

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Marie Šmardová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Transformace lipidů na mastné kyseliny nejen pomocí enzymatické katalýzy
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Marie Šmardová**
Osobní číslo: **C21273**
Studijní program: **B0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Transformace lipidů na mastné kyseliny nejen pomocí enzymatické katalýzy**
Téma práce anglicky: **Transformation of Lipids into Fatty Acids not Only by Enzymatic Catalysis**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

V rámci teoretické části zpracujte informace o lipidech a fosfolipidech – výskyt, vlastnosti, chemické složení a dělení podle různých hledisek. Zaměřte se na různé způsoby přeměny fosfolipidů na mastné kyseliny. Popište možnosti enzymatické katalýzy včetně imobilizace.
V rámci experimentální části proveďte přeměnu olejů s různým množstvím fosfolipidů pomocí několika způsobů a výsledky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

recentní vědecká literatura, publikace z databáze WOS, PubMed, Sciencedirect apod. Dále dle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Martin Hájek, Ph.D.**
Katedra fyzikální chemie
Konzultant bakalářské práce: **doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem *Transformace lipidů na mastné kyseliny nejen pomocí enzymatické katalýzy* jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 27. 6. 2024

Marie Šmardová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Martinu Hájkovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce a doc. RNDr. Lucii Korecké, Ph.D., bez které by nebyla možná práce s enzymy. Děkuji za jejich trpělivost, ochotu, cenné rady, inspiraci a za jejich čas, který mi věnovali. Také bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomohli s experimentální částí a získáváním dat. Nakonec děkuji své rodině za jejich podporu a trpělivost během celého mého studia.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá přeměnou volných mastných kyselin (VMK) z rostlinných olejů s obsahem fosfolipidů pomocí homogenní a enzymatické katalýzy. Teoretická část popisuje vlastnosti a využití lipidů (zejména triacylglycerolů a fosfolipidů) a možnosti jejich přeměny na mastné kyseliny včetně jejich vlastností a využití. V rámci experimentální práce bylo provedeno zmýdelnění rostlinného oleje a fosfolipidu a pak jejich neutralizace na VMK, což bylo potvrzeno vysokým číslem kyselosti. V případě enzymatické katalýzy byla pro přeměnu fosfolipidu využita fosfolipáza A1 z *Aspergillus oryzae* imobilizované na magnetických částicích makroporézní perlové celulózy. Součástí práce byla optimalizace reakčních podmínek pro solubilní fosfolipázu a ověření hydrolytické aktivity solubilní a imobilizované fosfolipázy. Produkt reakce byl analyzován pomocí infračervené a Rammanovy spektrometrie, kde byly sledovány funkční skupiny vzniklé hydrolytickým štěpením.

KLÍČOVÁ SLOVA

enzymatická katalýza, lipidy, enzymy, fosfolipázy, imobilizace, hydrolyza

Transformation of Lipids into Fatty Acids not Only by Enzymatic Catalysis

ANNOTATION

This bachelor's thesis focuses on transformation of free fatty acids (FFA) from plant oils with addition of phospholipids via homogenic and enzymatic catalysis. The theoretical part describes properties and utilization of lipids (mainly triacylglycerols and phospholipids) and possibilities of their transformation into fatty acids, including their properties and utilization. As part of the experiment plant oil was saponified and then neutralized to FFA, which was confirmed by a high acidity number. In the case of enzymatic catalysis, phospholipase A1 from *Aspergillus oryzae* immobilized on magnetic nanoparticles of macroporous pearl cellulose was used for the transformation of phospholipid. Part of this thesis is the optimization of the reaction conditions for soluble enzyme and the verification of the hydrolytic activity of soluble and immobilized phospholipase. The product of the reaction was analyzed using infrared and Ramman spectrometry, where individual functional groups formed by hydrolysis were monitored.

KEYWORDS

enzymatic catalysis, lipids, enzymes, phospholipases, immobilization, hydrolysis

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
ÚVOD.....	12
1 TEORETICKÁ ČÁST	13
1.1 Lipidy.....	13
1.1.1 Triacylglyceroly.....	13
1.1.2 Fosfolipidy	14
1.1.3 Využití a získávání lipidů	15
1.1.4 Mastné kyseliny	16
1.1.5 Získávání mastných kyselin z olejů	18
1.1.6 Využití mastných kyselin	20
1.2 Fosfolipázy	20
1.2.1 Klasifikace fosfolipáz	21
1.2.2 Fosfolipáza A1	22
1.2.3 Využití fosfolipáz	23
1.2.4 Enzymatická přeměna olejů na mastné kyseliny	23
1.2.5 Aktivita enzymu.....	24
1.3 Použité analytické metody	26
1.3.1 Tuková čísla.....	26
1.3.2 UV-Vis spektroskopie	26
1.3.3 Infračervená a Rammanova spektroskopie	27
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
2.1 Chemikálie a materiály	28
2.2 Alkalická hydrolyza.....	29
2.3 Enzymatická katalýza	31

2.4 Analýza reakčních produktů hydrolýzy metodou FT-IR.....	32
3 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	33
3.1 Alkalická hydrolýza.....	33
3.2 Enzymatická katalýza	35
3.2.1 Závislost aktivity fosfolipázy na teplotě.....	35
3.2.2 Závislost aktivity fosfolipázy na pH.....	36
3.2.3 Výsledek enzymatické hydrolýzy fosfolipidů	38
4 ZÁVĚR.....	40
Citovaná literatura.....	41

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1: Třídy fosfolipidů	14
Obrázek 2: cis a trans konfigurace mastné kyseliny.....	18
Obrázek 3: Alkalická hydrolýza triacylglycerolu	19
Obrázek 4: Závislost aktivity fosfolipázy a nescifické esterázy na koncentraci substrátu ...	21
Obrázek 5: Místa hydrolytického štěpení fosfolipáz	21
Obrázek 6: Schéma reakce katalyzované enzymem	25
Obrázek 7: Aparatura pro zmýdelnění.....	30
Obrázek 8: IČ spektrum volných mastných kyselin	34
Obrázek 9: Ramanovo spektrum řepkového oleje a volných mastných kyselin	35
Obrázek 10: Teplotní optimum aktivity solubilní fosfolipázy v 50 minutě	36
Obrázek 11: pH optimum aktivity solubilní fosfolipázy v čase 50 minut.....	37
Obrázek 12: Aktivita solubilní fosfolipázy v čase při 30 °C a 50 °C	37
Obrázek 13: IČ spektrum vzorků odebraných po hydrolytické reakci	38
Obrázek 14: IČ spektrum vzorků odebraných po hydrolytické reakci po odečtení spektra ethanolu.....	39
Tabulka 1: Dělení lipidů podle jejich struktury	13
Tabulka 2: Příklady běžných nasycených a nenasycených mastných kyselin.....	17
Tabulka 3: Základní omega-3 a omega-6 mastné kyseliny	20
Tabulka 4: Přehled výhod a nevýhod pro různé druhy hydrolýzy.....	24
Tabulka 5: Navážky výchozích látek pro zmýdelnění.....	29
Tabulka 6: Navážky směsí a spotřeba KOH.....	30
Tabulka 7: Vypočítané hodnoty čísla kyselosti	33

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ATR	Zeslabená úplná reflektance (Attenuated total reflectance)
CMC	Kritická micelární koncentrace (Critical micelar concentration)
CRL	<i>Candida rugosa</i> lipáza
ČK	Číslo kyselosti
FT-IR	Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (Fourier transformation Infrared spektrometry)
IČ	Infračervené
NPB	p-nitrofenylbutyrát
PA	Kyselina fosfatidová
PC	Fosfatidylcholin
PL	Fosfolipidy
PLA	Fosfolipáza A
PS	Fosfatidylserin
Lyso-PL	Lysofosfolipid
UV	Ultrafialové
Vis	Viditelné světlo
VMK	Volné mastné kyseliny

ÚVOD

Lipidy jsou důležité přírodní látky, jsou součástí všech živých organismů. Poskytují zásobu energie u živočichů i rostlin a jsou důležitou složkou buněčné stěny. Lipidy jsou látky hydrofobní povahy nerozpustné ve vodě. Z chemického hlediska jsou to estery vyšších mastných kyselin a alkoholů. Transformace lipidů na mastné kyseliny je zásadní nejen pro porozumění základním biologickým procesům, ale také pro vývoj nových technologií v oblasti biopaliv, farmaceutik a potravinářských aditiv.

Homogenní a enzymatická katalýza představují dvě metody, které mohou být využity k transformaci lipidů. Homogenní katalýza, která zahrnuje použití rozpustných katalyzátorů, umožňuje přesnou kontrolu reakčních podmínek a často vede k vysokým výtěžkům. Na druhé straně enzymatická katalýza využívá biokatalyzátorů, v tomto případě lipázy a fosfolipázy, které specificky rozkládají lipidy a fosfolipidy na mastné kyseliny a glycerol. Tento přístup je ekologičtější a energeticky účinnější, což z něj činí atraktivní alternativu k tradičním chemickým metodám.

Cílem této práce bylo porovnat účinnost a výtěžnost přeměny fosfolipidů na mastné kyseliny pomocí homogenní chemické a heterogenní enzymatické katalýzy. Porovnání těchto dvou metod může poskytnout bližší informace pro jejich využití v průmyslových aplikacích. Práce se zaměřuje na teoretické základy obou typů katalýzy, experimentální postupy a analýzu výsledků, které by mohly přispět k optimalizaci výrobních procesů a k udržitelnějším technologickým řešením.

Význam tohoto výzkumu spočívá nejen ve stanovení hydrolytického působení enzymu fosfolipázy A1, ale také k jejímu praktickému využití, které může vést k inovacím v různých průmyslových odvětvích. Vzhledem k rostoucí poptávce po obnovitelných zdrojích energie a ekologicky šetrných materiálech je zkoumání efektivních metod transformace fosfolipidů na mastné kyseliny aktuální a relevantní.

Tato práce má za cíl otestovat ovlivnění výtěžku homogenní katalýzy přidávkem fosfolipidů k oleji a využití imobilizované fosfolipázy A1 pro jejich štěpení na mastné kyseliny.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Lipidy

Lipidy se vyskytují v celém živém světě, ve všech typech buněk a jsou významnou složkou buněčné struktury. Slouží jako zásoba energie u živočichů v podobě podkožního tuku a u rostlin ve formě rostlinných olejů a účastní se mnoha buněčných procesů jako je transkripce genů [1]. Lipidy jsou látky charakteristické nerozpustností ve vodě naopak jsou rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Mají přesně definovanou strukturu a řadí se mezi nízkomolekulární látky [2]. Lipidy je možné dělit na základě několika hledisek, nejběžnějším je dělení podle jejich struktury (Tabulka 1).

Tabulka 1: Dělení lipidů podle jejich struktury. [1; 3]

jednoduché	acylglyceroly	nasycené (tuky) nenasycené (oleje)
	vosky isoprenoidy	
složené		sfingolipidy glykolipidy lipoproteiny fosfolipidy
odvozené		steroidy karotenoidy a lipofilní vitaminy

Dále je možné je dělit podle jejich polaritě na polární a neutrální. Neutrální lipidy jsou látky skládající se z mastných kyselin, alkoholů, glyceridů a sterolů. Polární lipidy obsahují glycerofosfolipidy a glyceroglykolipidy. Lipidy se také mohou dělit na zmýdelnitelné a nezmýdelnitelné. Pokud z nich lze alkalickou hydrolyzou uvolnit soli mastných kyselin, pak se řadí mezi zmýdelnitelné. Jsou to především neutrální lipidy a polární lipidy na bázi glycerolu nebo sfingosinu, obsahují acylové zbytky vázané esterovou nebo amidovou vazbou. Zástupcem skupiny nezmýdelnitelných lipidů jsou zejména isoprenoidy [3].

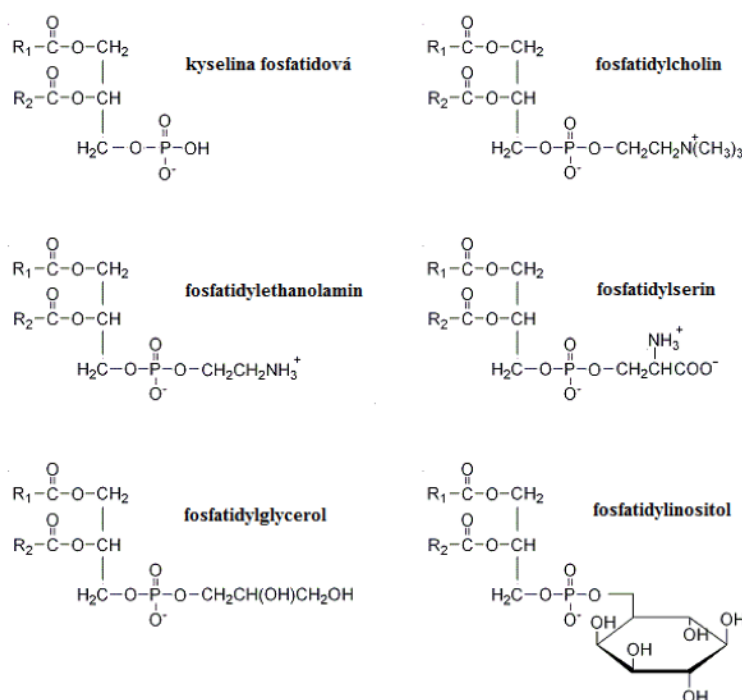
1.1.1 Triacylglyceroly

Triacylglyceroly jsou tvořeny třemi molekulami mastných kyselin a jednou molekulou glycerolu a jsou hlavní složkou všech olejů a tuků [2]. Kvůli symetrické struktuře molekuly glycerolu existují dvě identické vnější polohy a jedna středová, kam se mohou esterifikovat mastné kyseliny [4]. Jejich syntéza a odbourávání v organismu jsou řízeny hormonálně [3]. Oleje jsou kapalného skupenství a ve struktuře mají výraznější zastoupení nenasycených

mastných kyselin oproti nasyceným, získávají se lisováním nejčastěji semen rostlin [2]. Tuky jsou obsaženy v buňkách tukové tkáně a u živočichů jsou významnou zásobárnou energie [3]. Jsou skupenství pevného a jejich struktura je tvořena přibližně stejným podílem nasycených i nenasycených mastných kyselin. Jejich původ je převážně živočišný a získávají se extrakcí nebo vyškvařováním [2].

1.1.2 Fosfolipidy

Fosfolipidy (PL) se řadí do skupiny složených lipidů a jsou základním stavebním prvkem buněčných membrán všech živých organismů. Skládají se z glycerolu a dvou řetězců vyšších mastných kyselin vázaných esterovou vazbou, na třetím uhlíkovém atomu nesou zbytek kyseliny fosforečné, ke které je připojena jedna ze čtyř různých bazických skupin (cholin, ethanolamin, serin nebo inositol), od kterého je odvozen jejich název (Obrázek 1) [5].



Obrázek 1: Třídy fosfolipidů, Převzato [6]

Nejjednodušším zástupcem fosfolipidů je kyselina fosfatidová (PA), nachází se v malém množství v rostlinných tkáních. V buňkách je důležitá jako meziproduct jejich biosyntézy. Nejrozšířenějšími fosfolipidy jsou fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylinositol a fosfatidylglycerol [5]. Sfingomyelin je sfingolipidový analog fosfatidylcholinu (PC), který se skládá z ceramidové jednotky s PC skupinou připojenou k pozici sn-1 a je všudypřítomnou součástí plazmatické membrány živočišných buněk. Podtřídou fosfolipidů, která je definována vinyl etherovou vazbou a tvoří přibližně 18 % hmoty PL, jsou plasmogeny. Nejvyšší podíl

plasmogenu je ve třídě fosfatidylethanolaminu, poněkud menší množství je obsaženo ve PC a v ostatních fosfolipidech je obvykle obsah minimální nebo žádný [7].

Většina fosfatidylglycerolu se nachází v chloroplastech rostlinných buněk. Ostatní fosfolipidy jsou obsaženy v mitochondriích rostlinných buněk a v plazmatické membráně. V rostlinných fosfolipidech se nachází řada různých mastných kyselin. Fosfolipidy se vyskytují ve všech biologických membránách [5]. Většina syntézy PL probíhá v endoplazmatickém retikulu jater, kde se spojují s jinými lipidy a proteiny a výsledné lipoproteiny jsou uvolňovány do krevního řečiště. Složení mastných kyselin PL významně přispívá k fyzikálním a biochemickým vlastnostem membrán. Membránové PL jsou v neustálém procesu degradace a resyntézy. V buněčných membránách je převládajícím fosfolipidem fosfatidylcholin [7].

1.1.3 Využití a získávání lipidů

Využití lipidů je velmi široké. Nejdůležitějším trhem pro oleje je potravinářský průmysl a průmysl detergentů se spotřebou až 60 % vyrobených derivátů.

Lipidy jsou v potravě zcela nenahraditelná základní složka, jsou nejvydatnějším zdrojem energie. Jejich energetická hodnota je v porovnání se sacharidy asi dvakrát vyšší. Jsou nositeli vitamínů rozpustných v tucích a při nadbytku se ukládají v podkoží, kde působí jako tepelný izolátor. Pro získání olejů ze semen nebo olejnatých plodů je za potřebí chemických nebo mechanických operací, které povedou ke zlepšení výtěžku a kvality získaného oleje. Pokud se při procesu využívá pouze mechanických operací (tlak), lze oleje označit jako panenské. U většiny olejů po lisování následuje krok extrakce rozpouštědlem. U některých semen s nízkým obsahem oleje, jako je sója, není krok mechanického tlaku nutný. Oleje vyrobené extrakcí rozpouštědlem musí být následně rafinovány. Olejnatá semena musí být skladována po co nejkratší dobu v dobrých podmínkách, aby bylo možné zaručit kvalitu oleje a nedocházelo k hydrolyze nebo oxidaci semen. Tepelná úprava ovlivňuje vzhled oleje a obsah fosfolipidů, lisování za studena podporuje extrakci triacylglycerolů tím, že potlačuje extrakci fosfolipidů. Cílem rafinace je zachovat nebo zlepšit organoleptické vlastnosti (chuť, vůně, čírost), nutriční vlastnosti a stabilitu tukových látek [8].

Dalším důležitým využitím je výroba biopaliv, kde je nutná chemická modifikace vzhledem k odlišnosti od ostatních palivových vlastností, zejména snížení jejich viskozity. Rostlinné oleje jsou vysoce viskózní a mají nízkou těkavost [8]. Z rostlinných surovin je z hlediska množství nejdůležitějším olejem řepkový. O dalším využití olejů rozhoduje složení mastných kyselin obsažených v oleji [9].

Použití rostlinných olejů je časté i v kosmetice. Ochraňují a zvlhčují pokožku díky afinitě mezi lipidy kůže a přírodními lipidy. Rostlinné oleje plní v kosmetice několik funkcí jako změkčovadla, základ pro další složky, nebo transportní funkci pro přenos biologicky aktivních látek přes lipidovou bariéru pokožky [10]. Zvláště vhodné pro zpracování na kosmetiku jsou kokosové oleje a laurové oleje, které mají vysoký podíl mastných kyselin s krátkým nebo středně dlouhým řetězcem [9].

Rostlinné oleje jsou obnovitelné, zcela biologicky odbouratelné a netoxické. Proto se jejich využití rozšiřuje i do výroby rozpouštědel a maziv [8]. Palmový, sójový, řepkový a slunečnicový olej společně s živočišnými tuky obsahují především mastné kyseliny s dlouhým řetězcem a využívají se jako suroviny pro maziva [9].

Fosfolipidy jsou důležitými složkami v potravinářském průmyslu [11], lékařství [12] nebo v biotechnologických a kosmetických aplikacích [13]. Komerčně dostupné PL jsou získávány ze surových sójových bobů, slunečnicového oleje nebo vaječného žloutku. Obecný postup pro získání lecitinu obvykle zahrnuje hydrataci fosfatidů, separaci lecitinového kalu a sušení kalu [14]. Jejich povrchová aktivita umožňuje jejich využití jako emulgátory v mnoha potravinářských výrobcích. PL se přidávají do práškových nebo granulových produktů jako smáčedla například napomáhají snadnému rozptýlení kakaového prášku ve vodě. Ve spojení s pšeničným lepem mohou fosfolipidy zlepšovat pružnost těsta a fermentační toleranci [11]. PL v kosmetice se využívají jako emulgátory a pro zlepšení produktu při průniku do kůže, protože jsou to biologicky snadno odbouratelné přírodní složky. Fosfolipidy také podporují kožní bariéru, udržují pokožku ve zdravém stavu a napomáhají pro snadné rozčesávání vlasů a snižují jejich elektrostatický náboj [13].

1.1.4 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny je společný název pro skupinu alifatických monokarboxylových kyselin a lze je získat hydrolýzou zmýdelnitelných přírodních lipidů. Ty, které obsahují více než deset uhlíkových atomů v řetězci, se označují jako vyšší mastné kyseliny. Mastné kyseliny v přírodě téměř neexistují jako volné karboxylové kyseliny kvůli jejich výrazné afinitě k proteinům. Živočichové a rostliny syntetizují mastné kyseliny nenasycené i nasycené, téměř vždy nerozvětvené a se sudým počtem atomů uhlíku. Nerozvětvené mastné kyseliny se označují dvojcíslím v podobě ($m:n$), kde m odpovídá celkovému počtu atomů uhlíku v molekule a n vyjadřuje počet dvojných vazeb. V přírodních nenasycených mastných kyselinách se dvojně vazby vyskytují vždy v konfiguraci *cis* a mohou jich mít až 6 [3]. Kvůli nepřetržitému

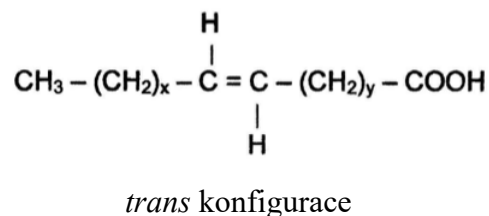
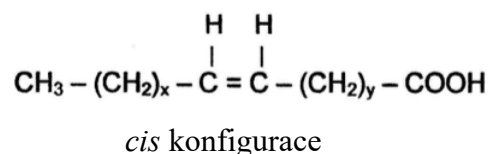
tepelnému pohybu v živých systémech a volné rotaci kolem uhlíkových vazeb jsou mastné kyseliny schopny zaujmout značné množství různých konfigurací, ale průměrně připomínají prodloužený rovný řetězec [15]. Příklady nasycených a nenasycených mastných kyselin se nacházejí v Tabulce 2.

Tabulka 2: Příklady běžných nasycených a nenasycených mastných kyselin [3; 16]

	Název kyseliny	počet C: počet dvojných vazeb
nasycené	laurová	12:0
	myristová	14:0
	palmitová	16:0
	stearová	18:0
	palmitolejová	16:1
nenasycené	olejová	18:1
	linolová	18:2
	linolenová	18:3

Všechny nasycené mastné kyseliny mají nevětvený řetězec a neobsahují žádnou dvojnou vazbu. Velké množství nasycených mastných kyselin je zejména v živočišných tucích, ale vyskytují se také v palmovém a kokosovém oleji. Nasycené mastné kyseliny jsou méně náchylné k oxidaci na rozdíl od nenasycených [16].

Monoenové nenasycené mastné kyseliny jsou charakteristické přítomností jedné dvojně vazby mezi atomy uhlíků. Přítomnost dvojně vazby zapříčiňuje omezení v pohybu acylového řetězce. Kolem dvojně vazby vznikají *cis* a *trans* konfigurace (Obrázek 2). Nejběžněji mají dvojnou vazbu s *cis* konfigurací nejčastěji začínající na devátém uhlíku (počítáno od karboxylového konce). *Cis* formy jsou termodynamicky více stabilní než *trans*. *Trans* izomery se v přírodě nevyskytují, ale vznikají zahřátím oleje na vysokou teplotu. *Cis* konfigurace způsobuje zlom do průměrného tvaru molekuly, zatímco *trans* konfigurace zajišťuje mastné kyselině vlastnosti bližší nasyceným kyselinám s ekvivalentní délkou řetězce [15]. Nejrozšířenější nenasycenou mastnou kyselinou je kyselina olejová, která je složkou téměř všech triacylglycerolů obsažených v přírodních tucích a olejích [3].



Obrázek 2: *cis* a *trans* konfigurace mastné kyseliny

Dienové kyseliny jsou odvozené od kyselin monoenoových a obsahují dvě dvojně vazby [15]. Nejrozšířenější dienovou mastnou kyselinou je kyselina linolová [3].

Esenciální mastné kyseliny, kyselina linolová a kyselina linolenová jsou polynenasycené mastné kyseliny, z nichž některé mají alespoň dvě dvojně vazby uhlík-uhlík v hydrofobním uhlovodíkovém řetězci [1]. Například kyselina linolová má osmnáct atomů uhlíku a dvě dvojně vazby na uhlících č. 9 a 12 (od karboxylového konce), její označení se pak zapisuje (18:2). Esenciální mastné kyseliny jsou pro člověka nezbytné a volně dostupné ve stravě. Pro získání jejich plných výhod musí být metabolizovány na jejich příslušné metabolity s dlouhým řetězcem. Esenciální mastné kyseliny a jejich deriváty mají různé biologické účinky a jsou zapojeny do fyziologických a patologických procesů [1].

1.1.5 Získávání mastných kyselin z olejů

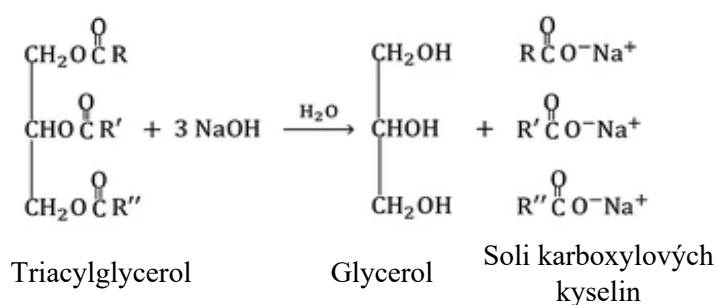
Většina mastných kyselin se přirozeně vyskytuje v podobě triacylglycerolů v rostlinných a živočišných materiálech, ze kterých jsou získávány. Nejprve musí být provedeny kroky zpracování pro získání požadovaných triacylglycerolů, které se dále hydrolyzují, aby došlo k oddělení mastných kyselin od glycerolu.

Tradiční zpracování lze rozdělit do čtyř kroků: regeneraci, rafinaci, konverzi a stabilizaci oleje. Regenerace zahrnuje mechanické lisování nebo extrakci rozpouštědlem, aby došlo k oddělení surového oleje nebo tuku od jiných složek jako jsou sacharidy a bílkoviny. Výsledný olej nebo tuk se následně rafinuje, aby se odstranily nežádoucí složky. Poté může být olej nebo tuk modifikován pomocí hydrogenace, winterizace (krystalizace tuhých podílů oleje), krystalizace nebo interesterifikace, aby došlo ke změně jejich fyzikálních vlastností. Finálním krokem je stabilizace, která zajistí, že olej nebo tuk je ve správné krystalové formě, aby splňoval požadované funkce a stabilitu [17].

Hydrolýza rostlinných olejů a tuků je endotermická reakce. S rostoucí teplotou se stupeň hydrolýzy zvyšuje a při vysokých teplotách a tlacích se také zvyšuje mísitelnost vody s lipidem. Tímto se zvyšuje rychlost hydrolytické reakce [18]. Hydrolytické reakce mohou probíhat v kyselém nebo alkalickém prostředí, o alkalické hydrolýze můžeme mluvit také jako o saponifikaci neboli zmýdelnění.

Jedním z prvních průmyslově využívaných procesů byl Twitchellův proces. Probíhal za použití Twitchellova činidla, které bylo směsí kyseliny olejové, kyseliny sírové a naftalenu, při teplotě varu vody a atmosférickém tlaku za použití páry. Tento proces se přestal používat vzhledem k jeho časové náročnosti (36-48 hodin) a používání silných kyselin. V současné době se masné kyseliny komerčně získávají reakcí rostlinných olejů a živočišných tuků s přehřátou párou. Reakce se obvykle provádí při teplotě 100-260 °C a tlaku 100-7000 kPa za použití 0,4-1,5 hm.% poměru vody k oleji. Pro štěpení tuků se používá vsádkový autoklávový proces. Dochází k produkci směsi volných mastných kyselin a celý proces trvá pouze 6-10 hodin. Reakce probíhá rychleji díky provozu při vysokém tlaku. Hlavní nevýhodou je potřeba destilační jednotky pro čištění vzniklých volných mastných kyselin a vysoká spotřeba páry [17; 19; 20].

Přeměna triacylglycerolů na karboxylové kyseliny pomocí silného hydroxidu (hydroxid draselný nebo sodný ve vodě) je velmi běžným způsobem získávání mastných kyselin. Během alkalické hydrolýzy jsou hydrolyzovány esterové vazby mezi glycerolem a mastnými kyselinami za vzniku sodných nebo draselných solí mastných kyselin v podobě mýdel (Obrázek 3). Mechanismus reakce probíhá prostřednictvím kroků, kdy prvně dojde k přechodu triacylglycerolu na diacylglycerol a poté na monoacylglycerol, přičemž nakonec zůstane volný glycerol. Hydrolýza centrálního esteru je zvýhodněna, takže dva externí estery jsou hydrolyzovány až po centrálním. Tradiční alkalická hydrolýza olejů nebo tuků se typicky provádí ve vodní lázni s přidáním alkalického vodného roztoku. Reakce vyžaduje stálé míchání a zahřátí [21].



Obrázek 3: Alkalická hydrolýza triacylglycerolu, Převzato a upraveno [21]

1.1.6 Využití mastných kyselin

Vzhledem k jejich strukturní rozmanitosti jsou mastné kyseliny široce využívány jako suroviny pro potravinářské aplikace, kosmetický průmysl a oleochemický průmysl [17]. Také biopaliva založena na mastných kyselinách a jejich derivátech jsou zajímavým tématem pro průmysl pro výrobu ekologicky šetrnějších biopalivových sloučenin [22].

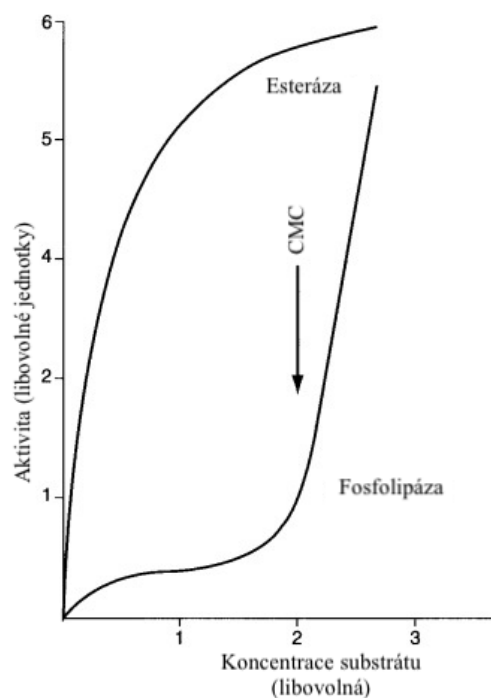
Mastné kyseliny a jejich deriváty jsou důležitými složkami kosmetických produktů [17]. V kosmetice mají využití zejména polynenasycené mastné kyseliny. Omega-3 a omega-6 mastné kyseliny (Tabulka 3) udržují pokožku pružnou a hydratovanou. Omega-3 kyseliny mají protizánětlivé vlastnosti a omega-6 pomáhají posilovat kožní bariéru a chrání ji před vnějšími vlivy [23].

Tabulka 3: Základní omega-3 a omega-6 mastné kyseliny [23]

Omega-3	Omega-6
Kyselina α -linolenová 18:3	Kyselina linolenová 18:2
Kyselina eikosapentaenová 20:5	Kyselina γ -linolenová 18:3
Kyselina dokosahexaenová 22:6	Kyselina arachidonová 20:4

1.2 Fosfolipázy

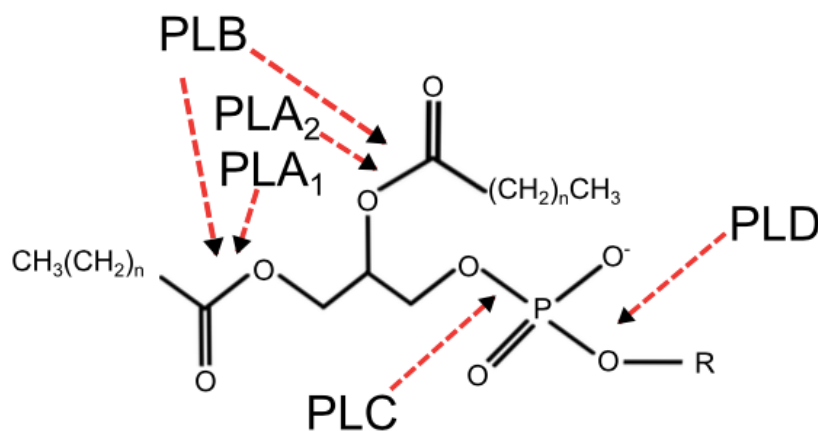
Vedle získávání mastných kyselin chemickou hydrolýzou, lze využít i hydrolýzu pomocí enzymů, fosfolipáz. Fosfolipázy se řadí do skupiny enzymů označované jako hydrolázy (EC 3.1.1.X), které katalyzují rozkladnou reakci za přítomnosti vody. Jsou všudypřítomnou skupinou enzymů, které hydrolyzují fosfolipidy [24]. Liší se od sebe v místě působení v molekule fosfolipidu. Kontinuální remodelace buněčných membrán vyžaduje působení jedné nebo více fosfolipáz. Mají v organismu několik rolí, jako je trávení živin nebo tvorba bioaktivních molekul zapojených do buněčné regulace. Vazbou na regulační membránový receptor může několik fosfolipáz vykonávat biologickou funkci nezávisle na jejich katalytické aktivitě. Téměř všechny fosfolipázy jsou aktivnější na agregovaném substrátu nad tzv. kritickou micelární koncentrací (CMC) fosfolipidu (Obrázek 4) [25]. CMC je koncentrace, při níž se začínají tvořit micely v roztoku. Pod touto koncentrací je micelární koloid v systému pouze ve formě unimerních molekul a nad ní všechny přidávané molekuly asociují do micel [26].



Obrázek 4: Závislost aktivity fosfolipázy a nespecifické esterázy na koncentraci substrátu, Převzato a upraveno [25]

1.2.1 Klasifikace fosfolipáz

Fosfolipázy se dělí podle místa štěpení fosfolipidu na fosfolipázu A1, A2, B, C a D. Fosfolipázy A (PLAS) jsou acylhydrolázy a dělí se podle hydrolyzy 1-acylesteru (PLA1) nebo 2-acylesteru (PLA2). Produktem jsou volné mastné kyseliny a lysofosfolipidy. Ty, které hydrolyzují obě acylové skupiny patří do skupiny fosfolipáz B (PLB) a také se řadí mezi acylhydrolázy. Fosfolipázou C (PLC) je katalyzováno štěpení glycerofosfátové vazby. Odstranění základní skupiny (O-R skupina na fosfátu) je katalyzováno fosfolipázou D (PLD) a produktem je kyselina fosfatidová a příslušná hlavní skupina. PLC a PLD se řadí mezi fosfodiesterázy [24]. Štěpení molekuly fosfolipidu jednotlivými skupinami fosfolipáz je znázorněno na Obrázku 5.



Obrázek 5: Místa hydrolytického štěpení fosfolipáz, Převzato [24]

1.2.2 Fosfolipáza A1

Jak bylo dříve uvedeno, fosfolipáza A1 katalyzuje výhradně hydrolýzu v poloze sn-1. produktem reakce je volná mastná kyselina a lysofosfolipid. Biologická role této acylhydrolázy spočívá v účasti v tzv. Landsově cyklu. Landsův cyklus je deacylačně-reacylační cyklus, u kterého se předpokládá, že dochází k remodelaci acylového řetězce fosfolipidů pro zachování homeostatického složení molekul fosfolipidu v membránových dvojvrstvách. Enzym PLA1 vykazuje obvykle mnohem nižší LysoPLA aktivitu a aktivitu neutrální lipázy, i přesto preferuje místo štěpení sn-1 [25]. Pro maximální aktivitu je potřeba zvolit vhodné podmínky, klíčové parametry pro fosfolipázu jsou teplota a pH [27; 28; 29].

Za PLA1 enzymy mohou být označovány pouze ty, které prošly určitou úrovní čištění nebo klonováním a charakterizací. Jediným neměnným rysem fosfolipázy A1 se zdá být lipázový konsenzuální motiv v peptidové sekvenci, který sleduje vzorec aminokyselinových zbytků, uvnitř kterého se nachází společný motiv GX SXG obsahující katalytický serin v aktivním místě jako součást katalytické triády. Fosfolipázy A1 vykazují podstatnou sekvenční podobnost s pankreatickými, jaterními a endoteliálními lipázami [30].

V současné době je u savců známo devět molekul PLA1, šest extracelulárních a tři intracelulární PLA1 enzymy. Intracelulární a extracelulární PLA1 nesdílí žádné sekvenční homologie a mají odlišné funkce. Všechny extracelulární PLA1 patří do rodiny genů pankreatické lipázy, kde je v současnosti známo deset členů [31]. Extracelulární se skládají z fosfatidylserin (PS)-specifické PLA1 a membránově-asociované pro kyselinu fosfatidovou (PA)-selektivní PLA1. Tyto fosfolipázy A1 vykazují striktní substrátovou specifickou a mohou mít fyziologické role, protože produkují lysofosfolipidy, lyso-PS a lyso-PA, o kterých je známo, že jsou lipidovými mediátory mnoha biologických funkcí [30]. Fosfolipáza A1 se nachází i u metazoálních a prvokových parazitů nebo v hadích jedech. V mikroorganismech byla identifikována řada fosfolipáz. Prokaryotická verze enzymu PLA1, která byla objevena u podtřídy bakterií proteobacteria, gen pro PLA1 byl izolován z rodu *Serratia* a následně exprimován v *E. Coli*. Velké množství fosfolipáz bylo identifikováno také v houbách. Dlouho používaná v Japonském fermentačním průmyslu je vláknitá houba *Aspergillus oryzae*, která obsahuje gen kódující sekretovanou PLA1. Ačkoli byla tato PLA1 částečně charakterizována, její regiospecifita na sn-1, substrátová specifita, buněčná lokalizace a fyziologická funkce zatím nebyly zcela pochopeny [30; 31].

1.2.3 Využití fosfolipáz

O fosfolipázy je velký zájem v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. V potravinářském průmyslu se fosfolipázy běžně využívají ke zlepšení emulgačních vlastností potravinářských výrobků působením na fosfolipidy již přítomné v přísadách [32; 33; 34]. Například při výrobě chleba, kdy fosfolipázy generují přírodní emulgátory hydrolyzou lipidů v těstě [34]. Enzymaticky modifikovaný lecitin obsahující lyso-PL má vyšší hydrofilní a lipofilní rovnováhu než lecitin. Poskytuje lepší tepelnou odolnost při vystavení vysokým teplotám a jsou vhodnými emulgátory pro potravinářské a kosmetické aplikace [32]. Také úprava vaječného žloutku pomocí PLA1 k hydrolyze PL na lyso-PL zlepšuje jeho emulgační schopnosti a zejména jeho schopnost vytvářet stabilní emulze [33]. Fosfolipázy také zlepšují výtěžek komerčně vyráběných rostlinných olejů [24]. Lysofosfolipidy jsou běžně využívány jako povrchově aktivní látky v potravinářské technologii [33; 34] a kosmetice [30; 32] a jako složky lipozomů používaných při dodávání léčiv. Komerčně se lysofosfolipidy vyrábí prostřednictvím jejich chemické syntézy nebo působením extraktů z prasečí slinivky, která obsahuje PLA2. Pro fosfolipázu A2 je komerčně dostupná řada zdrojů, zatímco u PLA1 jsou potíže s produkcí a čištěním enzymu. Jako potenciální přirozený zdroj PLA1 byl studován prvek *Tetrahymena thermophila*. Geny pro PLA1 byly klonovány z různé řady mikroorganismů, u kterých byla vyzkoušena purifikace pro splnění komerčních potřeb, ale žádná z nich nebyla charakterizována [30; 32].

1.2.4 Enzymatická přeměna olejů na mastné kyseliny

Využití enzymů jako biokatalyzátorů pro oleochemický průmysl je zejména kvůli jejich dobře známé roli v různých metabolických procesech a reakcích. Nejdůležitějšími průmyslovými enzymy jsou lipázy, které se primárně využívají pro enzymatickou hydrolyzu triacylglycerolů. Průmyslové použití zatím omezuje citlivost lipáz na reakční podmínky jako je teplota nebo pH a obvykle jsou drahé a obtížně se získávají (Tabulka 4). Enzymatická katalýza probíhá bez vytváření vedlejších produktů, regenerace produktu je snadná a lze katalyzátor znovu použít v případě, že je fixován na pevnou fázi [35]. Lipázy mohou katalyzovat částečnou nebo úplnou hydrolyzu lipidů [36]. Aby mohl být enzym znovu použit je potřeba ho imobilizovat na nějaký nosič jako jsou třeba magnetické částice. Výsledky studií [27; 28; 29] dokazují, že imobilizace značně zlepšuje stabilitu enzymu i proti tepelné denaturaci. Díky zvýšené tepelné stabilitě imobilizovaného enzymu se zvyšuje také jeho životnost.

Při reakcích katalyzovaných lipázami je nevýhodou nemísitelnost mezi substráty, lipázy mají zvláštní mechanismus katalýzy, který jim umožňuje působit na rozhraní mezi hydrofobním

a vodným prostředím. Tento mechanismus se nazývá mezifázová aktivace a dochází zde k pohybu polypeptidového řetězce zvané „víko“. V nepřítomnosti fázového rozhraní pokrývá víko jejich centrum aktivních míst, což způsobuje blokování přístupu enzymu k molekule substrátu. Pokud je naopak fázové rozhraní přítomno, dochází ke konformační změně enzymu a také k expozici jeho aktivního centra [37]. Větší katalytickou aktivitu během transesterifikační reakce vyvolá přidání organického rozpouštědla, které zvýší rozpustnost oleje v alkoholu. Koncentrace pomocného rozpouštědla by měla být nízká, aby nedošlo k inaktivaci lipázy. Transesterifikační proces s použitím pomocných rozpouštědel umožňuje také současnou konverzi volných mastných kyselin a triacylglycerolů na estery [38].

Postup pro odstranění fosfolipidů ze surového oleje navržený Yu a kol. (2013) [27] využíval enzymatické hydrolýzy za použití enzymu fosfolipázy A1 (Lecitase Ultra). Dosáhli snížení hladiny fosforu na méně než 10 mg/kg po 7 hodinách reakce. Metoda pro zlepšení kvality sójového oleje za pomoci enzymatické hydrolýzy navržená Luo a kol. (2023) [29] využívala enzymu fosfolipázy A1 (*Aspergillus oryzae*). Dosáhli snížení hodnoty fosforu v oleji na 35,09 mg/kg po 3 hodinách reakce. Obě tyto metody byly provedeny s využitím imobilizace enzymu na magnetické nanočástice. Xiang a kol. (2014) [28] navrhli metodu využití hydrolytické aktivity fosfolipázy A1 (Lecitase Ultra) pro výrobu strukturovaných fosfolipidů obohacených o kyselinu dokosaheptaenovou a kyselinu eikosapentaenovou. Bylo dosaženo 74% celkového výtěžku. Pro tuto metodu byly jako nosič enzymu použity částice makroporézní pryskyřice.

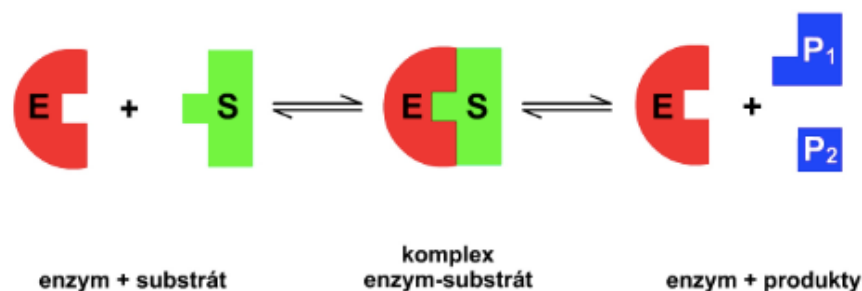
Tabulka 4: Přehled výhod a nevýhod pro různé druhy hydrolýzy

Druh hydrolýzy	výhody	nevýhody
Kyselá	rychlé, levné, necitlivé k nečistotám	extrémní podmínky, potřeba dále čistit produkt
Alkalická	rychlé, levné, snadné	vícekový proces, vedlejší produkty
Enzymatická	žádné vedlejší produkty, katalyzátor lze znovu použít	drahé, citlivost na reakční podmínky

1.2.5 Aktivita enzymu

Protože jsou enzymy obsaženy v biologickém materiálu v nízkých koncentracích, je lepší znát jejich účinnost spíše než jejich množství. Pro měření aktivity enzymu se namísto jejich koncentrace využívá jejich substrátová specifita. Množství enzymu je nepřímo kvantifikováno

na základě reakční rychlosti, jakou enzym katalyzuje přeměnu substrátu na produkt ve zvoleném časovém intervalu. Metoda je dostatečně specifická pouze za předpokladu, že na substrát působí v daném materiálu pouze jeden enzym. Pokud je zvolena vhodná koncentrace substrátu vzhledem k enzymu je metoda i dostatečně citlivá a přesná. Pro snadné porovnávání rychlosti úbytku substrátu nebo přírůstku produktu, je potřeba, aby reakce probíhala podle kinetiky nultého řádu. Toho lze dosáhnout v případě, je-li veškerý enzym substrátem nasycen. K vazbě veškerého enzymu do enzym-substrátového komplexu ES (Obrázek 6) dojde pouze v případě velkého nadbytku substrátu [39]. Fosfolipázy mají velmi nízkou aktivitu na monomerním substrátu, k jejich aktivaci dojde po překročení CMC [25]. Jednotkou enzymové aktivity jsou unit [U], který udává množství enzymu potřebné k přeměně 1 μmol substrátu za minutu nebo katal [kat], který udává množství enzymové aktivity, které katalyzuje přeměnu 1 molu substrátu za sekundu [39].



Obrázek 6: Schéma reakce katalyzované enzymem. Převzato [40]

Enzymová aktivita může být ovlivněna několika faktory:

- a) Teplota: rychlost enzymově katalyzovaných reakcí s teplotou vzrůstá. Pokud teplota přesáhne kritickou hodnotu, dojde k denaturaci bílkovinné části molekuly enzymu a rychlost reakce začne klesat. Většina enzymů má nejvyšší aktivitu při teplotě 37 °C a aktivitu ztrácí při 55-60 °C.
- b) pH: enzymy působí katalyticky pouze v určité oblasti pH. Tato vlastnost je spojena s disociačním stavem kyselých a bazických skupin aktivního centra. Většina enzymů má pH-optimum v neutrálních nebo slabě kyselých hodnotách.
- c) Modulátory: první jsou látky zvyšující rychlost enzymové reakce, která nazýváme aktivátory. Pokud je enzym v neaktivní formě v podobě proenzymů nebo zymogenů, mění se pomocí aktivátoru na aktivní formu. Aktivátor dosedne na aktivní místo enzymu a tím dojde k jeho aktivaci a může plnit svoji funkci. Druhými modulátory jsou inhibitory, které snižují rychlost enzymové reakce. Negativně ovlivňují vazbu mezi enzymem a substrátem, například mohou napodobovat substrát a blokovat aktivní místo [40].

1.3 Použité analytické metody

1.3.1 Tuková čísla

Číslo kyselosti (ČK) je mírou obsahu volných mastných kyselin v tuku a je vyjádřen jako spotřebované množství KOH (v mg) potřebného k neutralizaci kyselin obsažených v 1 g tuku. Rozpuštěný tuk je titrován 0,1M roztokem KOH v ethanolu s přidávkem indikátoru fenolftaleinu nebo thymolftaleinu. Pro výpočet se využívá Rovnice 1.

$$\text{číslo kyselosti} = 56,11 \cdot c_{\text{KOH}} \cdot \frac{V_{\text{KOH}}}{m_v} \text{ [mg KOH/g]} \quad (1)$$

kde c_{KOH} je koncentrace hydroxidu draselného [mol/l], V_{KOH} je spotřebovaný objem hydroxidu draselného [ml] a m_v je hmotnost stanovovaného vzorku [g].

Dalšími jsou číslo zmydelnění, které vyjadřuje hmotnost KOH (v mg) potřebného k neutralizaci mastných kyselin a k hydrolýze jejich esterů v 1 g tuku. Esterové číslo, které vyjadřuje obsah esterově vázaných mastných kyselin a udává se jako hmotnost KOH (v mg) potřebného k hydrolýze esterů mastných kyselin obsažených v 1 g tuku. Jeho výpočet je pouze rozdíl čísla kyselosti od čísla zmydelnění. Násobením esterového čísla faktorem 0,547 můžeme vypočítat obsah vázaného glycerolu v tuku (v mg/g). K vyjádření obsahu parciálních esterů glycerolu v tuku se používá hydroxylové číslo, který se vyjadřuje jako hmotnost KOH (v mg) a ta je potom ekvivalentem obsahu hydroxylových skupin [41].

1.3.2 UV-Vis spektroskopie

U spektroskopie v ultrafialové (UV) a viditelné (Vis) oblasti světla pozorujeme excitaci elektronů. Elektron je excitován, pokud odpovídá frekvence dopadajícího záření rozdílu energie mezi dvěma elektronickými stavy. Tento energetický rozdíl závidí na elektronové struktuře zkoumané molekuly a jejím prostředí. Pokud frekvence záření odpovídá energetickému rozdílu přechodu mezi dvěma energetickými stavy, dochází k rezonanční excitaci, změně rozložení elektronové hustoty a elektronovému přechodu. Energii potřebnou pro přechod poskytuje záření. Tento proces je známý jako absorpce [42]. U spektrofotometru dochází k rozdělení světla na jednotlivé vlnové délky hranolovým nebo mřížkovým monochromátorem. Pro UV oblast se používají deuteriové výbojky a pro oblast viditelného světla wolframové výbojky. Nástroje se pak rozlišují na jednopaprskové a dvoupaprskové [43].

1.3.3 Infračervená a Rammanova spektroskopie

Tyto metody se využívají zejména pro identifikaci funkčních skupin ve vzorku. U infračervené (IČ) spektroskopie dochází k absorpci charakteristické frekvence infračerveného záření různými funkčními skupinami. Jde o měření absorpce různých IČ frekvencí vzorkem umístěným v dráze IČ paprsku. Infračervené záření pokrývá část elektromagnetického spektra, které má vlnočet od cca 13 000 do 10 cm^{-1} . Informace o IČ absorpci je prezentována ve formě spektra jako závislost absorbance na vlnočtu [44]. U Rammanovy spektroskopie dochází k měření rozdílu energií vibračních hladin molekuly, je založena na tzv. Rammanově jevu, kdy dochází k přechodu molekuly mezi dvěma vibračními hladinami po interakci s fotonem. Zdrojem fotonu je nejčastěji laserový paprsek. Výsledkem je spektrum závislosti intenzity posunutého záření na rammanově posunu (také ve formě vlnočtu) [45].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie a materiály

Přístroje a pomůcky:

- Magnetická míchačka s topnou deskou Heidolph MR Hei-Tech (Heidolph instrument GmbH & CO, USA)
- Hřídelová míchačka Heidolph Hei-Torque Core (Heidolph instrument GmbH & CO, USA)
- Analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Německo)
- Rotátor Bio RS-24 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Thermo-Shaker TS-100C (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Magnetický separátor (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA)
- pH metr Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- Centrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Spektrofotometr PowerWave™ HT, software Gen5 (BioTek, Vermont, USA)
- Infračervený spektrometr s Fourierovou transformací Nicolet iS50, software Omnic (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA)
- Mikropipety (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Mikrotitrační destičky, 96 jamek (PP, P-Lab, ČR)

Chemikálie:

- Enzym fosfolipáza A1 z *Aspergillus oryzae* ≥ 10 KLU/G (Sigma Aldrich, Missouri, USA)
- Enzym lipáza *Candida rugosa* Type VII, ≥ 700 IU/mg (Sigma Aldrich, Missouri, USA)
- Sójové fosfolipidy, mix fosfolipidů, $\geq 20,0$ % Fosfatidylcholin (Sigma Aldrich, Missouri, USA)
- Kyselina chlorovodíková, 36 % (Penta, Chrudim, ČR)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Tris, čistota p.a. (Sigma Aldrich, Missouri, USA)
- 4-nitrofenylbutyrát, NPB, ≥ 98 % (Sigma Aldrich, Missouri, USA)
- Jodistan sodný (NaIO_4), čistota p.a. (Sigma Aldrich, Missouri, USA)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, čistota p.a. (Lachner, Neratovice, ČR)
- Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, čistota p.a. (Lachner, Neratovice, ČR)
- Řepkový olej

- Hydroxid draselný, čistota p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Chlorid vápenatý (CaCl₂), čistota p.a. (Penta, Chrudim, ČR)

Magnetické částice:

- Magnetická makroporézní perlová celulóza, porozita 200, –OH funkční skupiny, velikost částic 80–100 μm (IONTOSORB, Ústí na Labem, Česká Republika)

Roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH = 7,3
- 0,1 mM Tris–HCl pH = 7,4
- 0,2 M NaIO₄
- Zásobní roztok 50 mM NPB (v acetonitrilu)
- Zásobní roztok fosfolipázy A1 z *Aspergillu oryzae* (3,7 mg/ml) ve fosfátovém pufru (0,1M, pH 7,3)
- Zásobní roztok lipázy *Candida rugosa* (2,5 mg/ml) ve fosfátovém pufru (0,1M, pH 7,3)

2.2 Alkalická hydrolýza

Jako výchozí látky byly použity řepkový olej a lecitin, kterého bylo přidáno 0, 0,5, 1 a 3 hm.%. Směs oleje s lecitinem byla převedena pomocí zmýdelnění s následným okyselením kyselinou chlorovodíkovou na směs volných mastných kyselin. Po reakci bylo stanoveno číslo kyselosti a byla provedena analýza infračervenou a Ramanovou spektroskopií.

Zmýdelnění

Reakce probíhala v kádince o objemu 1000 ml. Nejprve bylo naváženo potřebné množství výchozích látek (Tabulka 5). Hydroxid draselný byl rozpuštěn v destilované vodě (62 hm.%) a poté byl po kapkách přidáván za stálého míchání do reakční směsi (Obrázek 7). Po přidání celého objemu hydroxidu probíhala reakce za stálého míchání po dobu 2 hodin při teplotě 60°C.

Tabulka 5: Navážky výchozích látek pro zmýdelnění, Z1 = řepkový olej bez fosfolipidu, Z2 = řepkový olej s 0,5 hm.% fosfolipidu, Z3 = řepkový olej s 1 hm.% fosfolipidu, Z4 = řepkový olej s 3 hm.% fosfolipidu

Hmotnost [g]	Z1	Z2	Z3	Z4
Řepkový olej	150	149,25	148,5	145,5
Lecitin	0	0,75	1,5	4,5
KOH	190	190	190	190
Voda	116	116	116	116



Obrázek 7: Aparatura pro zmýdelnění

Po dvou hodinách byla směs zneutralizována 36% kyselinou chlorovodíkovou a pH bylo kontrolováno pomocí pH metru a upraveno na výsledné pH 3. Roztok byl následně převeden do dělicí nálevky, kde byla oddělena vodná fáze od organické. Po promytí organické fáze vodou byla vodná fáze odpuštěna a organická fáze, tj. směs mastných kyselin, byla použita pro zjištění čísla kyselosti.

Číslo kyselosti

Na analytických vahách bylo do dvou titračních baněk naváženo 0,25 g směsi mastných kyselin. Do každé titrační baňky bylo pomocí odměrného válce odměřeno 30 ml směsi ethanolu s toluenem, aby se mastné kyseliny rozpustily. Poté byly přidány 3 kapky indikátoru fenolftaleinu. Směs byla za stálého míchání titrována 0,1M KOH v ethanolu s $f = 0,9852$ dokud směs v titrační baňce nezrůžověla. Číslo kyselosti bylo vypočítáno ze spotřebovaného KOH (Tabulka 6) (Rovnice 1).

Tabulka 6: Navážky směsí a spotřeba KOH, Z1 = řepkový olej bez fosfolipidu, Z2 = řepkový olej s 0,5 hm.% fosfolipidu, Z3 = řepkový olej s 1 hm.% fosfolipidu, Z4 = řepkový olej s 3 hm.% fosfolipidu

	Z1	Z2	Z3	Z4
m1 MK [g]	0,2584	0,256	0,2577	0,2551
m2 MK [g]	0,2551	0,2534	0,2567	0,2555
V1 KOH [ml]	10,08	10,29	9,55	9,9
V2 KOH [ml]	9,34	10,2	9,4	9,8

2.3 Enzymatická katalýza

Imobilizace enzymu na makroporézní perlovou celulózu

Pro imobilizaci enzymu na magnetické částice makroporézní perlové celulózy bylo nejprve potřeba provést oxidaci hydroxylových funkčních skupin částic. Pro imobilizaci bylo odebráno 500 μl sedimentovaných částic pomocí magnetického separátoru, ty byly následně 10x promyty destilovanou vodou, pro odstranění stabilizačního roztoku. K sedimentovaným částicím bylo následně přidáno 500 μl oxidačního činidla (0,2 M NaIO_4) a směs byla inkubována 90 minut při laboratorní teplotě za mírného otáčení ve tmě. Po oxidaci byly částice 10x promyty destilovanou vodou a byl přidán roztok enzymu fosfolipázy A1/lipázy (750 μg v 1ml fosfátového pufru, 0,1 M, pH 7,3). Takto připravená směs byla inkubována 3 hodiny při laboratorní teplotě na rotátoru. Po imobilizaci enzymu byl odebrán supernatant a částice byly 10x promyty fosfátovým pufrem (0,1 M, pH 7,3), ve kterém byly skladovány při 4 °C pro další použití.

Stanovení aktivity fosfolipázy A1

Jako substrát byl použit p-nitrofenylbutyrát (NPB) a pro každou sérii měření byl připraven čerstvý zásobní roztok v acetonitrilu o koncentraci 50 mmol/l. Tento zásobní roztok byl ředěn na požadovanou koncentraci 0,75 mmol/l pro 200 μl reakční směsi. Reakční směs v jamkách mikrotitrační destičky obsahovala enzym fosfolipázu A1 o koncentraci 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Aktivita enzymu byla nejdříve proměřena pro teploty 25, 30, 37, 40, 45 a 50 °C monitorováním produktu enzymatické hydrolýzy p-nitrofenolu spektrofotometricky v prostředí Tris-HCl pufru o pH 8, stejná reakce byla měřena ještě s přidavkem CaCl_2 o koncentraci 25 mmol/l. Absorbance byla měřena spektrofotometricky při 414 nm po celkovou dobu 60 minut v intervalech 10 minut. Výsledky byly následně zpracovány v programu Excel.

Stejně připravená reakce byla následně provedena při 30 a 50 °C v Tris-HCl pufre o pH 4, 5, 6, 7 a 8. Reakce byla opět opakována s přidavkem CaCl_2 o koncentraci 25 mmol/l. Průběh reakce byl monitorován spektrofotometricky při 414 nm.

Enzymatická hydrolýza fosfolipidů

Byly provedeny dvě reakce, nejdříve pro dvě různé koncentrace enzymu a poté pro různé koncentrace substrátu fosfolipidu. Reakce byly prováděny v mikrozkušnicích s imobilizovanou a solubilní lipázou *Candida rugosa* a fosfolipázou A1 o koncentracích 100

a 200 µg /ml. Reakce probíhala vždy v thermomixeru (510 rpm) po dobu 4 hodin při teplotách 37 a 40 °C.

Pro první reakci byly připraveny roztoky sójového fosfolipidu v ethanolu, aby množství enzymu k fosfolipidu bylo 0,2 hm. % a přidány po 1ml k enzymu o koncentraci 100 a 200 µg/ml. Reakce probíhala při 37 a 40 °C při pH 5.

Pro druhou reakci byly připraveny čtyři roztoky fosfolipidu 2% a 5% každý v ethanolu a v destilované vodě a ke každému z nich byl přidán CaCl₂ o koncentraci 25 mmol/l. Koncentrace enzymu byla v každé zkumavce 200 µg/ml. Reakce probíhala při 40 °C.

Mikrozkumavky se solubilním enzymem byly následně zahřáty na 90 °C pro zastavení reakce. Reakční směsi byly centrifugovány a byl odebrán supernatant. Odebrané vzorky byly následně analyzovány infračervenou spektrometrií (FT-IR). Magnetické částice s imobilizovanými enzymy byly následně promyty a uchovány při 4 °C pro stanovení reziduální aktivity.

2.4 Analýza reakčních produktů hydrolýzy metodou FT-IR

Byl využit infračervený spektrometr s Fourierovou transformací (FT-IR) Nicolet iS50 s integrovaným systémem Omnic a s jednodrazovým diamantovým ATR modulem. U naměřených spekter byly identifikovány významné funkční skupiny, které byly přítomny ve vzorcích při chemické homogenní i enzymatické hydrolýze. Na ATR modul bylo odpipetováno 50 µl vzorku a měření bylo provedeno s počtem skenů 32, ATR korekcí a rozlišením 1 cm⁻¹. Spektra byla zpracována pomocí programu Origin a následně vyhodnocena.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Práce se zabývá různými způsoby přeměny fosfolipidů na mastné kyseliny a studiem aktivity fosfolipázy A1 z *Aspergillus oryzae* a jejího využití pro přípravu mastných kyselin v porovnání s homogenní katalýzou. Záměrem bylo otestovat ovlivnění alkalické hydrolyzy přidávkem fosfolipidů a otestovat hydrolytickou aktivitu solubilního enzymu. Následně enzym imobilizovat na vhodný nosič a také použít pro hydrolyzu fosfolipidů.

Zjištění čísla kyselosti umožnilo získat informace o množství uvolněných mastných kyselin alkalickou hydrolyzou, a tedy jejich obsahu v samotném oleji a v oleji s přidávkem fosfolipidu. Přítomnost mastných kyselin byla dále ověřena infračervenou spektrometrií.

Byla stanovena aktivita solubilní fosfolipázy pomocí chromogenního substrátu a byla určena vhodná reakční teplota a pH. Následně byla provedena reakce imobilizované i solubilní fosfolipázy s fosfolipidem, pro kterou byly zvoleny podmínky na základě informací z literatury [27; 28; 29], které se zabývaly imobilizací fosfolipázy A1. K potvrzení proběhlé hydrolyzy byla použita infračervená spektrometrie.

3.1 Alkalická hydrolyza

Řepkový olej s přidávkou fosfolipidu byl přeměněn pomocí zmýdelnění a následné neutralizace kyselinou chlorovodíkovou na směs volných mastných kyselin (popsáno v kapitole 2.2.1). Mýdla vytvořila pevné částice, které musely být ponechány přes noc, aby se rozpustily. Množství uvolněných mastných kyselin bylo zjištěno pomocí čísla kyselosti, jehož stanovení proběhlo titrační metodou podle postupu uvedeného v kapitole 2.2.2 (Tabulka 7).

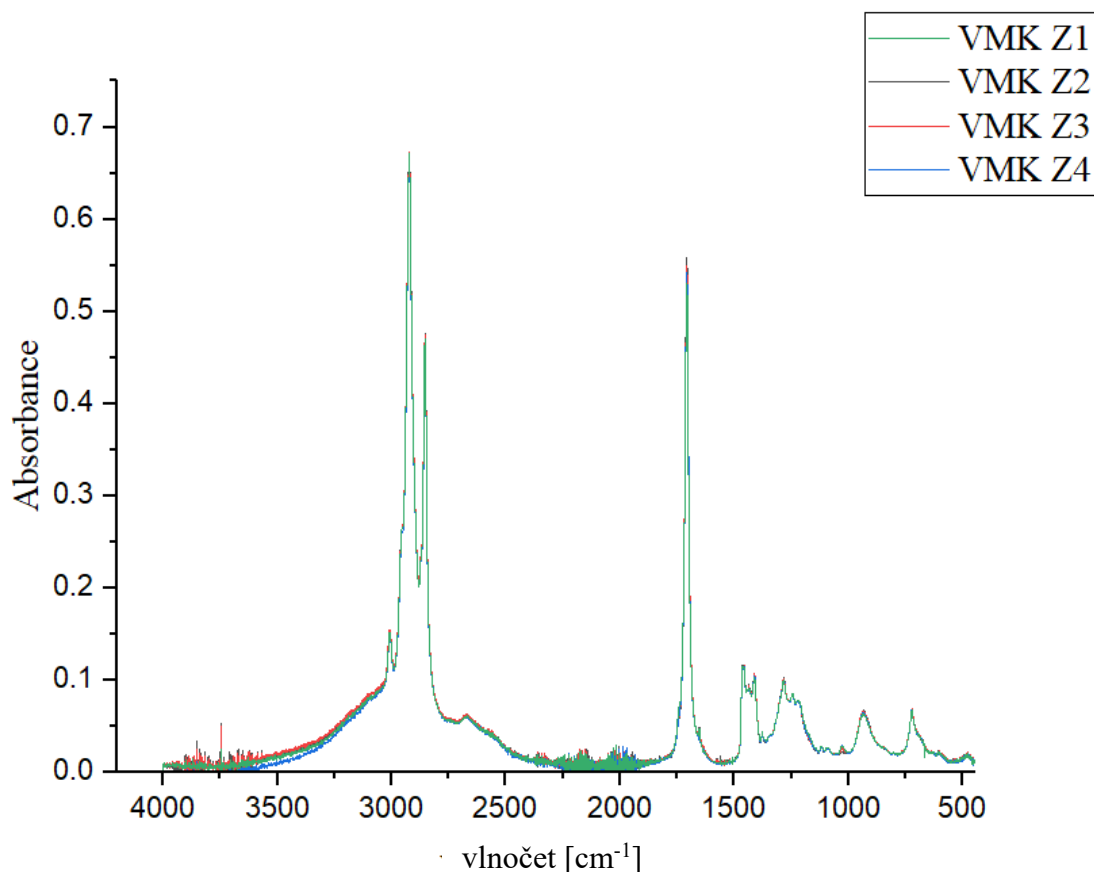
Tabulka 7: Vypočítané hodnoty čísla kyselosti, Z1 = řepkový olej bez fosfolipidu, Z2 = řepkový olej s 0,5 hm.% fosfolipidu, Z3 = řepkový olej s 1 hm.% fosfolipidu, Z4 = řepkový olej s 3 hm.% fosfolipidu

	Z1	Z2	Z3	Z4
ČK 1	215,6	222,198	204,86	214,53
ČK 2	202,4	222,5	210,63	212,03
průměr	209	222,349	207,745	213,28

Volné mastné kyseliny (VMK) mají číslo kyselosti kolem 200-210 mg KOH/g to znamená, že došlo k přeměně téměř ze 100 %.

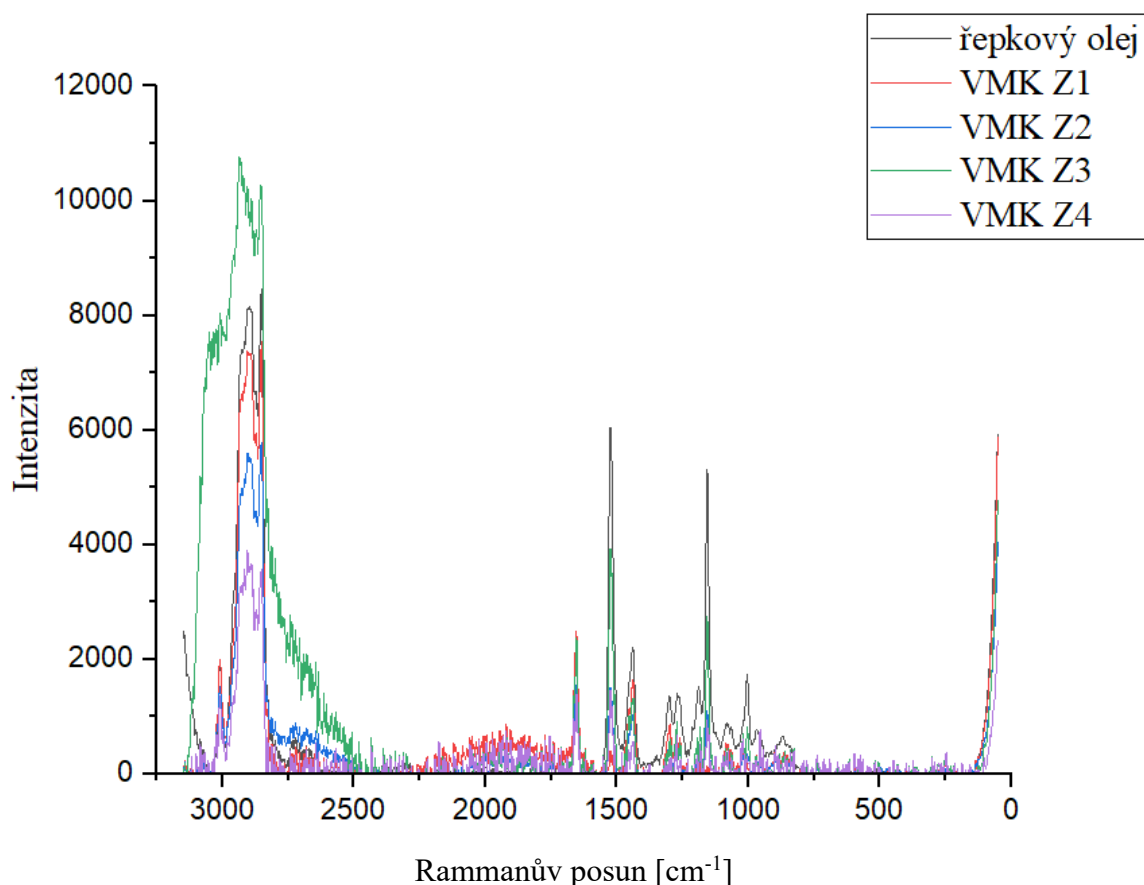
Pro identifikaci funkčních skupin vzniklé směsi mastných kyselin byla použita infračervená spektrometrie (IČ). Záznam popisuje závislost absorbance na vlnočku (obrázek 8).

Ve spektrech vzniklých mastných kyselin s přidaným fosfolipidem nejsou v porovnání s čistými VMK zásadní rozdíly. V oblasti charakteristických frekvencí (3300-1900 cm^{-1}) byly identifikovány absorpční pásy: (i) valenční vibrace alkenů, resp. dvojně vazby mezi uhlíky (3100-3000 cm^{-1}), (ii) OH skupiny (3500-3200 cm^{-1}), (iii) skupina karboxylových kyselin (3200-2500 cm^{-1}). V absorpčním pásu 2380-1850 cm^{-1} se nacházela odezva diamantového ATR modulu.



Obrázek 8: IČ spektrum volných mastných kyselin pro samostatný řepkový olej (Z1), a s 0,5 (Z2), 1 (Z3) a 3 (Z4) hm.% sójového fosfolipidu.

K identifikaci výsledku zmýdelnění byla provedena i Rammanova spektroskopie. V záznamu bylo obtížné identifikovat funkční skupiny, kvůli výraznému šumu způsobeného rozptylem laserového paprsku. Byly identifikovány pásy (i) dvojná vazba mezi uhlíky (2980-3020 cm^{-1}) a (ii) pásy příslušící barvivům obsaženým v oleji.



Obrázek 9: Rammanovo spektrum řepkového oleje a volných mastných kyselin pro samostatný řepkový olej (Z1), a s 0,5(Z2), 1 (Z3) a 3(Z4) hm.% sójového fosfolipidu

Pomocí čísla kyselosti a infračervené spektroskopie bylo potvrzeno, že došlo k úspěšnému převedení řepkového oleje a sójového fosfolipidu na volné mastné kyseliny.

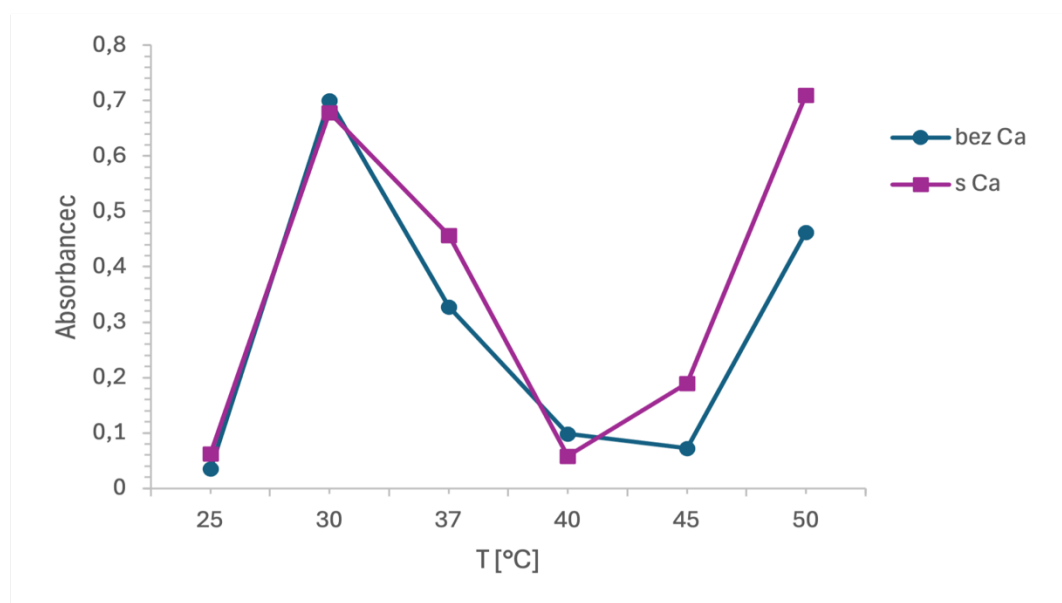
3.2 Enzymatická katalýza

Dříve než byla fosfolipáza imobilizována na magnetické částice makroporézní perlové celulózy, byla stanovena aktivita solubilního enzymu. Ke stanovení byla použita metoda Alam a kol. (2015) [46] upravena na naše podmínky. Byla ověřena závislost aktivity fosfolipázy na teplotě a pH. Jako substrát sloužil 4-nitrofenylbutyrát (NPB) a byla monitorována absorbance produktu enzymatické reakce p-nitrofenolu. Změna absorbance v čase byla měřena při 414 nm po celkovou dobu 60 minut v intervalech 10 minut. Následně byla provedena reakce hydrolytického štěpení fosfolipidu. Vzniklé funkční skupiny byly identifikovány pomocí infračervené spektrometrie.

3.2.1 Závislost aktivity fosfolipázy na teplotě

Bylo stanoveno teplotní optimum solubilní fosfolipázy. Pro jeho určení byla měřena závislost absorbance na teplotě. Měření bylo provedeno pro koncentraci enzymu 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a substrátu

NPB 0,75 mmol/l podle postupu uvedeného v kapitole 2.3.2. Aktivita enzymu byla sledována při teplotách 25, 30, 37, 40, 45 a 50 °C. Teplotní rozmezí bylo zvoleno dle literatury [27; 29] a protože je známo, že enzymy reagují dobře za nižších teplot, bylo měření rozšířeno i o teploty 25 a 30 °C. Vyšší teploty než 50 °C byly naopak vyřazeny, kvůli možné denaturaci enzymu. Měření bylo při každé teplotě provedeno ještě s přidavkem 25 mmol/l chloridu vápenatého, který má podle literatury [47] pozitivní vliv na aktivitu fosfolipázy. Do grafu závislosti absorbance na teplotě (Obrázek 9) byly vyneseny hodnoty absorbance v čase 50 minut.

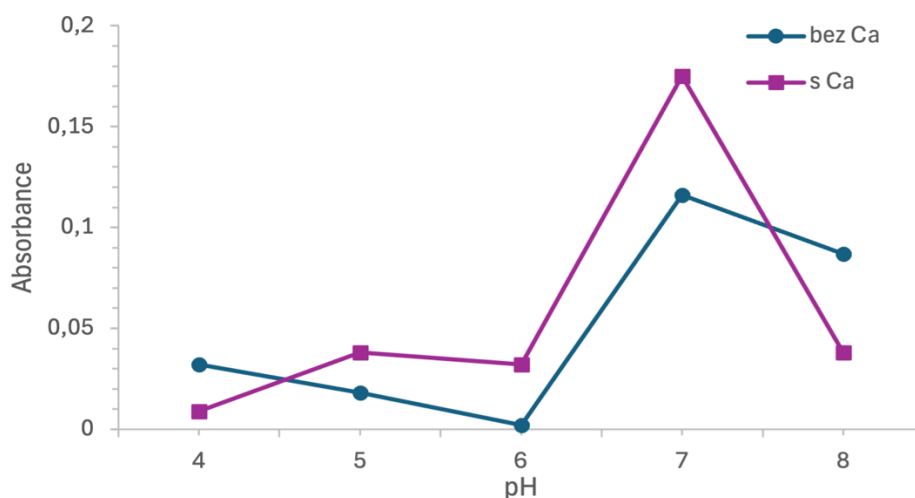


Obrázek 10: Teplotní optimum aktivity solubilní fosfolipázy v 50 minutě. Závislost absorbance na teplotě. Reakční směs: 5 µg/ml fosfolipázy, substrát 0,75 mol/l NPB v prostředí Tris-HCl (0,1 mM, pH 7,4); reakční podmínky teplota 25, 30, 37, 40, 45 a 50 °C, 60 minut, $\lambda=414\text{nm}$.

Z obrázku 9 je patrné, že optimální teplotou pro hydrolytické štěpení je 30 a 50 °C. Maximum v 50 °C koresponduje s literaturou, enzymy mají při vyšších teplotách vyšší reakční rychlost. Po přidání chloridu vápenatého do reakční směsi je patrná mírně vyšší aktivita enzymu při teplotě 45 a 50 °C, ale změna nebyla nijak výrazná.

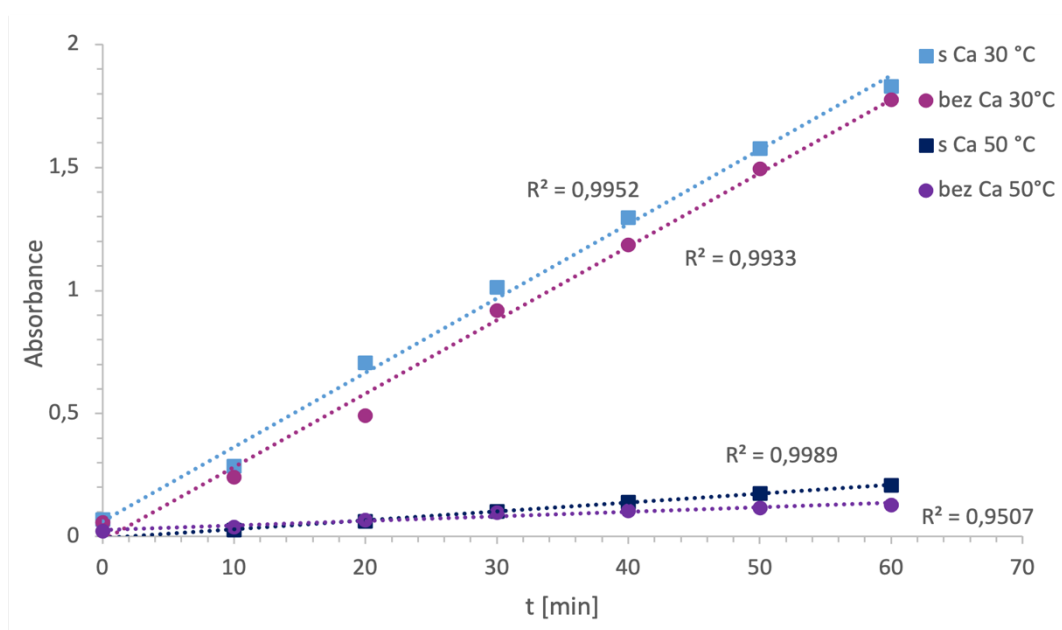
3.2.2 Závislost aktivity fosfolipázy na pH

Měření pH optima bylo provedeno nejdříve při 50 °C a následně byla změřena aktivita enzymu v čase při pH 7 při 30 a 50 °C. Měření bylo provedeno pro koncentraci enzymu 5 µg/ml a substrátu NPB 0,75 mmol/l, celý postup je uveden v kapitole 2.3.2. Pro stanovení bylo upraveno pH reakčního pufru Tris-HCl na pH 4, 5, 6, 7 a 8. Hodnoty nepřesahovaly hodnotu 8 kvůli stabilitě substrátu. Následně byla analýza provedena ve stejných roztocích, ale s přidavkem chloridu vápenatého o koncentraci 25 mmol/l. Vyhodnocení bylo provedeno jako závislost absorbance na pH v reakčním čase 50 minut (Obrázek 10).



Obrázek 11: pH optimum aktivity solubilní fosfolipázy v čase 50 minut. Reakční směs: 5 $\mu\text{g/ml}$ fosfolipázy, substrát 0,75 mmol/l NPB v prostředí Tris-HCl o pH 4, 5, 6, 7 a 8; reakční podmínky teplota 50 $^{\circ}\text{C}$, 60 minut, $\lambda=414\text{nm}$.

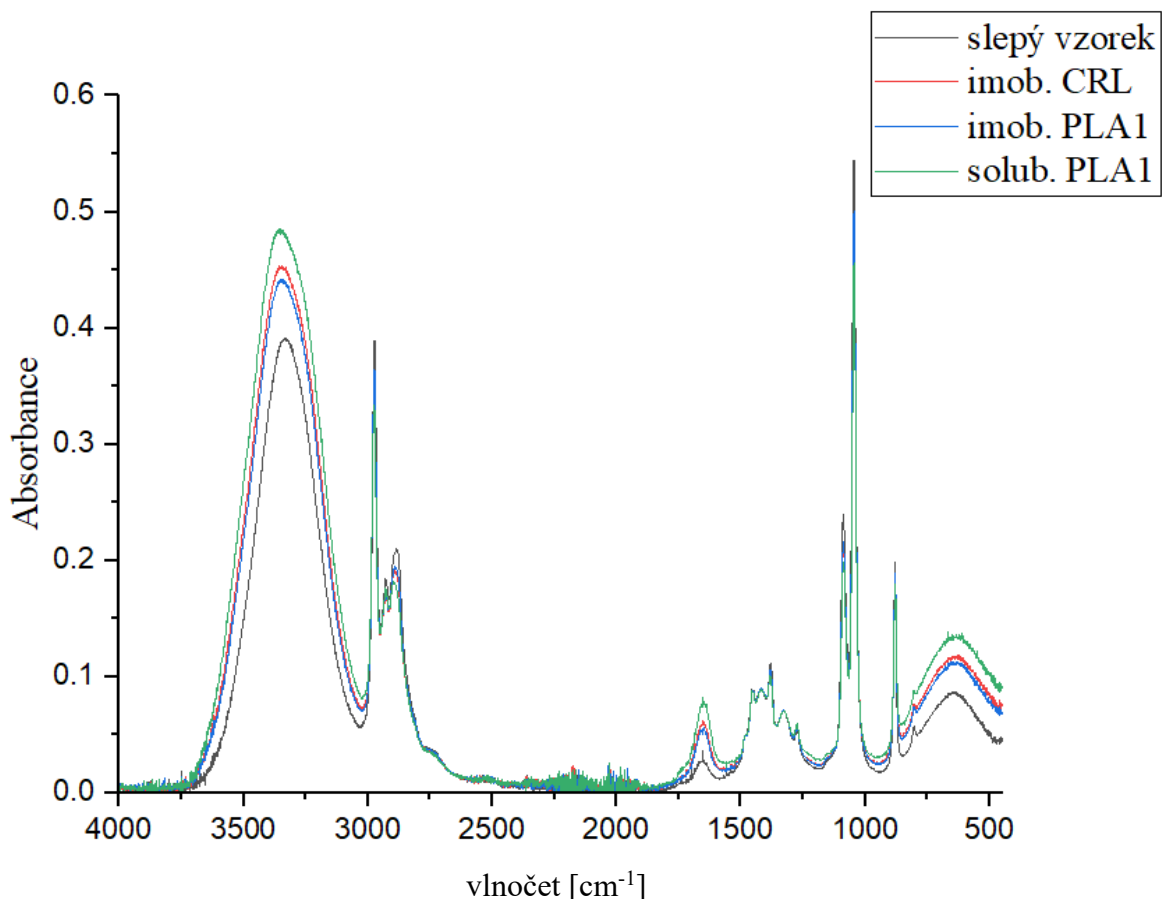
Solubilní fosfolipáza vykazovala jedno maximum, a to při pH 7, po přidání CaCl_2 došlo ke zvýšení aktivity. Aktivita solubilní fosfolipázy se značně snižuje při hodnotách pH nad i pod hodnotu 7. Toto maximum bylo proměřeno ještě při 30 $^{\circ}\text{C}$ a byla vynesena závislost absorbance na čase (Obrázek 12). Aktivita fosfolipázy při 30 $^{\circ}\text{C}$ byla značně vyšší, než při 50 $^{\circ}\text{C}$, to mohlo být způsobeno již částečnou degradací enzymu při vysoké teplotě.



Obrázek 12: Aktivita solubilní fosfolipázy v čase při 30 $^{\circ}\text{C}$ a 50 $^{\circ}\text{C}$. Reakční směs: 5 $\mu\text{g/ml}$ fosfolipázy, substrát 0,75 mmol/l NPB v prostředí Tris-HCl o pH 7; reakční podmínky teplota 50 $^{\circ}\text{C}$, 60 minut, $\lambda=414\text{nm}$.

3.2.3 Výsledek enzymatické hydrolyzy fosfolipidů

Pro identifikaci funkčních skupin ve vzorcích po reakci (postup provedení v kapitole 2.3.3) sójového fosfolipidu s fosfolipázou A1 v solubilní formě, fosfolipázou A1 imobilizovanou na magnetické nanočástice a lipázou *Candida rugosa* imobilizovanou na magnetické nanočástice bylo využito infračervené spektrometrie. Záznamy infračervených spekter z různých sérií měření byly téměř identické, pro popis byl tedy zvolen pouze jeden reprezentativní záznam (Obrázek 13).



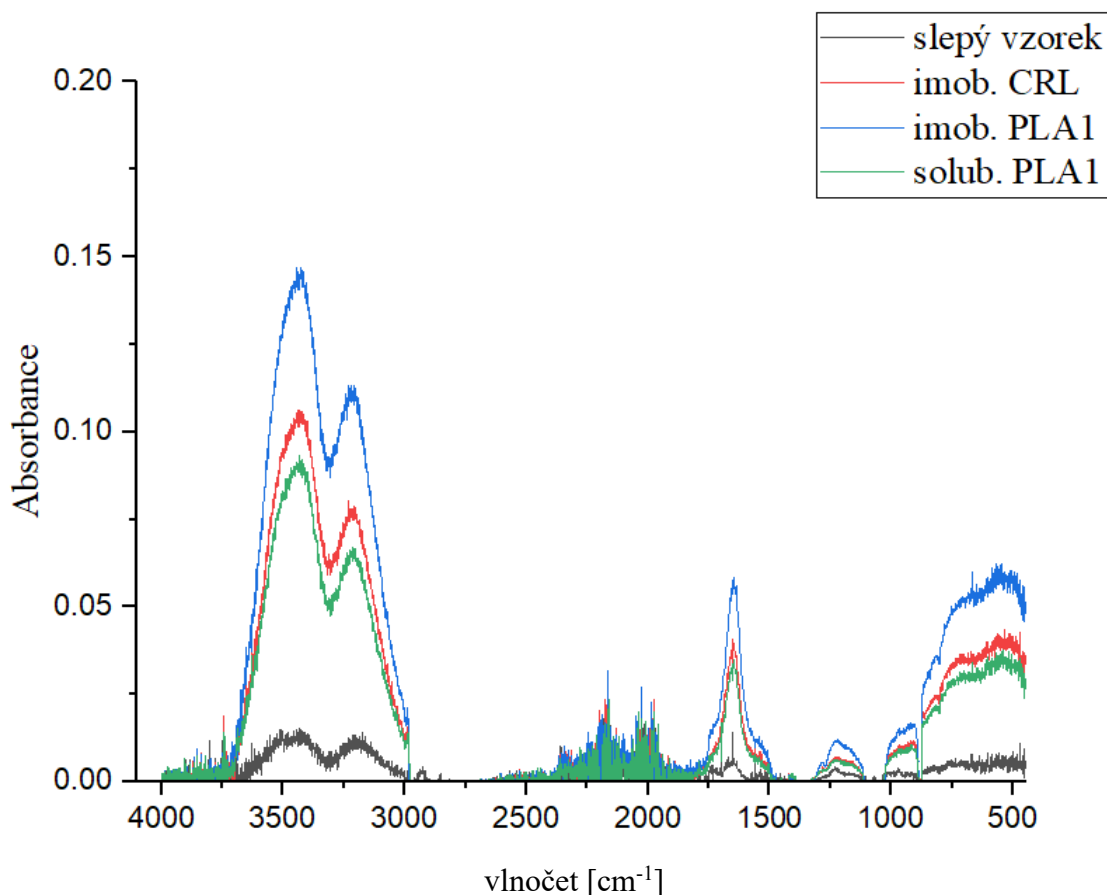
Obrázek 13: IČ spektrum vzorků odebraných po hydrolytické reakci. Reakční směs: 50 mg sójového fosfolipidu rozpuštěného v ethanolu, 200 $\mu\text{g/ml}$ solubilního nebo imobilizovaného enzymu, přidavek 25 mmol/l CaCl_2 . Slepý vzorek: 50 mg fosfolipidu v ethanolu a přidavek 25 mmol/l. Reakční podmínky teplota 40 $^\circ\text{C}$, pH = 5. CRL – *Candida rugosa* lipasa, PLA – fosfolipáza A

Bylo zvoleno IČ spektrum odebraných vzorků po hydrolytické reakci, která probíhala v reakční směsi 50 mg sójového fosfolipidu rozpuštěného v ethanolu s obsahem 200 $\mu\text{g/ml}$ enzymu v solubilní nebo imobilizované formě a přidavkem 25 mmol/l chloridu vápenatého.

V oblasti charakteristických frekvencí (3300-1900 cm^{-1}) byly identifikovány absorpční pásy: (i) OH skupiny (3700-3000 cm^{-1}) (ii) C-H skupiny alkanů (3000-2700 cm^{-1}) (iii) dvojná vazba

mezi uhlíkem a kyslíkem ($1750-1500\text{ cm}^{-1}$). V absorpčním pásu $2380-1850\text{ cm}^{-1}$ se nacházela odezva diamantového ATR modulu.

Protože všechny vzorky obsahovaly ethanol, který sloužil jako rozpouštědlo, bylo změřeno samostatné spektrum ethanolu a následně bylo od spektra vzorků odečteno (Obrázek 14).



Obrázek 14: IČ spektrum vzorků odebraných po hydrolytické reakci po odečtení spektra samotného ethanolu. Reakční směs: 50 mg sójového fosfolipidu rozpuštěného v ethanolu, 200 $\mu\text{g/ml}$ solubilního nebo imobilizovaného enzymu, přídavek 25 mmol/l CaCl_2 . Slepý vzorek: 50 mg fosfolipidu v ethanolu a přídavek 25 mmol/l CaCl_2 . Reakční podmínky teplota $40\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$. CRL – *Candida rugosa* lipasa, PLA – fosfolipáza A

Po odečtení IČ spektra samotného ethanolu je patrné, že došlo k mírnému nárůstu OH skupin, to může být způsobeno u solubilního enzymu přítomností OH skupin v molekule enzymu a u imobilizovaného enzymu mohlo dojít k zachycení vody v pórech částic, kterou byly promývány. Toto by bylo možné eliminovat promytím částic alespoň 5x ethanolom. Také v oblasti dvojné vazby mezi uhlíkem a kyslíkem došlo k nárůstu, to mohlo být způsobeno oddělením mastné kyseliny na sn-1 poloze, ale pro potvrzení by byla za potřebí přesnější analýza vzorku. Nelze tedy jednoznačně určit, zda byla reakce úspěšná, či nikoliv.

4 ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývá využitím enzymu fosfolipázy A1 v oleochemii v porovnání s homogenní katalýzou, zejména hydrolytickým štěpením pro výrobu mastných kyselin. Byl ověřen vliv vybraných reakčních podmínek pro přípravu mastných kyselin pomocí enzymatické katalýzy a alkalické hydrolýzy a jejich srovnání.

Teoretická část popisuje různá využití a způsoby získávání lipidů a způsoby přípravy mastných kyselin z olejů homogenní a enzymatickou katalýzou. Zabývá se klasifikací fosfolipáz a bližším popisem fosfolipázy A1 a jejího působení. Cílem bylo popsat rozdíl enzymatické a homogenní katalýzy a jejich výhody a nevýhody pro přípravu mastných kyselin a ovlivnění hydrolytické aktivity solubilního enzymu fosfolipázy A1 z *Aspergillus oryzae* teplotou a pH prostředí.

V experimentální části byl otestován vliv přidaného množství fosfolipidu k oleji na výsledné množství vzniklých mastných kyselin. Pro homogenní přeměnu bylo stanovením čísla kyselosti dokázáno, že k přeměně oleje na mastné kyseliny došlo téměř ze 100 %. Ze získaných infračervených spekter vzorků připravených zmýdlením bylo patrné, že přítomnost fosfolipidu v oleji neměla na reakci vliv.

Z výsledků vlivu prostředí na aktivitu enzymu bylo patrné, že solubilní fosfolipáza nejlépe reaguje při 30 °C v oblasti neutrálního pH. Z infračervených spekter vzorků odebraných po enzymatické hydrolýze nebylo možné blíže určit, zda ke štěpení došlo nebo ne. Bylo by za potřebí vzorek přesněji analyzovat např. chromatograficky. Také nebylo otestováno širší spektrum experimentálních podmínek, nelze tedy dojít k jasnému závěru, zda a do jaké míry přeměna na mastné kyseliny proběhla.

Téma enzymatické hydrolýzy fosfolipidů jako šetrnější variantu homogenní hydrolýzy je momentálně velice atraktivní. Využití imobilizované fosfolipázy z *Aspergillus oryzae* k tomuto účelu zatím nebylo předmětem rozsáhlejšího výzkumu.

Citovaná literatura

1. **Das, U. N.** Essential fatty acids: Biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnology Journal*. 2006, 1, 420-439.
2. E-chembook. Dostupné z: <http://e-chembook.eu/cz/biochemie/Lipidy.pdf>. [duben 2024]
3. **Kodíček, M., Valentová, O. a Hynek, R.** *Biochemie chemický pohled na biologický svět*. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2022. 147-149. ISBN 9788070809273.
4. **Bockisch, M.** *Fats and oils handbook*. Amsterdam: Elsevier, 2015. ISBN 9780128043554.
5. **Simon, E. W.** Phospholipids and plant membrane permeability. *New Phytologist*. 1974, 73, stránky 377-420.
6. **Tomková, Hana.** Analytické metody pro výzkum fosfolipidů. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2017.
7. **Hodson, L., Skeaf, M. C. a Fielding, B. C.** Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Progress in lipid research*. 2008, 47, 348-380.
8. **Stevens, C. a Verhé, R.** *Renewable bioresources: Scope and modification for non-food application*. New Jersey : John Wiley & Sons, 2004. 227-249. ISBN 9780470021040.
9. **Hill, K.** Fats and oils as oleochemical raw materials. *Pure and applied chemistry*. 2000, 72, 1255-1264.
10. **Kunik, O. a Saribekova, D.** Emulsions based on fatty acids from vegetable oils for cosmetics. *Industrial crops and products*. 2022, 189.
11. **Cui, L. a Decker, E.** Phospholipids in foods: Prooxidants or antioxidants? *Journal of the science of food and agriculture*. 2016, 96.
12. **van Hoogevest, Peter a Wendel, Armin.** The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *European journal of lipid science and technology*. 2014, 116.
13. **van Hoogevest, P. a Fahr, A.** *Nanocosmetics: Phospholipids in Cosmetic Carriers*. Berlín : Springer Nature, 2019. ISBN 9783030165734.
14. **Hou, C. T. a Shaw, J-F.** *Biocatalysis and Biomolecular Engineering*. USA : John Wiley & Sons, 2010. ISBN 9780470920831.
15. **Harwood, J. L. a Gurr, M. I.** *Lipid biochemistry: An introduction*. Berlín : Springer Science & Business Media, 2013. ISBN 9781461538622.
16. **Rustan, A. C. a Dreven, C. A.** Fatty acids: structure and properties. *Encyclopedia of life sciences*. 2005.
17. **Ahmad, M.** *Fatty acids: Chemistry, synthesis and application*. Amsterdam : Elsevier, 2017. stránky 28-29. ISBN 9780128095447.
18. **Satyarthi, J. K., Srinivas, D. a Ratnasamy, P.** Hydrolysis of vegetable oils and fats to fatty acids over solid acid catalysts. *Applied catalysis: General*. 2011, 391, 427-435.

19. **Ngaosuwan, K. a Lotero, E.** *Industrials & engineering chemistry research*. 2009.
20. **Stirton, A. J., Hammaker, E. M. a Herb, S. F.** Comparison of fat splitting reagents in the twitchell process. *Oil soap*. 1944, 21.
21. **Mercantili, L., davis, F. a Higson, S. P. J.** Ultrasonic initiation of the alkaline hydrolysis of triglycerides (saponification) without phase catalysis. *Journal Durfact Deterg.* 2014, 17, 133-141.
22. **Hendke, P., Lynch, S. A. a Gill, R. T.** Application and engineering of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli* for advanced fuels and chemicals. *metabolic Engineering*. 2011, 13.
23. **Kelm, G. R. a Wickett, R. R.** *Fatty acids*. USA : AOCS, 2017. 385-404. ISBN 9780128095218.
24. **Cerminati, S. a Paoletti, L.** Industrial uses of phospholipases: Current state and future applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019.
25. **Wilton, D. C.** *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. [editor] Dennis E. Vance a Jean E. Vance. Amsterdam : Elsevier, 2008. 305-329. ISBN 9780444532190.
26. *E-learning VSCHT*. Dostupné z: https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/kriticka_micelarni_koncentrace.html. [květen 2024]
27. **Yu, D. a Ying, M.** Characterization of immobilized phospholipase A1 on magnetic nanoparticles for oil degumming application. *LWT - Food Science and Technology*. 2013, 50.
28. **Xiang, L. a Chen, J-F.** Production of structured phosphatidylcholine with high content of DHA/EPA by Immobilized Phospholipase A1-Catalyzed Transesterification. *International journal of molecular science*. 9, 2014.
29. **Shunian, L. a Weining, W.** A new strategy for magnetic immobilized phospholipase A1 and its application in soybean oil degumming: Multipoint covalent binding. *LWT*. 2023, 186.
30. **Richmond, G. S. a Smith, T. K.** Phospholipases A1. *International Journal of Molecular Science*. 2011, 12, 588-612.
31. **Aoki, J. a Inoue, A.** Structure and function of extracellular phospholipase A1 belonging to the pancreatic lipase gene family. *Biochimie*. 2007, 89, 197-204.
32. **Schmitt, H. a Heirman, M.** *Enzymatic modification of lecithin*. 7189544B2 US, 2007.
33. **Yamamoto, T., a další, a další.** *Hen eggs: Basic and applied science*. USA : CRC Press, 2018. ISBN 9780849340055.
34. **Goesaert, H. a Brijs, K.** Wheat flour constituents: How they impact bread quality and how to impact their functionality. *Trends in Food Science and Technology*. 2005, 16.
35. **Lam, M. K., Lee, K. T. a Mohamed, A. R.** Homogenous, heterogenous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid iol to biodiesel. *Biotechnology advances*. 2010, 28.

36. **Abdelmoez, W., Mostafa, N. A, a Mustafa, A.** Utilization of oleochemical industry residues as substrates for lipase production for enzymatic sunflower oil hydrolysis. *Journal of Cleaner production*. 2013, 59.
37. **Ferreira, M.M., de Oliveira, G.F. a Basso, R.C.** Optimization of free fatty acid production by enzymatic hydrolysis of vegetable oils using a non-commercial lipase from *Geotrichum candidum*. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2019, 42.
38. **Caetano, N. S., Teixeira, J. I. M. a Mata, T. M.** Enzymatic catalysis of vegetable oil with ethanol in the presence of co-solvents. *Chemical engineering transaction*. 2012, 26.
39. *wikiskripta*. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Stanoven%C3%AD_enzymov%C3%A9_aktivit%C3%BD. [květen 2024]
40. *studiumbiochemie*. Dostupné z: http://www.studiumbiochemie.cz/prirodni_latky_enzymy.html#8. [květen 2024]
41. *VŠCHT*. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~koplikr/%c4%8c%c3%a1stB5.pdf>. [květen 2024]
42. **Gaughlitz, G.** *Handbook of Analytical techniques*. New Jersey : Wiley & sons, 2001. 419-463. ISBN 9783527301652.
43. **Perkampus, H.** *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications*. Berlín : Springer science & Business media, 2013. 11-13. ISBN 9783642774775.
44. **Hsu, C-P. S.** Infrared spectroscopy. *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*. 1997, 249.
45. **Staveley, L. A. K.** *The Characterization of Chemical Purity: Organic Compounds*. Amsterdam : Elsevier, 2016. 149-155. ISBN 9781483279992.
46. **Alam, P., Rabbani, G. a Bard, G.** The surfactant-induced conformational and activity alterations in *Rhizopus niveus* lipase . *Cell biochemistry and biophysics*. 2015, 71.
47. **Song, J. K. a Rhee, J. S.** Simultaneous Enhancement of Thermostability and Catalytic Activity of Phospholipase A1 by Evolutionary Molecular Engineering. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, 66.