



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

**VALORIZACE ODPADNÍHO ŽIVOČIŠNÉHO TUKU POMOCÍ
KAROTENOGENNÍCH KVASINEK**

VALORIZATION OF WASTE ANIMAL FAT BY CAROTENOGENIC YEASTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Nikola Chrástová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1295/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Nikola Chrástová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název diplomové práce:

Valorizace odpadního živočišného tuku pomocí karotenogenních kvasinek

Zadání diplomové práce:

Cílem práce je studium možnosti utilizace odpadního živočišného tuku kvasinkami a valorizace na hodnotné produkty.

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše zaměřená na využití odpadních substrátů různého typu karotenogenními kvasinkami
- 2) srovnání růstu a produkčních vlastností vybraných druhů kvasinek kultivovaných na surovém odpadním tuku, tuku hydrolyzovaném komerčními enzymy a na směsi tukových a sacharidových substrátů
- 3) stanovení množství a složení lipidických metabolitů produkovaných na tukovém substrátu
- 4) vyhodnocení míry valorizace tukového substrátu kvasinkami.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019:

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

Bc. Nikola Chrástová
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá valorizací odpadního živočišného tuku pomocí karotenogenních kvasinek a konverze na biomasu obohacenou o cenné a hodnotné látky. Tyto mikroorganismy mají schopnost využít různé odpadní substráty a převést je na zajímavé produkty jako jsou karotenoidy, lipidy, ergosterol a ubichinon. V práci byly použity čtyři kmeny kvasinek (*Rhodotorula glutinis*, *Cystofilobasidium macerans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporidiobolus pararoseus*). Teoretická část je zaměřena na charakterizaci kvasinek, enzymů a lipáz, produkované metabolity, kultivaci kvasinek a popis analytických metod. V experimentální části byly provedeny kultivace při čtyřech C/N poměrech na médiích s různým zdrojem uhlíku, kterým byla glukóza, glycerol, tuk, tuk s přídavkem emulgátoru, enzymaticky hydrolyzovaný tuk a tuk s přídavkem enzymu. U všech vzorků byla gravimetricky stanovena biomasa. Karotenoidy, ergosterol a ubichinon byly analyzovány na sestavě HPLC/PDA. Obsah intracelulárních lipidů byl stanoven pomocí GC/FID. Produkce těchto látek byla u všech kmenů rozdílná v závislosti na zdroji uhlíku a C/N poměru. K produkci biomasy a karotenoidů je nejvhodnější kvasinka *Rhodotorula glutinis*. Ergosterol a ubichinon byly nejvíce produkovány kvasinkou *Cystofilobasidium macerans*. Největší obsah lipidů v biomase měla kvasinka *Sporidiobolus pararoseus*. Tato diplomová práce byla zpracována v rámci mezinárodního projektu „LipoFungi“.

KLÍČOVÁ SLOVA

Karotenogenní kvasinky, odpadní tuk, karotenoidy, lipidy

ABSTRACT

This diploma thesis deals with valorization of waste animal fat using carotenogenic yeast and conversion to biomass enriched with valuable substances. These microorganisms have the ability to utilize various waste substrates and convert them into interesting products such as carotenoids, lipids, ergosterol and ubiquinone. Four strains of yeast (*Rhodotorula glutinis*, *Cystofilobasidium macerans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporidiobolus pararoseus*) were used. The theoretical part is focused on characterization of yeasts, enzymes and lipases, produced metabolites, yeast and description of analytical methods. In the experimental part, cultures were performed at four C/N ratios on media with different carbon sources, which were glucose, glycerol, fat, fat with added emulsifier, enzymatically hydrolyzed fat and fat with enzyme addition. Biomass was determined gravimetrically for all samples. Carotenoids, ergosterol and ubiquinone were analyzed on an HPLC/PDA equipment. The intracellular lipid content was determined by GC/FID. The production of these substances was different in individual strains depending on the carbon source and the C/N ratio. *Rhodotorula glutinis* is the most suitable for producing biomass and carotenoids. The highest amounts of ergosterol and ubiquinone were produced by *Cystofilobasidium macerans*. *Sporidiobolus pararoseus* had the largest lipid content in biomass. This diploma thesis was elaborated within the international project "LipoFungi".

KEYWORDS

Carotenogenic yeast, waste fat, carotenoids, lipids

CHRÁSTOVÁ, Nikola. *Valorizace odpadního živočišného tuku pomocí karotenogenních kvasinek*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115838>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

Prohlášení

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

V této části chci poděkovat své vedoucí práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za cenné rady a připomínky, vedení a čas, který mi věnovala při tvorbě diplomové práce. Další velké poděkování náleží mému konzultantovi Ing. Martinu Szotkowskému za veškeré rady, náměty, pomoc a ochotu při řešení práce. V neposlední řadě cenné díky patří rodičům, příteli, rodině a přátelům, kteří mne celou dobu studia podporovali.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Kvasinky	10
2.1.1	Karotenogenní kvasinky	10
2.1.1.1	Rod Rhodotorula	10
2.1.1.2	Rod Cystofilobasidium.....	11
2.1.1.3	Rod Sporidiobolus.....	11
2.1.2	Cytologie kvasinek	12
2.1.3	Růstová křivka.....	13
2.2	Enzymy	14
2.2.1	Stavba a rozdělení enzymů	14
2.2.2	Enzymatická reakce	15
2.2.2.1	Aktivátory a inhibitory enzymatických reakcí	15
2.2.3	Lipolytické enzymy	16
2.2.3.1	Produkce lipáz pomocí mikroorganismů.....	17
2.2.3.2	Aplikace a využití lipáz.....	17
2.3	Sledované metabolity kvasinek	17
2.3.1	Karotenoidy	17
2.3.1.1	B-karoten	18
2.3.1.2	Torulen a torularhodin.....	18
2.3.1.3	Funkce a význam karotenoidů.....	19
2.3.1.4	Biosyntéza karotenoidů	19
2.3.1.5	Faktory ovlivňující biosyntézu karotenoidů u mikroorganismů	21
2.3.2	Lipidické látky	22
2.3.2.1	Mastné kyseliny.....	22
2.3.2.2	Biosyntéza mastných kyselin	23
2.3.3	Steroly a ergosterol	25
2.3.4	Ubichinon	25
2.4	Kultivace kvasinek	26
2.4.1	Bioreaktor	26
2.5	Odpadní substráty	26
2.5.1	Odpadní tuk	26
2.5.1.1	Hydrolýza tuku	27
2.5.2	Glycerol	27
2.5.3	Syrovátka.....	27
2.6	Metody stanovení	27
2.6.1	Absorpční spektrofotometrie	28
2.6.2	Chromatografie	28

2.6.2.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	28
2.6.2.2	Plynová chromatografie	29
2.6.2.3	Tenkvrstvá chromatografie	29
3	CÍL PRÁCE.....	30
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1	Použité chemikálie.....	31
4.2	Použité přístroje a pomůcky.....	32
4.3	Použité kmeny kvasinek.....	33
4.4	Enzymatické hydrolýzy tuku.....	33
4.4.1	Analýza glycerolu v hydrolyzátech pomocí HPLC	34
4.4.2	Tenkvrstvá kapalinová chromatografie	34
4.5	Úprava syrovátky	34
4.6	Kultivace kvasinek	34
4.6.1	Inokulum I a II	35
4.6.2	Produkční média	35
4.6.3	Velkoobjemové kultivace s časovými odběry	36
4.6.4	Velkokapacitní kultivace ve fermentoru.....	36
4.6.4.1	Fermentor s částečně hydrolyzovaným tukem	37
4.6.4.2	Fermentor s tukem a syrovátkou	37
4.7	Izolace, stanovení, analýza kvasinkové biomasy a sledovaných metabolitů	37
4.7.1	Gravimetrické stanovení biomasy	37
4.7.2	Extrakce karotenoidů a lipidických metabolitů	37
4.7.3	Analýza karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu na HPLC	38
4.7.4	Transesterifikace lipidů	38
4.7.5	Analýza lipidů na GC	38
4.7.6	Stanovení aktivity lipáz	39
4.7.6.1	Kalibrační křivka.....	39
4.7.6.2	Příprava substrátu	39
4.7.6.3	Stanovení lipolytické aktivity.....	39
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	40
5.1	Enzymatické hydrolýzy odpadního tuku	40
5.1.1	Testování komerčních lipáz k hydrolýze odpadního tuku	40
5.1.1.1	Obsah glycerolu u enzymatických hydrolyzátů	41
5.1.1.2	TLC u enzymatických hydrolyzátů	43
5.1.2	Časová závislost u hydrolýzy odpadního tuku pomocí enzymu lipáza z <i>Candida rugosa</i>	44

5.2	Výsledky základních kultivací kvasinek na C/N poměru 13	44
5.2.1	Růstové charakteristiky a celková biomasa kvasinek při C/N poměru 13	44
5.2.2	Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu na C/N poměru 13.....	45
5.2.3	Produkce lipidů na C/N poměru 13	48
5.2.3.1	Zastoupení mastných kyselin	49
5.2.4	Kultivace kvasinek na různých enzymatických hydrolyzátech	50
5.3	Výsledky základních kultivací kvasinek na C/N poměru 25	53
5.3.1	Růstové charakteristiky a celková biomasa kvasinek při C/N poměru 25	53
5.3.2	Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu na C/N poměru 25.....	53
5.3.3	Produkce lipidů na C/N poměru 25	56
5.3.3.1	Zastoupení mastných kyselin	57
5.4	Výsledky základních kultivací kvasinek na C/N poměru 50	58
5.4.1	Růstové charakteristiky a celková biomasa kvasinek při C/N poměru 50	58
5.4.2	Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu na C/N poměru 50.....	58
5.4.3	Produkce lipidů na C/N poměru 50	61
5.4.3.1	Zastoupení mastných kyselin	62
5.5	Výsledky základních kultivací kvasinek na C/N poměru 100	63
5.5.1	Růstové charakteristiky a celková biomasa kvasinek při C/N poměru 100	63
5.5.2	Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu na C/N poměru 100.....	63
5.5.3	Produkce lipidů na C/N poměru 100	66
5.5.3.1	Zastoupení mastných kyselin	67
5.6	Velkoobjemové kultivace kvasinek s časovými odběry	68
5.6.1	Růstové křivky během kultivace a celkové biomasy kvasinek	68
5.6.2	Časová závislost produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu.....	72
5.6.2.1	Glukózové médium	72
5.6.2.2	Glycerolové médium	73
5.6.2.3	Tukové médium.....	75
5.6.2.4	Tukové médium s přidavkem emulgátoru.....	76
5.6.2.5	Médium s částečně hydrolyzovaným tukem	78
5.6.2.6	Tukové médium s přidavkem enzymu	79
5.6.3	Produkce lipidů v průběhu kultivace	81
5.6.3.1	Zastoupení mastných kyselin v průběhu kultivace	83
5.6.4	Lipolytická aktivita komerčního enzymu během kultivace.....	87
5.6.4.1	Kalibrační křivka.....	88
5.7	Kultivace kvasinky <i>Rhodotorula glutinis</i> ve fermentoru	89
5.7.1	Růstová charakteristika a celková biomasa	89
5.7.2	Produkční vlastnosti na médiu s částečně hydrolyzovaným odpadním tukem	90
5.7.2.1	Karotenoidy, ergosterol a ubichinon	90
5.7.2.2	Lipidy a mastné kyseliny.....	91
5.7.2.3	Lipolytická aktivita	92
5.7.3	Produkční vlastnosti na médiu s odpadním tukem a syrovátkou.....	93
5.7.3.1	Karotenoidy, ergosterol a ubichinon	93
5.7.3.2	Lipidy a mastné kyseliny.....	94

6	ZÁVĚR.....	95
7	LITERATURA.....	97
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	101
9	PŘÍLOHA.....	102
9.1	Fotografie výsledných kvasinkových kultur u základních kultivací	102

1 ÚVOD

Jedním z mnoha úkolů moderních biotechnologií je co nejefektivněji zužít odpadů vznikajících z různých odvětví průmyslu či potravinářských výrob a dále je převést na zajímavý a cenný produkt s přidanou hodnotou. Takovým odpadem může být živočišný tuk, který vzniká zejména v potravinářském průmyslu a získává se v kafilériích pomocí extrakce. Obsahuje tuky v podobě triacylglycerolů, které mohou dobře sloužit jako uhlíkatý zdroj pro kultivace karotenogenních kvasinek. Tento substrát se může využít surový nebo jej lze upravovat pomocí chemických či biochemických reakcí.

Karotenogenní kvasinky jsou známé pro produkci karotenoidních barviv a také pro velkou schopnost akumulace lipidů ve svých buňkách. Karotenoidy jsou přírodní pigmenty, které jsou pomocí sekundárního metabolismu produkovány v největší míře rostlinami, ale i některými živočichy nebo mikroorganismy. V organismech slouží jako silné antioxidanty, chrání buňky a jsou důležitým prekurzorem vitamínů a hormonů. Hojně se využívají v potravinářském, zemědělském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Lze z nich vyrábět léčiva, vitamínové doplňky a barviva. Lipidy jsou v organismech zásobárnou energie a hlavní složkou biomembrán, zaujímají mnoho dalších důležitých funkcí. Jejich největší potenciál v průmyslu je ve využití pro výrobu biopaliv. Díky vysokému podílu nenasycených mastných kyselin u kvasinkových lipidů, se tyto látky hodí pro výrobu farmaceutických preparátů a doplňků stravy snižujících hladinu cholesterolu.

Tato diplomová práce je zaměřena na valorizaci živočišného odpadního tuku a srovnání růstu a produkčních vlastností vybraných karotenogenních kvasinek. Předložená práce byla vypracována v rámci mezinárodního projektu „LipoFungi“, který se zabývá biokonverzí živočišného odpadního tuku na mikrobiální biomasu, která bude obohacena o zajímavé metabolity, jako jsou například právě zmíněné karotenoidy, lipidy či ergosterol a ubichinon.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou jednobuněčné eukaryotické chemoheterotrofní organismy, které patří do říše hub. Rozmnožování kvasinek probíhá zejména nepohlavně pomocí dělení buněk, kterému se říká pučení. Kvasinky nejsou schopny tvořit micelární struktury, ale mohou žít i v koloniích, kdy tvoří pseudomycelia. Jejich velikost a následné vlastnosti závisí na druhu, na prostředí, ve kterém žijí, a na nutričních podmínkách. To vše ovlivňuje jejich růst a metabolickou aktivitu.

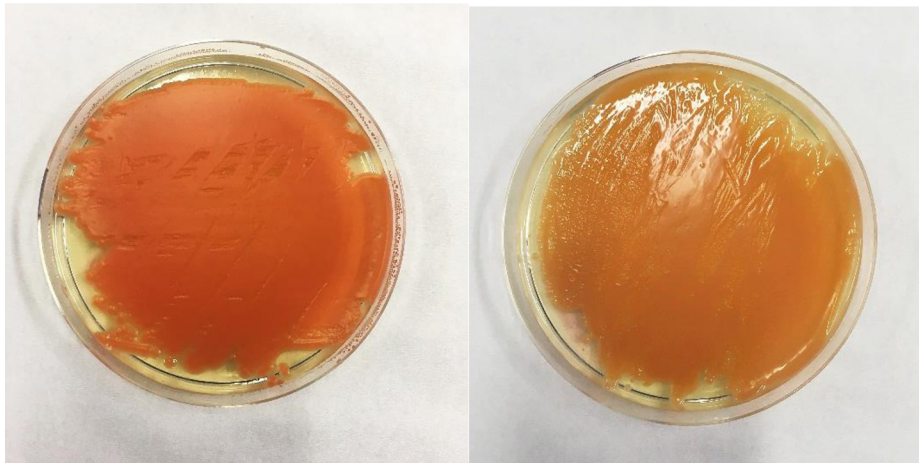
Výskyt kvasinek je široký a nachází se po celém světě. Jejich rozmanitost a aktivita zasahuje do mnoha vědních disciplín, technologií a lékařství. Některé druhy mají důležitou roli v potravinářském průmyslu při výrobě nápojů nebo pečiva, jiné lze využít k produkci biopaliv nebo léčiv [1] [2] [3].

2.1.1 Karotenogenní kvasinky

Karotenogenní kvasinky jsou kvasinky třídy *Basidiomycetae*, které jsou charakteristické produkcí karotenoidních pigmentů a jejich akumulací v buňce. Mezi tyto barviva se řadí β -karoten, torularhodin a torulen. Díky tomu mají typické zbarvení v odstínech žluté, oranžové až sytě červené barvy. Některé druhy těchto kvasinek mají i vysokou schopnost produkce lipidů, které obsahují vysoký podíl polynenasycených mastných kyselin. Syntézu karotenoidů a lipidických látek v kvasinkové buňce lze ovlivnit pomocí podmínek kultivace, intenzity osvětlení, přístupu kyslíku a složení kultivačního média [1] [2] [4] [5].

2.1.1.1 Rod *Rhodotorula*

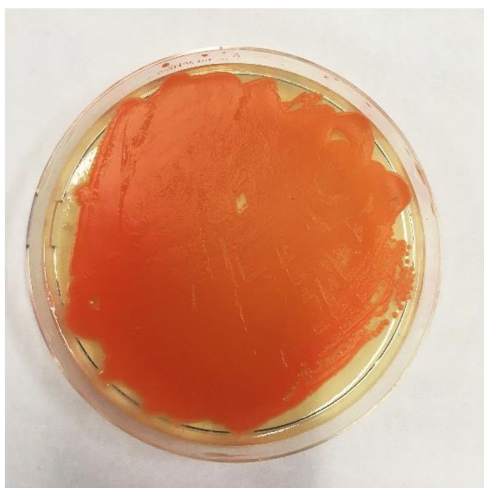
Kvasinky rodu *Rhodotorula* se vyznačují kulovitým až oválným tvarem a žlutým až červenorůžovým zbarvením buněk. Zástupci tohoto rodu nemají schopnost zkvašovat cukry, ale jejich pentózový cyklus je vysoce vyvinutý na využití glukózy. Tyto kvasinky se v přírodě běžně vyskytují, lze je nalézt ve vodách i půdě nebo v symbióze s různými rostlinami a živočichy. Samy ale netvoří žádné spory ani pseudomycelia. Z biotechnologického hlediska se jedná o velice významný a využívaný rod, schopný vysoké produkce karotenoidů i lipidů se zajímavým a velkým spektrem polynenasycených mastných kyselin, jako je například kyselina linolová. Nejznámějšími zástupci tohoto rodu jsou *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* a *Rhodotorula minuta* [1] [2] [6] [7] [8] [9] [10].



Obrázek 1 *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula micilaginosa*

2.1.1.2 Rod *Cystofilobasidium*

Pro kvasinky rodu *Cystofilobasidium* je typické tvořit hladké a lesklé kolonie, jejichž buňky jsou kulaté až protáhlé se světle žlutým až červeným zbarvením. Charakter basidia těchto kvasinek je jednobuněčný a neseptovaný, říká se mu holobasidium. Ve své buněčné stěně obsahují xylózu a zvládnou využít glukoronát. Mezi zástupce patří druhy *Cystofilobasidium bisporidii*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* a *Cystofilobasidium macerans* [1] [2] [6] [7] [8].



Obrázek 2 *Cystofilobasidium macerans*

2.1.1.3 Rod *Sporidiobolus*

Rod kvasinek *Sporidiobolus* zahrnuje přibližně dvacet zástupců, kteří jsou charakterističtí buňkami kulovitě až elipsoidního tvaru. Jejich kultury jsou ploché a drsné. Mají silnou karotogenezi a proto je jejich zbarvení někdy až tmavě červené. Tyto kvasinky se mohou vyskytovat ve fylosféře a atmosféře, kde jim jako zdroj dusíku stačí redukované formy dusíkatých sloučenin. Kvasné schopnosti u těchto kvasinek nejsou. Mezi nejznámější zástupce se řadí *Sporidiobolus metaroseus*, *Sporidiobolus microsporus*, *Sporidiobolus pararoseus* a *Sporidiobolus salmonicolor* [1] [2] [6] [8].



Obrázek 3 *Sporidiobolus pararoseus*

2.1.2 Cytologie kvasinek

Každá buňka je základní stavební a funkční jednotka všech živých organismů. Kvasinky mají eukaryotické buňky, které se od prokaryotických liší membránovými organelami. Proto jsou eukaryotické buňky podstatně složitější, vysoce organizované a také větší. Eukaryotická kvasinková buňka se skládá z těchto organel:

Buněčná stěna kvasinek je pevná struktura, která odděluje buňku od vnějšího prostředí a chrání ji před působením osmotického tlaku. Díky velkým pórům, které jsou na jejím povrchu, slouží k transportu a přenosu látek jak nízkomolekulárních tak vysokomolekulárních. Buněčná stěna je složena z polysacharidů, proteinů, lipidů a fosfolipidů [6] [7] [11] [12].

Cytoplasmatická membrána je tenký semipermeabilní obal umístěný pod buněčnou stěnou. Skládá se z lipidové dvojvrstvy se zakotvenými proteiny. Pomocí těchto proteinů jsou přenášeny látky, které nejsou rozpustné v tucích, tudíž se přes lipidickou složku nedostanou [11] [12] [13].

Cytoplasma je homogenní transparentní hmota tvořící buněčné prostředí s pH kolem 6 – 6,5. Složení této hmoty je různorodé, tvoří ji převážně voda, anorganické molekuly, enzymy, různé rezervní látky a vedlejší produkty metabolismů [12] [13].

Jádro je nejdůležitější organelou. Má dvě membrány, které tvoří jeho obal. Jsou v něm obsaženy dlouhé polymery molekul DNA, které obsahují genetickou informaci [14].

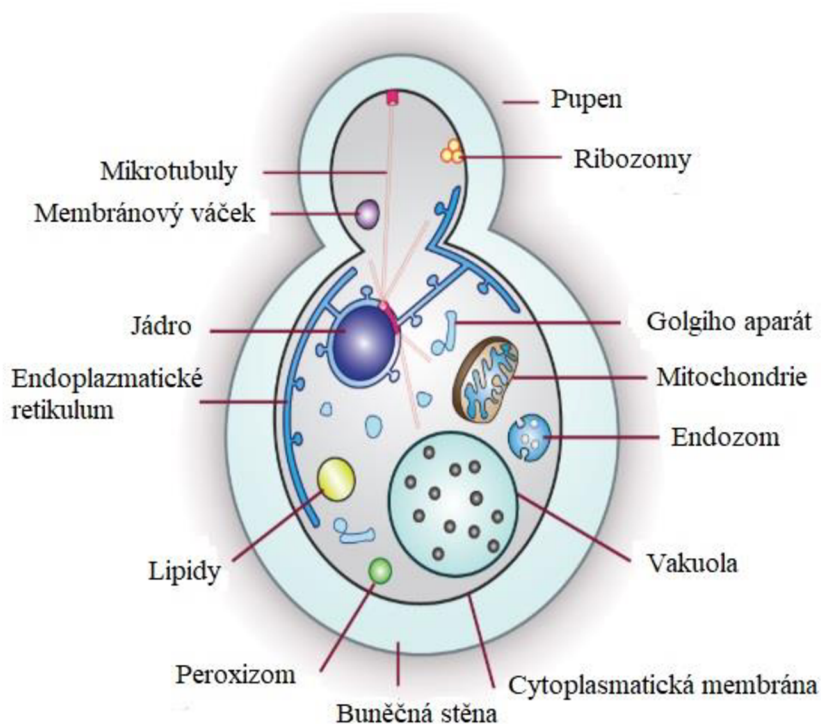
Mitochondrie se nacházejí v cytoplasmě a mají dvě membrány, vnitřní a vnější. Mitochondrie jsou generátory chemické energie pro buňky, obsahují enzymy dýchacího řetězce a probíhá v nich buněčné dýchání [12] [14].

Vakuola je další kulovitý útvar s membránou vyskytující se v cytoplasmě. Velikost a počet vakuol se odvíjí od stáří buňky. Mladé buňky mají hned několik drobných vakuol, oproti tomu ve starých buňkách se nachází jedna velká vakuola. Uvnitř se mohou nacházet enzymy, aminokyseliny, anorganické ionty a jiné [14] [15].

Golgiho aparát je organela podílející se na syntéze molekul určených pro export z buňky. Tento aparát se skládá ze zploštělých membránových váčků poskládaných do stohů, ze kterých se postupně odškrucují malé váčky [13] [14] [15].

Endoplazmatické retikulum vytváří u kvasinek lamely, cisterny a tubuly a rozlišuje se na hladké a drsné. Drsné se specializuje na syntézu některých proteinů, v hladkém probíhají procesy odstraňování toxických látek a regulace vápenatých iontů [13] [15].

Ribozomy jsou velké komplexní struktury složeny zejména z rRNA a proteinů a probíhá v nich translace. Peroxizom je organela, která se podílí na různých metabolických drahách a slouží k likvidaci toxických substancí. Mikrotubuly jsou vláknité struktury a slouží k transportu látek uvnitř buňky [13] [14] [15].



Obrázek 4 Buňka kvasinky [12]

2.1.3 Růstová křivka

Základní charakteristikou vývoje kvasinkové kultury je růstová křivka, která udává nárůst počtu buněk za určitý čas. Rychlost růstu závisí na několika faktorech, z nichž nejvýznamnější je teplota kultivace, přístup světla a kyslíku a složení živného média.

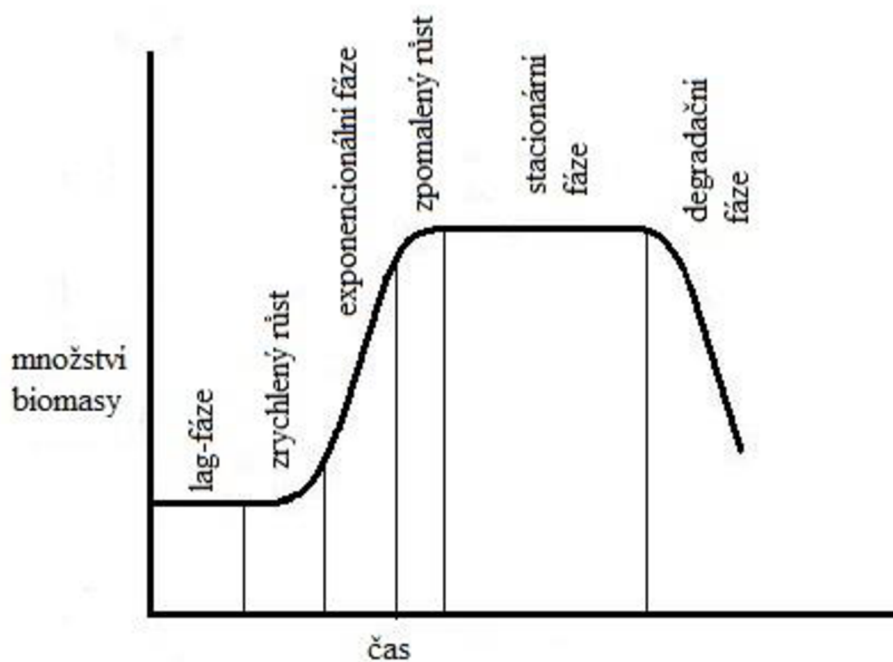
První fází je lag-fáze, při které se buňky adaptují na nové prostředí, syntetizují si složky nutné pro dělení, potřebné enzymy a zvětšují se. Buňky, které se v této fázi neadaptují, odumírají.

Následuje fáze zrychleného růstu, kdy jsou kvasinky už přizpůsobené a začíná samotné dělení buněk.

V exponenciální neboli logaritmické fázi probíhá intenzivní dělení, populace exponenciálně narůstá a generační doba je zde nejkratší. Tuto fázi lze ovlivnit množstvím limitujících živin, protože po jejich vyčerpání následuje fáze zpomaleného růstu, při které se rychlost množení výrazně zpomalí.

Ve stacionární fázi se buňky už přestávají množit a nově vytvořené nahrazují odumírající buňky. Vzniká tedy stav rovnováhy a počet buněk se výrazně nemění. Dochází k akumulaci primárních metabolitů a syntéze sekundárních metabolitů.

Poslední etapou je fáze odumírání, kdy počet buněk klesá a v médiu se začínají hromadit mrtvé buňky. Může zde docházet i ke tvorbě klidových stádií [6] [11].



Obrázek 5 Růstová křivka [11]

2.2 Enzymy

Enzymy jsou bílkovinné molekuly s katalytickou aktivitou. V živých organismech enzymy fungují jako biokatalyzátory, které se uplatňují při řadě biochemických reakcí a určují jejich povahu a rychlost.

Enzymy a enzymové technologie nachází široké využití v potravinářském, textilním, papírenském průmyslu, v odpadovém hospodářství, při výrobě biopaliv, ale také mají velký význam ve farmacii, vědě a výzkumu. Enzymy se rozlišují podle charakteru aplikace a požadavků na čistotu, cenu výroby, náročnost izolace a způsob úpravy a stabilizace. V průmyslu je u enzymů kladen důraz na velkou produkci, velkoobjemové použití a ekonomickou přijatelnost. Kdežto enzymy používané pro vědecké účely vyžadují vysokou čistotu, často náročnou izolaci a stabilizaci, což vede k vysoké ceně preparátu [16] [17] [18].

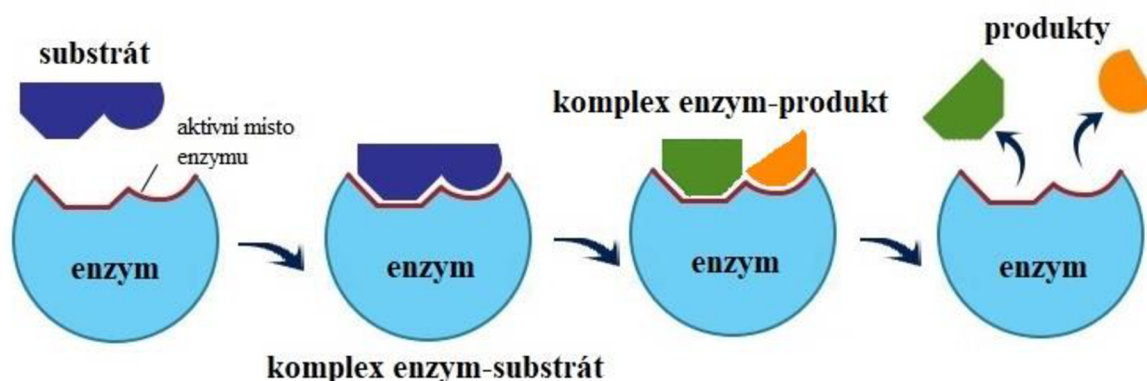
2.2.1 Stavba a rozdělení enzymů

Katalyticky funkční enzym může být buď jednoduchý a obsahovat pouze bílkovinou část, nebo složený. Složené enzymy ke své funkci potřebují i nebílkovinné molekuly, kterým se říká kofaktory. Úkolem kofaktorů je umožnit přenos funkčních skupin, atomů či elektronů během reakcí. Kofaktory se mohou rozdělovat do dvou skupin: na koenzymy a prostetickou skupinu. Koenzymy se váží na bílkovinu pouze slabě a mohou lehce disociovat, zatímco prostetická skupina kofaktorů tvoří s bílkovinou silnou a stabilní molekulu.

Enzymy lze rozdělit na intracelulární a extracelulární. Intracelulární enzymy vznikají v buňce a poté v ní vykonávají specifické funkce. Extracelulární enzymy jsou po vzniku vylučovány do prostředí, ve kterém se buňka nachází, a mají především za úkol štěpit potřebné živiny. Enzymy se dále klasifikují podle typu katalyzované reakce do šesti hlavních tříd: oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, izomerázy a ligázy [17] [18].

2.2.2 Enzymatická reakce

Enzymatická reakce probíhá na aktivním centru enzymu, což je malá část molekuly se specifickým rozmístěním funkčních skupin. Nejčastěji se skládá z několika zbytků aminokyselin s reaktivními skupinami ve vedlejších řetězcích. Vazba mezi substrátem a aktivním místem je vysoce specifická. Enzymatická reakce probíhá v několika stupních. V prvním kroku se vytvoří komplex enzym-substrát a následně se aktivuje. Dále proběhne chemická přeměna a vzniká komplex enzym-produkt, ze kterého se v posledním kroku oddělí produkt od enzymu. Rychlost enzymatických reakcí závisí na koncentraci substrátu, množství enzymu, fyzikálních a chemických podmínkách jako je teplota a pH [17] [20].



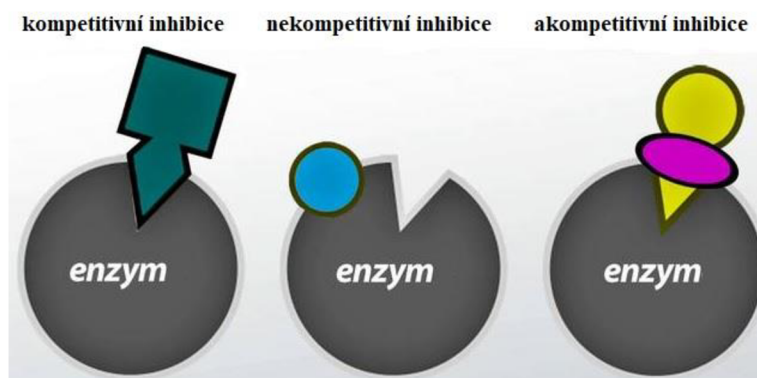
Obrázek 6 Schéma enzymatické reakce [17]

2.2.2.1 Aktivátory a inhibitory enzymatických reakcí

Zvyšovat aktivitu těchto reakcí mohou látky zvané jako aktivátory, naopak inhibitory mohou snižovat účinek enzymů. Při navázání inhibitoru na enzym dojde k omezení nebo úplnému zamezení správného průběhu reakce. Lze rozlišovat přirozenou inhibici, která je určena jako regulátor buněčných procesů, nebo nepřirozenou inhibici, kdy jako inhibitor vystupují různá léčiva, jedy, ionty kovů (Hg^+ , Fe^{2+} , Cu^+ , Pb^{2+}), nízkomolekulární anorganické látky, vysokomolekulární organické látky nebo zplodiny metabolismu [17] [20].

Podle způsobu účinku mohou být inhibitory rozděleny do dvou skupin – reverzibilní a nevratné. Nevratná neboli ireverzibilní inhibice je spojená s tvorbou kovalentní vazby nebo hydrofobní interakce mezi enzymem a inhibitorem, tudíž inhibitor disociuje z komplexu enzym-inhibitor velmi pomalu. Tyto inhibitory jsou někdy nazývány jako enzymové jedy. U reverzibilní inhibice existuje rovnováha mezi tvorbou a disociací komplexu enzym-inhibitor. Zde se inhibitor váže pomocí nekovalentních interakcí, jako jsou vodíkové nebo iontové vazby [21] [22].

Prvním typem reverzibilní inhibice je kompetitivní inhibice, kdy inhibitor soutěží se substrátem o vazebné místo enzymu. Inhibitor dost často svou strukturou připomíná substrát. U druhého typu, kterým je nekompetitivní inhibice, se inhibitor váže na alosterická místa enzymu, nebrání vazbě substrátu, ale způsobí zamezení přeměny na produkt. Třetím typem je akompetitivní inhibice, při které se inhibitor váže na komplex enzym-substrát a znemožňuje přeměnu na produkt, výsledkem je komplex enzym-substrát-inhibitor [21] [22].

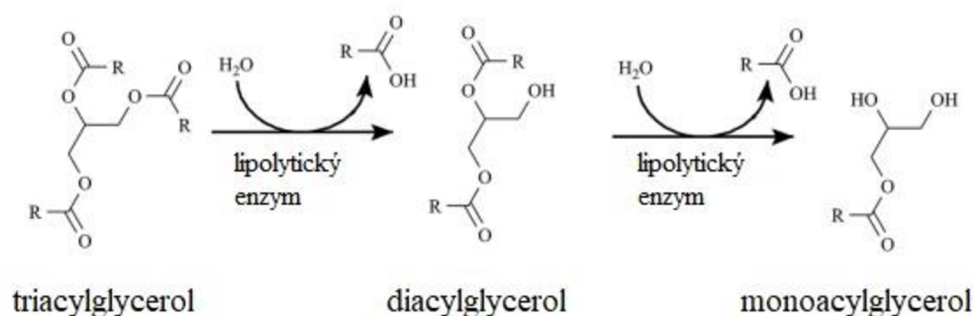


Obrázek 7 Inhibice u enzymatických reakcí [22]

Opakem inhibitorů jsou enzymové aktivátory. Ty se váží na molekulu enzymu a pozitivně ovlivňují rychlost enzymatické reakce. Mnoho enzymů je specificky a přímo aktivováno vápenatými kationty, které v něm mají speciální místo pro vazbu a po navázání dojde ke změně konformace příslušného enzymu a tím i ke zvýšení jeho aktivity. Enzymy se dají aktivovat i eliminací určitých enzymových inhibitorů, jako jsou například kationty těžkých kovů. K tomuto se využívají malé organické sloučeniny jako kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) nebo EGTA. Pro aktivaci živočišných amylas lze využít chloridové ionty [17] [20] [21] [22].

2.2.3 Lipolytické enzymy

Lipolytické enzymy jsou skupina enzymů patřících do třídy hydroláz, které katalyzují hydrolýzu tuků na glycerol a mastné kyseliny. Jako lipázy se označují enzymy hydrolyzující acylglyceroly s řetězcí mastných kyselin obsahujícími minimální počet uhlíku 10. Lipázy jsou aktivní především na rozhraní lipid – voda. Lipolytické enzymy, hydrolyzující acylglyceroly s uhlíkatým řetězcem mastných kyselin kratším než 10 C, se nazývají esterázy či karboxylázy. Tyto enzymy vykazují aktivitu především ve vodných roztocích [17] [23] [24].



Obrázek 8 Mechanismus hydrolýzy pomocí lipolytických enzymů [17]

Lipolytické enzymy se dělí do tří skupin. První skupinou je skupina nespecifická. Enzymy spadající do této kategorie zcela hydrolyzují vazbu na všech třech pozicích a tím vzniká glycerol a mastné kyseliny. Druhou skupinou jsou lipolytické enzymy s 1,3- specifitou. Tyto enzymy jsou schopné uvolňovat mastné kyseliny z vnějších pozic, a tak tvoří 1,2-diacylglyceroly, 2,3-diacylglyceroly a 2-monoacylglyceroly. Poslední třetí skupina je specifická a enzymy preferují jen vybrané mastné kyseliny [17] [23] [24].

Lipázy jsou produkovány ve většině případů extracelulárně na konci exponencionální a začátku stacionární fáze růstu mikroorganismů. Na její produkci se podílí řada faktorů během kultivace jako je teplota, pH, přístup kyslíku, zdroj živin a obsah solí. Lipázy jsou produkovány v minimálním množství nepřetržitě, ale řadí se mezi indukovatelné enzymy, tudíž k jejich zvýšené produkci dochází tehdy, jestliže mají v médiu tzv. induktor. Tím mohou být například různé mastné kyseliny jako kyselina olejová nebo palmitová. Lipáza ve většině případů nevyžaduje žádný kofaktor, optimální pH pro aktivitu lipázy je v rozmezí 6 až 9 a lze ji podpořit přidáním vápenatých kationtů [17] [23] [24].

2.2.3.1 Produkce lipáz pomocí mikroorganismů

Syntéza lipáz probíhá téměř ve většině mikroorganismech, ale jen některé mikroorganismy jsou vhodné k jejich výrobě a průmyslovému využití. U jejich výběru je podstatná dostatečná produkce lipáz, náročnost na izolaci a požadované vlastnosti. Existují i genetické manipulace s DNA, které vedou ke zvýšení produkce či změně kvality. Produkce lipáz se dá stimulovat i pomocí živných médií s proměnlivým obsahem lipidů, triacylglycerolů a mastných kyselin, které mohou indukovat zvýšenou syntézu. Mezi komerčně využívané mikroorganismy schopné produkovat lipázy z kvasinek patří *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Candida tropicalis*, kvasinky rodu *Pichia*, *Saccharomyces* a *Rhodotorula*. Z plísní to jsou *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus nigricans* a plísně rodu *Penicillium* [25] [26] [27].

2.2.3.2 Aplikace a využití lipáz

Využití lipáz má v dnešní době ohromný biotechnologický potenciál. Jsou to biokatalyzátory, které se využívají v potravinářském průmyslu při výrobě sýrů, kde zajišťují hydrolýzu mléčného tuku, k výrobě piva a vína nebo potravinových doplňků. Velké uplatnění nachází i ve farmacii při specifických hydrolýzách, v kosmetice například při modifikacích monoglycerolů a přípravě emulgátorů nebo v textilním průmyslu. Klíčovou roli hrají při syntéze biopolymerů, aromatických sloučenin, chemikálií a také při výrobě biopaliv. Zájem o tyto enzymy a jejich důležitost se neustále zvyšuje [25] [26] [27].

2.3 Sledované metabolity kvasinek

Kvasinky jsou schopné ve své buňce akumulovat široké spektrum látek, z nichž mnoho nachází významné biotechnologické uplatnění. Tyto látky se pak dále využívají jako různé výživové doplňky jak lidí, tak zvířat, nebo ke krmným účelům. Některé mohou sloužit i jako biopaliva. Kvasinková buňka je tvořena z sacharidů, proteinů, lipidů, vitamínů, stopových prvků, pigmentů a antioxidantů [2] [28].

2.3.1 Karotenoidy

Karotenoidy zastupují jednu z nejzajímavějších skupin přírodních pigmentů. Jsou to bezdusíkaté organické látky spadající do skupiny terpenů. Tyto pigmenty jsou nenasycené nepolární molekuly, které se vyskytují v chromoplastech nebo mohou být vázány na membrány thylakoidů, nachází se i v cytoplasmatické membráně, kde slouží jako fotoprotektor. Jejich syntéza vychází z izoprenoidní dráhy a jsou to produkty sekundárního metabolismu zejména rostlin a některých druhů mikroorganismů. Skládají se z osmi izoprenových jednotek složených do polyenového řetězce obvykle obsahujícího 40 uhlíkových atomů. V řetězci se nachází konjugované dvojné vazby, které se vyskytují hlavně v konfiguraci trans.

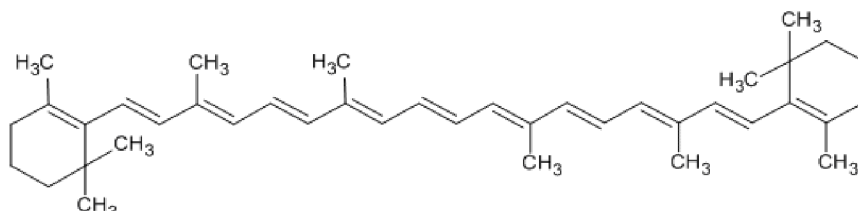
Řetězec může být různě větvený, mohou na něm být navázané methylové skupiny a postranní konce řetězce mohou být cyklické či lineární. Tyto faktory nejvíce ovlivňují vlastnosti karotenoidů [28] [29] [30] [31].

Karotenoidy mohou být červené, oranžové a žluté. Podle obsahu kyslíku ve své molekule se tedy dělí do dvou skupin, které se odlišují zbarvením. Karoteny ve své molekule nemají kyslík a představují červené pigmenty. Základním karotenem je lykopen, z jeho struktury se pomocí cyklizačních reakcí derivují ostatní zástupci karotenů jako je γ -karoten, ψ -karoten a β -karoten. Xantofyly jsou produkty oxidačních reakcí karotenů a ve svém uhlovodíkovém řetězci obsahují kyslík. Vystupují jako žluté pigmenty a nejznámější jsou lutein, violaxantin a kantaxantin [28] [29] [30] [31] [32] [32].

Dále se karotenoidy mohou dělit podle struktury řetězce, a hlavně dle jeho zakončení, v tomto případě se rozlišují tři skupiny. Dicyklické karotenoidy mají oba konce řetězce zacyklené. Monocyklické mají na jednom konci cyklický útvar složený z pěti nebo šesti uhlíků a poslední acyklické karotenoidy mají oba konce řetězce lineární [28] [29] [30] [31] [32] [32].

2.3.1.1 *B-karoten*

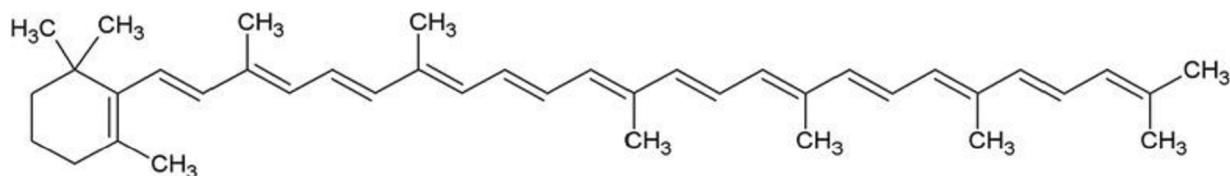
Ze všech zástupců karotenoidů je nejvýznamnější právě β -karoten. Vzniká ze základního řetězce lykopenu cyklizací, při které vznikají iontové struktury na koncích, a je tvořen dvěma β -iononovými strukturami. Samostatně se nachází jako žlutočervené barvivo a slouží jako antioxidant. U živočichů ale hraje důležitou roli jako jeden z hlavních prekurzorů vitamínu A, kdy z jedné jeho molekuly vzniknou dvě jednotky vitamínu A. Nedostatek tohoto vitamínu způsobuje snížení tvorby rhodopsinu a tím šeroslepost, záněty očních spojivek a poškození sítnice, dále snižuje imunitu a zvyšuje riziko vzniku karcinomu [28] [30].



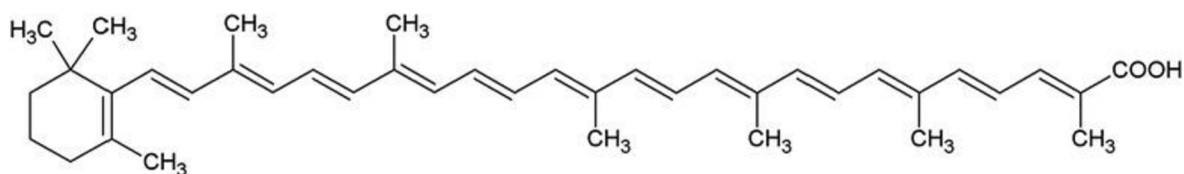
Obrázek 9 β -karoten

2.3.1.2 *Torulen a torularhodin*

Torulen a torularhodin jsou dalšími významnými karotenoidy syntetizovanými především kvasinkami a houbami. Nejvýznamnějšími producenty těchto pigmentů jsou kvasinky rodu *Rhodotorula* a *Sporidiobolus*. Mají jeden p-iononový kruh připojený k polyenovému řetězci. Díky přítomnosti třinácti dvojných vazeb má torulen a torularhodin silné antioxidační vlastnosti a antimikrobiální vlastnosti. Studie těchto pigmentů ukázaly, že torulohorin z *R. glutinis* měl větší záchytovou aktivitu vůči peroxylovým radikálům a inhiboval degradaci singletovým kyslíkem účinněji než β -karoten [28] [34].



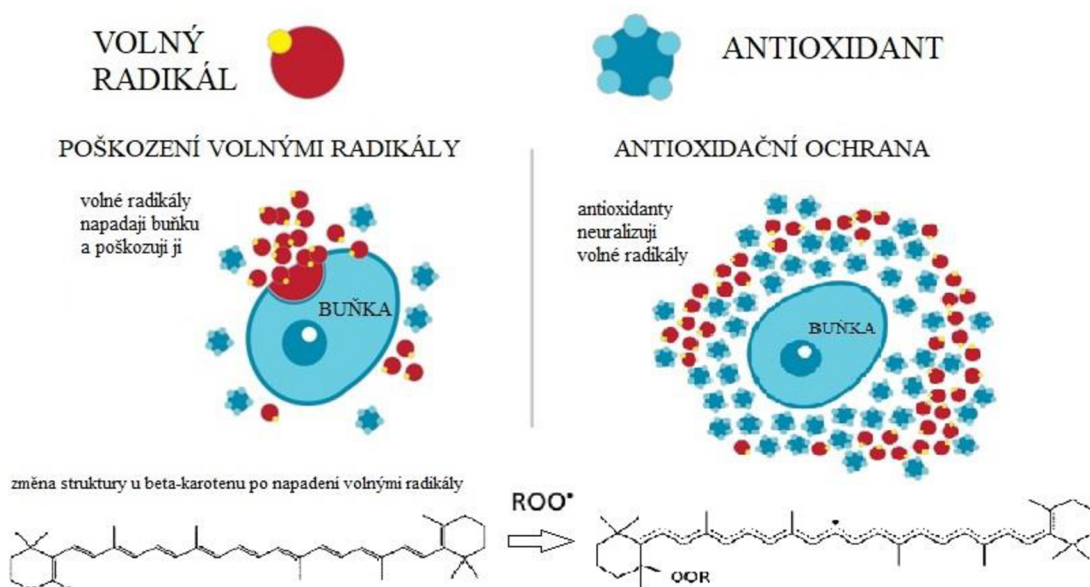
Obrázek 10 Torulen



Obrázek 11 Torularhodin

2.3.1.3 Funkce a význam karotenoidů

Karotenoidy působí jako sekundární anténní systémy v chloroplastech a také chrání buňku před poškozením slunečními paprsky. Mají výrazné antioxidační účinky a chrání proti volným radikálům a vysoce reaktivních forem kyslíku. Jsou schopny absorbovat světelné záření mezi 400 až 500 nm [31] [32] [33].



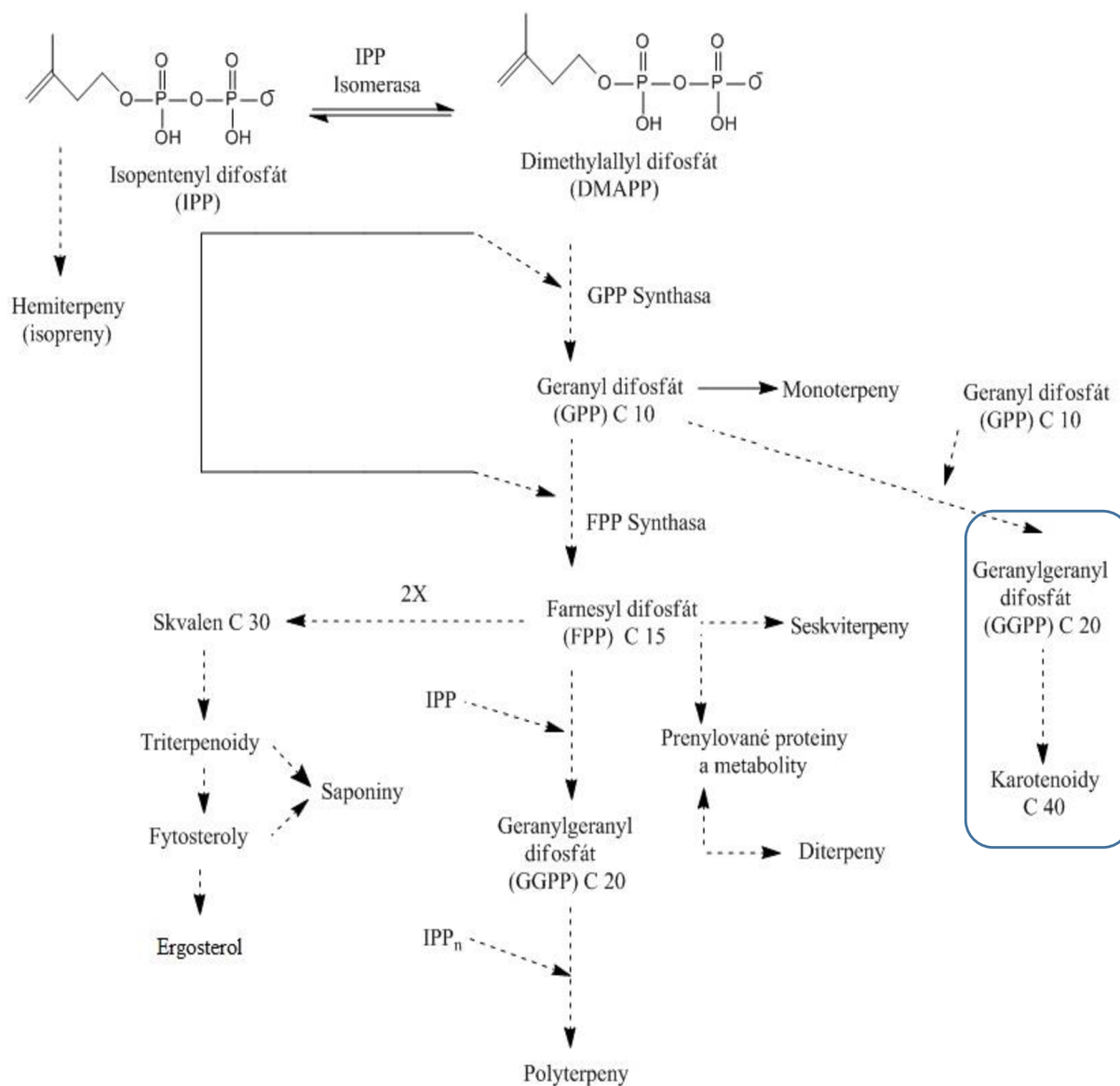
Obrázek 12 Antioxidační ochrana před volnými radikály

Je pravděpodobné, že karotenoidy mohou být spojeny s modifikací propustnosti membrány a tím zvýšenou buněčnou odolností proti oxidaci a záření. Využívají se mohou ve farmaceutickém průmyslu jako doplňky stravy nebo mohou pomáhat při léčbě rakoviny a pozitivně ovlivňují funkci kardiovaskulární i nervové soustavy. Dále v kosmetickém průmyslu ke stabilizaci výrobků, mohou se přidávat jako barviva do potravin nebo do krmných směsí pro zvířata [31] [32] [33].

2.3.1.4 Biosyntéza karotenoidů

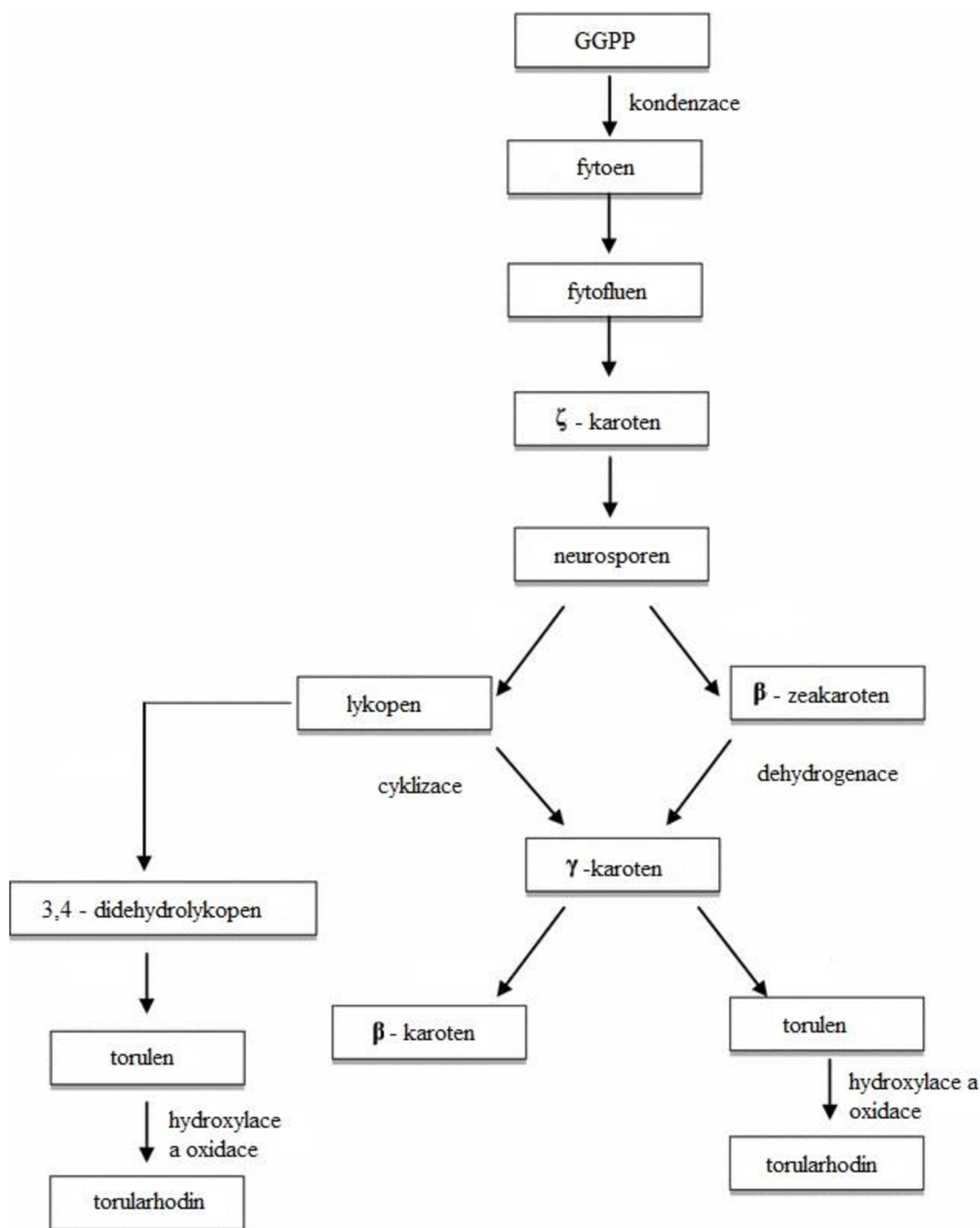
Karotenoidy se v přírodě většinou vyskytují v 40-ti uhlíkaté kostře s dvojnými vazbami. Acetyl-CoA je klíčovou molekulou pro jejich syntézu. Získává se z β -oxidace mastných kyselin nebo z aerobního odbourávání sacharidů. Syntéza karotenoidů probíhá v jedné z větví izoprenoidní dráhy. V první části této složité biosyntézy se acetyl-CoA přemění mevalonátovou dráhou přes mezi produkt kyselinu mevalonovou na produkt isopentenylpyrofosfát. Kondenzací dvou jednotek isopentenylpyrofosfátu hlava k patě vzniká geranylpyrofosfát (GPP). Další kondenzací těchto dvou molekul (GPP) taktéž hlava k patě pak vzniká geranylgeranylpyrofosfát (GGPP).

Následující krok je kritický a vede ke vzniku fytoenu, což je první C₄₀ acyklický karotenoidní skelet. Ten vzniká kondenzací dvou molekul geranylgeranylpyrofosfátu hlava k hlavě. Fytoen dále podstupuje řadu desaturačních a cyklizačních reakcí za vzniku lycopenu s 11 nenasycenými vazbami. Z něj se dále odvozují a vznikají další barevné karoteny a xantofyly [18] [28] [30] [35].



Obrázek 13 Syntéza karotenoidů [18]

Biosyntéza karotenoidů v buňkách mikroorganismů zahrnuje řadu enzymatických reakcí. Kondenzace dvou jednotek GGPP je katalyzována fytoen-syntázou. Další postupné reakce katalyzuje enzym fytoen-desaturáza. Tento enzym se podílí na tvorbě neurosporenu. Neurosporen může být přeměněn na lycopenu nebo β -zeakaroten. Cyklizace lycopenu nebo dehydrogenace β -zeakarotenu vede k tvorbě γ -karotenu. Molekula γ -karotenu poskytuje prekurzor pro biosyntézu β -karotenu a torulenu, zatímco torularhodin se získává v další transformaci torulenu pomocí hydroxylace a oxidace [18] [28] [30] [35].



Obrázek 14 Biosyntéza karotenoidů podrobně [18] [30]

2.3.1.5 Faktory ovlivňující biosyntézu karotenoidů u mikroorganismů

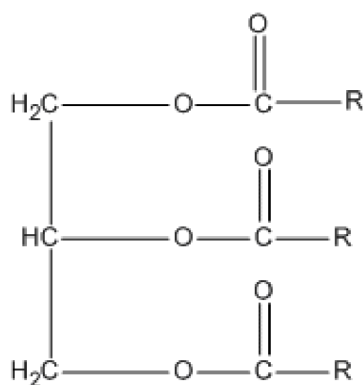
Výtěžnost karotenoidů a jejich procentuální zastoupení není u mikroorganismů konstantní. Jejich obsah závisí zejména na kmeni kvasinek. Avšak některými parametry lze zvýšit jejich produkci. Nejdůležitější faktor, který ovlivňuje karotenogenezi je zdroj uhlíku a dusíku v kultivačním médiu. Nejvyšší celková hladina karotenoidů u kmene *R. glutinis* byla stanovena na kultivaci, kde jako zdroj uhlíku sloužil koncentrovaný hroznový mošt. Pro zvýšení produkce karotenoidů lze do média přidat jako zdroj dusíku pepton či síran amonný. Mikroelementy v kultivačním médiu jsou dalším faktorem ovlivňujícím biosyntézu karotenoidů. Přítomnost kovových iontů může inhibovat nebo i stimulovat enzymy podílející se na karotenogenezi. Například ionty zinku a manganu mohou zcela inhibovat syntézu torulenu [30] [31].

Dalším faktorem je teplota kultivace. Obecně platí, že při nižších teplotách je stimulována syntéza β -karotenu a naopak vyšší teploty podporují produkci torulenu a torularodinu. Syntézu lze ovlivňovat intenzitou aerace, ozařováním nebo přidáním různých chemikálií [30] [31].

2.3.2 Lipidické látky

Lipidy jsou estery glycerolu a vyšších karboxylových kyselin, které mohou být nasycené, tak i nenasycené. Jedná se o látky hydrofobní povahy, které jsou nerozpustné ve vodě. V živých organismech zauímají hned několik funkcí. Lipidy plní strukturní a obrannou funkci a jsou také důležitou součástí biomembrán. Tuky se podle složení mohou dělit na homolipidy a heterolipidy. Mezi heterolipidy patří fosfolipidy, glykolipidy a lipoproteiny. K homolipidům patří tuky, oleje a vosky, což jsou estery vyšších karboxylových kyselin [36] [37].

Triacylglyceroly tvoří hlavní složku tuků a jsou to estery glycerolu a vyšších mastných kyselin. Strukturu triacylglycerolu tvoří glycerol a tři molekuly mastných kyselin, které jsou pomocí esterových vazeb navázány na každé z hydroxylových skupin glycerolu. Při působení se na tyto esterové vazby enzymem lipázou, dochází k hydrolýze a vznikají mastné kyseliny spolu s glycerolem. Triacylglyceroly se nacházejí ve všech rostlinných i živočišných tucích a tvoří hlavní složkou lipoproteinů. Pomocí transesterifikace lze lipidy štěpit na alkylestery mastných kyselin, které jsou dále využívány jako biopalivo [36] [37] [38] [39].



Obrázek 15 Triacylglycerol

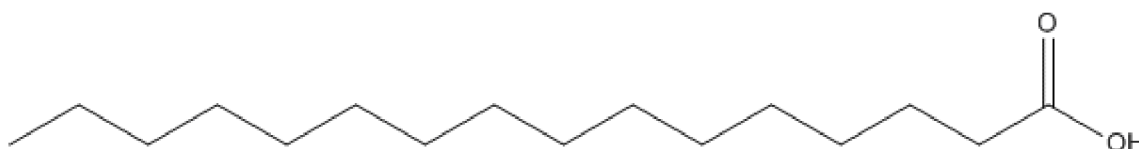
2.3.2.1 Mastné kyseliny

Základní stavební jednotkou lipidů jsou mastné kyseliny (MK). Jedná se o nenasycené nebo nasycené karboxylové kyseliny s počtem uhlíků od 4 do 36. Mohou se lišit délkou a charakterem uhlíkového řetězce nebo také přítomností substituentů. Obecně lze říci, že nasycené mastné kyseliny jsou pro zdraví člověka nepříznivé, zatímco ty nenasycené jsou považované za nezbytné a zdraví prospěšné. PUFA neboli polynenasycené mastné kyseliny jsou alifatické nenasycené mastné kyseliny s více dvojnými vazbami, které bývají většinou nekonjugované. Některé z nich nemohou být tedy syntetizovány v lidském těle a musí být přijímány v potravě, tudíž jsou to esenciální mastné kyseliny [36] [37].

Pro omega-3 mastné kyseliny je typický výskyt první dvojně vazby na uhlíku číslo tři od koncového methylu. K těmto mastným kyselinám patří eikosapentaenová kyselina (EPA), α -linolenová kyselina (ALA), dokosaheptaenová kyselina (DHA) a dokosapentaenová kyselina (DPA-3). Nejdůležitější kyselinou je kyselina α -linolenová, ze které se poté dále odvozují a syntetizují kyseliny jako kyselina eikosapentaenová a kyselina dokosaheptaenová.

Tyto kyseliny jsou známé a využívané ve farmaceutickém průmyslu, protože jsou schopny snižovat riziko onkologických a kardiovaskulárních onemocnění. Zdrojem těchto mastných kyselin jsou potraviny jako ryby, maso a různá semínka [36] [37].

Další skupinou významných mastných kyselin jsou omega-6 mastné kyseliny, které obsahují dvojně vazby na šestém uhlíku od konce řetězce. Mezi zástupce z této skupiny mastných kyselin jsou kyselina linolová (LA), γ -linolenová kyselina (GLA), dihomogamma-linolenová kyselina (DHGLA) a arachidonová kyselina (AA). Kyselina linolová je základní produkovaná kyselinou a kyseliny GLA, DHGLA a ARA jsou jejími metabolickými produkty. Mezi potravinové zdroje těchto kyselin patří zejména rostlinné oleje jako je slunečnicový, sójový nebo řepkový [36] [37].



Obrázek 16 Kyselina palmitová

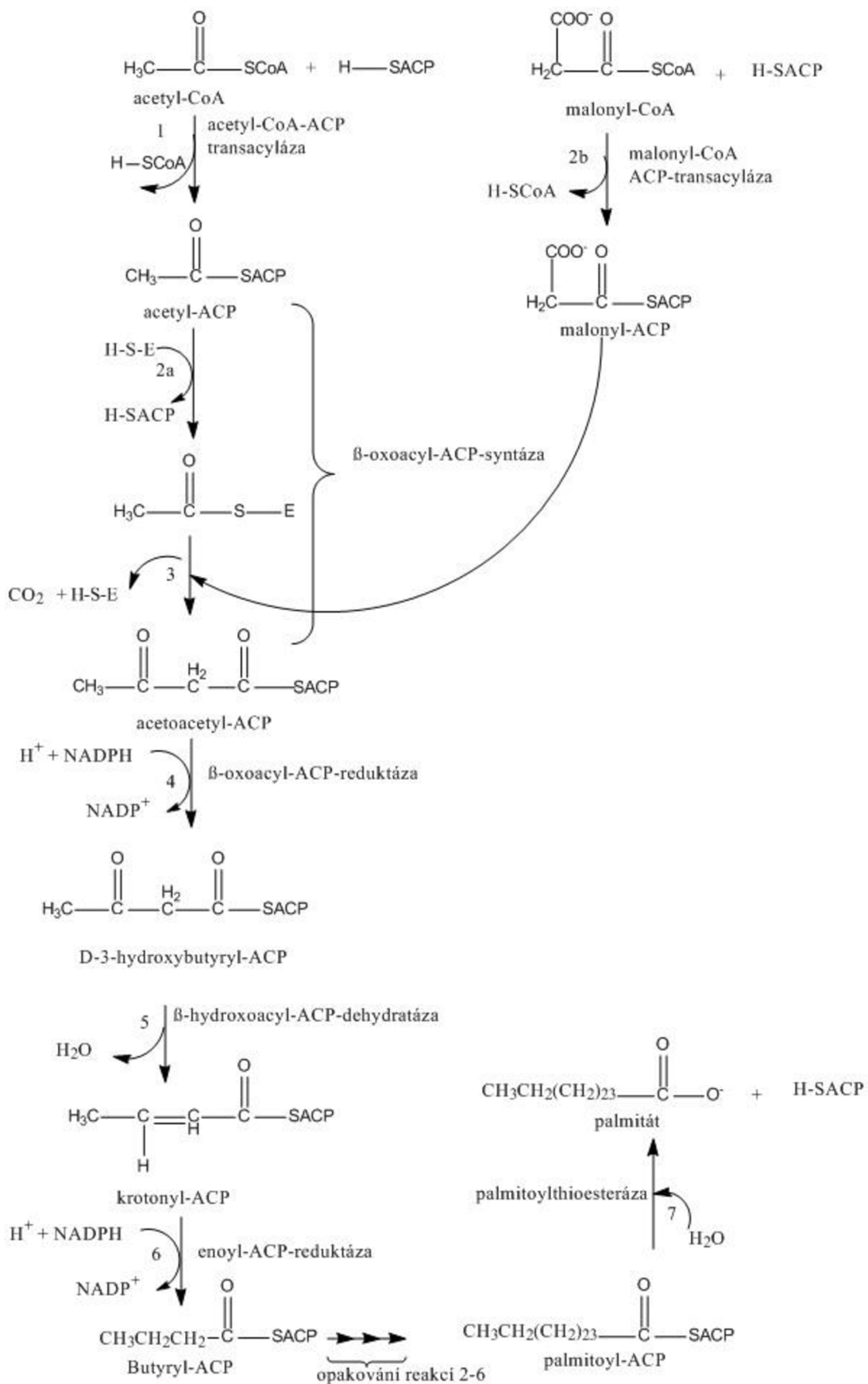


Obrázek 17 Kyselina linolová

2.3.2.2 Biosyntéza mastných kyselin

Biosyntéza mastných kyselin je lokalizována v cytoplasmě buněk. Výchozí látkou pro biosyntézu mastných kyselin je acetyl-CoA, vznikající při aerobním odbourávání sacharidů, případně aminokyselin nebo při odbourávání jiných mastných kyselin. V prvním kroku se acetyl-CoA pomocí enzymu acetyl-CoA-karboxylázy karboxyluje na malonyl-CoA. Při této reakci dochází ke spotřebě ATP. Poté je malonyl-CoA převeden na malonyl-ACP pomocí enzymu malonyl-CoA-transacetyláza. Dále nastává kondenzační reakce mezi malonyl-ACP a acetyl-ACP (ten byl vytvořen z acetyl-CoA pomocí enzymu acetyl-CoA-transacetyláza). Kondenzací těchto dvou látek vzniká acetoacetyl-ACP a dochází k uvolnění oxidu uhličitého.

Poté probíhá redukce acetoacyl-ACP enzymem β -ketoacyl-ACP-reduktáza na β -hydroxybutyryl-ACP. β -hydroxybutyryl-ACP je dehydratován enzymem β -hydroxyacyl-dehydrogenázou vzniká krotonyl-ACP. Následnou reakcí je redukce enzymem enoylreduktáza a vznik butyryl-ACP. Takto se původní řetězec acetyl-CoA prodlužuje o další dva uhlíky. Stejným principem poté dochází k dalšímu prodlužování řetězce, dokud řetězec neobsahuje šestnáct uhlíků. Tím vzniká výsledný produkt kyselina palmitová. Tuto mastnou kyselinu lze pomocí enzymatických reakcí transformovat na další z ní odvozené mastné kyseliny. K syntéze palmitátu je zapotřebí 8 molekul acetyl-CoA, 7 molekul ATP a 14 molekul NADPH [18] [28].

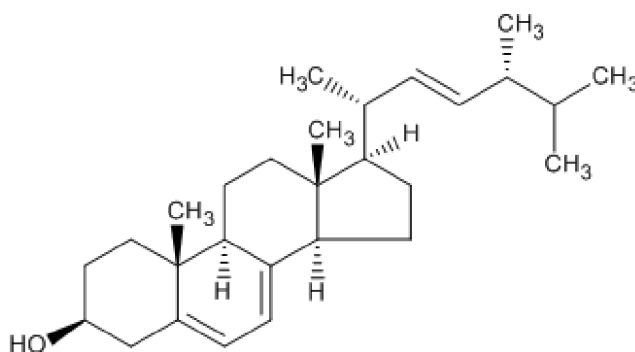


Obrázek 18 Syntéza kyseliny palmitové [18] [28]

2.3.3 Steroly a ergosterol

Steroly jsou z chemického hlediska organické látky s hydroxylovou skupinou, jsou odvozeny od perhydro-1,2-cyklopentanofenanthrenu. Steroly mají schopnost reagovat s vyššími mastnými kyselinami za vzniku esterů. Steroly tvoří základní součást plazmatických membrán eukaryotických buněk a mají velký vliv na fyzikální a chemické vlastnosti lipidové dvojvrstvy tím, že zajišťují její fluiditu a permeabilitu a také stabilizují metabolismus. Mohou se rozdělovat na rostlinné steroly, které se označují jako fytoosteroly a živočišné nazývající se zoosteroly [28] [40] [41].

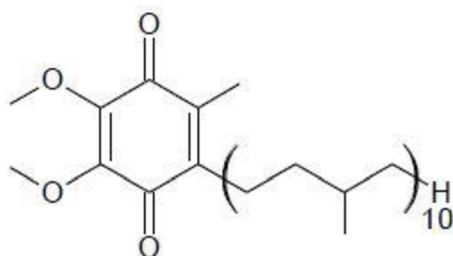
Ergosterol je steroidní látka s eukaryotickým původem. Výchozí látkou pro jeho biosyntézu je acetyl-CoA. Obsažen je v některých rostlinách, ale především se nachází v eukaryotických mikroorganismech. Vlivem působení ultrafialového záření se otevře kruh se dvěma dvojnými vazbami a transformací vzniká ergokalciferol a cholekalciferol. Tyto látky se označují jako vitamín D2 a D3. Hrají důležitou roli pro správné fungování v metabolismu a jsou hojně využívány ve farmacii pro výrobu výživových doplňků [28] [40] [41].



Obrázek 19 Ergosterol

2.3.4 Ubichinon

Ubichinon neboli koenzym Q₁₀ je lipofilní sloučenina složená z chinonového jádra a deseti isoprenoidních jednotek v postranním řetězci. Nachází se u většiny eukaryotických buněk a je lokalizovaný v mitochondriích a membránách. Je nedílnou součástí dýchacího řetězce, kde slouží jako přenašeč protonů a elektronů, kdy akceptuje elektrony a redukuje se na ubichinol. V konečné fázi respirace je zpět reoxidován na ubichinon. Dále funguje jako antioxidant a je spojen s procesem stárnutí. Při nedostatku ubichinonu dochází k peroxidaci lipidů, k velkému výskytu volných kyslíkových radikálů a tím jsou organismy vystaveny oxidačnímu stresu a možným mutacím mitochondriální DNA, což může narušit i samotnou produkci energie [18] [42].



Obrázek 20 Ubichinon

2.4 Kultivace kvasinek

Pro kultivaci kvasinek v jiném, než jejich přirozeném prostředí je nutné vytvořit v laboratoři optimální podmínky a splnit všechny jejich nutriční požadavky, které mohou být pro každý druh rozdílné. Proces mohou znesnadňovat i vysoké nároky na sterilitu a možnost kontaminace. Kultivační média musí obsahovat zdroj uhlíku, kterým nejčastěji bývají sacharidy, dále i lipidy nebo jiné organické látky. Nezbytnou složkou je zdroj dusíku a fosforu. Kvasinky se mohou kultivovat na Petriho miskách, ve zkumavkách nebo různých baňkách. Sofistikovanější variantou jsou bioreaktory, ve kterých se snáze dosahuje optimálních podmínek jako je teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, iontová síla a pH.

Rozdělují se tři základní způsoby kultivace. Prvním způsobem je tzv. „Batch“ kultivace neboli vsádka, při které je systém zcela uzavřený. Druhou z možností je „Fed-batch“ systém, který je částečně otevřený a do vsadky postupně proudí substrát. Poslední variantou je kontinuální systém, který je otevřený a zajišťuje přívod substrátu i odvod produktů.

Kvasinky jsou nejčastěji kultivovány v tekutých médiích submerzně, kdy je pomocí míchání a protřepávání docíleno vyrovnaného provzdušňování, což vede k homogennímu růstu [43] [44].

2.4.1 Bioreaktor

Fermentor je zařízení využívající se v biotechnologické praxi pro kultivace mikroorganismů, buněk či virů. Pro vývoj a výzkum se používají bioreaktory s objemem od 0,5 l až do 100 l. Fermentor se standardně skládá z kultivační nádoby, vyrobené z borosilikátového skla nebo nerez oceli, která musí být inertní. Dále ho tvoří motor pro míchání média a míchadlo, lahve s reagensy a peristaltické pumpy pro dávkování reagensů případně média, sondy pro sledování požadovaných parametrů (pH sonda, kyslíková sonda, teplotní sonda). Důležitou součástí je řídicí jednotka pro ovládání bioreaktoru. Menší fermentory s objemem do 10 l jsou autoklavovatelné a tvoří je skleněné nádoby [45].

2.5 Odpadní substráty

Jako substrát ke kultivacím mikroorganismů lze v biotechnologiích využít různé odpady převážně z potravinářského průmyslu. Tyto substráty už dále nenachází jiná významnější uplatnění, nekonkurují výživě člověka nebo je jejich likvidace náročná. Stále ale obsahují vysoký podíl uhlíku, dusíku a dalších prvků, které mohou kvasinky využít, přeměnit na požadovaný produkt a odpad tak valorizovat. Míra zužitkování závisí na kvalitě odpadu, jeho úpravě a zajištění vhodných podmínek.

2.5.1 Odpadní tuk

Tuky živočišného původu jsou získávány v kafilériích pomocí extrakce a jedná se o odpad převážně z potravinářského průmyslu, z malé části i kožedělné výroby. Z chemického hlediska jde o proměnlivou směs triacylglycerolů mastných kyselin, zejména kyseliny olejové, palmitové a stearové. V této nepolární směsi se mohou dále nacházet různé aromatické látky a pigmenty lipofilního charakteru jako je chlorofyl a karotenoidy, které byly obsaženy v potravě [46] [47].



Obrázek 21 Odpadní tuk

2.5.1.1 Hydrolýza tuku

Tuky lze rozložit hydrolýzou esterových vazeb na glycerol a mastné kyseliny. Hydrolyzovat se tuky mohou za použití kyseliny, zásady nebo enzymu. Kyselou hydrolýzou se získává směs glycerolu a mastných kyselin, je zde potřeba vysoká teplota a silné kyseliny jako je například kyselina sírová. U bazické hydrolýzy neboli saponifikaci vzniká glycerol a soli dané zásady s obsaženými mastnými kyselinami. Jako zásadu lze použít NaOH nebo KOH, záleží na požadovaných vlastnostech produktu. Enzymatická hydrolýza tuku pomocí lipáz je cenově nejnáročnější [48] [49].

2.5.2 Glycerol

Glycerol v čistém stavu je viskózní hydrofobická kapalina bez zápachu a barvy. Vzniká jako odpad při výrobě bionafty, mýdel a zpracování olejů či tuků. Ten se dále může přečišťovat pomocí vakuové destilace anebo může být využíván jako surový. Glycerol běžně tvoří přírodní tuky, ve kterých je acylován mastnými kyselinami a vznikají triacylglyceroly [36] [37].

2.5.3 Syrovátka

Syrovátka neboli mléčné sérum vzniká při srážení mléka, kdy se z něj odstraňuje kasein. Tento vodný roztok obsahuje laktózu, zbylé bílkoviny a je bohatá na vitamíny B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12, H, C a minerální látky jako hořčík, fosfor, vápník, draslík, sodík a zinek. Dříve byl tento vedlejší produkt likvidován jako odpad, ale postupem času rostou snahy o její další využívání. V současné době se využívá v potravinářském průmyslu při výrobě nových druhů jogurtů a sýrů nebo při sportovní výživě jako zdroj bílkovin [36] [37].

2.6 Metody stanovení

Ke stanovení biomasy a látek vyprodukovaných kvasinkami se nejčastěji používají moderní separační techniky, jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie a plynová chromatografie.

2.6.1 Absorpční spektrofotometrie

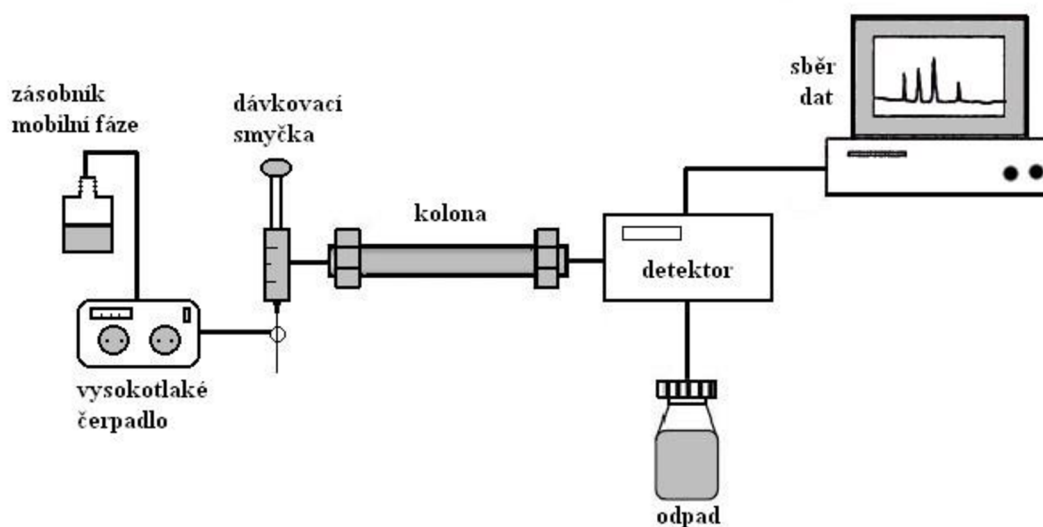
Absorpční spektrofotometrie je analytická metoda založena na absorpci viditelného nebo ultrafialového záření roztoku molekul vzorku. Princip této techniky je založen na absorpci záření molekulami a následné excitaci valenčních elektronů. Jako zdroj viditelného záření ve spektrofotometru se používají wolframové a halogenové žárovky. Absorpčním prostředím je kyveta vyrobená z plastu nebo z křemenného skla, do níž je dávkován samotný vzorek [50] [51].

2.6.2 Chromatografie

Chromatografie je analytická separační metoda, při které dochází k dělení jednotlivých složek obsažených v separovaném vzorku. Tato metoda je využívána pro kvantitativní i kvalitativní analýzu látek. Analyzovaný vzorek se vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, kterým se říká mobilní a stacionární. Na začátek nepohyblivé neboli stacionární fáze se umístí vzorek, který je pohybem mobilní fáze unášen. Dochází k rozdělování a jednotlivé složky vzorku jsou postupně zachycovány ve stacionární fázi. Na konec stacionární fáze se dostávají složky nejméně zadržované, které mají nejnižší afinitu ke stacionární fázi, ale největší afinitu k fázi mobilní [50] [51] [52].

2.6.2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je separační metoda, jejím principem je pohyb vzorku mezi mobilní a stacionární fází. Mobilní fází při této metodě je vždy kapalina, která je za vysokého tlaku pomocí čerpadla přiváděna do systému. Stacionární fází může být tuhá látka či kapalina ukotvena na tuhém nosiči. Stacionární fáze se nachází v náplňové koloně ve formě sorbentu, kterým pak protéká mobilní fáze obohacena o analyzovaný vzorek. Pro umožnění distribuce mezi mobilní a stacionární fází, musí existovat fázové rozhraní. Při dělení dochází k opakovanému ustalování rovnováhy dělených látek mezi mobilní a stacionární fází. Distribuce složek se popisuje distribuční konstantou. U této hodnoty platí, že čím je vyšší, tím déle zůstávají molekuly dané látky ve stacionární fázi a jejich retence je větší. Jednotlivé separované zóny vzorku vychází z kolony a dále se zaznamenávají detektorem. Signál z detektoru je zpracováván a převeden na chromatogram, který se vyhodnotí [50] [51] [52].



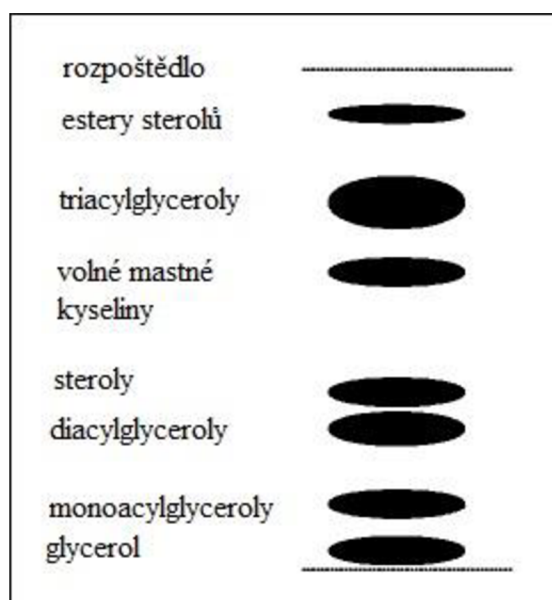
Obrázek 22 Schéma kapalinového chromatografu [51]

2.6.2.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je technika spadající do separačních metod. Využívaná je k separaci látek s nízkým bodem varu. Mobilní fází je zde nosný plyn, který musí být inertní a nesmí interagovat se vzorkem. Lze využít plyny jako vodík, dusík a hélium. Vzorek se dávkuje do proudu tohoto plynu. V koloně se složky vzorku separují na základě různé afinity se stacionární fází. U plynové chromatografie se používají kolony buď náplňové, nebo kapilární. Složky, které opouštějí kolonu, identifikuje detektor, a jeho signál se převede na chromatogram [50] [51] [52].

2.6.2.3 Tenkovrstvá chromatografie

Chromatografie na tenké vrstvě je jednou z nejrychlejších analytických metod sloužících k rozdělení vzorku v důsledku pohybu mezi mobilní fází rozpouštědla a stacionární tenké vrstvy, kterou je nejčastěji hliníková destička pokrytá sorbentem. Selektivitu lze zajistit výběrem rozpouštědla. Výhodou této techniky je, že vzorek nemusí být nijak čištěný ani izolovaný a nemůže dojít k jeho kontaminaci z předchozího stanovení, protože destičky jsou jednorázové. TLC se využívá k orientačním stanovením [53] [54].



Obrázek 23 Schéma rozdělení enzymatického hydrolyzátu tuku u TLC [54]

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je studium možnosti utilizace odpadního živočišného tuku kvasinkami a valorizace na hodnotné produkty.

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- Literární rešerše zaměřená na využití odpadních substrátů různého typu karotenogenními kvasinkami.
- Srovnání růstu a produkčních vlastností vybraných druhů kvasinek kultivovaných na surovém odpadním tuku, tuku hydrolyzovaném komerčními enzymy a na směsi tukových a sacharidových substrátů.
- Stanovení množství a složení lipidických metabolitů produkovaných na tukovém substrátu.
- Vyhodnocení míry valorizace tukového substrátu kvasinkami.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Chemikálie použité pro hydrolýzy tuku

Tuk - směsný živočišný (Norilia, Norsko)
Lipáza z *Aspergillus niger*, Sigma Aldrich (SRN)
Lipáza z *B Candida antarctica*, recombinant from *Aspergillus oryzae*, Sigma Aldrich (SRN)
Lipáza z *Candida rugosa*, Sigma Aldrich (SRN)
Lipáza z *Mucor miehei*, Sigma Aldrich (SRN)
Lipáza z *Pseudomonas cepacia*, Sigma Aldrich (SRN)
Lipáza z *Pseudomonas fluorescens*, Sigma Aldrich (SRN)
Lipáza z *Rhizopus oryzae*, Sigma Aldrich (SRN)
Lipáza z *Rhizopus niveus*, Sigma Aldrich (SRN)
Lipáza z porcine pancreas, Sigma Aldrich (SRN)

Chemikálie použité pro TLC

Kyselina fosforečná, Merci (ČR)
Síran měďnatý, Lachema (ČR)
Diethylether p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Hexan p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Kyselina octová, Merci (ČR)

Chemikálie použité pro kultivaci kvasinek

Kvasničný autolyzát, Himedia (Indie)
Bakteriologický pepton, Himedia (India)
D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner s r.o. (ČR)
Síran amonný p.a., Lachema (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Síran horečnatý heptahydrát p.a., Chemapol (ČR)
Glycerol, Lach-Ner (ČR)
Polysorbát 80 (Tween 80), Lach-Ner (ČR)

Chemikálie použité pro extrakci, transesterifikaci, HPLC a GC

Aceton p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Ethyl-acetát pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)
Kyselina sírová 96%, Merci (ČR)
Methanol pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)
Hexan pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)
Heptadekanová kyselina, Sigma-Aldrich (SRN)
Acetonitril pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)
Kyselina chlorovodíková 37% p.a., Merci (ČR)
Tris((Hydroxymethyl)aminomethan), Lach-Ner (ČR)

Chemikálie použité pro stanovení lipázové aktivity

p-nitrofenol, Sigma Aldrich (SRN)
p-nitrofenylpalmitát, Sigma Aldrich (SRN)
Dodecylsírán sodný (SDS), Lach-Ner (ČR)
Triton X-100, Lach-Ner (ČR)

Ostatní použité chemikálie byly vesměs čistoty p.a. a byly získány od běžných distributorů.

4.2 Použité přístroje a pomůcky

Přístroje a pomůcky pro hydrolýzy tuku

Běžné laboratorní sklo
Míchačka Benchmark Magnetic Stirrer
Multipozicová magnetická míchačka MS-H-S10, (DLAB)
pH metr

Přístroje a pomůcky pro kultivace kvasinek

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

Přístroje a pomůcky pro izolaci a analýzu látek

HPLC/PDA sestava:

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

TRACE GC/FID (Thermo Fischer Scientific, USA)

Kapilární kolona Zebron ZB-FAME, 30 m délky

HPLC/RI sestava:

Dionex UltiMate 3000 series
DAD detector UltiMate
Pump UltiMate
Column Oven LCO 101, ECOM
ERC RefractoMax 520

Filtry pro HPLC, PRE-CUT, Alltech (GB)
 Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)
 Termostat blokový s 2 20místními bloky (VWR, ČR)
 Vortex genius 3 (IKA, SRN)
 ELISA Reader BioTek ELx808
 Běžné laboratorní sklo

4.3 Použité kmeny kvasinek

<i>Rhodotorula glutinis</i>	CCY 20-2-26
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	CCY 10-1-2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CCY 19-4-6
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	CCY 19-9-6

Kmeny byly získány z Culture Collection of Yeasts, Chemického ústavu SAV v Bratislavě, Slovensko.

4.4 Enzymatické hydrolýzy tuku

U hydrolýzy tuku pomocí lipáz je nutné znát optimální pH, při kterém je daný enzym aktivní. Většina použitých lipáz měla tuto hodnotu okolo pH 7, proto byl zvolen jako tlumivý roztok pro hydrolýzy fosfátový pufr o koncentraci 0,1 M a pH 7,2. K testování účinnosti lipáz bylo vybráno 10 enzymů (9 komerčně dostupných) izolovaných z různých typů mikroorganismů, které jsou přehledně uvedeny v Tabulka 1.

Tabulka 1 Použité lipázy pro testování účinnosti hydrolýzy tuku

pracovní označení	lipáza z
1	<i>Aspergillus niger</i>
2	<i>B Candida antarctica, recombinant from Aspergillus oryzae</i>
3	<i>Candida rugosa</i>
4	<i>Mucor miehei</i>
5	<i>Pseudomonas cepacia</i>
6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
7	<i>Rhizopus oryzae</i>
8	<i>Rhizopus niveus</i>
9	prasečí pankreas
10	<i>Rhodotorula glutinis</i> *(lipáza izolovaná z kvasinky (kmen RG) kultivované na tukovém médiu při C/N poměru 50)

Do Erlenmayerovy baňky o objemu 100 ml bylo naváženo 5 g odpadního tuku, odměřeno 50 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,2 a bylo přidáno 25 mg příslušného enzymu. Směs byla zahřívána na teplotu 37 °C a promíchávána na temperované magnetické míchače při 300 ot./min po dobu 30 hodin. Během experimentu byly prováděny odběry hydrolyzátu, které byly dále analyzovány.

K dalším hydrolyzám byl použit enzym lipáza z *Candida rugosa* a výsledný hydrolyzát byl dále použit jako složka do produkčního média pro kultivaci kvasinek. Bylo naváženo příslušné množství odpadního tuku a odměřeno potřebný objem fosfátového pufru o koncentraci 0,1 M a pH 7,2. Do promíchané směsi zahřáté na 37 °C bylo vloženo příslušné množství enzymu a hydrolyza probíhala 24 hodin. Poté byla směs převedena do dělicí nálevky a rozdělena spodní vodná část od horní části obsahující volné mastné kyseliny a tuk. Vodná část obsahující glycerol byla dále analyzována a použita ke kultivacím.

4.4.1 Analýza glycerolu v hydrolyzátech pomocí HPLC

K analýze glycerolu v hydrolyzátech byla využita HPLC sestava Dionex Ultimate 3000 od firmy Thermo Fischer Scientific s RI detektorem. Analýza probíhala na koloně Rezex ROA Organic acids o rozměrech 300x7,8 mm s průtokem mobilní fáze (0,005 M kyselina sírová) 1,0 ml/min. Vzorek byl dávkován dávkovací smyčkou o objemu 20 µl. Termostat byl vyhřát na teplotu 60 °C a doba analýzy trvala 15 minut. Výsledná data byla zpracována a vyhodnocena pomocí programu Chromeleon.

4.4.2 Tenkovrstvá kapalinová chromatografie

Na silikagelovou TLC destičku s vyznačeným začátkem a koncem byl pomocí pipety nanesen vzorek enzymatického hydrolyzátu. Po zaschnutí vzorku byla destička vložena do skleněné komory s vyvíjecí směsí (hexan:diethylether:kyselina octová v poměru 70:30:1) dokud se mobilní fáze nedostala na označený konec. Poté byla destička vytažena a přesunuta do digestoře, kde oschla. Na vysušenou destičku byla rozprašovačem nastříkána vizualizační směs složená z 10 % H₃PO₄ a 10 % CuSO₄ vodného roztoku. Pro vykreslení jednotlivých odseparovaných zón byla destička umístěna do sušárny vyhřáté na 110 °C po dobu 10 minut.

4.5 Úprava syrovátky

Surová syrovátka byla nejprve vysterilizována v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem při 120 °C po dobu 45 minut. Po ochlazení se pomocí Buchnerovy nálevky a sníženého tlaku zfiltraval vysrážený protein. Hydrolyza laktózy obsažené v syrovátce probíhala tak, že do syrovátky byl přidán komerční farmaceutický preparát Laktazym od Dr. Max a směs byla zahřívána na teplotu 37 °C a míchána pomocí magnetické míchačky. Obsah glukózy a galaktózy byl sledován stejným způsobem jako obsah glycerolu u enzymatických hydrolyzátů tuku postupem uvedeným v kapitole 4.4.1. Poté, co směs obsahovala požadované množství glukózy, byla hydrolyza ukončena a směs znovu vysterilizována a připravena na další použití.

4.6 Kultivace kvasinek

Kvasinky jsou aerobní organismy, proto jejich kultivace probíhala za nepřetržitého třepání (120 rpm), aby docházelo k intenzivnějšímu vzdušnění. Z důvodu produkce karotenoidů muselo být zajištěno neustálé osvětlení kultur. Teplota během kultivace byla laboratorní. Práce s těmito mikroorganismy vyžaduje sterilní prostředí, proto s kulturami bylo manipulováno výhradně v boxu. Média pro kultivace byla vždy sterilizována 45 minut v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem při teplotě 120 °C. Všechny kultivace byly provedeny paralelně v duplikátech a ve výsledných gryfech jsou uvedeny průměrné hodnoty ze dvou kultivací.

4.6.1 Inokulum I a II

Na začátku každé kultivace musely být připraveny inokulační média. Inokulace probíhala ve dvou stupních. Do vysterilizovaného inokula I byly sterilně naočkovány kultury zvoleného kvasinkového kmene ze zásobních agarových ploten, vždy v poměru 1 očkovací klička na 10 ml média. Po 24 hodinové kultivaci inokula I byla kultura přeočkována do sterilního inokula II vždy v poměru 1 : 5. Složení inokula I i inokula II je uvedeno v Tabulka 2 .

Tabulka 2 Složení inokula I a inokula II

Bakteriologický pepton [g/l vody]	20
Kvasničný autolyzát [g/l vody]	10
Glukóza [g/l vody]	20

4.6.2 Produkční média

Kultivace kultury kvasinek v produkčním médiu byla zahájena sterilním přeočkováním inokula II, které bylo kultivováno 24 hodin. Očkovací poměr byl zachován na 1 : 5 jako v předchozím kroku. Pro základní kultivace bylo použito 7 typů produkčních médií s různým zdrojem uhlíku (glukóza, glycerol, tuk, tuk + emulgátor, enzymatický hydrolyzát, tuk + glukóza, tuk + enzym). Každý kmen byl kultivován na všech typech médií se čtyřmi různými C/N poměry (13, 25, 50, 100). Výsledný objem produkčního média i se zaočkováním inokulem 2 byl 42 ml. Kultivace v produkčním médiu probíhala vždy 96 hodin. Kompletní složení všech použitých produkčních médií je souhrnně uvedeno v Tabulka 3. Po ukončení kultivace následovalo odebrání vzorku a jeho následné zpracování.

Tabulka 3 Složení produkčních médií u základních kultivací

C/N poměr	13	25	50	100
zdroj uhlíku (vždy jeden)				
glukóza [g/l]	30,00	49,50	99,90	199,80
glycerol [g/l]	30,67	46,00	93,00	186,00
tuk [g/l]	18,70	35,00	70,00	140,00
tuk + emulgátor [g/l]	18,70 + 1,87	35,00 + 3,50	70,00 + 7,00	140,00 + 14,00
hydrolyzát (glycerol) [g/l]	30,67	46,00	93,00	186,00
tuk + glukóza [g/l]	9,35 + 15,00	17,50 + 24,75	35,00 + 50,00	40,00 + 100,00
tuk + enzym [g/l]	18,70 + 0,25	35,00 + 0,44	70,00 + 0,89	140,00 + 1,82
anorganický základ (všechny složky)				
(NH ₄) ₂ SO ₄ [g/l]	4,00	4,00	4,00	4,00
KH ₂ PO ₄ [g/l]	4,00	4,00	4,00	4,00
MgSO ₄ ·7H ₂ O [g/l]	0,69	0,69	0,69	0,69

4.6.3 Velkoobjemové kultivace s časovými odběry

Pro velkoobjemové kultivace s časovým odběrem bylo vytvořeno 6 produkčních médií s rozdílným zdrojem uhlíku. Byla použita glukóza, glycerol, surový tuk, tuk s přídavkem emulgátoru, tuk s přídavkem enzymu a částečně hydrolyzovaný tuk (hydrolyza proběhla z 10 %). Kultivace probíhala na základním C/N poměru 13. Podmínky inokulace a doba kultivace zůstaly stejné jako u předchozích. Celkový objem výsledné kultury tvořil 500 ml. Během kultivace bylo naplánováno celkem 15 odběrů v různých časových intervalech. Odběry probíhaly vždy ve sterilním prostředí a vzorky z těchto odběrů byly dále zpracovány a analyzovány jako vzorky z předchozích kultivací.

Tabulka 4 Označení a čas odběru u velkoobjemových kultivací

číslo odběru	doba kultivace	číslo odběru	doba kultivace	číslo odběru	doba kultivace
1	0 hod	6	24 hod	11	60 hod
2	3 hod	7	30 hod	12	72 hod
3	6 hod	8	36 hod	13	78 hod
4	9 hod	9	48 hod	14	84 hod
5	12 hod	10	54 hod	15	96 hod

4.6.4 Velkokapacitní kultivace ve fermentoru

Pro porovnání výtěžnosti biomasy a vlastností procesu kultivace byl dále využit ke kultivaci kvasinek fermentor s pracovním objemem 2 l. Kultivace byla provedena stejným způsobem jak u předchozích, poměr zaočkovaného inokula k produkčnímu médiu zůstal stejný (1 : 5). Zkrátila se jen doba kultivace kultury v produkčním médiu a to na 48 hodin. Během fermentace byly v několika časových intervalech odebrány vzorky.

Nádoba fermentoru byla nejprve řádně vyčištěna a vymyta, poté mohla být naplněna produkčním médiem o objemu 1,5 l. K nádobě byly zapojeny sondy pro snímání hodnoty pH, množství rozpuštěného kyslíku (pO_2) a teploty. Dále byla nakalibrována pH sonda pomocí standardů s $pH = 4,00$ a $pH = 9,01$. Všechny vstupní a výstupní otvory fermentorové nádoby byly uzavřeny a utěsněny. Následovala sterilizace v autoklávu při $120\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 1 hodiny. Po zapojení přívodu chladicí vody, sond a vzduchu bylo médium ochlazeno na teplotu $22\text{ }^\circ\text{C}$ a byla nakalibrována sonda pO_2 . Pomocí peristaltických čerpadel byl zapojen přívod báze (10 % NaOH ve vodě) a kyseliny (10 % H_2SO_4) pro úpravu pH. Dále také přívod inokulační kultury a látky snižující pěnovost média (Antifoam). Inokulum bylo přečerpáno do produkčního média a zahájena kultivace. Pro kultivaci byly nastaveny podmínky uvedené v Tabulka 5. U kultivací byly sledovány tyto parametry: teplota, pH, spotřeba báze, otáčky míchadla a redox potenciál.

Tabulka 5 Kultivační podmínky ve fermentoru

pH	5,6
teplota	$22\text{ }^\circ\text{C}$
pO_2	25 %
Průtok vzduchu	2,5 l/min

4.6.4.1 Fermentor s částečně hydrolyzovaným tukem

Pro přípravu kultivačního média bylo naváženo požadované množství odpadního tuku na přípravu 1,5 l produkčního média a k němu příslušné množství enzymu lipázy z *Candida rugosa*. K navážkám bylo přidáno 500 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,2 a směs byla hydrolyzována podle již zmíněného postupu v kapitole 4.4. Průběh hydrolyzy byl sledován a poté, co byl tuk z 10 % hydrolyzován, následovalo ukončení procesu. Celá směs byla převedena do kultivační nádoby fermentoru a doplněna vodou na požadovaný objem. K produkčnímu médiu byly přidány anorganické složky a mohla následovat sterilizace, při které došlo k denaturaci enzymu. Zdroj uhlíku v produkčním médiu tvořil tedy z 90 % odpadní tuk a z 10 % tuk hydrolyzovaný s obsahem glycerolu a volných mastných kyselin. Ke stanovení množství glycerolu v médiu byla použita metoda popsaná v kapitole 4.4.1

4.6.4.2 Fermentor s tukem a syrovátkou

Pro přípravu kultivačního média bylo naváženo 90 % z požadovaného množství odpadního tuku na přípravu 1,5 l produkčního média a k němu bylo přidáno takové množství syrovátky, aby koncentrace glukózy v ní tvořila 10 % ze zdroje uhlíku. Do nádoby byla doplněna voda tak, aby celkový objem produkčního média byl 1,5 l. K produkčnímu médiu byly přidány anorganické složky (pouze KH_2PO_4 a $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Jako zdroj dusíku sloužil izolovaný protein ze syrovátky. Poté mohla následovat sterilizace. Zdroj uhlíku v produkčním médiu tvořil převážně z 90 % odpadní tuk a z 10 % glukóza obsažená v syrovátce. Ke stanovení množství glycerolu a glukózy v médiu byla použita metoda popsaná v kapitole 4.4.1.

4.7 Izolace, stanovení, analýza kvasinkové biomasy a sledovaných metabolitů

K izolaci, stanovení a analýze kvasinkové biomasy a metabolitů obsažených v ní byly použity následující pracovní postupy a analytické metody.

4.7.1 Gravimetrické stanovení biomasy

Odebraný vzorek kvasinkové kultury byl centrifugován při 5000 otáčkách 3 minuty. Supernatant byl slit a uchován v mrazicím zařízení k další analýze. Buňky byly dále promyty destilovanou vodou, v případě médií obsahujících tuk bylo promytí prováděno směsí hexanu a destilované vody. Opět následovala centrifugace. Kvasinková biomasa byla rozsuspendována v malém množství destilované vody a kvantitativně převedena do předem zvážené Eppendorfovy zkumavky, kde byla stočená zbytková voda. Následovala lyofilizace vzorku. Po vysušení mrazem byly zkumavky vyjmuty a uzavřeny. Následovalo vážení na analytických vahách a z rozdílu hmotností byla spočítaná celková hmotnost biomasy v daném objemu.

4.7.2 Extrakce karotenoidů a lipidických metabolitů

Do 20 mg lyofilizovaného vzorku bylo odpipetováno 100 μl destilované vody. Vzorek byl ponechán hodinu, aby se rehydratoval a poté uložen na hodinu do mrazicího zařízení o teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$, aby došlo k rozrušení buněk. K rehydratované biomase bylo odpipetováno 1,5 ml acetonu. Bylo přidáno malé množství skleněných kuliček, aby jejich objem byl minimálně v trojnásobku objemu biomasy a směs byla ponechána na vortexu za intenzivního protřepávání po dobu 30 minut. Po uplynutí doby byl vzorek pipetován do slzičkové baňky a buněčná biomasa s kuličkami byla promyta 1 ml acetonu, který byl dále také pipetován do slzičkové baňky k původnímu vzorku. Vzorek byl odpařen na vakuové odparce. Poté rozpuštěn v 1 ml ethylacetátu v HPLC kvalitě.

Přes filtr 20 µm byl přefiltrován do mikrozkuhavky. Takto připravený vzorek byl uložen v mrazícím zařízení při teplotě -40 °C pro další analýzu.

4.7.3 Analýza karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu na HPLC

Analýza probíhala na HPLC sestavě od firmy Thermo Fischer Scientific. Analýza probíhala na nepolární koloně Core Shell C18 od firmy Kinetex s délkou 150 mm a velikostí částic 5,0 µm. Během separace byl nastaven průtok 1000 µl/min a doba analýzy trvala 19 minut. Mobilní fáze měly následující složení: mobilní fáze A – ACN:MeOH:TrisHCl pufr o pH 8 v poměru 84:2:14 a mobilní fáze B – MeOH:EtAc v poměru 60:40. Byl nastaven eluční program uvedený v Tabulka 6. PDA detektor byl nastaven na snímání 3D pole a bylo měřeno na třech kanálech: kanál A - 455 nm, kanál B - 445 nm (karotenoidy) a kanál C - 285 nm (steroly, ubichinon). Na zpracování výsledných chromatogramů byl využit software Xcalibur. Jednotlivé karotenoidy (β-karoten, torulen, torularhodin) byly identifikovány na základě standartu. Karotenoidní barviva, které neodpovídaly standartum byly zahrnuty do celkových karotenoidů společně s výše identifikovanými.

Tabulka 6 Eluční program u analýzy karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu pomocí HPLC

čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0,00	100,00	0,00
10,00	0,00	100,00
14,00	0,00	100,00
15,30	100,00	0,00
19,00	100,00	0,00

4.7.4 Transesterifikace lipidů

Do čisté krymplovací vialky o objemu 2 ml bylo naváženo přibližně 10 mg lyofilizované biomasy a odpipetováno 1,8 ml transesterifikační směsi o složení 15 % kyseliny sírové v methanolu o HPLC kvalitě s přídavkem interního standardu C17 o koncentraci 0,5 mg/ml. Zakrymplovaná vialka byla vložena na 2 hodiny do termobloku vyhřátého na 85 °C. po vyjmutí se vialky nechaly volně zchladnout. Do 4 ml vialky se napipetoval roztok NaOH o koncentraci 0,05 M a k němu se vлил celý obsah transesterifikované směsi. Poté, co se do vialky přidal 1 ml hexanu a vzorek byl 3 minuty extrahován na vortexu. Poté, co se fáze oddělily, bylo z vrchní organické fáze obsahující methylestery mastných kyselin odpipetováno 100 µl a převedeno do čisté šroubovací vialky s 900 µl hexanu. Takto připravený vzorek je čirý a bez barvy.

4.7.5 Analýza lipidů na GC

Analýza probíhala na plynovém chromatografu Thermo Scientific TRACE™ Gas Chromatograph s autosamplrem Thermo Scientific AI 1310. K detekci analytu byl použit plamenově ionizační detektor. Analýza probíhala celkem 25 minut a měla tyto podmínky:

- kolona Zebron ZB-FAME, 30 m délky, vnitřní průměr 0,25 mm a šířka filmu 0,25 µm
- rozpouštědlo - hexan GC kvality
- nosný plyn – vodík s konstantním průtokem 1 ml/min
- teplota na vstupu 250 °C, split ratio 10
- FID detektor - teplota 260 °C, 350 ml/min průtok vzduchu, 35 ml/min průtok vodíku a 30 ml/min průtok dusíku

Z naměřeného množství mastných kyselin bylo dále vypočítáno procentuální zastoupení lipidů.

Tabulka 7 Teplotní rampa u GC

No	retention time [min]	rate [°C/min]	target value [°C]	hold time [min]
1	0,000	Run		
2	1,000	0,00	80,00	1,00
3	5,000	15,00	140,00	0,00
4	21,667	3,00	190,00	0,00
5	25,467	25,00	260,00	1,00
7	25,467	StopRun		

4.7.6 Stanovení aktivity lipáz

Ke stanovení lipázové aktivity byla využita kolorimetrická metoda s p-nitrofenylpalmitátem, která je založena na schopnosti lipáz štěpit tento substrát za vzniku žlutě zbarveného produktu, kterým je p-nitrofenol. Ten se poté stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 410 nm. K měření byl použit 0,1M Tris-HCl pufr o pH 7,2.

4.7.6.1 Kalibrační křivka

Pro sestavení kalibrační křivky byl využit roztok p-nitrofenolu o koncentraci 0,5 mmol/l a z něj byla poté puftrem naředěna koncentrační řada v rozmezí od 0,005 mmol/l do 0,05 mmol/l. Jednotlivé absorbance byly odečteny při vlnové délce 410 nm na spektrofotometru ELISA reader.

4.7.6.2 Příprava substrátu

Pro přípravu substrátu, který sloužil pro stanovení lipáz, bylo do odměrné baňky o objemu 100 ml naváženo 0,0135 g p-nitrofenylpalmitátu, 0,017 g SDS a 1 g Triton-X-100. Roztok byl po rysku doplněn destilovanou vodou. Takto připravený substrát mohl být uchováván při teplotě 4 °C po dobu 3 dnů.

4.7.6.3 Stanovení lipolytické aktivity

Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 125 µl pufru, 125 µl substrátu a 50 µl vzorku neboli supernatantu. Analýza probíhala na ELISA readeru temperovaném na 30 °C, kdy po dobu 1 hodiny v 5 minutových intervalech byla odečítaná absorbance při vlnové délce 410 nm. Lipolytická aktivita enzymu byla vypočtena dle vzorce uvedeného v Rovnice 1.

Rovnice 1 Vzorec pro výpočet lipolytické aktivity

$$a = \frac{A_{410} + d}{c \cdot V \cdot t}$$

kde a lipolytická aktivita enzymu [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} = \text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$]
 A_{410} absorbance vzorků
t doba inkubace vzorku s enzymem [min]
V objem vzorku [ml]
c, d koeficienty z rovnice regresní přímky kalibrační křivky

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Jedním z prvních úkolů této diplomové práce bylo otestovat sadu komerčně dostupných lipolytických enzymů a určit nejvhodnější a nejúčinnější enzym pro hydrolýzu odpadního tuku na základě TLC a stanovení obsahu vzniklého glycerolu pomocí HPLC/RI.

Následoval základní screening, kdy byl každý kmen kultivován při 4 poměrech C/N (13, 25, 50, 100) na 7 různých médiích lišících se zdrojem uhlíkatého substrátu. U každé kultivace byla stanovena gravimetricky kvasinková biomasa, která byla dále podrobena extrakci a také transesterifikaci. Byly sledovány tyto metabolity – karotenoidy (torulen, torularhodin, β -karoten), ergosterol, ubichinon, celkové lipidy a spektrum mastných kyselin. Vzhled výsledných kvasinkových kultur je na fotografiích v příloze v kapitole 9.1.

Poté byly provedeny velkoobjemové kultivace kvasinek s časovými odběry při základním poměru C/N 13, kde byly sledovány všechny již uvedené látky, ale také hodnota pH a lipolytická aktivita komerčního enzymu během kultivace.

V poslední části práce byla otestována schopnost velkokapacitní kultivace kvasinky *Rhodotorula glutinis* na dvou typech médií, kde odpadní tuk tvořil majoritní zdroj uhlíku. Kultura byla během kultivace sledována a byly u ní stanoveny již výše zmíněné parametry.

5.1 Enzymatické hydrolýzy odpadního tuku

Na odpadním tuku byla otestována sada dostupných komerčních lipolytických enzymů a z ní byl určen nejvhodnější a nejefektivnější enzym, s kterým bylo dále pracováno. Jednotlivé enzymy se od sebe odlišovaly účinností, cenou a mechanismem hydrolytické reakce. U každého hydrolyzátu byl změřen obsah glycerolu v g/l a provedena analýza pomocí TLC.

5.1.1 Testování komerčních lipáz k hydrolýze odpadního tuku

Pro testování lipáz k hydrolýze 5 g odpadního tuku v 50 ml pufru byly použity enzymy uvedeny v Tabulka 1. Samotné hydrolýzy byly sledovány 30 hodin a během této doby byly odebírány vzorky.



Obrázek 24 Výsledný vzhled enzymatických hydrolyzátnů odpadního tuku

Konečné koncentrace glycerolu v g/l jsou uvedeny v Tabulka 8. Jednoznačně nejúčinnějším enzymem byla lipáza z *Candida rugosa*, kde byl obsah glycerolu v hydrolyzátu téměř 16 g/l, což odpovídá téměř úplné hydrolýze. Druhým nejlepším enzymem je lipáza z *Mucor miehei*, tento hydrolyzát obsahoval 11,84 g/l glycerolu. Za ní následovala lipáza z *Pseudomonas cepacia*.

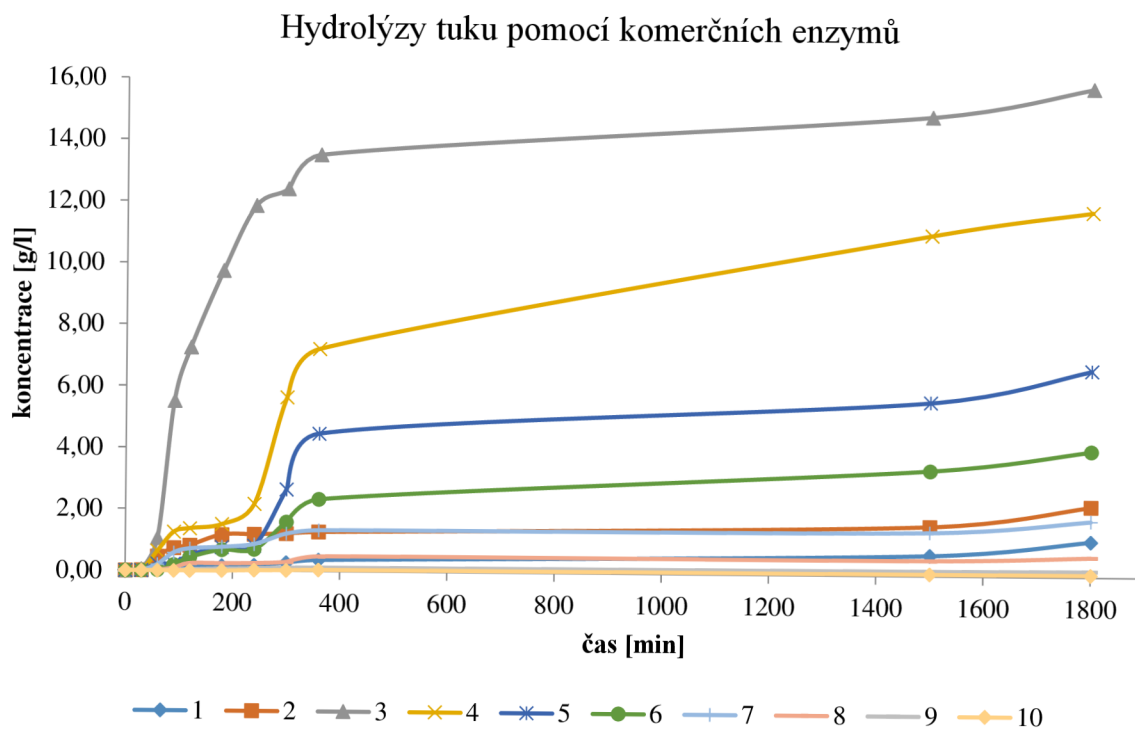
Z hlediska účinnosti hydrolýzy se jako nejslabší enzym se ukázala lipáza produkovaná kvasinkou *Rhodotorula glutinis*. Lipáza je nejméně účinná a v porovnání s komerčními enzymy je její schopnost hydrolyzovat odpadní tuk téměř nulová, z důvodu nízké koncentrace a nízké čistoty. Tato kvasinka je sice schopna využít odpadní tuk, ale jelikož je pro tento enzym indukovaný, produkuje ho na běžném médiu jen v malém množství. Dalšími neefektivními enzymy byla především lipáza z prasečího pankreatu nebo lipáza z plísně *Rhizopus niveus*.

Tabulka 8 Výsledné koncentrace glycerolu v enzymatických hydrolyzátech při testování komerčních lipáz

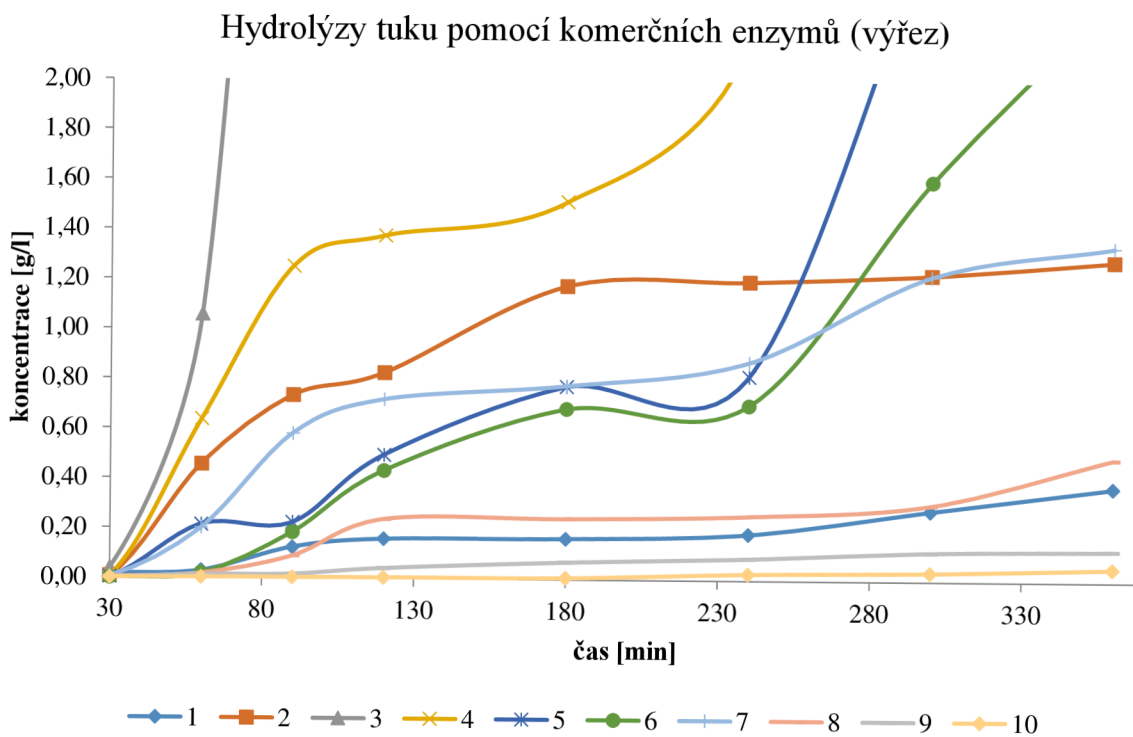
označení	lipáza	c glycerolu [g/l]
1	<i>Aspergillus niger</i>	1,16
2	<i>B Candida antarctica</i> , recombinant from <i>Aspergillus oryzae</i>	2,28
3	<i>Candida rugosa</i>	15,85
4	<i>Mucor miehei</i>	11,84
5	<i>Pseudomonas cepacia</i>	6,69
6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4,08
7	<i>Rhizopus oryzae</i>	1,82
8	<i>Rhizopus niveus</i>	0,64
9	prasečí pankreas	0,19
10	<i>Rhodotorula glutinis</i>	0,08

5.1.1.1 Obsah glycerolu u enzymatických hydrolyzátů

Během 30 hodinové hydrolýzy byl sledován obsah glycerolu a jeho množství bylo stanoveno pomocí HPLC/RI. Všechny naměřená data jsou uvedena v grafech v Obrázek 25 a v Obrázek 26. Z grafu lze vyčíst, že u lipázy z *Candida rugosa* (označení číslem 3) bylo dosaženo vysokého procenta zhydrolyzování již po prvních 6 hodinách, kdy byl obsah glycerolu 13,5 g/l.



Obrázek 25 Časová závislost obsahu glycerolu v enzymatických hydrolyzátech během 30 hodin



Obrázek 26 Časová závislost obsahu glycerolu v enzymatických hydrolyzátech v prvních 5 hodinách

5.1.1.2 TLC u enzymatických hydrolyzátů

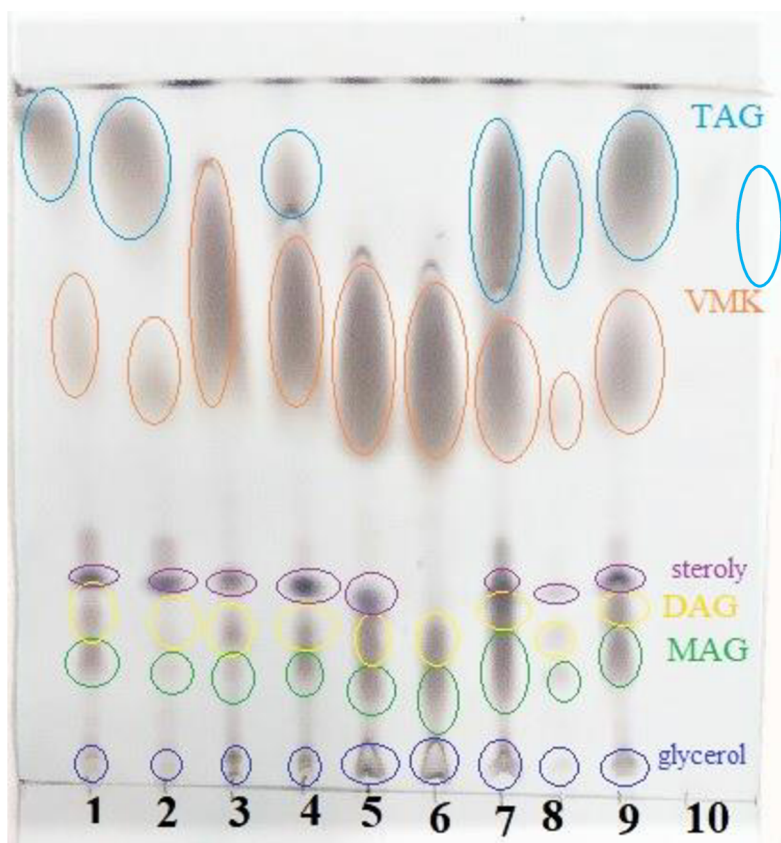
Ke zjištění substrátové specifity pro každou lipázu byla provedena tenkovrstvá chromatografie. Jak už bylo zmíněno výše, tak i dle TLC na Obrázek 27, je jednoznačně nejúčinnější hydrolytický enzym lipáza z kvasinky *Candida rugosa*. U této lipázy dochází majoritně ke štěpení triacylglycerolů na volné mastné kyseliny, monoacylglyceroly a diacylglyceroly vznikají v minimálním množství.

Lipázy izolované z bakterií rodu *Pseudomonas* (označení 5 a 6) mají mechanismus účinku podobný jako kvasinková lipáza z *Candida rugosa*. U těchto vzorků byly rozštěpeny také veškeré triacylglyceroly a vznikl velký podíl monoacylglycerolů a diacylglycerolů, jejichž vazby nebyly už dál hydrolyzovány.

Plísňové lipázy (vzorky s označením 1, 4, 7 a 8) nemají danou přesnou substrátovou specifitu a hydrolyza probíhá průběžně na všech triacylglycerolech, diacylglycerolech i monoacylglycerolech. Nejúčinnější lipáza izolovaná z plísní byla lipáza z *Mucor miehei*, zde byl nejmenší podíl triacylglycerolu a největší obsah glycerolu.

Pankreatická lipáza z prasečí slinivky (vzorek 9) štěpí taktéž všechny vazby v triacylglycerolech, diacylglycerolech i monoacylglycerolech. Pro hydrolyzu odpadního tuku se ale ukázala být jako nejméně vhodná.

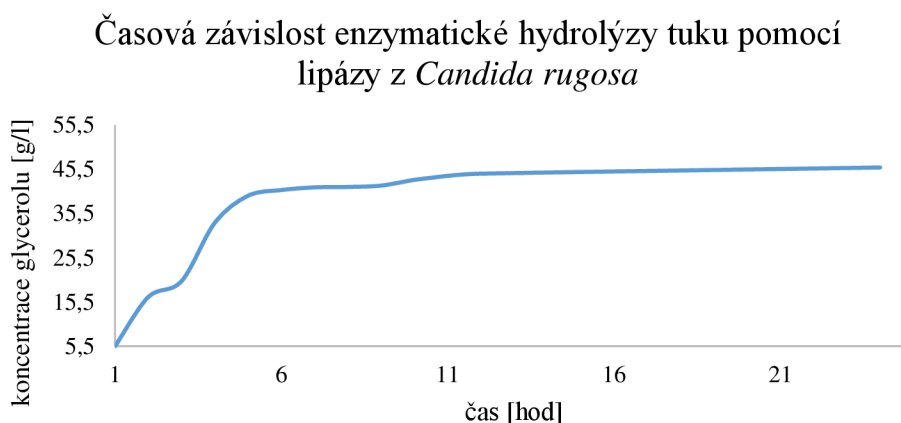
Vzorek 10, kterým byla lipáza z kvasinky *Rhodotorula glutinis*, byl velmi slabý, což bylo dáno nízkou koncentrací v preparátu. Z toho důvodu nebyly na TLC zachyceny žádné stopy glycerolu ani diacylglycerolů a monoacylglycerolů. Z předchozích experimentů bylo zjištěno, že kvasinková lipáza kopíruje mechanismus účinku lipázy z *Candida rugosa*.



Obrázek 27 TLC enzymatických hydrolyzátů při testování lipáz

5.1.2 Časová závislost u hydrolýzy odpadního tuku pomocí enzymu lipáza z *Candida rugosa*

Podle výše uvedených testování byl jako nejlepší, nejefektivnější a nejrychlejší enzym, schopný hydrolyzovat odpadní tuk, zvolen komerčně dostupný enzym (Sigma) izolovaný z kvasinky *Candida rugosa*. Tato lipáza byla dále používána ke všem kultivacím, jak už k hydrolýze tuku, tak i přidání k samotné kultivaci. Sledována byla časová závislost enzymatické hydrolýzy tuku, jejíž graf je uveden na Obrázek 28.



Obrázek 28 Časová závislost enzymatické hydrolýzy tuku pomocí lipázy z *Candida rugosa*

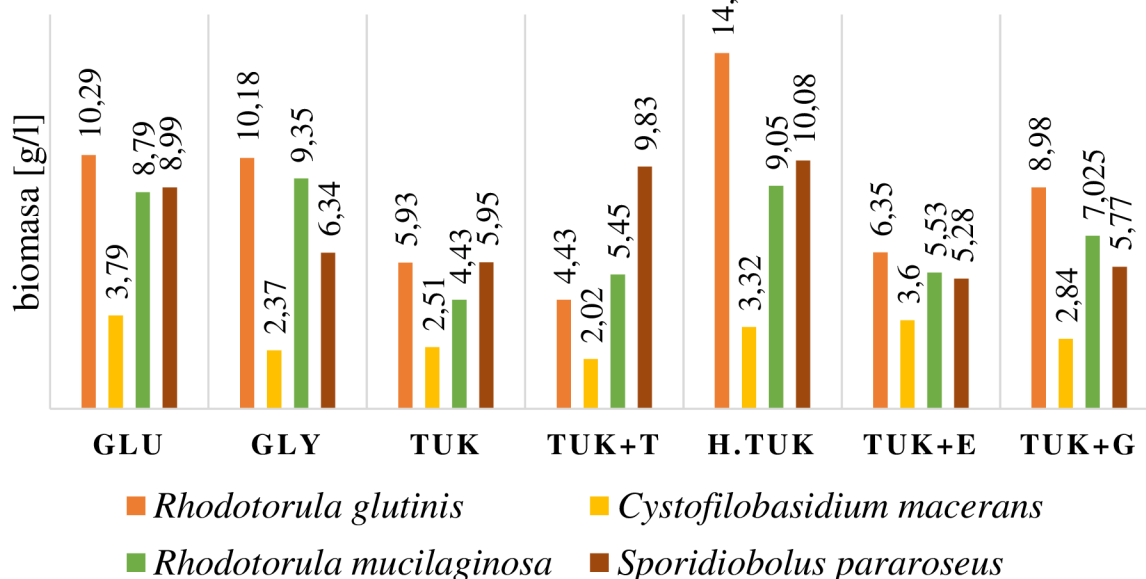
5.2 Výsledky základních kultivací kvasinek na C/N poměru 13

5.2.1 Růstové charakteristiky a celková biomasa kvasinek při C/N poměru 13

C/N poměr 13 je považován za základní poměr uhlíku a dusíku v kultivačním médiu pro karotenogenní kvasinky. Na Obrázek 29 jsou souhrnně uvedena množství biomasy při základních kultivacích na C/N poměru 13. Největší nárůst u všech kvasinek byl zaznamenán na glukózovém a glycerolovém médiu, ale i na médiu, kde zdroj uhlíku tvořil enzymaticky hydrolyzovaný tuk. Glukóza a glycerol jsou pro kvasinky jednoduchý uhlíkatý substrát, což jim umožňuje mnohem rychlejší utilizaci a s tím spojený i rychlejší nárůst biomasy. V médiích s hydrolyzovaným tukem byl v malé koncentraci obsažen tlumivý roztok, ve kterém probíhala samotná hydrolýza. Tento zbytek pufru umožnil kvasinkám lepší kultivační podmínky díky tomu, že v médiu udržoval hodnotu pH blízkou 5-6. Tato hodnota pH je pro kvasinky optimální. Při klasických kultivacích kvasinky během růstu produkují metabolity, které snižují pH prostředí a tím zhoršují kultivační podmínky a postupně může docházet až k inhibici růstu, což je zapříčiněno silně kyselým prostředím.

Nejvyšší nárůst biomasy na C/N poměru 13 byl zaznamenán na médiu s hydrolyzovaným tukem u kvasinky *Rhodotorula glutinis*, kde hodnota dosáhla 14,4 g/l. nejnižší hodnoty biomasy dosahovala kvasinka *Cystofilobasidium macerans*, jejíž hodnoty se pohybovaly kolem 2-4 g/l ve všech médiích. Vysoký nárůst vykazovala i kvasinka *Sporidiobolus pararoseus*, která měla největší nárůst také na hydrolyzovaném tukem. Kvasinka *Rhodotorula mucilaginos*a se jevila jako průměrná.

C/N poměr 13



Obrázek 29 Grafické znázornění gravimetrického stanovení biomasy u základních kultivací na C/N poměru 13

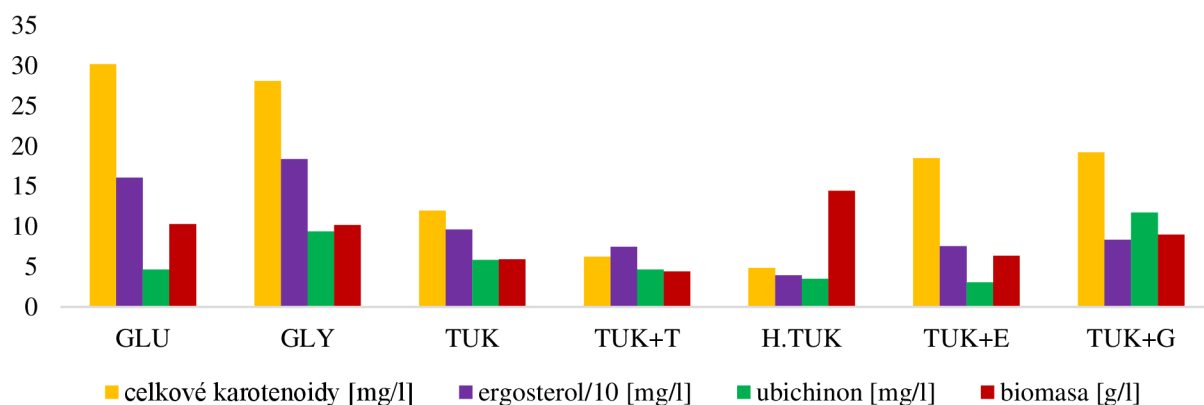
5.2.2 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu na C/N poměru 13

Produkce karotenoidů v kvasinkových buňkách je spjata s přístupem kyslíku v médiu a stresovými faktory. Karotenoidy slouží jako antioxidanty a chrání buňku před škodlivými vlivy. Ergosterol je produkován, aby udržel fluiditu membrány a celistvost buňky, v případě možného ohrožení, dochází k jeho nadprodukcí. Hlavní role ubichinonu je v dýchacím řetězci, proto jeho produkce závisí na množství kyslíku v médiu. Jeho obsah se zvyšuje, pokud stoupá množství kyslíku. Vyhodnocení karotenoidů bylo provedeno na základě postupu v kapitole 4.7.3.

Na obrázcích (Obrázek 30, Obrázek 32, Obrázek 34, Obrázek 36) jsou graficky znázorněny koncentrace celkových karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu v 1 l média s kvasinkovými buňkami. Největší schopnost produkce karotenoidů má jednoznačně kvasinka *Rhodotorula glutinis*, kde nejvyšší koncentrace karotenoidy dosahovaly na glukózovém a glycerolovém médiu (až 30 mg/l). Koncentrace karotenoidů u kvasinek *Cystofilobasidium macerans* a *Rhodotorula mucilaginosa* byly v porovnání velmi nízké, někdy až pouhé 3 mg/l. Co se týče konkrétního zastoupení jednotlivých karotenoidů (grafy na Obrázek 31, Obrázek 33, Obrázek 35, Obrázek 37), tak největší produkce β -karotenu bylo dosaženo kvasinkou *Rhodotorula glutinis*. Obecně lze říci, že větší produkce β -karotenu bylo dosaženo na klasických médiích s glukózou a glycerolem, naopak jeho produkce se snížila a zvýšila se produkce torulenu v médiu, kde zdroj uhlíku tvořil tuk s glukózou.

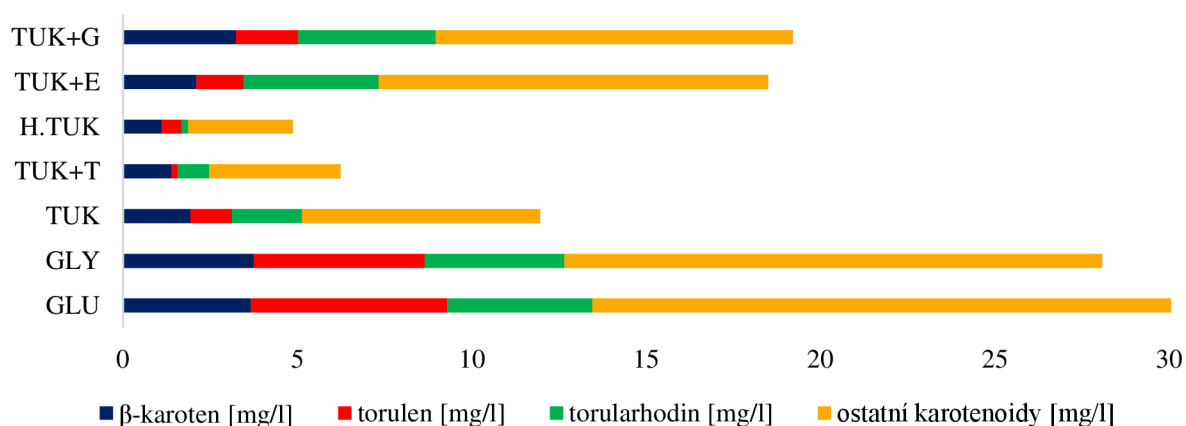
Ergosterol byl nejvíce produkován kvasinkou *Sporidiobolus pararoseus*. na klasickém glukózovém a glycerolovém médiu, na tukových médiích se jeho koncentrace snižovala. U kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* nebyla pozorována žádná výrazná změna ohledně jeho obsahu v závislosti na médiu. Největší koncentrace ubichinonu byla naměřena u kultivace na tukovém médiu s přidavkem emulgátoru kvasinkou *Sporidiobolus pararoseus* (17,3 mg/l). Zajímavý jev nastal u kvasinky *Cystofilobasidium macerans*, kdy u tukových médií došlo k výraznému nárůstu ubichinonu.

Rhodotorula glutinis C/N poměr 13



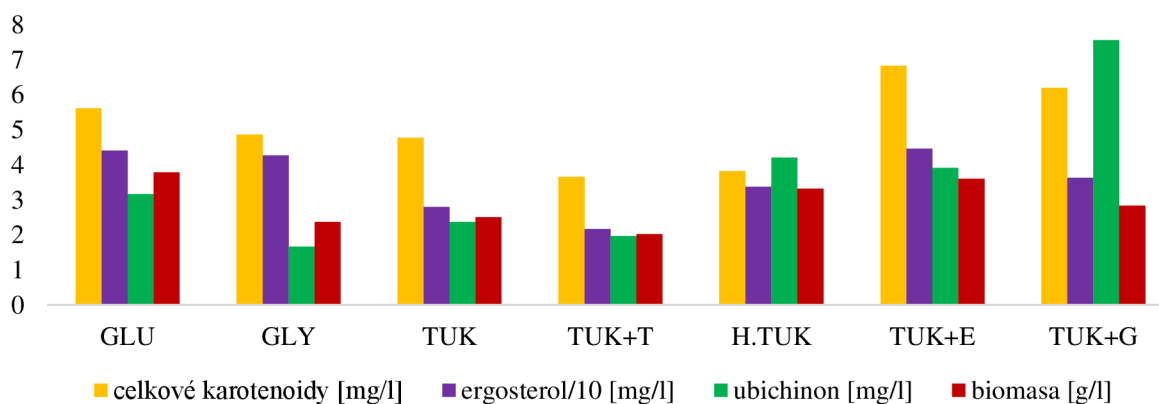
Obrázek 30 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu kvasinkou *Rhodotorula glutinis* na C/N poměru 13

Rhodotorula glutinis C/N poměr 13: profil karotenoidů



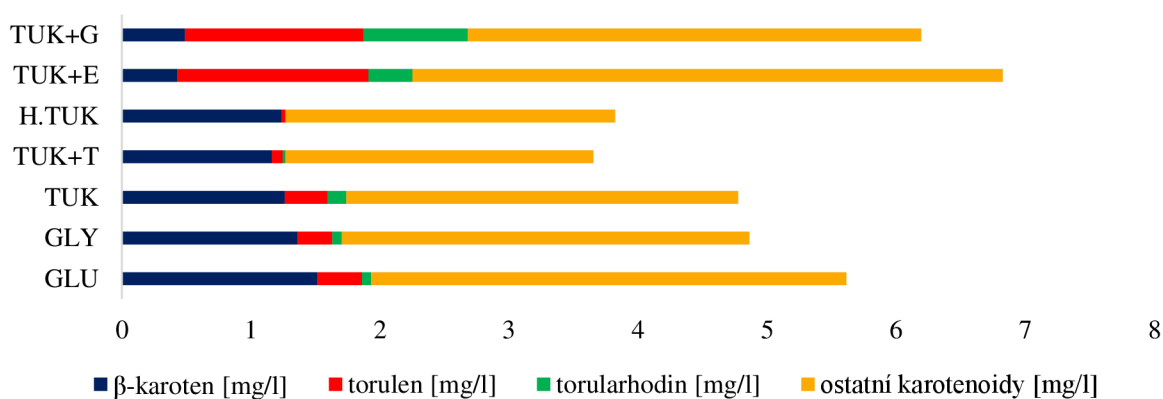
Obrázek 31 Zastoupení jednotlivých karotenoidů u kvasinky *Rhodotorula glutinis* na C/N poměru 13

Cystofilobasidium macerans C/N poměr 13



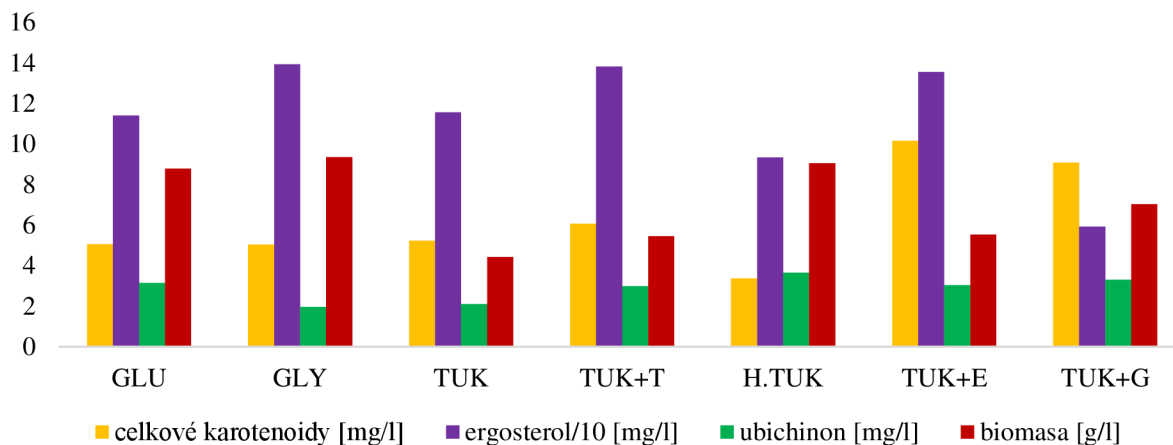
Obrázek 32 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu kvasinkou *Cystofilobasidium macerans* na C/N poměru 13

Cystofilobasidium macerans C/N poměr 13: profil karotenoidů



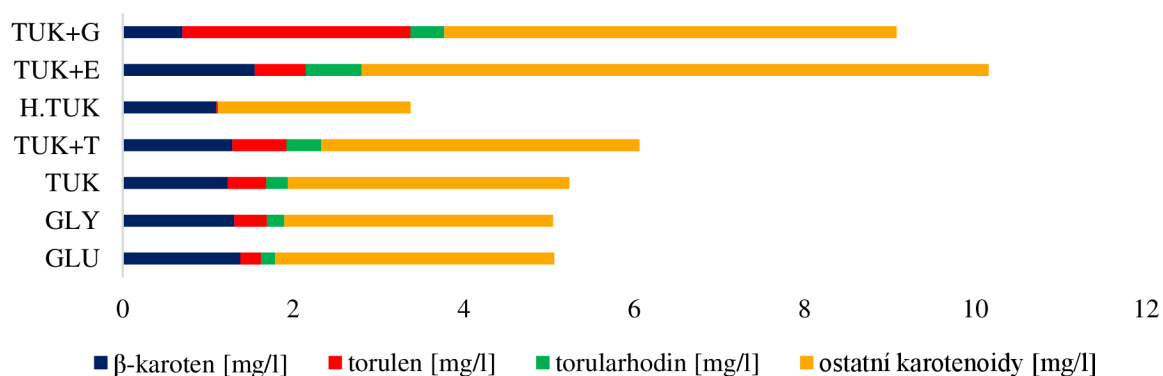
Obrázek 33 Zastoupení jednotlivých karotenoidů u kvasinky *Cystofilobasidium macerans* na C/N poměru 13

Rhodotorula mucilaginosa C/N poměr 13



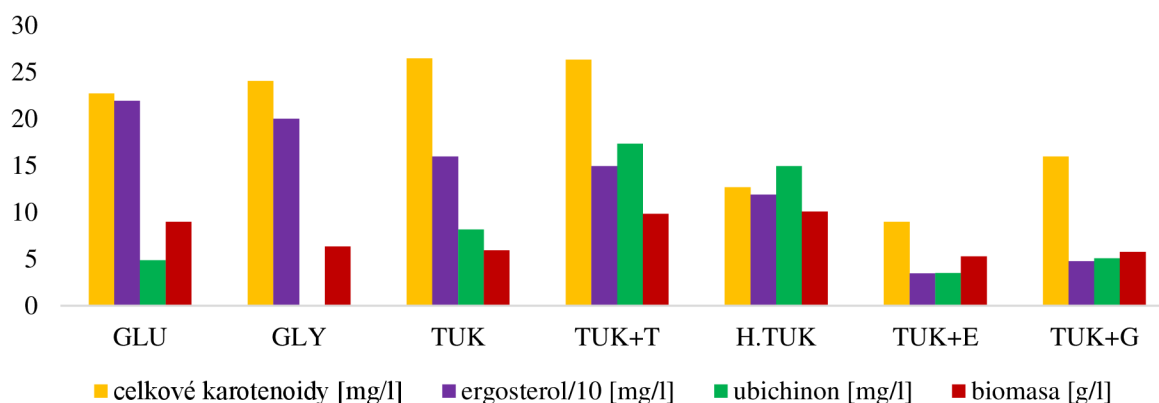
Obrázek 34 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu kvasinkou *Rhodotorula mucilaginosa* na C/N poměru 13

Rhodotorula mucilaginosa C/N poměr 13: profil karotenoidů



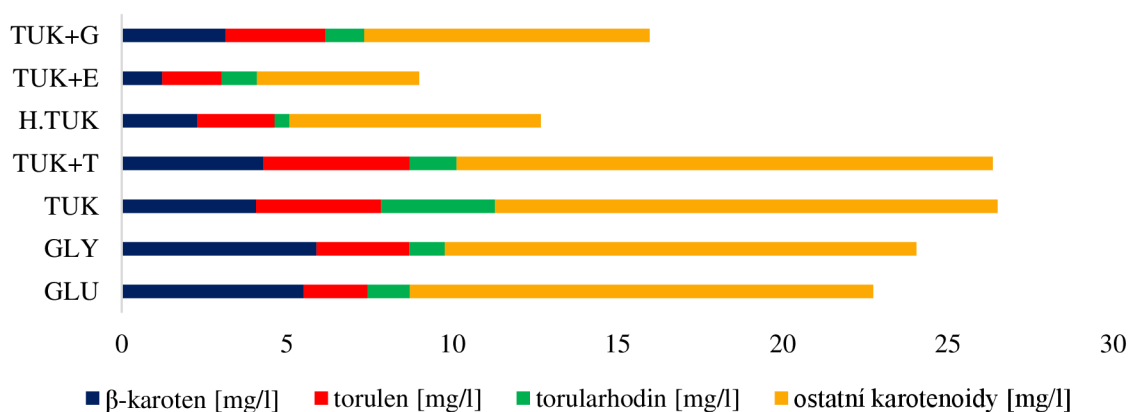
Obrázek 35 Zastoupení jednotlivých karotenoidů u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* na C/N poměru 13

Sporidiobolus pararoseus C/N poměr 13



Obrázek 36 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu kvasinkou *Sporidiobolus pararoseus* na C/N poměru 13

Sporidiobolus pararoseus C/N poměr 13: profil karotenoidů



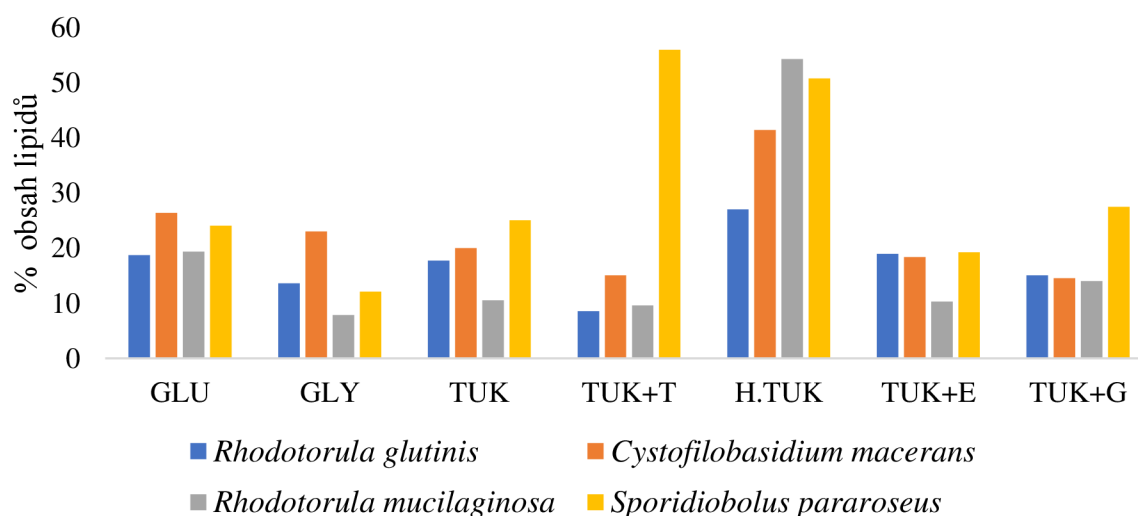
Obrázek 37 Zastoupení jednotlivých karotenoidů u kvasinky *Sporidiobolus pararoseus* na C/N poměru 13

5.2.3 Produkce lipidů na C/N poměru 13

Produkce lipidů a mastných kyselin je u kvasinek dána zejména množstvím uhlíkatého zdroje v médiu. Jejich akumulace v buňce probíhá až do jeho vyčerpání. Obecně platí, že čím více uhlíkatého zdroje, tím větší podíl lipidů v kvasinkové buňce. Pro analýzu a kvantifikaci mastných kyselin byla použita plynová chromatografie s FID detekcí.

Na Obrázek 38 jsou graficky znázorněny procentuální zastoupení intracelulárních lipidů v biomase. K největší produkci docházelo na médiu, kde jako zdroj uhlíku sloužil enzymaticky hydrolyzovaný tuk. Jako nejlepším producentem se ukázala kvasinka *Sporidiobolus pararoseus*, kde procentuální obsah přesahoval až 50 %. Méně významnými producenty u C/N poměru 13 byla kvasinka *Rhodotorula glutinis* a *Rhodotorula mucilaginosa*, jejíž obsah tvořil někdy i méně jak 10 %.

Procentuální obsah lipidů v biomase u C/N poměru 13

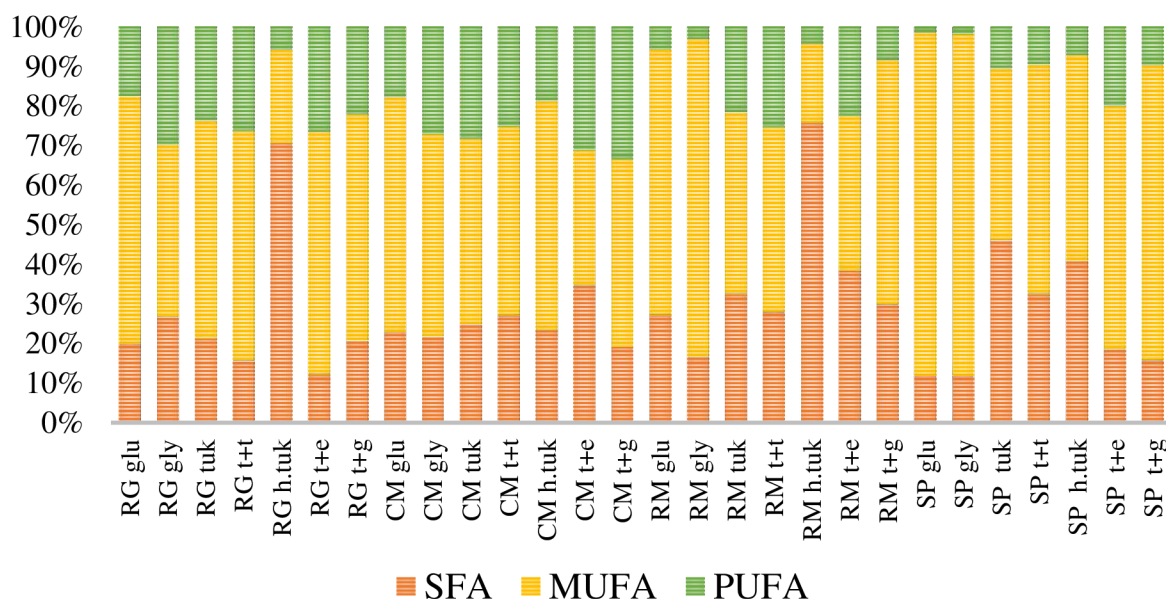


Obrázek 38 Procentuální zastoupení lipidů v biomase u C/N poměru 13

5.2.3.1 Zastoupení mastných kyselin

Mastné kyseliny, které byly analyzovány, se v buňkách vyskytují ve formě triacylglycerolů, ale také i fosfolipidů. Profil mastných kyselin v kvasinkové buňce je velmi proměnlivý, jeho složení závisí na mnoha faktorech, jako je zdroj nutrientů, vzdušnění, světlo nebo teplota.

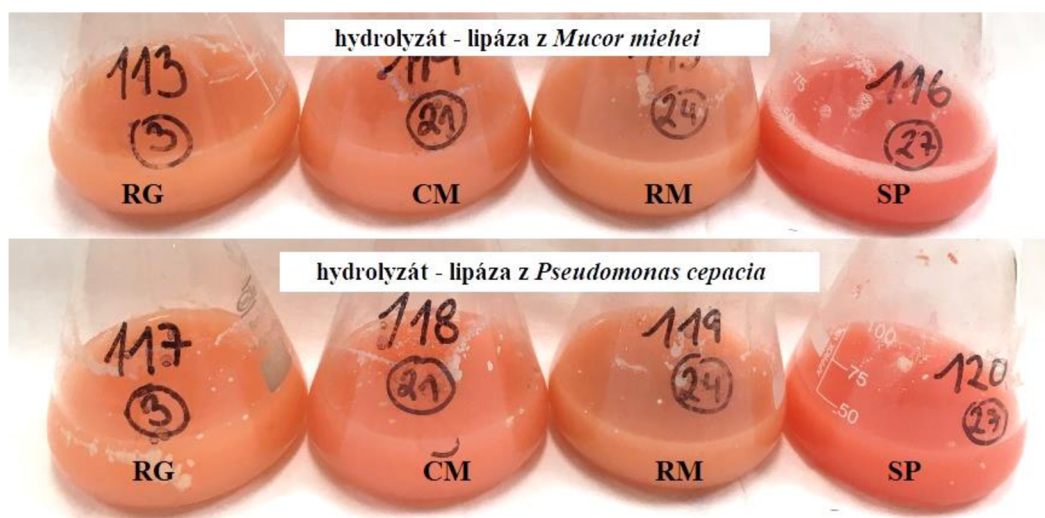
V grafickém znázornění na Obrázek 39 lze vidět, že největším producentem zdraví prospěšných polynenasycených mastných kyselin je kvasinka *Cystofilobasidium macerans*. Naopak největší zastoupení nasycených mastných kyselin má ve svém profilu kvasinka *Rhodotorula mucilaginosa*. Zajímavý je profil mastných kyselin u kultivací kvasinek rodu *Rhodotorula* na hydrolyzovaném tuku, kde obsah nasycených mastných kyselin tvoří až dvě třetiny. U těchto kultivací bylo také dosaženo poměrně velkého nárůstu biomasy.



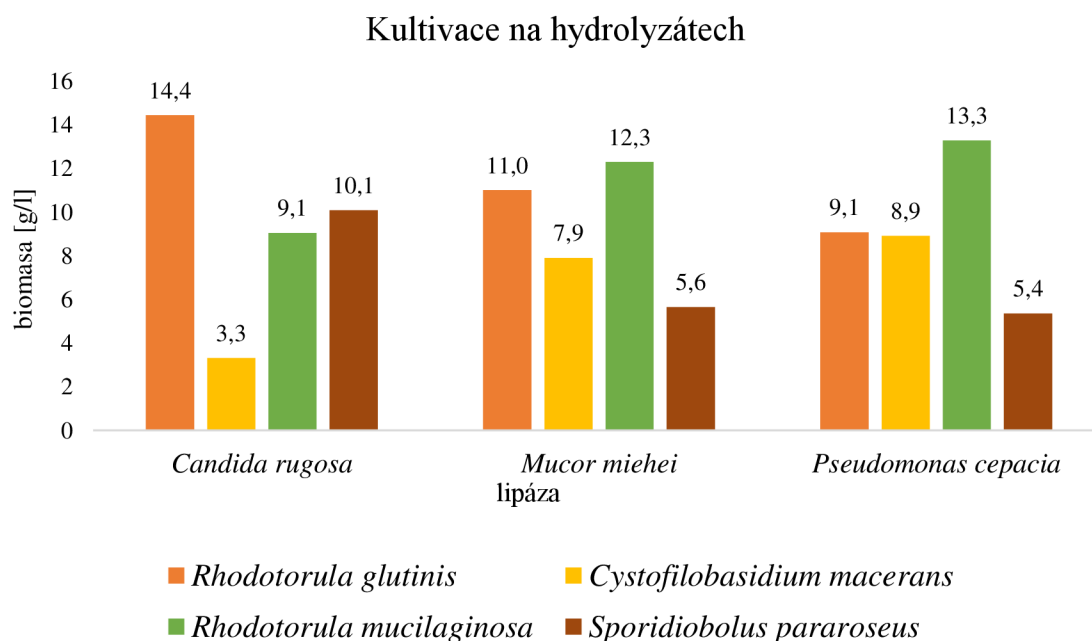
Obrázek 39 Profil mastných kyselin v biomase u C/N poměru 13

5.2.4 Kultivace kvasinek na různých enzymatických hydrolyzátech

U C/N poměru 13 byly také provedeny kultivace na dvou jiných enzymatických hydrolyzátech, kdy byly použity lipázy z *Mucor miehei* a z *Pseudomonas cepacia*. Tyto dvě lipázy vyšly při testování jako další vhodné (viz 5.1.1). Nárůst kvasinkových biomas v porovnání s enzymatickým hydrolyzátem lipázou z *Candida rugosa*, je uveden v grafu na Obrázek 41. U kvasinek *Cystofilobasidium macerans* a *Rhodotorula mucilaginosa* byl zaznamenán vyšší nárůst u hydrolyzátu z lipázy z *Pseudomonas cepacia* než v původním hydrolyzátu z lipázy z *Candida rugosa*. U kvasinek *Rhodotorula glutinis* a *Sporidiobolus pararoseus* tomu bylo naopak. Největší množství biomasy ale zůstává stále u kvasinky RG na hydrolyzátu z lipázy *Candida rugosa*.



Obrázek 40 Kultivace na enzymatických hydrolyzátech

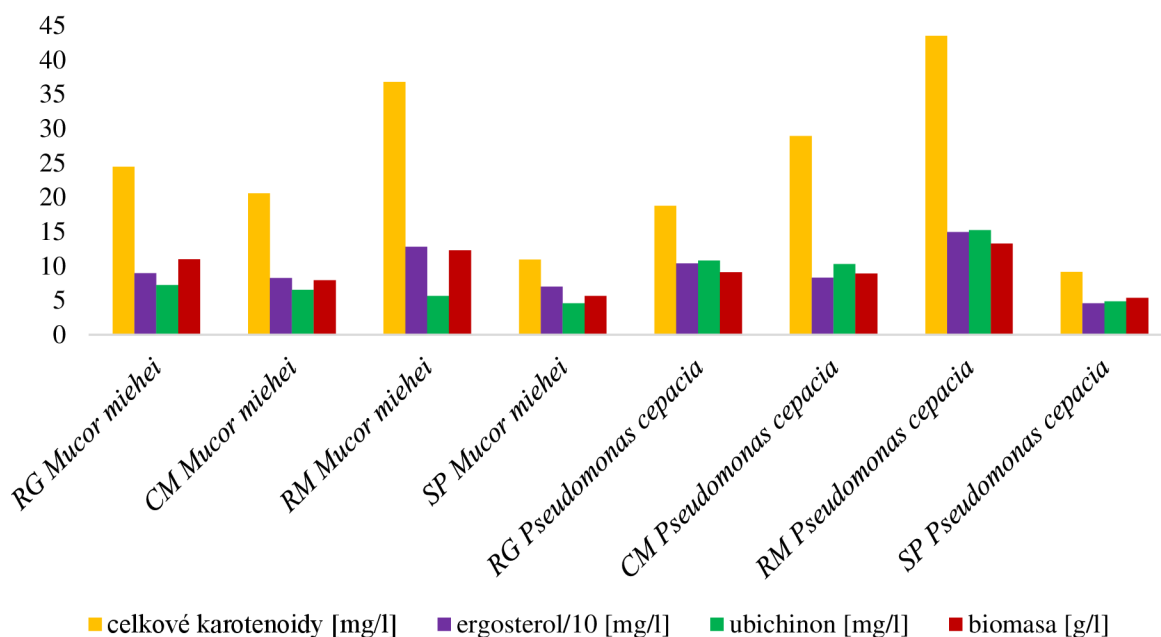


Obrázek 41 Grafické znázornění gravimetrického stanovení biomasy u enzymatických hydrolyzátu na C/N poměru 13

U karotenoidů při kultivaci na enzymatických hydrolyzátech došlo k velkému zvýšení produkce, zejména u kvasinek rodu *Rhodotorula*. V porovnání s enzymatickým hydrolyzátem lipázou z *Candida rugosa* (3-5 mg/l), se obsah karotenoidů zněkolikanásobil až na hodnoty 20 - 40 mg/l. Došlo i ke zvýšení tvorby torulenu (nejvyšší hodnota 15,5 mg/l u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa*) a torularhodinu, a to na úkor produkce β -karotenu.

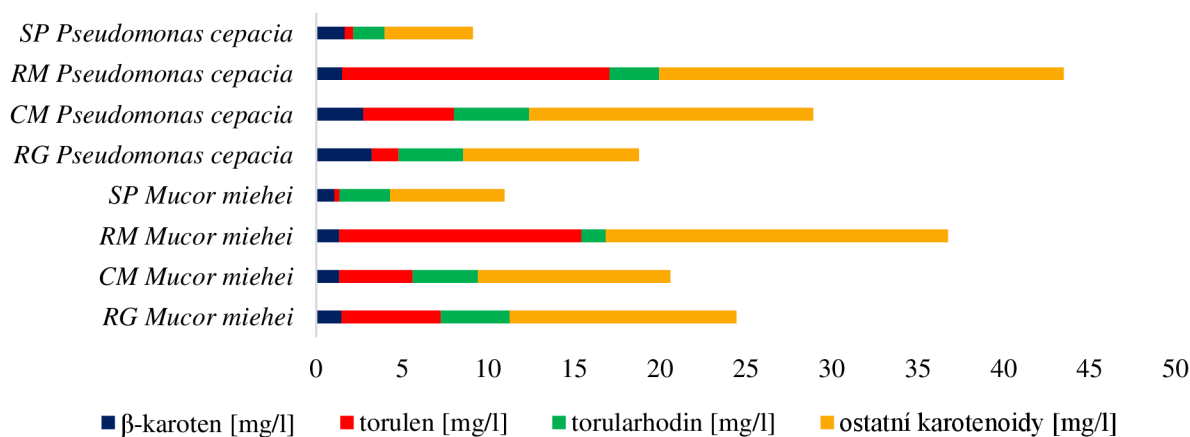
Ergosterol byl syntetizován průměrně ve stejné míře jako u předchozího enzymatického hydrolyzátu. Produkce ubichinonu se ale značně zvýšila, zejména u kvasinky *Rhodotorula glutinis*, až na 10,7 mg/l. Vyšší tvorba ubichinonu byla zaznamenána u všech kvasinek na hydrolyzátu lipázou z *Pseudomonas cepacia*.

produkce na enzymatických hydrolyzátech C/N poměr 13



Obrázek 42 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu u enzymatických hydrolyzátu na C/N poměru 13

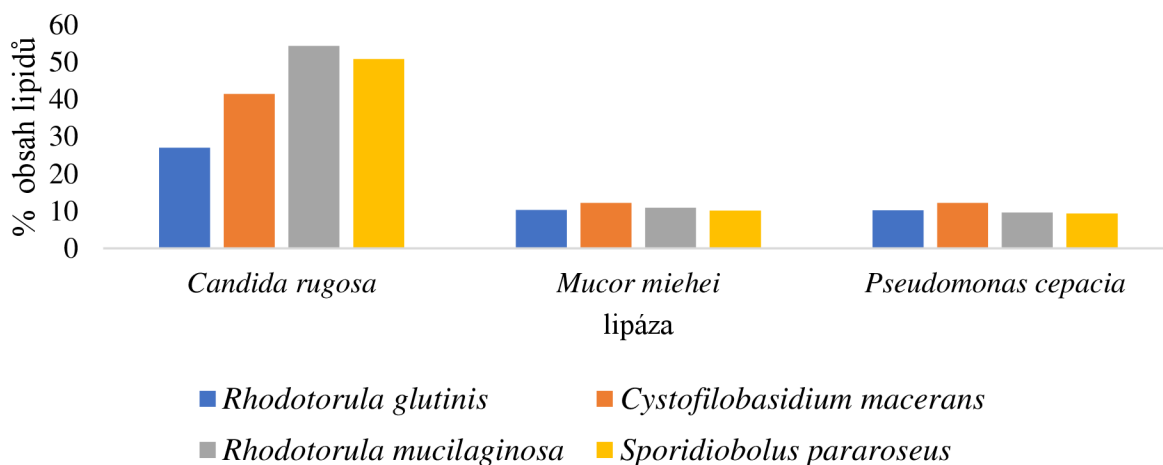
Profil karotenoidů: enzymatické hydrolyzáty C/N poměr 13



Obrázek 43 Zastoupení jednotlivých karotenoidů u enzymatických hydrolyzátu na C/N poměru 13

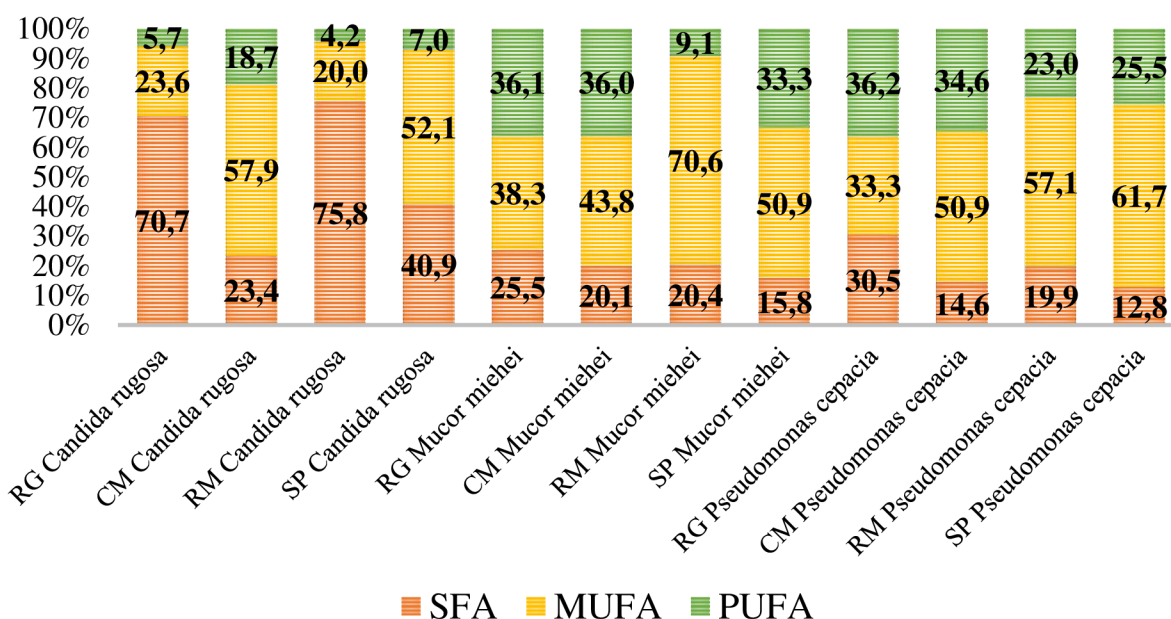
V případě produkce lipidů (viz Obrázek 44) se jejich procentuální zastoupení prudce snížilo, což může být způsobeno méně kvalitním hydrolyzátem s menším obsahem glycerolu. U dvou nových hydrolyzáťů ve všech kvasinkách bylo dosaženo nejvíce 12 % lipidů v biomase, což je více jak dvojnásobně méně než u původního hydrolyzáťu z lipázy z *Candida rugosa*.

Procentuální obsah lipidů v biomase u kultivací na hydrolyzáťech
C/N poměr 13



Obrázek 44 Procentuální zastoupení lipidů v biomase u kultivací na enzymatických hydrolyzáťech při C/N poměru 13

Z profilu mastných kyselin (Obrázek 45) je zřejmé, že u dvou nových enzymatických hydrolyzáťů došlo ke zvýšení tvorby polynenasycených mastných kyselin (především u kyseliny linolové a α -linolenové) a poklesu nasycených mastných kyselin, než tomu bylo u kultivace na enzymatickém hydrolyzáťu pomocí lipázy z *Candida rugosa*. Největší změna byla zaznamenána u kvasinky *Rhodotorula glutinis*.



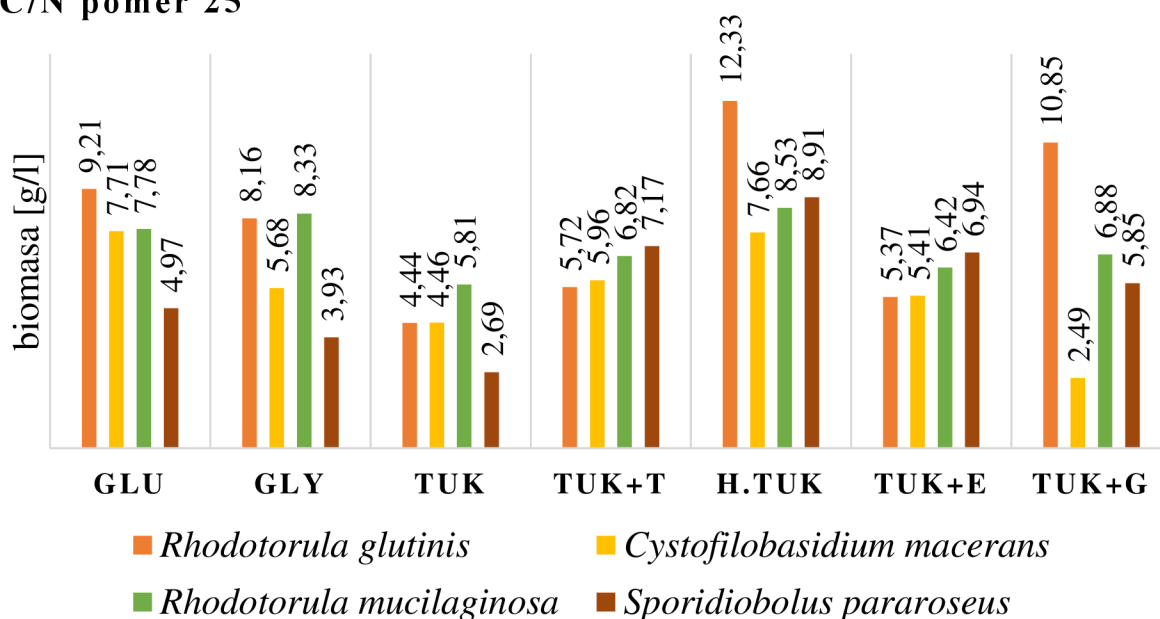
Obrázek 45 Profil mastných kyselin v biomase u kultivací na enzymatických hydrolyzáťech při C/N poměru 13

5.3 Výsledky základních kultivací kvasinek na C/N poměru 25

5.3.1 Růstové charakteristiky a celková biomasa kvasinek při C/N poměru 25

U kultivací kvasinek na C/N poměru 25, jejichž výsledky jsou souhrnně uvedeny v grafu na Obrázek 46, produkce biomasy obecně klesla na glukózových a glycerolových médiích. Naopak tomu bylo u médií, kde zdroj uhlíku tvořil odpadní tuk. Ve většině případů vzrostla produkce kvasinkové biomasy. U kvasinky *Cystofilobasidium macerans* byly na všech médiích pozorovány zvýšené nárůsty biomasy, v mnoha případech až dvakrát vyšší než u předchozího C/N poměru 13. Výtěžnost u kvasinek rodu *Rhodotorula* se nějak výrazně nesnížila. Opět největšího nárůstu dosáhla kvasinka *Rhodotorula glutinis* na médiu s enzymaticky hydrolyzovaným tukem s hodnotou 12,3 g/l biomasy.

C/N poměr 25



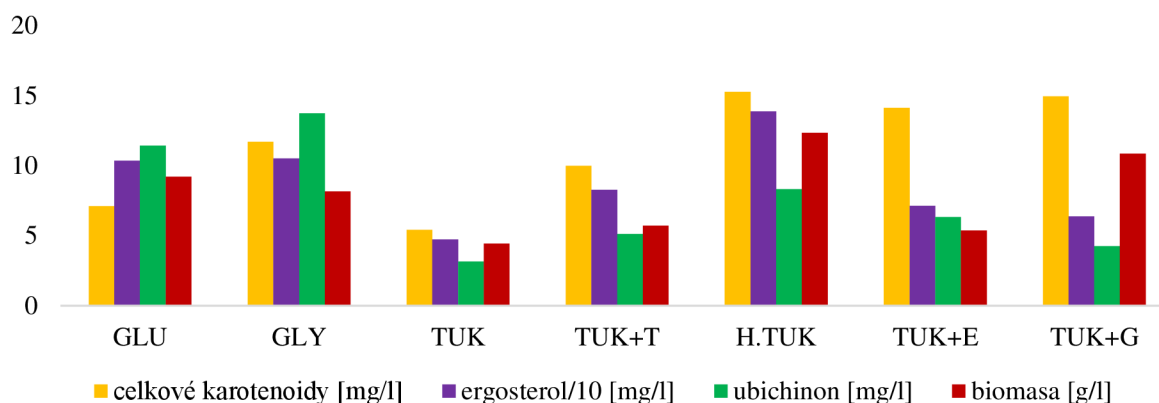
Obrázek 46 Grafické znázornění gravimetrického stanovení biomasy u základních kultivací na C/N poměru 25

5.3.2 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu na C/N poměru 25

Na obrázcích (Obrázek 47, Obrázek 49, Obrázek 51, Obrázek 53) jsou graficky znázorněny produkční vlastnosti karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu pro každý kmen na všech médiích. U kmene *Cystofilobasidium macerans* se produkce karotenoidů výrazně zvýšila oproti kultivacím na C/N poměru 13. Naopak došlo k poklesu produkce karotenoidů u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* a *Sporidiobolus pararoseus*. U kmene *S. pararoseus* došlo k výraznému poklesu β -karotenu a naopak se ve vyšších koncentracích tvořil torulen.

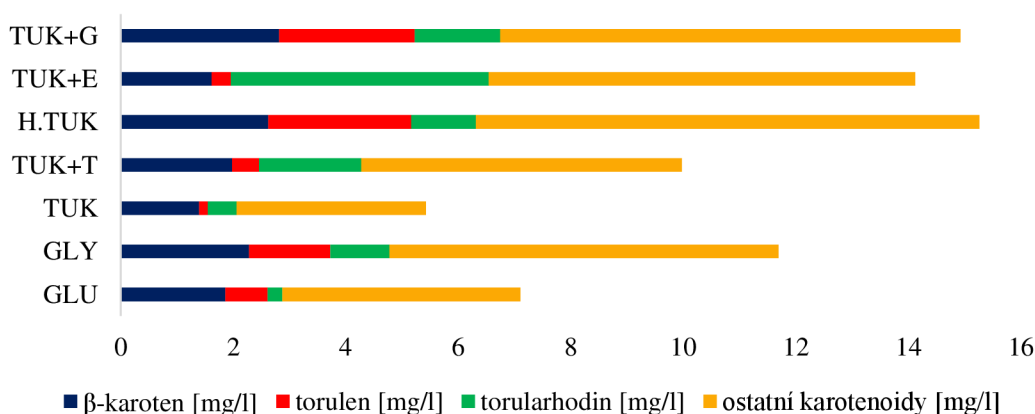
U ergosterolu byl zaznamenán významný nárůst zejména na médiích s hydrolyzovaným tukem, jeho hodnoty u *Rhodotorula glutinis* stouply až čtyřnásobně. Největším producentem této látky je jednoznačně na všech médiích kvasinka *Rhodotorula mucilaginosa*, jak tomu bylo i u poměru C/N 13. Nejvyšší produkci ubichinonu vykazovala kvasinka *Cystofilobasidium macerans* kde hodnoty na tukových médiích dosahovaly až 33,7 mg/l. Hodnoty pro ubichinon se zvýšily i u kvasinky *Sporidiobolus pararoseus*.

Rhodotorula glutinis C/N poměr 25



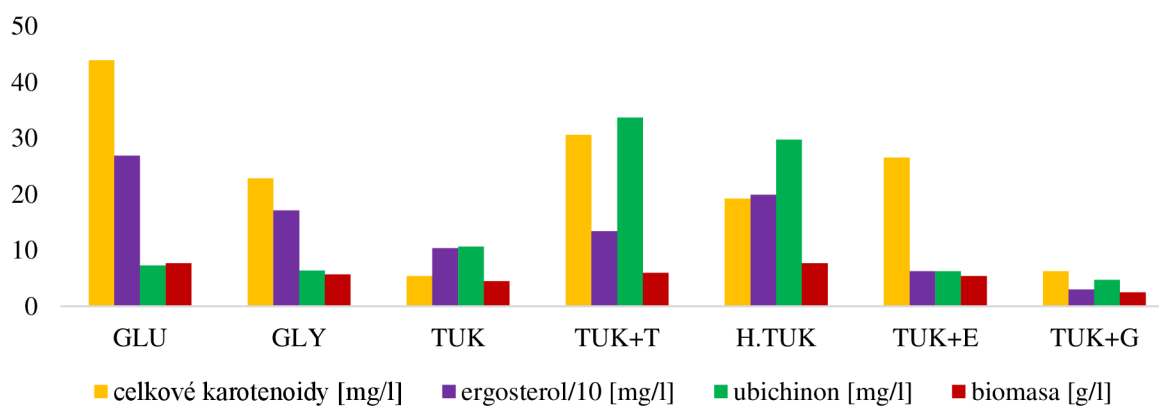
Obrázek 47 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu kvasinkou *Rhodotorula glutinis* na C/N poměru 25

Rhodotorula glutinis C/N poměr 25: profil karotenoidů



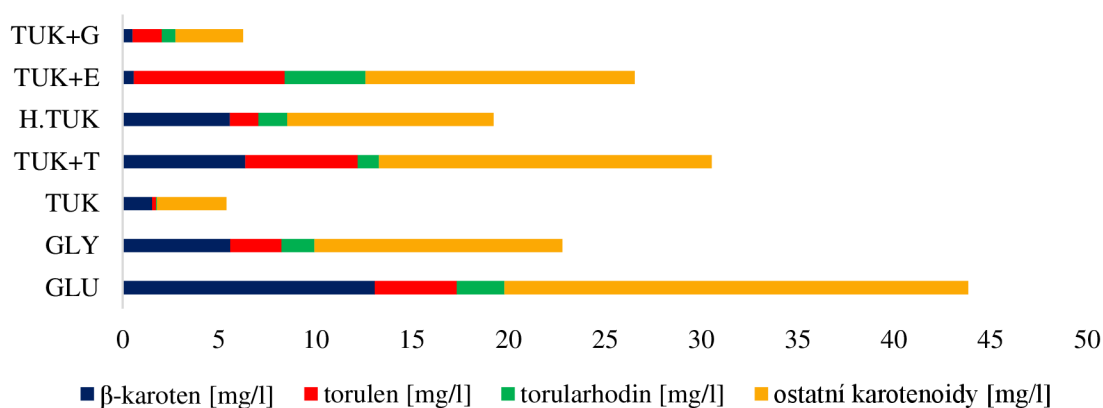
Obrázek 48 Zastoupení jednotlivých karotenoidů u kvasinky *Rhodotorula glutinis* na C/N poměru 25

Cystofilobasidium macerans C/N poměr 25



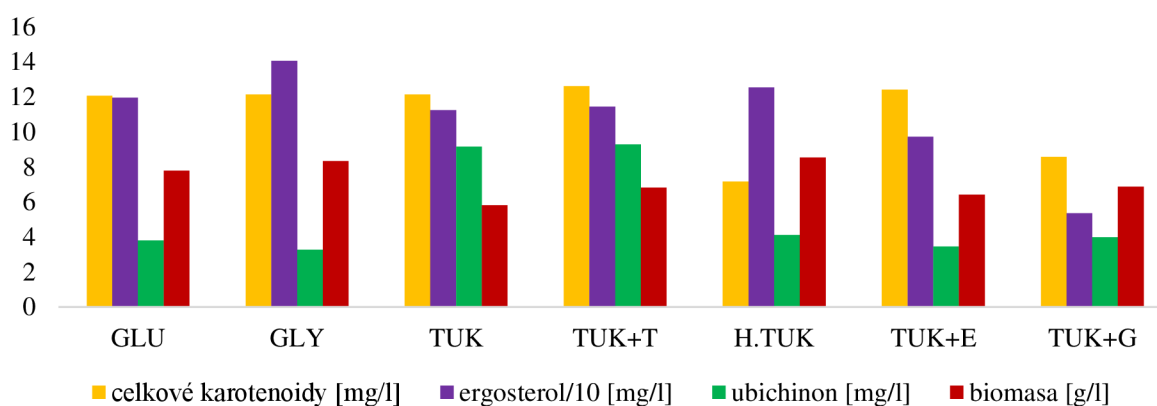
Obrázek 49 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu kvasinkou *Cystofilobasidium macerans* na C/N poměru 25

Cystofilobasidium macerans C/N poměr 25: profil karotenoidů



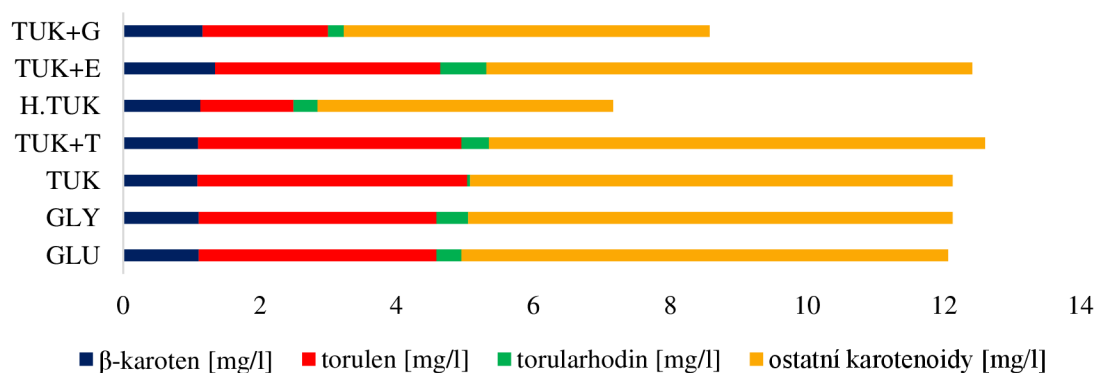
Obrázek 50 Zastoupení jednotlivých karotenoidů u kvasinky *Cystofilobasidium macerans* na C/N poměru 25

Rhodotorula mucilaginosa C/N poměr 25



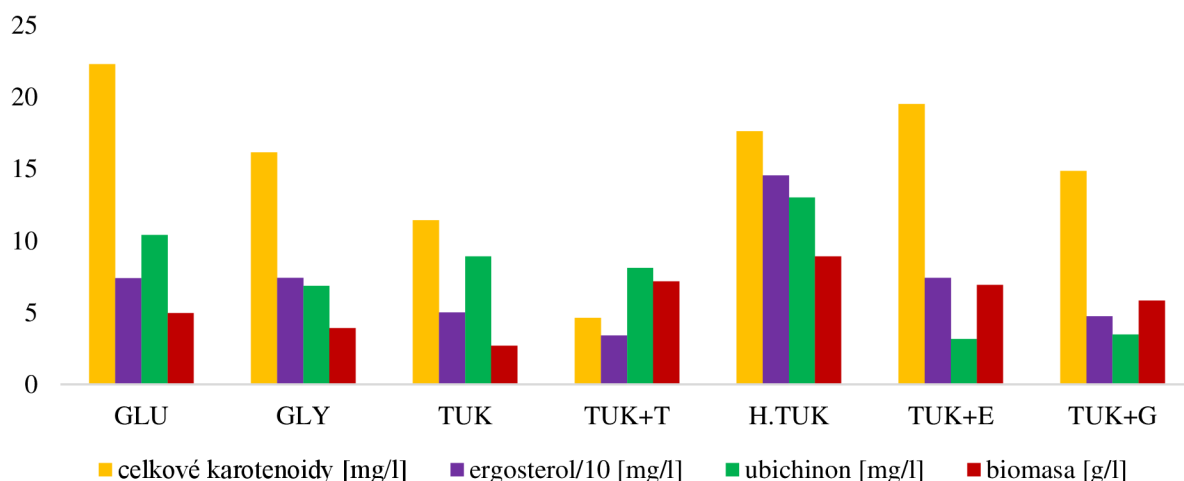
Obrázek 51 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu kvasinkou *Rhodotorula mucilaginosa* na C/N poměru 25

Rhodotorula mucilaginosa C/N poměr 25: profil karotenoidů



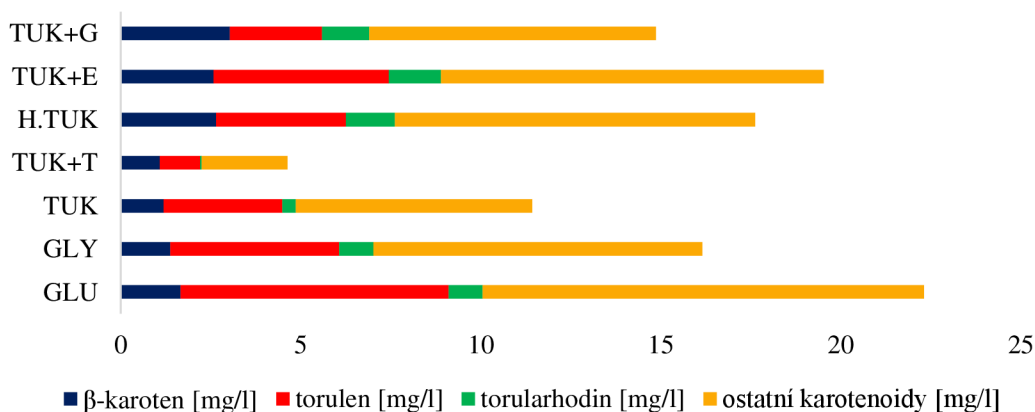
Obrázek 52 Zastoupení jednotlivých karotenoidů u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* na C/N poměru 25

Sporidiobolus pararoseus C/N poměr 25



Obrázek 53 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu kvasinkou *Sporidiobolus pararoseus* na C/N poměru 25

Sporidiobolus pararoseus C/N poměr 25: profil karotenoidů



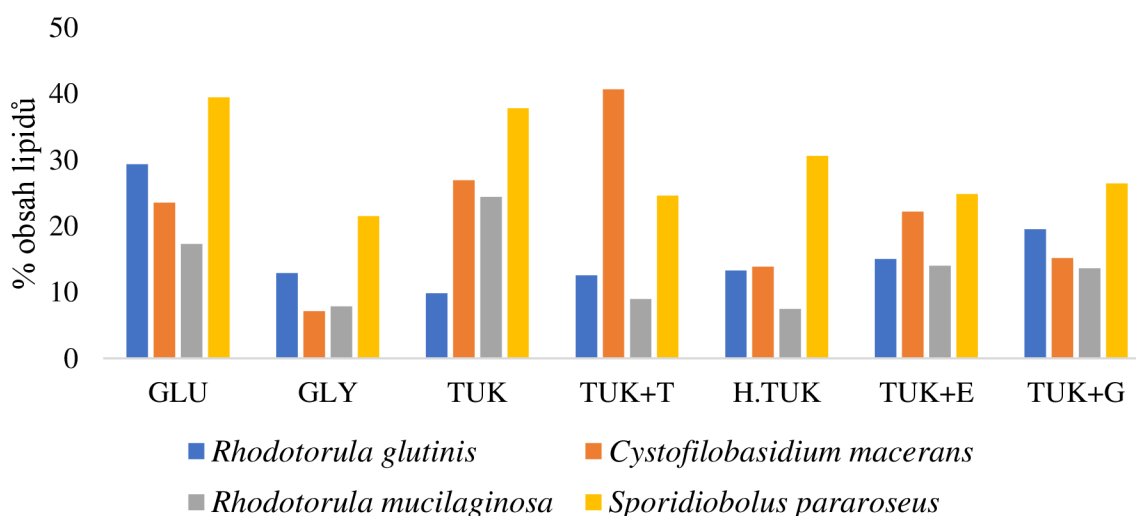
Obrázek 54 Zastoupení jednotlivých karotenoidů u kvasinky *Sporidiobolus pararoseus* na C/N poměru 25

5.3.3 Produkce lipidů na C/N poměru 25

Z hlediska produkce lipidů (Obrázek 55) se jako nejvhodnější kmen jeví *Sporidiobolus pararoseus*, který dosahuje u glukóзовého média až 40 % intracelulárních lipidů ve své biomase. Stejně procento má ve svých buňkách i kvasinka *Cystofilobasidium macerans*, ale pouze kultivovaná na médiu s odpadním tukem a emulgátorem.

Obecně ale došlo ke zvýšení produkce intracelulárních lipidů, než tomu bylo u kultivací na C/N poměru 13. Kvasinkou, která měla nejnižší obsah lipidů, stále zůstává *Rhodotorula mucilaginosa*, jejíž hodnoty se průměrně pohybují kolem 15 %.

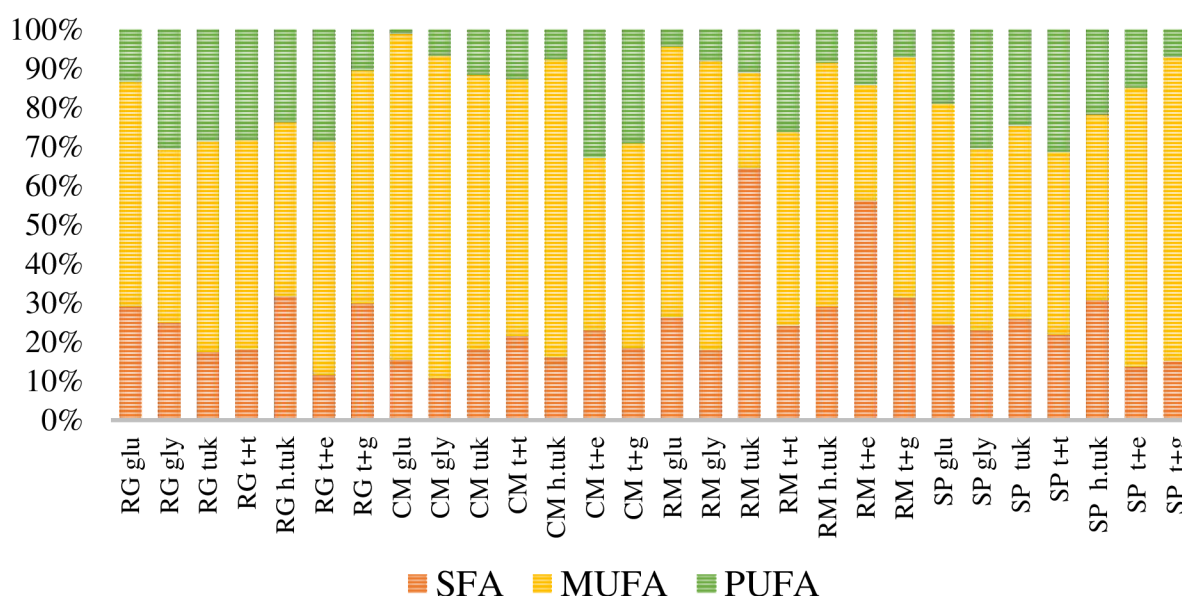
Procentuální obsah lipidů v biomase u C/N poměru 25



Obrázek 55 Procentuální zastoupení lipidů v biomase u C/N poměru 25

5.3.3.1 Zastoupení mastných kyselin

Co se týče profilu mastných kyselin, který je graficky znázorněn na Obrázek 56, výrazně se změnil poměr MUFA a PUFA u kvasinky *Cystofilobasidium macerans*. Došlo zde ke snížení tvorby polynenasycených mastných kyselin (hlavně kyseliny linolové) a zvýšilo se procento mononenasycených mastných kyselin (především kyseliny olejové a palmitolejové), než jak tomu bylo u C/N poměru 13. U kvasinky *Sporidiobolus pararoseus* vzrostlo procento PUFA a v některých případech se zvýšil i podíl MUFA na úkor nasycených mastných kyselin. Nejzajímavější profil mastných kyselin má u kultivací na C/N poměru 25 kvasinka *Rhodotorula glutinis*, kultivovaná na médiu s odpadním tukem a přidaným enzymem, kde zastoupení nasycených mastných kyselin je pouze 11,7 %, MUFA tvoří 59,7 % a zbylých 28,6 jsou zdraví prospěšné polynenasycené mastné kyseliny.



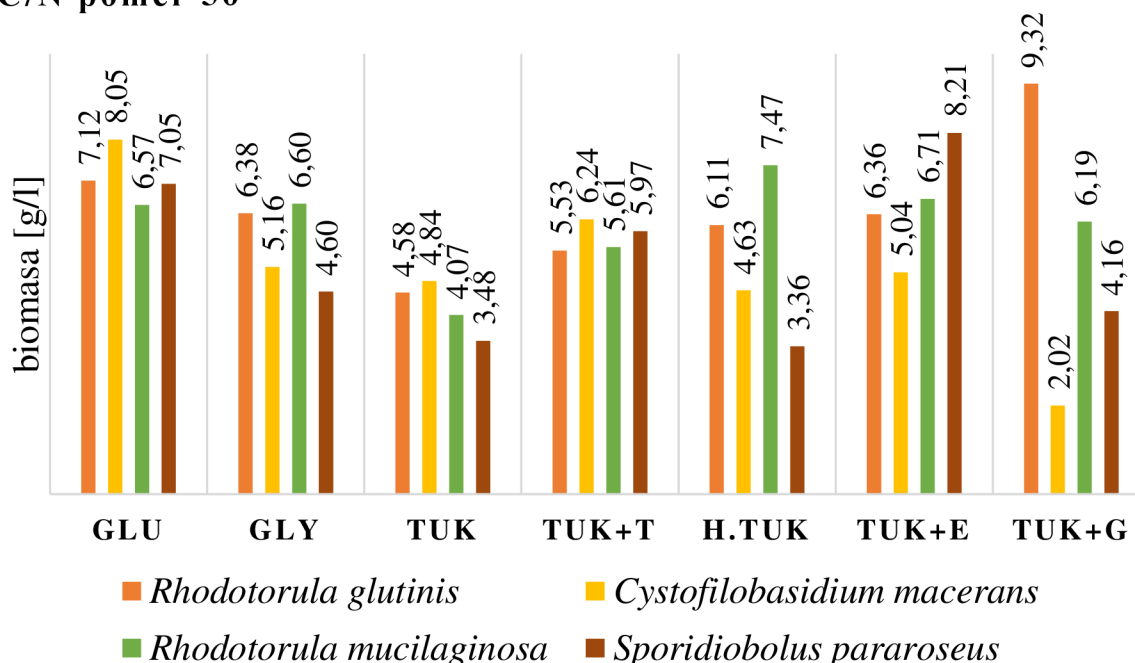
Obrázek 56 Profil mastných kyselin v biomase u C/N poměru 25

5.4 Výsledky základních kultivací kvasinek na C/N poměru 50

5.4.1 Růstové charakteristiky a celková biomasa kvasinek při C/N poměru 50

U kultivací na C/N poměru 50, jejichž výsledky jsou přehledně uvedeny v grafu na Obrázek 57, došlo ke snížení produkce kvasinkové biomasy téměř u všech kmenů, což může být následek možné substrátové inhibice. Pouze pro kvasinku *Cystofilobasidium macerans* byly tyto podmínky optimálnější, její biomasa vzrostla zejména na glukózovém, tukovém médiu a médiu tukovém s přidavkem emulgátoru. Nejvíce se kvasinkám dařilo růst na glukózovém médiu a dále na médiu s tukem a přidavkem enzymu. Konstantně největších nárůstů dosahuje kvasinka *Rhodotorula glutinis* a nejméně se dařilo na C/N poměru 50 kvasince *Sporidiobolus pararoseus*.

C/N poměr 50

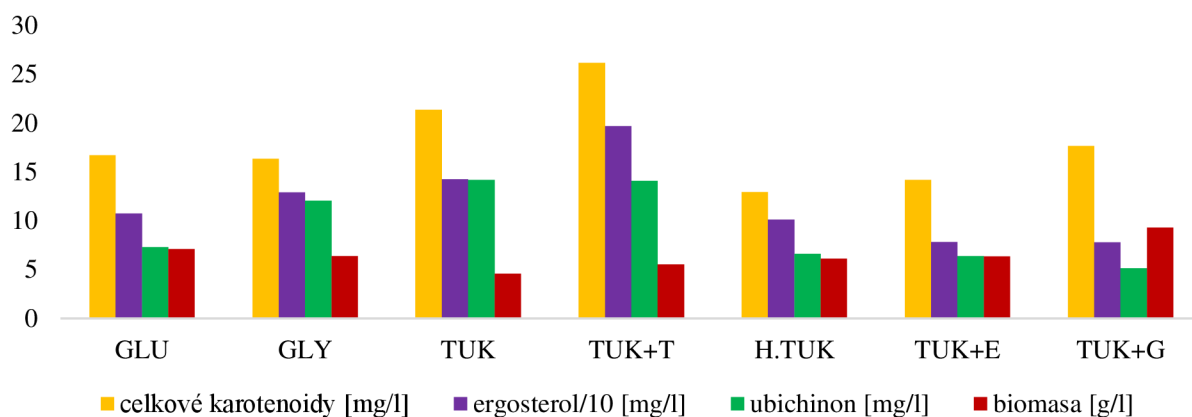


Obrázek 57 Grafické znázornění gravimetrického stanovení biomasy u základních kultivací na C/N poměru 50

5.4.2 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu na C/N poměru 50

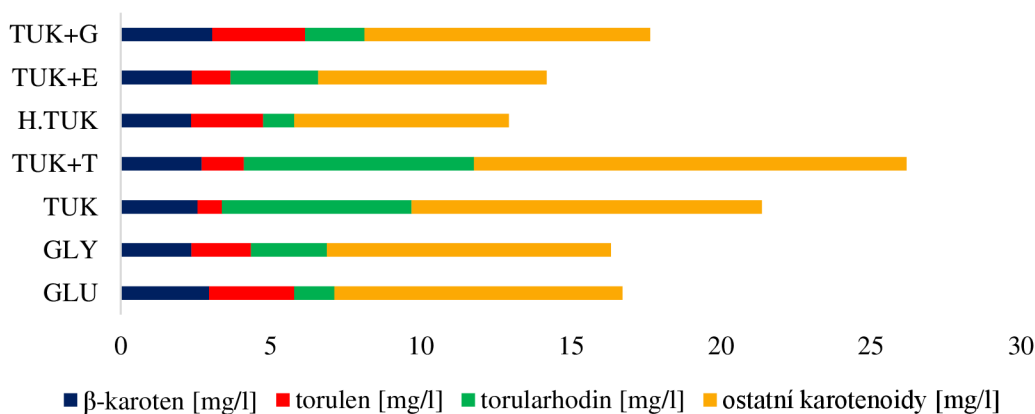
Z výsledků analýzy karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu, které jsou v grafech na Obrázek 58, Obrázek 60, Obrázek 62 a Obrázek 64, vyplývá, že obsah karotenoidů se nějak výrazně nezměnil ve srovnání s C/N poměrem 25. Pouze u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* byl zaznamenán výrazný nárůst na některých médiích (glukózové, glycerolové a tukové). Z grafu na Obrázek 59 a Obrázek 61 si lze všimnout, že C/N poměr 50 podporoval syntézu torularhodinu u kvasinek RG a CM. Této látky bylo nejvíce naměřeno u kvasinky RG na tukovém médiu s přidavkem emulgátoru (7,6 mg/l), kde tvořil skoro třetinu všech karotenoidů. Co se týče produkce ergosterolu, tak jeho koncentrace vzrostla u kvasinky CM zejména na tukových médiích, nejvyšší koncentrace byla ale naměřena na glycerolovém médiu (30,3 mg/l). Největší produkci ubichinonu vykazovala kvasinka *Sporidiobolus pararoseus* na tukovém médiu a médiu s tukem a přidavkem emulgátoru.

Rhodotorula glutinis C/N poměr 50



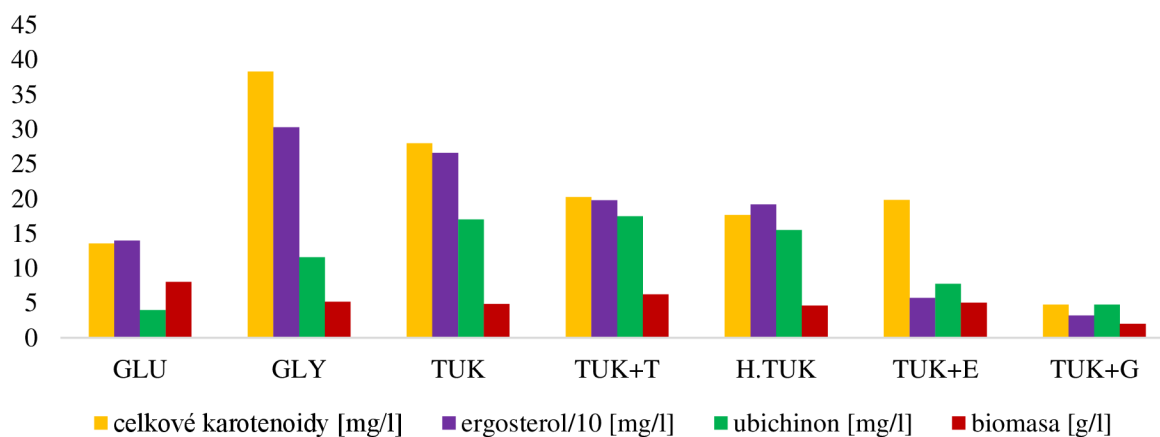
Obrázek 58 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu kvasinkou *Rhodotorula glutinis* na C/N poměru 50

Rhodotorula glutinis C/N poměr 50: profil karotenoidů



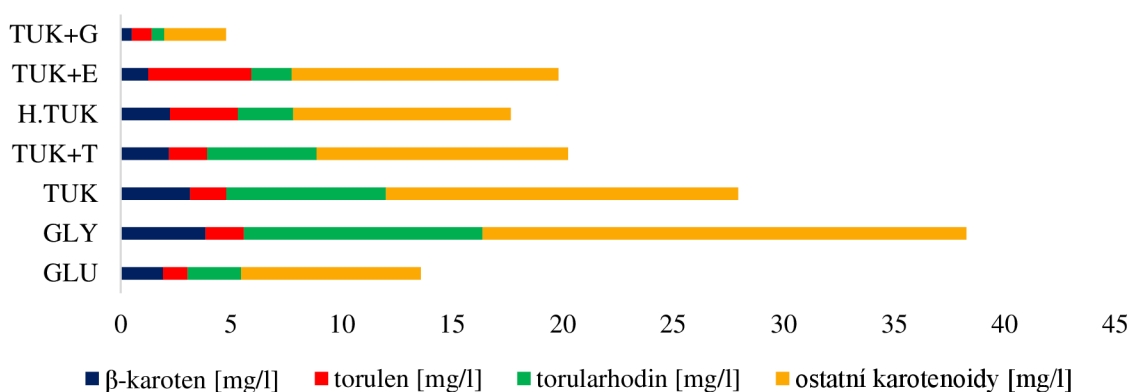
Obrázek 59 Zastoupení jednotlivých karotenoidů u kvasinky *Rhodotorula glutinis* na C/N poměru 50

Cystofilobasidium macerans C/N poměr 50



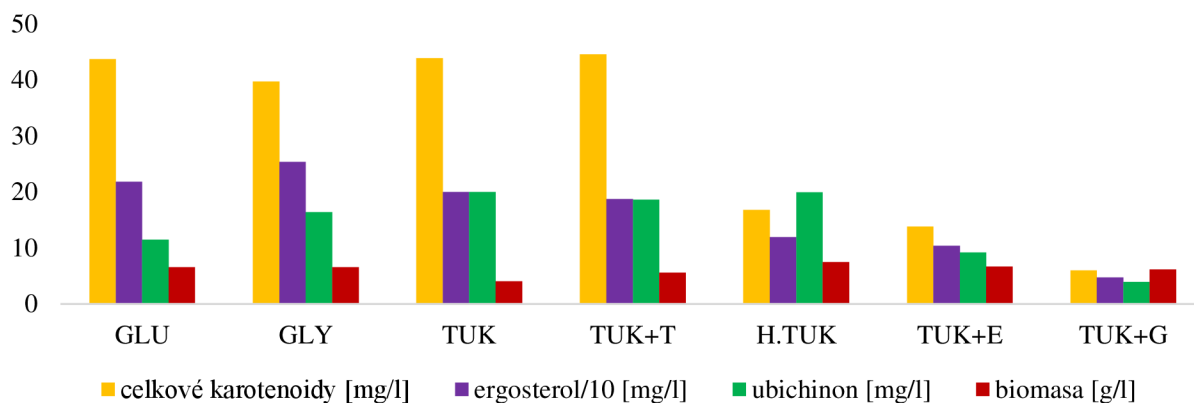
Obrázek 60 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu kvasinkou *Cystofilobasidium macerans* na C/N poměru 50

Cystofilobasidium macerans C/N poměr 50: profil karotenoidů



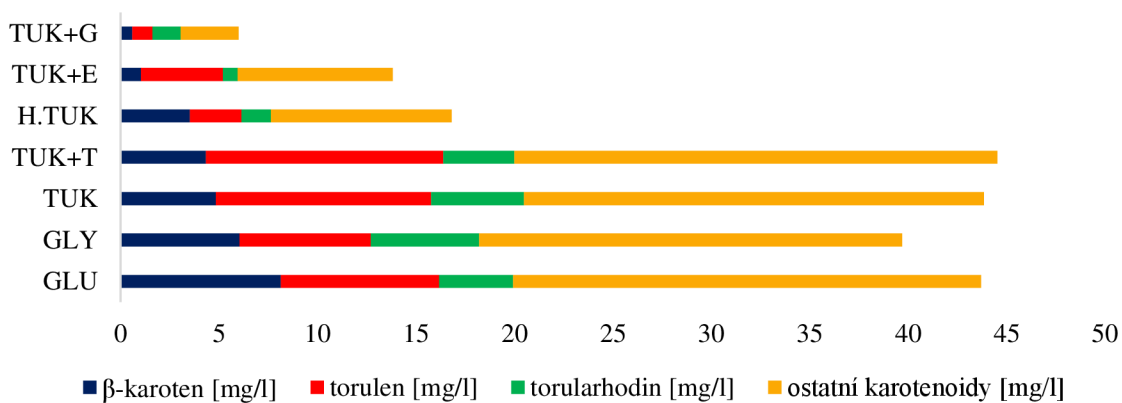
Obrázek 61 Zastoupení jednotlivých karotenoidů u kvasinky *Cystofilobasidium macerans* na C/N poměru 50

Rhodotorula mucilaginosa C/N poměr 50



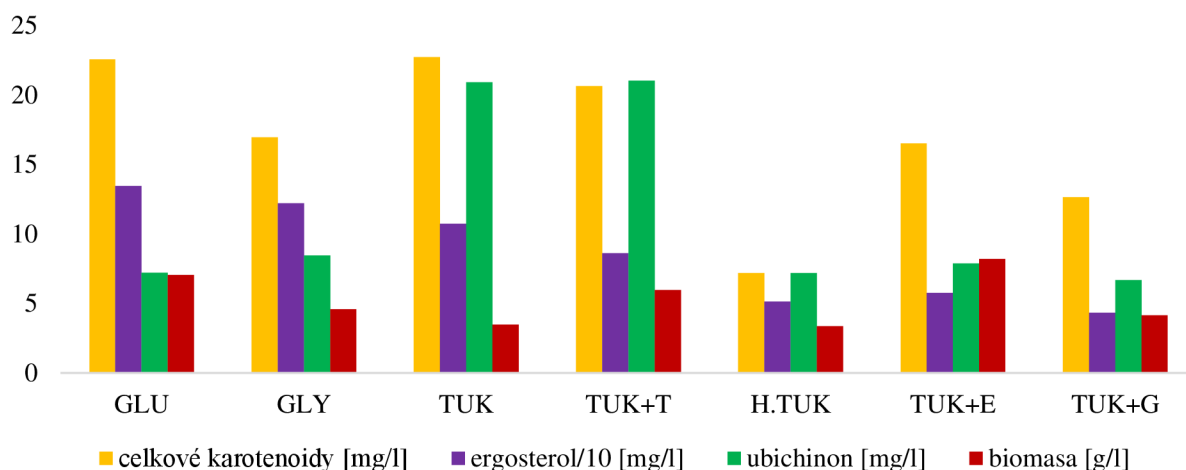
Obrázek 62 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu kvasinkou *Rhodotorula mucilaginosa* na C/N poměru 50

Rhodotorula mucilaginosa C/N poměr 50: profil karotenoidů



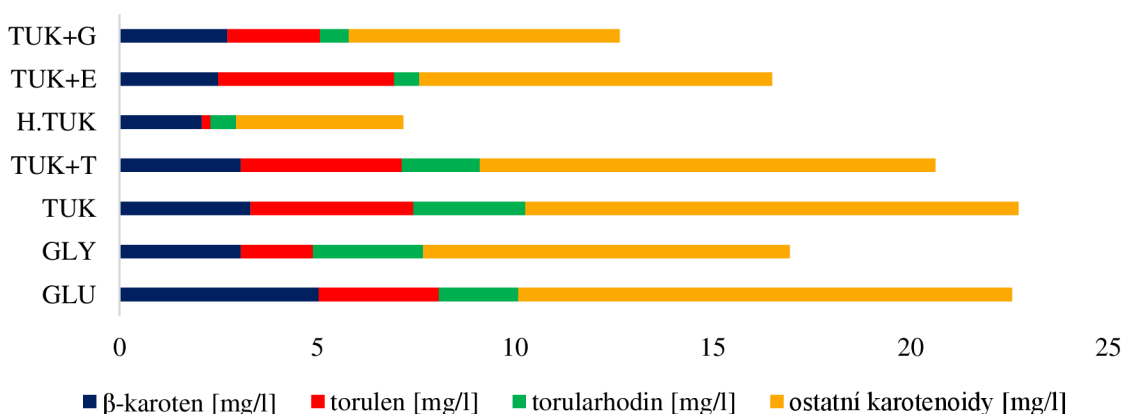
Obrázek 63 Zastoupení jednotlivých karotenoidů u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* na C/N poměru 50

Sporidiobolus pararoseus C/N poměr 50



Obrázek 64 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu kvasinkou *Sporidiobolus pararoseus* na C/N poměru 50

Sporidiobolus pararoseus C/N poměr 50: profil karotenoidů

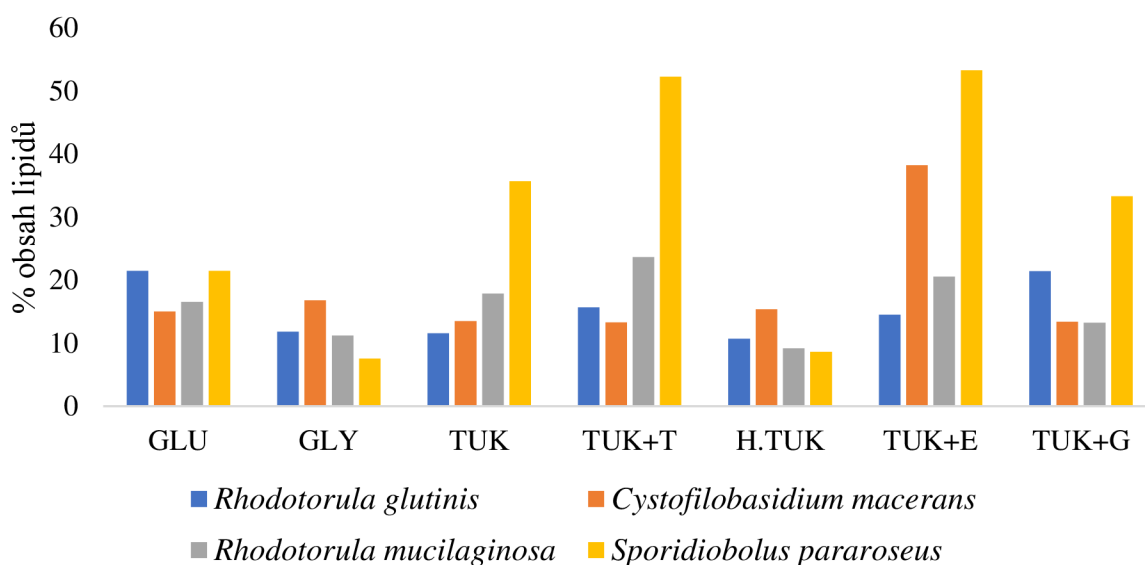


Obrázek 65 Zastoupení jednotlivých karotenoidů u kvasinky *Sporidiobolus pararoseus* na C/N poměru 50

5.4.3 Produkce lipidů na C/N poměru 50

Po analýze mastných kyselin v biomase (graf na Obrázek 66) vyplynulo, že procentuální obsah intracelulárních lipidů se v buňce pohybuje průměrně kolem 15 – 20 %. V porovnání s předchozím C/N poměrem došlo u kvasinky *R. glutinis* ke snížení procenta lipidů. Podobně tomu bylo i u kmene *Cystofilobasidium macerans*, kdy se obsah lipidů výrazně snížil, až na vzorek kultivovaný na tukovém médiu s přidavkem emulgátoru, kde se hodnota skoro zdvojnásobila na 38 %. U kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* nedošlo k žádné výrazné změně v porovnání s kultivací na C/N poměru 25. největší podíl intracelulárních lipidů má kvasinka *Sporidiobolus pararoseus*, a to na tukových médiích s přidavkem emulgátoru a enzymu. U těchto hodnot došlo až ke zdvojnásobení na 52 % a 53 %.

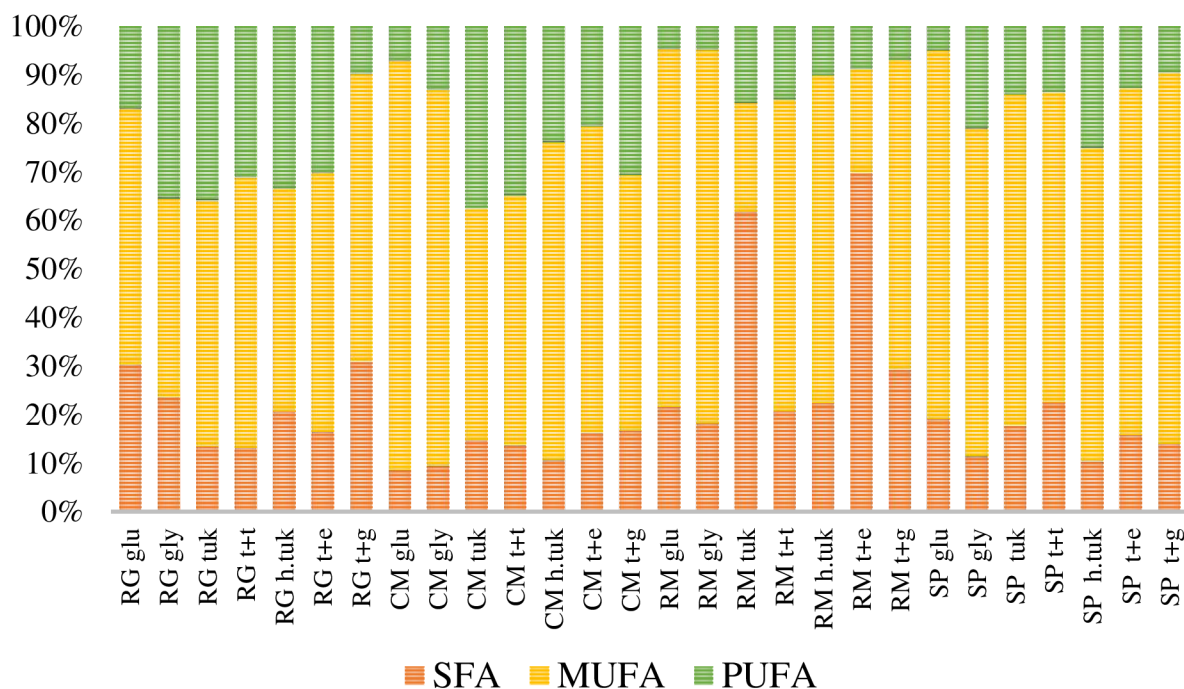
Procentuální obsah lipidů v biomase u C/N poměru 50



Obrázek 66 Procentuální zastoupení lipidů v biomase u C/N poměru 50

5.4.3.1 Zastoupení mastných kyselin

Profil mastných kyselin u kultivací na C/N poměru 50, který je na Obrázek 67, se nějak výrazně neliší od předchozího u C/N poměru 25. Největší zastoupení PUFA mají kvasinky *Rhodotorula glutinis* a *Cystofilobasidium macerans*, u těchto kmenů je pozorován i malý podíl SFA. Naopak vysoký obsah nasycených mastných kyselin (kyseliny stearové a hexadekanové) má opět kvasinka *Rhodotorula mucilaginosa* kultivovaná na tukovém médiu a médiu s přidavkem enzymu (až 70%).



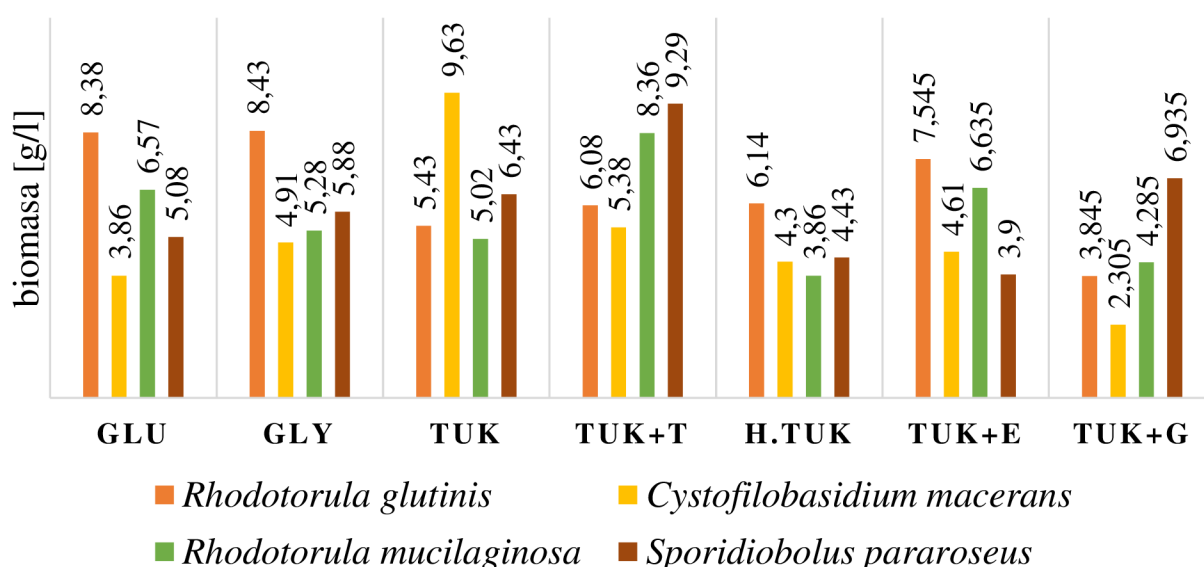
Obrázek 67 Profil mastných kyselin v biomase u C/N poměru 50

5.5 Výsledky základních kultivací kvasinek na C/N poměru 100

5.5.1 Růstové charakteristiky a celková biomasa kvasinek při C/N poměru 100

U kultivací na C/N poměru 100 biomasa dosahovala taktéž nižších nárůstů, což může být zapříčiněno již zmíněnou substrátovou inhibicí. Kompletní nárůsty u všech vzorků jsou uvedeny v grafu na Obrázek 68. U kvasinky *Rhodotorula glutinis* došlo k mírnému nárůstu biomasy než u předchozího C/N poměru 50. Odlišoval se jen vzorek kultivovaný na tukovém médiu s glukózou, kde biomasa klesla o polovinu. Kvasinka *Cystofilobasidium macerans* neprojevovala žádné významné změny, až na médiu se surovým odpadním tukem, kde se dočkala úplně nejvyššího nárůstu, a to 9,6 g/l. Kmen *Sporidiobolus pararoseus* dosahoval podobných produkčních hodnot jako u předchozích kultivací.

C/N poměr 100

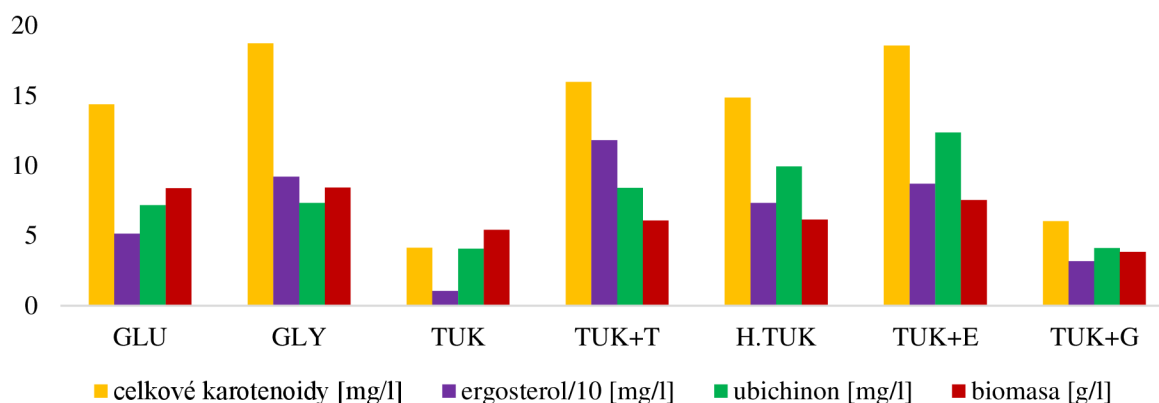


Obrázek 68 Grafické znázornění gravimetrického stanovení biomasy u základních kultivací na C/N poměru 100

5.5.2 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu na C/N poměru 100

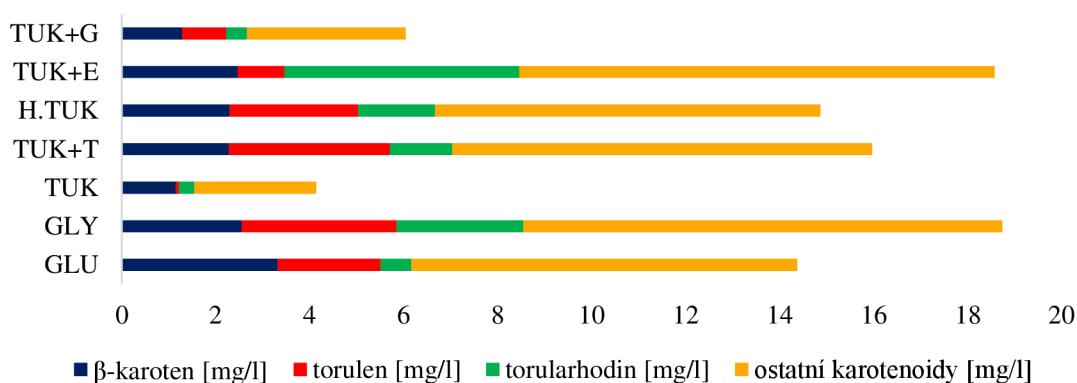
Z analýzy pomocí HPLC/PDA vyplývá (výsledky na Obrázek 69, Obrázek 71, Obrázek 73, Obrázek 75), že množství karotenoidů bylo u kvasinek převážně sníženo v porovnání s C/N poměrem 50. U kvasinky *Rhodotorula glutinis* bylo pozorováno mírné snížení, ale i větší poměrné zastoupení β -karotenu. Kvasinka *C. macerans* karotenoidů výrazně snížila, v této kultivaci se ale vyznačuje vysokým podílem torularhodinu. V rámci této kultivace výrazně klesla i produkce karotenoidů kvasinkou *Rhodotorula mucilaginosa*, pouze na tukovém médiu si zachovala obdobné produkční vlastnosti jako u C/N poměru 50. U tohoto kmene byl pozorován minimální obsah torularhodinu. Jediná kvasinka, která zvýšila produkci karotenoidů je *Sporidiobolus pararoseus* a to na médiích s tukem a tukem s přísadkou emulgátorem. Největší nárůst ergosterolu byl naměřen u kmene *S. pararoseus* na médiu se surovým odpadním tukem (15,2 mg/l). Jinak u ostatních tří kmenů byl pozorován úbytek této látky. Hodnoty pro ubichinon jsou u kvasinky *Rhodotorula glutinis* podobné, u kmene *C. macerans* taktéž, na dvounásobnou hodnotu se ubichinon zvýšil pouze na médiu s tukem a glukózou. Nejvíce ubichinonu bylo naměřeno u kvasinky *Sporidiobolus pararoseus* na tuku s emulgátorem (20,3 mg/l).

Rhodotorula glutinis C/N poměr 100



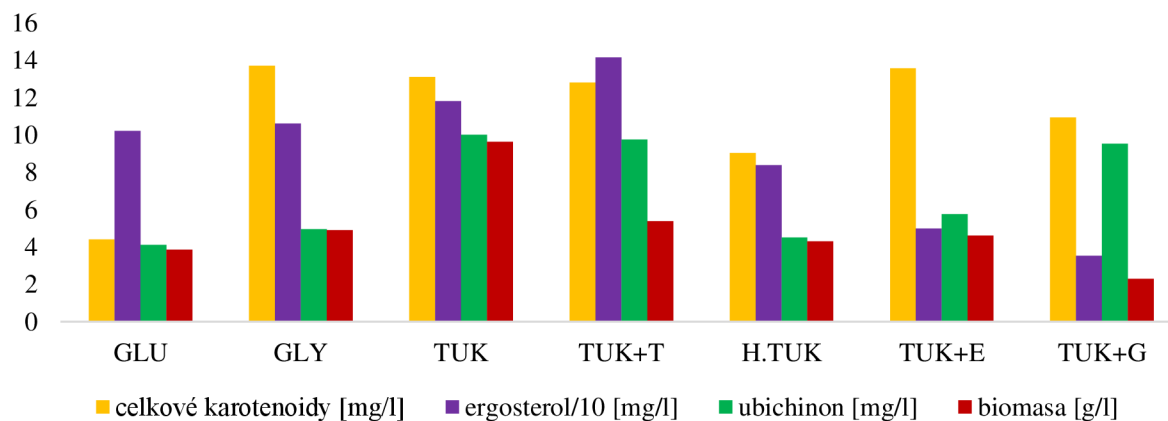
Obrázek 69 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu kvasinkou *Rhodotorula glutinis* na C/N poměru 100

Rhodotorula glutinis C/N poměr 100: profil karotenoidů



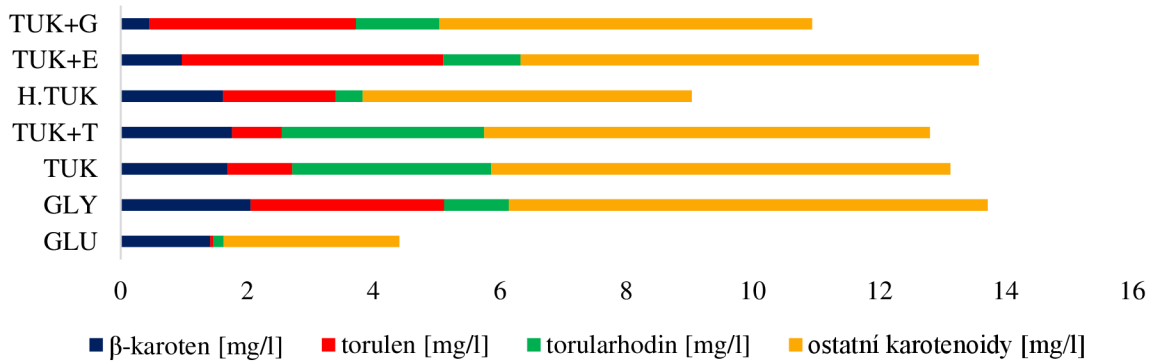
Obrázek 70 Zastoupení jednotlivých karotenoidů u kvasinky *Rhodotorula glutinis* na C/N poměru 100

Cystofilobasidium macerans C/N poměr 100



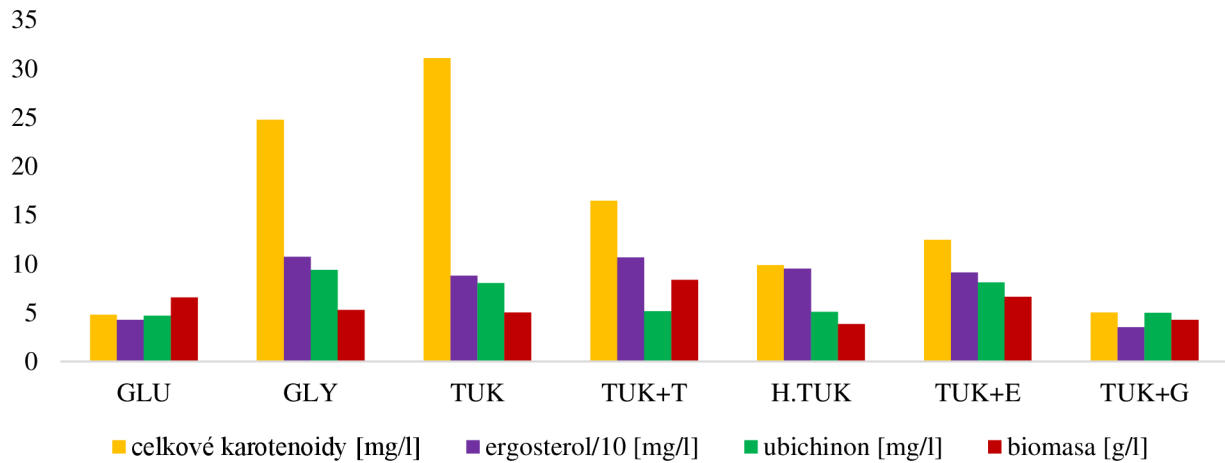
Obrázek 71 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu kvasinkou *Cystofilobasidium macerans* na C/N poměru 100

Cystofilobasidium macerans C/N poměr 100: profil karotenoidů



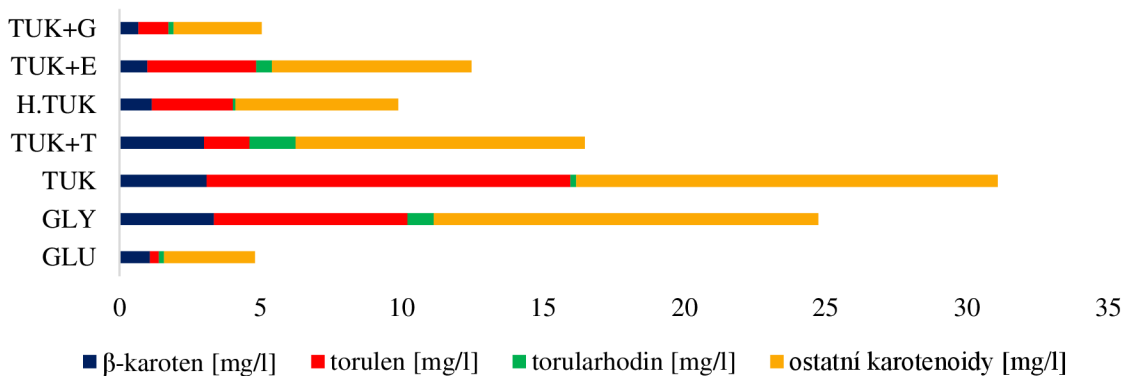
Obrázek 72 Zastoupení jednotlivých karotenoidů u kvasinky *Cystofilobasidium macerans* na C/N poměru 100

Rhodotorula mucilaginosa C/N poměr 100



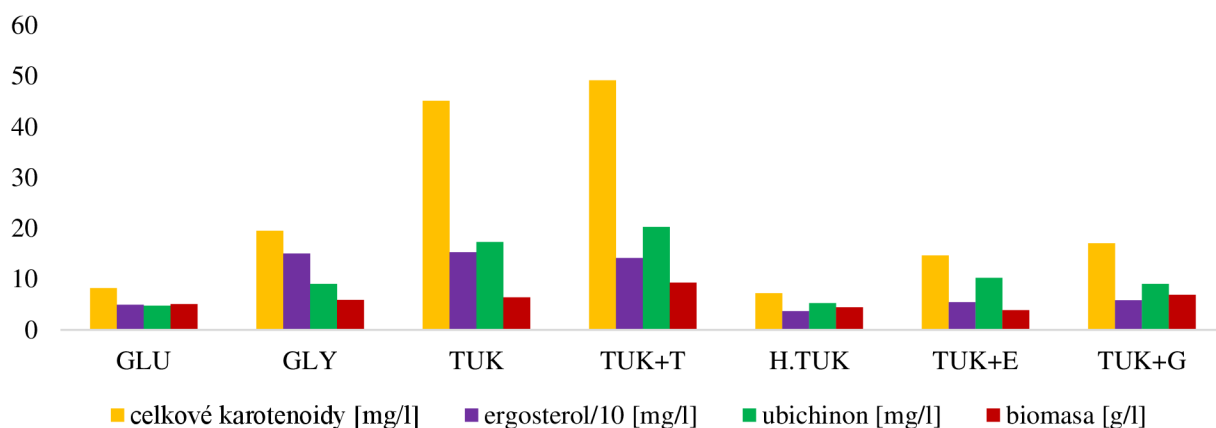
Obrázek 73 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu kvasinkou *Rhodotorula mucilaginosa* na C/N poměru 100

Rhodotorula mucilaginosa C/N poměr 100: profil karotenoidů



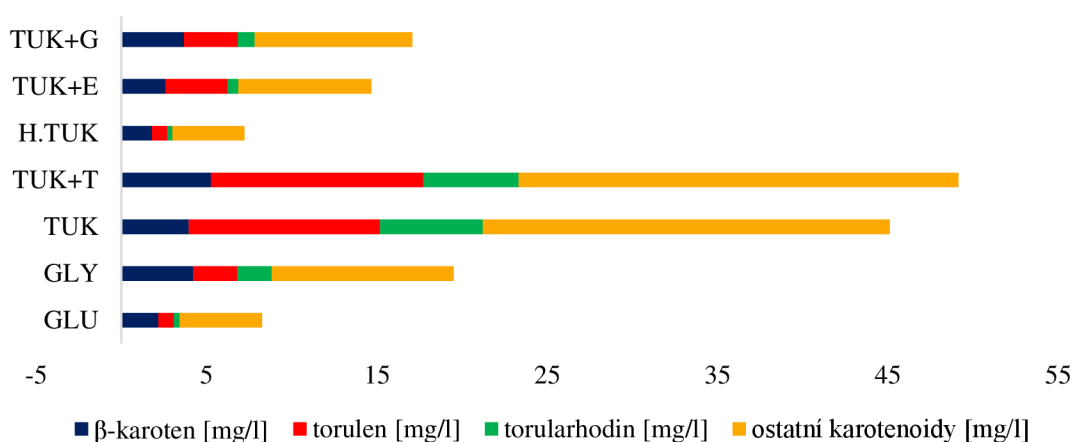
Obrázek 74 Zastoupení jednotlivých karotenoidů u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* na C/N poměru 100

Sporidiobolus pararoseus C/N poměr 100



Obrázek 75 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu kvasinkou *Sporidiobolus pararoseus* na C/N poměru 100

Sporidiobolus pararoseus C/N poměr 100: profil karotenoidů

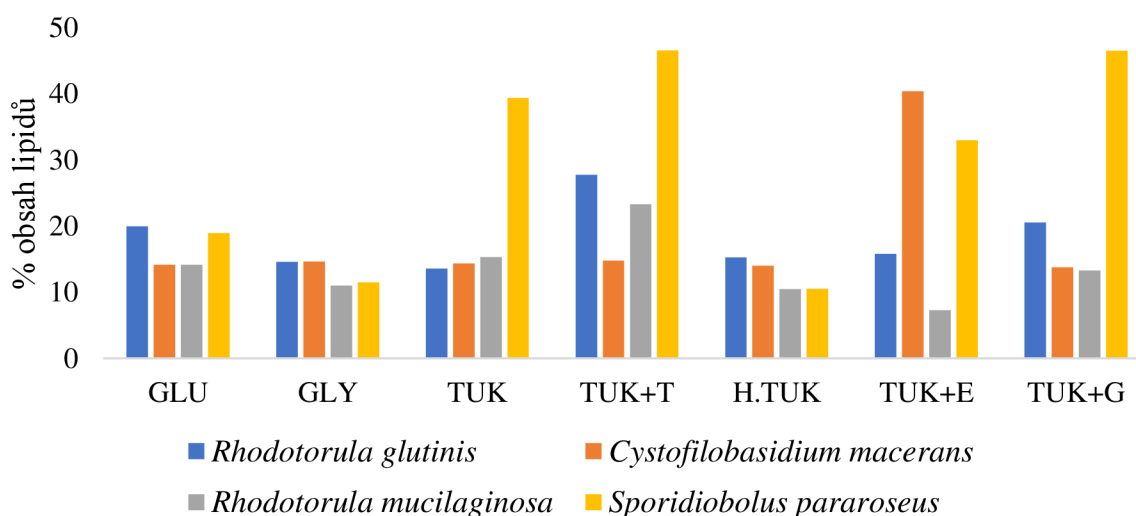


Obrázek 76 Zastoupení jednotlivých karotenoidů u kvasinky *Sporidiobolus pararoseus* na C/N poměru 100

5.5.3 Produkce lipidů na C/N poměru 100

Z hlediska produkce lipidů, jejíž výsledky jsou uvedeny na Obrázek 77, vyplývá, že procentuální zastoupení intracelulárních lipidů se nějak významně neliší od kultivací na předchozím C/N poměru 50 a výsledky jsou obdobné. U kvasinek rodu *Rhodotorula* a kvasinky *Cystofilobasidium macerans* se obsah lipidů pohybuje kolem 10 -20 % v biomase. Nejvyššího procenta lipidů ve své buňce dosáhla opět kvasinka *Sporidiobolus pararoseus* na médiích, kde jako zdroj uhlíku sloužil tuk. Hodnoty se zde pohybovaly od 40 až po 45 %. Zajímavá je hodnota u kvasinky *Cystofilobasidium macerans* na médiu obsahujícím tuk a přidávaný enzym. Zde bylo naměřeno 40,3 % intracelulárních lipidů, což je skoro totožné s kultivací na C/N poměru 50.

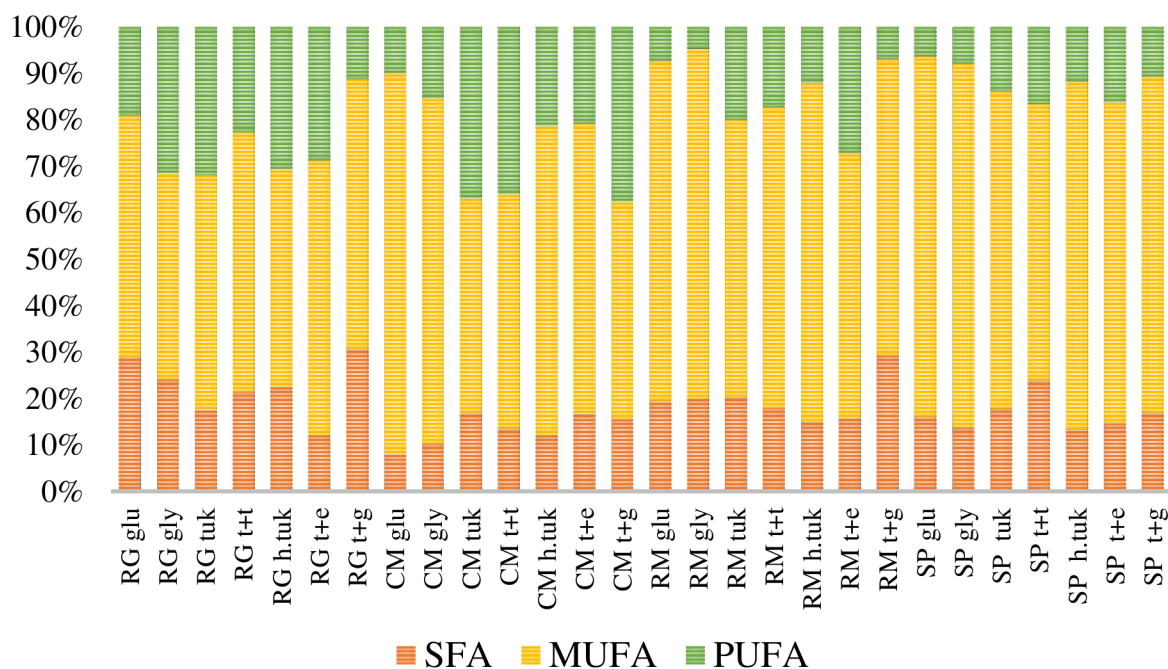
Procentuální obsah lipidů v biomase u C/N poměru 13



Obrázek 77 Procentuální zastoupení lipidů v biomase u C/N poměru 100

5.5.3.1 Zastoupení mastných kyselin

Profil mastných kyselin u kultivací na C/N poměru 100, který je zobrazený na Obrázek 78, je taktéž velmi podobný jako u C/N poměru 50, alespoň co se týče procentuálního podílu polynenasycených mastných kyselin. K výraznější změně došlo u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa*, kdy se snížilo procento nasycených mastných kyselin na maximální hodnotu 29,3 %. Největší podíl PUFA stále obsahuje kvasinka *Cystofilobasidium macerans*, která u tukového média s přidavkem glukózy dosahuje až 37,6 % PUFA (zejména kyselina linolová a α -linolenová).



Obrázek 78 Profil mastných kyselin v biomase u C/N poměru 100

5.6 Velkoobjemové kultivace kvasinek s časovými odběry

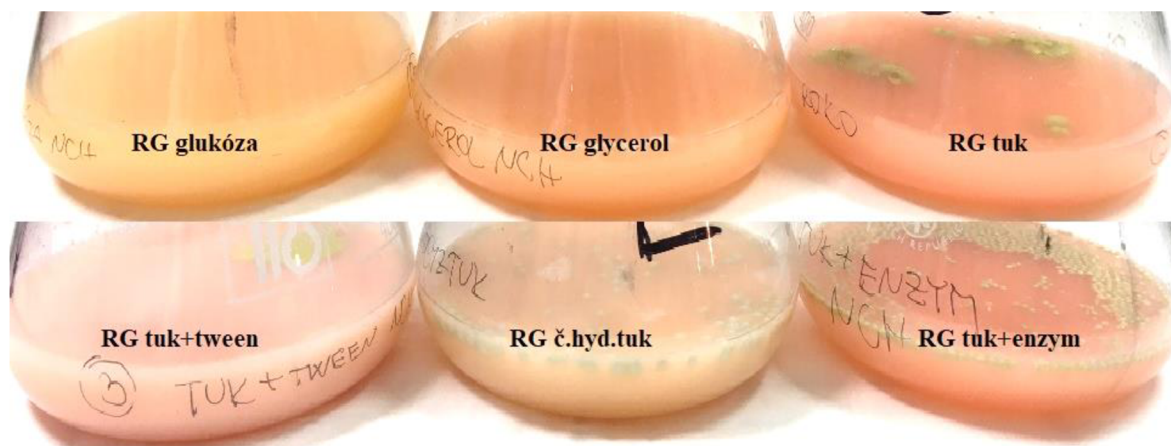
Velkoobjemové kultivace byly provedeny v Erlenmayerově baňce o objemu 1 l a počáteční celkový objem kvasinkové kultury v médiu byl 500 ml. Postupně bylo odebíráno vždy 15 ml a z tohoto vzorku byly stanoveny všechny již zmíněné parametry.

5.6.1 Růstové křivky během kultivace a celkové biomasy kvasinek

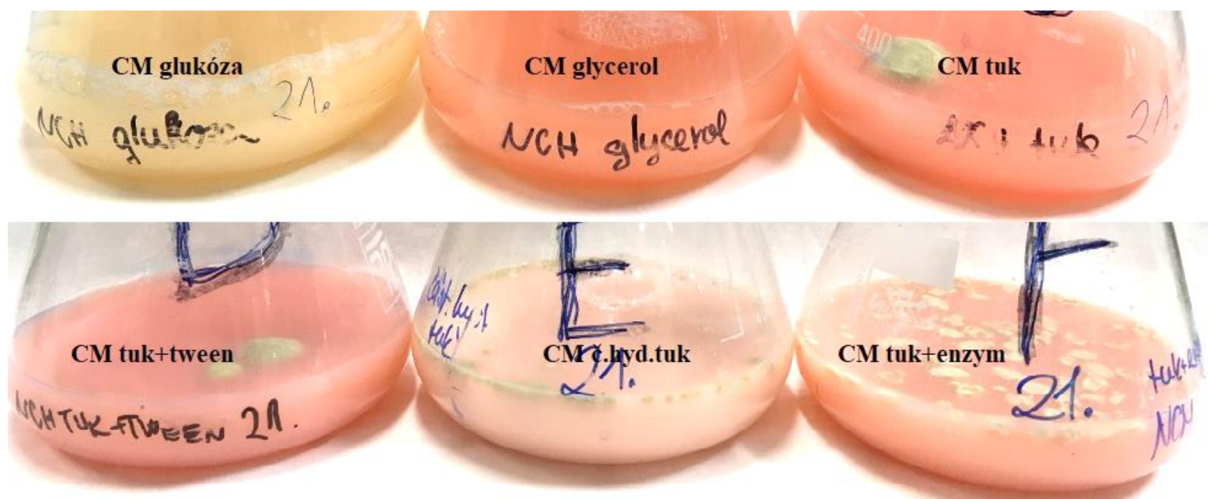
Pomocí gravimetrického stanovení biomasy byla sledována růstová křivka u všech čtyř kmenů. Tyto časové závislosti jsou uvedeny graficky na Obrázek 83, Obrázek 84, Obrázek 85 a Obrázek 86. Pro většinu karotenogenních kvasinek je typický jev zvaný diauxie, který byl pozorovaný již v předchozích pracích [56] [55]. Diauxie je trend, při kterém dochází k opakování lag fáze po prvním maximu exponenciální fáze. Je to způsobeno přítomností dvou různých zdrojů uhlíku, kdy se v případě vyčerpání prvního zdroje, který je pro buňku snadno utilizovatelný, tvoří příslušné enzymy a poté může být druhý substrát dále zpracován. V tomto případě se může jednat o médium s částečně hydrolyzovaným tukem, kde se nachází část glycerolu a zbylý surový tuk. Diauxii lze nejlépe pozorovat u kvasinky *Rhodotorula glutinis* ve 12. a 30. hodině kultivace. U kvasinky *Cystofilobasidium macerans* není tento jev tak zřetelný, ale kvasinka *Rhodotorula mucilaginosa* vykazuje stejný trend. U kmenem *Sporidiobolus pararoseus* došlo k prvnímu maximu v 12. hodině a druhé bylo zaznamenáno o něco později, a to v 36. hodině kultivace. Stacionární fáze u všech kmenů nastávala zhruba po 60. hodině kultivace a měla velmi pozvolný nástup. Během této fáze lze ještě pozorovat mírný nárůst biomasy, ale především tvorbu a akumulaci sledovaných metabolitů.

Co se týče konečného nárůstu biomasy (Tabulka 9 Výsledné hodnoty gravimetrického stanovení biomasy u velkoobjemových kultivací), lze pozorovat největší hodnoty u médií s částečně hydrolyzovaným tukem. V těchto médiích se opět vyskytoval zbytek fosfátového pufru, který pomáhal udržet hodnotu pH v optimu a tím zabránil možné inhibici růstu kyselými produkty kvasinek. Největšího nárůstu dosahuje kvasinka *Sporidiobolus pararoseus* s hodnou téměř 10 g/l. Poměrně vysoké nárůsty byly zaznamenány i na médiu z tuku a přidaným enzymem, zejména u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa*. Tento kmen dosáhl hodnoty 6,2 g/l biomasy, což je nejvíc v porovnání s ostatními médii.

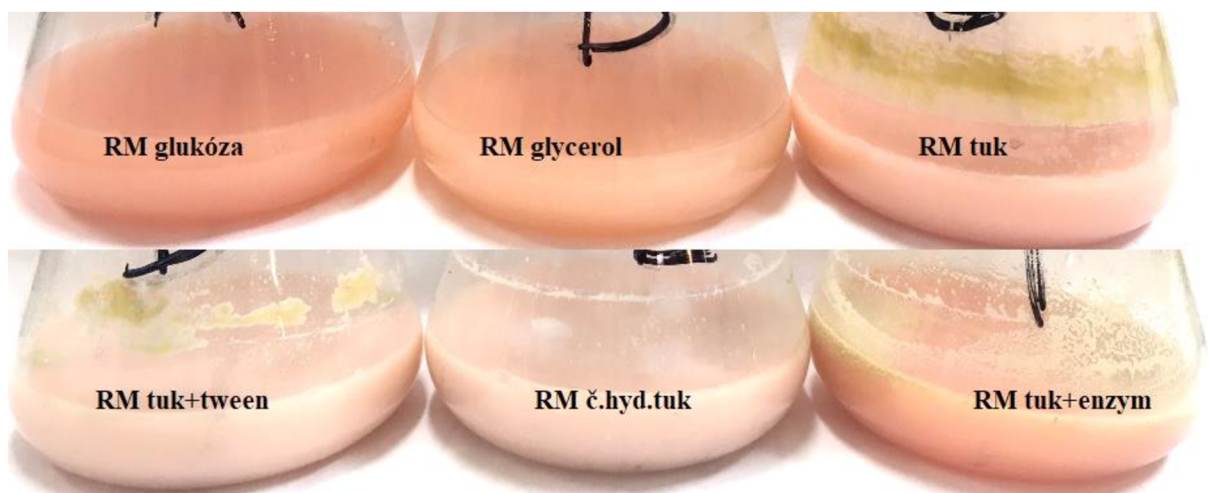
V porovnání gravimetrického stanovení biomasy se základními kultivacemi na C/N poměru 13, jsou tyto hodnoty o něco nižší. To může být zapříčiněno častým zásahem do kvasinkové kultury během kultivace a odebíráním vzorku kultury i média.



Obrázek 79 Konečný vzhled kvasinkové kultury *Rhodotorula glutinis* u velkoobjemové kultivace



Obrázek 80 Konečný vzhled kvasinkové kultury *Cystofilobasidium macerans* u velkoobjemové kultivace

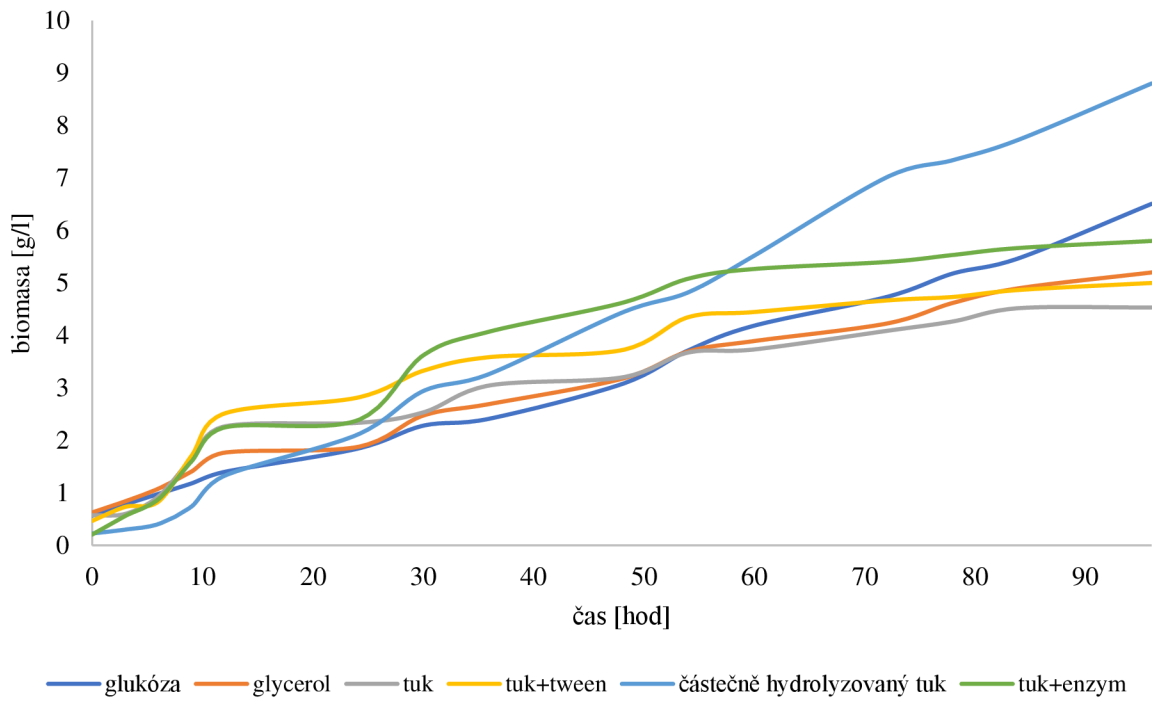


Obrázek 81 Konečný vzhled kvasinkové kultury *Rhodotorula mucilaginosa* u velkoobjemových kultivace



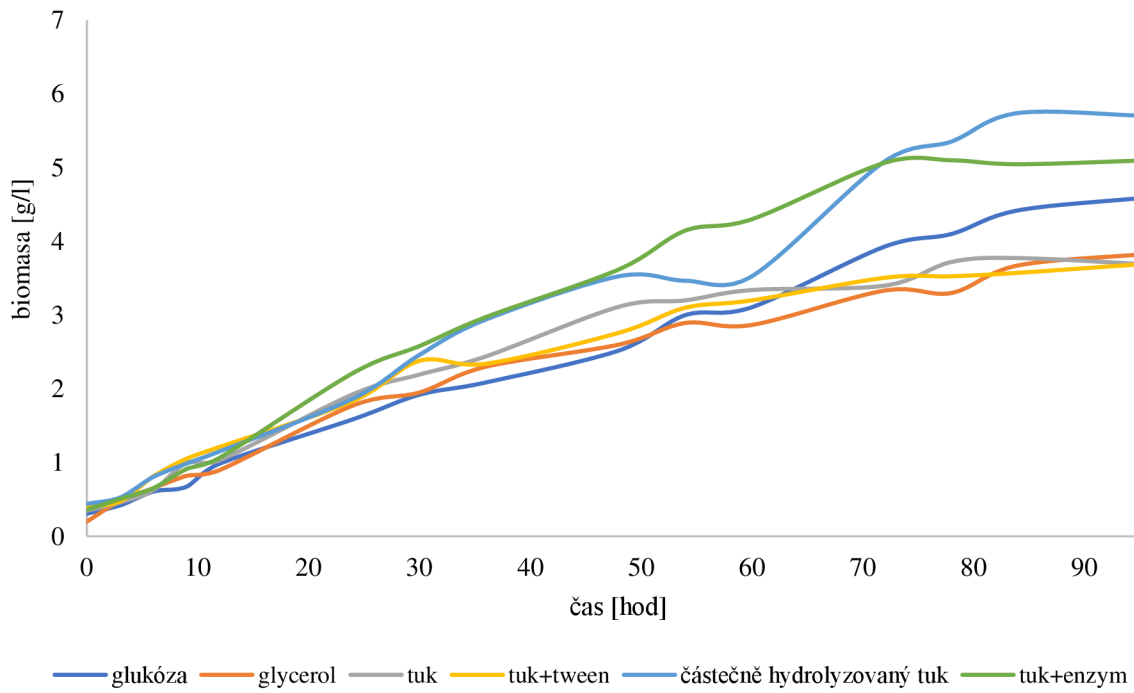
Obrázek 82 Konečný vzhled kvasinkové kultury *Sporidiobolus pararoseus* u velkoobjemové kultivace

Rhodotorula glutinis



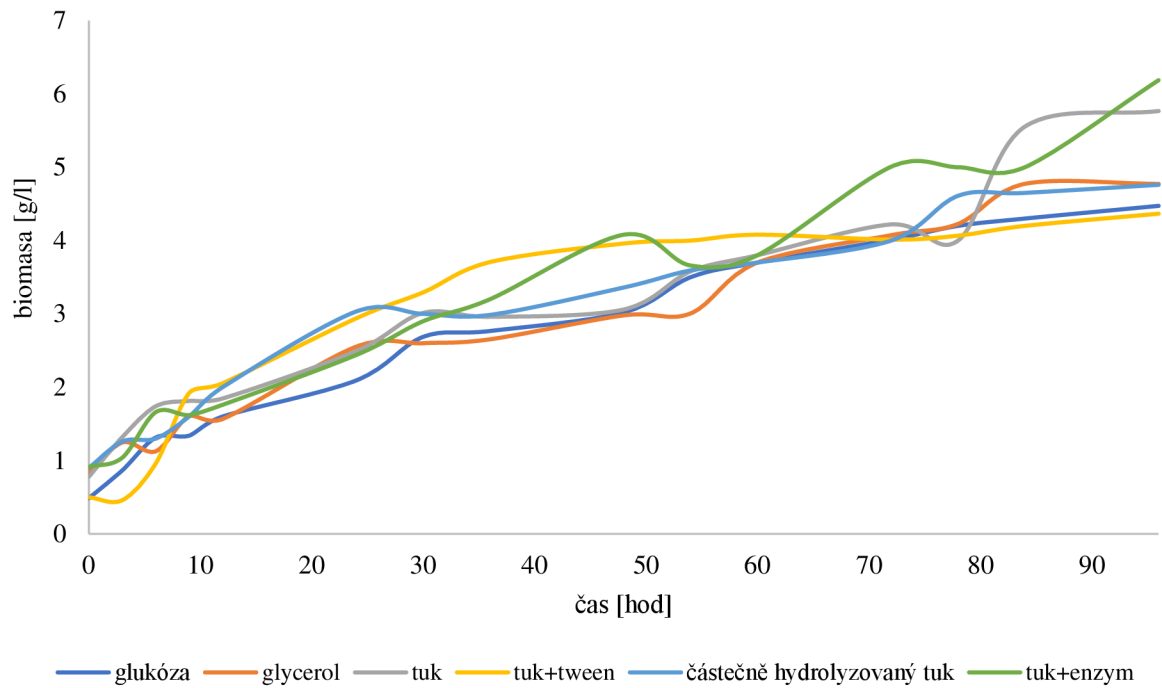
Obrázek 83 Růstová křivka *Rhodotorula glutinis*

Cystofilobasidium macerans



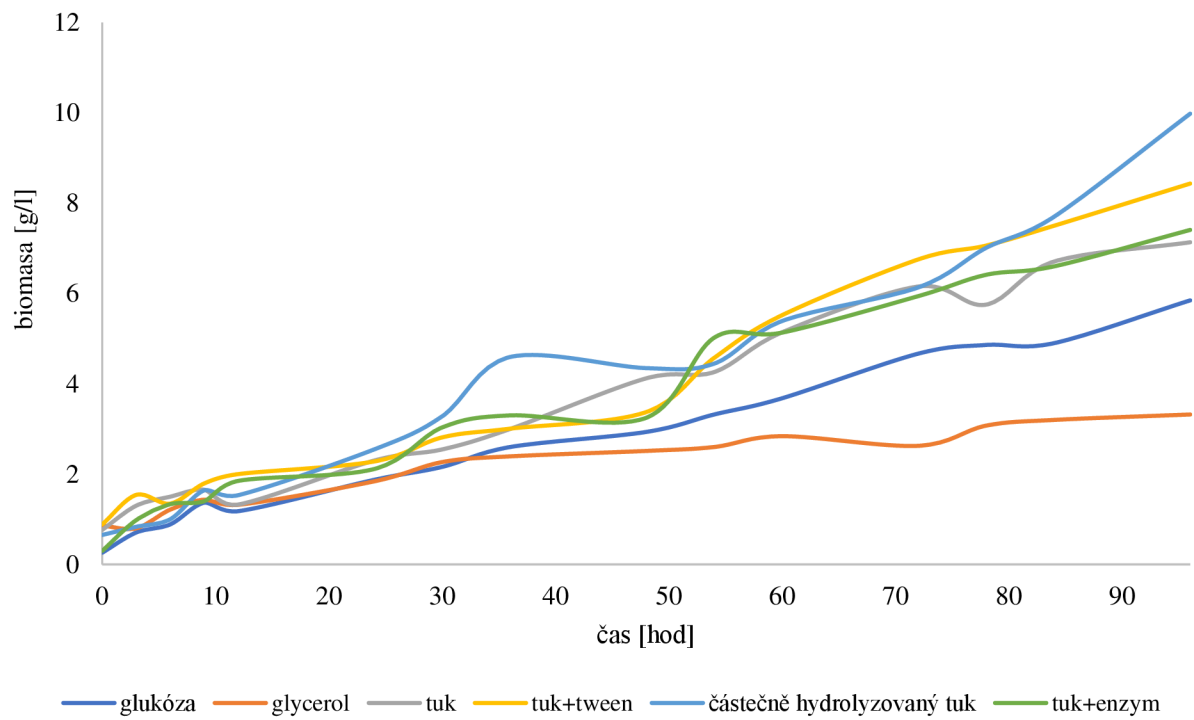
Obrázek 84 Růstová křivka *Cystofilobasidium macerans*

Rhodotorula mucilaginosa



Obrázek 85 Růstová křivka *Rhodotorula mucilaginosa*

Sporidiobolus pararoseus



Obrázek 86 Růstová křivka *Sporidiobolus pararoseus*

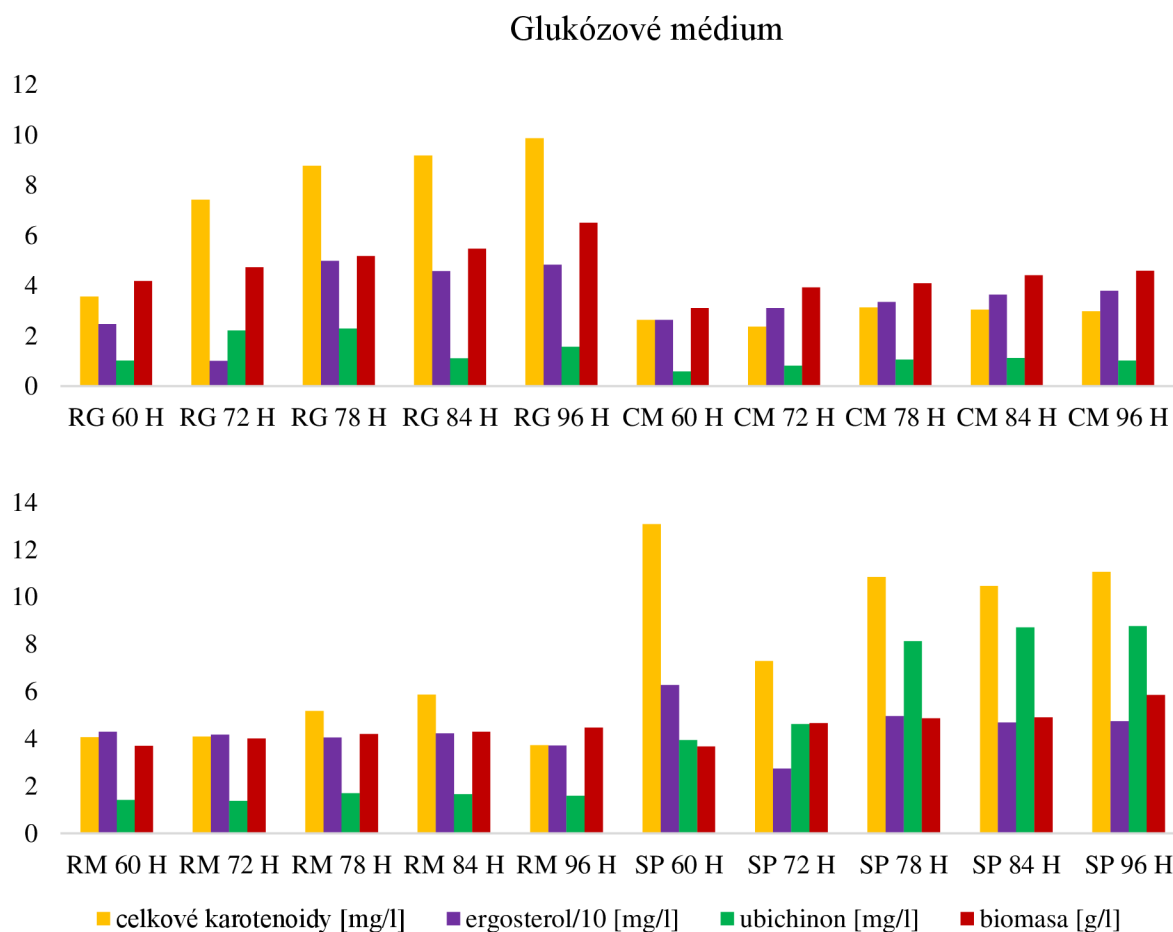
Tabulka 9 Výsledné hodnoty gravimetrického stanovení biomasy u velkoobjemových kultivací

Biomasa [g/l média]						
médium/kvasinka	glukóza	glycerol	tuk	tuk+t	č.hyd.tuk	tuk+e
<i>Rhodotorula glutinis</i>	6,51	5,20	4,53	5,00	8,80	5,80
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	4,60	3,83	3,69	3,70	5,70	5,10
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	4,74	4,77	5,77	4,37	4,76	6,19
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	5,85	3,32	7,13	8,43	9,98	7,41

5.6.2 Časová závislost produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu

Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu byla pozorována od počátku stacionární fáze, což byla u každého kmene zhruba 60. hodina kultivace.

5.6.2.1 Glukózové médium

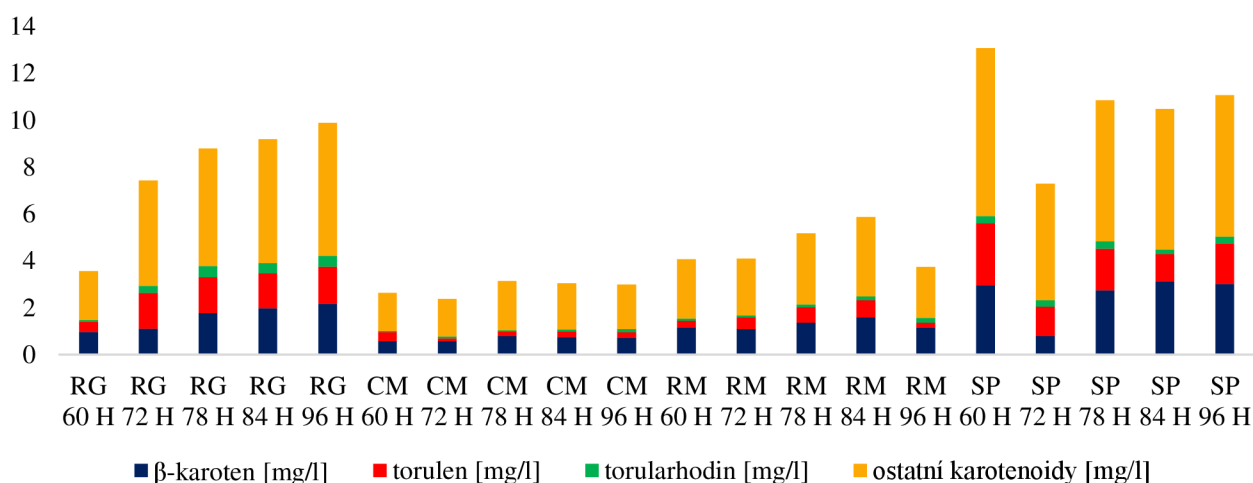


Obrázek 87 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu na glukózovém médiu u velkoobjemové kultivace

V případě glukózového média (Obrázek 87) lze pozorovat postupný lineární nárůst karotenoidů u kvasinek RG, CM a RM. U kmene *Sporidiobolus pararoseus* byla naměřena největší koncentrace karotenoidů v 60. hodině kultivace, což byla zároveň i nejvyšší hodnota (13 mg/l), a poté už se koncentrace snižovala. Koncentrace ergosterolu lineárně rostla u kvasinek RG a CM a na konci kultivace dosahovala maxima. U kvasinky RM bylo zastoupení ergosterolu během stacionární fáze konstantní. Naopak tomu bylo u kmene *Sporidiobolus pararoseus*, kde ergosterol dosáhl maxima v 60. hodině kultivace (63 mg/l), kdy byl potřebný k syntéze biomembrán, a poté už mírně klesal. Co se týče produkce ubichinonu, jednoznačně nevyšší zastoupení je u *Sporidiobolus pararoseus*, kde se koncentrace lineárně zvyšuje až na 8,8 mg/l.

Na Obrázek 88 jsou graficky znázorněny jednotlivé karotenoidy. Lze si všimnout, že u glukózového média dochází k velmi nízké produkci barviva torularhodin. U kmene RG a SP bylo pozorováno podobné zastoupení β -karotenu a torulenu. Naproti tomu u CM a RM se vyskytoval převážně β -karoten.

Glukózové médium: profil karotenoidů



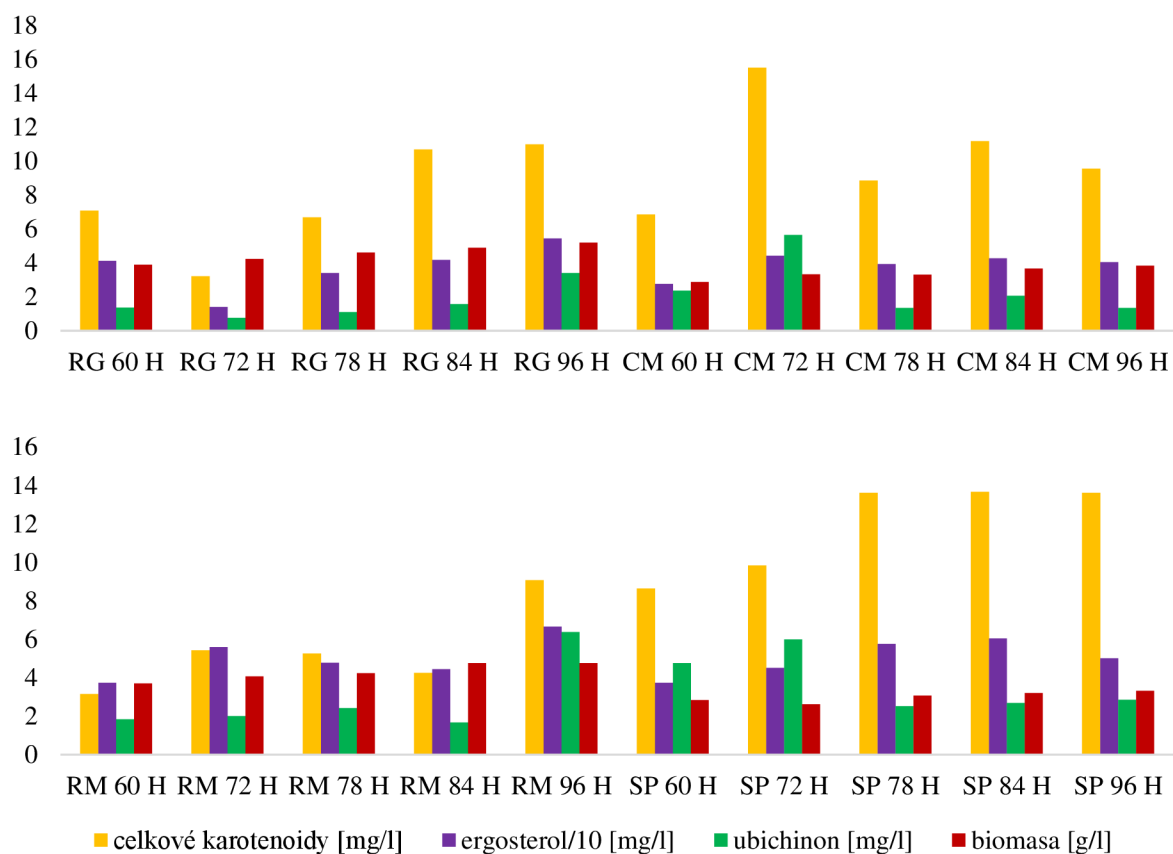
Obrázek 88 Zastoupení jednotlivých karotenoidů na glukózovém médiu u velkoobjemové kultivace

5.6.2.2 Glycerolové médium

V rámci kultivace na glycerolovém médiu (Obrázek 89) byla zjištěna lineární produkce karotenoidů u kmene RG, RM a SP. Kvasinka *Cystofilobasidium macerans* dosahuje maxima karotenoidů v 72. hodině (15,5 mg/l) a poté už se hodnota postupně o třetinu snižuje. Nejnižší hodnoty byly naměřeny u kvasinky *Rhodotorula glutinis*. Z Obrázek 90 si lze povšimnout, že dochází k vyšší tvorbě torulenu na úkor produkce β -karotenu. Zároveň se zde objevuje i barvivo torularhodin, hlavně u kmene CM.

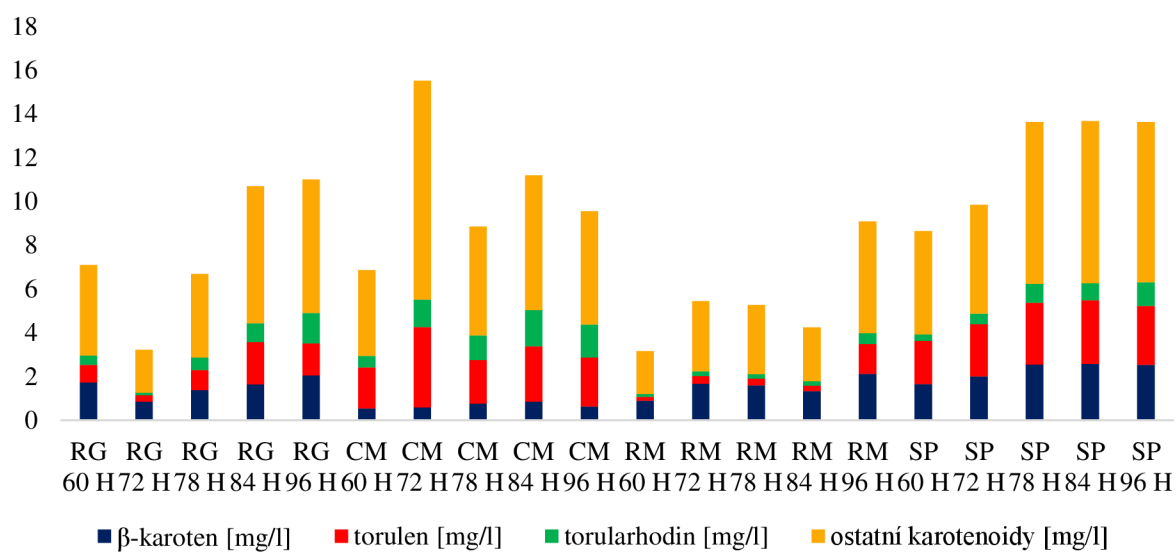
Produkce ergosterolu má lineární charakter pouze u *Rhodotorula glutinis*., u ostatních tří kmenů je jeho zastoupení téměř konstantní. Jeho nejvyšší koncentrace 66,7 mg/l byla naměřena u *Rhodotula mucilaginosa* na konci kultivace. Ubichinon má stoupající produkci u kvasinek rodů *Rhodotorula*. U kmenů CM a SP byla jeho nejvyšší koncentrace naměřena z počátku stacionární fáze v 72. hodině kultivace. Obecně se ale syntéza ubichinonu snížila v porovnání s glukózovým médiem.

Glycerolové médium



Obrázek 89 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu na glycerolovém médiu u velkoobjemových kultivací

Glycerolové médium: profil karotenoidů

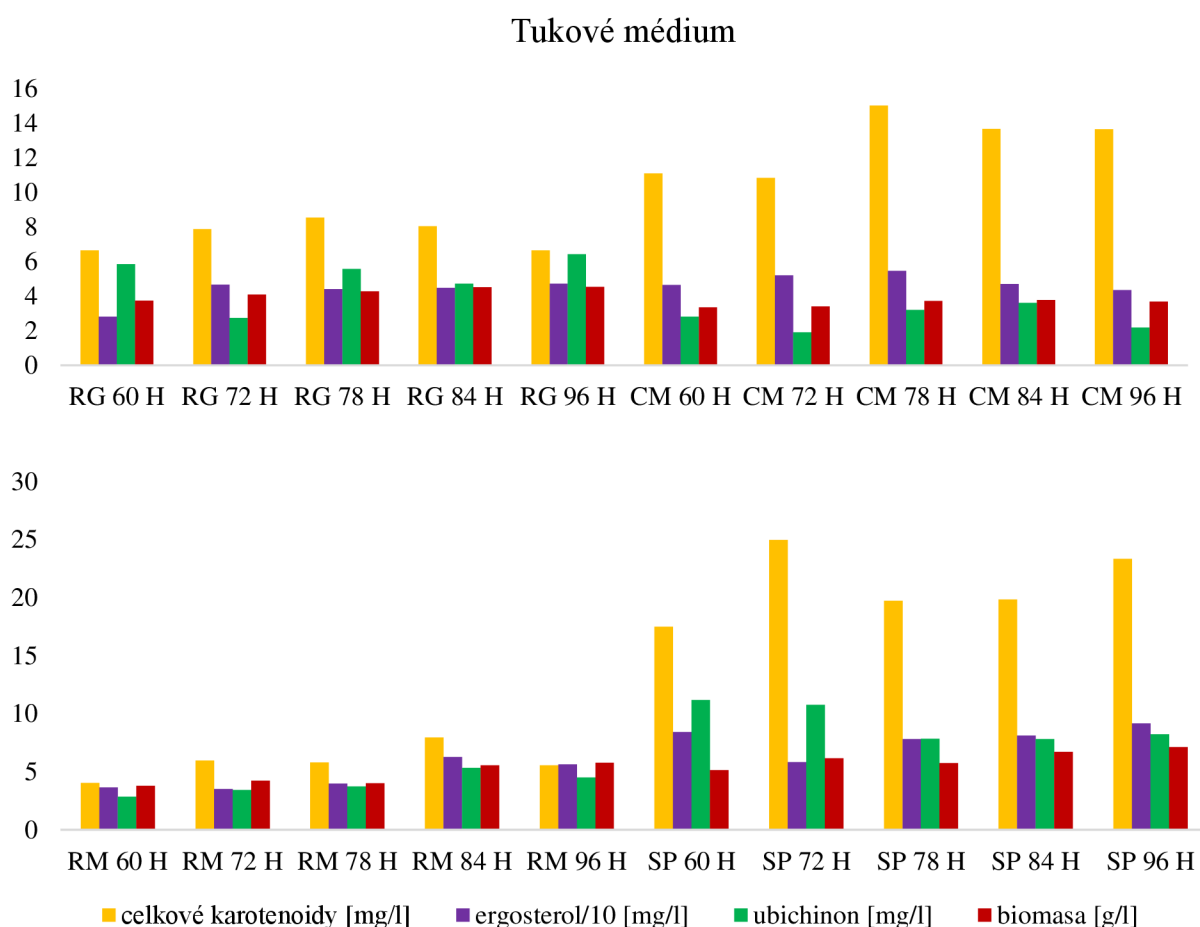


Obrázek 90 Zastoupení jednotlivých karotenoidů na glycerolovém médiu u velkoobjemových kultivací

5.6.2.3 Tukové médium

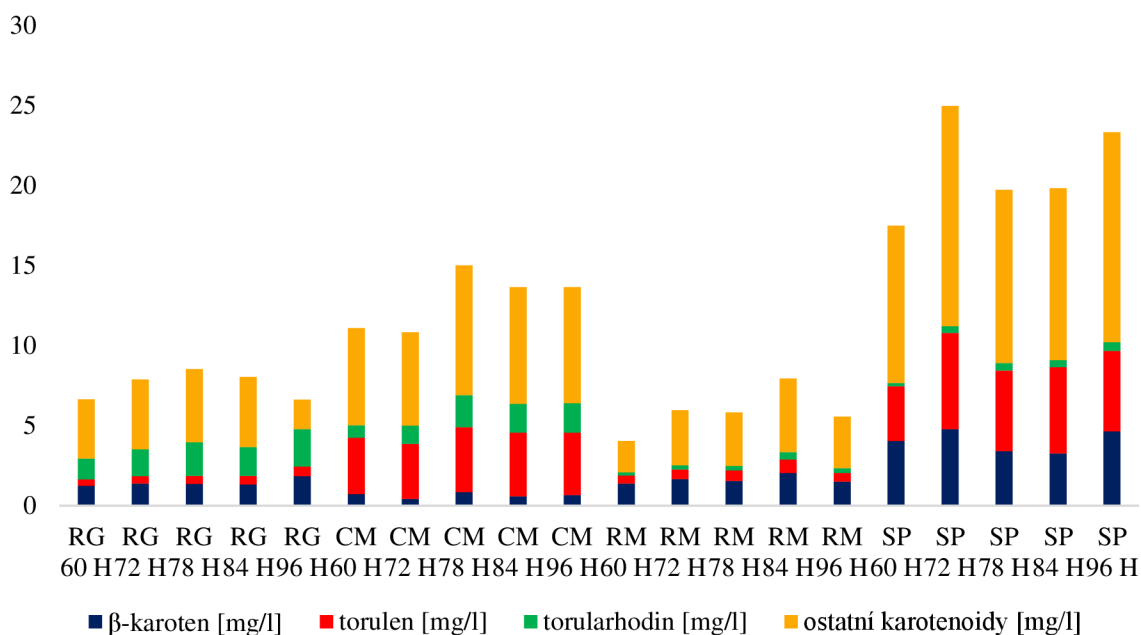
Výsledky produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu v rámci tukového média u velkoobjemových kultivací (Obrázek 91) vykazují významné zvýšení produkce karotenoidů u kmene *Sporidiobolus pararoseus*, kde jsou hodnoty během stacionární fáze vcelku konstantní. Na konci kultivace karotenoidy dosahují až 23,3 mg/l. U dalších tří kmenů (RG, CM a RM) má produkce karotenoidů také celkem konstantní hodnoty. Zajímavostí je, že ergosterol, který ve většině u předchozích médií rostl lineárně, tak zde je jeho zastoupení takřka konstantní. Nejvyšších hodnot dosahuje kvasinka *Sporidiobolus pararoseus*, až 91,7 mg/l. K nejmenší syntéze dochází u kmene *Rhodotorula glutinis*. Koncentrace ubichinonu u tukového média výrazně stoupla, hlavně u kvasinek *Rhodotorula glutinis* a *Sporidiobolus pararoseus*. Nejvyšší hodnota 11,2 mg/l byla naměřena u *Sporidiobolus pararoseus* na začátku stacionární fáze v 60. hodině kultivace.

V případě zastoupení jednotlivých karotenoidů (Obrázek 92), si lze všimnout, že procento zastoupení torularhodinu u kvasinky *Rhodotorula glutinis* stoupá a v některých případech převyšuje i nad β -karotenem. U *Cystofilobasidium macerans* došlo k velkému poklesu β -karotenu, ale významným barvivem se zde stal torulen. Ve srovnání s kultivací na glukózovém médiu tomu bylo opačně.



Obrázek 91 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu na tukovém médiu u velkoobjemových kultivací

Tukové médium: profil karotenoidů



Obrázek 92 Zastoupení jednotlivých karotenoidů na tukovém médiu u velkoobjemových kultivací

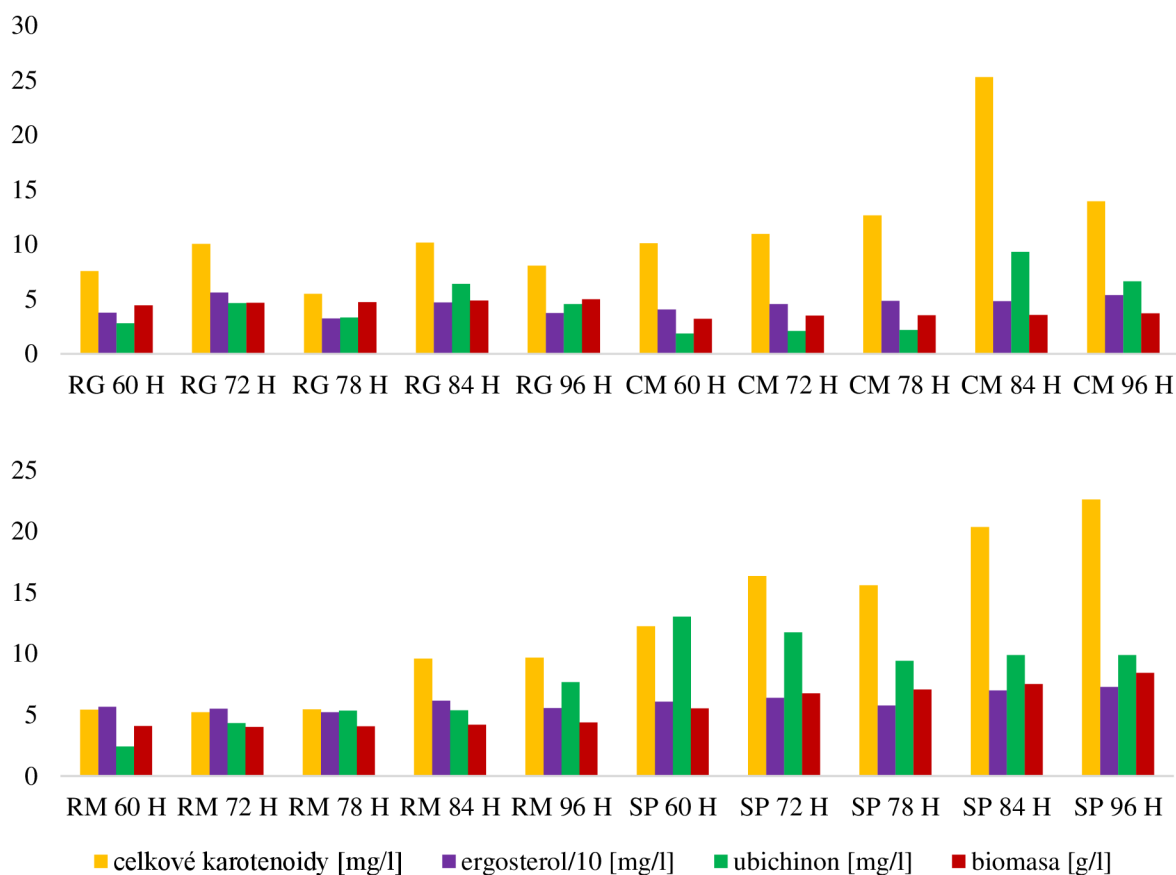
5.6.2.4 Tukové médium s přidavkem emulgátoru

Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu je graficky znázorněna na Obrázek 93. U kvasinek rodu *Rhodotorula* nedošlo k nějaké výrazné změně ohledně produkce karotenoidů. Kvasinka *Cystofilobasidium macerans* dosáhla u tohoto média nejvyšší koncentrace karotenoidů 25,2 mg/l. Koncentrace karotenoidů u SP byla mírně stoupající během stacionární fáze. Z hlediska zastoupení jednotlivých karotenoidů (Obrázek 94) došlo k velmi nízkému podílu β-karotenu a ve větších množstvích se začal objevovat torularhodin.

Koncentrace ergosterolu byla naměřena u všech kvasinek v rozmezí 30 – 50 mg/l. Nejvyšší množství se nacházelo u kvasinky *Sporidiobolus pararoseus*, kde na počátku stacionární fáze měl koncentraci 60 mg/l a na konci kultivace 91 mg/l. Spolu s tukovým médiem jsou to zatím největší zaznamenané hodnoty u této látky.

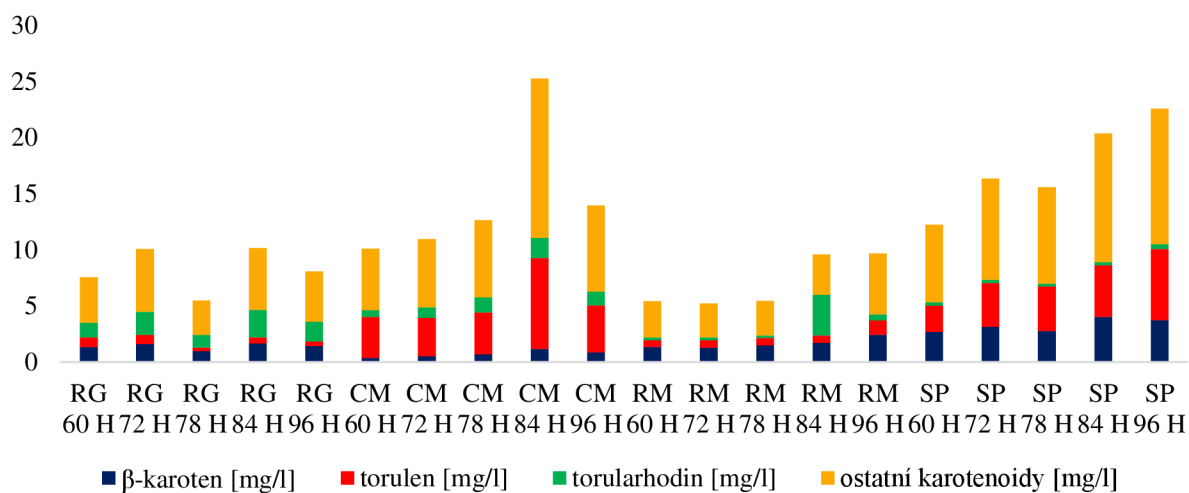
Koncentrace ubichinonu také stoupla. Nejlepším producentem stále zůstává kvasinka *Sporidiobolus pararoseus*. Hodnoty ubichinonu se u ní vyšplhaly až na 13 mg/l, s rostoucí dobou kultivace ale postupně koncentrace ubichinonu klesala. Významný nárůst ubichinonu lze pozorovat u kvasinky *Cystofilobasidium macerans* na konci stacionární fáze. Zde došlo k navýšení až na 9,3 mg/l, což je doposud nejvyšší koncentrace ubichinonu u této kvasinky.

Tukové médium s přidavkem emulgátoru



Obrázek 93 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu na tukovém médiu s přidavkem emulgátoru u velkoobjemové kultivace

Tukové médium s přidavkem emulgátoru: profil karotenoidů



Obrázek 94 Zastoupení jednotlivých karotenoidů na tukovém médiu s přidavkem emulgátoru u velkoobjemové kultivace

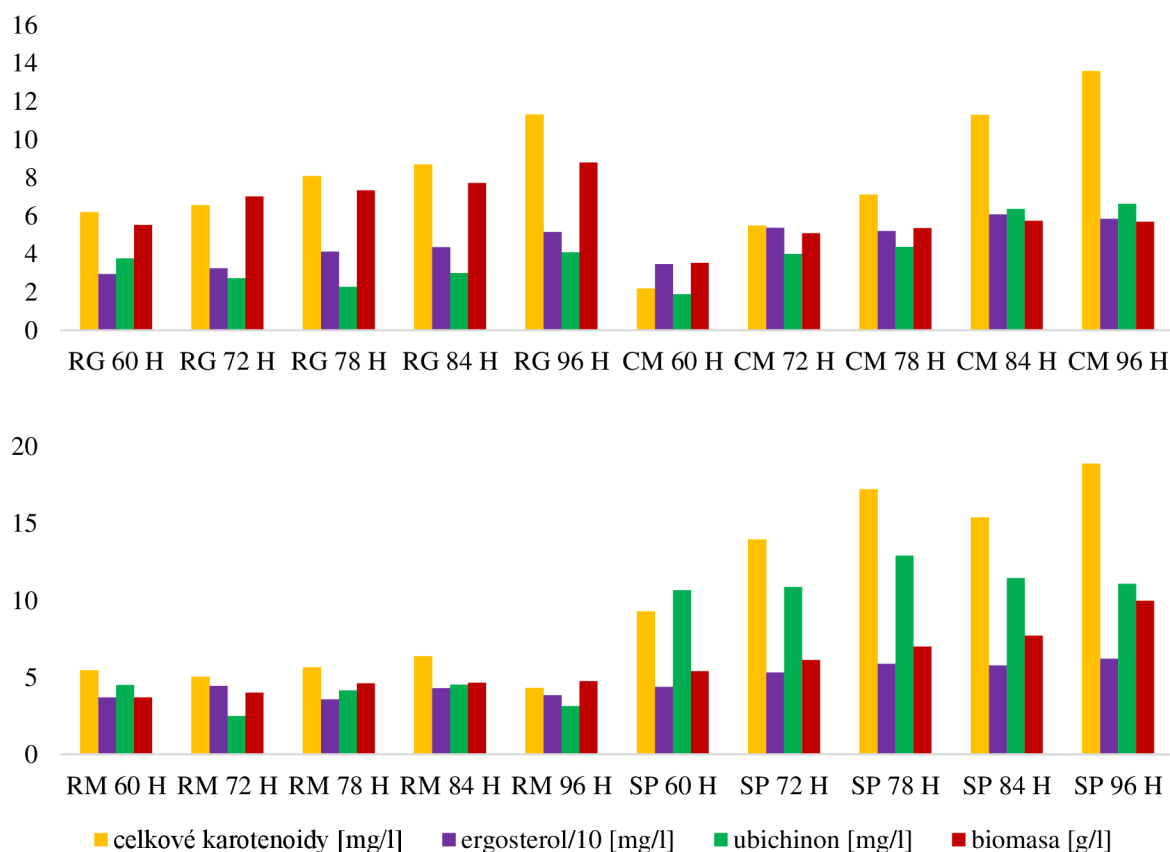
5.6.2.5 Médium s částečně hydrolyzovaným tukem

V případě velkoobjemové kultivace na médiu s částečně hydrolyzovaným tukem byl zjištěn pokles karotenoidů v rámci všech kmenů. Kompletní výsledky jsou uvedeny v grafu na Obrázek 95. Karotenoidy během stacionární fáze měly konstantní charakter u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa*. K lineárnímu zvyšování koncentrace došlo u zbylých tří kmenů. Nejvíce karotenoidů bylo obsaženo v kvasince *Sporidiobolus pararoseus* na konci kultivace (18,9 mg/l).

Produkce ergosterolu nebyla nějak významná. U všech kmenů docházelo k mírnému postupnému zvyšování během stacionární fáze. Nejvíce se ergosterol nacházel v kvasince *Cystofilobasidium macerans*.

Co se týče ubichinonu, tak jeho zastoupení bylo u kvasinek *Rhodotorula glutinis* téměř konstantní a dosahovalo hodnot v průměru kolem 40 mg/l. U kvasinky *Cystofilobasidium macerans* byla zaznamenána linearita tvorby ubichinonu a nejvíce ho bylo obsaženo ve vzorku na konci kultivace - 66,4 mg/l. Opět nejvyšší hodnoty naměřeny u kvasinky *Sporidiobolus pararoseus*, kde se během stacionární fáze koncentrace ubichinonu nijak významně neměnila. Maximální hodnota 129 mg/l byla u vzorku ze 78. hodiny kultivace.

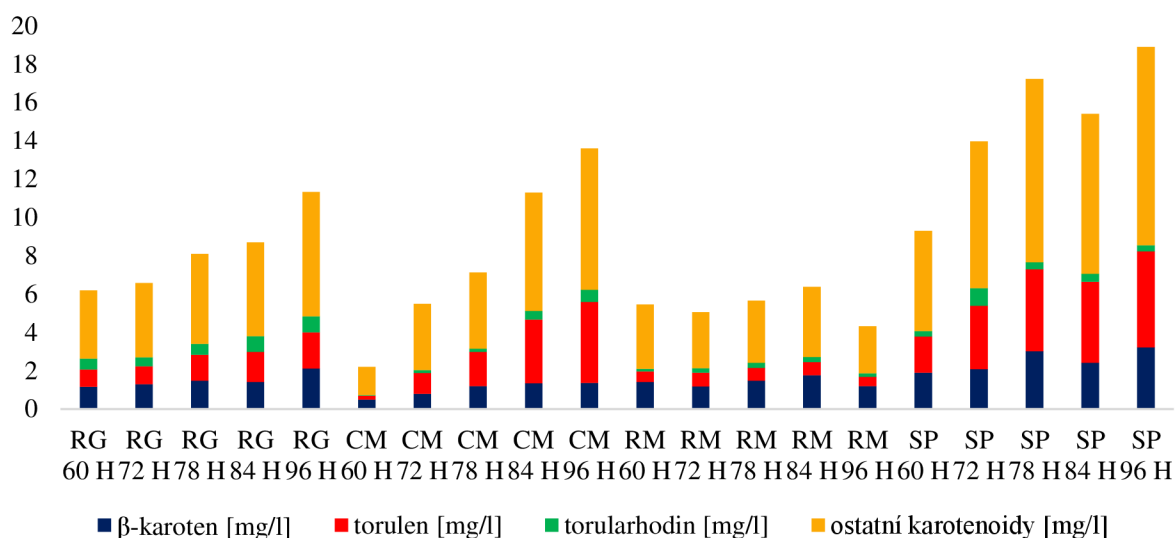
Médium s částečně hydrolyzovaným tukem



Obrázek 95 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu na médiu s částečně hydrolyzovaným tukem u velkoobjemových kultivací

Při pohledu na zastoupení jednotlivých karotenoidů (Obrázek 96) si lze všimnout nízkého podílu barviva torularhodin. *Rhodotorula glutinis* produkovala větší procento torulenu. U kvasinek kmene *Cystofilobasidium macerans* se mírně zvýšila produkce β -karotenu. Kmen *Sporidiobolus pararoseus* měl schopnost největší produkce obou barviv.

Médium s částečně hydrolyzovaným tukem: profil karotenoidů



Obrázek 96 Zastoupení jednotlivých karotenoidů na médiu s částečně hydrolyzovaným tukem u velkoobjemových kultivací

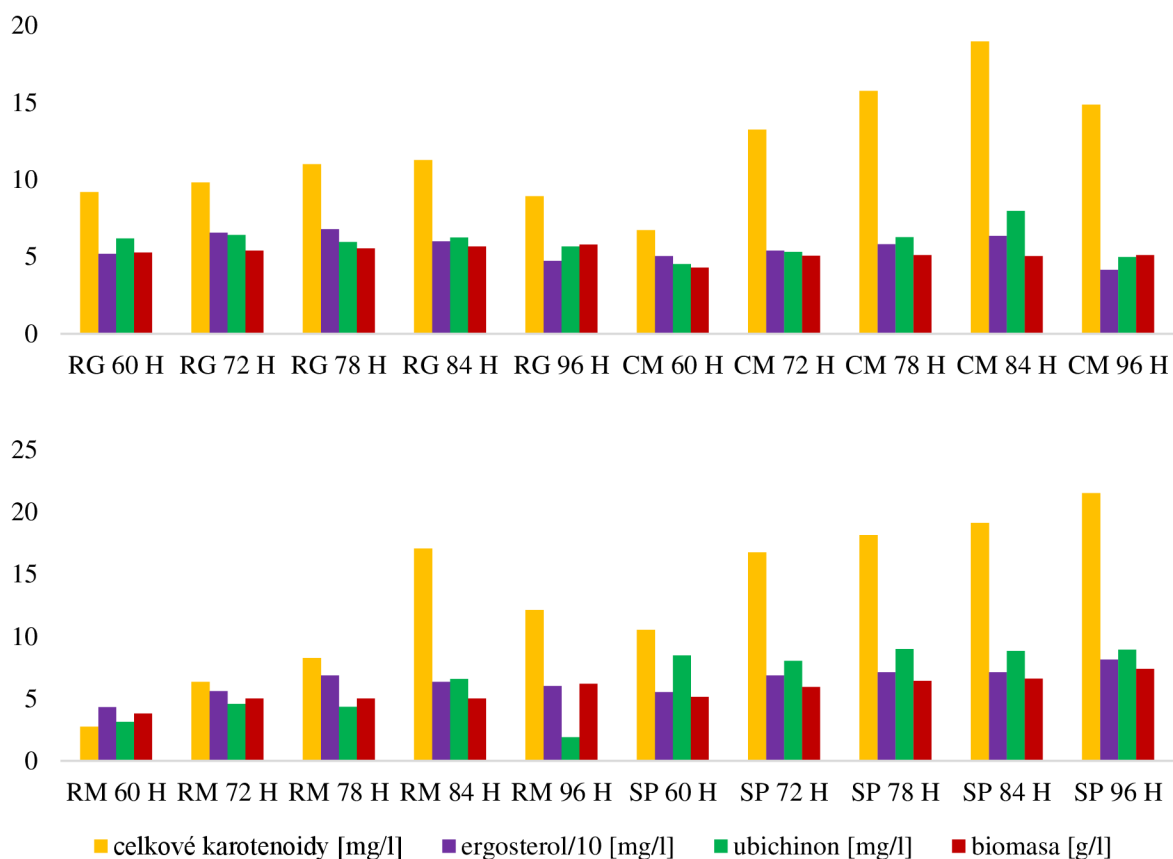
5.6.2.6 Tukové médium s přidavkem enzymu

V tukovém médiu s přidavkem komerčního enzymu lipázy bylo zaznamenáno mírné zvýšení tvorby karotenoidů. Kompletní výsledky jsou uvedeny na Obrázek 97. U kvasinky *Rhodotorula glutinis* se obsah karotenoidů během stacionární fáze měnil jen mírně. U ostatních tří kmenů jejich koncentrace lineárně rostla s prodlužující dobou kultivace. Největší produkci těchto pigmentů vykazovala kvasinka *Sporidiobolus pararoseus*. V případě zastoupení jednotlivých karotenoidů (Obrázek 98), u RG byla pozorována vysoká tvorba torularhodinu a téměř minimální produkce torulenu. Naopak tomu bylo u kmene RM a SP, kde největší podíl tvořil torulen a β -karoten. V kvasince *Cystofilobasidium macerans* jednoznačně převládal torulen.

Koncentrace ergosterolu byla obecně u všech kvasinek vcelku konstantní a její hodnoty se během stacionární fáze nijak významně neměnily, pouze u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* bylo pozvolné lineární stoupání. Nejvyšší koncentrace (81,3 mg/l) byla zaznamenána u *Sporidiobolus pararoseus* na konci kultivace.

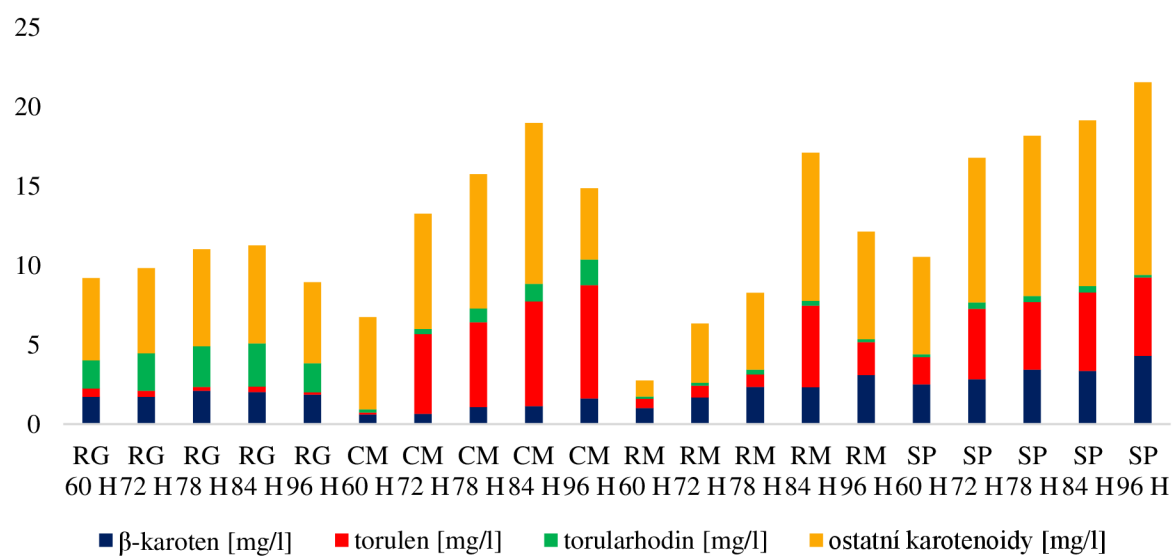
Ubichinon u této kultivace dosahoval nižších hodnot. Nejvíce ho bylo naměřeno u kvasinky *Sporidiobolus pararoseus*, kde se jeho koncentrace během stacionární fáze nějak výrazně neměnila. U kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* docházelo k postupnému zvyšování jeho koncentrace během stacionární fáze. Propad nastal až v posledních hodinách, kdy se jeho koncentrace snížila na čtvrtinu.

Tukové médium s přidavkem enzymu



Obrázek 97 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu na tukovém médiu s přidavkem enzymu u velkoobjemových kultivací

Tukové médium s přidavkem emulgátoru: profil karotenoidů

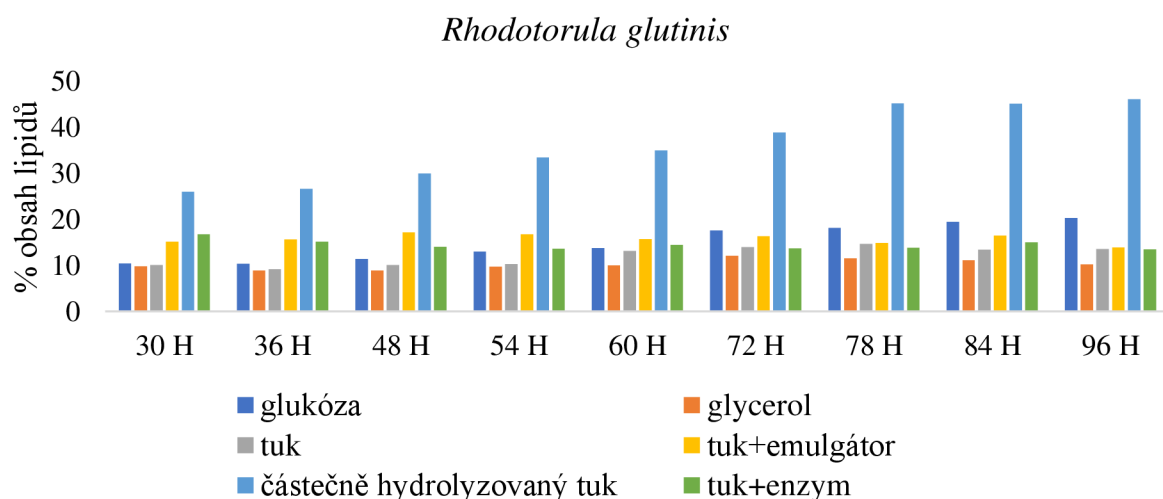


Obrázek 98 Zastoupení jednotlivých karotenoidů na tukovém médiu s přidavkem enzymu u velkoobjemových kultivací

5.6.3 Produkce lipidů v průběhu kultivace

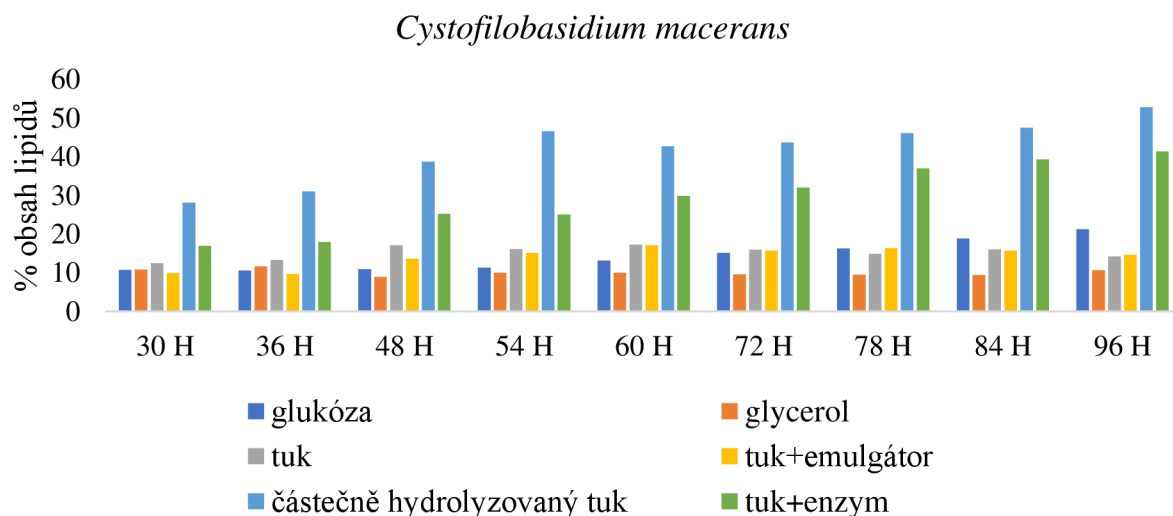
Sledování procentuálního zastoupení lipidů v biomase bylo prováděno od 30. hodiny kultivace, kdy probíhala exponenciální fáze.

U kvasinky *Rhodotorula glutinis* (Obrázek 99) se procentuální obsah lipidů v biomase pohybuje v průměru kolem 10 – 15 % u všech médií. Výjimka je pouze u média s částečně hydrolyzovaným tukem, kde je dosaženo až 46 % intracelulárních lipidů. Takto vysoká hodnota může být spojena s velkým nárůstem biomasy a velkou část této hodnoty mohou tvořit fosfolipidy.



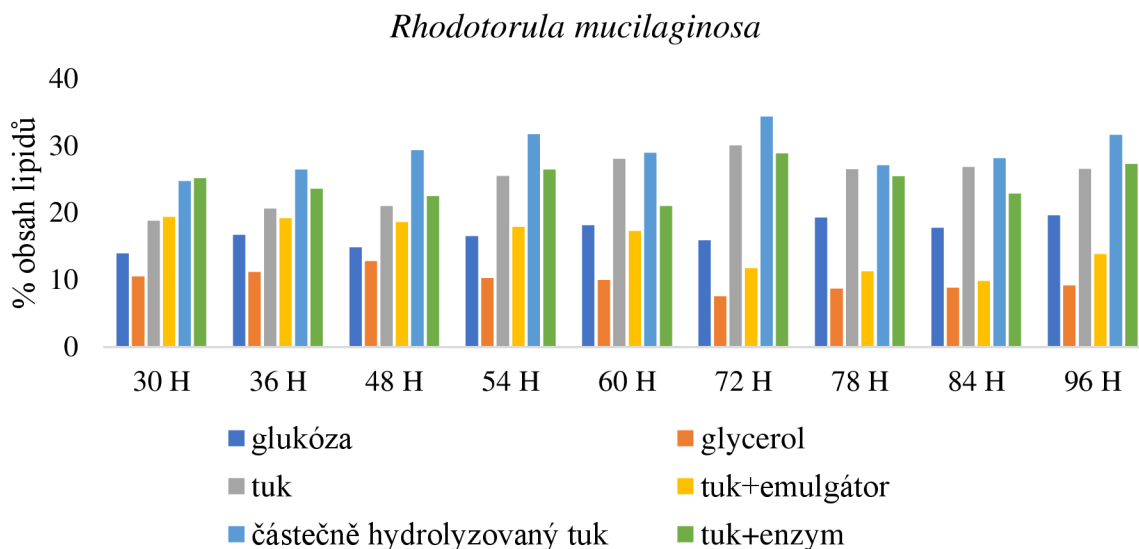
Obrázek 99 Procentuální zastoupení lipidů v biomase u *Rhodotorula glutinis*

Kmen *Cystofilobasidium macerans* (Obrázek 100) měl ve své biomase na médiích s glukózou, glycerolem, tukem a tukem s emulgátorem hodnoty průměrné okolo 10 – 20 %. Vysoké procento bylo naměřeno u média s částečně hydrolyzovaným tukem a tukem s přidavkem enzymu, kde kvasinka byla schopná akumulace až 50 % intracelulárních lipidů ve své biomase.



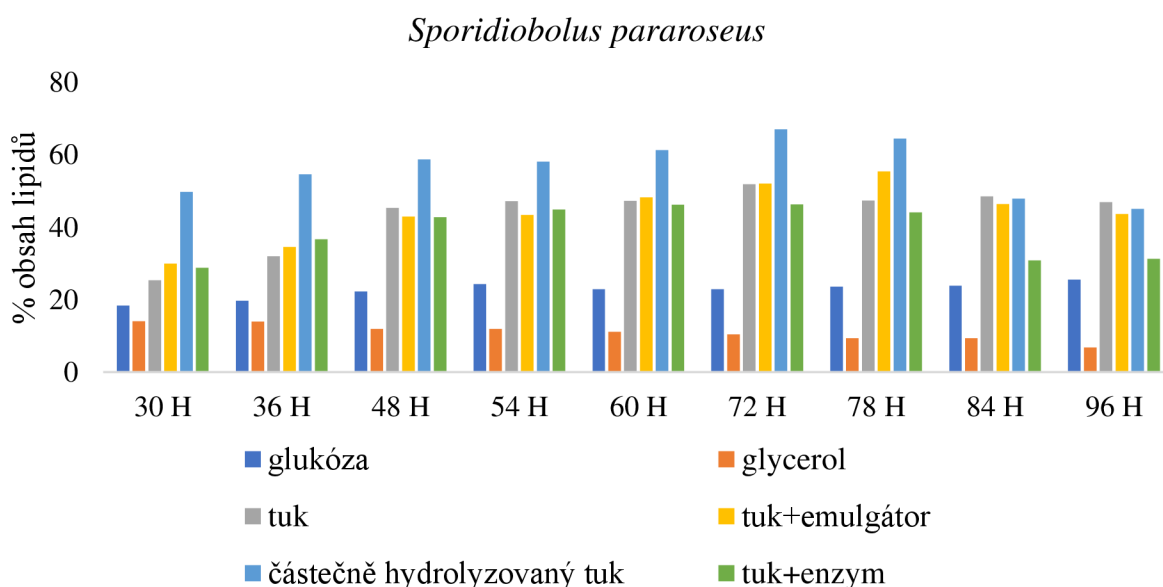
Obrázek 100 Procentuální zastoupení lipidů v biomase u *Cystofilobasidium macerans*

Co se týče kmene *Rhodotorula mucilaginosa* (Obrázek 101), tak zde bylo naměřeno 20 % lipidů u glukóзовého média. V porovnání s glycerolovým médiem, které mělo 10 %, je to dvakrát více. U tukového média s emulgátorem je pozorováno snižování intracelulárních lipidů během kultivace, z 20 % na výsledných 14 %. U médií s tukem, s částečně hydrolyzovaným tukem a tukem s přidavkem enzymu se hodnoty vyšplhaly až na 30 % intracelulárních lipidů v biomase.



Obrázek 101 Procentuální zastoupení lipidů v biomase u *Rhodotorula mucilaginosa*

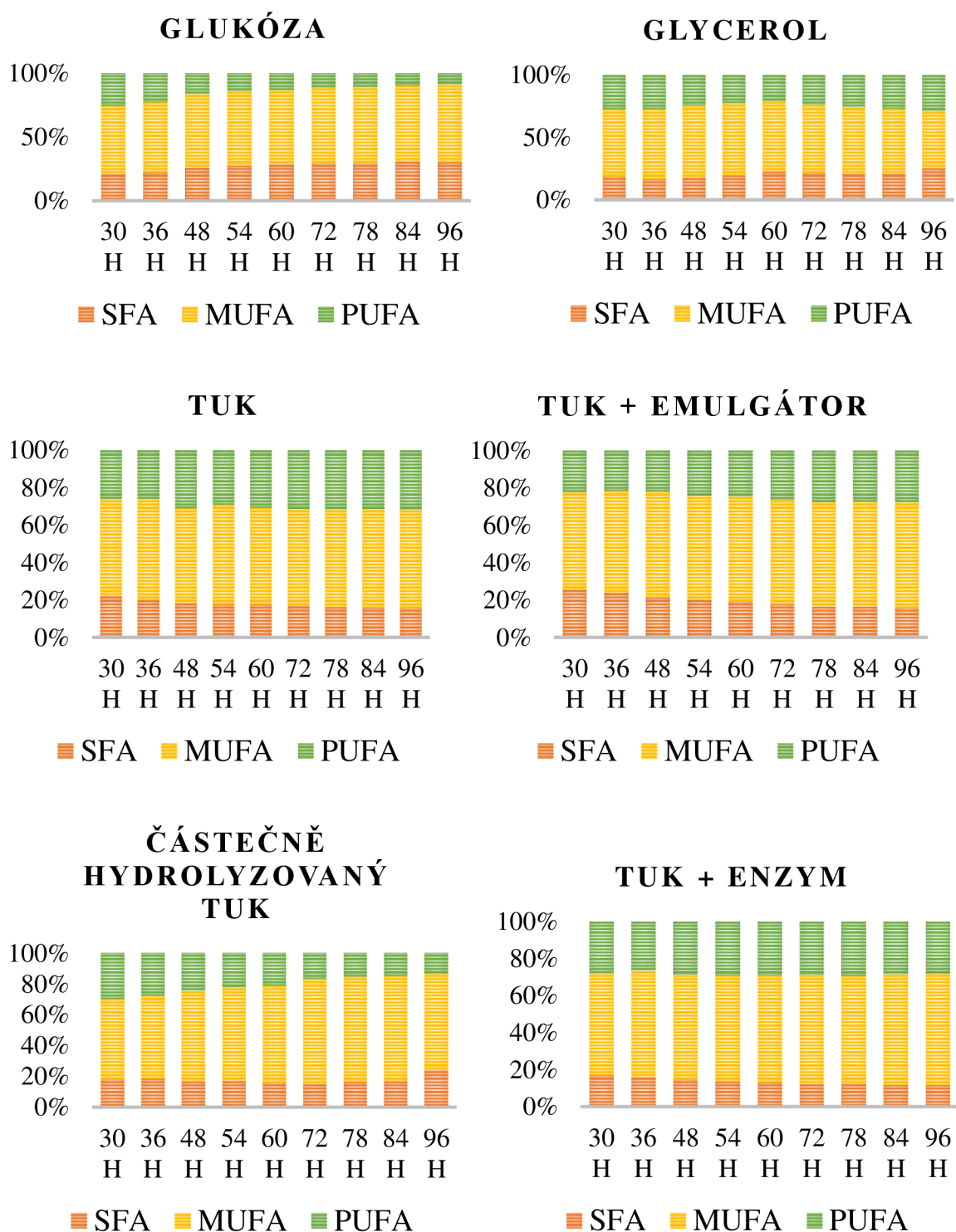
Kvasinka *Sporidiobolus pararoseus* (Obrázek 102) projevila největší schopnost akumulace intracelulárních lipidů. Největší procento u všech médií bylo zaznamenáno v 72. hodině kultivace, poté mírně kleslo. U média s částečně hydrolyzovaným tukem byla kvasinka schopná obsahovat až 65 % intracelulárních lipidů. Na konci kultivace se hodnoty u třech nejlepších médií (tuk, tuk + emulgátor, částečně hydrolyzovaný tuk) pohybovaly okolo 45 %.



Obrázek 102 Procentuální zastoupení lipidů v biomase u *Sporidiobolus pararoseus*

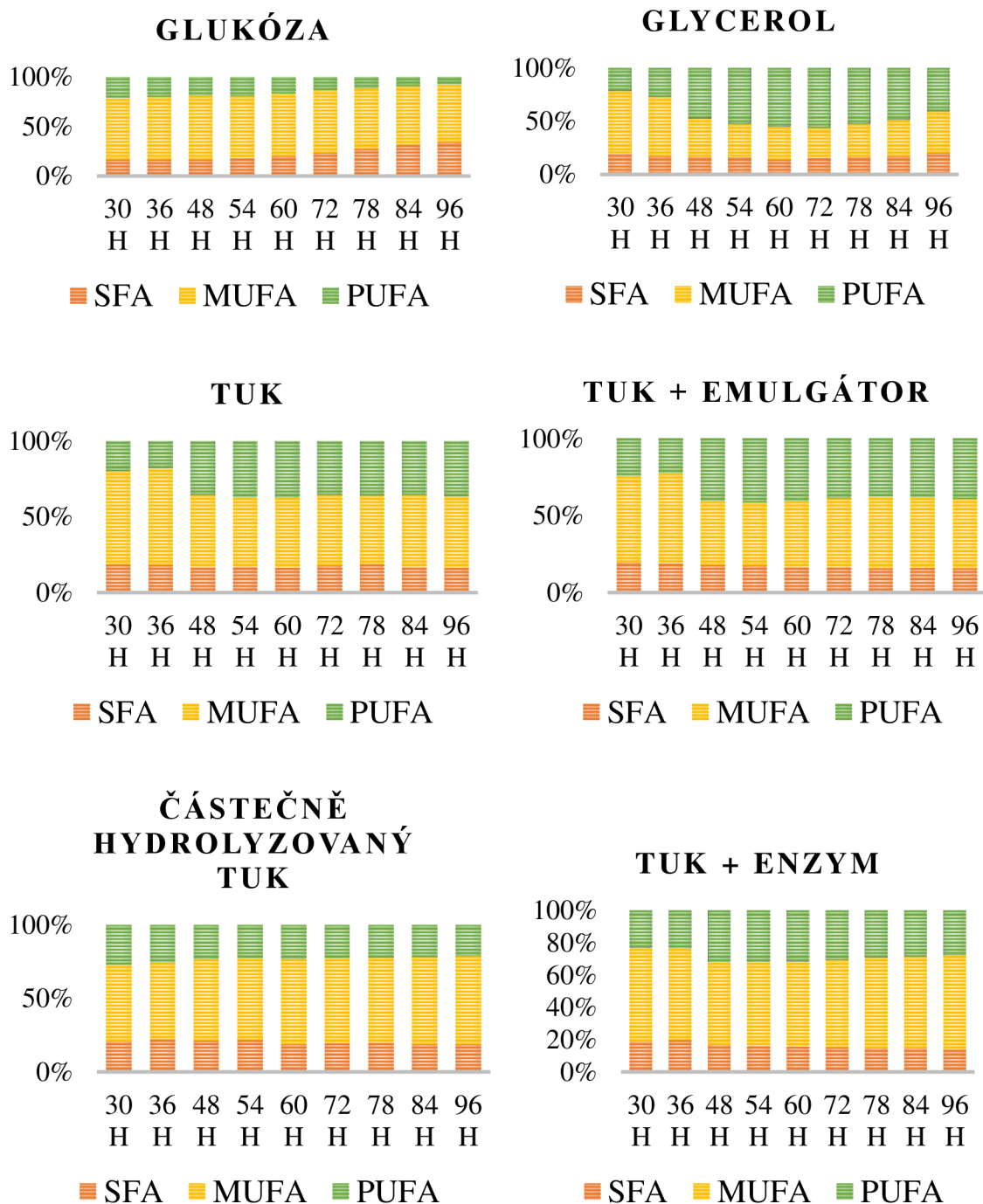
5.6.3.1 Zastoupení mastných kyselin v průběhu kultivace

Ke sledování procentuálního zastoupení PUFA, MUFA a SFA u kvasinky *Rhodotorula glutinis* slouží grafy na Obrázek 103. Nejvíce PUFA a zároveň nejméně SFA bylo naměřeno u kultivací na tuku a tuku s přidavkem emulgátoru. Na základním médiu s glukózou lze během kultivace pozorovat postupné snižování PUFA a zvyšování SFA.



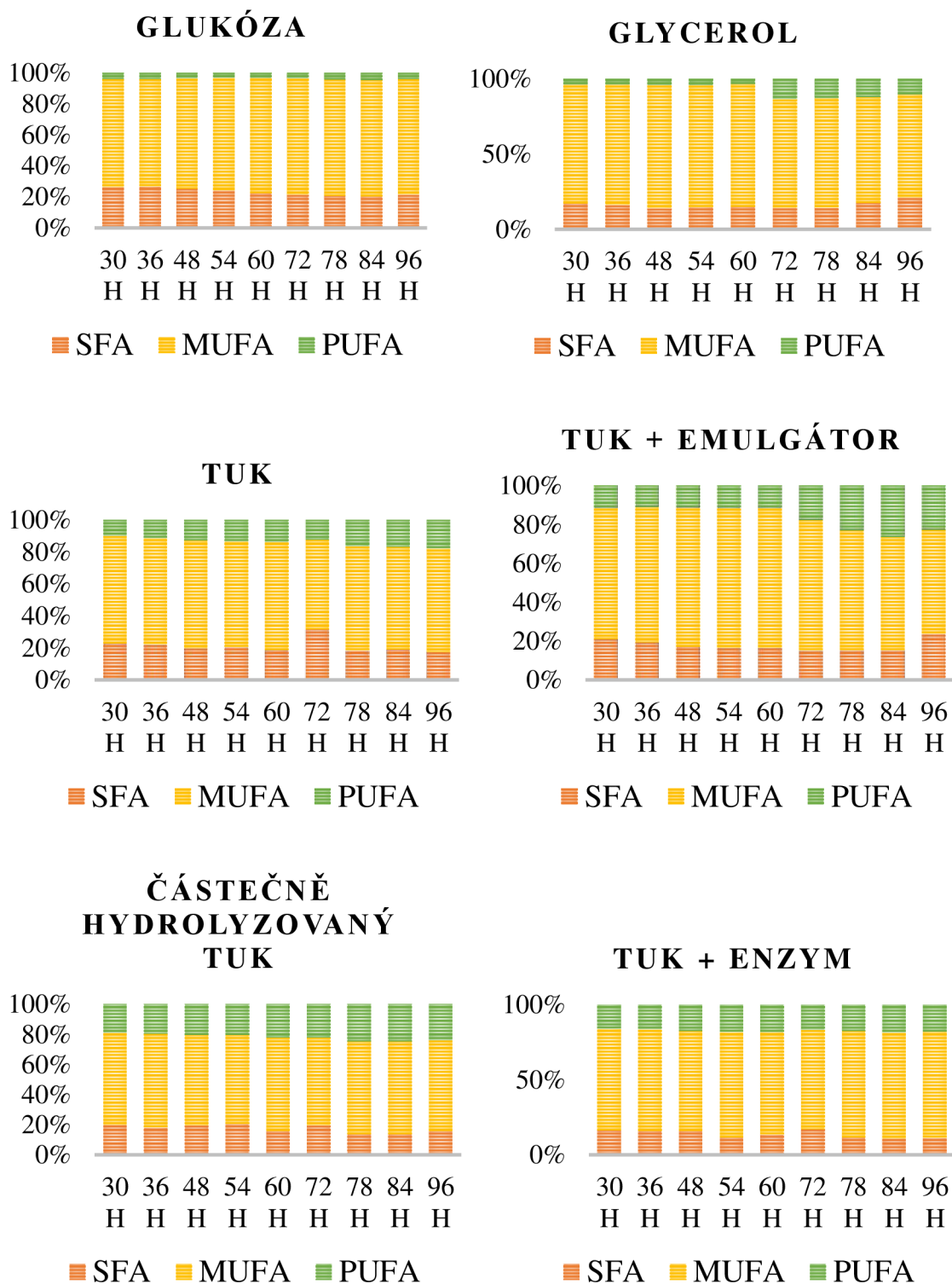
Obrázek 103 Profil mastných kyselin v biomase kvasinky *Rhodotorula glutinis* u velkoobjemové kultivace

U kvasinky *Cystofilobasidium macerans* dochází k větší produkci PUFA a zároveň je zde i malé procento SFA. Polovinu všech mastných kyselin u glycerolového média tvoří PUFA (kyselina linolová a kyselina α -linolenová), jejich obsah se ale na konci kultivace mírně snižuje na 40 %. Ke 40 % PUFA se blíží i kultura na tukovém médiu. Nejmenší podíl PUFA a zároveň i nejvíce nasycených mastných kyselin se nachází u glukózového média. Na médiu s částečně hydrolyzovaným tukem dochází k největší produkci mononenasycených mastných kyselin.



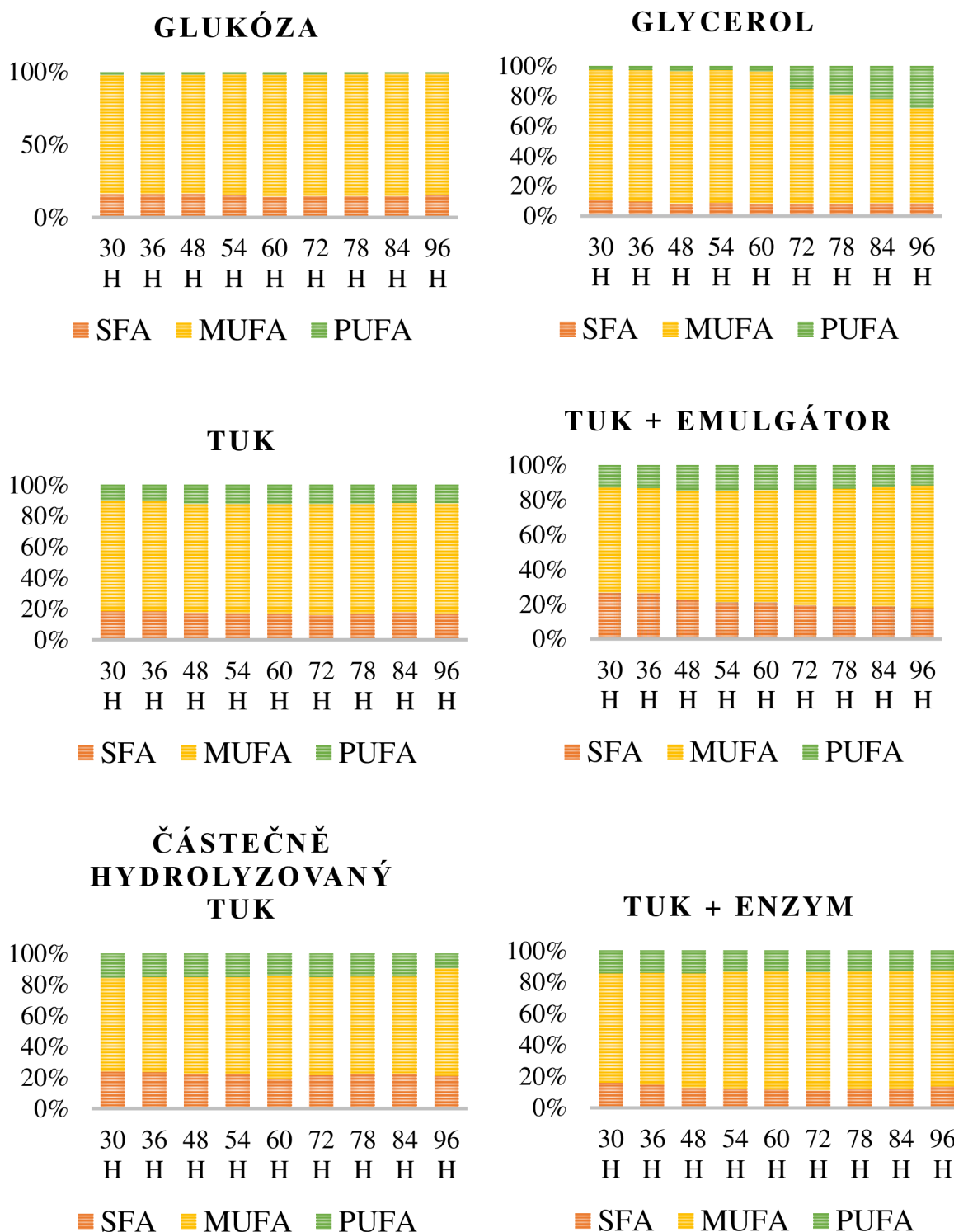
Obrázek 104 Profil mastných kyselin v biomase kvasinky *Cystofilobasidium macerans* u velkoobjemové kultivace

U kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* (Obrázek 105) je nejvíce PUFA obsaženo na tukových médiích, konkrétně na médiu s částečně hydrolyzovaným tukem, kde tvoří až 23 %. Jinak se jejich procento pohybuje kolem 15. Obsah nenasycených mastných kyselin u této kvasinky tvořil nejvíce okolo 20 %.



Obrázek 105 Profil mastných kyselin v biomase kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* u velkoobjemové kultivace

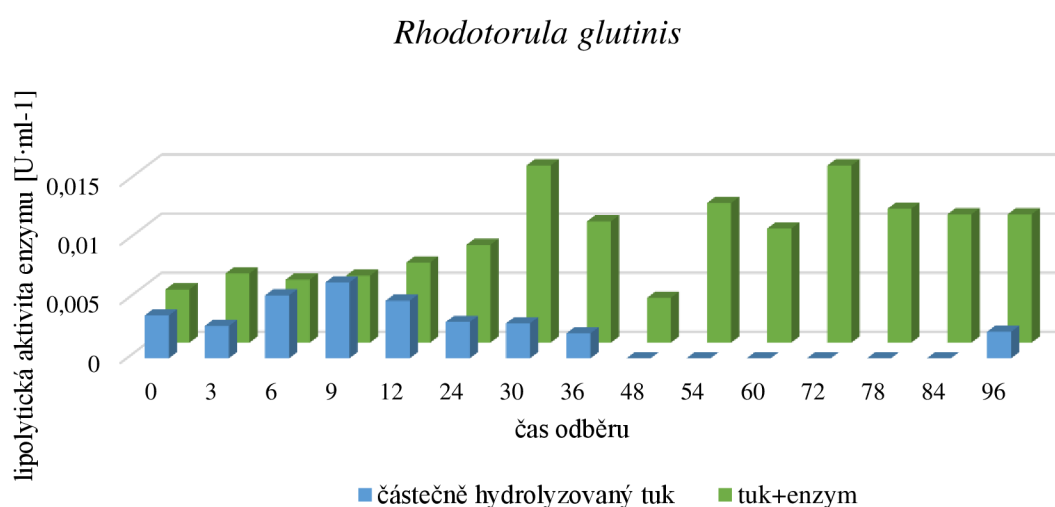
Kmen *Sporidiobolus pararoseus* (Obrázek 106) vykázal nejmenší schopnost produkce polynenasycených mastných kyselin. Na glukózovém médiu tvořily PUFA pouze 2 %. Pouze na glycerolovém médiu na konci kultivace došlo ke zvýšení zastoupení PUFA na 28 %. Co se týče tukových médií, profil mastných kyselin se nějak výrazně neměnil a byl vcelku konstantní. PUFA tvořily okolo 15 %, SFA přibližně 20 % a na zbytku se podílely MUFA.



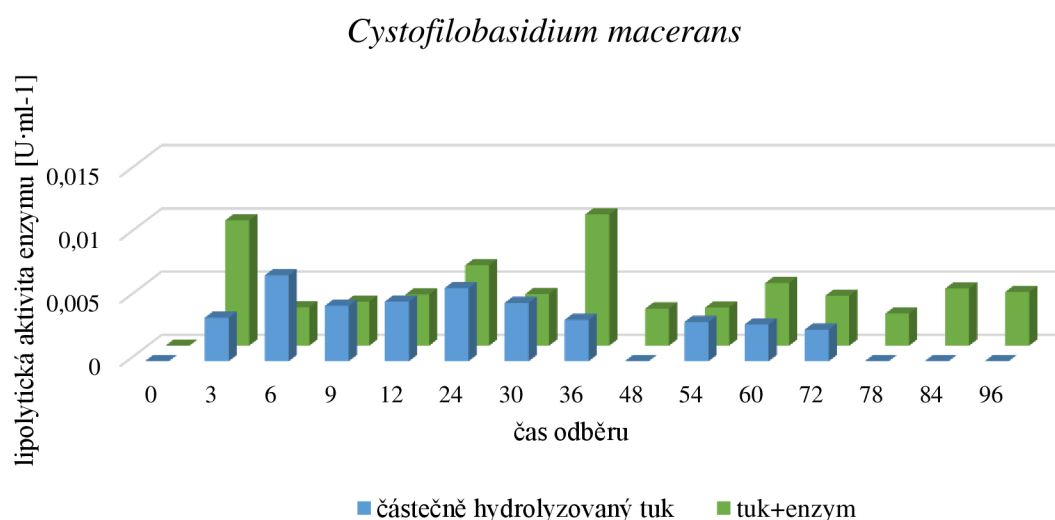
Obrázek 106 Profil mastných kyselin v biomase kvasinky *Sporidiobolus pararoseus* u velkoobjemové kultivace

5.6.4 Lipolytická aktivita komerčního enzymu během kultivace

Pomocí ELISA readeru byla změřena lipolytická aktivita extracelulárně produkovaného enzymu v médiu s částečně hydrolyzovaným tukem (komerční enzym byl již denaturován - viz kapitola 4.6.4.1) a v médiu, kde byl k tuku přidán komerční enzym lipáza z *Candida rugosa*. Byla sledována změna aktivity produkovaného enzymu během kultivace. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v grafech na Obrázek 107, Obrázek 108Obrázek 109Obrázek 110. Na médiu s částečně hydrolyzovaným tukem byly naměřeny u kvasinek rodu *Rhodotorula* a kmene *Cystofilobasidium macerans* nízké lipolytické aktivity okolo - 0,005 U/ml, vyskytující se jen v prvních 30 hodinách kultivace. Poté už došlo k inhibici a enzym již nebyl aktivní. U kmene *Sporidiobolus pararoseus* byla aktivita stabilní během celé doby kultivace a pohybovala se od 0,003 po 0,006 U/ml. U tukového média s přidavkem enzymu se největší aktivita (až 0,02 U/ml) projevuje u kvasinek rodu *Rhodotorula*, kde nejvyšší hodnoty jsou v 72. hodině kultivace.

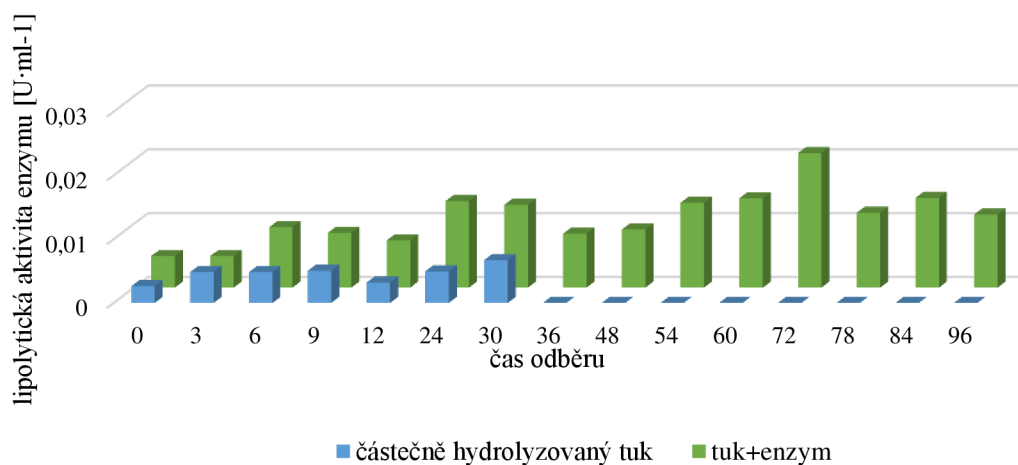


Obrázek 107 Lipolytická aktivita kvasinky *Rhodotorula glutinis* u velkoobjemové kultivace



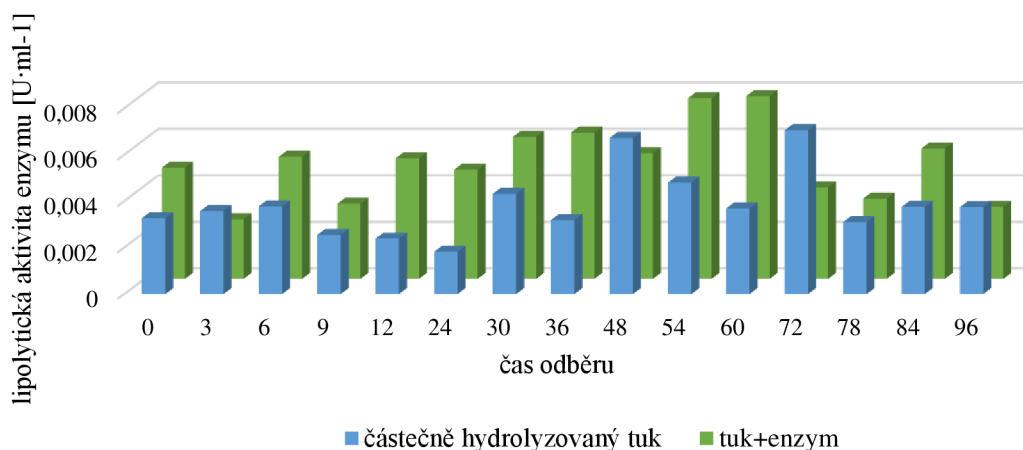
Obrázek 108 Lipolytická aktivita kvasinky *Cystofilobasidium macerans* u velkoobjemové kultivace

Rhodotorula mucilaginosa



Obrázek 109 Lipolytická aktivita kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* u velkoobjemové kultivace

Sporidiobolus pararoseus



Obrázek 110 Lipolytická aktivita kvasinky *Sporidiobolus pararoseus* u velkoobjemové kultivace

5.6.4.1 Kalibrační křivka

Kalibrační křivka pro stanovení lipolytické aktivity byla proměřena ze základního roztoku p-nitrofenolu. Tato látka byla naředěna Tris-HCl pufrům na koncentrace v rozmezí $0,005 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ až $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a proměřena. Výsledná kalibrační rovnice je uvedena v Rovnici 2.

Rovnice 2 Kalibrační rovnice pro výpočet lipolytické aktivity

$$y = 10,87x + 0,0477$$

$$R^2 = 0,9969$$

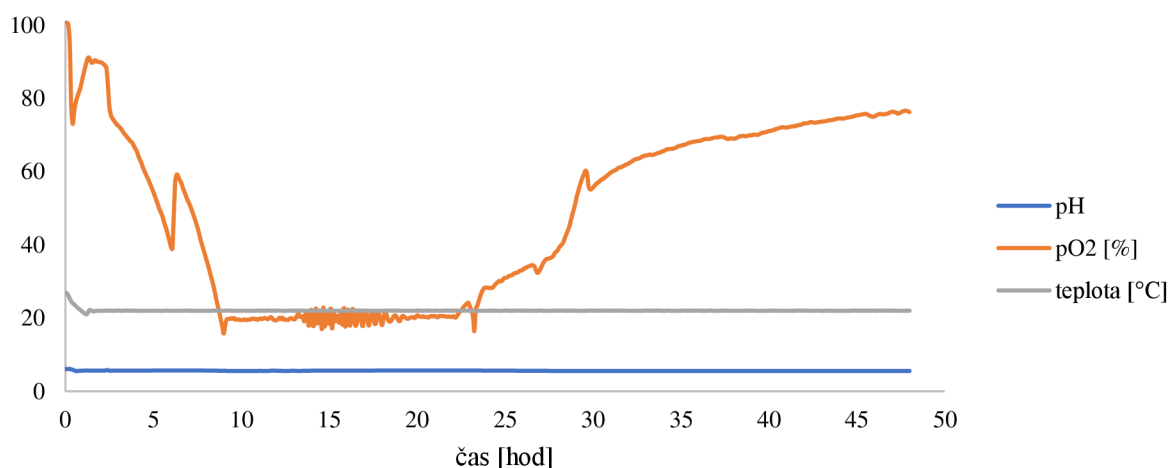
5.7 Kultivace kvasinky *Rhodotorula glutinis* ve fermentoru

K velkokapacitním kultivacím ve fermentoru byla vybrána kvasinka *Rhodotorula glutinis* z několika důvodů – dosahovala největších nárůstů biomasy a je to jedna z nejvíce prostudovaných karotonogenních kvasinek. Díky optimálním podmínkám (především vzdušnění), které fermentor zvládne udržovat, byla doba kultivace zkrácena o polovinu na 48 hodin. Složení obou médií je uvedeno v kapitolách 4.6.4.1 a 4.6.4.2

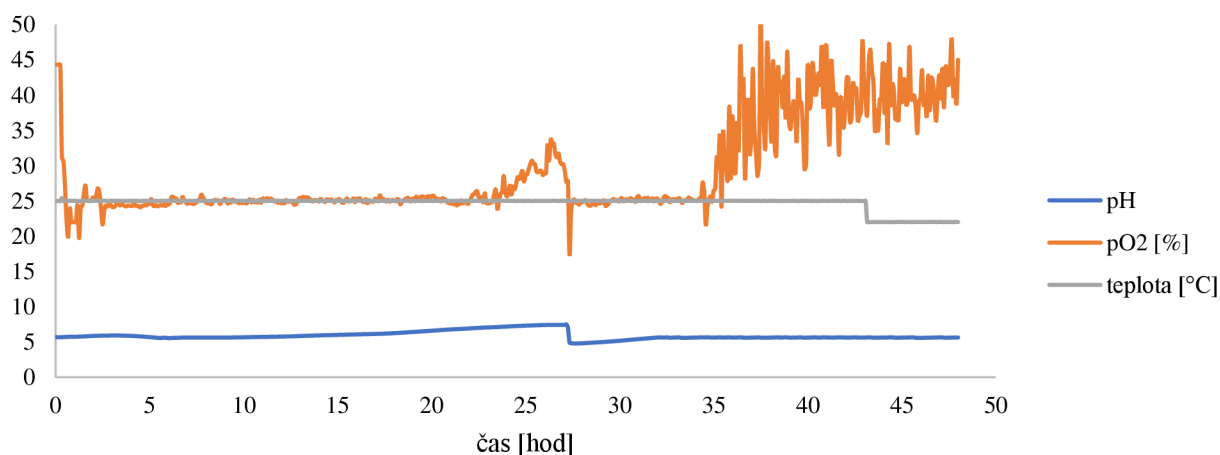
5.7.1 Růstová charakteristika a celková biomasa

Během kultivací byly on-line sledovány tři parametry – hodnota pH, teplota a množství rozpuštěného kyslíku. Grafy závislosti těchto parametrů na čase jsou uvedeny na Obrázek 111. U kultivace ve fermentoru s částečně hydrolyzovaným tukem byla hodnota pH a teplota konstantní. Množství rozpuštěného kyslíku se pohybovalo od 90 % po 20 %, ve stacionární fázi se udržovalo v průměru kolem 75 %. U fermentoru s odpadním tukem a syrovátkou se hladina rozpuštěného kyslíku se pohybovala ve stacionární fázi kolem 40 %.

Fermentor s částečně (10 %) zhydrolyzovaným tukem

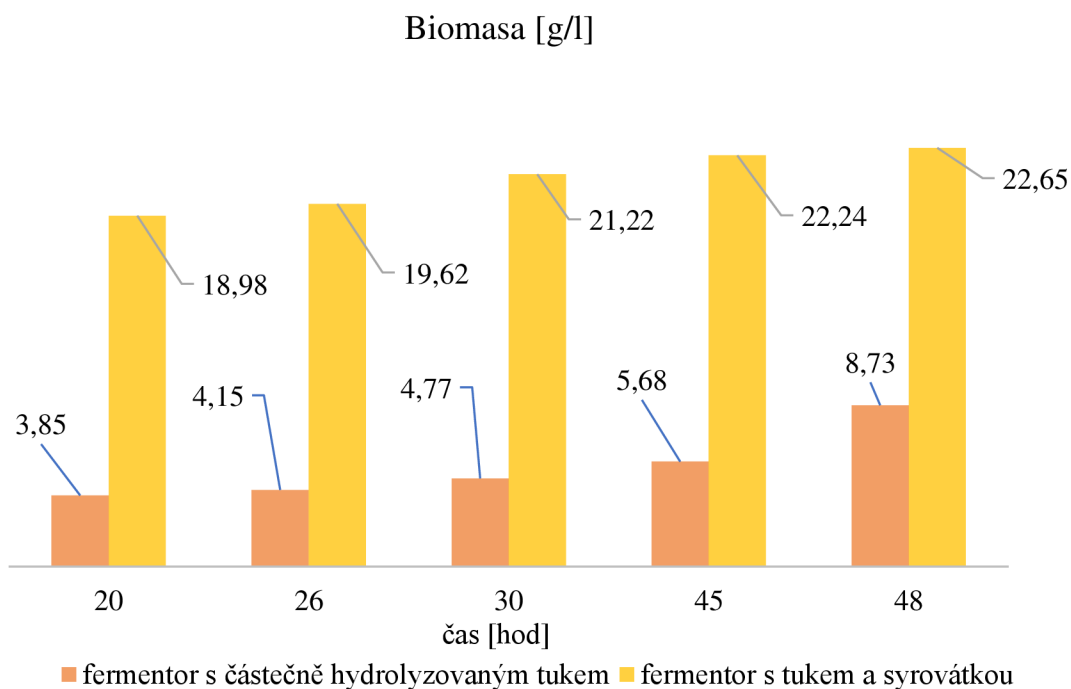


Fermentor s odpadním tukem a syrovátkou



Obrázek 111 Sledované parametry u kultivace kvasinky *Rhodotorula glutinis* ve fermentorech

Od začátku stacionární fáze byly provedeny odběry a gravimetricky stanovena kvasinková biomasa, jejíž výsledky jsou graficky znázorněny na Obrázek 112. Až trojnásobného nárůstu dosahovala kvasinka na tukovém médiu se syrovátkou. Hlavním důvodem tohoto faktu je obsah proteinů v syrovátce, který slouží jako dobrý zdroj dusíku a energie pro buňky. Další příčinou může být koncentrace nejenom glukózy, ale i galaktózy, obsažené v hydrolyzované syrovátce, oproti glycerolu obsaženém v částečně hydrolyzovaném tuku, což poskytuje více jednoduchého uhlíkatého substrátu.



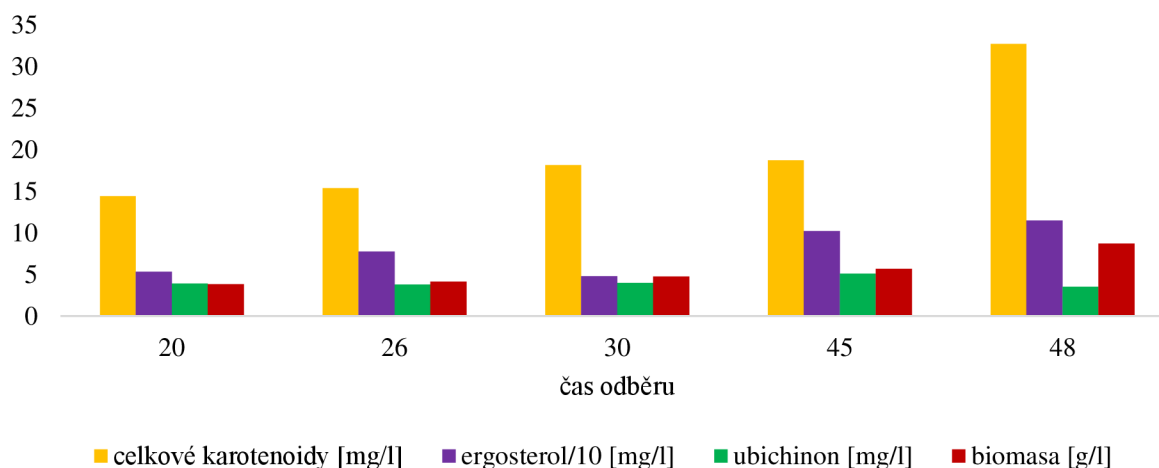
Obrázek 112 Grafické znázornění gravimetrického stanovení biomasy u kultivací ve fermentoru

5.7.2 Produkční vlastnosti na médiu s částečně hydrolyzovaným odpadním tukem

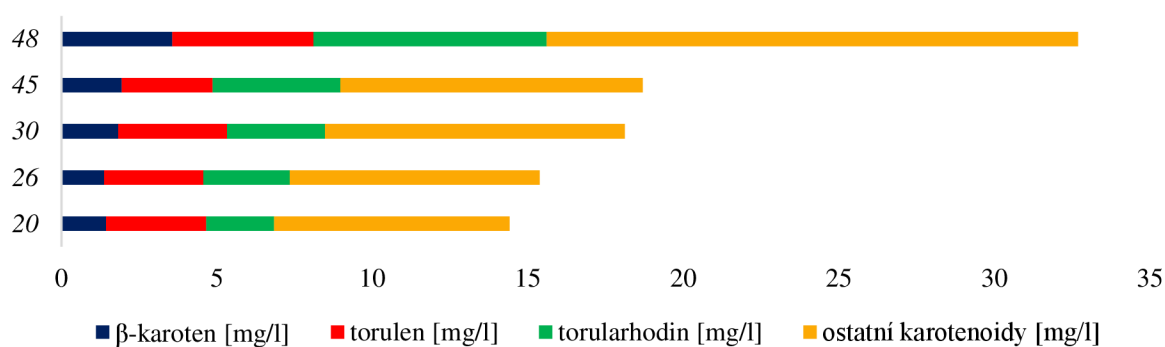
5.7.2.1 Karotenoidy, ergosterol a ubichinon

Produkce karotenoidů během kultivace lineárně stoupala a bylo dosaženo až 32,7 mg/l karotenoidů. Tato vysoká hodnota je způsobena provzdušňováním média a dobrým přístupem kyslíku. Hladina ergosterolu se nejprve zvyšovala, poté dosáhla ve 30. hodině minima. To může být zapříčiněno spotřebou ergosterolu na tvorbu biomembrán se souvisejícím nárůstem biomasy. Po 30. hodině kultivace se opět koncentrace ergosterolu zvedla a na konci kultivace dosáhla 114,7 mg/l. Množství ubichinonu bylo poměrně nízké, což může být následek vysoké spotřeby při aerobním metabolismu. Jeho maximální hodnota (5,1 mg/l) byla naměřena v 45. hodině před koncem kultivace.

Co se týče zastoupení jednotlivých karotenoidů, tak posledních hodinách kultivace během stacionární fáze došlo k poměrně velké tvorbě barviv β -karotenu, torulenu a torularhodinu. Jejich množství se zvýšila nejméně o jednu třetinu. Čtvrtinu ze všech karotenoidů tvořil na konci kultivace torularhodin.



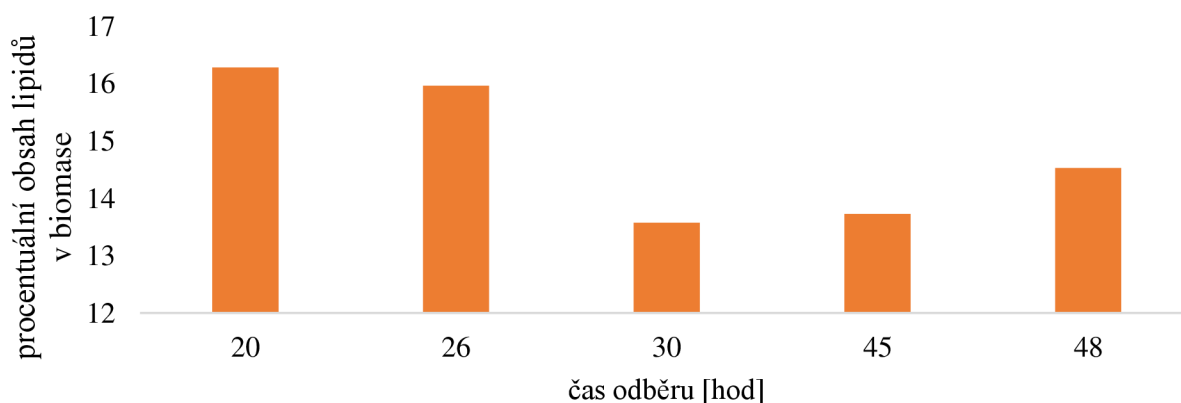
Obrázek 113 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu ve fermentoru s částečně hydrolyzovaným tukem



Obrázek 114 Zastoupení jednotlivých karotenoidů ve fermentoru s částečně hydrolyzovaným tukem

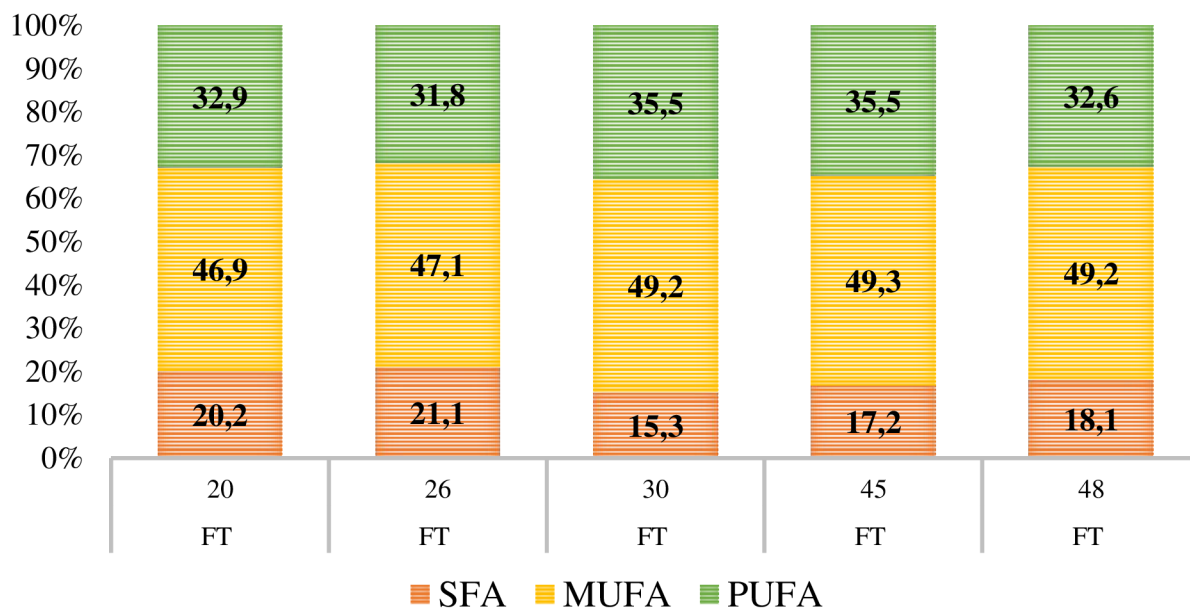
5.7.2.2 Lipidy a mastné kyseliny

Graf na Obrázek 115 ukazuje procentuální zastoupení intracelulárních lipidů v biomase. Lze si všimnout, že na začátku stacionární fáze se lipidy v buňce pohybovaly kolem 15 % a ke poté se jejich obsah snížil. To může být spojeno s vytvářením energetické zásoby v buňce a poté její využití a další postupná akumulace.



Obrázek 115 Procentuální zastoupení lipidů v biomase ve fermentoru s částečně hydrolyzovaným tukem

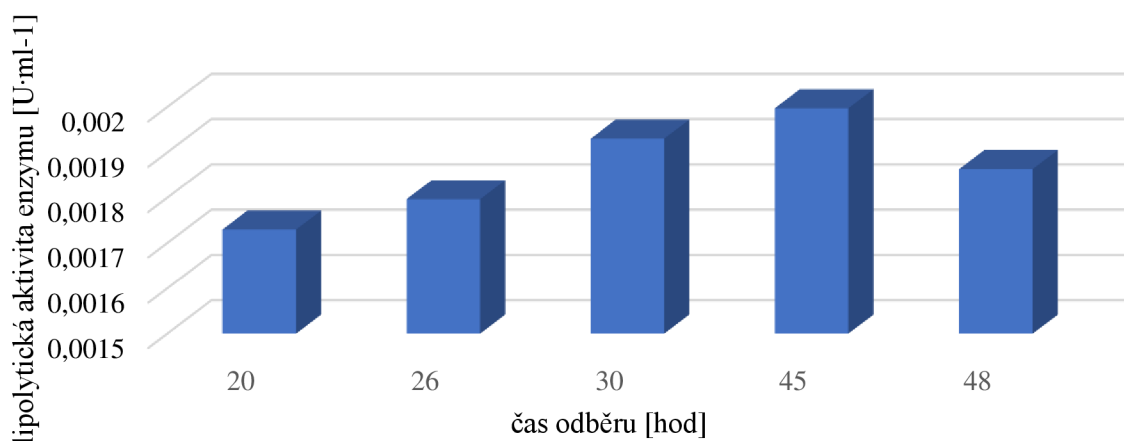
Profil mastných kyselin v průběhu kultivace nějak výrazně nemění. Klesá jen procento nasycených mastných kyselin a tvoří se více mononenasycených mastných kyselin. Poměr polynenasycených mastných kyselin (zejména kyseliny linolové a kyseliny α -linolenové) je vysoký a na konci kultivace tvoří 32,6 %.



Obrázek 116 Profil mastných kyselin v biomase ve fermentoru s částečně hydrolyzovaným tukem

5.7.2.3 Lipolytická aktivita

Lipolytická aktivita enzymu se během kultivace nijak výrazně nemění. Její hodnoty se pohybují od 0,0017 po 0,0019 U/ml. Nedochází ani k inhibici enzymu, spíše ke zvýšené spotřebě uhlíku v pozdější fázi kultivace.

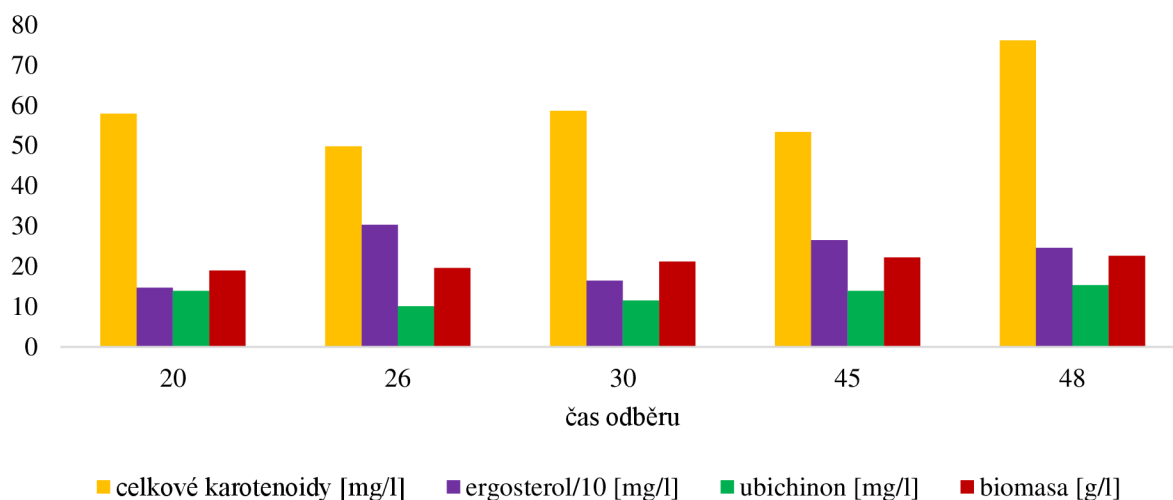


Obrázek 117 Lipolytická aktivita ve fermentoru s částečně hydrolyzovaným tukem

5.7.3 Produkční vlastnosti na médiu s odpadním tukem a syrovátkou

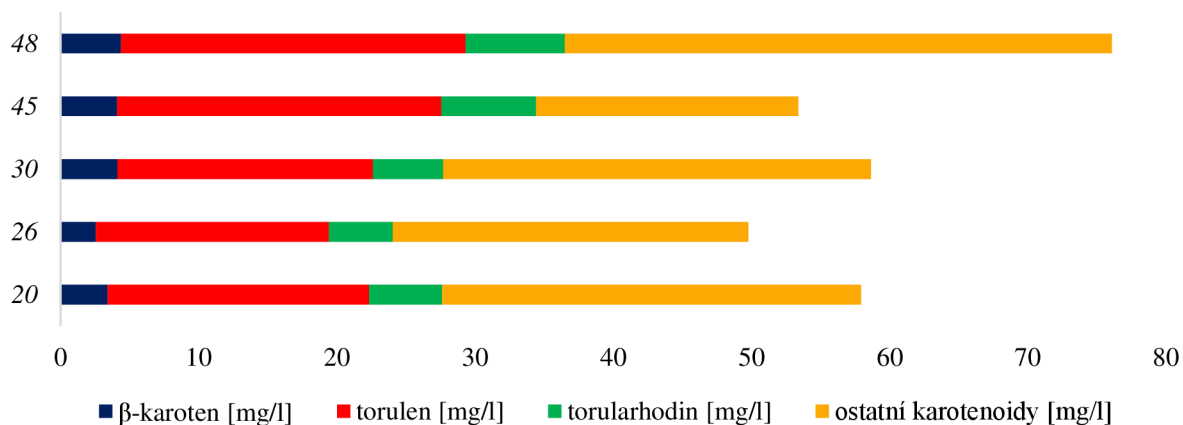
5.7.3.1 Karotenoidy, ergosterol a ubichinon

Díky optimálním podmínkám a výhodám syrovátky jako zdroje uhlíku a dusíku se u fermentoru s odpadním tukem a syrovátkou koncentrace karotenoidů postupně zvýšily až na 76 mg/l. Vysokých hodnot dosahoval i ergosterol. Jeho maximum bylo naměřeno při 26. hodině kultivace, poté se koncentrace snížila o 140 mg/l, což může být zapříčiněno potřebou na tvorbu nových buněčných membrán. Na konci kultivace byl ale vyprodukován na výslednou koncentraci 245,7 mg/l. Zvýšená produkce byla pozorována i u ubichinonu, což je zapříčiněno taktéž intenzivním vzdušněním. Jeho produkce lineárně stoupala spolu s tvorbou biomasy a dosáhla koncentrace 15,3 mg/l.



Obrázek 118 Produkce karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu ve fermentoru s odpadním tukem a syrovátkou

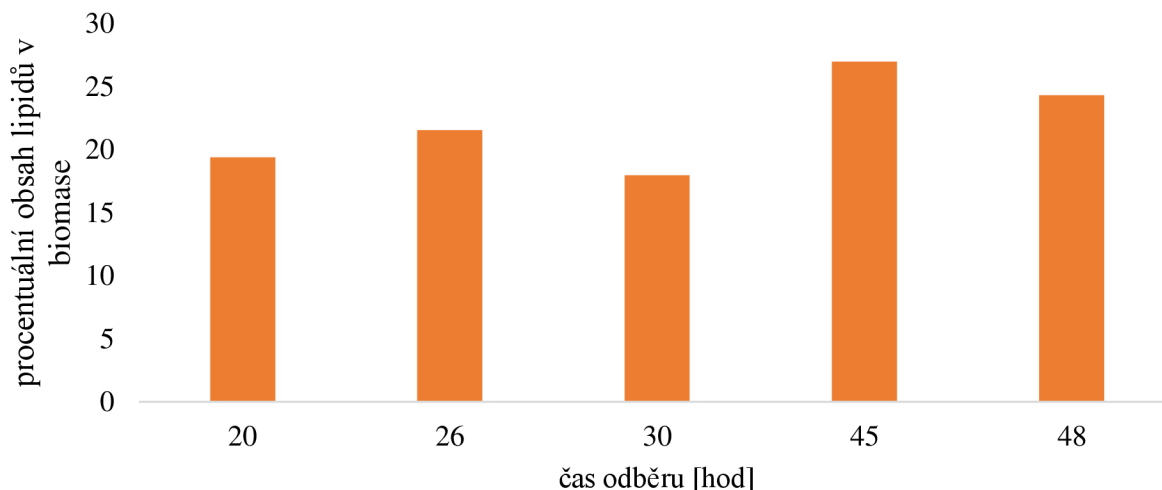
Z hlediska zastoupení jednotlivých karotenoidů, tak jejich poměr se během kultivace nezměnil. Nejvíce kvasinka obsahovala barvivo torulen, dále potom torularhodin a nejméně byl zastoupen β -karoten, což je zřejmě důsledek intenzivního vzdušnění a tvorby oxidovaných karotenoidů.



Obrázek 119 Zastoupení jednotlivých karotenoidů ve fermentoru s odpadním tukem a syrovátkou

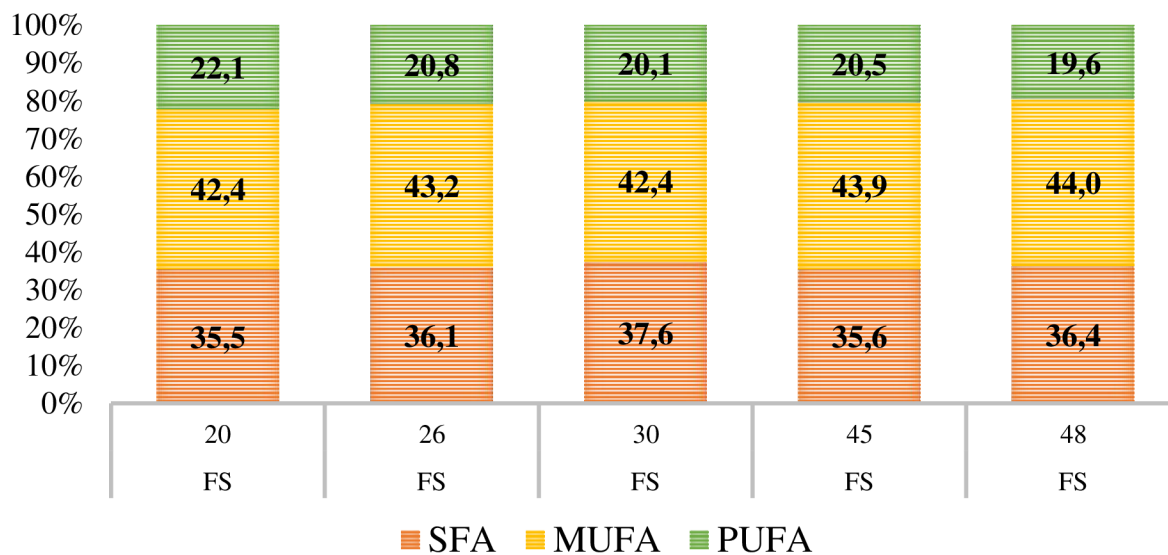
5.7.3.2 Lipidy a mastné kyseliny

Procentuální obsah v biomase se zvýšil v průměru o 10 % oproti předchozí kultivaci ve fermentoru. Tato skutečnost může být způsobena vysokým nárůstem biomasy a s tím spojenou akumulací lipidů. Na konci kultivace intracelulární lipidy tvořily v biomase 24,3 %.



Obrázek 120 Procentuální zastoupení lipidů v biomase ve fermentoru s odpadním tukem a syrovátkou

Profil mastných kyselin se v průběhu kultivace nějak výrazně neměnil. Došlo k vyšší produkci nasycených mastných kyselin a ke snížení produkce PUFA oproti kultivaci ve fermentoru s částečně hydrolyzovaným tukem.



Obrázek 121 Profil mastných kyselin v biomase ve fermentoru s odpadním tukem a syrovátkou

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo studium možností utilizace odpadního živočišného tuku a jeho valorizace a konverze pomocí karotenogenních kvasinek. Tyto mikroorganismy jsou známé produkcí karotenoidních barviv, velkou akumulací lipidů a syntézou ergosterolu a ubichinonu. V práci byly studovány a použity čtyři kmeny kvasinek – *Rhodotorula glutinis*, *Cystofilobasidium macerans*, *Rhodotorula mucilaginosa* a *Sporidiobolus pararoseus*. V rámci práce byl srovnán růst a produkční vlastnosti na celkem sedmi různých médiích (glukózové, glycerolové, tukové, tukové s přídavkem emulgátoru, médium s hydrolyzovaným tukem, tukové s enzymem a tukové s glukózou) se čtyřmi C/N poměry (13, 25, 50, 100). Dále bylo u všech vzorků stanoveno množství a složení lipidických metabolitů. Na závěr byly provedeny velkokapacitní kultivace ve fermentoru. Hlavním úkolem bylo tedy vyhodnocení míry valorizace tukového substrátu pomocí karotenogenních kvasinek.

První dílčím úkolem v práci bylo otestování komerčních lipáz a určení nejvhodnějšího enzymu k hydrolýze odpadního živočišného tuku. Podle provedených testů a analýz byla jako nejúčinnější enzym ověřena lipáza z *Candida rugosa*. Tento enzym má hned několik výhod. Hydrolýza tuku s jeho použitím proběhla nejrychleji a nejúčinněji, je schopný primárně štěpit všechny přítomné triacylglyceroly, je poměrně dostupný a jeho izolace není zřejmě tak náročná jako u ostatních lipáz.

Produkce biomasy byla sledována u všech kultivací, u velkoobjemových kultivací byly stanoveny i růstové křivky. Po gravimetrickém stanovení u základních kultivací z hlediska nárůstu biomasy byl jako nejlepší produkční kmen zvolen *Rhodotorula glutinis*. Nejvyššího nárůstu dosáhl tento kmen u kultivací na enzymaticky hydrolyzovaném tuku u C/N poměru 13, kde byl nárůst biomasy 14,4 g/l a C/N poměru 25, kde byl nárůst 12,3 g/l. Kvasinka *Cystofilobasidium macerans* dosahovala největší produkce biomasy na médiích s C/N poměrem 50 a C/N poměrem 100, kde byla zaznamenána i nejvyšší hodnota 9,6 g/l u tukového média. Pro kvasinku *Rhodotorula mucilaginosa* se jako nejlepší jevíly nižší poměry C/N, nejvyššího nárůstu dosáhla na médiu s enzymatickým hydrolyzátem u C/N poměru 13 (9,1 g/l). Kmen *Sporidiobolus pararoseus* vykazoval podobné produkční vlastnosti ohledně biomasy jako *Cystofilobasidium macerans*. Výhodou enzymatických hydrolyzátů z hlediska produkce biomasy je nízká koncentrace tlumivého roztoku u médií, což má za následek udržování hodnoty pH v optimu. U větších poměru C/N může být ale problém ve vyšší koncentraci volných mastných kyselin, které ve zvýšeném množství mohou být pro kvasinky inhibitory růstu.

K analýze karotenoidů byla použita metoda HPLC/PDA. Bylo zjištěno, že k syntéze karotenoidů u kvasinky *Rhodotorula glutinis* je vhodný C/N poměr 13, nejvyšší produkce bylo dosaženo u glukózového média (30 mg/l). Se zvyšujícím se C/N poměrem klesala koncentrace karotenoidů. Pouze u média s tukem a přídavkem emulgátoru došlo na C/N poměrech 50 a 100 k výraznější produkci až na 26 mg/l. U kvasinky *Cystofilobasidium macerans* byla zaznamenána nejvyšší produkce na C/N poměrech 25 a 50 na základních glukózových a glycerolových médiích, kde bylo dosaženo hodnot kolem 40 mg/l. Pro kmen *Rhodotorula mucilaginosa* měly nízké poměry C/N za následek nízkou produkci karotenoidů (pouze kolem 10 mg/l), až u vyšších C/N poměrů docházelo k většímu nutričnímu stresu a tím i k vyšší tvorbě těchto pigmentů.

Na tukovém médiu s přidavkem emulgátoru u C/N poměru 50 bylo zaznamenáno až 44 mg/l. Co se týče kmene *Sporidiobolus pararoseus*, tak u něj měly nízké C/N poměry podobný následek a karotenoidy se zde pohybovaly kolem 20 mg/l. K velkému zvýšení došlo až u C/N poměru 100, kde koncentrace karotenoidů u tukového média s přidavkem emulgátoru dosáhla 49 mg/l.

Výtěžky ergosterolu byly nejvyšší u kvasinky *Cystofilobasidium macerans*, kde u C/N poměru 25 a 50 byla koncentrace na glukózovém a glycerolovém médiu až 300 mg/l, což je spojeno i s vyšším nárůstem biomasy. U kvasinky *Rhodotorula glutinis* bylo maximální koncentrace 180 mg/l dosaženo u C/N poměru 13 na glycerolovém médiu. U kmene *Rhodotorula mucilaginosa* a *Sporidiobolus pararoseus* se nejvyšší koncentrace pohybovaly v průměru kolem 150 mg/l.

Nejvyšší produkce ubichinonu byly obecně u kvasinek kultivovaných na tukových médiích, nejvíce na tukovém médiu s přidavkem emulgátoru. U *Rhodotorula glutinis* byla naměřena nejvyšší koncentrace u C/N poměru 50 s hodnotou 14 mg/l. Kvasinka *Cystofilobasidium macerans* dosahovala vyšších koncentrací ubichinonu na tukových médiích s emulgátorem, u C/N poměru 25 to bylo až 33 mg/l. *Rhodotorula mucilaginosa* byla schopná produkce ubichinonu pouze v nízkých koncentracích, jen u enzymatického hydrolyzátu při C/N poměru 50 bylo dosaženo koncentrace 20 mg/l. Kvasinka *Sporidiobolus pararoseus* měla jednoznačně nejvyšší produkci na tukových médiích, a to u C/N poměru 50 až 21 mg/l.

Pomocí metody GC/FID bylo u všech kultivací stanoveno procento obsahu intracelulárních lipidů. Konstantně nejvyšší hodnoty procentuálního obsahu lipidů zaujímal kvasinka *Sporidiobolus pararoseus*, jejíž hodnoty v některých případech zejména na tukových médiích překračovaly až 50 % biomasy. Průměrné zastoupení lipidů v kvasinkách se pohybovalo u C/N poměru 13 a 25 kolem 20 – 30 %. U vyšších C/N poměrů klesl obsah lipidů na průměrnou hodnotu 10 -20 %. Kvasinky, které mají největší zastoupení polynenasycených mastných kyselin ve své biomase, jsou *Rhodotorula glutinis* a *Cystofilobasidium macerans*.

Pro ověření produkčních vlastností na tukovém substrátu byla provedena velkokapacitní kultivace ve fermentorech. Vybrána byla kvasinka *Rhodotorula glutinis* a médium s částečně hydrolyzovaným tukem a tukem s přidavkem dalšího odpadního substrátu, kterým byla hydrolyzovaná syrovátka (C/N poměr 13). Fermentor kultury zajišťoval optimální podmínky pro růst, tudíž docházelo k výrazně zvýšené a rychlejší produkci biomasy oproti kultivacím v laboratorním měřítku. Díky míchání a lepšímu přístupu kyslíku došlo také k několikanásobnému zvýšení koncentrace karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu. Naopak produkce lipidů byla nižší ve srovnání s laboratorními kultivacemi. Lze ale předpokládat, že při prodloužení kultivační doby ze 48 hodin by se mohla zvýšit akumulace lipidů, růst by pro kvasinky nebyl už tak energeticky náročný.

Z řady faktů, které byly v předložené práci zjištěny, lze závěrem konstatovat, že odpadní živočišný tuk je určitě zajímavým substrátem pro karotenogenní kvasinky a tato varianta je i dobře biotechnologicky využitelná. Kvasinky tuk zvládnou využít i bez náročnějších předúprav, a tím tento odpad valorizovat a převést na cenné produkty v podobě lipidických látek s vysokou přidanou hodnotou. Práce byla zpracována v rámci mezinárodního projektu „LipoFungi“ financovaného „National Research Council, Norway“. Výsledky budou v projektu použity pro další výzkum.

7 LITERATURA

- [1] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. Bratislava: Alfa, 1982. Edícia potravinárskej literatúry (Alfa).
- [2] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. a VRANÁ, D., ed. *Kvasinky ve výzkumu a praxi*. Praha: Academia, 1986. Edícia potravinárskej literatúry (Alfa).
- [3] KURTZMAN, C. P. a FELL, W. J. *The yeasts: a taxonomic study*. 4th ed. New York: Elsevier, c2000. ISBN 04-448-1312-8.
- [4] JANDEROVÁ, B. a BENDOVIÁ, O. *Úvod do biologie kvasinek*. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-718-4990-1.
- [5] BARNETT, J. A., PAYNE, R. W. a YARROW D. *Yeasts: characteristics and identification*. 3rd ed. New York, NY, USA: Cambridge University Press, 2000. Edícia potravinárskej literatúry (Alfa). ISBN 05-215-7396-3.
- [6] BERRY, D. R., RUSSELL, I. a STEWART, G. *Yeast biotechnology*. Boston, 1987. ISBN 00-457-4042-9.
- [7] WALKER, G. M. *Yeast physiology and biotechnology*. New York: J. Wiley, c1998. ISBN 04-719-6446-8.
- [8] SATYANARAYANA, T. a KUNZE, G. *Yeast biotechnology: diversity and applications*. New York: Springer, [2009].
- [9] RHODOTORULA GLUTINIS (Fresenius) Harrison, 2008. *MINIATLAS MIKROORGANISMŮ* [online]. Praha: VŠCHT [cit. 2018-05-20]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/rhod-glu.htm>
- [10] HERNÁNDEZ-ALMANZAA, A., CESARMONTANEZ, J. a A. AGUILAR-GONZÁLEZ, M. *Rhodotorula glutinis as source of pigments and metabolites for food industry*. *Food Bioscience*. 2013, 2014(5), 64-72.
- [11] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [12] PRESCOTT, D. M. *Methods in cell biology: Yeast cell*. Volume IX. San Diego: Academic Press. ISBN 0091-679X.
- [13] COOPER, G. M. *The cell: a molecular approach*. Washington: ASM Press, 1996. ISBN 08-789-3119-8.
- [14] LODISH, H. F. *Molecular cell biology*. 7th ed. New York: W.H. Freeman, c2013. ISBN 978-1-4641-0981-2.
- [15] ALBERTS, B. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science, c2008. ISBN 978-0-8153-4105-5.
- [16] ILLANES, A. *Enzyme biocatalysis: principles and applications*. Dordrecht: Springer, c2008. ISBN 14-020-8361-0.

- [17] VODRÁŽKA, Z.; Kaš, J.; Rauch, P.: *Enzymologie*. 3. přeprac. vyd. Praha VŠCHT, 1998. 171 s. ISBN 80-708-0330-4.
- [18] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [19] SINGH, R., KUMAR, M., MITTA, L. A. a MEHTA, P. K. *Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech*. 2016, 6(2). DOI: 10.1007/s13205-016-0485-8. ISBN 10.1007/s13205-016-0485-8.
- [20] COPELAND, R. A.. *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. New York: VCH Publishers, 1996. ISBN 15-608-1903-0.
- [21] *Enzyme Activator* [online]. [cit. 2019-04-16]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/enzyme-activator>
- [22] LOPINA, O. D. Enzyme Inhibitors and Activators. *Enzyme Inhibitors and Activators*. InTech, 2017, 2017-03-29. DOI: 10.5772/67248. ISBN 978-953-51-3057-4. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/enzyme-inhibitors-and-activators/enzyme-inhibitors-and-activators>
- [23] DOOLITTLE, M. H. a REUE, K.. *Lipase and phospholipase protocols: An Industrial Enzyme Through Metagenomics*. Totowa, N.J.: Humana Press, c1999. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), v. 109. ISBN 08-960-3546-8.
- [24] RAMNATH, L., SITHOLE, B. a GOVINDEN, R. Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry. *Canadian Journal of Microbiology*. 2017, **63**(3), 179-192. DOI: 10.1139/cjm-2016-0447. ISSN 0008-4166. Dostupné také z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/cjm-2016-0447>
- [25] GOSH, P.K., SAXENA, R.K., GUPTA, R., YADAV, R.P. a DAVIDSON S.: *Microbial lipases: production and applications*. *Science Progress*. 1996, 79(2), 119-157.
- [26] ANBU, P., GOPINATH, S. C. B., CHAULAGAIN, B. P. a LAKSHMIPRIYA, T. Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine 2016. *BioMed Research International*. 2017, **2017**, 1-3. DOI: 10.1155/2017/2195808. Dostupné také z: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/2195808/>
- [27] ANDUALEMA, B. a GESSESSE, A. Microbial Lipases and Their Industrial Applications: Review. *Biotechnology(Faisalabad)*. 2012, **11**(3), 100-118. DOI: 10.3923/biotech.2012.100.118. ISSN 1682296X. Dostupné také z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=biotech.2012.100.118>
- [28] VOET, D. a VOET, J. G. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0544-9.
- [29] YAMAGUCH, M.. *Carotenoids: properties, effects, and diseases*. New York: Nova Science Publishers, c2010. ISBN 978-1-61209-713-8.

- [30] BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S. a PFANDER, H. *Carotenoids handbook*. Boston: Birkhäuser Verlag, c2004. ISBN 37-643-6180-8.
- [31] LANDRUM, J. T., LIAAEN-JENSEN, S. a PFANDER, H. *Carotenoids: physical, chemical, and biological functions and properties*. Boca Raton: CRC Press, c2010. ISBN 978-1-4200-5230-5.
- [32] LANDRUM, J.T., LIAAEN-JENSEN, S. a PFANDER, H. *Carotenoids: physical, chemical, and biological functions and properties*. Boca Raton: CRC Press, c2010. ISBN 978-94-009-5862-3.
- [33] Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products - ScienceDirect. *ScienceDirect.com | Science, health and medical journals, full text articles and books*. [online]. [cit. 16.04.2019]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691518305052?via%3Dihub>
- [34] KO, A. M., BŁAŻEJAK, S., GIENKA, I., KIELISZEK, M. a BRYŚ, J. Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry?. *Microbial Cell Factories*. 2018, **17**(1). DOI: 10.1186/s12934-018-0893-z. ISSN 1475-2859. Dostupné také z: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-018-0893-z>
- [35] MURRAY, R. K. a VOET, J. G.. *Harperova Biochemie*. Jinočany: Victoria Publishing, 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- [36] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*. Vyd. 1. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902-3914-5.
- [37] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-866-5901-1.
- [38] VANCE, D. E. a VANCE, J. E. *Biochemistry of lipids, lipoproteins, and membranes*. 4th ed. Boston: Elsevier, 2002. Biochemistry of plants. ISBN 978-0-444-51139-3.
- [39] AKOH, C. C. a VANCE, J. E. *Handbook of functional lipids*. 4th ed. Boca Raton: Elsevier, 2006. Biochemistry of plants. ISBN 08-493-2162-X.
- [40] PARISH, E. J. a NES, W. D. *Biochemistry and function of sterols*. Boca Raton: CRC Press, c1997. ISBN 08-493-7674-2.
- [41] PATTERSON, G. W. a NES, W. D. *Physiology and biochemistry of sterols*. Champaign, Ill.: American Oil Chemists' Society, c1991. ISBN 09-353-1538-1.
- [42] LEY, B. M. *Coenzyme Q10: all-around nutrient for all-around health! : latest research as a ... heart strengthener, energy promoter, aging fighter, and much more!*. Temecula, CA: BL Publications, 1999. ISBN 18-907-6606-2.
- [43] MONEY, N. P. *Microbiology: a very short introduction*. Oxford: Oxford University Press, 2014. Very short introductions. ISBN 978-0-19-968168-6.

- [44] VESELÁ, M. a DRDÁK, M. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 2. vyd. přeprac. Brno: VUTIUM, 1999. ISBN 80-214-1305-0.
- [45] CHRIAŠTEL, L. *Bioreaktory*. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 1992. ISBN 80-227-0467-9.
- [46] O'BRIEN, R. D. *Fats and oils: formulating and processing for applications*. 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c2004. Monographs on appropriate industrial technology. ISBN 08-493-1599-9.
- [47] GUNSTONE, F. D. *Oils and fats in the food industry*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell Pub., 2008. ISBN 14-051-7121-9.
- [48] Effects of lipids on enzymatic hydrolysis and physical properties of starch - ScienceDirect. *ScienceDirect.com | Science, health and medical journals, full text articles and books*. [online]. [cit. 16.04.2019]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861712008831?via%3Dihub>
- [49] Optimization of enzymatic hydrolysis for effective lipid extraction from microalgae *Scenedesmus* sp. - ScienceDirect. *ScienceDirect.com | Science, health and medical journals, full text articles and books*. [online]. [cit. 16.04.2019]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960148118300880?via%3Dihub>
- [50] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [51] SOMMER, L. *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [52] VITHA, M. F. a JUNGBAUER, A. *Chromatography: principles and instrumentation*. Hoboken, New Jersey: Wiley, [2017]. ISBN 978-111-9270-898.
- [53] SCOTT, R. P. W. *Techniques and practice of chromatography*. New York: M. Dekker, c1995. Chromatographic science, v. 70. ISBN 08-247-9460-5.
- [54] SHERMA, J. a FRIED, B. *Handbook of thin-layer chromatography*. 3rd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, c2003. Chromatographic science, v. 89. ISBN 08-247-0895-4.
- [55] HÁRONIKOVÁ, A. *Produkce vybraných kvasinkových metabolitů využitelných do potravinových doplňků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 141 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [56] SZOTKOWSKI, M. *Srovnání metabolické aktivity a potenciálního využití mikrořas a pigmentotvorných kvasinek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 97 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

C/N poměr – poměr uhlíku a dusíku v kultivačním médiu

RG – *Rhodotorula glutinis*

CM – *Cystofilobasidium macerans*

RM – *Rhodotorula mucilaginosa*

SP – *Sporidiobolus pararoseus*

PUFA – Polynenasycené mastné kyseliny

MUFA – Mononenasycené mastné kyseliny

SUFA – Nasycené mastné kyseliny

CoA – Koenzym A

HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

PDA – Detektor diodového pole

GC – Plynová chromatografie

FID – Plamenově ionizační detektor

Glu – Glukózové médium

Gly – Glycerolové médium

Tuk – tukové médium

T+t – Tuk + tween (emulgátor) médium

H. tuk – Médium s hydrolyzovaným tukem

T+e – Tuk + enzym médium

T+g – tuk + glukóza médium

9 PŘÍLOHA

9.1 Fotografie výsledných kvasinkových kultur u základních kultivací



Obrázek 122 Základní kultivace kvasinek (médium - glukózové, glycerolové, tukové, tukové s emulgátorem, hydrolyzovaný tuk)



Obrázek 123 Základní kultivace - médium s tukem a enzymem a médium s tukem a glukózou
 (vždy v pořadí C/N poměr 13, 25, 50, 100)