



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# VYUŽITÍ ODPADŮ MLÉKÁRENSKÉHO PRŮMYSLU PRO PRODUKCI OBOHACENÉ KVASINKOVÉ BIOMASY

UTILIZATION OF DAIRY INDUSTRY WASTE FOR THE PRODUCTION OF ENRICHED YEAST BIOMASS

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Erika Laššová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.

BRNO 2023

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1814/2022 Akademický rok: 2022/23  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Erika Laššová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Biochemická technologie  
Vedoucí práce: **Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Využití odpadů mlékárenského průmyslu pro produkci obohacené kvasinkové biomasy

### Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše k tématu karotenogenních kvasinek a jejich využití pro biotransformaci potravinářských odpadů.
2. Optimalizace předúpravy mlékárenské syrovátky pro biotechnologické využití
3. Screeningové kultivace vybraných kvasinek na médiích obsahujících syrovátku či její jednotlivé komponenty
4. Provedení poloprovozní fermentorové kultivace
5. Analýza produkované biomasy a vyhodnocení výsledků

### Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

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

-----  
Erika Laššová  
studentka

Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.  
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Táto bakalárska práca sa zaoberá produkciou mikrobiálnej biomasy vybratých kmeňov karoténoidných kvasiniek na odpadnom produkte mliekarenských výrob – srvátky. Cieľom práce bolo nakultivovať vybraté kmene karoténoidných kvasiniek na srvátkovom médiu s prídavkom enzýmov laktázy a proteázy. V tejto práci boli sledované tieto kvasinkové kmene: *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodotorula kratochvilovae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporidiobolus metaroseus*, *Cystofilobasidium macerans*. Práca je rozdelená na dve hlavné časti. V teoretickej časti sú popísané vybrané kmene kvasiniek a ich metabolity, použitý odpadný substrát – srvátka a jej využitie na kultiváciu mikroorganizmov. Taktiež je stručne popísaná charakteristika enzýmov a chromatografické metódy plynovej a kvapalinovej chromatografie. Praktická časť sa zaoberá kultiváciou vybraných mikroorganizmov na využitom odpadnom substráte – srvátky s pridaním enzýmov laktázy a proteázy. Nakultivovaná biomasa bola ďalej analyzovaná na plynovej a kvapalinovej chromatografii, kde bol stanovovaný obsah mastných kyselín, karoténoidov, ergosterolu a ubichinonu.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

Karoténogénne kvasinky, karoténoidy, ergosterol, ubichinon, srvátka, enzýmy

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis deals with the production of microbial biomass of selected carotenoid yeast strains on the waste product of dairy production - whey. The aim of the work was to cultivate selected carotenoid yeast strains on whey medium with the addition of lactase and protease enzymes. The following yeast strains were studied in this work: *Rhodospodium toruloides*, *Rhodotorula kratochvilovae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporidiobolus metaroseus*, *Cystophilobasidium macerans*. The thesis is divided into two main parts. The theoretical part describes the selected yeast strains and their metabolites, the waste substrate used - whey and its use for cultivation of microorganisms. In addition, there is also briefly described the characteristics of enzymes and chromatographic methods of gas and liquid chromatography. The practical part deals with the cultivation of selected microorganisms on the used waste substrate - whey with the addition of lactase and protease enzymes. The cultured biomass was further analyzed by gas and liquid chromatography to determine the content of fatty acids, carotenoids, ergosterol and ubiquinone.

## **KEY WORDS**

Carotenogenic yeasts, carotenoids, ergosterol, ubiquinone, whey, enzymes



LAŠŠOVÁ, Erika. *Využití odpadů mlékárenského průmyslu pro produkci obohacené kvasinkové biomasy* [online]. Brno, 2023 [cit.2023-05-15]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149103>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Martin Szotkowski.

### **Čestné prehlásenie**

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....  
podpis študenta

### **Pod'akovanie**

Rada by som touto formou prejavila vďaku svojmu vedúcemu práce Ing. Martinu Szotkowskému Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady a pomoc pri vypracovaní tejto bakalárskej práce. Moja vďaka patrí tiež aj konzultantovi Ing. Jiřímu Holubovi za rady a usmernenie, ktoré dopomohli k vypracovaniu tejto bakalárskej práce.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	9
2	TEORETICKÁ ČASŤ .....	10
2.1	Kvasinky .....	10
2.1.1	Kvasinky .....	10
2.1.2	Cytológia.....	10
2.1.3	Rozmnožovanie.....	11
2.1.4	Karoténogénne kvasinky .....	11
2.1.4.1	Rod Cystofilobasidium .....	11
2.1.4.2	Rod Rhodotorula .....	12
2.1.4.3	Rod Rhodosporidium .....	12
2.1.4.4	Rod Sporidiobolus.....	13
2.2	Metaboly.....	13
2.2.1	Karotény.....	13
2.2.1.1	Štruktúra karoténoidov .....	13
2.2.1.2	Biosyntéza karoténoidov .....	14
2.2.1.3	Karotény .....	16
2.2.2	Lipidy .....	16
2.2.2.1	Biologická funkcia a delenie lipidov.....	16
2.2.2.2	Mastné kyseliny .....	17
2.2.2.3	Biosyntéza mastných kyselín.....	17
2.2.2.4	$\beta$ oxidácia.....	19
2.2.2.5	Ubichinon .....	19
2.2.2.6	Ergosterol.....	19
2.3	Kultivácia .....	20
2.3.1	Kultivácia kvasiniek .....	20
2.3.2	Rastová krivka.....	20
2.3.3	Bioreaktor .....	20
2.4	Odpadný substrát .....	21
2.4.1	Srvátka.....	21
2.5	Úprava substrátu .....	21
2.5.1	Enzýmy.....	21
2.5.1.1	Laktáza .....	21

2.5.1.2	Proteáza .....	21
2.6	Analytické postupy .....	22
2.6.1	Chromatografia .....	22
2.6.2	Plynová chromatografia.....	22
2.6.3	Vysokoučinná kvapalinová chromatografia .....	22
3	CIEĽ PRÁCE .....	24
4	PRAKTICKÁ ČASŤ .....	25
4.1	Chemikálie.....	25
4.2	Pomôcky a prístroje .....	25
4.2.1	Prístrojová technika a pomôcky pre kultiváciu kvasiniek .....	25
4.2.2	Prístrojová technika a pomôcky pre izoláciu a analýzu karotenoidov a lipidov.....	26
4.3	Druhy kvasiniek .....	26
4.4	Predpríprava odpadného substrátu.....	27
4.4.1	Srvátka.....	27
4.5	Kultivácia kvasiniek v malom objeme .....	27
4.5.1	Podmienky pri kultivácii .....	27
4.5.2	Inokulom I a II .....	27
4.5.3	Kultivácia v produkčných médiách.....	27
4.6	Kultivácia vo fermentore.....	28
4.6.1	Podmienky .....	28
4.6.2	Príprava inokúl a produkčného média.....	28
4.6.3	Odbery z fermentora.....	29
4.7	Spracovanie vzoriek biomasy .....	29
4.7.1.1	Príprava biomasy.....	29
4.7.2	Príprava vzoriek na analýzu.....	29
4.7.2.1	Príprava vzoriek na plynový chromatograf .....	29
4.7.2.2	Analýza na plynovom chromatograme.....	29
4.7.2.3	Príprava vzoriek na kvapalinovú chromatografiu .....	30
4.7.2.4	Analýza na kvapalinovej chromatografii.....	30
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	31
5.1	Stanovenie rastových vlastností vybratých kultúr .....	31
5.1.1	<i>Rhodotorula kratochvilovae</i> (CCY 20-2-26).....	31
5.1.2	<i>Rhodosporidium toruloides</i> (CCY 062-002-001) .....	34

5.1.3	<i>Cystofilobasidium macerans</i> (CCY 10-1-2).....	37
5.1.4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCY 19-4-6).....	40
5.1.5	<i>Sporidiobolus metaroseus</i> (CCY 19-9-6).....	43
5.1.6	<i>Rhodoturula mucilagiosa</i> (CCY 20-9-7).....	46
5.2	Stanovenie rastových vlastností v čase kultivácie vo fermentore.....	49
6	ZÁVER .....	52
7	ZDROJE POUŽITEJ LITERATÚRY .....	53
8	ZOZNAM SKRATIEK.....	57

# 1 ÚVOD

Výroba syru a mliečnych výrobkov začala už pred tisíckami rokov. Okrem produkcie sa vyprodukuje aj nespočetné množstvo odpadných substrátov, najmä srvátky, ktorú je treba nejako ďalej spracovať. Zo srvátky sa teda stáva lacný a účinný substrát pre rôzne mikroorganizmy. Niektoré druhy kvasiniek, ako napríklad karoténoidné kvasinky dokážu tento odpadný substrát spracovať a premeniť ho na využiteľné látky ako sú karoténoidy, rôzne steroly a nenasýtené mastné kyseliny.

Nenasýtené mastné kyseliny sú dôležitými zložkami, ktoré pomáhajú zlepšovať zdravie srdcového a cievneho systému a znižovať hladinu cholesterolu v krvi. Steroly sú antioxidantné látky s priaznivými účinkami na srdcové zdravie a cholesterol. Karoténoidy sú prírodné farbivá, ktoré majú antioxidantové účinky a pomáhajú chrániť bunky pred oxidačným stresom. Mnohé karoténoidy sú prekursorom vitamínu A. Tiež pomáhajú pri zlepšení funkcie pečene a majú protizápalové účinky na organizmus. Ich dopyt a využitie sa každým rokom navyšuje a je žiadaný nielen v potravinárskom a farmaceutickom priemysle, ale aj v kozmetike a výživových doplnkoch. Vďaka pozitívnym účinkom na zdravie a krásu sa stávajú nevyhnutnou súčasťou zdravého životného štýlu.

## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

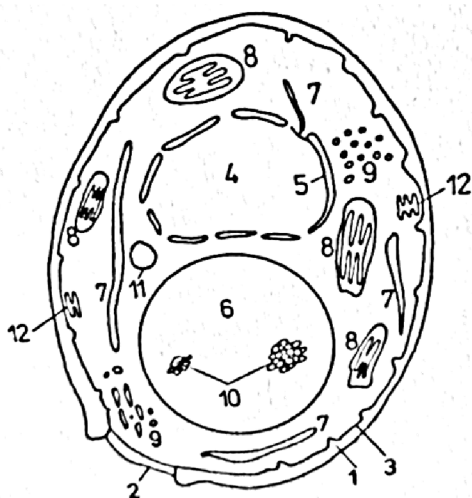
### 2.1 Kvasinky

#### 2.1.1 Kvasinky

Kvasinky sú heterotrofné eukaryotické organizmy, ktoré patria do ríše *fungi*. Tvar buniek je najčastejšie elipsoidný, vajcový, alebo guľový. Je to následkom vegetatívneho rozmnožovania – pučania prípadne delenia a do určitej miery aj kultivačnými podmienkami a vekom buniek. Vplyvom prostredia majú kvasinkové bunky tendenciu zhlukovať sa a klesať na dno nádoby. Zmenšením svojho permeabilného povrchu sa bránia proti nepriaznivej látkovej výmene z média. [1,2].

#### 2.1.2 Cytológia

Vegetatívna kvasinková bunka má na povrchu bunkovú stenu silnej a pevnej štruktúry. Tento útvar ju chráni pred mechanickým poškodením a osmotickým tlakom. Na povrchu bunkovej steny sa nachádzajú jazvy po pučaní. Cytoplazmatická membrána pod bunkovou stenou má polopriepustný charakter, ktorý umožňuje bunke import živiny a export splođín či už aktívne, alebo pasívne. Pod týmito biomembránami sa nachádza vnútorné prostredie bunky s cytoplazmou a bunkovým jadrom a organelami. Cytoplazma sa počas života bunky mení. U mladých buniek sa javí ako priehľadná, homogénna hmota. U starších sa začínajú objavovať zrníčka s menšou alebo väčšou vakuolizáciou. Jadro je od cytoplazmatickej membrány oddelené dvomi membránami. Obsahuje chromozómy, čiže obsahuje genetickú informáciu bunky. Medzi najvýznamnejšie organely patria mitochondrie, endoplazmatické retikulum, vakuoly a Golgiho aparát. Mitochondrie sú semiautonómne organely s dvomi membránami, v ktorých sa nachádzajú dýchacie enzýmy a systémy oxidačnej fosforilácie. Endoplazmatické retikulum sa nachádza v blízkosti jadra a je tvorené sústavou membrán a kanálikov. Na jej povrchu sú polyzómy a agregáty ribozómov, v ktorých prebieha proteosyntéza. Vakuoly slúžia ako úložisko niektorých látok ako sú draselné ióny, puríny, aminokyseliny a ďalšie. Zároveň v nich dochádza k rozkladu látok s krátkym medzičasom rozpadu. Význam Golgiho aparátu pozostáva v transporte prekurzorov bunkovej steny, z cytoplazmy, cez cytoplazmatickú membránu [1].



1. Bunková stena
2. Jazva zrodu
3. Cytoplazmatická membrána
4. Jadro
5. Jadrová membrána
6. Vakuola
7. Endoplazmatické reticulum
8. Mitochondrie
9. Glykogén
10. Polymetafosfát (Volutín)
11. Lipidy
12. Golgiho aparát

Obrázok 1 Prierez kvasinkovou bunkou [1]

### 2.1.3 Rozmnožovanie

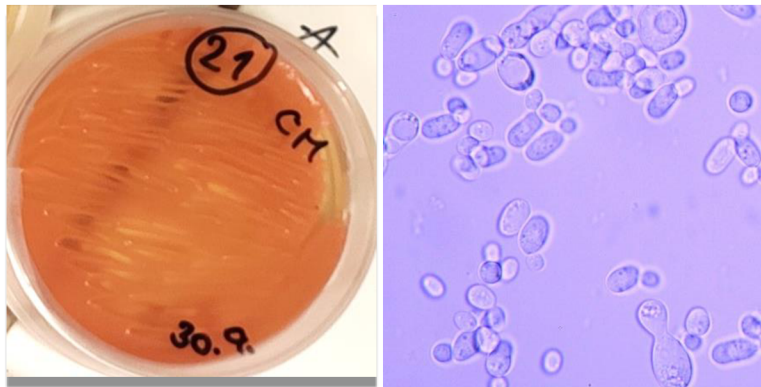
Kvasinky sa najčastejšie vegetatívne rozmnožujú pučaním. Po mitotickom delení a zdvojení bunecného materiálu vzniká dcérska bunka (pupeň), ktorá je spojená kanálikom. V niektorých prípadoch sa pupeň neoddelí od materskej bunky a zostanú spojené. Tieto bunky sa ďalej množia a vzniká reťazec buniek, takzvané pseudomycelium. Druhým spôsobom rozmnožovania kvasiniek je pohlavné rozmnožovanie pomocou spór. Obecné je charakterizované spájaním dvoch haploidných buniek, následným spájaním ich jadier, počas ktorého vznikajú diploidné jadrá. Vzniknuté diploidné jadrá sa delia meiózou na štyri haploidné jadrá, ktoré sú základom spór. [1, 2].

### 2.1.4 Karoténogénne kvasinky

Sú to kvasinky, ktoré majú svoj metabolizmus prispôsobený na produkciu červených farbív, teda karoténov. Karotény sú pigmenty žltého až červeného sfarbenia, rozpustné v tukoch, ale nerozpustné vo vode. Nachádzajú sa na vnútornej strane cytoplazmatickej membrány. Medzi producentov karotenoidov patria najmä kvasinky z oddelenia *Basidiomycotina*, kam patria rody: *Rhodototula*, *Rhodospórídium*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces* a *Cystofilobasidium* [3].

#### 2.1.4.1 Rod *Cystofilobasidium*

Kvasinky tohto rodu vytvárajú karotenoidy, ktorých kombinácia podmieňuje ich jasne oranžové, ružovo - lososové až škoricové sfarbenie. Tvar buniek je vajcovitý až predĺžený. K nepohlavnému rozmnožovaniu dochádza polárnym pučaním. Niektoré druhy vytvárajú pseudohýfy. Počas pohlavného rozmnožovania sa vytvára pravé mycélium. V telomorfnom stave sa na mycelium vytvárajú interkalárne, guľovité, hrubostenné tmavo sfarbené probazídie. Medzi najznámejšie druhy tohto rodu patria: *Cystofilobasidium bisporidii*, *Cystofilobasidium macerans* [7].



Obrázok 2 Kultúra na Petriho miske a záznam z mikroskopu kvasinky *Cystofilobasidium macerans*

#### 2.1.4.2 Rod *Rhodotorula*

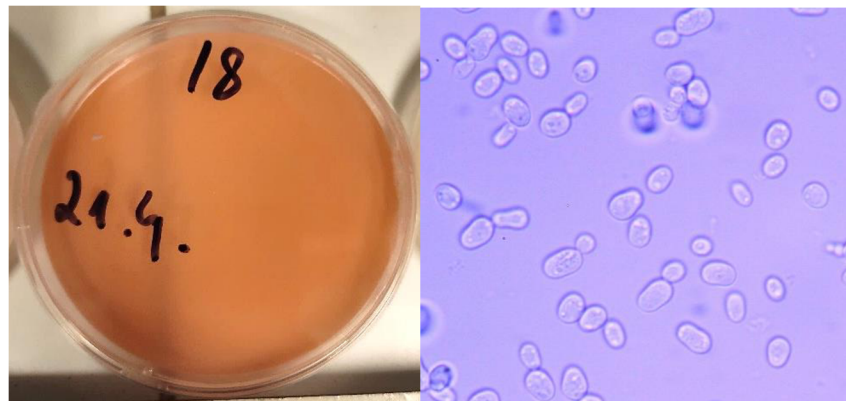
Bunky tohto rodu sú guľovité, vajcovité alebo predĺžené. Syntetizujú žlté alebo červené pigmenty. Nepohlavné rozmnožovanie prebieha mnohostranným alebo polárnym pučaním. Netvorí balistokonídie. U väčšiny druhov chýba schopnosť asimilovať inozitol a úplne chýba fermentačná schopnosť [8].



Obrázok 3 Kultúra na Petriho miske kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*

#### 2.1.4.3 Rod *Rhodosporidium*

Kolónie týchto druhov kvasiniek majú ružovú až oranžovú farbu. Tvar bunky je premenlivý od guľovitého, vajcovitého až predĺženého. Nepohlavné rozmnožovanie je zabezpečené mnohostranným pučaním alebo pučaním na póloch. Netvorí balistokonídie. Niektoré druhy sa správajú heterotalicky, iné sa dokážu oplodniť samé. Výsledkom je vznik dikaryotidneho mycélia so svorkovými spojmi. Patria sem napríklad druhy: *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodosporidium kratochvilovae* a *Rhodosporidium lusitaniae* [9, 10].

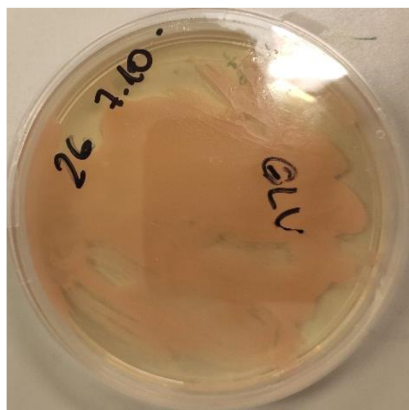


Obrázok 4 Kultúra na Petriho miske a záznam z mikroskopu kvasinky *Rhodosporidium toruloides*



#### 2.1.4.4 Rod *Sporidiobolus*

Tvar buniek je vajcovitý, elipsoidný, alebo predĺžený. Farba je oranžová, ružová až červená. Nepohlavne sa rozmnožujú pučaním a balistokonídie sa vytvárajú na jednoduchých a rozvetvených sterigmatách. Pohlavné rozmnožovanie môže byť heterotalické i homotalické. Pri heterotalickom rozmnožovaní vzniká dikaryotické mycélium konjugáciou kompatibilného párového páru. Pri homotalickom sa vyvíjajú hýfy s telospórmi. Výsledkom klíčenia telospór je metabazídium s diploidnými bazidiospórmi. Fermentačný metabolizmus úplne chýba. Patria sem napríklad druhy: *Sporidiobolus pararoseus*, *Sporidiobolus metaroseus*, alebo *Sporidiobolus johnsonii* [11, 12].



Obrázok 5 Kultúra na Petriho miske kvasinky *Sporidiobolus metaroseus*

## 2.2 Metabolity

### 2.2.1 Karoténoidy

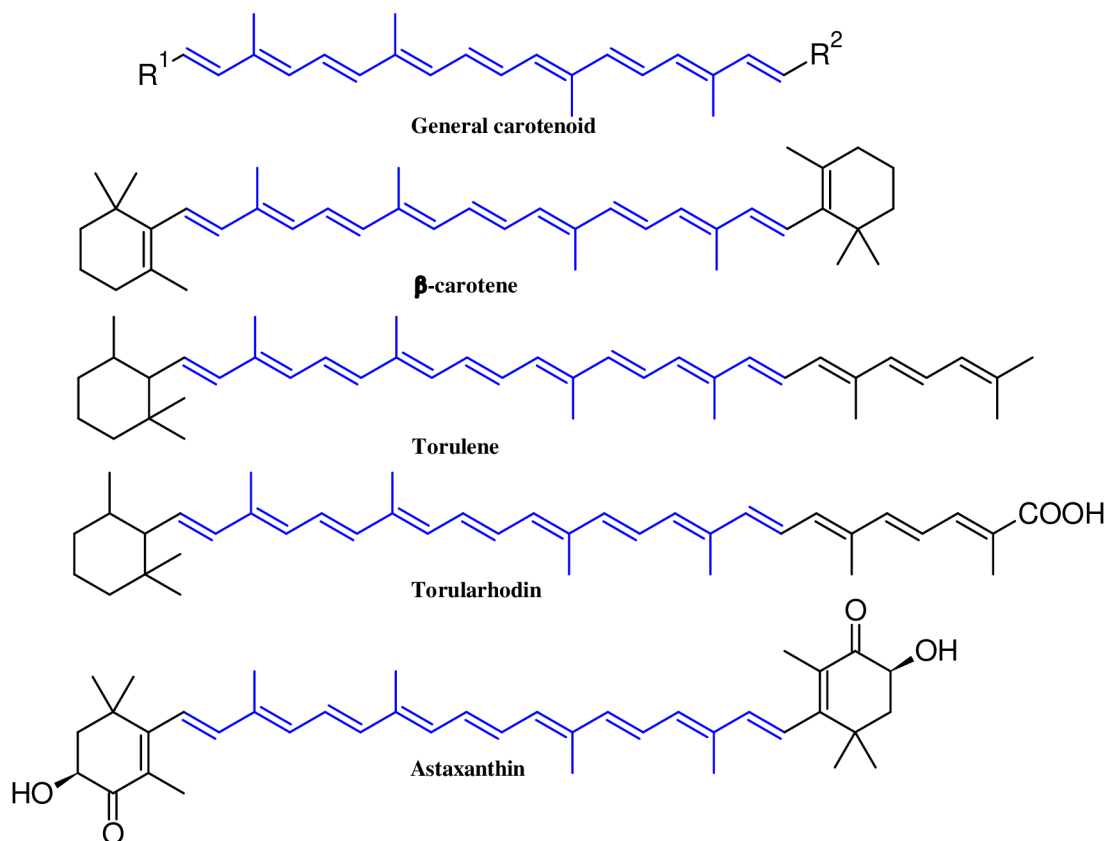
Karoténoidy predstavujú skupinu cenných molekúl široko využívaných v rôznych odvetviach medzi ktoré patrí najmä potravinársky, farmaceutický a krmný priemysel. Sú prekurzormi vitamínu A a farbivami. Pôsobia ako veľmi dobré antioxidanty, ktoré zachytávajú kyslíkové a peroxidové radikály. Ľudský organizmus si karoténoidy nedokáže vytvárať sám, musí ich prijímať v potrave alebo vo výživových doplnkoch. Sú však syntetizované organizmami, ako sú rastliny, mikroriasy, cyanobaktéria a kvasinky. V bunke sa nachádzajú na vnútornej strane cytoplazmatickej membrány, kde chránia bunky pred poškodením svetlom. Rozmanitosť štruktúr a biosyntetických dráh karoténoidov je ovplyvnená vonkajším prostredím. Podmienky ako pH, teplota, koncentrácia solí, množstvo rozpusteného kyslíka priamo ovplyvňujú reguláciu biosyntetických dráh karoténoidov. V stresových podmienkach sú karoténoidy prostriedkom obranného mechanizmu [3,4,5,6].

#### 2.2.1.1 Štruktúra karoténoidov

Karoténoidy patria medzi terpenoidy, ktorých základnou jednotkou je 2 – metyl - 1,3 – butadién. Centrálna časť je zložená z dlhého uhlíkovodíkového reťazca s konjugovanými dvojnými väzbami. Karoténoidy sa rozdeľujú na dve skupiny, a to na karotény a xantofyly. Ich rozdiel spočíva v prítomnosti rôznych kyslíkatých funkčných skupín, ako sú napríklad epoxy, metoxy, hydroxy, u xantofylov [4, 13].

Podľa cyklizácie na koncových častiach reťazca sa delia na:

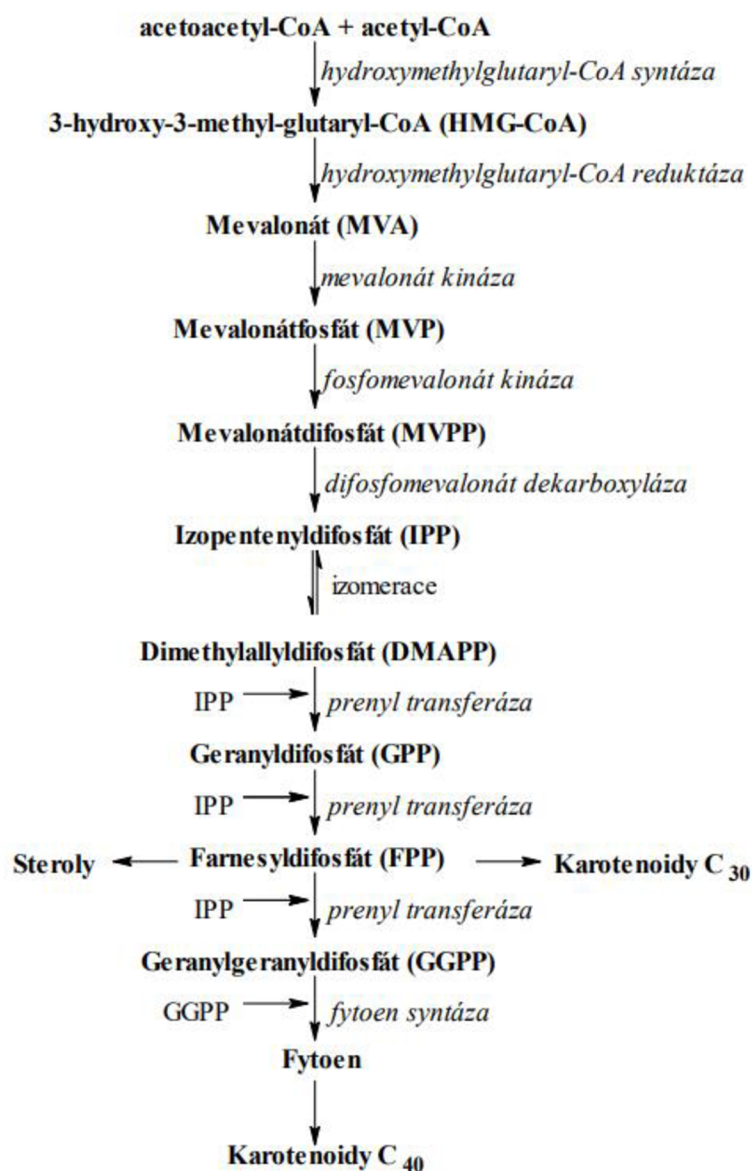
- Acyklické ( Tvorené lineárnym reťazcom, napríklad Lykopén)
- Monocyklické ( Na jednej strane je vytvorený päť-uhlíkatý, alebo šesť-uhlíkatý cyklus, napríklad torulén)
- Bicyklické (Na oboch stranách je zakončenie cyklom, napríklad  $\beta$  – karotén)[3].



Obrázok 6 Štruktúra vybraných karoténoidov [15]

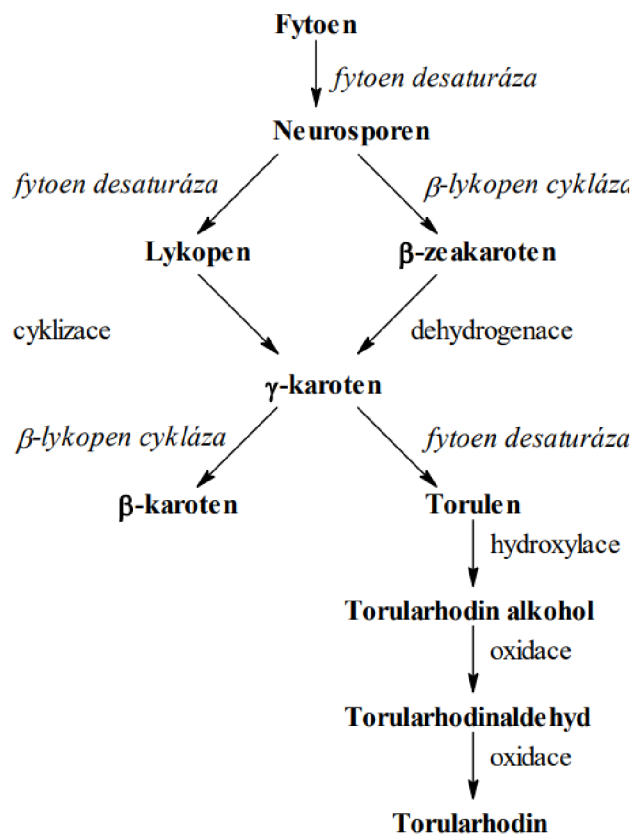
### 2.2.1.2 Biosyntéza karoténoidov

Karoténoidy sú produktom sekundárneho metabolizmu počas izoprenovej dráhy. Sú derivátmi univerzálnych päť-uhlíkatých prekursorov, konkrétne izopentenylpyrofosfátu (IPP) a dimetylallylpyrofosfátu (DMAPP). Existujú dve cesty syntézy: Mevalonátová (MVA) dráha a 2-C-metyl-D-erytritol-4-fosfátová (MEP) dráha. Kvasinky výlučne využívajú MVA dráhu. Biosyntéza mevalónovej dráhy začína kondenzáciou dvoch molekúl acetyl-CoA na acetoacetyl-CoA a pokračuje ďalšou kondenzáciou na medziprodukt  $\beta$ -hydroxymethylglutaryl-CoA. Ten sa ďalej redukuje na mevalonovú kyselinu, ktorá je prvým špecifickým prekursorom biosyntetickej cesty terpenoidov. Ďalej sa fosforyluje a následne dekarboxyluje a vznikajú molekuly isopentenyl difosfátu (IPP), alebo jeho izoméru dimethylallyldifosfátu (DMAPP). Postupným pripájaním troch molekúl IPP ku DMAPP vzniká hlavný produkt geranylgeranylpyrofosfát (GGPP). Redukčnou kondenzáciou dvoch GGPP vzniká fytoén, čo je najjednoduchší C<sub>40</sub> karoténoid [17,26,27].



Obrázok 7 Mechanizmus mevalonovej dráhy biosyntézy karoténoidov[15]

Syntéza samotných karoténoidov vedie cez fytoén. Ten podlieha desaturácií, čo vedie k vzniku lykopénu. Lykopén pôsobí ako prekursor cyklických karoténoidov. Cyklizáciou lykopénu vzniká  $\gamma$ -karotén, ktorý tvorí hlavný bod vetvenia. Z neho vznikajú rôznymi metabolickými reakciami ďalšie karoténoidy ako  $\beta$ -karotén, torulén. Thorularhodin vzniká následnou hydroxyláciou a oxidáciou torulénu.



Obrázok 8 Schéma biosyntézy vybraných karoténoidov [15]

### 2.2.1.3 Karotény

Karotény majú jednoduchú štruktúru, sú tvorené len uhlíkovým reťazcom. Sú lipofilné, bioaktívne látky, ktoré sú nerozpustné vo vode. Vďaka svojej polyénovej štruktúre sú výbornými antioxidantami, ktoré zachytávajú a eliminujú kyslíkové radikály z prostredia. Sú nestabilné voči oxidácii, teplu a svetlu vďaka štruktúre konjugovanej dvojnej väzby, ktorá je bohatá na elektróny. [4, 14, 16].

### 2.2.2 Lipidy

Pod označenie lipidy spadá široké spektrum látok, ktorých spoločným znakom je prevaha veľkých nepolárnych uhlíkových štruktúr v molekule, ktoré dodávajú lipidom typickú olejovitou až voskovú povahu. Jedná sa o nepolárne molekuly rozpustné v organických rozpúšťadlách, ale nerozpustných vo vode [18].

### **2.2.2.1 Biologická funkcia a delenie lipidov**

Lipidy rozdeľujeme na jednoduché a zložité. Medzi jednoduché patria triacylglyceroly, ktoré majú vysoký obsah vodíku a živín a sú teda aj energeticky najbohatšie. Skladajú sa z troch mastných kyselín spojených s glycerolom esterovou väzbou. V organizmoch slúžia ako hlavné zásobné látky. Medzi zložité lipidy patria fosfoacylglyceroly, sfingolipidy a ďalšie komplexné zlúčeniny ako lipoproteíny alebo glykolipidy. Fosfolipidy a steroly sa orientujú do monovrstiev a dvojvrstiev a vytvárajú štruktúrne jadro biomembrán. Tvoria až polovicu celkového zloženia biomembrány. Biologická funkcia lipidov je veľmi rozmanitá. Ostatné lipidy hrajú dôležitú rolu ako napríklad enzýmy, kofaktory, elektrónové prenášače a ďalšie [18,28].

### **2.2.2.2 Mastné kyseliny**

Mastné kyseliny sú základné súčasti lipidov. Jedná sa o alifatické monokarboxylové kyseliny s dlhými až na výnimky nevetvenými reťazcami tvorenými 4 až 26 atómami uhlíku. Voľne v prírode sa bežne nevyskytujú. V ich esterifikovanej forme sú však hlavnou zložkou rôznych lipidov. V prírode sa molekuly mastných kyselín vyskytujú zväčša s párnym počtom atómov uhlíka. V závislosti od počtu dvojných väzieb môžu byť nenasýtené, mononasýtené, alebo polynasýtené. [19].

Mononasýtené mastné kyseliny (MUFA) majú vo svojom reťazci jednu dvojnú väzbu. Sú to olejovité látky, ktorým sa pripisujú priaznivé účinky na srdcovocievny systém. Hlavným zástupcom je kyselina olejová. [19,35].

Polynasýtené mastné kyseliny (PUFA) obsahujú dve alebo viac nenasýtených dvojných väzieb v cis konformácií. Sú to kvapalné látky. Majú priaznivé protizápalové vlastnosti. Kvôli vyššiemu množstvu dvojných väzieb sú najnáchylnejšie k oxidácií. Príkladom polynasýtených mastných kyselín sú linolenová kyselina, alebo arachidonová kyselina. [19, 34]

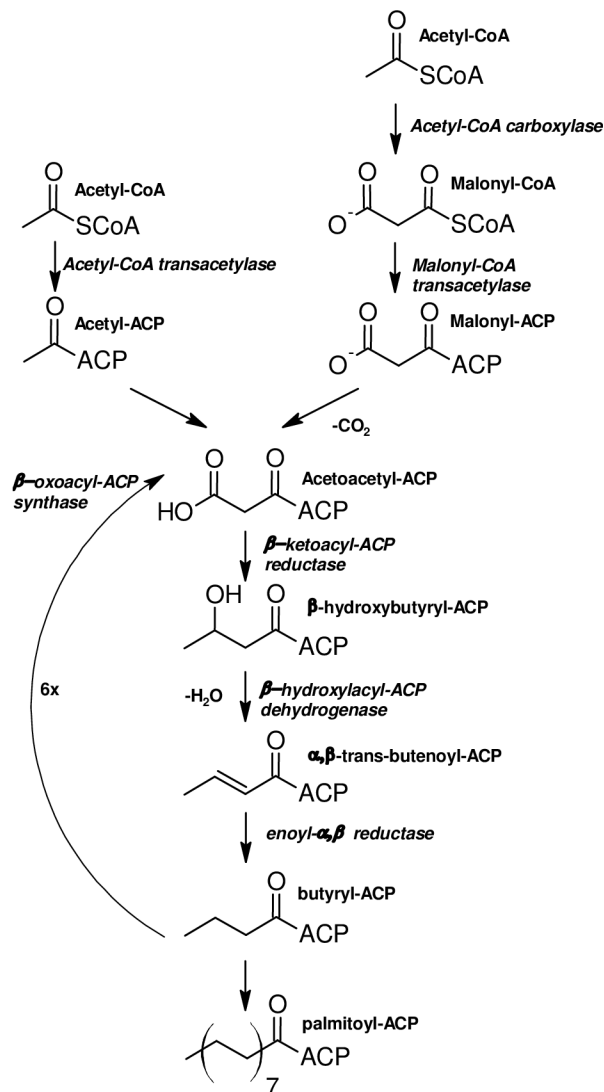
Nasýtené mastné kyseliny (SFA) v svojej štruktúre neobsahujú dvojnú väzbu. Vďaka tomu sú najstabilnejšie. Jedná sa o tuhé látky za izbovej teploty. Spája sa s nimi zvyšovanie cholesterolu v krvi. [19, 35]

### **2.2.2.3 Biosyntéza mastných kyselín**

Biosyntéza mastných kyselín alebo tiež označované ako lypogenéza, prebieha v bunkách v cytosole. Táto dráha neprebíha v organizme reverzibilne ich oxidáciou. Na syntéze mastných kyselín sa podieľa v bakteriálnych bunkách sedem nezávislých enzýmov. V kvasinkách a ďalších vyšších organizmoch túto rolu prevzal enzým *fatty acid synthase* (FAS), ktorý nahradzuje sedem samostatných enzýmov. Biosyntéza mastných kyselín je rozdeliteľná do troch fáz [19,20].

V prvom kroku syntézy mastných kyselín sa acetyl-CoA karboxyluje na malonyl-CoA za prítomnosti acetyl-CoA-karboxylázy a hydrogénuhličitanu ako zdroja CO<sub>2</sub>. Tento enzým je multienzýmový proteín obsahujúci variabilný počet identických podjednotiek, ktorá každá obsahuje biotín, biotín karboxylázu a proteín, ktorý ho nesie, transkarboxylázu a regulačné allosterické miesto [43].

FAS je dimér zložený z dvoch identických monomérov. Každá nesie na jednom polypeptidickom reťazci všetkých sedem enzýmov. Na začiatku dochádza k spojeniu pôvodnej molekuly acetyl-CoA s cysteinovou -SH skupinou. Je katalyzovaná acetyltransacylazou. Malonyl-CoA zreaguje so susednou SH-skupinou na 4-fosfopantetheinu ACP na druhom monomére za vzniku acetyl(acyl)-malonyl enzýmu. Acetylová skupina pôsobí na metylovú skupinu malonylových rezíduí a tým sa uvoľňuje CO<sub>2</sub> a vytvorí sa 3-ketoacyl enzým, pričom cysteinová skupina zostáva voľná. Ďalej dochádza ku redukcií, dehydratácií a ďalšej redukcií 3-ketoacylovej skupiny a vytvára sa nasýtený acyl-S-enzým. Nová molekula malonyl-CoA sa spája s SH-skupinou a nahrádza nasýtený acylový zbytok na voľnej cysteinobvev -SH skupine. Po šiestich opakovaníach týchto reakcií je vytvorený 16-uhlíkový acylový radikál (palmitoyl). Ten je následne uvoľnený z komplexu enzýmov účinkom siedmeho enzýmu thioesterasy [43].



Obrázok 9 Schéma biosyntézy mastných kyselín [15]

#### **2.2.2.4 $\beta$ oxidácia**

$\beta$  oxidácia mastných kyselín prebieha v mitochondriách. Na mitochondriálnom matrice sa nachádza skupina enzýmov nazývaná oxidáza mastných kyselín. Tento enzymatický systém katalyzuje oxidáciu acyl-CoA na acetyl-CoA, ktoré sú sprážené s fosforyláciou ADP.

Predtým, ako sú mastné kyseliny katabolizované, musia byť premenené na aktívnu formu acyl-CoA. Táto reakcia je katabolizovaná enzýmom acyl-CoA-synthetasou. V prvom kroku  $\beta$  - oxidácie sa odoberajú dva vodíky z 2( $\alpha$ )- a 3( $\beta$ )- uhlíkových reťazcov. Táto reakcia je katalyzovaná acyl-CoA-dehydrogenázou. Vzniká  $\Delta^2$ -trans -enoyl-CoA a FADH<sub>2</sub>. Následne je dvojná väzba nasýtená molekulou vody a katalyzovaná enzýmom  $\Delta^2$  -enoyl-CoA-hydratázou a vzniká 3-hydroxyacyl-CoA. Následnou dehydrogenáciou na 3. uhlíku vzniknú zhodné zlúčeniny 3- ketoacyl-CoA zlúčeniny. V poslednom kroku je na pozícií 2,3 rozštiepený thioláz a vzniká acetyl-CoA a reťazec acyl-CoA, ktorý je o dva uhlíky kratší ako pôvodný. Acyl-CoA znovu vstupuje do cyklu ďalšej oxidácie. Oxidácia mastných kyselín je ukončená vtedy, keď je v citrátovom cykle posledný acetyl-CoA oxidovaný na CO<sub>2</sub> a vodu [43].

#### **2.2.2.5 Ubichinon**

Ubichinon, iným názvom koenzým Q, označuje benzochinóny rozpustné v tukoch, ktoré sa líšia dĺžkou izoprenylového bočného reťazca. Tvoria neodmysliteľnú súčasť dýchacieho reťazca, kde transportuje elektróny pri oxidatívnej fosforylácii. Taktiež je kofaktorom syntézy pyrimidínových nukleotidov a napomáha recyklácii oxidu dusnatého. V svojej redukovanej forme je výborným antioxidantom, účinne chráni membránové fosfolipidy a sériové lipoproteíny s nízkou hustotou pred peroxidáciou. Nepriamo stabilizuje vápnikové kanály, aby sa zabránilo preťaženiu vápnikom, podieľa sa na recyklácii  $\alpha$ -tokoferolového radikálu späť na  $\alpha$ -tokoferol. V bunkách sa jeho koncentrácia zvyšuje, ak sú bunky v strese. Jeho obsah sa s pribúdajúcim vekom znižuje. Jeho najznámejším zástupcom je koenzým Q 10. Koenzým Q 10 je syntetizovaný z mevalovej dráhy, kde je získavaný z acyl-CoA, ktorý produkuje cholesterol, dilichol a ako konečný produkt CoQ10 [32,39,40,41].

#### **2.2.2.6 Ergosterol**

Ergosterol je bioaktívna látka, ktorá patrí medzi steroly. Nachádza sa vo väčšine hubovitých buniek, kde je jednou z hlavných zložiek biomembrán. V rastlinnej ríši sa vyskytuje vo forme fytosterolu a u zvierat cholesterolu. Je finálnym produktom dlhej viacstupňovej biosynthetickej sterolovej dráhy. Pre ich prvé tri kroky je biosyntéza rovnaká, potom sa začne dráha každej odlišovať. Funkcia ergosterolu spočíva v zabezpečení pevnosti, správnej fluidity a stability biomembrány a zvýšení odolnosti buniek pred zmenami vonkajších podmienok, ako sú osmotický tlak, teplota a vlhkosť [37,38].



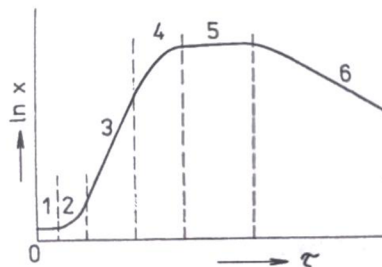
## 2.3 Kultivácia

### 2.3.1 Kultivácia kvasiniek

Životaschopnosť a vývoj mikroorganizmov závisí na vonkajších podmienkach. Každá zmena v podmienkach dokáže ovplyvniť rast a vývoj buniek. Ak však sú zabezpečené vhodné podmienky, daný organizmus sa množí veľmi rýchlo. Medzi najvýznamnejšie faktory patria výživa, teplota, pH, vodná aktivita a airácia. Každé médium by malo mať zabezpečený dostatok uhlíkatého substrátu a ďalšie anorganické ióny pre správny rast buniek [1].

### 2.3.2 Rastová krivka

Množstvo živín obsiahnutých v živnom médiu obmedzuje rast populácie, pretože ich postupne mikroorganizmy spotrebovávajú a začínajú sa hromadiť sploďiny metabolizmu, ktoré vo vyšších koncentráciách zabraňujú ďalšiemu rozmnožovaniu. Rastová krivka nám graficky znázorňuje závislosť koncentrácie buniek v živnom médiu na čase v médiu. Mikroorganizmy po prenesení do iného živného média nedokážu ihneď optimalizovať rýchlosť rastu a množenia, tento čas využívajú na aktiváciu enzýmov. Táto fáza sa označuje ako Lag - fáza. Jej dĺžka závisí na mnohých faktoroch, z ktorých medzi najvýznamnejšie patrí zloženie média, druh mikroorganizmu a podobne. Po Lag-fáze nastáva fáza exponenciálneho rastu, ktorá je charakteristická najväčším zrýchlením rastu kultúry. V stacionárnej fáze sa ustáľuje počet buniek približne na rovnakej hodnote. Je to spôsobené spomalením rozmnožovania, kedy prírastok nových buniek je vyvážený odumierajúcimi. Posledná fáza je fáza odumierania počas ktorej dochádza k autolýze buniek, hromadeniu metabolitov a úbytku živín [1, 2].



Obrázok 10 Rastová krivka [1]

### 2.3.3 Bioreaktor

Bioreaktory sú nádoby alebo nádrže, v ktorých prebieha transformácia surovín na biochemické produkty. Sú vyrobené z inertného materiálu, najčastejšie sklo alebo nerezová oceľ. Skladajú sa z výmenného chladiča, miešadla, aeračného zariadenia, čerpadla. Všetky tieto časti sú ovládané cez centrálny systém. Je dôležité, aby bioreaktor obsahoval pH sondu, teplomer, a kyslíkovú sondu. Tieto čidlá vysielajú signály, ktoré vyhodnocuje systém a usmerňuje celý fermentor. Podľa veľkosti sa fermentory rozdeľujú na laboratórne o objeme do 30 l: štvrtprvádkové o objeme 30 až 100 l, poloprevádzkové s objemom 100 až 5000 l a prevádzkové, ktoré majú objem viac ako 5000 l. Podľa spôsobu prevádzky rozdeľujeme bioreaktory na: vsátkové (Batch), kontinuálne, alebo fed- batch. Vsátkový bioreaktor patrí medzi najvyužívanejšie. Jeho podstatou je uzavretý systém, v ktorom dochádza k zmenám v priebehu času [30.31].



## **2.4 Odpadný substrát**

### **2.4.1 Srvátka**

Srvátka je tekutý, žltozelený, vedľajší produkt pri výrobe syrov, alebo kazeínu z mlieka. Je výsledkom koagulácie mliečnych bielkovín kyslými alebo proteolytickými enzýmami. V závislosti od typu použitej výrobnnej metódy prípravy, hlavne výberom zrážadla, rozdeľujeme kyslú a sladkú srvátku.. Ku kyslému, kazeínovému zrážaniu dôjde pri pH približne 4,6. Využíva sa pri výrobe tvarohu alebo čerstvých kyslých syrov. Na výrobu sladkých syrov sa pridávajú do mlieka enzýmy, ktoré spôsobia narušenie kazeínových bielkovín a následné uvoľnenie organických kyselín, minerálov a bielkovín do srvátky. Srvátka predstavuje približne 85–95 % mlieka a zachováva si približne 55 % výživných látok. Zloženie srvátky však ovplyvňuje mnoho faktorov, ako napr. sú zdroj mlieka, metóda použitá pri výrobe alebo doba skladovania. Hlavnou zložkou kyslej i sladkej srvátky tvorí voda s približne 93 %, z celkového objemu srvátky. Sušina srvátky je všeobecne zložená zo: 70–72 % laktózy, srvátkových bielkovín 8–10 %, minerálnych látok 12–15 % a z kyseliny mliečnej, citrónovej, nebielkovinových zlúčenín dusíka, ako sú močovina a kyselina močová a vitamínov skupiny B [22, 23].

## **2.5 Úprava substrátu**

### **2.5.1 Enzýmy**

Enzýmy sú molekuly bielkovinovej povahy, schopné katalyzovať biochemické reakcie. Nachádzajú sa vo všetkých živých organizmoch, kde sa zapájajú a usmerňujú prakticky všetky metabolické procesy v bunke. Vyznačujú sa vysokou špecifitou substrátu a fungujú za miernych teplôt a neutrálneho pH. Enzymová aktivita je závislá na svojej primárnej až kvartérnej štruktúre. Enzymová reakcia prebieha na aktívnych miestach. Sú to malé oblasti enzýmu, ktoré obsahujú určité presne rozmiestnené funkčné skupiny vedľajších reťazcov aminokyselín . Do aktívneho centra enzýmu je substrát pripútaný nekovalentnými väzbami , ktoré vyžadujú presné vzdialenosti medzi interagujúcimi atómami substrátu a väzbových skupín centra a ich správne nasmerovanie. Zdrojom energie pre aktiváciu enzymových reakcií je energia uvoľnená pri väzbe substrátu na enzym. Pri poškodení denaturáciou alebo disociáciou na podjednotky strácajú svoje katalytickú aktivitu. [19,20].

#### **2.5.1.1 Laktáza**

Laktáza taktiež nazývaná  $\beta$ -galaktozidáza je enzym, ktorý katalyzuje hydrolýzu laktózy na galaktózu a glukózu. Často sa používa v potravinárskom priemysle. Používajú sa dva typy, a to neutrálna a kyslá laktáza. Laktáza produkovaná hubami má vysokú aktivitu pri kyslých hodnotách pH 2,5- 5,5. Laktáza produkovaná kvasinkami vykazuje najvyššiu aktivitu pri pH 6-8 [36].

#### **2.5.1.2 Proteáza**

Proteázy sú enzýmy, ktoré katalyzujú ireverzibilný rozklad amínovej väzby v peptidových a proteínových substrátoch. Vďaka tomu sa zúčastňujú prakticky všetkých biologických procesov. Ich aktivita v organizme musí byť prísne kontrolovaná pre zvýšenie proteolýzy alebo zabráneniu nadmernej hydrolýze proteínov[37].

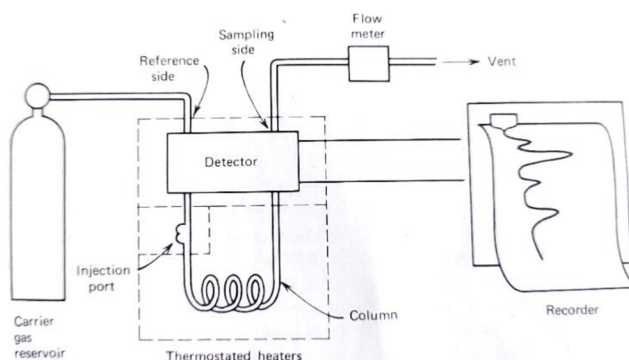
## 2.6 Analytické postupy

### 2.6.1 Chromatografia

Obečne je chromatografia analytická metóda, ktorá rozdeľuje analyzovanú vzorku na komponenty, tým že sa distribuuje medzi 2 fázy: stacionárnu a mobilnú fázu. Stacionárna fáza je zafixovaná v kolóne alebo na pevnom povrchu. Mobilná fáza sa pohybuje cez alebo skrz stacionárnu fázu a unáša so sebou zmes analytu. Separácia je založená na rozdielnej rýchlosti elúcií jednotlivých komponentov analytu. Podľa umiestnenia stacionárnej fázy môžeme chromatografické metódy rozdeliť na kolónovú chromatografiu, kedy je stacionárna fáza v úzkej trubici – kolóne a planárnu chromatografiu, kedy je stacionárna fáza porézna vrstva na pevnom povrchu [24, 25].

### 2.6.2 Plynová chromatografia

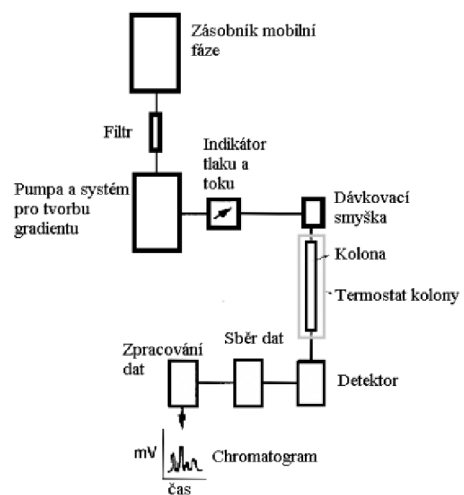
Plynová chromatografia je jednou z najpoužívanějších techník kvantitatívnej a kvalitatívnej analýzy. Využíva sa pre látky s nízkou teplotou varu a zároveň látky, ktoré sú stále pri vysokých teplotách. Jej analýza je založená na separovaní vzorky na základe rozdelenia medzi plynnou mobilnou fázou a pevnou, alebo kvapalnou stacionárnou fázou. Mobilná fáza je nosný plyn, ktorý je inertný voči analytom. Využívajú sa plyny ako je vodík, dusík, argón alebo hélium. Dusík má veľmi nízku chemickú reaktivitu, takže sa neviaže na analyzované zlúčeniny, čo umožňuje ich rýchlu a presnú separáciu. Taktiež má veľmi malú molekulovú hmotnosť, čo znamená, že má vyššiu rýchlosť šírenia v plynovej fáze, a tým aj väčšiu účinnosť separácie. Dusík je tiež netoxický, nehorľavý a nenákladný, čo robí jeho použitie v plynovej chromatografii bezpečným a efektívnym [24, 25].



Obrázok 11 Schéma kvapalinového chromatografu [25]

### 2.6.3 Vysokoučinná kvapalinová chromatografia

Vysokoučinná kvapalinová chromatografia HPLC je separačná metóda, ktorá separuje analyty v najrôznejších organických, anorganických a biologických materiáloch. Metóda je využiteľná pre látky s nízkou teplotou varu a pre tepelne nestabilné látky. Mobilnou fázou je kvapalina, do ktorej je dávkovaná vzorka v kvapalnej forme cez alebo skrz stacionárnu fázu v kolóne [24, 25].



Obrázok 12 Schéma vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie [42]

### **3 CIEĽ PRÁCE**

Cieľom práce je optimalizácia predprípravy mliekarenského odpadu – srvátky pre kultiváciu vybraných karoténogénnych kvasiniek.

Ciele práce boli rozdelené do jednotlivých čiastkových bodov uvedených nižšie:

1. Vypracovaná literárna rešerš k téme karotenogénnych kvasiniek a ich využitia pre biotransformáciu potravinárskych odpadov
2. Optimalizácia predprípravy mliekarenskej srvátky pre biotechnologické využitie
3. Skrínigové kultivácie vybraných kvasiniek na médiách obsahujúcich srvátku a jej jednotlivé komponenty
4. Vykonanie poloprevádzkovej fermentorovej kultivácie
5. Analýza produkovanej biomasy a vyhodnotenie výsledkov

## **4 PRAKTICKÁ ČASŤ**

### **4.1 Chemikálie**

Kvasničný autolyzát, Roth (SRN)

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

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

Bakteriologický pepton, Duchefa Biochemie (Nizozemsko)

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

Glycerol, Penta (Česká Republika)

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

Methanol p.a, Penta (Česká Republika)

Chlorofom p.a. Penta (Česká Republika)

Acetonitril pro HPLC, Chem-Lab (Belgie)

Hexan pro HPLC, Carlo ERBA (Francie)

Heptadekanová kyselina, Sigma-Aldrich (SRN)

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

Ethylacetát pro HPLC, Roth (SRN)

Hydroxid sodný, Lach-ner (Česká Republika)

Tris-HCl, Penta (Česká republika)

Methanol pro HPLC, Chem-Lab (Belgie)

### **4.2 Pomôcky a prístroje**

#### **4.2.1 Prístrojová technika a pomôcky pre kultiváciu kvasiniek**

Predvážky Scout, Ohaus

Analytické váhy Boeco

Laminárny box Air Stream ESCO Class II BSC

Skriňová trepačka ZWYR-D2401, Labwirt

Trepačka WiseShake SHR-2D, Witeg

Centrifúga Z 36 HK, Hermle Centrifuga MIKRO 120, Hettich

GKB Color Digital CCD kamera

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

Autokláv Systec  
Lyofilizátor FreeZone 4.5 l Freeze Dry Systém, Labconco  
Vakuová pumpa k lyofilizátoru Vakuumbrand  
Mikroskop L II ooA, Intraco Micro  
Homogenizátor BeadBug, Benchmark Scientific  
Termoblok Dry Block Heater, Ohaus  
Fermentor RALF 7 l, BiOiNGENiRiNG  
Vortex Genie 2, P-Lab  
Vortex Fixed Speed Vortex Mixer, VXMNFS, Ohaus  
Vakuová odparka HB4 basic, HBA Labortechnik

#### **4.2.2 Prístrojová technika a pomôcky pre izoláciu a analýzu karoténoidov a lipidov**

Stuart Block Heater SBH200D (UK)

GC/FID zostava:

TRACE 1300 TM (Thermo Fischer, USA)

Kapilárna kolóna Zebron GC FAME, 30m, 0,25 mm, 0,20 µm (Phenomenex)

HPLC/PDA zostava:

Zostava Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fischer, USA)

Kolóna Kinetex C18 EVO 150 mm, 4,6 mm, 2,6 µm (Phenomenex)

DAD detektorom rady Vanquish (Thermo Fischer, USA)

Držiak predkolóny - KJ0 - 4282, ECOM (ČR)

Predkolóna - C18, AJ0 - 4287, Phenomenex

Vyhodnocovací software Chromeleon 7.2

#### **4.3 Druhy kvasiniek**

*Cystofilobasidium macerans* (CCY 10-1-2)

*Rhodotorula kratochvilovae* (CCY 20-2-26)

*Rhodotorula mucillaginosa* (CCY 19-4-6)

*Rhodotorula mucillaginosa* (CCY 20-9-7)

*Rhodosporidium toruloides* (CCY 062-002-001)

*Sporidiobolus metaroseus* (CCY 19-6-20)

## 4.4 Predpríprava odpadného substrátu

### 4.4.1 Srvátka

Srvátka v dvojlitrových fľašiach bola sterilizovaná v autokláve po dobu 15 minút pri 121 °C. Po vychladnutí boli zo srvátky odfiltrované srvátkové bielkoviny filtráciou za zníženého tlaku. Filtrát bol umiestnený na magnetickú miešačku, kde bol pridávaný enzým laktáza. Počas hydrolyzy boli odoberané vzorky, u ktorých bol stanovený obsah cukrov metódou HPLC/RI. Po dosiahnutí požadovanej koncentrácie cukru bol hydrolyzát opäť vysterilizovaný v autokláve.

## 4.5 Kultivácia kvasiniek v malom objeme

### 4.5.1 Podmienky pri kultivácii

Vzhľadom na to že nami vybrané kvasinky sú všetky aeróbne mikroorganizmy, ich kultivácia bola prevedená aeróbne v Erlenmayrových 250 ml bankách na trepačkách. Pre udržateľnosť homogenity výsledkov boli všetky kultivácie prevádzané v skriňových trepačkách pri konštantnej teplote 25 °C.

### 4.5.2 Inokulom I a II

Pri kultivácii bola využitá dvojstupňová Inokulácia I a II. Na začiatku každej kultivácie boli pripravené médiá pre inokulum I a II podľa tabuľky 1. Objem inokula I bol 50 ml v 250 ml Erlenmayerovej banke a objem inokula II bol 100 ml v 500 ml Erlenmayerovej banke. Pripravené inokulá boli v ďalšom kroku sterilizované v tlakovom hrnci pri 120 °C po dobu 45 minút. Po vychladnutí bolo inokulum I zaočkované vybratou kvasinkou v sterilnom prostredí očkovacieho boxu. Kvasinky na Petriho miske boli prenesené pomocou sterilnej kľučky. Množstvo kvasiniek činilo päť kľučiek. Následne bola banka zazátkovaná a umiestnená na trepačky po dobu 24 hodín. Po ubehnutí stanoveného času bolo inokulum I preočkované do inokula II v očkovacom pomere 1 : 5 v sterilnom očkovacom boxe.

*Tabuľka 1 Zloženie inokulačných médií I a II*

Zložka	Koncentrácia (g/l)
Kvasničný autolyzát	10
Glukóza monohydrát	22
Pepton	20

### 4.5.3 Kultivácia v produkčných médiách

Pri kultivácii kvasiniek boli v produkčných médiách využité dva typy zloženia média. Prvého, základného, ktorého zloženie je uvedené v tabuľke č. 2 a druhého so zvýšeným obsahom srvátky o 50 % so zložením v tabuľke č. 3. Vždy bolo pripravené pre jednu kvasinku päť 250 ml Erlenmayerových baniek do ktorých boli pripravené médiá o objeme 50 ml. Prvá banka obsahovala kontrolné médium a ďalšie štyri srvátkové médiá. Po príprave boli tieto banky vysterilizované v tlakovom hrnci pri teplote 120°C po dobu 45 minút. Po vychladnutí médií boli zaočkované v sterilnom očkovacom boxe. Očkovací pomer z inokula II bol 1 : 5. Pri očkovaní bolo do každého média napipetovaných 100 µl mikroelementov a 20 µl enzýmov podľa údajov v tabuľke č. 4. Pripravené a zaočkované médiá boli vložené na trepačku po dobu 96 hodín.

Tabuľka 2 Zloženie kontrolného a srvátkového média

Kontrolné médium		Srvátkové médium	
Zložka	Koncentrácia (g/l)	Zložka	Koncentrácia (g/l)
Glukóza (monohydrát)	50,882	Srvátka (obsah cukru)	50,882
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4,000	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4,000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,696	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,696
Močovina	1,810	močovina	1,810

Tabuľka 3 Zloženie kontrolného a srvátkového média pri zvýšenom množstve cukru

Kontrolné médium		Srvátkové médium	
Zložka	Koncentrácia (g/l)	Zložka	Koncentrácia (g/l)
Glukóza (monohydrát)	76,323	Srvátka (obsah cukru)	76,323
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4,000	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4,000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,696	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,696
Močovina	1,810	močovina	1,810

Tabuľka 4 Prídavok enzýmov v produkčných médiách

Označenie	Prídavok enzýmov	Objem ( $\mu\text{l}$ )
A	Kontrolné médium	0
B	Srvátkové médium bez enzýmov	0
C	Srvátkové médium z proteázou	20
D	Srvátkové médium z laktázou	20
E	Srvátkové médium z proteázou a laktázou	20+20

## 4.6 Kultivácia vo fermentore

### 4.6.1 Podmienky

Kultivácia bola uskutočnená v 2,5 l laboratórnom fermentore o objeme média po zaočkovaní s objemom 1,8 l. Kultivácie bola riadené operačným systémom, ktorého podmienky boli nastavené na pH 5,8; teploty 22°C a  $\text{pO}_2$  v rozmedzí 20–30 %. Maximálne otáčky miešadla boli nastavené na 1000 ot/min, aby sa zabránilo poškodeniu buniek.

### 4.6.2 Príprava inokúl a produkčného média

Zloženie inokúl I, II je uvedené v Tabuľke 1. 50 ml inokula I bolo pripravené do 250 ml Erlenmayerovej banky. Po vysterilizovaní bolo médium zaočkované z petriho misky. Po 24 hodinách na trepačkách bol celý objem preliaty do inokula II o objeme 250 ml v 2 l Erlenmayerovej banke. Všetky očkovania prebiehali v sterilnom prostredí očkovacieho boxu.

Bolo pripravené 1,5 l produkčného srvátkového média so zvýšeným obsahom cukru so zložením v Tabuľke 3. V autokláve bolo médium vysterilizované a po vychladnutí bolo v sterilnom prostredí pridaný enzým laktáza, mikroelementy a následne bolo zaočkované celým objemom inokula II.



### **4.6.3 Odbery z fermentora**

Kultivácia vo fermentore prebiehala 120 hodín. Počas tejto doby boli vzorky odoberané pre ďalšiu analýzu. Tie boli odoberané v rôznych časových rozmedziach, do 10 ml centrifugačnej skúmavky.

## **4.7 Spracovanie vzoriek biomasy**

### **4.7.1.1 Príprava biomasy**

Po 96 hodinách boli Erlenmayerové banky vytiahnuté z trepačky. Z každej banky bolo odobraných 40 ml do veľkých 50 ml centrifugačných skúmaviek. Tie boli vložené do centrifúgy pri 8000 ot/min po dobu 3 minút. Následne bol supernatant zliaty a biomasa na dne skúmavky bola rozsuspenzovaná s malým množstvom destilovanej vody a kvantitatívne prevedená do čistých 15 ml centrifugačných skúmaviek. Skúmavky boli následne centrifugované pri 3000 ot/min po dobu 5 minút. Potom bol supernatant zliaty a skúmavky boli vložené do mraziaceho boxu. Po zmrazení vzoriek, boli skúmavky vložené na lyofilizátor, kde boli zlyofilizované.

### **4.7.2 Príprava vzoriek na analýzu**

#### **4.7.2.1 Príprava vzoriek na plynový chromatograf**

Vzorky boli pred analýzou na plynovom chromatografe najprv navážené na analytických váhach do krimpovacích vialiek. Váha biomasy sa pohybovala od 10 – 18 mg. Potom bolo do krimpovacích vialiek napipetovaných 1,8 ml transesterifikačnej zmesi a vialky boli zakrimpované. Tie boli ďalej umiestnené na termoblok, kde boli temperované, pri teplote 85 °C po dobu 2 hodín. Po vychladnutí boli vialky odkrimpované a kvantitatívne prevedené do 5 ml vialiek. Ku vzorkám bolo napipetovaných 0,5 ml 0,05 M roztoku NaOH a 1 ml HPLC hexánu. Vzorky boli uzavreté a umiestnené na vortex po dobu 5 minút. Po ustálení dvoch fáz bolo z hornej fázy odpipetovaných mikropipetov 100 µl roztoku nepolárnej fázy, ktorá bola prevedená do závitovej vialky. Nakoniec bolo do závitovej vialky pridaných 0,9 ml HPLC hexánu a vialka bola uzavretá a pripravená k analýze.

#### **4.7.2.2 Analýza na plynovom chromatograme**

Na plynovom chromatografe bola uskutočnená analýza mastných kyselín. Bola použitá kolóna Lion - GC FAME 30 m x 0,25 mm x 0,2 µm s prietokom nosného plynu vodíku 1 ml / minútu. Nástrik vzorky činil 1 µl so split mechanizmom a split ratiom 10. Detekcia prebiehala na detektore FID.

Tabuľka 5 Ďalšie parametre plynovej chromatografie

Retenčný čas	Miera	Cielená hodnota	Čas zdržania
0,000	Run		
1,000	0,00	60,0	1,00
3,625	40,00	125,0	1,00
8,625	5,00	140,0	2,00
19,736	4,50	190,0	0,00
22,236	25,00	240,0	0,50
	New Row		
22,300	Stop run		

#### 4.7.2.3 Príprava vzoriek na kvapalinovú chromatografiu

Do Eppendorfovej skúmavky bolo na analytických váhach vážených 10 -20 mg zlyofilizovanej biomasy. Následne bolo pridaných 1 ml vody a vzorky sa ponechali hydratovať 30 minút. Tie boli vložené do centrifúgy pri 14000 ot/min po dobu 1 minúty, Supernatant bol následne zliaty. K hydratovanej biomase bolo napipetovaných 1 ml metanolu a približne 0,5 ml sklenených guľôčok. Skúmavky boli vložené na dezintegrátor po dobu 1 a pol minúty. Obsah Eppendorfových skúmaviek bol kvantitatívne prevedený do 15 ml centrifugačných skúmaviek do ktorých bolo napipetované 2 ml chloroformu. Tie boli vložené na multipozičný vortex po dobu 10 minút. Následne bolo pridaných 1 ml destilovanej vody a skúmavky boli ručne pretrepané a scentrifugované pri 3000 ot/min po dobu 1 minúty. Do čistej 15 ml sklenenej skúmavky bola odpipetovaná spodná chloroformová fáza. Vzorky v sklenených skúmavkách boli vložené na termoblok a vytemperované na 45 °C a pomocou prístupu plynného dusíka bol chloroform odparený. Odparok bol následne rozpustený v 1 ml zmesi ethylacetátu a acetonitrilu (v pomere 2:1). Nakoniec bola vzorka prefiltrovaná cez PTFE filter do 2 ml závitovej vialky a bola uzavretá vrchnáčkikom.

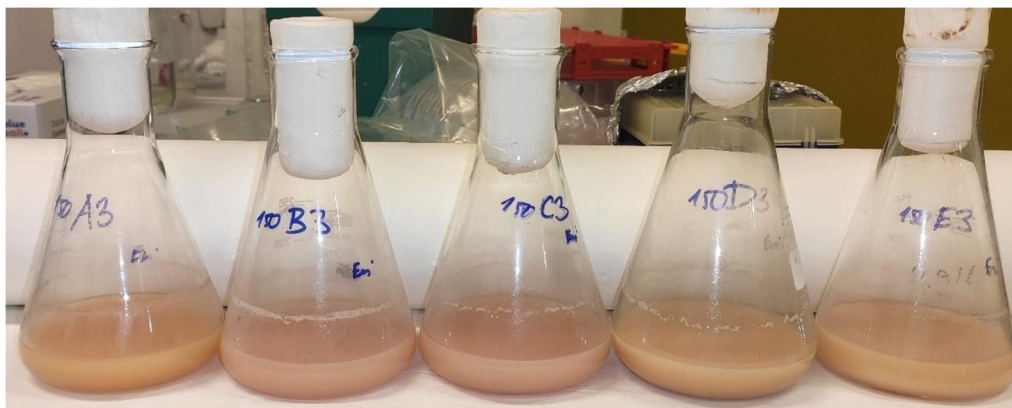
#### 4.7.2.4 Analýza na kvapalinovej chromatografii

Na kvapalinovom chromatograme boli alalyzované karoténoidy, ubichinon a ergosterol. Na túto analýzu bola použitá kolóna kinetex EVO C18 o rozmeroch 150x4,6x2,6 µm. Elúcia pebiehala v gradientom móde o prietoku mobilnej fázy 1,2 ml /min pri teplote 25 °C. Mobilná fáza bola zložená z 2 roztokov A a B. Zloženie mobilnej fázy A bolo acetonitril, TrisHCl (pH 8) a metanol v pomere 84:14:2. Zloženie mobilnej fázy B bolo Metanol a ethylacetát v pomere 60 : 40. Ako detektor bol využitý detektor DAD rady Vanquish od firmy Thermo Fisher.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

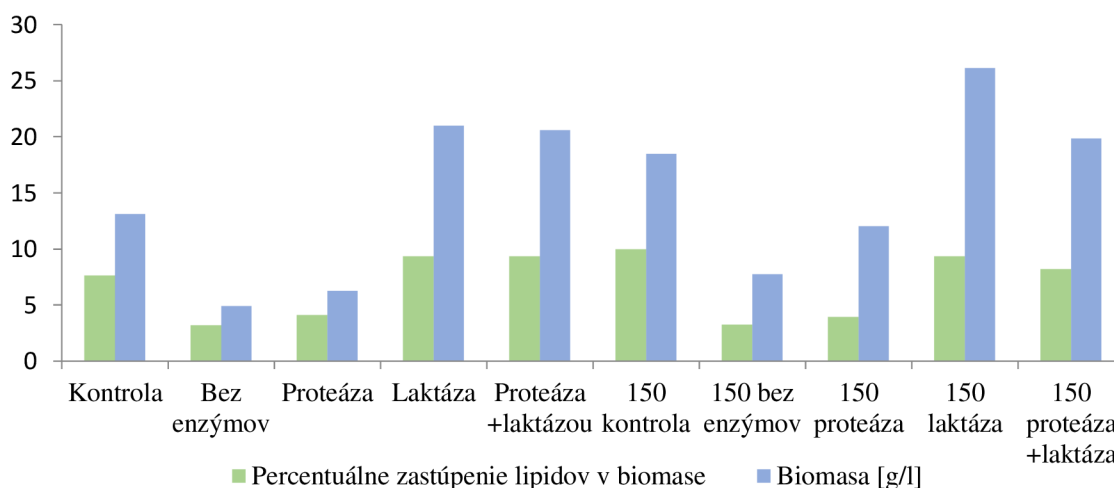
### 5.1 Stanovenie rastových vlastností vybratých kultúr

#### 5.1.1 *Rhodotorula kratochvilovae* (CCY 20-2-26)



Obrázok 13 Kultivácia kmeňa *Rhodotorula kratochvilovae* v srvátkovom médiu so zvýšeným obsahom srvátky

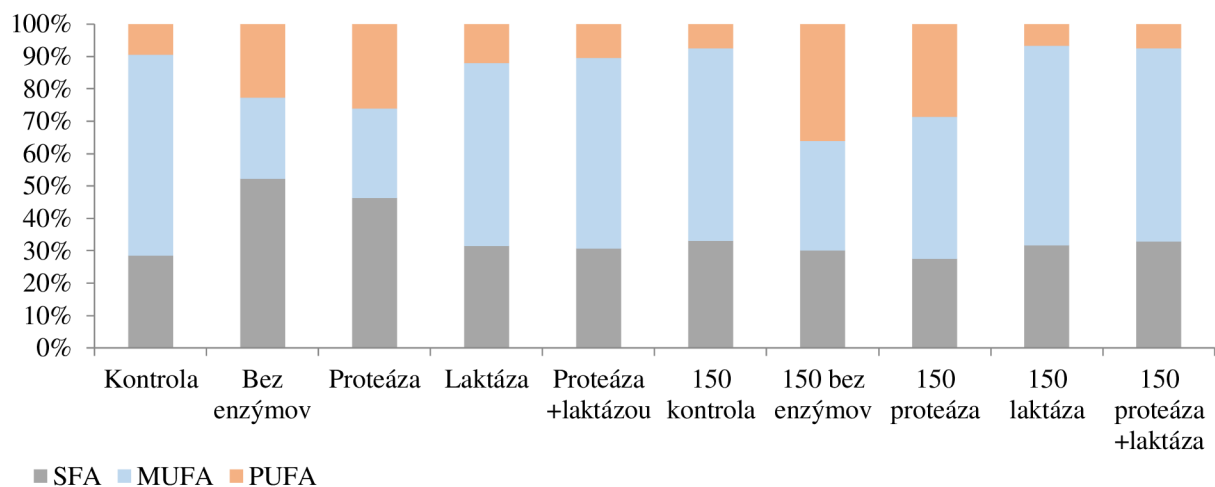
Na Obrázku 13 môžeme vidieť produkčné médiá kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*, ktorej farebné zastúpenie sa pohybuje od odtieňov oranžovej až ružovej.



Graf 1 Graf percentuálneho zastúpenia lipidov v porovnaní s biomasou pri kvasinke *Rhodotorula kratochvilovae* na srvátkovom médiu

Na grafe 1 je vidieť že množstvo biomasy u kontrolného média bolo stanovených na 13,14 g/l s percentuálnym zastúpením lipidov 7,63 %. Oproti tomu médium bez enzýmov a médium s prídavkom proteázy mali nižší výťažok biomasy a tiež menšie hodnoty percentuálneho zastúpenia lipidov. Hodnota biomasy u média bez prídania enzýmov bola stanovená na 4,92 g/l a u média s prídavkom proteázy na 6,27 g/l. Percentuálne zastúpenie lipidov biomase v média bez prídania enzýmov bolo stanovené na 3,17 % a média s prídavkom proteázy na 4,11 %. Médium s prídavkom laktázy a médium kombinácie proteázy + laktázy mali oproti kontrole vyššie výťažky biomasy. Výťažok z laktázového média činil 21,00 g/l s 9,36 % zastúpením lipidov v biomase. U média proteáza + laktáza bol výťažok biomasy 20,58 g/l s 9,37 % zastúpením lipidov v biomase.

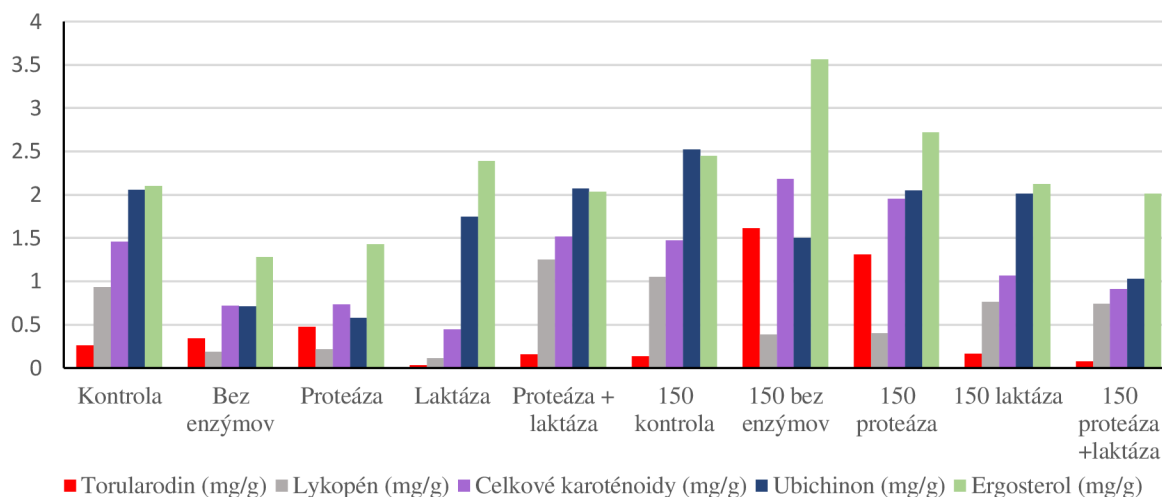
Tento trend bol obdobný aj v médiách, v ktorých bolo zvýšené množstvo srvátky. Biomasa kontroly 150 činila 18,49 g/l s 9,96 % zastúpením lipidov v biomase. Oproti tomu médium 150 bez prídania enzýmov a médium 150 s proteázou mali nižšie výtťažky a nižšie zastúpenie celkových lipidov. Hodnota biomasy bola u média 150 bez enzýmov stanovená na 7,77 g/l a u média 150 s proteázou na 12,04 g/l. Percentuálne zastúpenie lipidov v biomase bolo u média 150 bez enzýmov stanovené na 3,23 % a u média 150 s proteázou na 3,91 %. U médií 150 s prídavkom laktázy a kombinácie laktázy + proteázy bolo pozorované zvýšenie. Hodnota výtťažku biomasy u média 150 s prídavkom laktázy činila 26,15 g/l a u média 150 s prídavkom laktázy + proteázy 19,85 g/l. Percentuálne zastúpenie lipidov v biomase bolo u média 150 s prídavkom laktázy stanovené na 9,37 % a u média 150 s laktázou a proteázou na 8,19 %.



Graf 2 Graf percentuálneho zastúpenia mastných kyselín pre kmeň *Rhodotorula kratochvilovae* na srvátkovom médiu

V grafe 2 je zastúpenie mastných kyselín v kontrole činilo 28,47 % SFA 62 % MUFA a 9,50 % PUFA. V médiu bez enzýmov došlo k zvýšeniu množstva SFA na hodnotu 52,19 % a PUFA na hodnotu 22,60 %. V médiu s prídanim proteázy došlo k zvýšeniu množstva SFA na 46,21 % a PUFA na 25,99 % za súčasného zníženia MUFA oproti kontrolnému médiu. U média s prídavkom laktázy a u média s kombináciou laktázy a proteázy je možno pozorovať, že sa hodnoty percentuálneho zastúpenia mastných kyselín sa oproti kontrole líšia len nepatrne.

Kontrola 150 pre médiá so zvýšeným obsahom srvátky vykazovala obsah mastných kyselín v uvedenom zastúpení 33,04 % SFA, 59,60 % MUFA a 7,37 % PUFA. Vo vzorke 150 bez enzýmov a vo vzorke 150 s prídavkom proteázy boli namerané zvýšené množstvá PUFA. V médiu 150 bez enzýmov táto hodnota činila 36,09 % a v médiu 150 s prídavkom proteázy 28,59 %. Zároveň sa však v týchto dvoch médiach oproti kontrole 150 znížil obsah MUFA. V médiu 150 s laktázou a médiu 150 s laktázou + proteázou sú len minimálne zmeny v percentuálnom zastúpení mastných kyselín oproti kontrole 150 so zvýšeným obsahom srvátky.



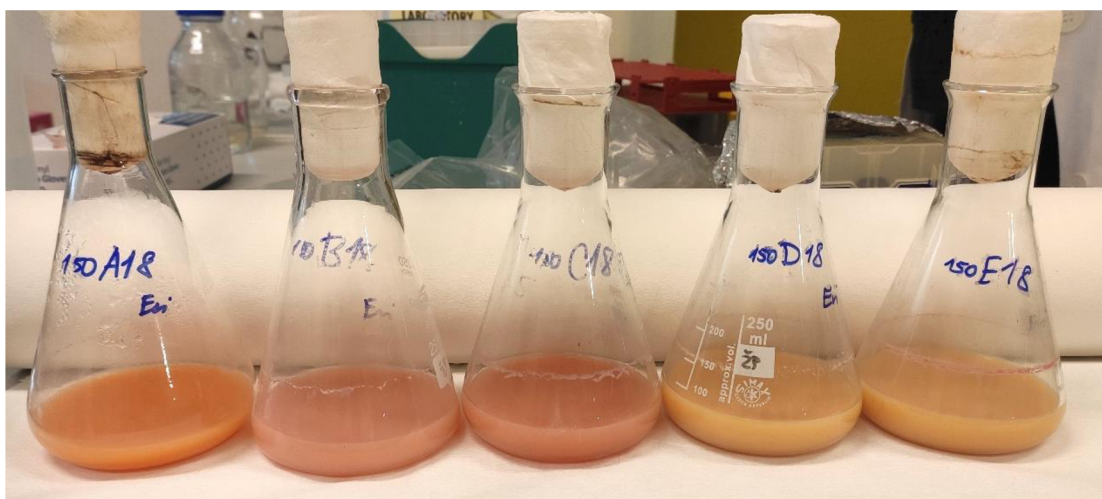
Graf 3 Graf zastúpenia vybraných karoténoidov a sterolov pre *Rhodotorula kratochvilovae*

V grafe 3 bol u kontrolného média stanovený obsah karoténoidov na 1,46 mg/g biomasy. Najvyššie zastúpenie mal lykopen s 0,93 mg/g biomasy. Hodnota ergosterolu bola stanovená na 2,10 mg/g biomasy a ubichinonu na 2,06 mg/g biomasy. Oproti tomu médiá bez prídavku enzýmov a s prídavkom proteázy vykazovali nižšie hodnoty ergosterolu, ubichinonu a taktiež celkových karoténoidov. Médium s prídavkom laktázy malo znížené zastúpenie karoténoidov, ktorý činil 0,45 mg/g biomasy a ubichinonu s hodnotou 1,74 mg/g biomasy. Toto médium malo tiež zvýšený obsah ergosterolu s hodnotou 2,39 mg/g biomasy. U média s prídavkom proteázy + laktázy bolo zastúpenie karoténoidov na 1,52 mg/g biomasy. Toto médium malo taktiež najvyššie zastúpenie lykopenú s hodnotou 1,25 mg/g biomasy. Obsah ergosterolu bol stanovený na 2,03 mg/g biomasy a obsah ubichinonu na 2,07 mg/g biomasy.

U kontroly 150 pre médiá so zvýšeným množstvom srvátky bol obsah karoténoidov stanovený na 1,47 mg/g biomasy, obsah ergosterolu na 2,45 mg/g biomasy a obsah ubichinonu na 2,52 mg/g biomasy. Oproti tomu médium 150 bez prídavku enzýmov vykazovalo najväčšie množstvo karoténoidov s hodnotou 2,19 mg/g biomasy a tiež najväčším množstvom torularodinnu a ergosterolu s hodnotou 3,57 mg/g biomasy. Obsah ubichinonu tu bol stanovený na 1,51 mg/g biomasy. V médiu 150 s pridaním proteázy bol obsah karoténoidov stanovený na 1,96 mg/g biomasy, obsah ergosterolu na 2,72 mg/g biomasy a ubichinonu na 2,05 mg/g biomasy. V médiu 150 s prídavkom laktázy a v médiu 150 s kombináciou laktázy a proteázy boli spozorované znížené hodnoty karoténoidov, ergosterolu i ubichinonu ako v kontrolnom médiu 150.

Pri porovnaní týchto 2 skupín – skupina so základným množstvom srvátky a s 50 % zvýšením množstva srvátky možno pozorovať, že pri 50 % zvýšení množstva srvátky sa u všetkých médií mierne zvýšilo množstvo vyprodukovanej biomasy, z čoho možno usudzovať, že väčšie množstvo použitého substrátu a hlavne použitie enzýmu laktázy malo za následok väčšiu produkciu biomasy. Taktiež možno sledovať, že percentuálne zastúpenie lipidov v biomase a percentuálne zloženie mastných kyselín v biomase sa u oboch skupín príliš nelíšilo, avšak v oboch skupinách vykazovali média bez enzýmov a média s pridanou proteázou výrazné zmeny v obsahu zastúpenia jednotlivých mastných kyselín, čo môže byť zapríčinené stresovým faktorom nedostatku využiteľných cukrov. Toto taktiež súviselo zo zvýšenou produkciou sterolov a karoténoidov u týchto médií.

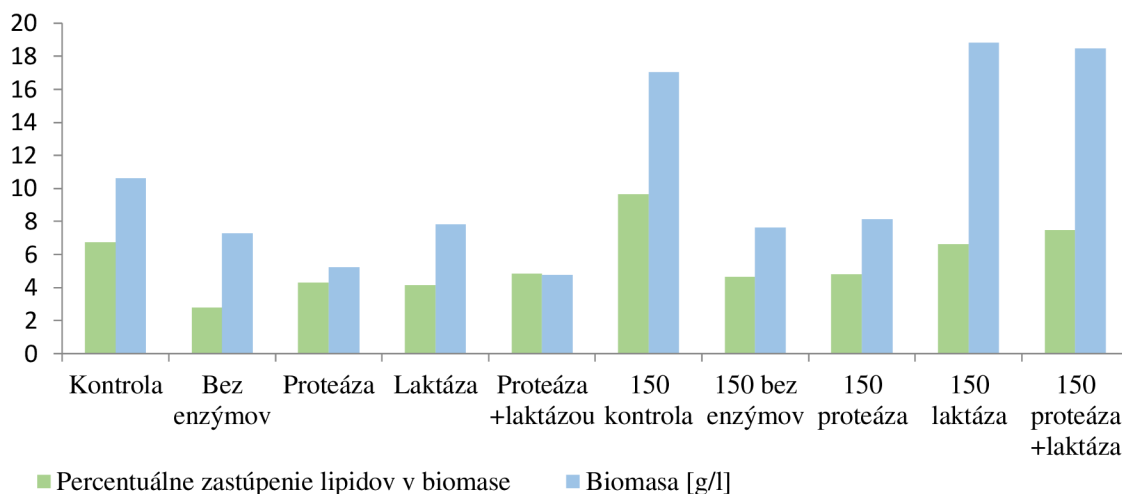
### 5.1.2 *Rhodospidium toruloides* (CCY 062-002-001)



Obrázok 14 Kultivácia kmeňa *Rhodotorula toruloides* v srvátkovom médiu so zvýšeným obsahom cukru

Pri kultivácii kvasinky *Rhodotorula toruloides* na obrázku 14 boli pozorované viaceré farby od sýto oranžovej pri kontrolnom médiu, ružovej u média bez enzýmu a média s proteázou a žlté sfarbenie u média s laktázou a u média kombinácií laktázy + proteázy.

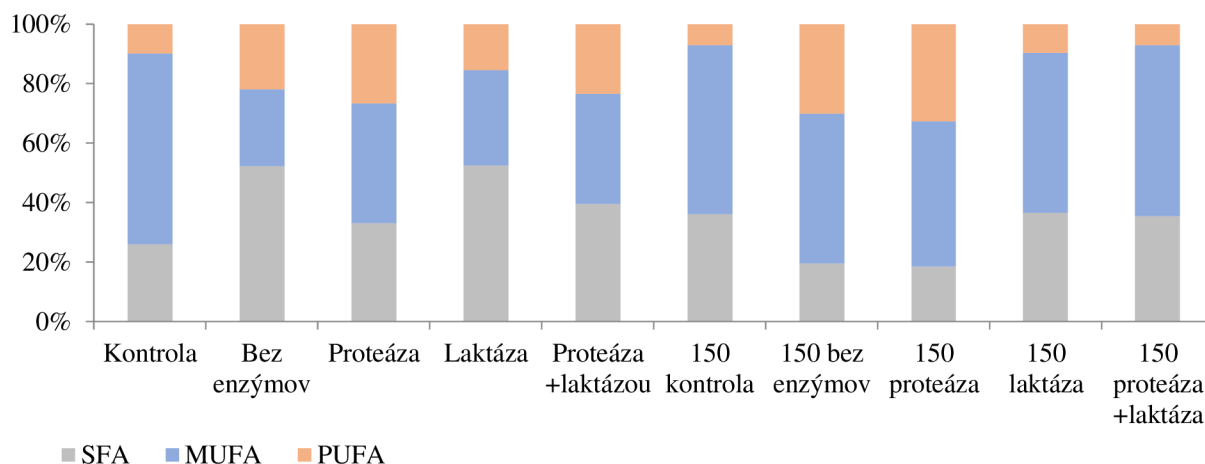




Graf 4 Graf percentuálneho zastúpenia lipidov v porovnaní s biomasou pri kvasinke *Rhodotorula toruloides* na srvátkovom médiu

V grafe 4 bolo množstvo biomasy u kontrolného média bolo stanovené na 10,6 g/l s percentuálnym zastúpením lipidov 6,75 %. Všetky média v tejto skupine vykazovali nižšiu koncentráciu biomasy ako u kontroly. Najvyššie zastúpenie biomasy v srvátkových médiách bolo stanovené v médiu s laktázy, kde bola stanovená koncentrácia na 7,83 g/l s 4,13 % zastúpením celkových lipidov v biomase. Najnižší výtťažok biomasy bol nameraný u média s proteázou + laktázou s hodnotou 4,76 g/l.

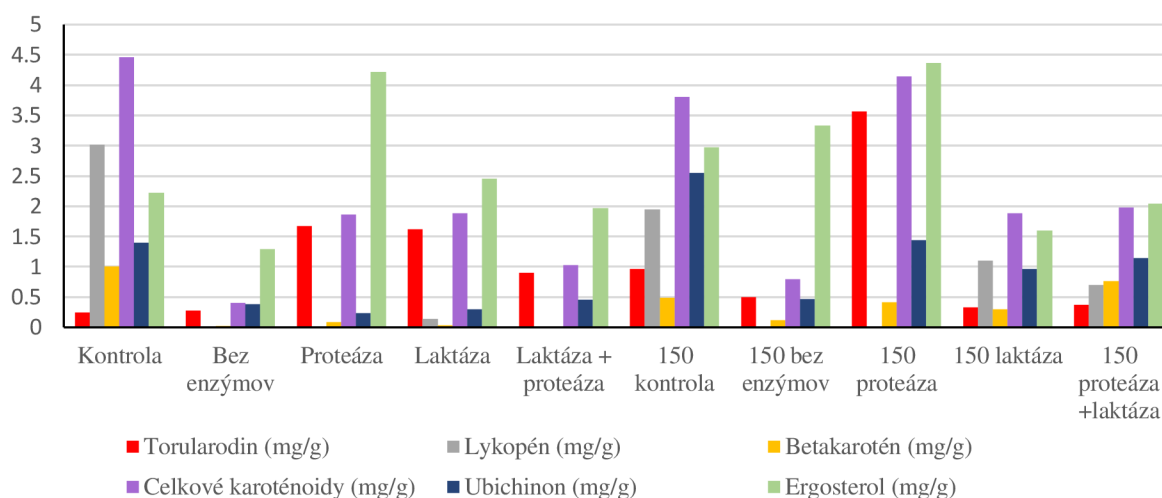
U médií so zvýšenou srvátkou bol u kontroly 150 nameraný výtťažok 17,05 g/l s 9,66 % zastúpením lipidov v biomase. Oproti tomu médiá 150 s laktázou a kombináciou laktázy + proteázy mali oveľa vyšší výtťažok. U média 150 s laktázou bola koncentrácia biomasy stanovená na 18,81 g/l s 6,63 % zastúpením lipidov. U média 150 s kombináciou proteázy + laktázy bola táto hodnota stanovená na 18,47 g/l s 7,47 % zastúpením lipidov. Médium 150 bez enzýmov a médium 150 s proteázou vykazovali nižšie výtťažky ako kontrola 150. To bolo pravdepodobne spôsobené tým že *Rhodotorula toruloides* nedokázali utilizovať laktózu ako u médií s prídavkom laktázy, kde bola už rozštiepená na jednoduché cukry.



Graf 5 Graf percentuálneho zastúpenia mastných kyselín pre kmeň *Rhodotorula toruloides* na srvátkovom médiu

Podľa grafu 5 bolo zastúpenie mastných kyselín u kontrolného média bolo 25,94 % SFA, 64,33 % MUFA a 9,73 % PUFA. Všetky vzorky v tejto skupine vykazovali zvýšenú produkciu SFA, ktorá mala najväčšiu hodnotu u média s využitím laktázy 52,57 %. Toto navýšenie SFA bolo najnižšie u média s pridaním proteázy, kde sa zastúpenie SFA činilo len 33,15 %

U médií so zvýšeným obsahom srvátky bolo zloženie kontrolného média 150 v zastúpení 36,07 % SFA, 56,88 % MUFA a 7,04 % PUFA. U média 150 bez prídavku enzýmov sa obsah SFA znížil na hodnotu 19,56 % a u média 150 s pridaním proteázy na hodnotu 18,4 %. Zároveň sa však zvýšil percentuálny obsah PUFA, ktorý u média 150 bez enzýmov stúpol na hodnotu 30,00 % a u média 150 bez prídavku enzýmov na 32,56 %. Média, ktoré obsahovali pridanú laktázu alebo kombináciu laktázy + proteázy mali len nepatrné zmeny v percentuálnom zastúpení mastných kyselín oproti kontrolnom médiu 150.



Graf 6 Graf zastúpenia vybraných karoténoidov a sterolov pre *Rhodotorula toruloides*

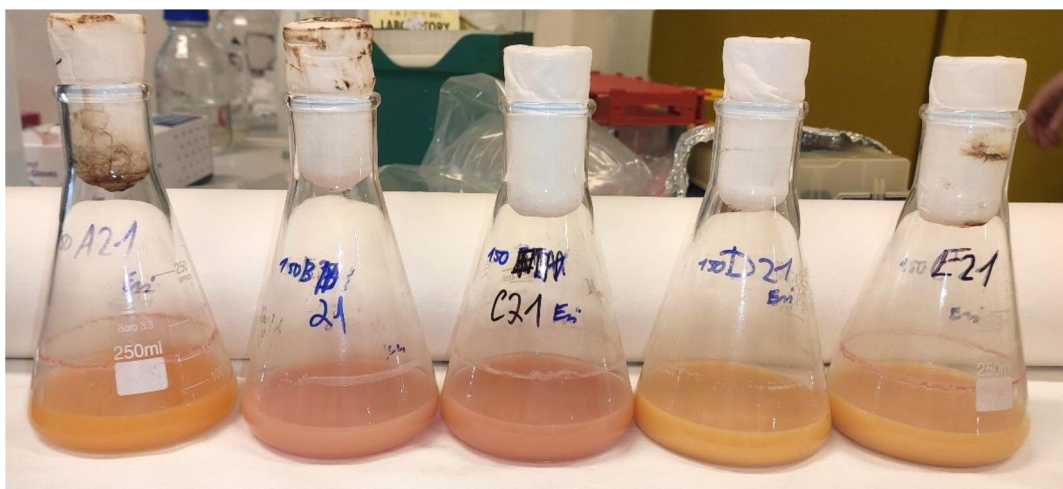
V grafe 6 bol obsah karoténoidov u kontrolného média stanovený na 4,47 mg/g biomasy. Najvyššie zastúpenie malo betakarotén s 1,00 mg/g biomasy. Zastúpenie ergosterolu bolo 2,22 mg/g biomasy a ubichinonu 1,40 mg/g biomasy. Oproti tomu všetky vzorky vykazovali menšie hodnoty karoténoidov a ubichinonu. Médium s prídavkom proteázy malo najvyššie zastúpenie ergosterolu, a to 4,22 mg/g biomasy.

U kontroly 150 pre média so zvýšeným množstvom srvátky bol obsah karoténoidov stanovený na 3,81 mg/g biomasy, obsah ergosterolu na 2,97 mg/g biomasy a obsah ubichinonu na 2,55 mg/g biomasy. Rovnako ako u médií so základným množstvom srvátky bol najvyšší obsah karoténoidov a sterolov stanovený u proteázového média. Obsah karoténoidov v médiu 150 s proteázou činil 4,15 mg/g biomasy, s najvyšším zastúpením betakaroténu. Obsah sterolov činil 4,37 mg /g biomasy a obsah ubichinonu 1,44 mg/g biomasy. Ostatné média vykazovali výrazne nižšie výťažky karoténoidov, ergosterolu i ubichinonu ako u kontroly 150.



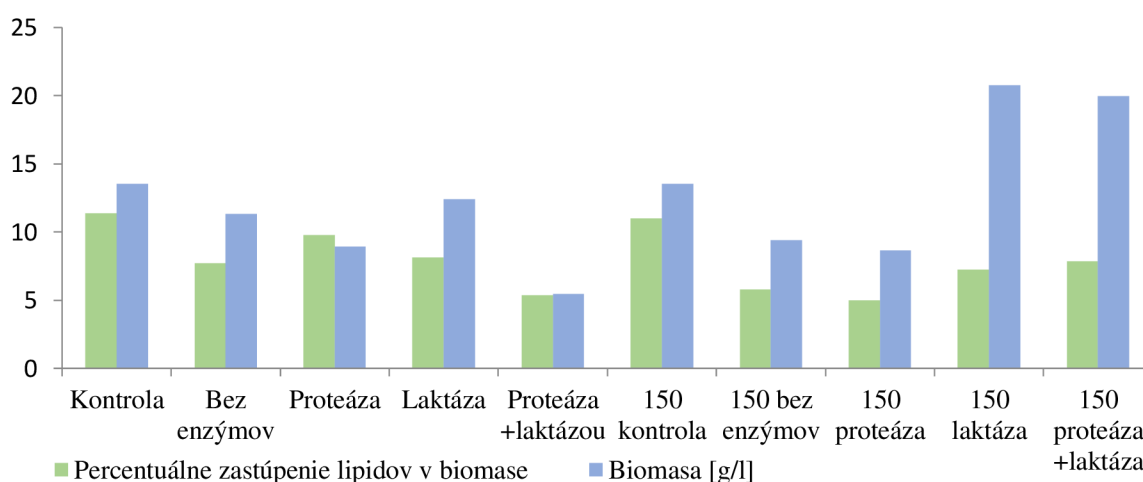
Ak porovnáme tieto dve skupiny – skupinu so základným množstvom srvátky a s 50 % zvýšením, tak možno pozorovať, že koncentrácia biomasy a zastúpenia celkových lipidov bola vyššia v médiách s navýšeným množstvom srvátky a pridaným enzýmom hlavne laktázy, ktorá bola schopná rozštiepiť laktózu zo srvátky na jednoduchšie spracovateľné cukry. Taktiež táto kvasinka vykazovala zmenu zastúpenia mastných kyselín u médií bez využitia laktázy, čo spustilo stresovú produkciu SFA u médií zo základným zložením a produkciu MUFA a PUFA u médií so zvýšeným množstvom srvátky. Táto stresová reakcia spustila taktiež vysokú produkciu karoténoidov a sterolov u týchto médií.

### 5.1.3 *Cystofilobasidium macerans* (CCY 10-1-2)



Obrázok 16 Kultivácia kmeňa *Cystofilobasidium macerans* v srvátkovom médiu so zvýšeným obsahom cukru

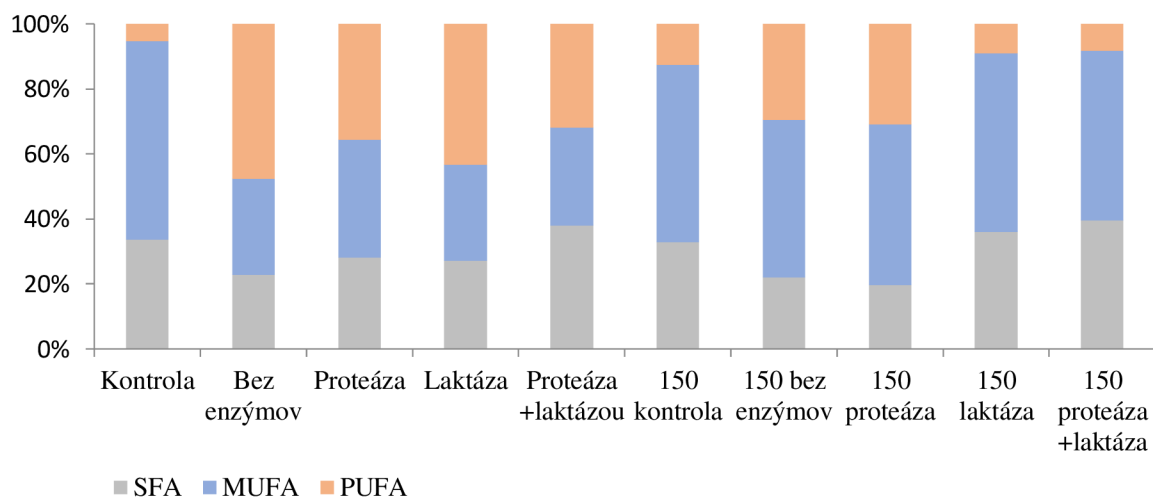
Pri kultivácii kvasinky *Cystofilobasidium macerans* obrázok 16 bola pozorovaná pri rôznych zloženiach médií zmena sfarbenia od oranžovej, ružovej až po žltú.



Graf 7 Graf percentuálneho zastúpenia lipidov v porovnaní s biomasou pri kvasinke *Cystofilobasidium macerans* na srvátkovom médiu

V grafe 7 bolo stanovené množstvo biomasy u kontrolného média na 13,54 g/l s 11,38 % zastúpením lipidov v biomase. Pri porovnaní s ostatnými médiami, bez navýšenia srvátky mali všetky média nižší výťažok biomasy ako kontrolné médium. Najbližšie sa tejto koncentrácií biomasy približovalo médium prídavkom laktázy s hodnotou 12,40 g/l a s 8,11 % zastúpením lipidov. Najvyššie percentuálne zastúpenie lipidov s výnimkou kontrolného média, bolo zaznamenané u média s proteázou s hodnotou 9,77 %.

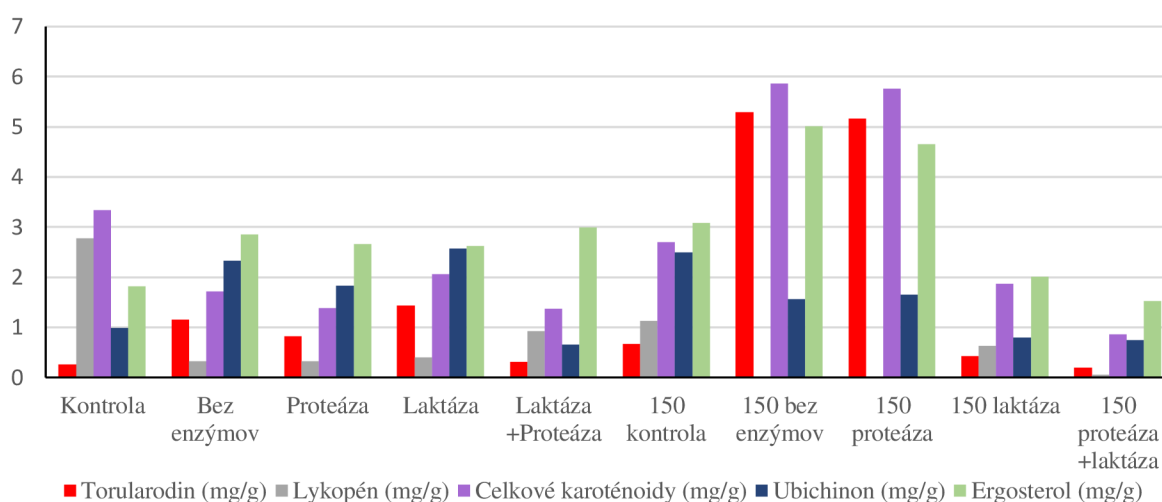
U kontrolného média 150, ktoré obsahovalo zvýšené množstvo srvátky, bola stanovená hodnota na 13,55 g/l. Percentuálne zastúpenie lipidov v biomase činilo 11,00 %. Pri porovnaní ostatných médií z tejto skupiny, mali najvyššie koncentrácie biomasy médiá s pridanou laktázou, alebo s kombináciou laktázy + proteázy. U média s prídavkom laktázy bola stanovená koncentrácia na 20,74 g/l s 7,26 % zastúpením lipidov v biomase. U média s prídavkom laktázy + proteázy bola stanovená koncentrácia na 19,98 g/l, s 7,85 % zastúpením lipidov. Tiež ako u predošlého druhu kvasinky môžeme vidieť, že médiá s pridanou laktázou majú vyššie hodnoty biomasy ako médiá bez enzýmu, prípadne médiá s pridanou proteázou. To je spôsobené tým, že laktáza je schopná rozštiepiť laktózu v srvátke na jednoduché cukry a dochádza k väčšiemu nárastu biomasy.



Graf 8 Graf percentuálneho zastúpenia mastných kyselín pre kmeň *Cystofilobasidium macerans* na srvátkovom médiu

Podľa grafu 8 bolo percentuálne zastúpenie mastných kyselín u kontrolného média bez zvýšenia množstva srvátky v zložení 33,74 % SFA, 60,98 % MUFA a 5,28 % PUFA. Pri porovnaní s kontrolným médiom, došlo u všetkých médií k výraznému zvýšeniu percentuálneho zastúpenia PUFA. Táto hodnota bolo najvyššia u média bez pridaných enzýmov s obsahom PUFA 44,56 %. Pri porovnaní s kontrolným médiom došlo u všetkých médií k miernemu zníženiu SFA. Tento pokles bol najnižší u média bez enzýmov, ktorého množstvo SFA činilo 22,78 %.

U kontrolného média 150 so zvýšenou srvátkou bol stanovený obsah mastných kyselín na 32,77 % SFA, 54,60 % MUFA a 12,63 PUFA. V médiu 150 bez enzýmov a v médiu 150 s proteázou došlo k výraznému poklesu SFA. V médiu 150 bez enzýmov klesol obsah SFA na hodnotu 22,03 % a médiu 150 s proteázou na 19,62 %. Zároveň však v týchto médiách došlo k navýšeniu množstva PUFA. V médiu 150 bez enzýmov sa obsah PUFA zvýšil na hodnotu 29,57 % a médiu 150 s proteázou na 30,83 %. Média so zvýšeným obsahom srvátky, ktoré obsahovali pridanú laktázu alebo kombináciu laktázy + proteázy mali len nepatrné zmeny v percentuálnom zastúpení mastných kyselín oproti kontrolnom médiu 150. Dôvodom tohto mohlo byť, že po rozložení laktózy na jednoduché cukry, sa zloženie cukrov srvátkových médiách podobalo na kontrolné médium.

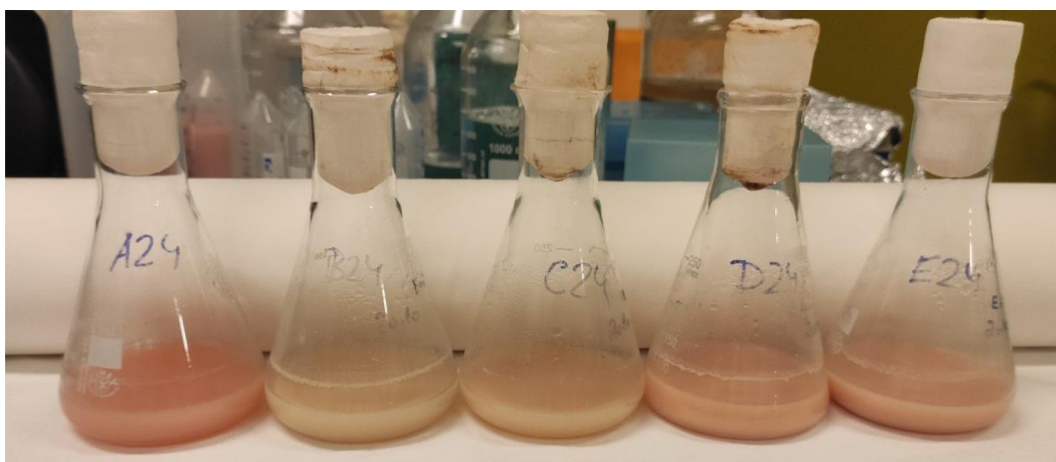


Graf 9 Graf zastúpenia vybraných karoténoidov a sterolov pre kvasinku *Cystofilobasidium macerans*

U kontrolného média bol v grafe 9 stanovený obsah karoténoidov na 3,33 mg/g biomasy obsah ergosterolu na 1,81 mg/g biomasy a obsah ubichinonu na 0,99 mg/g biomasy. V porovnaní s kontrolným médiom mali všetky srvátkové média nižší obsah karoténoidov. Obsah sterolov bol veľmi podobný u všetkých srvátkových médií a pohyboval sa od 2,62 mg/g biomasy u média s prídavkom laktázy až po 2,99 mg/g biomasy u média s kombináciou proteázy + laktázy. Obsah ubichinonu bol najvyšší u média s prídavkom laktázy a to 2,57 mg/g biomasy.

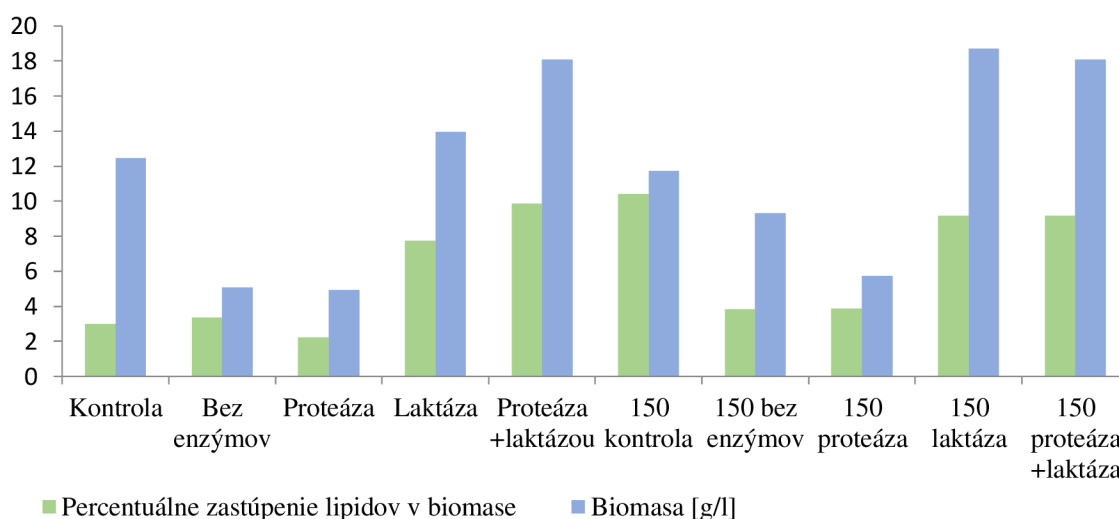
U kontroly pre média 150 so zvýšeným množstvom srvátky, bol obsah karoténoidov stanovený na 2,69 mg/g biomasy, obsah ergosterolu na 3,08 mg/g biomasy a obsah ubichinonu na 2,50 mg/g biomasy. Najvyššie hodnoty karoténoidov i ergosterolu boli spozorované u média 150 bez prídavku enzýmov a s prídavkom proteázy. U média 150 bez prídavku enzýmov bolo toto množstvo karoténoidov stanovené na 5,86 mg/g a obsah ergosterolu na 5,00 mg/g biomasy. U média 150 s pridaním proteázy bol obsah karoténoidov stanovený na 5,76 mg/g biomasy a ergosterol na 4,65 mg/g biomasy. Zvýšená produkcia karoténoidov a sterolov, mohla byť zapríčinená stresovým faktorom nedostatku živín z dôvodu neschopnosti kvasinky *Cystofilobasidium macerans* sama utilizovať laktózu zo srvátky.

#### 5.1.4 *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 19-4-6)



Obrázok 17 Kultivácia kmeňa *Rhodotorula mucilaginosa* v srvátkovom médiu

Pri kultivácii kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* obrázok 17 boli pozorované rôzne farby od sýto oranžovej, svetlo žltej až po svetlo oranžovú, čo môže predpovedať nízke zastúpenie karoténoidov v srvátkových médiách.

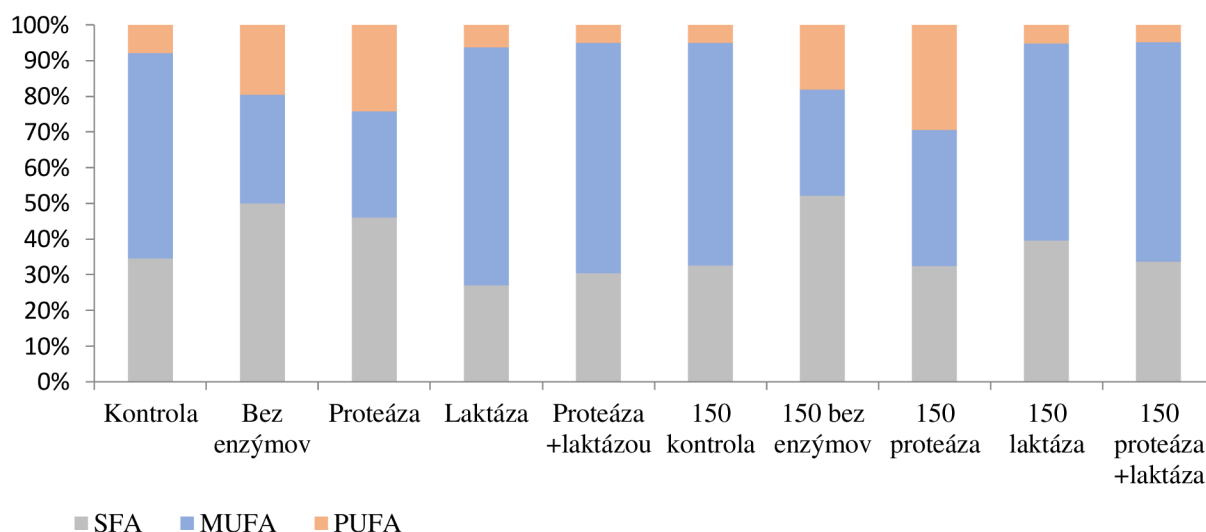


Graf 10 Graf percentuálneho zastúpenia lipidov v porovnaní s biomasou pri kvasinke *Rhodotorula mucilaginosa* na srvátkovom médiu

Podľa grafu 10 bola v médiách bez zvýšeného množstva srvátky v kontrolnom médiu stanovená koncentrácia biomasy na 12,45 g/l s 3,00 % zastúpením lipidov. Najvyššiu koncentráciu biomasy a percentuálneho zastúpenia lipidov malo médium s prídavkom kombinácie proteázy + laktázy. Táto koncentrácia tu činila 18,09 g/l s 9,87 % celkových lipidov. Taktiež došlo k výraznému nárastu biomasy v médiu s prídavkom laktázy oproti médiám, kde tento enzým nebol pridaný. Tento výťažok biomasy bol stanovený na 13,94 g/l s 7,75 % zastúpenia lipidov.

V médiách so zvýšeným množstvom srvátky bola koncentrácia biomasy v médiu kontroly 150 stanovená na 11,72 g/l so zastúpením lipidov 10,42 %. Naproti tomu médiá bez enzýmov, prípadne iba s prídavkom proteázy vykazovali koncentráciu len približne polovičnú. V médiách, kde bola pridaná laktáza alebo jej kombinácia s proteázou boli tieto výtázky najvyššie, čo bolo zapríčinené rozložením laktózy na jednoduché cukry. U média 150 s prídavkom laktázy bol obsah biomasy stanovený na 18,71 g/l s 9,17 % zastúpením lipidov v biomase. U média 150 s prídavkom laktázy + proteázy bol obsah biomasy stanovený na 18,11 g/l s 9,15 % lipidov.

Zvýšená hodnota biomasy u médií bez zvýšenia a so zvýšením srvátky bola spôsobená dostatkom využiteľných cukrov, ktoré sa nachádzali v médiách po pridaní laktózy, ktorá rozložila laktózu zo srvátky.

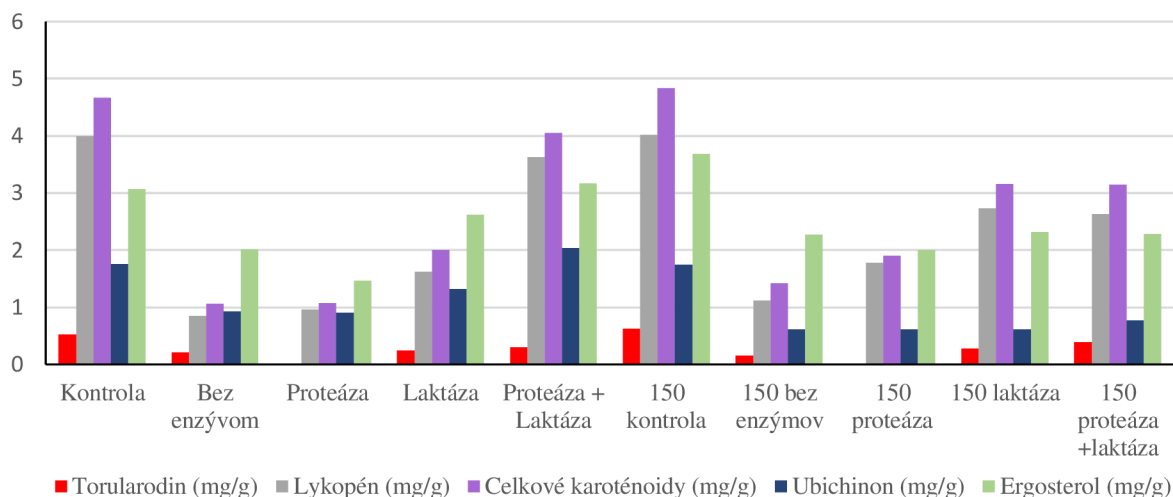


Graf 11 Graf percentuálneho zastúpenia mastných kyselín pre kmeň *Rhodotorula mucilaginosa* na srvátkovom médiu

V kontrolnom médiu pre médiá bez zvýšenia srvátky bolo podľa grafu 11 stanovené zastúpenie mastných kyselín na 31,85 % SFA, 52,89 % MUFA a 7,26 % PUFA. Najnižšie zastúpenie SFA bolo stanovené u laktózového média s 30,42 %. Toto médium malo taktiež najvyššie zastúpenie MUFA a to 66,75 %. Médium s prídavkom kombinácie proteázy + laktázy vykazovalo druhé najlepšie zastúpenie mastných kyselín s hodnotou SFA 30,42 % a MUFA 64,53 %.

Média, ktoré obsahovali zvýšený obsah srvátky boli hodnoty zastúpenia mastných kyselín kontrolného média 150 stanovené 32,57 %, 62,34 % a 5,09 %. Najvyššie zastúpenie SFA malo médium 150 bez prídania enzýmov a najnižšia hodnota bola zaznamenaná v médiu s prídavkom proteázy + to 32,50 %. Médiá bez a aj so zvýšeným obsahom srvátky ktoré obsahovali pridanú laktázu alebo kombináciu laktázy + proteázy mali len nepatrné zmeny v percentuálnom zastúpení mastných kyselín v porovnaní s kontrolnými médiami, čo mohlo byť zapríčinené tým že zloženie využiteľných cukrov v médiách s prídavkom laktázy bolo oveľa vyššie ako u média, kde sa nachádzala nerozštiepená laktáza, ktorú tento mikroorganizmus nedokázal využiť.





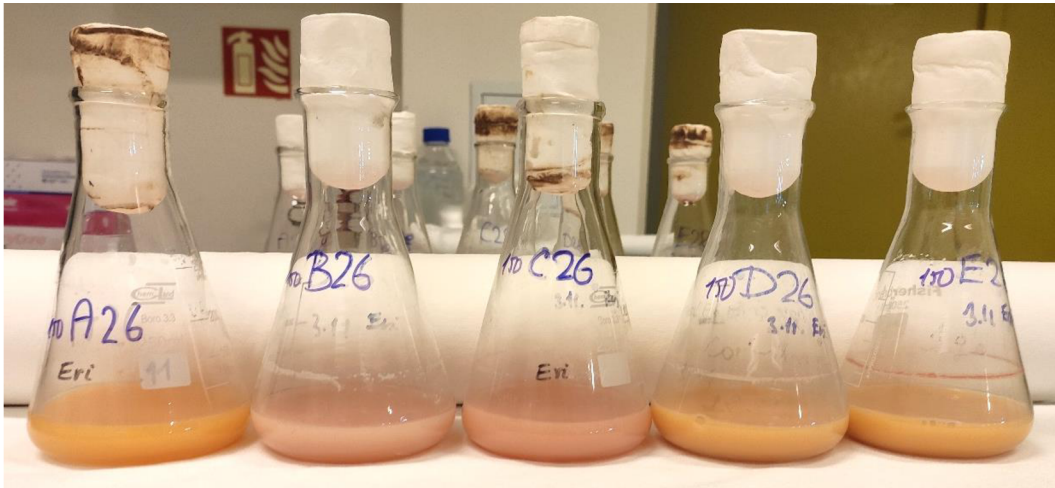
Graf 12 Graf zastúpenia vybraných karoténoidov a sterolov pre *Rhodotorula mucilaginosa*

U kontrolného média bol podľa grafu 12 stanovený obsah karoténoidov na 4,67 mg/g biomasy s najvyšším zastúpením lykopénu, ergosterolu na 3,06 mg/g biomasy a ubichinonu na 1,75 mg/g biomasy. Všetky srvátkové médiá mali v porovnaní s kontrolným médiom nižšiu výťažnosť karoténoidov. Zo srvátkových médií malo najvyššie zastúpenie karoténoidov médium s kombináciou laktázy + proteázy, kde bola hodnota stanovená na 4,05 mg/g biomasy s najväčším zastúpením lykopénu. Hneď po kontrolnom médiu, tu bol tiež zaznamenaný najvyšší obsah ergosterolu s hodnotou 3,17 mg/g biomasy a ubichinonu s hodnotou 2,03 mg/g/biomasy. Zastúpenie ergosterolu a ubichinonu bolo u ostatných srvátkových médií nižšie v porovnaní ako u kontroly.

U kontroly 150 pre médiá so zvýšeným množstvom srvátky, bol obsah karoténoidov stanovený na 4,83 mg/g biomasy s najväčším pomerom lykopénu. Obsah ergosterolu tu bol stanovený na 3,68 mg/g biomasy a obsah ubichinonu na 1,74 mg/g biomasy. Všetky srvátkové médiá 150 so zvýšeným množstvom srvátky mali nižší výťažok karoténoidov, ergosterolu a ubichinonu. Najvyššie zastúpenie karoténoidov a ergosterolu zo srvátkových médií 150 vykazovalo médium s prídavkom laktázy, kedy množstvo karoténoidov bolo stanovené na 3,15 mg/g biomasy a ergosterolu na 2,31 mg/g biomasy. Najvyššie zastúpenie ubichinonu bolo stanovené u média s prídavkom kombinácie proteázy + laktázy s hodnotou 0,77 mg/g biomasy.

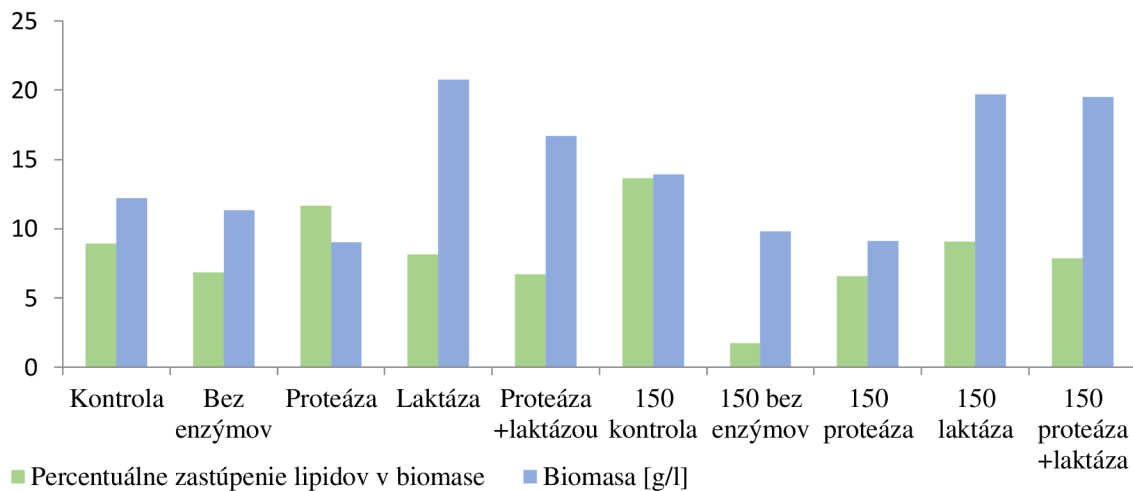
Táto kvasinka narozdiel od doteraz spomínaných kvasiniek dosahovala zvýšenú produkciu karoténoidov a ergosterolu u médií, kde bol pridaný enzým laktáza, alebo v kontrolnom médiu, čo by mohlo byť odôvodnené tým, že táto kvasinka nepotrebuje stresové podmienky na tvorbu týchto metabolitov.

### 5.1.5 *Sporidiobolus metaroseus* (CCY 19-9-6)



Obrázok 18 Kultivácia kmeňa *Sporidiobolus metaroseus* v srvátkovom médiu so zvýšeným obsahom cukru

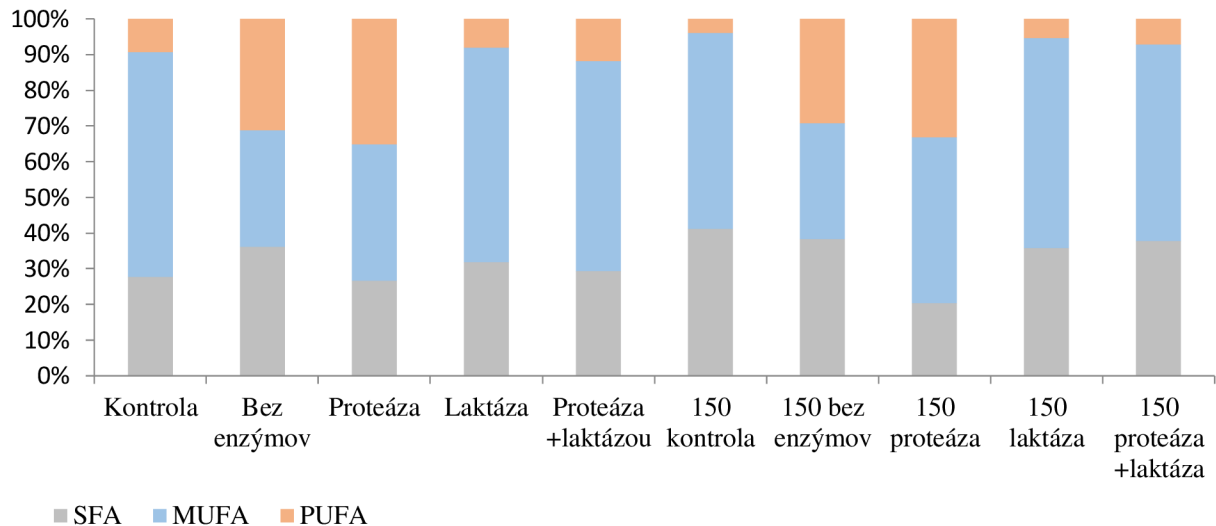
Pri kultivácii kvasinky *Sporidiobolus metaroseus* obrázok 18 bola pozorovaná zmena sfarbenia v závislosti od použitého média. Menila sa od sýto oranžovej cez ružovú, až svetlo žltoranžovú.



Graf 13 Graf percentuálneho zastúpenia lipidov v porovnaní s biomasou pri kvasinke *Sporidiobolus metaroseus* na srvátkovom médiu

V kontrolnom médiu bez zvýšenia srvátky bola podľa grafu 13 stanovená koncentrácia biomasy na 12,21 g/l s celkovými lipidmi 8,93 %. Najvyššia koncentrácia biomasy bola stanovená v médiu s pridanou laktázou, ktorej hodnota bola 20,78 g/l a so zastúpením celkových lipidov 8,14 %. Média bez pridaní enzýmov a s pridaním proteázy vykazovali nižšie hodnoty biomasy ako kontrola pretože kvasinka *Sporidiobolus metaroseus* nedokázal využiť nerozloženú laktózu zo srvátky.

V médiách so zvýšeným množstvom srvátky bola stanovená koncentrácia kontrolného médium 150 na 13,92 g/l biomasy s celkovými lipidmi 13,63 %. Najvyššiu koncentráciu spomedzi srvátkových médií malo médium s prídavkom laktázy a to 19,71 g/l s 9,07 % zastúpením lipidov. Druhú najvyššiu koncentráciu biomasy malo médium s prídavkom kombinácie laktázy a proteázy s koncentráciou 19,52 g/l biomasy a 7,86 % zastúpením lipidov. Média s prídavkom proteázy + bez enzýmov mali výrazne výt'ažky ako kontrolné médium 150.



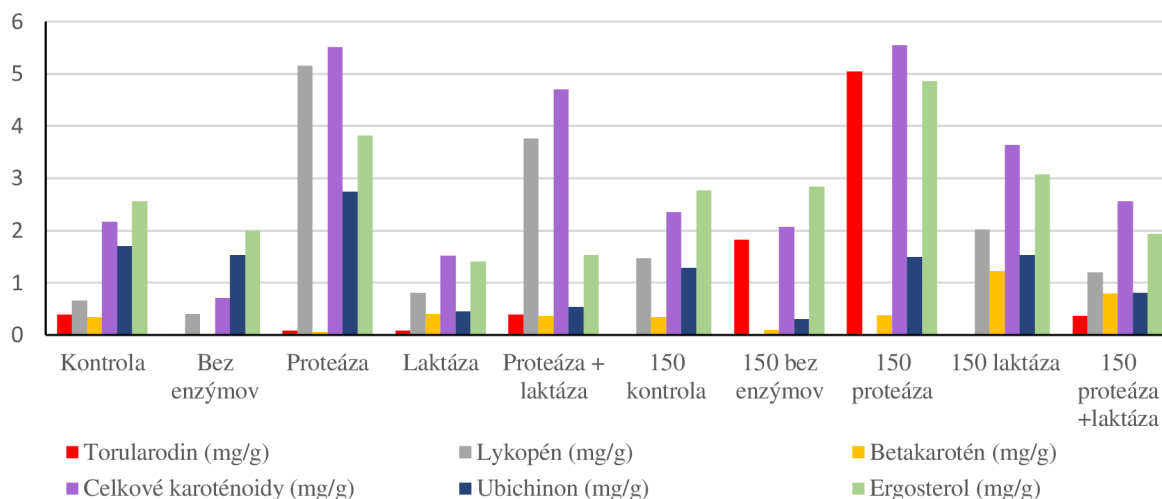
Graf 14 Graf percentuálneho zastúpenia mastných kyselín pre kmeň *Sporidiobolus metaroseus* na srvátkovom médiu

V kontrole pre médiá bez zvýšenia srvátky bolo vzhľadom na graf 14 stanovené percentuálne zastúpenie mastných kyselín na 27,71 % SFA, 63,05 % MUFA a 9,24 % PUFA. Naproti tomu len u médiá s prídavkom proteázy došlo k zníženiu množstva SFA na 26,73 %. Najvyššie zastúpenie PUFA bolo v médiu s proteázou, a to 35,09 %. Všetky vzorky mali znížené hodnoty MUFA oproti kontrolnej vzorke.

U kontroly 150 pre médiá zo zvýšeným množstvom srvátky bolo zastúpenie mastných kyselín stanovené na 41,25 % SFA, 54,73 % MUFA a 9,24 % PUFA. Najnižšie zastúpenie SFA bolo namerané u médiá s prídavkom proteázy + to 20,34 %. U ostatných vzoriek bolo pozorované mierny pokles SFA. Najvyššia hodnota PUFA bolo u médiá s prídavkom proteázy + to 33,22 %.

U médií s prídavkom proteázy, v médiu bez zvýšenia srvátky aj s ňou vykazovali zníženie zastúpenia v SFA v médiách čo by mohlo byť zapríčinené prítomnosťou aminokyselín v médiu po štiepení srvátkových bielkovín proteázou. Taktiež u tejto kvasinky sa potvrdzuje trend veľmi podobného zastúpenia mastných kyselín v médiách obsahujúcich laktázu s kontrolnými médiami.





Graf 15 Graf zastúpenia vybraných karoténoidov a sterolov pre *Sporidiobolus metaroseus*

U kontrolného média bol podľa grafu 15 stanovený obsah karoténoidov na 2,17 mg/g biomasy, obsah ergosterolu na 2,56 mg/g biomasy a ubichinonu na 1,70 mg/g biomasy. Média s prídavkom proteázy + kombinácie proteázy + laktázy mali zvýšené zastúpenie karoténoidov. U média s použitím proteázy bol stanovený obsah karoténoidov na 5,51 mg/g biomasy s najväčším zastúpením lykopénu. Zároveň malo toto médium aj najvyššie zastúpenie ergosterolu s hodnotou 3,81 mg/g biomasy a ubichinonu s 2,74 mg/g biomasy. U média s prídavkom kombinácie proteázy + laktázy bola zastúpenie karoténoidov stanovené na 4,70 mg/g. Média bez enzýmu a s prídavkom laktázy vykazovali nižšie zastúpenie karoténoidov ako u kontroly. Zastúpenie ergosterolu bolo nižšie u všetkých srvátkových médií, okrem média s prídavkom proteázy spomínaného vyššie. Hodnoty ubichinonu mali všetky srvátkové média nižšie ako u kontroly, s najvyšším zastúpením u média bez prídania enzýmov a to 1,70 mg/g biomasy.

U kontroly 150 pre média so zvýšeným množstvom srvátky bol stanovený obsah karoténoidov na 2,35 mg/g biomasy, obsah ergosterolu na 2,76 mg/g biomasy a hodnota ubichinonu na 1,28 mg/g biomasy. Najvyššie zastúpenie karoténoidov a ergosterolu bolo v médiu 150 s prídavkom proteázy. Zastúpenie karoténoidov tu bolo stanovené na 5,55 mg/g biomasy s najväčším obsahom torularodínu a zastúpenie ergosterolu s hodnotou 4,86 mg/g biomasy. Médium 150 s prídavkom laktázy malo zastúpenie karoténoidov 3,63 mg/g biomasy, s najväčším zastúpením lykopénu s hodnotou 3,07 mg/g biomasy. Toto médium malo tiež najvyššie zastúpenie ubichinonu s hodnotou a 1,52 mg/g biomasy.

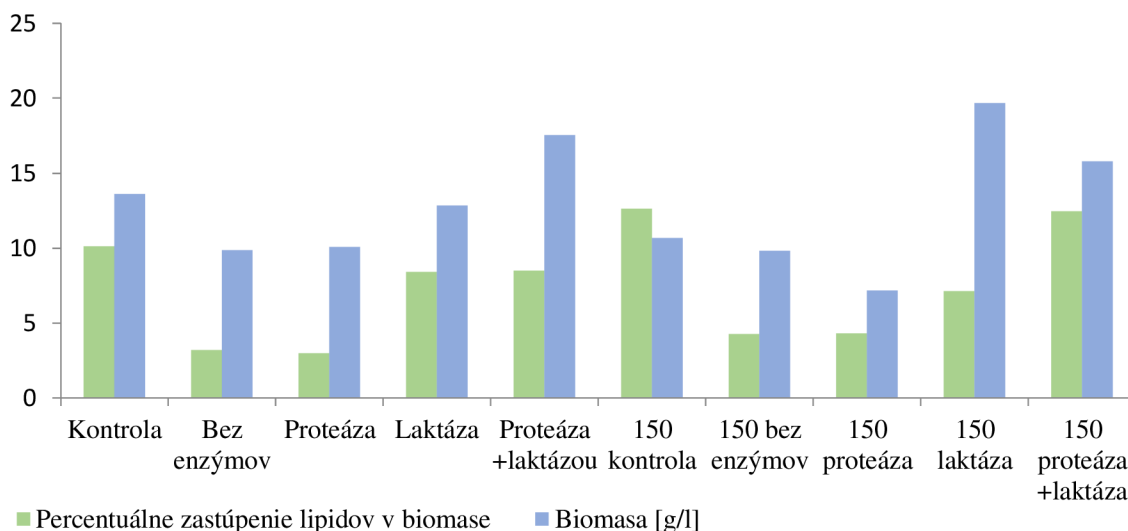
V médiách do ktorých bol pridaný enzým proteáza vykazovali zvýšené hodnoty karoténoidov a ergosterolu, čo mohlo byť zapríčinené aminokyselinami vzniknutými po rozštiepení srvátkových proteínov.

### 5.1.6 *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 20-9-7)



Obrázok 20 Kultivácia kmeňa *Sporidiobolus metaroseus* v srvátkovom médiu

Pri kultivácii kvasinky *Sporidiobolus metaroseus* na obrázku 20 možno pozorovať zmenu sfarbenia médií za použitia rôznych srvátkových substrátov. Kontrolné médium s oranžovou farbou, médium bez enzýmov a s proteázou žltej farby a médiá s laktázou a kombináciou proteázy + laktázy ružovej farby.

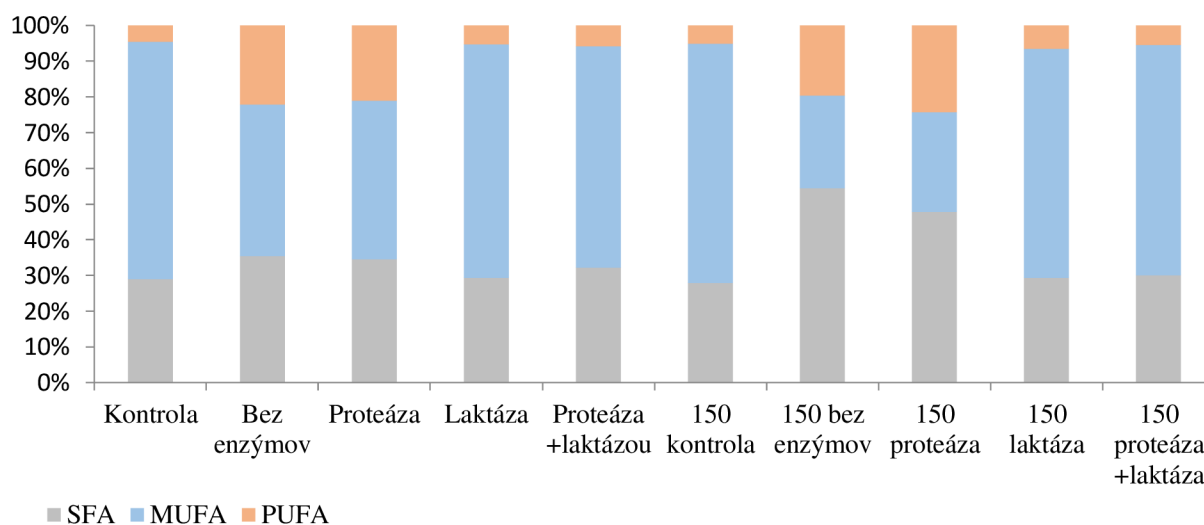


Graf 16 Graf percentuálneho zastúpenia lipidov v porovnaní s biomasou pri kvasinke *Rhodotorula mucilaginosa* na srvátkovom médiu

Podľa grafu 16 bola v kontrolnom médiu bez zvýšenia srvátky stanovená koncentrácia biomasy na 13,61 g/l s 10,12 % zastúpením lipidov v biomase. Koncentrácia biomasy bola mierne zvýšená u média s prídavkom proteázy + laktázy so stanovenou hodnotou 17,54 g/l. Percentuálny obsah zastúpenia lipidov tu činil 8,47 %.

U kontroly médií 150 so zvýšeným množstvom srvátky bola stanovená koncentrácia biomasy na 10,65 g/l s 1,62 % celkových lipidov. Najvyššiu koncentráciu biomasy malo médium 150 s prídavkom laktázy s koncentráciou 19,66 g/l a 7,13 % zastúpením celkových lipidov. Taktiež bola zaznamenaná vysoká koncentrácie biomasy u média 150 s kombináciou laktázy a proteázy s hodnotou 15,77 g/l a s 12,47 % zastúpením celkových lipidov. Médiá bez enzýmov a s prídavkom proteázy mali nižší výťažok ako kontrolné médium.

Kvasinka *Rhodotorula mucilaginosa* vykazovala veľmi podobný trend s nevyužitelnosťou laktózy v srvátke, čo malo dopad na hodnoty produkcie biomasy.

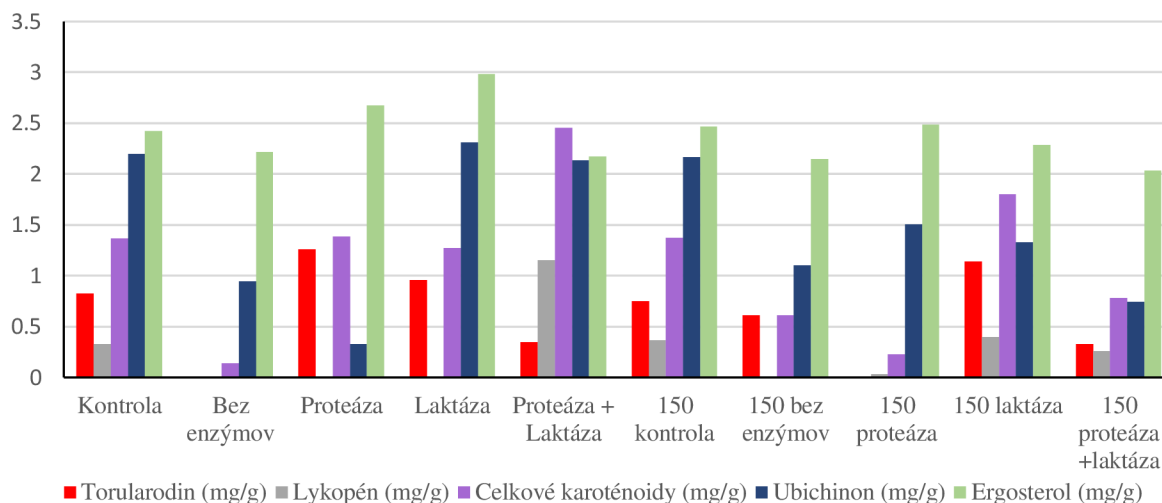


Graf 17 Graf percentuálneho zastúpenia mastných kyselín pre kmeň *Rhodotorula mucilaginosa* na srvátkovom médium

V kontrolnom médiu bez zvýšenia srvátky bol vzhľadom na graf 17 stanovený obsah zastúpenia mastných kyselín na 29,03 % SFA, 66,44 % MUFA a 4,54 % PUFA. Pri všetkých médiách bez zvýšenia srvátky sa hodnoty SFA zvýšili len minimálne. Médium bez prídavku enzýmov malo zastúpenie PUFA 22,15 % a s prídavkom proteázy vykazovalo mierne zvýšené zastúpenie PUFA na hodnotu 20,95 %.

U kontroly 150 pre médiá so zvýšeným obsahom srvátky bolo zastúpenie mastných kyselín nasledovné: 27,88 % SFA, 66,44 % MUFA a 4,54 % PUFA. Všetky srvátkové médiá vykazovali zvýšený podiel SFA, s najmenším zastúpením u média s laktázou s obsahom 29,33 % a najvyšším zastúpením u média s proteázou s hodnotou 54,46 %. Kontrolné médiá a médiá, ktoré obsahovali laktázu, alebo kombináciu laktázy + proteázy mali len nepatrné zmeny v percentuálnom zastúpení mastných kyselín. To neovplyvnilo ani zvýšený obsah pridanej syrovátky.

Táto kvasinka taktiež vykazovala, ako ostatné kvasinky spomenuté vyššie, veľmi podobné zastúpenie mastných kyselín v médiách, kde bol pridaný enzým laktáza ako v kontrolných médiách.



Graf 18 Graf zastúpenia vybraných karoténoidov a sterolov pri kvasinke *Sporidiobolus metaroseus*

Podľa grafu 18 bol u kontrolného média stanovený obsah karoténoidov na 1,37 mg/g biomasy, ergosterolu na 2,43 mg/g biomasy a ubichinonu na 2,20 mg/g biomasy. Najvyššie zastúpenie karoténoidov bolo stanovené v médiu s prídavkom kombinácie proteázy + laktázy. Jeho koncentrácia bola stanovená na 2,45 mg/g biomasy s najvyšším zastúpením lykopenú. Ostatné srvátkové médiá mali zastúpenie nižšie ako v kontrole. Najvyššia hodnota ergosterolu bola nameraná v médiu s prídavkom laktázy, kde jeho zastúpenie vzrástlo na 2,98 mg/g biomasy. Táto hodnota bola tiež výrazne vyššia hodnotota u médiu s prídavkom proteázy, kde bolo zastúpenie 2,67 mg/g biomasy. Najvyššie zastúpenie ubichinonu bolo namerané u média s prídavkom laktázy s hodnotou 2,31 mg/g biomasy. Ostatné médiá vykazovali nižšie výťažky ako kontrola.

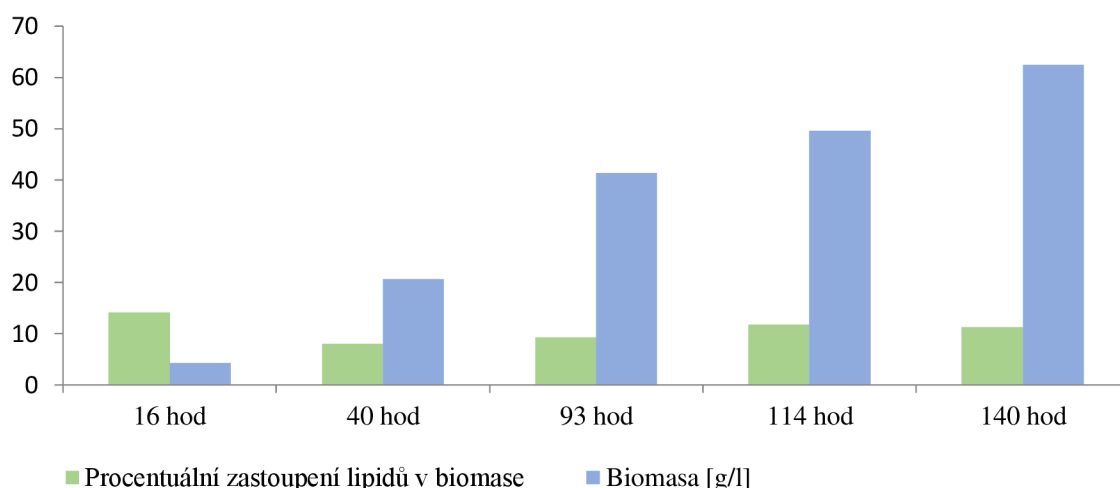
U kontroly 150 pre médiá so zvýšeným množstvom srvátky bol obsah karoténoidov nameraný na 1,37 mg/g biomasy, obsah ergosterolu na 2,47 mg /g biomasy a obsah ubichinonu na 2,17 mg/g biomasy. Najvyššie zastúpenie karoténoidov bolo u média 150 s pridaním laktázy, kde bolo zastúpenie 1,80 mg/g. Zastúpenie ergosterolu u tohto média činilo 2,48 mg/g biomasy. Najvyššie množstvo ergosterolu bolo stanovené u média 150 s prídavkom proteázy s hodnotou 2,49 mg/g biomasy. Zastúpenie ubichinonu bolo vo všetkých srvátkových médiách o niečo nižšie ako v kontrolnom médiu, avšak táto hodnota bola najvyššia u média 150 s prídavkom proteázy s hodnotou 1,50 mg/g biomasy.

Kvasinka *Sporidiobolus metaroseus* produkovala vo všetkých typoch médiách veľmi podobné výťažky ergosterolu ako v kontrolnom médiu, čo môže byť zapríčinené, tým že jej metabolizmus ergosterolu nie je ovplyvnený množstvom využiteľného cukru, ako tomu bolo u predchádzajúcich kvasiniek.

## 5.2 Stanovenie rastových vlastností v čase kultivácie vo fermentore

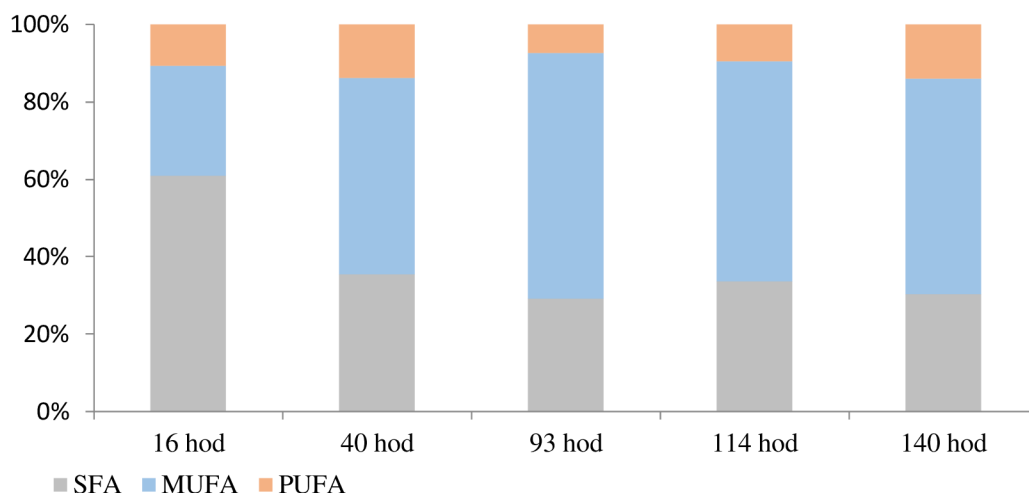
Pre kultiváciu vo fermentore bola vybraná kvasinka *Rhototorula kratochvilovae* v médiu so zvýšeným množstvom srvátky s prídavkom laktázy.

Táto kombinácia kvasinky a média boli vybrané pre svoj vysoký výtťažok biomasy a zároveň bola dobrým kompromisom ohľadom produkovaných metabolitov. Táto kvasinka vykazovala vyššie zastúpenie celkových lipidov v biomase a zároveň priaznivý pomer nasýtených a nenasýtených mastných kyselín.



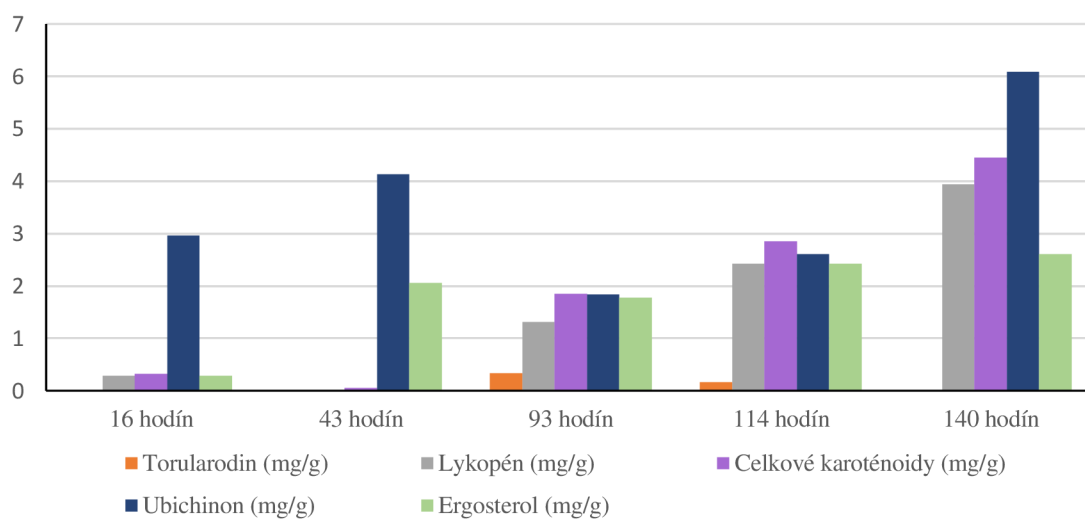
Graf 19 Graf percentuálneho zastúpenia lipidov v porovnaní s biomasou pri kvasinke *Rhodotorula mucilaginosa* na srvátkovom médiu s prídavkom laktázy v časovom vývoji fermentora

Podľa grafu 19 bola v čase 16 hodín od spustenia fermentoru nameraná hodnota biomasy 4,29 g/l s hodnotou celkových lipidov na 14,15 %. Zastúpenie lipidov bolo v tento čas najvyššie, čo mohlo byť spôsobené prechodom z inokula do produkčného média. Po 40 hodinách od spustenia bola zaznamenaná hodnota biomasy 20,63 g/l, kde kleslo percentuálne zastúpenie lipidov v biomase na najnižšiu mieru 7,95 %. V čase 93 hodín stúpila hodnota biomasy na 41,37 g/l a percentuálne zastúpenie lipidov na 9,29 %. V čase 114 hodín bola stanovená koncentrácia na hodnotu 49,64 g/l s percentuálnym zastúpením lipidov 11,75 %. Po 140 hodinách bola nameraná finálna koncentrácia biomasy 62,49 g/l so zastúpením lipidov 11,24 %. Z týchto údajov a grafu 21 je pozorovateľná veľmi rýchla miera rastu biomasy a len veľmi malá miera rastu percentuálneho zastúpenia mastných kyselín, z čoho je možné usúdiť, že kvasinky mali ideálne podmienky rastu.



Graf 20 Graf percentuálneho zastúpenia mastných kyselín pre kmeň *Rhodotorula toruloides* na srvátkovom médiu s prídavkom laktázy v časovom vývoji fermentora

Zastúpenie mastných kyselín podľa grafu 20 bolo po 16 hodinách od spustenia fermentora 60,87 % SFA, 28,48 % MUFA a 10,64 PUFA. Po 40 hodinách kultivácie sa znížil obsah SFA na 35,40 % a zvýšil sa obsah MUFA na 50,76 % a 13,84 % PUFA. Toto zastúpenie mastných kyselín už zostalo konštantné po zvyšok doby kultivácie vo fermentore, z čoho je možné odvodiť že kvasinka *Rhodotorula kratochvilovae* mala i po ukončení merania dostatok spracovateľných cukrov a nebola obmedzovaná substrátom.



Graf 21 Graf zastúpenia vybraných karoténoidov a sterolov pri kvasinke *Rhodotorula toruloides* na srvátkovom médiu s prídavkom laktázy v časovom vývoji fermentora

Podľa grafu 21 bola na začiatku kultivácie hodnota karoténoidov 0,33 mg/g biomasy. Obsah ergosterolu bol 0,29 mg/g biomasy a obsah ubichinonu 2,96 mg/g biomasy. Po dobe 40 hodín klesol obsah karoténoidov na 0,054 mg/g biomasy, kedy bol najnižší. Hodnota ergosterolu stúpla na 2,06 mg/g biomasy a hodnota ubichinonu stúpala na 4,13 mg/g biomasy. V čase 93 hodín klesla hodnota ubichinonu na hodnotu 1,84 mg/g biomasy a ergosterolu na hodnotu 1,77 mg/g biomasy. V ďalších zaznamenaných časových úsekoch začala opäť stúpať koncentrácia ergosterolu a ubichinonu. Hodnota karoténoidov stúpala len veľmi pomaly, čo bolo predpokladané vzhľadom na kultiváciu v malom objeme. Z posledného odberu v čase 140 hodín bola hodnota karoténoidov 4,45 mg/g biomasy, hodnota ergosterolu 2,61 mg/g biomasy a hodnota ubichinonu 6,08 mg/g biomasy. Kultiváciou vo fermentore sa potvrdili naše predpoklady o nízkej produkcii karoténoidov z predchádzajúcich kultivácií.



## 6 ZÁVER

Podstatou tejto práce bola optimalizácia predprípravy mliekarenského odpadu – srvátky použitím enzýmov laktázy a proteázy pre biotechnologické spracovanie vybranými kmeňmi karoténoidných kvasiniek. Pridaním vybraných enzýmov a zmenou množstva srvátky sa zmenilo zloženie substrátu, čo ovplyvnilo i produkciu metabolitov našich vybraných kvasiniek.

Vo všeobecnosti všetky nami použité karoténoidné kvasinky maximálne výtťažky biomasy a percentuálne zastúpenie mastných kyselín u médií so zvýšeným množstvom srvátky, v ktorých bol použitý enzým laktáza, ktorý najprv rozštiepil laktózu na jednoduché cukry glukózu a galaktózu. Tieto jednoduché cukry už boli spracovateľné pre kvasinky. Použitie laktázy v médiách malo tiež vplyv na percentuálne zastúpenie mastných kyselín v biomase. Vo väčšine týchto médií bolo percentuálne zastúpenie mastných kyselín veľmi podobné kontrolným médiám, čo mohlo byť zapríčinené rozštiepením laktózy na jednoduché cukry a tým priblíženie podmienok srvátkových médií s kontrolnými médiami.

Produkcia karoténoidov a sterolov bola veľmi často premenlivá u rôznych organizmov. Väčšina z nich však mala najvyššie hodnoty karoténoidov a sterolov v médiách bez enzýmov a v médiách s proteázou. Tento trend mohol byť zapríčinený stresovým faktorom nedostatku využiteľného substrátu, kedy kvasinky prešli na metabolizmus zásobných látok sterolov a karoténoidov. Výnimkou boli kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 19-4-6), ktorej zastúpenie karoténoidov bolo najvyššie v kontrolných médiách a v médiách, kde bola využitá laktáza a kvasinka *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 20-9-7), ktorej zastúpenie sterolov sa v závislosti zloženia takmer vôbec nemenil.

Využitie enzýmu laktázy pri kultivácií karoténoidných kvasiniek významne ovplyvňovalo produkciu biomasy a kvasinkových metabolizmov. Na druhú stranu, využitie proteázy v kultiváciách vybraných mikroorganizmov malo len minimálny vplyv na produkciu obohatenej biomasy.



## 7 ZDROJE POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6
- [2] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky*. Bratislava: Slovenské vydavateľstvo technickej literatúry, 1957. Edícia literatúry pre potravinársky priemysel. ISBN (Váz.).
- [3] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkových mikroorganizmov*. Bratislava: Alfa, 1990. ISBN 80-05-00644-6.
- [4] Khyati Joshi, Pravir Kumar, Rashmi Kataria, Microbial carotenoid production and their potential applications as antioxidants: A current update, *Process Biochemistry*, 2023, ISSN 1359-5113.
- [5] Ayerim Hernández-Almanza, Julio Montañez-Sáenz, Cristian Martínez-Ávila, Raúl Rodríguez-Herrera, Cristóbal N. Aguilar, Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YB-252 in solid-state fermentation, *Food Bioscience*, Volume 7, 2014, Pages 31-36, ISSN 2212-4292
- [6] PETRIK, Sinisa, Ivana MAROVA, Andrea HARONIKOVA, Iveta KOSTOVOVA a Emilia BREIEROVA. Production of biomass, carotenoid and other lipid metabolites by several red yeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production – a comparative screening study. *Annals of Microbiology* [online]. 2013, **63**(4), 1537-1551 [cit. 2023-03-25]. ISSN 1590-4261. Dostupné z: doi:10.1007/s13213-013-0617-x
- [7] KWON-CHUNG, K.J. *Cystofilobasidium Oberwinkler & Bandoni*. In: *The Yeasts* [online]. Elsevier, 1998, 1998, s. 646-653 [cit. 2023-03-25]. ISBN 9780444813121. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044481312-1/50085-X
- [8] STATZELL-TALLMAN, A. a J.W. FELL. *Rhodotorula F.C. Harrison*. In: *The Yeasts* [online]. Elsevier, 1998, 1998, s. 800-827 [cit. 2023-03-25]. ISBN 9780444813121. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044481312-1/50110-6
- [9] SAMPAIO, José Paulo. *Rhodosporidium*. In: *The Yeasts* [online]. Elsevier, 2011, 2011, s. 1523-1539 [cit. 2023-03-25]. ISBN 9780444521491. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-52149-1.00127-0
- [10] STATZELL-TALLMAN, A. a J.W. FELL. *Rhodosporidium Banno*. In: *The Yeasts* [online]. Elsevier, 1998, 1998, s. 678-692 [cit. 2023-03-25]. ISBN 9780444813121. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044481312-1/50091-5
- [11] STATZELL-TALLMAN, A. a J.W. FELL. *Sporidiobolus Nyland*. In: *The Yeasts* [online]. Elsevier, 1998, 1998, s. 693-699 [cit. 2023-03-25]. ISBN 9780444813121. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044481312-1/50092-7
- [12] SAMPAIO, José Paulo. *Sporidiobolus Nyland (1949)*. In: *The Yeasts* [online]. Elsevier, 2011, 2011, s. 1549-1561 [cit. 2023-03-25]. ISBN 9780444521491. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-52149-1.00130-0
- [13] DOUKANI, Koula, Ammar S.M. SELLES, Hasna BOUHENNI, Meriem CHAFAA a Leila SOUDANI. Carotenoids (Xanthophylls and Carotenes). In: *Antioxidants Effects in Health* [online]. Elsevier, 2022, 2022, s. 279-308 [cit. 2023-04-05]. ISBN 9780128190968. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-819096-8.00044-6

- [14] YASMEEN, Nusrath, Aga SYED SAMEER a Saniya NISSAR. Lycopene. In: *Nutraceuticals and Health Care* [online]. Elsevier, 2022, 2022, s. 115-134 [cit. 2023-04-05]. ISBN 9780323897792. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-89779-2.00009-0
- [15] HOLUB, Jiří. Optimalizace kultivace karotenogenních kvasinek na směsných odpadních substrátech [online]. Brno, 2020 [cit. 2023-3-29]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zavprace/detail/123930>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.
- [16] *Bioscience* [online]. 2023, **52** [cit. 2023-04-05]. ISSN 22124292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2023.102388
- [17] HEJRI, Abdolrasoul, Alireza KHOSRAVI, Kamaladin GHARANJIG a Mohammadreza Malekzade DAVARANI. Effect of edible antioxidants on chemical stability of  $\beta$ -carotene loaded nanostructured lipid carriers. *LWT* [online]. 2019, **113** [cit. 2023-04-06]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2019.108272
- [18] JOSHI, Khyati, Pravir KUMAR a Rashmi KATARIA. Microbial carotenoid production and their potential applications as antioxidants: A current update. *Process Biochemistry* [online]. 2023, **128**, 190-205 [cit. 2023-04-17]. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2023.02.020
- [19] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. Praha: Academia, 1992. ISBN 80-200-0441-6.
- [20] VOET, Donald a Judith G. VOET. *Biochemistry*. 3rd ed. Hoboken: John Wiley, 2004. ISBN 0-471-39223-5.
- [21] ŠÍCHO, Vladislav, Zdeněk VODRÁŽKA a Blanka KRÁLOVÁ. *Potravinářská biochemie: ... učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. 2., dopln. a přeprac. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1981.
- [22] ZHAO, Changhui, Nan CHEN a Tolulope Joshua ASHAOLU. Whey proteins and peptides in health-promoting functions – A review. *International Dairy Journal* [online]. 2022, **126** [cit. 2022-04-08]. ISSN 09586946. Dostupné z: doi:10.1016/j.idairyj.2021.105269
- [23] RYAN, Michael P. a Gary WALSH. The biotechnological potential of whey. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* [online]. 2016, **15**(3), 479-498 [cit. 2023-05-22]. ISSN 1569-1705. Dostupné z: doi:10.1007/s11157-016-9402-1
- [24] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Analytická chemie*. Přeložil Karel NESMĚRÁK, přeložil Václav ČERVENÝ, přeložil Tomáš KRÍŽEK, přeložil Eliška NOVÁKOVÁ. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0.
- [25] CHRISTIAN, Gary D. *Analytical chemistry*. 5th ed. New York: John Wiley, 1994. ISBN 0-471-59761-9.
- [26] BROUN, Pierre a Chris SOMERVILLE. Progress in plant metabolic engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2001, **98**(16), 8925-8927 [cit. 2023-05-22]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.171310598

- [27] FRENGOVA, Ginka I. a Dora M. BESHKOVA. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2009, **36**(2), 163-180 [cit. 2023-04-23]. ISSN 1367-5435. Dostupné z: doi:10.1007/s10295-008-0492-9
- [28] LEHNINGER, Albert L., Michael M. COX a David L. NELSON. *Principles of Biochemistry*. 2nd Ed. New York: Worth Publishers, 1993. ISBN isbn0-87901-500-4.
- [29] VOET, Donald a Judith G. VOET. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN isbn80-85605-44-9.
- [30] KAŠTÁNEK, František. *Bioinženýrství*. 1. Praha: Academia, 2001. ISBN 80-200-0768-7.
- [31] PÁCA, Jan. *Bioreaktory*. *Kvasný průmysl*. 1987, **33**(1), 20-21.
- [32] KOHLMEIER, Martin. Ubiquinone. In: *Nutrient Metabolism* [online]. Elsevier, 2003, 2003, s. 532-537 [cit. 2023-04-29]. ISBN 9780124177628. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012417762-8.50077-6.
- [33] KRIS-ETHERTON, PENNY, KAI HECKER, DENISE SHAFFER TAYLOR, GUIXIANG ZHAO, STACIE COVAL a AMY BINKOSKI. Dietary Macronutrients and Cardiovascular Risk. In: *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease* [online]. Elsevier, 2001, 2001, s. 279-290 [cit. 2023-05-02]. ISBN 9780121931551. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012193155-1/50020-9.
- [34] CALDER, Philip C. Metabolism of Polyunsaturated Fatty Acids by Cells of the Immune System. In: *Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism* [online]. Elsevier, 2018, 2018, s. 135-155 [cit. 2023-05-02]. ISBN 9780128112304. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-811230-4.00008-9
- [35] DUPONT, J. VEGETABLE OILS | Dietary Importance. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* [online]. Elsevier, 2003, 2003, s. 5921-5925 [cit. 2023-05-02]. ISBN 9780122270550. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-227055-X/01229-3
- [36] SHEN, Xiuru, Lingtong LIAO, Guoqiang ZHANG, Jingwen ZHOU, Jianghua LI a Guocheng DU. Characterization of putative mannoprotein in *Kluyveromyces lactis* for lactase production. *Synthetic and Systems Biotechnology* [online]. 2023, **8**(1), 168-175 [cit. 2023-05-02]. ISSN 2405805X. Dostupné z: doi:10.1016/j.synbio.2023.01.001
- [37] DUPONT, Sebastien, Guillaume LEMETAIS, Thierry FERREIRA, Philippe CAYOT, Patrick GERVAIS a Laurent BENEY. ERGOSTEROL BIOSYNTHESIS: A FUNGAL PATHWAY FOR LIFE ON LAND? Evolution [online]. 2012, **66**(9), 2961-2968 [cit. 2023-05-07]. ISSN 00143820. Dostupné z: doi:10.1111/j.1558-5646.2012.01667.x
- [38] WEETE, John D., Maritza ABRIL, Meredith BLACKWELL a Geraldine BUTLER. Phylogenetic Distribution of Fungal Sterols. *PLoS ONE* [online]. 2010, **5**(5) [cit. 2023-05-07]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.001089
- [39] CASAGRANDE, Daniela, Paulo H. WAIB a Alceu Afonso JORDÃO JÚNIOR. Mechanisms of action and effects of the administration of Coenzyme Q10 on metabolic syndrome. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism* [online]. 2018, **13**, 26-32 [cit. 2023-05-07]. ISSN 23523859. Dostupné z: doi:10.1016/j.jnim.2018.08.00

- [40] ERNSTER, Lars a Gustav DALLNER. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 1995, 1271(1), 195-204 [cit. 2023-05-07]. ISSN 09254439. Dostupné z: doi:10.1016/0925-4439(95)00028-3
- [41] ERNSTER, Lars a Gustav DALLNER. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 1995, 1271(1), 195-204 [cit. 2023-05-07]. ISSN 09254439. Dostupné z: doi:10.1016/0925-4439(95)00028-3
- [42] SETTLE, Frank A. *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. 1. New Jersey: Prentice Hall PTR, 1997. ISBN 0-13-177338-0.
- [43] MURRAY, Robert K. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Přeložil Bohuslav MATOUŠ. Praha: Galén, c2012. ISBN isbn978-80-7262-907-7.

## **8 ZOZNAM SKRATIEK**

MVA	Mevalonová dráha
IPP	Izopentenylpyrofosfát
DMAPP	Dimethylallyldifosfát
GGPP	Geranylgeranylpyrofosfát
MUFA	Mononasýtené mastné kyseliny
PUFA	Polynasýtené mastné kyseliny
SFA	Nasýtené mastné kyseliny
HPLC	Vysokoučinná kvapalinová chromatografia
GC	Plynová chromatografia
FID	Plameňový ionizačný detektor
DAD	Detektor diódového poľa