



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

PRODUKCE KAROTENOIDŮ A DALŠÍCH METABOLITŮ KVASINKAMI S VYUŽITÍM VYBRANÝCH POTRAVINÁŘSKÝCH ODPADŮ.

PRODUCTION OF CAROTENOIDS AND OTHER METABOLITES BY YEAST USING SELECTED FOOD WASTES.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Oleg Chujanov

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1660/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Oleg Chujanov**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Produkce karotenoidů a dalších metabolitů kvasinkami s využitím vybraných potravinářských odpadů.

Zadání bakalářské práce:

V rámci této práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- Přehledná literární rešerše zaměřená na vybrané kmeny karotenogenních kvasinek
- Optimalizace úpravy vybraných odpadních substrátů potravinářského průmyslu.
- Kultivace vybraných kmenů kvasinek na odpadních substrátech.
- Optimalizace složení produkčních médií.
- Příprava a izolace různých extraktů z kvasinkové biomasy a jejich charakterizace.
- Srovnání produkčních vlastností vybraných kmenů.
- Vyhodnocení výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

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

Oleg Chujanov
student

Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou kultivace kvasinek s využitím potravinářských odpadních substrátů v laboratorním měřítku. Karotenogenní kvasinky jsou mikroorganismy schopné spotřebovat odpadní potravinářské substráty a využívat je jako zdroje organických živin pro růst. Ke zkoumané problematice bylo přistupováno z praktického i teoretického hlediska. V praktické části byly popsány jednotlivé druhy kvasinek, probírané metabolity a typy odpadních substrátů. Mezi hlavní zvolené substráty patřil kuřecí tuk a kuřecí peří. Během této práce byly využity kvasinkové druhy *Rhodotorula kratochvilovae* (CCY 20-2-26), *Rhodospiridium toruloides* (CCY 62-2-4), *Cystofilobasidium macerans* (CCY 10-1-2), *Sporidiobolus pararoseus* (CCY 19-9-6), *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 20-9-7), *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 19-4-25) a *Sporidiobolus metaroseus* (CCY 19-6-20). Dané kmeny vykazovaly dobré vlastnosti při produkci sledovaných metabolitů. Pro produkci sledovaných metabolitů na odpadních substrátech byly vybrány kmeny s nejlepšími výsledky, a to jsou *Rhodospiridium toruloides* (CCY 62-2-4) a *Sporidiobolus metaroseus* (CCY 19-6-20).

Klíčová slova: karotenoidy, karotenogenní kvasinky, pérový hydrolyzát, kultivace, kuřecí tuk, mastné kyseliny

Abstract

This bachelor thesis is focused on the issue of yeast cultivation with the usage of waste substrates from the food industry on a laboratory level. Carotenogenic yeasts are microorganisms capable of processing food waste substrates and use them as a source of organic nutrients for growth. This thesis consists of a practical as well as theoretical part. The experimental section focuses on the description of different strains of yeasts, metabolites and types of waste substrates. The two main substrates chosen for this research were chicken fat and chicken feathers. The yeast types used in this thesis were *Rhodotorula kratochvilovae* (CCY 20-2-26), *Rhodospiridium toruloides* (CCY 62-2-4), *Cystofilobasidium macerans* (CCY 10-1-2), *Sporidiobolus pararoseus* (CCY 19-9-6), *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 20-9-7), *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 19-4-25) and *Sporidiobolus metaroseus* (CCY 19-6-20). These strains reported high production values of the metabolites researched in this thesis. The strains *Rhodospiridium toruloides* (CCY 62-2-4) and *Sporidiobolus metaroseus* (CCY 19-6-20) were chosen for the production of metabolites from waste substrates, for those reported the most promising results,

Key words: carotenoids, carotenogenic yeasts, feather hydrolyzate, cultivation, chicken fat, fatty acids

CHUJANOV, Oleg. *Produkce karotenoidů a dalších metabolitů kvasinkami s využitím vybraných potravinářských odpadů*. [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-25]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139132>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martin Szotkowski.

Prohlášení

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

.....

podpis studenta

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu své bakalářské práce panu Ing. Martinu Szotkowskému Ph.D. a odbornému konzultantovi Ing. Jiřímu Holubovi za vedení, ochotu a pomoc při řešení problematiky. Chemické fakultě za vytvoření podmínek a možností pro realizaci této práce. Dále

bych rád poděkoval své rodině a přátelům za veškerou podporu v průběhu celého studia na vysoké škole.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Teoretická část.....	10
2.1	Kvasinky	10
2.1.1	Rozmnožování kvasinek	10
2.1.2	Struktura buňky kvasinek.....	10
2.1.3	Karotenogenní kvasinky.....	11
2.2	Metabolyty	13
2.3	Karotenoidy.....	13
2.3.1	Chemická struktura karotenoidů	13
2.3.2	Význam karotenoidů	14
2.4	Lipidy.....	14
2.4.1	Mastné kyseliny.....	15
2.4.2	Ergosterol	18
2.5	Lipofilní látky	19
2.5.1	Ubichinon (Koenzym Q10).....	19
2.6	Odpadní substráty	19
2.6.1	Živočišné odpadní tuky	19
2.6.2	Odpadní substráty při produkci karotenoidů	20
2.7	Kultivace kvasinek.....	20
2.8	Bioreaktor	21
2.9	Plynová chromatografie (GC).....	21
2.10	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	22
2.11	Spektrofotometrická detekce	22
3	Cíl práce	23
4	Experementalni část	24
4.1	Použité chemikálie	24
4.1.1	Chemikálie použité ke kultivaci kvasinek.....	24
4.1.2	Chemikálie použité k hydrolýze kuřecího peří	24
4.1.3	Chemikálie použité pro přípravu vzorků a analýzu (HPLC, GC).....	24
4.2	Použité pomůcky a přístroje.....	25
4.2.1	Přístrojová technika a pomůcky pro kultivaci kvasinek.....	25
4.2.2	Přístrojová technika a pomůcky pro izolaci a analýzu karotenoidů a lipidů.....	25

4.3	Použité druhy kvasinek	26
4.4	Kultivace vybraných druhů kvasinek.....	26
4.4.1	Vnější podmínky	26
4.4.2	Inokulum I.....	26
4.4.3	Inokulum II.....	27
4.4.4	Produkční média.....	27
4.4.5	Hydrolyza odpadního kuřecího peří.....	28
4.4.6	Fermentor	28
4.5	Zpracování biomasy.....	29
4.5.1	Uskladnění vzorků a stanovení koncentrace biomasy.....	29
4.5.2	Extrakce pro HPLC analýzu.....	29
4.5.3	Analýza vzorků metodou HPLC/PDA	30
4.5.4	Transesterifikace a extrakce mastných kyselin pro GC	30
4.5.5	Analýza lipidů na GC	31
5	Výsledky a diskuze.....	32
5.1	Stanovení produkčních vlastností biomasy u baňkových kultivací	32
5.1.1	Porovnání produkčních vlastností biomasy na médiu bez a s přidáním pěřového hydrolyzátu o C/N poměru 25	33
5.1.2	Porovnání produkčních vlastností biomasy na médiu bez a s přidáním pěřového hydrolyzátu o C/N poměru 50	46
5.2	Stanovení produkčních vlastností biomasy u fermentorové kultivace kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i>	58
6	Závěr.....	60
7	Literatura	62
8	Seznam použitých zkratk.....	65

1 ÚVOD

V dnešní době se z důvodu rozšíření průmyslu produkuje velké množství potravinářského odpadu. Z ekologických i ekonomických důvodů je však mnohem lepší tento odpad dále zpracovávat k produkci látek užitečných pro lidskou či živočišnou spotřebu.

Karotenogenní kvasinky jsou ideální volbou pro zpracovávání organických potravinářských odpadů, jelikož jsou schopny využívat tyto substráty jako zdroje živin. Odpadní živočišný tuk, kuřecí peří a další substráty mohou být pro karotenogenní kvasinky bohatým zdrojem uhlíku a dusíku. Karotenogenní kvasinky produkují metabolity (karotenoidy, mastné kyseliny, koenzym Q10 a ergosterol), jež nachází široké uplatnění v potravinářském, krmivářském a farmaceutickém průmyslu. Karotenoidy jsou látky nezbytné pro normální fungování lidského organismu. Živočiškové však tyto látky neumí syntetizovat, proto je musíme přijímat skrze potravu anebo ve formě výživových doplňků.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou eukaryotické heterotrofní mikroorganismy. Patří do říše Houby (*Fungi*). V přírodě se vyskytují buď jako jednobuněčné organismy anebo ve tvaru větvených vláken – kolonií. Díky své buněčné struktuře a schopnosti zkvašovat monosacharidy se vyskytují téměř všude. Buňky kvasinek mají kulovitý až protáhlý tvar a díky pevné buněčné stěně se jich tvar skoro nemění během jejich životního cyklu [1].

2.1.1 Rozmnožování kvasinek

Kvasinky jsou schopné se rozmnožovat dvojím způsobem: pohlavním a nepohlavním. Vegetativní rozmnožování může probíhat buď pomocí dělení nebo pomocí pučení, pohlavní pak pomocí spájení dvou mateřských buněk za vzniku spor [1].

2.1.1.1 Vegetativní rozmnožování

Při rozmnožování pomocí pučení na mateřské buňce se vytvoří pupen, který se postupně zvětšuje. Po dosažení dostatečné velikosti, se pupen odděluje od mateřské buňky, za vzniku jizvy. Podle toho, na jakém místě se pupen oddělí od mateřské buňky, můžeme rozdělit pučení na monopolární, bipolární a multipolární [1].

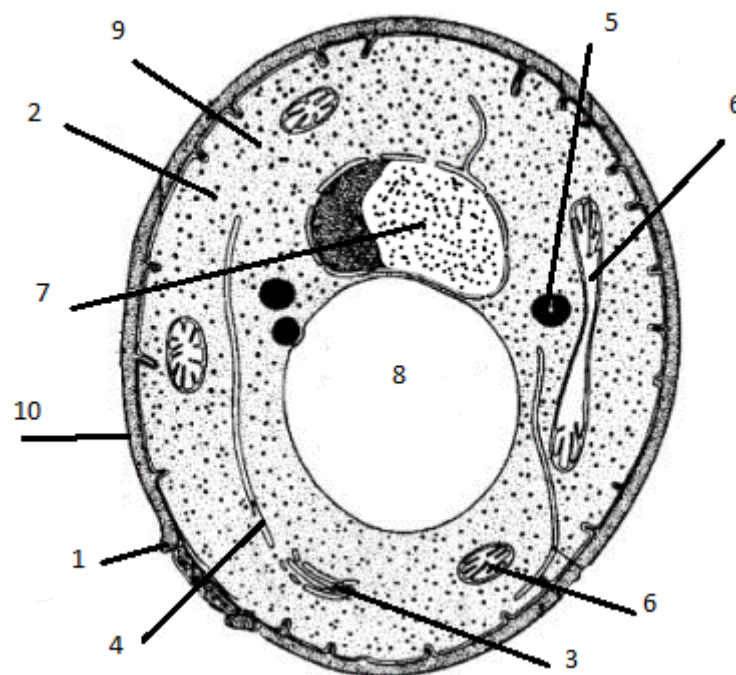
2.1.1.2 Pohlavní rozmnožování

Většina kvasinek kromě vegetativního rozmnožování má ještě rozmnožování pohlavní, při kterém vznikají spory. Při pohlavním rozmnožování spolu konjugují dvě haploidní buňky, u nichž pak dojde ke spojení jejich jader (tomuto procesu se říká karyogamie). Konjugací dvou kvasinkových buněk vznikne zygota, která následně sporuluje za vzniku ask nebo bazidií, v nichž jsou spory uloženy. Může také nastat mitotické dělení jádra a potom dojde ke vzniku spor [1].

2.1.2 Struktura buňky kvasinek

Kvasinky mají kulovitý, občas elipsoidní tvar buněk. Buňka je složena z celkem pevné buněčné stěny. Buněčnou stěnu kvasinek tvoří polysacharidy, bílkoviny, lipidy a fosfolipidy. Uvnitř buňky se nacházejí cytoplazma a organely ohraničené cytoplazmatickou membránou. Jelikož kvasinkové buňky patří do skupiny eukaryotických buněk, patří sem pro eukaryotickou buňku typické organely, například: Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum, mitochondrie a vakuoly (Obrázek 1). Buněčná stěna je pevná a elastická struktura schopná zajistit stálost tvaru buňky a odolat výraznému osmotickému tlaku. Dále zajišťuje transport živin do buňky. Přes buněčnou stěnu je rovněž zajištěn výstup odpadních produktů buňky. Cytoplazmatická membrána se nachází přímo pod buněčnou stěnou. Její hlavní funkcí je regulace pronikání živin do buňky a vylučování metabolických produktů do extracelulárního prostoru. Vnitřní prostor buňky vyplňuje cytoplazma, což je komplexní systém intracelulárních struktur a organel. V cytoplazmě probíhají nejdůležitější procesy biosyntézy a ukládá se zde genetická informace. Mitochondrie jsou kulovité nebo protáhlé intracelulární organely obsahující enzymatické systémy, zejména pro transport elektronů. Mezi funkce mitochondrií patří oxidační reakce, které jsou zdrojem energie pro syntézu ATP skrze přenos elektronů přes dýchací řetězec. Dále pak obsahuje vlastní genetickou informaci sloužící jako templát k syntéze mitochondriálních proteinů.

Ribozomy jsou ultramikroskopické granule ve formě nepravidelných kuliček, které se skládají z proteinu a RNA. Ribozomy syntetizují proteiny a enzymy. Jádro má tvar kulaté a oválné bubliny obklopené skořápkou. Funkcí jádra je ukládání a přenos genetické informace při dělení buněk. Endoplazmatické retikulum je komplexní membránová síť, která tvoří systém kanálů, jímž je zprostředkován transport v rámci intracelulárního prostoru. Golgiho aparát je nahromaděním nejmenších zploštělých tělísek spojených membránovým systémem endoplazmatického retikula. Role Golgiho aparátu zahrnuje posttranslační modifikace proteinů či produkci prekurzorů pro buněčnou stěnu. Kromě toho plní i ochrannou funkci – konzervaci a odstraňování produktů buněčné sekrece. Vakuoly zabírají centrální část buňky. Jsou naplněny buněčnou mízou, která je uzavřena v lipoproteinové membráně. Vakuoly se podílejí na osmotické regulaci a jsou místem různých redoxních procesů. Vakuoly se tvoří během stárnutí kvasinkové buňky; obsahují živiny, odpadní látky a granule rezervních látek: glykogen, trehalóza, tuk [2], [3].



Obrázek 1: Struktura kvasinkové buňky (1 – cytoplazmatická membrána, 2 – cytoplazma, 3,4 – endoplazmatické retikulum, 5 – kapky tuku, 6 – mitochondrie, 7 – jádro, 8 – vakuola, 9 – ribozomy, 10 – buněčná stěna) [4]

2.1.3 Karotenogenní kvasinky

Karotenogenní kvasinky jsou kvasinky, které akumulují ve svých buněčných strukturách lipofilní pigmenty, jimiž jsou například betakaroten, torulen aj. Pro syntézu karotenoidů je potřeba přístup světla a kyslíku [3].

2.1.3.1 Rod *Rhodotorula*

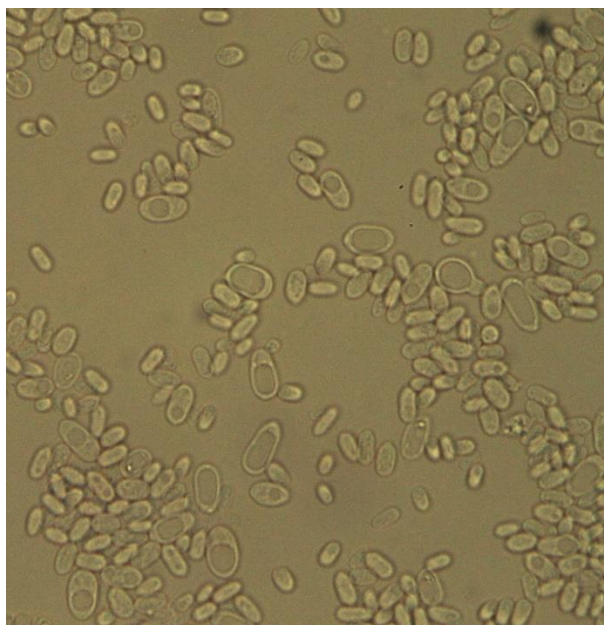
Pro tento rod jsou charakteristické kulovité a oválné buňky. Produkují lipidy, mastné kyseliny a pigmenty. Mají červenou anebo žlutou barvu. Nemají fermentační schopnosti. Jsou velmi rozšířené v půdě vodních ploch a v různých potravinách. Nejrozšířenější druh rodu *Rhodotorula* je *Rhodotorula glutinis* [3] [5].

2.1.3.2 Rod *Sporobolomyces*

Pro tento rod není typické kvašení. Mají žlutou až růžovou barvu. Buňky mají kulaté až protáhlé nebo vřetenovité. Při pučení můžou vytvářet přisedle anebo na krátkých dentikulech pupeny. Některé druhy tvoří mycelium, některé pseudomycelium. Produkují karotenoidy jako betakaroten, torulen aj. Nejvýznamnější druhy: *Sporobolomyces pararoseus* a *Sporobolomyces salmonicolor* [3] [5].

2.1.3.3 Rod *Rhodosporidium*

Pro tento rod je charakteristická žlutá, oranžová a červená barva. Nemají fermentační schopnosti. Tento rod je známý svou produkcí koenzymů Q9 a Q10. Buňky mají kulovitý tvar. Nejznámější druhy tohoto rodu jsou *Rhodosporidium toruloides*, viz Obrázek 2, *Rhodosporidium babjevae* a *Rhodosporidium fluviale* [5].



Obrázek 2: *Rhodosporidium toruloides*

2.1.3.4 Rod *Cystofilobasidium*

Kvasinky tohoto rodu nejčastěji vytvářejí kolonie oranžové, lososové až skořicové barvy. Ne-pohlavní rozmnožování probíhá pučením. Při pohlavním rozmnožování vytvářejí pravé mycelium se svorkovým spojením. Buňky mají kulovitý nebo protáhlý tvar. Zástupci tohoto rodu jsou schopny fermentace. Mezi zástupce tohoto rodu patří například *Cystofilobasidium capitatum*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* a *Cystofilobasidium macerans* [5].

2.1.3.5 Rod *Sporidiobolus*

Buňky tohoto rodu mají převážně elipsoidní nebo vejčitý tvar. Kolonie jsou vybarvené do růžové až červené barvy díky přítomnosti karotenogenních pigmentů. Vegetativní rozmnožování probíhá pučením za tvorby pseudomycelia a pravého mycelia. Sexuální rozmnožování je homotalické anebo heterotalické. Zástupce tohoto rodu jsou známy přítomnosti koenzymu Q10 ve svých buňkách. Nejsou schopny fermentovat cukry. Do tohoto rodu patří druhy *Sporidiobolus pararoseus*, *Sporidiobolus johnsonii* aj. [5].

2.2 Metabolity

Metabolity jsou produkty látkové přeměny (metabolismu). Podle účasti v lidském těle je můžeme rozdělit na primární a sekundární: *Primární metabolity* (sacharidy, bílkoviny, lipidy, nukleové kyseliny) jsou látky nezbytné pro správné fungování organismu, podílejí se na růstu, vývoji a rozmnožování. *Sekundární metabolity* se přímo nepodílejí na vývinu organismu, jsou však důležité pro jeho správné fungování. Mezi sekundární metabolity se řadí například karotenoidy [6].

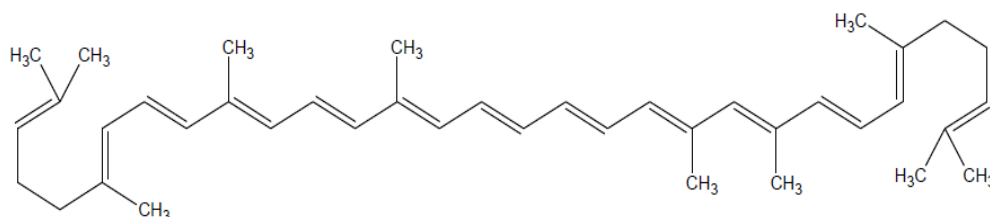
2.3 Karotenoidy

Mezi karotenoidy řadíme barviva rostlin, řas, hub a mikroorganismů. Jsou to lipofilní látky, což znamená, že jsou rozpustné v tucích, ale nejsou rozpustné ve vodě. Díky přítomnosti systému konjugovaných dvojných vazeb v jejich struktuře jsou barevné a mohou mít žlutou, oranžovou nebo červenou barvu. Tvoří barvu mnoha potravin, proto přímo souvisejí s vnímáním jejich kvality, protože barva ovlivňuje preference spotřebitelů. Díky své struktuře mají dobré antioxidační vlastnosti. Jsou přítomné v rostlinných chromoplastech, což jsou plastidy, v nichž neprobíhá fotosyntéza. Svou přítomností chrání fotosyntetický aparát před poškozením. Mají funkci absorbovat světlo a předávat ho do reakčního centra chlorofylu [7] [8].

2.3.1 Chemická struktura karotenoidů

Z chemického hlediska patří karotenoidy mezi tetraterpenoidní molekuly, skládající se z osmi pětiuhlíkatých zbytků izoprenu (jedná se tedy o oligomery izoprenu). Karotenoidové pigmenty tvoří přirozeně žlutou, oranžovou nebo červenou barvu mnoha potravin. Molekuly karotenoidů jsou tvořeny řetězcem ze 40 atomů uhlíku. Barva karotenoidů závisí na poloze a konjugaci vazeb v řetězci. V řetězci převažují trans konfigurace. Podle složení je můžeme rozdělit na 2 základní skupiny.

- a) Karoteny – karotenoidy, které mají ve svém řetězci pouze uhlík a vodík. Ve většině případů mají oranžové a červené zbarvení (např. lykopen, viz Obrázek 3).



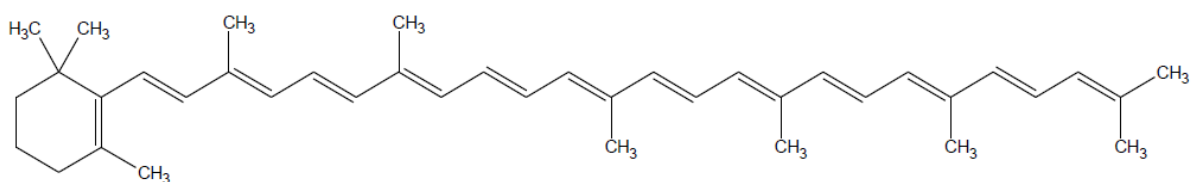
Obrázek 3: Strukturní vzorec lykopenu

- b) Xantofyly – v řetězci těchto karotenoidů je přítomen kyslík, obvykle mají žluté zbarvení (např. lutein, kantaxantin).

Podle přítomnosti cyklických částí řetězce můžeme karotenoidy rozdělit na:

- 1) Acyklické – mají lineární řetězec (lykopen).

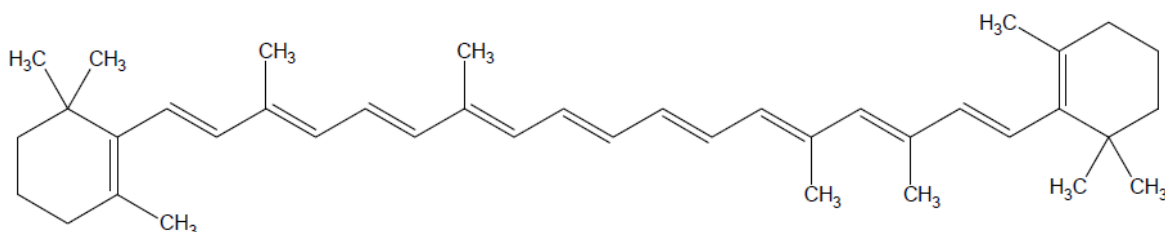
- 2) Monocyklické – řetězec je zakončen cyklickou strukturou (např. torulen, viz Obrázek 4, γ -karoten).



Obrázek 4: Strukturální vzorec torulenu

- 3) Dicyklické – řetězec obsahuje 2 cykly. (např. β -karoten viz Obrázek 5).

Karotenoidy mají řetězec s vysokým stupněm nenasycenosti, díky čemuž jsou velmi účinnými antioxidanty. Například nejlepším antioxidantem je lykopen [7] [9] [10].



Obrázek 5: Strukturální vzorec β -karotenu

2.3.2 Význam karotenoidů

První ze dvou hlavních funkcí karotenoidů je absorpce světla pro fotosyntézu, což pomáhá k efektivnějšímu využití sluneční energie. Předávají tuto energii na chlorofyl, proto se jim říká pomocné fotosyntetické pigmenty. Druhou je ochranná funkce. Přeměňují přebytečnou energii, kterou přijaly chlorofyly, na teplo. Tato funkce je velice důležitá pro rostliny, rovněž je chrání před UV zářením. Karotenoidy přeměňují barvy listů na podzim, nebo barvy ovoce a zeleniny při zranění. V buňkách karotenoidy se vážou na volné radikály a tím zabraňují mutacím nebo úplné smrti buňky. Karotenoidy, jakožto dobré antioxidanty jsou důležité pro zdravé fungování lidského organismu, hlavně jeho imunitního systému. Například při štěpení β -karotenu vznikají dvě molekuly retinolu (vitamin A) který je nezbytný pro lidský zrak a imunitní systém [11] [12].

2.4 Lipidy

Jsou důležité přírodní látky (tuky, oleje, vosky, vitaminy, hormony). Z chemického pohledu to jsou převážně estery vyšších mastných kyselin a alkoholu (nejčastěji triacylglyceroly). Obecnou charakteristikou pro všechny lipidy je hydrofobní charakter, který je způsoben nepolárním uhlovodíkovým řetězcem.

Nejvýznamnější funkce lipidů:

- Tvoří složku buněčných membrán, kde jsou ve formě membránové dvojvrstvy, která je nepropustná pro vodu.
- Rozpouštědlo pro lipofilní vitaminy A, D, E a K.

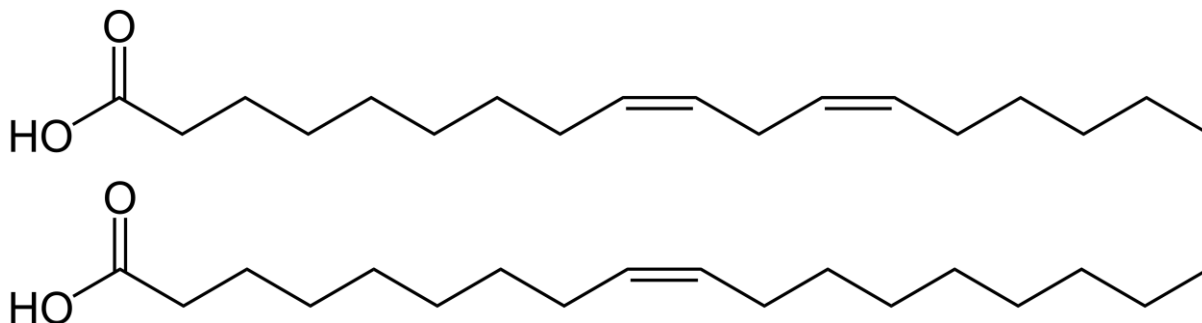
- c) Zdroj energie pro organismus
- d) Mechanicky a tepelně chrání vnitřní orgány – izolační vrstva těla
- e) Jsou součástí transportních lipoproteinů

Podle složení lze lipidy rozdělit na:

- *Jednoduché* (acylglyceroly, vosky) jsou mastné kyseliny vázané na alkohol. V případě tuků a olejů jsou mastné kyseliny vázané na glycerol, u vosků pak například na cetylalkohol či myrialkohol.
- *Složené* (sfingolipidy, glykolipidy, lipoproteiny, fosfolipidy) mají na alkohol navázanou, kromě esteru mastné kyseliny, ještě nějakou další skupinu.
 - Fosfolipidy kromě mastné kyseliny a alkoholu v jejich struktuře je obsazen zbytek kyselina fosforečné. Díky své struktuře mají polární a nepolární konec.
 - Glykolipidy na jednom svém koci mají navázaný oligo- nebo monosacharid
 - Sfingolipidy mají sfingoidní bázi součástí, které je sfingosin
- *Odvozené lipidy* (steroidy, karotenoidy, lipofilní vitaminy a prostaglandiny) jsou látky lipidické povahy, které však nemohou být svojí strukturou zařazeny mezi lipidy [13], [14], [15].

2.4.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny se 4 až 26 uhlíky. Obsahují převážně sudý počet uhlíků v řetězci, protože jsou syntetizované z dvouuhlíkatých acetyl-CoA. V živých soustavách se vyskytují převážně ve formě lipidů (vázané na alkohol) méně pak volně. Na základě přítomnosti dvojných vazby jsou rozdělené na nasycené a nenasycené. Mají amfipatickou povahu, působí jako tenzidy, jsou relativně dobře rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Podle struktury řetězce lze mastné kyseliny rozdělit na rozvětvené a nerozvětvené. Mastné kyseliny s dvojnými vazbami mohou mít cis a trans formu, a to proto, že dvojná vazba nemá osu rotace. Podle toho, zda je lidské tělo umí syntetizovat, nebo je musí přijímat skrze potravu, můžeme mastné kyseliny rozdělit na esenciální a neesenciální (viz Obrázek 6).



Obrázek 6: Strukturální vzorce kyselin olejové a palmitové

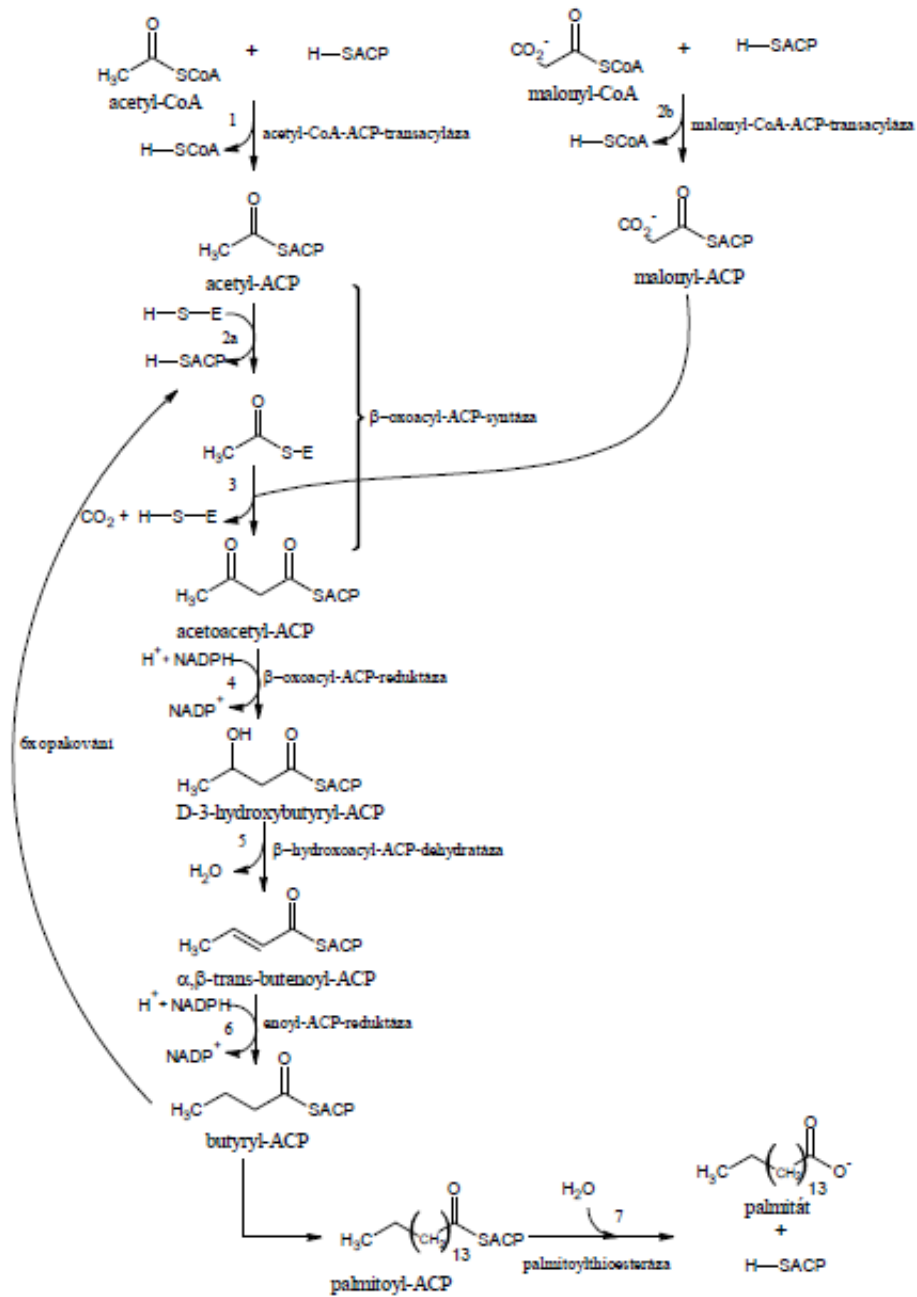
Mastné kyseliny jsou zdrojem energie pro náš organismus. Energie se získává v metabolické dráze, která je pojmenovaná beta-oxidace. Aktivace je katalyzována enzymem acyl-CoA-syntázou a je umožněna pouze za spotřeby energie z ATP. [16].

2.4.1.1 Biosyntéza mastných kyselin

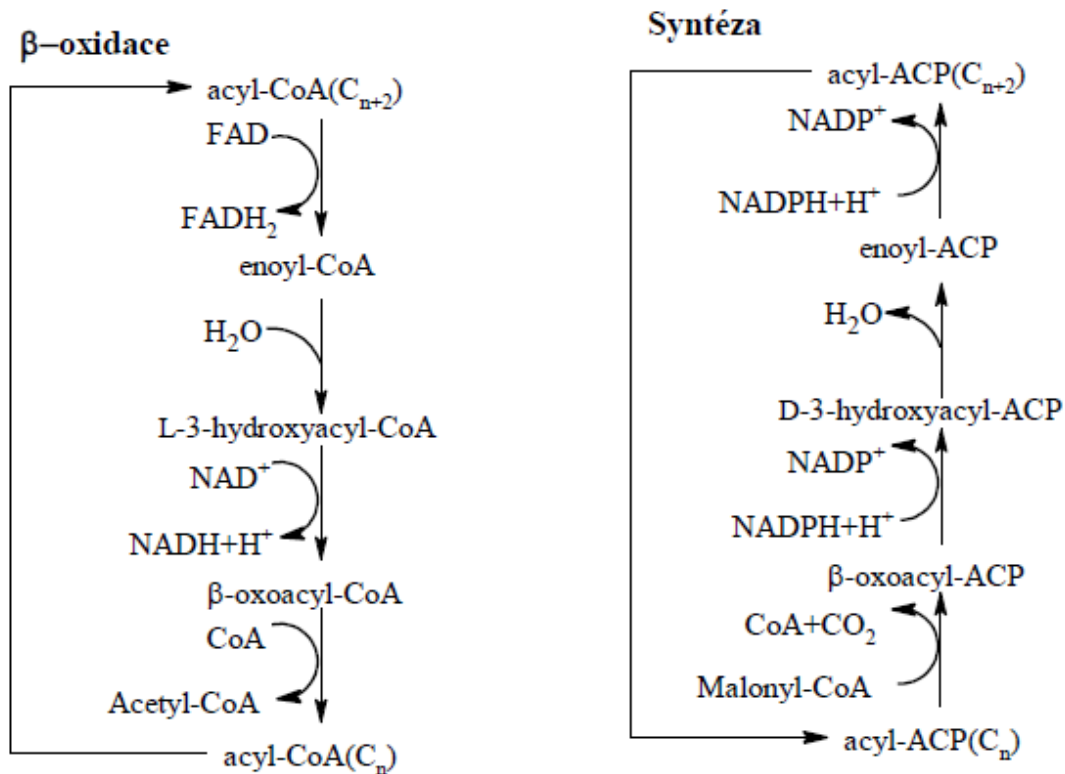
Syntéza mastných kyselin probíhá v cytoplazmě buněk, v endoplazmatickém retikulu. Syntéza mastných kyselin je složitý proces skládající se z řady reakcí jdoucích za sebou. Výchozí látkou jsou 2 molekuly acetyl-CoA. Pomocí enzymu acetyl-CoA-ACP-transacetylázy je jedna z molekul acetyl-CoA převedena na molekulu acetyl-ACP. Dále do reakce vstupuje enzym acetyl-CoA-karboxyláza, který způsobuje vazbu CO_2 na jinou molekulu acetyl-CoA a tím prodlužuje řetězec o jeden uhlík. Takto vznikne molekula malonyl-CoA která je následně pomocí enzymu malonyl-CoA-ACP-transacylázy převedena na malonyl-ACP. Jako další krok je kondenzace a dekarboxylace acetyl-ACP s molekulou malonyl-ACP za vzniku acetoacetyl-ACP. Tento reakční krok je katalyzován enzymem β -oxoacyl-ACP-syntetázou. Následně acetoacetyl-ACP je redukován na β -hydroxybutyryl-ACP pomocí enzymu β -ketoacyl-ACP-reduktázy. Následně z něho pomocí β -hydroxyacyl-dehydrogenázy vznikne α,β -trans-buteonyl-ACP. Jako další reakční krok proběhne redukce α,β -trans-buteonyl-ACP na butyryl-ACP pomocí enoyl- α,β -reduktázy. Jako výsledek těchto reakčních kroků je prodloužení řetězce o dva atomy uhlíku. Tento reakční cyklus proběhne několikrát, záleží na tom, kolik atomů uhlíků má výsledná mastná kyselina. Jako zakončení syntézy proběhne reakce, která je katalyzována acylsterázou a která přemění acyl na kyselinu odštěpením ACP a navázáním H_2O (viz Obrázek 7) [15], [17], [18], [19].

2.4.1.2 β -oxidace mastných kyselin

Odbourávání mastných kyselin probíhá v peroxizomech a mitochondriích. Za vlivu specifických enzymů dochází k postupnému štěpení uhlíkatého řetězce mastné kyseliny. Štěpení podléhá vazba mezi α a β atomy uhlíku. Schéma β -oxidace mastných kyselin je znázorněno na Obrázku 8 [18], [19].



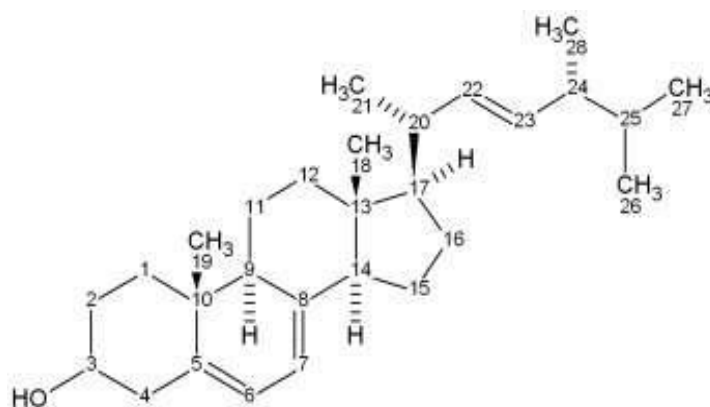
Obrázek 7: Schéma syntézy mastných kyselin, v daném případě kyseliny palmitové [19].



Obrázek 8: Schémata β -oxidace a biosyntézy mastných kyselin [20]

2.4.2 Ergosterol

Ergosterol je lipidická látka nepolární povahy (ergosta-5,7,22-trien-3-beta-ol) viz Obrázek 9, pojmenovaná „houbový sterol“ podle námele – houby, ze které byl poprvé ergosterol izolován. Ergosterol se nenachází v rostlinných ani v živočišných buňkách. Nachází se v buněčných membránách kvasinek a hub a slouží obdobně jako cholesterol v živočišných buňkách. Jelikož se vykytuje v plísniích, lze ho používat jako indikační látku při kontaminaci potravin. Ergosterol je provitaminem vitamínu D2. U kvasinek ergosterol má funkci regulátoru proteinkinázy (enzym nezbytný pro růst kvasinkových buněk) [21], [19], [22], [23].



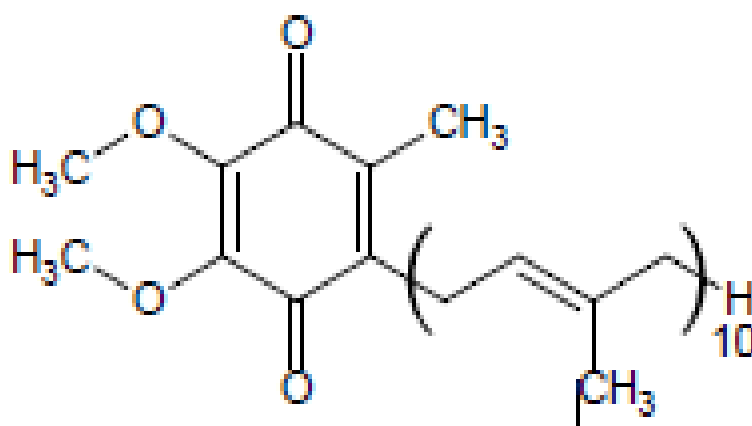
Obrázek 9: Strukturní vzorec ergosterolu [19]

2.5 Lipofilní látky

Jsou to látky, které jsou dobře rozpustné v tucích, resp. dobře mísitelné s tuky a oleji. V lidském těle to mohou být například lipidy. Někdy může být pojem lipofilní látka zaměňován za pojem hydrofobní látka (nerozpustná ve vodě).

2.5.1 Ubichinon (Koenzym Q10)

Látky, kterým se říká Koenzymy Q jsou látky, které na benzochinonovém jádru mají navázaný izoprenový řetězec. Příkladem ubichinonu je Koenzym Q10 (Obrázek 10), který má na benzochinonovém jádru navázaný izoprenový řetězec složený z 10 izoprenoidních jednotek. Koenzymy Q se využívají v dýchacím řetězci jako přenašeče vodíku a elektronů, přičemž dochází k tvorbě ATP. Za absence kyslíku přecházejí na chinoly [24].



Obrázek 10: Strukturální vzorec koenzymu Q10.

2.6 Odpadní substráty

Odpadní substráty jsou používány jako zdroj energie a živin pro růst mikroorganismů v tomto případě konkrétně kvasinek, a pro růst a produkci metabolitů. Ke kultivacím se využívají i odpadní materiály, protože jsou dobrými zdroji organického uhlíku a ostatních makro- a mikroelementů. Jedna se o skvělý způsob recyklace a použití odpadu pro další biologické a chemické účely.

2.6.1 Živočišné odpadní tuky

Živočišné tuky jsou většinou estery mastných kyselin a glycerolu. Jsou rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Jsou to produkty zpracování organické hmoty z těl zvířat. Složení živočišných tuků závisí na tom, jakou mělo zvíře potravu, na původu potravy a druhu zvířete. Pro další použití tuk nesmí být toxický a patogenní, jedině pak může být využíván jako surovina pro produkci látek, určených ke spotřebě lidmi v potravě [25].

2.6.2 Odpadní substráty při produkci karotenoidů

Při kultivaci kvasinek a následné produkci karotenoidů lze využít několika odpadních substrátů. Jedním z nich je glycerol – bezbarvá viskózní kapalina bez zápachu. Vyskytuje se v estericky vázané formě s vyššími mastnými kyselinami. Odpadní glycerol lze získat jako produkt zpracování olejů a tuků [15].

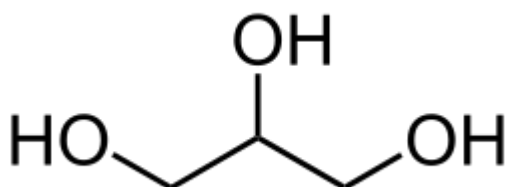
Druhým ze substrátů může být syrovátka. Je to mléčné sérum, které vzniká při odstranění kaseinu z mléka. Podle průměrného složení syrovátka obsahují zhruba 93 % vody a okolo 50 - 55 % celkové sušiny přítomné v mléce. Hlavní složkou sušiny je laktóza (5 %) Při odstranění kaseinu z mléka vznikají 2 složky: tuhá – kasein, a tekutá – syrovátka. Dříve se syrovátka likvidovala jako odpad, ale v dnešní době může být využita ke krmení zvířat nebo ke kultivaci kvasinek a následně produkci karotenoidů. Obsahují spoustu vitaminů a minerálních látek [26].

2.6.2.1 Kuřecí peří

Kuřecí peří je jedním z odpadních substrátů zkoumaných v rámci dané práce. jedná se o jeden z mnoha vedlejších odpadních produktů při zpracování kuřat pro výrobky z kuřecího masa. Při bazické úpravě kuřecího peří se uvolňuje značné množství oligopeptidů a volných aminokyselin, proto lze pérový hydrolyzát používat jako komplexní zdroj dusíku pro kultivaci kvasinek. Další důležitou složkou pérového hydrolyzátu je keratin. Značnou produkci peptidů a aminokyselin poskytuje bazický hydrolyzát kuřecího peří [27], [28], [29].

2.6.2.2 Glycerol

Glycerol (Obrázek 11) je jedním z odpadních substrátů při výrobě bionafty a také při zpracování olejů a tuku. Při výrobě bionafty je část odpadního glycerolu přečištěna na čistý glycerol, zbytek lze použít při kultivaci kvasinek. Díky své struktuře a nečistotám po zpracování obsahuje dost uhlíku, vápníku, sodíku a dalších užitečných látek pro kultivaci kvasinek. [30].



Obrázek 11: Strukturní vzorek glycerolu

2.7 Kultivace kvasinek

Kultivace kvasinek probíhá v médiích, u nichž změnami ve složení lze dosáhnout ideálních podmínek pro produkci biomasy či kýžených metabolitů. V laboratoři se používá speciálně připravených médiích. Média se skládají ze složek, esenciálních pro propagaci kvasinek. Jakékoliv médium musí obsahovat důležité organické a anorganické živiny pro růst kultury. Při kultivaci kultur se musí dodržovat sterilita prostředí a všechny potřebné podmínky, jež kvasinky pro svůj růst vyžadují. Jsou to teplota, míchaní, pH, množství kyslíku a dostatečné množství živin.

2.8 Bioreaktor

Bioreaktor je umělé vytvořené zařízení sloužící ke kultivaci mikroorganismů. Bioreaktory se aktivně využívají v průmyslu pro kultivaci kultur mikroorganismu ve větším objemu. Vnitřek bioreaktoru musí být vyroben z materiálů které žádným způsobem neinteragují s uvnitř kultivovanou kulturou. Při kultivaci je potřeba dodržovat optimální podmínky pro růst kultury. Jsou to: teplota, osmotický tlak, množství kyslíku, pH, koncentrace živin atd. Přesně proto musí být bioreaktor vybaven speciálními sondami a snímači pro sledování kultivačních podmínek. Pro sledování množství kyslíku se používá kyslíková elektroda, pro zvýšení nebo snížení jeho obsahu bioreaktor je vybaven míchadlem, u kterého lze regulovat počet otáček za minutu. Pro sledování a regulaci pH se používá pH elektroda a zásobní lahve s příslušnou kyselinou a zásadou vybavenými peristaltickými čerpadly, které tyto látky dávkuji dovnitř bioreaktoru.

Podle typu kultivace bioreaktory můžeme rozdělit na:

- Batch (vsádkový) – bioreaktor, který je veden jako uzavřená soustava.
- Fed-batch – bioreaktor, který je částečně otevřeným systémem - postupně přidáváme substrát.
- Kontinuální – bioreaktor který je otevřeným systémem, odvádíme médium a přidáváme substrát

Podle velikosti můžeme rozdělit bioreaktory na:

- Laboratorní (objem do 30 litrů)
- Čtvrtprovozní (objem od 30 do 100 litrů)
- Poloprovozní (objem od 100 do 5000 litrů)
- Provozní (objem nad 5000 litrů)

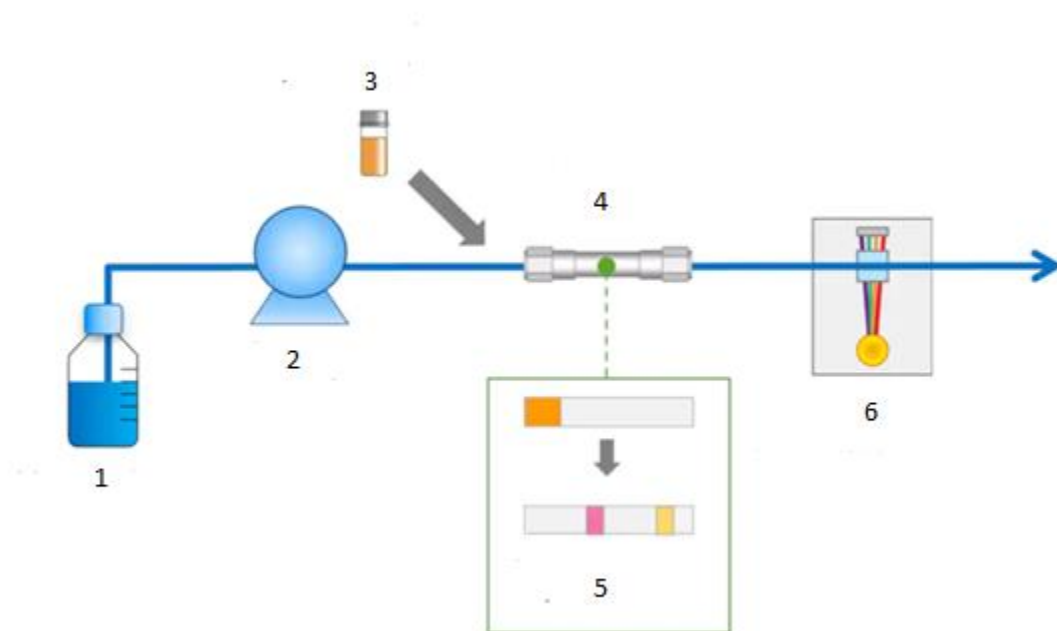
Při kultivaci v rámci našeho experimentu byl použit laboratorní bioreaktor o objemu 5 litrů, zvoleným typem kultivace se stal batch [31], [32], [33].

2.9 Plynová chromatografie (GC)

Metoda, která funguje na principu interakci vzorku neseného mobilní fází s fází stacionární. Jako mobilní fáze se používá inertní nosný plyn, který nese zkoumaný vzorek přes celý systém, a hlavně přes kolonu se stacionární fází. Kolony pro plynovou chromatografii se vyrábějí nejčastěji ze skla nebo křemíku, jedná se nejčastěji o kolony kapilární s velmi malým vnitřním průměrem a značnou délkou (desítky metrů). Díky tomu můžeme očekávat od těchto kolon kvalitní separaci při analýze vzorku. V našem případě byly vzorky detekovány plamenovým ionizačním detektorem (FID). FID funguje na principu spalování analytu ve vodíkovém plamenu uprostřed dvou elektrod. Jako výsledek spalování vzniknou iontové částice, jejichž množství je úměrné koncentraci zkoumaných látek ve vzorku [34], [35].

2.10 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Metoda, která je používána k separaci, izolaci a zjištění koncentrace látek (Obrázek 12). Vzorek je unášen mobilní kapalnou fází přes stacionární fází za zvýšeného tlaku. Separace nebo izolace látek probíhá v chromatografické koloně prostřednictvím interakcí separovaných látek se stacionární fází, k separaci dochází na základě rozdílné afinity analytu k jednotlivým fázím. K detekci jsou použity fotometrické senzory, které měří absorbanci eluátu vytékajícího z kolony [34], [36].



Obrázek 12: Schéma HPLC (1 – mobilní fáze, 2 - čerpadlo na dodávání rozpouštědla, 3 – kapalný vzorek, 4 – kolona (stacionární fáze), 5 - oddělena složka směsi, 6 - převedení množství každé složky na elektrický signál) [37]

2.11 Spektrofotometrická detekce

Spektrofotometrická detekce je typ detekce, při které se měří absorbance eluátu v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Vzhledem k velkému rozsahu vlnových délek musíme volit správný materiál, ze kterého bude vyrobena měrná cela (nádobka ve které se nachází vzorek při měření). Při průchodu světla látkou dochází k absorpci světla, děje se to kvůli excitaci elektronu v molekulových orbitalech měřené látky. Pro zdroj ultrafialového záření se používají deuteriové výbojky, naopak pro zdroj viditelného světla se používají halogenové nebo wolframové žárovky. Detekce je potom způsobena fotoelektrickými detektory. Při kvantitativním stanovení látek ve vzorku se využívá Lambert-Beerův zákon. Matematicky zápis tohoto zákona je následující:

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

kde A je absorbance, ε je molární absorpční koeficient [$l/mol \cdot cm$], který je vždycky konstantní pro dané látky a dané vlnové délky, c je molární koncentrace [mol/l], l je délka kyvety [cm], [34], [35], [36].

3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem práce je zjistit nejvhodnější podmínky kultivace kvasinek na odpadním tuku a kuřecím peří a následně zjistit při jakých podmínkách kvasinky produkuje nejvíce sledovaných metabolitů. Průběh práce byl řízen následujícími body:

- Přehledná literární rešerše zaměřená na vybrané kmeny karotenogenních kvasinek
- Optimalizace úpravy vybraných odpadních substrátů potravinářského průmyslu.
- Kultivace vybraných kmenů kvasinek na odpadních substrátech.
- Optimalizace složení produkčních médií.
- Příprava a izolace různých extraktů z kvasinkové biomasy a jejich charakterizace.
- Srovnání produkčních vlastností vybraných kmenů.
- Vyhodnocení výsledků.

4 EXPERIMENTALNI ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité ke kultivaci kvasinek

Kvasničný autolyzát, Roth (SRN)

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

Bakteriologický pepton, Duchefa Biochemie (Nizozemsko)

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

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

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

Glycerol, Penta (Česká Republika)

Izopropylalkohol p.a. Roth (SRN)

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

Odpadní tuk, Norilia (Norsko)

Kuřecí peří (ČR)

4.1.2 Chemikálie použité k hydrolýze kuřecího peří

Hydroxid draselný p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Kyselina sírová p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

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

Methanol p.a, Penta (Česká Republika)

Chloroform p.a. Penta (Česká Republika)

Ethylacetát pro HPLC, Roth (SRN)

Acetonitril pro HPLC, Chem-Lab (Belgie)

Heptadekanová kyselina, Sigma-Aldrich (SRN)

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

Methanol pro HPLC, Chem-Lab (Belgie)

Hydroxid sodný, Lach-ner (Česká Republika)

Hexan pro HPLC, Carlo ERBA (Francie)

Tris-HCl, Penta (Česká republika)

4.2 Použité pomůcky a přístroje

4.2.1 Přístrojová technika a pomůcky pro kultivaci kvasinek

Předvážky Scout, Ohaus

Analytické váhy Boeco

Autokláv Systec

Laminární box Air Stream ESCO Class II BSC

Skříňová třepačka ZWYR-D2401, Labwirt

Třepačka WiseShake SHR-2D, Witeg

Mikroskop L II ooA, Intraco Micro

GKB Color Digital CCD kamera

Lucia Image active 5.0, Laboratory Imaging spol. s r.o.

Centrifuga Z 36 HK, Hermle

Centrifuga MIKRO 120, Hettich

Lyofilizátor FreeZone 4.5 l Freeze Dry Systém, Labconco

Vakuová pumpa k lyofilizátoru Vakuumbrand

Homogenizátor BeadBug, Benchmark Scientific

Vortex Fixed Speed Vortex Mixer, VXMNFS, Ohaus

Vortex Genie 2, P-Lab

Termoblok Dry Block Heater, Ohaus

Fermentor RALF 3,5 l, BiOiNGENiRiNG

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

Stuart Block Heater SBH200D (UK)

HPLC/PDA sestava:

- Sestava Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fischer, USA)
- DAD detektorem řady Vanquish (Thermo Fischer, USA)
- Kolona Kinetex C18 EVO 150 mm, 4,6 mm, 2,6 μm (Phenomenex)
- Držák předkolony - KJ0 - 4282, ECOM (ČR)
- Předkolona - C18, AJ0 - 4287, Phenomenex

GC/FID sestava:

- TRACE 1300 TM (Thermo Fischer, USA)
- Kapilární kolona LION GC FAME, 30m, 0,25 mm, 0,20 µm (Phenomenex)

Vyhodnocovací software Chromeleon 7.2

4.3 Použité druhy kvasinek

- *Rhodotorula kratochvilovae* CCY 20-2-26
- *Rhodospiridium toruloides* CCY 62-2-4
- *Cystofilobasidium macerans* CCY 10-1-2
- *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6
- *Rhodotorula mucilaginosa* CCY 20-9-7
- *Rhodotorula mucilaginosa* CCY 19-4-25
- *Sporidiobolus metaroseus* CCY 19-6-20

4.4 Kultivace vybraných druhů kvasinek

4.4.1 Vnější podmínky

Kvasinky výše uvedených druhů jsou aerobní kmeny, proto byly kultivovány v submerzním médiu při laboratorní teplotě za neustálého míchání na reciprokých třepáčkách.

4.4.2 Inokulum I

Médium pro Inokulum I bylo vždy připraveno v množství 50 ml do 250 ml Erlenmeyerových baněk. Inokulační médium bylo připraveno podle složení uvedeného v Tabulce 1. Erlenmeyerovy baňky s médiem byly sterilovány ve vysokotlakých hrncích s otevřenými parními uzávěry po dobu 40 minut při sterilizační teplotě. Očkování kvasinkami ze zásobních Petriho misek s narostlou kulturou probíhalo v sterilním očkovacím boxu, který byl předem vysterilován ultrafialovým světlem. Očkování bylo provedeno předem vysterilovanými očkovacími kličkami. Kulturační doba pro Inokulum I trvala 24 hod.

Tabulka 1: Složení inokulačního média

Složka	Množství
Bakteriologický pepton	20 g
Kvasničný autolyzát	10 g
Glycerol	20 g
Voda (vodovodní)	1000 ml

4.4.3 Inokulum II

Médium pro Inokulum II mělo totožné složení jako médium pro Inokulum I (viz Tabulka 1) a bylo připraveno v množství 125 ml do 500 ml Erlenmeyerové baňky. Sterilizace probíhala stejným způsobem jako u média pro Inokulum I. Inokulace probíhala v poměru 1 obj. díl inokula I na 5 obj. dílu média pro inokulum II. Kultivace inokula II trvala 24 hodin.

4.4.4 Produkční média

Média se skládala ze dvou složek: první anorganická, jež byla společná pro všechna média (viz Tabulka 2), a druhá organická, která obsahovala specifický organický substrát (viz Tabulka 3, 4, 5, 6). Média byla připravována v objemech 50 ml. Inokulace 50 ml médií probíhala přidáním inokula II přímo do produkčního média v objemovém poměru 1 díl inokula II ku 5 dílům produkčního média. Kultivace kvasinek v produkčních médiích probíhala 96 hodin.

Tabulka 2: Společný anorganický základ všech produkčních médií

Složka	Množství
KH ₂ PO ₄	4 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,696 g
Voda (vodovodní)	1000 ml

Tabulka 3: Specifický anorganický a organický substrát všech produkčních médií pro objem 1000 ml a C/N 25 (množství uhlikatého substrátu (C) v poměru ke množství dusíku (N) v médiu).

Složka	GLY (kontrola)	Tuk 100%	Tuk + 10% GLY	Tuk + 25% GLY	GLY + P
Tuk (g)	0	17,66	15,89	13,24	0
Glycerol (g)	46,26	0	4,63	11,56	46,26
Močovina (g)	1,81	1,81	1,81	1,81	0
Péřový hydrolyzát (ml)	0	0	0	0	80

Tabulka 4: Specifický anorganický a organický substrát všech produkčních médií pro objem 1000 ml a C/N 50 (množství uhlikatého substrátu (C) v poměru ke množství dusíku (N) v médiu).

Složka	GLY (kontrola)	Tuk 100%	Tuk + 10% GLY	Tuk + 25% GLY	GLY + P
Tuk (g)	0	35,31	31,78	26,49	0
Glycerol (g)	92,51	0	9,25	23,13	92,51
Močovina (g)	1,81	1,81	1,81	1,81	0
Péřový hydrolyzát (ml)	0	0	0	0	80

Pro porovnání jednotlivých médií a jednotlivých C/N poměrů bylo zvoleno produkční médium, kde zdroj dusíku (močovina) byla ve všech médiích, kromě kontrolního, nahrazena péřovým hydrolyzátem. Složení média ukazují Tabulka 5 a 6.

Tabulka 5: Porovnávací médium s nahrazeným zdrojem dusíku ve všech produkčních médiích pro objem 1000 ml a C/N 25 (množství uhlíkatého substrátu (C) v poměru ke množství dusíku (N) v médiu).

Složka	GLY (kontrola)	Tuk 100% + P	Tuk + 10% GLY + P	Tuk + 25% GLY + P	GLY + P
Tuk (g)	0	17,66	15,89	13,24	-
Glycerol (g)	46,26	0	4,63	11,56	46,26
Močovina (g)	1,81	0	0	0	0
Péřový hydrolyzát (ml)	0	80	80	80	80

Tabulka 6: Porovnávací médium s nahrazeným zdrojem dusíku ve všech produkčních médiích pro objem 1000 ml a C/N 50 (množství uhlíkatého substrátu (C) v poměru ke množství dusíku (N) v médiu).

Složka	GLY (kontrola)	Tuk 100% + P	Tuk + 10% GLY + P	Tuk + 25% GLY + P	GLY + P
Tuk (g)	0	35,31	31,78	26,49	0
Glycerol (g)	92,51	0	9,25	23,13	92,51
Močovina (g)	1,81	0	0	0	0
Péřový hydrolyzát (ml)	0	80	80	80	80

4.4.5 Hydrolýza odpadního kuřecího peří

Ke kultivaci karotenogenních kvasinek byl použit bazický hydrolyzát kuřecího peří.

4.4.5.1 Bazický hydrolyzát

Navážené množství (80 g) kuřecího peří bylo rozpuštěno v 800 ml 1M NaOH. Následně byl hydrolyzát vysterilován v hrnci při sterilační teplotě. Bazický hydrolyzát měl pH kolem 14.

4.4.6 Fermentor

4.4.6.1 Podmínky

Kultivace byla provedena v laboratorním fermentoru o objemu 3,5 l, který byl naplněn 2 l produkčního média. Po přidání kultury o objemu 200 ml výsledný objem média činil 2,2 l. Před kultivací byl fermentor vysterilován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Po zapojení fermentoru bylo upraveno pH na hodnotu vhodnou pro kultivaci. Hodnota pH byla sledovaná pomocí pH elektrody a ustálena pumpováním 10% hydroxidu draselného a kyseliny sírové prostřednictvím peristaltických čerpadel napojených na zásobníky výše uvedených látek.

4.4.6.2 Příprava produkčního média

Jako produkční médium pro kultivaci ve fermentoru bylo zvoleno médium se 100% glycerolu s přidáním péřového hydrolyzátu jako zdroje dusíku. Zmíněné médium bylo vybráno na základě nejlepších produkčních výsledků zjištěných po analýze vzorku. Pro kultivaci byl zvolen C/N poměr 50. Přesnější složení produkčního média viz Tabulka 7. Po navážení všech složek, uvedených v Tabulce 7 byl objem média doplněn vodovodní vodou na 2000 ml.

Tabulka 7: Složení produkčního média (2000 ml) pro kultivace ve fermentoru

Složka	Množství
KH ₂ PO ₄	8 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,392 g
Glycerol (g)	92,51 g
Péřový hydrolyzát	160 ml

4.4.6.3 Kultivace a odběry

Kultivace trvala 48 h a v průběhu byly odebírány vzorky pro analýzu. Pokaždé bylo odebráno 15 ml média, 5 ml na proplachování odběrového zařízení a 10 ml pro analýzu. Vzorky byly odebírány do 15 ml plastových zkumavek, ve kterých ihned byla biomasa zpracována. Odběry probíhaly v několika časových intervalech: 0 h, 3h, 5h, 24 až 144h.

4.5 Zpracování biomasy

4.5.1 Uskladnění vzorků a stanovení koncentrace biomasy

Z narostlých produkčních médií bylo odebráno 40 ml kultury a přelito do centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml. Následně byly zkumavky se vzorky odstředěny při 7000 ot/min po dobu 3 minut. Supernatant byl slit, k obsahu zkumavky bylo přidáno 20 ml destilované vody, obsah zkumavky byl protřepán na vortexu a následně opět zcentrifugován za stejného nastavení centrifugy. Po odstranění supernatantu byla získána biomasa s minimálním obsahem vody, která následně byla uchovávána v mrazicím boxu po dobu několika hodin při teplotě -80 °C. Po úplném zmrazení vzorku byly zkumavky dány do lyofilizátoru a lyofilizovány do úplného odstranění vody z biomasy (cca 24 hodin). Následně byla biomasa ze zkumavek zvážena na analytických vahách a byla stanovena koncentrace biomasy v g/l.

4.5.2 Extrakce pro HPLC analýzu

Na začátku na analytických vahách bylo zváženo 10-20 mg biomasy do plastových šroubovacích vialek o objemu 2 ml. K zamraženému vzorku biomasy ve zkumavce byla přidána destilovaná voda (1 ml) a směs byla nechána hydratovat po dobu 25-30 min. Poté byla biomasa zcentrifugována při 12 000 ot/min po dobu 3 minut a supernatant byl vylit. K sedimentu bylo přidáno cca 1 ml skleněných kuliček a 1 ml methanolu p.a. kvality. Následně byly vialky protřepány na dezintegrátoru po dobu 1 minuty. Po úplném rozmělnění biomasy byl obsah vialek kvantitativně přelit do 15ml zkumavek. Následně bylo přidáno 2 ml chloroformu p.a. kvality a zkumavky byly umístěny na 10 minut na multipoziční vortex. Po protřepání byl k obsahu zkumavek přidán 1 ml destilované vody a zkumavky znovu byly umístěny na multipoziční vortex po dobu 10 minut.

V dalším kroku byly zkumavky zcentrifugovány při 4500 ot/min po dobu 1 minuty pro lepší rozdělení fází. Spodní (chloroformová) fáze byla odpipetovaná do skleněné šroubovací zkumavky a chloroform byl odpařen pomocí dusíku na termobloku vyhřátém na 45 °C. Odparek byl rozpuštěn ve 2 ml směsi rozpouštědel pro analýzu na HPLC (acetonitril:ethylacetát v poměru 1:2). Následná směs byla přefiltrována přes PTFE filtr do šroubovací vialky. Takto připravený vzorek byl zanalyzován.

4.5.3 Analýza vzorků metodou HPLC/PDA

Vzorky byly analyzované na HPLC sestavě značky Thermo Fischer Scientific, byla použita kolona kinetex EVO C18 o rozměrech 150x4,6x2,6. Eluce probíhala v gradientovém módu o průtoku mobilní fáze 1,2 ml/min, doba analýzy činila 25 minut. Složení mobilních fází (A,B) je uvedeno v Tabulce 8. Změna gradientu mobilní fáze na koloně je uvedena v Tabulce 9. Detekce probíhala na PDA detektoru při vlnových délkách 450 nm a 285 nm. Při vlnové délce 450 nm byly detekovány karotenoidy a při vlnové délce 285 nm byly detekovány ubichinon a ergosterol. Identifikace a kvantitativní stanovení výsledku bylo provedeno na základě předem naměřených standardů a jejich kalibračních křivek. Vyhodnocení pak probíhalo v programu Chromeleon.

Tabulka 8: Složení mobilních fází pro HPLC.

Mobilní fáze	Složka	obj. díly
A	Acetonitril	84
	100mM trisHCl pufr o pH 8	14
	Methanol	2
B	Methanol	60
	Ethylacetát	40

Tabulka 9: Změna gradientu mobilní fáze vyjádřená v časových intervalech.

Čas analýzy [min]	MF A [%]	MF B [%]
0	100	0
13	0	100
19	0	100
20	100	0
25	100	0

4.5.4 Transesterifikace a extrakce mastných kyselin pro GC

Do krimpovacích vialek bylo naváženo 10–20 mg biomasy a přidáno 1,8 ml transesterifikační směsi (složení směsi viz Tabulka 10). Připravené vialky se směsí byly zakrimpovány a vloženy do termobloku vyhřátého na 85 °C, kde byly inkubovány po dobu 2 hodin. Po inkubaci byly vialky vyjmuty z termobloku a ponechány k vychladnutí na okolní teplotu. Obsah krimpovacích vialek se po vychladnutí vylil do 5 ml vialek, do nichž byl předem napipetováno 0,5 ml 0,5M vodného roztoku hydroxidu sodného a 1 ml hexanu HPLC kvality.

Nově vzniklá směs byla intenzivně protřepána na multipozičním vortexu po dobu 10 minut a po oddělení fází bylo z horní hexanové fáze odpipetováno 0,1 ml do vialek se závitkem pro GC. Obsah vialek byl doplněn 0,9 ml hexanu. Vialky byly uzavřeny víčkem se septem pro GC a obsah byl analyzován na GC.

Tabulka 10: Složení transesterifikační směsi.

Složka	Koncentrace	Rozpouštědlo
Kyselina sírová	15 %	Methanol
Kyselina heptadecylová	0,5 mg/ml	

4.5.5 Analýza lipidů na GC

Vzorky byly zanalyzované na plynovém chromatografu Thermo Scientific TRACETM Gas Chromatograph, s autosamplerm Thermo Scientific AI 1310, automatickým dávkovačem se splitterem. Pro analýzu byla použita kolona LION GC-FAME o rozměrech 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m a plamenově ionizační detektor (FID). Analýza probíhala za těchto podmínek:

- 1) Teplota injektoru 240 °C
- 2) Poměr děliče toku 10
- 3) Mobilní fáze – vodík o stálém průtoku 1 ml/min
- 4) Teplota na detektoru 240 °C s průtoky plynů 350 ml/min u vzduchu, 35 ml/min u vodíku a 30 ml/min u dusíku
- 5) Objem nástřiku vzorku 1 μ l
- 6) Teplotní program: 80 °C udržováno 1 minutu ($t_R=1$ min), poté zvýšení teploty na 140 °C s gradientem 15 °C/min ($t_R=5$ min), následované dalším zvýšením na 190 °C s gradientem 3 °C/min ($t_R=21,7$ min), dále zvýšení na teplotu 260 °C s teplotním gradientem 25 °C/min a udržením teploty po dobu 1 minuty ($t_R=25,5$ min); celková doba analýzy 25,5 minut

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Stanovení produkčních vlastností biomasy u baňkových kultivací

Hlavním úkolem baňkových kultivací byla optimalizace složení produkčních médií, C/N poměrů, a hlavně vybrání kmenu, který by poskytl nejlepší výsledky a produkční vlastnosti na daném typu média. Pro porovnání byly zvoleny 2 typy média. Rozdíl ve složení spočíval v produkčních médiích, kde jedna sada měla jako zdroj dusíku močovinu a druhá sada bazický péřový hydrolyzát. Složení jednotlivých médií je popsáno v Tabulce 11.

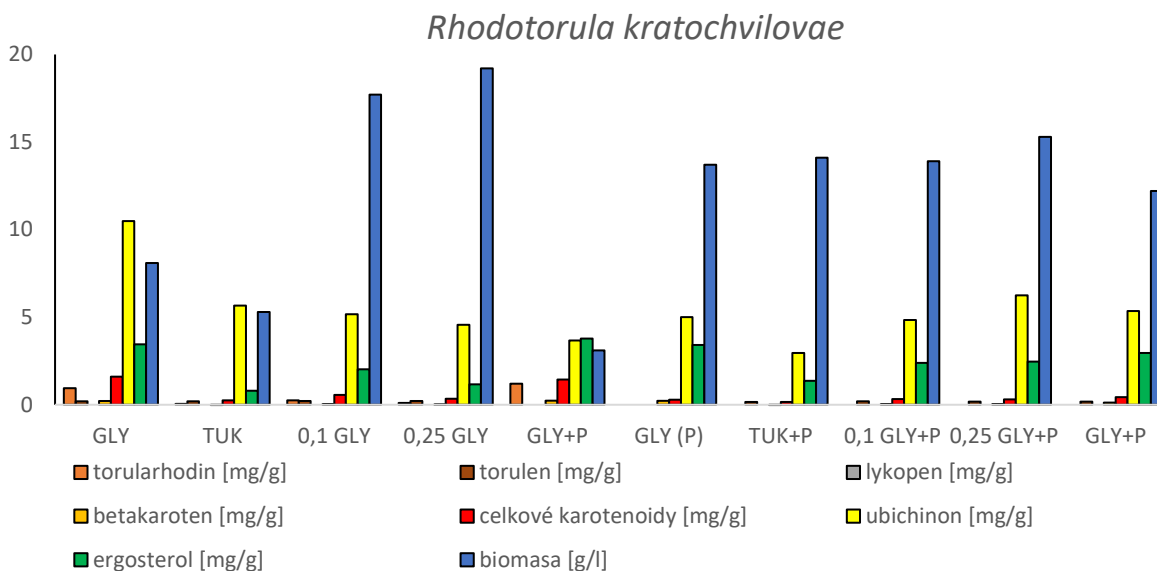
Tabulka 11: Použita média

Specifická složka	Médium	Zkratka
Žádná	Glycerol (kontrolní)	GLY
	Kuřecí tuk 100%	TUK
	Kuřecí tuk + 10% Glycerol	0,1GLY
	Kuřecí tuk + 25% Glycerol	0,25GLY
	Glycerol + péřový hydrolyzát	GLY+P
Péřový Hydrolyzát	Glycerol(kontrolní)	GLY(P)
	Kuřecí tuk 100% + péřový hydrolyzát	TUK+P
	Kuřecí tuk + 10% Glycerol + péřový hydrolyzát	0,1GLY+P
	Kuřecí tuk + 25% Glycerol + péřový hydrolyzát	0,25GLY+P
	Glycerol + péřový hydrolyzát	GLY+P

Množství biomasy bylo stanoveno podle postupu v experimentální části. Dále byly stanoveny jednotlivé metabolity pomocí HPLC a GC. Prostřednictvím HPLC byly stanoveny karotenoidy, ubiquinon a ergosterol. Pomocí GC bylo stanoveno množství a složení mastných kyselin ve vzorcích.

5.1.1 Porovnání produkčních vlastností biomasy na médiu bez a s přidáním péřového hydrolyzátu o C/N poměru 25

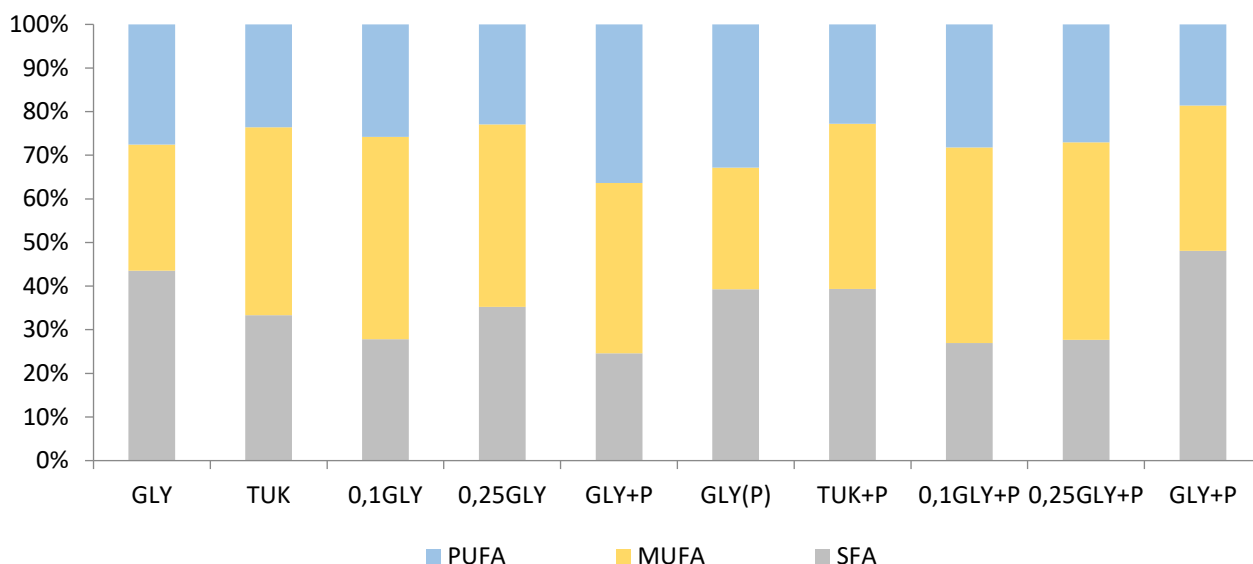
5.1.1.1 Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula kratochvilovae*



Graf 1: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na typu média

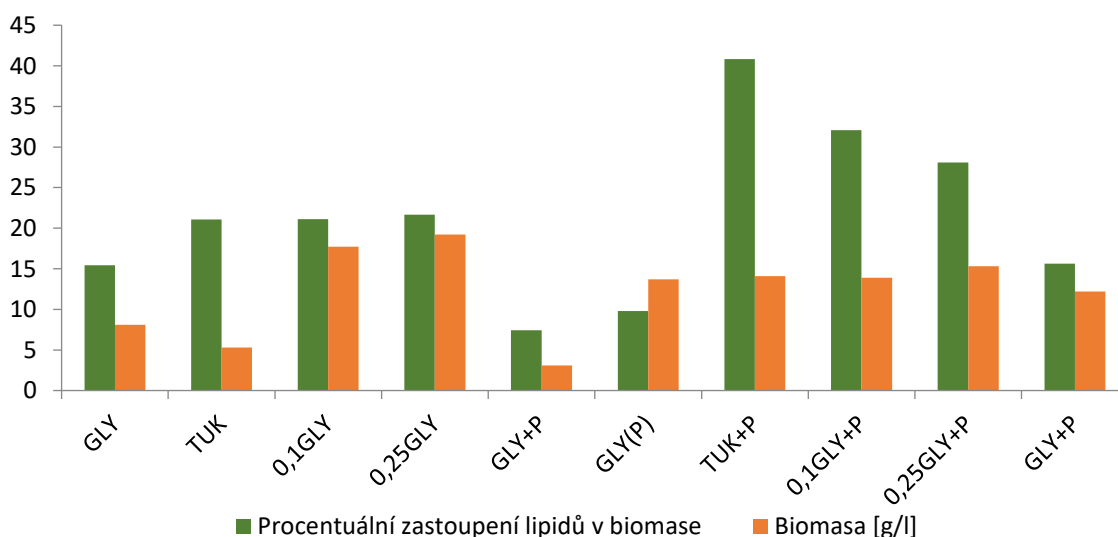
Z Grafu 1 můžeme usoudit, že největší produkci biomasy (19,2 g/l) měl daný kmen při kultivaci na médiu s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 25:75 bez přidavku péřového hydrolyzátu jako zdroje dusíku. Naopak nejmenší produkci biomasy (3,1 g/l) na glycerolovém médiu s přidavkem péřového hydrolyzátu.

Celkové karotenoidy měly nejvyšší hodnotu (1,6 mg/g biomasy) na Glycerolovém médiu bez přidavku péřového hydrolyzátu, kde také můžeme sledovat nevyšší produkci ubichinonu (10,5 mg/g biomasy), druhou největší hodnotu produkce celkových karotenoidů (1,4 mg/g biomasy) můžeme pozorovat na glycerolovém médiu s přidavkem péřového hydrolyzátu. Také lze vidět, že produkce ergosterolu stoupala s klesající koncentrací kuřecího tuku. Přídavek péřového hydrolyzátu měl za následek stabilnější produkci biomasy na všech typech médií oproti médiím bez přidavku hydrolyzátu.



Graf 2: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase

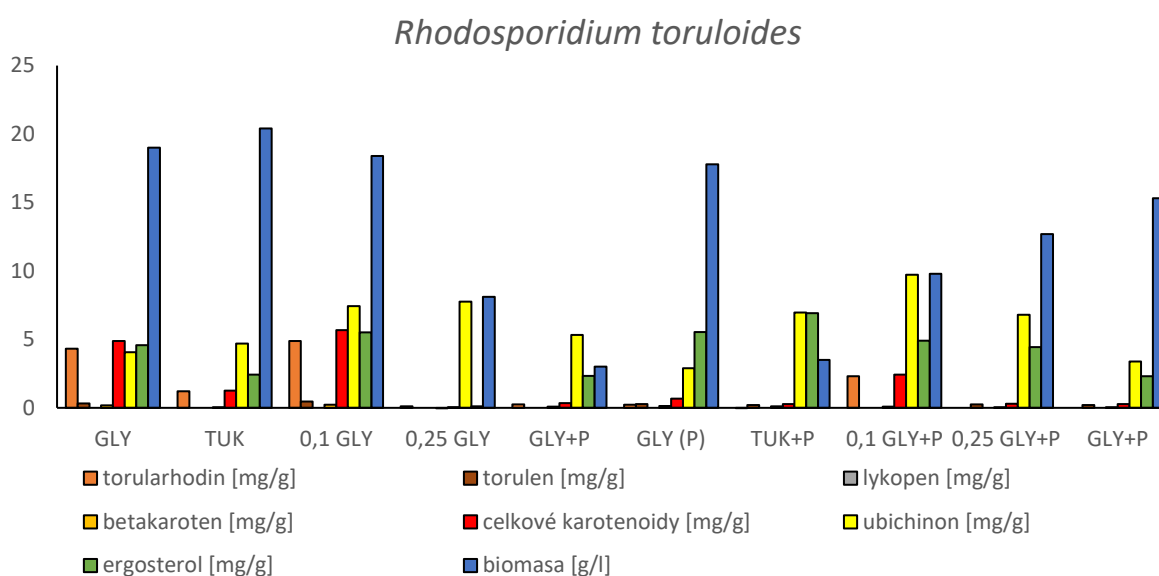
Na Grafu 2 můžeme sledovat zastoupení jednotlivých typu mastných kyselin v biomase. Nejmenší produkci nasycených mastných kyselin (dále SFA) vykazoval daný kmen kvasinek na glycerolovém médiu s přidavkem pěřového hydrolyzátu (24,6 %) a na médiu s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 10:90 s přidavkem pěřového hydrolyzátu (26,9 %). Největší zastoupení polynenasycených (dále PUFA) mastných kyselin měl daný kmen na glycerolovém médiu s přidavkem pěřového hydrolyzátu (36,4 %), který zároveň měl značné zastoupení mononenasycených (dále MUFA) mastných kyselin (39,0 %). Největší akumulace MUFA byla pozorována při kultivaci na médiu s 90% zastoupením tuku jako uhlíkatého substrátu bez přidavku pěřového hydrolyzátu, s hodnotou 46,4 %.



Graf 3: Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase

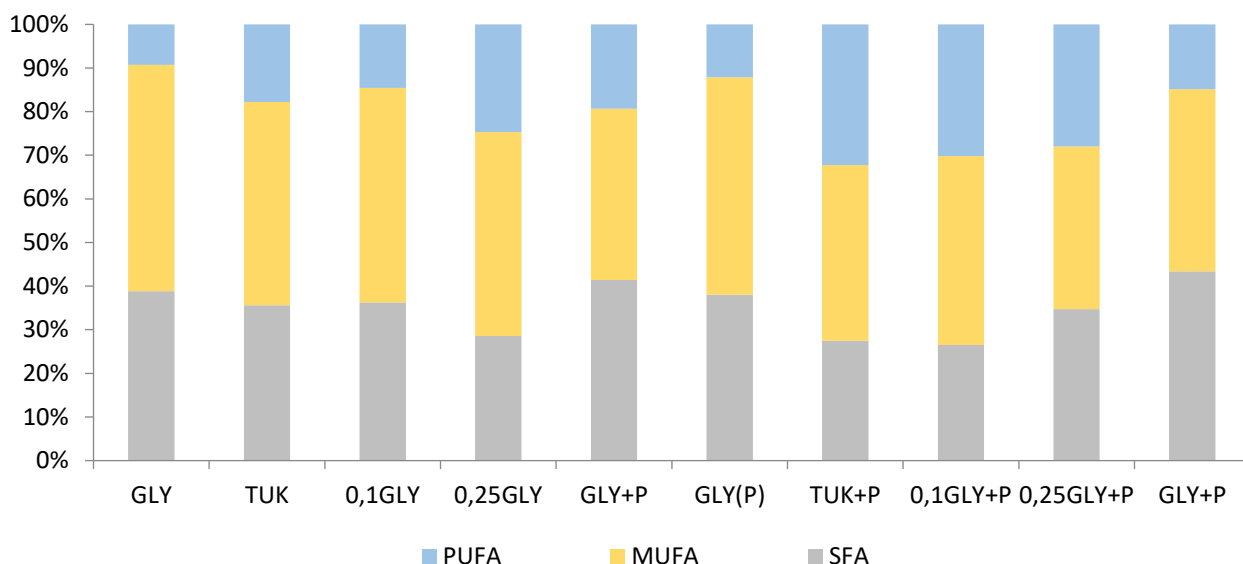
Graf 3 nám ukazuje procentuální zastoupení lipidů v biomase. Z grafu můžeme pozorovat, že největší zastoupení lipidů (40,8 %) měl tento kmen na tukovém médiu s přidavkem pěřového hydrolyzátu. Naopak nejmenší hodnoty nám vykazovaly kultivace na médiích s glycerolovým základem. U druhé sady médií (s přidavkem pěřového hydrolyzátu) můžeme vidět klesající trend s klesající koncentrací kuřecího tuku v médiu. Dále lze vidět trend snížení procentuálního zastoupení lipidů v biomase s klesající koncentrací kuřecího tuku, který můžeme pozorovat pouze na médiích s přidavkem pěřového hydrolyzátu.

5.1.1.2 Produkční vlastnosti kmene *Rhodosporidium toruloides*



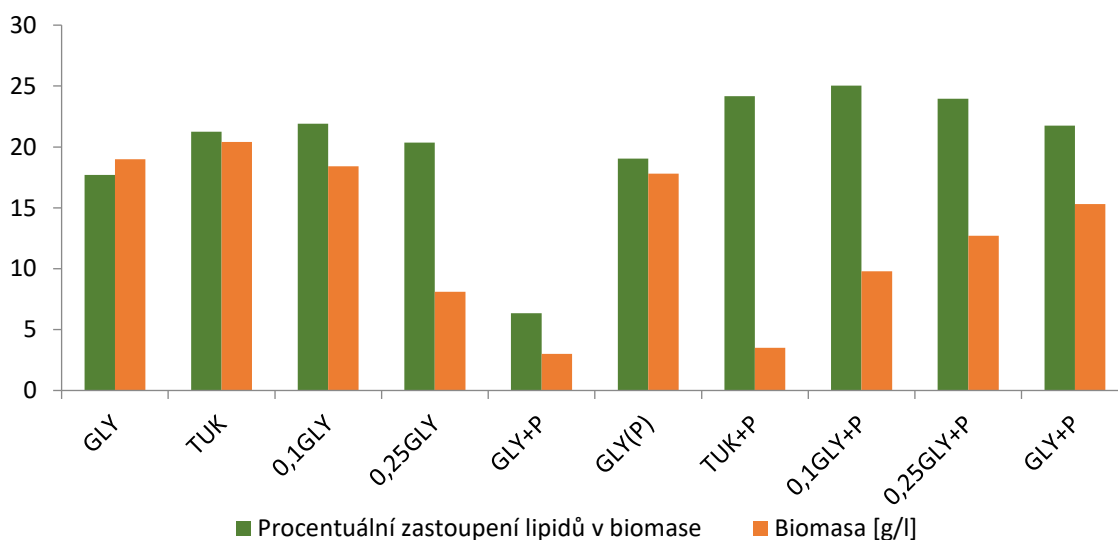
Graf 4: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na typu média

Na Grafu 4 můžeme vidět, že největší narůst biomasy (20,4 g/l) měl daný kmen na médiu s kuřecím tukem bez přidavku pěřového hydrolyzátu. Co se týče celkových karotenoidů, tak největší produkci (5,7 mg/g biomasy) měl daný kmen na médiu s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 10:90 bez přidavku pěřového hydrolyzátu. Koncentrace torularhodinu klesá s klesající koncentrací kuřecího tuku na médiích s přidavkem pěřového hydrolyzátu. Největší produkci ubichinonu (9,7 mg/g biomasy) produkoval daný kmen na médiu s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 10:90 s přidavkem pěřového hydrolyzátu.



Graf 5: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase

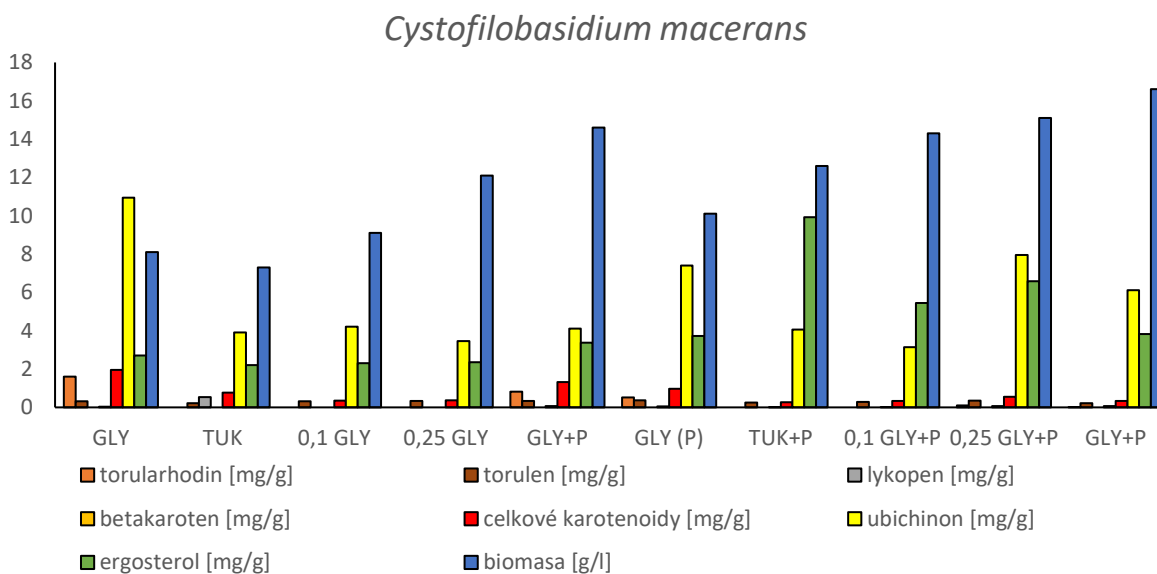
Z Grafu 5 můžeme posoudit, že největší zastoupení PUFA (32,2 %) měl daný kmen na tukovém médiu s přidavkem pérového hydrolyzátu, zároveň na tomto typu média bylo velké zastoupení MUFA (40,3 %). Zastoupení PUFA klesalo s klesající koncentrací kuřecího tuku v médiích. Nejmenší zastoupení PUFA vykazoval daný kmen na glycerolovém médiu s a bez přidavku pérového hydrolyzátu, ovšem za největších zastoupení SFA. Média s přidavkem pérového hydrolyzátu vykazovaly mnohem větší procentuální zastoupení PUFA a MUFA.



Graf 6: Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase

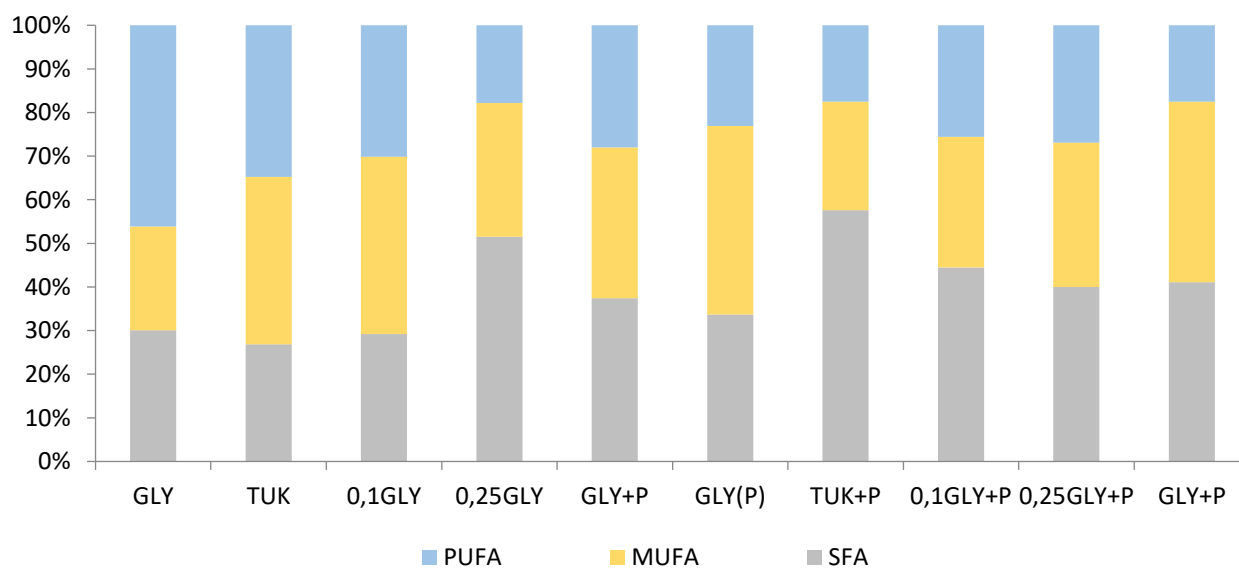
Z Grafu 6 můžeme posoudit, že biomasa kultivovaná na médiích s přidavkem pérového hydrolyzátu měla větší zastoupení celkových lipidů, ale naopak menší produkci biomasy. Se snížením koncentrace kuřecího tuku stoupala produkce biomasy na médiích s přidavkem pérového hydrolyzátu. U první série (bez přidavku pérového hydrolyzátu) lze pozorovat opačný trend, kde se zvyšující se koncentrací kuřecího tuku v médiu roste produkce biomasy.

5.1.1.3 Produkční vlastnosti kmene *Cystofilobasidium macerans*



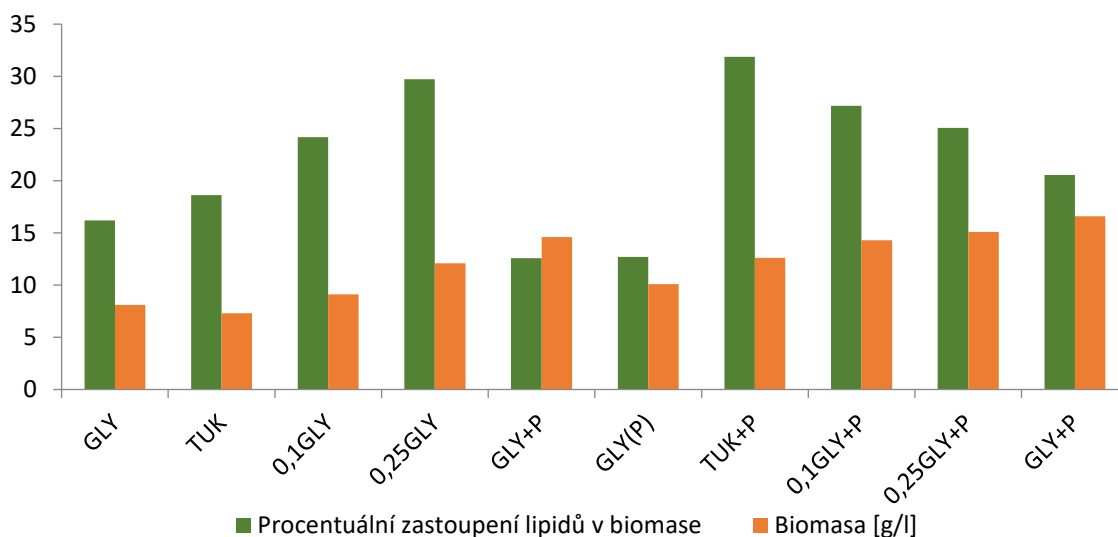
Graf 7: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na typu média

Z Grafu 7 plyne, že produkce biomasy stoupala s klesající koncentrací kuřecího tuku na médiích bez přídavku pérového hydrolyzátu. Na médiích s přídavkem pérového hydrolyzátu můžeme vidět podobný trend. Největší produkci ubichinonu (10,9 mg/g biomasy) měl daný kmen na glycerolovém médiu. Daný kmen nevykazuje velkou produkci celkových karotenoidů, avšak vykazuje značnou produkci ubichinonu na všech typech médií. Média na kuřecím tuku s přídavkem pérového hydrolyzátu měla větší produkci ergosterolu než média bez přídavku pérového hydrolyzátu.



Graf 8: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase

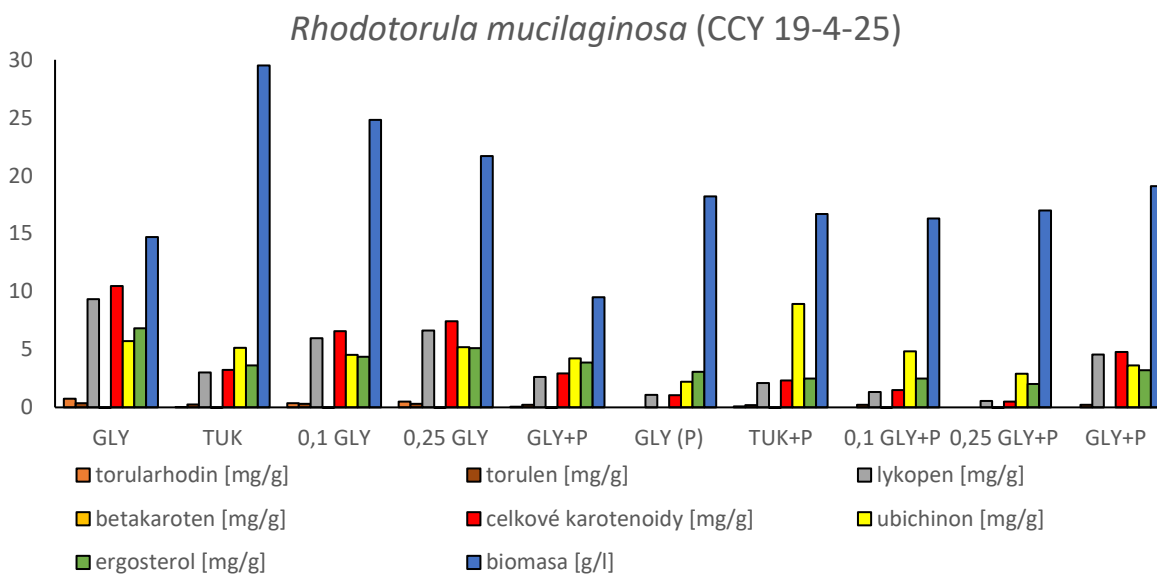
Z Grafu 8 plyne že největší zastoupení PUFA (46,1 %) měl daný kmen na glycerolovém médiu bez přídavku pérového hydrolyzátu. Procentuální zastoupení PUFA klesalo s klesající koncentrací kuřecího tuku na médiích bez přídavku pérového hydrolyzátu. Největší zastoupení SFA (57,6 %) měl daný kmen na médiu s kuřecím tukem s přídavkem pérového hydrolyzátu. U médií s přídavkem pérového hydrolyzátu klesalo procentuální zastoupení s klesající koncentrací kuřecího tuku.



Graf 9: Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase

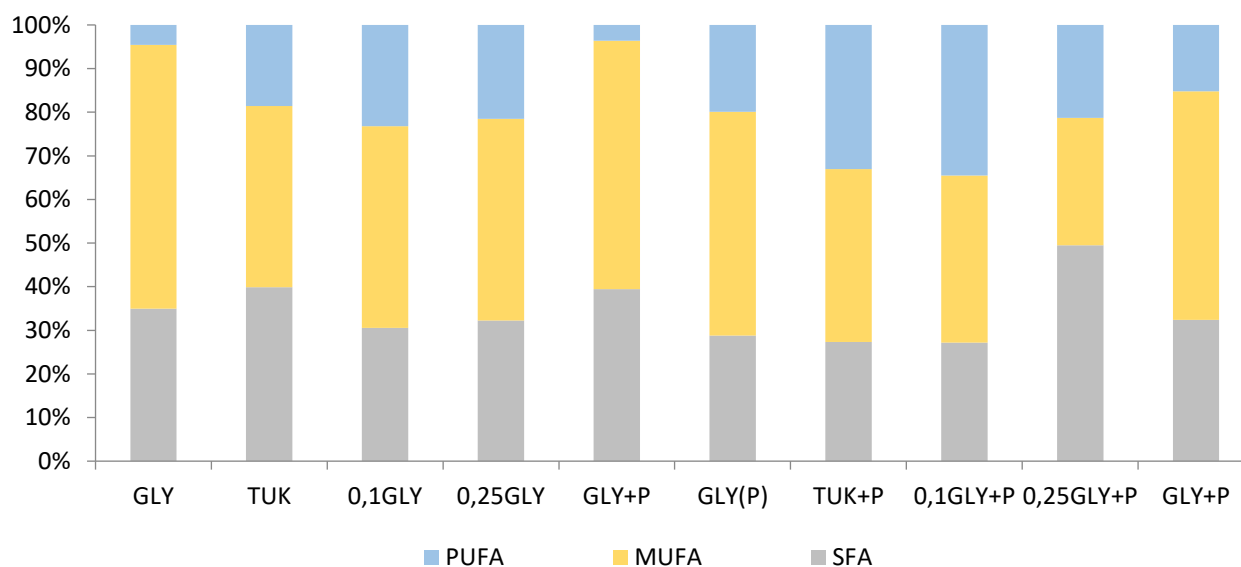
Na Grafu 9 můžeme vidět, že zastoupení lipidů v biomase stoupalo s klesající koncentrací kuřecího tuku na médiích bez přídavku pérového hydrolyzátu, a naopak klesalo s klesající koncentrací kuřecího tuku na médiích s přídavkem pérového hydrolyzátu. Největší zastoupení lipidů v biomase (29,7%) měl daný kmen na médiu s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 25:75 bez přídavku pérového hydrolyzátu a na médiu s kuřecím tukem s přídavkem pérového hydrolyzátu (31,9 %).

5.1.1.4 Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 19-4-25)



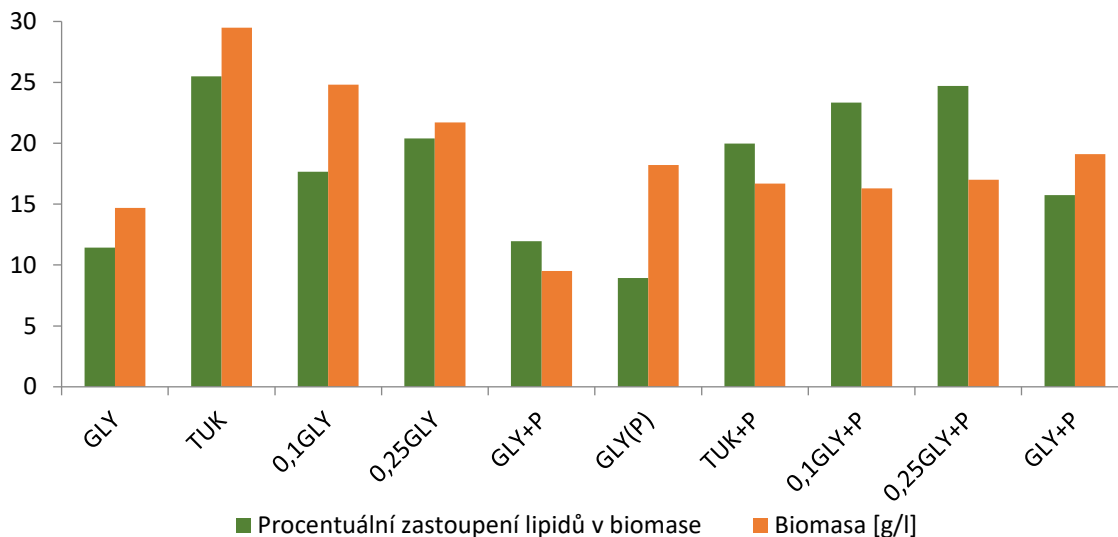
Graf 10: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na typu média

Z Grafu 10 můžeme usoudit, že produkce biomasy klesala s klesající koncentrací kuřecího tuku na médiích bez přidavku pěřového hydrolyzátu. Produkce celkových karotenoidů byla značně větší na médiích bez přidavku pěřového hydrolyzátu než na médiích s přidavkem pěřového hydrolyzátu. Daný kmen vykazoval větší produkci lykopenu oproti kmenům již zmiňovaným. Celkově lepší výsledky daný kmen vykazoval na médiích bez přidavku pěřového hydrolyzátu. U médií bez přidavku pěřového hydrolyzátu můžeme sledovat přibližně stejnou produkci ubichinonu. Naopak u médií s přidavkem pěřového hydrolyzátu lze pozorovat klesající trend v produkci ubichinonu s klesající koncentrací kuřecího tuku.



Graf 11: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase

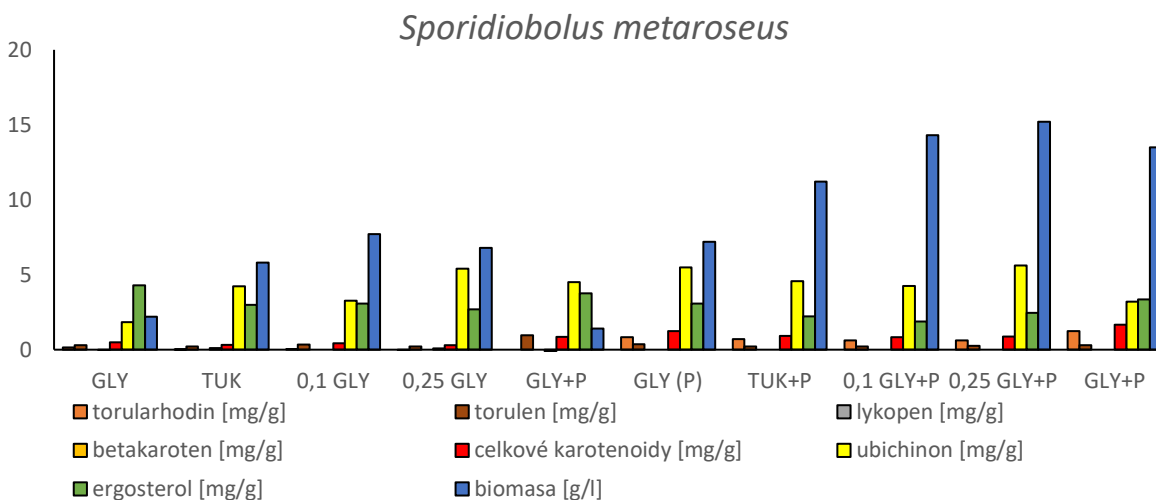
Z Grafu 11 plyne, že nejmenší produkci PUFA měl daný kmen na glycerolových médiích si bez přídavku pérového hydrolyzátu, ale zároveň největší produkci MUFA. Obecně je vidět, že daný kmen produkoval na všech typech médií větší množství MUFA. Kultivace na médiích s přídavkem pérového hydrolyzátu vykazovaly v biomase větší procentuální zastoupení PUFA než tomu bylo u médií bez hydrolyzátu.



Graf 12: Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase

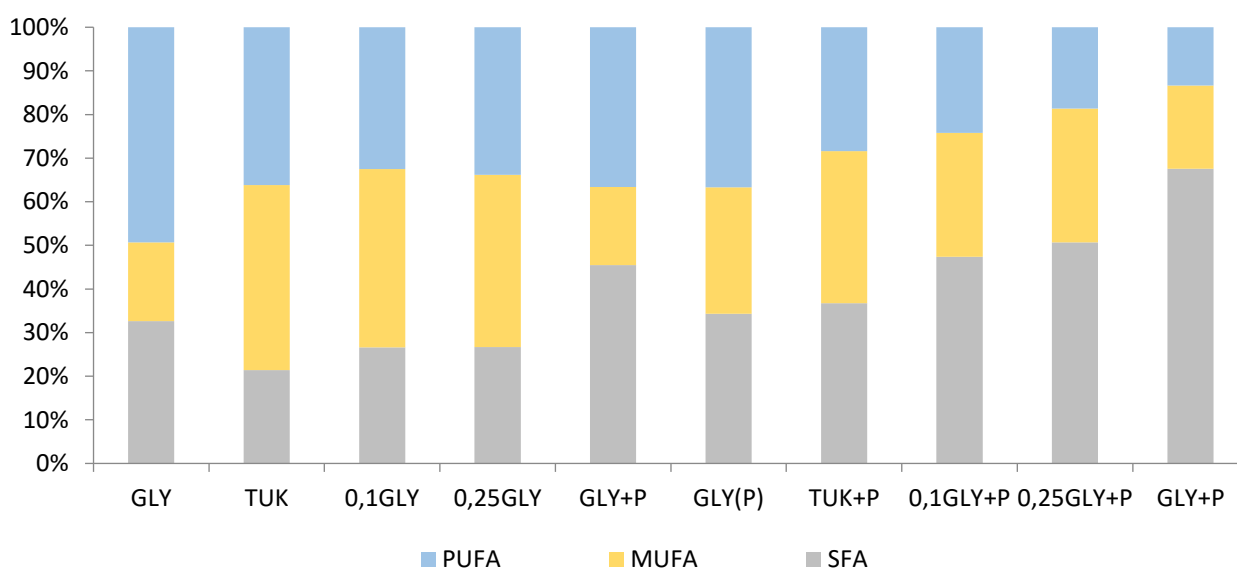
Z Grafu 12 plyne, že procentuální zastoupení celkových lipidů v biomase stoupalo s klesající koncentrací kuřecího tuku na médiích s přídavkem pérového hydrolyzátu. U médií bez přídavku hydrolyzátu žádný trend pozorován nebyl. Největší zastoupení lipidů (25,5%) vykazoval daný kmen na médiu s kuřecím tukem bez přídavku pérového hydrolyzátu.

5.1.1.5 Produkční vlastnosti kmene *Sporidiobolus metaroseus*



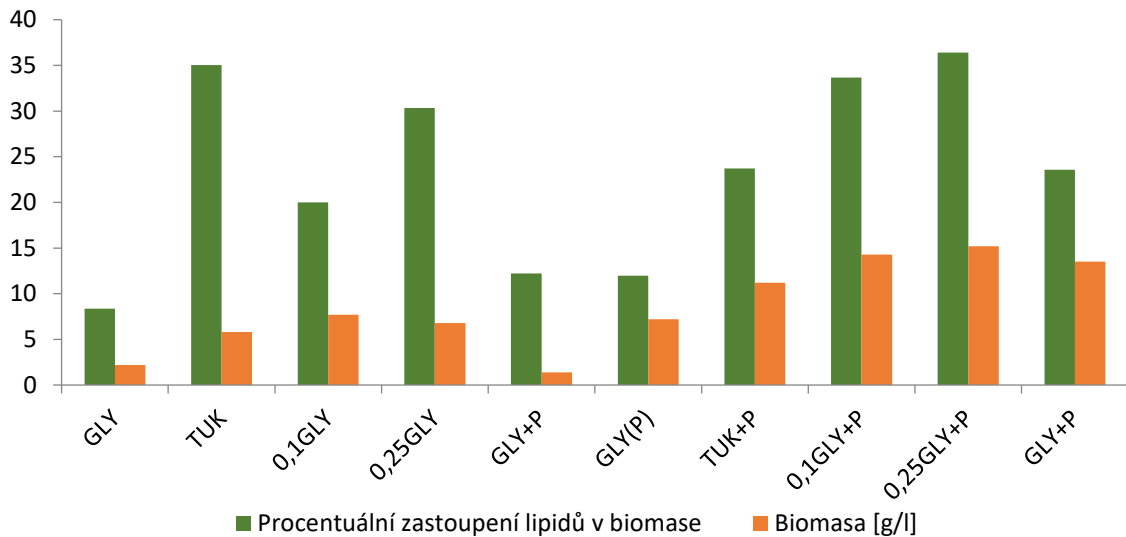
Graf 13: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na typu média

Na Grafu 13 lze jednoznačně pozorovat, že produkci biomasy měl daný kmen mnohem větší na médiích s přidavkem pérového hydrolyzátu. Zároveň je vidět stoupající trend s klesající koncentrací kuřecího tuku ve zmíněných médiích. Produkce ubichinonu byla na všech typech médií přibližně stejná. Můžeme také usoudit, že produkce ergosterolu byla větší oproti kmenu *Rhodotorula kratochvilovae*. Produkce celkových karotenoidů byla také mnohem větší na médiích s přidavkem pérového hydrolyzátu. Také lze tvrdit, že daný kmen skoro neprodukuje lykopen. Největší produkci biomasy (15,2 g/l) měl daný kmen na médiu s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 25:75 s přidavkem pérového hydrolyzátu.



Graf 14: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase

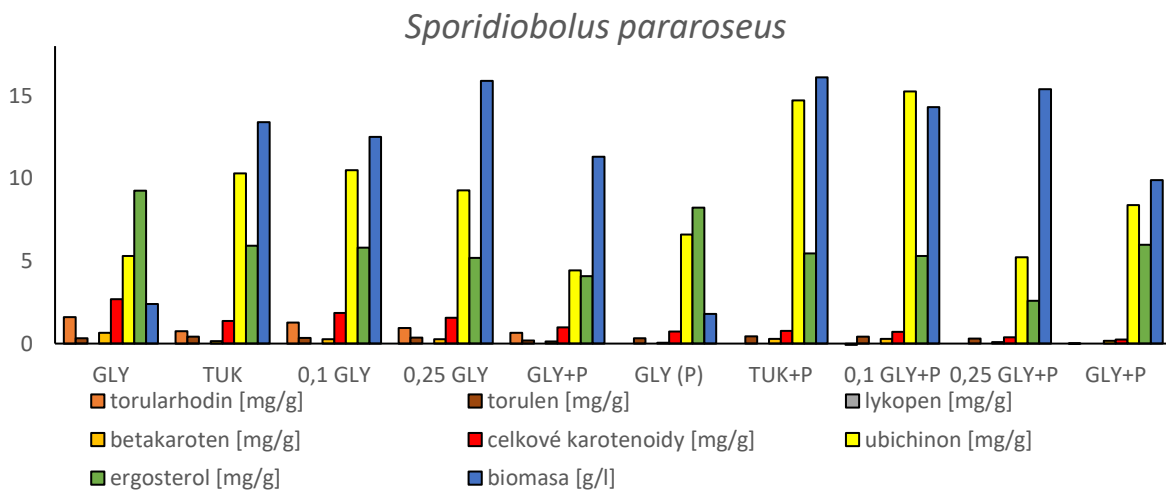
Na Grafu 14 můžeme vidět daný kmen měl značné zastoupení PUFA. Na médiích s přidavkem pérového hydrolyzátu můžeme pozorovat trend klesajícího zastoupení PUFA a MUFA s klesající koncentrací kuřecího tuku na médiích s přidavkem pérového hydrolyzátu. Naopak můžeme vidět stoupaní zastoupení SFA s klesající koncentrací kuřecího tuku na médiích s přidavkem hydrolyzátu. Největší zastoupení PUFA (49,3 %) měl daný kmen na glycerolovém médiu bez přidavku pérového hydrolyzátu.



Graf 15: Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase

Z Grafu 15 plyne, že procentuální zastoupení lipidů má stejný trend jako produkce biomasy: s klesající koncentrací kuřecího tuku stoupa zastoupení celkových lipidů, a to jen na médiích s přidavkem pěrového hydrolyzátu. Z Grafu 15 můžeme také posoudit, že zastoupení celkových lipidů bylo větší na médiích s přidavkem pěrového hydrolyzátu. Největší zastoupení lipidů (36,4 %) měl daný kmen na médiu s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 25:75 s přidavkem pěrového hydrolyzátu.

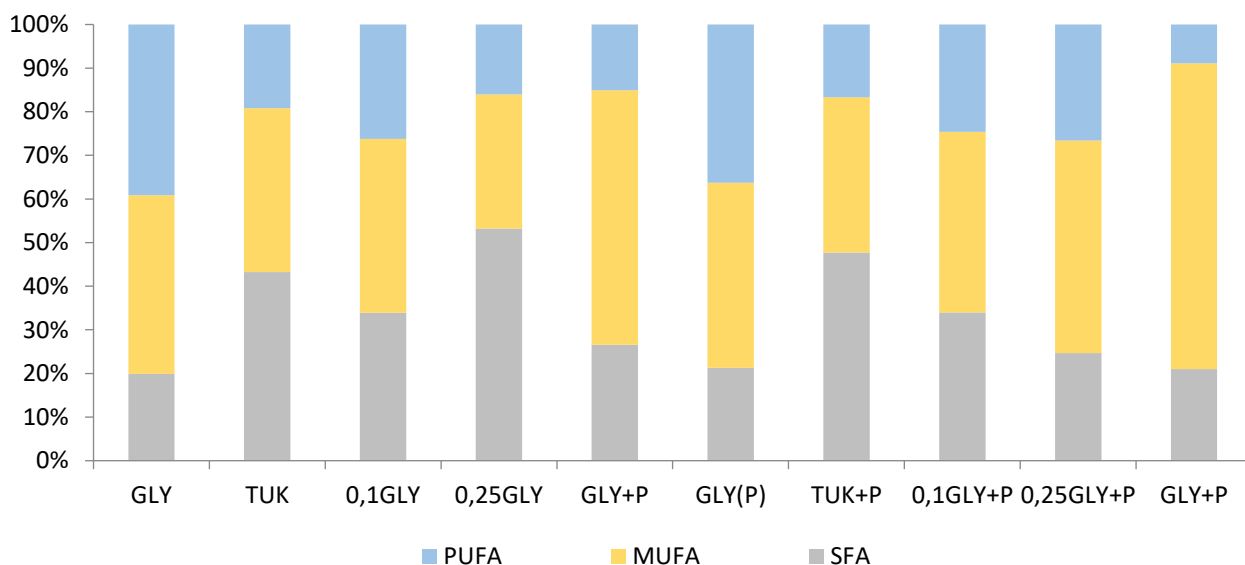
5.1.1.6 Produkční vlastnosti kmene *Sporidiobolus pararoseus*



Graf 16: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na typu média

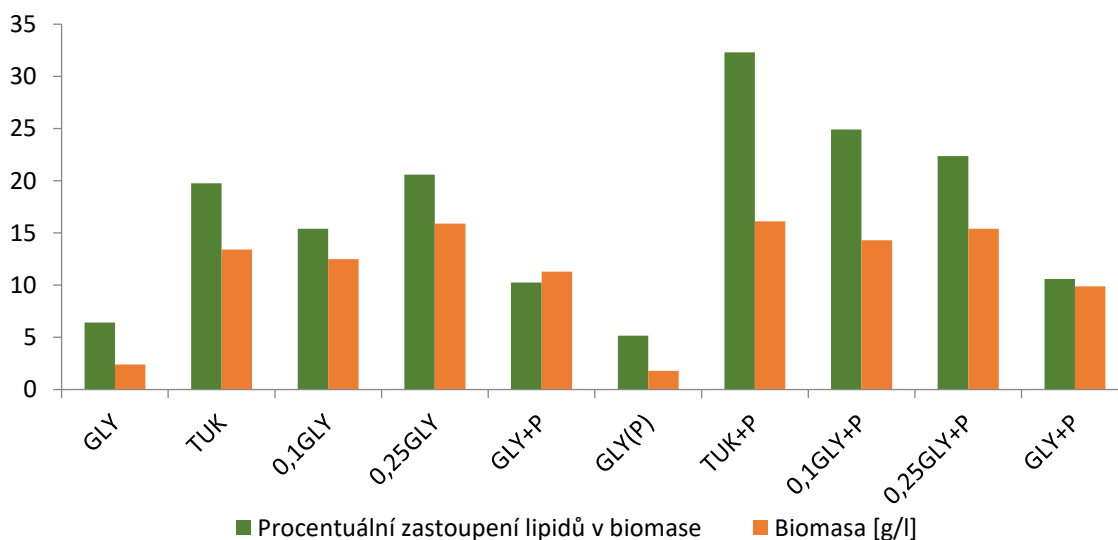
Z Grafu 16 můžeme posoudit, že daný kmen na všech typech médií kromě glycerolových (bez přidavku pěrového hydrolyzátu) vykazoval značnou produkci biomasy. Ze všech kmenu na C/N poměru 25 měl daný kmen největší produkce ubichinonu.

Nejvýznamnější produkce ubiquinonu (15,3 mg/g biomasy) byla pozorována na médiu s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 10:90 s přidavkem pérového hydrolyzátu. Z Grafu 16 plyne, že produkce ergosterolu klesala s klesající koncentrací kuřecího tuku na médiích s přidavkem pérového hydrolyzátu.



Graf 17: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase

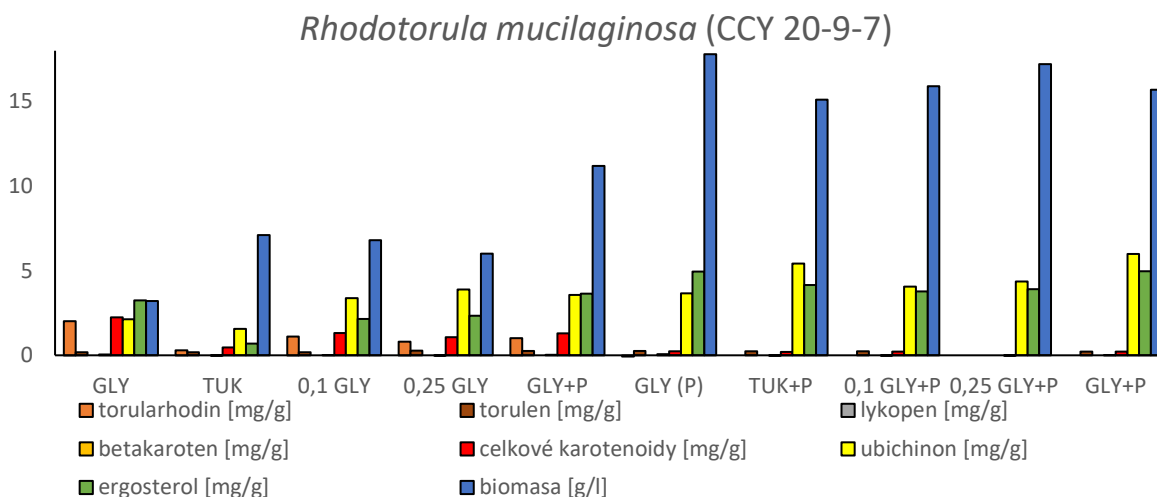
Na Grafu 17 vidíme, že největší produkci PUFA měl daný kmen na glycerolových médiích (bez přidavku pérového hydrolyzátu). Naopak na glycerolových médiích s přidavkem pérového hydrolyzátu byla zjištěna největší produkce MUFA. Produkce PUFA klesala s klesající koncentrací kuřecího tuku na médiích s přidavkem hydrolyzátu, nápodobně stoupala koncentrace MUFA. Největší zastoupení PUFA (39,2 %) měl daný kmen na glycerolovém médiu bez přidavku pérového hydrolyzátu.



Graf 18: Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase

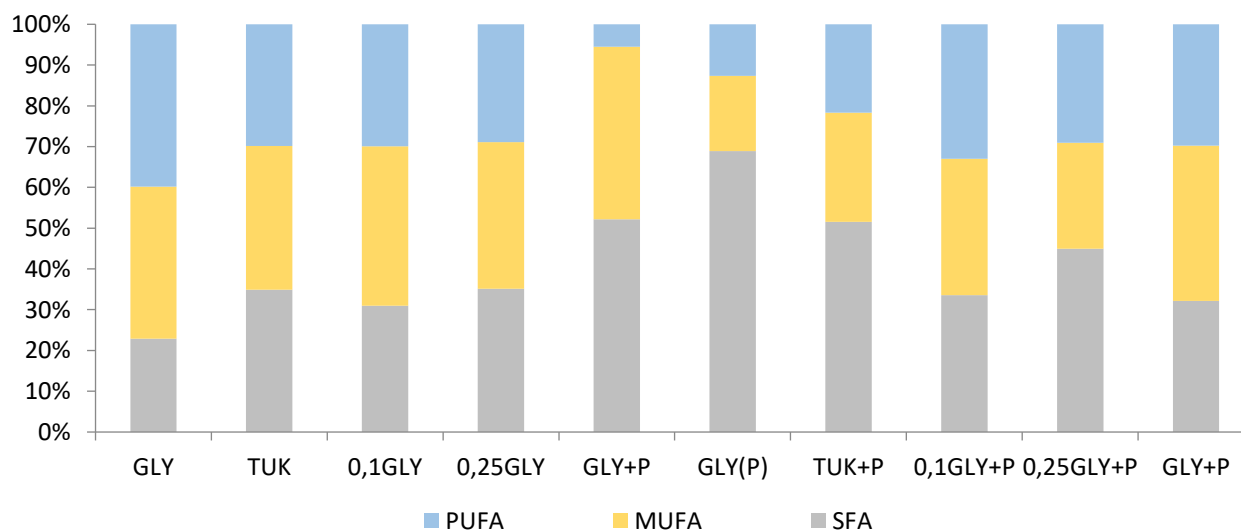
Na Grafu 18 můžeme vidět, že zastoupení celkových lipidů měl daný kmen větší na médiích s přidavkem pérového hydrolyzátu. Zároveň u celkových lipidů můžeme pozorovat klesající trend s klesající koncentrací kuřecího tuku na médiích s přidavkem pérového hydrolyzátu. Nejmenší zastoupení celkových lipidů v biomase bylo na kontrolních glycerolových médiích (6,4 a 5,2 %) bez přidavku pérového hydrolyzátu.

5.1.1.7 Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 20-9-7)



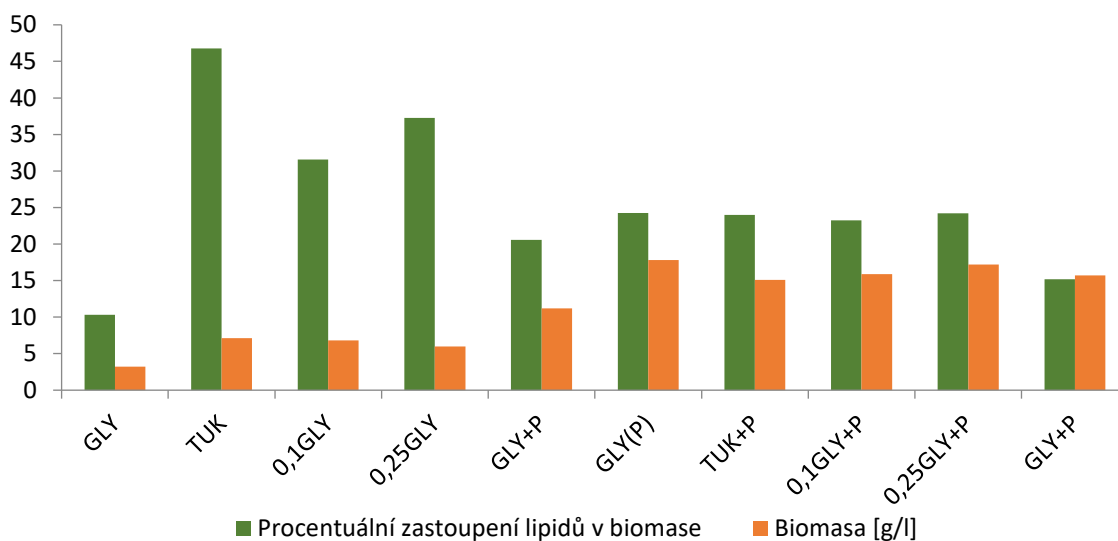
Graf 19: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na typu média

Z Grafu 19 můžeme posoudit, že daný kmen produkoval mnohem více biomasy na médiích s přidavkem pérového hydrolyzátu než na médiích bez něho. Zároveň na médiích s hydrolyzátem byla větší produkce ubichinonu a ergosterolu. Produkci celkových karotenoidů měl daný kmen větší na médiích bez přidavku pérového hydrolyzátu. Produkce ubichinonu a ergosterolu byla také větší na médiích s přidavkem pérového hydrolyzátu. Největší produkci ubichinonu (6 mg/g biomasy) bylo na glycerolovém médiu s přidavkem pérového hydrolyzátu.



Graf 20: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase

Z Grafu 20 můžeme posoudit, že daný kmen vykazoval téměř stejné procentuální zastoupení PUFA na médiích s přídavkem i bez přídavku pérového hydrolyzátu. Výjimkou byla kultivace na glycerolovém médiu s péroým hydrolyzátem (6 %). Největší zastoupení PUFA (39,8 %) bylo pozorováno na glycerolovém médiu bez pérového hydrolyzátu. Procentuální zastoupení MUFA bylo větší na médiích bez přídavku pérového hydrolyzátu. Naopak u SFA tomu bylo na médiích s hydrolyzátem. Největší zastoupení SFA měl daný kmen na glycerolovém médiu bez pérového hydrolyzátu.

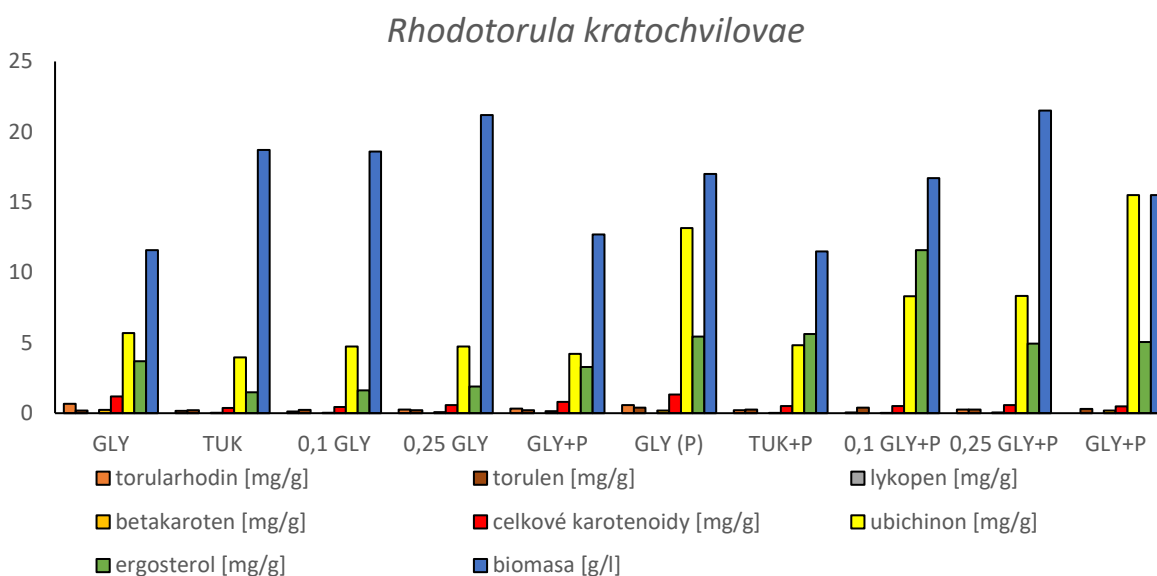


Graf 21: Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase

Graf 21 nám naznačuje, že celkové lipidy byly více zastoupeny na médiích bez pérového hydrolyzátu. U médií s přídavkem pérového hydrolyzátu bylo procentuální zastoupení celkových lipidů v biomase téměř stejné. Největší produkci lipidů (46,8 %) vykazoval daný kmen na médiu s kuřecím tukem bez přídavku hydrolyzátu. Naopak nejmenší produkci lipidů (10,3 %) měl daný kmen na glycerolovém médiu bez přídavku pérového hydrolyzátu.

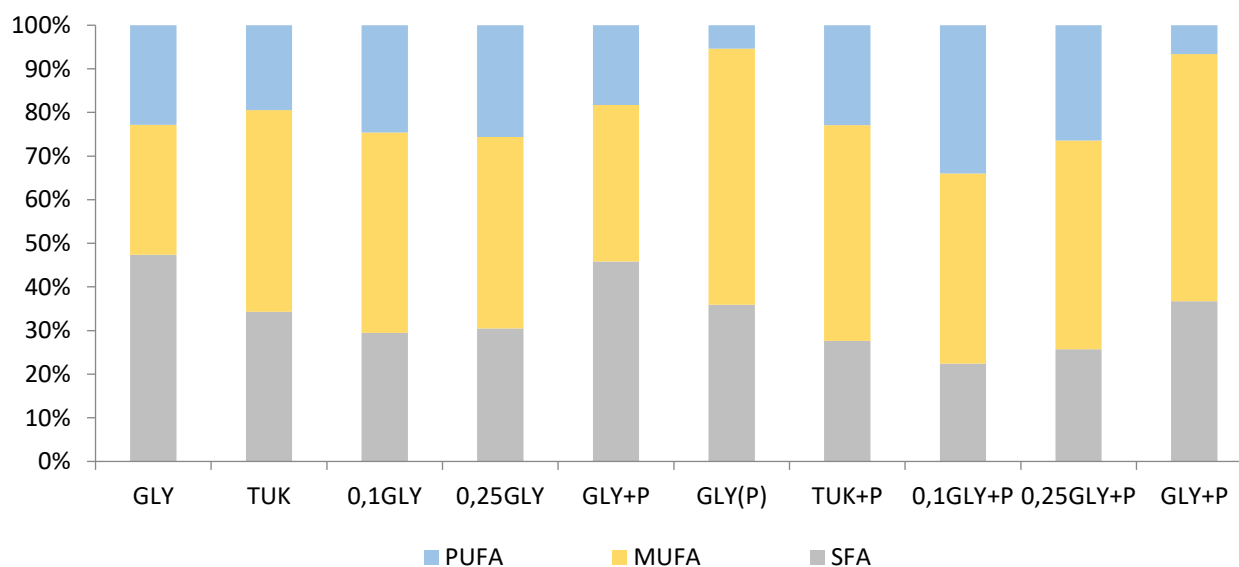
5.1.2 Porovnání produkčních vlastností biomasy na médiu bez a s přidáním pérového hydrolyzátu o C/N poměru 50

5.1.2.1 Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula kratochvilovae*



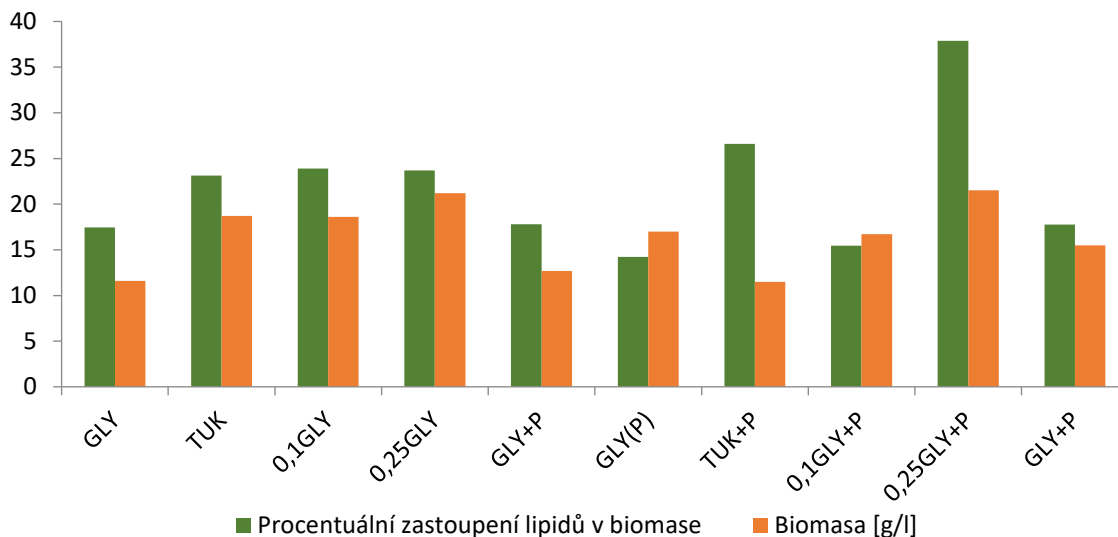
Graf 22: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na typu média

Z Grafu 22 můžeme posoudit, že daný kmen vykazoval větší produkce biomasy na médiích bez přídavku pérového hydrolyzátu. Naopak větší produkce ubichinonu a ergosterolu byla na médiích s přídavkem pérového hydrolyzátu. Produkce celkových karotenoidů byla větší na glycerolovém médiu bez hydrolyzátu (1,2 a 1,3 mg/g biomasy). Zároveň můžeme vidět, že produkce biomasy stoupala s klesající koncentrací kuřecího tuku na médiích s přídavkem pérového hydrolyzátu.



Graf 23: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase

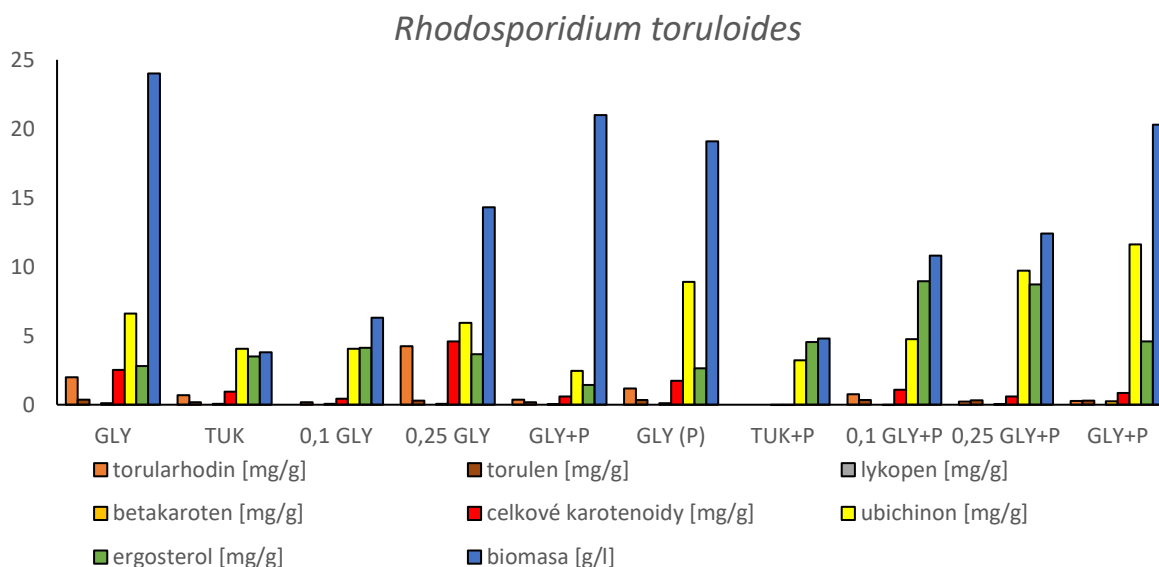
Graf 23 nám ukazuje, že větší zastoupení MUFA měl daný kmen na médiích s přidavkem péřového hydrolyzátu. Největší zastoupení MUFA (58,7 %) bylo akumulováno daným kmenem na glycerolovém médiu bez hydrolyzátu. Největší produkce FUFA byla pozorována na médiu s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 10:90 s přidavkem hydrolyzátu. Zastoupení SFA na médiích s hydrolyzátem bylo menší než na médiích bez hydrolyzátu.



Graf 24: Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase

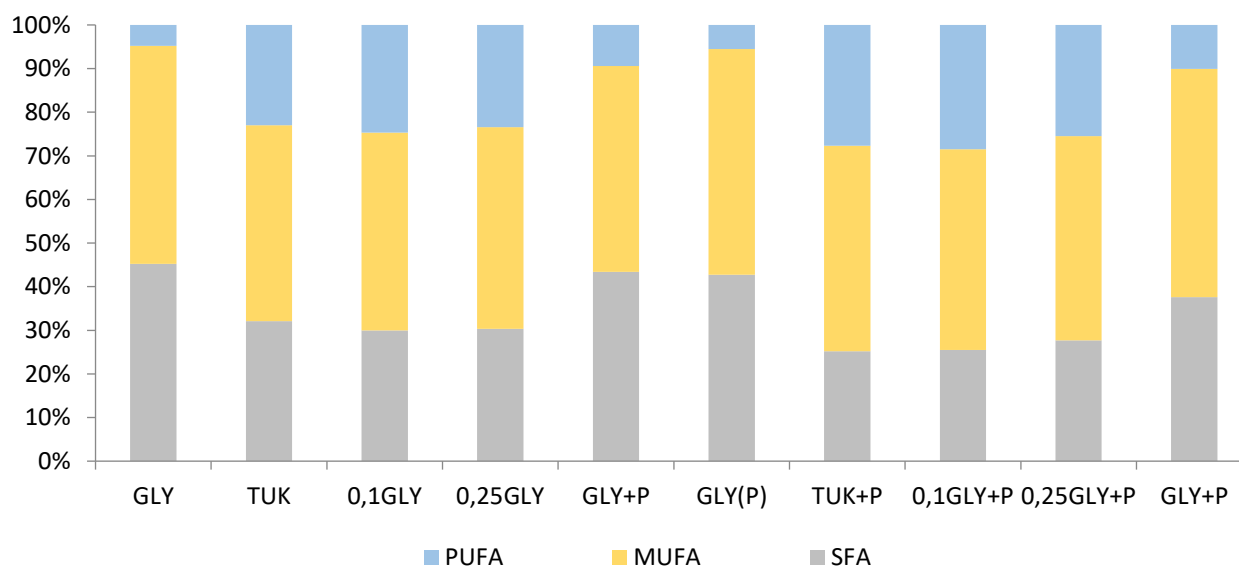
Z Grafu 24 můžeme vidět, že největší zastoupení celkových lipidů (37,9 %) bylo na médiu s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 25:75 s přidavkem péřového hydrolyzátu. Naopak nejmenší zastoupení lipidů bylo zjištěno na glycerolových médiích s přidavkem i bez přidavku hydrolyzátu. Také můžeme posoudit, že v přepočtu daný kmen produkoval mnohem více lipidů na médiích bez přidavku péřového hydrolyzátu.

5.1.2.2 Produkční vlastnosti kmene *Rhodosporidium toruloides*



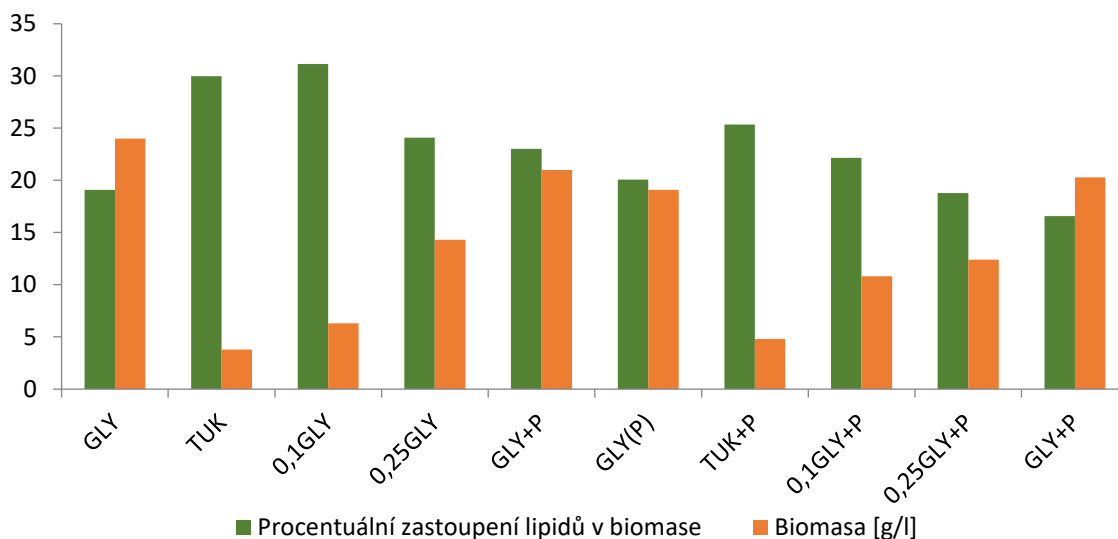
Graf 25: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na typu média

Na Grafu 25 můžeme vidět, že produkce biomasy stoupala s klesající koncentrací kuřecího tuku na obou typech média. Největší produkci biomasy vykazoval daný kmen na glycerolových médiích s přidavkem i bez přidavku pérového hydrolyzátu. Produkce ubichinonu a ergosterolu byla větší na médiích s hydrolyzátem. Produkce celkových karotenoidů byla větší na médiích bez přidavku hydrolyzátu. Největší produkce ubichinonu (11,6 mg/g biomasy) byla pozorována na glycerolovém médiu s přidavkem hydrolyzátu. Největší produkce ergosterolu (8,4 mg/g biomasy) byla kmenem produkována na médiu s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 10:90 s přidavkem pérového hydrolyzátu.



Graf 26: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase

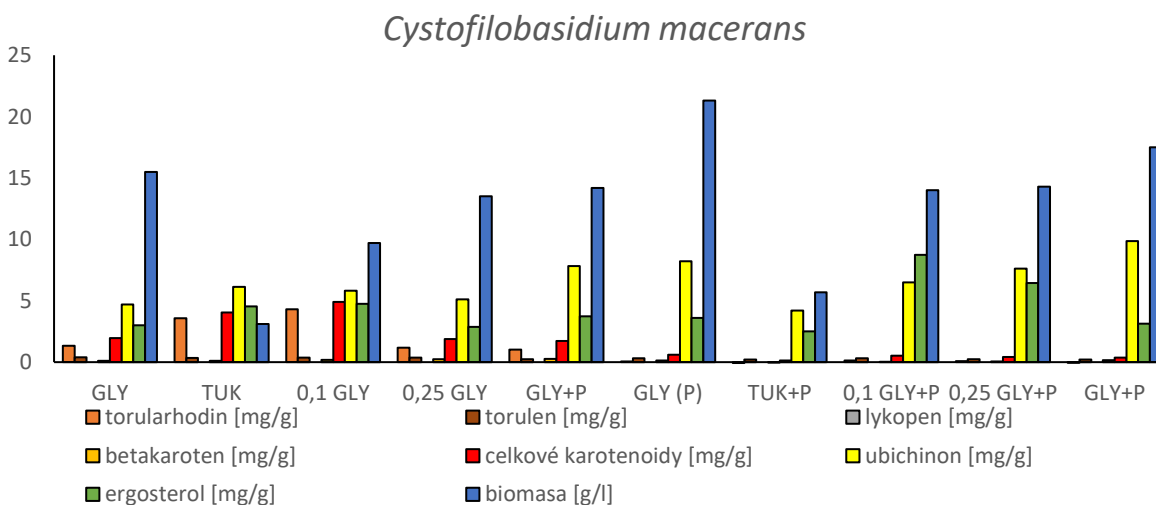
Z Grafu 26 plyne, že produkce MUFA na všech typech médií byla téměř stejná. Zastoupení PUFA vykazovala nižší hodnoty u kultivací na glycerolových médiích a to jak s přidavkem, tak i bez přidavku pérového hydrolyzátu. Zastoupení SFA naopak bylo nejmenší na médiích kombinující tuk s glycerolem či pouze na tukových médiích.



Graf 27: Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase

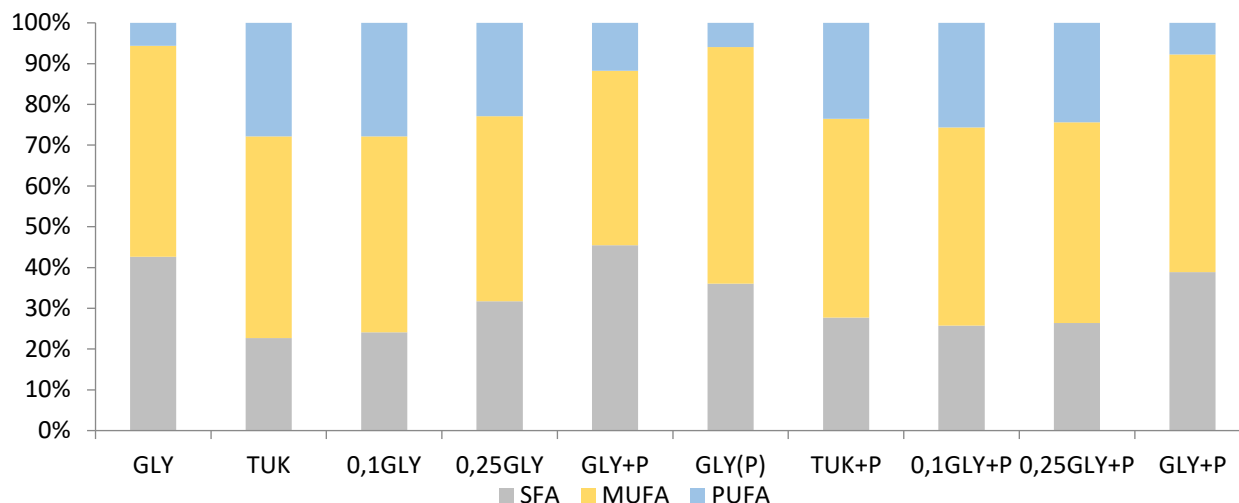
Z Grafu 27 můžeme posoudit, že celkové lipidy byly biomasou kumulovány ve větších množstvích na médiích bez přidavku pérového hydrolyzátu. Na médiích s přidavkem pérového hydrolyzátu můžeme vidět klesající trend obsahu lipidů s klesající koncentrací kuřecího tuku. Největší zastoupení celkových lipidů (31,1 %) bylo na médiu s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 10:90 bez přidavku hydrolyzátu. Na glycerolových médiích s přidavkem i bez přidavku hydrolyzátu bylo zastoupení celkových lipidů menší než na ostatních médiích.

5.1.2.3 Produkční vlastnosti kmene *Cystofilobasidium macerans*



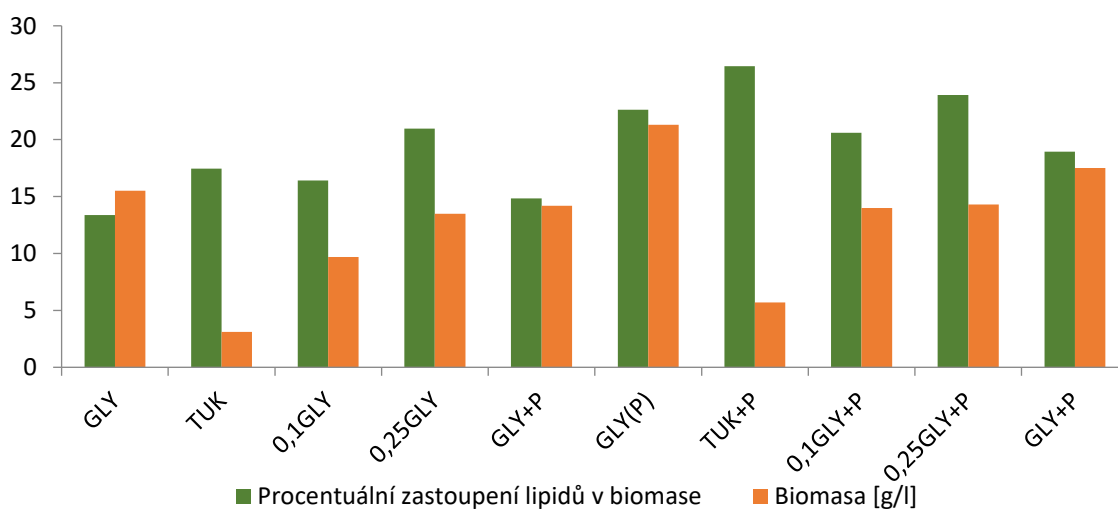
Graf 28: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na typu média

Na Grafu 28 můžeme vidět stoupající produkci biomasy s klesající koncentrací kuřecího tuku na médiích s přídavkem i bez přídavku pérového hydrolyzátu. Produkce ubiquinonu na všech typech médií byla téměř stejná, ale největší produkci ubiquinonu (9,9 mg/g biomasy) měl daný kmen na glycerolovém médiu s přídavkem hydrolyzátu. Co se týče celkových karotenoidů, tak lze pozorovat, že jejich produkce byla větší na médiích bez přídavku pérového hydrolyzátu. Největší produkce biomasy (21,3 g/l) byla na glycerolovém médiu bez hydrolyzátu.



Graf 29: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase

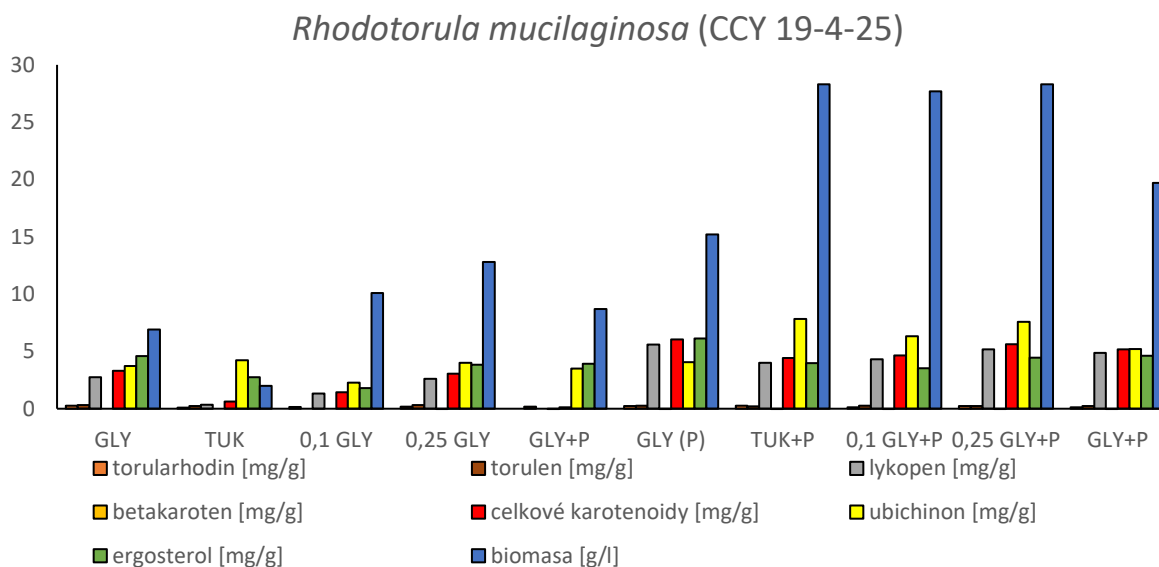
Z Grafu 29 můžeme posoudit, že největší koncentrace PUFA vykazoval daný kmen na všech typech médií kombinující glycerol s tukem či na médiích s čistým tukem. Naopak nejmenší na glycerolových médiích. Největší produkce MUFA byla na glycerolových médiích s přídavkem i bez přídavku pérového hydrolyzátu. Na médiích s glycerolem a kuřecím tukem bylo zastoupení MUFA téměř stejné. Největší zastoupení MUFA (58 %) bylo na glycerolovém médiu bez přídavku pérového hydrolyzátu. Největší zastoupení SFA (45,5 %) vykazoval daný kmen na glycerolovém médiu s přídavkem pérového hydrolyzátu.



Graf 30: Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase

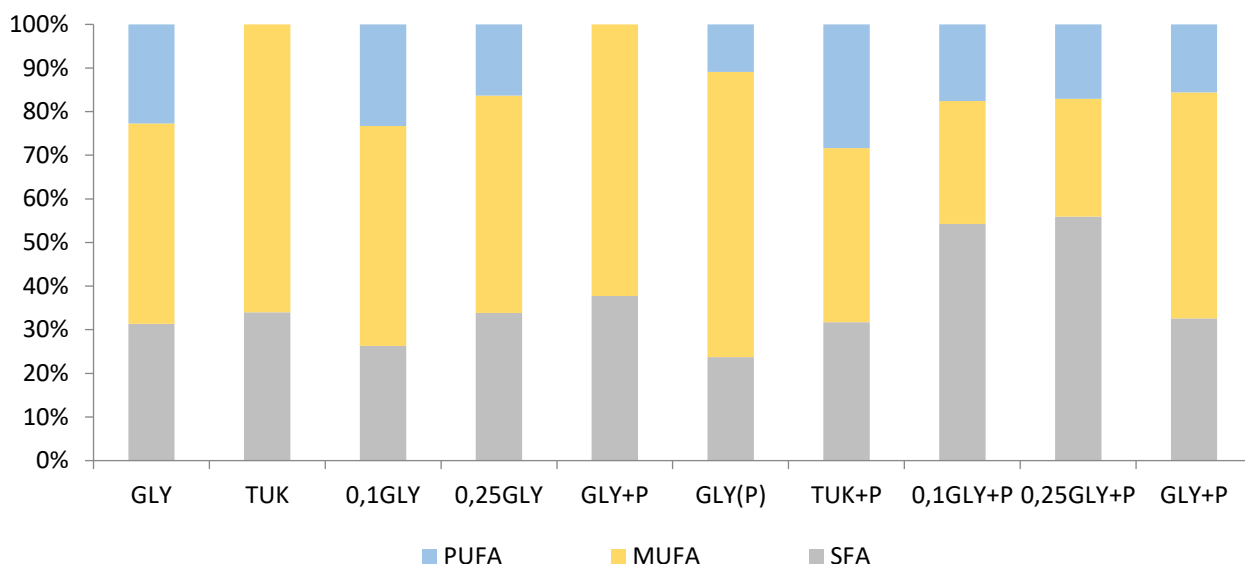
Z Grafu 30 plyne že, na médiích s přidavkem pérového hydrolyzátu bylo zastoupení celkových lipidů v biomase větší než na médiích bez hydrolyzátu. Největší zastoupení celkových lipidů (26,5 %) vykazoval daný kmen na médiu s kuřecím tukem a přidavkem pérového hydrolyzátu. Naopak nejmenší zastoupení lipidů (13,4 %) měl daný kmen na glycerolovém médiu bez přidavku pérového hydrolyzátu.

5.1.2.4 Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 19-4-25)



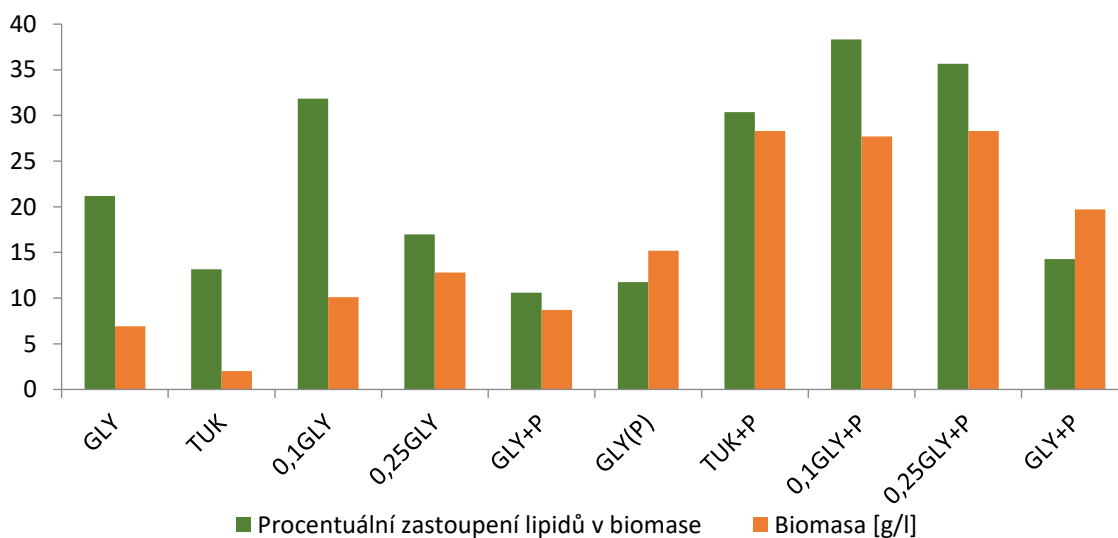
Graf 31: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na typu média

Na Grafu 31 můžeme vidět, že daný kmen produkoval mnohem více biomasy na médiích s přidavkem pérového hydrolyzátu než na médiích bez něho. Produkce celkových karotenoidů byla mnohem větší na médiích s přidavkem hydrolyzátu. Narozdíl od předchozích kmenů, produkoval daný kmen značné množství lykopenu. vyšších produkcí lykopenu bylo dosaženo na médiích s přidavkem pérového hydrolyzátu. Produkce ubichinonu a ergosterolu byla také větší na médiích s přidavkem hydrolyzátu. Největší produkce biomasy (28,3 g/l) dosáhl daný kmen na médiu s kuřecím tukem s přidavkem hydrolyzátu a na médiu s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 25:75 s hydrolyzátem.



Graf 32: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase

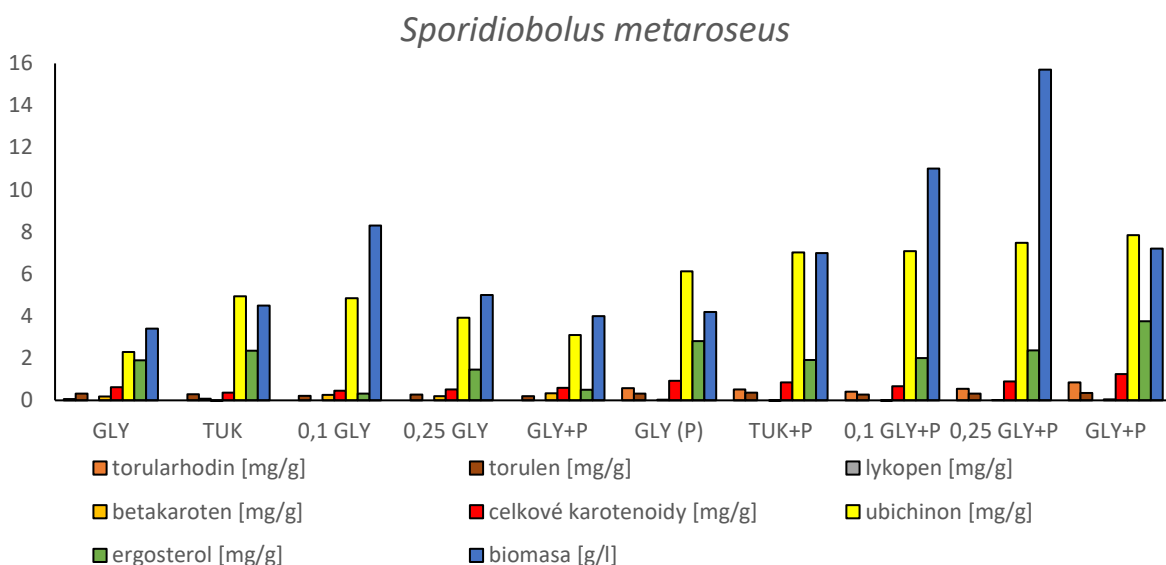
Z Grafu 32 plyne, že zastoupení MUFA bylo větší u kultivací na médiích bez přídavku pérového hydrolyzátu, kde bylo zároveň pozorováno menší zastoupení SFA. Můžeme také vidět, že s klesající koncentrací kuřecího tuku klesalo zastoupení MUFA na médiích s přídavkem pérového hydrolyzátu. Největší zastoupení PUFA (28,3 %) vykazoval daný kmen na médiu s kuřecím tukem a péroým hydrolyzátem. Největší zastoupení SFA (56 %) bylo na médiu s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 25:75 a s přídavkem pérového hydrolyzátu.



Graf 33: Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase

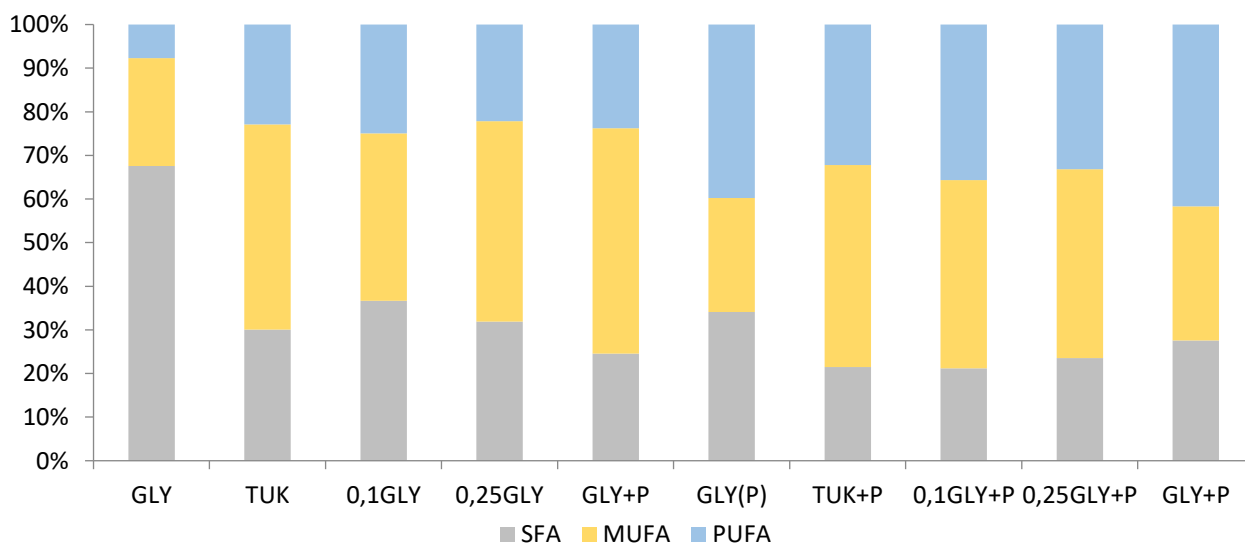
Na Grafu 33 můžeme vidět klesající zastoupení celkových lipidů se stoupající koncentrací glycerolu na médiích bez přídavku pérového hydrolyzátu. Celkové zastoupení lipidů bylo větší na médiích s přídavkem hydrolyzátu. Největší hodnotu (38,8 %) vykazoval daný kmen na médiu s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 10:90 a s péroým hydrolyzátem. Nejmenší zastoupení lipidů bylo zjištěno na glycerolových médiích s přídavkem i bez přídavku hydrolyzátu.

5.1.2.5 Produkční vlastnosti kmene *Sporidiobolus metaroseus*



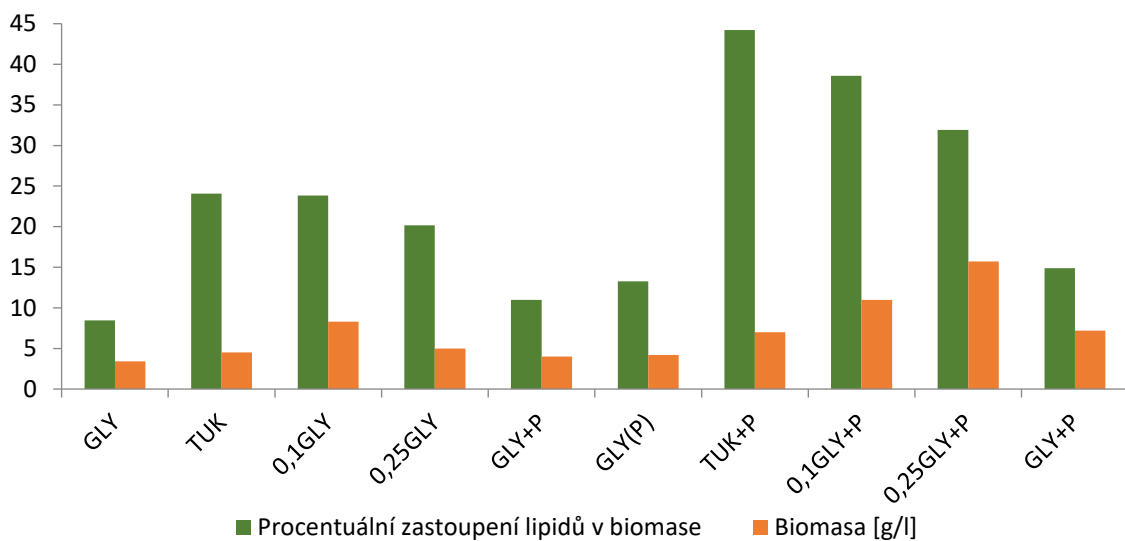
Graf 34: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na typu média

Z Grafu 34 plyne, že větší produkci biomasy daný kmen vykazoval na médiích s přidavkem péřového hydrolyzátu. Také můžeme vidět stoupající produkci biomasy s klesající koncentrací kuřecího tuku na médiích s přidavkem hydrolyzátu. Největší produkce biomasy (15,7 g/l) byla na médiu s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 25:75 a s péřovým hydrolyzátem. Produkce ubichinonu a ergosterolu byla větší na médiích s péřovým hydrolyzátem. Celkové karotenoidy daný kmen produkoval více na médiích s péřovým hydrolyzátem než na médiích bez něho.



Graf 35: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase

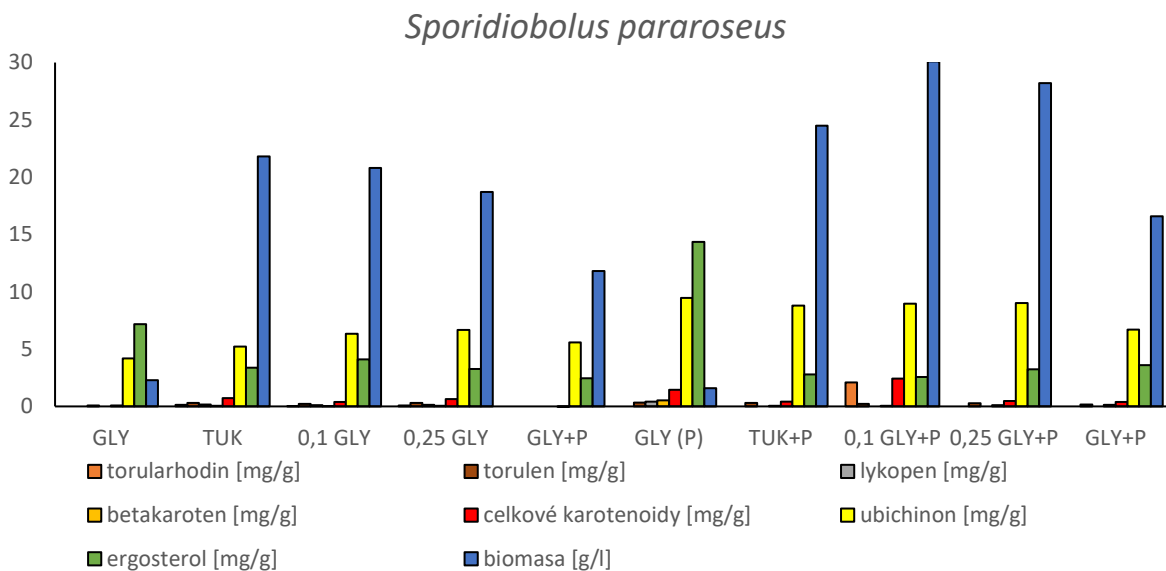
V Grafu 35 můžeme vidět, že na médiích s přidavkem péřového hydrolyzátu byla produkce PUFA větší než na médiích bez hydrolyzátu, zároveň bylo pozorováno menší zastoupení SFA na médiích s přidavkem hydrolyzátu. Největší zastoupení PUFA (41,7 %) bylo zaznamenáno na glycerolovém médiu s přidavkem hydrolyzátu. Nevětší zastoupení SFA (67,5 %) vykazoval daný kmen na glycerolovém médiu bez přidavku péřového hydrolyzátu.



Graf 36: Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase

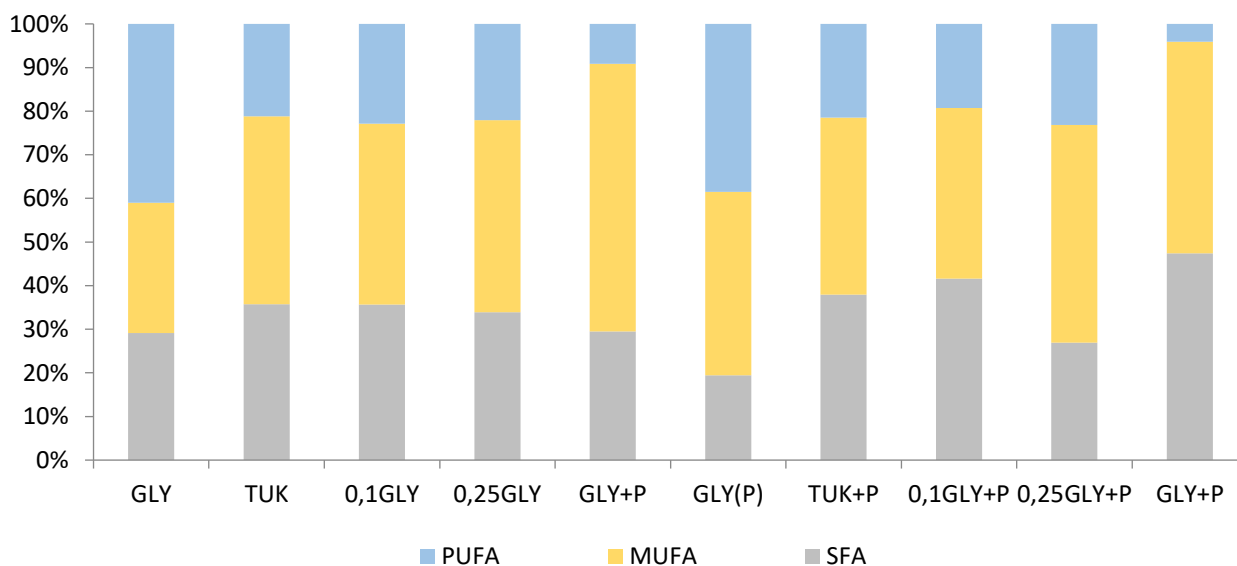
Z Grafu 36 můžeme posoudit, že zastoupení celkových lipidů bylo větší na médiích s přidavkem pérového hydrolyzátu. Také můžeme vidět, že zastoupení celkových lipidů klesalo s klesající koncentrací kuřecího tuku na médiích s přidavkem hydrolyzátu. Největší zastoupení celkových lipidů bylo zjištěno na médiu s kuřecím tukem a péroým hydrolyzátem. Naopak nejmenší zastoupení lipidů vykazoval daný kmen na glycerolových médiích s přidavkem i bez přidavku hydrolyzátu.

5.1.2.6 Produkční vlastnosti kmene *Sporidiobolus pararoseus*



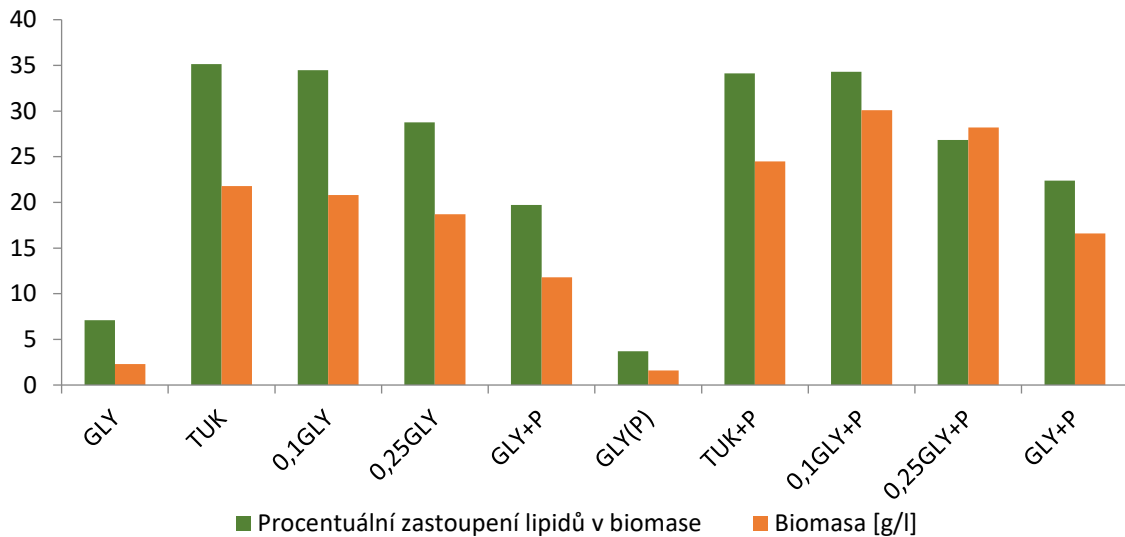
Graf 37: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na typu média

Z Grafu 37 plyne, že produkce biomasy byla větší na médiích s přidavkem pérového hydrolyzátu než na médiích bez hydrolyzátu. Největší produkci biomasy (30,1 g/l) vykazoval daný kmen na médiu s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 10:90 a s pérovým hydrolyzátem. Naopak nejmenší narůst biomasy můžeme vidět na glycerolových médiích bez přidavku pérového hydrolyzátu. Největší produkce ergosterolu byla na glycerolových médiích bez přidavku hydrolyzátu. Produkce ubichinonu byla větší na médiích s pérovým hydrolyzátem. Celkové karotenoidy také byly produkované ve větší míře na médiích s hydrolyzátem. U médií bez přidavku pérového hydrolyzátu můžeme pozorovat trend klesající produkce biomasy s klesající koncentrací kuřecího tuku.



Graf 38: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase

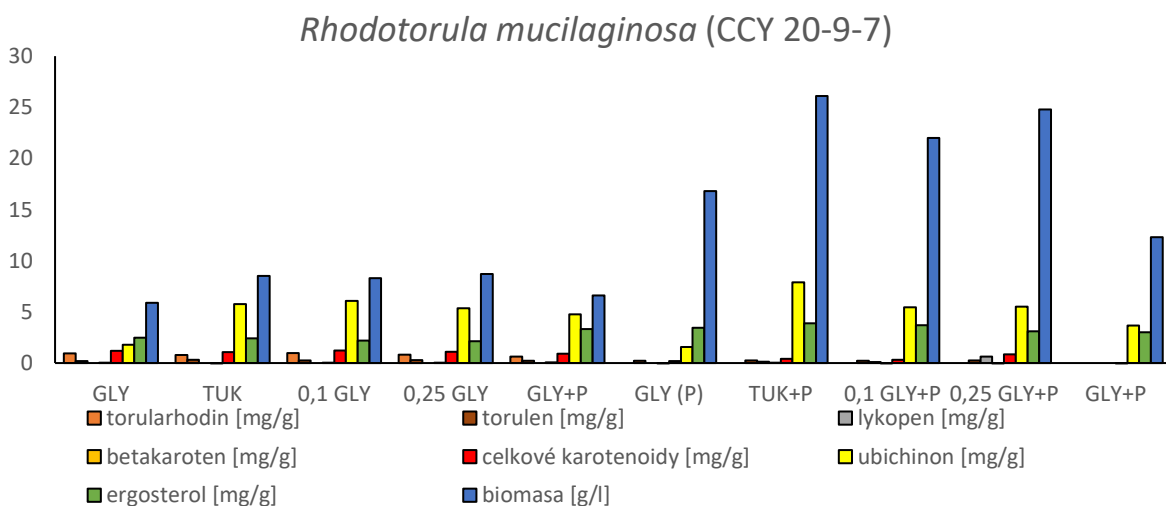
Na Grafu 38 můžeme pozorovat, že zastoupení PUFA bylo větší na médiích s glycerolem a kuřecím tukem bez pérového hydrolyzátu. Největší produkce PUFA (41 %) vykazoval daný kmen na glycerolovém médiu bez přidavku hydrolyzátu. Naopak nejmenší zastoupení PUFA bylo na glycerolovém médiu s přidavkem pérového hydrolyzátu. Produkce MUFA na všech typech médií bylo téměř stejné až na glycerolové médium s přidavkem pérového hydrolyzátu a na médium s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 25:75 a pérovým hydrolyzátem. Největší zastoupení SFA (47,4 %) vykazoval daný kmen na glycerolovém médiu s hydrolyzátem.



Graf 39: Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase

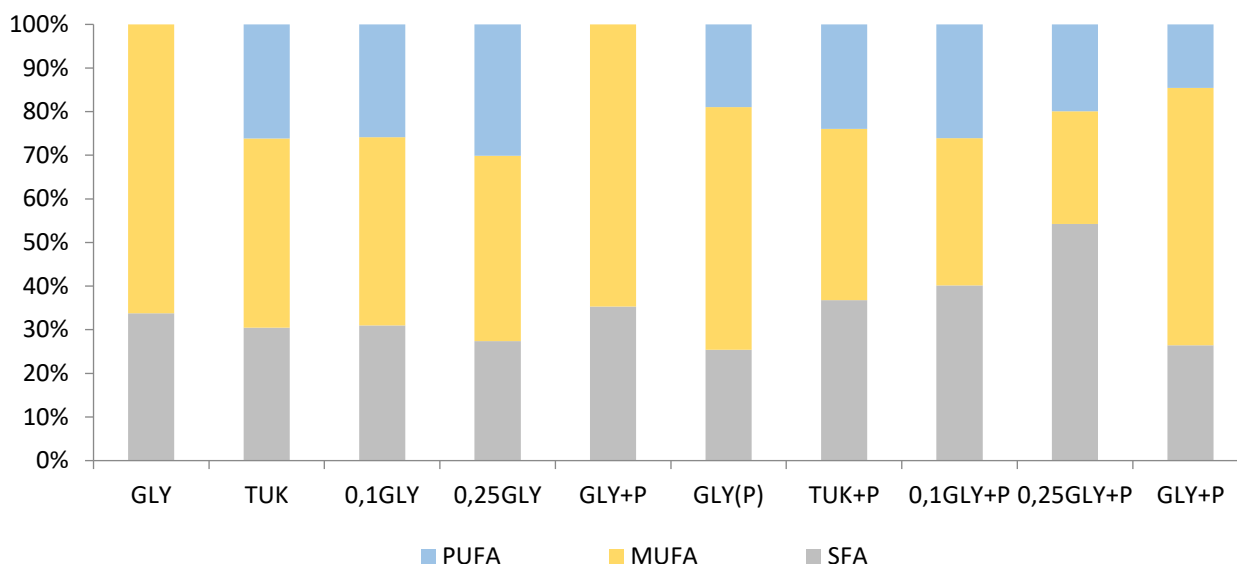
Z Grafu 39 plyne, že zastoupení celkových lipidů na médiích s i bez pérového hydrolyzátu je téměř stejné. Nejmenší produkce celkových lipidů byly na glycerolových médiích bez přídavku pérového hydrolyzátu. U médií s glycerolem a kuřecím tukem bez přídavku i s přídavkem hydrolyzátu můžeme pozorovat klesající trend celkového zastoupení lipidů v biomase s klesající koncentrací kuřecího tuku. Největší zastoupení celkových lipidů (35,1 %) bylo na médiu s kuřecím tukem bez pérového hydrolyzátu.

5.1.2.7 Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 20-9-7)



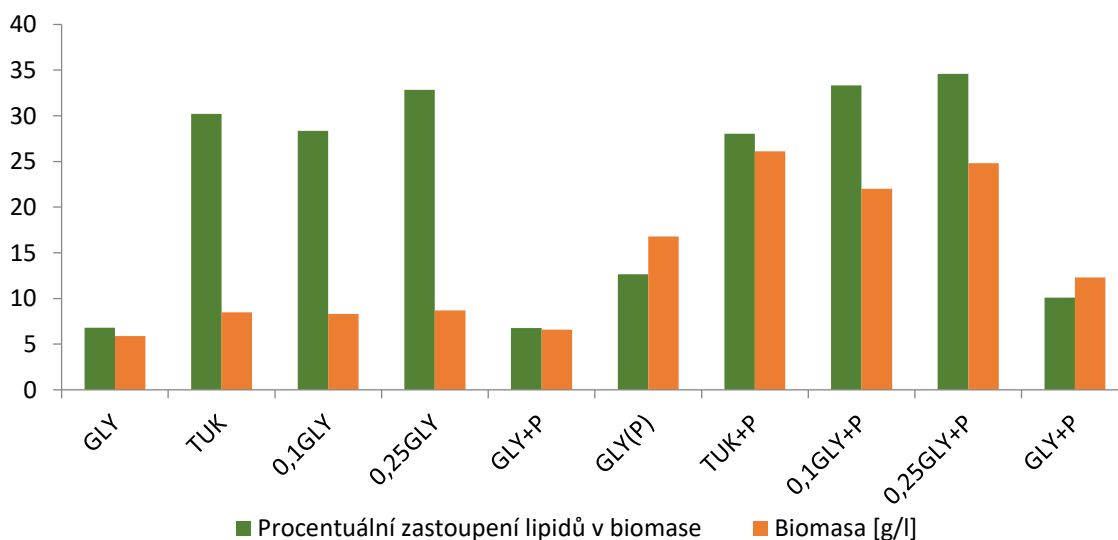
Graf 40: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na typu média

Z Grafu 40 plyne, že produkce biomasy byla větší na médiích s přídavkem pérového hydrolyzátu než na médiích bez něho. Největší produkce biomasy (26,1) byla na médiu s kuřecím tukem a přídavkem pérového hydrolyzátu. Produkce ubichinonu a ergosterolu byla také větší na médiích s hydrolyzátem. Produkce celkových karotenoidů naopak byla větší na médiích bez pérového hydrolyzátu. U médií bez přídavku pérového hydrolyzátu můžeme pozorovat produkci torulenu.



Graf 41: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase

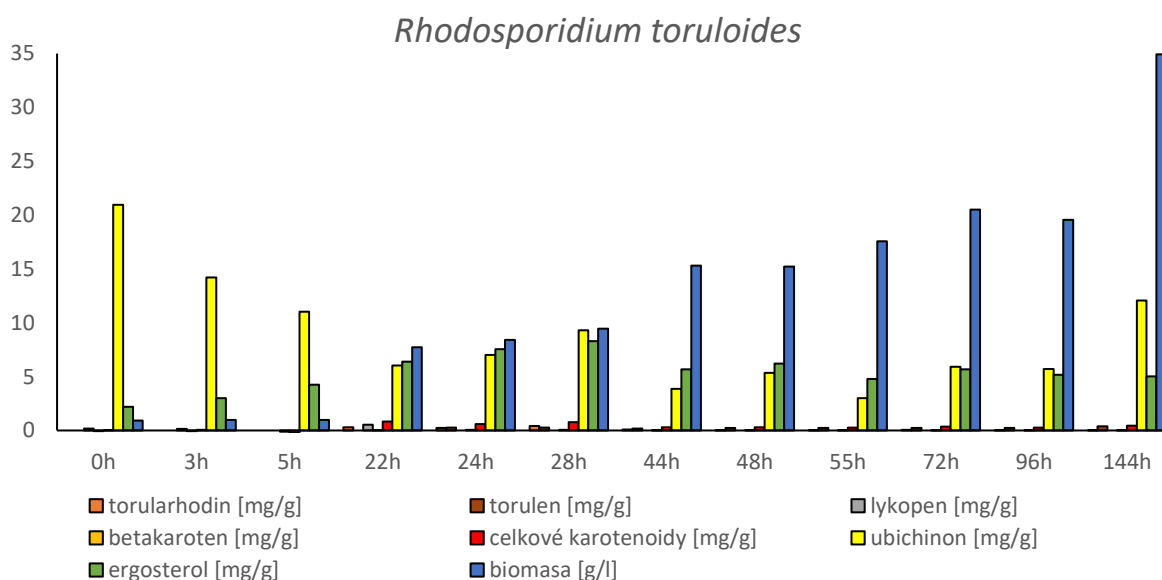
Na Grafu 41 můžeme vidět, že produkce PUFA byla větší na médiích bez přídavku pérového hydrolyzátu. Největší zastoupení PUFA (30,1 %) vykazoval daný kmen na médiu s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 25:75 bez pérového hydrolyzátu. Co se týče MUFA, tak můžeme pozorovat klesající trend s klesající koncentrací kuřecího tuku na médiích s přídavkem hydrolyzátu. Největší zastoupení MUFA (66,2 % a 64,7 %) byly na glycerolových médiích bez a s péroým hydrolyzátem. Procentuální zastoupení SFA bylo větší na médiích s přídavkem pérového hydrolyzátu (největší hodnota 54,3 % na médiu glycerolem a kuřecím tukem v poměru 25:75).



Graf 42: Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase

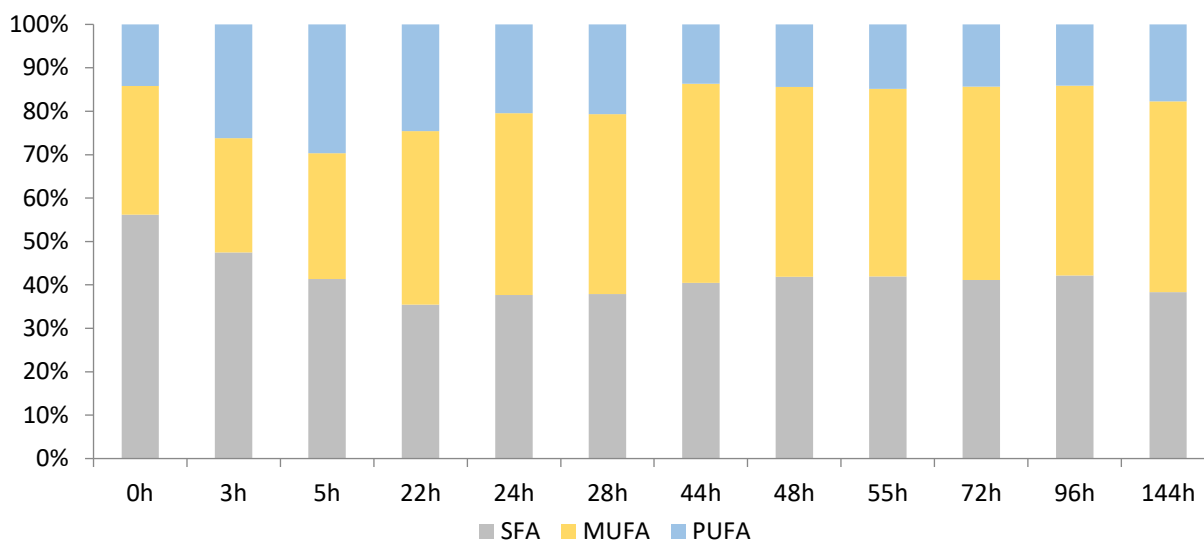
Z Grafu 42 plyne, že zastoupení celkových lipidů je větší u médií s přidavkem péřového hydrolyzátu. Také zde můžeme pozorovat stoupající trend celkových lipidů s klesající koncentrací kuřecího tuku v médiích s hydrolyzátem. Nejmenší zastoupení celkových lipidů bylo na glycerolových médiích bez přidavku i s přidavkem péřového hydrolyzátu. Nejmenší hodnotu (6,8 %) vykazoval daný kmen na glycerolovém médiu s přidavkem hydrolyzátu. Naopak největší hodnota zastoupení celkových karotenoidů (34,6 %) byla na médiu s glycerolem a kuřecím tukem v poměru 25:75 a s péřovým hydrolyzátem.

5.2 Stanovení produkčních vlastností biomasy u fermentorové kultivace kmene *Rhodosporidium toruloides*



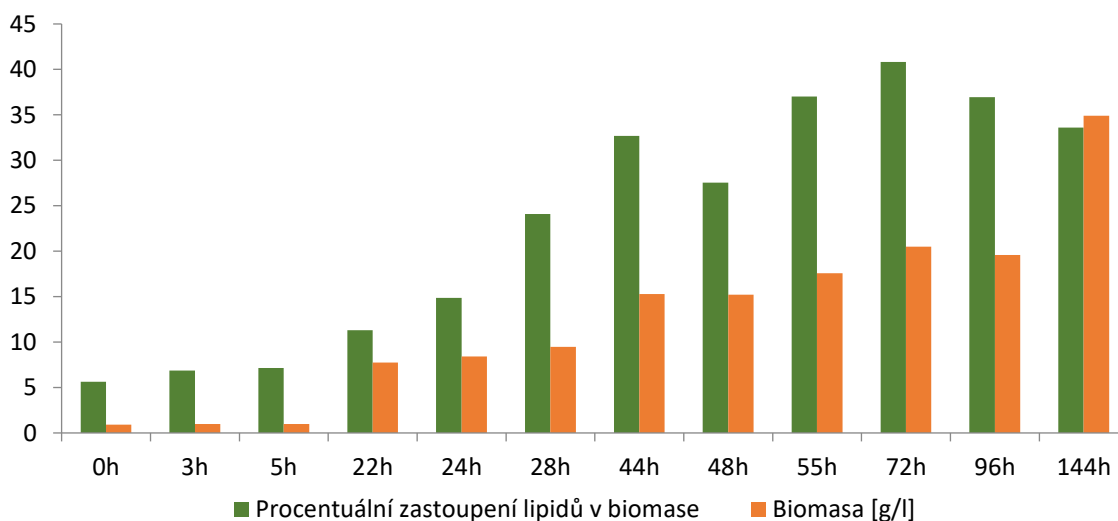
Graf 43: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na čase

Z Grafu 43 plyne, že výrazná změna v produkci biomasy, ubichinonu a ergosterolu nastala mezi 5. a 22. hodinou. Nejvyšší hodnota (34,92 g/l) produkce biomasy byla zaznamenána ve 144. hodině kultivace. Můžeme vidět, že v průběhu kultivace se téměř neměnily produkce celkových karotenoidů. Nejvyšší produkce ergosterolu byla pozorována mezi 22. a 28. hodinou kultivace. Nejvyšší hodnota (8,3 mg/g biomasy) byla zaznamenána ve 28. hodině kultivace. Největší produkce ubichinonu (12,1 mg/g biomasy) byla pozorována ve 144. hodině kultivace.



Graf 44: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase v závislosti na čase

Z Grafu 44 můžeme posoudit, že od 22. hodiny kultivace se téměř neměnilo procentuální zastoupení mastných kyselin v biomase.



Graf 45: Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase v závislosti na čase

Z Grafu 45 plyne, že procentuální zastoupení celkových lipidů se zvyšovalo s časem a se stoupající produkcí biomasy. Výrazná změna v kumulaci lipidů nastala mezi 5. a 22. hodinou kultivace. Největší zastoupení lipidů (40,8 %) vykazoval daný kmen ve 72. hodině kultivace. Po 72. hodině kultivace začalo procentuální zastoupení celkových lipidů v biomase klesat.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo provedení kultivací vybraných kmenů kvasinek v laboratorních podmínkách se zaměřením na využití odpadních substrátů. V rámci experimentů bylo dokázáno, že vybrané potravinářské odpadní substráty jsou vhodné pro kultivaci vybraných kmenů kvasinek. Experimenty se prováděly na následujících kmenech: *Rhodotorula kratochvilovae* (CCY 20-2-26), *Rhodosporidium toruloides* (CCY 62-2-4), *Cystofilobasidium macerans* (CCY 10-1-2), *Sporidiobolus pararoseus* (CCY 19-9-6), *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 20-9-7), *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 19-4-25), *Sporidiobolus metaroseus* (CCY 19-6-20). Kultivace probíhaly na médiích s obsahem odpadního kuřecího tuku, glycerolu a bazického pěrového hydrolyzátu.

Při kultivaci na C/N poměru 25 u kmene *Rhodotorula kratochvilovae* (CCY 20-2-26) byly pozorované lepší výsledky na médiích s použitím pěrového hydrolyzátu a to jsou: produkce biomasy, ubichinonu a ergosterolu. Zastoupení celkových lipidů a jednotlivých druhů mastných kyselin bylo větší při použití pěrového hydrolyzátu jako zdroje dusíku. Bylo zjištěno, že produkce lipidů daným kmenem přímo závisí na koncentraci použitého kuřecího tuku. Při kultivaci na C/N poměru 50 byla produkce biomasy větší na médiích bez přídavku hydrolyzátu. Ale produkce ubichinonu a ergosterolu byla výrazně větší na médiích s pěrovým hydrolyzátem.

U kmene *Rhodosporidium toruloides* (CCY 62-2-4) při použití C/N poměru 25 byla produkce biomasy větší na médiích bez přídavku hydrolyzátu. Také bylo zjištěno, že produkce biomasy přímo závisí na koncentraci kuřecího tuku na médiích bez hydrolyzátu a obráceně na médiích s hydrolyzátem. Produkce celkových lipidů a jednotlivých druhů mastných kyselin byla téměř stejná na obou typech médií, větší ale byla při kultivaci na C/N poměru 50. Nápodobně byla pozorovaná obrácená závislost produkce biomasy daného kmene na koncentraci kuřecího tuku při kultivaci na C/N poměru 50. Ubichinon a ergosterol daný kmen produkoval ve větších množstvích na médiích s pěrovým hydrolyzátem a větším C/N poměrem.

Kmen *Cystofilobasidium macerans* (CCY 10-1-2) vykazoval lepší výsledky při kultivaci na C/N poměru 25. Produkce biomasy stoupala s klesající koncentrací kuřecího tuku, a to na obou typech médií, větší ale byla na médiích s přídavkem pěrového hydrolyzátu. Produkce ubichinonu a ergosterolu byla výrazně větší na médiích s přídavkem hydrolyzátu. Produkce celkových karotenoidů byla vyšší na médiích bez hydrolyzátu.

U kmene *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 19-4-25) byly zaznamenány lepší výsledky produkce biomasy na C/N poměru 50 a to na médiích s přídavkem pěrového hydrolyzátu. Ale produkce jednotlivých druhů mastných kyselin a celkových lipidů byla lepší na C/N poměru 25 u obou typů médií. Daný kmen jako jediný produkoval lykopen na obou C/N poměrech a na všech typech médií. Produkce celkových karotenoidů byla větší na médiích bez hydrolyzátu při kultivaci na C/N poměru 25 a na médiích s přídavkem pěrového hydrolyzátu při kultivaci na C/N poměru 50. Produkce ubichinonu a ergosterolu byla větší u médií bez hydrolyzátu na C/N poměru 25 a u médií s přídavkem hydrolyzátu na C/N poměru 50.

Kmen *Sporidiobolus metaroseus* (CCY 19-6-20) vykazoval lepší produkci biomasy a ubichinonu a ergosterolu při kultivaci na C/N poměru 50. Produkce celkových lipidů a jednotlivých druhů mastných kyselin byla lepší na obou C/N poměrech u médií s přidavkem pěřového hydrolyzátu. Na C/N poměru 25 s klesající koncentrací kuřecího tuku roste celkové zastoupení lipidů, naopak na C/N poměru 50 se zastoupení celkových lipidů snižuje s klesající koncentrací kuřecího tuku.

Kmen *Sporidiobolus pararoseus* (CCY 19-9-6) vykazoval lepší výsledky produkce biomasy, ubichinonu, ergosterolu a produkci celkových karotenoidů na obou typech média při kultivaci na C/N poměru 25. Produkce jednotlivých druhů mastných kyselin a celkových lipidů byla větší na obou typech média a C/N poměru 50. Zároveň se zastoupení lipidů snižovalo s klesající koncentrací kuřecího tuku na obou typech média. Na C/N poměru 25 byla produkce celkových lipidů větší na médiích s přidavkem pěřového hydrolyzátu.

U kmene *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 20-9-7) byly lepší výsledky produkce biomasy, ubichinonu a ergosterolu při kultivaci na C/N poměru 25 a 50, ale při kultivaci na C/N poměru 25 byla produkce celkových karotenoidů výrazně větší, a to na médiích s přidavkem pěřového hydrolyzátu. Procentuální zastoupení celkových lipidů a jednotlivých druhů mastných kyselin bylo větší na obou typech média při kultivaci na C/N poměru 50. Zároveň na médiích s přidavkem pěřového hydrolyzátu stoupala produkce lipidů s klesající koncentrací kuřecího tuku.

Největší produkci biomasy (30,1 g/l) měl kmen *Sporidiobolus pararoseus* (CCY 19-9-6), ale daný kmen nevykazoval dostatečné nárůsty biomasy na pevných médiích (při očkování z Petriho misek). Proto byl pro fermentorovou kultivaci zvolen kmen *Rhodospiridium toruloides* (CCY 62-2-4) a C/N poměr 50. Největší produkci biomasy (34,92 g/l) daný kmen vykazoval na konci kultivace ve 144. hodině, zároveň byla v tomto čase největší produkce ubichinonu (12,1 mg/g biomasy). Produkce ergosterolu se po celou dobu fermentorové kultivace téměř neměnila, stejně jako procentuální zastoupení jednotlivých druhů mastných kyselin. Produkce celkových lipidů dosáhla svých největších hodnot (40,8 %) v 72. hodině kultivace a potom začala mírně klesat.

Fermentorová kultivace by mohla sloužit jako model pro velkoobjemové využití těchto odpadů při průmyslových kultivacích karotenogenních kvasinek. Pro důkladnější prozkoumání této problematiky by bylo vhodné provést další sérii experimentů v laboratorním bioreaktoru, formou zdokonalení a optimalizace kultivací pro produkci biomasy a metabolitů na odpadních substrátech ze zpracování drůbeže. Dále by bylo vhodné otestovat ve fermentorových podmínkách více kvasinkových karotenogenních kmenů, zdali by dosahovaly srovnatelných či vyšších výtěžků sledovaných metabolitů a biomasy, než tomu bylo u kvasinky *Rhodospiridium toruloides*.

7 LITERATURA

- [1] JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVIÁ. *Úvod do biologie kvasinek*. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-990-1.
- [2] MCCLARY, Dan O. The cytology of yeasts. *The Botanical Review*. 1964, **30**(2). ISSN 0006-8101. Dostupné z: doi:10.1007/BF02858602
- [3] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. Bratislava: Alfa, 1982. Edícia potravinárskej literatúry (Alfa).
- [4] HARTMANN, Christoph a Antonio DELGADO. Stress And Strain in a Yeast Cell Under High Hydrostatic Pressure. *PAMM*. 2004, **4**(1), 316-317. ISSN 1617-7061. Dostupné z: doi:10.1002/pamm.200410139
- [5] KURTZMAN, Cletus a J.W. FELL. *The Yeasts - A Taxonomic Study*. 4. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1998. ISBN 0-444-81312-8.
- [6] MCNAB, Brian K. What determines the basal rate of metabolism?. *Journal of Experimental Biology*. ISSN 1477-9145. Dostupné z: doi:10.1242/jeb.205591
- [7] CEZARE-GOMES, Eleane, Lauris MEJIA-DA-SILVA, Lina PÉREZ-MORA, Marcelo MATSUDO, Livia FERREIRA-CAMARGO, Anil SINGH a João DE CARVALHO. Potential of Microalgae Carotenoids for Industrial Application. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2019, **188**(3), 602-634. ISSN 0273-2289. Dostupné z: doi:10.1007/s12010-018-02945-4
- [8] BÖHM, Volker. *Carotenoids*. 1. Basel, Switzerland: MDPI, 2019. ISBN 978-3-03921-864-6.
- [9] TIMMINS, John, Heinrich KROUKAMP, Ian PAULSEN a Isak PRETORIUS. The Sensory Significance of Apocarotenoids in Wine: Importance of Carotenoid Cleavage Dioxygenase 1 (CCD1) in the Production of β -Ionone. *Molecules*. 2020, **25**(12). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25122779
- [10] BRITTON, George. Carotenoid research: History and new perspectives for chemistry in biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2020, **1865**(11). ISSN 13881981. Dostupné z: doi:10.1016/j.bba-lip.2020.158699
- [11] LIU, George, Anthony ESSEX, John BUCHANAN, Vivekanand DATTA, Hal HOFFMAN, John BASTIAN, Joshua FIERER a Victor NIZET. Staphylococcus aureus golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *Journal of Experimental Medicine*. 2005, **202**(2), 209-215. ISSN 1540-9538. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20050846

- [12] HLÚBIK, Pavol a Libuše OPLTOVÁ. *Vitaminy*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0373-4.
- [13] KLOUDA, Pavel. *Biochemie zblízka*. Ostrava: Pavko, 2012. ISBN 978-808-6369-211.
- [14] BLOOR, W. R. Outline of a classification of the lipoids. *Experimental Biology and Medicine*. 1920, **17**(6), 138-140. ISSN 1535-3702. Dostupné z: doi:10.3181/00379727-17-75
- [15] BERG, Jeremy, John TYMOCZKO a Lubert STRYER. *Biochemistry*. 6th ed. New York: Freeman, 2007. ISBN 978-0-7167-8724-2.
- [16] MATOUŠ, Bohuslav. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén, 2010. ISBN 978-80-7262-702-8.
- [17] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [18] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [19] VOET, Donald a Judith VOET. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0544-9.
- [20] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. Jinočany, 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- [21] BHATTACHARYA, Somanon. Ergosterol Synthesis. *Encyclopedia of Mycology*. Elsevier, 2021, 230-238. ISBN 9780323851800. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-819990-9.00070-6
- [22] VOIGT, J. Physiology and Biochemistry of Sterols. Ed. by G. W. Patterson and W. D. Nes. 395 pages, numerous tables. American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois, 1991. Price: 80,- \$ (for members 60,- \$). *Food / Nahrung*. 1992, **36**(4), 424-424. ISSN 0027769X. Dostupné z: doi:10.1002/food.19920360437
- [23] DOHNAL, Vlastimil, Alena JEŽKOVÁ a Jiří SKLÁDANKA. Ergosterol: Klíčový steroid hub. *Kontakt*. 2009, **10**(2), 449-454. ISSN 12124117. Dostupné z: doi:10.32725/kont.2008.066
- [24] KAWAMUKAI, Makoto. Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2002, **94**(6), 511-517. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1016/S1389-1723(02)80188-8
- [25] O'BRIEN, Richard D. *Fats and Oils*. Dostupné z: doi:10.1201/9781420061673

- [26] JANŠTOVÁ, Bohumíra. *Technologie mléka a mléčných výrobků*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012. ISBN 978-80-7305-635-3.
- [27] BENESOVA, P., D. KUCERA, I. MAROVA a S. OBRUCA. Chicken feather hydrolysate as an inexpensive complex nitrogen source for PHA production by *Cupriavidus necator* on waste frying oils. *Letters in Applied Microbiology*. 2017, **65**(2), 182-188. ISSN 02668254. Dostupné z: doi:10.1111/lam.12762
- [28] KORNIŁOWICZ-KOWALSKA, Teresa a Justyna BOHACZ. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Management*. 2011, **31**(8), 1689-1701. ISSN 0956053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2011.03.024
- [29] STIBOROVA, Hana, Barbora BRANSKA, Tereza VESELA et al. *Transformation of raw feather waste into digestible peptides and amino acids*. 2016, **91**(6), 1629-1637. ISSN 02682575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.4912
- [30] EASTERLING, Emily, W. FRENCH, Rafael HERNANDEZ a Margarita LICHA. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology*. 2009, **100**(1), 356-361. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2008.05.030
- [31] MOOIMAN, Christiaan, Jonna BOUWKNEGT, Wjib DEKKER, Sanne WIERSMA, Raúl ORTIZ-MERINO, Erik DE HULSTER a Jack PRONK. Critical parameters and procedures for anaerobic cultivation of yeasts in bioreactors and anaerobic chambers. *FEMS Yeast Research*. 2021, **21**(5). ISSN 1567-1364. Dostupné z: doi:10.1093/femsyr/foab035
- [32] KAŠTÁNEK, František. *Bioinženýrství*. Praha: Academia, 2001. ISBN 80-200-0768-7.
- [33] PÁČA, J. Bioreactors. I. Classification of reactors. *Kvasny Prumysl*. 1987, **33**(1), 20-21. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp1987006
- [34] SOMMER, Lumír. *Teoretické základy analytické chemie III*. Brno: Vysoké učení technické, 1995. ISBN 80-214-0660-7.
- [35] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-.
- [36] KROFTA, Jiří. *Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie 2*. Vyd. 6. přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0451-3.
- [37] What is HPLC?. In: *SHIMADZU* [online]. Japan: Shimadzu Corporation [cit. 2022-05-19]. Dostupné z: https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

FSA	nasyčené mastné kyseliny
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MK	mevalonát kináza
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
UV	ultrafialové záření
C/N poměr	poměr uhlíku k dusíku
PDA	detektor diodového pole
FID	plamenově ionizační detektor
CoA	koenzym A
GLY	glycerol
TUK	kuřecí tuk
P	péřový hydrolyzát
VIS	viditelné záření
ACP	Acyl Carrier Protein