



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

**METABOLICKÁ ADAPTACE KAROTENOGENNÍCH
KVASINEK NA NUTRIČNÍ STRES INDUKOVANÝ
VYBRANÝMI ODPADY POTRAVINÁŘSKÉHO PRŮMYSLU**

METABOLIC ADAPTATION OF CAROTENOGENIC YEASTS TO NUTRITIONAL STRESS INDUCED BY
SELECTED WASTES OF THE FOOD INDUSTRY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Žaneta Plhalová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1718/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Žaneta Píhalová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Metabolická adaptace karotenogenních kvasinek na nutriční stres indukovaný vybranými odpady potravinářského průmyslu

Zadání bakalářské práce:

V rámci této práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- Přehledná literární rešerše zaměřená na vybrané kmeny červených kvasinek.
- Optimalizace úpravy odpadních substrátů.
- Kultivace vybraných kmenů kvasinek za stresových podmínek.
- Optimalizace složení produkčních médií.
- Příprava a izolace různých extraktů z buněčné biomasy a jejich charakterizace.
- Srovnání produkčních vlastností vybraných kmenů.
- Vyhodnocení výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Žaneta Píhalová
student(ka)

Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá produkcí karotenoidů a lipidických látek vybranými kmeny karotenogenních kvasinek kultivovaných na odpadních substrátech potravinářského průmyslu. Byly sledovány produkční vlastnosti kvasinkových kmenů *Sporidiobolus pararoseus*, *Sporidiobolus metaroseus*, *Cystofilobasidium macerans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula kratochvilovae* a *Rhodospiridium toruloides*. Kultury byly kultivovány pomocí odpadních produktů potravinářské výroby: odpadní fritovací olej, kávový olej, který byl získán extrakcí z kávové sedliny a odpadní živočišný tuk z kafilerii.

Práce je složena ze dvou hlavních částí. V teoretické části jsou popsány jednotlivé rody kvasinek, sledované metabolity, odpadní produkty a metody analýzy sledovaných metabolitů. Experimentální část je zaměřena na použití a zpracování odpadních substrátů, kultivace kvasinek, získávání a zpracování biomasy analýzu metabolitů.

Pro produkci karotenoidů na odpadních substrátech byly nejvhodnější kmeny *Rhodospiridium toruloides* a *Sporidiobolus pararoseus*. Nejvyšší produkce lipidických látek byla naměřena u kmene *Sporidiobolus pararoseus*.

Klíčová slova

Karotenogenní kvasinky, karotenoidy, ergosterol, ubichinon, tokoferol, kávový olej, fritovací olej, odpadní živočišný tuk

Abstract

This bachelor thesis deals with the production of carotenoids and lipids by selected strains of carotenogenic yeasts cultivated on waste substrates of the food industry. The production properties of the yeast strains *Sporidiobolus pararoseus*, *Sporidiobolus metaroseus*, *Cystofilobasidium macerans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula kratochvilovae* and *Rhodospiridium toruloides* were studied. The cultures were cultivated by using waste products of food industry: waste frying oil, coffee oil which was obtained by extraction from coffee grounds and waste animal fat from rendering plants.

The work consists of two main parts. The theoretical part describes the individual genera of yeasts, monitored metabolites, waste products and methods of analysis of monitored metabolites. The experimental part is focused on the processing of used waste substrates, cultivation of yeasts, acquisition and processing of biomass and analysis of metabolites.

Rhodospiridium toruloides and *Sporidiobolus pararoseus* strains were the most suitable for the production of carotenoids on waste substrates. The highest production of lipid substances was measured in the strain *Sporidiobolus pararoseus*.

Keywords

Carotenogenic yeasts, carotenoids, ergosterol, ubiquinone, tocopherol, coffee oil, frying oil, waste animal fat

PLHALOVÁ, Žaneta. *Metabolická adaptace karotenogenních kvasinek na nutriční stres indukovaný vybranými odpady potravinářského průmyslu*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131840>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Martin Szotkowski.

Prohlášení

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

.....

Podpis studenta

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu své bakalářské práce Ing. Martinu Szotkowskému Ph.D. za odborné vedení práce, ochotu při řešení problémů, ochotu, trpělivost a cenné rady. Taktéž děkuji svému odbornému konzultantovi Ing. Jiřímu Holubovi za pomoc s realizací experimentální části a cenné připomínky. V neposlední řadě patří poděkování mé rodině, příteli a přátelům za podporu po celou dobu studia.

OBSAH

1 ÚVOD	9
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1 Kvasinky	10
2.1.1 Cytologie kvasinek.....	10
2.1.2 Karotenogenní kvasinky.....	11
2.1.2.1 Rod Rhodotorula	11
2.1.2.2 Rod Sporidiobolus.....	12
2.1.2.3 Rod Cystofilobasidium.....	12
2.2 Sledované metabolity	13
2.2.1 Karotenoidy.....	13
2.2.1.1 Chemická struktura a vlastnosti	13
2.2.1.2 Funkce karotenoidů.....	14
2.2.1.3 Biosyntéza karotenoidů.....	14
2.2.1.4 Možné využití karotenoidů v průmyslu.....	16
2.2.2 Lipidy	17
2.2.2.1 Chemická struktura a vlastnosti	17
2.2.2.2 Mastné kyseliny.....	17
2.2.2.3 Biosyntéza lipidů.....	18
2.2.2.3.1 Biosyntéza mastných kyselin	18
2.2.2.3.2 Biosyntéza triacylglycerolů.....	19
2.2.2.4 Degradace mastných kyselin.....	19
2.2.3 Ubichinony.....	20
2.2.4 Ergosterol	20
2.2.5 Tokoferol (Vitamín E).....	21
2.3 Kultivace	21
2.3.1 Růstová křivka	21
2.3.2 Odpadní substráty.....	22
2.3.2.1 Glycerol.....	22
2.3.2.2 Kávový olej (Kávová sedlina).....	22
2.3.2.3 Fritovací olej	22
2.3.2.4 Odpadní živočišný tuk.....	22
2.3.3 Bioreaktor.....	23
2.4 Metody získávání metabolitů pro analýzu.....	23
2.4.1 Dezintegrace.....	23
2.4.2 Extrakce.....	23
2.4.3 Transesterifikace	23

2.5 Metody analýzy buněčných složek.....	23
2.5.1 Chromatografie	24
2.5.1.1 Plynová chromatografie (GC)	24
2.5.1.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	24
3 CÍL PRÁCE	25
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	26
4.1 Použité chemikálie	26
4.1.1 Chemikálie použité ke kultivaci kvasinek.....	26
4.1.2 Chemikálie použité pro přípravu vzorků a analýzu (HPLC, GC)	26
4.2 Použité pomůcky a přístroje.....	26
4.2.1 Přístrojová technika a pomůcky pro kultivaci kvasinek.....	26
4.2.2 Přístrojová technika a pomůcky pro izolaci a analýzu karotenoidů a lipidů.....	27
4.3 Použité druhy kvasinek	27
4.4 Zpracování odpadních substrátů.....	28
4.4.1 Fritovací olej	28
4.4.2 Kávový tuk.....	28
4.5 Kultivace vybraných druhů kvasinek	28
4.5.1 Vnější podmínky	28
4.5.2 Inokulum I a II	28
4.5.3 Produkční média.....	29
4.6 Zpracování biomasy	29
4.6.1 Stanovení biomasy	29
4.6.2 Uskladnění biomasy	29
4.6.3 Extrakce, stanovení a analýza látek.....	30
4.6.3.1 Plynová chromatografie (GC)	30
4.6.3.1.1 Příprava vzorků na GC.....	30
4.6.3.1.2 Analýza vzorků na GC	30
4.6.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	30
4.6.3.2.1 Příprava vzorků na HPLC	30
4.6.3.2.2 Analýza na HPLC.....	31
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	32
5.1 Stanovení produkčních vlastností biomasy u baňkových kultivací.....	32
5.1.1 Produkční vlastnosti kmene <i>Sporidiobolus pararoseus</i>	33
5.1.2 Produkční vlastnosti kmene <i>Sporidiobolus metaroseus</i>	37
5.1.3 Produkční vlastnosti kmene <i>Cystofilobasidium macerans</i>	41
5.1.4 Produkční vlastnosti kmene <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	45
5.1.5 Produkční vlastnosti kmene <i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	49

5.1.6 Produkční vlastnosti kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i>	53
5.2 Stanovení produkčních vlastností biomasy u fermentorové kultivace	57
5.2.1 Fermentorová kultivace kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i>	57
6 ZÁVĚR	59
7 ZDROJE.....	62
8 POUŽITÉ ZKRATKY	65
9 PŘÍLOHY	66

1 ÚVOD

S všeobecně rostoucím zájmem o zdravý životní styl roste i poptávka po potravinových doplncích, do nichž se přidávají i karotenoidy a nenasycené mastné kyseliny. Lipidické látky jsou nezbytnou součástí potravy a zastávají mnoho biologických funkcí (například rozpouštědla pro lipofilní vitamíny). Mikrobiální lipidy obsahují velké množství nenasycených mastných kyselin, které mají protizánětlivý účinek a mají vliv na snižování hladiny LDL cholesterolu v krvi. Některé karotenoidy jsou prekurzory vitamínu A, který je esenciální pro živočichy (včetně člověka). Karotenoidy patří mezi přírodní barviva, která jsou syntetizována pomocí rostlin. Schopnost syntetizovat karotenoidy mají kromě rostlin také některé mikroorganismy jako například karotenogenní kvasinky. Produkce karotenoidů je možné provádět pomocí velkokapacitních kultivací karotenogenních kvasinek. Komerčně dostupné komplexní substráty jsou ekonomicky cenově nákladné, proto se hledají levnější alternativy využitelných substrátů. Současně v posledních letech se nejen ve vědě klade také důraz na cirkulární ekonomiku. V biotechnologiích tedy dochází k nahrazování komerčních substrátů odpadními látkami z jiných výroby. Odpadní substráty z potravinářského průmyslu jsou energeticky bohaté směsí látek, které jsou po vhodné úpravě výborným uhlíkatým či komplexním substrátem pro kvasinky. Mezi vhodné odpadní substráty z potravinářského průmyslu patří například použitý fritovací olej, kávová sedlina (popř. kávový olej) či odpadní živočišný tuk z kafilerii. Optimalizací jejich úpravy a podmínek kultivace můžeme jejich efektivitu ještě zvýšit. Karotenoidy jsou díky svým specifickým vlastnostem využívány ve farmakologickém průmyslu pro přípravu vitaminů, potravinových doplňků a využívají se i ke snižování rizika určitých onemocnění. Dále karotenoidy našly své využití v kosmetickém průmyslu, v potravinářském průmyslu při výrobě potravinářských barviv a v neposlední řadě i v zemědělském průmyslu jako součást krmných směsí.

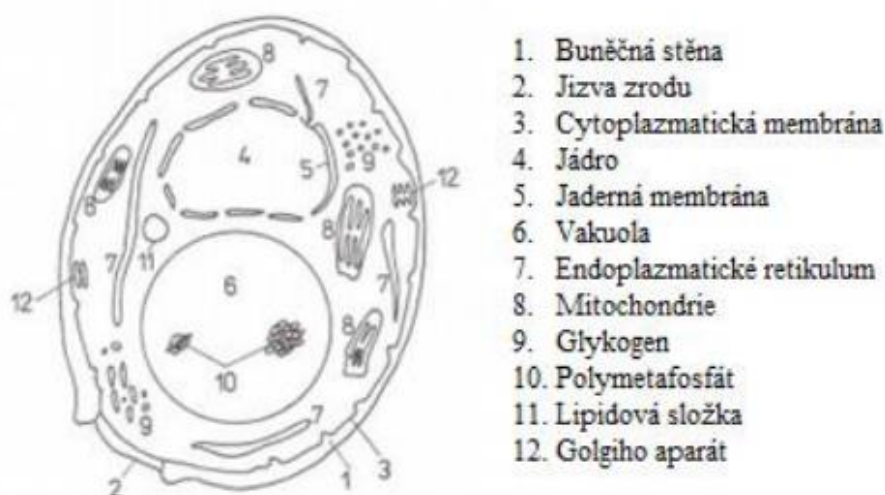
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou jednobuněčné chemoorganotrofní mikroorganismy, spadající do říše *Fungi*. Rozmnožují se nejčastěji nepohlavně – dělením či pučením, je možné i pohlavní rozmnožování pomocí spor. Je známo zhruba 1500 druhů kvasinek a vyskytují se po celém světě. Druhy jsou tvarově rozmanité: kulovité, elipsoidní, oválné nebo vláknité. Velikost jedné buňky se pohybuje kolem 3-6 μm . Mají tendenci shlukovat se do kolonií. Některé kmeny zkvašují monosacharidy za vzniku ethanolu a oxidu uhličitého. Tato schopnost jim zajistila významné místo v potravinářském průmyslu. [1][2]

2.1.1 Cytologie kvasinek

Kvasinky patří mezi eukaryotní organismy. Na povrchu jsou opatřeny pevnou buněčnou stěnou bez brv a bičíků. Buněčná stěna slouží jako ochrana buňky – je pevná a silná. Pod buněčnou stěnou se nachází cytoplazmatická membrána (Obrázek 1) tvořená fosfolipidovou dvouvrstvou s membránovými proteiny. Slouží jako osmotické rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím. Zajišťuje jak přijímání látek do buňky, tak jejich transport z buňky do jejího okolí. Vnitřní prostor buňky obklopující jádro a buněčné organely je vyplněn cytosolem. Jádro je od cytoplazmy odděleno dvojitou jadernou membránou a obsahuje chromozomy jako nositele genetické informace. Mezi nejvýznamnější organely patří endoplazmatické retikulum, které má na své vnější části ribozomy. Je důležité svou rolí při proteosyntéze. Další podstatnou organelou jsou mitochondrie, které obsahují dýchací enzymy, a probíhá zde oxidační fosforylace. Dále obsahuje vakuoly, které obsahují hydrolytické enzymy a dále slouží k zásobě polysulfátů, aminokyselin a purinů, které se právě nepodílejí na žádných procesech v buňce. Při fylogenezi buňka obsahuje několik malých vakuol, ve starších buňkách je pouze jedna, která může zaplňovat většinu prostoru v buňce. Golgiho aparát je měchýřkovitá organela, jejíž funkcí je nejspíše transport prekurzorů buněčné stěny z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu. K pohybu organel v buňce slouží cytoskelet, který je tvořen proteinovými vlákny. V buňce kvasinek se také vyskytují zrníčka rezervních látek (volutinu a glykogenu), enzymy, ribozomy, nukleosidy a další. [1][2]



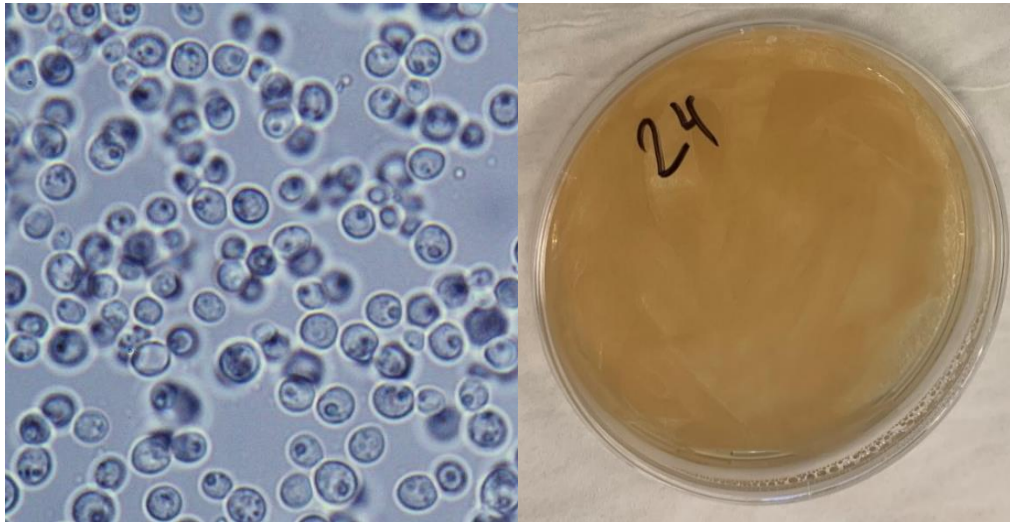
Obrázek 1: Schematické zobrazení buňky kvasinky [3]

2.1.2 Karotenogenní kvasinky

Karotenogenní kvasinky se vyznačují schopností produkce a akumulace karotenoidních barviv. Tyto naakumulovaná barviva mají za následek žlutooranžové až červené zbarvení těchto kvasinek, díky němuž jsou také nazývány „červené kvasinky“. Mezi nejvýznamnější barviva patří β -karoten, lykopen, torulen a torularhodin. Skladba karotenoidů v buňce kvasinek je ovlivněna druhem kvasinek, živným médiem a vnějšími podmínkami (světlo, teplo a přísun kyslíku). Karotenogenní kvasinky spadají do třídy *Basidiomycete* a mezi nejlépe prozkoumané rody patří *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* a *Cystofilobasidium*. Společným znakem těchto kvasinek je vysoká akumulace lipidů se zvýšeným podílem polynenasycených mastných kyselin (PUFA). Tyto látky mají velký význam v oblasti potravinářství, farmakologickém průmyslu i v průmyslu paliv. [3][4]

2.1.2.1 Rod *Rhodotorula*

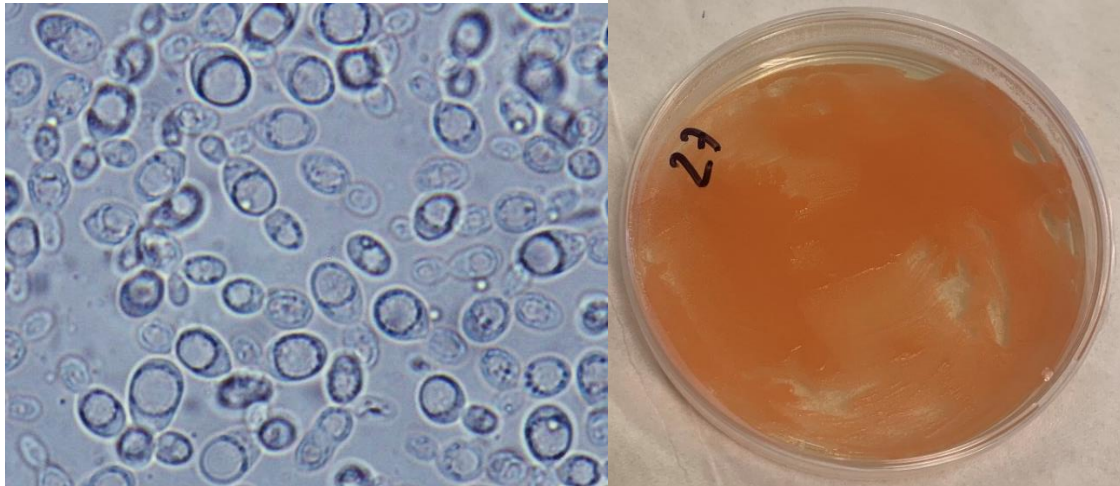
Do tohoto rodu patří bezmála 160 druhů, mezi neznámější patří *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula minuta* a *Rhodotorula glutinis*. Kvasinky tohoto rodu mají oválný až protáhlý tvar. Jejich zbarvení se pohybuje v širokém spektru od žlutého, přes růžové až po červené (Obrázek 2). Produkují směs karotenoidů převážně složenou z β -karotenu, torularhodinu a torulenu. Tento rod se vyznačuje dobře vyvinutým pentózovým cyklem a neschopností zkvašovat cukry. Rozmnožují se multilaterálním pučením popřípadě polárním. Jejich požadavky na kultivaci nejsou velké, vyskytují se ve vodě, vzduchu, na rostlinách a najdeme je i v půdách s nízkým obsahem dusíku, díky jejich nenáročnosti na jeho obsah. Přínosné jsou díky své vysoké schopnosti akumulovat lipidy s vysokým obsahem PUFA. [2][3][4][5]



Obrázek 2: *Rhodotorula mucilaginosa* – snímek z mikroskopu a kultura na Petriho misce

2.1.2.2 Rod *Sporidiobolus*

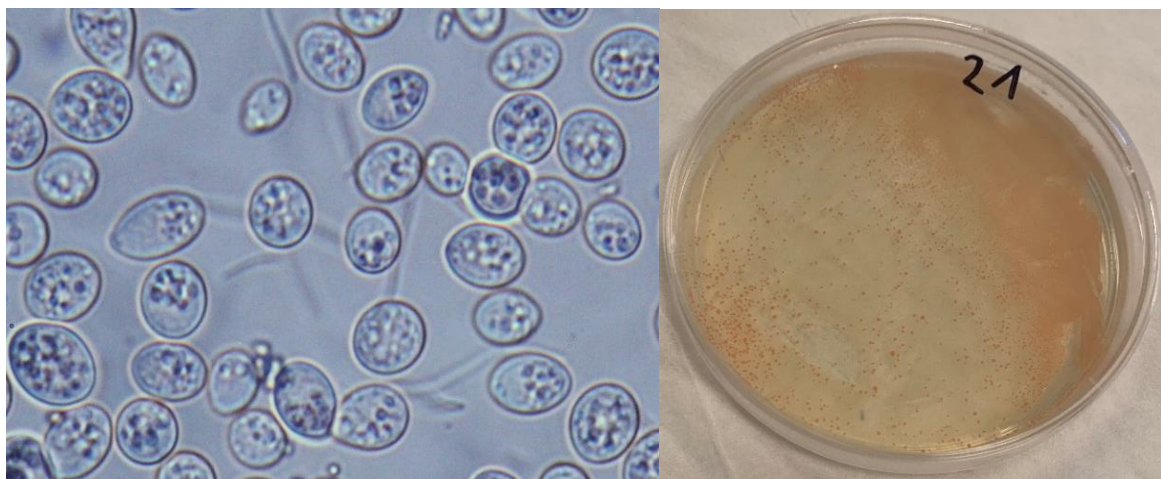
Jde o perfektní stadium rodu *Sporobolomyces*. Jejich buňky mají vejčité, oválný až válcovitý tvar. Kolonie jsou ploché až vypouklé, žluté, oranžové až sytě růžové (Obrázek 3). Jsou charakteristické tvorbou balistokonidií. Některé druhy jsou schopny vytvářet pravé mycelium. Kvasinky rodu *Sporidiobolus* jsou striktně aerobní. Nejsou schopny zkvašovat cukry. Karotogenezi produkují torulen, β -karoten a torularhodin. Mezi zástupce patří například *Sporidiobolus pararoseus* nebo *Sporidiobolus salmonicolor*. [3]



Obrázek 3: *Sporidiobolus pararoseus* – snímek z mikroskopu a kultura na Petriho misce

2.1.2.3 Rod *Cystofilobasidium*

Kvasinky z rodu *Cystofilobasidium* jsou příbuzné rodu *Rhodotorula*, od nichž se liší jednobuněčným basidiem. Řadíme sem *Cystofilobasidium capitatum*, *Cystofilobasidium macerans* nebo *Cystofilobasidium bisporidii*. Tvar buněk je kulatý až protáhlý. Kolonie tvoří hladké, lesklé, oranžové až skořicové barvy (Obrázek 4). Některé druhy jsou schopny zkvašovat cukry. Ke společným znakům patří schopnost využít glukuronátu a obsah xylosu v buněčné stěně. [1][6]



Obrázek 4: *Cystofilobasidium macerans* – snímek z mikroskopu a kultura na Petriho misce

2.2 Sledované metabolity

2.2.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou lipofilní barviva – rozpustná v tucích. Jde o žluté, oranžové a červené pigmenty, vyskytující se v rostlinách, řasách, houbách, mikroorganismech i živočišných organismech. Díky své lipofilní povaze se vyskytují v membránách, například v membráně některých chloroplastů. V přírodě mají karotenoidy hned několik funkcí. K hlavním patří vliv na snížení oxidačního stresu a odchyt volných radikálů. Dále jsou dobrými antioxidanty díky obsahu dvojných vazeb. Významná je i jejich funkce jako prekurzor vitamínu A. Karotenoidy jsou důležité i pro správný chod lidského organismu, ale naše tělo si je neumí samo syntetizovat, proto je nutné je dodávat v potravě. Mezi nejdůležitější karotenoidy pro náš organismus patří β -karoten, jako prekurzor pro syntézu vitamínu A. Má dobrý vliv na pokožku (při vystavení Slunci), zabraňuje vzniku očních chorob a zlepšuje imunitní systém. [1][7][8]

2.2.1.1 Chemická struktura a vlastnosti

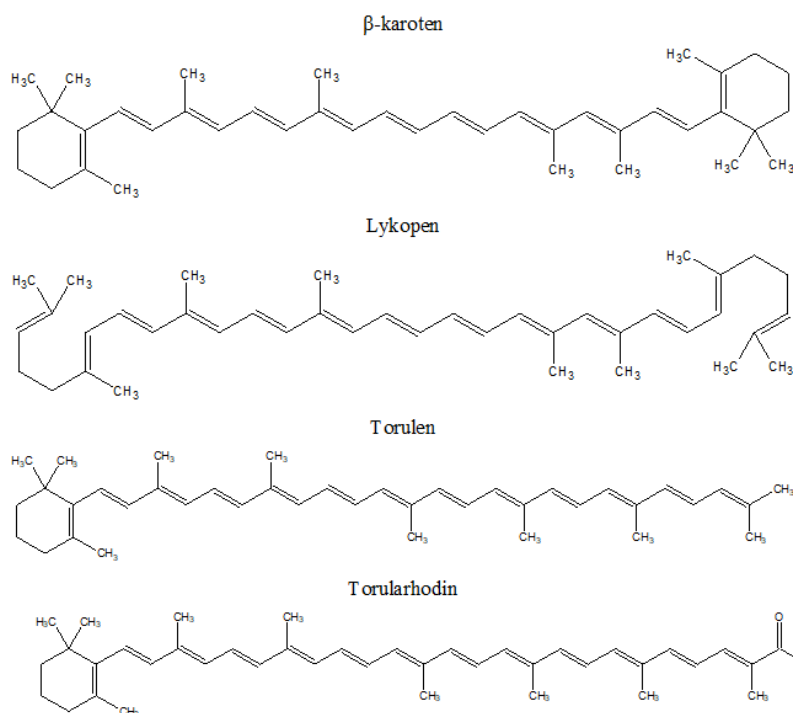
Karotenoidy definujeme jako izoprenoidy s osmi izoprenoidními jednotkami - tetraterpeny. Jejich struktura tudíž obsahuje 40 atomů uhlíků v polyenovém řetězci. Obsahují konjugovaný systém dvojných vazeb nejčastěji v *trans*-izomeraci (Obrázek 5). Karotenoidy rozlišujeme podle jejich chemické struktury na:

- Karoteny: nesubstituované uhlovodíkové řetězce. Mají oranžové až červené zbarvení.
- Xantofyly: jde o kyslíkaté deriváty karotenů. Vznikají oxidací nebo hydroxylací karotenů. Jejich zbarvení je žluté.

Dále je dělíme podle zakončení polyenového řetězce:

- Acyklické (alifatické): neobsahují žádný cyklus.
 - Lykopen – prekurzor pro další karotenoidy, δ -karoten
- Monocyklické: jeden z konců řetězce je tvořen cyklem (pětičlenným či šestičlenným)
 - γ -karoten, torulen, torularhodin
- Dicyklické: Oba konce podléhají cyklizaci
 - β -karoten

Konjugovaný systém dvojných vazeb v karotenoidech má za následek jejich fotochemické vlastnosti. Jejich absorpční spektrum je v rozsahu vlnových délek 400-500 nm, přičemž na jejich absorpční maximum mají vliv jednotlivé substituenty derivátů. Karotenoidy jsou nepolární látky nerozpustné ve vodě. Jsou poměrně odolné vůči působení redukčních činidel a změně pH. Naopak jsou nestabilní a rozkládají se působením oxidačních činidel a záření. Působením světla, tepla či kyselého prostředí podléhají izomerii na *cis*-formy a nejsou tak schopné být provitamínem A. [7][8][9]



Obrázek 5: Strukturální vzorce vybraných karotenoidů [10]

2.2.1.2 Funkce karotenoidů

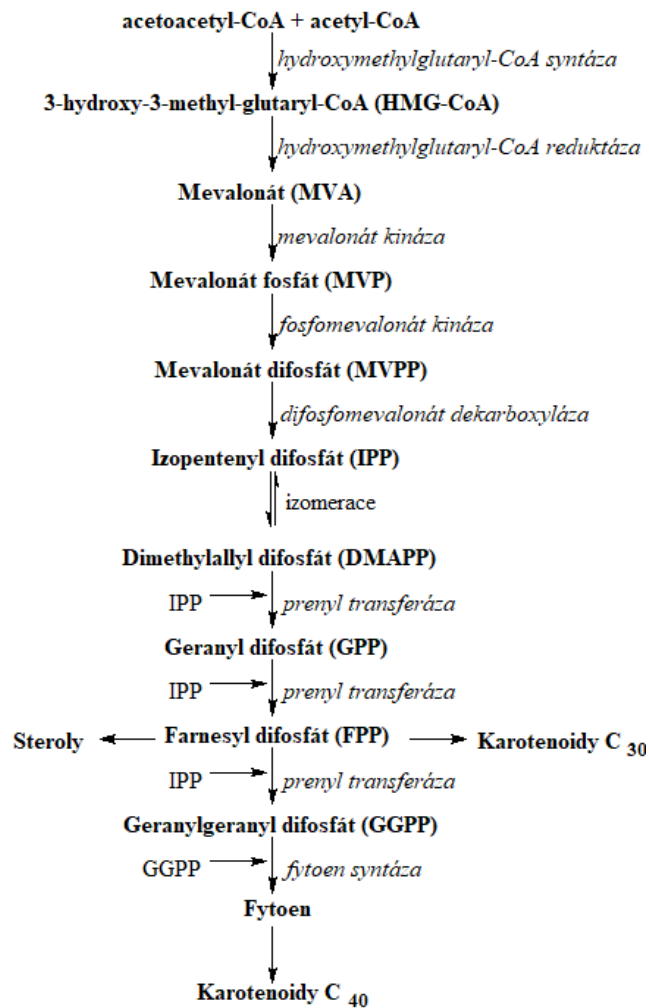
Karotenoidy mají vliv na velkou část metabolických procesů. Karotenoidy vázané v membráně chloroplastů ochraňují fotochemický aparát a podílejí se i na samotné fotosyntéze. Vázané mimo zelené části rostlin jsou přítomny v chloroplastech a působí jako barviva. V mikroorganismech se vyskytují ve formě lipidových kapek a v biomembránách, kde je využívána jejich antioxidační vlastnost pro ochranu molekul náchylných na oxidaci. Tato antioxidační vlastnost se uplatňuje ve všech typech buněk a zabraňuje změně struktury buněk, narušování tkání a vzniku nádorových bujení. Mnoho karotenoidů jsou prekurzory vitamínu A (retinolu), který chrání zrak. [11][12]

2.2.1.3 Biosyntéza karotenoidů

Syntéza karotenoidů probíhá pomocí izoprenové dráhy, která spadá do sekundárního metabolismu. Izoprenová dráha má dvě části. V první části dochází k syntéze aktivované formy izoprenu (isopentenyldifosfátu) a v druhé části dráhy dochází ke kondenzaci těchto aktivovaných izoprenových jednotek. Další úpravy vedou ke vzniku samotných derivátů karotenoidů (Obrázek 6).

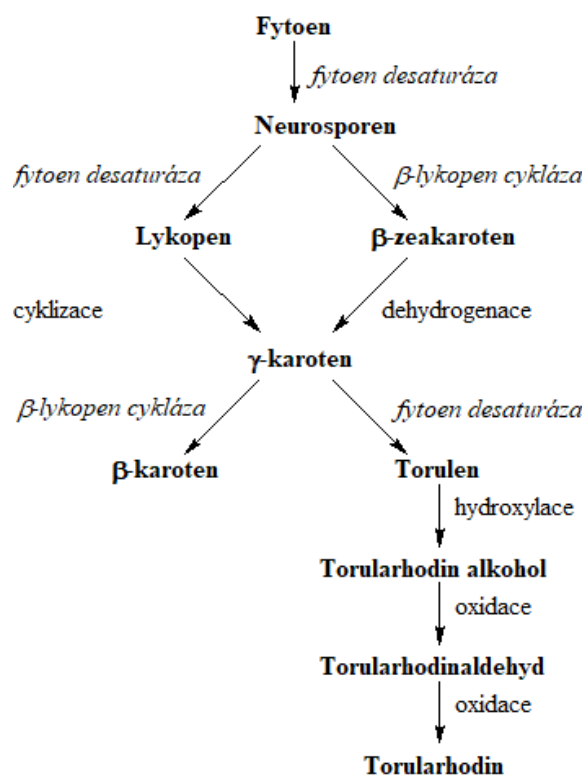
První část začíná aldolovou kondenzací acetylů ve formě acetyl-CoA, získaného z glykolýzy či β -oxidace vyšších mastných kyselin. Kondenzací dvou acetyl-CoA vzniká acetoacetát, který dále kondenzuje s dalším acetyl-CoA za vzniku 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA). V dalším kroku se HMG-CoA redukuje pomocí reduktáz na mevalonát. Mevalonát podstupuje fosforylaci pomocí kinázy za vzniku mevalonát fosfátu a následně znovu fosforyluje na mevalonátdifosfát. První fáze končí dekarboxylací mevalonátdifosfátu za vzniku aktivní izoprenové jednotky izopentenyldifosfátu (IPP) či jeho izomeru dimethylallyldifosfátu (DMAPP).

Ve druhé části jsou izoprenové jednotky kondenzovány způsobem „hlava-pata“ a vzniká tak geranyldifosfát, druhou adicí vzniká farnesyldifosfát. Třetí adicí isopentenyldifosfátu se formuje geranylgeranyldifosfát (GGPP). Dvě molekuly GGPP podstupují redukční kondenzaci spojením „hlava-hlava“ a vzniká nejjednodušší C_{40} karotenoid fytoen.



Obrázek 6: Schéma syntézy karotenoidů [10]

Od fytoenu se dále odvíjí syntéza ostatních karotenoidů. Fytoen je dehydrogenován na neurosporen a další dehydrogenací vzniká lykopen a jeho cyklizace vede ke vzniku γ -karotenu. γ -karoten je možné získat i přes β -zeakaroten, který vzniká cyklizací neurosporenu a podléhá dehydrogenaci na γ -karoten. Právě γ -karoten je prekurzorem dvou nejvýznamnějších karotenoidů, které se v kvasinkách vyskytují a to β -karoten a torulen. β -karoten vzniká cyklizací γ -karotenu. Pokud γ -karoten je desaturován, tak dochází k biosyntéze torulenu, který je prekurzorem dalšího významného karotenoidu vyskytujícího se v kvasinkách – torularhodinu. Aby došlo k biosyntéze torularhodinu, musí torulen podstoupit hydroxylaci a dvojitou oxidaci (Obrázek 7). [5][13][14][15]



Obrázek 7: Schéma syntézy karotenoidů z fytoenu [10]

2.2.1.4 Možné využití karotenoidů v průmyslu

Karotenoidy našly své uplatnění už velice dávno jako přírodní barviva ve formě čerstvých či sušených rostlin pro barvení potravin. Taktéž jsou přidávány do krmných směsí krav a drůbeže pro získání požadované barvy mléka a žloutků. Pokud jsou karotenoidy v potravě hospodářských zvířat ve vstřebatelné podobě, neslouží pouze k obarvení výsledných produktů, ale také ke zlepšení imunity jedinců a zrychlení jejich růstu. Jedním z nejznámějších využití je jejich uplatnění ve farmakologickém průmyslu. Zde se karotenoidy využívají k výrobě doplňků stravy. Snižují oxidační stres a tím předchází nádorovému bujení, snižují výskyt kardiovaskulárních chorob, předchází degradaci žluté skvrny na sítnici (příčina slepoty), chrání kůži před UV zářením a slouží jako prekurzory vitamínu A. Díky svým antioxidačním a pigmentačním vlastnostem jsou karotenoidy využívány i v kosmetickém průmyslu například při výrobě samoopalovacích krémů. [8][9][11]

Díky novým poznatkům o účincích karotenoidů a jejich zvýšenému využívání v mnoha odvětvích průmyslu se hledá vhodná, efektivní, levná cesta jejich mikrobiální produkce ve vysokém výtěžku, ale i čistotě.

2.2.2 Lipidy

Lipidy jsou přírodní látky přítomné ve všech živých organismech (tuky, oleje, vosky,...). Jde o produkty primárního metabolismu, nebo jsou získávány z potravy. Plní zde mnoho důležitých funkcí, podle kterých je možné je i dělit:

- **Stavební:** Lipidy se podílejí na výstavbě a komplementaritě buněk. Jsou součástí fosfolipidových biomembrán, které jsou nezbytné pro existenci a životaschopnost buněk. Biomembrány jsou tvořeny dvojvrstvou fosfolipidů (sfingomyeliny a fosfoacylglyceroly), dále obsahují steroly (cholesterol) a glykosfingolipidy (cerebrosidy a ganglosidy).
- **Zásobní:** Jednou z nejvýznamnějších funkcí lipidů v buněčných organismech je, že slouží jako zásobárna chemické energie. Tato energie je v lipidech uskladněna v podobě mastných kyselin vázaných v triacylglycerolech. Při nedostatku živin dochází v buňkách k odbourávání mastných kyselin β -oxidací a získává se tak energie.
- **Metabolická:** Lipidy slouží jako rozpouštědla nepolárních látek, což je velice významné pro rozpustnost lipofilních látek, jako jsou například vitamíny A, D, E a K či hormony.
- **Ochranná:** V neposlední řadě mají lipidy v podobě tukových tkání termoizolační funkci. [7][13]

2.2.2.1 Chemická struktura a vlastnosti

Z chemického pohledu jde o estery alkoholů a vyšších mastných kyselin. Hlavním znakem všech lipidů je jejich nepolární struktura. Jsou tedy nerozpustné ve vodě a samy slouží jako rozpouštědla nepolárních látek. Tato vlastnost se významně uplatňuje při struktuře biomembrán. Lipidy rozdělujeme podle složení:

- **Jednoduché lipidy:** Jedná se o estery vyšších mastných kyselin a alkoholů. Pokud uvažujeme oleje a tuky alkoholem je glycerol, pokud vosky, vystupují zde vyšší alkoholy.
- **Složené lipidy:** Jde o deriváty jednoduchých alkoholů, kdy je na alkohol esterově vázána i jiná skupina či složky, než vyšší mastná kyselina. Mezi složené lipidy patří fosfolipidy, glykolipidy, lipoproteiny, aminolipidy,... Jejich hlavním znakem je amfifilní charakter – část molekuly je hydrofobní a část je hydrofilní.
- **Odvozené lipidy a prekurzory:** Jde o rozmanitou skupinu látek s lipofilním charakterem (steroidy, alkoholy, nepolární vitamíny, ketolátky, karotenoidy či hormony). [7][13]

2.2.2.2 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou významnými stavebními prvky mnoha lipidů. Jde o organické monokarboxylové kyseliny s uhlíkatým řetězcem o délce 4 až 26 atomů uhlíku. Podle výskytu dvojných vazeb v řetězci dělíme mastné kyseliny na:

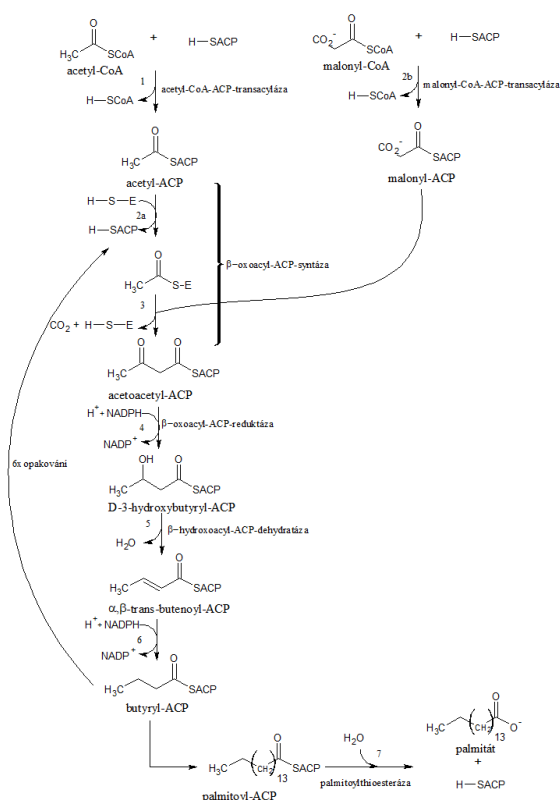
- **Nasycené mastné kyseliny (SFA = Saturated Fatty Acids)** – neobsahují ve svém řetězci dvojnou vazbu. Za laboratorní teploty jde o pevné látky. Díky nepřítomnosti dvojných vazeb jsou stabilní. Mezi zástupce patří kyselina stearová a palmitová.
- **Mononenasycené mastné kyseliny (MUFA = MonoUnsaturated Fatty Acids)** - obsahují právě jednu dvojnou vazbu ve svém řetězci. Za laboratorní teploty jde o kapalné látky. Významnou funkcí je snižování LDL cholesterolu v krvi. Nejvýznamnější je kyselina olejová.
- **Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA = PolyUnsaturated Fatty Acids)** – v jejich řetězci se objevují alespoň dvě dvojně vazby. Za laboratorní teploty jde o kapalné látky. PUFA jsou nejméně stabilní vůči oxidaci, ale mají příznivý vliv na organismus. Působí protizánětlivě a snižují hladinu LDL lipoproteinů. K zástupcům patří kyselina linolová či linoleová. [7][13]

2.2.2.3 Biosyntéza lipidů

Jelikož jsou lipidy rozmanité látky, jejich metabolismus se sestává z mnoha drah podle finální podoby produktu. Nejvýznamnější je biosyntéza triacylglycerolů. Ta probíhá v cytosolu buněk a probíhá pouze za dostatku ATP a acetylCoA v buňce. Má tři hlavní kroky. Prvním krokem je biosyntéza mastných kyselin. Druhým krokem je biosyntéza glycerolu. Posledním krokem je kondenzace mastných kyselin s glycerolem za vzniku triacylglycerolů. [13][14]

2.2.2.3.1 Biosyntéza mastných kyselin

Biosyntéza mastných kyselin nejlépe probíhá za dostatečné saturace organismu živinami. Výchozí látkou pro biosyntézu mastných kyselin je acetyl-CoA (Obrázek 8). První vstupující molekula acetylkoenzymu A je převedena na acetyl-ACP pomocí enzymu acetyl-CoA-ACP-transacetylasy a dochází k navázání na cysteinový zbytek enzymatického komplexu syntézy mastných kyselin (FAS) za uvolnění CoA. Za působení acetyl-CoA-karboxylázy dochází k navázání CO₂ na druhou molekulu acetyl-CoA a prodloužení řetězce o jeden uhlík, vzniku malonyl-CoA, který je následně převeden na malonyl-ACP. Malonyl-ACP se váže na konjugační enzym a je převeden na FAS komplex s acetátovým zbytkem. Následuje kondenzace s dekarboxylací acetyl-ACP s molekulou malonyl-ACP za katalýzy enzymem β-oxoacyl-ACP-syntetázou za vzniku acetoacetyl-ACP. Na FAS komplexu dochází k úpravám acetoacetyl-ACP pomocí řady enzymatických reakcí dochází k redukci oxoskupiny enzymem β-oxoacyl-ACP-reduktázou až na β-hydroxybutyryl-ACP. Ten podstupuje dehydrataci katalyzovanou β-hydroxyacyl-dehydrogenázou za vzniku α,β-trans-buteonyl-ACP. Dalším krokem je redukce za katalýzy enoyl-α,β-reduktázou na butyryl-ACP. Tímto způsobem došlo k prodloužení řetězce o dva atomy uhlíku. Pokud dojde ještě šestkrát k zopakování tohoto mechanismu, vznikne kyselina palmitová. Aby se acyl stal kyselinou, je nutné podstoupit reakci působením enzymu acylsterázy a dojde k odštěpení ACP a navázání vody. Pomocí speciálních enzymatických reakcí pro daný mikroorganismus dochází k její transformaci na jiné nasycené či nenasycené mastné kyseliny. [13][14]



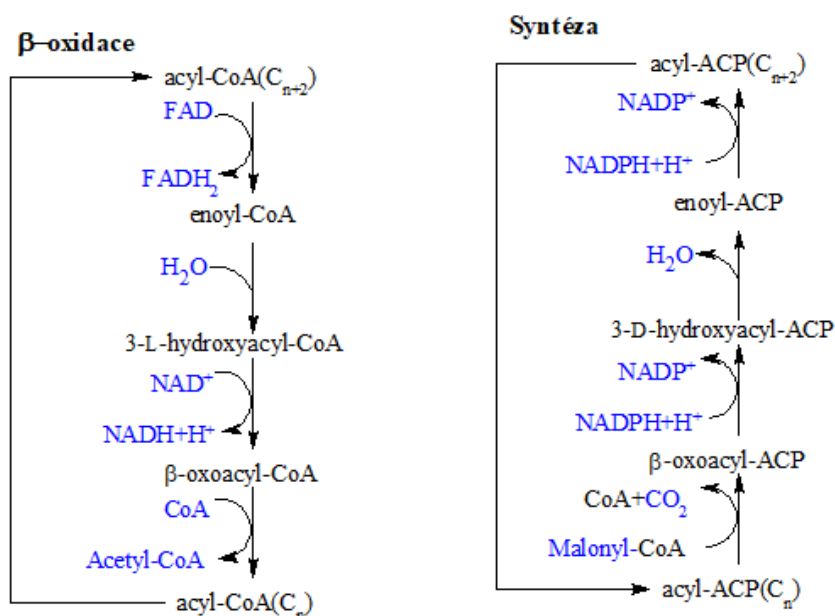
Obrázek 8: Biosyntéza mastných kyselin (zde palmitová) [10]

2.2.2.3.2 Biosyntéza triacylglycerolů

Posledním krokem syntézy lipidů je biosyntéza lipidů, která probíhá esterifikací glycerolu s biosyntetizovanými mastnými kyselinami. Umožňují to enzymy zvané acyltransferázy. Pro reakci je nutná aktivovaná forma glycerolu (glycerol-3-fosfát, dihydroxyacetonfosfát), tyto formy buňka získává z glykolýzy sacharidů. První esterifikace probíhá na této aktivované formě napojením mastné kyseliny za vzniku lysofosfatidové kyseliny. Ta podléhá druhé esterifikaci a produktem je fosfatidová kyselina. Tento produkt je štěpen fosfatázou za vzniku diacylglycerolu a následuje jeho esterifikace za vzniku triacylglycerolu. Molekula fosfatidové kyseliny může být využita i na syntézu složených lipidů. [14]

2.2.2.4 Degradace mastných kyselin

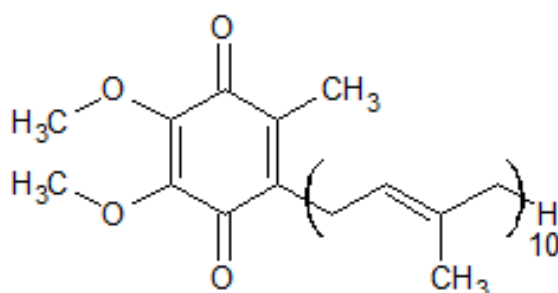
Jelikož jsou mastné kyseliny významným zdrojem energie, je důležité zmínit i metabolickou dráhu jejich odbourání. Tento proces probíhá drahou známou jako β -oxidace, která na rozdíl od biosyntézy probíhá v mitochondriální matrix. Mastné kyseliny se do mitochondriální matrix dostávají pomocí karnitinového transportního systému. Nejprve dochází k aktivaci molekuly mastné kyseliny koenzymem A za pomoci enzymu acyl-CoA-syntázy za spotřeby ATP. Tento proces probíhá v cytosolu a k transportu přes mitochondriální membránu je nutné využití karnitinu. Acyl-CoA se naváže na karnitin za odštěpení koenzymu A a vzniku acylkarnitinu, který je transportován do mitochondriální matrix. Acyl je přenesen na koenzym A z mitochondriální rezervy za vzniku acylCoA a karnitin je vrácen do cytosolu. V prvním kroku dochází k dehydrogenaci acyl-CoA za účasti acyl-CoA-dehydrogenázy a oxidačního koenzymu FAD za vzniku enoyl-CoA. Enoyl-CoA je hydratován za přispění enoyl-CoA-hydratázy a produktem je L-3-hydroxyacyl-CoA, který je následně dehydrogenován za pomoci biokatalýzy β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenázy vzniká β -oxoacyl-CoA. Do posledního kroku vstupuje koenzym A a reakce je katalyzována β -oxoacyl-CoA-tholázou za odštěpení acetyl-CoA a vzniká acyl-CoA, jehož řetězec je o dva uhlíky kratší než původní (Obrázek 9). Tento mechanismus je zopakován dle potřeby až do doby, kdy výsledným produktem celého mechanismu jsou dvě molekuly acetyl-CoA. [15]



Obrázek 9: Porovnání syntézy a degradace mastných kyselin [10]

2.2.3 Ubichinony

Ubichinony nebo také koenzymy Q jsou skupina látek, jejichž struktura se skládá z benzochinonového jádra, na němž je navázaný izoprenový řetězec (Obrázek 10). Délka řetězce je specifická pro dané typy organismů. Další důležitou charakteristikou je jejich rozpustnost v tucích. Existuje celá řada koenzymů Q, z nichž nejznámější je koenzym Q₁₀, kdy číselný index udává počet opakování izoprenových jednotek v postranním hydrofobním řetězci. Koenzym Q₁₀ je přítomný ve většině eukaryotických buněk. Zásadní funkcí koenzymu Q₁₀ je, že slouží jako přenašeč vodíku a elektronů v elektron-transportním řetězci, propojuje tak NADH a flavoproteiny s cytochromem B. Za aerobních podmínek se koenzymy Q nachází v chinonovém stavu, po přechodu do anaerobních podmínek se redukuje na chinoly. S vitamínem E se vyskytují v lipidových částech buňky a zabráňují zde peroxidaci lipidů. Také se přímo podílí na regeneraci antioxidantů (například vitamínu E). Jeho další významnou funkcí v organismu je, že zabráňuje oxidaci LDL-cholesterolu, takže snižuje pravděpodobnost vzniku kardiovaskulárních onemocnění. [14][15][16]

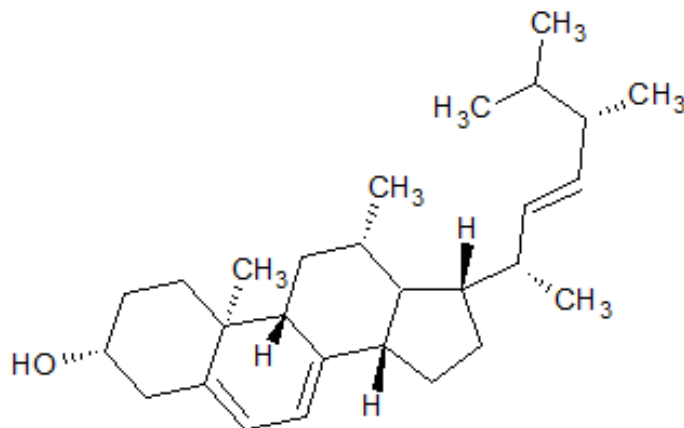


Obrázek 10: Strukturální vzorec ubichinonu [10]

2.2.4 Ergosterol

Ergosterol řadíme do skupiny látek zvané steroly. Steroly jsou steroidní alkoholy, jejichž společným znakem je hydroxylová skupina na třetím uhlíku (Obrázek 11). Ergosterol se vyskytuje v kvasinkách, houbách a plísních, tudíž ho řadíme do skupiny mykosterolů. Svou funkcí se velmi podobá cholesterolu v živočišných buňkách. Jeho hlavní funkcí je jeho uplatnění v buněčných membránách, kde se podílí na jejich stabilitě a fluiditě. Taktéž slouží jako prekurzor vitamínu D₂, který se z něj stává po ozáření pomocí UVB záření. [7][16][18][19][20]

Díky své roli a výskytu pouze v buňkách nižších organismů a absenci v lidských buňkách se poznatky o něm dodnes využívají při výrobě antimykotik, které cílí na zastavení jeho biosyntézy či změně jeho fyzikálně-chemických vlastností a tím zhroucení daných buněk. [7]



Obrázek 11: Strukturální vzorec ergosterolu [10]

2.3.2 Odpadní substráty

Pro růst kvasinek je nutný dostatečný přísun živin, který se dá zajistit vhodným zvolením substrátu. Pro svou nízkou cenu se často využívají potravinářské odpady, které by se jinak nedaly využít. Tyto odpady obsahují stále dostatek uhlíku, dusíku a dalších látek využitelných při kultivaci.

2.3.2.1 Glycerol

Odpadní glycerol je produktem zpracování olejů a tuků. Ve velkém množství je odpadním produktem při výrobě bionafty či mýdel saponifikací. Při kultivaci kvasinek slouží jako zdroj organického uhlíku, ale obsahuje i významné množství sodíku, draslíku a vápníku. [9][19]

2.3.2.2 Kávový olej (Kávová sedlina)

Káva patří mezi nejvíce konzumované nápoje ve světě. Ročně z produkce kávy vzniká 6 milionů tun odpadu. Při výrobě instantních kávových nápojů dochází k extrakci do vodní fáze, z procesu odchází jako odpadní látka pevný podíl – kávová sedlina. Ta se nejvíce využívá jako palivo do průmyslových ohříváčů. V současné době se ale začíná díky svému obsahu kávového oleje (10-20%) uplatňovat v biotechnologiích. Kávový olej se získává z kávové sedliny extrakcí nepolárním rozpouštědlem. Kávový olej má vysoký obsah triacylglycerolů s vyšším obsahem mono- a polynenasycených mastných kyselin. Zároveň je bohatým zdrojem vitamínu E. [24][25]

2.3.2.3 Fritovací olej

Některé rostlinné oleje je možné využít k fritování. Mezi nejběžnější patří slunečnicový, řepkový a palmový. Po přepálení dojde ke ztrátě mnoha cenných látek a není možné ho pak dále využít v potravinářském průmyslu. Tento odpad našel své uplatnění v biotechnologickém průmyslu jako uhlíkový zdroj pro kultivaci kvasinek.

2.3.2.4 Odpadní živočišný tuk

Z chemického hlediska klasifikujeme tuky jako estery vyšších mastných kyselin a glycerolu. Jsou nerozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Počet dvojných vazeb v navázaných mastných kyselinách silně ovlivňuje teplotu tání. Odpadní živočišný tuk vzniká extrakcí v kafilériích z odpadů z potravinářského a kožedělného průmyslu. Jde o směs tuků z různých druhů zvířat, tudíž rozložení lipofilních látek a mastných kyselin se může lišit, jelikož závisí na druhu zvířete, jeho potravě a původu. S obrovským nárůstem zájmu o cirkulární ekonomiku vzrostlo i využívání odpadního tuku k dalším účelům. Odpadní tuk našel své další uplatnění. Mezi nejvýznamnější patří jeho spalování ve spalovnách, které je však na ústupu a je nahrazováno petrochemickým zpracováním, kdy jeho transesterifikací se produkují biopaliva a díky jeho bohatému složení dále stoupá jeho uplatnění v biotechnologiích jako substrát při kultivacích. Odpadní živočišný tuk přímo z kafilerie je pro mikroorganismy obtížně využitelný, proto je nutné ho před použitím hydrolyzovat. [22][23]

2.3.3 Bioreaktor

Bioreaktor je zařízení, které slouží k biotechnologické produkci metabolitů pomocí enzymů nebo buněk. Je vyroben z inertních materiálů, nejčastěji jde o sklo a nerez. Dalším důležitým parametrem pro výrobu bioreaktoru je odolnost jeho komponent vůči sterilační teplotě (121°C). Bioreaktor je řízen centrálním plně automatickým systémem, ten zajišťuje po celou dobu kultivace zadané podmínky pro růst biomasy. Součástí reaktoru je chladič, míchadla, topné těleso, provzdušňovací zařízení a čerpadla. Pro schopnost kontroly a koordinace parametrů kultivace je bioreaktor vybaven čidly, jako je teploměr, pH metr a kyslíková sonda. Tyto sondy zabezpečují optimální podmínky kultivace: teplotu, pH, iontovou sílu, osmotický tlak, koncentraci rozpuštěného kyslíku a koncentraci substrátu. Podle velikosti dělíme fermentory na laboratorní (do 30 l), čtvrtprovozní (30-100 l), poloprovozní (100-5000 l) a provozní (více než 5000 l). Dále se fermentory dělí podle způsobu provozu na vsádkové, přítokované a kontinuální. V provozu je nejběžnější vsádkové (batch) upořádání, kdy jde o uzavřený systém, vsádka se dělá na počátku a už se nedoplňuje ani neodpouští. Další varianta, přítokované neboli fed-batch uspořádání, což znamená, že do vsádky se v průběhu kultivace řízeně dávkuje složky média, zabraňuje to inhibici produktem či substrátem. Poslední variantou je kontinuální uspořádání, kdy mluvíme o otevřeném systému, kdy dochází ke kontinuálnímu přítoku čerstvého média a odtoku média s metabolity. [29][30]

2.4 Metody získávání metabolitů pro analýzu

2.4.1 Dezintegrace

Abychom získali látky, obsažené v buněčných strukturách, je nutné rozrušení buněčných stěn a membrán. Využíváme metod mechanických a chemických. Principem mechanických metod je rozrušení buněčných obalů na základě působení vnějších mechanických sil, dochází k lyzi buněk. Využívá se ultrazvuk, mletí, lisování a míchání. Chemické metody jsou založeny na lyzi buněk způsobené změnou vnějších fyzikálně chemických podmínek či působením chemických látek. Mezi tyto metody patří opakované zmrazování a rozmrazování, využívání vhodných rozpouštědel, sušení či používání enzymů k rozrušení buněčné stěny. [26][27]

2.4.2 Extrakce

Extrakce je metoda na oddělování na složek směsí na základě jejich rozpustnosti mezi dvěma nemísitelnými fázemi. Karotenoidy patří mezi lipofilní látky, proto se extrahují do nepolárního rozpouštědla. Využívá se vícesložkové rozpouštědlo. Po přidání už malého množství polárního rozpouštědla se směs snadno rozdělí na dvě fáze. Nepolární fázi s rozpuštěnými karotenoidy je nutné dále přechistit. Výsledný extrakt je nutné rozpustit v čistém rozpouštědle pro HPLC. [28][29]

2.4.3 Transesterifikace

Pokud chceme analyzovat lipidické vzorky pomocí plynové chromatografie, je nutné snížit teplotu varu analyzovaných látek, což se provádí metodou transesterifikace. Transesterifikace je organická reakce založená na výměně uhlovodíkového řetězce alkoholu vázaném v esteru mastné kyseliny R_1 za řetězec alkoholu R_2 za účasti báze či kyseliny jako katalyzátoru. Z triacylglycerolů nám tedy vzniknou estery mastných kyselin a glycerol. [28][29][31]

2.5 Metody analýzy buněčných složek

Pomocí analytických metod můžeme stanovit nárůst biomasy a množství metabolitů tvořených kvasinkami. K analýze karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu se využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie s gradientovou elucí. Mastné kyseliny je možné po transesterifikaci analyzovat na plynovém chromatografu.

2.5.1 Chromatografie

Chromatografie se řadí mezi separační metody. Vzorek je vložen mezi dvě nemísitelné fáze. Vzorek je po nástřiku unášen mobilní fází skrz fázi stacionární. Při unášení dochází k rozdělení analytu na jednotlivé složky a zadržení ve stacionární fázi. K separaci dochází na základě rozdílných afinit složek analytu k fázím. [29][32][33]

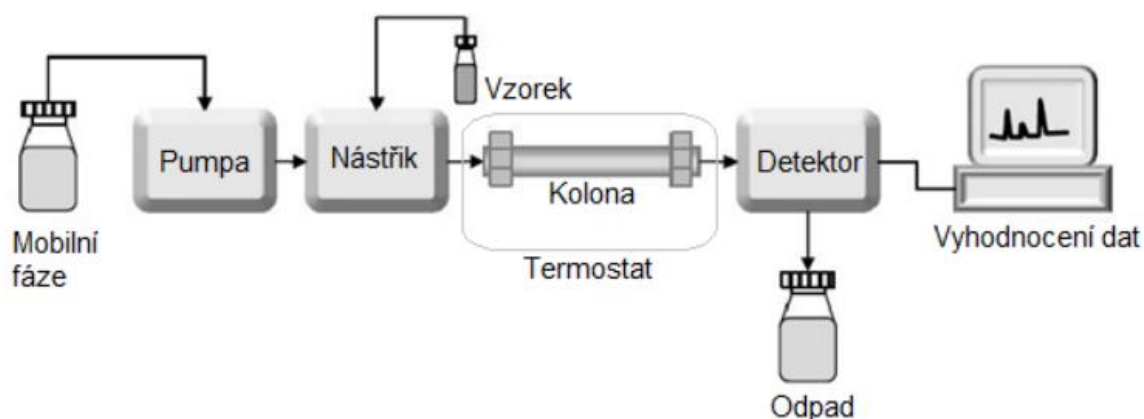
2.5.1.1 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie se používá k separaci látek s relativně nízkým bodem varu. Využívá jako mobilní fázi inertní tzv. nosný plyn. Nejčastěji se využívá vodík, dusík nebo helium. Nedochozí zde k reakci analytu s mobilní fází, plyn slouží pouze k transportu analytu kolonou. Pro plynovou chromatografii se používají náplňové a kapilární kolony. Náplňové jsou shodné s kolonami pro HPLC. Kapilární kolony jsou tvořeny křemennou kapilárou pokrytou polyamidem. Vnitřní strana kapiláry je potažena stacionární fází. Délka kapilárních kolon je 10-100 m, což zajišťuje velkou separační plochu a účinnost. Po průchodu kolonou přichází analyt na detektor. V našem případě se jedná o plamenový ionizační detektor (FID), jehož principem je spalování analytu ve vodíkovém plamenu mezi dvěma elektrodami. Spalováním vznikají iontové částice, které zvyšují vodivost. Proud probíhající detektorem je přímo úměrný koncentraci elektrolytu v nosném plynu. [32]

2.5.1.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Při vysokoučinné kapalinové chromatografii se používají náplňové kolony obsahující stacionární fázi. Analyzovaný vzorek je unášen mobilní fází za vysokého tlaku. Účinnost kolony je závislá na její délce a náplni, která zadržuje složky analytu. Stacionární fáze může být pevná látka či kapalina polárního nebo nepolárního charakteru. Chromatografické kolony, kde dochází k dělení složek, je konstruovaná jako trubice naplněná porézní látkou (stacionární fáze), nejčastěji silikagelem. Druh kolony (náplň, poréznost) se volí podle analyzovaných látek. K detekci se využívají fotometrické detektory, založené na stanovení absorbance eluátu. Mobilní fázi při tomto uspořádání je vždy kapalina s opačnou polaritou, než je stacionární fáze. [29][32][33]

Pro analýzu karotenoidů se využívá nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze. Při gradientové eluci není složení mobilní fáze konstantní, poměr rozpouštědel se v čase mění. Separované složky vychází z kolony na detektor (v našem případě PDA – detektor diodového pole). Signály jsou zpracovány a převedeny na data do počítače. Výstupem je chromatogram. (Obrázek 14)



Obrázek 14: Schéma HPLC [34]

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je optimalizace kultivace karotenogenních kvasinek na odpadních tukových substrátech.

Dosažení vytyčeného cíle bylo řešeno pomocí jednotlivých dílčích cílů:

- Literární rešerše zaměřená na vybrané kmeny červených kvasinek.
- Optimalizace úpravy odpadních substrátů.
- Kultivace vybraných kmenů kvasinek za stresových podmínek.
- Optimalizace složení produkčních médií.
- Příprava a izolace různých extraktů z buněčné biomasy a jejich charakterizace.
- Srovnání produkčních vlastností vybraných kmenů.
- Vyhodnocení výsledků.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité ke kultivaci kvasinek

Kvasničný autolyzát, Roth (SRN)

D-glukóza monohydrát p.a., Lach-ner (Česká Republika)

Bakteriologický pepton, Duchefa Biochemie (Nizozemsko)

Síran amonný p.a., Penta (Česká Republika)

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-ner (Česká Republika)

Síran horečnatý heptahydrát p.a., Lach-ner (Česká Republika)

Glycerol, Penta (Česká Republika)

Izopropylalkohol p.a. Roth (SRN)

Hexan p.a., (Lach-ner, Česká republika)

Odpadní tuk, Norilia (Norsko)

4.1.2 Chemikálie použité pro přípravu vzorků a analýzu (HPLC, GC)

Methanol p.a, Penta (Česká Republika)

Chlorofom p.a. Penta (Česká Republika)

Ethylacetát pro HPLC, Roth (SRN)

Acetonitril pro HPLC, Chem-Lab (Belgie)

Heptadekanová kyselina, Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina sírová 96%, Lach-ner (Česká Republika)

Methanol pro HPLC, Chem-Lab (Belgie)

Hydroxid sodný, Lach-ner (Česká Republika)

Hexan pro HPLC, Carlo ERBA (Francie)

Tris-HCl, Penta (Česká republika)

4.2 Použité pomůcky a přístroje

4.2.1 Přístrojová technika a pomůcky pro kultivaci kvasinek

Předvážky Scout, Ohaus

Analytické váhy Boeco

Autokláv Systec

Laminární box Air Stream ESCO Class II BSC

Skříňová třepačka ZWYR-D2401, Labwirt

Třepačka WiseShake SHR-2D, Witeg
 Mikroskop L II ooA, Intraco Micro
 GKB Color Digital CCD kamera
 Lucia Image active 5.0, Laboratory Imaging spol. s r.o.
 Centrifuga Z 36 HK, Hermle
 Centrifuga MIKRO 120, Hettich
 Lyofilizátor FreeZone 4.5 l Freeze Dry Systém, Labconco
 Vakuová pumpa k lyofilizátoru Vakuumbrand
 Homogenizátor BeadBug, Benchmark Scientific
 Vortex Fixed Speed Vortex Mixer, VXMNFS, Ohaus
 Vortex Genie 2, P-Lab
 Termoblok Dry Block Heater, Ohaus
 Fermentor RALF 7 l, BiOiNGENiRiNG
 Vakuová odparka HB4 basic, HBA Labortechnik
 Aparatura dle Soxhleta

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

Stuart Block Heater SBH200D (UK)
 HPLC/PDA sestava: Sestava Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fischer, USA)
 DAD detektorem řady Vanquish (Thermo Fischer, USA)
 Kolona Kinetex C18 EVO 150 mm, 4,6 mm, 2,6 μm (Phenomenex)
 Držák předkolony - KJ0 - 4282, ECOM (ČR)
 Předkolona - C18, AJ0 - 4287, Phenomenex
 GC/FID sestava: TRACE 1300 TM (Thermo Fischer, USA)
 Kapilární kolona Zebron GC FAME, 30m, 0,25 mm, 0,20 μm (Phenomenex)
 Vyhodnocovací software Chromeleon 7.2

4.3 Použité druhy kvasinek

Tabulka 1: Kmeny použitých kvasinek a jejich sbírkový kód

Název	Kód
Sporidiobolus pararoseus	CCY 19-9-6
Sporidiobolus metaroseus	CCY 19-6-20
Cystofilobasidium macerans	CCY 10-1-2
Rhodotorula mucilaginosa	CCY 19-4-6
Rhodotorula kratochvilovae	CCY 20-2-26
Rhodospiridium toruloides	CCY 062-002-004

4.4 Zpracování odpadních substrátů

4.4.1 Fritovací olej

Odpadní fritovací olej byl před použitím zfiltrován za sníženého tlaku přes filtrační papír (K0) aby se zbavil nečistot a zbytků potravy a následně byl uchováván při 4-8°C pro další použití.

4.4.2 Kávový tuk

Kávová sedlina (Bellarom, Lidl, směs Arabica:Robusta) byla získána z ústavní kuchyňky. Sedlina byla vysušena v laboratorní sušárně při 80°C po dobu 24 hodin. Vysušená sedlina byla následně pomletá, aby bylo dosaženo uniformních částic velikosti 100-200 µm. 50 g pomleté kávové sedliny bylo následně extrahováno směsí IPA:Hexan 50:50 po dobu 90 minut v Soxhletově aparatuře. Po extrakci byla sedlina opět vysušena v sušárně a skladována pro další použití ve tmě za laboratorní teploty. Získaný extrakt obsahující kávový olej byl následně odpařen ve vakuové odparce. Takto získaný olej byl následně uchováván pro další analýzy a použití při 4-8°C. 200 g extrahované kávové sedliny bylo smíšeno s 1200 ml 1% roztoku kyseliny sírové do sterilační láhve a umístěno do autoklávu na 4 hodiny při 130°C. Získaný hydrolyzát byl poté neutralizován roztokem hydroxidu sodného na pH=5. Po úpravě pH byla k hydrolyzátu přidána směs celulózových enzymů. Enzymatická hydrolyza probíhala při 40°C po dobu 24 hodin. Po enzymatické hydrolyze byla směs zfiltrována vakuově přes filtrační papír. Vzniklý hydrolyzát byl uchováván při 4-8°C pro další použití a analýzy. Množství cukrů v hydrolyzátu bylo analyzováno pomocí metody dle Duboise a chromatografických technik HPLC-RI.

4.5 Kultivace vybraných druhů kvasinek

4.5.1 Vnější podmínky

Použité druhy kvasinek patří mezi aerobní mikroorganismy. Kultivace probíhala v Erlenmayerových 250 ml baňkách. Ty byly inkubovány ve skříňové třepačce, aby byla udržena homogenita experimentu a aerace. Jelikož cílem byla produkce karotenoidů, bylo udržováno konstantní osvětlení. Teplota při kultivaci byla udržována na 25°C.

4.5.2 Inokulum I a II

Kultivace probíhala dvojstupňovou inokulací. Před každou kultivací byla nachystána média pro inokulum I a II podle tabulky č. 2. Inokulum I o objemu 50 ml v 250 ml Erlenmayerových baňkách a Inokulum II o objemu 125 ml v 500 ml Erlenmayerových baňkách. Tato média byla sterilována v tlakovém hrnci při teplotě 120 °C po dobu 40 minut. Po vychladnutí média byly ve sterilním prostředí očkovacího boxu zaočkovány kvasinky. Kvasinky byly přidány třemi kličkami z Petriho misek s narostlým daným kmenem do inokula I. Kultivační doba inokula I činila 24 hodin. Následně bylo inokulum I přeočkováno do inokula II v očkovacím poměru 1:5 sterilně v očkovacím boxu. Kultivace inokula II trvala 24 hodin. Při kultivaci s využitím tukové indukce bylo k inokulu I přidáno 1 ml a k inokulu II 2 ml fritovacího oleje.

Tabulka 2: Složení inokulačních médií

Složka	Množství (g/l)
Kvasničný autolyzát	10
Pepton	20
Glukóza monohydrát	22

4.5.3 Produkční média

Inokulum II bylo v posledním kroku přeočkováno do produkčního média v zachovaném poměru 1:5. Pro přípravu produkčních médií bylo využito minerální médium připravené podle tabulky 3. Produkční média byla připravována o objemu 50 ml do 250 ml Erlenmayerových baněk. Z důvodu velkého počtu typů produkčních médií probíhala sterilace v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Produkční média se lišila složením v obsahu glycerolu a odpadního substrátu a také typem využitého odpadního substrátu. Při každé kultivaci bylo připraveno kontrolní glycerolové médium. Dále se pracovalo s fritovacím olejem, kávovým olejem a živočišným směsným tukem. Z nich byly navíc připraveny dvě směsi 50:50 první s obsahem fritovacího oleje a živočišného tuku a druhá s obsahem kávového oleje a živočišného tuku. První várka médií se připravovala s obsahem glycerolu 10 % a 25 %, druhá bez glycerolu, pouze s odpadními substráty jako uhlíkovými zdroji a třetí bez glycerolu a s tukovou indukci v inokulu I i II. Navážky glycerolu a odpadních substrátů/směsí jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 3: Složení minerálního média

Složka	Množství (g/l)
KH ₂ PO ₄	4,0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,7
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,0

Tabulka 4: Navážky glycerolu a odpadních substrátů do jednotlivých typů produkčních médií

Médium	Navážka (g/50 ml média)	
	Glycerol	Lipidický substrát
Kontrolní glycerolové	2,3230	0
S glycerolem 10%	0,2323	1,0665
S glycerolem 25%	0,5808	0,8888
Bez glycerolu	0	1,1850

4.6 Zpracování biomasy

4.6.1 Stanovení biomasy

Z narostlého produkčního média bylo odpipetováno do 2 ml plastové Eppendorfovy zkumavky 1 ml kultury. Vzorek byl odstředěn při 3000 ot/min po dobu 4 minut. Supernatant byl slit. K biomase byl přidán 1 ml destilované vody a rozsuspendován. Následně byl vzorek zcentrifugován při stejném nastavení, supernatant slit a vzorek biomasy zamražen. Takto upravený vzorek byl umístěn na 24 hodin na lyofylizátor. Lyofilizovaná biomasa byla zvážena a hmotnost přepočítána na jeden litr kultury.

4.6.2 Uskladnění biomasy

Pro zajištění dostatku biomasy na extrakce bylo do 50 ml centrifugačních plastových zkumavek odlito 40 ml kultury. Tento vzorek byl centrifugován při 7000 ot/min po dobu 4 minut. Supernatant byl slit. K biomase bylo přidáno 20 ml destilované vody a vzorek rozsuspendován. Centrifugace proběhla při 7000 ot/min po dobu 4 min, supernatant následně slit a vzorek byl zmražen. Zmražený vzorek byl umístěn na lyofylizátor na 24 hodin a následně uskladněn v mrazicím boxu.

4.6.3 Extrakce, stanovení a analýza látek

4.6.3.1 Plynová chromatografie (GC)

4.6.3.1.1 Příprava vzorků na GC

Do kryptovacích vialek bylo odváženo na analytických vahách 8-18 mg zmražené lyofilizované biomasy a připipetováno 1,8 ml transesterifikační směsi. Uzavřená vialka byla umístěna na termoblok vyhřátý na 85 °C po dobu 2 hodin. Obsah zkumavky byl po vychladnutí kvantitativně převeden do 5 ml šroubovací vialky. Ke vzorku bylo napipetováno 0,5 ml 0,5 M NaOH a 1 ml hexanu HPLC kvality. Vialka byla na 10 minut umístěna na vortex, aby došlo k extrakci mastných kyselin do hexanu a dokonalému oddělení fází. Z horní hexanové fáze bylo do 2 ml šroubovací vialky odpipetováno 0,1 ml a následně připipetováno 0,9 ml hexanu HPLC kvality. Takto připravený vzorek byl umístěn na plynový chromatograf.

4.6.3.1.2 Analýza vzorků na GC

Plynová chromatografie byla použita k zjištění obsahu a složení mastných kyselin a tím i lipidů v biomase. Byl použit plynový chromatograf TRACE 1300 TM s automatickým dávkovačem a splitter s nastaveným split poměrem 10. K detekci byl využit plamenový ionizační detektor. Separace probíhala na koloně Zebron GC FAME o rozměrech 30 m 0,25 mm a 0,2 μm. Objem dávkovaného vzorku byl 0,1 μl. Jako nosný plyn byl využit vodík o průtoku 0,5 ml/min. V tabulce 5 níže je uveden teplotní program analýzy. Vyhodnocení probíhalo pomocí metody inertního standartu a externí kalibrace pomocí standardů Supleco FAME 37 mix. Tabulka níže (Tabulka 5) popisuje nastavený teplotní program. Data získána pomocí programu Chromeleon byla převedena do Excelu a vyhodnocena.

Tabulka 5: Teplotní program pro analýzu mastných kyselin a lipidů na GC

	Retenční čas (min)	Gradient (°C/min)	Teplota (°C)	Zadržení (min)
1	0,000	Start	-	-
2	1,000	0,0	80,0	1,0
3	5,000	15,0	140,0	0,0
4	21,667	3,0	190,0	0,0
5	25,667	25,0	260,0	1,0
6	25,467	Stop	-	-

4.5.6.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

4.5.6.2.1 Příprava vzorků na HPLC

Na analytických vahách bylo z lyofilizované biomasy odváženo 10-20 mg do 2 ml závitové zkumavky. K biomase byl přidán 1 ml destilované vody a vzorek byl 30 minut hydratován, poté byl vzorek zcentrifugován při 14000 ot/min po dobu 1 minuty a voda odlita. K hydratované biomase byl přidán 1 ml p.a. methanolu a přibližně 0,5 ml skleněných kuliček. Vzorek byl umístěn na mechanický dezintegrátor na 1 min, aby došlo k co nejdokonalejšímu rozrušení buněčných membrán. Následně byl vzorek kvantitativně převeden do 15 ml centrifugační zkumavky za přídavku 2 ml chloroformu p.a. a na 15 min umístěn na multipoziční vortex. K protřepanému vzorku byl přidán 1 ml destilované vody a ručně protřepán. Vzorek byl zcentrifugován při 3000 ot/min po dobu 1 minuty. Do 15 ml skleněné zkumavky byla odpipetována spodní chloroformová fáze. Chloroform byl odpařen za přívodu dusíku na termobloku při teplotě 45°C. Pevný zbytek po odpařování byl rozpuštěn v 1 ml směsi rozpouštědel HPLC kvality ethylacetát:acetonitril 2:1. Rozpuštěný vzorek byl přefiltrován přes PTFE filtr do 2 ml šroubovací vialky. Takto připravený vzorek byl umístěn na kapalinový chromatograf.

4.5.6.2.2 Analýza na HPLC

Analýza barviv probíhala na sestavě Dionex UltiMate 3000 s DAD detektorem řady Vanquish od firmy Thermo Fisher. K separaci látek se využila kolona Kinetex C18 EVO o rozměrech 150 mm, 4,6 mm a 2,6 µm. Průtok byl zvolen na 1,2 ml/min při teplotě separace 25°C. Byla využita gradientová eluce (gradientová rampa uvedena v tabulce č. 6) s mobilními fázemi A a B. Mobilní fáze A obsahovala acetonitril, TrisHCl o pH 8 a methanol v poměru 84:14:2. Mobilní fáze B byla složena z methanolu a ethylacetátu v poměru 60:40.

Tabulka 6: Gradientová rampa pro analýzu barviv při HPLC

	Retenční čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
1	0,0	100	0
2	13,0	0	100
3	19,0	0	100
4	20,0	100	0
5	25,0	100	0

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Stanovení produkčních vlastností biomasy u baňkových kultivací

Cílem baňkových kultivací byla optimalizace složení produkčních médií. Pro jednodušší orientaci byla média rozdělena do 3 kategorií: s glycerolem, bez glycerolu a s tukovou indukcí v inokulu I a II. Veškerá média jsou uvedena v tabulce číslo 7.

Množství biomasy bylo stanoveno stočením a zlyofilizováním 1 ml kultury, biomasa byla zvážena na analytických vahách a výsledek přepočítán na litr kultury. Také byly stanoveny produkční hodnoty vybraných metabolických látek. Pomocí HPLC byly stanoveny ergosterol, ubichinon, tokoferol a barviva β -katořen, lykopen, torulen, torularhodin a celkové karotenoidy. Veškeré výsledky jsou uvedeny v příloze. Biomasa a metabolity s vysokou produkcí jsou uvedeny v grafech níže. Koncentrace jsou uváděny v miligramech na gram suché biomasy. V druhé části bylo využito stanovení obsahu a složení mastných kyselin v transesterifikovaných vzorcích biomasy pomocí GC. Grafy jsou uvedeny níže.

Tabulka 7: Využívaná média

Kultivace	Médium	Zkratka
S GLYCEROLEM	Kontrolní glycerolové	Kontrolní 1
	Fritovací olej + glycerol 10%	FOG10
	Fritovací olej + glycerol 25%	FOG25
	Kávový olej + glycerol 10%	KOG10
	Kávový olej + glycerol 25%	KOG25
	Živočišný tuk + glycerol 10%	TUK+G10
	Živočišný tuk + glycerol 25%	TUK+G25
	Fritovací olej + živočišný tuk + glycerol 10%	FO+T+G10
	Fritovací olej + živočišný tuk + glycerol 25%	FO+T+G25
	Kávový olej + živočišný tuk + glycerol 10%	KO+T+G10
	Kávový olej + živočišný tuk + glycerol 25%	KO+T+G25
BEZ GLYCEROLU	Kontrolní glycerolové	Kontrolní 2
	Fritovací olej	FO
	Kávový olej	KO
	Živočišný tuk	TUK
	Fritovací olej + živočišný tuk	FO+T
	Kávový olej + živočišný tuk	KO+T
S INDUKCÍ	Kontrolní glycerolové	Kontrolní 3
	Fritovací olej s indukcí v inokulech	FO (I)
	Kávový olej s indukcí v inokulech	KO (I)
	Živočišný tuk s indukcí v inokulech	TUK (I)
	Fritovací olej + živočišný tuk s indukcí v inokulech	FO+T (I)
	Kávový olej + živočišný tuk s indukcí v inokulech	KO+T (I)

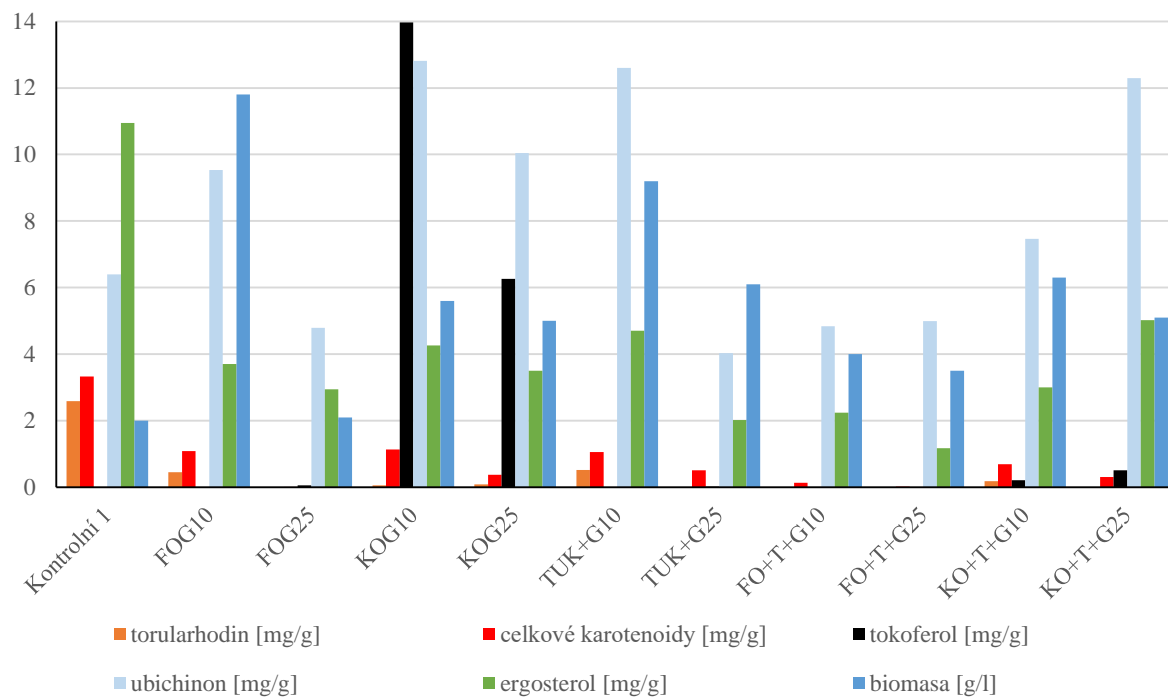
5.1.1 Produkční vlastnosti kmene *Sporidiobolus pararoseus*



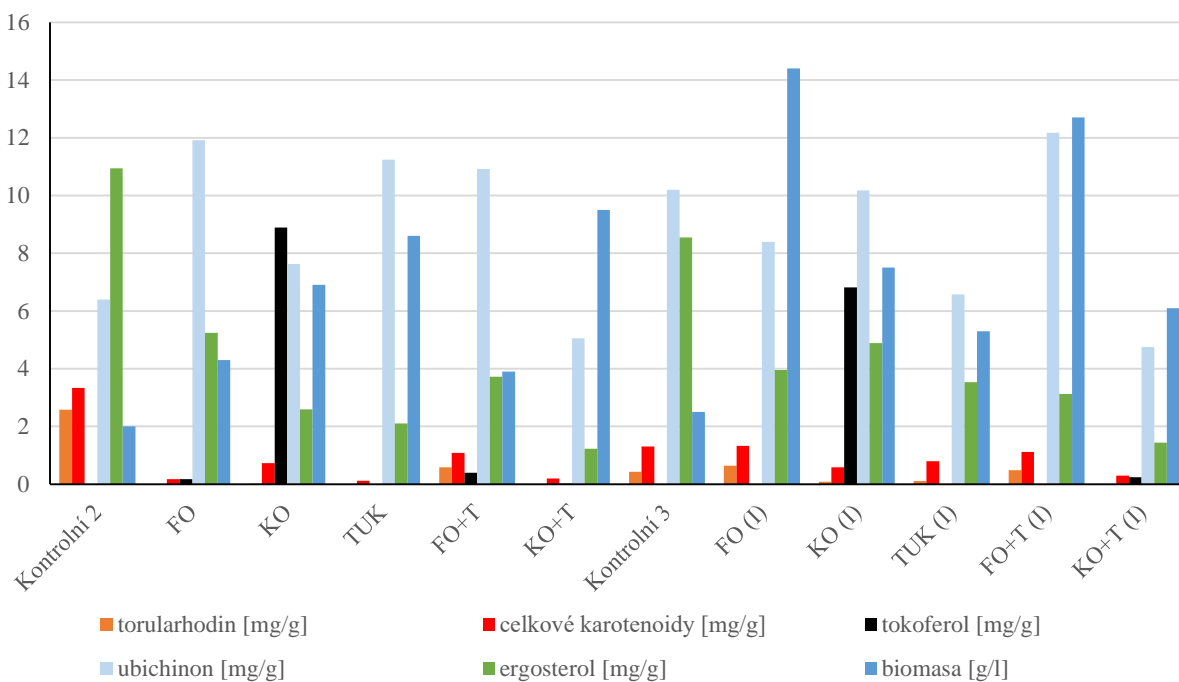
Obrázek 13: Kultivace kmene *Sporidiobolus pararoseus* s využitím odpadních substrátů bez glycerolu

Výsledky kultivací kmene *Sporidiobolus pararoseus* na zvolených médiích ukazují, že tukový substrát za daných podmínek nebyl kvasinkou dobře využíván a z celkového pohledu jsou produkce sledovaných látek i biomasy nízké, tomu odpovídá i zbarvení kultur na obrázku (Obrázek 13). Veškeré naměřené hodnoty jsou uvedeny v příloze (Příloha 1 a 2), produkce metabolitů s majoritním zastoupením jsou znázorněny v grafech (Graf 1 a 2). Nejvyšší produkce celkových karotenoidů byla dosažena u kontrolního glycerolového média a to 3,33 mg/g biomasy, kde nejvyššího zastoupení dosáhl torularhodin s produkcí 2,58 mg/g (téměř 80 % z celkových karotenoidů), následován betakarotenem (0,46 mg/g) a torulenem (0,20 g/g).

Nejlépeších výsledků bylo dosaženo na médiu obsahující fritovací olej s indukcí produkce lipáz. Kdy byla zjištěna nejvyšší produkce biomasy 14,40 g/l s druhým největším obsahem celkových karotenoidů 1,33 mg/g (40 % v porovnání s nejvyšší hodnotou při použití kontrolního glycerolového média), v nichž je započítána i nejvyšší produkce torulenu (0,27 mg/g) a druhá nejvyšší produkce torularhodinu (0,64 mg/g), betakaroten tvořil 0,35 mg/g. Produkce lykopenu byla o 23 % větší, ale naopak produkce torularhodinu byla snížena o více jak 75 % (oproti nejvyšší získané hodnotě na kontrolních glycerolových médiích). Produkci lykopenu vyhovovala média s kávovým olejem, při využití kávového oleje s 10 % glycerolu byla produkce 0,85 mg/g. Nejvyšší produkce ergosterolu byla dosažena využitím média s fritovacím olejem, bez glycerolu, bez indukce a to 5,24 mg/g, což dosahuje méně než poloviny nejvyšší hodnoty produkce při použití kontrolního glycerolového média. Odpadní lipidické látky se zdají být dobrým substrátem pro produkci ubichinonu, ten dosáhl nejvyšší hodnoty produkce při kultivaci s využitím média s kávovým olejem s 10 % glycerolu, kdy bylo dosaženo dvojnásobné hodnoty oproti kontrolnímu médiu (12,81 mg/g). Podobné produkce ubichinonu bylo dosaženo i při kultivaci na médiu s odpadním živočišným tukem a přidavkem glycerolu 10 % (12,60 mg/g). V médiích obsahujících kávový olej docházelo k akumulaci tokoferolu přítomného v oleji samotnou kvasinkou, kdy při kultivaci v médiu s kávovým olejem a nižším přidavkem glycerolu dosáhla hodnoty 13,97 mg/g suché biomasy.

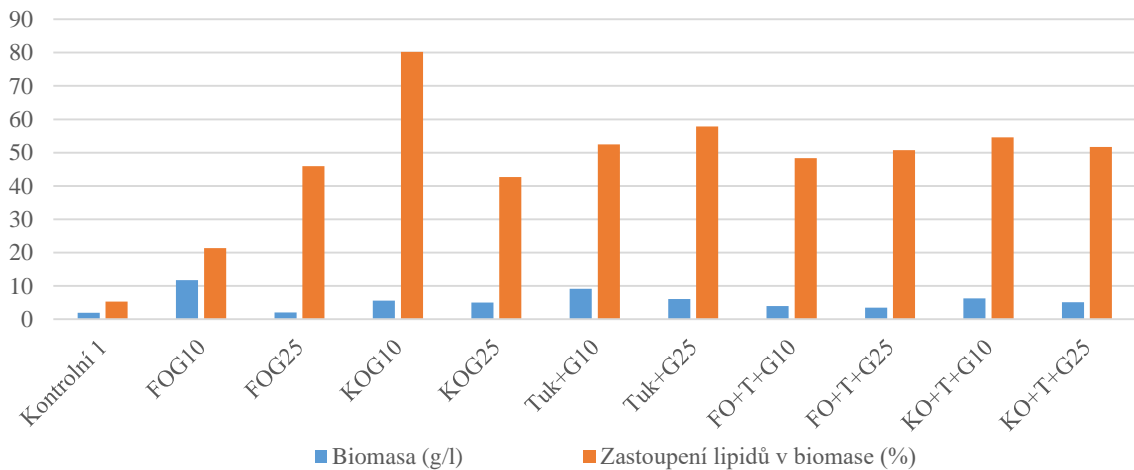


Graf 1: Graf produkce vybraných metabolitů pro kmen *Sporidiobolus pararoseus* na médiích s odpadními substráty s přidavkem glycerolu.

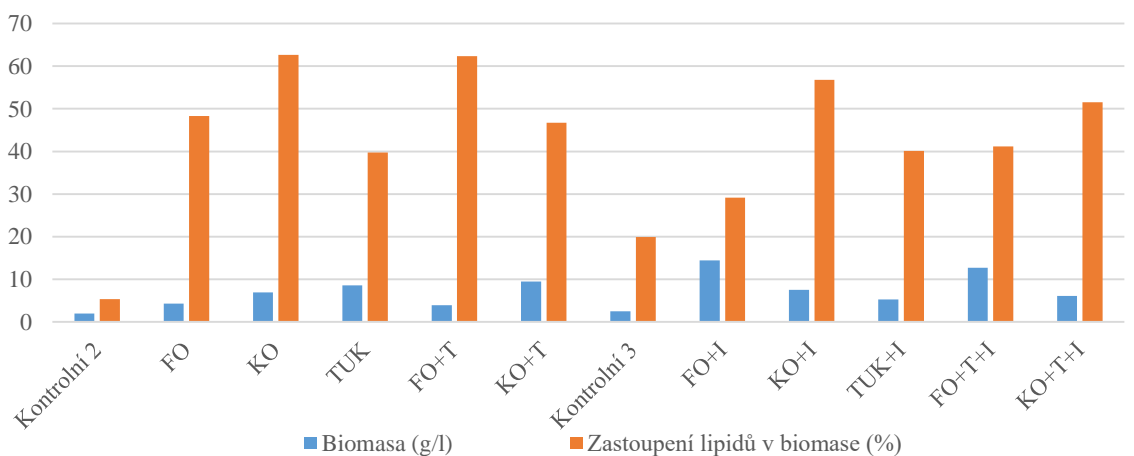


Graf 2: Graf produkce vybraných metabolitů pro kmen *Sporidiobolus pararoseus* na médiích s odpadními substráty bez glycerolu a s tukovou indukcí

Z výsledků chromatografické analýzy produkce lipidů kvasinkou *Sporidiobolus pararoseus* je patrná rozdílná schopnost kvasinky využít zvolené odpadní substráty. V případě médií obsahujících kombinaci lipidového substrátu a glycerolu dochází k vyšší produkci biomasy i lipidů. Celkově nejvyšší obsah lipidů 80,22 % byl stanoven na médiích obsahující kávový olej s nižším přídatkem glycerolu (Graf 3). Výborná schopnost kvasinky *Sporidiobolus pararoseus* využít kávový olej byla potvrzena již v předchozích pracích [35]. Výsledky na tukových médiích bez přídatku glycerolu poukazují na sníženou užitelnost substrátu, která je dána jeho fyzikálním stavem. Za podmínek kultivace byl použitý odpadní tuk v pevném skupenství a celková aktivní plocha pro působení lipáz tak byla výrazně nižší, ve srovnání s fritovacím či kávovým olejem. Tomu odpovídá také snížená produkce biomasy, kterou lze připsat z větší části použitému glycerolu v médiu. Smísením tuhého živočišného tuku s kapalným olejem došlo k zlepšení jeho kultivačních vlastností a zvýšení využitelnosti samotnou kvasinkou. Jak lze vidět z výsledků v grafech (Graf 3 a 4). Kvasinka na médiích se směsným tukem, zejména ve směsi s kávovým olejem, naprodukovala více biomasy v porovnání s čistým tukovým médiem a kontrolním glycerolovým médiem. V médiích s indukcí lipázové aktivity (přídavek oleje do inokulačních médií) dále vedl ke zvýšení produkce biomasy. V tomto kmeni však indukce neměla výrazný efekt. Na médiích s indukcí bylo dosaženo nejvyšší produkce lipidů 56,8 % opět na médiu s kávovým olejem. Z celkového pohledu vidíme, že aplikace jednotlivých kombinací tuků a přídatků glycerolu měla pozitivní vliv na produkci biomasy i lipidů.

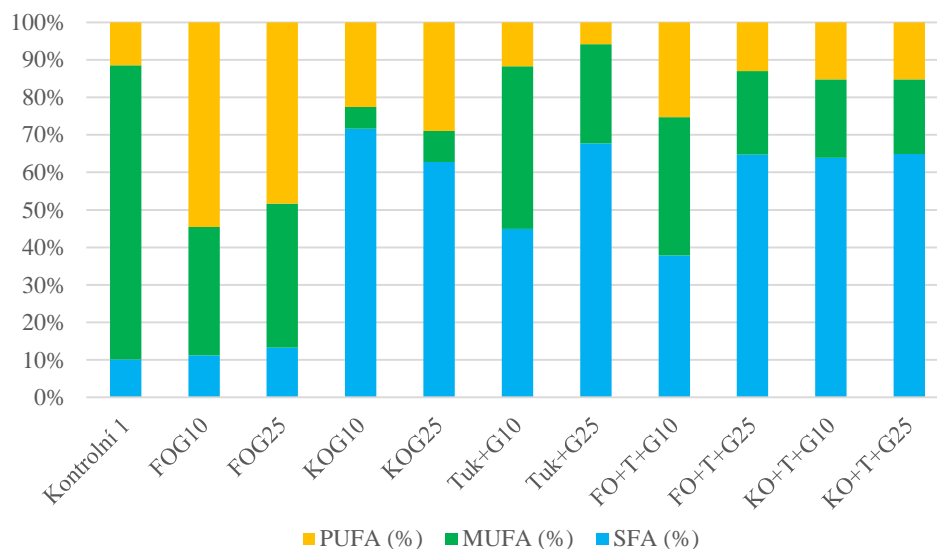


Graf 3: Produkce biomasy kmenem *Sporidiobolus pararoseus* a procentuální zastoupení lipidů v biomase při využití produkčních médií s odpadními substráty a glycerolem.

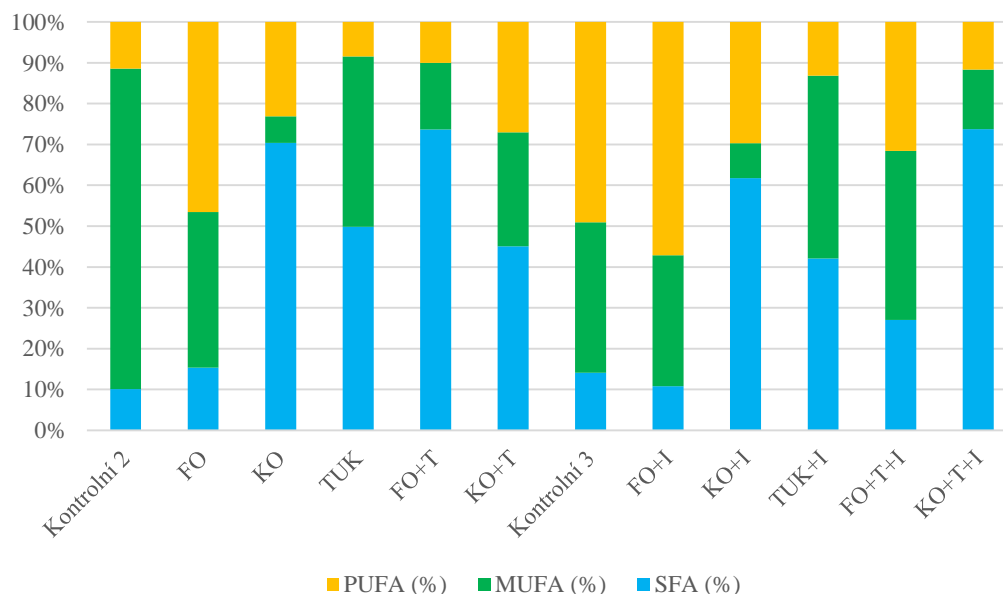


Graf 4: Produkce biomasy kmenem *Sporidiobolus pararoseus* a procentuální zastoupení lipidů v biomase při využití produkčních médií s odpadními substráty bez glycerolu a s tukovou indukcí

Z hlediska profilu mastných kyselin (Graf 5 a 6) vidíme, že aplikace různých typů lipidických odpadů má výrazný vliv na profil mastných kyselin. V porovnání s kontrolním glycerolovým médiem, kde převažuje obsah nenasycených mastných kyselin (UFA) (>85 %), dochází na médiích s odpadními lipidy k zvýšené akumulaci nasycených mastných kyselin, které tvoří více než 30-40 %. Tento jev lze přičíst rychlejšímu metabolismu a větší produkci biomasy. Lze předpokládat, že při prodloužení kultivace by docházelo ke zpomalení růstu a akumulaci vyššího obsahu UFA. Zvýšený obsah UFA je pozorován prakticky pouze na médiích obsahujících fritovací olej, kde obsah UFA je srovnatelný s glycerolovým kontrolním médiem. Z hlediska zastoupení jednotlivých skupin, vidíme, že aplikace fritovacího oleje vede k zvýšenému obsahu polynenasycených mastných kyselin (PUFA).



Graf 5: Složení lipidů v biomase při kultivacích kmene *Sporidiobolus parosaeus* na médiích s odpadním substrátem s přidavkem glycerolu



Graf 6: Složení lipidů v biomase při kultivacích kmene *Sporidiobolus parosaeus* na médiích s odpadním substrátem bez glycerolu a s tukovou indukci

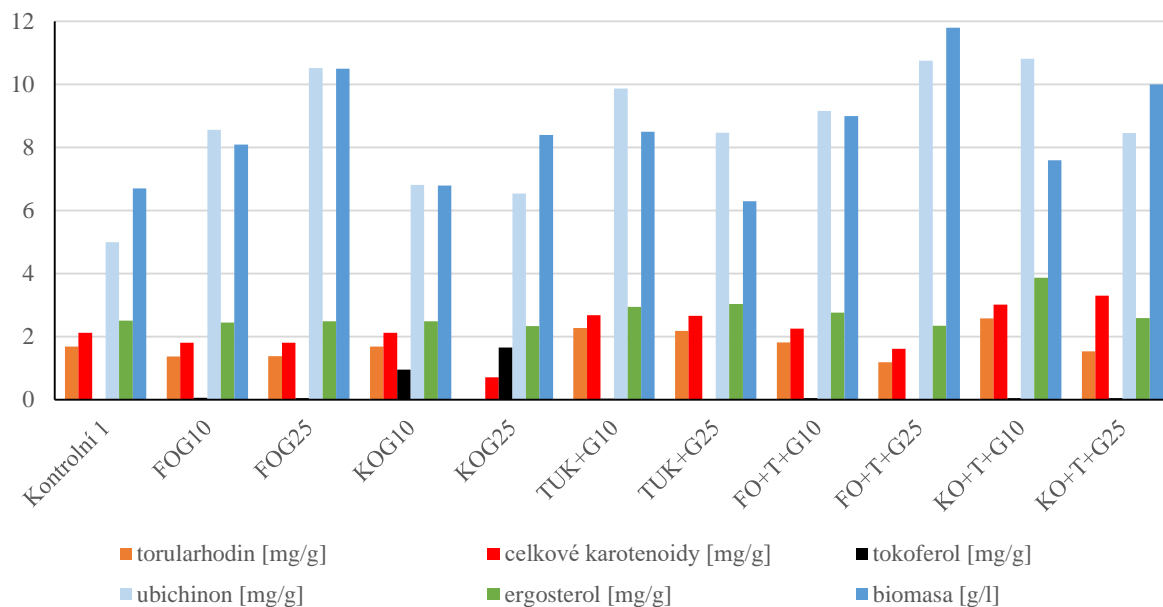
5.1.2 Produkční vlastnosti kmene *Sporidiobolus metaroseus*



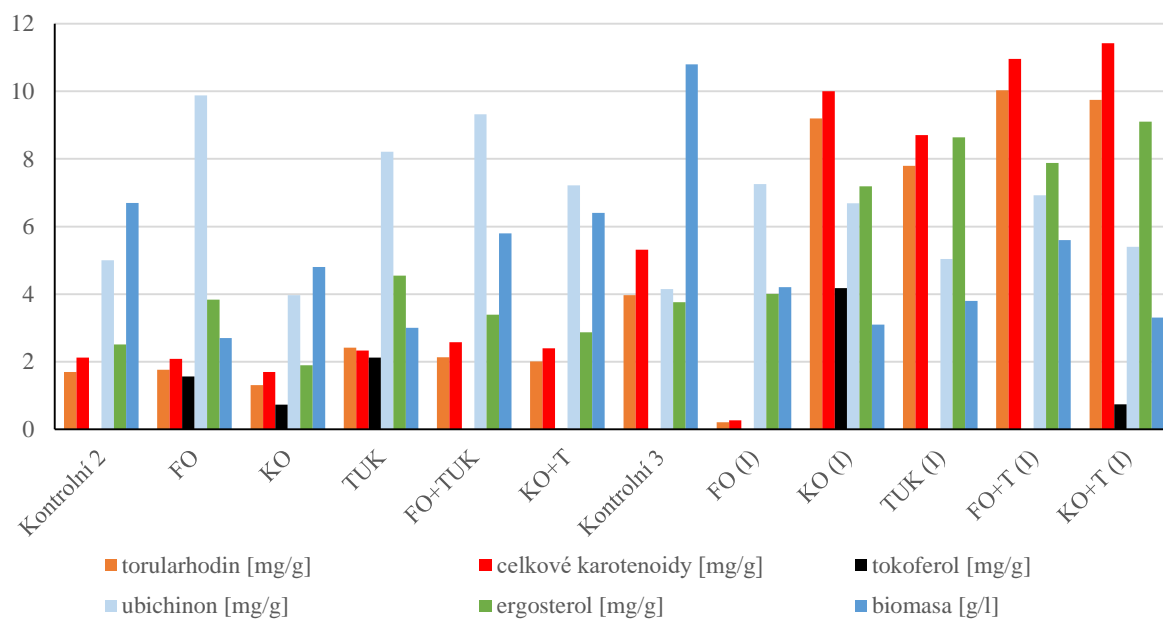
Obrázek 14: Kultivace kmene *Sporidiobolus metaroseus* s využitím odpadních tuků s glycerolem

Z výsledků kultivací (Příloha 3 a 4) kmene *Sporidiobolus metaroseus* je patrné, že odpadní tukové substráty jsou vhodným substrátem k produkci karotenoidů. Majoritní metabolity jsou vyneseny v grafech níže (Graf 7 a 8). Pro produkci biomasy jsou nejvýhodnější média s přidavkem glycerolu, kde nejvyšší hodnoty dosáhla kultivace na médiu se směsí fritovacího oleje a živočišným tukem s přidavkem 25 % glycerolu (11,8 g/l) což činí nárůst o 75 % oproti kultivaci na kontrolním glycerolovém médiu. Produkce biomasy při kultivacích bez přidavku glycerolu se pohybuje v rozmezí 2,5 – 6,5 g/l, což naznačuje, že glycerol je spotřebováván na růst kultury. Při využití indukce aktivity lipáz je patrné, že odpadní substráty jsou vhodné pro produkci karotenoidů. K nejvyšší produkci došlo při použití směsi kávového oleje a živočišného tuku, kdy dosáhly celkové karotenoidy hodnoty 11,43 mg/g. Torularhodin tvořil téměř 85,3% s druhou nejvyšší hodnotou produkce 9,75 mg/g. Dále je v hodnotě započten lykopen (1,06 mg/g), který dosáhl téměř trojnásobku hodnoty než při použití kontrolního média. Velmi vhodným substrátem byla také směs fritovacího oleje s živočišným tukem s produkcí karotenoidů 10,96 mg/g s nejvyšší produkcí torularhodinu 10,03 mg/g (91,5 % z příslušné celkové produkce karotenoidů).

Pokud je u kmene *Sporidiobolus metaroseus* indukována produkce lipáz přidavkem oleje do inokulačních médií, tak jsou odpadní lipidické substráty velice vhodné pro produkci ergosterolu. Z grafu (Graf 8) je patrné, že nejvhodnějším substrátem je odpadní živočišný tuk a směsi, kde je obsažen. Při kultivaci s využitím směsi kávového oleje a živočišného tuku bylo dosaženo maximální hodnoty produkce ergosterolu (9,11 mg/g). Při použití média pouze s živočišným tukem došlo k poklesu o pouhých 5 % i přes jeho pevné skupenství a malou aktivní plochu. Naopak pro produkci ubichinonu se zdají vhodnější média s přidavkem glycerolu, kde se nejvyšší produkce dosáhlo při využití směsi kávového oleje s živočišným tukem a přidavkem glycerolu 10 %, kdy ubichinon dosáhl hodnoty produkce 10,82 mg/g. U kontrolních glycerolových médií byla výtěžnost ubichinonu poloviční. Kmen *Sporidiobolus metaroseus* taktéž vykazuje akumulaci schopnost pro tokoferol. Pomocí tukové indukce bylo dosaženo maximální hodnoty produkce tokoferolu v biomase 4,17 mg/g. Tokoferol se také může vyskytovat v rybím tuku či v tuku přežvýkavců a dle výsledků je tento kmen schopný jej akumulovat právě i z živočišného tuku. Velmi vysoké hodnoty (2,12 mg/g) bylo dosaženo při jeho využití bez glycerolu i indukce. Živočišný tuk v pevném skupenství byl pro kmen *Sporidiobolus metaroseus* obecně těžko užitelný (velmi nízké produkce karotenoidů, průměrné produkce lipidických látek). Na obrázku (Obrázek 14) je viditelné výrazné červené zbarvení způsobené vyššími koncentracemi karotenoidů.

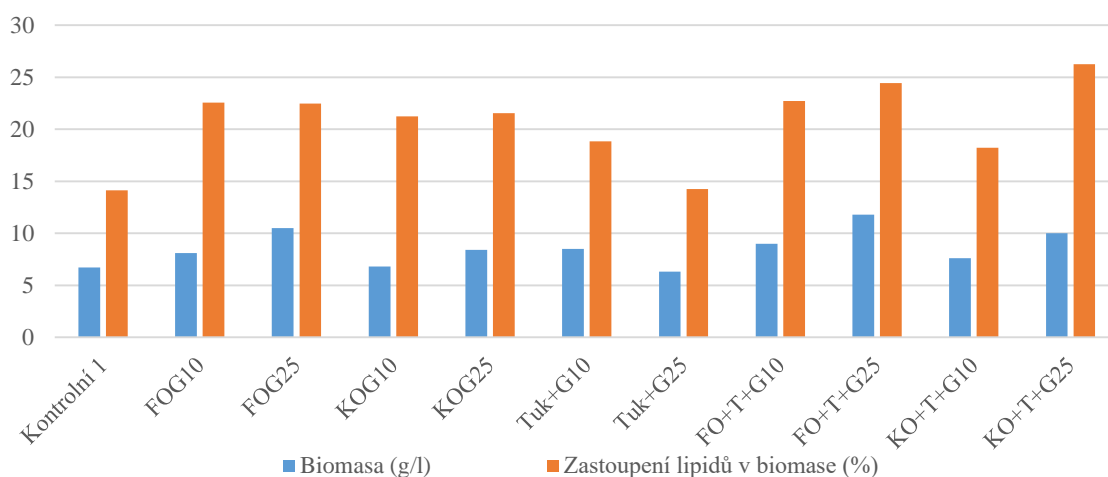


Graf 7: Graf produkce vybraných metabolitů pro kmen *Sporidiobolus metaroseus* na médiích s odpadními substráty s přidávkou glycerolu.

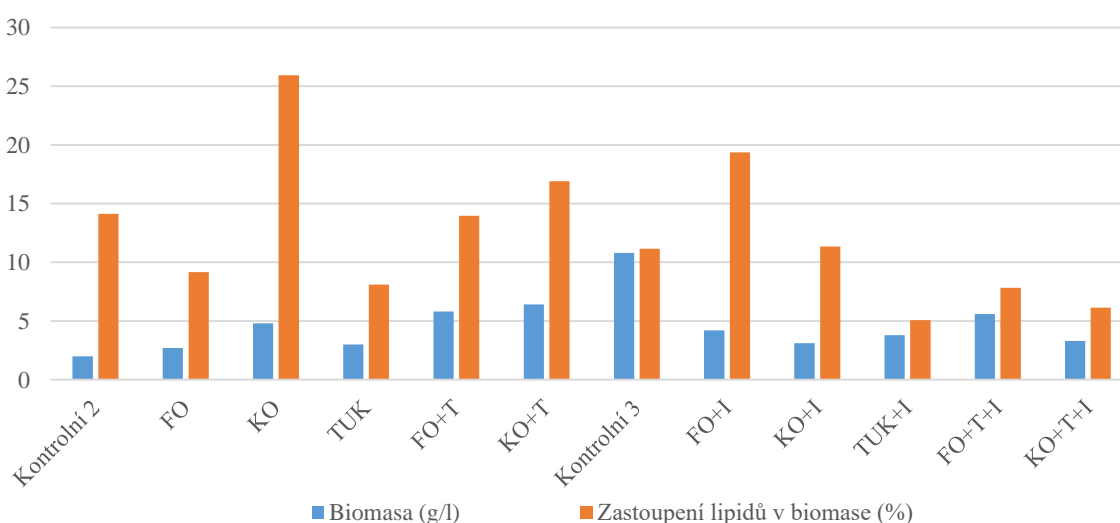


Graf 8: Graf produkce vybraných metabolitů pro kmen *Sporidiobolus metaroseus* na médiích s odpadními substráty bez glycerolu a s tukovou indukcí

Z grafů (Graf 9 a 10) je patrné, že kmen *Sporidiobolus metaroseus* má vyšší produkci biomasy při použití glycerolu jako substrátu. Stejně tak i procentuální zastoupení lipidů je při kultivaci na médiích s přidavkem glycerolu vyšší. Celkově má kmen *Sporidiobolus metaroseus* horší schopnost využít odpadní substráty než příbuzný kmen *Sporidiobolus pararoseus*. U *Sporidiobolus pararoseus* se vyšší hodnoty pohybovaly mezi 45-80 % a u *Sporidiobolus metaroseus* v rozmezí 20-26 %. Nejvyššího obsahu lipidů bylo dosaženo za využití média se směsí kávového oleje a živočišného tuku s přidavkem glycerolu 25 %, hodnota byla stanovena na 26,27 %. Ze substrátů je kávový olej pro tento kmen nejnázeji využitelný. Kombinace substrátů ale tuto schopnost zvyšuje. Živočišný tuk kvůli svému pevnému skupenství je mnohem hůře zpracovatelný. Nejvyšší produkce biomasy byla dosažena při využití směsi fritovacího oleje s živočišným tukem s vyšším přidavkem glycerolu a to 11,8 g/l se zastoupením lipidů 24,46 %. Při použití médií bez glycerolu a s tukovou indukcí v inokulech bylo dosaženo vyšší produkce karotenoidů, ale produkce biomasy a procentuální zastoupení lipidů je mnohem menší, než při použití médií s glycerolem. Pouze při využití média s kávovým olejem dosáhlo zastoupení lipidů hodnoty 25,95 % a ve směsi s živočišným tukem 16,91 %. Využití indukce lipázové aktivity vedlo sice k větší produkci karotenoidů, ale poklesla produkce biomasy i zastoupení lipidů.

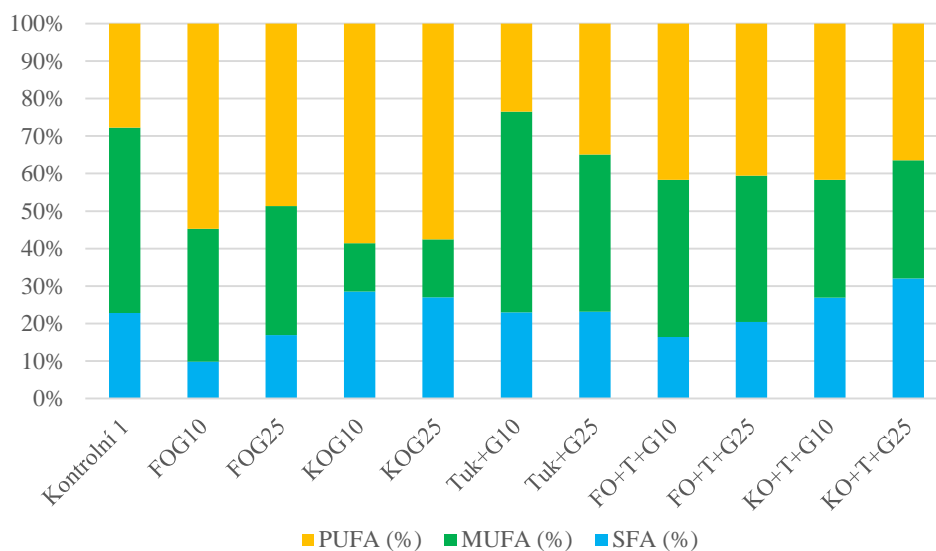


Graf 9: Produkce biomasy kmenem *Sporidiobolus metaroseus* a procentuální zastoupení lipidů v biomase při využití produkčních médií s odpadními substráty a glycerolem.

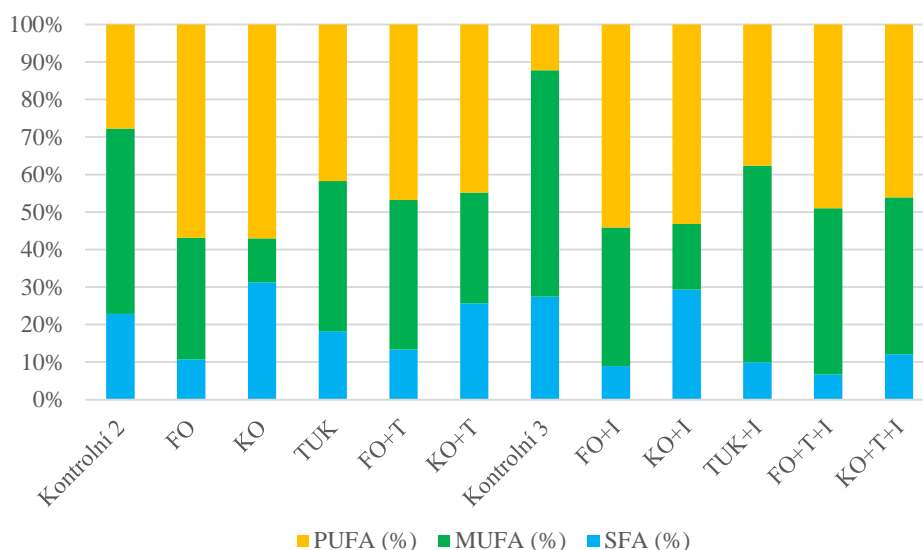


Graf 10: Produkce biomasy kmenem *Sporidiobolus metaroseus* a procentuální zastoupení lipidů v biomase při využití produkčních médií s odpadními substráty bez glycerolu a s tukovou indukcí

U kmene *Sporidiobolus metaroseus* nejsou viditelné (Grafy 11 a 12) tak velké změny v profilu mastných kyselin jako tomu bylo u *Sporidiobolus pararoseus*. S kultivací na lipidových substrátech roste zastoupení PUFA a dochází ke snížení MUFA. Oproti kontrolním médiím můžeme při kultivacích s fritovacím olejem pozorovat snížení množství nasycených mastných kyselin a celkového zvýšení nenasycených mastných kyselin. Naopak při kultivacích na kávovém oleji dosahovaly SFA nejvyšších hodnot (26-32 %). Kultivace na kávovém oleji taktéž vykazují nejmenší zastoupení mononenasycených mastných kyselin (MUFA). Indukce lipázové aktivity vedla k snížení akumulace SFA (6-12 %), kromě média s kávovým olejem (29,3 %).



Graf 11: Složení lipidů v biomase při kultivacích kmene *Sporidiobolus metaroseus* na médiích s odpadním substrátem s přidávkou glycerolu



Graf 12: Složení lipidů v biomase při kultivacích kmene *Sporidiobolus metaroseus* na médiích s odpadním substrátem bez glycerolu a s tukovou indukcí

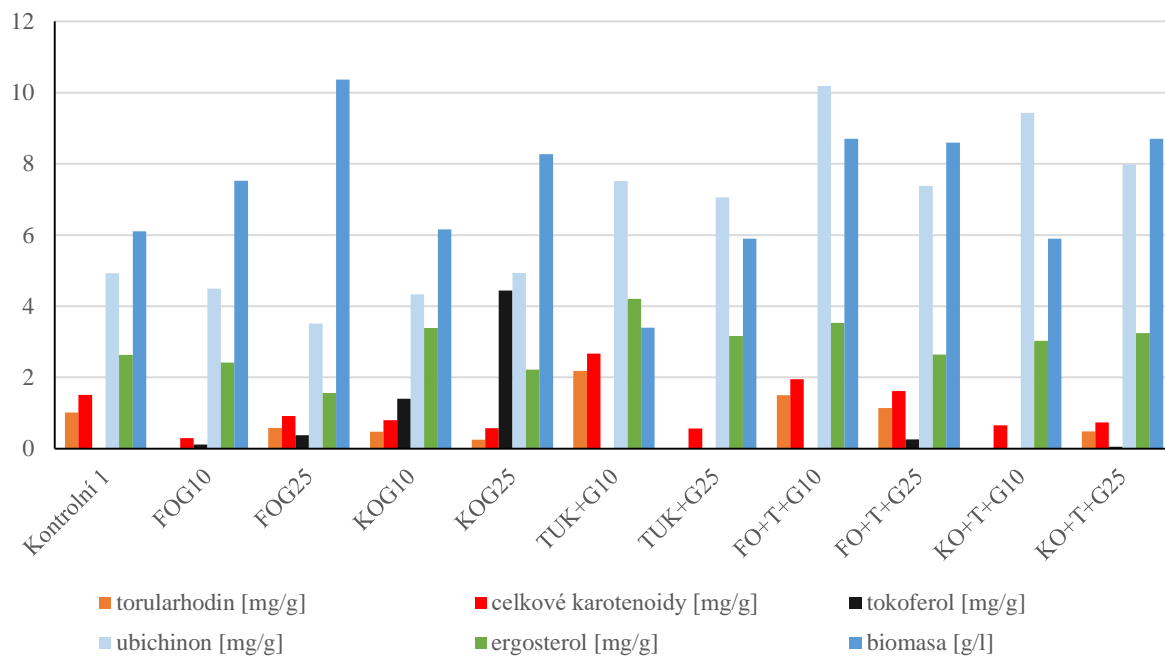
5.1.3 Produkční vlastnosti kmene *Cystofilobasidium macerans*



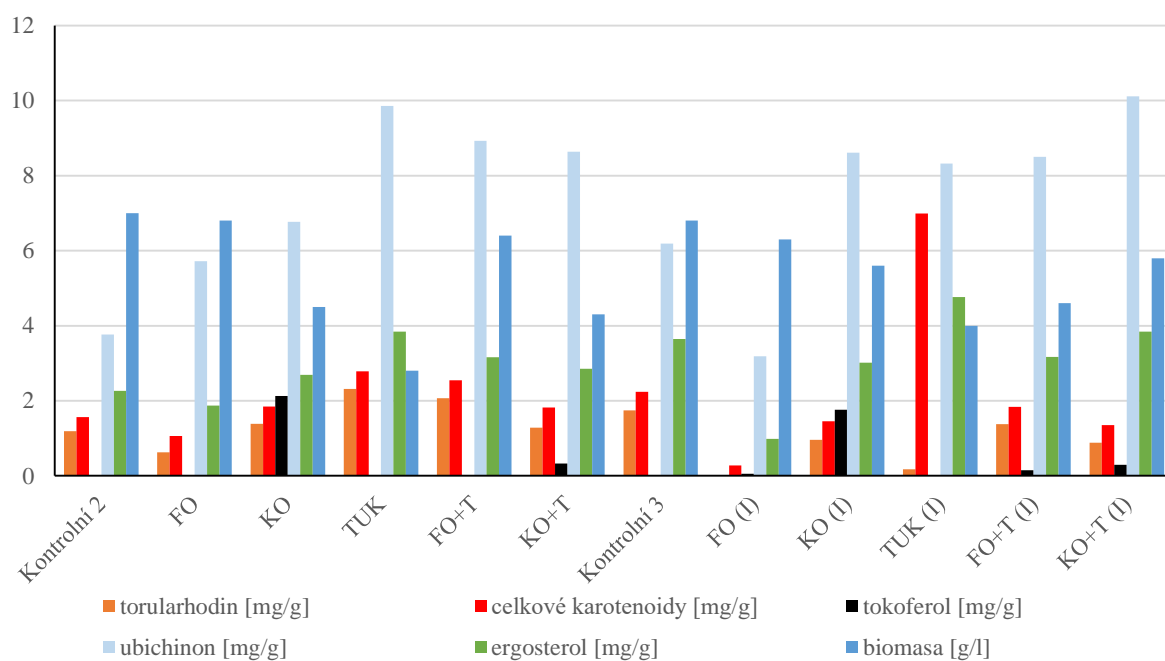
Obrázek 15: Kultivace kmene *Cystofilobasidium macerans* s využitím odpadních substrátů bez glycerolu a indukce

V příloze (Příloha 5 a 6) je viditelné, že pro produkci biomasy jsou vhodná média s přidavkem glycerolu. Nevyšší produkce byla zaznamenána při využití média s fritovacím olejem a přidavkem glycerolu 25 % a to 10,37 g/l. Obecně byla produkce biomasy bez využití glycerolu menší, ale obsah karotenoidů byl vyšší. V grafech níže (Graf 13 a 14) jsou vyneseny metabolity s majoritním zastoupením. Nejvyšší hodnotu produkce celkových karotenoidů obsahovala biomasa z kultivace na médiu s živočišným tukem s indukcí, která dosáhla hodnoty 6,99 mg/g. Celkové karotenoidy z více jak 90 % tvořil lykopen (6,39 mg/g), který při této kultivaci dosáhl nejvyšší hodnoty. Při kultivaci na médiu s živočišným tukem bez tukové indukce byla produkce karotenoidů o 60 % menší, ale hodnota 2,32 mg/g torularhodinu byla nejvyšší a současně zde bylo dosaženo druhé nejvyšší produkce lykopenu (0,18 mg/g). Na obrázku (Obrázek 15) můžeme vidět zbarvení kultur kultivovaných na odpadních substrátech bez glycerolu a indukce, zapříčiněné karotenoidy. Produkce betakarotenu byla vyšší při kultivacích s přidavkem glycerolu. Pro produkci ergosterolu jsou dle výsledků vhodná média s živočišným tukem, kdy nejvyšší hodnoty bylo dosaženo v médiu s využitím indukce aktivity lipáz (4,77 mg/g), bez využití indukce produkce klesla o 20 %.

Pro tvorbu ubichininonu kmenem *Cystofilobasidium macerans* je jako substrát nejvhodnější odpadní živočišný tuk a směsi s živočišným tukem, nejvyšší produkce bylo dosaženo při využití média se směsí fritovacího oleje a odpadního živočišného tuku s nižším přidavkem glycerolu (10,18 mg/g). Podobného výsledku bylo dosaženo při využití směsi s kávovým olejem a se stejným přidavkem glycerolu, kdy klesla jeho produkce o 8 %. I kmen *Cystofilobasidium macerans* vykazuje schopnost akumulovat tokoferol z kávového oleje, nejlepšího výsledku bylo dosaženo za použití kávového oleje s vyšším přidavkem glycerolu a to 4,44 mg/g. Poloviční hodnoty bylo dosaženo s využitím kávového oleje bez glycerolu a bez indukce.

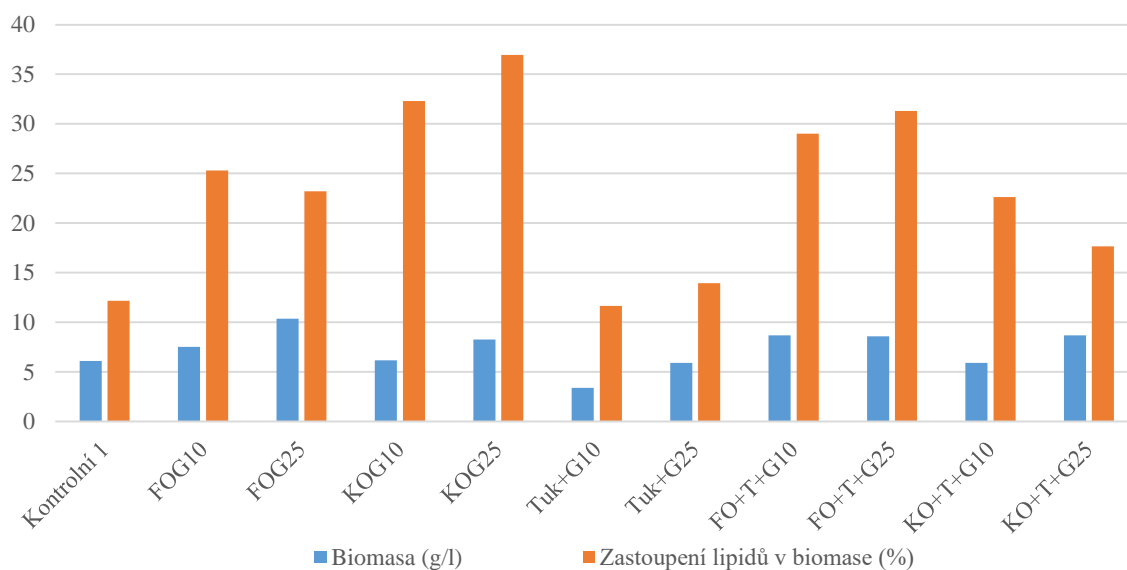


Graf 13: Graf produkce vybraných metabolitů pro kmen *Cystofilobasidium macerans* na médiích s odpadními substráty s přidavkem glycerolu.

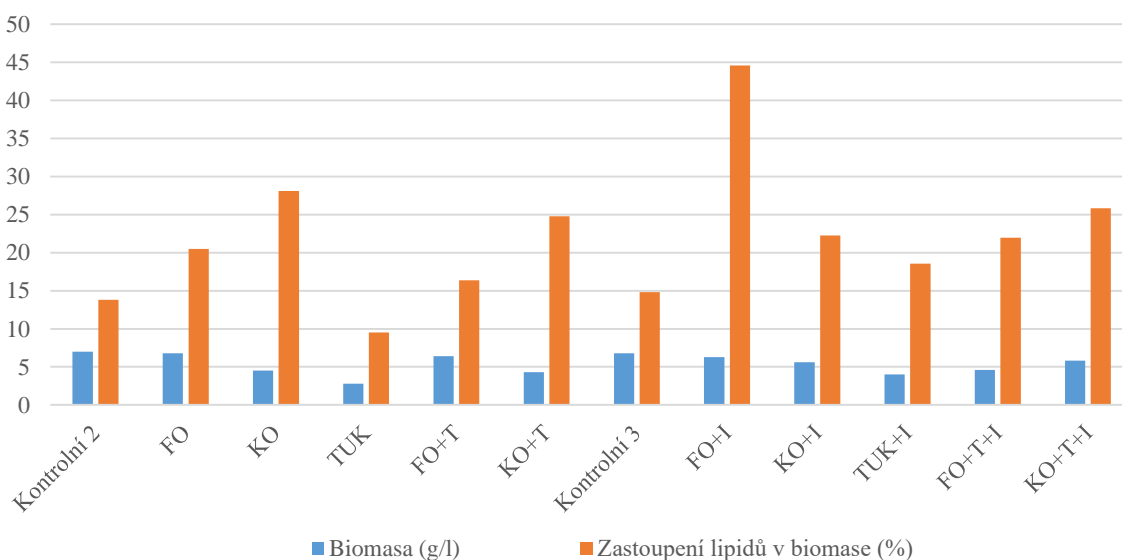


Graf 14: Graf produkce vybraných metabolitů pro kmen *Cystofilobasidium macerans* na médiích s odpadními substráty bez glycerolu a s tukovou indukcí

U kmene *Cystofilobasidium macerans* pozorujeme v grafech (Graf 15 a 16) zvýšenou schopnost produkce biomasy při využití přísad glycerolu. Na vyšším přísadku se odráží i vyšší produkce biomasy. Maximální produkce bylo dosaženo při použití fritovacího oleje s vyšším přísadkem glycerolu (10,4 g/l) a následně jeho směsi s živočišným tukem s přísadkou glycerolu, kdy produkce poklesla o 17 %. Pro zvýšení obsahu lipidů v biomase jsou taktéž média s glycerolem vhodnější. Ale i přes tento trend je nejvyšší zastoupení lipidů v biomase z kultivace na médiu s fritovacím olejem s tukovou indukcí lipázové aktivity, kde bylo dosaženo hodnoty obsahu lipidů v biomase 44,6 %. Živočišný tuk není vhodný pro produkci lipidů, jelikož je pro kvasinky těžko utilizovatelný. Nejvhodnějším dle výsledků je kávový olej, kdy se hodnoty pohybují v rozmezí 17-37 %. Ve většině případů tuková indukce v inokulech vedla ke snížení obsahu lipidů.

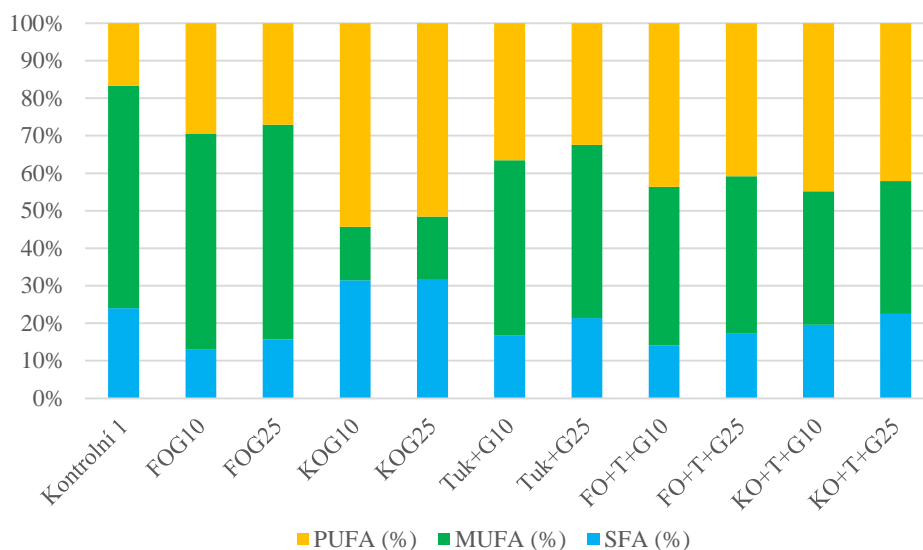


Graf 15: Produkce biomasy kmenem *Cystofilobasidium macerans* a procentuální zastoupení lipidů v biomase při využití produkčních médií s odpadními substráty a glycerolem.

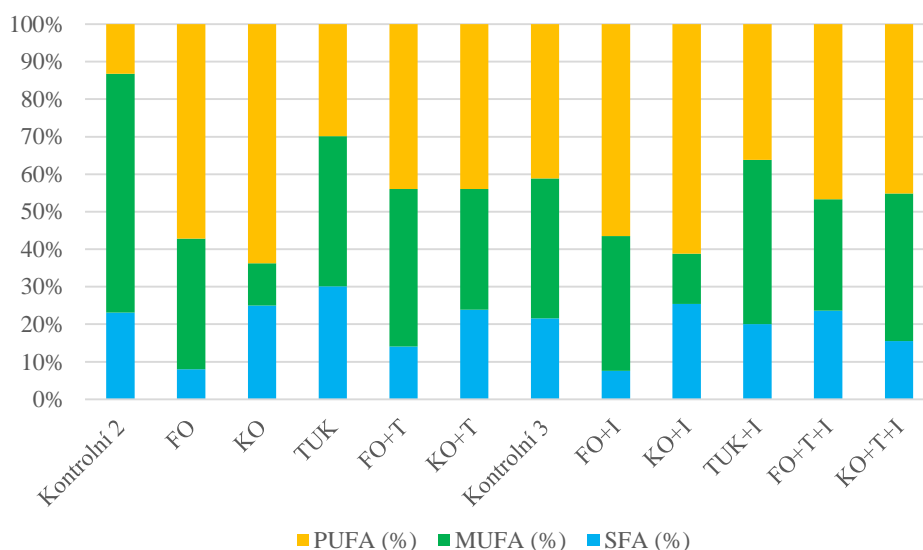


Graf 16: Produkce biomasy kmenem *Cystofilobasidium macerans* a procentuální zastoupení lipidů v biomase při využití produkčních médií s odpadními substráty bez glycerolu a s tukovou indukcí

U kmene *Cystofilobasidium macerans* pozorujeme při kultivaci na kontrolním glycerolovém médiu maximální zastoupení mononenasycených mastných kyselin (MUFA) v zastoupení kolem 60 % a celkové zastoupení UFA kolem 75 %. Z grafů (Graf 17 a 18) je zřejmé, že z kávového oleje kvasinky akumulují nejméně MUFA (11-17 %) a současně z něj dokážou naprodukovat nejvyšší hodnoty nasycených mastných kyselin (SFA), například při použití kávového oleje s vyšším přidavkem glycerolu bylo dosaženo nejvyšší hodnoty 31,8 %. Ke zvýšení obsahu polynenasycených mastných kyselin (PUFA) vede využití kávového oleje popřípadě fritovacího oleje bez přidavku glycerolu. Indukce lipázové aktivity lehce snižuje zastoupení PUFA asi o 1-3 %. Pro maximální zastoupení nenasycených mastných kyselin (UFA) je nejvhodnější použití fritovacího oleje jako substrátu. Maximální hodnoty bylo dosaženo za pomoci fritovacího oleje s indukcí a to 92,4 % UFA a bez indukce 92 %.



Graf 17: Složení lipidů v biomase při kultivacích kmene *Cystofilobasidium macerans* na médiích s odpadním substrátem s přidavkem glycerolu



Graf 18: Složení lipidů v biomase při kultivacích kmene *Cystofilobasidium macerans* na médiích s odpadním substrátem bez glycerolu a s tukovou indukcí

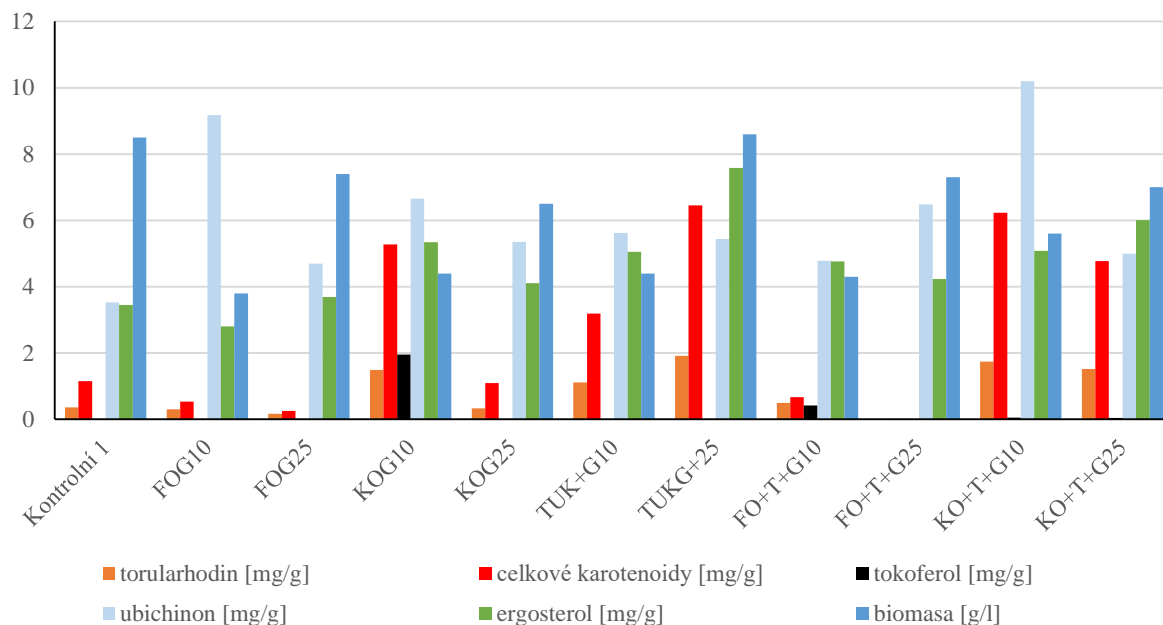
5.1.4 Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula mucilaginosa*



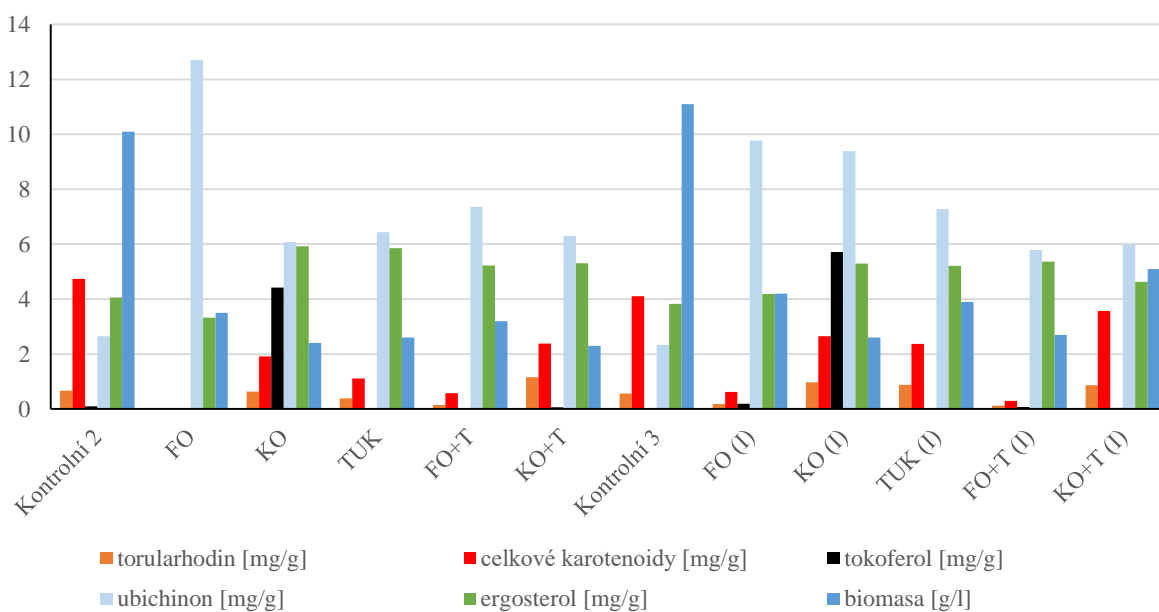
Obrázek 16: Kultivace kmene *Rhodotorula mucilaginosa* s využitím odpadních substrátů bez glycerolu

Jak je z grafů níže (Graf 19 a 20) patrné, odpadní lipidické látky nejsou vhodným substrátem pro kmen *Rhodotorula mucilaginosa* pro tvorbu karotenoidů, ale jsou vhodné k produkci lipidických látek tímto kmenem. Veškeré hodnoty produkce jsou uvedeny v příloze (Příloha 7 a 8). Nejvyšší hodnoty produkce biomasy byly zjištěny pro kultivace na kontrolním glycerolovém médiu (8,5-11,1 g/l). Při kultivacích s vyšším přídatkem glycerolu se hodnoty pohybují v rozmezí 6,5-8,6 g/l což činí přibližně 75 % oproti kontrolním médiím. Při použití čistě lipidických substrátů se hodnoty produkce biomasy snížily na 30 % vůči kontrolním médiím. Jak je patrné z obrázku (Obrázek 16) média bez přídavku glycerolu a bez použití indukce obsahovala málo karotenoidů a proto zbarvení není výrazné. Pro tvorbu vyšších hodnot celkových karotenoidů potřebovaly kvasinky přídavek glycerolu v produkčním médiu. K vhodnějším substrátům patřil odpadní živočišný tuk či kávový olej, popřípadě jejich směs. Nejlepším médiem pro tvorbu karotenoidů bylo médium s odpadním živočišným tukem s přídavkem glycerolu 25 %. Celkové karotenoidy dosáhly hodnoty produkce 6,45 mg/g, z nichž více jak 65 % tvořil lykopen (s nejvyšší hodnotou 4,37 mg/g) a téměř 30 % torularhodin se svou nejvyšší hodnotou produkce 1,92 mg/g. Velmi podobných výsledků bylo dosaženo při použití média se směsí kávového oleje s živočišným tukem s nižším přídatkem glycerolu (pokles celkových karotenoidů o téměř 5 %, lykopenu o 0,6 % a torularhodinu o 9 % oproti předchozímu médiu). Nejvyšší hodnoty betakarotenu bylo dosaženo při kultivaci na médiu s fritovacím olejem s tukovou indukcí, kdy produkce dosáhla hodnoty 0,22 mg/g, ale celkové karotenoidy dosáhly 10 % maximální hodnoty.

Odpadní lipidické substráty nejvíce podporují u kmene *Rhodotorula mucilaginosa* produkci ubichinonu. Několikanásobně vyšší produkce než na kontrolním médiu, bylo dosaženo při použití fritovacího oleje bez přídavku glycerolu 12,71 mg/g, při využití indukce lipázových aktivit u stejného substrátu produkce poklesla o téměř 25 % (9,77 mg/g), ale produkce ergosterolu naopak stoupla o 26 %. Pro produkci ergosterolu vyšla nejlépe média s odpadním živočišným tukem nebo jeho směsí. Nejvíce ergosterolu bylo vyprodukováno tímto kmenem při použití média s odpadním živočišným tukem s přídavkem glycerolu 25 % (7,59 mg/g), kdy došlo ke zdvojnásobení produkce na kontrolním glycerolovém médiu. Kmen *Rhodotorula mucilaginosa* je vhodný na akumulaci tokoferolu z odpadních lipidických látek. Nejvíce jej bylo akumulováno při využití kávového oleje s indukcí aktivity lipáz a to 5,71 mg/g, bez použití indukce hodnota klesla o 22 %. Jak je z výsledků v příloze patrné, je schopen jej akumulovat i z fritovacího oleje.

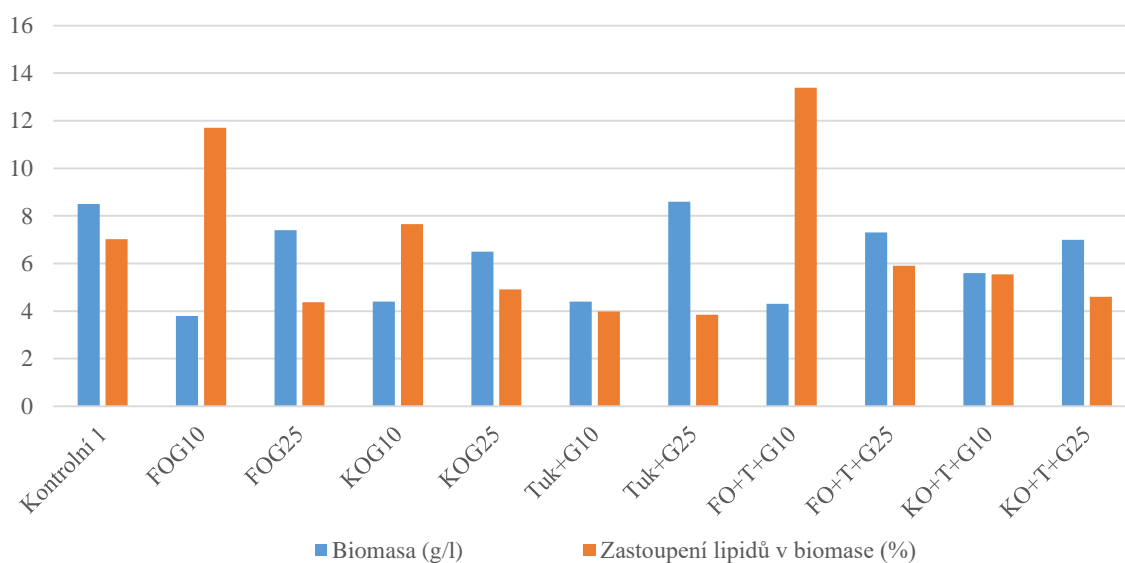


Graf 19: Graf produkce vybraných metabolitů pro kmen *Rhodotorula mucilaginosa* na médiích s odpadními substráty s přidavkem glycerolu.

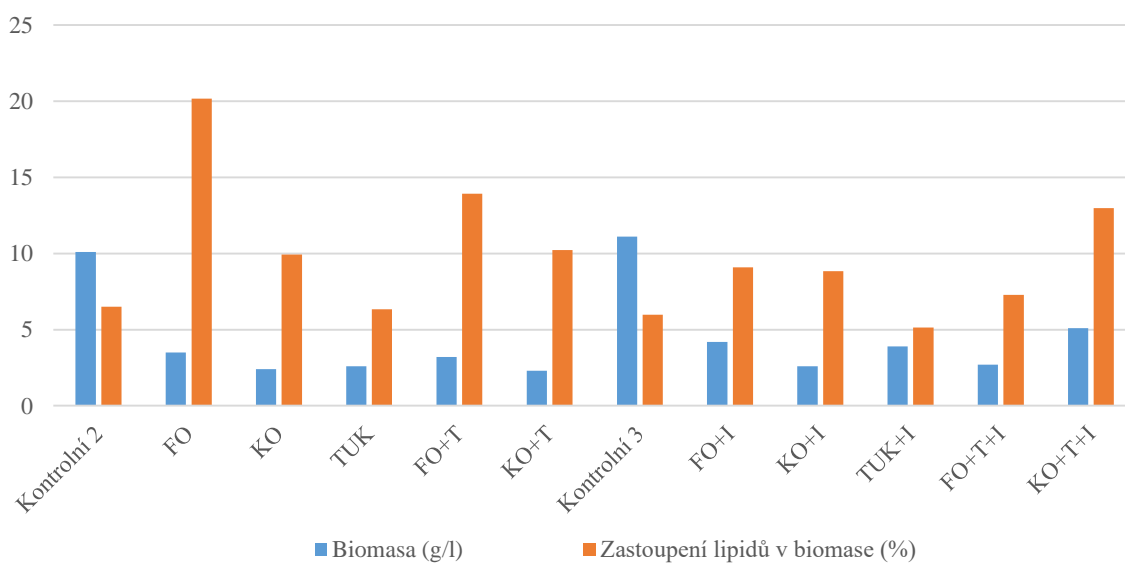


Graf 20: Graf produkce vybraných metabolitů pro kmen *Rhodotorula mucilaginosa* na médiích s odpadními substráty bez glycerolu a s tukovou indukcí

Biomasa kmene *Rhodotorula mucilaginosa* obecně obsahovala velmi málo lipidů. U kontrolních glycerolových médií se hodnota pohybovala kolem 6-7 %. Nejvhodnějším odpadním lipidickým substrátem pro zvýšení zastoupení lipidů v biomase byl fritovací olej. Nejvyšší hodnoty (20,2 %) bylo dosaženo při kultivaci na médiu s fritovacím olejem bez přidavku glycerolu a bez indukce. Při stejném typu kultivace jen se směsí fritovacího oleje a živočišného tuku pokleslo zastoupení lipidů o 6 %. Při využití indukce lipázové aktivity došlo ke snížení hodnot na polovinu. Pro kmen *Rhodotorula mucilaginosa* nejsou odpadní lipidické substráty vhodné pro růst biomasy. V grafech níže (Graf 21 a 22) lze pozorovat, že nejvyšších hodnot produkce biomasy bylo dosaženo na kontrolních glycerolových médiích. Z médií s odpadním lipidickým substrátem vyšly nejlépe média s vyšším přidavkem glycerolu, nejlépe médium s odpadním živočišným tukem (8,6 g/l). Při použití čistě odpadních substrátů klesla produkce biomasy na třetinu.

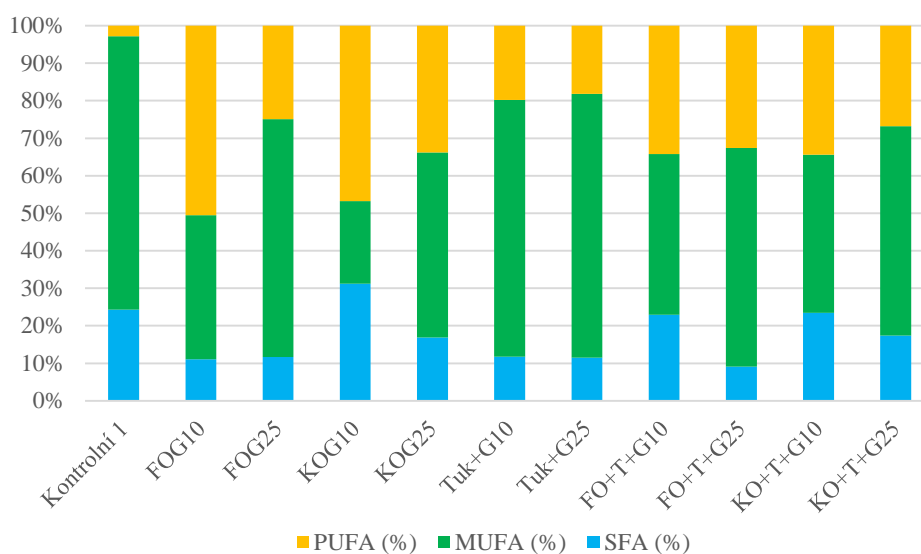


Graf 21: Produkce biomasy kmenem *Rhodotorula mucilaginosa* a procentuální zastoupení lipidů v biomase při využití produkčních médií s odpadními substráty a glycerolem.

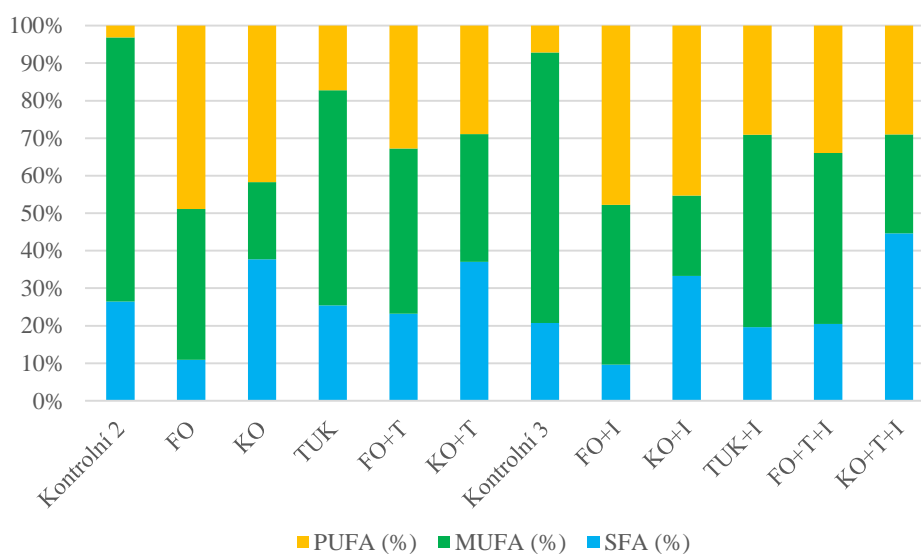


Graf 22: Produkce biomasy kmenem *Rhodotorula mucilaginosa* a procentuální zastoupení lipidů v biomase při využití produkčních médií s odpadními substráty bez glycerolu a s tukovou indukcí

Z grafů s profily obsahu mastných kyselin (Graf 23 a 24) je patrné, že pro kmen *Rhodotorula mucilaginosa* je nejvhodnější substrát pro akumulaci nenasycených mastných kyselin (SFA) kávový olej, popřípadě jeho směs s odpadním živočišným tukem. Maximální hodnoty 44,7 % bylo dosaženo při využití média s jejich směsí za použití tukové indukce. Fritovací olej a média s přídavkem glycerolu nejsou pro navýšení SFA vhodné. Po kultivacích na kontrolních glycerolových médiích biomasa obsahoval z více jak 70 % mononenasycených mastných kyselin (MUFA). Z odpadních substrátů je pro zvýšení hodnot MUFA v biomase nejvhodnější odpadní živočišný tuk. Při použití odpadního živočišného tuku s vyšším přídavkem glycerolu bylo dosaženo 70 % MUFA. Zastoupení polynenasycených mastných kyselin (PUFA) bylo naopak nejnižší u kontrolních médií (3-7 %). Nejvyšší hodnoty obsahu polynenasycených mastných kyselin byly dosaženy pomocí kultivací s využitím fritovacího oleje (47-50,5 % PUFA). Pro celkově nejvyšší obsah nenasycených mastných kyselin je tedy nejvhodnější u kmene *Rhodotorula mucilaginosa* zvolit směs fritovacího oleje s odpadním živočišným tukem s vyšším přídavkem glycerolu.



Graf 23: Složení lipidů v biomase při kultivacích kmene *Rhodotorula mucilaginosa* na médiích s odpadním substrátem s přídavkem glycerolu



Graf 24: Složení lipidů v biomase při kultivacích kmene *Rhodotorula mucilaginosa* na médiích s odpadním substrátem bez glycerolu a s tukovou indukci

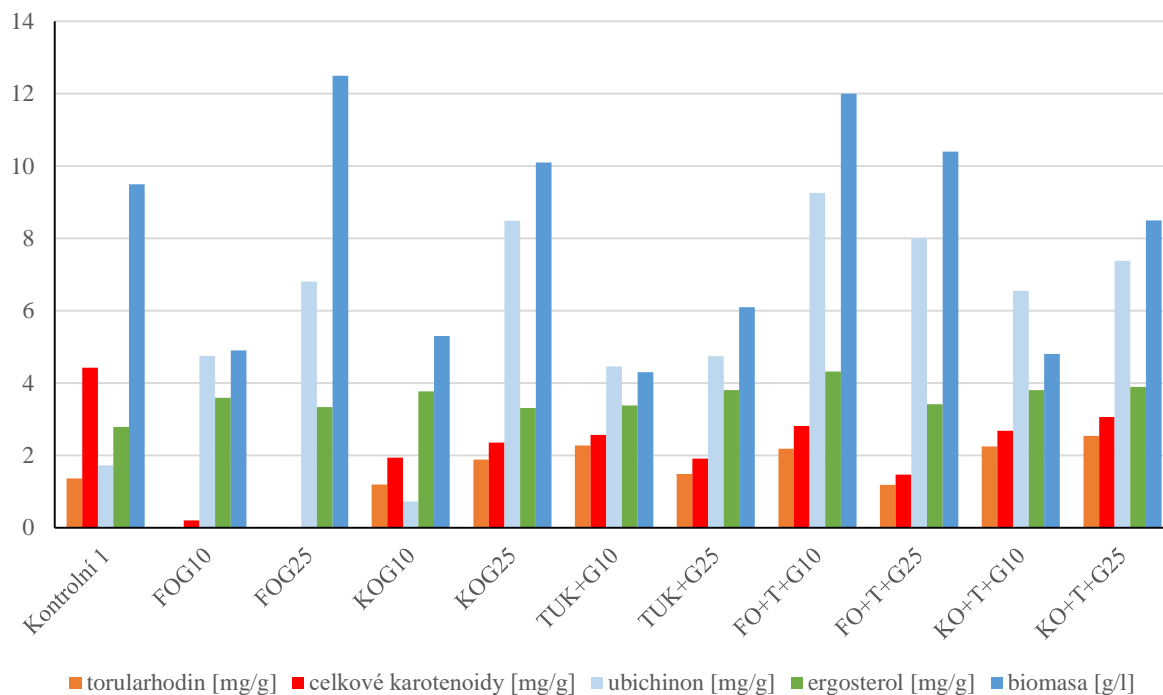
5.1.5 Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula kratochvilovae*



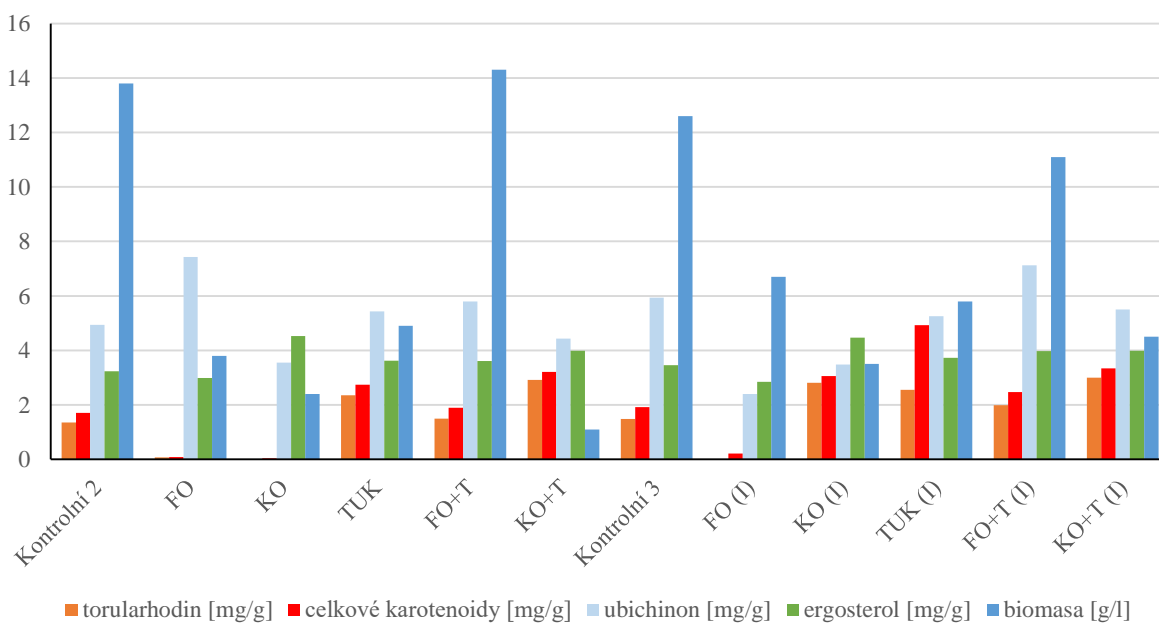
Obrázek 17: Kultivace kmene *Rhodotorula kratochvilovae* s využitím odpadních substrátů bez přidavku glycerolu a bez použití tukové indukce

Pro kmen *Rhodotorula kratochvilovae* byla pro produkci biomasy velice vhodná kontrolní glycerolová média, z odpadních substrátů byl nejvhodnější fritovací olej, popřípadě jeho směs s odpadním živočišným tukem. Jak už je patrné ze zabarvení kultur na obrázku (Obrázek 17) média bez glycerolu a bez využití tukové indukce nejsou pro tento kmen vhodná pro produkci karotenoidů. Veškeré hodnoty jsou uvedeny v příloze (Příloha 9 a 10). Samotný živočišný tuk kvůli svému pevnému skupenství je hůře užitelný. Nejvyšší hodnoty produkce biomasy (14,3 g/l) bylo dosaženo za využití média se směsí fritovacího oleje a odpadního živočišného tuku bez přidavku glycerolu a bez indukce. Z grafů (Graf 25 a 26) byla pro produkci karotenoidů nejvhodnější média s obsahem odpadního živočišného tuku. Nejvyšší produkce karotenoidů byla dosažena při kultivaci na médiu s odpadním živočišným tukem s indukcí aktivity lipáz a to 4,93 mg/g, s jedněmi z nejvyšších produkcí torularhodinu (2,56 mg/g), který tvořil 52 % z celkových karotenoidů, dále lykopenu (2,15 mg/g) a torulenu (0,14 mg/g). O 15 % vyšší produkce torularhodinu byla na médiu s kávovým olejem ve směsi s živočišným tukem s indukcí, ale současně produkce celkových karotenoidů byla o 32 % menší.

Celkově je pro tvorbu torularhodinu kmenem *Rhodotorula kratochvilovae* nejvhodnějším substrátem směs kávového oleje s živočišným tukem. Pro tvorbu lykopenu jsou nejvhodnější média s obsahem živočišného tuku. O přibližně 20 % větší byla produkce betakarotenu na médiu s kávovým olejem ve směsi s živočišným tukem s přidavkem glycerolu 25 % oproti kontrolním glycerolovým médiím. Vysoké produkce ergosterolu byly při kultivaci kmene *Rhodotorula kratochvilovae* při využití kávového oleje nebo jeho směsi s odpadním tukem. Nejvyšší hodnota byla dosažena na médiu s kávovým olejem bez indukce lipázové aktivity 4,53 mg/g a o 1,5 % méně (4,46 mg/g) s indukcí. Oproti kontrolním médiím jde o nárůst o více jak 50 %. Pro produkci ubichinonu byla nejvhodnější média s přidavkem glycerolu. Hodnoty 9,26 mg/g bylo dosaženo kultivací se směsí fritovacího oleje a živočišného tuku s přidavkem 10 % glycerolu, což je o více jak 80 % lepší výtěžek než u kontrolního glycerolového média. I kvasinky tohoto kmene jsou schopné akumulovat tokoferol z kávového oleje. Nejlepší výsledek byl získán při využití kávového oleje bez glycerolu a indukce 0,56 mg/g. Tento kmen jej dobře akumuluje i z fritovacího oleje, při stejném typu kultivace bylo dosaženo 0,46 mg/g, což je jen o 20 % méně než z kávového oleje, kdežto s použitím indukce u kávového oleje byla hodnota menší o 32 % (0,38 mg/g).

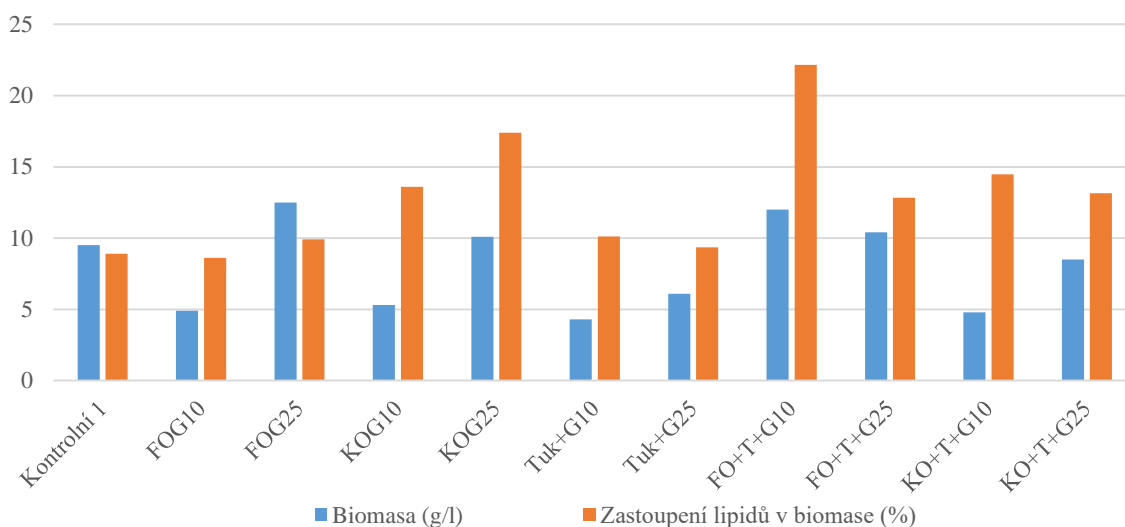


Graf 25: Graf produkce vybraných metabolitů pro kmen *Rhodotorula kratochvilovae* na médiích s odpadními substráty s přidavkem glycerolu.

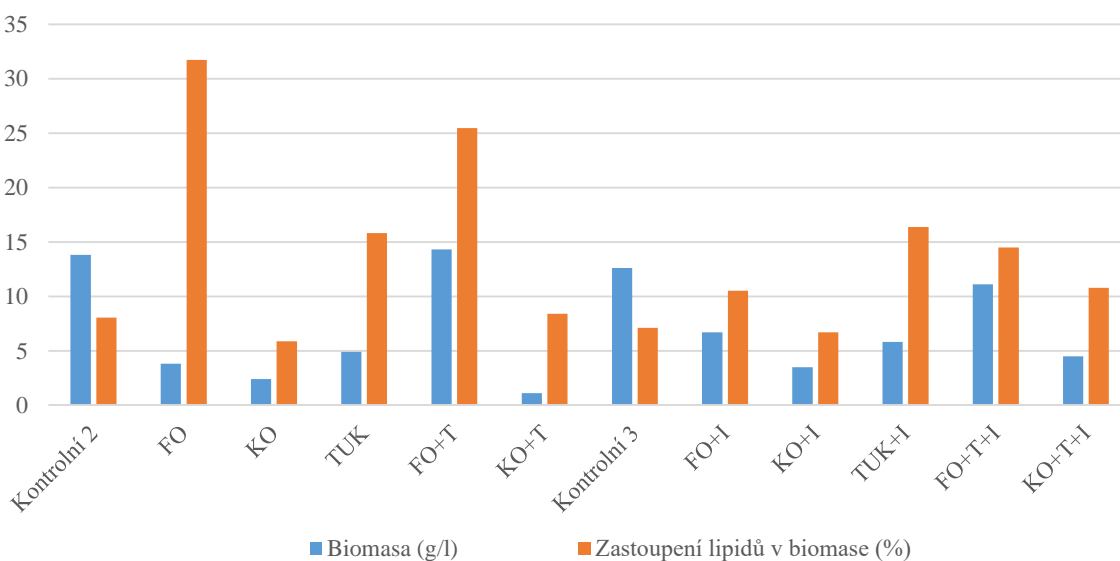


Graf 26: Graf produkce vybraných metabolitů pro kmen *Rhodotorula kratochvilovae* na médiích s odpadními substráty bez glycerolu a s tukovou indukcí

Z výsledků v grafech níže (Graf 27 a 28) je patrné, že kmen *Rhodotorula kratochvilovae* vykazuje nejlepší růstové schopnosti na médiích se směsí fritovacího oleje a odpadního živočišného tuku. Živočišný tuk samotný je kvůli svému pevnému skupenství a malé aktivní ploše nejhůře zpracovatelný, ale po vytvoření kapalné směsi s fritovacím olejem je mnohem lépe utilizovatelný. Při použití média s touto směsí bez přídavku glycerolu a bez tukové indukce bylo dosaženo produkce biomasy 14,3 g/l, při použití tukové indukce aktivity lipáz došlo k poklesu produkce o 22 %. Odpadní lipidické látky jsou u kmene *Rhodotorula kratochvilovae* vhodné pro zvýšení zastoupení lipidů v biomase. Nejlépe vyšla média s fritovacím olejem, odpadním živočišným tukem a jejich směsí. Nejvyššího zastoupení bylo dosaženo při kultivaci na médiu s fritovacím olejem bez indukce (31,7 %), což je přibližně čtyřnásobek hodnoty jako u produkčních médií. Při použití indukce se zastoupení lipidů snížilo téměř na hodnotu získanou při kultivacích na kontrolních médiích. Použití médií s kávovým olejem bez přídavku glycerolu vedlo ke snížení obsahu lipidů v biomase.

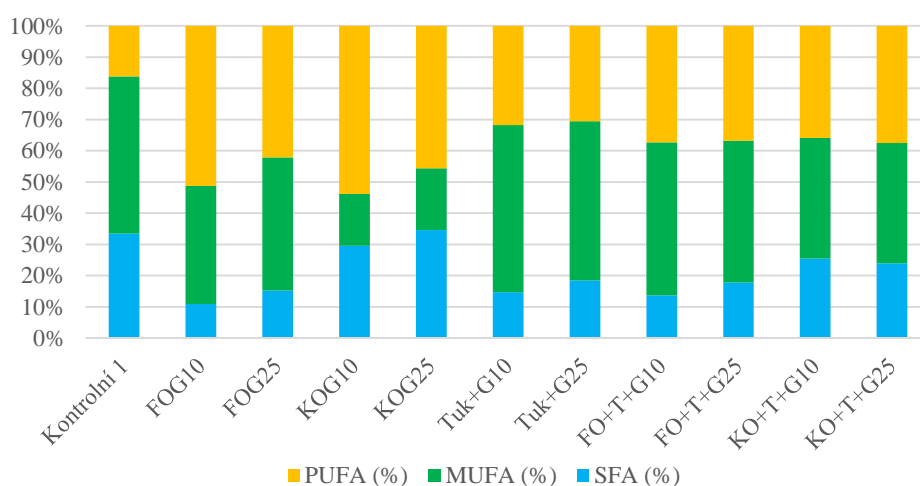


Graf 27: Produkce biomasy kmenem *Rhodotorula kratochvilovae* a procentuální zastoupení lipidů v biomase při využití produkčních médií s odpadními substráty a glycerolem.

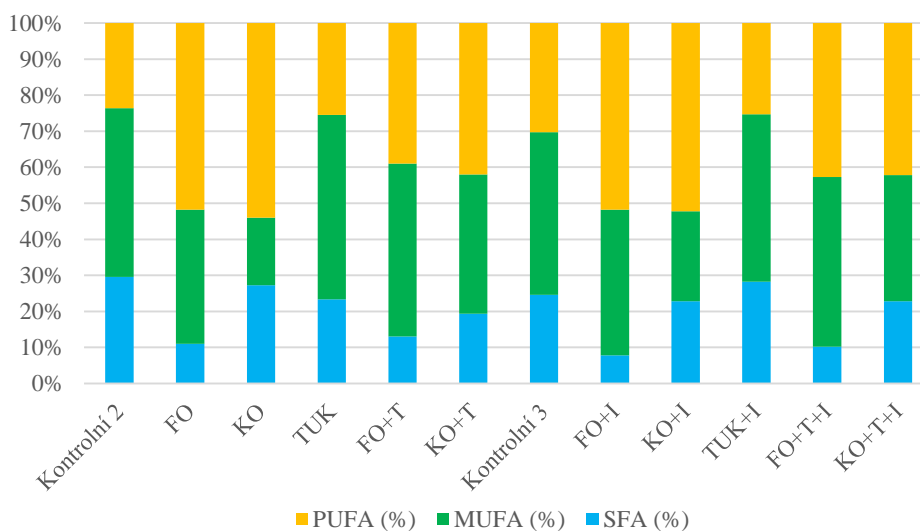


Graf 28: Produkce biomasy kmenem *Rhodotorula kratochvilovae* a procentuální zastoupení lipidů v biomase při využití produkčních médií s odpadními substráty bez glycerolu a s tukovou indukcí

Z profilu mastných kyselin uvedených v grafech níže (Graf 29 a 30) je u kmene *Rhodotorula kratochvilovae* nejvhodnější substrát pro akumulaci polynenasycených mastných kyselin (PUFA) kávový olej popřípadě fritovací olej. Při jeho použití, bez přídavku glycerolu a bez použití tukové indukce, dosáhlo jejich zastoupení 54 %. Využitím indukce se zastoupení PUFA v biomase snížilo o necelá 2 % a při použití s menším přídavkem glycerolu dokonce jen o 0,2 %. Biomasa získaná při kultivacích na kávovém oleji dosahovala podobných hodnot. Nejvyšších zastoupení mononenasycených mastných kyselin (MUFA) bylo získáno z kultivací na kontrolních glycerolových médiích a na médiích s přídavkem glycerolu. Z odpadních substrátů zvyšuje zastoupení MUFA odpadní živočišný tuk. Nejvyššího zastoupení bylo dosaženo při kultivaci na médiu s živočišným tukem s menším přídavkem glycerolu (53,5 %), při vyšším přídavku se zastoupení snížilo o 2,5 % a podobného výsledku bylo dosaženo i při využití samotného tuku. Celkové zastoupení UFA bylo nejvyšší při využití indukce u kultivace s fritovacím olejem (92,18 %) a se směsí fritovacího oleje a živočišného tuku (89,78 %). Nasycené mastné kyseliny (SFA) se nejlépe akumulují z kávového oleje, při využití vyššího přídavku glycerolu bylo dosaženo hodnoty 34,6 %, u nižšího přídavku glycerolu kleslo zastoupení SFA o 5 %. Použití fritovacího oleje jako substrátu má opačný efekt. Výsledky ukazují, že při použití fritovacího oleje biomasa obsahuje nejméně SFA (8-15 %).



Graf 29: Složení lipidů v biomase při kultivacích kmene *Rhodotorula kratochvilovae* na médiích s odpadním substrátem s přídavkem glycerolu



Graf 30: Složení lipidů v biomase při kultivacích kmene *Rhodotorula kratochvilovae* na médiích s odpadním substrátem bez glycerolu a s tukovou indukcí

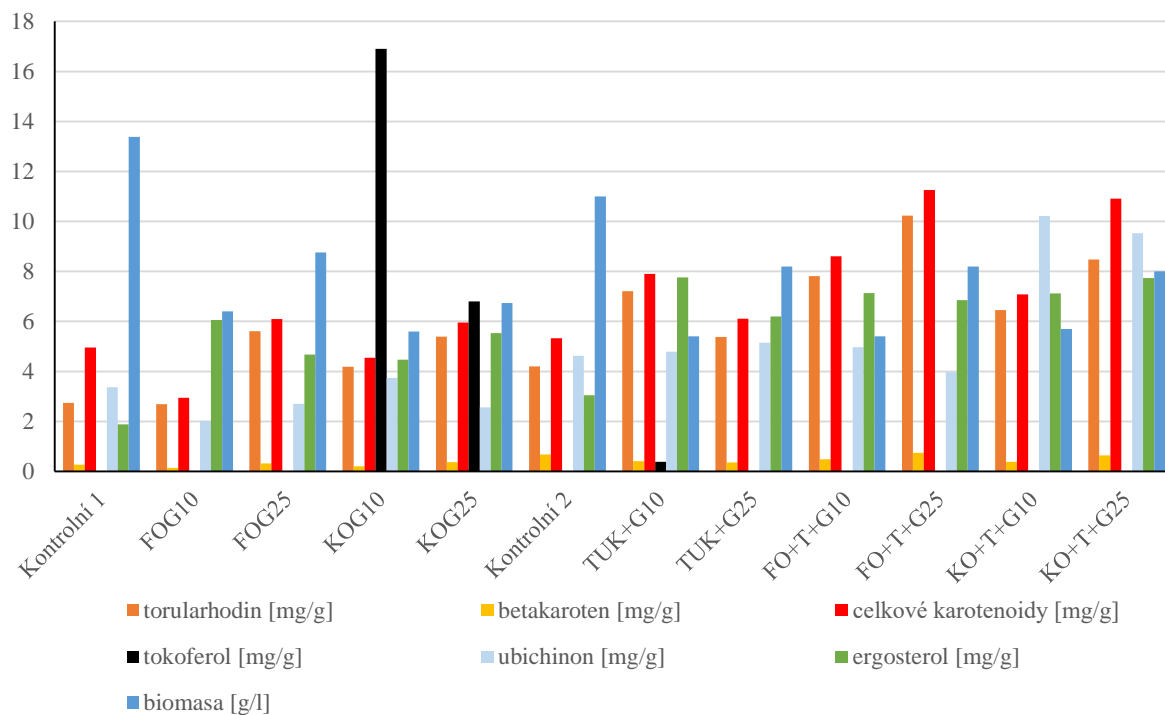
5.1.6 Produkční vlastnosti kmene *Rhodosporidium toruloides*



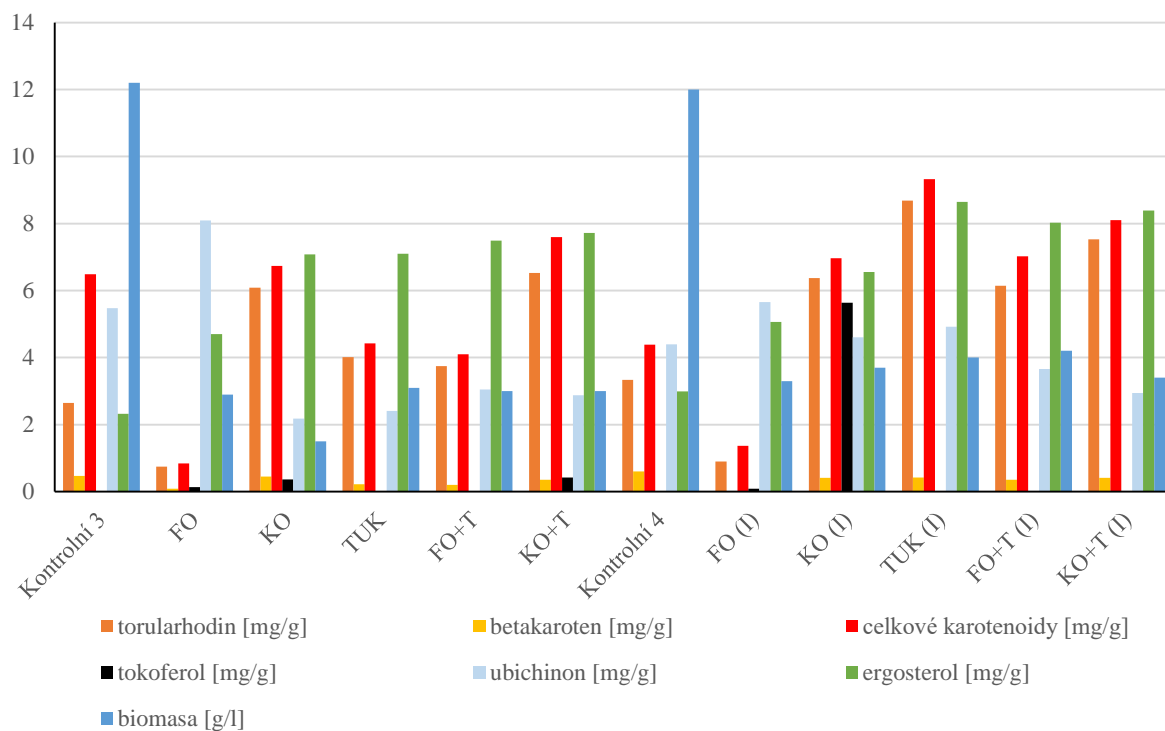
Obrázek 18: Kultivace kmene *Rhodosporidium toruloides* s využitím odpadních substrátů s přidavkem glycerolu

Kmen *Rhodosporidium toruloides* vykazoval výbornou schopnost využít odpadní lipidické substráty s vysokou produkcí karotenoidů i lipidických látek. (Příloha 11 a 12). Kultury dosahovaly sytě červených zbarvení (Obrázek 18). Nejvyšší produkce biomasy vykazovaly kultury za použití kontrolních glycerolových médií (v průměru 12,15 g/l). Z grafů (Graf 31 a 32) byla produkce biomasy nejvyšší na médiu s fritovacím olejem s přidavkem glycerolu 25 % s hodnotou 8,76 g/l, což je téměř o 30 % méně, než je průměr kontrolních glycerolových médií. Pro produkci karotenoidů kmenem *Rhodosporidium toruloides* bylo nejvhodnější médium se směsí fritovacího oleje s živočišným tukem a přidavkem glycerolu 25 %. Hodnota celkových karotenoidů se díky nejvyššímu obsahu betakarotenu (0,75 mg/g) a torularhodinu (10,23 mg/g), který tvořil 91 %, vyšplhala na 11,26 mg/g. Vhodným médiem s vysokými hodnotami produkce betakarotenu (0,64 mg/g), lykopenu (1,58 mg/g) a torularhodinu (8,48 mg/g) bylo i médium se směsí kávového oleje s živočišným tukem s přidavkem glycerolu 25 %, kde bylo dosaženo druhé nejvyšší hodnoty produkce karotenoidů s hodnotou 10,91 mg/g (pokles o 3 %).

Živočišný tuk i přes své pevné skupenství je výborným substrátem pro tento kmen, jelikož z grafů (Graf 32) je patrné, že bez přidavku glycerolu je nejvyšší produkce karotenoidů právě na médiu s odpadním živočišným tukem s indukcí aktivity lipáz (9,32 mg/g), což je pokles asi o 17 % oproti maximu. Na tomto médiu byla zjištěna o 15 % menší produkce torularhodinu oproti nejvyšší hodnotě. Odpadní živočišný tuk je také velice vhodný při produkci ergosterolu, kdy při jeho použití v jakékoliv kombinaci bylo dosahováno hodnot minimálně 7 mg/g. Nejvyšší produkce ergosterolu byla kmenem *Rhodosporidium toruloides* dosažena při kultivaci s odpadním živočišným tukem s využitím indukce (8,64 mg/g). Při stejném typu kultivace (s indukcí) byl ve směsi živočišného tuku s fritovacím olejem rozdíl v produkci ergosterolu 9,3 % a při použití směsi s kávovým olejem pouze 3 %. Produkce ubichinonu byla nejvyšší při využití směsi kávového oleje s živočišným tukem s přidavkem glycerolu. Při přidavku 10 % glycerolu dosáhl ubichinon nejvyšší hodnoty a to 10,22 mg/g a při vyšším přidavku glycerolu jen o 7 % menší (9,53 mg/g). Kmen *Rhodosporidium toruloides* vykazoval výbornou schopnost akumulovat tokoferol z médií s kávovým olejem. Při kultivaci na médiu s kávovým olejem s přidavkem glycerolu 10 % bylo dosaženo hodnoty tokoferolu 16,9 mg/g, při přidavku 25 % glycerolu nastal pokles o téměř 60 % (6,8 mg/g) a při využití indukce a následného využití kávového oleje dokonce více než 65 % (5,64 mg/g).

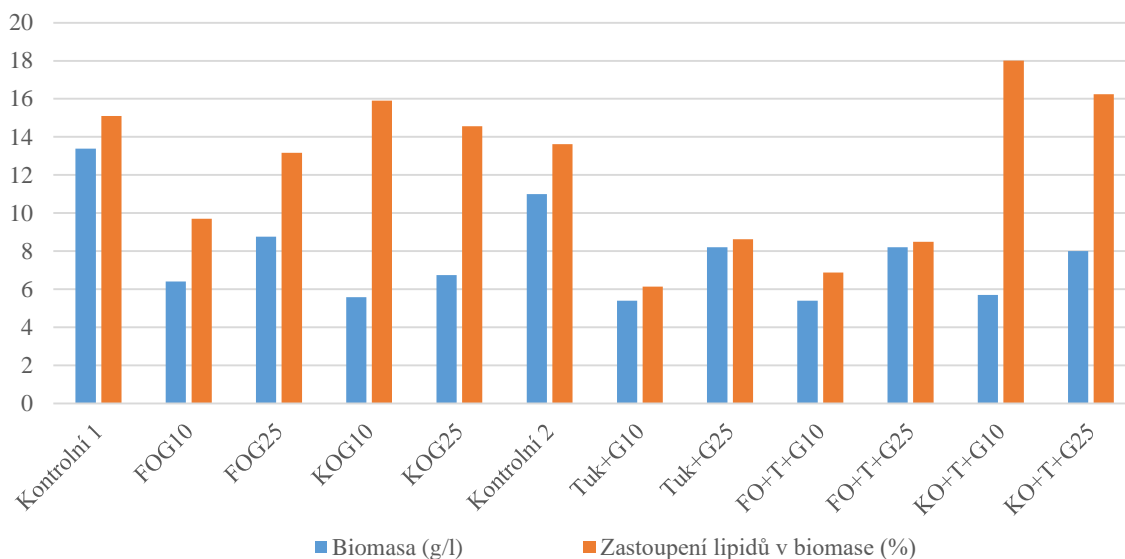


Graf 31: Graf produkce vybraných metabolitů pro kmen *Rhodosporidium toruloides* na médiích s odpadními substráty s přidavkem glycerolu.

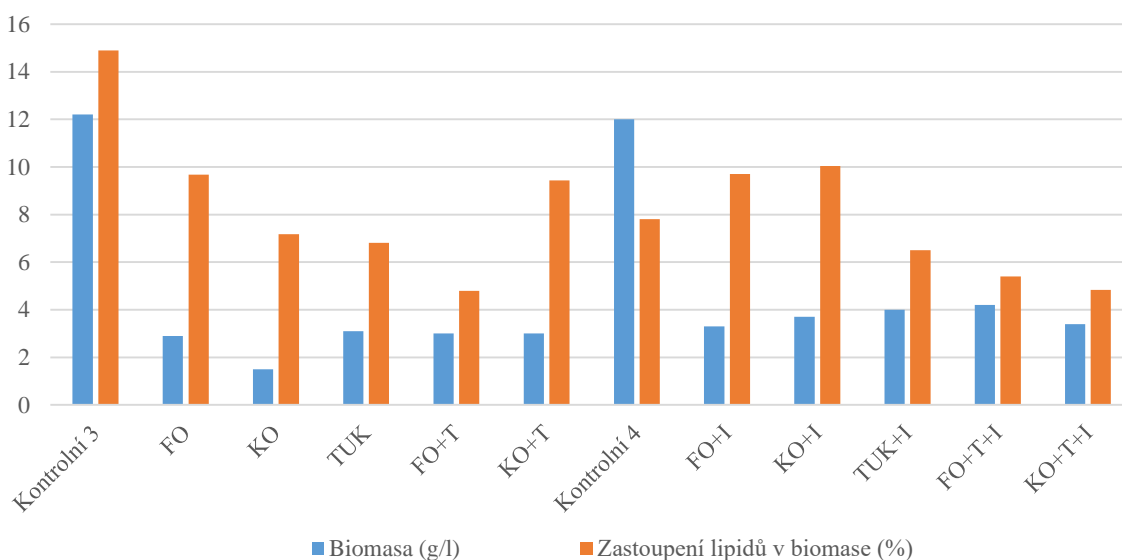


Graf 32: Graf produkce vybraných metabolitů pro kmen *Rhodosporidium toruloides* na médiích s odpadními substráty bez glycerolu a s tukovou indukcí

Z výsledků GC analýzy (Graf 33 a 34) je patrné, že využití odpadních lipidických substrátů není pro kmen vhodné pro zvýšení produkce biomasy ani pro zvýšení obsahu lipidů v biomase. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo na kontrolních glycerolových médiích. Z médií s obsahem odpadních substrátů vyšla nejlépe média s vyšším přidavkem glycerolu. Zastoupení lipidů v biomase je také vyšší spíše u médií s přidavkem glycerolu. Dobrým substrátem se zdá být kávový olej. Při jeho použití ve směsi s odpadním živočišným tukem a menším přidavkem glycerolu bylo dosaženo nejvyšší hodnoty pro obsah lipidů v biomase (18 %). Při použití vyššího přidavku glycerolu u stejného substrátu byl zaznamenán pokles o 1,8 %. Při kultivacích pouze s odpadními substráty se obsah lipidů pohyboval v rozmezí 4,5-10 %. Nejvyšší hodnoty bylo dosaženo při využití indukce aktivity lipáz při použití kávového oleje (10,04 %), bez indukce došlo k poklesu o necelá 3 %.

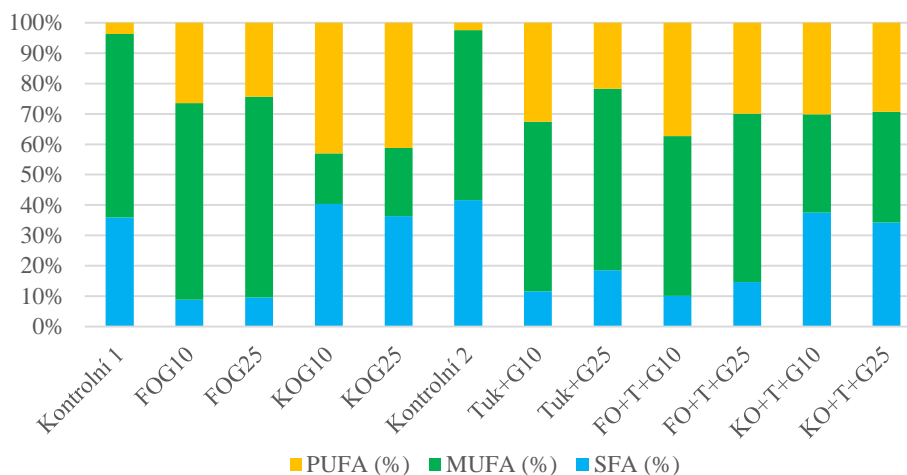


Graf 33: Produkce biomasy kmenem *Rhodospiridium toruloides* a procentuální zastoupení lipidů v biomase při využití produkčních médií s odpadními substráty a glycerolem.



Graf 34: Produkce biomasy kmenem *Rhodospiridium toruloides* a procentuální zastoupení lipidů v biomase při využití produkčních médií s odpadními substráty bez glycerolu a s tukovou indukcí

Profily mastných kyselin při kultivacích s kmenem *Rhodosporidium toruloides* jsou uvedeny v grafech níže (Graf 35 a 36). Typ použitého substrátu silně ovlivňuje profil mastných kyselin. Je patrné, že při využití kontrolních médií je zastoupení polynenasycených mastných kyselin (PUFA) nejnižší. Pro produkci PUFA je nejvhodnější kávový olej, popřípadě fritovací olej. Nejvyšší hodnoty zastoupení PUFA dosáhl kmen za použití kávového oleje bez tukové indukce lipáz (54,9 %) a následně při využití fritovacího oleje s indukcí lipázové aktivity (50,9 %). Pro akumulaci mononenasycených mastných kyselin jsou nejvhodnější média s fritovacím olejem či s odpadním živočišným tukem nebo jejich směsí. Hodnoty 66 % MUFA bylo dosaženo při kultivaci s fritovacím olejem a vyšším přídatkem glycerolu a s nižším přídatkem bylo dosaženo hodnoty 64,6 %. Při stejném typu kultivace (s přídatky glycerolu) s využitím odpadního živočišného tuku a jeho směsi s fritovacím olejem bylo dosaženo hodnot v rozmezí 52-60 %, u kávového oleje dochází k výraznému snížení na 16,7 a 22,5 %. Volba kávového oleje je vhodná, pokud chceme docílit vysokého zastoupení nasycených mastných kyselin (SFA). Při použití kávového oleje bylo dosaženo podobných hodnot jako u kontrolních médií. Nejvyšší hodnoty SFA při použití odpadního substrátu bylo dosaženo při kultivaci na médiu s kávovým olejem a nižším přídatkem glycerolu (40,3 %). Pro dosažení co nejvyšších hodnot obsahu celkových nenasycených mastných kyselin (UFA) jsou vhodná média s fritovacím olejem. S využitím indukce bylo dosaženo hodnoty 93,6 % a při použití směsi s odpadním živočišným tukem 91,6 %.



Graf 35: Složení lipidů v biomase při kultivacích kmene *Rhodosporidium toruloides* na médiích s odpadním substrátem s přídatkem glycerolu



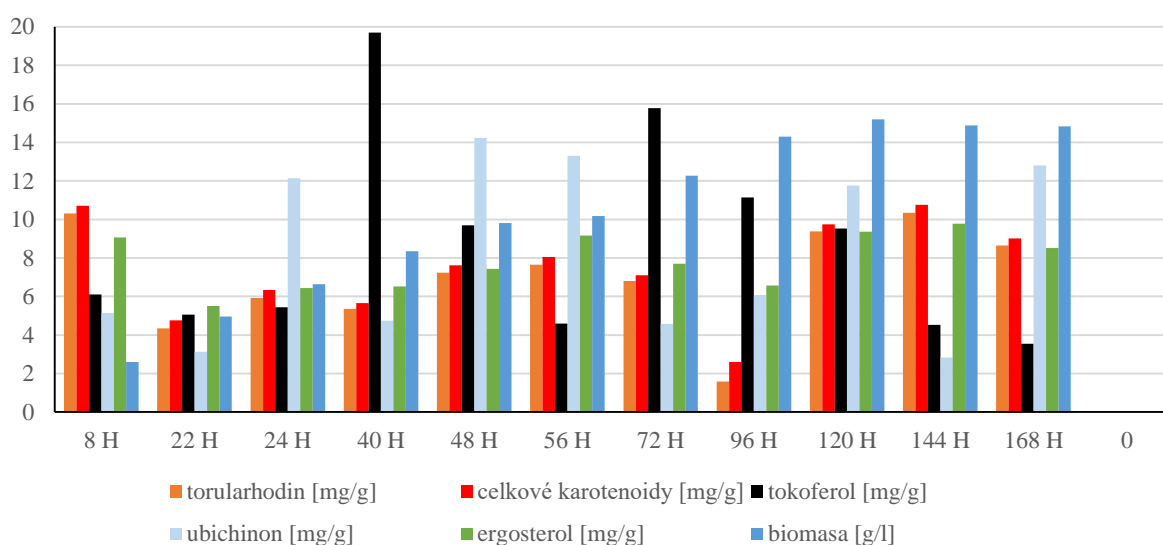
Graf 36: Složení lipidů v biomase při kultivacích kmene *Rhodosporidium toruloides* na médiích s odpadním substrátem bez glycerolu a s tukovou indukcí

5.2 Stanovení produkčních vlastností biomasy u fermentorové kultivace

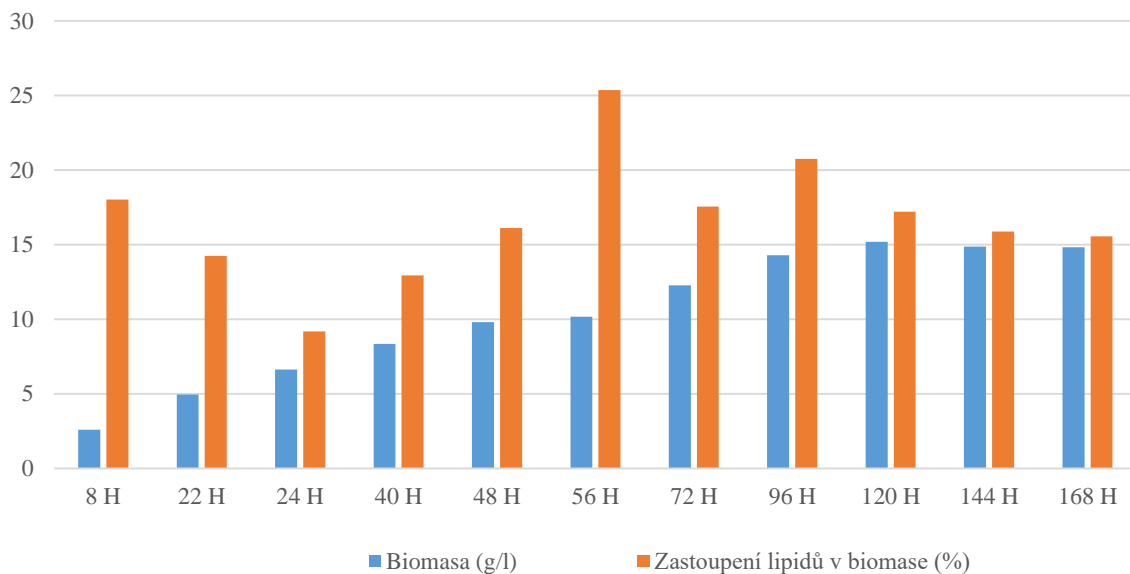
5.2.1 Fermentorová kultivace kmene *Rhodosporidium toruloides*

V návaznosti na předchozí práce byla provedena fermentorová kultivace s kmenem *Rhodosporidium toruloides* s použitím kávového oleje s kávovým hydrolyzátem jako substrátem. [35] Kultivace probíhala 7 dní v sedmilitrovém fermentoru.

Z grafu (Graf 37) byla vypořizována narůstající koncentrace biomasy v čase. Veškeré hodnoty produkci jsou uvedeny v příloze (Příloha 13). Maximální hodnoty produkce biomasy (15,2 g/l) bylo dosaženo ve 120. hodině, poté došlo k mírnému poklesu nejspíše z důvodu stárnutí buněk. V 8. hodině byl obsah celkových karotenoidů vysoký (10,71 mg/g). Poté došlo k velkému poklesu a k postupnému nárůstu. Maxima bylo dosaženo při odběru v 144. hodině s hodnotou podobnou 8. hodině 10,76 mg/g. Ve 144. hodině bylo také dosaženo maximálního obsahu betakarotenu (0,26 mg/g) a torularhodinu s hodnotou 10,35 mg/g. Torulen, jako prekurzor pro syntézu torularhodinu dosáhl svého maxima jako jediný už v 24. hodině (0,15 mg/g). V 8. hodině dosáhl ergosterol hodnoty 9,06 mg/g, jeho obsah se pak snížil téměř na polovinu a v dalších hodinách došlo k jeho nárůstu. Maxima dosáhl ve 144. hodině s hodnotou (9,78 mg/g). Ubichinon dosáhl svého maxima už v 48. hodině (14,22 mg/g) a pak jeho koncentrace klesala a znovu stoupala. Při posledním odběru jeho koncentrace činila 12,81 mg/g. Jelikož byl jako substrát využit kávový olej, docházelo kmenem *Rhodosporidium toruloides* k akumulaci tokoferolu obsaženého v oleji. Nejvyšší hodnoty 19,71 mg/g bylo dosaženo v 40. hodině, poté koncentrace klesala a v 72. hodině bylo dosaženo druhé nejvyšší hodnoty 15,78 mg/g.

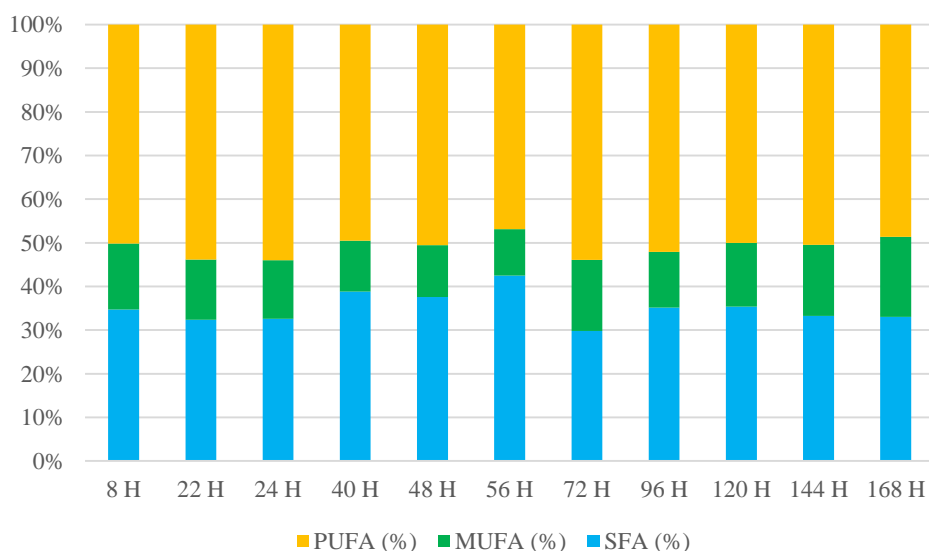


Graf 37: Produkce sledovaných metabolitů při kultivaci kmene *Rhodosporidium toruloides* ve fermentoru



Graf 38: Produkce biomasy a procentuální zastoupení lipidů při kultivaci kmene *Rhodosporidium toruloides* ve fermentoru

V grafu výše (Graf 38) vidíme, že na počátku kultivace došlo k naakumulování lipidů v biomase, následoval pokles do 24. hodiny a nárůst až do maxima v 56. hodině (25,4 %). Poté následoval pokles a následné ustálení kolem 15 %. V grafu níže (Graf 39) je zobrazeno rozložení zastoupení jednotlivých skupin mastných kyselin. Směs kávového oleje s kávovým hydrolyzátem vedla k vysoké akumulaci polynenasycených mastných kyselin a nasycených mastných kyselin. Zastoupení SFA se pohybovalo okolo 30-35 %, ve 40. až 56. hodině došlo k nárůstu na 37,5-42,5 %. Mononenasycené mastné kyseliny se pohybovaly v rozmezí 10-18 %, a svého maxima dosáhly při posledním odběru v 168. hodině s hodnotou 18,3 %. Nejvyššího zastoupení dosahovaly polynenasycené mastné kyseliny, ty byly přítomny v rozmezí 47-54 %. Svého maxima (53,9 %) dosáhly ve 24. hodině, následovaly opakované poklesy a nárůsty a v posledním odběru bylo jejich zastoupení 48,6 %.



Graf 39: Složení lipidů při kultivaci kmene *Rhodosporidium toruloides* ve fermentoru

6 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na studium produkce biomasy a vybraných metabolitů kmeny karotenogenních kvasinek na médiích s glycerolem a odpadními produkty potravinářského průmyslu.

Většina kmenů vykazovala nejvyšší produkce biomasy na kontrolních glycerolových médiích, a to díky jednoduchému metabolismu zpracování glycerolu. Na odpadních substrátech většinou produkce biomasy klesala. Vysoká produkce na čistě odpadním médiu byla u kmene *Rhodotorula mucilaginosa* při využití směsi fritovacího oleje a odpadního živočišného tuku bez použití tukové indukce v inokulech (hodnota uvedena v Příloze 7). *Sporidiobolus pararoseus* vykazoval výrazné zvýšení produkce biomasy při kultivacích na odpadních substrátech, při použití tukové indukce aktivity lipáz došlo k ještě většímu zvýšení (hodnoty uvedeny v kapitole 5.1.1 a v Příloze 1). Pro tvorbu biomasy byl nejvhodnější fritovací olej, popřípadě jeho směs s odpadním živočišným tukem.

Odpadní substráty ve většině případů snižují produkci betakarotenu, pro jeho produkci jsou nejvhodnější glycerolová média. Kmen *Sporidiobolus metaroseus* je schopný dosahovat stejných či velice podobných hodnot produkce betakarotenu (Příloha 3), pokud je v inokulačních médiích použita indukce aktivity lipáz. Buňky si tak v inokulačních médiích s přídavkem fritovacího oleje připraví enzymatický aparát pro zpracování lipidů. S využitím odpadního živočišného tuku či jeho směsí (pouze za přídavku glycerolu) je možné dosáhnout hodnot produkce podobných jako s využitím kontrolního glycerolového média u kmene *Rhodospiridium toruloides* (hodnoty uvedeny v Příloze 11).

Vhodné jsou naopak odpadní substráty (hlavně odpadní živočišný tuk) pro produkci torularhodinu. S výjimkou *Sporidiobolus pararoseus* dochází až k několikanásobnému zvýšení produkce. Nejlepších výsledků bylo dosaženo kmenem *Rhodospiridium toruloides*, kdy nejvhodnější bylo médium se směsí fritovacího oleje a odpadního živočišného tuku s vyšším přídavkem glycerolu (hodnota uvedena v kapitole 5.1.6). Kmen *Sporidiobolus metaroseus* vykazoval několikanásobné zvýšení produkce torularhodinu po využití indukce lipázové aktivity v inokulačních médiích. Nejvhodnějšími substráty byly směsi živočišného tuku s oleji. (hodnoty zmíněny v kapitole 5.1.2).

Odpadní živočišný tuk byl velice vhodný pro většinu kmenů pro produkci lykopenu, i u kmenů s nízkými až nulovými hodnotami (*Cystofilobasidium macerans*, *Rhodotorula kratochvilovae*) bylo na médiích s živočišným tukem za využití indukce dosaženo mnohem vyšších hodnot. Nízké hodnoty lykopenu jsou důsledkem dráhy syntézy karotenoidů, kdy lykopen je výchozí pro syntézu ostatních karotenoidů. Celkově nejlepším kmenem pro tvorbu lykopenu na médiích s odpadními substráty byl kmen *Rhodotorula mucilaginosa*. Nejvyšší hodnoty bylo dosaženo na médiu s odpadním živočišným tukem s vyšším přídavkem glycerolu (hodnota uvedena v kapitole 5.1.4).

Torulen je prekurzorem pro syntézu torularhodinu, proto jeho výtěžky byly ve většině případu velmi nízké. Nejlépe byl syntetizován kmenem *Cystofilobasidium macerans* na kontrolních glycerolových médiích. Mírné snížení produkce bylo pozorováno u médií se směsí fritovacího oleje a živočišného tuku (veškeré produkce jsou uvedeny v Příloze 5). Nejvyšší hodnoty na médiu s obsahem odpadního substrátu bylo dosaženo u kmene *Sporidiobolus metaroseus* na médiu s odpadním živočišným tukem s vyšším přídavkem glycerolu (hodnota koncentrace uvedena v Příloze 3).

Celková produkce karotenoidů byla nejvyšší u kmene *Sporidiobolus metaroseus* při využití indukce lipázové aktivity (výsledky uvedeny v Příloze 3), díky indukci se hodnota celkových karotenoidů znásobila. Vysokých hodnot dosahoval také kmen *Rhodospiridium toruloides*, kterému pro tvorbu karotenoidů vyhovují média s odpadním živočišným tukem. Tento kmen dosáhl maximální produkce při využití média se směsí fritovacího oleje a odpadního živočišného tuku s vyšším přídavkem glycerolu (hodnota zmíněna v kapitole 5.1.6)

Nejvyšší koncentrace ergosterolu bylo dosaženo na kontrolních glycerolových médiích kmenem *Sporidiobolus pararoseus*, ale při využití odpadních substrátů došlo k výraznému poklesu (hodnoty uvedeny v Příloze 1). Nejvyšších hodnot na odpadních médiích bylo dosaženo díky využití indukce aktivity lipáz u kmenů *Rhodospotidium toruloides* (hodnota v kapitole 5.1.6) a *Sporidiobolus metaroseus* (hodnota zmíněna v kapitole 5.1.2). Nejvhodnějším odpadním substrátem pro zvýšení produkce ergosterolu je odpadní živočišný tuk.

Kultivace na médiích s odpadním substrátem vedou u všech použitých kmenů k výraznému zvýšení produkce ubiquinonu. Nejlépe se jeví využití fritovacího oleje. Nejvyšších produkcí bylo dosaženo kmenem *Sporidiobolus pararoseus* (produkce uvedeny v Příloze 1). Maximální produkce bylo dosaženo tímto kmenem na médiu s kávovým olejem a nižším přídatkem glycerolu. Podobných hodnot bylo dosaženo při kultivacích kmene *Rhodotorula mucilaginosa*, kdy měl nelepší vliv fritovací olej. Maximální hodnoty bylo dosaženo na médiu s fritovacím olejem bez přídatku glycerolu a bez využití indukce (hodnota produkce je uvedena v kapitole 5.1.4)

V průběhu práce bylo zjištěno, že vybrané kmeny karotenogenních kvasinek jsou schopné akumulovat tokoferol ze substrátu. Nejlépe k tomu dochází z kávového oleje, který ho obsahuje nejvíce. Nejvhodnějším kmenem pro akumulaci tokoferolu z kávového oleje byl kmen *Rhodospotidium toruloides*, který jej akumuloval téměř ve všech médiích ve vysoké koncentraci. Nejvyšší hodnoty však bylo dosaženo při použití média s kávovým olejem a nižším přídatkem glycerolu (hodnota uvedena v kapitole 5.1.6). Velmi vysokých hodnot dosahoval i kmen *Sporidiobolus pararoseus*. Nejvyšší produkce byla stejně jako u předchozího kmene zjištěna na médiu s kávovým olejem s nižším přídatkem glycerolu (hodnota zmíněna v kapitole 5.1.1)

Pomocí plynové chromatografie bylo zjišťováno procentuální zastoupení lipidů v biomase a zastoupení mastných kyselin. Výběr odpadního substrátu určuje zastoupení typu mastných kyselin v lipidech. Biomasa kmene *Sporidiobolus pararoseus* obsahovala největší zastoupení lipidů, které bylo způsobeno využitím odpadních lipidických substrátů. U většiny kultivací se pohybovalo množství lipidů mezi 40-80 %. Maximální hodnoty bylo dosaženo při využití kávového oleje s nižším přídatkem glycerolu (hodnota zmíněna v kapitole 5.1.1). Kávový olej byl velmi vhodným substrátem pro zvýšení lipidů v biomase.

Nasyčené mastné kyseliny (SFA) jsou nejlépe akumulovány z kávového oleje či jeho směsi s odpadním tukem. Maximální hodnoty bylo dosaženo kmenem *Sporidiobolus pararoseus* při kultivaci na médiu kávového oleje s odpadním živočišným tukem s využitím indukce aktivity lipáz (73,8 %). Hodnoty SFA na kávových médiích u kmene *Sporidiobolus pararoseus* se pohybovaly kolem 60-74 %. Kmen s druhými nejvyššími hodnotami byl *Cystofilobasidium macerans*, kdy se hodnoty na kávových médiích pohybovaly mezi 20-30 %.

Největší zastoupení mononenasycených mastných kyselin (MUFA) bylo pozorováno na kontrolních glycerolových médiích. S využitím odpadních substrátů jejich zastoupení klesalo. Nejvyšší hodnoty bylo dosaženo kmenem *Sporidiobolus pararoseus* na kontrolním glycerolovém médiu (Graf 5 v kapitole 5.1.1), při použití odpadních substrátů zastoupení kleslo alespoň o 35 %. Nejvyšších hodnot MUFA při kultivacích na odpadních substrátech bylo dosaženo kmenem *Rhodotorula mucilaginosa* (nejvyšší hodnoty v rozmezí 50-70 %). Kdy nejvhodnějším substrátem pro vysoký obsah MUFA byl odpadní živočišný tuk. Nejvyšších hodnot MUFA u kmene *Rhodospotidium toruloides* bylo dosaženo pomocí médií s fritovacím olejem a přídatkem glycerolu (hodnoty uvedeny v kapitole 5.1.6).

Maxima zastoupení polynenasycených mastných kyselin (PUFA) se pohybovala u všech kmenů v rozmezí 50-65 %. Pro akumulaci PUFA jsou nejvhodnější média s obsahem kávového oleje, popřípadě fritovacího oleje. Kmenem *Cystofilobasidium macerans* bylo dosaženo maximální hodnoty PUFA (63,8 %) při použití média s kávovým olejem bez indukce. Nejvyšší hodnoty PUFA se pohybovaly v rozmezí (40-64 %). Kmen *Rhodospotidium toruloides* dosahoval na kontrolních médiích

nejnižších hodnot (kolem 2-4 %) kultivací na médiu s kávovým olej bez využití indukce lipázové aktivity bylo dosaženo hodnoty 55 %.

Z výsledků této práce plyne, že vybrané odpadní substráty jsou vhodnými zdroji uhlíku pro kultivaci karotenogenních kvasinek. Všechny zvolené kmeny kvasinek byly schopny využít kombinace zvolených substrátů. Využití těchto odpadů potravinářského průmyslu v biotechnologiích s využitím kvasinek může vést ke snížení produkce odpadů a zároveň ochraně cenných přírodních zdrojů. Následnou optimalizací podmínek kultivace by bylo možné dosáhnout vyšších produkcí.

7 ZDROJE

- [1] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. Bratislava: Alfa, 1982.
- [2] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [3] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. Bratislava: Alfa, 1990.
- [4] KURTZMAN, Cletus a J.W. FELL. *The Yeasts - A Taxonomic Study*. 4. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1998, 1076 s. ISBN 0-444-81312-8.
- [5] FRENGOVA, Ginka I. a Dora M. BESHKOVA. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2009, 36(2), 163-180. ISSN 1367-5435. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-008-0492-9>
- [6] WALKER, Graeme. *Yeast physiology and biotechnology*. 1. st. New York: John Wiley and Sons Ltd., 1998. ISBN 04-719-6446-8.
- [7] DRABINA, Pavel. *Bioorganická chemie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2020. ISBN 978-80-7560-316-6.
- [8] DOUŠA, Michal. Vlastnosti karotenoidů. *News from HPLC analysis* [online]. 2004 Dostupné z: http://hplc1.sweb.cz/Carotenoids/ch_karotenoids.htm
- [9] YAMAGUCHI, Masayoshi, c2010. Carotenoids: properties, effects, and diseases. New York: Nova Science Publishers. Biochemistry research trends series. ISBN 978-1-61209-713-8
- [10] HOLUB, Jiří. *Optimalizace kultivace karotenogenních kvasinek na směsných odpadních substrátech* [online]. Brno, 2020 [cit. 2021-7-29]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123930>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.
- [11] PACKER, L.. Carotenoids and retinoids: molecular aspects and health issues. Champaign, Ill.: AOCS Press, c2005.
- [12] KRINSKY, Norman I. a Elizabeth J. JOHNSON. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 2005, 26(6), 459-516. DOI: 10.1016/j.mam.2005.10.001. ISSN 00982997.
- [13] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [14] VODRÁŽKA, Z.. *Biochemie*. 2., opr. vyd. Praha: Academia, 1996, 180, 135, 191 s. Dotisk 2007.
- [15] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. Jinočany, 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- [16] VILLALBA, J. M., Navas P., *Regulation of coenzyme Q biosynthesis pathway in eukaryotes*, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 165, 2021, Pages 312-323, ISSN 0891-5849. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.055>.
- [17] VOET D., VOETOVÁ J. G.. *Biochemie*. 1. české vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995, 1325 s.
- [18] DOHNAL, Vlastimil, Alena JEŽKOVÁ a Jiří SKLÁDANKA. *Ergosterol: Klíčový steroid hub*. Kontakt. 2009, 10(2), 449-454. DOI: 10.32725/kont.2008.066. ISSN 12124117.

- [19] EASTERLING, E., W. FRENCH, R. HERNANDEZ a M. LICHA. *The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology* [online]. 2009, 100(1), 356-361 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.05.030. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852408004768>
- [20] BENEŠOVÁ K., Hartman I., Běháková S. a Mikulíková R., 2014. *Charakteristika ječného sladu pomocí HPLC*. *Chemické listy*. 108(10), 925-1016. ISSN 0009-2770
- [21] PROŠKOVÁ, Alexandra, Jiří KUČERA a Zdenka KOPICOVÁ, 2009. *Porovnání kyselých a bazických katalyzovaných transesterifikací kafilerního tuku methanolem*. *Chemické listy*. 103(12), 1034-1036.
- [21] SZOTKOWSKI, Martin, Dana BYRTUSOVA, Andrea HARONIKOVA, Marie VYSOKA, Marek RAPTA, Volha SHAPAVAL a Ivana MAROVA. *Study of Metabolic Adaptation of Red Yeasts to Waste Animal Fat Substrate*. *Microorganisms*. 2019, 7(11). ISSN 2076-2607
- [22] SZOTKOWSKI, Martin, Dana BYRTUSOVA, Andrea HARONIKOVA, Marie VYSOKA, Marek RAPTA, Volha SHAPAVAL a Ivana MAROVA. *Study of Metabolic Adaptation of Red Yeasts to Waste Animal Fat Substrate*. *Microorganisms*. 2019, 7(11). ISSN 2076-2607.
- [23] PROŠKOVÁ, Alexandra, Jiří KUČERA a Zdenka KOPICOVÁ, 2009. *Porovnání kyselých a bazických katalyzovaných transesterifikací kafilerního tuku methanolem*. *Chemické listy*. 103(12), 1034-1036.
- [24] Getachew, A. T., Cho, Y. J., and Chun, B. S. (2018). *Effect of pretreatments on isolation of bioactive polysaccharides from spent coffee grounds using subcritical water*. *Int. J. Biol. Macromol.* 109, 711-719
- [25] OBRUCA, Stanislav, Pavla BENESOVA, Dan KUCERA, Sinisa PETRIK a Ivana MAROVA. *Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids*. *New Biotechnology*. 2015, 32(6), 569-574. DOI: 10.1016/j.nbt.2015.02.008. ISSN 18716784. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678415000333>
- [26] BÍLKOVÁ, Kateřina a Blanka KRÁLOVÁ, 1997. *Izolace biomakromolekul*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-708-0288-X.
- [27] KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna, VRANÁ, Dagmar, ed., 1986. *Kvasinky ve výzkumu a praxi*. Praha: Academia.
- [28] PRÍBELA, Alexander, 1991. *Analýza potravin*. Bratislava: STU, 224 s. ISBN 8022703745.
- [29] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie II*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [29] KAŠTÁNEK, František. *Bioinženýrství*. 1. Praha: Academia, 2001. ISBN 80-200-0768-7
- [30] PÁČA, Jan, 1987. *Bioreaktory. Kvasný průmysl*. VŠCHT, katedra kvasné chemie a bioinženýrství, Praha, 33/1987(1), 20-21.
- [31] MCMURRY, J. a C. FRYHLE. *Organická chemie: a practical approach*. Vydání první. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2015. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-7080-930-3.
- [32] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [33] SOMMER, Lumír, 1995. *Teoretické základy analytické chemie. III*. Brno: Fakulta chemická VUT, 101 s. ISBN 8021406607.

[34] CZAPLICKI, Sylwester. *Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. Column Chromatography*. InTech, 2013, 2013-04-10. DOI: 10.5772/55620. ISBN 978-953-51-1074-3.

[35] SZOTKOWSKI, Martin. *Řízená produkce lipidů a dalších lipidických látek pomocí vybraných druhů kvasinek a mikrořas*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zavprace/detail/134986>. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

8 POUŽITÉ ZKRATKY

GC Plynová chromatografie

FID Plamenový ionizační detektor

HPLC Vysokoučinná kapalinová chromatografie

PDA Detektor diodového pole

SFA Nasycené mastné kyseliny

MUFA Mononenasycené mastné kyseliny

PUFA Polynenasycené mastné kyseliny

UFA Nenasycené mastné kyseliny

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Produkce metabolitů kvasinkou *Sporidiobolus pararoseus* - karotenoidy

	Zkratka	Biomasa (g/l)	β -karoten (mg/g)	Torularhodin (mg/g)	Lykopen (mg/g)	Torulen (mg/g)	Karotenoidy (mg/g)
S GLYCEROLEM	Kontrolní 1	2,00	0,4639	2,5832	0,0000	0,2032	3,3289
	FOG10	11,80	0,3429	0,4508	0,0000	0,1776	1,0847
	FOG25	2,10	0,0036	0,0000	0,0000	0,0000	0,0030
	KOG10	5,60	0,0995	0,0567	0,8484	0,1194	1,1357
	KOG25	5,00	0,1056	0,0853	0,0000	0,1255	0,3704
	TUK+G10	9,20	0,1840	0,5154	0,0000	0,1441	1,0532
	TUK+G25	6,10	0,0440	0,0000	0,3273	0,1068	0,5109
	FO+T+G10	4,00	0,0129	0,0000	0,0000	0,1033	0,1363
	FO+T+G25	3,50	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0154
	KO+T+G10	6,30	0,1311	0,1794	0,0000	0,2147	0,6944
	KO+T+G25	5,10	0,1028	0,0000	0,0000	0,1139	0,3019
BEZ GLYCEROLU	Kontrolní 2	2,00	0,4639	2,5832	0,0000	0,2032	3,3289
	FO	4,30	0,0285	0,0000	0,0000	0,1116	0,1684
	KO	6,90	0,0454	0,0166	0,5550	0,1132	0,7283
	TUK	8,60	0,0088	0,0000	0,0000	0,0000	0,1139
	FO+T	3,90	0,1735	0,5831	0,0000	0,1498	1,0822
	KO+T	9,50	0,1864	0,0000	0,0000	0,0000	0,1999
S INDUKCÍ	Kontrolní 3	2,50	0,5105	0,4333	0,0000	0,2197	1,3079
	FO (I)	14,40	0,3472	0,6389	0,0000	0,2703	1,3317
	KO (I)	7,50	0,1995	0,0874	0,0000	0,1468	0,5838
	TUK (I)	5,30	0,0527	0,1098	0,4166	0,1559	0,7959
	FO+T (I)	12,70	0,1568	0,4871	0,0000	0,2011	1,1139
	KO+T (I)	6,10	0,1320	0,0000	0,0000	0,1088	0,2995

Příloha 2: Produkce metabolitů kvasinkou *Sporidiobolus pararoseus* – lipidické metabolity

	Zkratka	Biomasa (g/l)	Ergosterol (mg/g)	Ubichinon (mg/g)	Tokoferol (mg/g)
S GLYCEROLEM	Kontrolní 1	2,00	10,9458	6,3941	0,0000
	FOG10	11,80	3,7027	9,5302	0,0000
	FOG25	2,10	2,9417	4,7893	0,0580
	KOG10	5,60	4,2628	12,8095	13,9711
	KOG25	5,00	3,4983	10,0411	6,2569
	TUK+G10	9,20	4,6999	12,6014	0,0000
	TUK+G25	6,10	2,0164	4,0313	0,0147
	FO+T+G10	4,00	2,2393	4,8391	0,0105
	FO+T+G25	3,50	1,1695	4,9939	0,0000
	KO+T+G10	6,30	3,0003	7,4610	0,2104
	KO+T+G25	5,10	5,0221	12,2963	0,5103
BEZ GLYCEROLU	Kontrolní 2	2,00	10,9458	6,3941	0,0000
	FO	4,30	5,2414	11,9203	0,1794
	KO	6,90	2,5919	7,6273	8,8925
	TUK	8,60	2,1018	11,2415	0,0000
	FO+T	3,90	3,7243	10,9157	0,3960
	KO+T	9,50	1,2328	5,0530	0,0206
S INDUKČÍ	Kontrolní 3	2,50	8,5432	10,1934	0,0000
	FO (I)	14,40	3,9547	8,3879	0,0000
	KO (I)	7,50	4,8849	10,1818	6,8142
	TUK (I)	5,30	3,5365	6,5687	0,0000
	FO+T (I)	12,70	3,1234	12,1676	0,0000
	KO+T (I)	6,10	1,4432	4,7507	0,2420

Příloha 3: Produkce metabolitů kvasinkou *Sporidiobolus metaroseus* - krotenoidy

	Zkratka	Biomasa (g/l)	β-karoten (mg/g)	Torularhodin (mg/g)	Lykopen (mg/g)	Torulen (mg/g)	Karotenoidy (mg/g)
S GLYCEROLEM	Kontrolní 1	6,70	0,0000	1,6898	0,0000	0,2699	2,1256
	FOG10	8,10	0,0000	1,3782	0,0000	0,2633	1,8051
	FOG25	10,50	0,0000	1,3788	0,0000	0,2720	1,8050
	KOG10	6,80	0,0000	1,6921	0,0000	0,2695	2,1220
	KOG25	8,40	0,1862	0,0000	0,0000	0,2889	0,7150
	TUK+G10	8,50	0,0000	2,2820	0,0000	0,2221	2,6824
	TUK+G25	6,30	0,0000	2,1900	0,0000	0,3141	2,6602
	FO+T+G10	9,00	0,0000	1,8227	0,0000	0,2519	2,2603
	FO+T+G25	11,80	0,0000	1,1949	0,0000	0,2525	1,6162
	KO+T+G10	7,60	0,0000	2,5780	0,0000	0,2926	3,0230
	KO+T+G25	10,00	0,0000	1,5359	1,4578	0,2775	3,3057
BEZ GLYCEROLU	Kontrolní 2	6,70	0,0000	1,6898	0,0000	0,2699	2,1221
	FO	2,70	0,0000	1,7631	0,0000	0,1546	2,0865
	KO	4,80	0,0000	1,3070	0,0000	0,2899	1,6952
	TUK	3,00	0,0008	2,4132	0,0000	0,2103	2,3308
	FO+T	5,80	0,0000	2,1297	0,0000	0,2942	2,5763
	KO+T	6,40	0,0081	2,0081	0,0000	0,2654	2,3945
S INDUKCÍ	Kontrolní 3	10,80	0,5817	3,9680	0,3716	0,2344	5,3107
	FO (I)	4,20	0,0536	0,2036	0,0000	0,0000	0,2657
	KO (I)	3,10	0,5090	9,1944	0,0000	0,1333	10,0055
	TUK (I)	3,80	0,5193	7,8005	0,0000	0,1444	8,7052
	FO+T (I)	5,60	0,4179	10,0309	0,0000	0,1440	10,9616
	KO+T (I)	3,30	0,4051	9,7519	1,0577	0,1627	11,4258

Příloha 4: Produkce metabolitů kvasinkou *Sporidiobolus metaroseus* – lipidické látky

	Zkratka	Biomasa (g/l)	Ergosterol (mg/g)	Ubichinon (mg/g)	Tokoferol (mg/g)
S GLYCEROLEM	Kontrolní 1	6,70	2,5071	5,0020	0,0000
	FOG10	8,10	2,4546	8,5638	0,0589
	FOG25	10,50	2,4877	10,5265	0,0490
	KOG10	6,80	2,4933	6,8114	0,9609
	KOG25	8,40	2,3418	6,5404	1,6550
	TUK+G10	8,50	2,9471	9,8702	0,0378
	TUK+G25	6,30	3,0434	8,4687	0,0000
	FO+T+G10	9,00	2,7607	9,1571	0,0508
	FO+T+G25	11,80	2,3463	10,7538	0,0000
	KO+T+G10	7,60	3,8763	10,8182	0,0523
	KO+T+G25	10,00	2,5917	8,4570	0,0529
BEZ GLYCEROLU	Kontrolní 2	6,70	2,5071	5,0020	0,0000
	FO	2,70	3,8335	9,8804	1,5582
	KO	4,80	1,8952	3,9702	0,7254
	TUK	3,00	4,5476	8,2169	2,1187
	FO+T	5,80	3,3925	9,3204	0,0075
	KO+T	6,40	2,8673	7,2211	0,0166
S INDUKCÍ	Kontrolní 3	10,80	3,7633	4,1488	0,0000
	FO (I)	4,20	4,0012	7,2606	0,0000
	KO (I)	3,10	7,1913	6,6834	4,1743
	TUK (I)	3,80	8,6442	5,0429	0,0000
	FO+T (I)	5,60	7,8836	6,9231	0,0000
	KO+T (I)	3,30	9,1050	5,3949	0,7380

Příloha 5: Produkce metabolitů kvasinkou *Cystofilobasidium macerans* - karotenoidy

	Zkratka	Biomasa (g/l)	β -karoten (mg/g)	Torularhodin (mg/g)	Lykopen (mg/g)	Torulen (mg/g)	Karotenoidy (mg/g)
S GLYCEROLEM	Kontrolní 1	6,10	0,0612	1,0117	0,0000	0,2753	1,5092
	FOG10	7,53	0,0000	0,0000	0,0000	0,1811	0,2906
	FOG25	10,37	0,0033	0,5838	0,0000	0,2125	0,9121
	KOG10	6,16	0,0001	0,4772	0,0000	0,2303	0,7961
	KOG25	8,28	0,0024	0,2495	0,0000	0,2221	0,5700
	Kontrolní	3,40	0,0201	2,1856	0,0000	0,2020	2,6671
	TUK+G25	5,90	0,0000	0,0000	0,0000	0,2621	0,5656
	FO+T+G10	8,70	0,0290	1,4976	0,0000	0,1991	1,9490
	FO+T+G25	8,60	0,0403	1,1375	0,0000	0,2533	1,6125
	KO+T+G10	5,90	0,0197	0,0000	0,0000	0,2169	0,6562
	KO+T+G25	8,70	0,0000	0,4792	0,0000	0,1352	0,7307
BEZ GLYCEROLU	Kontrolní 2	7,00	0,0000	1,1925	0,0000	0,2414	1,5607
	FO	6,80	0,0000	0,6247	0,0000	0,2273	1,0631
	KO	4,50	0,0000	1,3841	0,0000	0,2532	1,8460
	TUK	2,80	0,0000	2,3183	0,1816	0,1517	2,7867
	FO+T	6,40	0,0000	2,0699	0,0000	0,2765	2,5450
	KO+T	4,30	0,0000	1,2828	0,0000	0,2617	1,8196
S INDUKCÍ	Kontrolní 3	6,80	0,0031	1,7448	0,0000	0,3210	2,2390
	FO (I)	6,30	0,0000	0,0000	0,0000	0,1093	0,2765
	KO (I)	5,60	0,0000	0,9590	0,0000	0,2772	1,4545
	TUK (I)	4,00	0,0086	0,1725	6,3923	0,1303	6,9912
	FO+T (I)	4,60	0,0028	1,3814	0,0000	0,2640	1,8345
	KO+T (I)	5,80	0,0227	0,8852	0,0000	0,2521	1,3532

Příloha 6: Produkce metabolitů kvasinkou *Cystofilobasidium macerans* – lipidické látky

	Zkratka	Biomasa (g/l)	Ergosterol (mg/g)	Ubichinon (mg/g)	Tokoferol (mg/g)
S GLYCEROLEM	Kontrolní 1	6,10	2,6351	4,9253	0,0000
	FOG10	7,53	2,4162	4,4921	0,1118
	FOG25	10,37	1,5658	3,5104	0,3721
	KOG10	6,16	3,3838	4,3322	1,3979
	KOG25	8,28	2,2147	4,9364	4,4381
	TUK+G10	3,40	4,2030	7,5163	0,0000
	TUK+G25	5,90	3,1631	7,0593	0,0000
	FO+T+G10	8,70	3,5293	10,1844	0,0000
	FO+T+G25	8,60	2,6379	7,3823	0,2547
	KO+T+G10	5,90	3,0281	9,4317	0,0036
KO+T+G25	8,70	3,2434	7,9797	0,0539	
BEZ GLYCEROLU	Kontrolní 2	7,00	2,2665	3,7667	0,0000
	FO	6,80	1,8752	5,7193	0,0000
	KO	4,50	2,6918	6,7695	2,1309
	TUK	2,80	3,8459	9,8540	0,0000
	FO+T	6,40	3,1593	8,9232	0,0046
	KO+T	4,30	2,8537	8,6348	0,3248
S INDUKCÍ	Kontrolní 3	6,80	3,6426	6,1877	0,0000
	FO (I)	6,30	0,9819	3,1837	0,0566
	KO (I)	5,60	3,0155	8,6115	1,7573
	TUK (I)	4,00	4,7680	8,3172	0,0000
	FO+T (I)	4,60	3,1708	8,4982	0,1515
	KO+T (I)	5,80	3,8443	10,1084	0,2958

Příloha 7: Produkce metabolitů kvasinkou *Rhodotorula mucilaginosa* - karotenoidy

	Zkratka	Biomasa (g/l)	β -karoten (mg/g)	Torularhodin (mg/g)	Lykopen (mg/g)	Torulen (mg/g)	Karotenoidy (mg/g)
S GLYCEROLEM	Kontrolní 1	8,50	0,0028	0,3630	0,7350	0,0000	1,1574
	FOG10	3,80	0,0000	0,3074	0,2164	0,0000	0,5356
	FOG25	7,40	0,0000	0,1697	0,0832	0,0000	0,2543
	KOG10	4,40	0,0000	1,4880	3,5777	0,1204	5,2801
	KOG25	6,50	0,0070	0,3337	0,6816	0,0000	1,0921
	TUK+G10	4,40	0,0048	1,1168	1,9356	0,0000	3,1909
	TUK+G25	8,60	0,0000	1,9182	4,3690	0,0000	6,4503
	FO+T+G10	4,30	0,0000	0,4939	0,1496	0,0000	0,6715
	FO+T+G25	7,30	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0115
	KO+T+G10	5,60	0,0000	1,7465	4,3431	0,0000	6,2324
KO+T+G25	7,00	0,0057	1,5229	3,1443	0,0000	4,7709	
BEZ GLYCEROLU	Kontrolní 2	10,10	0,0000	0,6646	3,8857	0,1140	4,7316
	FO	3,50	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0085
	KO	2,40	0,0000	0,6278	1,1067	0,1329	1,9109
	TUK	2,60	0,0000	0,3855	0,5933	0,1102	1,1123
	FO+T	3,20	0,0000	0,1363	0,3282	0,0966	0,5713
	KO+T	2,30	0,0000	1,1572	1,1053	0,1225	2,3768
S INDUKCÍ	Kontrolní 3	11,10	0,0000	0,5608	3,3460	0,1374	4,1074
	FO (I)	4,20	0,2230	0,1800	0,2091	0,0000	0,6188
	KO (I)	2,60	0,0000	0,9658	1,5036	0,1201	2,6451
	TUK (I)	3,90	0,0000	0,8751	1,2927	0,1264	2,3626
	FO+T (I)	2,70	0,0000	0,1161	0,1826	0,0000	0,2965
	KO+T (I)	5,10	0,0000	0,8608	2,5082	0,1028	3,5740

Příloha 8: Produkce metabolitů kvasinkou *Rhodotorula mucilaginosa* – lipidické látky

	Zkratka	Biomasa (g/l)	Ergosterol (mg/g)	Ubichinon (mg/g)	Tokoferol (mg/g)
S GLYCEROLEM	Kontrolní 1	8,50	3,4525	3,5264	0,0000
	FOG10	3,80	2,8020	9,1795	0,0000
	FOG25	7,40	3,6881	4,7012	0,0000
	KOG10	4,40	5,3399	6,6609	1,9510
	KOG25	6,50	4,1104	5,3569	0,0000
	TUK+G10	4,40	5,0490	5,6212	0,0000
	TUK+G25	8,60	7,5867	5,4351	0,0000
	FO+T+G10	4,30	4,7690	4,7807	0,4190
	FO+T+G25	7,30	4,2314	6,4783	0,0000
	KO+T+G10	5,60	5,0851	10,1998	0,0537
	KO+T+G25	7,00	6,0143	4,9912	0,0460
BEZ GLYCEROLU	Kontrolní 2	10,10	4,0584	2,6453	0,0915
	FO	3,50	3,3238	12,7100	0,0152
	KO	2,40	5,9194	6,0807	4,4225
	TUK	2,60	5,8507	6,4372	0,0000
	FO+T	3,20	5,2270	7,3585	0,0000
	KO+T	2,30	5,3062	6,2990	0,0647
S INDUKCÍ	Kontrolní 3	11,10	3,8286	2,3303	0,0000
	FO (I)	4,20	4,1894	9,7744	0,1925
	KO (I)	2,60	5,2961	9,3841	5,7086
	TUK (I)	3,90	5,2108	7,2786	0,0000
	FO+T (I)	2,70	5,3588	5,7811	0,0692
	KO+T (I)	5,10	4,6305	5,9869	0,0314

Příloha 9: Produkce metabolitů kvasinkou *Rhodotorula kratochvilovae* - karotenoidy

	Zkratka	Biomasa (g/l)	β -karoten (mg/g)	Torularhodin (mg/g)	Lykopen (mg/g)	Torulen (mg/g)	Karotenoidy (mg/g)
S GLYCEROLEM	Kontrolní 1	9,50	0,2161	1,3568	2,5100	0,1104	4,4197
	FOG10	4,90	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2019
	FOG25	12,50	0,0033	0,0000	0,0000	0,0000	0,0136
	KOG10	5,30	0,0900	1,1908	0,0000	0,0000	1,9325
	KOG25	10,10	0,2054	1,8796	0,0000	0,1142	2,3520
	Kontrolní	4,30	0,1334	2,2749	0,0000	0,1247	2,5675
	TUK+G25	6,10	0,2204	1,4795	0,0000	0,1088	1,9116
	FO+T+G10	12,00	0,2381	2,1861	0,0000	0,1218	2,8077
	FO+T+G25	10,40	0,1731	1,1798	0,0000	0,0000	1,4682
	KO+T+G10	4,80	0,2169	2,2411	0,0000	0,1231	2,6811
	KO+T+G25	8,50	0,2962	2,5392	0,0000	0,1087	3,0575
BEZ GLYCEROLU	Kontrolní 2	13,80	0,2687	1,3518	0,0000	0,0000	1,7049
	FO	3,80	0,0129	0,0771	0,0000	0,0000	0,0808
	KO	2,40	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0348
	TUK	4,90	0,1699	2,3545	0,0000	0,1128	2,7441
	FO+T	14,30	0,1243	1,4959	0,0000	0,1179	1,8966
	KO+T	1,10	0,1318	2,9159	0,0000	0,1139	3,2124
S INDUKCÍ	Kontrolní 3	12,60	0,2290	1,4794	0,0000	0,1256	1,9217
	FO (I)	6,70	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2095
	KO (I)	3,50	0,1103	2,8133	0,0000	0,1156	3,0579
	TUK (I)	5,80	0,0983	2,5569	2,1500	0,1387	4,9296
	FO+T (I)	11,10	0,1411	1,9863	0,0000	0,1502	2,4711
	KO+T (I)	4,50	0,1199	2,9970	0,0000	0,1199	3,3344

Příloha 10: Produkce metabolitů kvasinkou *Rhodotorula kratochvilovae* – lipidické látky

	Zkratka	Biomasa (g/l)	Ergsterol (mg/g)	Ubichinon (mg/g)	Tokoferol (mg/g)
S GLYCEROLEM	Kontrolní 1	9,50	2,7875	1,7191	0,0000
	FOG10	4,90	3,5945	4,7538	0,0000
	FOG25	12,50	3,3355	6,8083	0,0000
	KOG10	5,30	3,7715	0,7200	0,0924
	KOG25	10,10	3,3032	8,4864	0,0956
	TUK+G10	4,30	3,3809	4,4622	0,0000
	TUK+G25	6,10	3,8037	4,7385	0,0000
	FO+T+G10	12,00	4,3179	9,2625	0,0000
	FO+T+G25	10,40	3,4175	8,0000	0,0000
	KO+T+G10	4,80	3,8012	6,5468	0,0361
	KO+T+G25	8,50	3,8941	7,3805	0,0480
BEZ GLYCEROLU	Kontrolní 2	13,80	3,2391	4,9396	0,0000
	FO	3,80	2,9875	7,4269	0,4573
	KO	2,40	4,5307	3,5549	0,5611
	TUK	4,90	3,6197	5,4258	0,0000
	FO+T	14,30	3,6068	5,7971	0,1110
	KO+T	1,10	3,9849	4,4378	0,0000
S INDUKCÍ	Kontrolní 3	12,60	3,4572	5,9398	0,0000
	FO (I)	6,70	2,8462	2,3997	0,3805
	KO (I)	3,50	4,4619	3,4807	0,1841
	TUK (I)	5,80	3,7282	5,2601	0,0000
	FO+T (I)	11,10	3,9800	7,1272	0,0000
	KO+T (I)	4,50	3,9903	5,5044	0,0052

Příloha 11: Produkce metabolitů kvasinkou *Rhodospiridium toruloides* - karotenoidy

	Zkratka	Biomasa (g/l)	β -karoten (mg/g)	Torularhodin (mg/g)	Lykopen (mg/g)	Torulen (mg/g)	Karotenoidy (mg/g)
S GLYCEROLEM	Kontrolní 1	13,38	0,2625	2,7454	1,7197	0,2096	4,9611
	FOG10	6,41	0,1384	2,6922	0,0000	0,1356	2,9483
	FOG25	8,76	0,3147	5,6044	0,0000	0,1473	6,0905
	KOG10	5,59	0,2004	4,1821	0,0000	0,1524	4,5445
	KOG25	6,74	0,3651	5,3955	0,0000	0,1585	5,9566
	Kontrolní 2	11,00	0,6787	4,2054	0,0000	0,1501	5,3304
	TUK+G10	5,40	0,4087	7,2125	0,0000	0,0000	7,9037
	TUK+G25	8,20	0,3514	5,3800	0,0000	0,0000	6,1093
	FO+T+G10	5,40	0,4805	7,8061	0,0000	0,1195	8,6107
	FO+T+G25	8,20	0,7459	10,2323	0,0000	0,1389	11,2562
	KO+T+G10	5,70	0,3853	6,4550	0,0000	0,1064	7,0842
	KO+T+G25	8,00	0,6367	8,4802	1,5845	0,1287	10,9118
BEZ GLYCEROLU	Kontrolní 3	12,20	0,4666	2,6499	3,2145	0,1183	6,4841
	FO	2,90	0,0866	0,7445	0,0000	0,0000	0,8430
	KO	1,50	0,4464	6,0908	0,0000	0,1440	6,7351
	TUK	3,10	0,2247	4,0170	0,0000	0,1322	4,4229
	FO+T	3,00	0,1978	3,7452	0,0000	0,0955	4,1001
	KO+T	3,00	0,3562	6,5256	0,5516	0,1312	7,5973
S INDUKCÍ	Kontrolní 4	12,00	0,6021	3,3387	0,0000	0,1416	4,3818
	FO (I)	3,30	0,0012	0,9026	0,2317	0,0989	1,3667
	KO (I)	3,70	0,4080	6,3772	0,0000	0,1608	6,9664
	TUK (I)	4,00	0,4240	8,6881	0,0000	0,1202	9,3234
	FO+T (I)	4,20	0,3570	6,1438	0,3649	0,1361	7,0264
	KO+T (I)	3,40	0,4146	7,5262	0,0000	0,1377	8,1046

Příloha 12: Produkce metabolitů kvasinkou *Rhodospodium toruloides* – lipidické látky

	Zkratka	Biomasa (g/l)	Ergosterol (mg/g)	Ubichinon (mg/g)	Tokoferol (mg/g)
S GLYCEROLEM	Kontrolní 1	13,38	1,8811	3,3714	0,0000
	FOG10	6,41	6,0589	2,0237	0,0000
	FOG25	8,76	4,6668	2,7046	0,0000
	KOG10	5,59	4,4638	3,7409	16,8987
	KOG25	6,74	5,5280	2,5600	6,8035
	Kontrolní 2	11,00	3,0419	4,6164	0,0000
	TUK+G10	5,40	7,7580	4,7847	0,3885
	TUK+G25	8,20	6,1946	5,1420	0,0000
	FO+T+G10	5,40	7,1344	4,9707	0,0000
	FO+T+G25	8,20	6,8544	3,9645	0,0000
	KO+T+G10	5,70	7,1137	10,2237	0,0216
	KO+T+G25	8,00	7,7391	9,5317	0,0000
BEZ GLYCEROLU	Kontrolní 3	12,20	2,3183	5,4793	0,0000
	FO	2,90	4,7025	8,0907	0,1301
	KO	1,50	7,0803	2,1755	0,3650
	TUK	3,10	7,0974	2,4091	0,0000
	FO+T	3,00	7,4878	3,0510	0,0000
	KO+T	3,00	7,7196	2,8811	0,4243
S INDUKCÍ	Kontrolní 4	12,00	2,9872	4,3913	0,0000
	FO (I)	3,30	5,0657	5,6533	0,0895
	KO (I)	3,70	6,5581	4,6055	5,6360
	TUK (I)	4,00	8,6438	4,9174	0,0000
	FO+T (I)	4,20	8,0228	3,6611	0,0000
	KO+T (I)	3,40	8,3930	2,9404	0,0000

Příloha 13: Produkce metabolitů kvasinkou *Rhodosporidium toruloides* při fermentorové kultivaci

Čas odběru (h)	Biomasa (g/l)	β-karoten (mg/g)	Torularhodin (mg/g)	Torulen (mg/g)	Karotenoidy (mg/g)
8	2,5925	0,2451	10,3126	0,1151	10,7143
22	4,9625	0,1860	4,3403	0,1408	4,7535
24	6,6275	0,2040	5,9176	0,1548	6,3301
40	8,3525	0,1760	5,3554	0,1023	5,6479
48	9,8050	0,2317	7,2379	0,1053	7,6140
56	10,1825	0,2419	7,6476	0,1210	8,0463
72	12,2675	0,1760	6,8039	0,1084	7,1071
96	14,2900	0,1427	1,5916	0,1291	2,5966
120	15,1925	0,2098	9,3862	0,1240	9,7516
144	14,8850	0,2580	10,3486	0,1108	10,7568
168	14,8225	0,2125	8,6458	0,1230	9,0070

Čas odběru (h)	Biomasa (g/l)	Ergosterol (mg/g)	Ubichinon (mg/g)	Tokoferol (mg/g)
8	2,5925	9,0636	5,1352	6,1005
22	4,9625	5,5032	3,1216	5,0567
24	6,6275	6,4297	12,1371	5,4404
40	8,3525	6,5198	4,7472	19,7059
48	9,8050	7,4320	14,2249	9,6946
56	10,1825	9,1654	13,3061	4,5874
72	12,2675	7,7055	4,5715	15,7759
96	14,2900	6,5733	6,0713	11,1318
120	15,1925	9,3585	11,7615	9,5216
144	14,8850	9,7828	2,8352	4,5289
168	14,8225	8,5219	12,8056	3,5386