



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**PRODUKCE KAROTENOIDŮ KVASINKAMI
KULTIVOVANÝMI NA ODPADNÍM TUKU**

PRODUCTION OF CAROTENOIDS GROWN ON WASTE FAT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Jiří Holub

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1294/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Jiří Holub**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Produkce karotenoidů kvasinkami kultivovanými na odpadním tuku

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) literární rešerše zaměřená zejména na možnosti využití lipidických substrátů mikroorganismy a na metabolismus karotenogenních kvasinek
- 2) kultivace vybraných druhů kvasinek na médiích s různým obsahem odpadního tuku
- 3) stanovení růstových a metabolických charakteristik kvasinek, produkce karotenoidů
- 4) vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 28.5.2018

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

Jiří Holub
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Karotenoidy jsou lipidické látky, převážně pigmenty obsažené v rostlinách a mikroorganismech. Karotenoidy jsou známé pro svoje antioxidační účinky. Lipidy jsou převážně nepolární látky, které jsou esenciální a vyskytují se ve všech typech organismů.

Práce byla provedena formou rešeršní i praktickou. Pojednávávala o produkci karotenoidních barviv a různých lipofilních látek kvasinkami *Rhodotorula glutinis*, *Rhodosporidium toruloides* a *Sporidiobolus metaroseus*, kultivovanými v médiích vyrobených z odpadního tuku živočišného původu či z glycerolu. Práce se dále zabírala metodami získávání lipidických látek z mikroorganismů a následnou analýzou vzorků plynovou či kapalinovou chromatografií. Hlavním úkolem práce bylo zjistit, které typy médií a které z daných druhů kvasinek byly nejvhodnější pro produkci lipidických látek.

Pro produkci lipidických látek na glycerolových médiích byl shledán jako nejlepší kmen *Rhodosporidium toruloides*, který zároveň vykazoval nejvyšší koncentrace karotenoidů na tukových a hydrolyzovaných tukových médiích.

Klíčová slova: kvasinka, karotenoid, odpadní tuk, glycerol, kultivace, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodosporidium toruloides*, *Sporidiobolus metaroseus*

Abstract

Carotenoids are lipid-soluble pigments which are contained in plants and microorganisms. Carotenoids are known for their antioxidant effects. Lipids are predominantly non-polar substances, which are essential and present in all types of organisms.

The research was made by theoretical and practical form. It was dealing with production of carotenoids pigments and different lipophilic substances by yeasts of *Rhodotorula glutinis*, *Rhodosporidium toruloides* and *Sporidiobolus metaroseus*, cultivated in media containing waste fat or glycerol. Further, methods for obtaining lipid substances from microorganisms and with further analysis of samples by gas or liquid chromatography were optimized. The main task of the research was to find out which types of media and yeasts are the most suitable for production of lipid substances.

For production of lipid substances in glycerol media, as the best producing strain *Rhodosporidium toruloides* was found, which simultaneously reported the highest concentrations of carotenoids on fatty and fatty hydrolyzed media.

Key words: yeast, carotenoid, waste fat, glycerol, cultivation, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodosporidium toruloides*, *Sporidiobolus metaroseus*

HOLUB, J. *Produkce karotenoidů kvasinkami kultivovanými na odpadním tuku*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 71 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

Prohlášení

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

.....
podpis studenta

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucí práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. a odbornému konzultantovi Ing. Martinu Szotkowskému za vedení a pomoc v průběhu řešení problematiky bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za veškerou podporu během celého bakalářského studia.

Obsah

1	Úvod	9
2	Teoretická část	10
2.1.	Karotenoidy	10
2.1.1.	Chemická struktura karotenoidů	10
2.1.2.	Význam karotenoidů	11
2.1.3.	Biosyntéza karotenoidů	11
2.2.	Lipidy	13
2.2.1.	Mastné kyseliny	13
2.2.2.	Syntéza a odbourávání mastných kyselin	14
2.2.3.	Ergosterol	15
2.3.	Lipofilní látky	16
2.3.1.	Ubichinon (koenzym Q)	16
2.4.	Kvasinky	16
2.4.1.	Struktura kvasinkové buňky	17
2.5.	Rozmnožování kvasinek	18
2.5.1.	Vegetativní rozmnožování	18
2.5.2.	Pohlavní rozmnožování	18
2.5.3.	Růstová křivka	19
2.6.	Karotenogenní kvasinky	20
2.6.1.	Rod Rhodotorula	20
2.6.2.	Rod Sporobolomyces	21
2.7.	Substráty	21
2.7.1.	Odpadní substráty při produkci karotenoidů	21
2.7.2.	Živočišné odpadní tuky	22
2.7.3.	Glycerol	22
2.7.4.	Kultivace kvasinek	22
2.7.5.	Bioreaktor	23
2.8.	Metody získávání metabolitů	23
2.8.1.	Dezintegrace	23
2.8.1.1.	Mechanické metody	23
2.8.1.2.	Chemické metody	24
2.9.	Extrakce	24
2.10.	Metody analýzy buněčných složek	24
2.10.1.	Absorpční spektrofotometrie	24

2.10.2.	HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie).....	24
2.10.3.	GC (plynová chromatografie).....	25
3	Cíl práce.....	26
4	Experimentální část.....	27
4.1.	Použité chemikálie.....	27
4.1.1.	Chemikálie použité ke kultivaci kvasinek.....	27
4.1.2.	Chemikálie použité k hydrolyze tuku.....	27
4.1.3.	Chemikálie potřebné pro extrakci karotenoidů.....	27
4.1.4.	Chemikálie potřebné pro analýzu karotenoidů.....	27
4.2.	Použité pomůcky a přístroje.....	27
4.2.1.	Přístrojová technika a pomůcky pro kultivaci buněk.....	27
4.2.2.	Přístrojová technika a pomůcky pro izolaci a analýzu karotenoidů a lipidů.....	28
4.3.	Použité druhy kvasinek.....	28
4.4.	Kultivace vybraných druhů kvasinek.....	28
4.4.1.	Vnější podmínky.....	28
4.4.2.	Inokulum I.....	28
4.4.3.	Inokulum II.....	29
4.4.4.	Produkční média.....	29
4.4.5.	Hydrolyza odpadního živočišného tuku.....	30
4.4.5.1.	Bazický hydrolyzát.....	30
4.4.5.2.	Kyselý hydrolyzát.....	30
4.4.5.3.	Enzymatický hydrolyzát.....	30
4.4.6.	Bioreaktor (fermentor).....	31
4.5.	Zpracování biomasy.....	32
4.5.1.	Stanovení biomasy.....	32
4.5.2.	Uskladnění biomasy.....	32
4.5.3.	Extrakce.....	32
4.5.4.	Analýza vzorků na HPLC.....	32
4.5.5.	Transesterifikace a příprava vzorků na GC.....	33
4.5.6.	Analýza lipidů na GC.....	34
5	Výsledky a diskuze.....	35
5.1.	Stanovení biomasy.....	35
5.2.	Stanovení produkčních vlastností daných kmenů kvasinek na HPLC.....	35
5.2.1.	Produkční vlastnosti kmene <i>Rhodotorula glutinis</i>	35
5.2.1.1.	Vlastnosti kultivací bez stočení při očkování produkčních médií.....	35
5.2.1.2.	Vlastnosti kultivací se stočením při očkování produkčních médií.....	36

5.2.1.3.	Srovnání vlastností kultivací se zařazením centrifugace a bez něj.....	37
5.2.1.4.	Vlastnosti kultivací na hydrolyzáttech.....	37
5.2.2.	Produkční vlastnosti kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i>	38
5.2.2.1.	Vlastnosti kultivací bez stočení při očkování produkčních médií.....	38
5.2.2.2.	Vlastnosti kultivací se stočením při očkování produkčních médií	39
5.2.2.3.	Srovnání vlastností kultivací se zařazením centrifugace a bez něj.....	40
5.2.2.4.	Vlastnosti kultivací na hydrolyzáttech.....	40
5.2.2.5.	Vlastnosti kultivace ve fermentoru.....	41
5.2.3.	Produkční vlastnosti kmene <i>Sporodiobolus metaroseus</i>	42
5.2.3.1.	Vlastnosti kultivací bez stočení při očkování produkčních médií.....	42
5.2.3.2.	Vlastnosti kultivací se stočením při očkování produkčních médií	43
5.2.3.3.	Srovnání vlastností kultivací se zařazením centrifugace a bez něj.....	44
5.2.3.4.	Vlastnosti kultivací na hydrolyzáttech.....	44
5.3.	Stanovení produkčních vlastností daných kmenů kvasinek na GC	45
5.3.1.	Produkční vlastnosti kmene <i>Rhodotorula glutinis</i>	45
5.3.1.1.	Poměrové zastoupení typů mastných kyselin.....	45
5.3.1.2.	Množství biomasy a procentuální celkové zastoupení tuku v biomase ..	47
5.3.2.	Produkční vlastnosti kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i>	48
5.3.2.1.	Poměrové zastoupení typů mastných kyselin.....	48
5.3.2.2.	Množství biomasy a procentuální celkové zastoupení tuku v biomase ..	49
5.3.3.	Produkční vlastnosti kmene <i>Sporodiobolus metaroseus</i>	51
5.3.3.1.	Poměrové zastoupení typů mastných kyselin.....	51
5.3.3.2.	Množství biomasy a procentuální celkové zastoupení tuku v biomase ..	52
5.4.	Spojené charakteristiky růstu biomasy a produkce metabolitů	53
5.4.1.	Charakteristika kmene <i>Rhodotorula glutinis</i>	54
5.4.1.1.	Glycerolová média.....	54
5.4.1.2.	Tuková média	54
5.4.1.3.	Média vytvořená z hydrolyzátů	54
5.4.2.	Charakteristika kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i>	55
5.4.2.1.	Glycerolová média.....	55
5.4.2.2.	Tuková média	55
5.4.2.3.	Média vytvořená z hydrolyzátů	55
5.4.2.4.	Fermentor	56
5.4.3.	Charakteristika kmene <i>Sporidiobolus metaroseus</i>	56
5.4.3.1.	Glycerolová média.....	56
5.4.3.2.	Tuková média	56

	5.4.3.3. Média vytvořená z hydrolyzátů.....	57
6	Závěr.....	58
7	Literatura	60
8	Seznam použitých zkratk	62
9	Přílohy	63

1 Úvod

V dnešní době postupně narůstá poptávka po vitamínech a potravních doplňcích, mezi které se řadí i karotenoidy či nenasycené mastné kyseliny. Z tohoto důvodu se hledají nové způsoby, jak zefektivnit a zlevnit jejich produkci. Produkce karotenoidů je řešena formou velkokapacitních kultivací karotenogenních kvasinek, přičemž její zlevnění je možné provést využitím odpadních látek, jako substrátů pro kultivaci zmíněných kvasinek. Jako odpadní substrát by mohl posloužit glycerol, který vzniká jako odpadní produkt při výrobě biopaliv, živočišné tuky, jež vznikají jako odpadní produkty při živočišné výrobě nebo syrovátka, která vzniká jako odpadní produkt při výrobě mléčných výrobků.

Základ karotenoidů tvoří osm izoprenových podjednotek, proto se řadí mezi tertaterpeny, které patří k početné skupině přírodních pigmentů a barviv. V přírodě jsou v největší míře syntetizovány u fotosyntetizujících organismů, jako jsou například rostliny, ale můžeme je také nalézt u mikroorganismů, jež fotosyntézu neprovádí, kupříkladu u kvasinek. Živočichové si karotenoidy sami syntetizovat neumí, proto je musí přijímat v potravě. Řada karotenoidů jsou prekurzory hormonů a některé, zvané karoteny, jsou prekurzory vitamínu A.

Kvůli specifickým vlastnostem jsou karotenoidy hojně využívány v různých oborech lidského působení. V zemědělství se používají jako krmné suplementy, v potravinářském průmyslu slouží pro výrobu potravinových doplňků a potravinářských barviv a ve farmaceutickém průmyslu jako prostředek pro snížení rizika vzniku nádorů.

2 Teoretická část

2.1. Karotenoidy

Jsou to žluté a oranžové pigmenty rostlin, hub, řas a mikroorganismů rozpustné v tucích. Stejně jako u zeleného barviva se karotenoidy vyskytují ve všech rostlinných pletivech provádějících fotosyntézu a některých fototrofních organismech, kde jsou přítomny jako fotochemické aktivní látky chloroplastů, jejichž funkcí je absorpce světla a jeho předání do reakčního centra chlorofylu, který svým zeleným zbarvením maskuje jednotlivé barvy karotenoidů.

2.1.1. Chemická struktura karotenoidů

Karotenoidy se kvůli své struktuře (skládají se z 8 izoprenových jednotek) řadí mezi triterpeny. Molekuly karotenoidů jsou obvykle tvořeny polyenovým řetězcem obsahující 40 uhlíkových atomů. Jejich barevnost je dána konjugací vazeb v polyenovém řetězci, které se vyskytují převážně v trans konfiguraci. Karotenoidy jsou na základě jejich složení rozděleny na dvě významné podskupiny.

První podskupinou jsou karoteny. Jsou to karotenoidy, jež obsahují ve svých řetězcích pouze uhlík a vodík. Karoteny jsou známé svým oranžovo – červeným zbarvením. Mezi nejznámější zástupce patří karoten, lykopen.

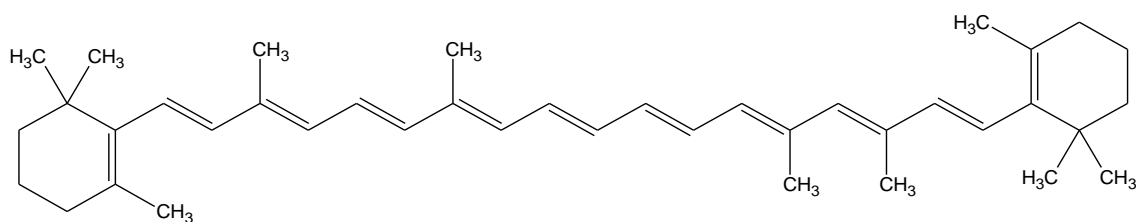
Druhou podskupinou jsou karotenoidy, jež obsahují na svém uhlovodíkovém řetězci vázaný kyslík. Kyslíkaté deriváty karotenů se nazývají xantofyly, které jsou příznačné žlutým zbarvením. Mezi významné druhy xantofylů patří lutein, violaxantin, kantaxantin.

Další dělení karotenoidu je určeno dle struktury jejich řetězců. Řetězce mohou být acyklické, nebo zakončené na jedné nebo obou stranách zacyklením. Podle zakončení uhlíkatého řetězce je lze rozdělit na tři skupiny:

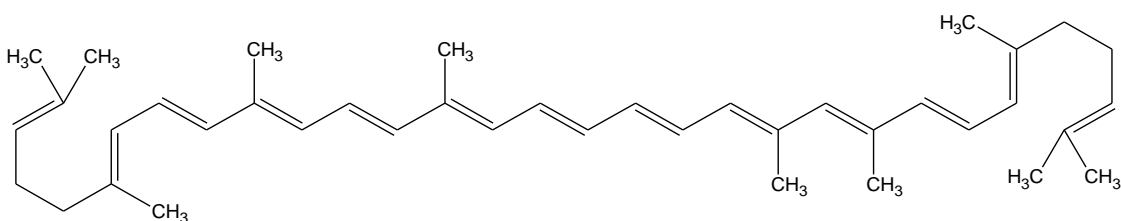
- První jsou acyklické karotenoidy, jejichž zakončení je tvořeno lineárními řetězci. (δ -karoten, lykopen, neurosporen)
- Druhé jsou monocyklické, u nichž jeden konec řetězce obsahuje pěti nebo šestičlenný cyklus. (torulen, tolularhodin, γ -karoten)
- Třetí jsou dicyklycké, u kterých jsou oba konce zacyklené. (β -karoten)

Chemická struktura karotenoidů je velmi pestrá, díky možnostem polohy dvojných vazeb na polyenovém řetězci a jejich reakcemi s různými skupinami, například hydrogenace, cyklizace či izomerace. Obrázek 1 vyobrazuje strukturu základních karotenoidů [1],[2].

β -karoten:



lykopen:



Obrázek 1: Struktura β -karotenu a lykopenu [3]

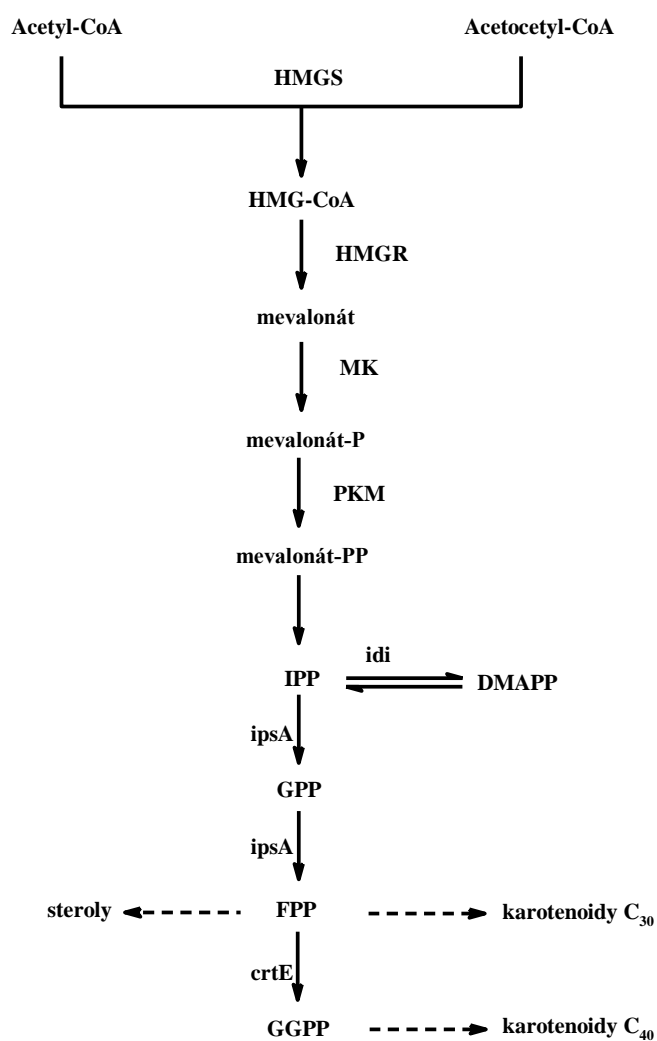
2.1.2. Význam karotenoidů

Karotenoidy, jakožto barviva, mají funkci přenašeče světla v rozmezí vlnových délek 400 až 500 nm ve fotosyntetizujících buňkách, dále chrání buňky před škodlivým ultrafialovým zářením. Díky vyššímu počtu násobných vazeb jsou karotenoidy silné antioxidanty schopné reagovat s volnými radikály vyskytujícími se v organismu. Volné radikály mohou způsobovat v organismu trvalé změny některých biologicky významných sloučenin, jako jsou nukleové kyseliny, či proteiny, což může vést k zásadnímu poškození buněk, tkání nebo k nádorovému onemocnění.

2.1.3. Biosyntéza karotenoidů

Karotenogenní kvasinky jsou kultivovány v kultivačních médiích, jež obsahují dostatečné množství uhlíku a dusíku pro produkci biomasy, a zvláště karotenoidů. Biosyntetická dráha karotenoidů probíhá podle obecné metabolické dráhy pro izoprenoidy a začíná u aktivní formy kyseliny octové, tzv. acetylkoenzymu A. Postupnou kondenzací acetylkoenzymu A vzniká acetoacetylkoenzym A, který kondenzuje s další molekulou acetylkoenzymu A na 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A, jehož redukcí vzniká kyselina mevalonová která je následně fosforylována a dekarboxylována za vzniku isopentenyl-difosfátu, který představuje tzv. „aktivní izoprenoidní jednotku“. Ze dvou izoprenoidních jednotek spojených způsobem „hlava-pata“ vzniká geranyl-difosfát. Ten kondenzuje s další molekulou izopentenyldifosfátu za vzniku farnesyldifosfátu.

Prodloužením molekuly farnesyldifosfátu kondenzací s další molekulou izopentenyldifosfátu vzniká geranylgeranyldifosfát s 20 atomy uhlíku v molekule. Redukční kondenzací dvou molekul geranylgeranyldifosfátu způsobem „pata-pata“ vzniká nejjednodušší karotenoid, resp. karoten, fytoen, který jako prekurzor tetraterpenů (karotenoidů) podléhá postupně dehydrogenaci za vzniku „all-trans“ konfigurace karotenoidů. Schéma biosyntézy karotenoidů vyobrazuje Obrázek 2 [4], [5], [6].



Obrázek 2: Biosyntetická dráha vedoucí k tvorbě karotenoidů [4]

2.2. Lipidy

Lipidy jsou velmi heterogenní skupina organických látek, které se nachází v organismech, a jejichž většina není téměř vůbec rozpustná ve vodě. V buňkách zastávají mnoho důležitých funkcí:

- Funkce stavební: Lipidy jsou jedny ze základních buněčných stavebních látek, například fosfolipidy, mezi něž patří difosfatidylglyceroly či sfingomyeliny, které tvoří buněčné obalové struktury a biomembrány.
- Funkce zásobní: Lipidy, zejména mastné kyseliny, mají vysokou energetickou hodnotu, jejich metabolické odbourávání se nazývá β -oxidace.
- Funkce metabolická: V buňkách slouží lipidy jako rozpouštědla důležitých nepolárních látek, kterými jsou například vitamíny A, D, E, K, či hormony.
- Funkce ochranná: U vyšších organismů zastávají tukové tkáně ochranu před vnějšími vlivy, slouží například jako termoizolace.

Pod lipidy se řadí:

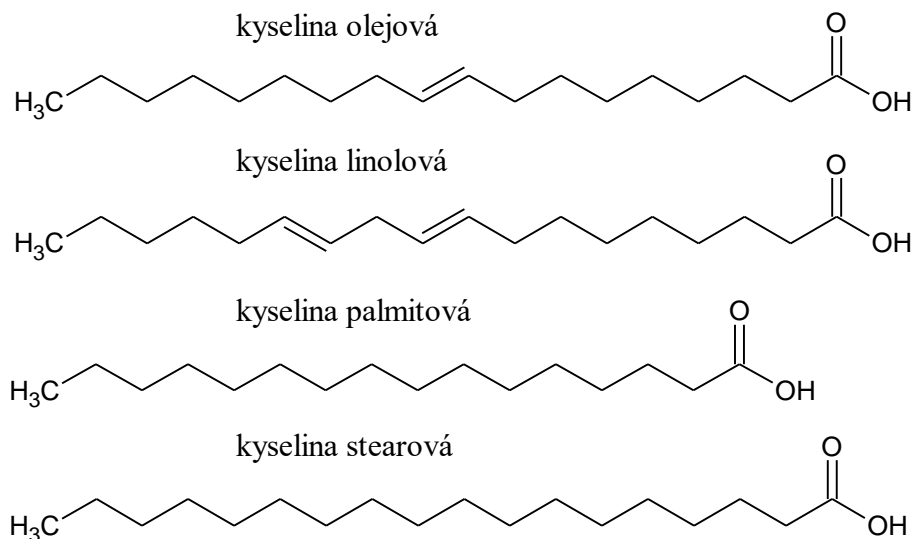
- Jednoduché lipidy, což jsou estery mastných kyselin a alkoholů, které se dále dělí na tuky a vosky, přičemž tuky jsou estery mastných kyselin a glycerolu a vosky se skládají z mastné kyseliny a esterově vázaného vyššího alkoholu.
- Složené lipidy, které kromě esterově vázané mastné kyseliny a alkoholu obsahují také jiné skupiny, jimiž jsou fosfátová skupina u fosfolipidů, cukerná skupina u glykolipidů a u ostatních složených lipidů tomu jsou sulfonová, proteinová či aminoskupina, které náleží sulfolipidům, lipoproteinům či aminolipidům.
- Prekursory a odvozené lipidy, jež zahrnují mastné kyseliny, steroidy, alkoholy včetně sterolů a glycerolu, mastné aldehydy a ketolátky, v tucích rozpustné vitamíny a hormony.

V našem případě se zájem obrací na mastné kyseliny, ergosterol a vitamíny rozpustné v tucích (viz Karotenoidy) [3].

2.2.1. Mastné kyseliny

Základní součástí lipidů jsou mastné kyseliny, jichž se v přírodě nachází více než 50. Kyseliny s více než 10 až 12 uhlíky se v buňce nemohou vyskytovat dlouhodobě samostatně, neboť jejich vysoká povrchová aktivita by poškozovala biologické struktury, proto se váží esterově s glycerolem za tvorby acylglycerolů. Výjimkou je přechodný stav při hydrolytickém štěpení tuků.

Mastné kyseliny se podle obsahu dvojných vazeb rozdělují na nasycené, jež obsahují pouze jednoduché vazby, nebo nenasycené, které obsahují nejméně jednu dvojnou vazbu. Převážná většina přírodních mastných kyselin je tvořena sudým počtem uhlíku. Nejběžnějšími zástupci nasycených mastných kyselin jsou kyselina palmitová (16:0) či kyselina stearová (18:0). Významnými zástupci nenasycených mastných kyselin jsou kyselina olejová (18:1^{Δ9}), či kyselina linolová (18:1^{Δ9,12}). Jmenované kyseliny vyobrazuje Obrázek 3 [6].

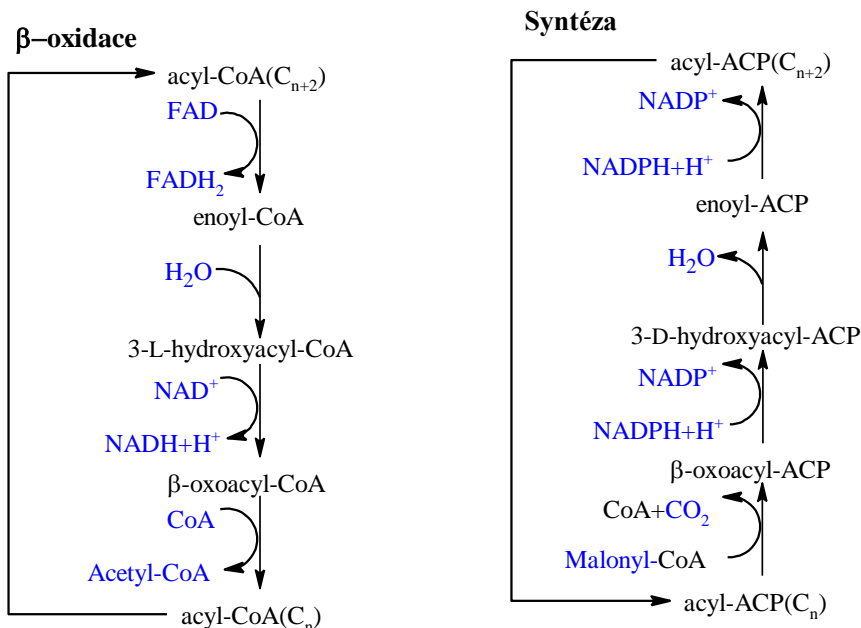


Obrázek 3: Struktury kyselin olejové, linolové, palmitové a stearové [6]

2.2.2. Syntéza a odbourávání mastných kyselin

Mastné kyseliny se syntetizují v buněčné cytoplazmě kondenzačními reakcemi z malonyl-CoA vzniklého z acetyl-CoA. Při každém cyklu se prodlouží řetězec mastné kyseliny vždy o dva atomy uhlíku. Vzniklý poly-β-oxo řetězec se před připojením další molekuly acetyl-CoA skupiny zredukuje. Proto se mastné kyseliny v lipidech vyskytují mnohem častěji se sudým počtem atomů uhlíku, než mastné kyseliny s lichým počtem atomů uhlíku.

Odbourání mastných kyselin (β-oxidace) probíhá v mitochondriích, kde dochází k postupnému hydrolytickému zkracování řetězce mastné kyseliny. Jejich řetězec je přerušen mezi α a β uhlíkovým atomem. Molekuly acyl-CoA jsou při β-oxidaci štěpeny od karboxykonce, což vede k uvolnění C2 acetylového zbytku připojeného na nosič CoA. Syntézu a odbourání mastných kyselin značí Obrázek 4 [3],[5].

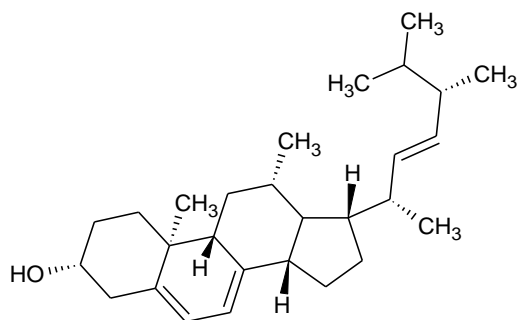


Obrázek 4: β -oxidace a syntéza mastných kyselin [3]

2.2.3. Ergosterol

Je organická sloučenina řadící se do skupiny sterolů (struktura ergosterolu viz Obrázek 5). Ergosterol je obsažen v buněčných strukturách hub a rostlin, kde odpovídá za fluiditu membrán. Při nedostatku ergosterolu dojde ke zvýšení polaritu membrány, což vede ke zvětšení pórů a buňka hyne. Ergosterol je považován za indikátor mykokontaminace, protože je ve velké míře produkován houbami, plísněmi a některými druhy kvasinek. Mikroorganismy produkující větší množství ergosterolu potřebují pro jeho produkci striktně aerobní prostředí, v anaerobním prostředí nejsou tudíž schopné růst z důvodu neschopnosti tvořit buněčnou membránu.

Ergosterol je provitaminem vitamínu D_2 ergokarciferolu, jenž vzniká z ergosterolu po ozáření UV zářením. Vitamin D_2 zajišťuje správné fungování metabolismu minerálních látek a tvorbu kostí u savců a ptáků. Ovlivňuje hladinu vápníku, fosforečnanů a parathyroidního hormonu v krevním séru [7].

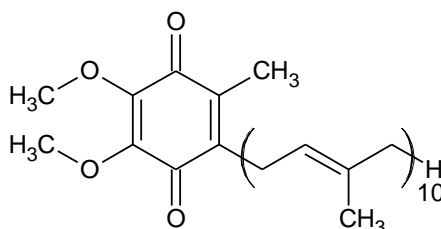


Obrázek 5: struktura ergosterolu

2.3. Lipofilní látky

2.3.1. Ubichinon (koenzym Q)

Ubichinon je lipofilní sloučenina, složená z benzochinonu a izoprenového řetězce (viz Obrázek 6), který je syntetizován metabolickou cestou kyseliny mevalonové. Ubichinon odpovídá za transport protonů a elektronů v dýchacím řetězci, dále se vyskytuje v membránách buněčných struktur, kde společně s vitamínem E brání peroxidaci lipidů. Při nedostatku ubichinonu trpí organizmy oxidačním stresem. Ubichinon se v rámci dýchacího řetězce redukuje na ubichinol, který je v konečné fázi řetězce oxidován zpátky na ubichinon [8].



Obrázek 6: struktura Ubichinonu (koenzymu Q10)

2.4. Kvasinky

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní organismy, patřící do říše houby (Fungi). Tvar buňky u kvasinek souvisí se způsobem vegetativního rozmnožování, taxonomií, okolním prostředím, či stářím buněk. Nejčastější tvar je elipsoidní, vejčitý až kulovitý. Vyskytuje se však i tvar trojúhelníkovitý (rod *Trigonopsis*) či válcovitý (rod *Schizosaccharomyces*).

2.4.1. Struktura kvasinkové buňky

Buňka kvasinky se ve vegetativním stavu skládá ze silné buněčné stěny, jemné cytoplazmatické membrány, cytoplazmy, jež kromě jádra obsahuje množství membránových struktur. Jádro je odděleno od cytoplazmy dvojitou membránou. U vegetativního stádia kvasinek se nevyskytují pohybové orgány (bičíky). Celé schéma buňky lze vidět na Obrázek 7 [9].

Buněčná stěna je útvar nacházející se na povrchu buňky, jenž udává její tvar. Buněčná stěna má silnou a pevnou strukturu a mezi její hlavní úkoly patří: chránit buňku před vnějšími mechanickými vlivy a osmotickým šokem. Sušina buněčné stěny obsahuje 80 % sacharidů, 6 až 10 % bílkovin, 3 až 10 % fosfolipidů a lipidů a dále fosforečnany vázané esterově na polysacharidy [9].

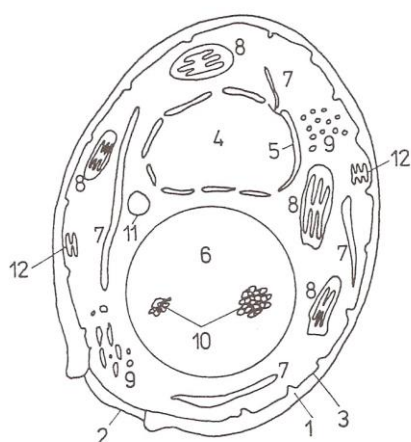
Cytoplazmatická membrána, je tenká vrstva při vnitřní straně buněčné stěny, která tvoří obal protoplastu, složena převážně z lipidů a proteinů. Plazmela je volně propustná pro malé molekuly, a tvoří proto osmotické rozhraní mezi buňkou a jejím prostředím. Dále je sídlem transportních mechanismů, umožňující obousměrný transport látek dovnitř i ven z buňky [9].

Cytoplazma je průhledná hmota, v níž se nachází endoplazmatické retikulum, obsahující systém membrán, které na vnější straně membrány syntetizuje v ribozomech bílkoviny a uvnitř obsahuje enzymy či zásobní látky. V Cytoplazmě se dále nacházejí mitochondrie, což jsou strukturální útvary rozmanitých tvarů a velikostí, které jsou sídlem dýchacích enzymů a systému oxidační fosforylace. Mitochondrie jsou nositelky mimojaderné dědičnosti, jelikož obsahují malé množství DNA a RNA [9].

Vakuola je složka cytoplazmy, většinou kulovitý útvar obklopený jednoduchou membránou. U mladých nebo pučících buněk jsou vakuoly přítomny ve větším počtu a jsou zpravidla malých rozměrů, naopak u starších buněk vyplňuje cytoplazmu jedna velká vakuola. Slouží jako rezervoár zásobních látek a enzymů, které se zrovna neúčastní metabolismu. Další funkce vakuoly spočívá v hydrolýze struktur s krátkým poločasem rozpadu, jejím živočišným ekvivalentem jsou lysozomy [9].

Golgiho aparát je další membránový útvar podobný plochému měchýřku, umístěný v cytoplazmě, sloužící k transportu prekurzorů struktur buněčné stěny z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu [9].

Jádro je odděleno od cytoplazmy dvojitou jadernou membránou s velkými póry a je umístěno přibližně ve středu buňky. Uvnitř haploidního jádra kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byl zjištěn obsah 16 chromozómů a u diploidního byl zjištěn dvojnásobek. V jádru kvasinek se těsně pod jadernou membránou nachází jadérko, jež je srpkovitého tvaru. Pólové tělísko vřetenka, které má tvar disku, se též nachází v jádře a slouží k tvorbě mikrotubuly, které spolu s tělískem tvoří důležitou roli při dělení jádra během rozmnožování buněk [9].



1. Buněčná stěna
2. Jizva zrodu
3. Cytoplazmatická membrána
4. Jádro
5. Jaderná membrána
6. Vakuola
7. Endoplazmatické retikulum
8. Mitochondrie
9. Glykogen
10. Volutin
11. Lipidy
12. Golgiho aparát

Obrázek 7: Schéma kvasinkové buňky [9]

2.5. Rozmnožování kvasinek

U kvasinek existují dva typy rozmnožování, vegetativní a pohlavní, které se u většiny kvasinek mezi sebou pravidelně střídají. Vegetativní rozmnožování se dále rozlišuje na pučení a dělení, pohlavní se liší tvorbou různých spor, askospor či bazidiospor [9].

2.5.1. Vegetativní rozmnožování

Většina rodů kvasinek se vegetativně rozmnožuje pučením. Při pučení je vznikající malá dceřiná buňka spojena kanálkem s mateřskou buňkou. Před pučením splývají membrány endoplazmatického retikula, pak dojde k jeho dělení, dále k opakovanému dělení vakuol a ke změně tvaru mitochondrií v dlouze protáhlé. Za současného mitotického dělení jádra a jeho migraci k pupenu, dochází k přesunu vakuol a mitochondrií také do nově vznikajícího pupenu. Spolu s jádrem přecházejí do pupenu i další složky cytoplazmy. Po dokončení přesunu dojde k uzavření kanálku mezi mateřskou a dceřinou buňkou, intenzivní syntéze endoplazmatického retikula, tvorbě nové buněčné stěny a spojení drobných vakuol v jedinou, čím je proces pučení u konce [9].

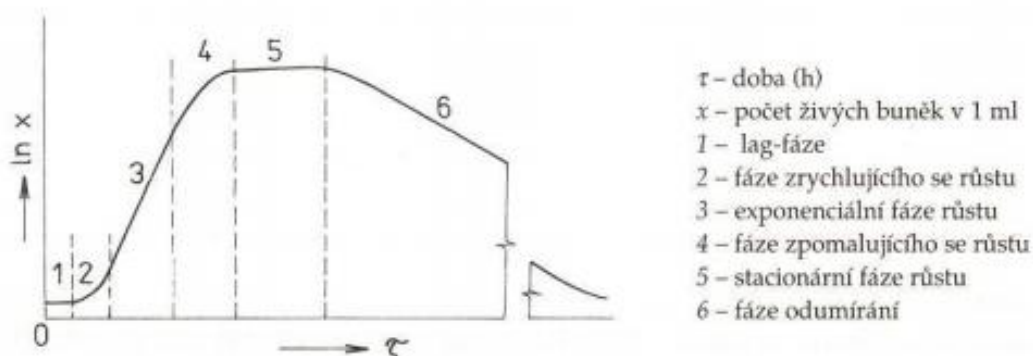
2.5.2. Pohlavní rozmnožování

Během pohlavního rozmnožování dochází k tvorbě spor, jež jsou u většiny kvasinek askospor, což jsou endospor, umístěné ve vřecku neboli asku. Tyto kvasinky zařazujeme mezi *Ascomycotina*. Některé rody tvoří spory vně sporotvorných buněk, ty se nazývají exospor. Tyto rody nazýváme *Basidiomycotina*.

Pohlavní rozmnožování kvasinek je charakterizováno jako spájení (konjugace) dvou haploidních buněk a spájení (karyogamie) jejich jader za vzniku diploidní buňky. Diploidní jádro se dále dělí redukčním dělením na čtyři haploidní jádra, jež jsou základem pro tvorbu pohlavních spor, nebo haploidní jádro pokračuje dále mitotickým dělením, a pak teprve dojde ke vzniku spor [9].

2.5.3. Růstová křivka

Růstová křivka vyjadřuje při batch kultivaci růst buněčné kultury v čase. Kultura při své adaptaci a následném růstu v kultivačním médiu prochází postupně několika stádii. První stadium po inokulaci se nazývá lag-fáze, při níž dochází k adaptaci na médium, zvětšování buněk a přípravě buněk k dělení, její délka závisí na fyziologickém stavu mikroorganismů, velikosti inokula a složení média. Následuje fáze zrychleného růstu, kdy se buňky začínají dělit. Zrychlený růst postupně přechází v exponenciální fázi, při níž dochází ke geometrickému nárůstu buněk a produkci primárních metabolitů. Exponenciální fáze je charakterizována nejkratší generační dobou, jež se v průběhu celé fáze nemění. Postupné zvyšování limitace kultury substrátem (růstovým faktorem) vede k poklesu rychlosti množení buněk, což se nazývá fáze zpomaleného růstu. Po zpomaleném růstu následuje stacionární fáze, při níž se již nenavysuže množství buněk v médiu, jelikož dochází k velmi pomalému rozmnožování, které kompenzuje množství odumřelých buněk. Při stacionární fázi dochází k produkci sekundárních metabolitů jako reakce na stres, což může být nedostatek kyslíku, světlo, snížené množství substrátu atd.. Fáze odumírání, která následuje po stacionární fázi, je charakterizována nedostatkem růstového faktoru, při němž dochází postupnému odumírání buněk. Průběh růstové křivky lze pozorovat na Obrázek 8 [9],[10].



Obrázek 8: Růstová křivka [9]

2.6. Karotenogenní kvasinky

Je specifický oddíl kvasinek, jež obsahují enzymatický aparát schopný ve vhodném prostředí produkovat karotenoidní pigmenty. Kvůli vysokému obsahu karotenoidů se kultury barví žlutými až červenými odstíny. Díky této vlastnosti jsou též známy pod názvem „červené kvasinky“. Mezi nejhojněji produkované karotenoidy patří β -karoten, torulen a torularhodin. Množství a typ karotenoidů produkovaných v buňkách závisí na zvoleném druhu kvasinky a složení okolního prostředí a živného média. Karotenogenní kvasinky spadají do třídy *Basidiomycetae*. Mezi známé producenty karotenoidů patří například kvasinky rodů *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* či *Cystofilobasidium* [11].

2.6.1. Rod *Rhodotorula*

Je imperfektní forma rodu *Rhodosporidium*. Z rodu *Rhodotorula* jsou nejznámější druhy *Rhodotorula mucilaginosa* a *Rhodotorula glutinis*. Má malé kulaté či oválné buňky, netvoří spory, jen výjimečně vytváří jednoduché pseudomycelium. Tento rod je specifický produkcí lipidů, aminokyselin a hlavně pigmentů β -karotenu, torulenu a torularhodinu, proto se barva kultur pohybuje mezi červenou až růžovou. Kvasinky rodu *Rhodotorula* jsou všudypřítomné, lze je nalézt ve vzduchu, v půdě, sladké i slané vodě, na povrchu rostlin, ale i v různých orgánech živočišného těla. Díky své nízké náročnosti na obsah dusíku roste i v půdách, jež dusíkaté látky téměř neobsahují. Obrázek 9 vyobrazuje druh *Rhodotorula glutinis*, jako příklad [9], [11].



Obrázek 9: Kolonie kvasinky *Rhodotorula glutinis* [12]

2.6.2. Rod *Sporobolomyces*

Je imperfektní forma rodu *Sporidiobolus*. Má kulaté, elipsoidní i protáhnuté buňky, které jsou charakteristické tvorbou povětšinou asymetrických balistokonidií. Některé druhy vytvářejí pravé mycelium (např. *Sporobolomyces holsaticus*), jiné pseudomycelium (např. *Sporobolomyces foliicola*). U *Sporobolomyces* je pozorovatelná významná karotenogeneze s převažujícím zastoupením β -karotenu, torularhodinu a torulenu díky nimž kultury získávají sytě tmavě červenou barvu, příkladem může být *Sporidiobolus salmonicolor*, viz Obrázek 10 [9],[11].



Obrázek 10: Kolonie kvasinky druhu *Sporidiobolus salmonicolor* [13]

2.7. Substráty

Kvasinky pro svůj růst potřebují dostatečný přísun živin, který se dá zajistit vhodným zvolením substrátu. Jako substráty se díky své nízké ceně nabízí různé druhy potravinářských odpadů, které už nejsou dále jinak zpracovatelné a jejich likvidace by byla problematická. Tyto odpady obsahují stále velké množství uhlíku, dusíku a dalších látek využitelných pro kultivaci mikroorganismů.

2.7.1. Odpadní substráty při produkci karotenoidů

Pro biotechnologickou výrobu karotenoidů je možno využít mnoho odpadních substrátů například tuk, syrovátka či glycerol a mnoho dalších. Množství produkovaných karotenoidů výrazně závisí na kvalitě a složení použitého odpadního substrátu. Dále je vyvíjena snaha o zvýšení výtěžnosti a snížení ceny biotechnologických procesů zahrnující optimalizaci podmínek pro pěstování jednotlivých kultur změnou nutričních a fyzikálních faktorů.

Mezi nutriční faktory patří například koncentrace dusíku, uhlíku či minerálních látek v substrátu. Mezi fyzikální faktory patří pH, teplota či intenzita světla. Tyto faktory mají hlavní dopad na růst buněk a množství produkovaných karotenoidů [14].

2.7.2. Živočišné odpadní tuky

Tuky jsou nepolární látky složené z esterů mastných kyselin a glycerolu, jež slouží živočichům převážně jako zásobní látky. Živočišné tuky vznikají jako odpadní produkt při potravinářské či kožedělné výrobě, získávají se extrakcí z živočišného odpadu v kafilerách. U takto získaného tuku nelze jednoznačně určit složení, jelikož se mění v závislosti: na druhu živočicha, ročním období, způsobu odběru a kvalitě zpracování. Proměnlivost ukazuje Tabulka 1. V získaném tuku mohou být rozpuštěny i jiné nepolární látky, kupříkladu u býložravců se v loji mohou nacházet lipofilní barviva, která jsou přijímána v potravě, např. chlorofyl, který způsobuje nazelenalou barvu loje [15],[16].

Tabulka 1: Nejvíce zastoupené mastné kyseliny obsažené v hovězím loji [16]

Mastná kyselina	Rozsah (hm. %)
C14:0 Myristová	1,4 až 7,8
C16:0 Palmitová	17,0 až 3M7,0
C16:1 Palmitolejová	0,7 až 8,8
C18:0 Stearová	6,0 až 40,0
C18:1 Olejová	26 až 50
C18:1 Octadecenová	3,4 až 6,2
C18:2 Linolová	0,5 až 5

2.7.3. Glycerol

Vzniká jako odpadní produkt při produkci bionafty. Část odpadu je dále přečišťována na čistý glycerol, část zbytku tzv. surového glycerolu se využívá ke kultivaci mikroorganismů. V médiích tvoří glycerol hlavní zdroj organického uhlíku, dále obsahuje nemalé množství vápníku, sodíku a draslíku. Složení surového glycerolu závisí na jeho kvalitě, průměrné složení je následující: 80 % glycerolu, 9 % popela, 4 až 15 % vody, maximálně 0,5 % methanolu a 1,5 % netěkavých organických látek [2], [14].

2.7.4. Kultivace kvasinek

Ke kultivaci mikroorganismů v laboratoři je nutno vytvořit vhodná média, jejichž složení závisí na zvoleném mikroorganismu. Vytvořená média by měla co nejvíce odpovídat přirozeným podmínkám zvoleného mikroorganismu. Přirozenými podmínkami se rozumí dostatečné množství sloučenin bohatých na zdroje uhlíku, což jsou kupříkladu cukry, lipidy či organické kyseliny. Dále zdroje dusíku, fosforu a síry. Při nedostatečném přísunu esenciálních látek mikroorganismu nastává zastavení vývoje kultury.

2.7.5. Bioreaktor

Bioreaktor je zařízení, ve kterém probíhá konverze substrátu na produkty, jež je umožněna a katalyzována pomocí živých buněk či jejich částí (převážně enzymy). Pro dosažení nejvyšší efektivity konverze, je třeba v bioreaktoru navodit optimální reakční podmínky, což jsou: teplota, pH, iontová síla, osmotický tlak, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace substrátu atd., z tohoto důvodu musí být bioreaktor vybaven množstvím sond snímajících konkrétní podmínky při reakci a dále zařízeními, jež jsou schopna dané podmínky navodit. Zařízeními jsou myšleny chlazení, filtry, aerační kroužek, míchadla, přívod substrátu, odvod média, dále zařízení pro odběr vzorků a inokulaci.

Bioreaktory se dělí dle velikosti na:

- a) laboratorní (do objemu 30 litrů)
- b) čtvrtprovozní (s objemem 30 – 100 litrů)
- c) poloprovozní (s objemem 100 – 5000 litrů)
- d) provozní (s objemem větším než 5000 litrů).

Bioreaktory se mohou dále dělit dle typu procesu, který v nich probíhá na:

- a) Batch (vsádkový) systém pracující jako uzavřená soustava.
- b) Fed-batch systém, pracující jako částečně otevřená soustava (vsádka s postupným ředěním substrátem).
- c) Kontinuální systém pracující jako otevřená soustava (obsah bioreaktoru je doplňován substrátem za stálého odvodu média).

V našem případě byl užit laboratorní bioreaktor o velikosti 2 litry, v němž probíhala batch kultivace na substrátu konkrétního složení [17].

2.8. Metody získávání metabolitů

2.8.1. Dezintegrace

Pro získání látek, jež jsou obsaženy v buněčných strukturách, je nutné rozrušení buněčných stěn a membrán. Pro tyto účely jsou vytvořeny metody mechanické a chemické.

2.8.1.1. Mechanické metody

Principem mechanických metod je rozrušení buněčných obalů na základě působení vnější mechanické síly. Základem je dosáhnout dostatečné stříhového namáhání, při němž dojde k lyzi buněk. Dostatečně velkého namáhání je možno dosáhnout více způsoby: ultrazvukem, mletím, mícháním či lisováním [18],[19].

2.8.1.2. Chemické metody

Jde o skupinu metod, která využívá změnu vnějších fyzikálně chemických podmínek, či chemické látky k lyzi buněk. Mezi tyto metody patří sušení, opakované zmrazování a rozmrazování, nebo využití vhodného rozpouštědla. Dále jsou velmi účinné enzymologické metody, jež využívají různé druhy trávicích enzymů schopných lyzovat buněčnou stěnu [18],[19].

2.9. Extrakce

Jsou metody získávání konkrétních složek ze směsi látek na základě jejich rozdělení mezi dvě navzájem nemísitelné fáze. Karotenoidy jsou lipofilní látky, vyskytující se převážně v lipoproteinové frakci membrán, proto se extrahují do nepolárního rozpouštědla. Využívá se zpravidla vícesložkového rozpouštědla, které se po přidání malého množství polární kapaliny snadno rozdělí na 2 fáze. Nepolární fáze se dále přečišťuje. Výsledný extrakt musí být rozpuštěn v čistém rozpouštědle určeném pro HPLC, aby mohl být analyzován metodou HPLC. Pro měření lipidických látek na GC je nutno nejprve vzorek transesterifikovat, aby se snížila teplota nutná k odpaření vzorku [20].

2.10. Metody analýzy buněčných složek

2.10.1. Absorpční spektrofotometrie

Je metoda založena na průchodu viditelného a ultrafialového záření (v rozsahu vlnových délek 200 až 800 nm) kapalným vzorkem, obsaženým v křemenné či skleněné kyvetě. Při průchodu záření vzorkem dochází ke světelné absorpci, skrze excitaci elektronů v molekulových orbitalech zkoumané látky. Jako zdroje ultrafialového záření se ve spektrofotometrech používají deuteriové výbojky. Pro viditelné záření slouží jako zdroje halogenové nebo wolframové žárovky. Velikost absorbance je detekována fotoelektrickými detektory.

Pro kvantitativní stanovení obsahu absorbující látky ve vzorku je nutno užít Lambert - Beerova zákona, který definuje absorbanci A [bez rozměru] jako součin koncentrace absorbující látky c [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$], tloušťky kyvety l [cm] a molárního absorpčního koeficientu ε [$\text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$] [21],[22].

$$A = c \cdot l \cdot \varepsilon$$

2.10.2. HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie)

Je metoda založena na interakcích při přenosu vzorku unášeného za vysokého tlaku (až 50 MPa) mobilní fází (směs vhodných rozpouštědel, v případě karotenoidů se jedná o nepolární rozpouštědla) přes fázi stacionární (porézní látka obsažená v koloně). Při unášení vzorku mobilní fází chromatografickou kolonou dochází k separaci částí vzorku postupným zachytáváním jednotlivých složek vzorku na stacionární fázi. Složky jsou nejčastěji analyzovány fotometrickými detektory, které stanovují absorbanci eluátu vytékajícího z kolony.

Chromatografické kolony jsou konstruovány jako trubice naplněné mikročásticemi porézní látky, nejčastěji silikagelu, jež umožňuje postupné rozdělování vzorků na jednotlivé frakce. Pro kvalitní určení obsahu vzorku je nutno zvolit vhodnou velikost a poréznost mikročástic [21],[22].

2.10.3. GC (plynová chromatografie)

Metoda separace je založena na interakci mobilní fáze obsahující vzorek a stacionární fáze. Mobilní fáze je inertní tzv. nosný plyn, zpravidla to bývá vodík, dusík či helium. U kapilárních kolon bývá stacionární fáze vrstva kapaliny na vnitřním povrchu kolony, jenž je zpravidla tvořen skleněnou, nebo křemennou kapilárou potaženou vrstvičkou polyamidu. Díky malým vnitřním průměrům a velkým délkám kolon, dosahují kapilární kolony kvalitní separace. Náplňové kolony vyráběné z kovu či skla, jsou plněné porézním materiálem, který v některých případech obsahuje na svém povrchu vrstvičku kapaliny. Princip separace u náplňových kolon je obdobný jako u HPLC [22], [23].

3 Cíl práce

Hlavní náplní práce je ověření možnosti efektivně kultivovat karotenoidní kvasinky na odpadním tuku a produkci karotenoidů za zmíněných podmínek. Dosažení vytyčeného cíle je řešeno pomocí jednotlivých úkonů:

- Literární rešerše zaměřená zejména na možnosti využití lipidických substrátů mikroorganismy a na metabolismus karotenogenních kvasinek.
- Kultivace vybraných druhů kvasinek na médiích s různým obsahem odpadního tuku.
- Stanovení růstových a metabolických charakteristik kvasinek.
- Stanovení produkce karotenoidů a lipidických látek pomocí HPLC a GC.
- Vyhodnocení výsledků a diskuse.

4 Experimentální část

4.1. Použité chemikálie

4.1.1. Chemikálie použité ke kultivaci kvasinek

Kvasničný autolyzát, Himedia (Indie)
D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner s r.o. (ČR)
Síran amonný p.a., Lachema (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)
Síran horečnatý heptahydrát p.a., Chemapol (ČR)
Glycerol, Lach-ner, s.r.o. (ČR)
Kyselina palmitová, Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Tween 60, Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Polyethylenglykol 400, Lach-ner, s.r.o. (ČR)
Odpadní tuk (Norsko)

4.1.2. Chemikálie použité k hydrolýze tuku

Hydroxid draselný p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Kyselina sírová p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Tween 60, Lach-ner, S.r.o. (ČR)

4.1.3. Chemikálie potřebné pro extrakci karotenoidů

Methanol p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)
Chloroform p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)

4.1.4. Chemikálie potřebné pro analýzu karotenoidů

Methanol pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)
Acetonitril pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)
Chloroform pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)
Ethylacetát pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)

4.2. Použité pomůcky a přístroje

4.2.1. Přístrojová technika a pomůcky pro kultivaci buněk

Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)
GKB Color Digital CCD kamera (Tchajwan)
Lucia Image active 5.0, Laboratory Imaging spol. s r.o. (ČR)
Třepačka Yellow line, (SRN)
Centrifuga Sigma Laborzentrifugen (SRN)
Analytické váhy Boeco (SRN)
Box Aura mini BioTech (ČR)
Fermentor BIOSTAT B Plus, Sartorius Stedim (SRN)

4.2.2. Přístrojová technika a pomůcky pro izolaci a analýzu karotenoidů a lipidů

Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)

HPLC filtry, PRE-CUT, Alltech (GB)

HPLC/PDA sestava: Sestava HPLC/MS (Thermo Fischer Scientific, USA)

- Termostat - LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)
- Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR
- Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR
- Vyhodnocovací systém Xcalibur
- Phenomenex Držák předkolony - KJ0 - 4282, ECOM (ČR)
- Předkolona - C18.AJ0 - 4287, Phenomenex
- Kolona Kinetex C18, 5 mm, 4,6 x 150 mm,

Termoblok – SBH 130, Stuart (GBR)

TRACE GC/FID (ThermoQuest S.p.A., Itálie)

- Kapilární kolona DB-23 s rozměry 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm

4.3. Použité druhy kvasinek

Rhodotorula glutinis CCY 20-2-26

Rhodosporidium toruloides CCY 062-002-004

Sporidiobolus metaroseus CCY 19-6-20

4.4. Kultivace vybraných druhů kvasinek

4.4.1. Vnější podmínky

Karotenogenní kvasinky rodů *Rhodotorula*, *Rhodosporidium* a *Sporidiobolus* jsou striktně aerobní kmeny, které byly kultivovány při laboratorní teplotě za stálého třepání a osvětlení, jež působilo jako světelný stres.

4.4.2. Inokulum I

Médium pro inokulum I, jehož složení lze najít v Tabulce 2, bylo užito v množství 30 ml a sterilováno ve vysokotlakých hrncích s otevřenými parními uzávěry po dobu 35 minut v 250 ml Erlenmeyerových baňkách. Následná inokulace kvasinkami proběhla ve sterilním prostředí očkovacího boxu, třemi kličkami odebranými z Petriho misek porostlými danými kmeny. Kultivační doba pro inokulum I trvala 24 hodin.

Tabulka 2: Složení inokulačního média.

Složení inokulačního média	
Složka	Množství
Bakteriologický pepton	20 g
Kvasničný autolyzát	10 g
Glukóza	20 g
Destilovaná voda	1000 ml

4.4.3. Inokulum II

Médium pro inokulum II, jehož složení bylo totožné s médiem pro inokulum I (viz Tabulka 2), bylo připraveno v množství 130 ml do 500 ml Erlenmeyerových baněk stejným způsobem jako médium předchozího stupně. Inokulace probíhala v poměru 1 obj. díl inokula I na 5 obj. dílu média pro inokulum II. Kultivace inokula II trvala 24 hodin.

4.4.4. Produkční média

Média se skládala ze dvou složek: první anorganická, jež byla společná pro všechna média (viz Tabulka 3), a druhá organická, která obsahovala specifický organický substrát (viz Tabulka 4). Média byla připravována v množstvích 50 a 60 ml. Inokulace 50 ml médií probíhala přidáním inokula II přímo do produkčního média v objemovém poměru 1 díl inokula II ku 5 dílům produkčního média (forma bez stočení biomasy). V případě 60ml produkčního média se před zaočkováním biomasa odstředila z 1 objemového dílu inokulačního média. Po odstranění supernatantu bylo získanou biomasou zaočkováno 6 objemových dílů produkčního média (forma se stočením biomasy). Kultivace kvasinek na obou typech kultivačních médií probíhala 96 hodin.

Tabulka 3: Společný anorganický základ všech produkčních médií.

Základ produkčního média	
Složka	Množství
(NH ₄) ₂ SO ₄	4 g
KH ₂ PO ₄	4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,696 g
Voda	1000 ml

Tabulka 4: Množství substrátů a specifických chemikálií v jednotlivých médiích.

Složení jednotlivých produkčních médií	
Typ substrátu	Množství
Glukóza	30 g/l
Glycerol	30,67 g/l
Glukóza + tuk	14 + 5 g/l
tuk	16,7 g/l
Tuk + glycerol	14 + 5 g/l
Tuk + Tween	16,7 + 10 g/l
1. tuk + kyselina palmitová	18,2 + 0,5 g/l
2. tuk + kyselina palmitová	17,7 + 1 g/l
Tuk + polyetylglykol	18,7 + 20 g/l

4.4.5. Hydrolýza odpadního živočišného tuku

Produkty chemické a enzymatické hydrolýzy živočišného tuku, které byly využity ke kultivaci karotenogenních kvasinek.

4.4.5.1. Bazický hydrolyzát

Navážené množství tuku bylo za horka při 80 °C rozpuštěno. Následně byl přidán roztok hydroxidu draselného v 3 molárním přebytku v porovnání s tukem. Reakční směs byla promíchávána do doby vzniku šedohnědé emulze. Po ochlazení byla emulze převedena do dělicí nálevky. Dalším krokem bylo přidání množství kyseliny sírové nutné k neutralizaci použitého hydroxidu draselného. Po viditelném rozrušení emulze byl přidán hexan a po oddělení fází byla spodní vodná fáze odebrána k analýze na HPLC a ke kultivaci kvasinek. Pro kultivaci kvasinek bylo použito hydrolyzátu o koncentraci glycerolu 15 g/l.

4.4.5.2. Kyselý hydrolyzát

Navážený tuk byl na magnetické míchačce rozpuštěn při 100 °C a poté byl přidán Tween 80 v množství 2 procent objemu rozpuštěného tuku. Do takto zahřáté směsi byl přidán roztok 2,5% kyseliny sírové v destilované vodě a směs byla míchána po dobu 24 hodin při teplotě 100-110 °C. Reakční směs byla po ochlazení převedena do dělicí nálevky. Poté byl přidán hexan a směs protřepána. Po oddělení fází byla horní hexanová fáze odebrána a vodní fáze byla opět převedena do dělicí nálevky. Poté byl ke směsi přidán hydroxid draselný v množství nutném pro neutralizaci kyseliny sírové. Po neutralizaci bylo přidáno další množství hexanu a směs byla protřepána. Po oddělení fází, byla spodní fáze odebrána a použita pro HPLC analýzu množství glycerolu a kultivace karotenogenních kvasinek. Koncentrace glycerolu v hydrolyzátu použitým na kultivaci byla 15 g/l.

4.4.5.3. Enzymatický hydrolyzát

Byl připraven roztok fosfátového pufru o pH 7,2. Pufr byl zahřát na 37 stupňů Celsia a následně byl do něho přidán lipolytický enzym, jenž pocházel z kvasinky druhu *Candida rugosa*. Do takto připravené směsi byl přidán tuk a za neustálého míchání se na temperované třepačce nechala probíhat reakce po dobu 24 hodin. Po reakci byl hydrolyzát extrahován pomocí hexanu a po oddělení fází byla spodní vodná část odebrána na analýzu na HPLC k zjištění množství obsahu glycerolu, následně byl obsah hydrolyzátu naředěn na koncentraci glycerolu 15 g/l a byla provedena kultivace.

4.4.6. Bioreaktor (fermentor)

Kultivace, jež byla uskutečněna v bioreaktoru, probíhala formou vsádky s regulací pH, přívodem vzduchu a mícháním, které byly regulovány na základě hladiny pO_2 . Bioreaktor o celkovém objemu 2 l byl použit ke kultivaci 1,5 litrové vsádky, která se skládala z 1,25 l produkčního média a 250 ml inokula II. Složení produkčního média lze najít v Tabulce 5.

Tabulka 5: Složení produkčního média pro fermentor, („antifoam“ byl přimíchán až po sterilaci)

Složení produkčního média pro fermentor	
Složka	Množství
(NH ₄) ₂ SO ₄	8 g
KH ₂ PO ₄	4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,696 g
Voda	1000 ml
Glycerol	20 g
Tuk	22,4 g
Tween	10 g
„Antifoam“	5 ml

Bioreaktor byl před zaočkováním společně s médiem vysterilován v autoklávu. Zaočkování bioreaktoru bylo uskutečněno 250 ml inokula II, jehož celkový objem činil 420 ml a jemuž předcházelo inokulum I s celkovým objemem 70 ml. Složení a postup výroby inokulačních médií byl obdobný médiím popsaných v kapitole 4.4.2 a 4.4.3 s rozdílem, že inokulum I bylo zaočkováno 7 kličkami a kultivováno v Erlenmeyerově baňce o objemu 300 ml, a inokulum II bylo zaočkováno veškerým objemem inokula I a bylo kultivováno v Erlenmeyerově baňce o objemu 2000 ml.

Kultivace probíhala 48 hodin. Hodnota pH média se udržovala na hodnotě 5,6 pomocí peristaltických pump, které do systému dávkovaly hydroxid sodný či kyselinu sírovou. Hodnota pO_2 byla udržována v intervalu 20-30 %, přičemž omezení míchadla, které zajišťovalo lepší rozpouštění kyslíku v médiu, bylo nastaveno na 1000 otáček za minutu. Vzorky biomasy byly z fermentoru odebrány po 24; 44; 46 a 48 hodinách od počátku kultivace, přičemž objem každého odběru byl 40 ml, z nichž 20 ml byl průplach odběrové hadičky, 10 ml bylo využito ke stanovení množství biomasy a zbylých 10 ml bylo využito pro extrakci lipidů a karotenoidů.

4.5. Zpracování biomasy

4.5.1. Stanovení biomasy

Z narostlých produkčních médií bylo odebráno 10 ml kultury kvasinek do centrifugačních zkumavek (objem 15 ml). Vzorky ve zkumavkách byly odstředěny při 5000 ot/min po dobu 3 minut, poté byl slit supernatant. Obsah zkumavky se nechal rozsuspendovat v 5 ml destilované vody a následně opět zcentrifugovat za stejného nastavení centrifugy. Odstraněním supernatantu byla získána čistá biomasa, jež byla následně rozsuspendována a vylita do předem vysušené a zvážené hliníkové misky. Miska byla následně umístěna do sušárny vyhřáté na 70 °C a byla sušena do konstantní hmotnosti, poté byla zvážena na analytických vahách a z rozdílu hodnot hmotností byla získána hmotnost v g biomasy v 10 ml média, po vynásobení výsledné hmotnosti koeficientem 100, byl získán finální výsledek množství biomasy v g/l.

4.5.2. Uskladnění biomasy

Z narostlých produkčních médií bylo odebráno 40 ml kultury kvasinek do centrifugačních zkumavek (objem 50 ml). Vzorky ve zkumavkách byly dvakrát odstředěny při 7000 ot/min po dobu 3 minut, kdy byl po první centrifugaci vylit supernatant a biomasa byla promyty a rozsuspendována v 20 ml destilované vody. Druhý supernatant byl vylit a zkumavka s biomasou byla uchována v mrazicím boxu.

4.5.3. Extrakce

K zamraženému vzorku biomasy ve zkumavce byla přidána extrakční směs dle Folche skládající se z chloroformu a methanolu v poměru 2:1. Ke směsi byly přidány skleněné kuličky a po uzavření zkumavky byl obsah protřepáván na vortexu 45 minut. Následně byl do zkumavky přidán 1 ml destilované vody a zkumavka se nechala zcentrifugovat. Po oddělení fázi se odebrala spodní chloroformová a nechala se v slzičkové baňce odpařit na vakuové odparce. Odparek byl poté rozpuštěn ve 2 ml HPLC chloroformu a přefiltrován do mikrozkumavky typu Eppendorf přes 20 µm filtr.

4.5.4. Analýza vzorků na HPLC

Extrahované vzorky se podrobily binární gradientové eluci s průtokem mobilní fáze 1000 µl/min při 25 °C na koloně C18 s předkolonou, přičemž doba eluce jednoho vzorku trvala 16 minut. Identifikace karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu byla zajištěna PDA detektorem proti standardům. Při vlnové délce 450 nm byl spolu s ostatními karotenoidy identifikován β-karoten a při vlnové délce 280 nm byly identifikovány ergosterol a ubichinon. Složení mobilních fází lze nalézt v Tabulce 6. Gradientovou změnu složení mobilní fáze v daných časech se nachází v Tabulce 7.

Tabulka 6: Složení mobilních fází pro HPLC.

mobilní fáze	složka	obj. díly
A	acetonitril	84
	methanol	2
	100mM trisHCl pufr o pH 8	14
B	ethylacetát	40
	methanol	60

Tabulka 7: Změna gradientu mobilní fáze vyjádřená v časových intervalech.

přechod	z čisté fáze	na čistou fázi
0 až 8 min	A	B
13 až 14,5 min	B	A

4.5.5. Transesterifikace a příprava vzorků na GC

Do krimpovacích vialek bylo odpipetováno po 1 ml chloroformového extraktu a 0,8 ml transesterifikační směsi (složení směsi viz Tabulka 8). Připravené vialky se směsí byly zakrimpovány a vloženy do termobloku vyhřátého na 90 °C, kde byly inkubovány po dobu 3 hodin. Po inkubaci byly vialky vyjmuty z termobloku a ponechány k vychladnutí na okolní teplotu. Obsah krimpovacích vialek se po vychladnutí vylil do 5 ml vialek, do nichž byl předem napipetován 0,05 M vodný roztok hydroxidu sodného. Nově vzniklá směs byla intenzivně protřepána a po oddělení fází bylo ze spodní chloroformové fáze odpipetováno 0,5 ml do vialek se závitem pro GC. Obsah vialek byl doplněn 0,5 ml chloroformu. Vialky byly uzavřeny víčkem se septem pro GC a obsah byl analyzován na GC.

Tabulka 8: Složení transesterifikační směsi.

složka	koncentrace	rozpouštědlo
Kyselina sírová	15 %	methanol
Kyselina heptadecylová	0,5 mg/ml	

4.5.6. Analýza lipidů na GC

Pro zjištění obsahu mastných kyselin obsažených ve vzorcích byl použit plynový chromatograf TRACE GC s automatickým dávkovačem bez splitteru a s plamenovou ionizační detekcí analytů, při dávkovaném objemu vzorku 0,1 μ l. Chromatograf byl vybaven kolonou DB-wax o rozměrech 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m. Analýza probíhala následujících podmínkách:

- Teplota injektoru 250 °C
- Dusík jako nosný plyn, s průtokem 0,5 ml/min
- Plamenový ionizační detektor, při pracovní teplotě 250 °C, s přítokem vodíku 35 ml/min, přítokem kyslíku 350 ml/min a make-upem dusíku 30 ml/min
- Teplotní program: 50 °C, udržováno 1 minutu, poté vzestupný gradient 25 °C/min do 200 °C, udržováno 0 minut, následně vzestupný gradient 3 °C/min do 230 °C, udržováno 30 minut, celkový čas analýzy 47 minut.

Data získána měřením byla pomocí programu TRACE převedena do tabulky v MS Excel a následně vyhodnocena.

5 Výsledky a diskuze

5.1. Stanovení biomasy

Z 10 ml byla získána sušina kvasinek, jež byla zvážena na analytických vahách. Hmotnost sušiny v 10 ml byla následně přepočítána na koncentraci biomasy v g/l. Všechny stanovené koncentrace biomasy lze najít v Přílohách 1 až 3.

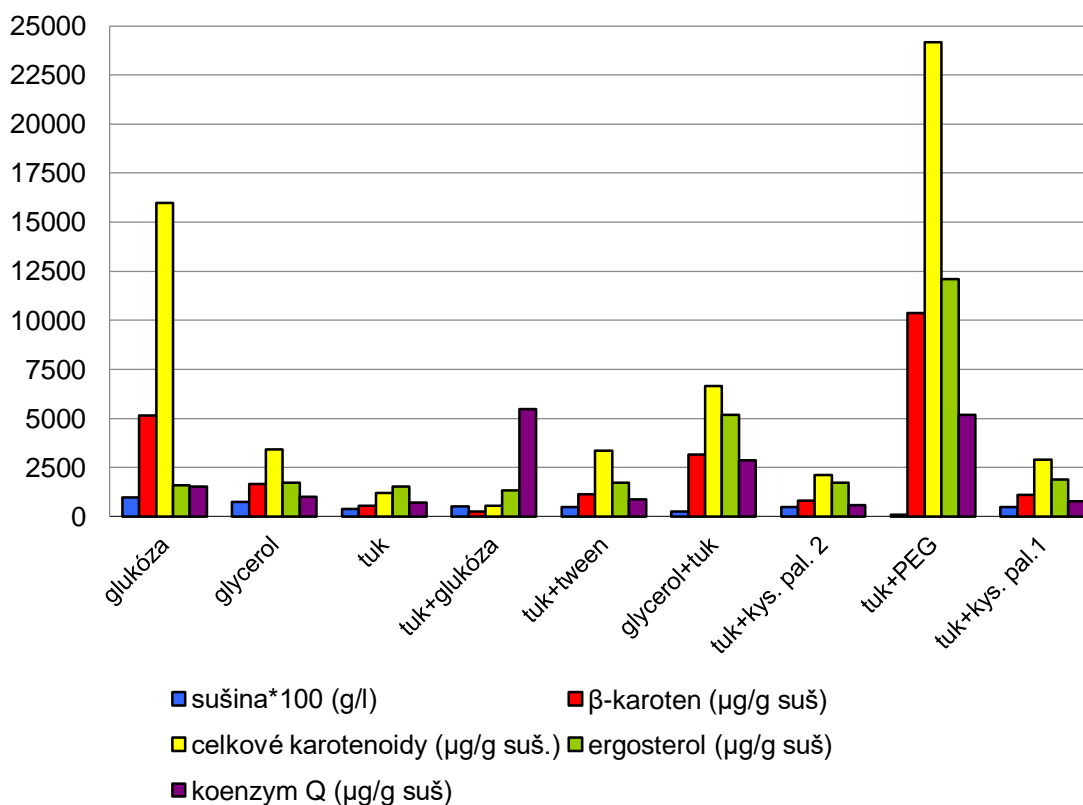
5.2. Stanovení produkčních vlastností daných kmenů kvasinek na HPLC

Pomocí HPLC byly prozkoumány specifické látky: karotenoidy, ergosterol a koenzym Q. Produkce těchto látek byla následně určena vztažením zjištěných množství na gramy sušiny biomasy.

5.2.1. Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula glutinis*

5.2.1.1. Vlastnosti kultivací bez stočení při očkování produkčních médií

Rhodotorula glutinis

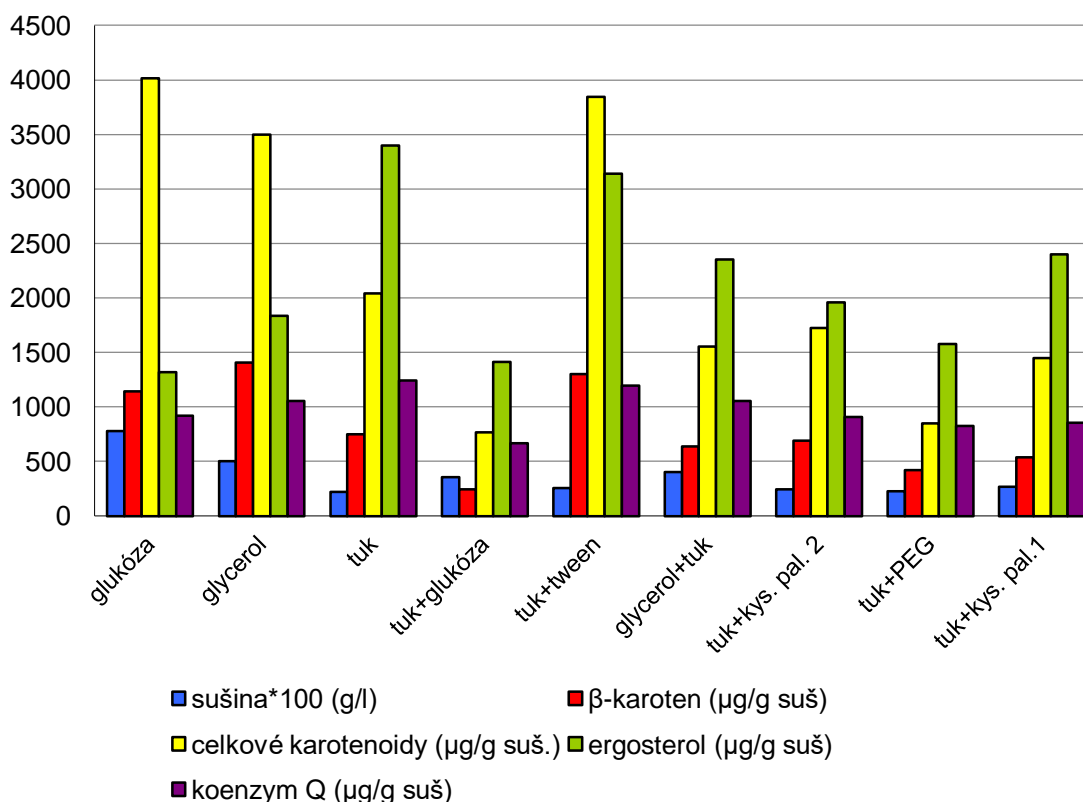


Graf 1: Diagramové zobrazení finální produkce zkoumaných lipofilních látek biomasou kmene *Rhodotorula glutinis*, kultivované při nestočení inokula II před zaočkováním produkčních médií.

Z pozorování Grafu 1 bylo vyvozeno, že kultivace na čistém tuku nebyla vhodná, z důvodu nízké produkce metabolitů. Tuk koaguloval na povrchu média a nepřecházel jako výživa do buněk, proto u médií s přidaným emulgátorem bylo zvýšené množství rozpuštěného substrátu, a tudíž i produktů, jakož tomu bylo u kultivací s přidavkem tweenu, glycerolu, kyseliny palmitové či polyetylglykolu, u něhož bylo dosaženo vysokých hodnot produkce všech sledovaných produktů: pro β -karoten 10,365 $\mu\text{g/g}$, karotenoidy 24,168 $\mu\text{g/g}$ a ergosterol 12,108 $\mu\text{g/g}$, a to zřejmě vzhledem k malému nárůstu biomasy 0,86 g. U glukózo-tukového média bylo docíleno výrazné produkce koenzymu Q (5,458 $\mu\text{g/g}$) na úkor ostatních látek.

5.2.1.2. Vlastnosti kultivací se stočením při očkování produkčních médií

Rhodotorula glutinis



Graf 2: Diagramové zobrazení finální produkce zkoumaných lipofilních látek biomasou kmene *Rhodotorula glutinis*, kultivované při stočení inokula II před zaočkováním produkčních médií.

Při kultivaci se stočením inokulačního média před zaočkováním produkčního média bylo u tukových médií docíleno výrazného navýšení produkce ergosterolu (viz Graf 2), jež ve více než polovině případů převýšila množství produkovaných karotenoidů.

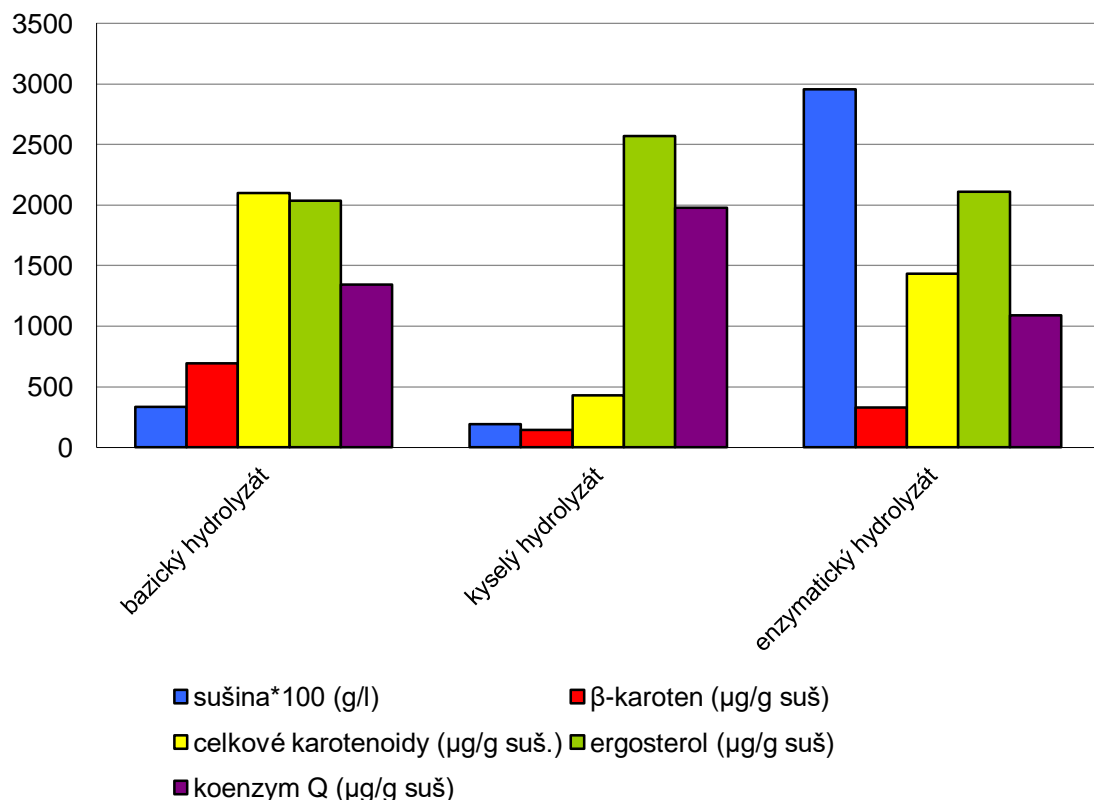
Nejvyšších produkcí β -karotenu (1,301 mg/g) a všech karotenoidů (3,846 mg/g) bylo dosaženo kultivací na tuku s přidavkem tweenu (vyjma kultivace na glukóze, jež sloužila jako kontrola), u ergosterolu bylo nejvyšších výsledků dosaženo kultivací na čistém tuku (3,398 mg/g) a u koenzymu Q toho bylo rovněž dosaženo při kultivaci na čistém tuku (1,245 mg/g).

5.2.1.3. Srovnání vlastností kultivací se zařazením centrifugace a bez něj

Kultivace se stočením byly vhodnější pro produkci a zisk ergosterolu, například tukové (3,398 mg/g) či tween-tukové médium (3,142 mg/g). Oproti tomu na produkci karotenoidů více vyhovovaly kultivace bez stáčení, například média tukovo-glycerolové (6,640 mg/g) nebo tukovo-polyethylenglykolové (24,168 mg/g). Při produkci koenzymu Q byl kmen dosti vyrovnaný, avšak nejvyšších hodnot bylo dosaženo tukovo-glukózovým médiem při nestočených kultivacích (5,458 mg/g).

5.2.1.4. Vlastnosti kultivací na hydrolyzátech

Rhodotorula glutinis

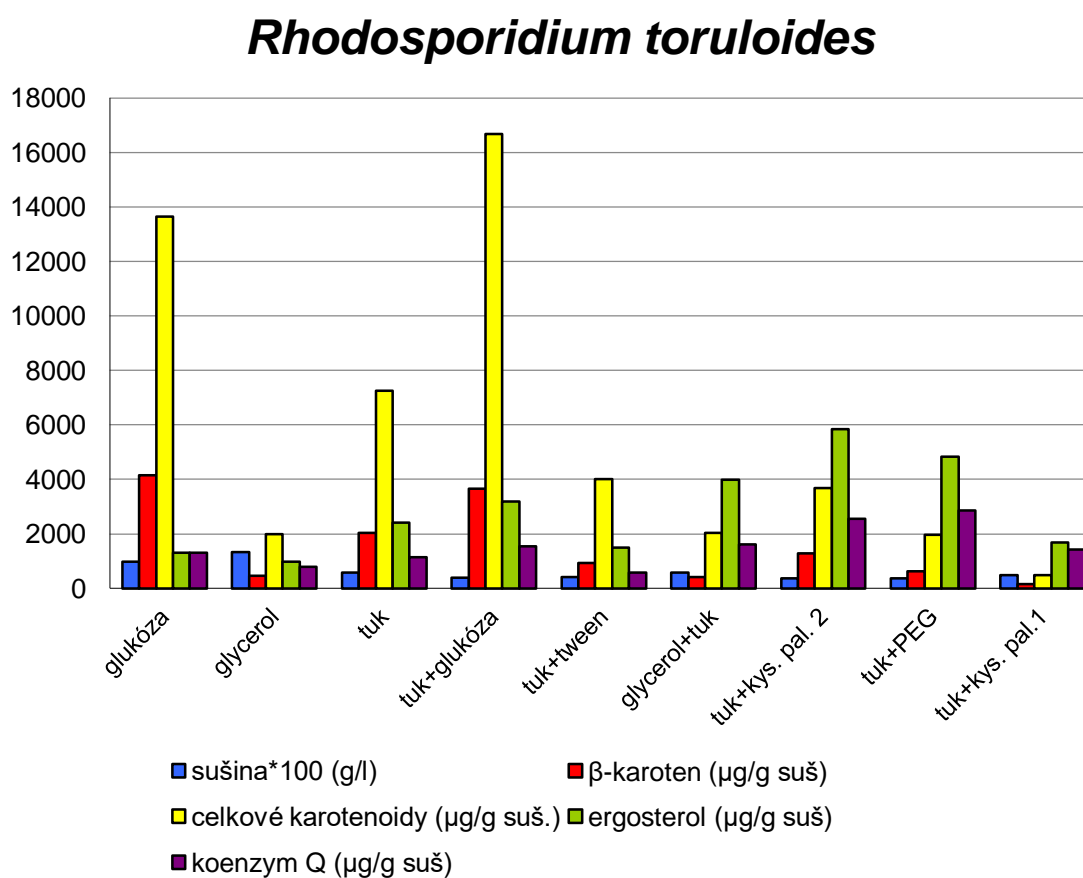


Graf 3: Diagramové zobrazení finální produkce zkoumaných lipofilních látek biomasou kmene *Rhodotorula glutinis*, kultivované na hydrolyzátech.

Z diagramu (viz Graf 3) bylo zjištěno, že hydrolyzou bylo možné dosáhnout vysoké produkce koenzymu Q a ergosterolu na úkor karotenoidů, tento rozdíl byl nejmarkantnější u kultivace na kyselém hydrolyzátu, kde bylo dosaženo nejvyšších hodnot produkce ergosterolu (2,572 mg/g) a koenzymu Q (1,978 mg/g). Nejvyšších hodnot produkce karotenoidů bylo dosaženo u bazického hydrolyzátu (2,099 mg/g). Velice významný nárůst biomasy byl zaznamenán u enzymatického hydrolyzátu (29,58 g/l).

5.2.2. Produkční vlastnosti kmene *Rhodosporidium toruloides*

5.2.2.1. Vlastnosti kultivací bez stočení při očkování produkčních médií



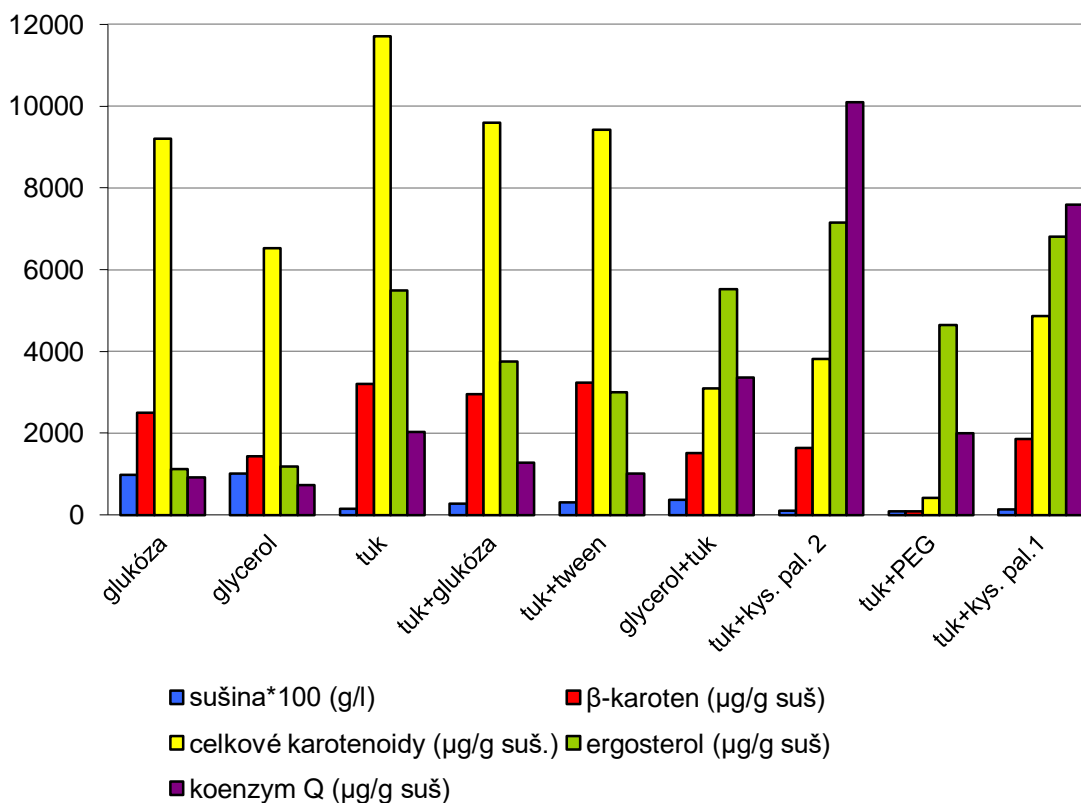
Graf 4: Diagramové zobrazení finální produkce zkoumaných lipofilních látek biomasou kmene *Rhodosporidium toruloides*, kultivované při nestočení inokula II před zaočkováním produkčních médií.

Z diagramu (viz Graf 4) bylo vyvozeno, že z kultivací bez stočení byly vhodné pro produkci karotenoidů média tukovo-glukózové (16,671 mg/g) a tukové (7,245 mg/g), (vyjma glukózového, jež bylo použito jako kontrola).

U tukového média s vyšším přidavkem kyseliny palmitové, tukovo-glycerolového média a tukovo-polyethylenglykolového média byly zjištěny významné produkce ergosterolu, převyšující produkce karotenoidů. Nejvyšší produkce ergosterolu byla pozorována u tukového média s vyšším přidavkem kyseliny palmitové (5,841 mg/g). Nejvýznamnější produkce koenzymu Q byla zaznamenána v médiu tukovo-polyethylenglykolovém (2,861 mg/g).

5.2.2.2. Vlastnosti kultivací se stočením při očkování produkčních médií

Rhodosporidium toruloides



Graf 5: Diagramové zobrazení finální produkce zkoumaných lipofilních látek biomasou kmene *Rhodosporidium toruloides*, kultivované při stočení inokula II před zaočkováním produkčních médií.

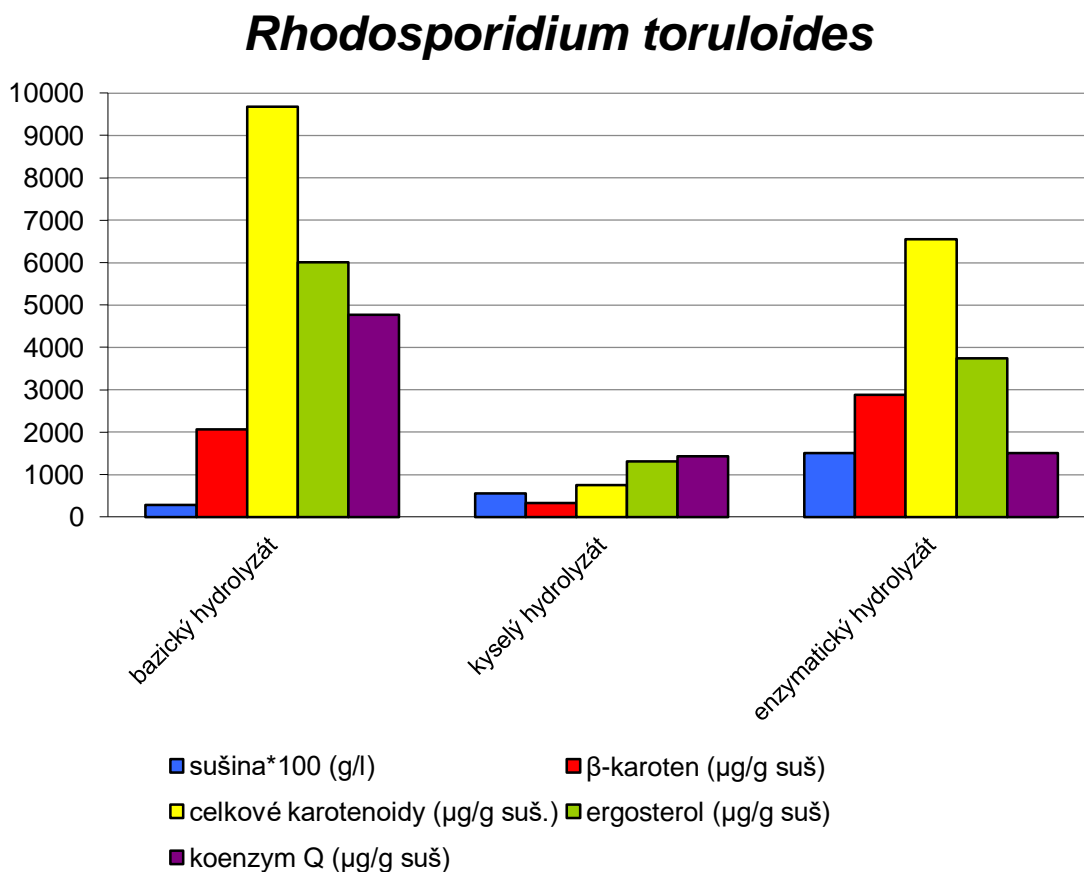
Z médií se stočením byla velmi vhodná pro produkci karotenoidů médium tukové, médium tukovo-glukózové a médium tween-tukové, přičemž nejvyšší produkce byla zaznamenána u tukového média (11,715 mg/g). Všechna média obsahující tuk měla vyšší produkci ergosterolu, jež byla nevýznamnější u médií obsahující přidavek kyseliny palmitové, konkrétně média s vyšším přidavkem kyseliny palmitové (7,151 mg/g).

Média s přidavkem kyseliny palmitové dosahovala rovněž velmi vysokých produkci koenzymu Q, konkrétně médium s vyšším přidavkem kyseliny palmitové (10,099 mg/g). Zmíněné produkce jsou vyobrazeny v Graf 5. Důvodem změn produkce uvedených složek je pravděpodobně remodeling membrán spojený s ochranou před stresem.

5.2.2.3. Srovnání vlastností kultivací se zařazením centrifugace a bez něj

Ve většině tukových médií převládaly v produkci karotenoidů kultivace se stočením, významnou výjimku tvořilo médium tukovo-glukózové, jímž bylo dosaženo nejvyššího výsledku (16,671 mg/g). Při produkci ergosterolu dosáhla tuková média bez stočení vyšší hodnoty pouze u tukovo-polyethylenglykolového média. V hodnotě produkce koenzymu Q dokázaly kultivace bez stočení na tukových médiích předčit kultivace se stočením pouze u médií tukovo-glukózového a tukovo-polyethylenglykolového. Nejvyšší hodnoty produkce koenzymu Q (10,099 mg/g) a ergosterolu (7,151 mg/g) byly zaznamenány na tukovém médiu s vyšším přidavkem kyseliny palmitové.

5.2.2.4. Vlastnosti kultivací na hydrolyzátech

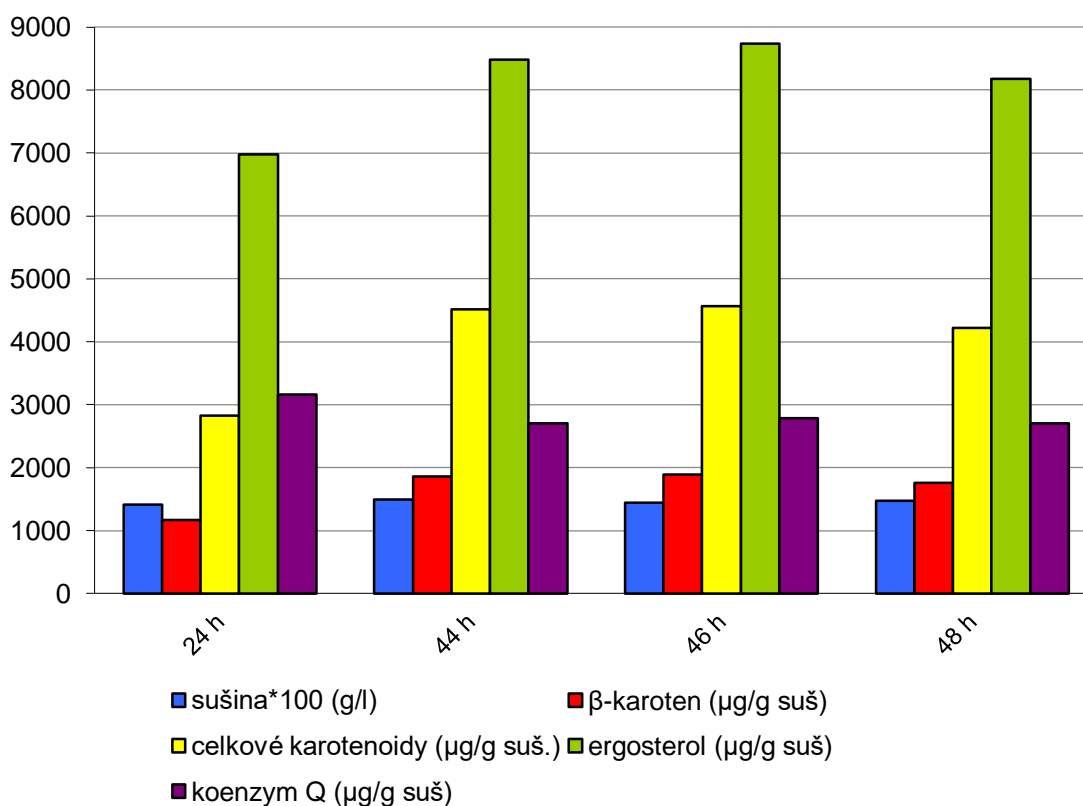


Graf 6: Diagramové zobrazení finální produkce zkoumaných lipofilních látek biomasou kmene *Rhodosporidium toruloides*, kultivované na hydrolyzátech.

Z Grafu 6 bylo vyvozeno, že z hydrolyzátů vykazoval nejlepší produkční vlastnosti na bazickém hydrolyzáte, jenž se odlišoval od ostatních poměrně vysokou produkcí karotenoidů (9,672 mg/g), ergosterolu (6,010 mg/g) a koenzymu Q (4,763 mg/g). Oproti tomu enzymatický hydrolyzát měl nejvyšší produkci β -karotenu (2,883 mg/g) a největší nárůst biomasy (15,03 g/l). Produkční vlastnosti kyselého hydrolyzáte vyšly oproti ostatním hydrolyzátům velmi nízké.

5.2.2.5. Vlastnosti kultivace ve fermentoru

Rhodosporidium toruloides

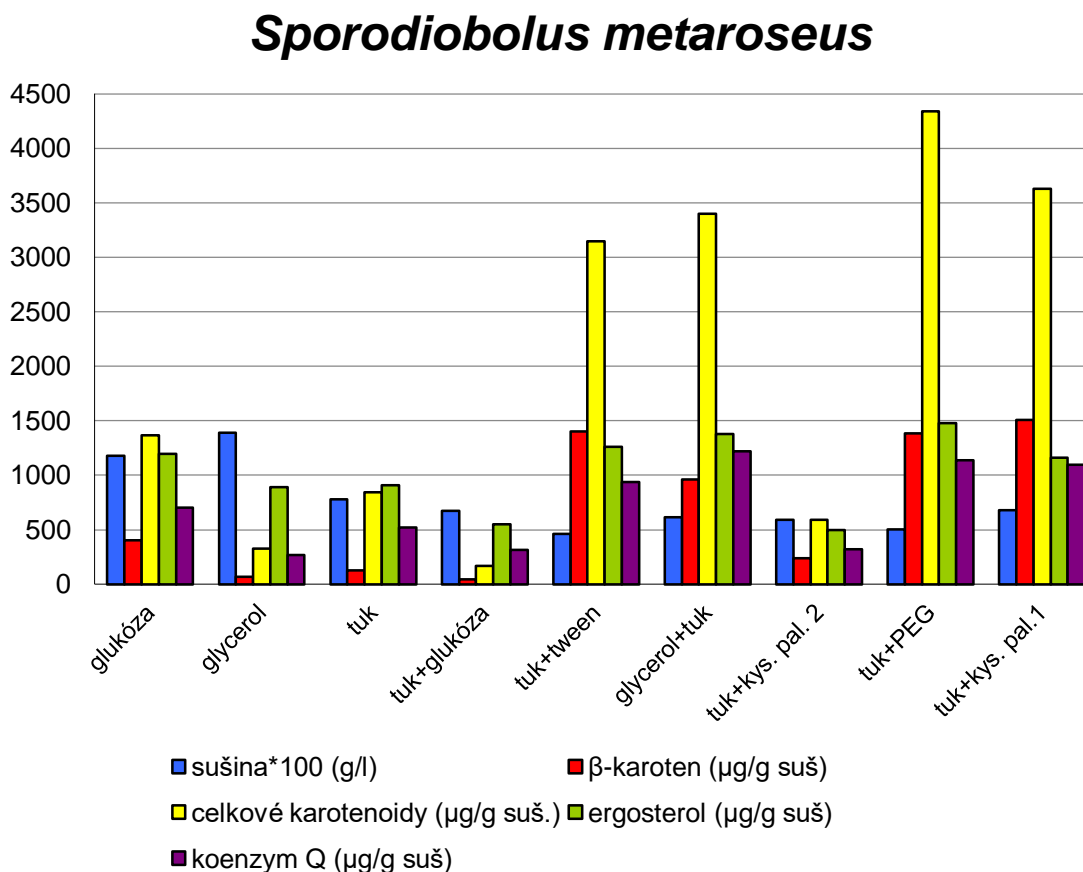


Graf 7: Diagramové zobrazení průběžné produkce zkoumaných lipofilních látek biomasou kmene *Rhodosporidium toruloides*, kultivované ve fermentoru.

Do Grafu 7 byly zaneseny produkční vlastnosti kultury v daných časech. Kultivace ve fermentoru byla vhodná pro získávání ergosterolu, jelikož jeho produkce dosahovala významných hodnot v průběhu celé doby kultivace. Nejoptimálnější čas pro získání karotenoidů (4,565 mg/g) a ergosterolu (8,741 mg/g) byl ve 46 h, jelikož jejich produkce dosáhla nejvyšší hodnoty. Nejvhodnější čas pro získání koenzymu Q byl ve 24 h, kdy jeho produkce měla nejvyšší hodnotu (3,167 mg/g). Nižší hodnoty při 48 h svědčily o částečném kryptickém růstu, kdy část buněk zlyzovala a biomasa se vzniklým lyzátem živila, tudíž docházelo ke snížení produkčních vlastností biomasy.

5.2.3. Produkční vlastnosti kmene *Sporidiobolus metaroseus*

5.2.3.1. Vlastnosti kultivací bez stočení při očkování produkčních médií

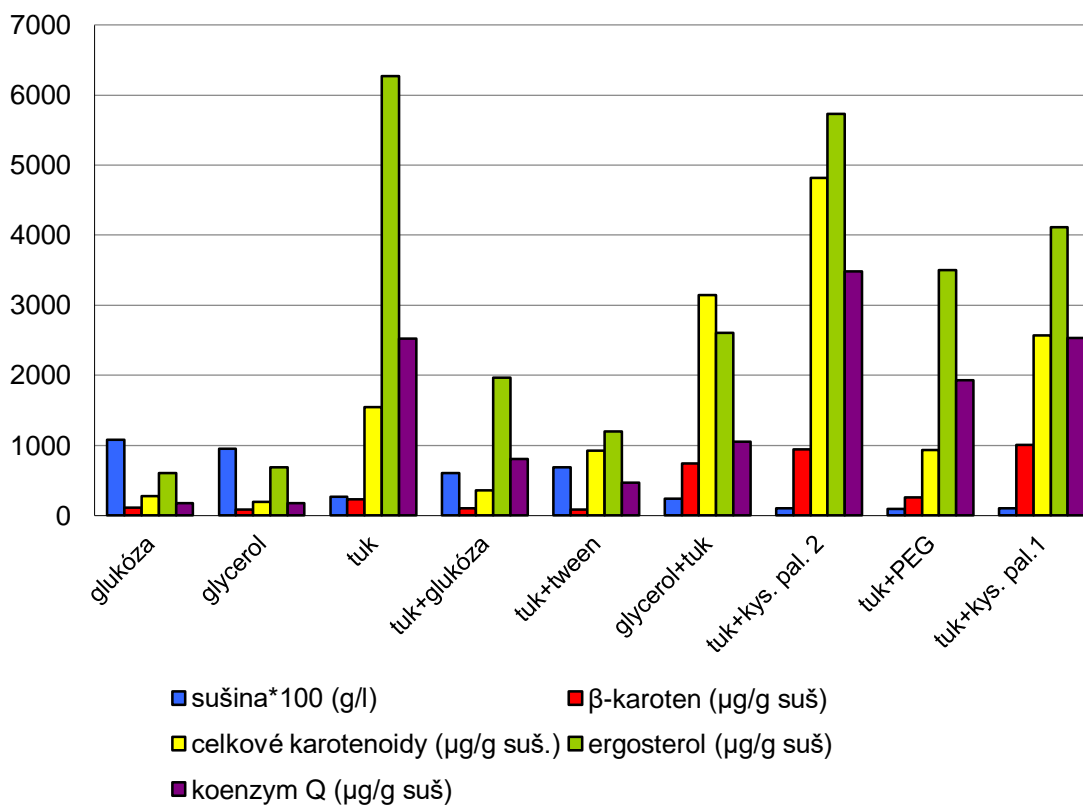


Graf 8: Diagramové zobrazení finální produkce zkoumaných lipofilních látek biomasou kmene *Sporidiobolus metaroseus*, kultivované při nestočení inokula II před zaočkováním produkčních médií.

V porovnání s ostatními kmeny kultivovanými bez stočení, vykazovaly kultivace na tukových médiích u kmene *Sporidiobolus metaroseus* významný růst biomasy. Nejvýznamnější produkce karotenoidů na tukových médiích byly zaznamenány na tukovo-polyethylenglykolovém médiu (4,337 mg/g) následovaném tukovým médiem s nižším přídatkem kyseliny palmitové (3,629 mg/g). Nejvyšší hodnoty produkce ergosterolu byly zaznamenány rovněž na tukovo-polyethylenglykolovém médiu (1,477 mg/g) následovaném tukovo-glycerolovým médiem (1,378 mg/g), kterým byla také vykazována nejvyšší produkce koenzymu Q (1,222 mg/g). Výše zmíněné vlastnosti vyobrazuje Graf 8.

5.2.3.2. Vlastnosti kultivací se stočením při očkování produkčních médií

Sporidiobolus metaroseus



Graf 9: Diagramové zobrazení finální produkce zkoumaných lipofilních látek biomasou kmene *Sporidiobolus metaroseus*, kultivované při stočení inokula II před zaočkováním produkčních médií.

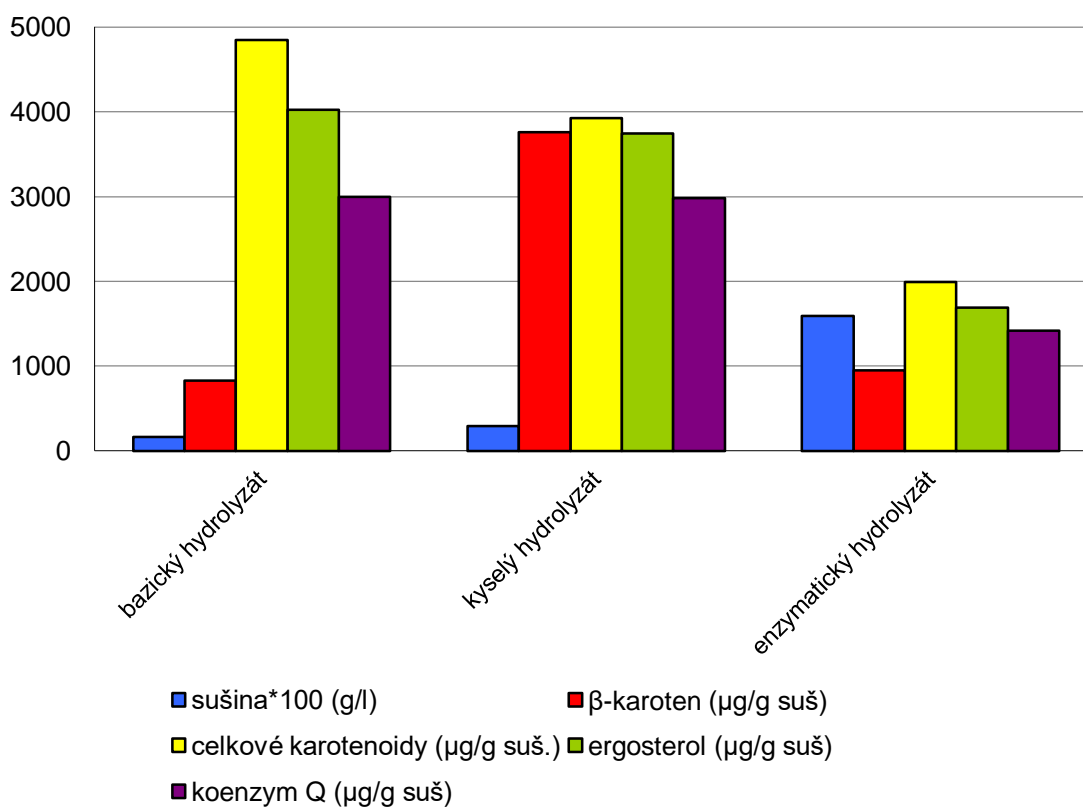
U kultivací se stočením na tukových médiích u kmene *Sporidiobolus metaroseus* bylo docíleno výrazné produkce ergosterolu, jež ve většině případů byla vyšší než produkce karotenoidů, přičemž nejvyšší hodnoty produkce ergosterolu byly dosaženy při kultivacích na tukovém médiu (6,267 mg/g) a tukovém médiu s vyšším přídatkem kyseliny palmitové (5,732 mg/g). Významnějších produkcí karotenoidů bylo dosaženo u kultivací na tukovém médiu s vyšším přídatkem kyseliny palmitové (4,821 mg/g) a tukovo-glycerolovém médiu (3,142 mg/g). Na tukovém médiu s vyšším přídatkem kyseliny palmitové byla rovněž nejvyšší produkce koenzymu Q (3,486 mg/g). Uvedené charakteristiky lze najít v Grafu 9.

5.2.3.3. Srovnání vlastností kultivací se zařazením centrifugace a bez něj

Z tukových médií bylo nejlepší pro produkci karotenoidů médium tukové s vyšším přídatkem kyseliny palmitové kultivované se stočením (4,821 mg/g). Pro produkci ergosterolu a koenzymu Q byly vhodnější kultivace na tukových médiích se stočením, přičemž pro ergosterol představuje výjimku médium tween-tukové, jež mělo jen o málo $\mu\text{g/g}$ vyšší produkci u nestáčených kultivací. Nejvyšší produkce ergosterolu bylo dosaženo v tukovém médiu při kultivaci se stočením (6,267 mg/g). Pro koenzym Q představují výjimky média tween-tukové a tukovo-glycerolové, jež měla vyšší produkci při kultivacích bez stočení. Nejvyšší hodnoty produkce koenzymu Q bylo dosaženo na tukovém médiu s vyšším přídatkem kyseliny palmitové (3,486 mg/g).

5.2.3.4. Vlastnosti kultivací na hydrolyzátech

Sporidiobolus metaroseus



Graf 10: Diagramové zobrazení finální produkce zkoumaných lipofilních látek biomasou kmene *Sporidiobolus metaroseus*, kultivované na hydrolyzátech.

Co se týkalo produkce všech látek, byl nejlepší bazický hydrolyzát (4,848 mg/g pro karotenoidy, 4,025 mg/g pro ergosterol a 2,996 mg/g pro koenzym Q). V produkci β -karotenu měla vedoucí postavení kultivace na kyselém hydrolyzátu (3,762 mg/g), u níž produkce β -karotenu představovala téměř veškerou produkci karotenoidů. Enzymatický hydrolyzát měl jako u předchozích kmenů nevyšší nárůst biomasy (15,94 g/l). Uvedené informace o kultivacích na hydrolyzátech vyobrazuje graficky Graf 10.

5.3. Stanovení produkčních vlastností daných kmenů kvasinek na GC

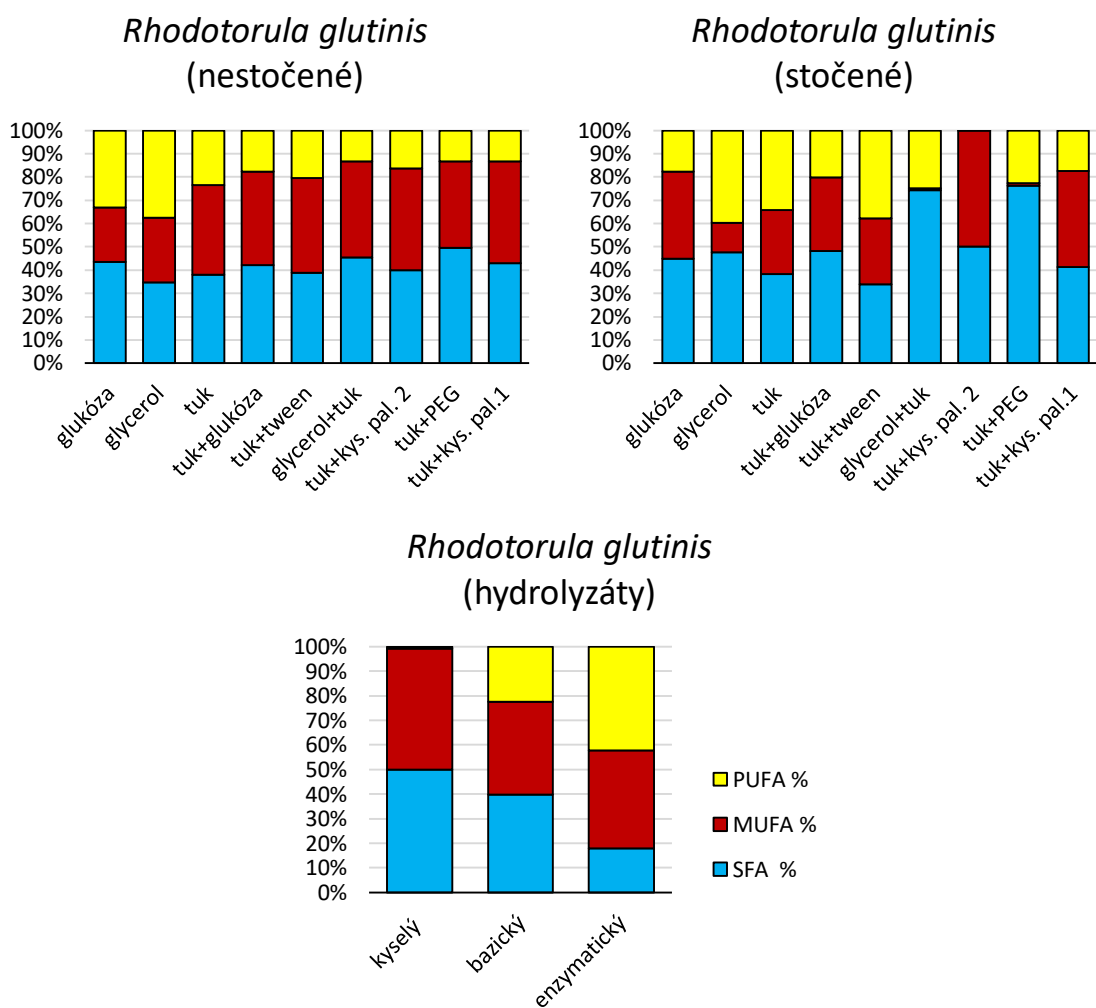
Analýza na plynovém chromatografu podávala výsledky o množství a složení mastných kyselin obsažených v tukách produkovanými kvasinkami. V podobě sloupcových diagramů bylo provedeno porovnání jednotlivých médií. První druh diagramu udává poměr mezi nasycenými mastnými kyselinami (SFA), mononenasyčenými mastnými kyselinami (MUFA) a polynenasycenými mastnými kyselinami (PUFA). Druhý diagram srovnává množství biomasy a procentuální celkové zastoupení tuku v ní mezi kultivacemi na jednotlivých médiích. Hodnoty prezentovány grafy lze najít v příloze v Přílohách 4 až 6.

5.3.1. Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula glutinis*

5.3.1.1. Poměrové zastoupení typů mastných kyselin

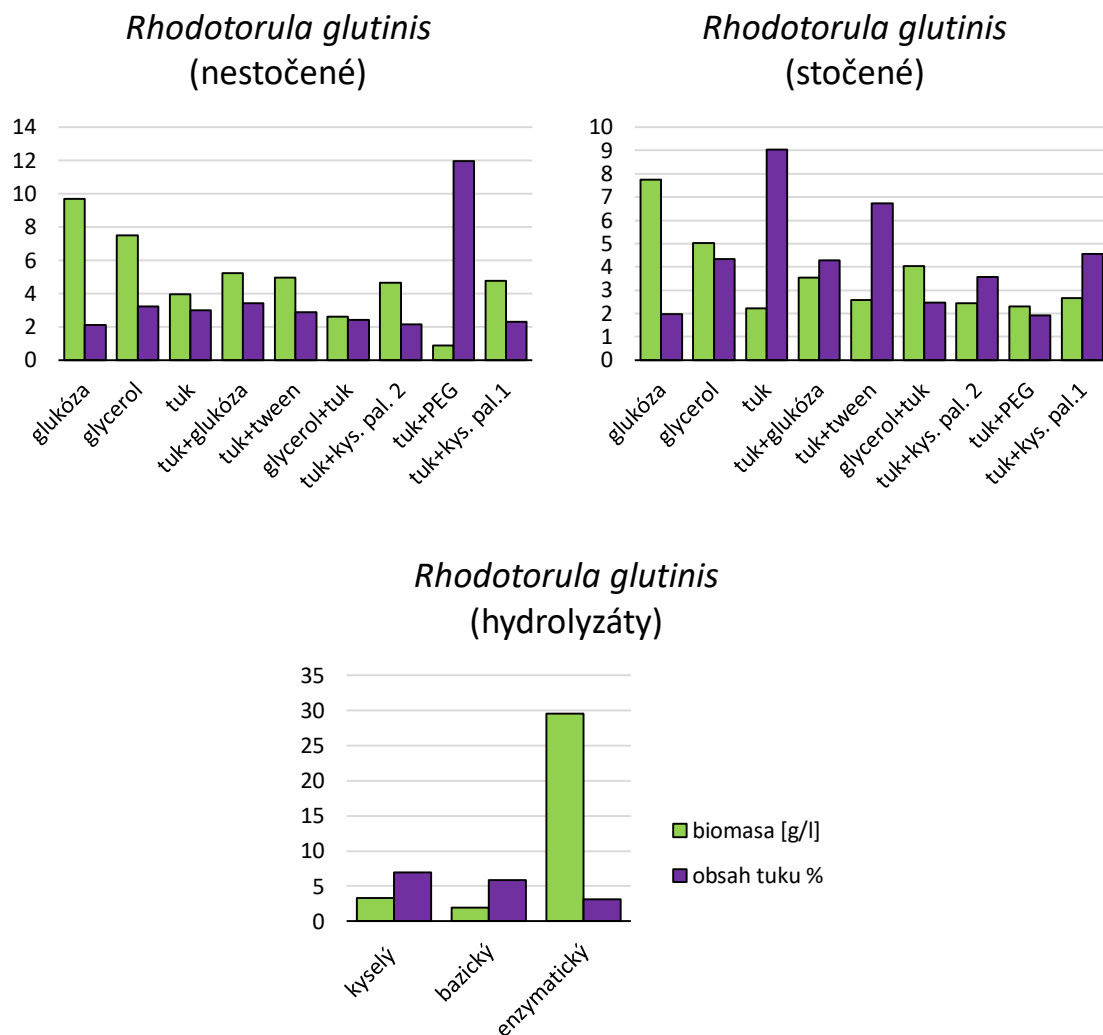
Na tukových médiích byla zaznamenána nejvyšší poměrová zastoupení SFA u tukovo-polyethyleglykolových médií při kultivaci bez stočení (48,58 %) i při kultivaci se stočením (76,21 %). Dále byla zjištěna nejvyšší poměrová zastoupení MUFA u tukových médií s vyšším přidavkem kyseliny palmitové, jak pro kultivace bez stočení (42,91 %), tak i pro kultivace se stočením (49,03 %). Nejvyšší poměrová zastoupení PUFA byla pozorována u čistých tukových médií bez stočení (23,13 %) i se stočením (33,03 %).

U hydrolyzátů byly pozorovány nejvyšší hodnoty zastoupení SFA (48,83 %) a MUFA (47,98 %) u kyselého hydrolyzátu. Nejvyšší zastoupení PUFA bylo pozorováno u enzymatického hydrolyzátu (42,30 %). Výše zmíněné hodnoty jsou vyobrazené na Grafech 11-13 nebo v Příloze 4.



Graf 11-13: Diagramové zobrazení poměrového zastoupení typů mastných kyselin pro kmen *Rhodotorula glutinis*. Každý diagram zastupuje typ kultivace a sloupce zastupují výše uvedené zastoupení pro jednotlivá média, na nichž byl daný kmen kultivován.

5.3.1.2. Množství biomasy a procentuální celkové zastoupení tuku v biomase



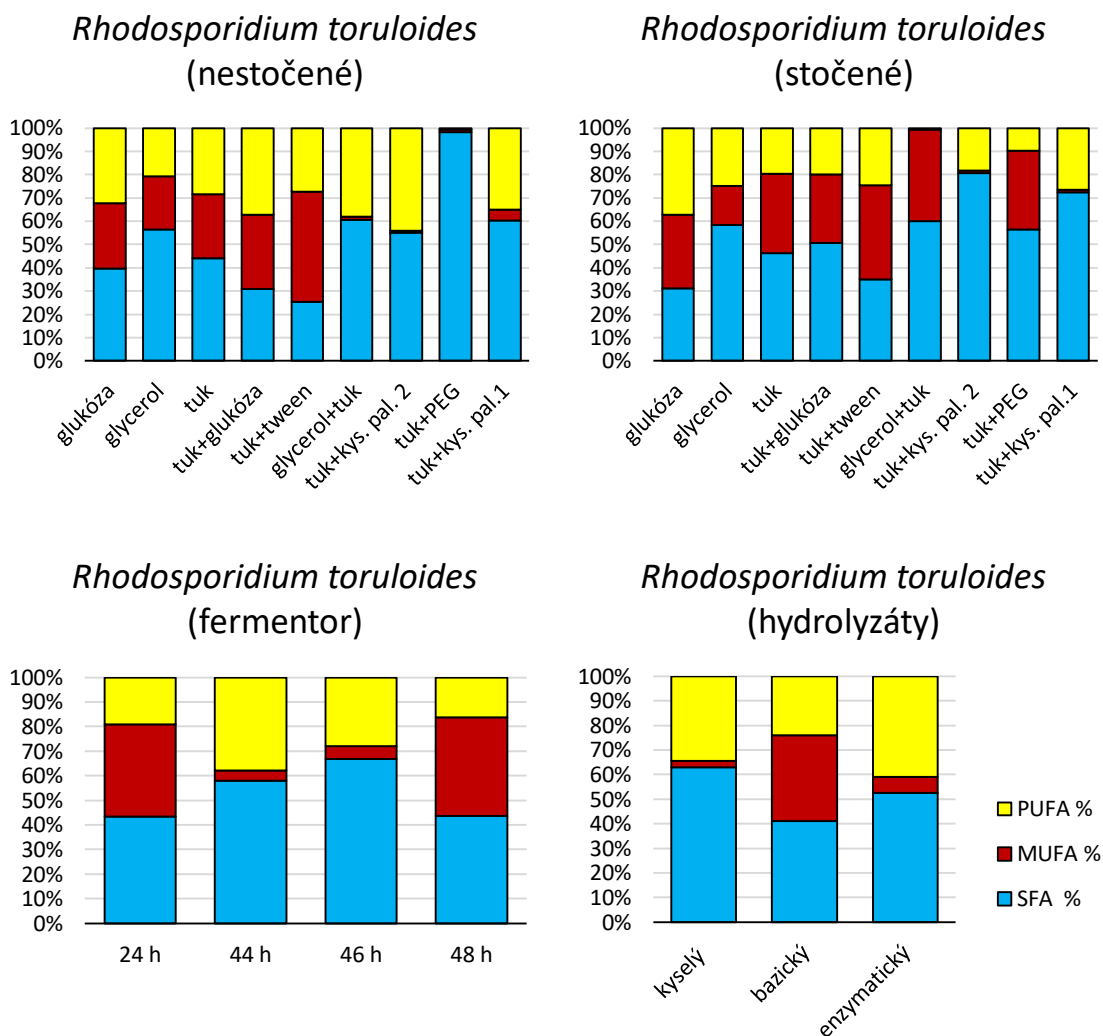
Graf 14-16: Diagramové zobrazení koncentrace biomasy a celkového obsahu tuku obsaženého v biomase kmenu *Rhodotorula glutinis*. Každý diagram zastupuje typ kultivace a dvojsloupce zastupují výše uvedené vlastnosti pro jednotlivá média, na nichž byl daný kmen kultivován.

Při kultivacích bez stočení na tukových médiích bylo zjištěno nejvyšší procentuální zastoupení tuku v buňkách u tukovo-polyetylglykolového média (11,98 %) a největší nárůst biomasy byl pozorován u tukovo-glukozového média (5,23 g/l). U kultivací se stočením na tukových médiích bylo určeno nejvyšší procentuální zastoupení tuku v buňkách u čistého tukového média (9,03 %) a největší nárůst biomasy byl zaznamenán u tukovo-glycerolového média (4,04 g/l).

U hydrolyzátů byla zjištěna nejvyšší hodnota procentuálního zastoupení tuku v biomase u kyselého hydrolyzátu (6,95 %) a nejvyšší nárůstu biomasy byl dosažen na enzymatickém hydrolyzátu (29,58 g/l). Zmíněné hodnoty jsou v Grafech 14-16 nebo v Přílohách 1 až 4.

5.3.2. Produkční vlastnosti kmene *Rhodosporidium toruloides*

5.3.2.1. Poměrové zastoupení typů mastných kyselin



Graf 17-20: Diagramové zobrazení poměrového zastoupení typů mastných kyselin pro kmen *Rhodosporidium toruloides*. Každý diagram zastupuje typ kultivace a sloupce zastupují výše uvedené zastoupení pro jednotlivá média, na nichž byl daný kmen kultivován.

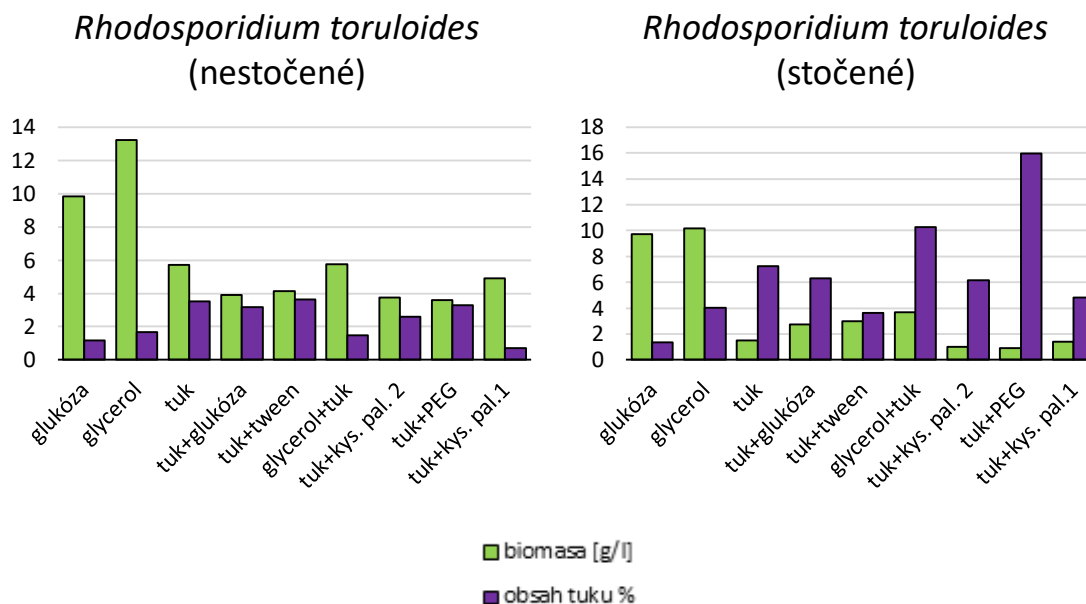
U tukových médií byla zaznamenána nejvyšší poměrová zastoupení SFA u tukovo-polyethyleglykolového média při kultivaci bez stočení (98,19 %) a při kultivaci se stočením u tukového média s vyšším přidavkem kyseliny palmitové (80,78 %). Dále byla zjištěna nejvyšší poměrová zastoupení MUFA u tween-tukových médií, jak pro kultivace bez stočení (45,88 %), tak i pro kultivace se stočením (40,33 %).

Nejvyšší poměrová zastoupení PUFA byla pozorována u tukových médií s vyšším pří-
davkem kyseliny palmitové při kultivaci bez stočení (42,83 %) a při kultivaci se stočením
tomu bylo u tukového s nižším přídavkem kyseliny palmitové (26,32 %).

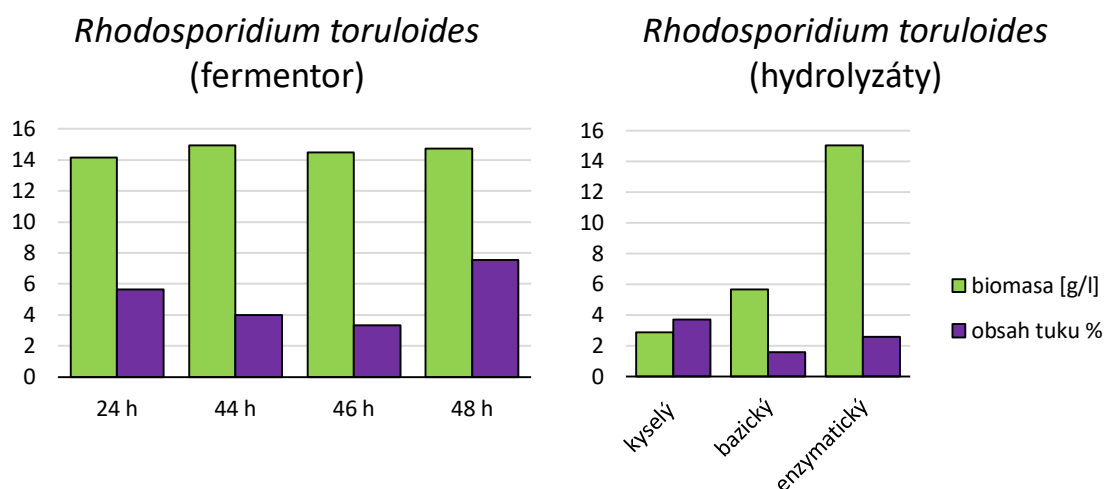
Při kultivaci ve fermentoru byla pozorována největší poměrová zastoupení SFA po
46 hodinách kultivace (64,97 %), MUFA po 48 hodinách kultivace (39,46 %) a PUFA po
44 hodinách kultivace (36,80 %).

Při kultivacích na hydrolyzátech byly pozorovány nejvyšší hodnoty zastoupení SFA u
kyselého hydrolyzátu (61,52 %), MUFA u bazického hydrolyzátu (34,45 %) a PUFA u en-
zymatického hydrolyzátu (38,74 %). Výše zmíněné hodnoty jsou vyobrazené v Grafech 17-
20 nebo v Příloze 5.

5.3.2.2. Množství biomasy a procentuální celkové zastoupení tuku v biomase



Graf 21-22: Diagramové zobrazení koncentrace biomasy a celkového obsahu tuku obsa-
ženého v biomase kmenu *Rhodosporidium toruloides*. Každý diagram zastupuje typ kultivace
a dvojsloupce zastupují výše uvedené vlastnosti pro jednotlivá média, na nichž byl daný
kmen kultivován.



Graf 23-24: Diagramové zobrazení koncentrace biomasy a celkového obsahu tuku obsaženého v biomase kmenu *Rhodosporidium toruloides*. Každý diagram zastupuje typ kultivace a dvojsloupce zastupují výše uvedené vlastnosti pro jednotlivá média, na nichž byl daný kmen kultivován.

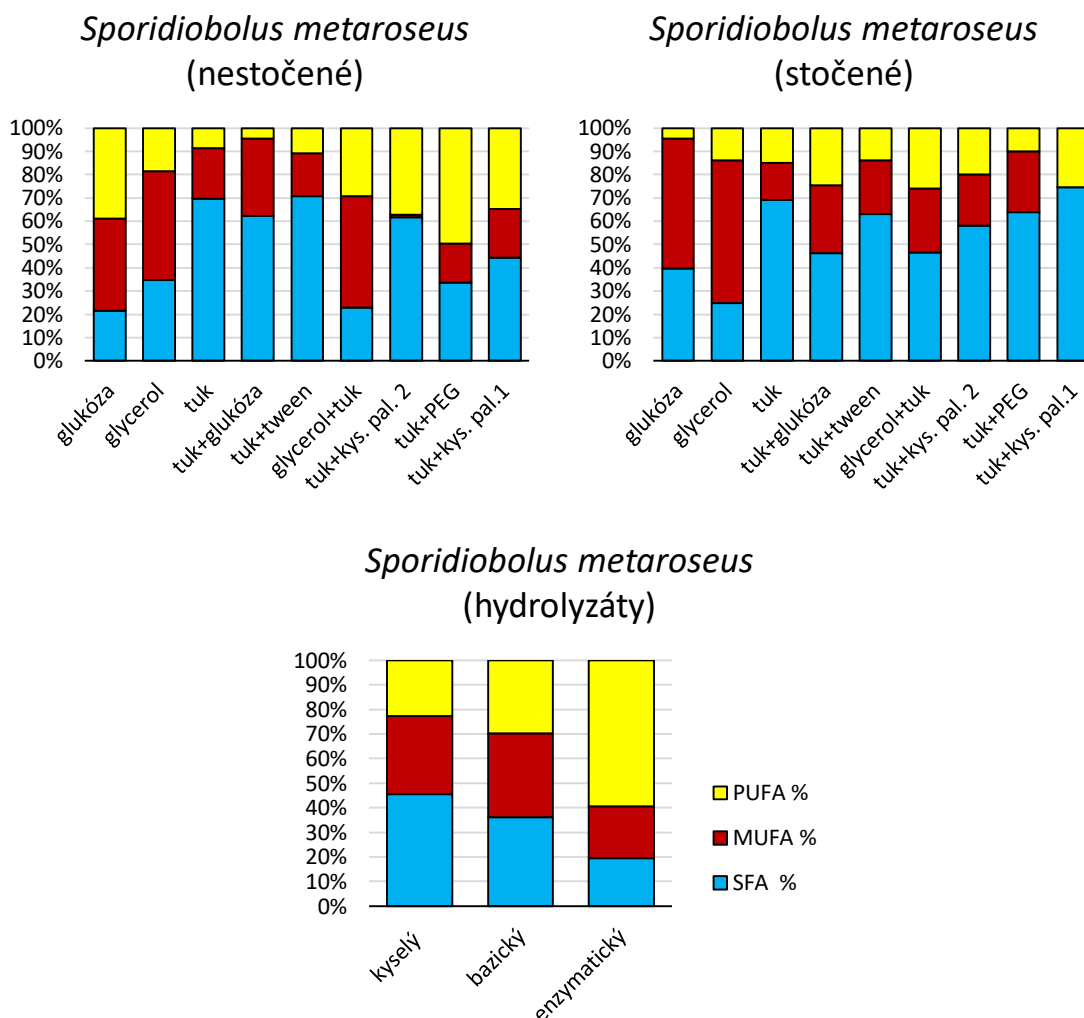
Při kultivacích bez stočení na tukových médiích bylo zjištěno nejvyšší procentuální zastoupení tuku v biomase u tween-tukového média (3,62 %) a největší nárůst biomasy byl pozorován u tukovo-glycerolového média (5,75 g/l). U kultivací se stočením na tukových médiích bylo stanoveno nejvyšší procentuální zastoupení tuku v buňkách u tukovo-polyethylenglykolového média (15,98 %) a největší nárůst biomasy byl zaznamenán u tukovo-glycerolového média (3,66 g/l). Výše zmíněné hodnoty jsou vyobrazené v Grafech 21-22 nebo v Tabulkách 10 a 13.

Kultivací ve fermentoru bylo dosaženo nejvyššího procentuálního zastoupení tuku v biomase po 48 hodinách kultivace (7,53 %). Největšího nárůstu biomasy kultura dosáhla po 44 hodinách kultivace (14,93 g/l).

Při kultivacích na hydrolyzátech byla určena největší hodnota procentuálního zastoupení tuku v kvasinkách u kyselého hydrolyzátu (3,69 %) a největší nárůst biomasy byl dosažen na enzymatickém hydrolyzátu (15,03 g/l). Zmíněné hodnoty zahrnující kultivace ve fermentoru a kultivace na hydrolyzátech jsou vyobrazeny v Grafech 23-24 nebo v Příloze 5.

5.3.3. Produkční vlastnosti kmene *Sporidiobolus metaroseus*

5.3.3.1. Poměrové zastoupení typů mastných kyselin

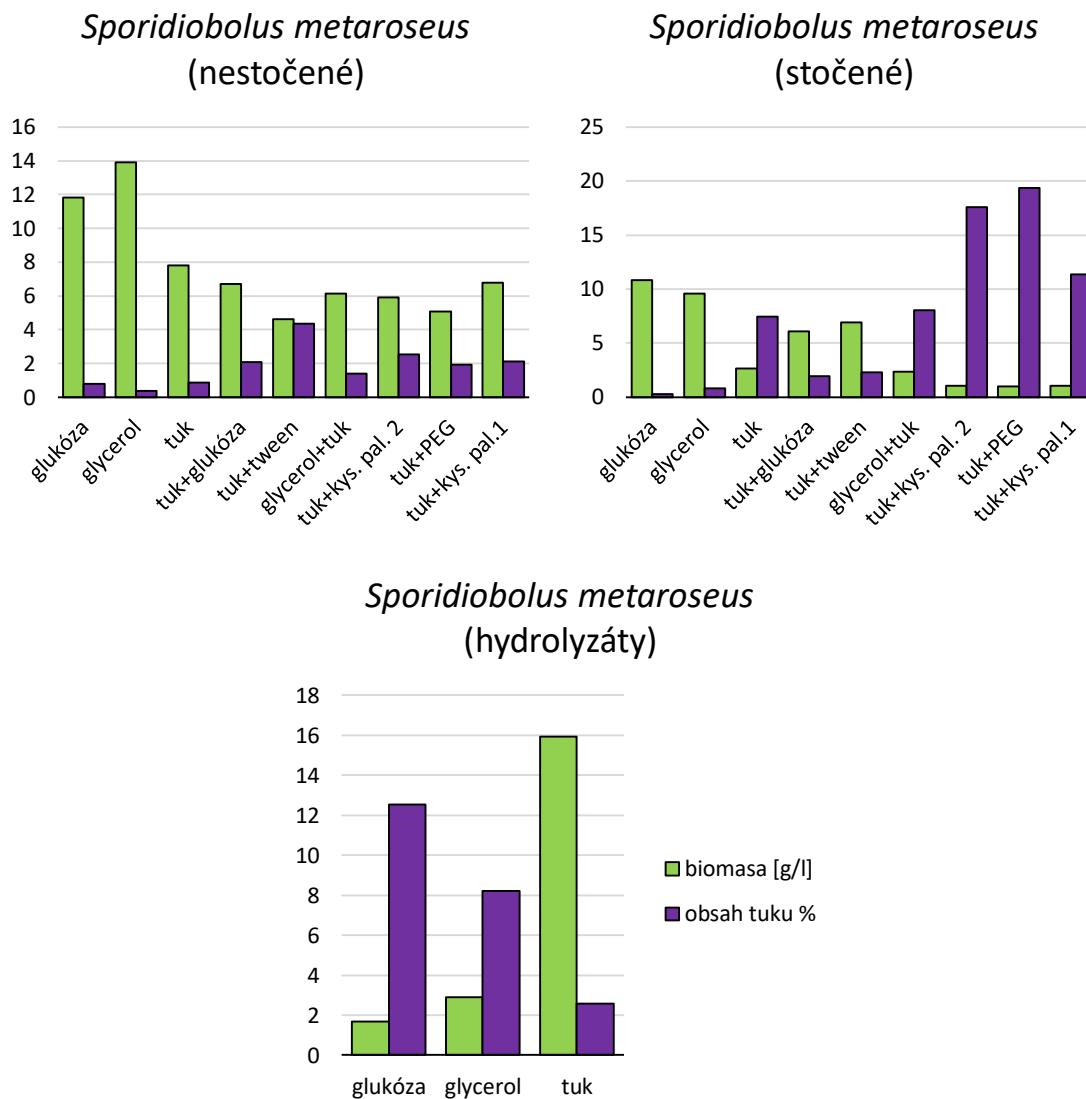


Graf 25-27: Diagramové zobrazení poměrového zastoupení typů mastných kyselin pro kmen *Sporidiobolus metaroseus*. Každý diagram zastupuje typ kultivace a sloupce zastupují výše uvedené zastoupení pro jednotlivá média, na nichž byl daný kmen kultivován.

Na tukových médiích byly pozorovány nejvyšší hodnoty poměrových zastoupení SFA u tween-tukového média při kultivaci bez stočení (70,53 %) a u kultivace se stočením na tukovém médiu s nižším přidavkem kyseliny palmitové (73,19 %). Nejvyšší poměrová zastoupení MUFA byla při kultivacích na tukových médiích stanovena u tukovo-glycerolového média, jak pro kultivace bez stočení (47,76 %), tak i pro kultivace se stočením (27,03 %). Nejvyšší poměrová zastoupení PUFA při kultivacích na tukových médiích byla zaznamenána na tukovo-polyethylenglykolovém médiu u kultivace bez stočení (49,60 %) a na tukovo-glycerolovém médiu při kultivaci se stočením (25,65 %).

Na hydrolyzátech byla pozorována nejvyšší zastoupení SFA u kyselého hydrolyzátu (44,88 %), MUFA u bazického hydrolyzátu (33,84 %) a PUFA u enzymatického hydrolyzátu (59,24 %). Zmíněné hodnoty poměrů mastných kyselin u tukových a hydrolyzovaných médií jsou vyobrazené v Grafech 25-27 nebo v Příloze 6.

5.3.3.2. Množství biomasy a procentuální celkové zastoupení tuku v biomase



Graf 28-30: Diagramové zobrazení koncentrace biomasy a celkového obsahu tuku obsaženého v biomase kmenu *Sporidiobolus metaroseus*. Každý diagram zastupuje typ kultivace a dvojsloupce zastupují výše uvedené vlastnosti pro jednotlivá média, na nichž byl daný kmen kultivován.

Na kultivacích bez stočení u tukových médiích bylo určeno nejvyšší procentuální zastoupení tuku v sušině u tween-tukového média (4,34 %) a největší nárůst biomasy byl zjištěn u čistě tukového média (7,82 g/l). Při kultivacích se stočením na tukových médiích bylo stanoveno nejvyšší procentuální zastoupení tuku v sušině u tukovo-polyethylenglykolového média (19,38 %) a největší nárůst biomasy byl pozorován u tween-tukového média (6,92 g/l).

U hydrolyzátů byla stanovena největší hodnota poměrového zastoupení tuku v biomase u kyselého hydrolyzátu (12,54 %). Nejvyšší nárůst biomasy byl dosažen na enzymatickém hydrolyzátu (15,94 g/l). Hodnoty procentuálního obsahu tuku a nárůstu biomasy jsou ukázány v Grafech 28-30 nebo v Přílohách 3 a 6.

5.4. Spojené charakteristiky růstu biomasy a produkce metabolitů

Produkce (p), které byly vyjádřeny v miligramech látky na gram biomasy, byly pomocí koncentrací biomasy (b), jež byly vyjádřeny v gramech biomasy na litr média, přepočítány na koncentrace zkoumaných látek (c), které byly vyjádřeny v miligramech na litr média. Výsledné koncentrace mnohem více vypovídaly o množství produkovaných látek. Na základě porovnání koncentrací byla vybrána média s nevyšší finální koncentrací sledovaných látek. Přepočet měl následující tvar:

$$c = p \cdot b$$

Koncentrace zkoumaných látek získané na základě výše zmíněného vztahu jsou uvedeny v Přílohách 7 až 9. Koncentrace tuku uvedené v Přílohách 4 až 6 byly převedeny na jednotky mg/l.

U jednotlivých kmenů byly koncentrace veškerých zkoumaných látek (β -karoten, karotenoidy, ergosterol, koenzym Q a tuk) u nejlepších kultivací porovnány s koncentracemi látek v referenčních glukozových kultivacích. Kultivace se dělily podle typu médií na 4 kategorie. Do první kategorie společně byly zahrnuty kultivace na glycerolu se stočením i bez stočení, do druhé kategorie byly zahrnuty veškeré kultivace na tukových médiích (stočené i nestočené dohromady), do třetí kategorie byly zahrnuty kultivace na hydrolyzátech a do čtvrté kategorie byla začleněna kultivace ve fermentoru. Pro média kultivovaná se stočením byla za referenční užívána glukozová média kultivovaná se stočením. Pro ostatní média byla jako referenční použita glukozová média kultivovaná bez stočení.

5.4.1. Charakteristika kmene *Rhodotorula glutinis*

5.4.1.1. Glycerolová média

Koncentrace všech produkovaných látek byla nejvyšší u kultivace na glycerolovém médiu bez stočení. Koncentrace β -karotenu byla stanovena na 12,413 mg/l, což bylo o 75,09 % méně v porovnání s referenční hodnotou (49,830 mg/l). Koncentrace karotenoidů byla určena na 25,542 mg/l, což bylo o 83,51 % méně v porovnání s referenční hodnotou (154,910 mg/l). Koncentrace ergosterolu byla stanovena na 12,979 mg/l, což bylo o 15,09 % méně v porovnání s referenční hodnotou (15,287 mg/l). Koncentrace koenzymu Q byla stanovena na 7,548 mg/l, což bylo o 49,00 % méně v porovnání s referenční hodnotou (14,800 mg/l). Koncentrace tuku byla stanovena na 240,913 mg/l, což bylo o 17,74 % více v porovnání s referenční hodnotou (204,615 mg/l).

5.4.1.2. Tuková média

Koncentrace všech produkovaných látek byla při kultivacích na tukových médiích nejvyšší u kultivací bez stočení, vyjma produkce tuku, jehož maximální koncentrace byla zaznamenána u kultivací se stočením. Koncentrace β -karotenu byla nejvyšší u tukovo-polyethylenglykolového média a byla stanovena na 8,914 mg/l, což bylo o 82,11 % méně v porovnání s referenční hodnotou (49,830 mg/l). Koncentrace karotenoidů byla nejvyšší u tukovo-polyethylenglykolového média a byla určena na 20,784 mg/l, což bylo o 86,58 % méně v porovnání s referenční hodnotou (154,910 mg/l). Koncentrace ergosterolu byla nejvyšší u tukovo-glycerolového média a byla stanovena na 13,568 mg/l, což bylo o 11,25 % méně v porovnání s referenční hodnotou (15,287 mg/l). Koncentrace koenzymu Q byla nejvyšší u tukovo-glukózového média a byla stanovena na 28,545 mg/l, což bylo o 92,87 % více v porovnání s referenční hodnotou (14,800 mg/l). Koncentrace tuku byla nejvyšší u čistě tukového média a byla stanovena na 200,448 mg/l, což bylo o 31,68 % více v porovnání s referenční hodnotou (152,226 mg/l).

5.4.1.3. Média vytvořená z hydrolyzátů

Koncentrace všech produkovaných látek byla nejvyšší u kultivace na enzymatickém hydrolyzátu. Koncentrace β -karotenu byla stanovena na 9,663 mg/l, což bylo o 80,61 % méně v porovnání s referenční hodnotou (49,830 mg/l). Koncentrace karotenoidů byla určena na 42,435 mg/l, což bylo o 72,61 % méně v porovnání s referenční hodnotou (154,910 mg/l). Koncentrace ergosterolu byla stanovena na 62,332 mg/l, což bylo o 307,74 % více v porovnání s referenční hodnotou (15,287 mg/l). Koncentrace koenzymu Q byla stanovena na 32,185 mg/l, což bylo o 117,47 % více v porovnání s referenční hodnotou (14,800 mg/l). Koncentrace tuku byla stanovena na 920,978 mg/l, což bylo o 350,10 % více v porovnání s referenční hodnotou (204,615 mg/l).

5.4.2. Charakteristika kmene *Rhodospiridium toruloides*

5.4.2.1. Glycerolová média

Koncentrace ergosterolu a koenzymu Q byly nejvyšší u kultivace bez stočení. Koncentrace β -karotenu, karotenoidů a tuku byly nevyšší u kultivace se stočením. Koncentrace β -karotenu byla stanovena na 14,601 mg/l, což bylo o 40,19 % méně v porovnání s referenční hodnotou (24,414 mg/l). Koncentrace karotenoidů byla určena na 66,205 mg/l, což bylo o 26,14 % méně v porovnání s referenční hodnotou (89,641 mg/l). Koncentrace ergosterolu byla stanovena na 13,057 mg/l, což bylo o 1,46 % více v porovnání s referenční hodnotou (12,869 mg/l). Koncentrace koenzymu Q byla stanovena na 10,561 mg/l, což bylo o 18,61 % méně v porovnání s referenční hodnotou (12,975 mg/l). Koncentrace tuku byla stanovena na 408,344 mg/l, což bylo o 208,79 % více v porovnání s referenční hodnotou (13,239 mg/l).

5.4.2.2. Tuková média

Koncentrace β -karotenu, karotenoidů a ergosterolu byly nejvyšší u kultivací bez stočení. Nejvyšší koncentrace koenzymu Q a tuku byly zaznamenány u kultivací se stočením. Koncentrace β -karotenu byla nejvyšší u tukovo-glukózového média a byla stanovena na 14,286 mg/l, což bylo o 65,01 % méně v porovnání s referenční hodnotou (40,830 mg/l). Koncentrace karotenoidů byla nejvyšší u tukovo-glukózového média a byla určena na 65,018 mg/l, což bylo o 51,57 % méně v porovnání s referenční hodnotou (134,240 mg/l). Koncentrace ergosterolu byla nejvyšší u tukovo-glycerolového média a byla stanovena na 22,954 mg/l, což bylo o 78,37 % více v porovnání s referenční hodnotou (12,869 mg/l). Koncentrace koenzymu Q byla nejvyšší u tukovo-glycerolového média a byla stanovena na 12,328 mg/l, což bylo o 38,07 % více v porovnání s referenční hodnotou (8,929 mg/l). Koncentrace tuku byla nejvyšší u tukovo-glycerolového média a byla stanovena na 375,780 mg/l, což bylo o 184,17 % více v porovnání s referenční hodnotou (132,239 mg/l).

5.4.2.3. Média vytvořená z hydrolyzátů

Koncentrace všech produkovaných látek byla nejvyšší u kultivace na enzymatickém hydrolyzátu. Koncentrace β -karotenu byla stanovena na 43,330 mg/l, což bylo o 6,12 % více v porovnání s referenční hodnotou (40,830 mg/l). Koncentrace karotenoidů byla určena na 98,548 mg/l, což bylo o 26,59 % méně v porovnání s referenční hodnotou (134,240 mg/l). Koncentrace ergosterolu byla stanovena na 56,232 mg/l, což bylo o 336,96 % více v porovnání s referenční hodnotou (12,869 mg/l). Koncentrace koenzymu Q byla stanovena na 22,697 mg/l, což bylo o 74,92 % více v porovnání s referenční hodnotou (12,975 mg/l). Koncentrace tuku byla stanovena na 383,513 mg/l, což bylo o 230,82 % více v porovnání s referenční hodnotou (115,927 mg/l).

5.4.2.4. *Fermentor*

Koncentrace β -karotenu a karotenoidů byly nejvyšší při 44. hodině fermentace. Koncentrace ergosterolu dosáhla maxima při 46. hodině kultivace. Při 24. hodině kultivace bylo dosaženo nejvyššího množství koenzymu Q a při 48. hodině bylo docíleno nejvyšší koncentrace tuku v médiu. Koncentrace β -karotenu byla stanovena na 27,816 mg/l, což bylo o 31,88 % méně v porovnání s referenční hodnotou (40,830 mg/l). Koncentrace karotenoidů byla určena na 67,402 mg/l, což bylo o 49,79 % méně v porovnání s referenční hodnotou (134,240 mg/l). Koncentrace ergosterolu byla stanovena na 126,575 mg/l, což bylo o 883,56 % více v porovnání s referenční hodnotou (12,869 mg/l). Koncentrace koenzymu Q byla stanovena na 44,845 mg/l, což bylo o 245,62 % více v porovnání s referenční hodnotou (12,975 mg/l). Koncentrace tuku byla stanovena na 1110,632 mg/l, což bylo o 858,05 % více v porovnání s referenční hodnotou (115,927 mg/l).

5.4.3. Charakteristika kmene *Sporidiobolus metaroseus*

5.4.3.1. *Glycerolová média*

Koncentrace všech produkovaných látek byla nejvyšší u kultivace bez stočení, výjimku tvořila pouze koncentrace tuku, jež měla nejvyšší hodnotu při kultivacích se stočením. Koncentrace β -karotenu byla stanovena na 0,991 mg/l, což bylo o 79,19 % méně v porovnání s referenční hodnotou (4,764 mg/l). Koncentrace karotenoidů byla určena na 4,551 mg/l, což bylo o 71,80 % méně v porovnání s referenční hodnotou (16,139 mg/l). Koncentrace ergosterolu byla stanovena na 12,351 mg/l, což bylo o 12,64 % méně v porovnání s referenční hodnotou (14,138 mg/l). Koncentrace koenzymu Q byla stanovena na 3,729 mg/l, což bylo o 55,25 % méně v porovnání s referenční hodnotou (8,332 mg/l). Koncentrace tuku byla stanovena na 80,476 mg/l, což bylo o 139,48 % více v porovnání s referenční hodnotou (33,604 mg/l).

5.4.3.2. *Tuková média*

Koncentrace všech produkovaných látek byla při kultivacích na tukových médiích nejvyšší u kultivací bez stočení, výjimku představovala jen koncentrace ergosterolu, která dosahovala nejvyšších hodnot u kultivací se stočením. Koncentrace β -karotenu byla nejvyšší u tukového média s nižším přídatkem kyseliny palmitové, a byla stanovena na 10,223 mg/l, což bylo o 114,57 % více v porovnání s referenční hodnotou (4,764 mg/l). Koncentrace karotenoidů byla nejvyšší u tukového média s nižším přídatkem kyseliny palmitové a byla určena na 24,568 mg/l, což bylo o 52,24 % více v porovnání s referenční hodnotou (16,139 mg/l). Koncentrace ergosterolu byla nejvyšší u čistě tukového média a byla stanovena na 16,544 mg/l, což bylo o 152,61 % více v porovnání s referenční hodnotou (6,549 mg/l). Koncentrace koenzymu Q byla nejvyšší u tukovo-glycerolového média a byla stanovena na 7,506 mg/l, což bylo o 9,92 % méně v porovnání s referenční hodnotou (8,332 mg/l). Koncentrace tuku byla nejvyšší u tween-tukového média a byla stanovena na 200,671 mg/l, což bylo o 109,38 % více v porovnání s referenční hodnotou (95,843 mg/l).

5.4.3.3. Média vytvořená z hydrolyzátů

Nejvyšších koncentrací všech zjišťovaných látek bylo dosaženo kultivací na enzymatickém hydrolyzátu. Koncentrace β -karotenu byla stanovena na 15,149 mg/l, což bylo o 217,96 % více v porovnání s referenční hodnotou (4,764 mg/l). Koncentrace karotenoidů byla určena na 31,711 mg/l, což bylo o 96,49 % více v porovnání s referenční hodnotou (16,139 mg/l). Koncentrace ergosterolu byla stanovena na 26,903 mg/l, což bylo o 90,29 % více v porovnání s referenční hodnotou (14,138 mg/l). Koncentrace koenzymu Q byla stanovena na 22,585 mg/l, což bylo o 171,06 % více v porovnání s referenční hodnotou (8,332 mg/l). Koncentrace tuku byla stanovena na 408,640 mg/l, což bylo o 326,37 % více v porovnání s referenční hodnotou (95,843 mg/l).

6 Závěr

Předložená práce byla zaměřena na studium produkce biomasy a vybraných metabolitů tří kmenů karotenogenních kvasinek na médiích obsahujících glycerol a odpadní živočišný tuk.

Kultivace na glycerolových médiích vykazovaly u všech kmenů vysoké nárůsty biomasy, což je způsobeno jednoduchým metabolickým zpracováním glycerolu. Největší koncentrace všech analyzovaných látek byly v rámci glycerolových médií pozorovány u kvasinky druhu *Rhodospodium toruloides* (hodnoty koncentrací jsou vypsány v kapitole 5.4.2.1), přičemž nejvyšší koncentrace produkovaných karotenoidů, β -karotenu a tuku byly zjištěny u stáčených médií a nejvyšší koncentrace ergosterolu a koenzymu Q u nestáčených médií. Ačkoliv byly kultivace provedeny na přečištěném glycerolu, mohly by sloužit jako orientační modely pro budoucí kultivace na odpadním glycerolu.

Ve většině případů u kultivací na tukových médiích dosahovaly vyšších nárůstů biomasy nestáčené kultivace. U stáčených kultivací byly u tukových médií pozorovány vyšší průměrné hodnoty koncentrací tuku oproti nestáčeným kultivacím. Z měření bylo vyvozeno, že pro dosažení nejvyšších koncentrací β -karotenu, karotenoidů, ergosterolu a tuku je vhodné ke kultivaci použít druh kvasinky *Rhodospodium toruloides* (hodnoty koncentrací jsou zmíněny v kapitole 5.4.2.2), avšak pro docílení nejvyšší koncentrace koenzymu Q je vhodné užít kvasinky druhu *Rhodotorula glutinis* (hodnota koncentrace je zmíněna v kapitole 5.4.1.2). Karotenoidy včetně β -karotenu dosahovaly nejvyšší koncentrace v čistě tukovém médiu při kultivaci bez stočení. Nejvyšší koncentrace ergosterolu byla dosažena v tukovo-glycerolovém médiu při kultivaci bez stočení. Koncentrace koenzymu Q dosáhla maximální hodnoty u tukovo-glukózového média u kultivace bez stočení. Nejvyšší koncentrace tuku byla dosažena u tukovo-glycerolového média při kultivaci se stočením. Výše zmíněná tuková média a druhy kvasinek byla nejvhodnější pro produkci analyzovaných látek.

U hydrolyzátů byly u všech kmenů zaznamenány nejvyšší koncentrace látek a biomasy při kultivacích na enzymatických hydrolyzátech. Nejvyšší koncentrace karotenoidů a β -karotenu byly zaznamenány u kvasinky druhu *Rhodospodium toruloides* (hodnoty koncentrací jsou zmíněny v kapitole 5.4.2.3). Dále pak nejvyšší koncentrace ergosterolu, koenzymu Q, tuku a biomasy byly zaznamenány u kvasinky druhu *Rhodotorula glutinis* (hodnoty koncentrací jsou zmíněny v kapitole 5.4.1.3). Nižší hodnoty koncentrací sledovaných látek a biomasy u kultivací na kyselých a bazických hydrolyzátech byly s vysokou pravděpodobností zapříčiněny vyšším osmotickým tlakem, který vznikl působením solí vzniklých při úpravě pH na optimální hodnotu. U enzymatického hydrolyzátu byl tento problém vyřešen prostředím pufry, který nevytvářel tak velký osmotický stres na buňky. Kultivace na hydrolyzovaném tuku by mohly mít výrazné perspektivy jak pro valorizaci tohoto typu odpadu, tak i pro velkoobjemovou produkci karotenoidů a ostatních lipidických látek, proto by bylo vhodné pro další zkoumání provést ke kultivacím také ekonomické zhodnocení procesu.

Kultivací ve fermentoru bylo dosaženo výrazných nárůstů biomasy a koncentrací sledovaných látek. Koncentrace jednotlivých složek se v průběhu kultivace měnily. Nejvhodnější doba pro získání karotenoidů včetně β -karotenu představovala 44. hodina kultivace, kdy koncentrace zmíněných látek dosáhly svého maxima. Hodnota rozdílu koncentrace ergosterolu byla mezi 44. a 46. hodinou téměř zanedbatelná, přičemž nejvyšší hodnoty koncentrace bylo dosaženo při 46. hodině kultivace. Nejvyšší hodnota koncentrace koenzymu Q byla naměřena při 24. hodině kultivace, přičemž je možné, že maxima dosáhla v dřívějších hodinách, avšak v této době nebyly provedeny žádné odběry. Koncentrace tuku byla nejvýznamnější na konci kultivace ve 48. hodině (veškeré hodnoty zmíněných koncentrací jsou uvedeny v kapitole 5.4.2.4). Pro budoucí zkoumání by bylo vhodné provést ve fermentoru kultivace na hydrolyzovaném tuku, což by mohlo sloužit jako model využití hydrolyzátů ve velkoobjemových kultivacích.

Většina poměrových zastoupení druhů mastných kyselin obsažených v tucích neprojevovala při porovnání kultivací na stejných médiích podobné trendy, výjimky tvořily kultivace na níže uvedených médiích. Podobné trendy byly vykazovány u hodnot PUFA u médií tukových, tukovo-glukozových a tween-tukových kultivovaných kvasinkou druhu *Rhodotorula glutinis* se stočením a bez stočení. Při porovnání kultivací na hydrolyzátech, vykazovaly hodnoty SFA u kvasinky *Sporidiobolus metaroseus* podobné trendy jako u kvasinky druhu *Rhodotorula glutinis*. Podobné poměrové zastoupení mastných kyselin vykazovala tukovo-polyethylenglykolová média při kultivacích se stočením u kvasinek druhů *Rhodospiridium toruloides* a *Sporidiobolus metaroseus*. Podobná zastoupení mastných kyselin byla pozorována u všech kmenů u tukovo-glukozových médií kultivovaných se stočením. Pro lepší porovnání poměrových zastoupení mastných kyselin by bylo vhodné provést více kultivací za shodných podmínek.

Produkce tuků vybranými druhy kvasinek byly na všech médiích velmi nízké, pravděpodobně z důvodu nízké hodnoty poměru uhlíku k dusíku, který není vhodný pro produkci tuků, avšak je vhodný pro produkci karotenoidů. Pro budoucí zkoumání v této oblasti by bylo vhodné optimalizovat C/N poměr, tak aby bylo dosaženo nejvyšších produkcí tuku.

7 Literatura

- [1] BRITTON, George., S. LIAAEN-JENSEN a H. PFANDER, c2004. Carotenoids handbook: molecular aspects and health issues. Boston: Birkhäuser Verlag. ISBN 37-643-6180-8.
- [2] YAMAGUCHI, Masayoshi, c2010. *Carotenoids: properties, effects, and diseases*. New York: Nova Science Publishers. Biochemistry research trends series. ISBN 978-1-61209-713-8.
- [3] MURRAY, Robert K., 2002. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.), v H. Jinočany: H. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- [4] LEE, P.C. a C. SCHMIDT-DANNERT. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 200301, vol. 60, 1-2, s. 1-11 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1007/s00253-002-1101-x. Dostupné z: <http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/884616461/fulltext-PDF/D290E2C83E364D6APQ/2?accountid=17115>
- [5] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ, 2009. *Chemie potravin. I. Rozš. a přeprac.* 3. vyd. Tábor: OSSIS, xxii, 580 s. : il. ISBN 9788086659176.
- [6] VODRÁŽKA, Zdeněk, 1996. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 191 s. ISBN 8020006001.
- [7] DOHNAL, Vlastimil, Alena JEŽKOVÁ a Jiří SKLÁDANKA, 2008. ERGOSTEROL: KLÍČOVÝ STEROID HUB. *Časopis pro ošetřovatelství a sociální vědy ve zdraví a nemoci*. 2008(2), 449-454. ISSN 1212-4117.
- [8] KAEAMUKAI, Makoto, 2002. Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. (6), 511-517. ISSN 1389-1723.
- [9] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila, 2002. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, ISBN 8020010246.
- [10] ROSYPAL, Sanislav, 1994. *Přehled biologie*. 2. upr. vyd., ve Scientii 1. vyd. Praha: Scientia, 635 s. ISBN 80-85827-32-8.
- [11] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1982, 483 s.
- [12] RHODOTORULA GLUTINIS (Fresenius) Harrison, 2008. *MINIATLAS MIKROORGANISMŮ* [online]. Praha: VŠCHT [cit. 2018-05-20]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/rhod-glu.htm>
- [13] SPORIDILOBOLUS SALMONICOLOR Fell et Tallman, 2008. *MINIATLAS MIKROORGANISMŮ* [online]. Praha: VŠCHT [cit. 2018-05-20]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/spori.htm>

- [14] MALISORN, C. a W. SUNTORNSUK, 2008. Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresource Technology* [online]. Elsevier, **99**(7), 2281-2287 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.05.019. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852407004348>
- [15] PROŠKOVÁ, Alexandra, Jiří KUČERA a Zdenka KOPICOVÁ, 2009. Porovnání kyselých a bazických katalyzovaných transesterifikací kafilerního tuku methanolem. *Chemické listy*. **103**(12), 1034-1036.
- [16] O'BRIEN., Richard D., 2009. *Fats and oils formulating and processing for applications*. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press. ISBN 14-200-6167-4.
- [17] PÁČA, Jan, 1987. Bioreaktory. Kvasný průmysl. VŠCHT, katedra kvasné chemie a bioinženýrství, Praha, 33/1987(1), 20-21.
- [18] BÍLKOVÁ, Kateřina a Blanka KRÁLOVÁ, 1997. Izolace biomakromolekul. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-708-0288-X.
- [19] KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna, VRANÁ, Dagmar, ed., 1986. *Kvasinky ve výzkumu a praxi*. Praha: Academia.
- [20] PRÍBELA, Alexander, 1991. *Analýza potravin*. Bratislava: STU, 224 s. ISBN 8022703745.
- [21] KROFTA, Jiří, 2001. *Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie II*. 6. přepr. vyd. Praha: VŠCHT, 9 sešitů (165) s. ISBN 8070804513.
- [22] SOMMER, Lumír, 1995. *Teoretické základy analytické chemie. III*. Brno: Fakulta chemická VUT, 101 s. ISBN 8021406607.
- [23] ARMAREGO, W. L. F. a Christina CHAI LI LIN, 2003. *Purification of laboratory chemicals* [online]. 5th ed. Amsterdam: Elsevier [cit. 2017-12-04]. ISBN 9780750675710.

8 Seznam použitých zkratek

DMAPP	dimethylallyldifosfát
FPP	farnesildifosfát
FSA	nasyčené mastné kyseliny
GC	plynová chromatografie
GGPP	geranylgeranyldifosfát
GPP	geranyldifosfát
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A
HMGS	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl syntáza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IPP	isopentenylidifosfát
kys. pal 2	větší přídavek kyseliny palmitové
kys. pal. 1	menší přídavek kyseliny palmitové
MK	mevalonát kináza
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny
PKM	fosfomevalonát kináza
PUFA	polynenasyčené mastné kyseliny
UV	ultrafialové záření
CN poměr	poměr uhlíku k dusíku
PEG	polyethylenglykol

9 Přílohy

Příloha 1: Produkce metabolitů kvasinkou *Rhodotorula glutinis* – obsah v biomase

Hodnoty produkci β -karotenu, karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q v jednotkách mg/g, a dále hodnoty koncentrací biomas pro jednotlivé kultivace a jednotlivá média kvasinky *Rhodotorula glutinis*.

Typ kultivace	Médium	β -karoten [mg/g]	karotenoidy [mg/g]	ergosterol [mg/g]	koenzym Q [mg/g]	biomasa [g/l]
Nestočené	Glukóza	5,142	15,987	1,578	1,527	9,69
	Glycerol	1,655	3,406	1,731	1,006	7,5
	Tuk	0,542	1,184	1,527	0,697	3,94
	Tuk + glukóza	0,266	0,551	1,329	5,458	5,23
	Tuk + tween	1,120	3,340	1,708	0,860	4,94
	Glycerol + tuk	3,146	6,640	5,179	2,877	2,62
	Tuk + kys. pal. 2	0,795	2,115	1,714	0,566	4,65
	Tuk + PEG	10,365	24,168	12,108	5,172	0,86
Tuk + kys. pal.1	1,096	2,901	1,874	0,763	4,75	
Stočené	Glukóza	1,142	4,016	1,319	0,917	7,76
	Glycerol	1,406	3,500	1,836	1,054	5,03
	Tuk	0,750	2,044	3,398	1,245	2,22
	Tuk + glukóza	0,246	0,770	1,411	0,665	3,53
	Tuk + tween	1,301	3,846	3,142	1,198	2,57
	Glycerol + tuk	0,639	1,557	2,351	1,053	4,04
	Tuk + kys. pal. 2	0,690	1,724	1,957	0,909	2,45
	Tuk + PEG	0,423	0,852	1,577	0,826	2,29
Tuk + kys. pal.1	0,535	1,448	2,401	0,857	2,65	
Hydrolyzáty	Kyselý	0,692	2,099	2,037	1,342	3,33
	Bazický	0,142	0,428	2,572	1,978	1,94
	Enzymatický	0,327	1,435	2,107	1,088	29,58

Příloha 2: Produkce metabolitů kvasinkou *Rhodosporidium toruloides* – obsah v biomase

Hodnoty produkci β -karotenu, karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q v jednotkách mg/g, a dále hodnoty koncentrací biomas pro jednotlivé kultivace a jednotlivá média kvasinky *Rhodosporidium toruloides*.

Typ kultivace	Médium	β -karoten [mg/g]	karotenoidy [mg/g]	ergosterol [mg/g]	koenzym Q [mg/g]	biomasa [g/l]
Nestočené	Glukóza	4,149	13,642	1,308	1,319	9,84
	Glycerol	0,472	1,988	0,986	0,798	13,24
	Tuk	2,037	7,245	2,408	1,149	5,71
	Tuk + glukóza	3,663	16,671	3,178	1,553	3,9
	Tuk + tween	0,939	4,021	1,495	0,590	4,13
	Glycerol + tuk	0,427	2,035	3,992	1,621	5,75
	Tuk + kys. pal. 2	1,296	3,681	5,841	2,547	3,77
	Tuk + PEG	0,637	1,972	4,834	2,861	3,6
	Tuk + kys. pal. 1	0,159	0,483	1,687	1,428	4,91
Stočené	Glukóza	2,507	9,203	1,117	0,917	9,74
	Glycerol	1,439	6,523	1,186	0,727	10,15
	Tuk	3,202	11,715	5,496	2,026	1,51
	Tuk + glukóza	2,951	9,597	3,749	1,281	2,75
	Tuk + tween	3,230	9,426	2,999	1,005	3
	Glycerol + tuk	1,519	3,101	5,517	3,368	3,66
	Tuk + kys. pal. 2	1,640	3,808	7,151	10,099	1
	Tuk + PEG	0,081	0,415	4,638	1,995	0,9
	Tuk + kys. pal. 1	1,853	4,869	6,813	7,587	1,39
Hydrolyzáty	Kyselý	2,065	9,672	6,010	4,763	2,85
	Bazický	0,328	0,749	1,305	1,432	5,64
	Enzymatický	2,883	6,557	3,741	1,510	15,03
hydrolyzáty	24 h	1,170	2,825	6,981	3,167	14,16
	44 h	1,863	4,515	8,477	2,708	14,93
	46 h	1,892	4,565	8,741	2,785	14,48
	44 h	1,762	4,220	8,173	2,706	14,75

Příloha 3: Produkce metabolitů kvasinkou *Sporidiobolus metaroseus* – obsah v biomase

Hodnoty produkci β-karotenu, karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q v jednotkách mg/g, a dále hodnoty koncentrací biomas pro jednotlivé kultivace a jednotlivá média kvasinky Sporidiobolus metaroseus

Typ kultivace	Médium	β-karoten [mg/g]	karotenoidy [mg/g]	ergosterol [mg/g]	koenzym Q [mg/g]	biomasa [g/l]
Nestočené	Glukóza	0,403	1,367	1,197	0,706	11,81
	Glycerol	0,071	0,328	0,889	0,268	13,89
	Tuk	0,129	0,846	0,911	0,520	7,82
	Tuk + glukóza	0,044	0,166	0,548	0,317	6,72
	Tuk + tween	1,401	3,149	1,259	0,936	4,62
	Glycerol + tuk	0,961	3,398	1,378	1,222	6,14
	Tuk + kys. pal. 2	0,238	0,591	0,496	0,322	5,93
	Tuk + PEG	1,388	4,337	1,477	1,140	5,06
	Tuk + kys. pal.1	1,510	3,629	1,160	1,096	6,77
Stočené	Glukóza	0,114	0,273	0,604	0,178	10,84
	Glycerol	0,081	0,190	0,689	0,175	9,56
	Tuk	0,235	1,545	6,267	2,526	2,64
	Tuk + glukóza	0,100	0,362	1,970	0,810	6,08
	Tuk + tween	0,080	0,923	1,197	0,464	6,92
	Glycerol + tuk	0,746	3,142	2,610	1,057	2,38
	Tuk + kys. pal. 2	0,945	4,821	5,732	3,486	1,06
	Tuk + PEG	0,257	0,933	3,499	1,928	0,97
	Tuk + kys. pal.1	1,005	2,568	4,111	2,532	1,07
Hydrolyzáty	Kyselý	0,828	4,848	4,025	2,996	1,69
	Bazický	3,762	3,926	3,742	2,978	2,9
	Enzymatický	0,950	1,989	1,688	1,417	15,94

Příloha 4: Produkce mastných kyselin kvasinkou *Rhodotorula glutinis*

Hodnoty množství tuku v buňkách v gramech na litr i v procentech vůči koncentraci biomasy a procentuální rozdělení mastných kyselin pro jednotlivé kultivace a jednotlivá média kvasinky *Rhodotorula glutinis*.

Typ kultivace	Médium	tuk v buňkách [g/l]	obsah tuku [%]	SFA [%]	MUFA [%]	PUFA [%]
Nestočené	Glukóza	0,205	2,11	43,03	23,00	32,86
	Glycerol	0,241	3,21	34,27	27,30	37,02
	Tuk	0,118	3,00	37,24	37,80	23,13
	Tuk + glukóza	0,134	3,40	41,16	39,27	17,21
	Tuk + tween	0,143	2,90	36,26	37,91	18,96
	Glycerol + tuk	0,064	2,43	44,47	40,29	13,14
	Tuk + kys. pal. 2	0,101	2,17	39,18	42,91	15,90
	Tuk + PEG	0,103	11,98	48,58	36,49	13,09
	Tuk + kys. pal.1	0,109	2,29	42,07	42,90	13,17
Stočené	Glukóza	0,152	1,96	43,87	36,85	17,26
	Glycerol	0,218	4,34	46,90	12,57	39,21
	Tuk	0,200	9,03	37,00	26,61	33,03
	Tuk + glukóza	0,152	4,30	44,04	28,98	18,60
	Tuk + tween	0,173	6,73	31,13	25,99	34,77
	Glycerol + tuk	0,099	2,46	72,97	0,84	24,43
	Tuk + kys. pal. 2	0,087	3,56	49,71	49,03	0,23
	Tuk + PEG	0,044	1,93	76,21	0,93	22,71
	Tuk + kys. pal.1	0,121	4,56	40,90	40,92	17,20
Hydrolyzáty	Kyselý	0,231	6,95	48,83	47,98	0,92
	Bazický	0,114	5,89	39,06	37,23	21,93
	Enzymatický	0,921	3,11	17,86	39,82	42,30

Příloha 5: Produkce mastných kyselin kvasinkou *Rhodosporidium toruloides*.

*Hodnoty množství tuku v buňkách v gramech na litr i v procentech vůči koncentraci biomasy a procentuální rozdělení mastných kyselin pro jednotlivé kultivace a jednotlivá média kvasinky *Rhodosporidium toruloides*.*

Typ kultivace	Médium	tuk v buňkách [g/l]	obsah tuku [%]	SFA [%]	MUFA [%]	PUFA [%]
Nestočené	Glukóza	0,116	1,18	38,14	26,84	31,00
	Glycerol	0,220	1,66	52,75	21,13	19,41
	Tuk	0,201	3,52	42,72	26,64	27,68
	Tuk + glukóza	0,123	3,17	30,14	31,43	36,49
	Tuk + tween	0,150	3,62	24,81	45,88	26,57
	Glycerol + tuk	0,086	1,49	59,03	1,37	36,94
	Tuk + kys. pal. 2	0,098	2,61	53,50	1,02	42,83
	Tuk + PEG	0,119	3,29	98,19	1,24	0,58
Tuk + kys. pal. 1	0,035	0,70	58,72	4,35	34,11	
Stočené	Glukóza	0,132	1,36	24,69	25,05	29,63
	Glycerol	0,408	4,02	52,41	14,97	22,41
	Tuk	0,110	7,27	45,55	33,73	19,20
	Tuk + glukóza	0,174	6,32	49,30	28,53	19,43
	Tuk + tween	0,109	3,65	34,93	40,33	24,37
	Glycerol + tuk	0,376	10,27	59,01	38,71	0,57
	Tuk + kys. pal. 2	0,062	6,17	80,78	0,96	18,31
	Tuk + PEG	0,144	15,98	55,51	33,44	9,56
Tuk + kys. pal. 1	0,067	4,81	71,76	0,96	26,32	
Hydrolyzáty	Kyselý	0,105	3,69	61,52	2,64	33,53
	Bazický	0,088	1,56	40,59	34,45	23,65
	Enzymatický	0,384	2,55	49,85	6,36	38,74
Fermentor	24 h	0,801	5,65	43,42	37,45	19,09
	44 h	0,594	3,98	56,24	4,15	36,80
	46 h	0,483	3,34	64,97	4,93	27,34
	48 h	1,111	7,53	42,81	39,46	16,09

Příloha 6: Produkce mastných kyselin kvasinkou *Sporodiobolus metaroseus*.

Hodnoty množství tuku v buňkách v gramech na litr i v procentech vůči koncentraci biomasy a procentuální rozdělení mastných kyselin pro jednotlivé kultivace a jednotlivá média kvasinky Sporodiobolus metaroseus.

Typ kultivace	Médium	tuk v buňkách [g/l]	obsah tuku [%]	SFA [%]	MUFA [%]	PUFA [%]
Nestočené	Glukóza	0,096	0,81	21,17	39,16	38,24
	Glycerol	0,055	0,39	31,65	42,43	16,77
	Tuk	0,067	0,86	66,87	20,72	8,40
	Tuk + glukóza	0,141	2,10	60,23	32,44	4,32
	Tuk + tween	0,201	4,34	70,53	18,44	10,83
	Glycerol + tuk	0,087	1,41	22,84	47,76	29,36
	Tuk + kys. pal. 2	0,149	2,52	61,82	0,97	37,26
	Tuk + PEG	0,098	1,94	33,63	16,86	49,60
	Tuk + kys. pal.1	0,143	2,11	41,08	19,30	32,24
Stočené	Glukóza	0,034	0,31	39,60	55,77	4,36
	Glycerol	0,080	0,84	24,66	61,39	13,76
	Tuk	0,197	7,47	67,66	15,60	14,73
	Tuk + glukóza	0,119	1,95	42,60	26,66	22,73
	Tuk + tween	0,160	2,32	62,87	23,23	13,82
	Glycerol + tuk	0,192	8,06	45,66	27,03	25,65
	Tuk + kys. pal. 2	0,186	17,59	58,13	21,94	19,89
	Tuk + PEG	0,188	19,38	62,31	25,74	9,71
	Tuk + kys. pal.1	0,122	11,37	73,19	0,11	24,92
Hydrolyzáty	Kyselý	0,212	12,54	44,88	31,30	22,45
	Bazický	0,238	8,21	35,89	33,84	29,57
	Enzymatický	0,409	2,56	19,38	21,23	59,24

Příloha 7: Produkce metabolitů kvasinkou *Rhodotorula glutinis* v objemu kultury

*Hodnoty koncentrací sledovaných látek pro jednotlivá média, jež byly podrobeny kultivaci kmenem kvasinky *Rhodotorula glutinis*.*

Typ kultivace	Médium	β -karoten [mg/l]	karoteno- idy [mg/l]	ergosterol [mg/l]	koenzym Q [mg/l]
Nestočené	Glukóza	49,830	154,910	15,287	14,800
	Glycerol	12,413	25,542	12,979	7,548
	Tuk	2,136	4,664	6,017	2,747
	Tuk + glukóza	1,391	2,881	6,950	28,545
	Tuk + tween	5,532	16,501	8,439	4,250
	Glycerol + tuk	8,242	17,398	13,568	7,537
	Tuk + kys. pal. 2	3,698	9,835	7,971	2,633
	Tuk + PEG	8,914	20,784	10,413	4,448
	Tuk + kys. pal.1	5,205	13,781	8,902	3,625
Stočené	Glukóza	8,863	31,161	10,233	7,119
	Glycerol	7,074	17,605	9,236	5,301
	Tuk	1,666	4,538	7,544	2,764
	Tuk + glukóza	0,867	2,717	4,982	2,347
	Tuk + tween	3,345	9,884	8,076	3,078
	Glycerol + tuk	2,582	6,289	9,498	4,255
	Tuk + kys. pal. 2	1,692	4,223	4,795	2,227
	Tuk + PEG	0,968	1,951	3,611	1,891
	Tuk + kys. pal.1	1,418	3,837	6,363	2,272
Hydrolyzáty	Kyselý	2,305	6,990	6,782	4,468
	Bazický	0,275	0,830	4,989	3,838
	Enzymatický	9,663	42,435	62,332	32,185

Příloha 8: Produkce metabolitů kvasinkou *Rhodosporidium toruloides* v objemu kultury

Hodnoty koncentrací sledovaných látek pro jednotlivá média, jež byly podrobeny kultivaci kmenem kvasinky Rhodosporidium toruloides.

Typ kultivace	Médium	β -karoten [mg/l]	karotenoidy [mg/l]	ergosterol [mg/l]	koenzym Q [mg/l]
Nestočené	Glukóza	40,83037	134,2401	12,869	12,97543
	Glycerol	6,247601	26,32645	13,05705	10,56103
	Tuk	11,63143	41,36806	13,7502	6,560416
	Tuk + glukóza	14,28641	65,01782	12,39302	6,056223
	Tuk + tween	3,877472	16,60645	6,173155	2,43715
	Glycerol + tuk	2,457901	11,70335	22,9538	9,322177
	Tuk + kys. pal. 2	4,886063	13,87813	22,02001	9,600567
	Tuk + PEG	2,294798	7,099368	17,40329	10,30137
	Tuk + kys. pal. 1	0,78049	2,370653	8,282506	7,009169
Stočené	Glukóza	24,41403	89,64113	10,87782	8,928604
	Glycerol	14,60117	66,20505	12,038	7,382959
	Tuk	4,835697	17,68901	8,299156	3,059082
	Tuk + glukóza	8,114862	26,39107	10,30852	3,523386
	Tuk + tween	9,689603	28,2778	8,997056	3,015353
	Glycerol + tuk	5,560335	11,35065	20,19257	12,32775
	Tuk + kys. pal. 2	1,640295	3,807554	7,150622	10,09915
	Tuk + PEG	0,073212	0,373592	4,174162	1,795596
	Tuk + kys. pal. 1	2,575471	6,767381	9,470213	10,54611
Hydrolyzáty	Kyselý	5,883876	27,56451	17,12814	13,57512
	Bazický	1,849614	4,222203	7,358012	8,075623
	Enzymatický	43,32961	98,54793	56,2324	22,69686
Fermentor	24 h	16,56859	40,00628	98,85156	44,84532
	44 h	27,81553	67,4024	126,5674	40,42851
	46 h	27,39271	66,10095	126,5748	40,32599
	48 h	25,99053	62,23902	120,5583	39,92015

Příloha 9: Produkce metabolitů *Sporidiobolus metaroseus* v objemu kultury

*Hodnoty koncentrací sledovaných látek pro jednotlivá média, jež byly podrobeny kultivaci kmenem kvasinky *Sporidiobolus metaroseus*.*

Typ kultivace	Médium	β -karoten [mg/g]	karoteno- idy [mg/g]	ergosterol [mg/g]	koenzym Q [mg/g]
Nestočené	Glukóza	4,764349	16,13851	14,13787	8,332226
	Glycerol	0,991281	4,550616	12,35111	3,728962
	Tuk	1,009266	6,618592	7,125049	4,065685
	Tuk + glukóza	0,293888	1,117678	3,682351	2,130951
	Tuk + tween	6,470904	14,55061	5,817678	4,322257
	Glycerol + tuk	5,897586	20,86237	8,459297	7,505778
	Tuk + kys. pal. 2	1,413238	3,505229	2,939559	1,907131
	Tuk + PEG	7,021024	21,94289	7,475487	5,768653
Stočené	Tuk + kys. pal.1	10,22276	24,56846	7,855436	7,417534
	Glukóza	1,234216	2,955038	6,549275	1,932185
	Glycerol	0,772061	1,818906	6,587959	1,67253
	Tuk	0,619887	4,079681	16,54382	6,668086
	Tuk + glukóza	0,607911	2,198373	11,97881	4,924651
	Tuk + tween	0,55674	6,389741	8,280323	3,211572
	Glycerol + tuk	1,775527	7,477038	6,212493	2,514585
	Tuk + kys. pal. 2	1,001791	5,110361	6,076287	3,695082
Hydrolyzáty	Tuk + PEG	0,249294	0,905325	3,393792	1,870487
	Tuk + kys. pal.1	1,075329	2,748122	4,398918	2,708975
	Kyselý	1,398898	8,193726	6,801944	5,062812
Hydrolyzáty	Bazický	10,91082	11,38503	10,85277	8,637243
	Enzymatický	15,14865	31,71127	26,90295	22,5854