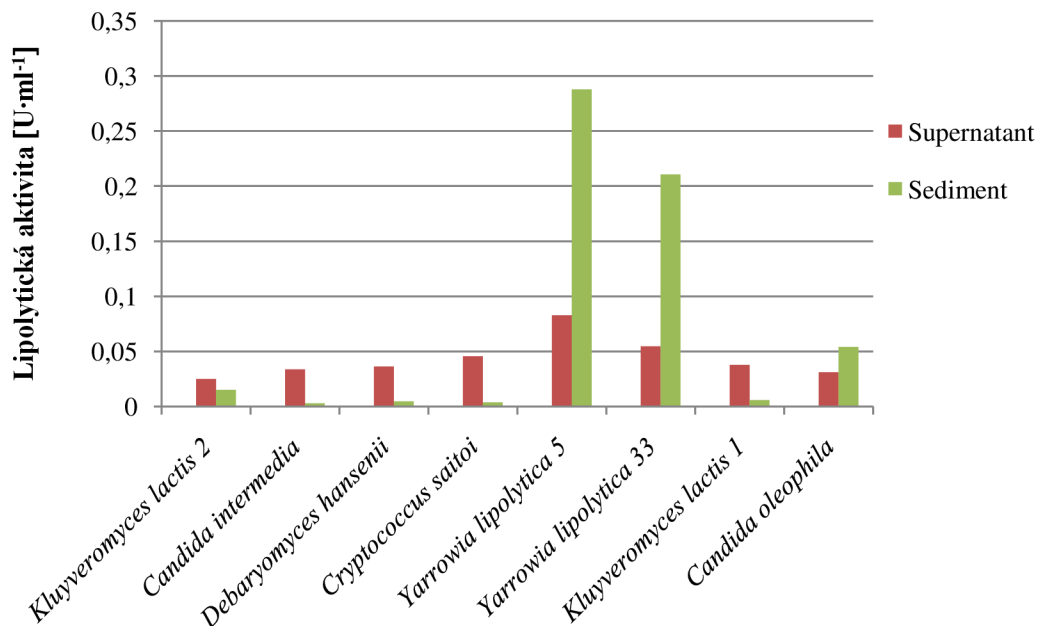
Graf 11: Stanovenie lipolytickej aktivity enzýmov vybraných kvasiniek kultivovaných v bazálnom médiu s glukózou



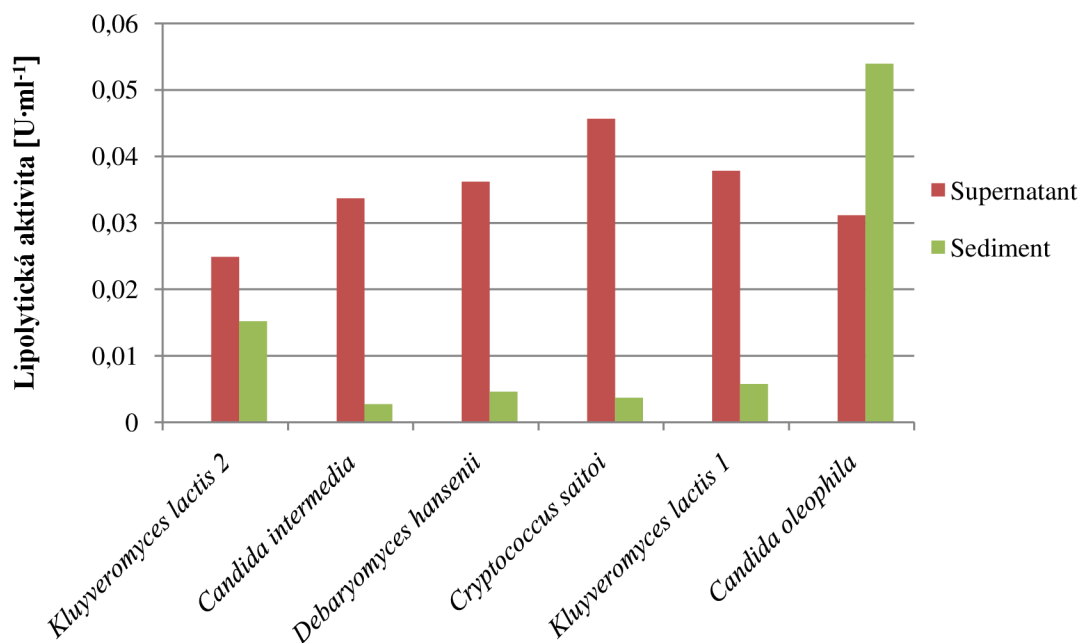
Graf 12: Stanovenie lipolytickej aktivity enzýmů vybraných kvasiniek, okrem kvasinky *Yarrowia lipolytica* 33, kultivovaných v bazálnom médiu s glukózou

4.3.3 Bazálne médium so slnečnicovým olejom

Z Graf 13 je možné pozorovať nárast lipolytickej aktivity v sedimente pre testované kmene *Yarrowia lipolytica* v prípade kultivácie v bazálnom médiu so slnečnicovým olejom. Taktiež je vyšší nárast aktivity v sedimente, na rozdiel od supernatantu, u kvasinky *Candida oleophila*. Na základe týchto výsledkov možno predpokladať, že produkcia lipolytických enzýmů viazaných na bunku u kvasiniek *Yarrowia* je indukovaná prítomnosťou lipidového zdroja uhlíka. Avšak táto produkcia nie je indukovaná len prítomnosťou lipidového zdroja uhlíka. Na Grafe 11 možno vidieť u kvasinky *Yarrowia lipolytica*, že výrazný nárast lipolytickej aktivity viazanej na bunku sa prejavil aj prítomnosťou glukózy. V prípade ostatných kvasiniek lipolytická aktivita v sedimente neprekročila hodnotu 0,02 U·ml⁻¹. Pre lepšie porovnanie lipolytických aktivít ostatných kvasiniek, okrem kvasiniek *Yarrowia lipolytica*, bol spracovaný Graf 14. Na Grafe 14 je potom možné vidieť, že prítomnosť lipidového zdroja uhlíka u ostatných kmeňů stimuluje produkciu extracelulárnych enzýmů. Najvyššiu lipolytickú aktivitu vykazovala kvasinka *Cryptococcus sakei* s hodnotou (0,046 U·ml⁻¹).



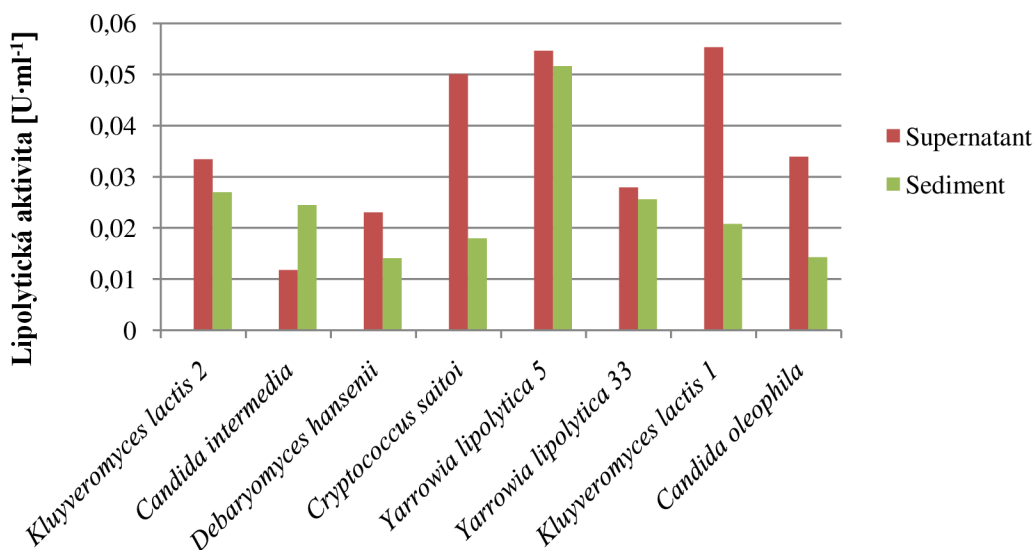
Graf 13: Stanovenie lipolytickej aktivity enzýmov vybraných kvasiniek kultivovaných v bazálnom médiu so slnečnicovým olejom



Graf 14: Stanovenie lipolytickej aktivity enzýmov vybraných kvasiniek, okrem kvasiniek Yarrowia lipolytica, kultivovaných v bazálnom médiu so slnečnicovým olejom

4.3.4 Bazálne médium s detergentom

Posledným testovaným médiom bolo bazálne médium s prídavkom detergentu. Ako detergent bol použitý prostriedok na mytie riadov W5 ECO. Z Grafu 15 vyplýva, že prídavok detergentu ovplyvnil produkciu extracelulárnych enzýmov i enzýmov viazaných na bunku. Najvyššie hodnoty lipolytickej aktivity dosahovali kvasinky *Kluyveromyces lactis* 1, *Yarrowia lipolytica* 5 a *Cryptococcus saitoi* v supernatante s hodnotou približne $0,05 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$. *Candida intermedia* ako jediná vykazuje vyššiu lipolytickú aktivitu v sedimente ($0,024 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$), na rozdiel od supernatantu.



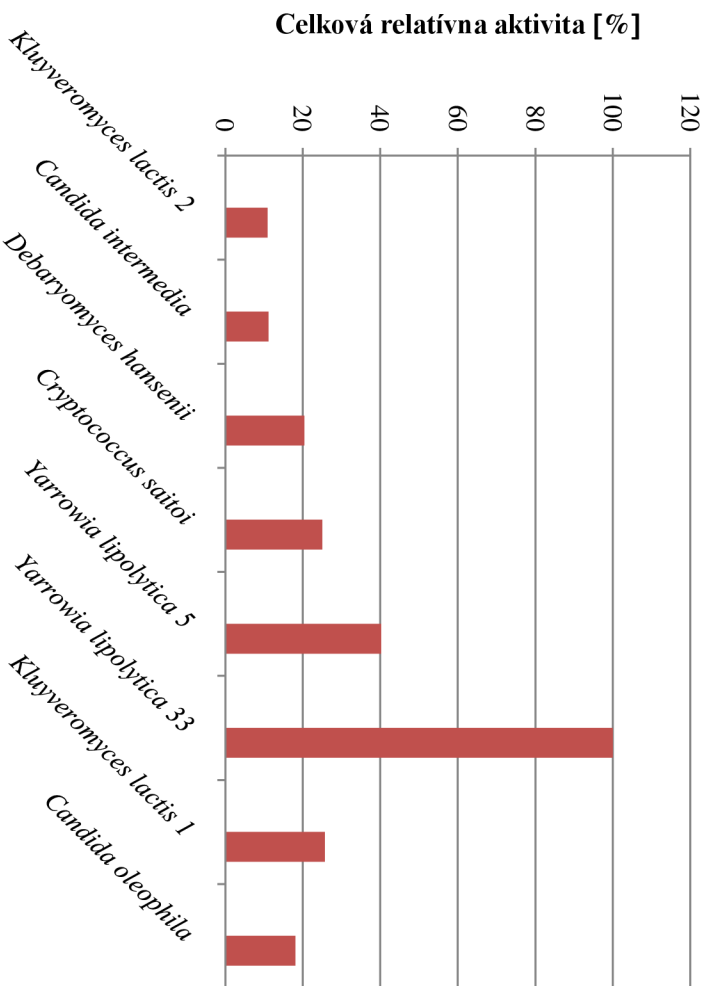
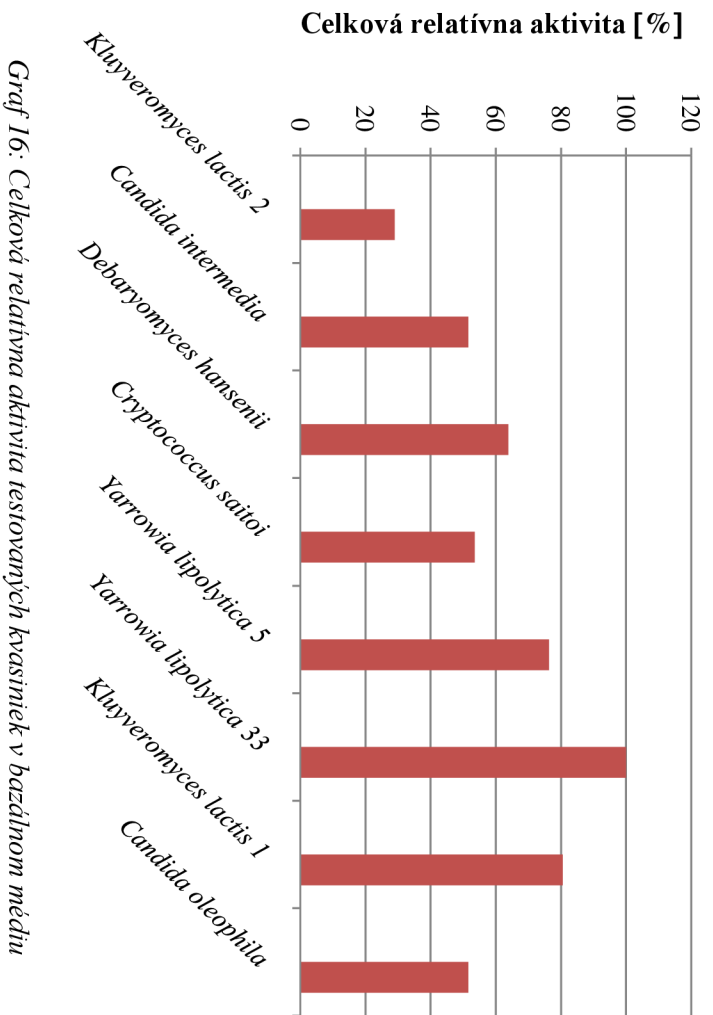
Graf 15: Stanovenie lipolytickej aktivity enzýmov vybraných kvasiniek kultivovaných v bazálnom médiu s detergentom

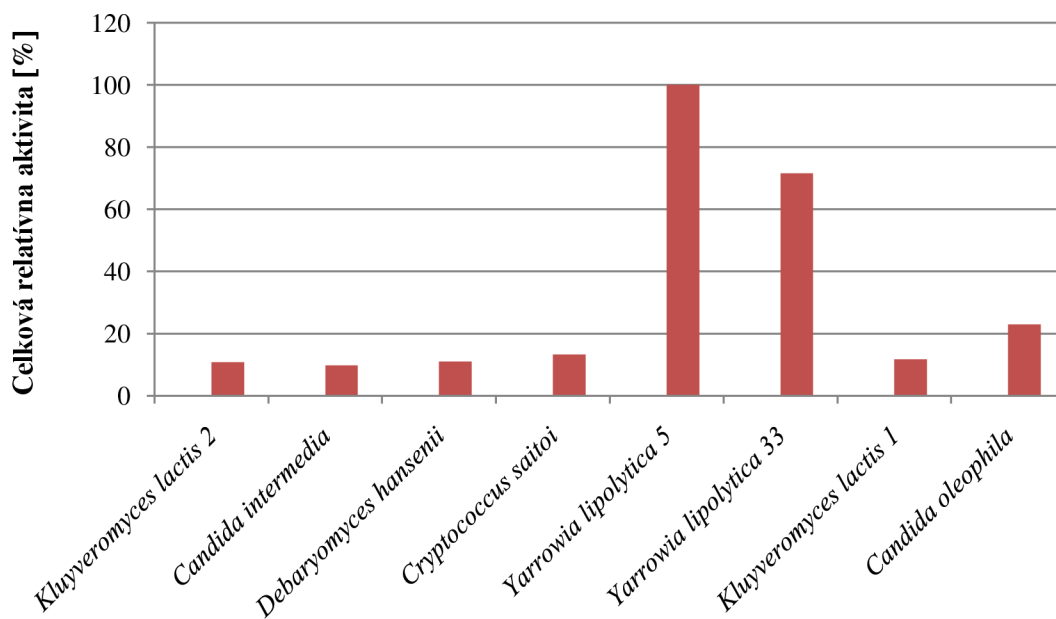
4.4 Vplyv testovaných médií na celkovú produkciu lipáz

Pre porovnanie celkovej aktivity, aktivity extracelulárnych enzýmov a enzýmov viazaných na bunku u testovaných kvasiniek, boli zostrojené stĺpcové grafy pre jednotlivé kultivačné médiá. Tieto závislosti sú uvedené v Grafoch 16–19. Z Grafu 16 je možné vidieť, že v bazálnom médiu, ktoré obsahuje iba kvasničný extrakt a peptón je celková relatívna aktivita 100 % iba u kmeňa *Yarrowia lipolytica* 33 a u kmeňa *Kluyveromyces lactis* 2 menej ako 30 %.

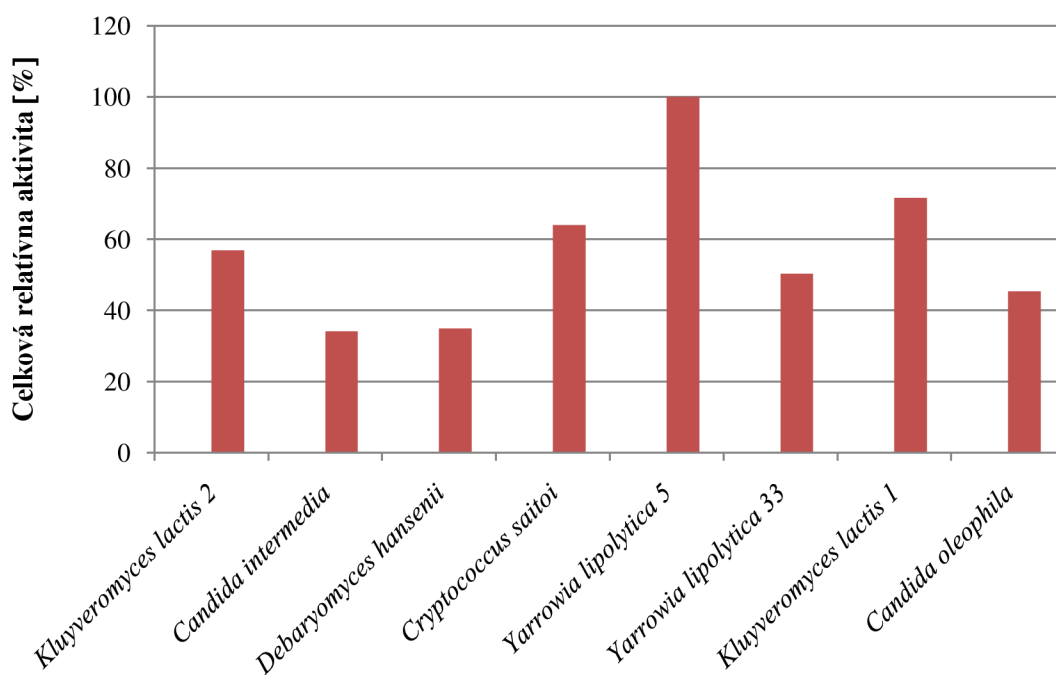
V prípade média s glukózou Graf 17 vyplýva, že najvyššiu celkovú relatívnu aktivitu opäť vykazuje kmeň *Yarrowia lipolytica* 33. Z Grafu 18 však vidieť, že prítomnosť slnečnicového oleja spôsobila zvýšenie celkovej relatívnej aktivity na 100 % u kmeňa *Yarrowia lipolytica* 5.

Celková relatívna aktivita enzýmov produkovaných v bazálnom médiu s detergentom je najvyššia u kmeňa *Yarrowia lipolytica* 5, Graf 19. V porovnaní s ostatnými kultivačnými médiami vykazovala *Kluyveromyces lactis* 2 najvyššiu relatívnu aktivitu (56,8 %) v bazálnom médiu s detergentom.





Graf 18: Celková relatívna aktivita testovaných kvasiniek v bazálnom médiu so snečnicovým olejom



Graf 19: Celková relatívna aktivita testovaných kvasiniek v bazálnom médiu s detergentom

5 ZÁVER

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo:

1. otestovať vybrané kmene kvasiniek na lipolytickú aktivitu,
2. otestovať vplyv rôzneho zloženia kultivačných médií na rast vybraných kvasiniek,
3. otestovať vybrané kvasinky na produkciu lipolytických enzýmov v prítomnosti médií s rôznym zložením.

Testované boli tieto kmene kvasiniek: *Yarrowia lipolytica* 5, *Yarrowia lipolytica* 33, *Kluyveromyces lactis* 1, *Kluyveromyces lactis* 2, *Cryptococcus saitoi*, *Candida intermedia*, *Candida oleophila* a *Debaryomyces hansenii*. Kultivované boli v 4 médiách a to v bazálnom médiu, v bazálnom médiu so slnečnicovým olejom, v bazálnom médiu s glukózou a bazálnom médiu s detergentom.

Vizuálne testovanie lipolytickej aktivity vybraných kmeňov kvasiniek pomocou platňovej kultivačnej metódy a roztoku síranu meďnatého preukázalo, že všetky testované kmene kvasiniek produkujú enzýmy s lipolytickou aktivitou.

Zo zostrojených rastových kriviek vybraných kvasiniek je zrejmé, že najvýraznejší nárast kvasiniek bol v prítomnosti bazálneho média s glukózou, až na kmene *Yarrowia lipolytica*, u ktorých je rast buniek stimulovaný aj prídavkom lipidového substrátu. Bazálne médium s detergentom malo inhibujúce účinky na rast kvasinky *Debaryomyces hansenii* a *Candida intermedia*. V médiu s detergentom u kvasinky *Cryptococcus saitoi* došlo i k posunu počiatku exponenciálnej fáze až do 24 hodiny kultivácie oproti ostatným médiám.

Bola testovaná lipolytická aktivita viazaná na bunku a taktiež extracelulárnych enzýmov produkovaných vybranými kvasinkami. Z vybraných kmeňov kvasiniek vykazovali najvyššiu lipolytickú aktivitu viazanú na bunku kmene *Yarrowia lipolytica* v médiu s prídavkom slnečnicového oleja oproti bazálnemu médiu, kde bola lipolytická aktivita veľmi nízka. I prídavok glukózy stimuloval najlepšie produkciu lipolytických enzýmov viazaných na bunku u *Yarrowia lipolytica* 33, porovnaním s bazálnym médiom. Najvyššie hodnoty celkovej relatívnej lipolytickej aktivity boli stanovené u kmeňov *Yarrowia lipolytica*, a to pri kultivácii v médiu s prídavkom glukózy a slnečnicového oleja.

6 ZOZNAM LITERATÚRY

- [1] ŠAJTER, Vít. Biofyzika, biochémia a rádiológia. Martin: Osveta, 2006. ISBN 80-806-3210-3.
- [2] TREICHEL, Helen, Débora DE OLIVEIRA, Marcio A. MAZUTTI, Marco DI LUCCIO a J. Vladimír OLIVEIRA. A Review on Microbial Lipases Production. *Food and Bioprocess Technology*. 2010,3(2), 182-196. DOI: 10.1007/s11947-009-0202-2. ISSN 1935-5130. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-009-0202-2>
- [3] HORÁKOVÁ, D., M. NĚMEC a M. SZOSTKOVÁ. *Laboratorní cvičení z fyziologie bakterii* [online]. Masarykova univerzita v Brně, 2003 [cit. 2016-02-12]. Dostupné z: http://is.muni.cz/elportal/estud/prif/ps06/3074288/Labor.cv.z_fyziol.bakterii_uprave_ne.pdf
- [4] JAEGER, Karl-Erich, Stéphane RANSAC, Bauke W. DIJKSTRA, Charles COLSON, Margreet HEUVEL a Onno MISSET. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 1994, 15(1), 29-63 [cit. 2016-02-29]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00121.x. ISSN 01686445. Dostupné z: <http://femsre.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00121.x>
- [5] REIS, P., K. HOLMBERG, H. WATZKE, M.E. LESER a R. MILLER. Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2009, 147-148, 237-250 [cit. 2016-02-29]. DOI: 10.1016/j.cis.2008.06.001. ISSN 00018686. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868608001000>
- [6] MARANGONI, A.G. Enzyme Kinetics of Lipolysis Revisited: The Role of Lipase Interfacial Binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1994, 200(3), 1321-1328 [cit. 2016-03-05]. DOI: 10.1006/bbrc.1994.1595. ISSN 0006291x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X84715956>
- [7] ZAKS, A. a A. M. KLIBANOV. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1985, 82(10), 3192-3196 [cit. 2016-03-12]. DOI: 10.1073/pnas.82.10.3192. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.82.10.3192>
- [8] GHOSH, P.K., R.K. SAXENA, R. GUPTA, R.P. YADAV a S. DAVIDSON. Microbial lipases: production and applications. *Science progress* [online]. 1996, 79(2), 119-157 [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/14377768_Microbial_lipases_production_and_applications_Sci_Prog

- [9] JANSSEN, Anja E.M., Birte J. SJURSNES, Alexander V. VAKUROV a Peter J. HALLING. Kinetics of lipase-catalyzed esterification in organic media: Correct model and solvent effects on parameters. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 1999, 24(8-9), 463-470 [cit. 2016-03-12]. DOI: 10.1016/S0141-0229(98)00134-3. ISSN 01410229. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022998001343>
- [10] STERGIOU, Panagiota-Yiolanda, Athanasios FOUKIS, Michalis FILIPPOU, et al. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnology Advances* [online]. 2013, 31(8), 1846-1859 [cit. 2016-03-12]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.08.006. ISSN 07349750. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975013001407>
- [11] RAJENDRAN, Aravindan, Anbumathi PALANISAMY a Viruthagiri THANGAVELU. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online]. 2009, 52(1), 207-219 [cit. 2016-03-13]. DOI: 10.1590/S1516-89132009000100026. ISSN 1516-8913. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext
- [12] GONZÁLEZ-SABÍN, Javier, Iván LAVANDERA, Francisca REBOLLEDO a Vicente GOTOR. Redesigning the mechanism of the lipase-catalysed aminolysis of esters. *Tetrahedron: Asymmetry* [online]. 2006, 17(8), 1264-1274 [cit. 2016-03-13]. DOI: 10.1016/j.tetasy.2006.04.021. ISSN 09574166. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0957416606002795>
- [13] KISHORE, J. Patil, Z. Chopda MANOJKUMAR a T. Mahajan RAGHUNATH. Lipase biodiversity. *Indian Journal of Science and Technology* [online]. 2011, 4(8), [cit. 2016-03-13]. DOI: 10.17485/ijst/2011/v4i8/30913. ISSN 0974- 6846. Dostupné z: <http://www.indjst.org/index.php/indjst/article/view/30913>
- [14] CAMACHO, Fernando, Alfonso ROBLES, Pedro A. GONZÁLEZ, Belén CAMACHO, Luis ESTEBAN a Emilio MOLINA. Mechanistic model for the lipase-catalyzed alcoholysis of triacylglycerols. *Applied Catalysis A: General* [online]. 2006, 301(2), 158-168 [cit. 2016-03-13]. DOI: 10.1016/j.apcata.2005.11.021. ISSN 0926860x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926860X05008884>
- [15] BORRELLI, Grazia a Daniela TRONO. Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2015, 16(9), 20774-20840 [cit. 2016-03-19]. DOI: 10.3390/ijms160920774. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/9/20774/>

- [16] SANTOS, Kádima C., Débora M.J. CASSIMIRO, Matheus H.M. AVELAR, Daniela B. HIRATA, Heizir F. DE CASTRO, Roberto FERNÁNDEZ-LAFUENTE a Adriano A.MENDES. Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. *Industrial Crops and Products* [online]. 2013, 49, 462-470 [cit. 2016-03-19]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.05.035. ISSN 09266690. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669013002859>
- [17] BARROS, M., L. F. FLEURI a G. A. MACEDO. Seedlipases: sources, applications and properties - a review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* [online]. 2010, 27(1), 15-29 [cit. 2016-03-20]. DOI: 10.1590/S0104-66322010000100002. ISSN 0104-6632. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext
- [18] PAHOJA, V.M a A. SETHAR . A Review of Enzymatic Properties of Lipase in Plants, Animals and Microorganisms. *Journal of Applied Sciences* [online]. 2002, 2(4), 474-484 [cit. 2016-05-07]. DOI: 10.3923/jas.2002.474.484. ISBN 10.3923/jas.2002.474.484. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=jas.2002.474.484>
- [19] SAXENA, R.K., P.K. GHOSH, R. GUPTA, W.S. DAVIDSON, S. BRADDOO a R. GULATI. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. *Fermentation - science and technology* [online]. 2012, 1(8), 88-92 [cit. 2016-03-22]. ISSN 2278-3202. Dostupné z: <http://www.isca.in/IJBS/Archive/v1i8/15.ISCA-IRJBS-2012-180.pdf>
- [20] VAKHLU, Jyoti a Avneet KOUR. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 2006, 9(1), 69-85 [cit. 2016-03-23]. DOI: 10.2225/vol9-issue1-fulltext-9. ISSN 07173458. Dostupné z: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue1/full/9/index.html>
- [21] SATYANARAYANA, T. T.B. JOHRI Microbial diversity: current perspectives and potential applications [online]. Reading: Paths, 2005 [cit. 2016-03-23]. ISBN 9788188237432.
- [22] SANGEETHA, R., I. ARULPANDI a A. GEETHA. Bacterial Lipases as Potential Industrial Biocatalysts: An Overview. *Research Journal of Microbiology* [online]. 2011-1-1, 6(1), 1-24 [cit. 2016-03-25]. DOI: 10.3923/jm.2011.1.24. ISSN 18164935. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=jm.2011.1.24>
- [23] GOPINATH, Subash C. B., Periasamy ANBU, Thangavel LAKSHMIPRIYA a Azariah HILDA. Strategies to Characterize Fungal Lipases for Applications in Medicine and Dairy Industry. *BioMed Research International* [online]. 2013, 2013, 1-10 [cit. 2016-03-25]. DOI: 10.1155/2013/154549. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/154549/>

- [24] VERMA, N., S. THAKUR a A.K. BHATT. Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties. *International Research Journal of Biological Sciences* [online]. 2012, 1(8), 88-92 [cit. 2016-03-26]. ISSN 2278-3202. Dostupné z: <http://www.isca.in/IJBS/Archive/v1i8/15.ISCA-IRJBS-2012-180.pdf>
- [25] LÓPEZ-LÓPEZ, Olalla, María-Esperanza CERDÁN a María-Isabel GONZÁLEZ-SISO. *Thermus thermophilus as a Source of Thermostable Lipolytic Enzymes* [online]. 2015,3(4), 792-808 [cit. 2016-03-30]. DOI: 10.3390/microorganisms3040792. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2076-2607/3/4/792/>
- [26] ANDUALEMA, Berhanu a Amare GESSESSE. Microbial Lipases and Their Industrial Applications: Review. *Biotechnology* [online]. 2012-3-1, 11(3), 100-118 [cit. 2016-03-31]. DOI: 10.3923/biotech.2012.100.118. ISSN 1682296x. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=biotech.2012.100.118>
- [27] HASAN, Fariha, Aamer Ali SHAH a Abdul HAMEED. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2006, 39(2), 235-251 [cit. 2016-03-31]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.016. ISSN 01410229. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022905004606>
- [28] GUPTA, R., N. GUPTA a P. RATHI. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2004-6-1, 64(6), 763-781 [cit. 2016-04-01]. DOI: 10.1007/s00253-004-1568-8. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-004-1568-8>
- [29] HU, Min, Yan LI, Eric Andrew DECKER a David Julian MCCLEMENTS. Role of calcium and calcium-binding agents on the lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model. *Food Hydrocolloids* [online]. 2010, 24(8), 719-725 [cit. 2016-04-02]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2010.03.010. ISSN 0268005x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X10000561>
- [30] BRÍGIDA, Ana I.S., Priscilla F.F. AMARAL, Maria A.Z. COELHO a Luciana R.B. GONCALVES. Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* [online]. 2014, 101, 148-158 [cit. 2016-04-03]. DOI: 10.1016/j.molcatb.2013.11.016. ISSN 13811177. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381117713003457>
- [31] FICKERS, P., J.M. NICAUD, C. GAILLARDIN, J. DESTAIN a P. THONART. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2004, 96(4), 742-749 [cit. 2016-04-03]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02190.x. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2004.02190.x>

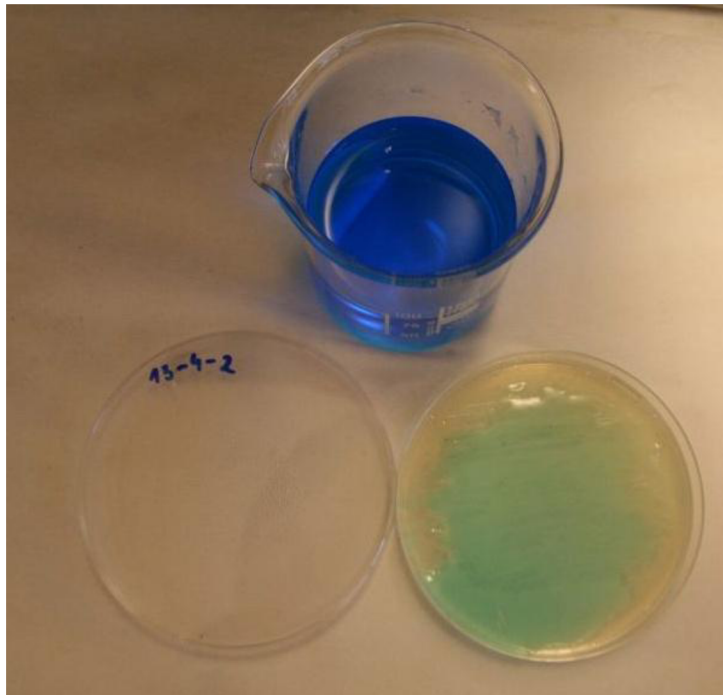
- [32] BREUER, Uta a Hauke HARMS. Debaryomyces hansenii — an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* [online]. 2006, 23(6), 415-437 [cit. 2016-04-05]. DOI: 10.1002/yea.1374. ISSN 0749-503x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/yea.1374>
- [33] KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. Bratislava: ALFA, 1990. ISBN 80-05-00644-6.
- [34] NĚMEC, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ. *Základy obecné mikrobiologie*. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-7923-6.
- [35] YÖNTEN, Vahap a Nahit AKTAS. Exploring the optimum conditions for maximizing the microbial growth of *Candida intermedia* by response surface methodology. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* [online]. 2013, 44(1), 26-39 [cit. 2016-04-08]. DOI: 10.1080/10826068.2013.782044. ISSN 1082-6068. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826068.2013.782044>
- [36] DAGBAGLI, Seval a Yekta GOKSUNGUR. Optimization of β -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 2008, 11(4), 0-0 [cit. 2016-04-08]. DOI: 10.2225/vol11-issue4-fulltext-12. ISSN 07173458. Dostupné z: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol11/issue4/full/12/index.html>
- [37] JAEGER, K. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology* [online]. 16(9), 396-403 [cit. 2016-04-09]. DOI: 10.1016/S0167-7799(98)01195-0. ISSN 01677799. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779998011950>
- [38] ABHIJIT, Ray. Application of Lipase in Industry. *Asian Pharma Press* [online]. 2012, 2(2), 33-37 [cit. 2016-04-11]. ISSN 2231-5713. Dostupné z: http://www.asianpharmaonline.org/ajpt/1_ajpt_2_2_2012.pdf
- [39] HASAN, Fariha, SHAH a Sundus JAVED. Enzymes used in detergents: Lipases. *African Journal of Biotechnology* [online]. 2010, 9(31), 4836-4844 [cit. 2016-04-13]. DOI: 10.5897/AJBx09.026. Dostupné z: http://www.academicjournals.org/article/article1380713950_Hasan%20et%20al.pdf
- [40] HOGG, Stuart. *Essential Microbiology* [online]. 2005. John Wiley & Sons Ltd [cit. 2016-05-07]. ISBN 0-471-49753-3. Dostupné z: http://www.grsmu.by/files/file/university/cafedry/microbiologii-virysologii-immunologii/files/essential_microbiology.pdf

- [41] CORZO, Gerardo, Sergio REVAH, C. GAILLARDIN, J. DESTAIN a P. THONART. *Production and characteristics of the lipase from Yarrowia lipolytica 681* [online]. [cit. 2016-05-07]. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00024-3. ISBN 10.1016/S0960-8524(99)00024-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852499000243>

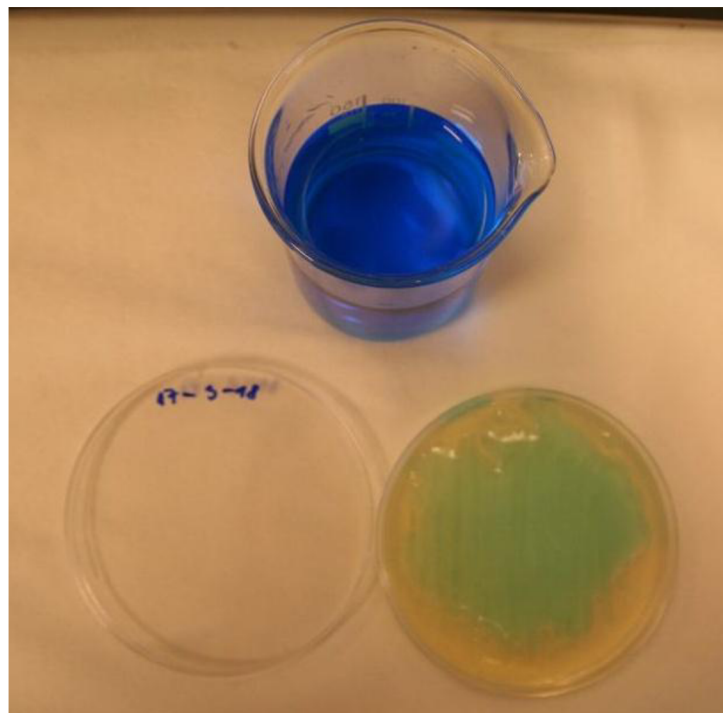
7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

BM	bazálne médiu
BM+G	bazálne médium s glukózou
BM+D	bazálne médium s detergentom
BM+SO	bazálne médium so slnečnicovým olejom
Ser	Serín
Asp	Kyselina asparágová
Glu	Kyselina glutámová
Gly	Glycín
His	Histidín
Leu	Leucín
resp.	respektíve

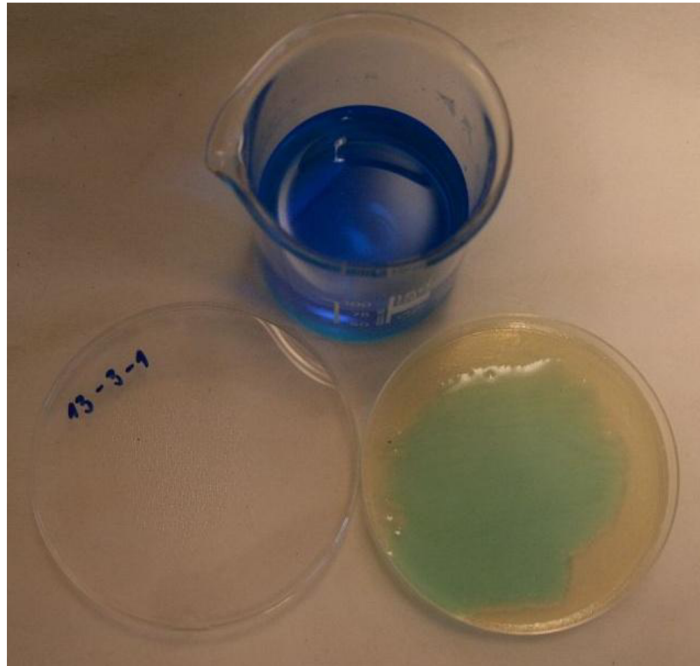
8 PRÍLOHA



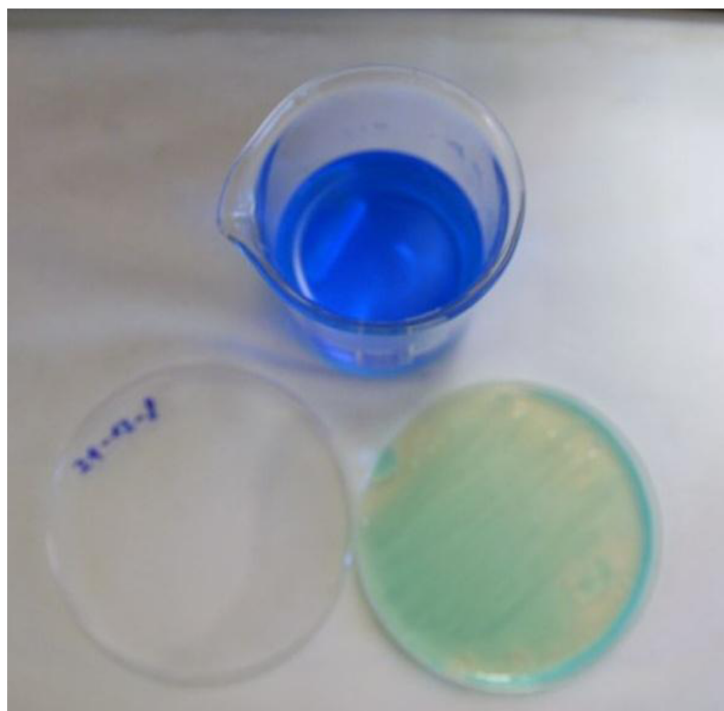
Obrázok 5: Testovanie lipolytickej aktivity u kvasinky *Kluyveromyces lactis* 2



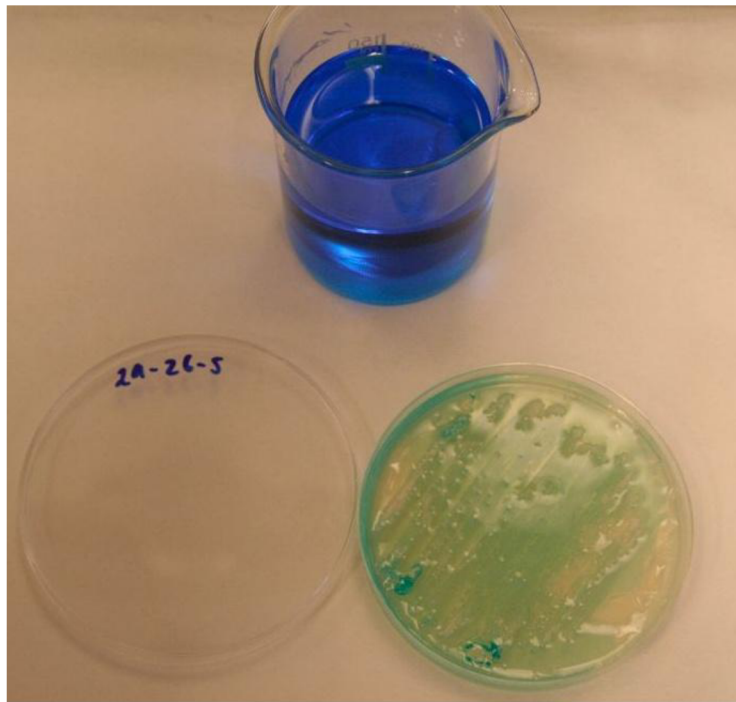
Obrázok 6: Testovanie lipolytickej aktivity u kvasinky *Cryptococcus saitoi*



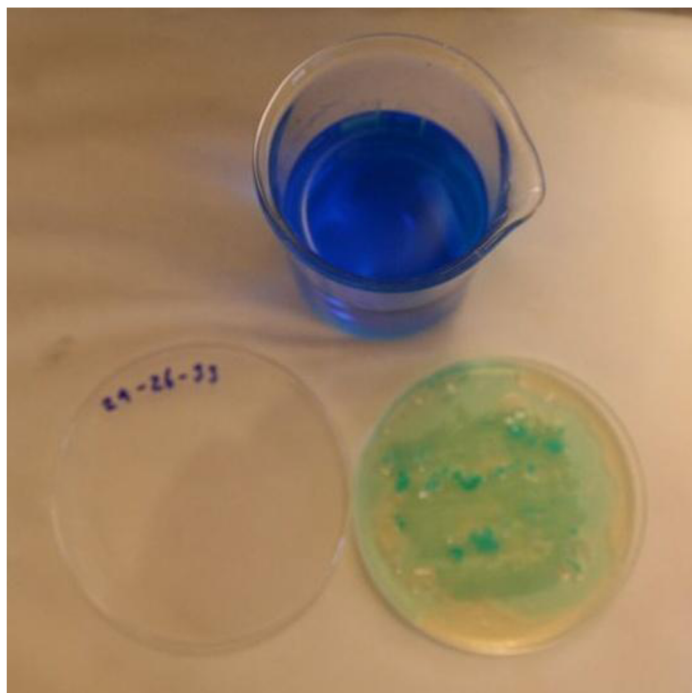
Obrázok 7: Testovanie lipolytickej aktivity u kvasinky *Kluyveromyces lactis* 1



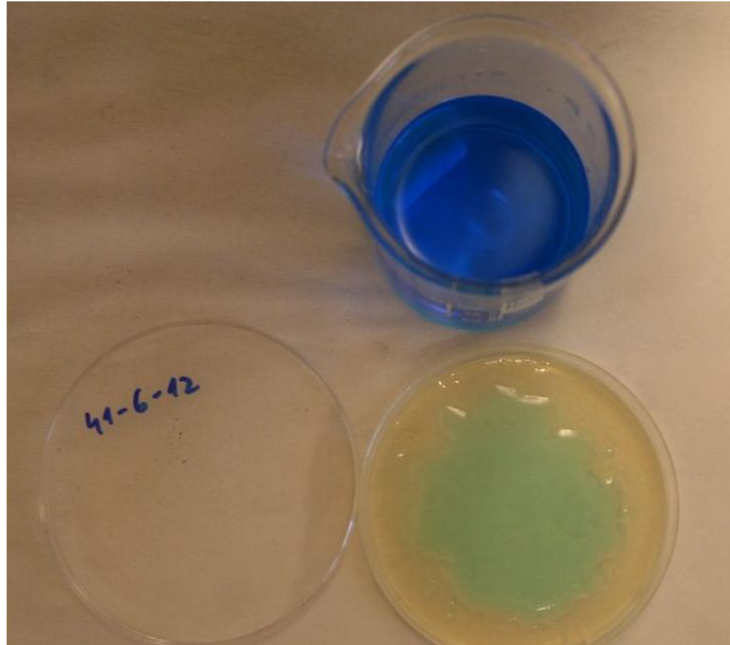
Obrázok 8: Testovanie lipolytickej aktivity u kvasinky *Candida intermedia*



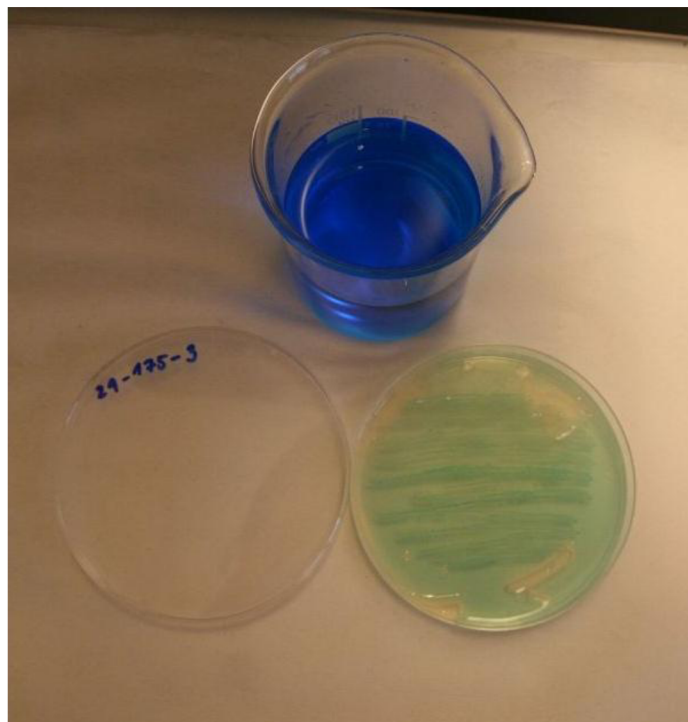
Obrázok 9: Testovanie lipolytickej aktivity u kvasinky *Yarrowia lipolytica* 5



Obrázok 10: Testovanie lipolytickej aktivity u kvasinky *Yarrowia lipolytica* 33



Obrázok 11: Testovanie lipolytickej aktivity u kvasinky *Debaryomyces hansenii*



Obrázok 12: Testovanie lipolytickej aktivity u kvasinky *Candida oleophila*