



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

STUDIUM PRODUKČNÍCH VLASTNOSTÍ KVASINEK RODU METCHNIKOWIA

STUDY OF PRODUCTION PROPERTIES OF METSCHNIKOWIA YEASTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Markéta Chadimová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1566/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Markéta Chadimová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Němcová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Studium produkčních vlastností kvasinek rodu *Metschnikowia*

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Rešerše – přehled mikrobiálních producentů významných lipidů, funkce a průmyslové využití lipidických látek
- 2) Optimalizace produkce lipidických látek kvasinkami rodu *Metschnikowia* s využitím vybraných forem stresových podmínek (teplota, nutriční stres)
- 3) Analýza metabolitů instrumentálními technikami

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

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

Markéta Chadimová
student(ka)

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Kvasinky rodu *Metschnikowia* jsou schopné produkovat za různých podmínek různě velké množství lipidů, které mají pozoruhodné využití v biotechnologiích a v průmyslu. Tato bakalářská práce je zaměřena na studium kultivačních podmínek, za kterých kvasinky vyprodukují nejvíce lipidů a také se zabývá tím, z jakých mastných kyselin jsou tyto triacylglyceroly složeny. Je také sledován vliv kultivačních podmínek na množství biomasy. Bylo zkoumáno pět kmenů kvasinek a to *M. pulcherrima* 145, *M. pulcherrima* 147, *M. pulcherrima* 149, *M. andauensis* 129 a *M. chrysoerlae* 1158. Na kultivaci byla použita kultivační média s různými poměry C/N, obsahující glukózu, nebo levné odpadní substráty (glycerol, káva a odpadní tuk). Kultivace byly prováděny při několika teplotách a následně bylo zjišťováno množství narostlé biomasy, pomocí plynové chromatografie bylo dále zjištěno složení a poměr mastných kyselin.

Jako kvasinka, která vyprodukovala v čase nejvíce biomasy, byla stanovena kvasinka *M. chrysoerlae* 1158, která po 336 hodinách růstu při teplotě 15 °C na médiu o poměru C/N = 100 byla schopná vytvořit 10,66 g/l biomasy. Největšího množství lipidů bylo dosaženo u kmene *M. andauensis* 129 při teplotě 8 °C na médiu C/N = 100 (21,57 % lipidů v sušině). Pokud vezmeme do úvahy i produkci biomasy, nejlepšího výsledku dosahuje kvasinka *M. chrysoerlae* 1158 při teplotě 11 °C na médiu s poměrem C/N = 100 s produkcí biomasy 10,15 g/l a 19,58 % lipidů v sušině. Tato kvasinka proto byla dále kultivována na odpadních substrátech.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kvasinky, *Metschnikowia*, lipidy, mastné kyseliny, odpadní substráty, plynová chromatografie

ABSTRACT

Metschnikowia yeasts are able to produce under different conditions different amounts of lipids, which have remarkable uses in biotechnology and industry. This bachelor thesis is focused on the study of cultivation conditions under which yeasts produce the most lipids and also deals with which fatty acids these triacylglycerols are composed of. The influence of cultivation conditions on the amount of biomass is also monitored. Five yeast strains were examined, namely *M. pulcherrima* 145, *M. pulcherrima* 147, *M. pulcherrima* 149, *M. andauensis* 129 and *M. chrysoperlae* 1158. Cultivation media with different C/N ratios, containing glucose or cheap waste substrates (glycerol, coffee and waste fat) were used for cultivation. The cultivations were performed at several temperatures and then the amount of grown biomass was determined, and the composition and ratio of fatty acids were determined by gas chromatography.

As yeast that produced the most biomass per time was determined the yeast *M. chrysoperlae* 1158, which after 336 hours of growth at 15 °C was able to produce 10,66 g/l of biomass on a medium with a ratio of C/N = 100. The highest amount of lipids was obtained with yeast *M. andauensis* 129 at 8 °C on medium with a ratio of C/N = 100 (21,57 % lipids in dry matter). If biomass production is also taken into account, the best results are obtained by the yeast *M. chrysoperlae* 1158 at a temperature of 11 °C on a medium with a ratio of C/N = 100 with a biomass production of 10,15 g/l and 19,58 % lipids in dry matter. This yeast was therefore further cultivated on waste substrates.

KEY WORDS

Yeasts, *Metschnikowia*, lipids, fatty acids, waste substrates, gas chromatography

CHADIMOVÁ, Markéta. *Studium produkčních vlastností kvasinek rodu Metchnikowia*. Brno, 2020. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Andrea Němcová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí své bakalářské práce Ing. Andree Němcové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, informace, ochotu a trpělivost při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat mé konzultantce Ing. Daně Byrtusové za rady a připomínky při zpracování teoretické části práce, ale hlavně za pomoc v laboratoři při řešení experimentální části práce. V neposlední řadě patří velký dík mé rodině za psychickou a finanční podporu během celého bakalářského studia.

OBSAH:

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Mikroorganismy	10
2.1.1	Klasifikace mikroorganismů	10
2.2	Kvasinky	11
2.2.1	Morfologie kvasinek	11
2.2.2	Cytologie kvasinek	12
2.2.2.1	Buněčná stěna	12
2.2.3	Růst a rozmnožování kvasinek	12
2.2.4	Chemické složení kvasinek	13
2.2.5	Růst a kultivace mikroorganismů	14
2.2.5.1	Druhy kultivace	14
2.2.5.2	Růstová křivka	14
2.2.5.3	Živná média	15
2.3	Významné metabolity kvasinek	16
2.3.1	Lipidy	16
2.3.1.1	Biosyntéza lipidů oleogenními kvasinkami	16
2.3.1.2	Faktory ovlivňující akumulaci lipidů	17
2.3.1.3	Funkce a průmyslové využití lipidů	18
2.4	Kvasinky rodu <i>Metschnikowia</i>	19
2.5	Odpadní substráty	21
2.5.1	Glycerol z bionafty	21
2.5.2	Syrovátka	21
2.5.3	Melasa	21
2.5.4	Odpadní tuk	22
2.5.5	Možnosti ovlivnění produkce lipidů pomocí fyzikálních stresových faktorů	22
2.6	Produkce metabolitů kvasinek rodu <i>Metschnikowia</i> na odpadních substrátech	22
2.7	Přehled metod využívaných při analýze mikrobiálních metabolitů	23
2.7.1	Stanovení mastných kyselin plynovou chromatografií	23
2.7.2	Analýza sacharidů	23

2.7.2.1	HPLC/RI	23
2.7.2.2	Enzymatické metody.....	24
3	CÍLE PRÁCE	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	26
4.1	Chemikálie, přístroje, pomůcky.....	26
4.1.1	Použité chemikálie:	26
4.1.1.1	Chemikálie použité na kultivační médium	26
4.1.1.2	Chemikálie použité na přípravu vzorků pro GC	26
4.1.2	Přístroje a pomůcky:.....	26
4.1.2.1	Pomůcky pro kultivaci	26
4.1.2.2	Pomůcky pro izolaci a analýzu lipidů	26
4.1.3	Kvasinkové kmeny:.....	27
4.2	Metody využité při analýze	27
4.2.1	Kultivace kvasinek	27
4.2.1.1	Podmínky kultivace	27
4.2.1.2	Příprava kultivačního média	27
4.2.1.3	Příprava inokula	28
4.2.1.4	Příprava produkčních médií	28
4.2.2	Odpadní substráty	29
4.2.3	Stanovení biomasy	30
4.2.4	Izolace a analýza mastných kyselin plynovou chromatografií.....	30
4.2.4.1	Příprava transesterifikační směsi	30
4.2.4.2	Přímá transesterifikace	30
4.2.4.3	Stanovení množství a profilu mastných kyselin	31
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	32
5.1	Závislost nárůstu biomasy na čase.....	32
5.1.1	Růst při 8 °C	32
5.1.2	Růst při 11 °C	34
5.1.3	Růst při 15 °C	36
5.2	Zastoupení mastných kyselin.....	38

5.2.1	Růst při 8 °C	38
5.2.2	Růst při 11 °C	41
5.2.3	Růst při 15 °C	45
5.3	Růst na odpadních substrátech	48
5.3.1	Množství biomasy	49
5.3.2	Množství lipidů	49
6	ZÁVĚR	52
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	54
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	60
9	PŘÍLOHY	61

1 ÚVOD

Lipidy jsou látky hojně využívané v každodenním životě. Setkáváme se s nimi v potravinářském průmyslu, v kosmetice a jsou také využívány při výrobě biopaliv. Jelikož existují oleogenní kvasinky, které se vyznačují tím, že jsou schopny produkovat lipidy podobné rostlinným olejům, bylo by možné těmito lipidy rostlinné oleje nahrazovat. V potravinářském průmyslu je nejčastěji využívaným tukem palmový olej, tudíž dochází ke kácení dešťových pralesů, což je jeden z globálních problémů. Lipidy, které kvasinky vyprodukují, jsou velmi podobné právě rostlinným olejům, proto by bylo možné tyto lipidy využít jako potenciální náhradu například palmového oleje. Taktéž by se tyto lipidy daly využít i v jiných průmyslových odvětvích, například při výrobě biopaliv.

Z ekonomického hlediska je výhodné tyto kvasinky, které produkují lipidy skládající se z triacylglycerolů, kultivovat na levných a snadno dostupných substrátech. Těmito substráty mohou být snadno rozložitelné látky obsahující různé sacharidy jakožto zdroj živin při kultivaci kvasinek. Známými a snadno dostupnými substráty jsou například slupky z brambor, otruby, zbytky ze zpracování ovoce, sláma, syrovátka, melasa a další. Výhodou některých kvasinek je, že nevyžadují světlo a jsou schopny růst při nízké teplotě a nízkém pH, což také výrazně snižuje náklady celého procesu.

Tato bakalářská práce se zabývá studií regulace produkce biomasy a lipidů u pěti kmenů kvasinek rodu *Metschnikowia*. Množství produkované biomasy a lipidů je ovlivněna oxidačním a nutričním stresem. Ten může být způsoben změnou kultivační teploty, kultivací na různých živných médiích, a i například kultivací na odpadních substrátech. V této bakalářské práci proto probíhala kultivace při třech různých teplotách, a to 8, 11 a 15 °C, na dvou různých médiích, jedno o poměru C/N = 100 a druhé C/N = 150. Poté byla kvasinka *M. chrysoperlae* 1158 kultivována ještě na třech odpadních substrátech. Jako odpadní substráty byl použit glycerol, káva, a odpadní tuk.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mikroorganismy

Mikroorganismy mají pro život člověka a celkově pro přírodu veliký smysl, neboť ovlivňují tvorbu a zachování životního prostředí na planetě. Udržují správný koloběh prvků v přírodě, díky nim také dochází k samočištění vodních toků a průmyslových odpadních vod. Jsou rovněž schopny zastavit činnost jiných organismů, a tím prodloužit skladovatelnost potravin. Z toho důvodu se některé využívají v kvasném a mlékárenském průmyslu, při výrobě sýra, při kvašení zelí apod. Využití najdou i ve farmaceutickém průmyslu například při výrobě antibiotik. Jelikož jsou mikroorganismy schopny syntetizovat bílkoviny mnohem větší rychlostí než jakékoli jiné organismy, a ještě k tomu využívat odpadní látky, mají mimořádný význam při zajišťování výživy lidstva [1].

Mikroorganismy jsou jednobuněčné nebo vícebuněčné organismy, které nejsme schopni pozorovat okem, a které nejsou schopny tvořit funkčně diferencované tkáně nebo pletiva [1] [2]. Jejich důležitou vlastností je hodně velký povrch v porovnání s celkovou velikostí. Díky tomu jsou schopni rychleji přijímat potravu a tím rychleji růst. Další výhodou je jejich krátká generační doba a velká četnost populací, které můžeme jednoduše technicky získat. Dokážou se velmi rychle adaptovat na nejrůznější živiny, díky čemuž je jednodušší jejich kultivace [2].

2.1.1 Klasifikace mikroorganismů

Mikroorganismy můžeme rozdělit na **Eukaryota** a **Prokaryota**. Eukaryota jsou organismy, které mají pravé jádro s jadernou membránou, ve kterém je deoxyribonukleová kyselina (DNA) uspořádána do chromozomů. Naopak Prokaryota jsou organismy, které nemají diferencované jádro. Mikroorganismy můžeme zařadit jak k eukaryotickým, tak k prokaryotickým organismům [1] [2].

Podle toho, jak se mikroorganismy vyživují, je dělíme na **autotrofní** a **heterotrofní**.

- Autotrofní mikroorganismy potřebují pro výživu pouze anorganické sloučeniny. energii získávají nejčastěji ze světelné energie nebo oxidací anorganických sloučenin, jako zdroj uhlíku využívají oxid uhličitý a zdrojem dusíku jsou obvykle dusičnany nebo amonné soli.
- Heterotrofní mikroorganismy vyžadují pro svoji výživu a růst organické sloučeniny. Rozlišují se organismy **prototrofní**, kterým stačí jednoduché organické uhlíkaté sloučeniny a organismy **auxotrofní**, které vyžadují navíc složitější sloučeniny, jako jsou například vitamíny, aminokyseliny apod [1].

Podle nároků na kyslík mikroorganismy dělíme na **aerobní** a **anaerobní**.

- Aerobní mikroorganismy vyžadují pro svůj růst a rozmnožování vzdušný kyslík nebo kyslík rozpuštěný ve vodě.
- Anaerobní mikroorganismy nevyžívají volný kyslík, jejich metabolismus probíhá bez vzdušného kyslíku. Tyto mikroorganismy nejsou schopny kyslík využívat, působí na ně spíše negativně (inhibičně) až toxicky [1] [2].

Podle toho, jak získávají energii, dělíme mikroorganismy na **fototrofní** a **chemotrofní**.

- Fototrofní mikroorganismy získávají energii při přeměně světelné energie na energii chemickou. Při této přeměně je stejně jako u rostlin důležitý chlorofyl.
- Chemotrofní mikroorganismy získávají energii v důsledku oxidace chemických sloučenin [1].

2.2 Kvasinky

Kvasinky jsou eukaryotické heterotrofní jednobuněčné mikroorganismy, které tvoří samostatnou taxonomickou skupinu. Řadíme je mezi nižší houby neboli Fungi. Nejčastěji tvoří kolonie na tuhých živných médiích. Název kvasinky dostaly z toho důvodu, že část z nich je schopná zkvašovat sacharidy na ethanol a oxid uhličitý [3] [4] [5].

Kvasinky mají sacharolytické vlastnosti, proto se vyskytují především na místech s obsahem cukrů. Typickým příkladem je ovoce (nejčastěji bobulové nebo peckové), sladké potraviny, květy. Vyskytují se ale i v půdě, ve vzduchu, na stromech nebo ve střevech živočichů [1] [4].

Jsou využívány lidmi hlavně v oblasti kvasných výrob, při výrobě piva, vína, také při přípravě mléčných výrobků, pekařských výrobků nebo například při získávání ergosterolu, což je prekurzor vitamínu D, který se dá dále využívat ve farmaceutickém průmyslu. Pro potravinářský průmysl je důležité, že některé druhy kvasinek jsou schopny využívat organické kyseliny např. kyselinu benzoovou nebo propionovou jako konzervanty. Z buněk kvasinek je možné vyizolovat různé látky (enzymy, koenzymy, lipidy, nukleosidy, nukleotidy), které se dají dále využívat v laboratořích. Existují tzv. patogenní kvasinky, které mohou u oslabených jedinců nebo u jedinců s poškozeným imunitním systémem způsobit někdy i vážná onemocnění [1] [4] [6].

2.2.1 Morfologie kvasinek

Buňky kvasinek bývají rozmanité. Tvar většinou souvisí s funkcí buňky, s druhem vegetativního rozmnožování a mění se vlivem vnějších podmínek v průběhu stádia vývoje. Taktéž tvar může být ovlivněn stářím buněk nebo kultivačními podmínkami. Nejčastějším tvarem je rotační elipsoid. Další tvar může být kulatý, oválný, citronový, podlouhlý a například ještě vláknitý (viz. Obr. 1). Velikost buněk kvasinek je přibližně 3–15 μm [3] [7].



Obr. 1: Tvary buněk kvasinek: a – kulaté, b – oválné, elipsoidní, c – citronovité, d – ogivální, e – lahvovité, f – podlouhlé, g – vláknité. [3]

2.2.2 Cytologie kvasinek

Vegetativní buňka kvasinek je vícefázový systém, kde membrány ohraničují jednotlivé kompartmenty, membránu tedy můžeme označit za tzv. bariéru. Kvasinkové buňky jsou eukaryotické buňky, tudíž jsou podobné eukaryotickým buňkám u jiných organismů. Buňku kvasinky tvoří buněčná stěna, cytoplazmatická membrána, cytoplazma, vakuoly, ribozomy, mitochondrie, Golgiho aparát, jádro, endoplazmatické retikulum a cytoskelet [1] [4] [7] [8] .

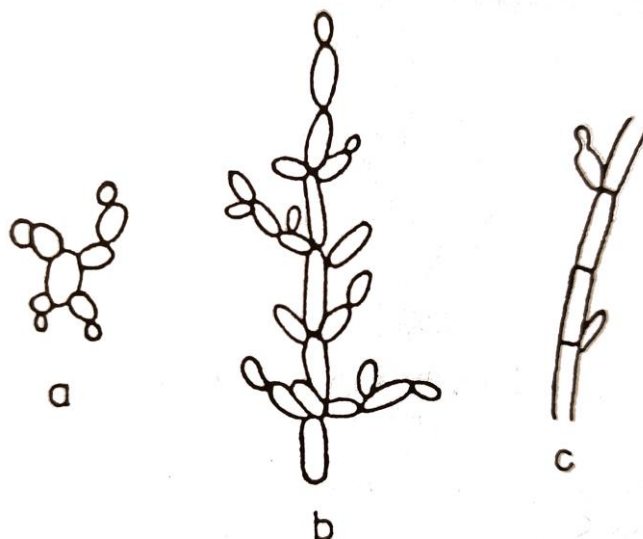
2.2.2.1 Buněčná stěna

Je to komponent, který díky své pevné struktuře dává buňce tvar a chrání ji před určitými vlivy. Je tvořena polysacharidy (80 %), bílkovinami (6–10 %), lipidy, fosfolipidy (3–10 %) a fosforečnany. Z polysacharidů jsou významnými komponenty glukany, manno proteiny a chitin. Na buněčné stěně najdeme jizvy po pučení, díky kterým je možné určit stáří kvasinky, a jizvu zrodu, což je místo, kde byla kvasinka připojena k mateřské buňce. Buňky mohou za určitých podmínek flokulovat (vytvářet shluky), což vede k sedimentaci. Jedná se o důležitý jev při výrobě vína a piva, jelikož je důležité, aby kvasinky po kvašení sedimentovaly a bylo možné je snadněji odseparovat [1] [4] [8] .

2.2.3 Růst a rozmnožování kvasinek

Kvasinky jsou mikroorganismy, které se rozmnožují převážně vegetativním způsobem, a to nejčastěji pučením. Při pučení dochází na mateřské buňce k tvorbě pupenu, který se zvětšuje. Dochází k dělení organel, z nichž část putuje spolu s rozděleným jádrem do pupenu. Po určité době dojde k oddělení pupenu od mateřské buňky a vzniká tak dceřiná buňka. Podle toho, v jaké části buňky se pupen tvoří, rozlišujeme monopolární (pupen se tvoří vždy na jednom pólu buňky), bipolární (pupen vzniká střídavě na obou pólech buňky) a multipolární pučení (pupen se může vytvořit na kterémkoli místě buňky, ovšem nikdy ne na stejném místě) [3] [8] [9] [10] .

Jsou ale i kvasinky, které se rozmnožují zaškrcením, dělením, tvorbou pravého mycelia nebo tvorbou nepravých hyf (pseudomycelia). Rozmnožují-li se kvasinky tvorbou pravého mycelia, mohou existovat i ve vícebuněčné formě. Dalším způsobem rozmnožování je pohlavní rozmnožování. U těchto kvasinek pak dochází ke vzniku pohlavních spor (askospor). U některých kvasinek dodnes způsob rozmnožování nebyl dokázán [3] [9] [10] .



Obr. 2: Růst kvasinek: a – ve svazcích, b – v pseudomyceliu, c – v pravém myceliu [1]

2.2.4 Chemické složení kvasinek

Složení kvasinek se hodně liší u konkrétních druhů. Záleží také, na jakém živném médiu se kvasinky rozmnožovaly a na způsobu analýzy. Rozdíl ve složení kvasinek je i mezi buňkou v nativním stavu a po usmrcení [7] [11].

Největší podíl ve složení buněčné hmoty má voda, která tvoří přibližně 60–80% buňky. Existují dvě formy vody. Vnitrobuněčná voda je voda nacházející se uvnitř buněk a mezibuněčná voda je voda nacházející se v prostoru mezi buňkami. Tato voda se mezi buňky dostává z kultivačního média [1] [11].

Voda je důležitá proto, že umožňuje rozpouštět minerální a organické látky, ulehčuje vyrovnávání změn osmotického tlaku, umožňuje vylučování metabolitů z buňky a odčerpávání přebytečného tepla. Je také důležitá pro rozpouštění kyslíku, jelikož buňky přijímají pouze kyslík rozpuštěný ve vodě. Při nedostatku vody může dojít k disfunkci buňky [7] [11].

Největší podíl sušiny tvoří bílkoviny (50 %), dále glykogen (30 %), který je u oxidačních typů kvasinek nahrazen lipidy, kterých lze dosáhnout v sušině až 62 %, dále pak nukleové kyseliny (10 %), polysacharidy (5 %) a popel (8 %). Dalšími organickými sloučeninami, které jsou součástí sušiny buněk kvasinek, jsou steroly, karotenoidy a vitamíny hlavně skupiny B, provitamin D (ergosterol) a provitamin A. Popel je z velké části tvořen oxidem fosforečným a ionty – v největším množství K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ . Polysacharidy se nevyskytují samostatně, nejčastěji se vyskytují ve vazbě s proteiny nebo s lipidy ve formě glykolipidů, glykoproteinů, lipopolysacharidů. Lipidy se vyskytují nejčastěji ve formě triacylglycerolů (tuků) jako kapičky rozptýlené především v buněčné stěně, volně v cytoplazmě nebo ve vakuolách. Množství jednotlivých tuků, které buňka obsahuje, závisí na druhu kvasinky, na teplotě, při které dochází ke kultivaci a na kultivačním médiu (viz kapitola 2.3.1.2.) [1] [7] [11].

2.2.5 Růst a kultivace mikroorganismů

2.2.5.1 Druhy kultivace

▪ Statická kultivace

Je to kultivace, která probíhá převážně na tuhých živných médiích, ovšem může docházet i ke kultivaci na kapalných živných médiích. Hlavním znakem je, že se mikroorganismus inkubuje v klidu. V průběhu růstu postupně dochází k vyčerpání živin.

▪ Submerzní kultivace

➤ Vsádková kultivace (batch)

Mikroorganismy se naočkují do kapalného média, které má předem dané složení a kultivuje se při konstantní teplotě a za občasného promíchání do té doby, dokud se v důsledku vyčerpání živin nezastaví růst a rozmnožování.

➤ Přítoková kultivace (fed-batch)

U přítokové kultivace není pracovní objem konstantní. Přitékají živiny, ale neodtéká objem média s vyrostlými organismy.

➤ Kontinuální kultivace

Při kontinuální kultivaci přitékají k rostoucím mikroorganismům živiny a zároveň odtéká stejný objem média, ve kterém vyrostly mikroorganismy. U této kultivace lze dosáhnout rovnovážného stavu tak, že zvolíme vhodnou rychlost přítoku živné půdy, a tudíž se v určitém objemu živného média bude udržovat konstantní počet buněk [3] [8] .

2.2.5.2 Růstová křivka

Je to grafické znázornění vzrůstu počtu živých buněk. Je to taktéž množství buněk (váha hmoty), které se vytvoří z původního naočkovaného množství za daných podmínek za určitý čas. Růstová křivka nám ukazuje, že se buňky nemnoží pořád stejnou rychlostí (viz. Obr. 3). Rychlost růstu buněk nám udává tzv. měrná růstová rychlost [1] , [11] , [12] .

Růstová křivka se skládá z několika fází:

I. Lag-fáze (přípravná fáze)

V této fázi se mikroorganismy přizpůsobují prostředí. Buňky, které se nepřizpůsobí, odumírají. Nedochází ke zvětšování počtu buněk, naopak jejich počet může i klesat. Dochází také ke zvýšení citlivosti vůči chemickým a fyzikálním vlivům a aktivaci enzymového systému. Délka této fáze závisí na druhu mikroorganismu, na složení prostředí, ve kterém mikroorganismus roste, na počtu naočkovaných buněk a taky na fyziologickém stavu buňky.

II. Fáze zrychlujícího se růstu

Buňky se začínají dělit a postupně se zvyšuje růstová rychlost.

III. Exponenciální fáze růstu

Buňky zde mají nejkratší generační dobu (čas potřebný na zdvojení buněk), která je v celé fázi konstantní. Je zde největší rychlost růstu, tzn. dochází k intenzivnímu množení buněk, kdy množství buněk exponenciálně roste až do doby, než dojde k vyčerpání živin.

IV. Fáze zpomalujícího se růstu

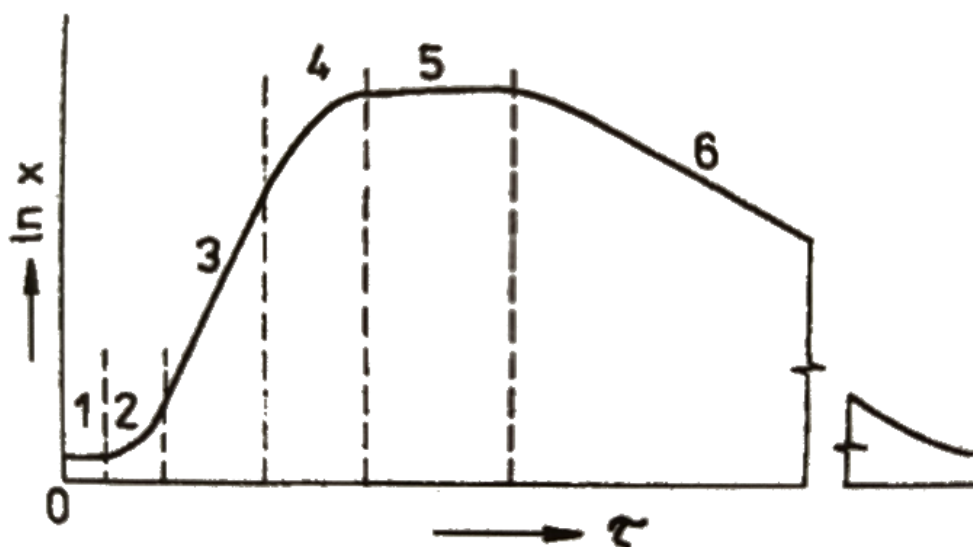
Postupným vyčerpáváním živin dochází ke zpomalování rychlosti množení buněk a zvyšuje se počet odumírajících buněk.

V. Stacionární fáze růstu

V této fázi jsou vyčerpány živiny a nastává stav rovnováhy mezi počtem nově vzniklých buněk a počtem buněk odumírajících.

VI. Fáze odumírání

Počet odumírajících buněk je větší, než je počet buněk nově vzniklých. Tato fáze je nežádoucí, protože v důsledku autolýzy dochází k celkovému úbytku počtu buněk [1] [9] [11].



Obr. 3: Růstová křivka [1]

2.2.5.3 Živná média

Každý mikroorganismus potřebuje pro svůj růst vhodné živné médium, které se bude co nejvíce podobat přirozeným podmínkám. Je důležité dbát na volbu základních živin (uhlík, dusík, fosfor, síra, hořčík), teploty, optimálního pH, osmotického tlaku, vhodných aerobních nebo anaerobních podmínek a také musí být přítomny růstové faktory (vitamíny, aminokyseliny), jsou-li pro daný mikroorganismus nezbytné. Nejčastějším zdrojem uhlíku a také zdrojem energie bývají jednoduché cukry nebo polysacharidy, alkoholy, organické kyseliny nebo

anorganická sloučenina CO₂. Jako zdroj dusíku bývají nejčastěji využívány amonné soli, močovina, dusičnany, vzdušný dusík nebo jednotlivé aminokyseliny. Fosfor je mikroorganismům dodáván nejčastěji ve formě solí kyseliny fosforečné a jako zdroj síry jsou nejčastěji využívány sírany a sirmé aminokyseliny [2] [3] [13] .

2.3 Významné metabolity kvasinek

2.3.1 Lipidy

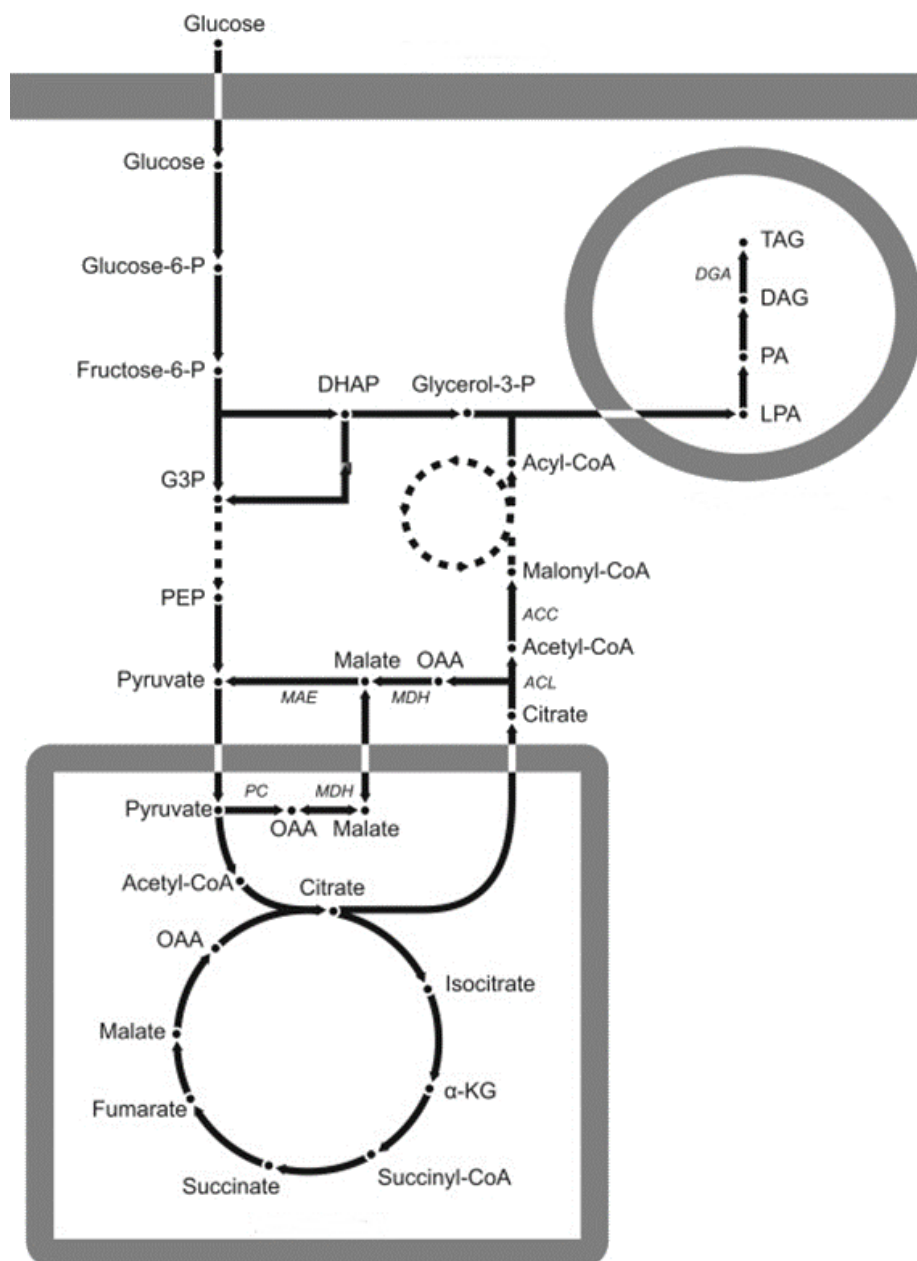
Lipidy jsou obecně estery vyšších mastných kyselin a alkoholu a jsou nerozpustné ve vodě. Nejčastěji dělíme lipidy na jednoduché a složené.

- a) Jednoduché – dělíme na vosky (estery vyšších mastných kyselin a vyšších alkoholů) a acylglyceroly (tuky a oleje)
- b) Složené – skládají se z glycerolu, který je esterifikovaný dvěma molekulami mastných kyselin a jednou molekulou kyseliny fosforečné. Jejich charakter závisí na další navázané složce, kterou může být alkohol nebo například sacharid. Patří sem například sfingolipidy, fosfolipidy nebo glykolipidy [2] [14]

Lipidy produkované kvasinkami jsou složeny z TAG, které jsou tvořeny estery vyšších mastných kyselin s glycerolem. Jsou účinnou formou ukládání energie s vysokou energetickou hodnotou asi 39 kJ/g. Jelikož samovolně tvoří dvojvrstvy, jsou v organismu i důležitým materiálem na stavbu biologických membrán [2] [15] [16] .

2.3.1.1 Biosyntéza lipidů oleogenními kvasinkami

Výchozí látka, která je potřeba na syntézu mastných kyselin je acetyl-CoA. Jeho syntéza začíná produkcí citrátu z cyklu trikarboxylových kyselin v mitochondriích. Pomocí citrát-lyázy je citrát přeměněn na acetyl-CoA v cytosolu. Část acetyl-CoA je přeměněna acetyl-CoA karboxylázou na malonyl-CoA, což je primární prekurzor pro prodloužení mastných kyselin (je o jeden uhlík delší než acetyl-CoA). Z malonyl-CoA se poté stává acyl-CoA. Dokončené mastné acyl-CoA řetězce jsou pak transportovány do ER nebo na membrány lipidových struktur společně s látkou glycerol-3-fosfát, který vznikl z dihydroxyacetonfosfátu získaného v průběhu glykolýzy. K sestavení TAG dojde cestou tzv. Kennedyho dráhy. Kennedyho dráha probíhá v ER a na membránách lipidových struktur. Acyl-CoA je prekurzor používaný pro acylaci na hlavní řetězec glycerol-3-fosfátu za vzniku kyseliny lysofosfatidové (LPA), která se dále acyluje za vzniku kyseliny fosfatidové (PA). PA je potom defosforylována za vzniku diacylglycerolu (DAG) a poté dojde k finální acylaci diacylglycerol acyltransferázou za vzniku TAG. Metabolické dráhy pro syntézu lipidů můžeme vidět na Obr. 4 [17] [18] [19] .



Obr. 4: Metabolické cesty pro syntézu lipidů [19]

2.3.1.2 Faktory ovlivňující akumulaci lipidů

Oleogenní mikroorganismy jsou kvasinky, houby nebo mikrořasy, které jsou schopny akumulovat za vhodných kultivačních podmínek lipidy, a to hlavně ve formě lipidových tělísek („lipid bodies“). Množství těchto lipidů, skládajících se z TAG (triacylglycerolů), může za vhodných kultivačních podmínek (vhodný poměr uhlíku a dusíku – C/N) dosáhnout až 60 % sušiny buňky. Produkci ovlivňuje široká škála faktorů, jako jsou zdroj dusíku a uhlíku, aplikace stresových podmínek a výběr samotného mikroorganismu. Je prokázáno, že k akumulaci lipidů v oleogenních kvasinkách dochází, když je živina v médiu (např. zdroj dusíku nebo fosforu) omezená a zdroj uhlíku je přítomen v nadbytku. Limitace dusíkem inhibuje syntézu proteinů a nukleových kyselin, čímž se zpomaluje rychlost růstu kultury. U neoleogenních druhů

zůstává přebytek uhlíku nevyužitý nebo je přeměněn na zásobní polysacharidy. Podle vědce Huang Jianzhong se jeví anorganický dusík vhodný pro růst biomasy, ale není vhodný pro akumulaci lipidů, zatímco organické zdroje dusíku, jako je pepton nebo bujón, jsou vhodnější pro produkci oleje, ale nejsou vhodné pro růst buněk. Nejčastěji se vyskytujícími kyselinami v buňkách kvasinek jsou kyseliny se 16 a 18 uhlíky, které se nejvíce podobají rostlinným olejům, jako je řepkový, palmový nebo sójový olej. Nejčastěji se vyskytujícími kyselinami jsou kyselina palmitová, olejová, palmitoolejová, stearová, linolová, myristová a linolenová. Poměr těchto kyselin je individuální u jednotlivých druhů kvasinek a záleží také na podmínkách kultivace [1] [6] [20] [21] [22] .

Jedním z faktorů, který ovlivňuje produkci lipidů je teplota. Bylo prokázáno, že při nižší teplotě kvasinky rodu *Metschnikowia* produkují více lipidů než při teplotě laboratorní. Nižší teplota má velkou výhodu, jelikož nízké teploty nejsou vhodné pro růst většiny mikroorganismů, hlavně bakterií, a proto nehrozí tak vysoké riziko kontaminace. Zároveň jsou tyto kvasinky schopné růst při nízkém pH 3 až 5, což také snižuje riziko kontaminace. Z těchto důvodů je tento rod atraktivní, hlavně z hlediska nízkých finančních nákladů na proces [23] [24] .

2.3.1.3 Funkce a průmyslové využití lipidů

Produkce mikrobiálních lipidů vzbudila v posledním desetiletí značný zájem, protože je lze úspěšně použít k výrobě bionafty katalyzovanou transesterifikací alkoholu s krátkým řetězcem. Jednalo by se pak o obnovitelné, biologicky rozložitelné a netoxické palivo, které by bylo vhodné k použití například v důlních prostorech nebo v mořských ekosystémech. Bionafta také snižuje emise díky vyššímu cetanovému číslu a nižšímu obsahu síry. Více než 95 % surovin na výrobu bionafty pochází z jedlých olejů, což je to příčina odlesňování v některých zemích EU, kvůli nárůstu požadované zemědělské půdy. Hlavním vedlejším produktem bionafty je surový glycerol, ovšem rafinace surového glycerolu na čistý glycerol je velice drahá. Podle výzkumu z roku 2016 [25] je možné surový glycerol použít jako hlavní zdroj uhlíku pro organismy produkující lipidy. Ve srovnání s jinými rostlinnými oleji mají mikrobiální oleje řadu výhod, jako je krátký životní cyklus, méně potřebné práce, menší náklonnost na místo, sezónu a klima a snadnější rozšiřování [6] [20] [21] [26] .

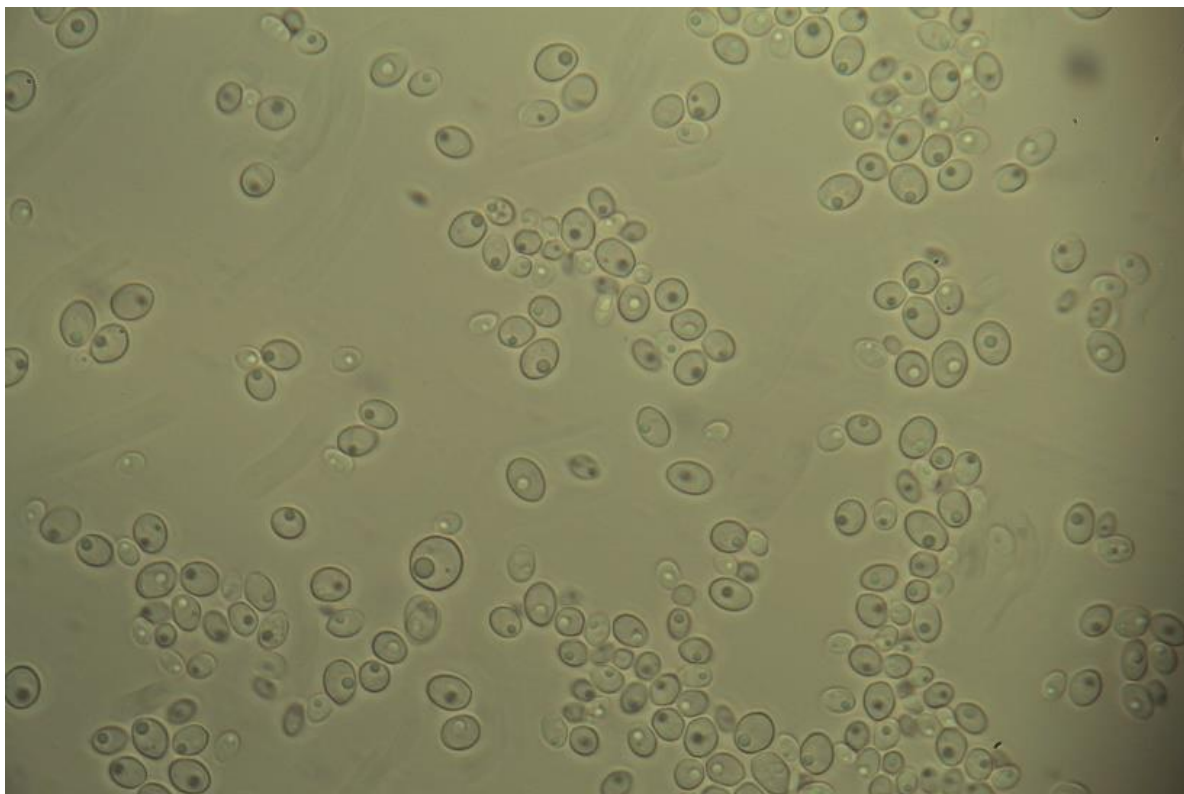
Některé kvasinky jsou schopné produkovat lipidy, které mají složení mastných kyselin podobné jako kakaové máslo. Bylo by tedy možné vyrábět levnější náhrady exotických tuků – kakaového, ale například i bambuckého másla. Důležitými látkami jsou také tzv. PUFA (polynenasycené mastné kyseliny), které by mohly být využitelné v potravinářství, ve farmacii (hlavně linolenová kyselina) nebo při výrobě kosmetických přípravků. Využití lipidů závisí na tzv. jodovém čísle, tj. na stupni nasycení mastných kyselin obsažených v TAG [24] [27] .

Dále lze mikrobiální lipidy použít jako složky barev, nátěrů, kosmetických přípravků, produkci proteinů, výrobu chemikálií, kyseliny citronové a bionafty, čímž se snižuje závislost na rostlinném a minerálním oleji [19] [28] .

2.4 Kvasinky rodu *Metschnikowia*

Taxonomické zařazení:

Čeleď:	<i>Metschnikowiaceae</i>
Řád:	<i>Saccharomycetales</i>
Třída:	<i>Hemiascomycetes</i>
Oddělení:	<i>Ascomycotina</i> (vřecovýtrusné houby)
Kmen:	<i>Eumycota</i>
Říše:	<i>Fungi</i> [4] [29]



Obr. 5: Kvasinky rodu *Metschnikowia* pod mikroskopem

Jsou to kvasinky kulatého až eliptického tvaru, u kterých dochází k multilaterálnímu (mnohostrannému) pučení a tvorbě rudimentálního pseudomycelia. Jsou to dobře definovatelné kvasinky, jelikož obsahují červené barvivo pulcherrimin a výrazné kulovité olejovité kapky uvnitř buňky. Při pohlavním rozmnožování vytváří 1–2 jehlicovité askospory ve vřecku. Výhodou je, že tyto kvasinky jsou schopny růst na různých zdrojích uhlíku, například na glukóze, sacharóze, fruktóze, galaktóze, maltóze. Podle výzkumu z roku 2014 jsou tyto kvasinky schopné růst při nízké teplotě a při pH, které umožňuje kultivaci těchto kvasinek v levných, nesterilních podmínkách, což ještě více poskytuje potenciální cestu k ekonomické produkci biopaliv [10] [23] [30] [31] .

Podle výzkumu z roku 2016 je u těchto kvasinek pro akumulaci TAG při růstu na surovém glycerolu nejvhodnější poměr uhlíku a dusíku C/N=118. Taktéž při tomto poměru kvasinky

vyprodukovaly největší množství PUFA (polynenasycené mastné kyseliny), které by mohly být využitelné v potravinářství, ve farmacii nebo při výrobě kosmetických přípravků [25] .

Další využití těchto kvasinek je použití jako biologické kontrolní činidlo díky své schopnosti produkovat přírodní antimikrobiální sloučeniny. Nejznámější pulcherrimin je červený pigment s antimykotickou aktivitou. Tato zvláštní mikrobiální aktivita proti různým mikroskopickým houbám a jiným druhům kvasinek je způsobena vyčerpáním železa v médiu prostřednictvím srážení iontů železa (III) v důsledku reakce s kyselinou pulcherriminovou. Tímto způsobem se živné médium stává nehostinným pro jiné mikroorganismy, které pro svůj vývoj vyžadují železo. Nejznámější kvasinka *Sacharomyces cerevisiae* není touto antimikrobiální aktivitou ovlivněna [30] [32] .



Obr. 6: Vzorec pulcherriminu [33]

Kvasinky se vyskytují v suchozemských stanovištích, zejména na ovoci na bobulích, v květech a v nektarech. Vyskytují se ve vinařství během počátečního stádia fermentace. Pouze ze začátku kvašení jsou totiž přítomny kvasinky, které jsou citlivé na ethanol a SO₂. V průběhu fermentace ztrácí svou životaschopnost, jelikož vzrůstá koncentrace ethanolu (fermentují mošt pouze do 2 % obj. ethanolu), proto se ve víně už nevyskytují. Mají ovšem vliv na kvalitu a profil vína, proto jsou v dnešní době dost studované [34] [35] [36] [37] .

2.5 Odpadní substráty

Hlavními faktory pro vyhodnocení potenciálu mikroorganismu pro produkci oleje jsou:

1. množství vyprodukovaného oleje; čím více oleje může mikrobiální buňka akumulovat, tím atraktivnější bude z komerčního hlediska
2. kvalita produkce oleje; profil mastných kyselin se hodně liší od mikroorganismu k mikroorganismu
3. schopnost využívat levné suroviny [18]

Na celém světě je spousta odpadního materiálu. Existují tzv. biologicky rozložitelné odpady (BRO), které obsahují snadno rozložitelné látky. Jelikož biologicky snadno rozložitelných odpadů je kolem nás spousta a obsahuje pro mikroorganismy snadno využitelné polysacharidy např. celulózu, je to levný zdroj živin pro kultivaci mikroorganismů. Nejznámějšími substráty jsou například slupky z brambor, odpady ze zpracování ovoce, otruby jak rýžové, tak kukuřičné, pšeničná sláma, odpad po vylisování semen z olejnatých rostlin, odpadní vody z potravinářského průmyslu, syrovátka, melasa, různé odpadní tuky a taktéž glycerol z bionafty [38] [39].

Některé organismy nejsou schopny využít (využívat) polysacharidy, proto je nutné je před kultivací upravit. Například je možné je enzymaticky rozštěpit na jednotlivé monosacharidy, které jsou pak organismy schopny využít jako zdroj živin pro svůj růst [39].

2.5.1 Glycerol z bionafty

Opadní glycerol vzniká při výrobě bionafty, kdy dochází k tzv. transesterifikaci. Je to reakce za přítomnosti katalyzátoru mezi olejem (TAG) a primárním alkoholem za vzniku glycerolu a esterů mastných kyselin, které představují bionaftu. Glycerol a bionaftu lze poté jednoduše oddělit na základě jejich hmotnosti. Glycerol představuje těžší fázi, tu je možné oddělit například odstředěním. V médiích představuje glycerol hlavní zdroj uhlíku, je ale také zdrojem například vápníku, sodíku a draslíku [40] [41].

2.5.2 Syrovátka

Představuje kolem 80 % použitého mléka, je to kapalný podíl po výrobě sýrů, tvarohů a kaseinů. Jelikož v dnešní době stoupá produkce sýra, roste i objem syrovátky. Velké využití má syrovátka v potravinářském průmyslu, jelikož se ale syrovátka vyskytuje v obrovském množství, je využívána i jako odpad. Je to dostatečné kultivační médium i pro řadu mikroorganismů potřebujících médium s podílem komplexní složky, jelikož obsahuje řadu nutričních prvků jako například vitamíny, aminokyseliny nebo lipidy. Nevýhodou je, že při sterilaci syrovátky se sráží bílkoviny, které je proto nutné nejdříve odstranit nebo hydrolyzovat [42].

2.5.3 Melasa

Je kapalný podíl při výrobě sacharózy z cukrové řepy nebo cukrové třtiny. Má vysoký obsah sacharózy a to přibližně 50 %, z toho důvodu je to vhodný zdroj živin pro růst mikroorganismů.

Má ovšem nízký obsah dusíku a fosforu, proto je potřeba tyto minerální látky do média přidat v jiné podobě [42] .

2.5.4 Odpadní tuk

Tuky jsou látky složené z mastných kyselin a glycerolu. U tuků není možné jednoznačně určit složení mastných kyselin, jelikož se liší v závislosti na původu tuku. Rozlišujeme rostlinné a živočišné odpadní tuky. Vznikají například v potravinářském průmyslu, v kožedělném průmyslu, živočišné se získávají extrakcí z živočišného odpadu v kafilerích [41] .

2.5.5 Možnosti ovlivnění produkce lipidů pomocí fyzikálních stresových faktorů

Stresové faktory jsou určité změny prostředí, na které reagují všechny buňky. Tyto změny mohou bránit růstu buněk nebo ovlivňovat metabolismus daného mikroorganismu. Mezi stresové faktory patří například teplota, pH, osmotický stres a další. Nejdůležitějším faktorem je teplota, která ve velké míře ovlivňuje růst a rozmnožování buněk. Pokud je mikroorganismus vystaven jiné teplotě, než je jeho optimální teplota, dojde k teplotnímu stresu. Výsledkem může být při vysoké teplotě denaturace buněk, nízká teplota může buňky ponechat v nezměněném stavu nebo je usmrtit. Při kultivaci je důležité najít optimální teplotu, která se pohybuje v rozmezí teplot, při kterých jsou mikroorganismy schopny se rozmnožovat [1] [45] [46] [47] .

Pokud dojde ke změně dostupnosti vody, která je způsobena tím, že se mění koncentrace rozpuštěných molekul v prostředí buňky, dochází k osmotickému stresu. Osmotický stres se projevuje buď zvýšením nebo snížením aktivity vody. Snížení aktivity vody je způsobeno zvýšením osmotické koncentrace (hyperosmotický stres), naopak zvýšení aktivity vody způsobuje snížení osmotické koncentrace (hyposmotický stres). Při hyperosmotickém stresu dochází k odtoku vody z buňky a při hyposmotickém stresu dochází k nasávání vody do buňky [46] .

2.6 Produkce metabolitů kvasinek rodu *Metschnikowia* na odpadních substrátech

Kvasinky toho rodu jsou schopné růst při nízkých teplotách a pH, což je z ekonomického hlediska velice pozitivní. Kombinací těchto dvou faktorů mohou produkovat významné látky, lipidy. Jelikož odpadní substráty jsou většinou heterogenní směsí, jsou schopny na nich růst pouze mikroorganismy, které mají určitou míru flexibility v požadavcích na výživu [23] .

Kvasinky rodu *Metschnikowia* jsou schopné růst například na glycerolu a dlouhé škále různých cukrů. Při růstu na glycerolu je důležité zvolit správnou koncentraci. Vyšší koncentrace glycerolu v médiu, mohou v důsledku osmotického tlaku inhibovat růst kultury. Bylo zjištěno, že při růstu na glycerolovém médiu je spouštěčem produkce lipidů snížení teploty. Kvasinky byly kultivovány nejprve 3 dny při 20 °C a poté byla teplota změněna. V tomto pokusu byly zkoumány tři teploty a to 15, 20 a 25 °C. K nejvyšší produkci lipidů došlo při 15 °C, což potvrzuje teorii, že při snížení teploty dochází k omezení sporulace, a naopak k hromadění většího množství lipidů v buňkách. Při 15 °C byl obsah lipidů v buňce stanoven na 26 %, zatímco při 25 °C byl obsah lipidů pouze 14 % [23] [25] .

Jako další odpadní substrát byla využita lignocelulóza. Tu lze jednoduše a levně převést na řadu cukrů. *M. pulcherrima* byla kultivována na různých cukrech, aby byla dokázána schopnost využívat lignocelulózu. Nejvyšší produkce biomasy byla zaznamenána při růstu na glukózovém médiu. Pokud byla v médiu přítomna glukóza, fungoval jakýkoli jiný cukr jako účinný zdroj uhlíku, pouze s trochu menším výnosem biomasy. Jelikož hlavním produktem depolymerizace lignocelulózy je glukóza, je lignocelulóza vhodný odpadní substrát pro tyto kvasinky. Množství lipidů při kultivaci na lignocelulóзовém médiu se podobalo množství lipidů při kultivaci na glycerolovém médiu [23] .

2.7 Přehled metod využívaných při analýze mikrobiálních metabolitů

2.7.1 Stanovení mastných kyselin plynovou chromatografií

Chromatografie je separační metoda, která pracuje na principu rozdělování složek mezi dvě fáze, a to stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou). U plynové chromatografie je mobilní fází tzv. nosný plyn. Stacionární fází je nejčastěji pevná látka např. aktivní uhlí, nebo kapalina. Princip plynové chromatografie je následující. Kolonou, ve které je stacionární fáze prochází nosný plyn. Vzorek je nanesen do nástřikové komory, kde dojde k jeho odpaření a páry vzorku jsou nosným plynem unášeny kolonou až na konec kolony. Rychlost každé složky vzorku závisí na jeho distribuční konstantě, což je poměr rovnovážné koncentrace ve stacionární a mobilní fázi. Jednotlivé složky vzorku poté vstupují do detektoru podle rostoucí distribuční konstanty. Závislost signálu detektoru na čase se nazývá chromatogram [43] [44] .

Metoda je založená na zmýdelnění glyceridů a fosfolipidů a v dalším kroku na esterifikaci volných mastných kyselin v roztoku methanolu. Následně dochází k extrakci do organického rozpouštědla (v našem případě do hexanu) a poté ke stanovení procentuálního zastoupení jednotlivých mastných kyselin z chromatogramu [48] .

2.7.2 Analýza sacharidů

Jelikož jsou sacharidy nejčastěji se vyskytující látky v potravinách, existuje mnoho metod k jejich stanovení. I když existují nové metody jako například kapalinová chromatografie, stále jsou v průmyslu nejčastěji používanými metodami polarimetrie a titrační metoda [49] .

2.7.2.1 HPLC/RI

Kapalinová chromatografie je separační metoda, kde mobilní fází je kapalina. Mobilní fáze je poháněna za pomoci čerpadla a vysokého tlaku, protéká kolonou a vtéká do detektoru. Detektor na základě fyzikálně-chemických změn zaznamená separované složky. Grafickou odezvu signálu detektoru na čase nám ukazuje chromatogram obsahující píky. Podle charakteru jednotlivých píků a jejich retenčního času můžeme určit o jakou látku se jedná [50] .

Refraktometrický detektor (RI) měří index lomu mobilní fáze. Je měřen index lomu čisté mobilní fáze a index lomu mobilní fáze s rozpuštěnou látkou v měrné a referenční cele. Při použití refraktometrického detektoru je důležité zajistit konstantní teplotu [50] .

2.7.2.2 Enzymatické metody

Enzymatické metody spočívají ve schopnosti enzymu katalyzovat určitou reakci. Jsou rychlé, specifické a citlivé k nízkým koncentracím sacharidů ve vzorku. Buď může za pomoci enzymů dojít k transformaci látky, nebo lze měřit aktivitu enzymu jako rychlost úbytku reaktantu nebo rychlost vzniku produktu [51] .

3 CÍLE PRÁCE

Cílem práce je řízená mikrobiální produkce vybraných lipidických látek kvasinkami rodu *Metschnikowia* s využitím různých typů odpadních substrátů a teplotních režimů.

- 1) Rešerše – přehled mikrobiálních producentů významných lipidů, funkce a průmyslové využití lipidických látek
- 2) Optimalizace produkce lipidických látek kvasinkami rodu *Metschnikowia* s využitím vybraných forem stresových podmínek (teplota, nutriční stres)
- 3) Analýza metabolitů instrumentálními technikami

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie, přístroje, pomůcky

4.1.1 Použité chemikálie:

4.1.1.1 Chemikálie použité na kultivační médium

Bakteriologický agar, Himedia (India)
Chlorid sodný p.a., Lachema (ČR)
Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lachema (ČR)
D-glukóza monohydrát p.a., Penta (ČR)
Hydrogenfosforečnan didraselný p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Hydrogenfosforečnan disodný p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Kvasničný autolyzát, Himedia (India)
Síran horečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Pepton aus Casein, Roth (SRN)

4.1.1.2 Chemikálie použité na přípravu vzorků pro GC

Hexan pro HPLC, Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Metanol p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Metanol pro HPLC, Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Kyselina sírová 96 %, p.a., Penta (ČR)
Kyselina heptadekánová, Sigma - Aldrich (SRN)
Hydroxid sodný, Lach-Ner s.r.o. (ČR)

4.1.2 Přístroje a pomůcky:

4.1.2.1 Pomůcky pro kultivaci

Analytické váhy Boeco (SRN)
Centrifuga U-32R, Boeco (SRN)
Centrifuga Z36HK, Hermle Labortechnik GmbH, (SRN)
Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)
GKB Color Digital CCD kamera (Taiwan)
Lucia Image active 5.0, Laboratory Imaging spol. s.r.o. (ČR)
Laminární box Aura mini (IT)
Třepačka IKA Yellow Line (SRN)
Chladicí box, Guzzanti GZ19 (ČR)
Ultrazvuk, PS0200, Powersonic s.r.o. (SK)

4.1.2.2 Pomůcky pro izolaci a analýzu lipidů

Vortex-Genie 2, Scientific Industries (USA)

Sklenené kuličky, Roth (DE)
Termoblok, SBH200D, Stuart (UK)
Plynový chromatograf TRACE GC ThermoQuest Italia S. p. A (IT)
FID detektor
kapilární kolona DB-WAX o rozměrech 30 m x 0,32 mm x 0,5 µm

4.1.3 Kvasinkové kmeny:

Kvasinkové kmeny použité v práci byly získány ze sbírky kultur kvasinek (Culture collection of yeasts, CCY), Bratislava, Slovensko a Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft, (CBS), Nizozemsko a jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Seznam kvasinkových kmenů

Kmen	Sbírkové číslo	Označení v práci
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	CCY 029-002-145	145
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	CCY 029-002-147	147
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	CCY 029-002-149	149
<i>Metschnikowia andauensis</i>	CCY 029-002-129	129
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	CBS 9803-11-1158	1158

4.2 Metody využití při analýze

4.2.1 Kultivace kvasinek

4.2.1.1 Podmínky kultivace

Byla uskutečněna kultivace pěti kmenů kvasinek rodu *Metschnikowia*. Každý kmen byl kultivován na dvou kultivačních médiích, a to o poměru C/N = 100 a C/N = 150. Vždy byla kultivace každého kmene na příslušném médiu prováděna při teplotě 8, 11 a 15 °C po dobu 336 hodin.

4.2.1.2 Příprava kultivačního média

V Tabulce 2 můžeme vidět složení kultivačního média, které bylo použito pro kultivaci kvasinek rodu *Metschnikowia*. Média byla nejprve 30 minut sterilována pomocí tlakového hrnce při teplotě 120 °C a následně byla rozlita do Petriho misek a ponechána ztuhnout. Na ztuhlém agarovém plotny byla pomocí kličky postupně nanášena biomasa z kryozkumavek všech pěti kmenů kvasinek. Takto připravené Petriho misky byly ponechány 3 dny při laboratorní teplotě.

Tabulka 2: Složení kultivačního média

Složka	Množství [g/l]
Glukóza	20
Bakteriologický pepton	5
Kvasničný extrakt	10
KH ₂ PO ₄	1
K ₂ HPO ₄	0,2
NaCl	0,1
CaCl ₂	0,1
MgSO ₄	0,5
Agar	20

4.2.1.3 Příprava inokula

Inokulum je potřeba z toho důvodu, aby se kvasinky rozrostly. Bylo připraveno univerzální YPD médium, jehož složení můžeme vidět v Tabulce 3. Toto médium bylo vysterilováno v tlakovém hrnci po dobu 30 minut při teplotě 120 °C. Následně bylo do každé 250ml Erlenmayerovy baňky nalito 60 ml média a do média byla sterilní kličkou nabrána kultura kultivovaná na Petriho miskách. Erlenmayerovy baňky byly umístěny na třepačku pro lepší aeraci (otáčky 150 rpm/22 °C).

Tabulka 3: Složení média pro přípravu inokula

Složka	Množství [g/l]
Glukóza	20
Bakteriologický pepton	20
Kvasničný extrakt	10

4.2.1.4 Příprava produkčních médií

Byla připravena produkční média, jedno o poměru C/N = 100 a druhé o poměru C/N = 150. Tato média se lišila pouze množstvím glukózy. Složení produkčních médií můžeme vidět

v Tabulce 4. Média byla vysterilována v tlakovém hrnci po dobu 30 minut při teplotě 120 °C. Následně bylo do sterilní plastové zkumavky převedeno 16 ml inokula příslušného kmenu. Buňky ve zkumavce byly odstředěny na odstředivce při 4500 otáčkách/minutu po dobu 5 minut. Poté byl supernatant odlit a bylo přidáno 20 ml příslušného sterilního produkčního média. Obsah zkumavky byl dostatečně rozsuspendován nalit do 500ml Erlenmyerovy baňky a bylo přilito ještě 80 ml daného produkčního média. Erlenmyerova baňka byla vložena do třepačky kvůli dostatečné aeraci (150 rpm). Kultivace probíhala nejprve při 22 °C po dobu tří dnů, pro dostatečný nárůst biomasy, a poté byla teplota snížena na 8, 11 nebo 15 °C. Kultivace probíhaly při každé teplotě po dobu 336 hodin. Z důvodu nedostatku času kultivace probíhaly pouze duplicitně.

Tabulka 4: Složení produkčních médií

Složka	Množství [g/l]	
	C/N 100	C/N 150
Glukóza	57,75	86,62
Bakteriologický pepton	0,1	0,1
Kvasničný extrakt	2	2
KH ₂ PO ₄	7	7
Na ₂ HPO ₄	2,5	2,5
CaCl ₂ · 6 H ₂ O	0,15	0,15
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,2	1,2
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,02	0,02

4.2.2 Odpadní substráty

Pro možnost využití odpadního substrátu jako produkčního média byla zvolena kvasinka *M. chrysoperlae* 1158, která v předchozích experimentech vykazovala nejvyšší produkce lipidů a biomasy. U kultivace na odpadních substrátech bylo využito stejných postupů jako v kapitole 4.2.1. Produkční média obsahovala místo glukózy kávový hydrolyzát, odpadní tuk a glycerol, do kterých byla následně zaočkována daná kvasinka. Složení produkčních médií s glycerolem a tukem můžeme vidět v Tabulce 5. Kávový hydrolyzát byl poskytnut Ing. Martinem Szotkowskim a připraven stejně jako v předchozí práci [52]. Hydrolyzát byl následně naředěn vodou tak, aby obsah cukru byl stejný jako u produkčního média o poměru C/N = 100, tj. 57,75 g/l glukózy, a také bylo přidáno příslušné množství minerálních látek jako u předchozích produkčních médií.

Tabulka 5: Složení produkčních médií s glycerolem a odpadním tukem

Složka	Množství [g/l]
Glycerol/Odpadní tuk	53,67/22,14
Kvasničný extrakt	2
KH ₂ PO ₄	4
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,7

4.2.3 Stanovení biomasy

Odběr biomasy probíhal u všech kultivací vždy v určitou dobu. První odběr byl po inkubaci při laboratorní teplotě, tzn. před snížením teploty na danou teplotu kultivace. Odběry tedy byly po 72, 120, 168, 240, 288 a 336 hodinách. Vždy bylo asepticky odebráno 10 ml biomasy daného kmene a dáno do plastové 15ml zkumavky. Biomasa byla odstředěna při 4500 otáčkách/minutu po dobu 10 minut. Supernatant byl odlit, k biomase bylo přidáno 5 ml destilované vody a obsah zkumavky byl promíchán. Opět byl roztok ve zkumavkách odstředěn při stejných podmínkách, supernatant byl odlit a k biomase bylo přilito 5 ml destilované vody. Obsah zkumavky byl zase promíchán a opět odstředěn za stejných podmínek. Následně byl supernatant odlit a biomasa ve zkumavce byla tentokrát doplněna pouze 2 ml destilované vody. Obsah byl promíchán a veškerý obsah zkumavky byl za pomoci pipety kvantitativně přenesen do mikrozkušavky o objemu 2 ml. Obsah v mikrozkušavce byl lyofilizován a následně bylo na analytických vahách zváženo množství biomasy.

4.2.4 Izolace a analýza mastných kyselin plynovou chromatografií

4.2.4.1 Příprava transesterifikační směsi

Do 500ml odměrné baňky bylo převedeno 100 ml methanolu a míchadlo. Do baňky bylo poté přidáno 250 mg interního standardu C17:0 (kyselina heptadekanová) společně s 75 ml koncentrované kyseliny sírové za stálého míchání. Roztok byl poté doplněn na objem 500 ml a následně použit pro analýzu mastných kyselin přímou transesterifikací (viz. kapitola 4.2.4.2).

4.2.4.2 Přímá transesterifikace

Do kryptovacích vialek bylo na analytických vahách odváženo 10 ± 2 mg biomasy. K vzorku bylo přidáno 1,8 ml transesterifikační směsi a vialky byly zakrymplovány. Následně byly vialky inkubovány v termobloku po dobu 2 hodin při teplotě 85 °C. Po proběhnutí transesterifikace byly vialky nechány volně vychladnout. Do 4ml vialek bylo napipetováno 0,5 ml 0,05M roztoku NaOH, do něho byl vylit celý obsah vialky po transesterifikaci a napipetován 1 ml hexanu. Vialka byla uzavřena a intenzivně protřepána na vortexu. Po oddělení fází bylo z horní

hexanové fáze odebráno 0,1 ml a převedeno do čisté šroubovací vialky. Do té bylo poté přidáno 0,9 ml čistého hexanu pro GC. Vialka byla uzavřena a uchována při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro následnou analýzu na plynovém chromatografu.

4.2.4.3 Stanovení množství a profilu mastných kyselin

Analýza mastných kyselin byla prováděna na plynovém chromatografu Thermo Scientific TRACETM Gas Chromatograph s autosamplrem Thermo Scientific A1 1310. Na detekci analytu byl využit plamenově ionizační detektor. Analýza probíhala po dobu 25 minut za daných podmínek:

- Jako rozpouštědlo byl použit hexan pro GC a jako nosný plyn vodík s konstantním průtokem 1 ml/min
- Byla využita kolona ZB-FAME (30m délky, vnitřní průměr 0,25 mm a šířka filmu 0,25 μm) a FID detektor (teplota 260 $^{\circ}\text{C}$, průtok vzduchu 350 ml/min, průtok vodíku 35 ml/min a průtok dusíku 30 ml/min)
- Teplota na vstupu byla 250 $^{\circ}\text{C}$ a hodnota split ratio 10

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

Číslo	Čas [min]	[$^{\circ}\text{C}/\text{min}$]	Cílová teplota [$^{\circ}\text{C}$]
1	1,000	0,00	80,00
2	5,00	15,00	140,0
3	21,667	3,00	190,0
4	25,467	25,00	260,0
5	25,467	Konec měření	

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Závislost nárůstu biomasy na čase

Stanovení růstu námi zkoumaných mikroorganismů v různých intervalech je důležité z hlediska pochopení fyziologie daných kmenů kvasinek a pro analýzu metabolitů, které kvasinka produkuje. Závislost nám ukazuje, jak se mění množství narostlé biomasy s prodlužujícím se časem kultivace. Tato závislost byla stanovena u 5 kmenů kvasinek rodu *Metschnikowia*: *M. pulcherrima* 145, *M. pulcherrima* 147, *M. pulcherrima* 149, *M. andauensis* 129 a *M. chrysoperlae* 1158, při třech různých teplotách a při kultivaci na dvou médiích o různých poměrech C/N (C/N = 100 a C/N = 150).

5.1.1 Růst při 8 °C

Tato nízká teplota byla zkoumána z toho důvodu, že kvasinky rodu *Metschnikowia* se obvykle vyskytují venku na hroznech a květech, tudíž zvládají žít a růst (sice zpomaleně) i při nižších teplotách [1] [4].

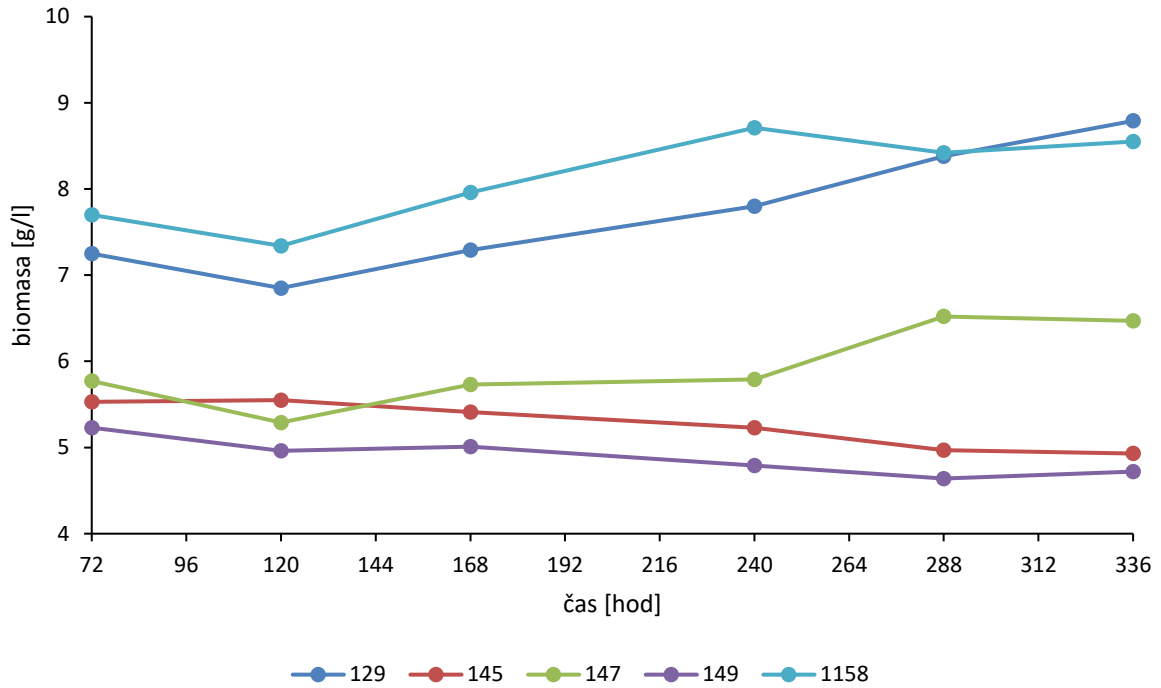
V šesti časových intervalech bylo zváženo množství biomasy z 10 ml odebrané kultury. Hodnoty množství biomasy u všech kmenů byly vyneseny do grafu v závislosti na čase. Bylo zjištěno, že při 8 °C a médiu o poměru C/N = 100 je největší množství biomasy u kmene *M. chrysoperlae* 1158, a to 8,71 g/l sušiny (Obr. 7). Rovněž bylo naměřeno, že k největšímu nárůstu biomasy došlo u kmene *M. chrysoperlae* 1158 po 240 hodinách, u kmene *M. andauensis* 129 po 336 hodinách, u kmene *M. pulcherrima* 147 po 288 hodinách, u kmene *M. pulcherrima* 145 po 120 hodinách a u kmene *M. pulcherrima* 149 hned po 72 hodinách (Obr. 7).

Kmen *M. pulcherrima* 129 vykazuje i v 336. hodině stálý nárůst biomasy, to znamená, že i po této době nedošlo k dosažení stacionární fáze u tohoto kmene. V budoucích experimentech by bylo vhodné prodloužit čas kultivace, popřípadě zvolit jiné vhodnější složení kultivačního média nebo teploty. Naopak kmeny *M. pulcherrima* 145 a *M. pulcherrima* 149 nevykazují výrazný nárůst, tudíž tato teplota se nejeví jako vhodná.

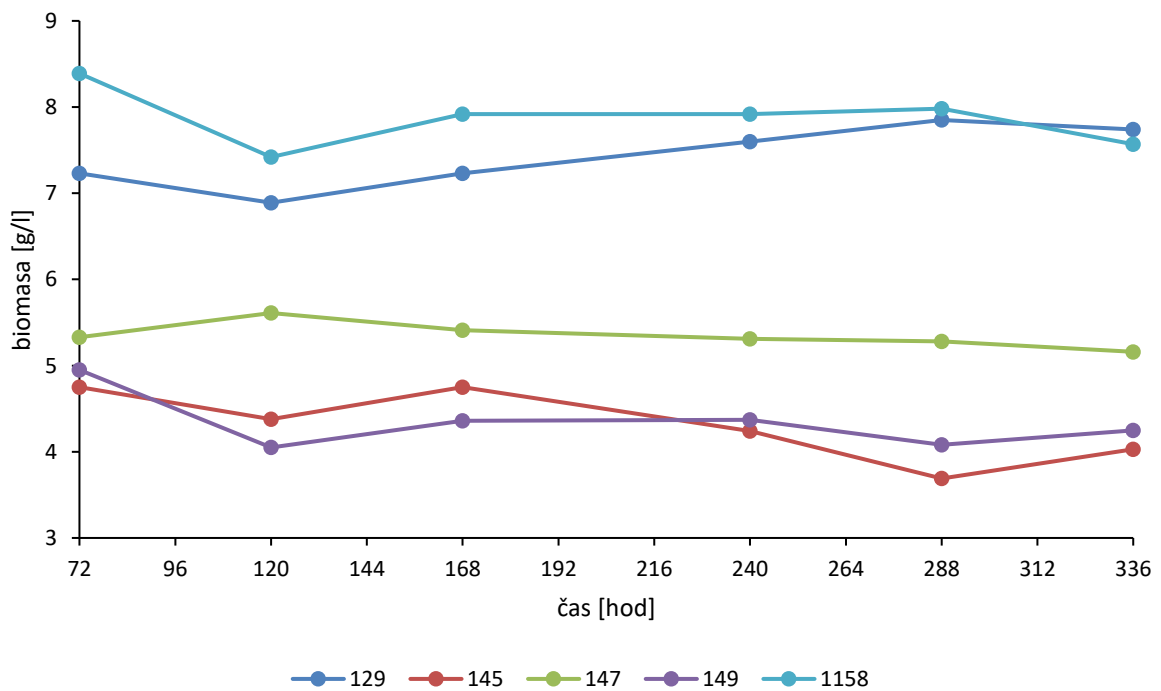
Dále bylo zjištěno, že stejně jako u kultivace na médiu o poměru C/N = 100 je největší množství biomasy při kultivaci na médiu o poměru C/N = 150 naměřeno u kmene *M. chrysoperlae* 1158, a to 8,39 g/l (Obr. 8). Také je z Obr. 8 patrné, že k největšímu nárůstu biomasy došlo u kmene *M. chrysoperlae* 1158 hned po 72 hodinách, u kmene *M. andauensis* 129 po 288 hodinách, u kmene *M. pulcherrima* 147 po 120 hodinách, u kmene *M. pulcherrima* 145 po 168 hodinách a u kmene *M. pulcherrima* 149 hned po 72 hodinách.

Kmen *M. pulcherrima* 147 nevykazuje žádný nárůst biomasy s časem, u kmenů *M. pulcherrima* 145 a *M. pulcherrima* 149 docházelo k výraznému kolísání množství biomasy.

V porovnání s kultivací s menším množstvím glukózy bylo dosaženo menšího nárůstu biomasy, což může být způsobeno osmotickým stresem zapříčiněným vysokou koncentrací glukózy v médiu.



Obr. 7: Závislost nárůstu biomasy na čase při teplotě 8 °C a poměru C/N = 100



Obr. 8: Závislost nárůstu biomasy na čase při teplotě 8 °C a poměru C/N = 150

5.1.2 Růst při 11 °C

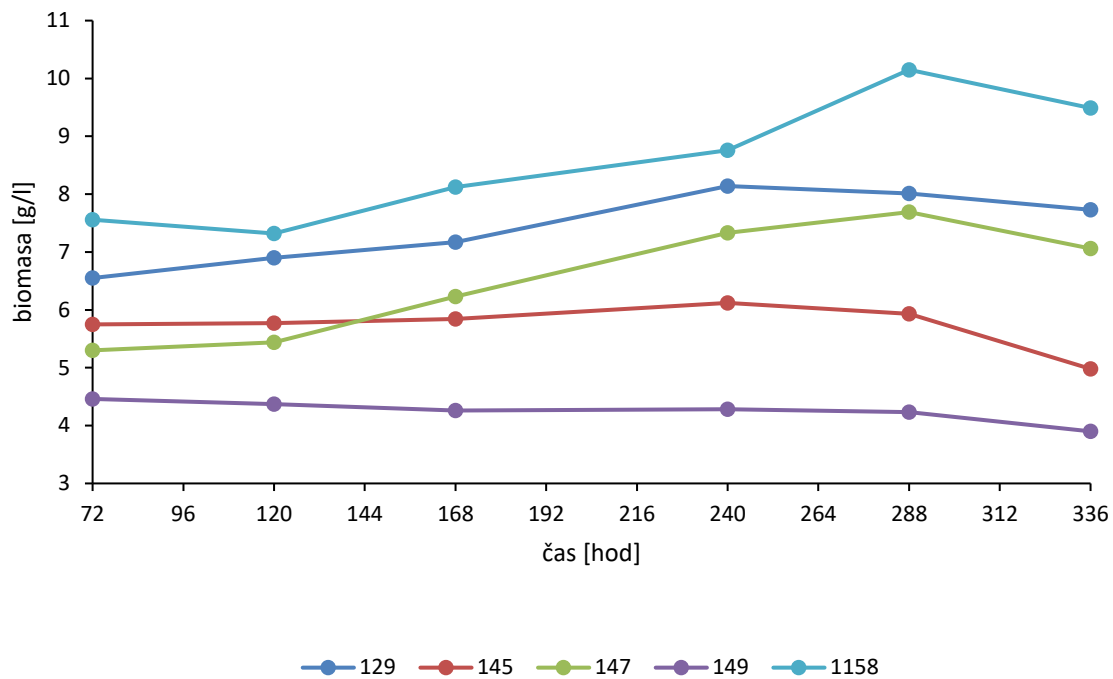
Stejně jako u kultivace při 8 °C bylo u poměru C/N = 100 zjištěno největší množství biomasy u kmene *M. chrysoperlae* 1158, a to 10,15 g/l. Z Obr. 9 je patrné, že k největšímu nárůstu biomasy došlo u kmene *M. chrysoperlae* 1158 až po 288 hodinách, ale bylo dosaženo většího množství biomasy než při teplotě 8 °C, kdy bylo největšího množství biomasy dosaženo již ve 240. hodině. U kmene *M. andauensis* 129 bylo nejvyšší množství biomasy získáno dříve než při 8 °C, a to po 240 hodinách, ovšem s menším nárůstem biomasy. S velkou pravděpodobností tento kmen dobře reaguje na chlad, ale vyžaduje prodloužení doby kultivace z důvodu delší adaptace na nižší teplotu. U kmene *M. pulcherrima* 147 je největší nárůst biomasy po 288 hodinách stejně jako u kultivace při 8 °C, došlo ovšem k lepšímu nárůstu biomasy. U kmene *M. pulcherrima* 145 bylo největšího množství biomasy dosaženo po 240 hodinách s vyšším nárůstem biomasy než u kultivace při 8 °C. U kmene *M. pulcherrima* 149 bylo největší množství biomasy naměřeno hned po 72 hodinách, stejně jako u kultivace při 8 °C, došlo ale k většímu nárůstu biomasy.

Kmeny *M. pulcherrima* 145 a *M. pulcherrima* 149 nevykazují výrazný nárůst, tudíž tato teplota se nejvíce jeví jako vhodná.

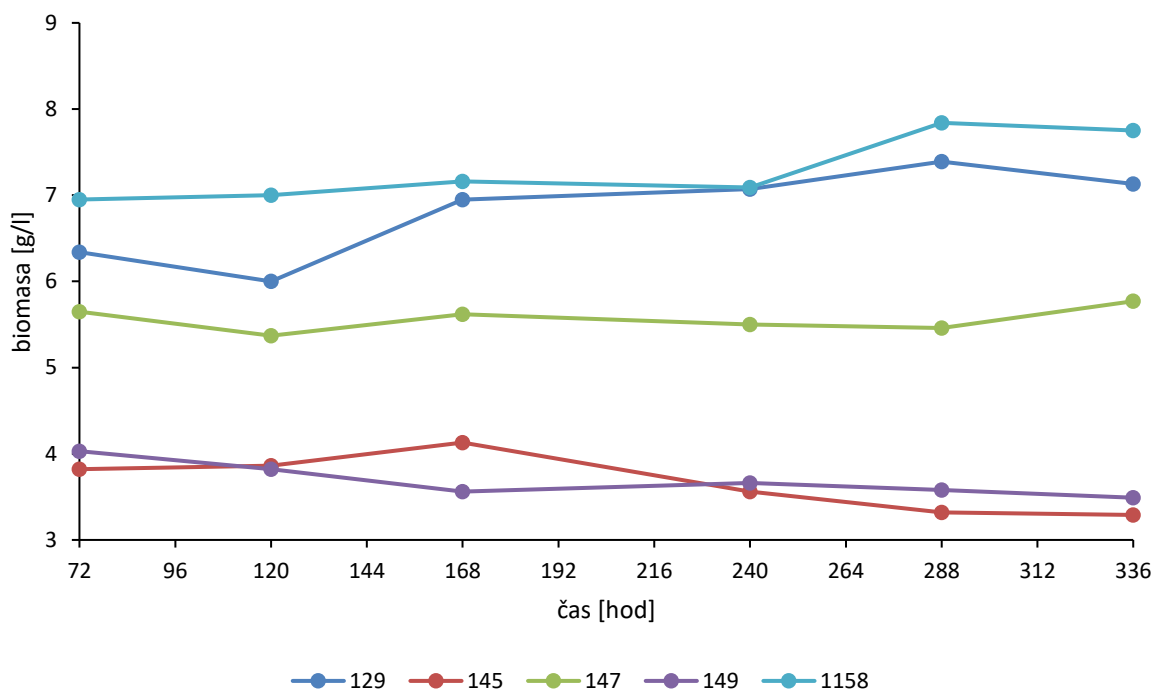
Dále bylo zjištěno, že největší množství biomasy při růstu na médiu o poměru C/N = 150 bylo získáno u kmene *M. chrysoperlae* 1158, a to 7,84 g/l (Obr. 10). U tohoto kmene bylo největší množství biomasy zaznamenáno po 288 hodinách ovšem s menším množstvím biomasy než u kultivace při 8 °C, kdy byl největší nárůst hned po 72 hodinách. U kmene *M. andauensis* 129 bylo nejvyšší množství biomasy naměřeno stejně jako u kultivace při 8 °C po 288 hodinách, u kultivace při 8 °C byl ovšem nárůst biomasy větší. U kmene *M. pulcherrima* 147 došlo k největšímu nárůstu po 336 hodinách, zatímco u kultivace při 8 °C už při 120 hodinách, nárůst biomasy byl ale v podstatě totožný. U kmene *M. pulcherrima* 145 bylo nejvíce biomasy naměřeno po 168 hodinách stejně jako u kultivace při 8 °C a u kmene *M. pulcherrima* 149 k největšímu nárůstu biomasy došlo hned po 72 hodinách stejně jako u kultivace při 8 °C. Větší nárůst biomasy byl zaznamenán při 8 °C.

U kmene *M. pulcherrima* 147 byl zjištěn stálý nárůst biomasy i v 336. hodině, to znamená, že i po této době nedošlo k dosažení stacionární fáze u tohoto kmene. V příštích experimentech by bylo zapotřebí zvolit vhodnější složení kultivačního média či teploty nebo prodloužit čas kultivace. Teplota u kmenů *M. pulcherrima* 145 a *M. pulcherrima* 149 se jeví jako nevhodná, jelikož tyto kmeny nevykazují výrazný nárůst.

Stejně jako u experimentu při 8 °C se jeví vhodnější použití nižšího C/N poměru, jelikož vlivem zvýšeného množství glukózy dochází k inhibici růstu.



Obr. 9: Závislost nárůstu biomasy na čase při teplotě 11 °C a poměru C/N = 100



Obr. 10: Závislost nárůstu biomasy na čase při teplotě 11 °C a poměru C/N = 150

5.1.3 Růst při 15 °C

U této kultivace bylo opět jako u kultivace při 8 a 11 °C u poměru C/N = 100 zjištěno největší množství biomasy u kmene *M. chrysoperlae* 1158, a to 10,66 g/l (Obr. 11), což je nejvyšší dosažená hodnota v této bakalářské práci. U kvasinky *M. andauensis* 129 bylo největšího množství biomasy dosaženo stejně jako při 11 °C po 240 hodinách. U tohoto kmene a při těchto podmínkách byl nárůst biomasy vyšší než při 11 °C a taktéž vyšší než při 8 °C, kdy bylo nejvíce biomasy naměřeno již ve 240. hodině. Kvasinka *M. pulcherrima* 147 vykazuje největší nárůst biomasy již po 168 hodinách, kdežto u kultivace při 8 a 11 °C byl největší nárůst biomasy až po 288 hodinách, a ještě k tomu s nižším množstvím biomasy než u této kultivace při 15 °C. U kmene *M. pulcherrima* 145 bylo nejvyšší množství biomasy změřeno již po 72 hodinách a u kmene *M. pulcherrima* 149 nastala největší nárůst biomasy až ve 336. hodině. Bylo zjištěno, že u kultivace při 15 °C na médiu o poměru C/N = 100 bylo u všech kmenů dosaženo nejvyššího množství biomasy.

U kmenů *M. chrysoperlae* 1158 *M. pulcherrima* 149 nedošlo k dosažení stacionární fáze ani po 336. hodině, jelikož byl i po této hodině zjištěn stálý nárůst biomasy. V dalších experimentech by bylo vhodné prodloužit čas kultivace. Naopak kmeny *M. pulcherrima* 145 a *M. pulcherrima* 149 neukazují výrazný nárůst biomasy s časem, tudíž ani teplota 15 °C se nejeví jako vhodná.

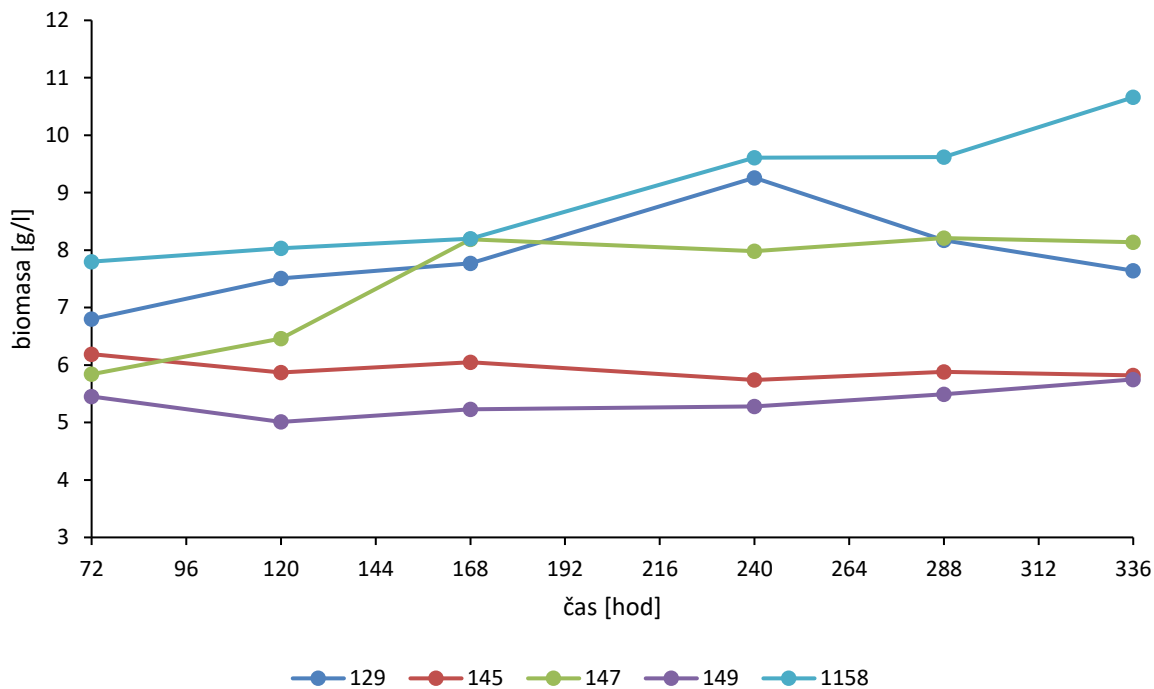
U vyššího poměru C/N = 150 bylo největší množství biomasy opět získáno u kmene *M. chrysoperlae* 1158, a to 10,49 g/l (Obr. 12).

U kmene *M. chrysoperlae* 1158 bylo nejvyššího množství biomasy dosaženo až po 336 hodinách, ovšem množství biomasy bylo nejvyšší ze všech kultivací při třech různých teplotách. U kultivace při 11 °C bylo nejvyššího množství dosaženo po 288 hodinách a při 8 °C už v 72. hodině, v obou případech bylo ale dosaženo menšího množství biomasy. U kmene *M. andauensis* 129 nastal nejvyšší nárůst biomasy již ve 240. hodině, a to s větším množstvím biomasy oproti ostatním kultivacím i když u kultivace při 8 i 11 °C bylo nejvyššího množství dosaženo až po 288 hodinách. Kvasinka *M. pulcherrima* 147 vykazuje největšímu nárůst biomasy po 336 hodinách růstu, stejně tak jako u kultivace při 11 °C, kdy bylo ovšem nejvyšší množství biomasy menší. U kultivace při 8 °C to bylo už při 120 hodinách, ovšem ještě s nižším nárůstem biomasy než u kultivace při 11 °C. U kmene *M. pulcherrima* 145 bylo nejvíce biomasy naměřeno již po 72 hodinách, a to s mnohem výraznějším nárůstem biomasy než u kultivací při 8 a 11 °C, kdy bylo nejvyššího množství biomasy dosaženo až ve 168. hodině. A u kmene *M. pulcherrima* došlo k největšímu nárůstu biomasy po 168 hodinách. V tomto případě bylo dosaženo nižšího množstvím biomasy než u kultivace při 8 °C, kdy nejvíce biomasy bylo naměřeno hned po 72 hodinách.

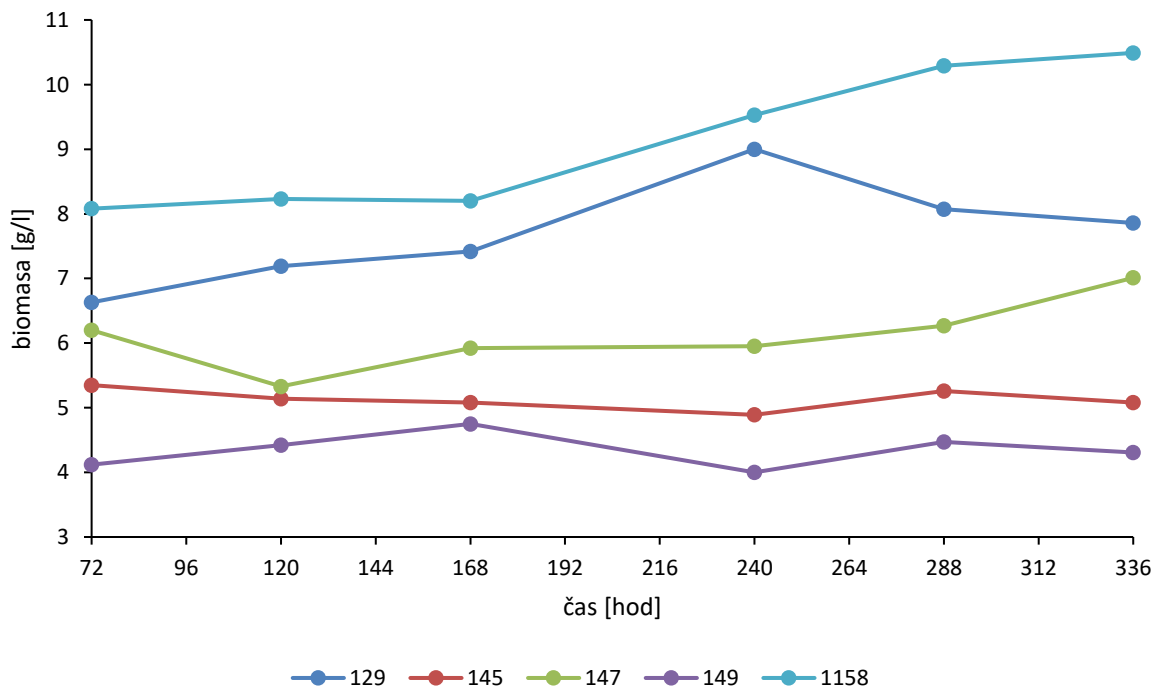
Opět bylo dokázáno, že až na výjimku, a to kmen *M. pulcherrima* 149, bylo ze všech tří kultivací na médiu o poměru C/N = 150 dosaženo největšího množství biomasy při této teplotě.

U kmenů *M. chrysoperlae* 1158 a *M. pulcherrima* 147 nedošlo k dosažení stacionární fáze, jelikož i v 336. hodině vykazují tyto kmeny stálý nárůst biomasy. Naopak kmeny *M. pulcherrima* 145 a *M. pulcherrima* 149 nevykazují i v tomto případě výrazný nárůst.

Z měření vyplývá, že oproti růstu při optimální teplotě (25 °C) dochází při nižších teplotách ke zpomalení růstu a jednotlivých růstových fází je dosaženo opožděně [39] [53] .



Obr. 11: Závislost nárůstu biomasy na čase při teplotě 15 °C a poměru C/N = 100



Obr. 12: Závislost nárůstu biomasy na čase při teplotě 15 °C a poměru C/N = 150

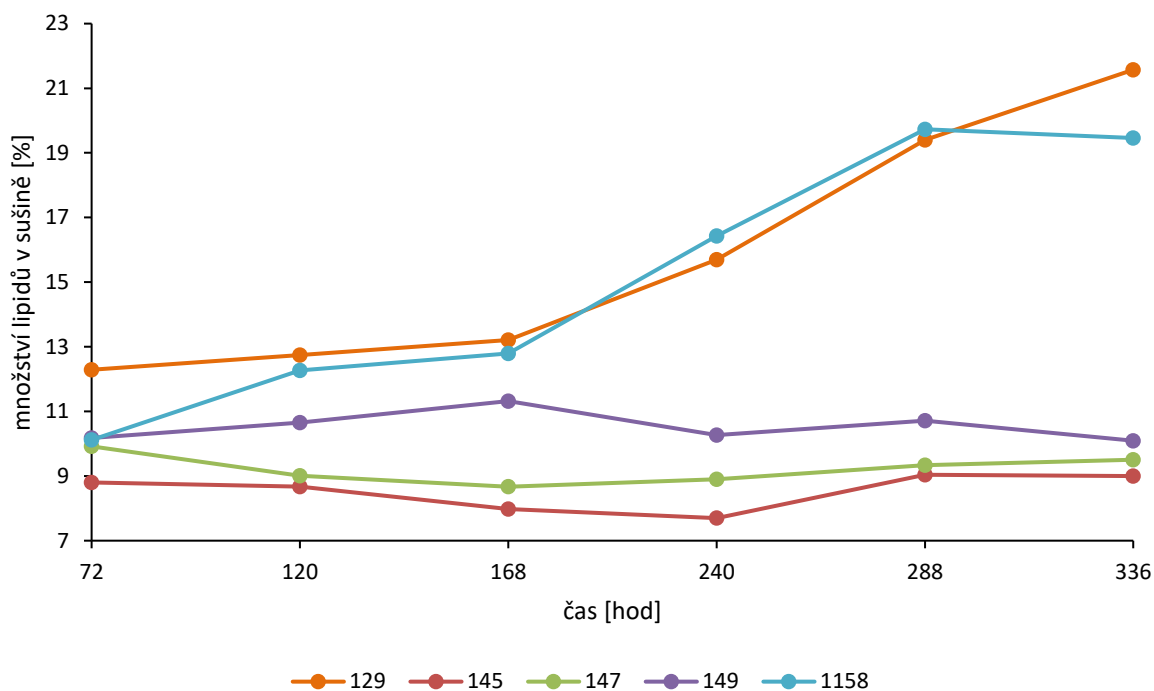
5.2 Zastoupení mastných kyselin

Kvasinky rodu *Metschnikowia* produkují lipidy, které jsou využitelné například ve formě biopaliv [23], proto je důležité zjistit optimální podmínky, při kterých jich daný kmen vyprodukuje nejvíce.

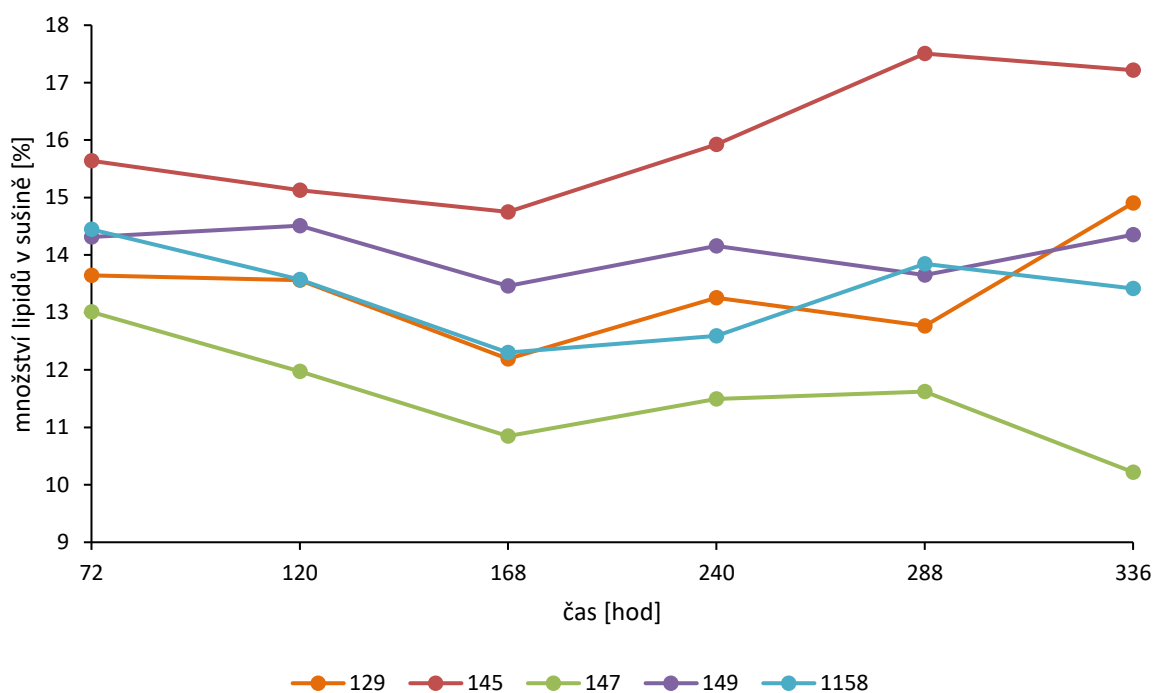
5.2.1 Růst při 8 °C

Z Obr. 13 vyplývá, že při teplotě 8 °C a růstu na médiu o poměru C/N = 100 vyprodukuje nejvíce mastných kyselin kvasinka *M. andauensis* 129 po 336. hodině kultivace a to 21,57 % lipidů z celkového množství sušiny. U tohoto kmene je vidět, že čím déle kultivace probíhá, tím více lipidů získáme. Podobný průběh má při těchto podmínkách i kvasinka *M. chrysoperlae* 1158. U ostatních kvasinek, tj. *M. pulcherrima* 145, *M. pulcherrima* 147 a *M. pulcherrima* 149, je množství získaných mastných kyselin v závislosti na čase relativně konstantní a nedochází vlivem snížené teploty k žádnému nárůstu.

Při kultivaci na médiu o vyšším poměru uhlíku a dusíku bylo nejvyšší množství lipidů v sušině pouze 17,5 % a to u kvasinky *M. pulcherrima* 145 po 288 hodinách růstu (Obr. 14). U ostatních kmenů není s časem znatelná akumulace lipidů a jejich množství. U kmenů *M. andauensis* 129, *M. pulcherrima* 149 a *M. chrysoperlae* 1158 kolísá kolem střední hodnoty (14 % lipidů z celkového množství lipidů), zatímco u kmene *M. pulcherrima* 147 nastal pokles až na hodnotu 10,22 %. Bylo zjištěno, že kvasinka *M. andauensis* 129 a *M. chrysoperlae* 1158 je schopna dosáhnout nejvyššího množství vyprodukovaných lipidů na médiu o nižším poměru C/N (v tomto případě C/N = 100), zatímco kvasinky *M. pulcherrima* 145, *M. pulcherrima* 147 a *M. pulcherrima* 149 produkují více lipidů na médiu o vyšším poměru C/N (v tomto případě C/N = 150). To bude nejspíše způsobeno stresovými faktory, na které každá kvasinka reaguje jinak.



Obr. 13: Závislost množství lipidů na čase při teplotě 8 °C a poměru C/N = 100



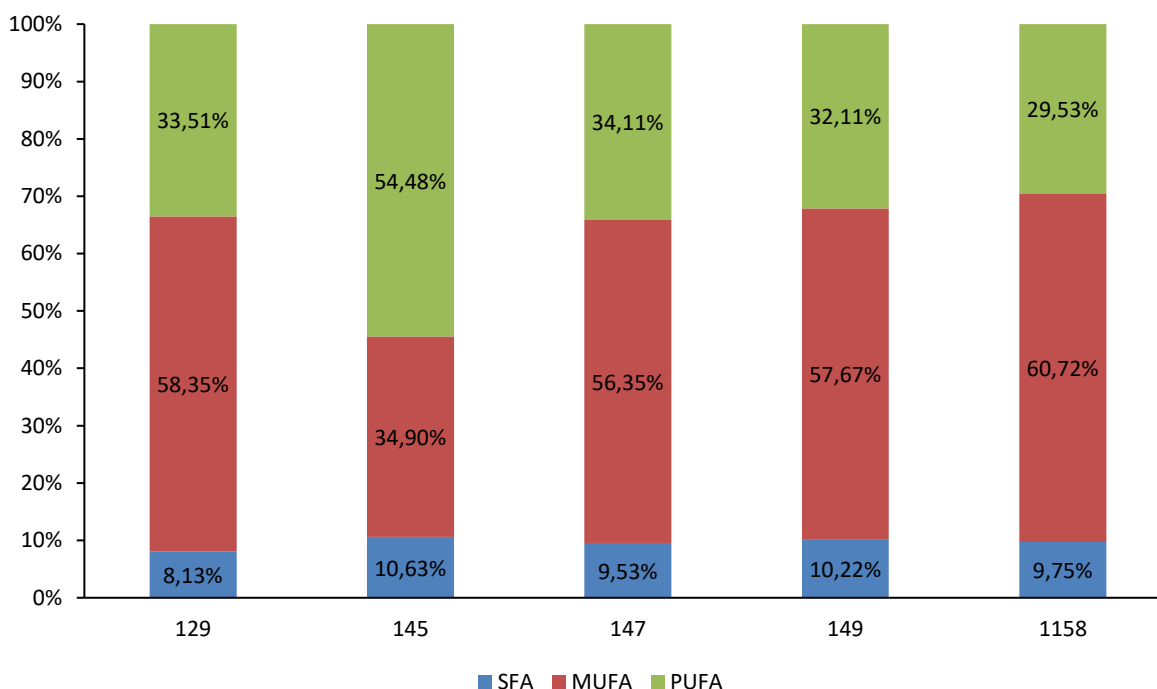
Obr. 14: Závislost množství lipidů na čase při teplotě 8 °C a poměru C/N = 150

Co se týká zastoupení mastných kyselin, z Obr. 15 a Obr. 16 bylo zjištěno, že u všech pěti kmenů při růstu na obou poměrech mají nejvyšší zastoupení mononenasyčené mastné kyseliny. Tyto kyseliny jsou více využitelné pro výrobu biopaliv. Jedinou výjimkou je kmen

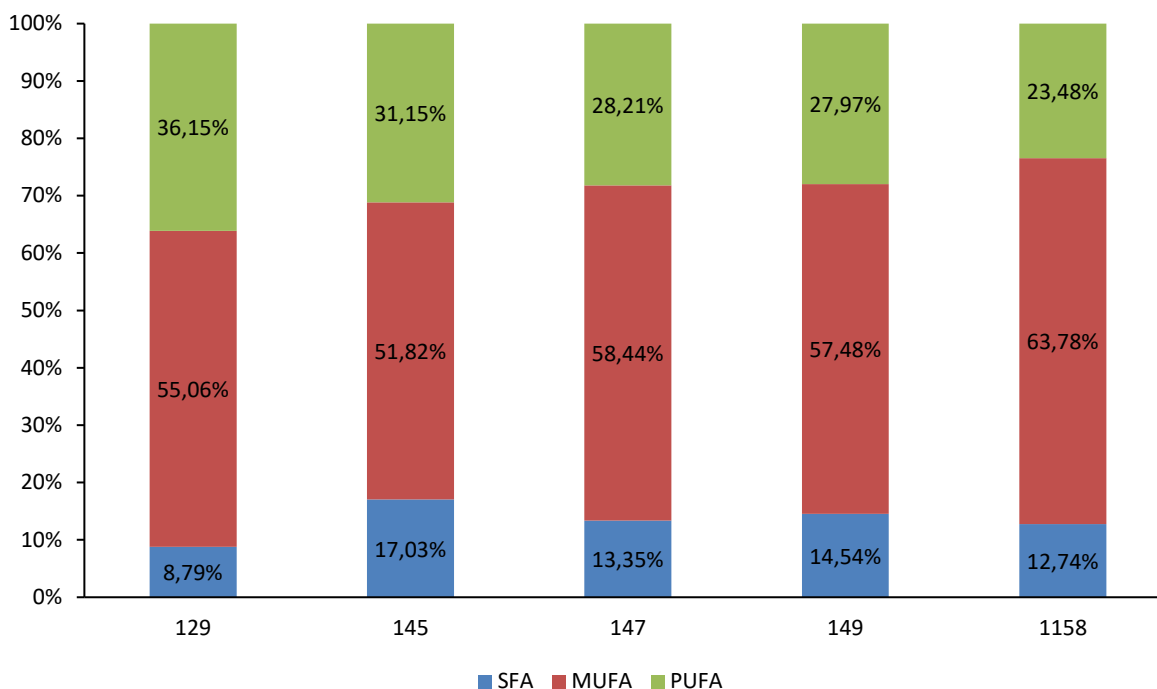
M. pulcherrima 145 při růstu na médiu o poměru C/N = 100. Zde největší podíl tvoří polynenasycené mastné kyseliny, které jsou využitelné v potravinářství, ve farmácii (hlavně linolenová kyselina) nebo při výrobě kosmetických přípravků [27] .

U vyššího poměru C/N bylo naměřeno u všech kmenů větší množství SFA a PUFA, zatímco množství MUFA s vzrůstajícím poměrem C/N kleslo.

U kultivace při 8 °C dochází u všech kmenů k nárůstu PUFA a poklesu MUFA s rostoucím časem kultivace, popřípadě u některých kmenů se hodnota s časem téměř nemění. Nejvýraznější nárůst PUFA s časem byl zjištěn při růstu na médiu C/N = 100 u kmene *M. pulcherrima* 145 a *M. pulcherrima* 147, při růstu na vyšším poměru C/N výrazný nárůst nastal u *M. chrysoperlae* 1158 (Obr. 22–31 v příloze).



Obr. 15: Zastoupení mastných kyselin při nejvyšší produkci lipidů u jednotlivých kmenů (8 °C, C/N = 100)



Obr. 16: Zastoupení mastných kyselin při nejvyšší produkci lipidů u jednotlivých kmenů (8 °C, C/N = 150)

5.2.2 Růst při 11 °C

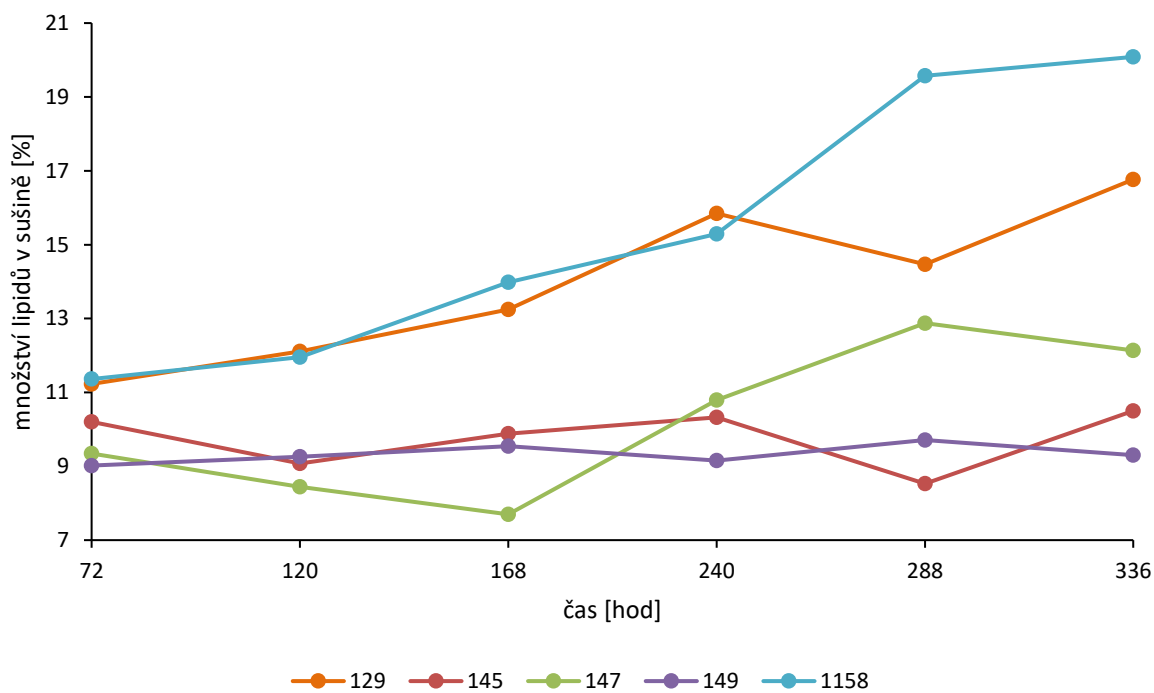
U kultivace při 11 °C bylo dokázáno, že vývoj produkce lipidů je přibližně stejný jako u kultivace při 8 °C. Nejvíce lipidů při teplotě 11 °C a růstu na médiu o poměru C/N = 100 vyprodukovala kvasinka *M. chrysoperlae* 1158 po 336. hodině kultivace a to 19,58 % lipidů z celkového množství sušiny (Obr. 17). U tohoto kmene je množství lipidů úměrné době kultivace, čím déle kultivace probíhá, tím více lipidů získáme. Podobný průběh má při těchto podmínkách i kvasinka *M. andauensis* 129 a *M. pulcherrima* 147. U ostatních kvasinek, tj. *M. pulcherrima* 145 a *M. pulcherrima* 149, se množství získaných mastných kyselin v závislosti na čase nemění.

Nejvyšší množství lipidů u kultivace na médiu o vyšším poměru C/N bylo dosaženo u kvasinky *M. pulcherrima* 145 po 336 hodinách růstu a hodnota dosáhla 17,5 % lipidů v sušině. Tento kmen je jediný, u kterého dochází k výraznějšímu nárůstu lipidů s časem (Obr. 18). U ostatních kmenů není s časem znatelný nárůst množství lipidů. Kmen *M. pulcherrima* 147 dokonce vykazuje pokles množství lipidů s časem. Celkově bylo zjištěno, že stejně jako u kultivace při 8 °C je kvasinka *M. andauensis* 129 a *M. chrysoperlae* 1158 schopna vyprodukovat nejvyšší množství mastných kyselin v médiu o nižším poměru C/N (v tomto případě C/N = 100), kdežto ostatní kvasinky *M. pulcherrima* 145, *M. pulcherrima* 147 a *M. pulcherrima* 149 vyprodukují více lipidů na médiu o vyšším poměru C/N (v tomto případě C/N = 150).

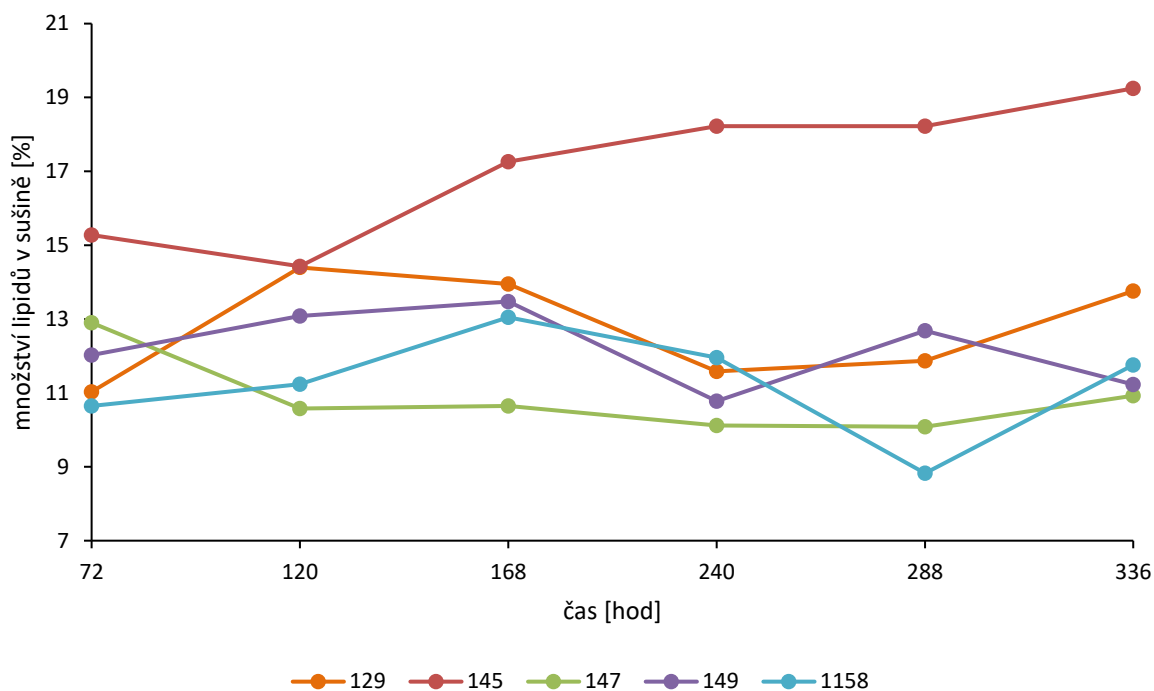
Co se týká porovnání teplot, bylo zjištěno, že kvasinky *M. andauensis* 129, *M. pulcherrima* 149 a *M. chrysoperlae* 1158 vyprodukovaly na obou médiích více lipidů

u kultivace při nižší teplotě (8 °C), zatímco kvasinky *M. pulcherrima* 145 a *M. pulcherrima* 147 vyprodukovaly více lipidů u kultivace při 11 °C.

Bylo tedy zjištěno, že kvasince *M. andauensis* 129 a *M. chrysoperlae* 1158 vyhovuje nižší teplota a médium s nižším poměrem C/N, zatímco kvasinka *M. pulcherrima* 145 a *M. pulcherrima* 147 spíše upřednostňuje vyšší teplotu a růst na médiu o vyšším poměru C/N. Kvasince *M. pulcherrima* 149 zase více vyhovuje růst při nižší teplotě, ale na médiu o vyšším poměru C/N.



Obr. 17: Závislost množství lipidů na čase při teplotě 11 °C a poměru C/N = 100



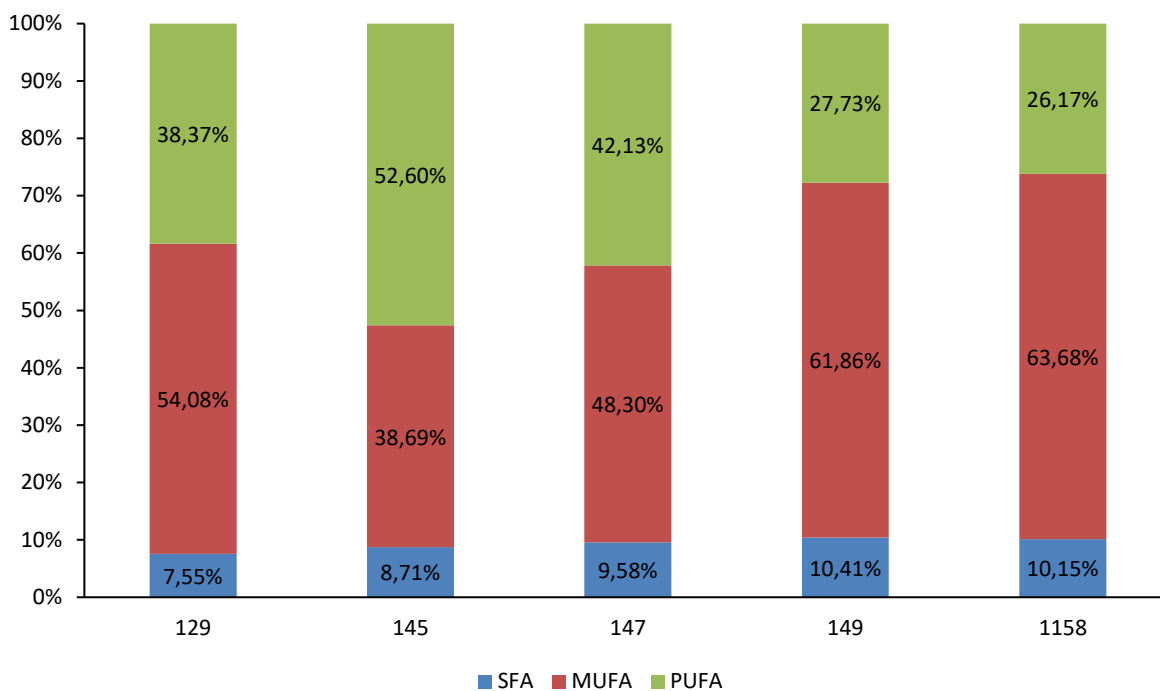
Obr. 18: Závislost množství lipidů na čase při teplotě 11 °C a poměru C/N = 150

Bylo zjištěno, že zastoupení mastných kyselin je podobné jako u kultivace při 8 °C (Obr. 19 a Obr. 20). Tzn., že u všech pěti kmenů při růstu na obou C/N poměrech mají nejvyšší zastoupení mononenasycené mastné kyseliny. Jedinou výjimkou je kmen *M. pulcherrima* 145 při růstu na médiu o poměru C/N = 100. Zde největší podíl tvoří polynenasycené mastné kyseliny.

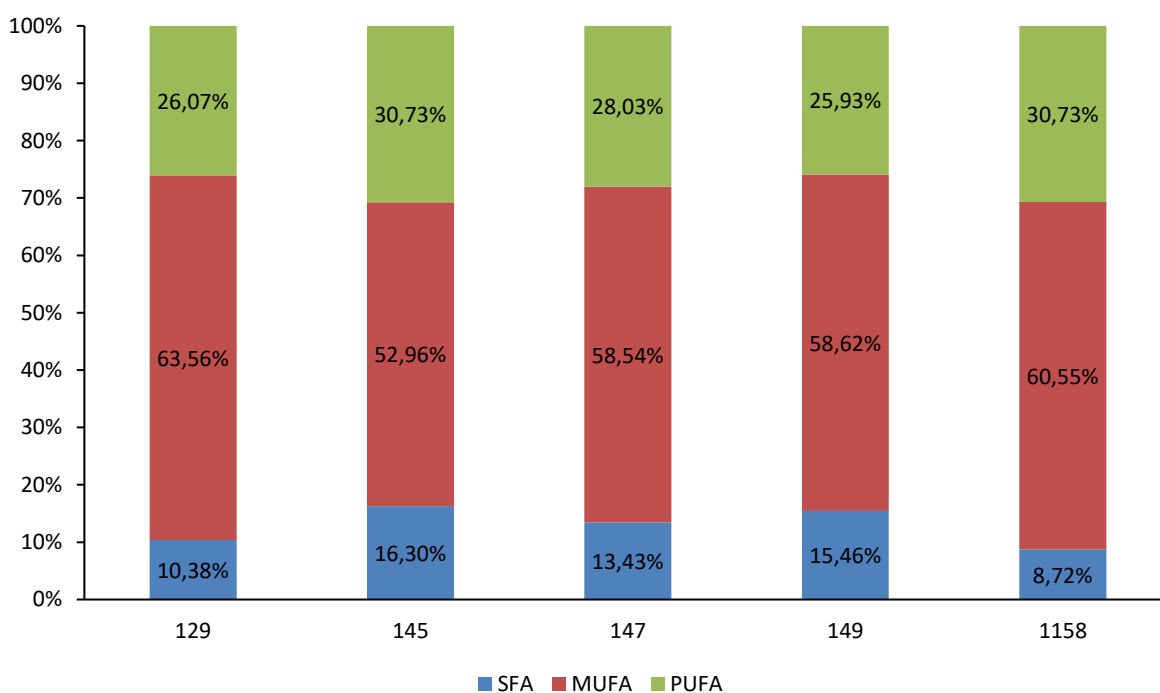
Oproti kultivaci při 8 °C došlo při růstu na nižším poměru C/N u kmenů *M. pulcherrima* 145, *M. pulcherrima* 149 a *M. chrysoperlae* 1158 ke snížení množství PUFA a zároveň zvýšení množství MUFA. U SFA nedochází k výrazným změnám. U kmene *M. andauensis* 129 a *M. pulcherrima* 147 naopak dochází k nárůstu množství PUFA a poklesu MUFA. Množství SFA ani v tomto případě není výrazně pozměněné (Obr. 19).

U kultivace na vyšším poměru C/N dochází k nárůstu PUFA oproti 8 °C pouze u kmene *M. chrysoperlae* 1158, u ostatních kmenů dochází k poklesu. U množství MUFA je tomu naopak. U kmene *M. chrysoperlae* 1158 navíc při tomto poměru C/N dochází oproti kultivaci při 8 °C k výraznějšímu snížení množství SFA (Obr. 20).

Při teplotě 11 °C dochází stejně jako při teplotě 8 °C k nárůstu PUFA a poklesu MUFA s časem u všech kmenů, popřípadě se s časem nemění. Nejvyšší nárůst PUFA byl zjištěn u kmene *M. pulcherrima* 145 při růstu na médiu C/N = 100 a u *M. andauensis* 129 při růstu na médiu C/N = 150. Jedinou výjimkou je při této teplotě kmen *M. pulcherrima* 149 při růstu na médiu o vyšším C/N. U tohoto kmene dochází naopak k poklesu PUFA a nárůstu MUFA s časem. (Obr. 32–41 v příloze).



Obr. 19: Zastoupení mastných kyselin při nejvyšší produkci lipidů u jednotlivých kmenů (11 °C, C/N = 100)



Obr. 20: Zastoupení mastných kyselin při nejvyšší produkci lipidů u jednotlivých kmenů (11 °C, C/N = 150)

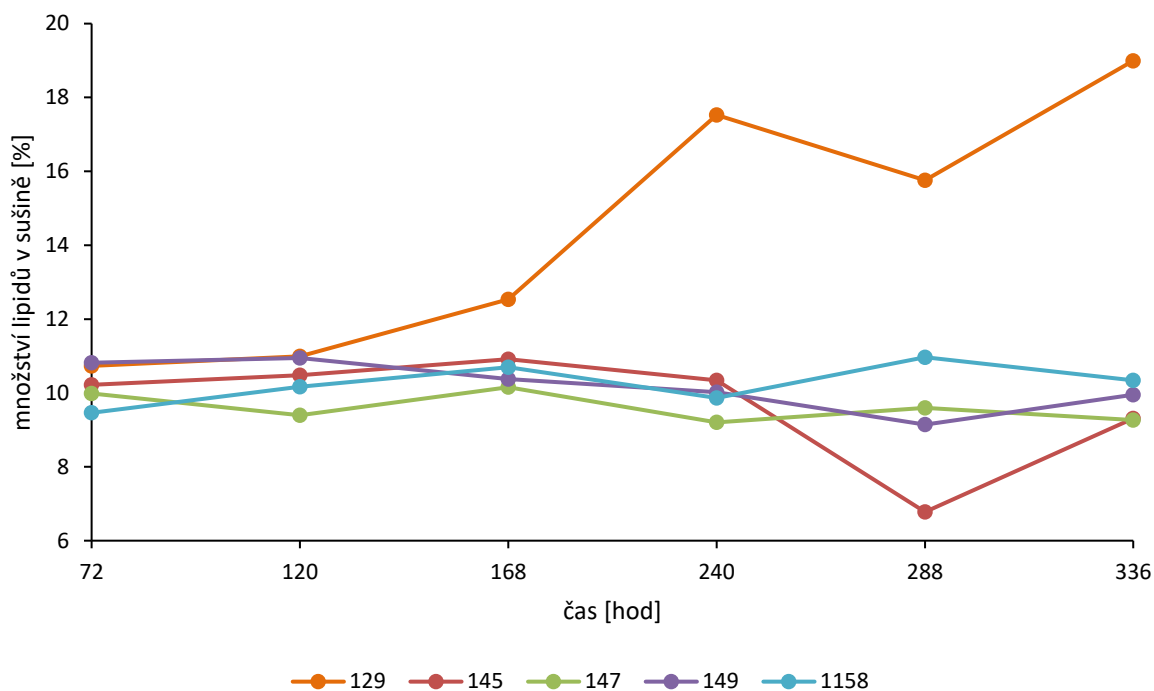
5.2.3 Růst při 15 °C

Vývoj produkce lipidů u růstu při 15 °C měl podobný průběh jako u kultivace při 8 a 11 °C. Výjimku tvoří kmen *M. chrysoerlae* 1158, který při růstu na médiu o poměru C/N = 100 produkuje podstatně menší množství lipidů než při teplotách 8 a 11 °C (Obr. 21). Z Obr. 21 je také zřejmé, že při této teplotě a růstu na médiu o poměru C/N = 100 dosahuje nejvyššího procentuálního množství lipidů kvasinka *M. andauensis* 129 po 336. hodině kultivace a to 18,99 % lipidů z celkové sušiny. Je to také jediná kvasinka, u které dochází s rostoucím časem kultivace k nárůstu procentuálního množství lipidů. U ostatních kvasinek je produkce lipidů po celou dobu kultivace relativně stejná.

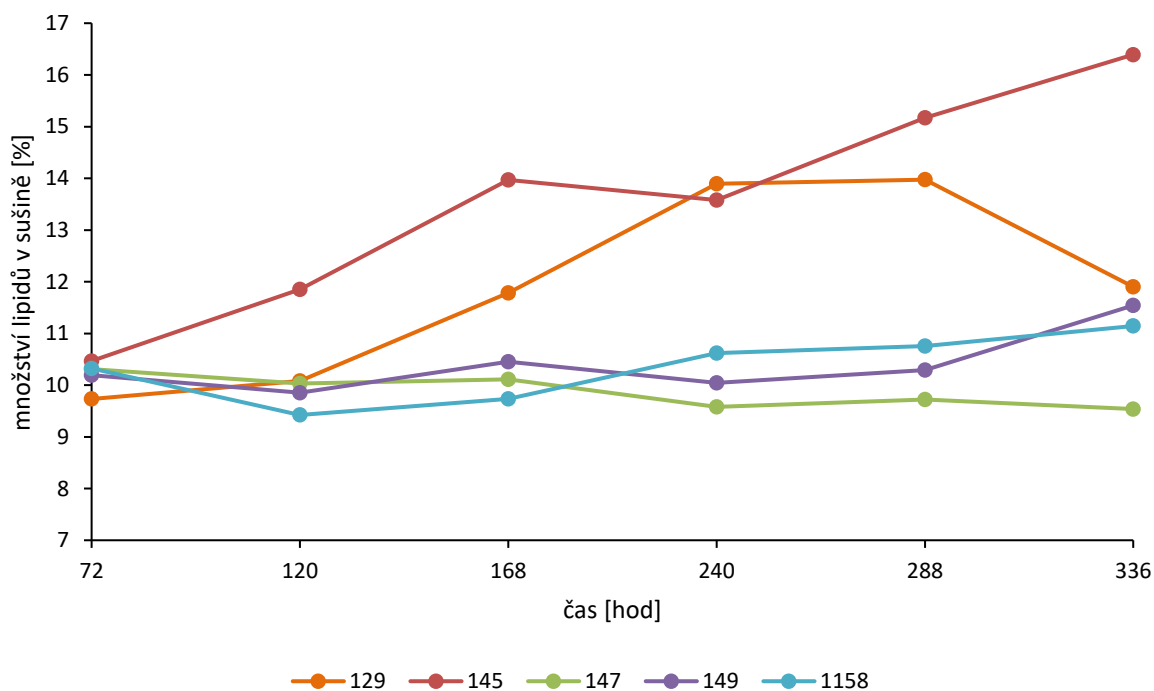
Při kultivaci na médiu o vyšším poměru uhlíku a dusíku bylo nejvyšší množství lipidů v sušině pouze 16,39 % a to u kvasinky *M. pulcherrima* 145 po 336 hodinách růstu stejně tak jako u kultivace při teplotách 8 a 11 °C. Bylo zjištěno, že při růstu na médiu o poměru C/N = 150 dochází k většímu nárůstu lipidů s časem pouze u kmene *M. andauensis* 129 a *M. pulcherrima* 145. U ostatních kmenů je množství lipidů relativně konstantní, nedochází k nárůstu lipidů s časem (Obr. 22).

Z naměřených hodnot bylo zjištěno, že kvasince *M. andauensis* 129 nejvíce vyhovuje teplota 8 °C a médium o nižším poměru C/N, kvasince *M. pulcherrima* 145 spíše vyhovuje médium o vyšší poměru a teplota 11 °C, kvasince *M. pulcherrima* 147 a *M. pulcherrima* 149 více vyhovuje nižší teplota (8 °C) a růst na médiu o vyšším poměru C/N a kvasinka *M. chrysoerlae* 1158 potřebuje růst spíše na médiu o nižším poměru C/N při teplotě 11°C.

Po kultivacích při třech různých teplotách je zřejmé, že na médiu o poměru C/N = 100 dosáhne ve všech třech případech nejvyššího procentuální množství lipidů kvasinka *M. andauensis* 129, zatímco u růstu na médiu o poměru C/N = 150 dostaneme nejvyšší zastoupení lipidů ve všech třech případech u kvasinky *M. pulcherrima* 145.



Obr. 21: Závislost množství lipidů na čase při teplotě 15 °C a poměru C/N = 100

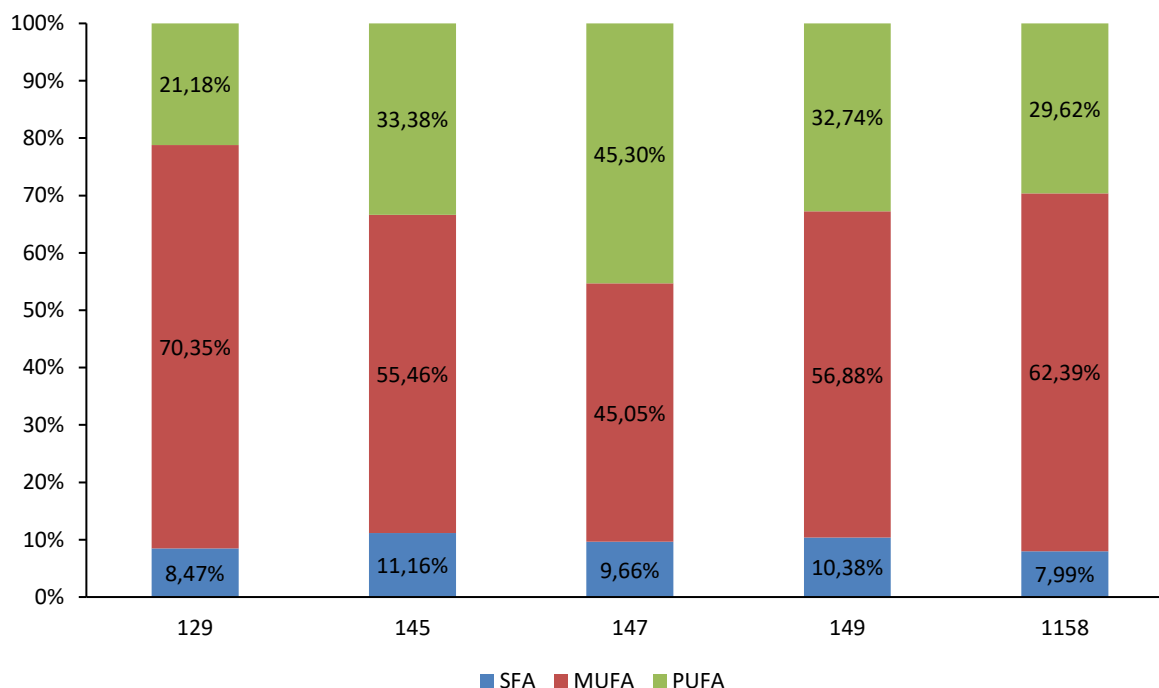


Obr. 22: Závislost množství lipidů na čase při teplotě 15 °C a poměru C/N = 150

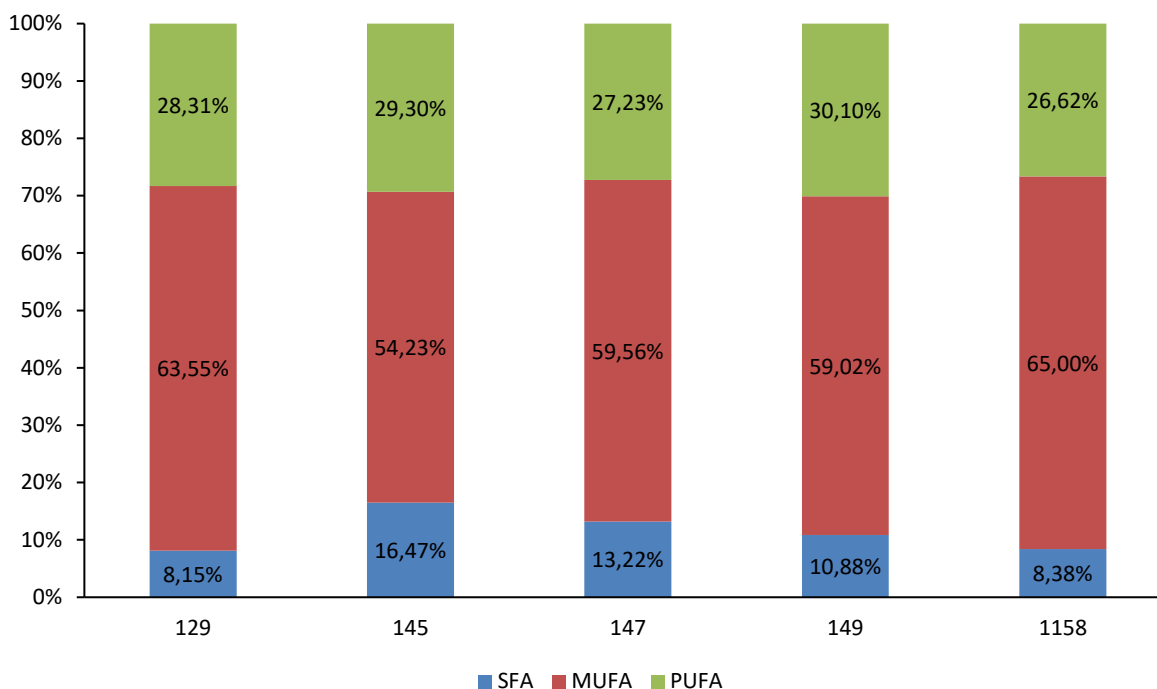
Z Obr. 23 a Obr. 24 je zřejmé, že zastoupení mastných kyselin je podobné jako u kultivace při 8 a 11 °C. Tzn., že u všech pěti kmenů při růstu na obou poměr mají nejvyšší zastoupení mononenasycené mastné kyseliny. Jedinou výjimkou je u této kultivace kmen

M. pulcherrima 147 (u předchozích dvou kultivací při nižších teplotách to byl kmen *M. pulcherrima* 145) při růstu na médiu o poměru C/N = 100. Zde největší podíl tvoří polynenasycené mastné kyseliny.

Při zvýšení teploty na 15 °C dochází u více kmenů ke změnám v profilu mastných kyselin. Kmeny *M. andauensis* 129 a *M. pulcherrima* 147 při růstu na médiu C/N = 100 a kmen *M. pulcherrima* 149 při růstu na médiu C/N = 150 vykazují oproti ostatním kmenům pokles PUFA a nárůst MUFA s časem (Obr. 48–57 v příloze).



Obr. 23: Zastoupení mastných kyselin při nejvyšší produkci lipidů u jednotlivých kmenů (15 °C, C/N = 100)



Obr. 24: Zastoupení mastných kyselin při nejvyšší produkci lipidů u jednotlivých kmenů (15 °C, C/N = 150)

Závěrem této kapitoly lze říct, že největšího množství lipidů bylo dosaženo u kmene *M. andauensis* 129 při teplotě 8 °C na médiu C/N = 100 (21,57 % lipidů v sušině). Pokud vezmeme do úvahy i produkci biomasy, nejlepšího výsledku dosahuje kvasinka *M. chrysoperlae* 1158 při teplotě 11 °C na médiu s poměrem C/N = 100 s produkcí biomasy 10,15 g/l a 19,58 % lipidů v sušině.

Z výzkumu [54] vyplývá, že u kvasinek *Metschnikowia pulcherrima* bylo bez zjevného omezení živin a při teplotě 15 °C dosaženo nejvyšší akumulace lipidů 29,8 %. Stejně tak jako v mém experimentu byla pro zvýšení kinetiky reakce ze začátku použita teplota kultivace 25 °C. Množství biomasy bylo v tomto experimentu stanoveno na 0,17 g/g glukózy. Po přepočtu na gram glukózy bylo zjištěno, že v mém pokusu byla hodnota biomasy u kvasinky *M. chrysoperlae* 1158 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a při 15 °C stanovena na 0,18 g/g glukózy. Další experiment [23] ukazuje, že u kultivace při 15 °C bylo dosaženo kolem 26 % lipidů v sušině, v mém experimentu je hodnota nižší a to přibližně 19 %.

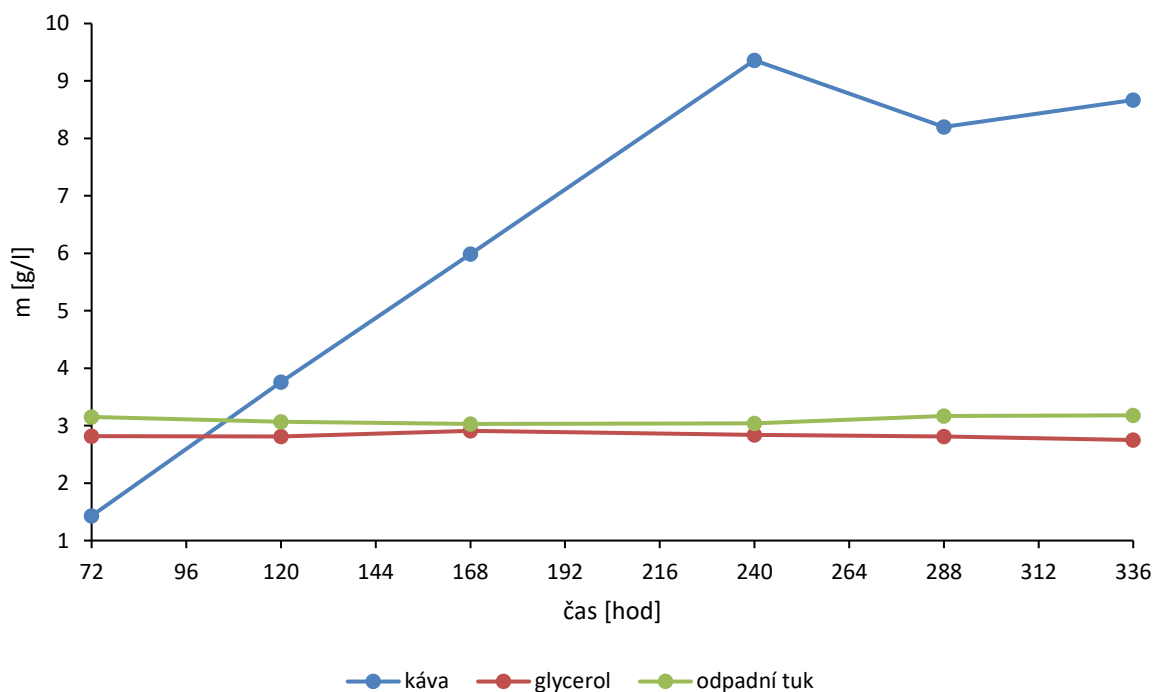
5.3 Růst na odpadních substrátech

Ke kultivaci na odpadních substrátech byla vybrána kvasinka *M. chrysoperlae* 1158, která u kultivace při 11 °C na glukózovém médiu o poměru C/N = 100 vyprodukovala jak velké množství lipidů, tak došlo k velkému nárůstu biomasy. Kultivace tedy probíhala na třech odpadních substrátech (glycerol, káva, odpadní tuk) při 11 °C stejným způsobem jako u předchozích kultivací.

5.3.1 Množství biomasy

Z naměřených hodnot vyplývá, že kvasinka *M. chrysoperlae* 1158 dobře rostla na médiu obsahujícím kávová hydrolyzát. Na Obr. 25 můžeme vidět velký nárůst biomasy až do 240. hodiny, kdy bylo dosaženo hodnoty 9,36 g/l. Srovnáme-li hodnotu s množstvím biomasy získané u této kvasinky při kultivaci na glukózovém médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 11 °C (10,15 g/l) je zřejmé, že množství získané biomasy je sice menší, ale od 72. hodiny došlo až do 240. hodiny k mnohem výraznějšímu nárůstu. U kultivace na glycerolu a odpadním tuku se množství biomasy pohybuje po celou dobu kultivace kolem hodnoty 3 g/l, nedochází k výraznějšímu nárůstu, tudíž tato média v kombinaci s teplotou 11 °C nejsou pro kvasinku *M. chrysoperlae* 1158 vhodná.

V předešlých experimentech bylo naměřeno množství biomasy na glycerolovém médiu na hodnotu 6 g/l ovšem v případě, že kultivace probíhala při 15 °C. Můžeme tedy usuzovat, že pro vyšší zisk biomasy je vhodnější vyšší teplota (15 °C) [23] .



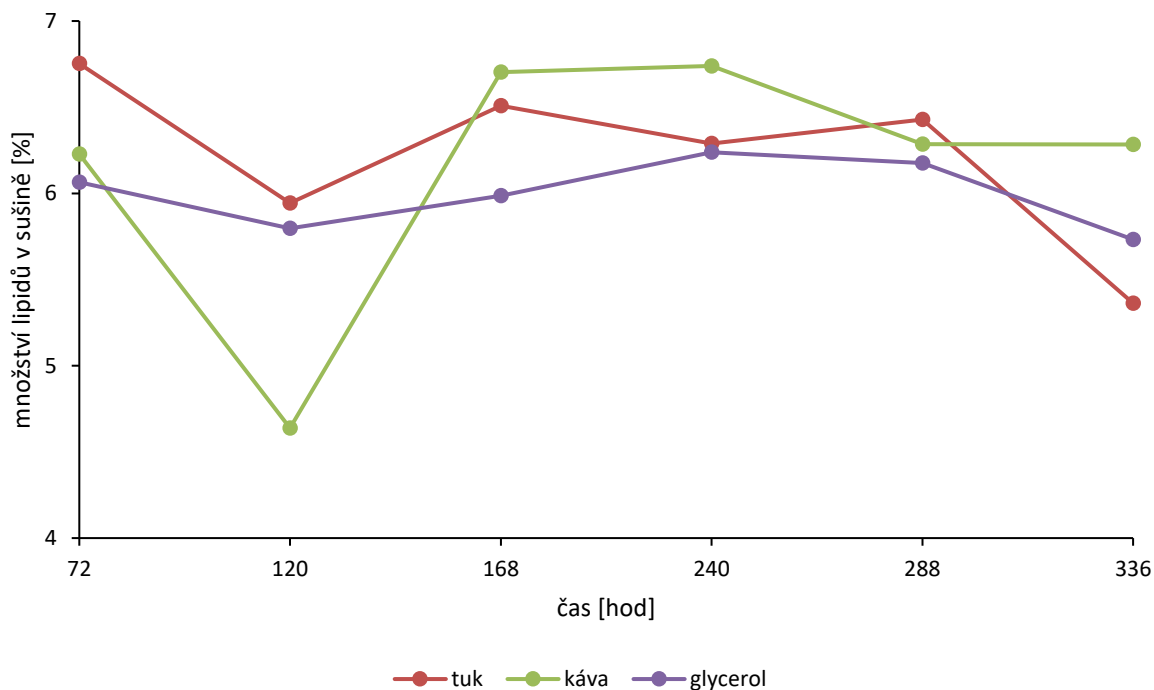
*Obr. 25: Závislost nárůstu biomasy na čase kmene *M. chrysoperlae* 1158 u kultivace při teplotě 11 °C na odpadních substrátech*

5.3.2 Množství lipidů

Bylo zjištěno, že nejvyššího procentuálního zastoupení lipidů v sušině dosáhla kvasinka *M. chrysoperlae* 1158 v 72. hodině kultivace na médiu s odpadním tukem, a to 6,75 % (Obr. 26). Velmi podobné hodnoty bylo dosaženo i při kultivaci na médiu obsahujícím kávu, ovšem až ve 168. hodině kultivace. Jelikož ale při růstu na médiu s kávou bylo vyprodukováno mnohem více biomasy, je pro získání velkého množství biomasy i velkého množství lipidů vhodnější médium s kávou. V porovnání s kultivací na glukózovém médiu o poměru C/N = 100

při teplotě 11 °C je nejvyšší množství získaných lipidů mnohem nižší, jelikož při této kultivaci bylo získáno dokonce 19,58 % lipidů v sušině.

Z Obr. 26 je také zřejmé, že narozdíl od kultivace na glukózovém médiu nedochází ani na jednom ze tří odpadních substrátů k nárůstu množství lipidů s časem. Ve 336. hodině kultivace je naopak množství lipidů menší nebo podobné než na počátku kultivace v 72. hodině.



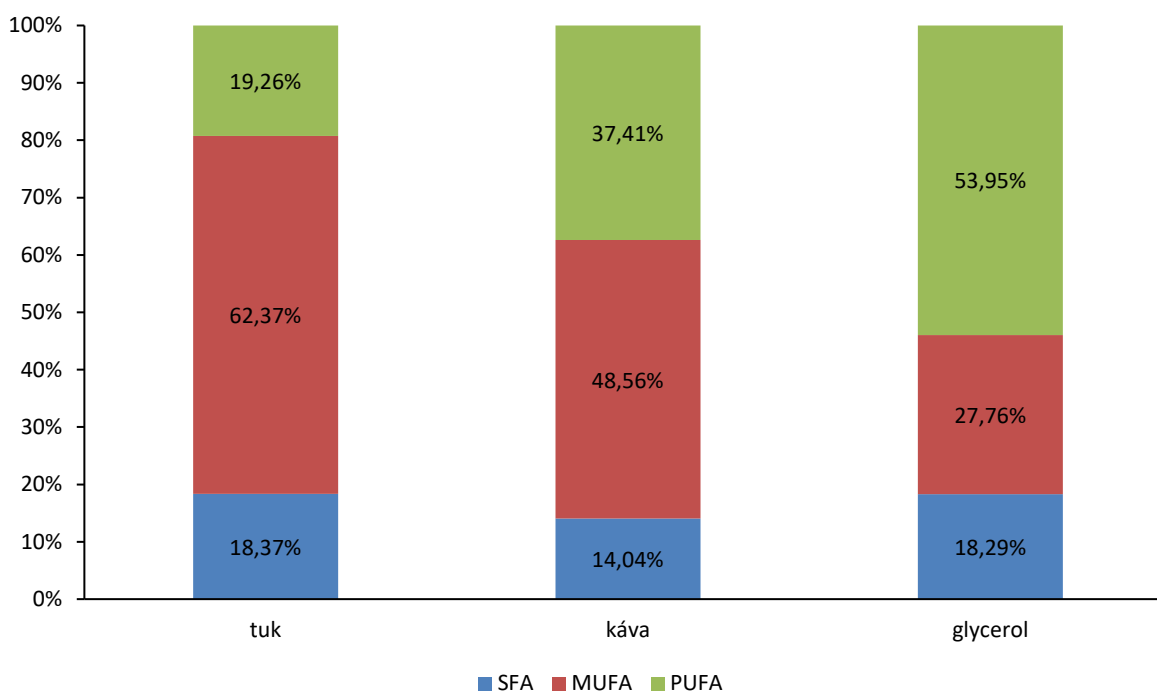
Obr. 26: Závislost množství lipidů na čase kmene *M. chrysoperlae* 1158 u kultivace při teplotě 11 °C na odpadních substrátech

Dále bylo zjištěno, že zastoupení mastných kyselin se u jednotlivých odpadních substrátů výrazně liší (Obr. 27). Při růstu na tukovém médiu mají nejvyšší zastoupení MUFA, kdy hodnota při nejvyšší produkci lipidů je 62,37 %. Tato hodnota je srovnatelná s hodnotou při růstu na glukózovém médiu, při které bylo taktéž naměřeno něco málo přes 60 % MUFA. U kultivace na kávovém médiu měly nejvyšší zastoupení opět MUFA, ovšem jen 48,57 %. Při této kultivaci bylo získáno oproti kultivaci na tukovém médiu mnohem vyšší množství PUFA. Největší změny ve složení mastných kyselin nastaly u kultivace na glycerolovém médiu. V tomto případě nejvyššího zastoupení dosáhly PUFA, a to dokonce hodnoty 53,95 %. Hodnota množství PUFA byla v této práci vyšší pouze u kultivace kvasinky *M. pulcherrima* 145 při 8 °C na glukózovém médiu o poměru C/N = 100, kdy množství PUFA bylo 54,48 %. Jelikož PUFA jsou mastné kyseliny využitelné v potravinářství, v kosmetice nebo ve farmacii [24,27], bylo by k získání nejvyššího množství těchto kyselin a při používání odpadních substrátů jako kultivačních médií vhodné zvolit kvasinku *M. chrysoperlae* 1158, která by byla kultivována na glycerolovém médiu při 11 °C.

Také bylo zjištěno, že u kultivace na odpadním tuku dochází s časem kultivace k nárůstu MUFA a poklesu PUFA (kromě 120. a 336. hodiny kultivace, kdy dochází k mírnému nárůstu PUFA), u kultivace na médiu obsahujícím kávu je to obdobné jako u kultivace na odpadním

tuku, výjimkou je opět 120. hodina kultivace, při které dochází k nárůstu PUFA a poklesu MUFA. U kultivace na glycerolovém médiu nedochází ke stálému nárůstu ani poklesu ani u jedné skupiny mastných kyselin, pouze bylo zjištěno, že množství PUFA je v 336. hodině vyšší než v 72. hodině a zastoupení MUFA je naopak nižší (viz příloha Obr. 58–60).

V dřívějších experimentech bylo zjištěno, že při kultivaci kvasinek rodu *Metschnikowia* na glycerolu nebo na kávovém hydrolyzátu dochází u batch kultivace k vysokému osmotickému tlaku. I když tyto kvasinky jsou vysoce osmofilní, při dosažení vysoké hustoty buněk začíná být růst díky vysokému osmotickému tlaku inhibován. Proto by u těchto kvasinek byla lepší fed-batch kultivace, při které je naopak ještě velmi cenná antimikrobiální aktivita těchto kvasinek [55] s. Dále bylo také zjištěno, že u kultivace na glycerolovém médiu při 15 °C bylo dosaženo až 15 % lipidů, což je více než dvojnásobná hodnota, která byla naměřena v tomto experimentu. Je možné, že u kultivace na glycerolovém médiu by bylo u příštích kultivací vhodné zvýšit teplotu na 15 °C [23] .



Obr. 27: Zastoupení mastných kyselin při nejvyšší produkci lipidů kvasinky *M. chrysoperlae* 1158 u kultivace při teplotě 11 °C na odpadních substrátech

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá regulací produkce biomasy a lipidů u pěti vybraných kmenů kvasinek rodu *Metschnikowia*. Ze zástupců tohoto rodu byly vybrány *M. andauensis* 129, *M. pulcherrima* 145, *M. pulcherrima* 147, *M. pulcherrima* 149 a *M. chrysoperlae* 1158. Jako stresový faktor ovlivňující výtěžky kultivací bylo zvoleno různé složení kultivačního média a různé teploty kultivace. Nejprve kultivace probíhala na dvou médiích o různém poměru C/N a třech různých teplotách. Jeden poměr byl C/N = 100 a druhý C/N = 150 při teplotách 8, 11 a 15 °C. V další části byl vybrán jeden kmen, u kterého byl zjištěn velký nárůst biomasy s časem a zároveň u něho bylo naměřeno vysoké procento tuků v sušině, a tento kmen byl kultivován na třech odpadních substrátech, konkrétně byl použit glycerol, káva a odpadní tuk.

U kultivace při 8 °C a na médiu o poměru C/N = 100 bylo nejvíce biomasy naměřeno u kvasinky *M. andauensis* 129 a to 8,79 g/l a nejvyšší procento lipidů a to 21,57 % obsahovala tatáž kvasinka. Při vyšším poměru C/N vyprodukovala nejvíce biomasy kvasinka *M. chrysoperlae* 1158, konkrétně 8,39 g/l, a nejvíce tuků v sušině (17,51 %) kvasinka *M. pulcherrima* 145.

Kultivace při 11 °C přinesla u kultivace na nižším poměru C/N vyšší hodnoty biomasy. Nejvyšší hodnota byla zaznamenána u kvasinky *M. chrysoperlae* 1158 a to 10,15 g/l a stejná kvasinka obsahovala i nejvíce lipidů (19,58 %). U vyššího poměru naopak došlo oproti kultivaci při 8 °C ke snížení množství biomasy. Nejvyšší hodnotu 7,84 g/l měla kvasinka *M. chrysoperlae* 1158. Z těchto výsledků je jasné, že kvasince *M. chrysoperlae* 1158 více vyhovuje médium s nižším obsahem glukózy. Nejvíce lipidů obsahovala kvasinka *M. pulcherrima* 145 a to 19,24 % lipidů v sušině.

U kultivace při 15 °C bylo opět na obou médiích nejvíce biomasy naměřeno u kvasinky *M. chrysoperlae* 1158. Z měření bylo dokázáno, že této kvasince vyhovují, co se týče růstu biomasy, média s nižším poměrem C/N a vyšší teploty. Při nižším poměru C/N bylo množství biomasy 10,66 g/l, při vyšším poměru byla hodnota podobná a to 10,49 g/l. Nejvyšší množství lipidů bylo při nižším poměru C/N naměřeno u kvasinky *M. andauensis* 129 (18,99 %) a na vyšším médiu u kvasinky *M. pulcherrima* 145 (16,39 %).

U všech kultivací je získané množství biomasy nižší u vyššího poměru C/N a zároveň procentuální zastoupení lipidů je u vyššího poměru C/N vyšší. To dokazuje fakt, že pokud je zdroj živin (dusík) omezen, nedochází k další syntéze proteinů a nukleových kyselin a tím pádem je omezen růst, zatímco nadbytek uhlíku je využit k syntéze lipidů.

Díky výše uvedeným výsledkům byla ke kultivaci na odpadních substrátech zvolena kvasinka *M. chrysoperlae* 1158. K výraznému nárůstu biomasy došlo pouze při kultivaci na médiu obsahujícím kávu, kdy nejvyšší množství biomasy bylo 9,36 g/l. Nejvyšší procentuální množství lipidů bylo naměřeno v 72. hodině při kultivaci na odpadním tuku, a to 6,76 %. Také bylo zjištěno, že u této kvasinky při růstu na glycerolovém médiu více než 50 % získaných lipidů tvoří PUFA, které jsou dále využitelné v různých odvětvích průmyslu.

Co se týká zastoupení mastných kyselin, bylo zjištěno, že u většiny provedených kultivací, tzn. s různými kmeny a při různých podmínkách, má nejvyšší procentuální zastoupení

mononenasyčená mastná kyselina, a to kyselina olejová. Pouze ve výjimečných případech má nejvyšší zastoupení kyseliny linolová, která patří do skupiny polynenasycených mastných kyselin.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008. ISBN 978-80-200-1703-1.
- [2] KLABAN, Vladimír. *Obecná a environmentální mikrobiologie: fascinující, neuvěřitelný a tajemný svět mikrobů v přírodním prostředí*. Hradec Králové: Gaudeamus, 2018. ISBN 978-80-7435-673-5.
- [3] VESELÁ, Mária a Milan DRDÁK. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 2. vyd. přeprac. Brno: VUTIUM, 1999. ISBN 80-214-1305-0.
- [4] JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVIÁ. *Úvod do biologie kvasinek*. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-718-4990-1.
- [5] KALHOTKA, Libor. *Mikromycety v prostředí člověka: vláknité mikromycety (plísňe) a kvasinky*. V Brně: Mendelova univerzita, 2014. ISBN 978-80-7375-943-8.7.
- [6] AMARETTI, A., RAIMONDI, S., SALA, M. *et al.* Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microb Cell Fact* **9**, 73 (2010) doi:10.1186/1475-2859-9-73
- [7] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. Bratislava: Alfa, 1982. Edícia potravinárskej literatúry (Alfa).
- [8] OBRUČA Stanislav, doc. Ing., Ph.D. *Obecná logika biotechnologických procesů*. Vysoké učení technické Brno, Fakulta chemická, 2019.
- [9] Příspěvatelé WikiSkript, *Měření růstu bakterií* [online], , c2018, Datum poslední revize 28. 11. 2018, 19:30 UTC, [citováno 28. 10. 2019]<https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=M%C4%9B%C5%99en%C3%AD_r%C5%AFstu_bakteri%C3%AD&oldid=417153>
- [10] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. Bratislava: Alfa, 1990. Edícia potravinárskej literatúry (Alfa).
- [11] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky*. Bratislava: Slovenské vydavateľstvo technickej literatúry, 1957. Edícia literatúry pre potravinársky priemysel.
- [12] KAŠTÁNEK, František. *Bioinženýrství*. Praha: Academia, 2001. ISBN 80-200-0768-7.
- [13] VYTRÁSOVÁ, Jarmila a Zuzana BÍLKOVÁ. *Laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie*. Vyd. 2. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2003. ISBN 80-719-4610-9.

[14] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 978-80-200-0600-4.

[15] 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.

[16] THEVENIEAU, France a Jean-Marc NICAUD. Microorganisms as sources of oils. *OCL*. 2013, **20**(6). DOI: 10.1051/ocl/2013034. ISSN 2257-6614. Dostupné také z: <http://www.ocl-journal.org/10.1051/ocl/2013034>

[17] ÁRENDÁSOVÁ, Veronika. *Mikrobiální produkce lipidických látek s využitím odpadních substrátů*. Brno, 2019

[18] THEVENIEAU, France a Jean-Marc NICAUD. Microorganisms as sources of oils. *OCL*. 2013, **20**(6). DOI: 10.1051/ocl/2013034. ISSN 2257-6614. Dostupné také z: <http://www.ocl-journal.org/10.1051/ocl/2013034>

[19] TAI, Mitchell a Gregory STEPHANOPOULOS. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metabolic Engineering*. 2013, **15**, 1-9. DOI: 10.1016/j.ymben.2012.08.007. ISSN 10967176. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717612000961>

[20] GRANGER, L-M., P. PERLOT, G. GOMA a A. PAREILLEUX. Efficiency of fatty acid synthesis by oleaginous yeasts: Prediction of yield and fatty acid cell content from consumed C/N ratio by a simple method. *Biotechnology and Bioengineering*. 1993, **42**(10), 1151-1156. DOI: 10.1002/bit.260421004. ISSN 0006-3592. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260421004>

[21] LI, Qiang, Wei DU a Dehua LIU. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, **80**(5), 749-756. DOI: 10.1007/s00253-008-1625-9. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-008-1625-9>

[22] LIU, Bo a Zongbao (Kent) ZHAO. *Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass*. 2007, **82**(8), 775-780. DOI: 10.1002/jctb.1744. ISSN 02682575. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1744>

[23] SANTAMAURO, Fabio, Fraeya M WHIFFIN, Rod J SCOTT, Christopher J CHUCK, M. ANTONUCCI, C. TRUZZI, G. SCARPONI a M. CIANI. Low-cost lipid production by an oleaginous yeast cultured in non-sterile conditions using model waste resources. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, **7**(1), 34-. DOI: 10.1186/1754-6834-7-34. ISSN 1754-6834

- [24] GONOVÁ, D. Studium produkce lipidických látek z odpadních substrátů pomocí kvasinek rodu *Metschnikowia*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 99 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Andrea Hároniková, Ph.D..
- [25] CANONICO, L., S. ASHOOR, M. TACCARI, F. COMITINI, M. ANTONUCCI, C. TRUZZI, G. SCARPONI a M. CIANI. Conversion of raw glycerol to microbial lipids by new *Metschnikowia* and *Yarrowia lipolytica* strains. *Annals of Microbiology*. 2016, **66**(4), 1409-1418. DOI: 10.1007/s13213-016-1228-0. ISSN 1590-4261. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s13213-016-1228-0>
- [26] MARTÍNEZ, Elia, Vijaya RAGHAVAN, Fernando GONZÁLEZ-ANDRÉS a Xiomar GÓMEZ. New Biofuel Alternatives: Integrating Waste Management and Single Cell Oil Production. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, **16**(12), 9385-9405. DOI: 10.3390/ijms16059385. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/5/9385>
- [27] PAPANIKOLAOU, Seraphim a George AGGELIS. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2011, **113**(8), 1031-1051. DOI: 10.1002/ejlt.201100014. ISSN 14387697. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201100014>
- [28] LAMERS, Dennis, Nick VAN BIEZEN, Dirk MARTENS, Linda PETERS, Eric VAN DE ZILVER, Nicole JACOBS-VAN DREUMEL, René H. WIJFFELS a Christien LOKMAN. Selection of oleaginous yeasts for fatty acid production. *BMC Biotechnology*. 2016, **16**(1). DOI: 10.1186/s12896-016-0276-7. ISSN 1472-6750. Dostupné také z: <http://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12896-016-0276-7>
- [29] BOEKHOUT, T. a V. ROBERT. *Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects*. Boca Raton: CRC Press, 2003. ISBN 08-493-1926-9.
- [30] MORATA, Antonio, Iris LOIRA, Carlos ESCOTT, Juan Manuel DEL FRESNO, María Antonia BAÑUELOS a José Antonio SUÁREZ-LEPE. Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in Wine Biotechnology. *Fermentation*. 2019, **5**(3). DOI: 10.3390/fermentation5030063. ISSN 2311-5637. Dostupné také z: <https://www.mdpi.com/2311-5637/5/3/63>
- [31] CSUTAK, ORTANSA, TATIANA VASSU, PETRUTA CORNEA a IRINA GREBENISAN. *Genetic characterization of two new Metschnikowia strains with antifungal activity* [online]. In: . University of Bucharest, Faculty of Biology, Department of Genetics, Aleea Portocalilor 1-3, 060101 Bucharest; USAMV Bucharest, Faculty of Biotechnology, Bd.Marasti 59, sector 1, Bucharest, 2007, 25. března 2007 [cit. 2019-11-18]. Dostupné z: https://rombio.eu/lucr_7_csutak%20bt.htm

- [32] KÁNTOR, Attila, Jana HUTKOVÁ, Jana PETROVÁ, Lukáš HLEBA a Miroslava KAČÁNIOVÁ. Antimicrobial activity of pulcherrimin pigment produced by *Metschnikowia pulcherrima* against various yeast species. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2016, **05**(03), 282-285. DOI: 10.15414/jmbfs.2015/16.5.3.282-285. ISSN 13385178.
- [33] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Pulcherrimin, CID=70698372, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pulcherrimin> (accessed on Nov. 23, 2019)
- [34] PITT, J. I. and M. W. Miller, *Sporulation in Candida pulcherrima, Candida reukaufii and Chlamydozoma species: their relationships with Metschnikowia*. *Mycologia*. 1968, 663-685. DOI: 10.2307/3757434.
- [35] In: UC DAVIS *Viticulture and Enology: Metschnikowia Pulcherrima* [online]. Department of Viticulture & Enology University of California 1136 Robert Mondavi Institute North 595 Hilgard Lane Davis, CA 95616-5270 U.S.A, 2018 [cit. 2019-11-18]. Dostupné z: <https://wineserver.ucdavis.edu/-info/enology/wine-microbiology/yeast-mold/metschnikowia-pulcherrima>
- [36] KOSSEVA, Maria R., V. K. JOSHI a P. S. PANESAR. *Science and technology of fruit wine production*. Tokyo: Academic Press is an imprint of Elsevier, [2017]. ISBN 01-280-0850-4.
- [37] MORENO-ARRIBAS, M. V., POLO, M. C.: *Wine Chemistry and Biochemistry*, Springer, New York 2009, ISBN 978-0-387-74116-1.
- [38] FILIP, Jiří. *Odpadové hospodářství*. Vyd. 1., Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2002. ISBN 80-7157-608-5.
- [39] ÁRENDÁSOVÁ, Veronika. Mikrobiální produkce lipidických látek s využitím odpadních substrátů [online]. Brno, 2019 [cit. 2020-01-25]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zavprace/detail/113475>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Andrea Hároniková.
- [40] MENŠÍKOVÁ, P. *Výroba bionafty z použitých jedlých olejů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2009. 59 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Jaroslav Jícha, CSc.
- [41] HOLUB, J. *Produkce karotenoidů kvasinkami kultivovanými na odpadním tuku*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 71 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..
- [42] OBRUČA Stanislav, doc. Ing., Ph.D. *Co jsou to biotechnologie?*. Vysoké učení technické Brno, Fakulta chemická, 2019.

- [43] KROFTA, Jiří. *Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie 2*. Vyd. 6. přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0451-3.
- [44] ZACHAŘ, P. a D. SÝKORA. Plynová chromatografie. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. Praha [cit. 2020-03-16]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>
- [45] WALKER, G. M. *Yeast – Physiology and Biotechnology*. Chicester : John Wiley & Sons Ltd, 1998.
- [46] HOHMANN, S. a W. H. MAGER. *Yeast stress responses*. rev. ed. New York: Springer, 2003. ISBN 35-404-3926-9.
- [47] HÁRONIKOVÁ, A. *Produkce vybraných kvasinkových metabolitů využitelných do potravinových doplňků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 141 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc
- [48] KOHOUTKOVÁ, Ing. Jana Ph.D. *Laboratoř analýzy potravin a přírodních produktů: Stanovení složení mastných kyselin*. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. Praha [cit. 2020-03-16]. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~kohoutkj/N%C3%81VODY%202017/Stanoven%C3%AD%20mastn%C3%BDch%20kyselin%20Kohoutkov%C3%A1119_09_2017_LP_2.pdf
- [49] *Metoda HPLC/RI ke stanovení sacharidů v cukrovarnických meziproduktech a výrobcích. Listy cukrovarnické a řepařské* [online]. VUC Praha, červenec-srpen 2015 [cit. 2020-03-16]. Dostupné z: http://www.cukr-listy.cz/on_line/2015/PDF/254-257.pdf
- [50] ČECHOVÁ, Erika. *Možnosti analýzy sacharidů s využitím HPLC-RI*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2016, 54 s. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/37498>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí práce Bubelová, Zuzana.
- [51] ČOPÍKOVÁ, Jana. *Chemie a analytika sacharidů*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1997. ISBN 80-708-0306-1.
- [52] HOLUB, Jiří. *Optimalizace kultivace karotenogenních kvasinek na směsných odpadních substrátech*. Brno, 2020. Dostupné také 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.
- [53] CAGÁŇOVÁ, Linda. *Využití odpadních substrátů k produkci lipidických látek kvasinkami rodu Metschnikowia*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113473>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Andrea Hároniková.

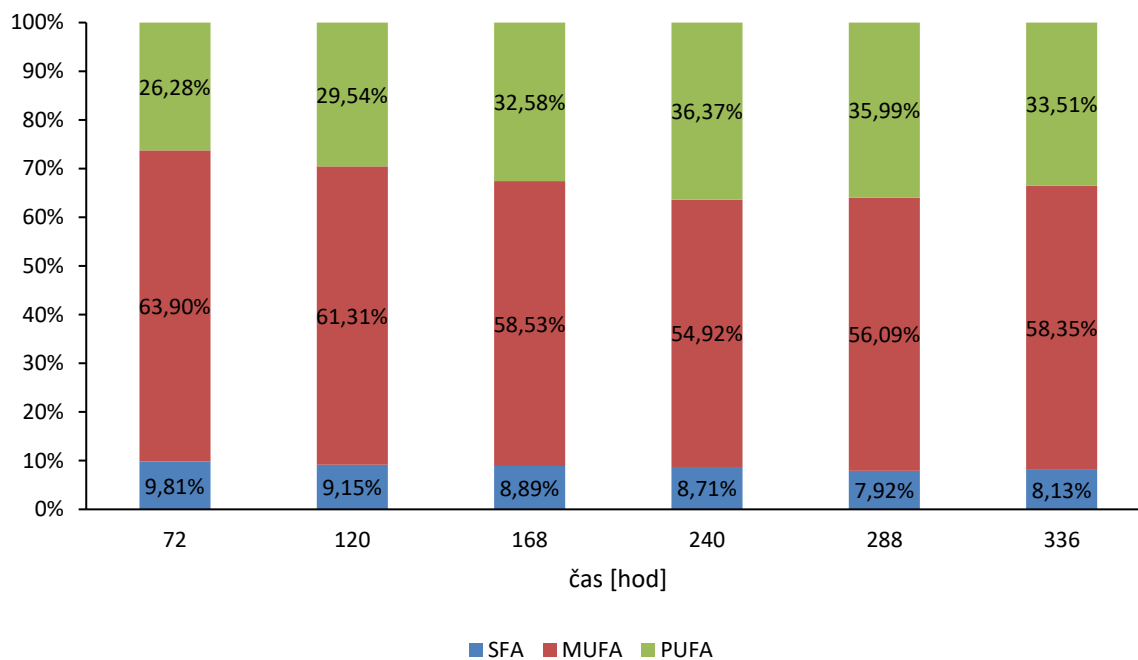
[54] Technology - Chemical Technology; Findings from University of Bath Provide New Insights into Chemical Technology (The Role of Temperature, Ph and Nutrition In Process Development of the Unique Oleaginous Yeast *Metschnikowia Pulcherrima*). *Health & Medicine Week* [online]. Atlanta: NewsRx, 2020 [cit. 2020-06-22]. ISSN 15316459. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/2357525280/>

[55] ABELN, Felix a Christopher J. CHUCK. Achieving a high-density oleaginous yeast culture: Comparison of four processing strategies using *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2019, **116**(12), 3200-3214. DOI: 10.1002/bit.27141. ISSN 0006-3592. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.27141>

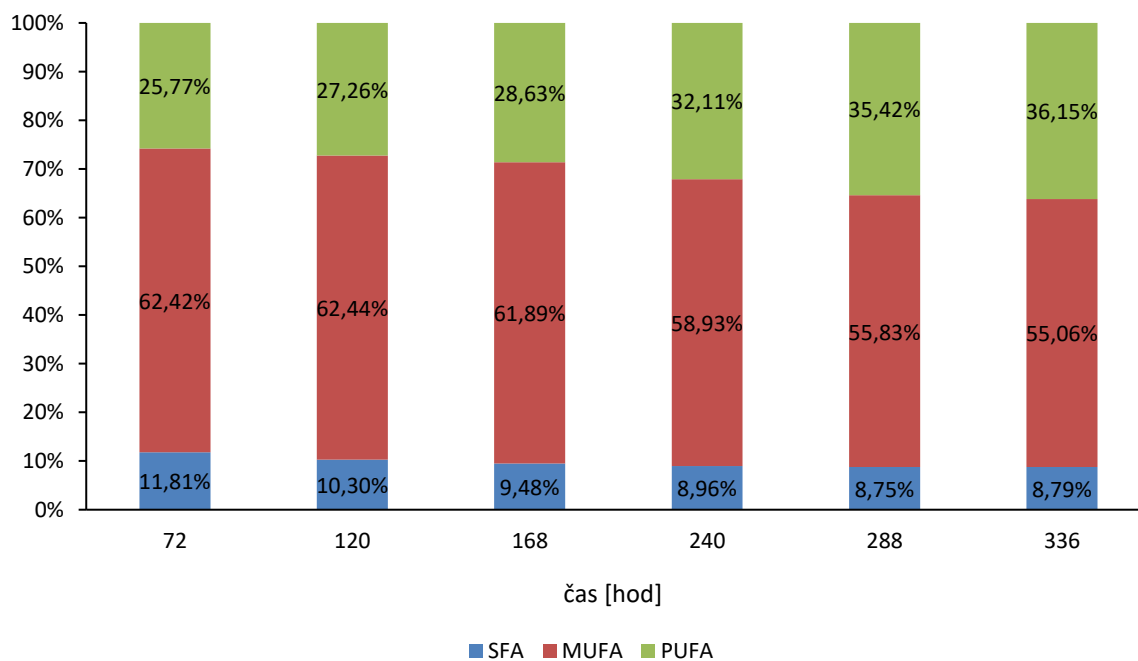
8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ATP	adenosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ER	endoplazmatické retikulum
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
RI	refraktometrický detektor
RNA	ribonukleová kyselina
SFA	nasycené mastné kyseliny
TAG	triacylglycerol
C14:0	kyselina myristová
C15:0	kyselina pentadecylová
C16:0	kyselina palmitová
C16:1	kyselina palmitoolejová
C17:1	kyselina heptadecenová
C18:0	kyselina stearová
C18:1c	kyselina olejová
C18:2c	kyselina linolová
C18:3d3	α -linolenová kyselina
C20:2	kyselina eikosadienová
C24:0	kyselina lignocerová
C22:6	kyselina dokosahexaenová

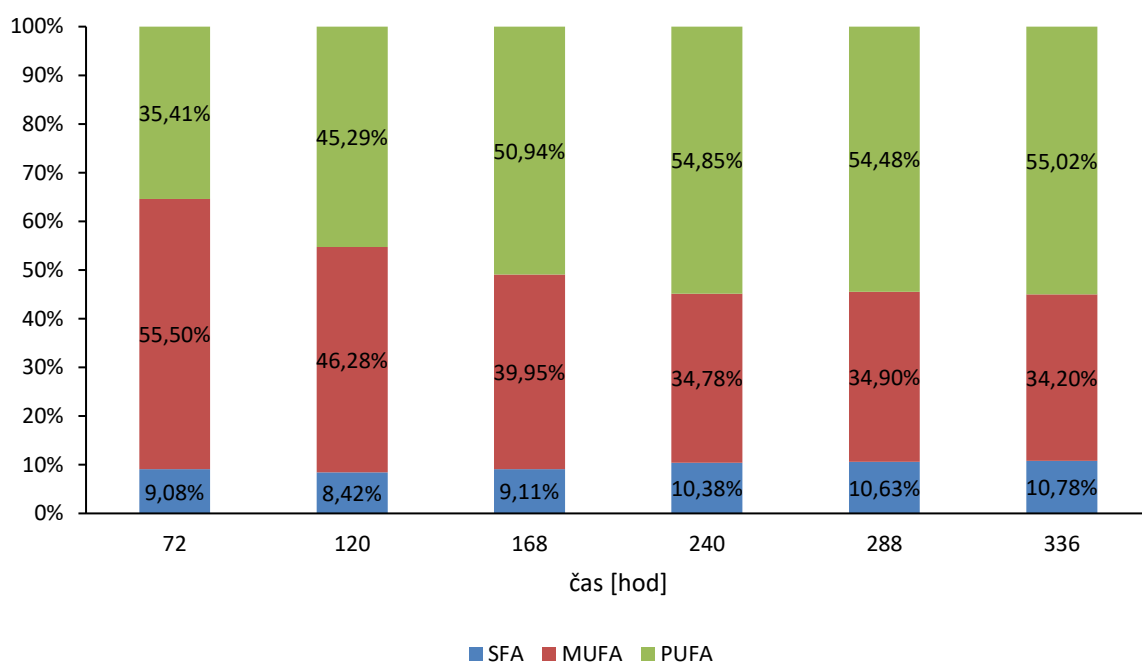
9 PŘÍLOHY



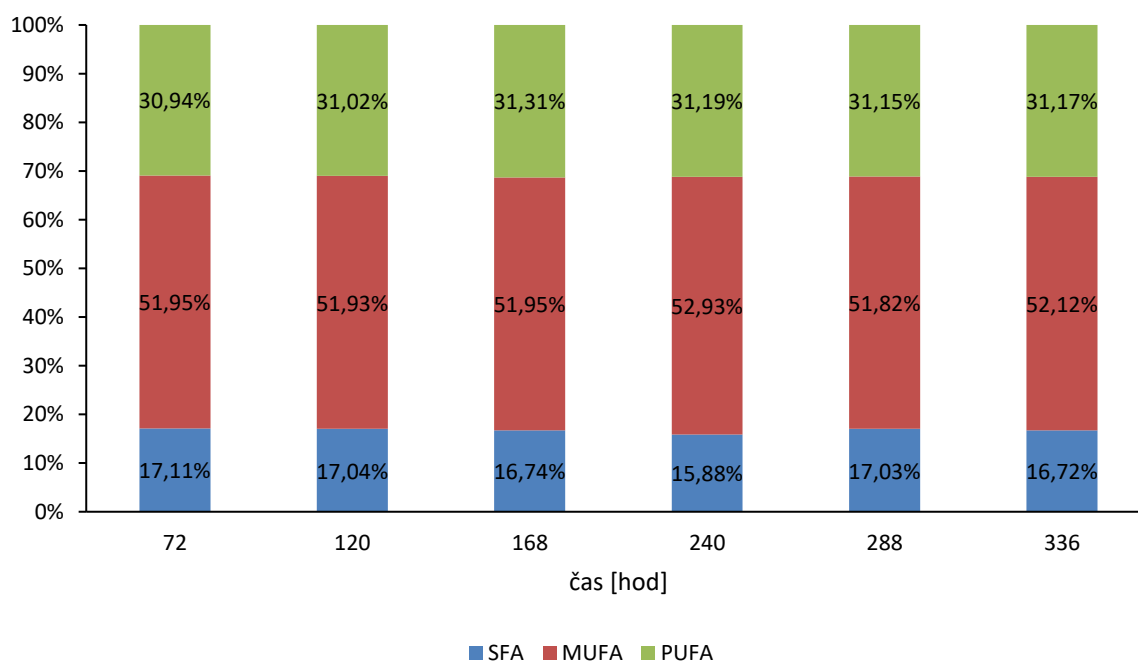
Obr. 28: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. andauensis* 129 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 8 °C



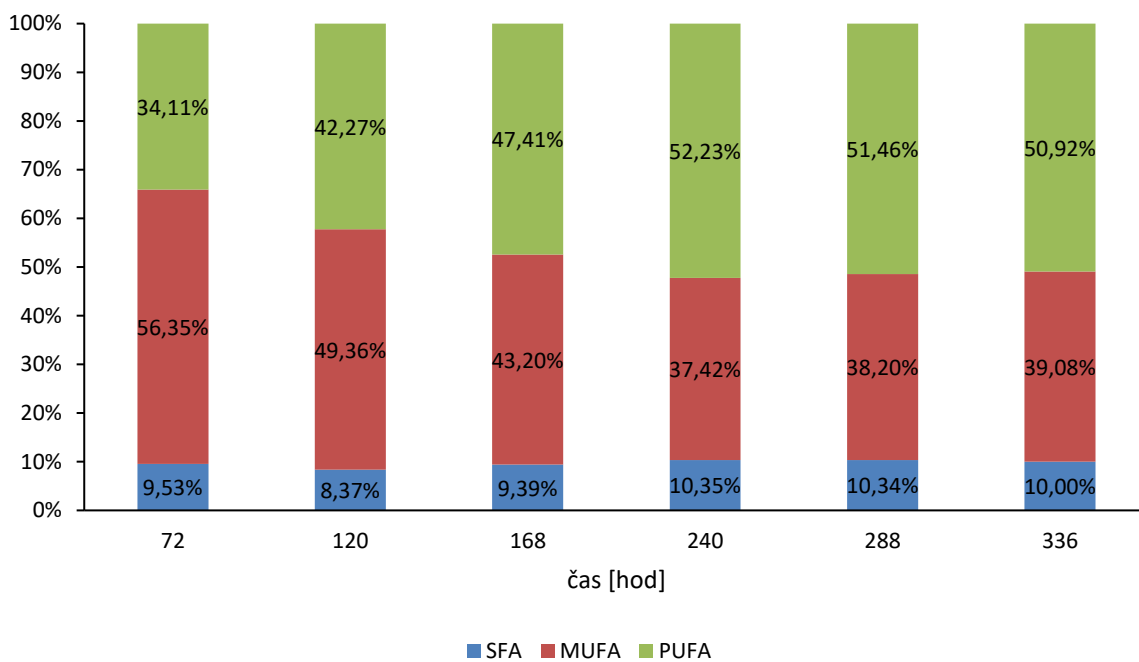
Obr. 29: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. andauensis* 129 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 8 °C



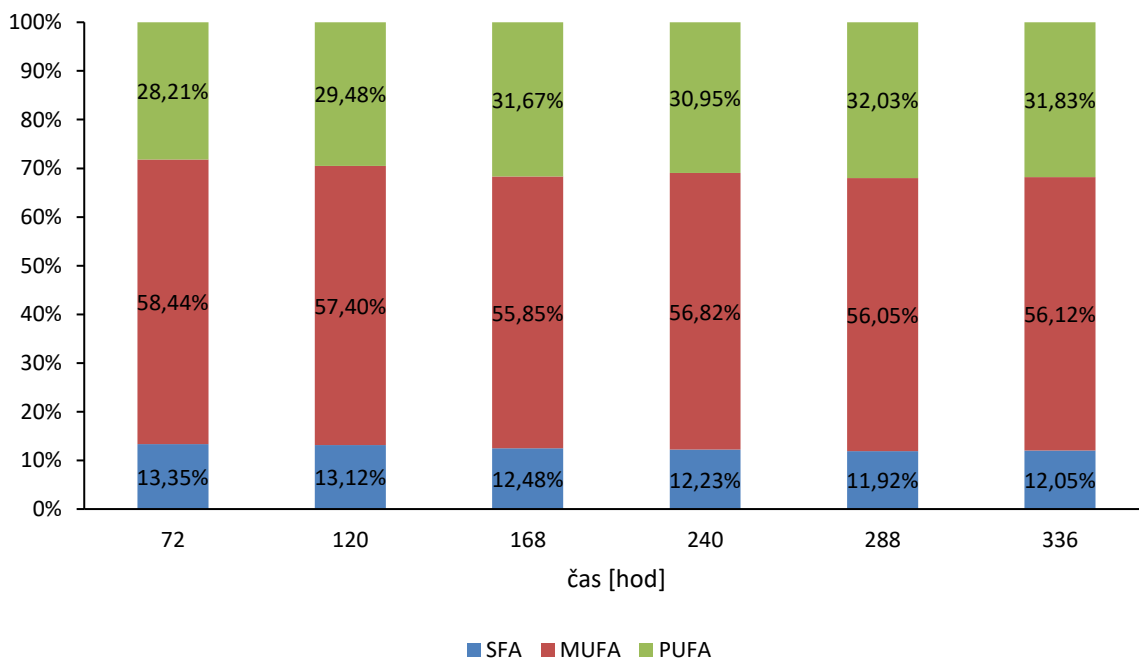
Obr. 30: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. pulcherrima* 145 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 8 °C



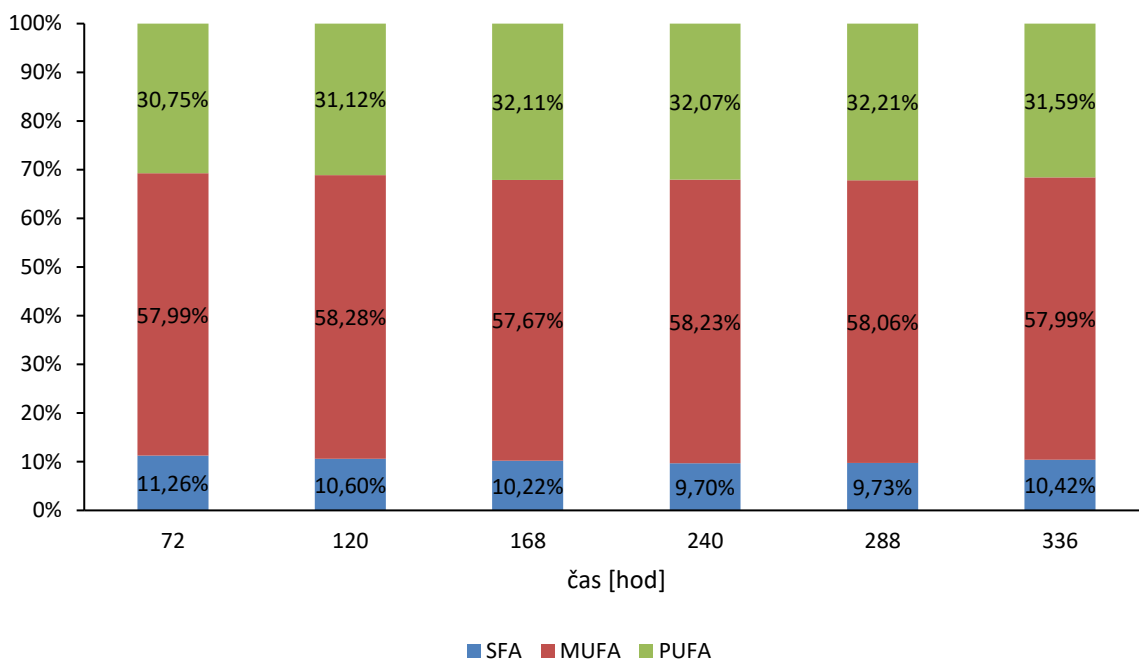
Obr. 31: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. pulcherrima* 145 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 8 °C



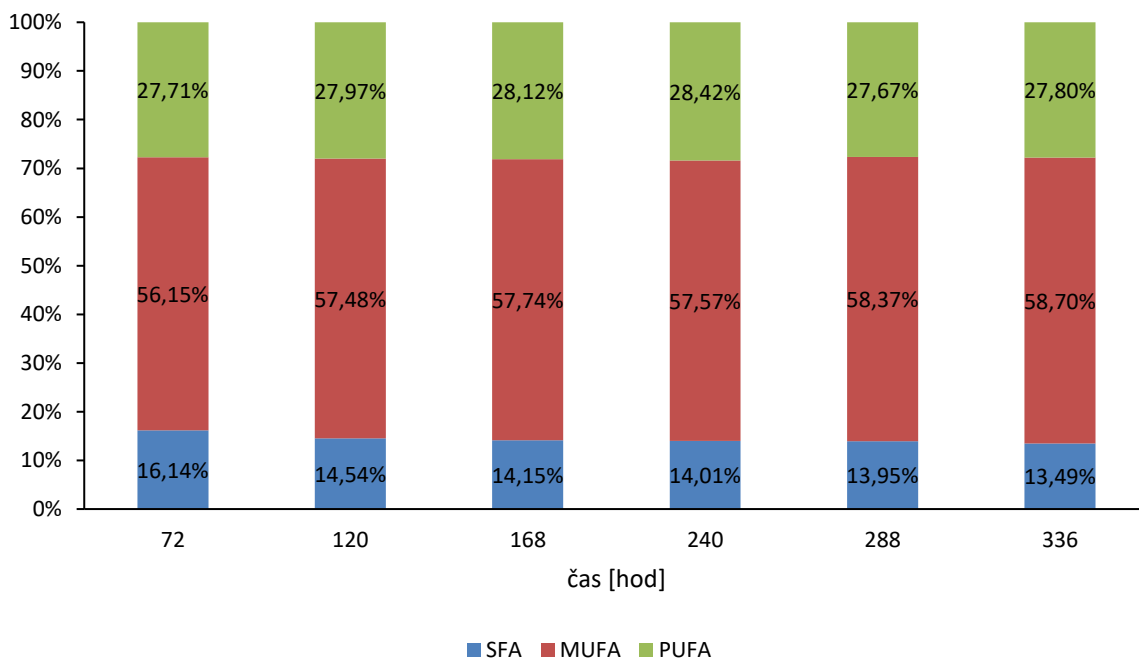
Obr. 32: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. pulcherrima* 147 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 8 °C



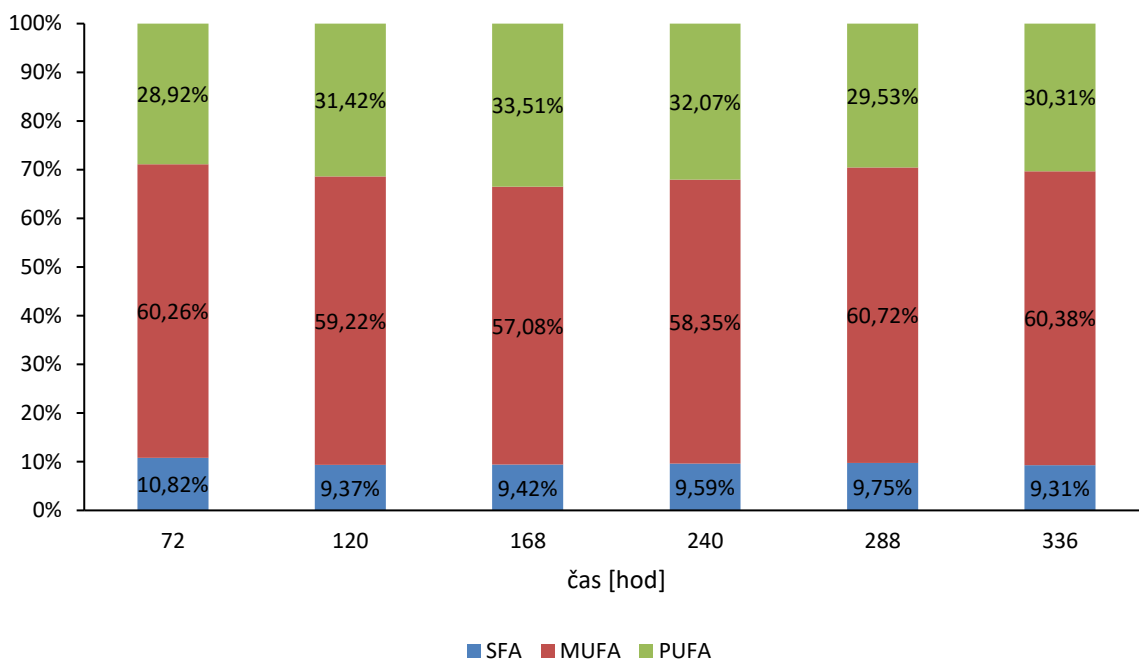
Obr. 33: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. pulcherrima* 147 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 8 °C



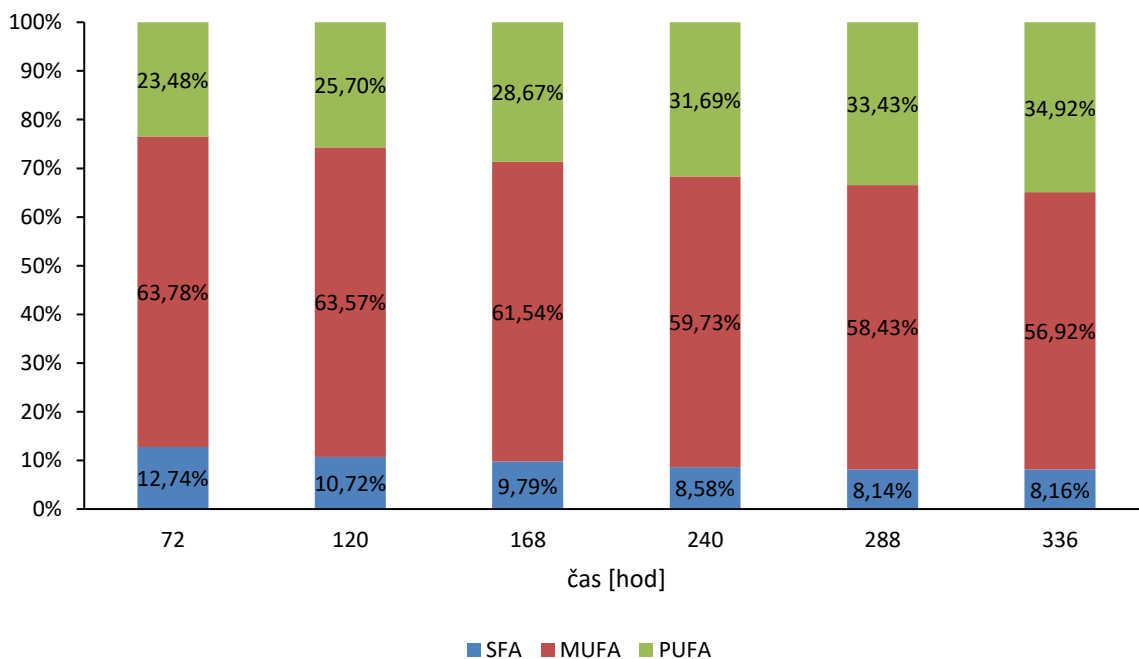
Obr. 34: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. pulcherrima* 149 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 8 °C



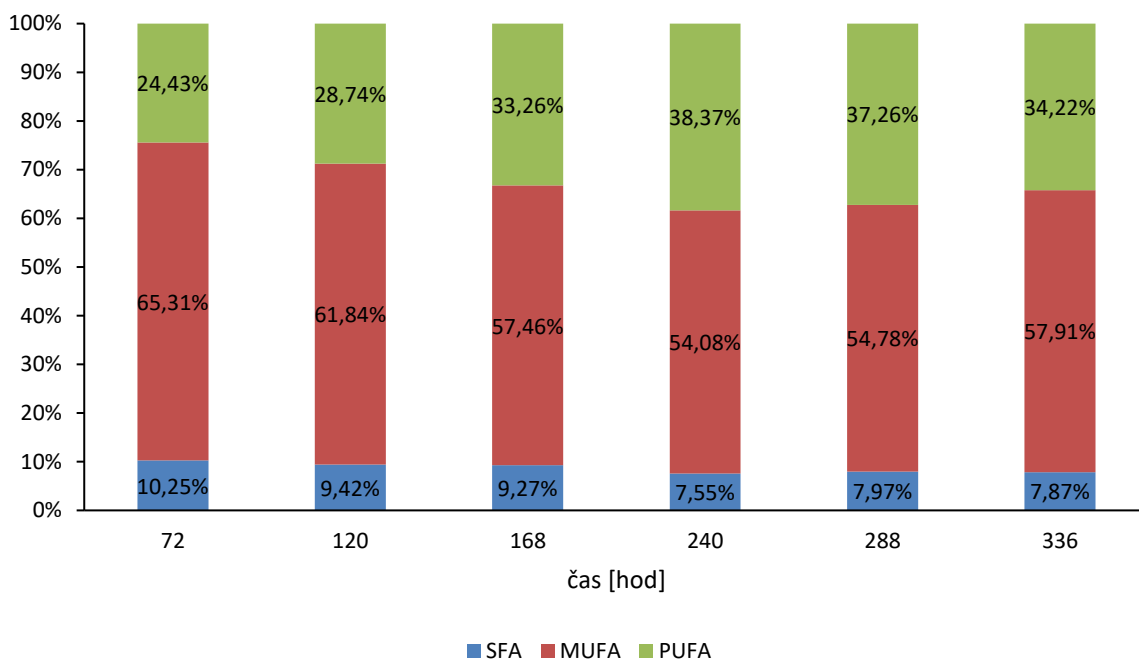
Obr. 35: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. pulcherrima* 149 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 8 °C



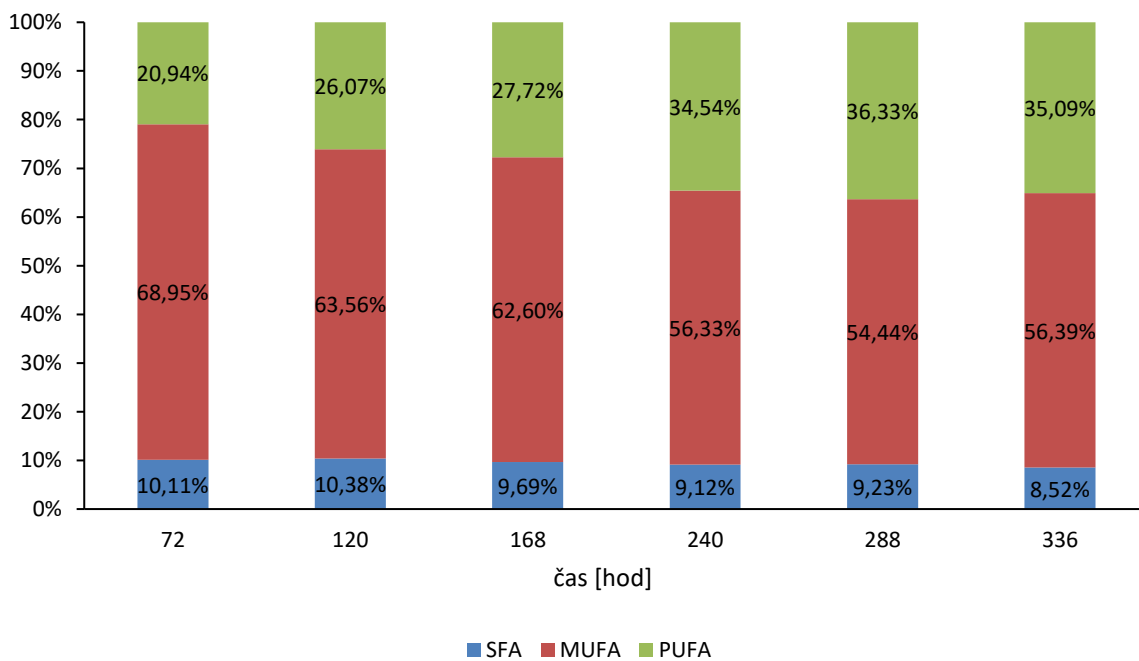
Obr. 36: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. chrysoperlae* 1158 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 8 °C



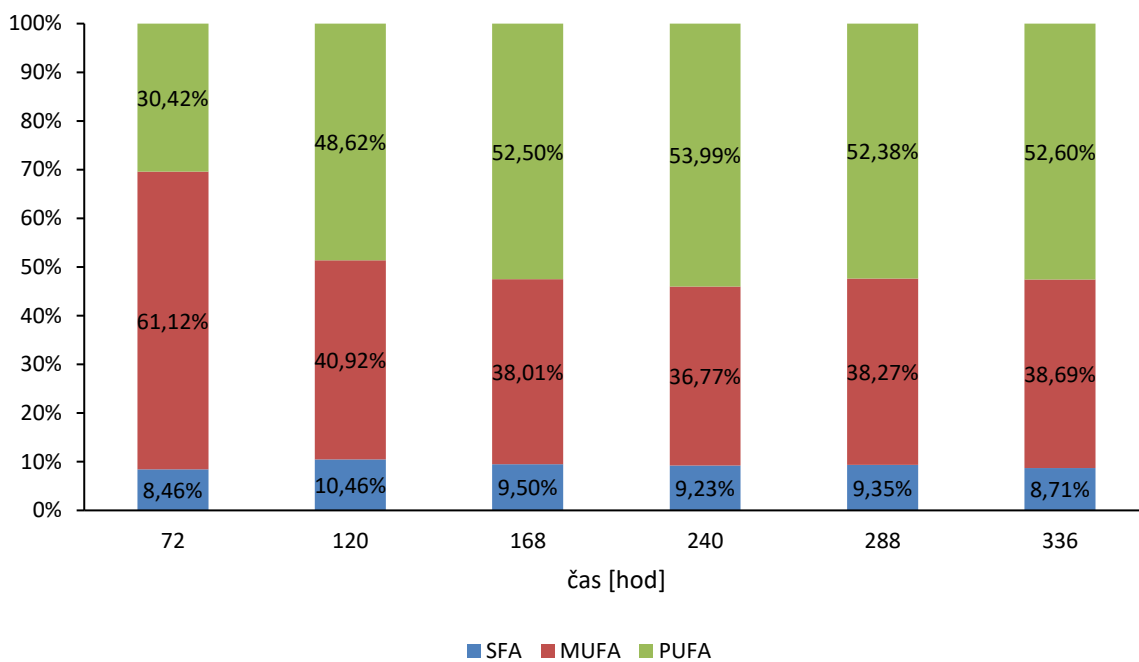
Obr. 37: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. chrysoperlae* 1158 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 8 °C



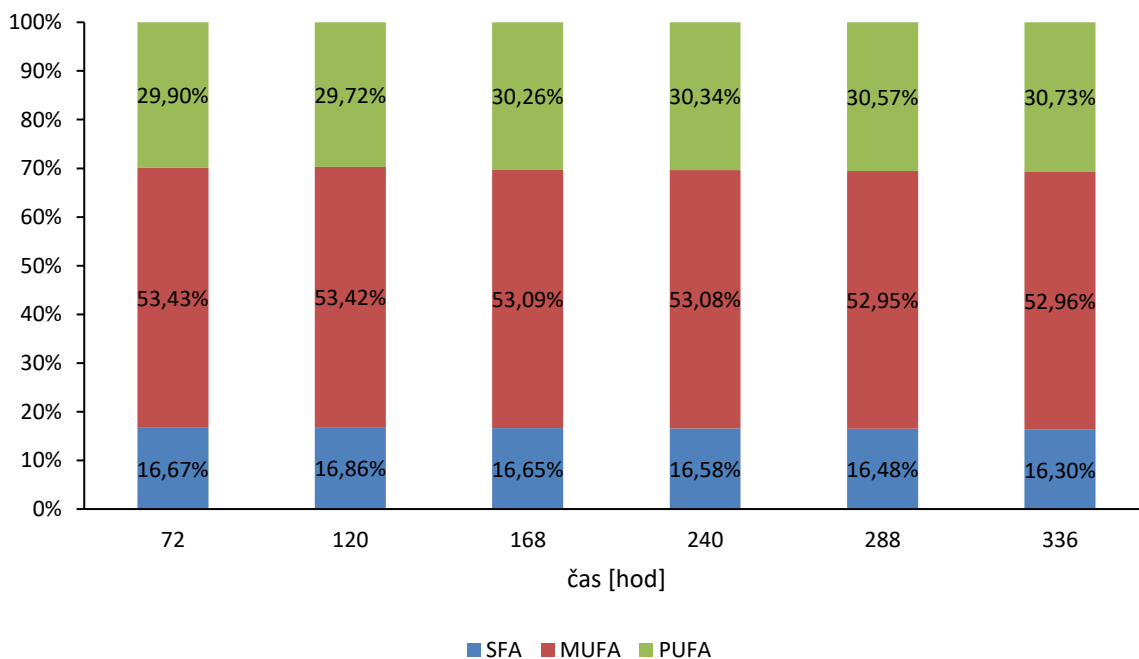
Obr. 381: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. andauensis* 129 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 11 °C



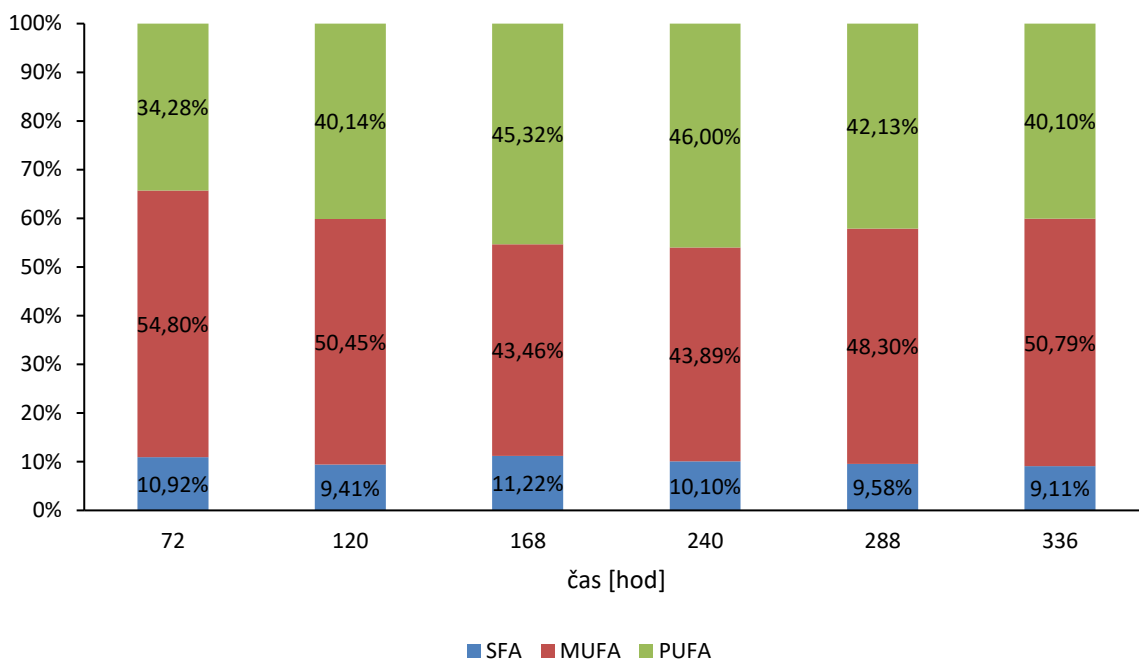
Obr. 39: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. andauensis* 129 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 11 °C



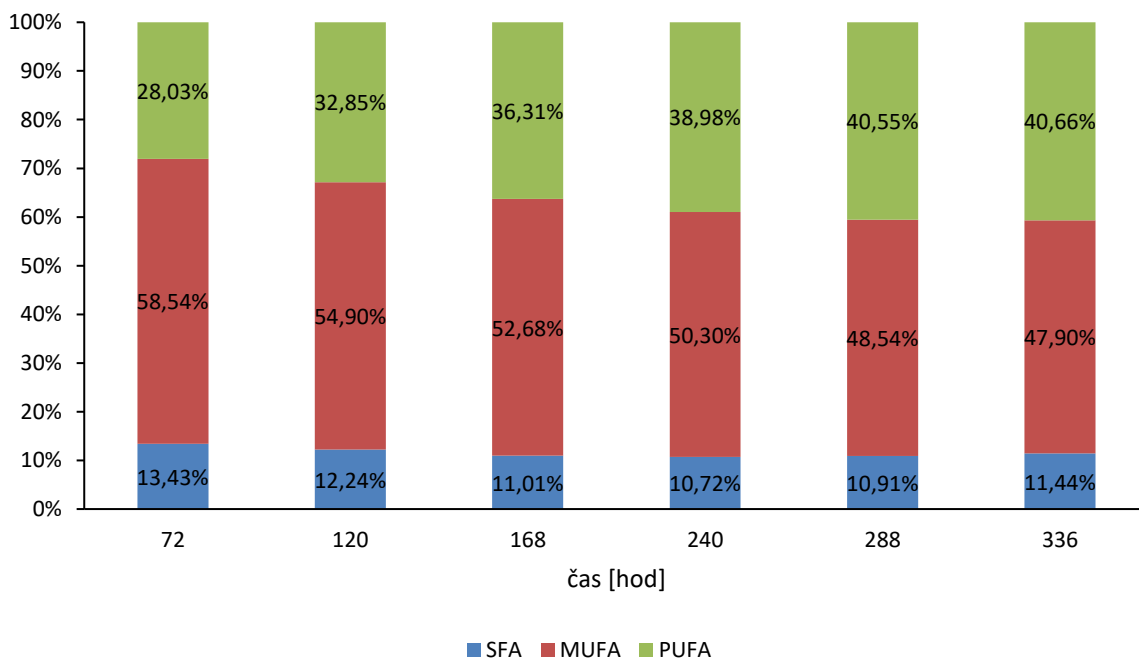
Obr. 40: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. pulcherrima* 145 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 11 °C



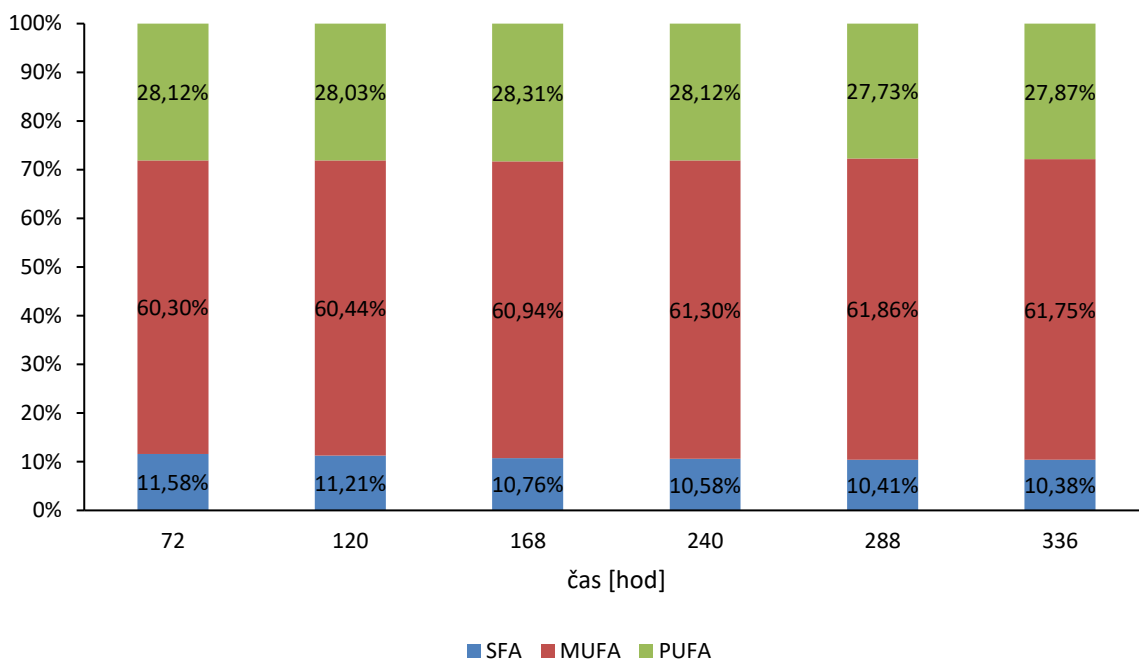
Obr. 41: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. pulcherrima* 145 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 11 °C



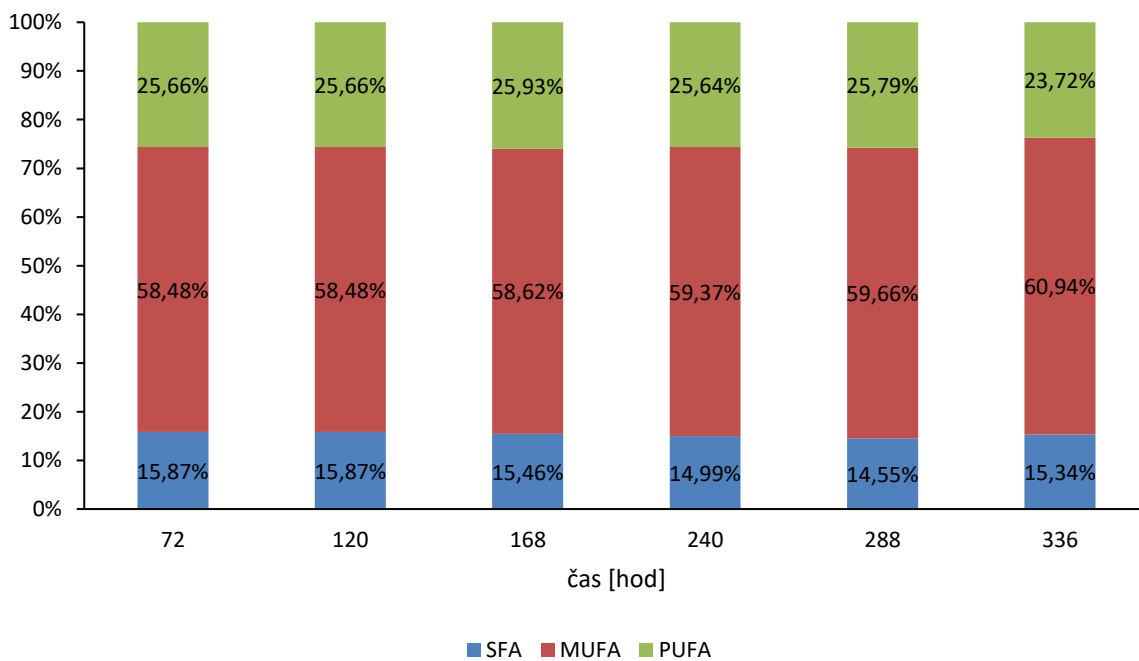
Obr. 42: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. pulcherrima* 147 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 11 °C



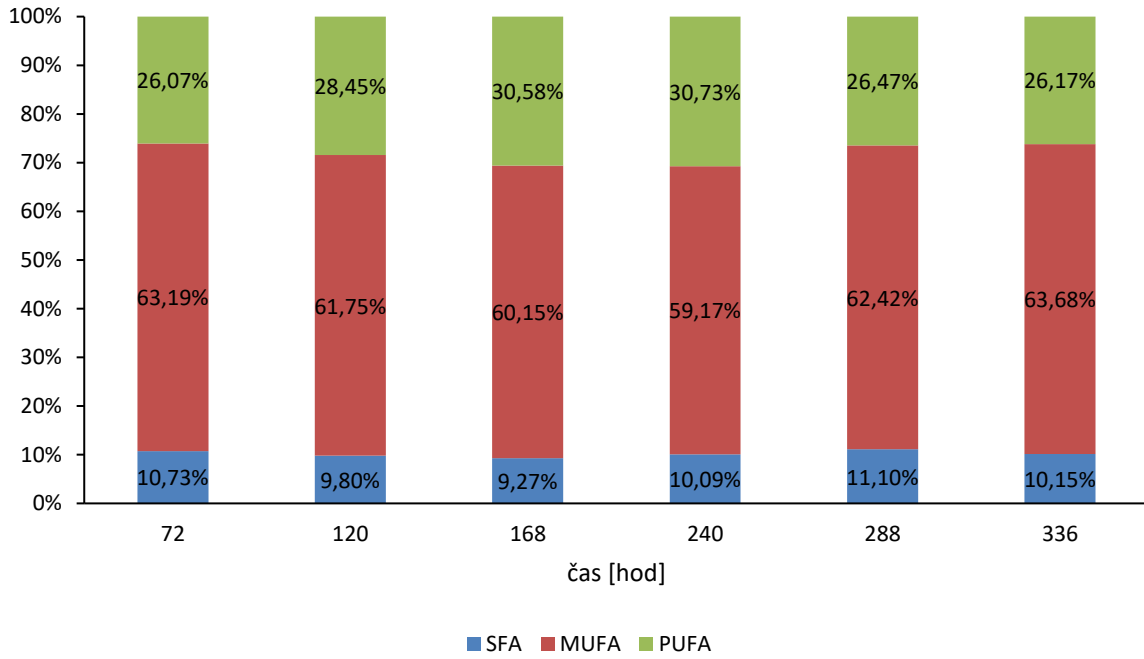
Obr. 43: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. pulcherrima* 147 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 11 °C



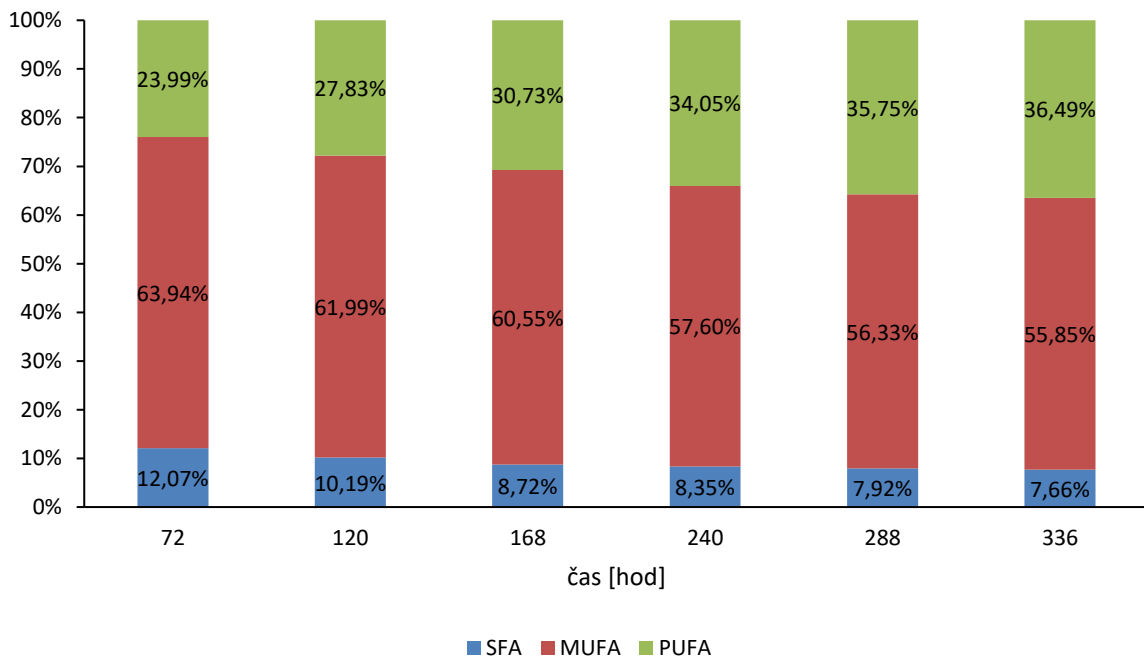
Obr. 44: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. pulcherrima* 149 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 11 °C



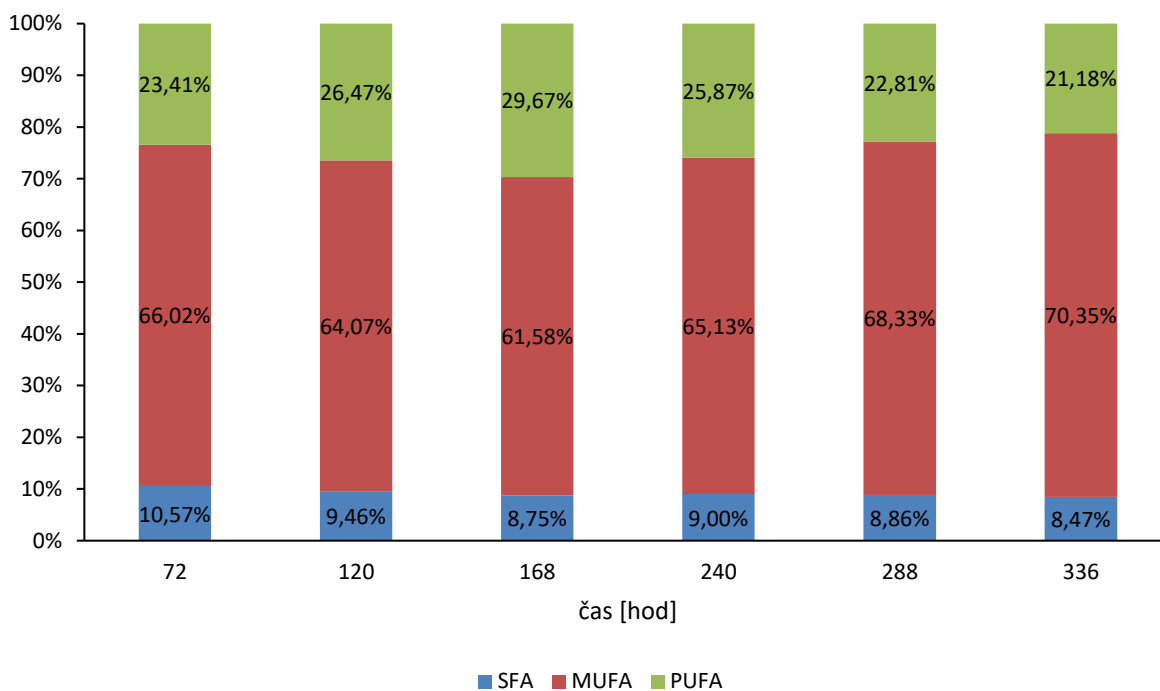
Obr. 45: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. pulcherrima* 149 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 11 °C



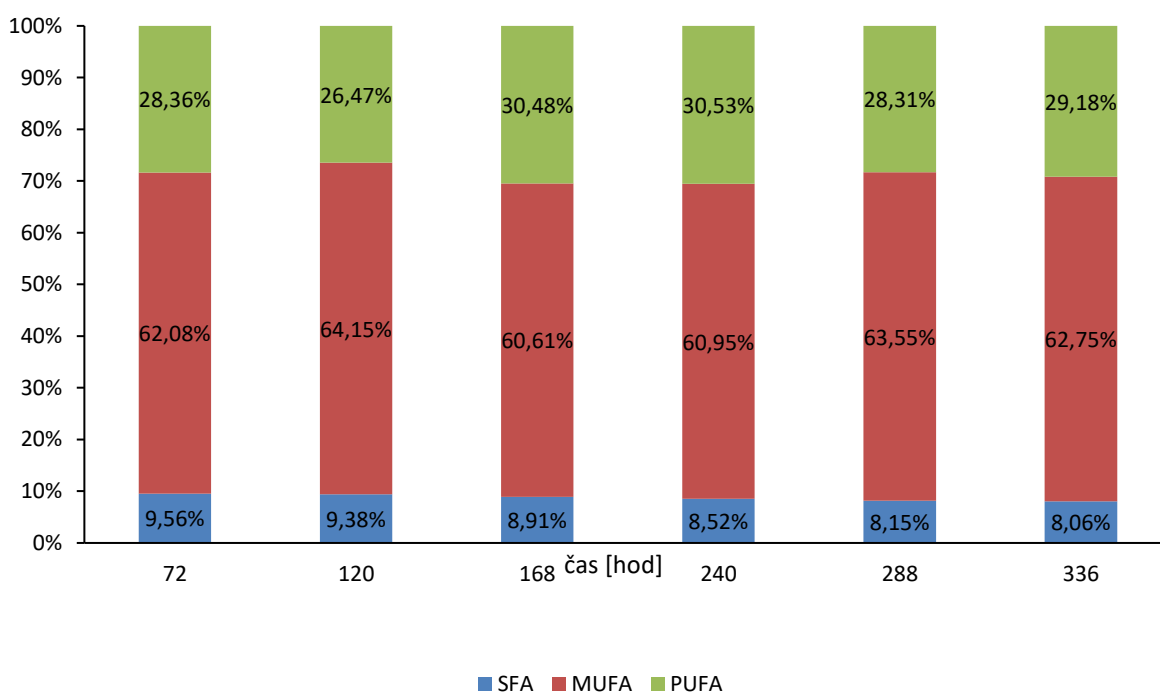
Obr. 46: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. chrysoperlae* 1158 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 11 °C



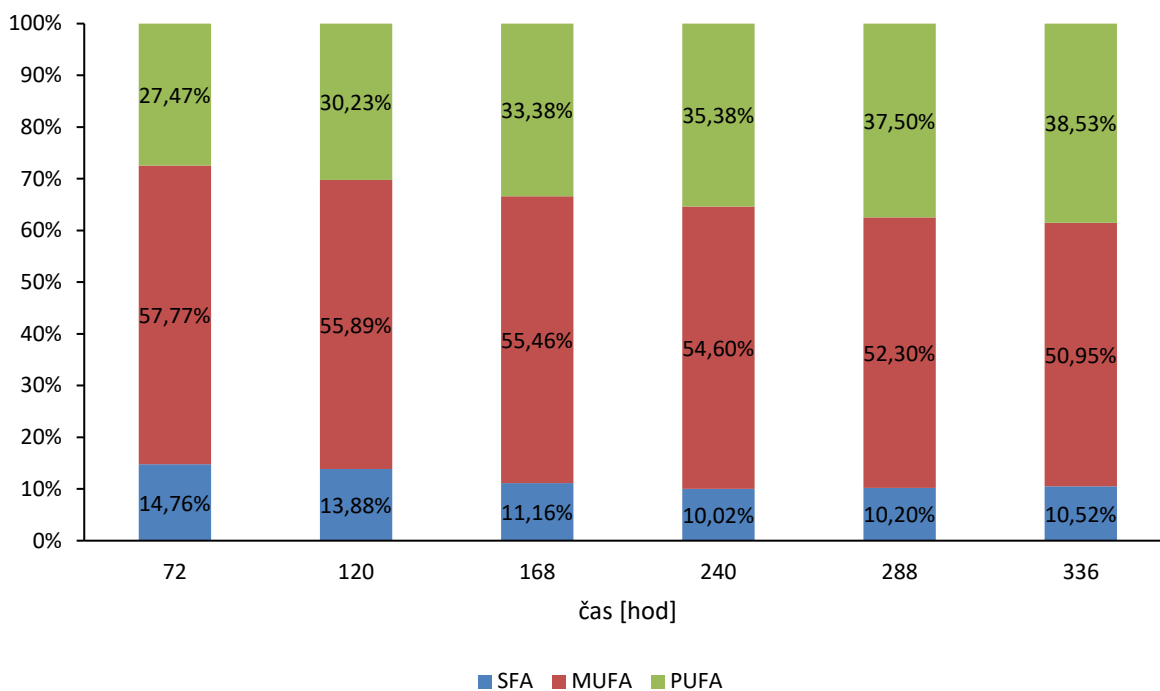
Obr. 47: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. chrysoperlae* 1158 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 11 °C



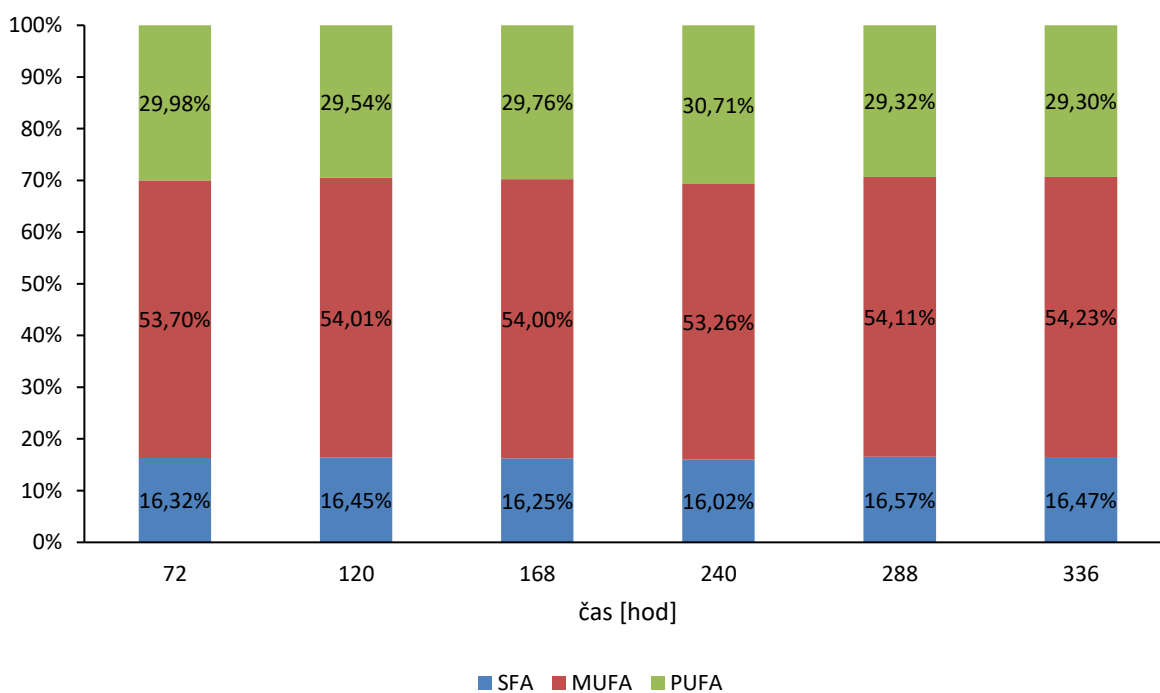
Obr. 48: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. andauensis* 129 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 15 °C



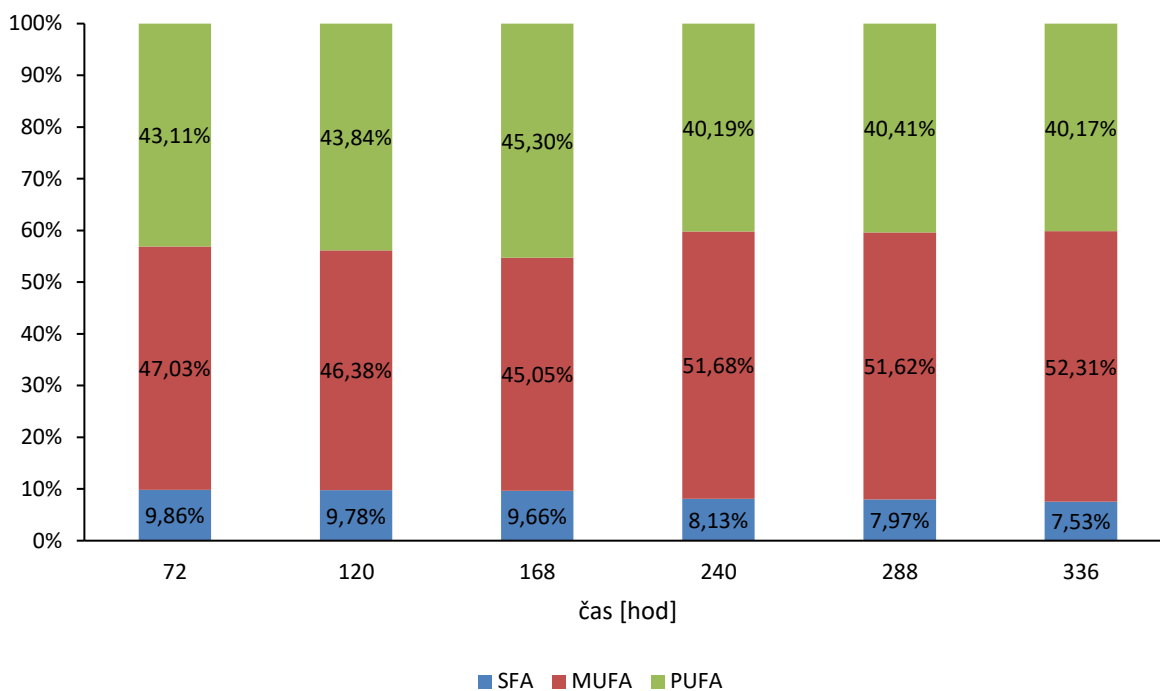
Obr. 49: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. andauensis* 129 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 15 °C



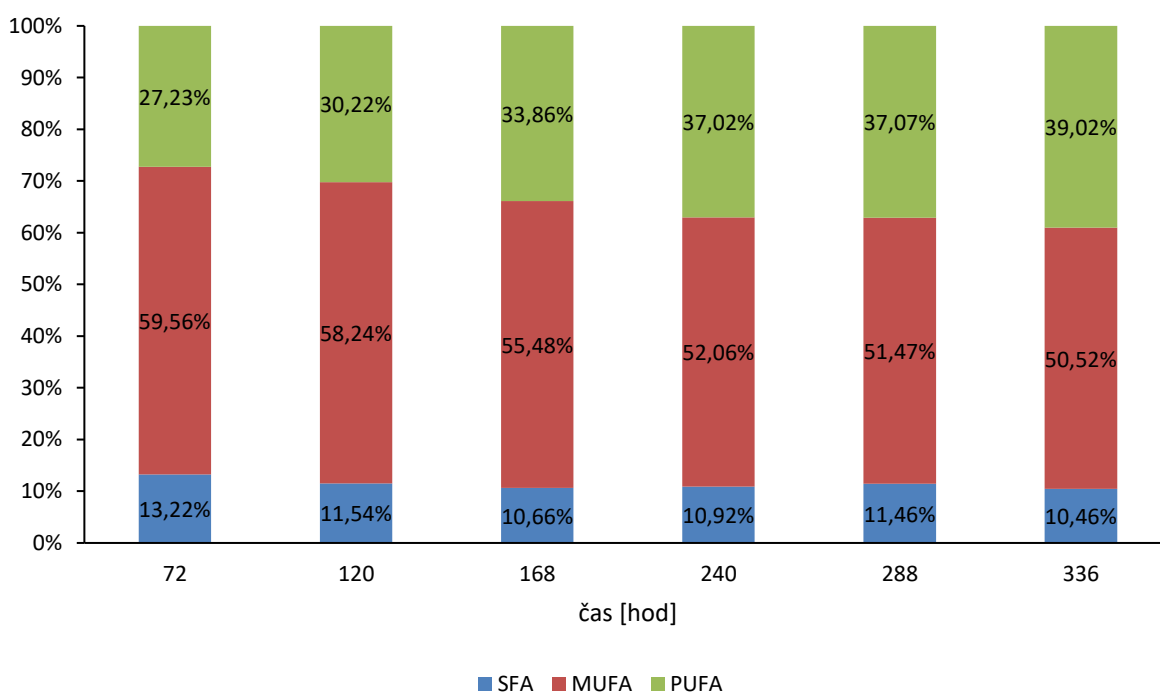
Obr. 50: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. pulcherrima* 145 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 15 °C



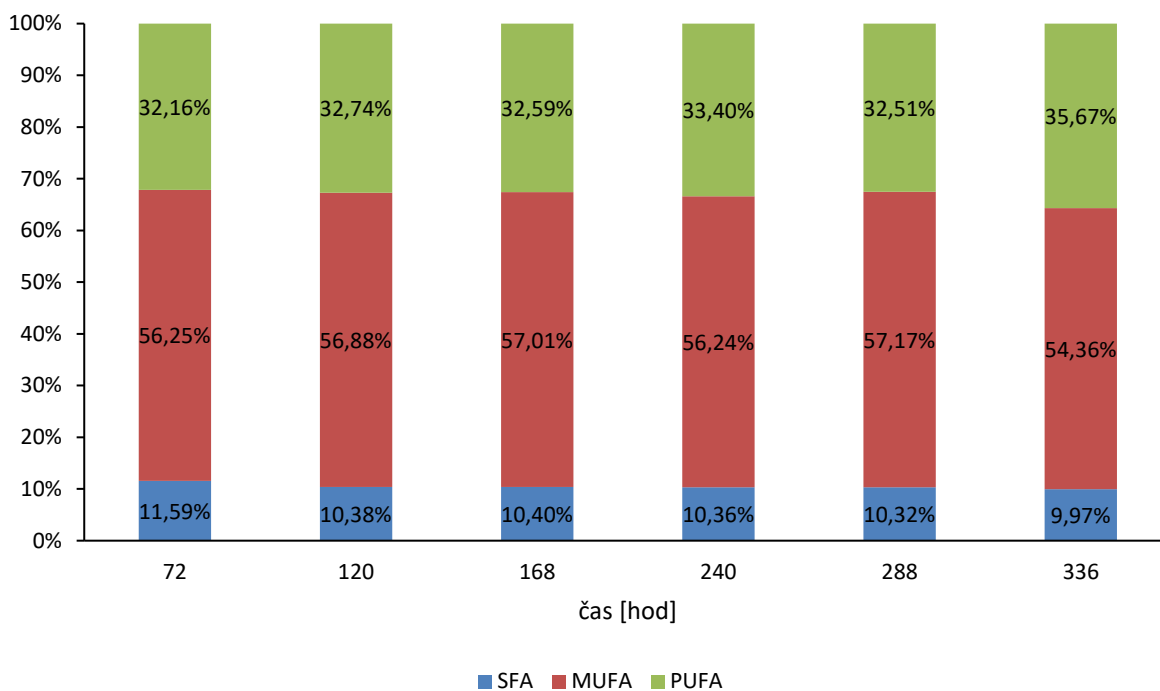
Obr. 51: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. pulcherrima* 145 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 15 °C



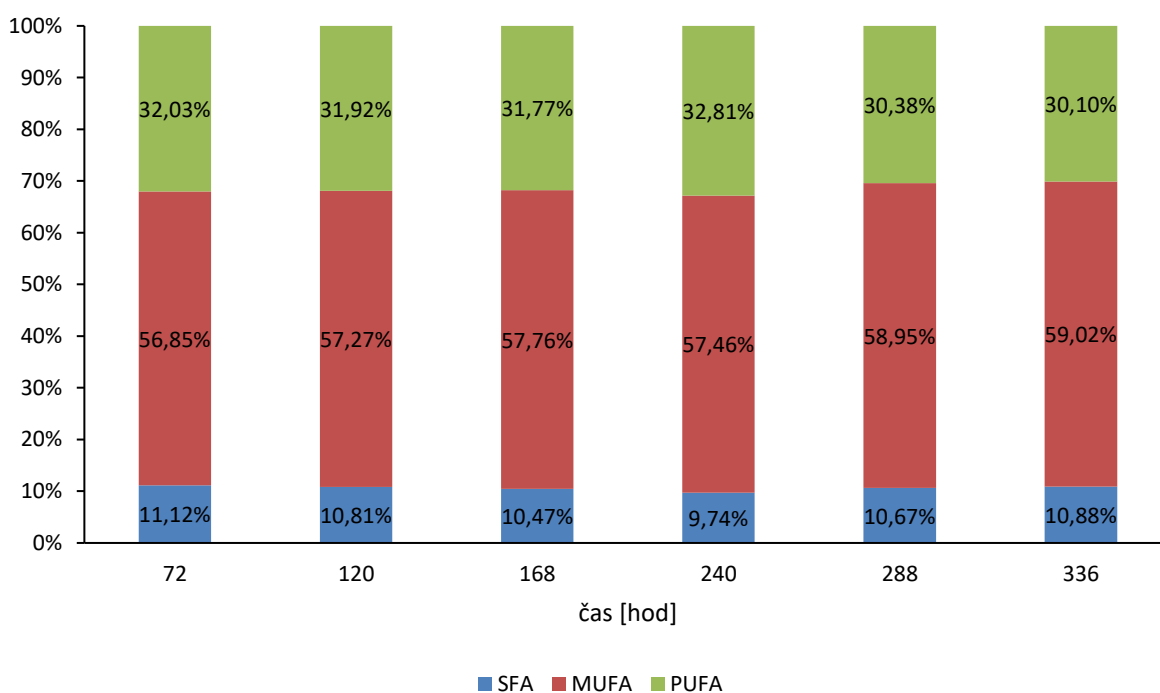
Obr. 52: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. pulcherrima* 147 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 15 °C



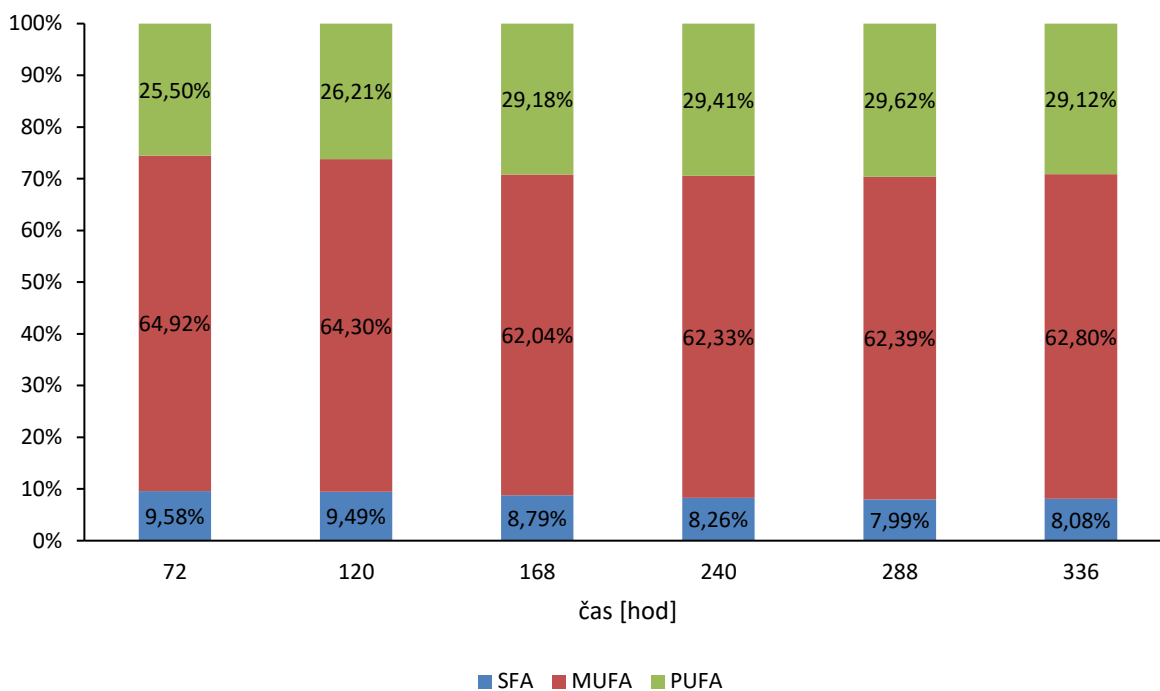
Obr. 53: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. pulcherrima* 147 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 15 °C



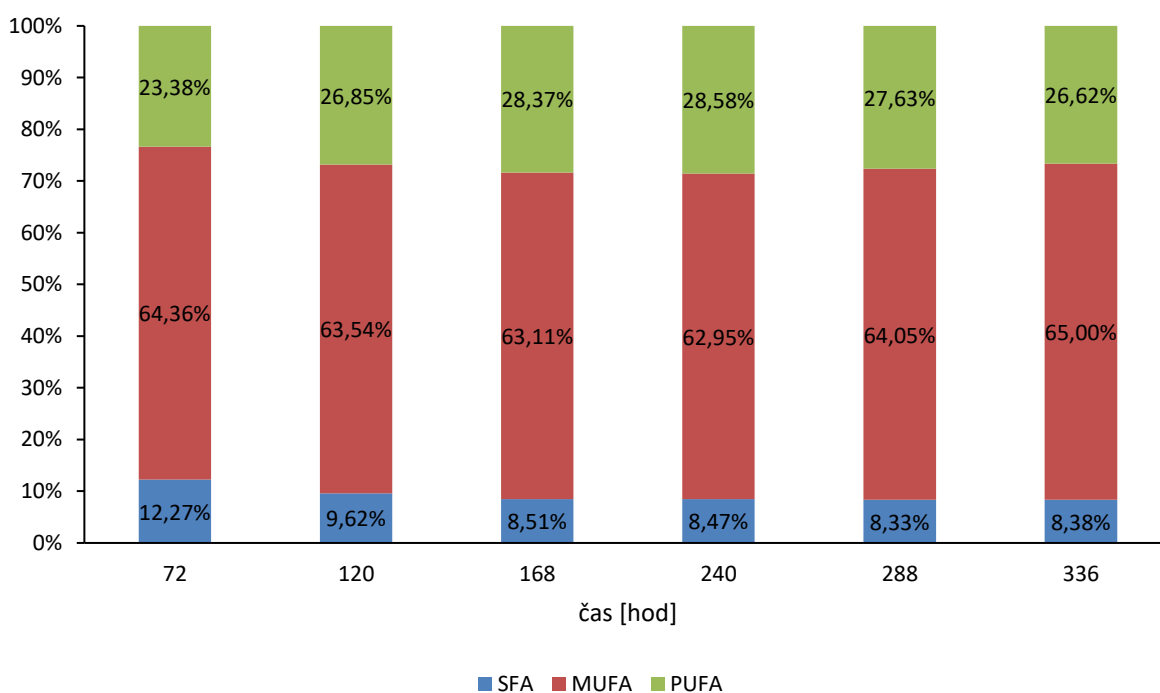
Obr. 54: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. pulcherrima* 149 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 15 °C



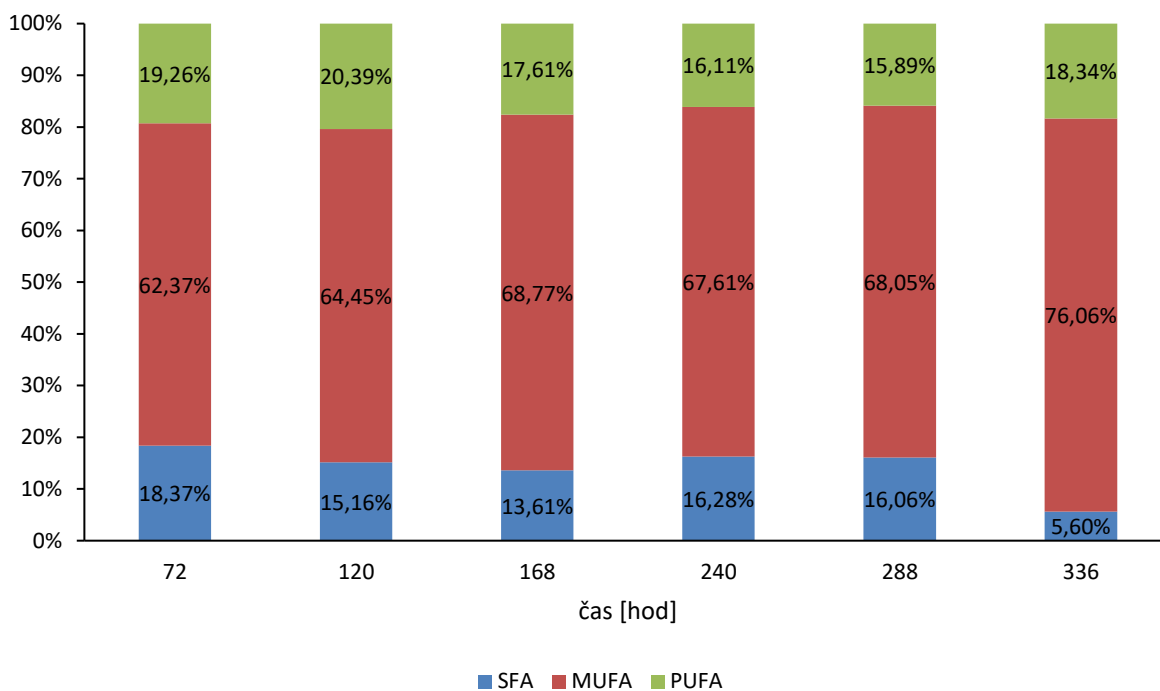
Obr. 55: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. pulcherrima* 149 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 15 °C



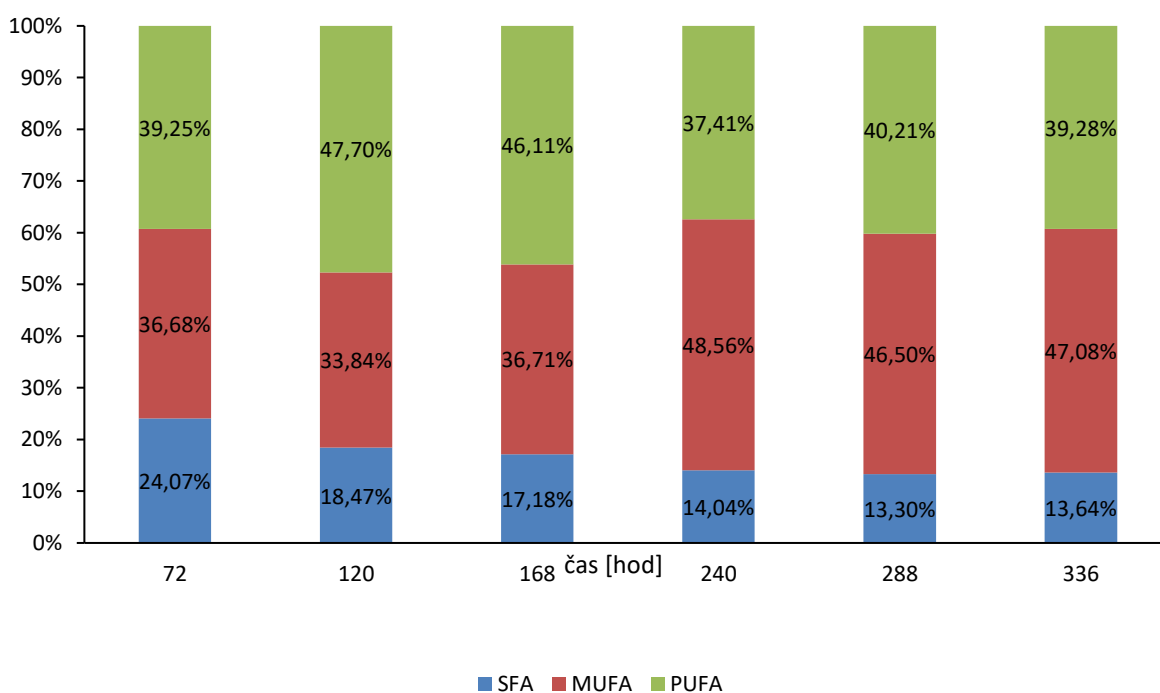
Obr. 56: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. chrysoperlae* 1158 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 15 °C



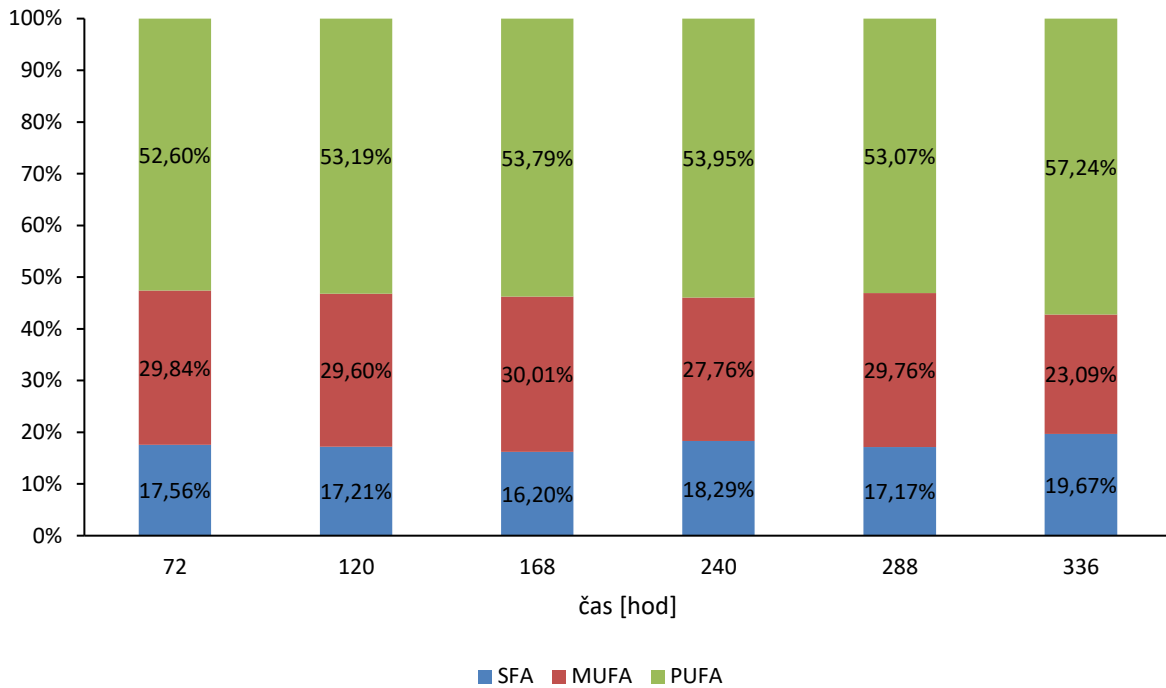
Obr. 57: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. chrysoperlae* 1158 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 15 °C



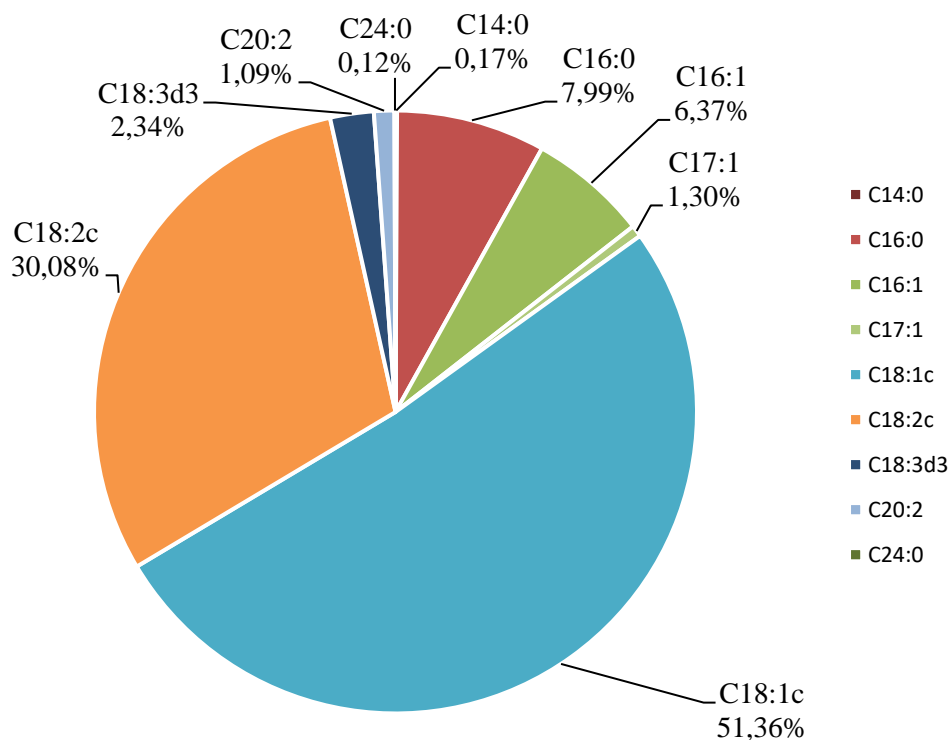
Obr. 58: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. chrysoperlae* 1158 při růstu na médiu obsahujícím odpadní tuk a teplotě 11 °C



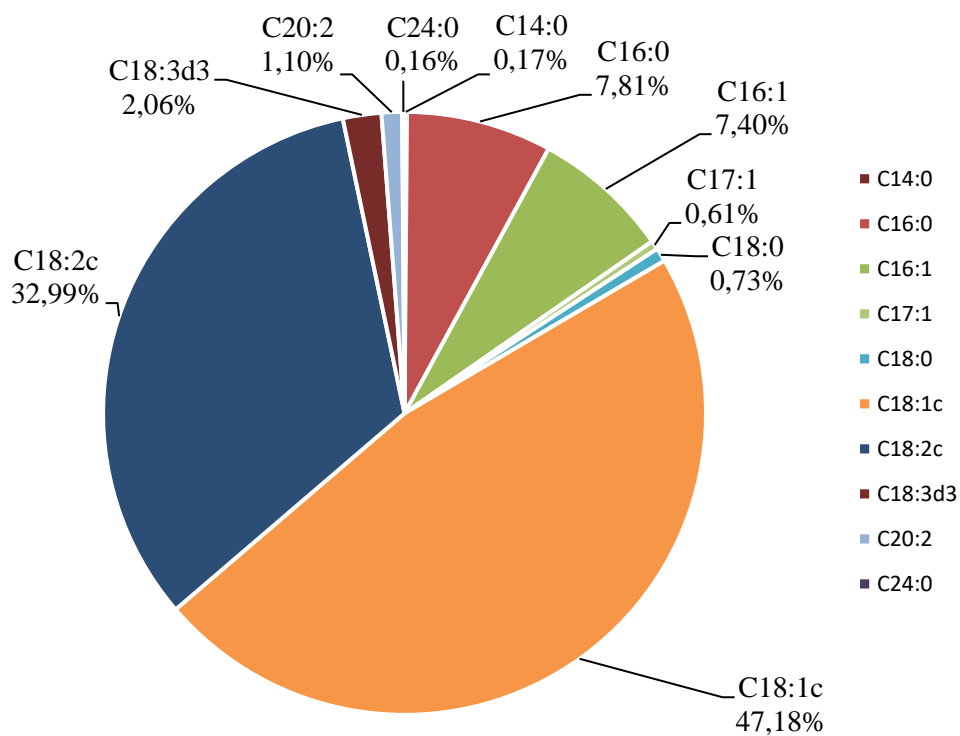
Obr. 59: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. chrysoperlae* 1158 při růstu na médiu obsahujícím kávu a teplotě 11 °C



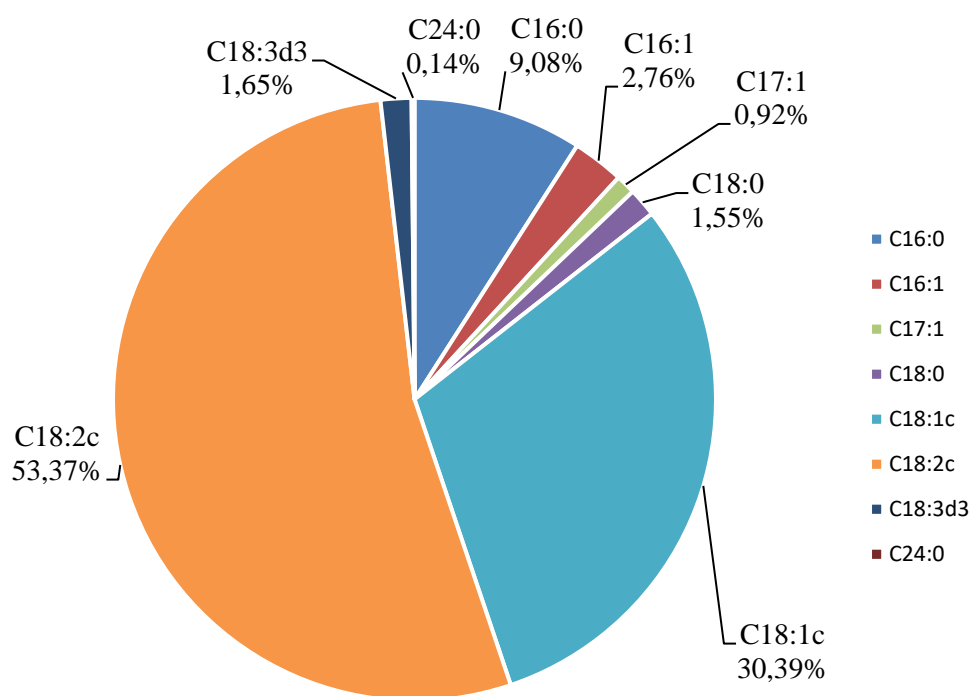
Obr. 60: Změna nasycenosti mastných kyselin v čase u kmene *M. chrysoperlae* 1158 při růstu na médiu obsahujícím glycerol a teplotě 11 °C



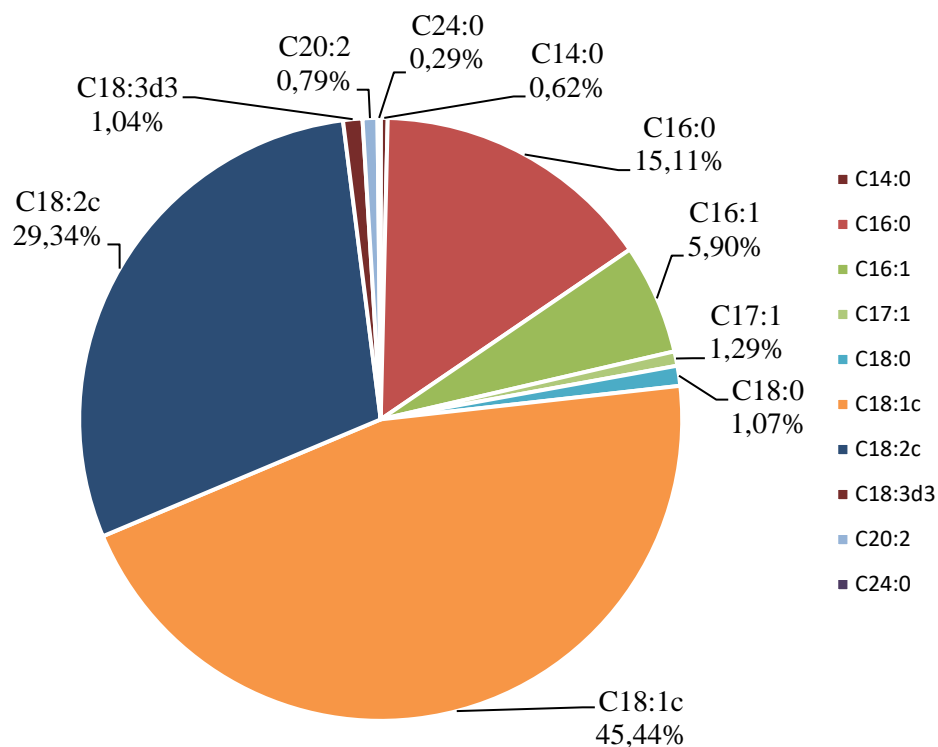
Obr. 61: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. andauensis* 129 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 8 °C



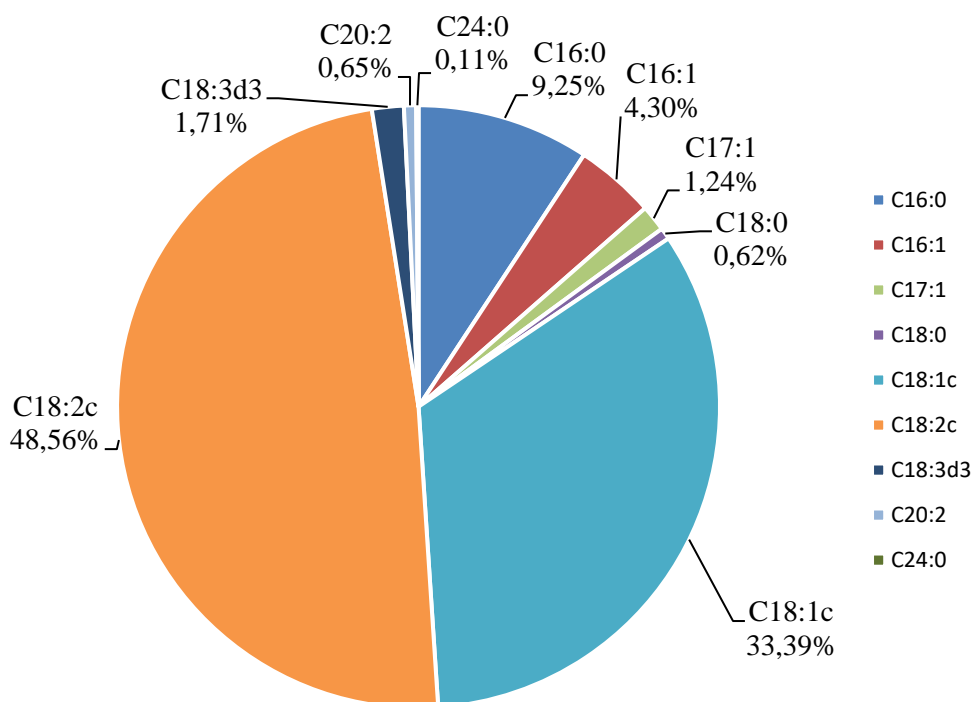
Obr. 62: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. andauensis* 129 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 8 °C



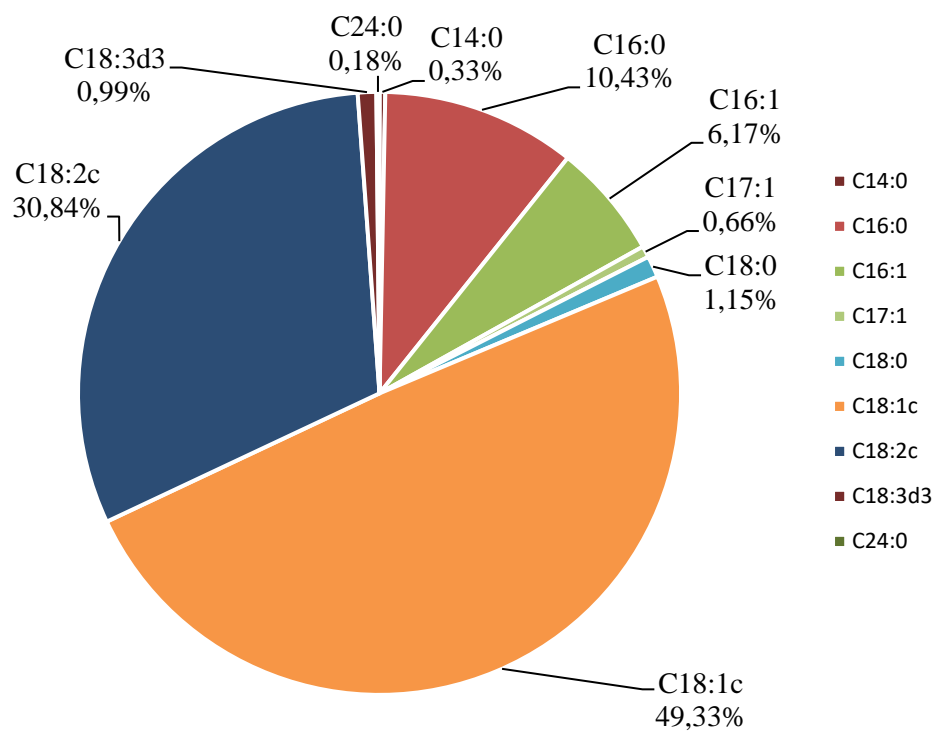
Obr. 63: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. pulcherrima* 145 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 8 °C



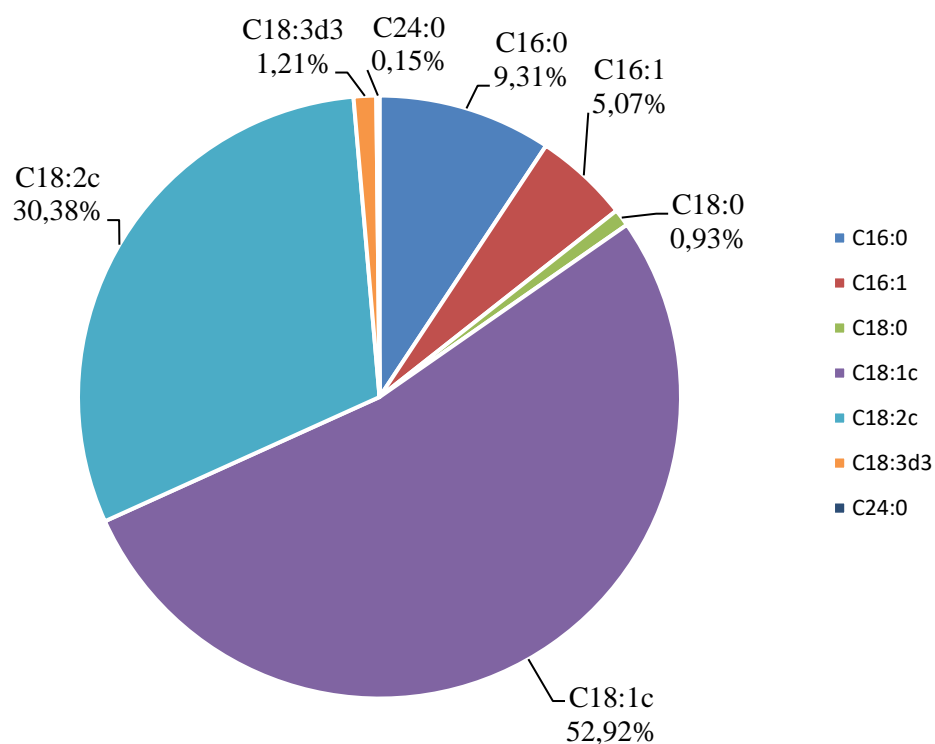
Obr. 64: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. pulcherrima* 145 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 8 °C



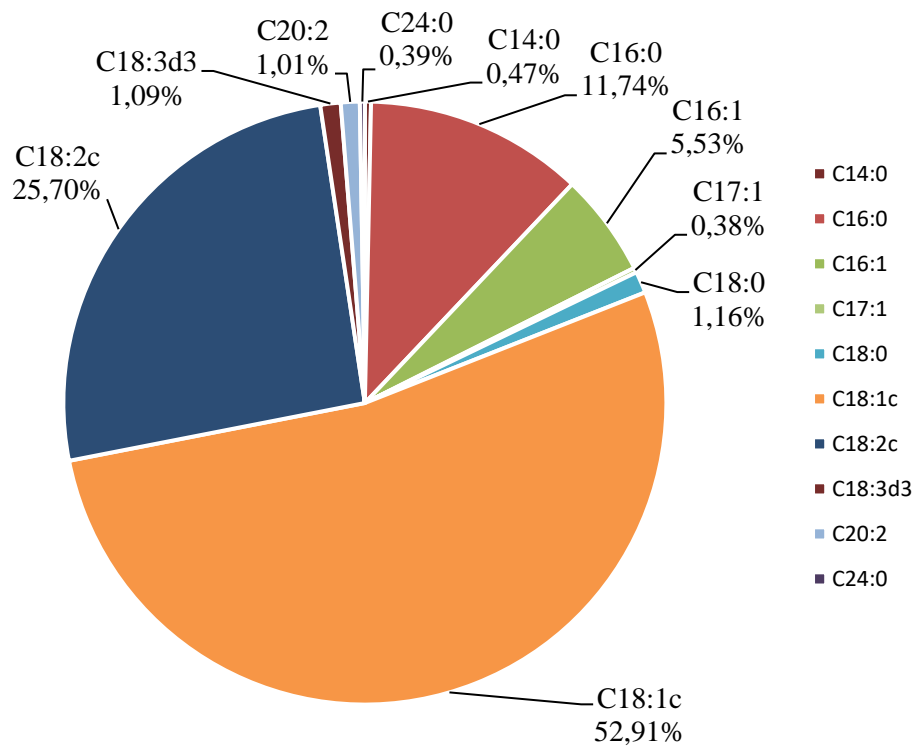
Obr. 65: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. pulcherrima* 147 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 8 °C



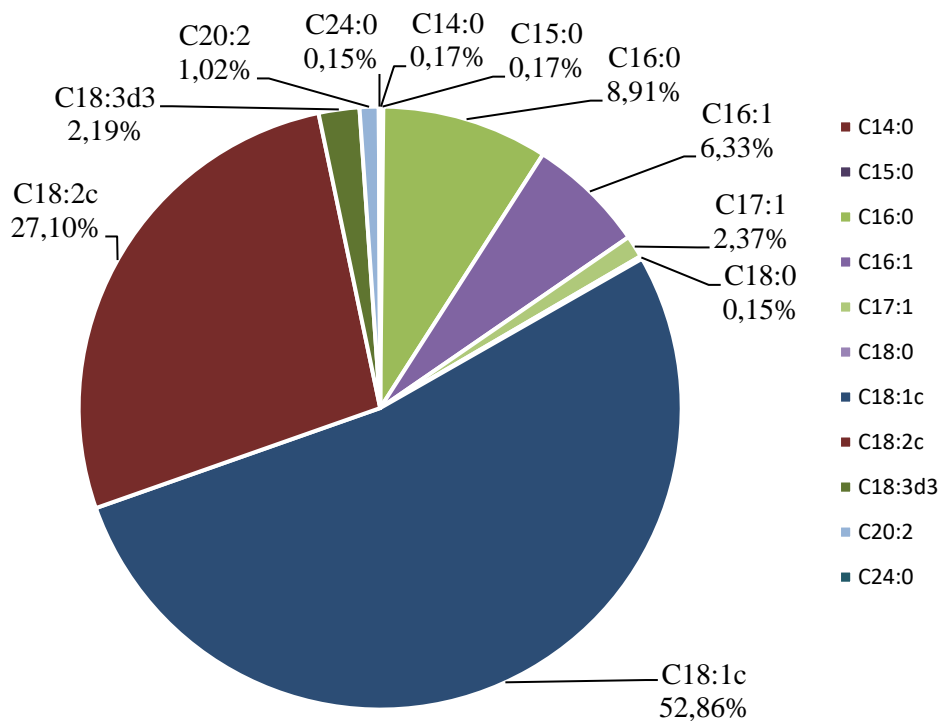
Obr. 66: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. pulcherrima* 147 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 8 °C



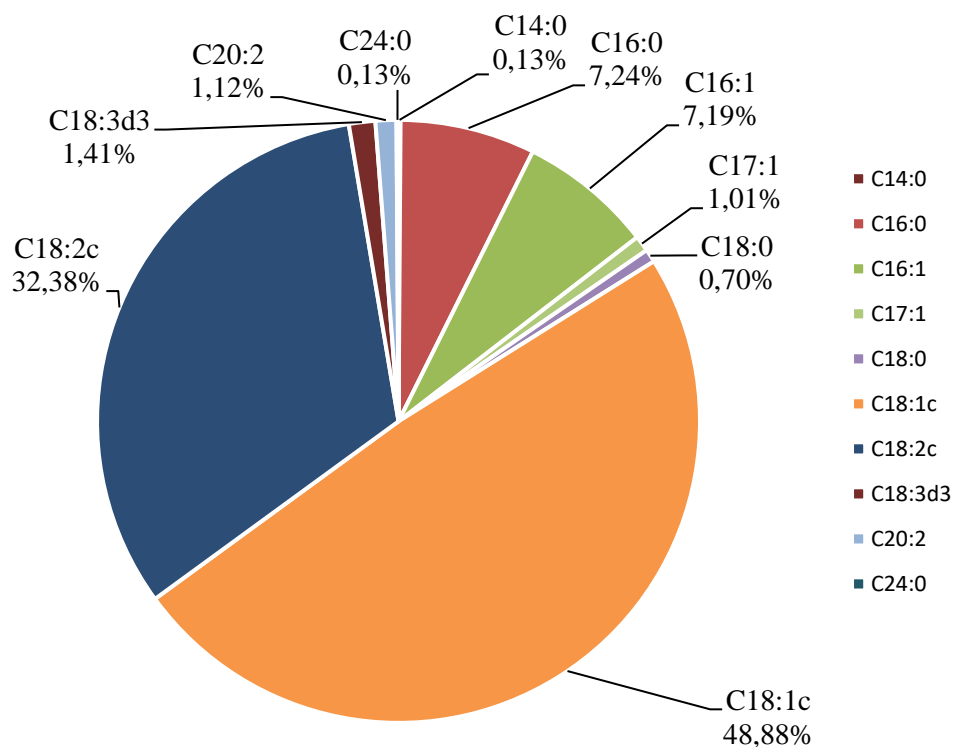
Obr. 67: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. pulcherrima* 149 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 8 °C



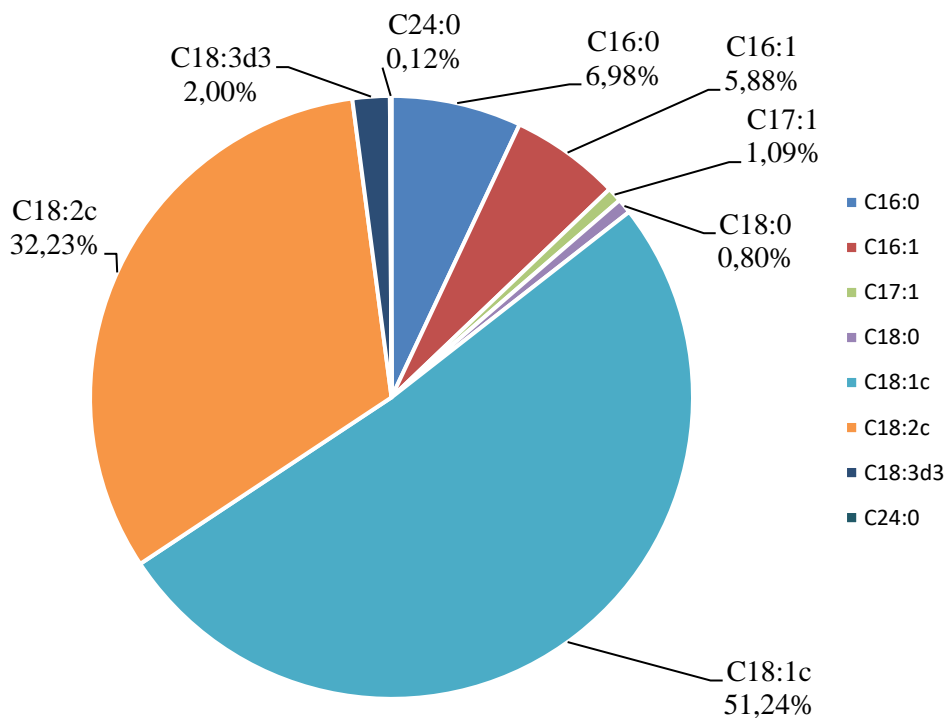
Obr. 68: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. pulcherrima* 149 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 8 °C



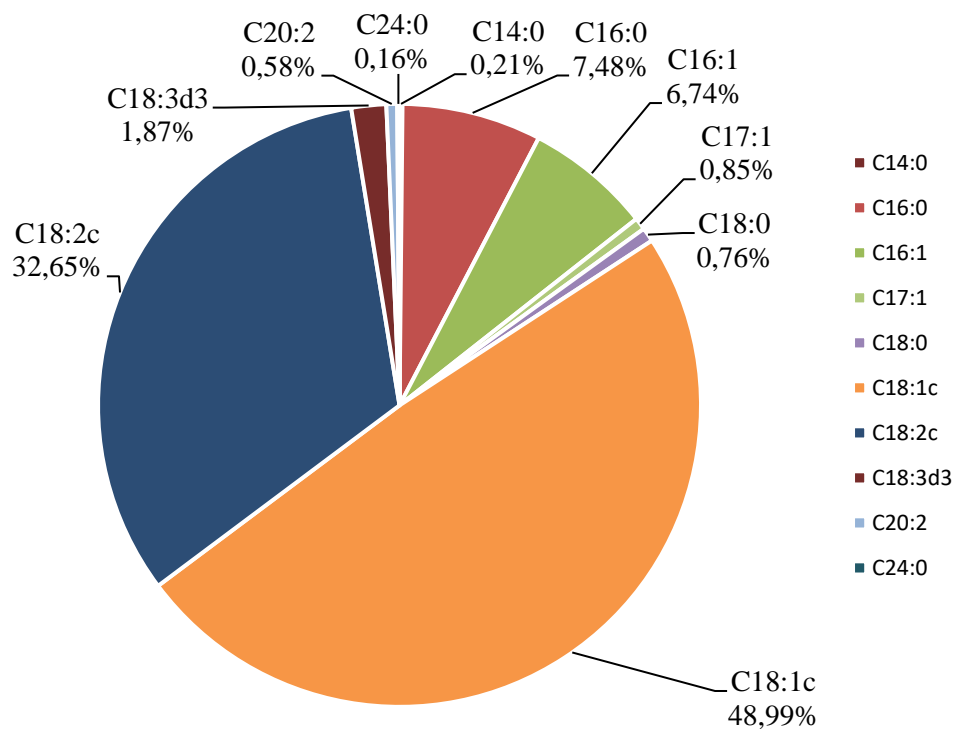
Obr. 69: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. chrysoperlae* 1158 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 8 °C



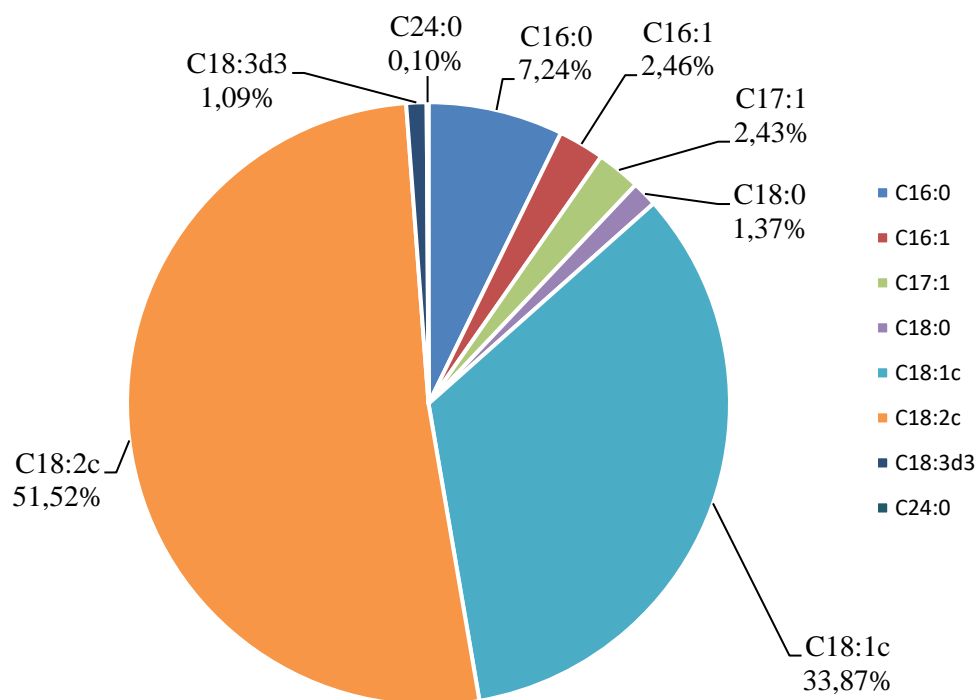
Obr. 70: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. chrysoperlae* 1158 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 8 °C



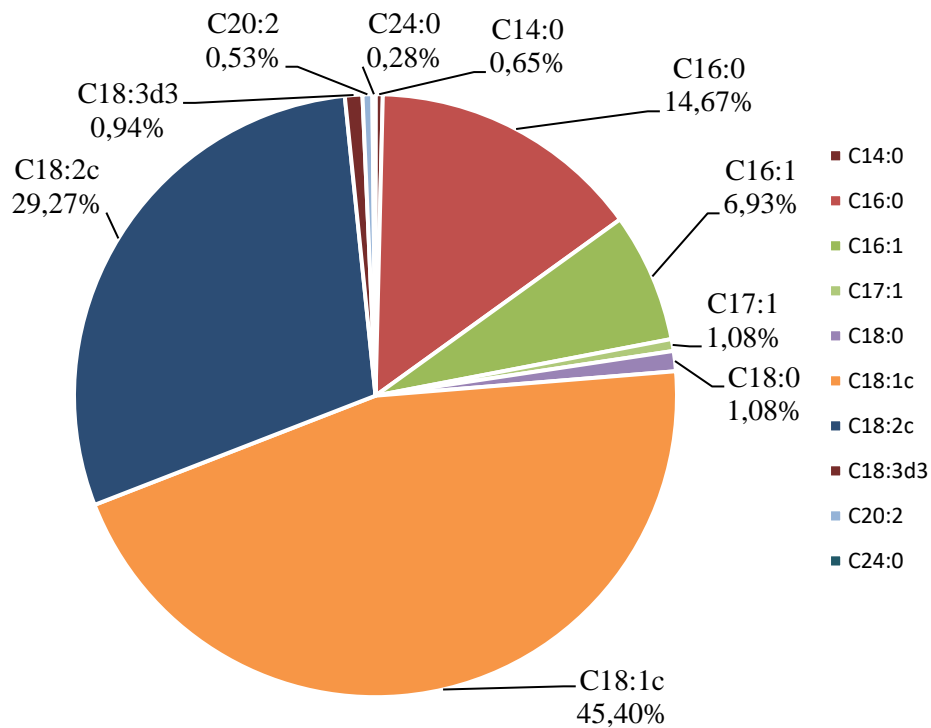
Obr. 71: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. andauensis* 129 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 11 °C



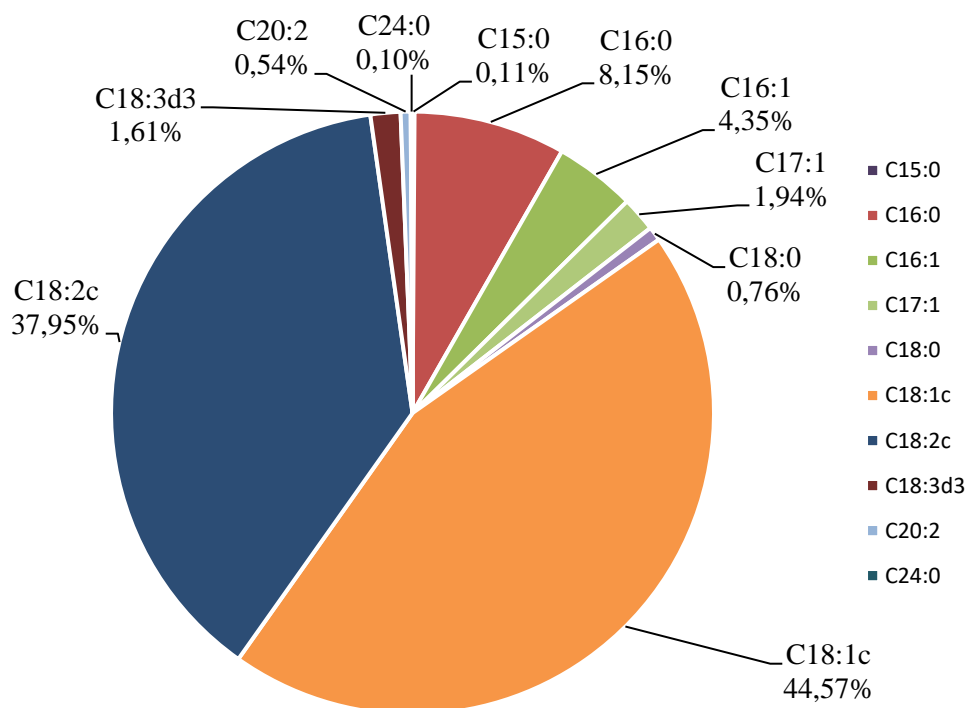
Obr. 72: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. andauensis* 129 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 11 °C



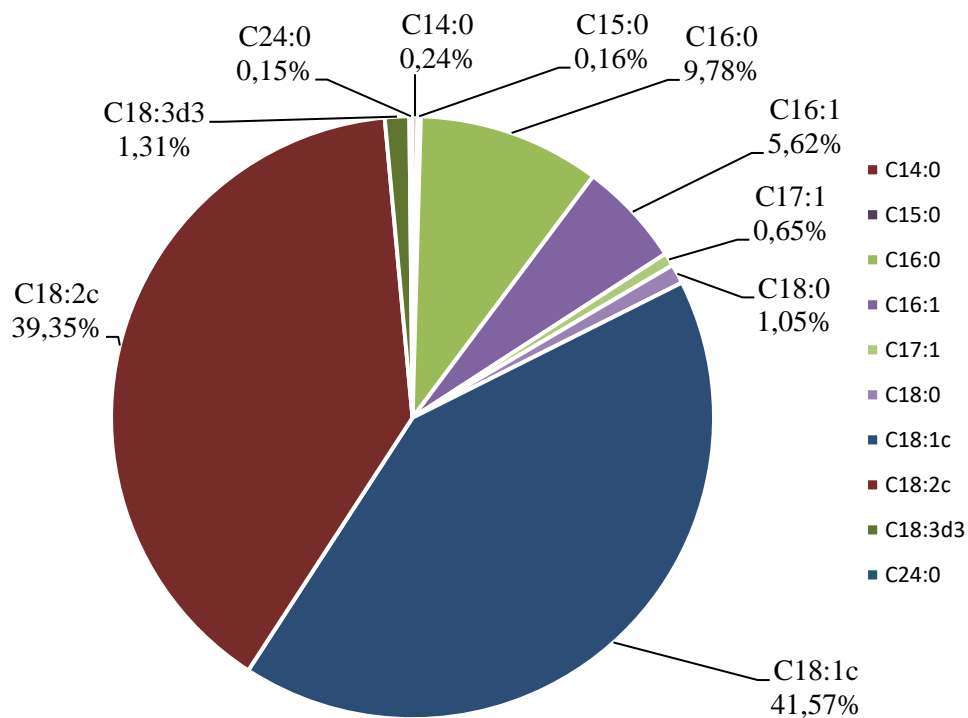
Obr. 73: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. pulcherrima* 145 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 11 °C



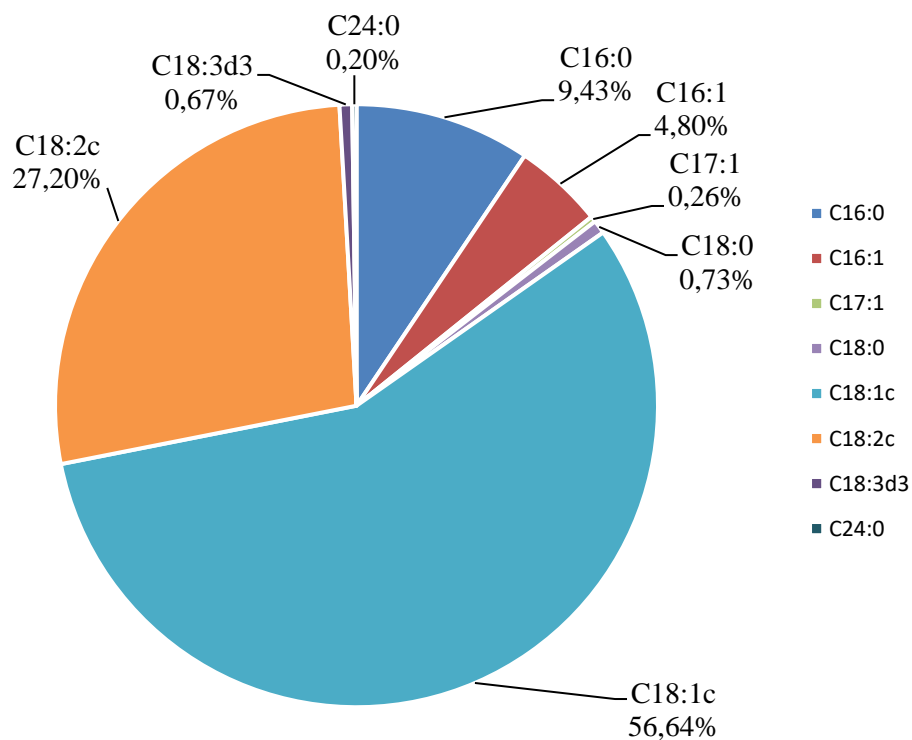
Obr. 74: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. pulcherrima* 145 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 11 °C



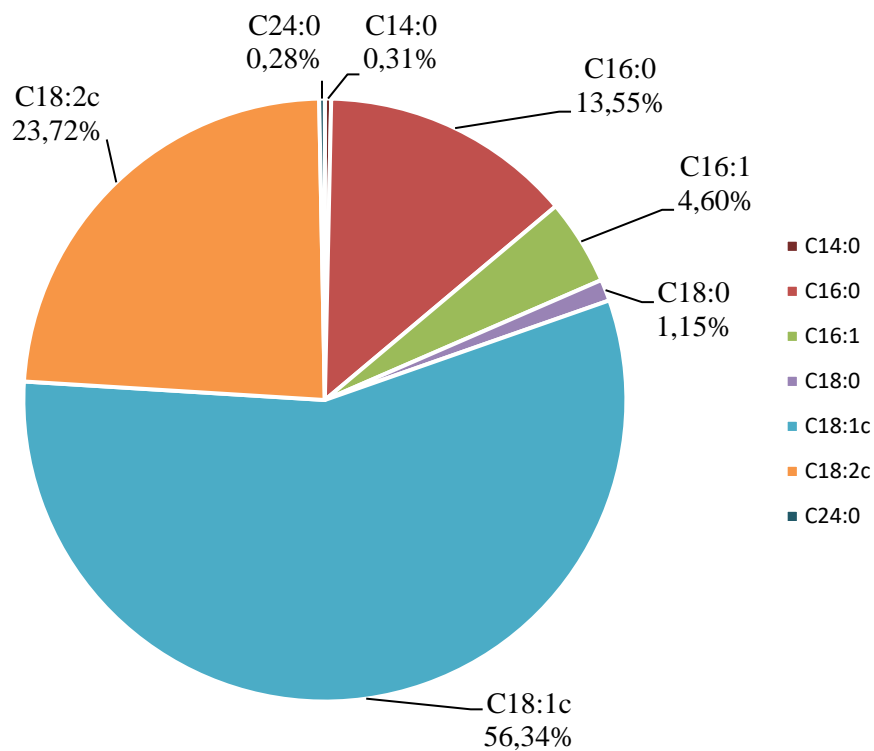
Obr. 75: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. pulcherrima* 147 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 11 °C



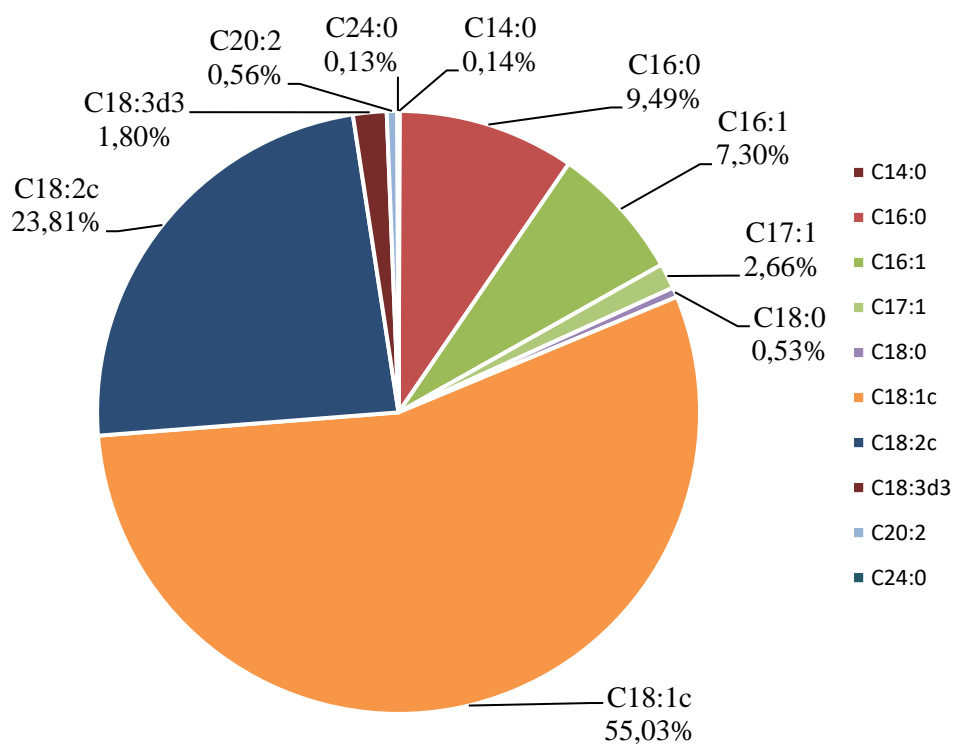
Obr. 76: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. pulcherrima* 147 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 11 °C



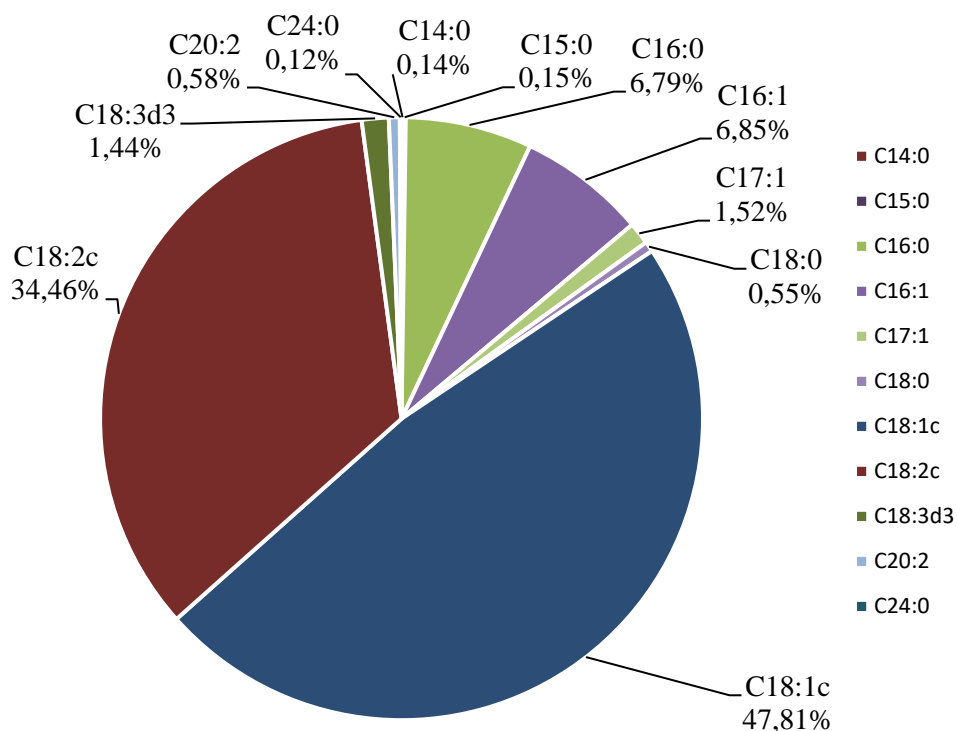
Obr. 77: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. pulcherrima* 149 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 11 °C



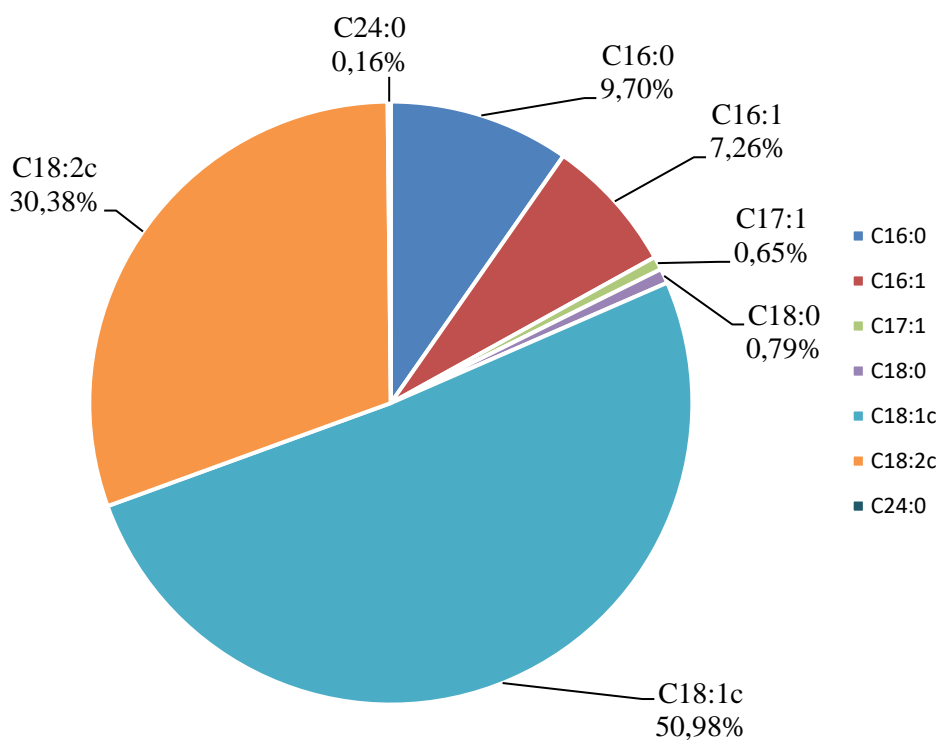
Obr. 78: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. pulcherrima* 149 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 11 °C



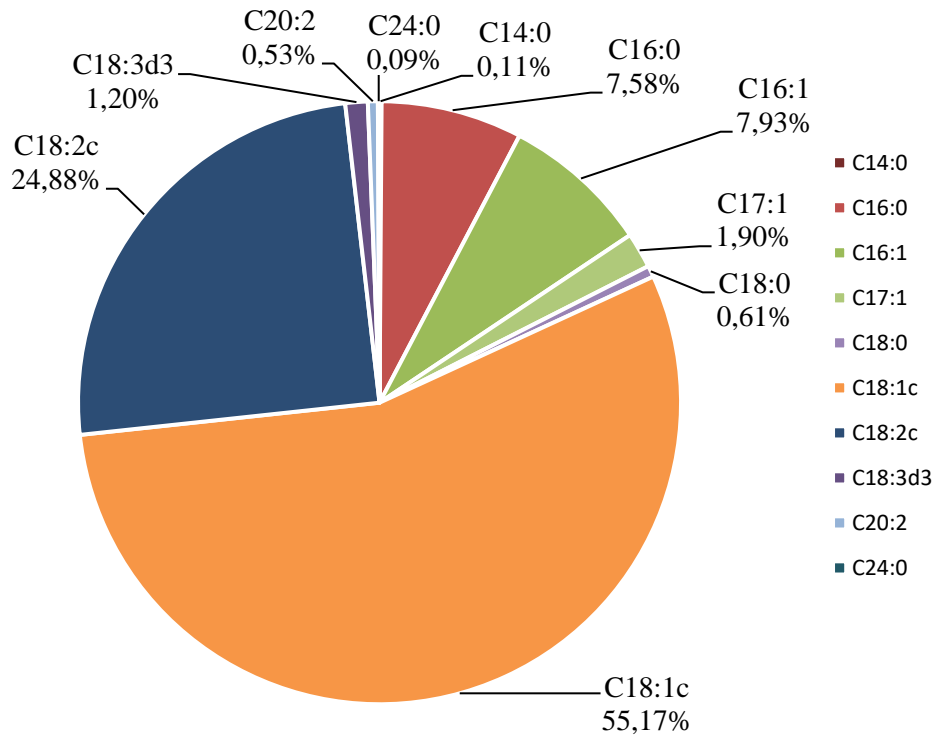
Obr. 79: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. chrysoperlae* 1158 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 11 °C



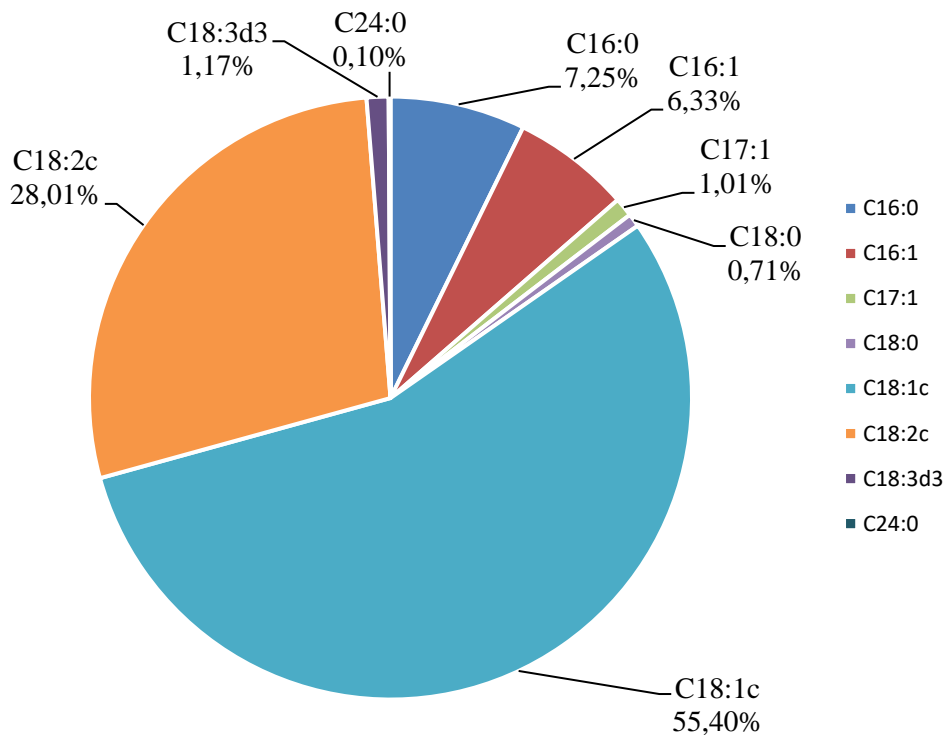
Obr. 80: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. chrysoperlae* 1158 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 11 °C



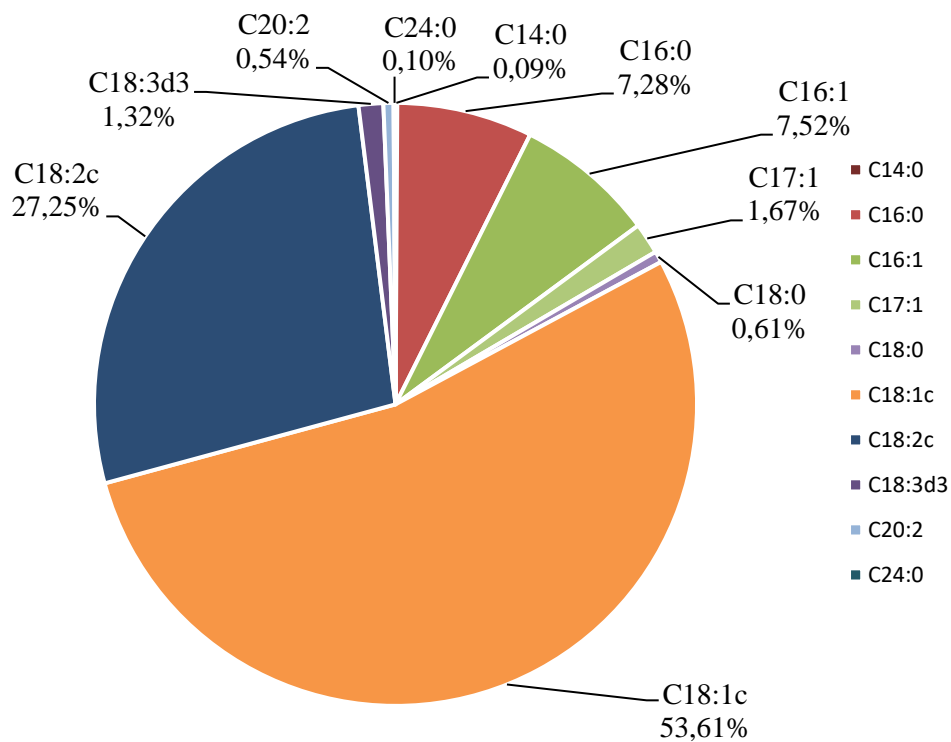
Obr. 81: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. andauensis* 129 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 15 °C



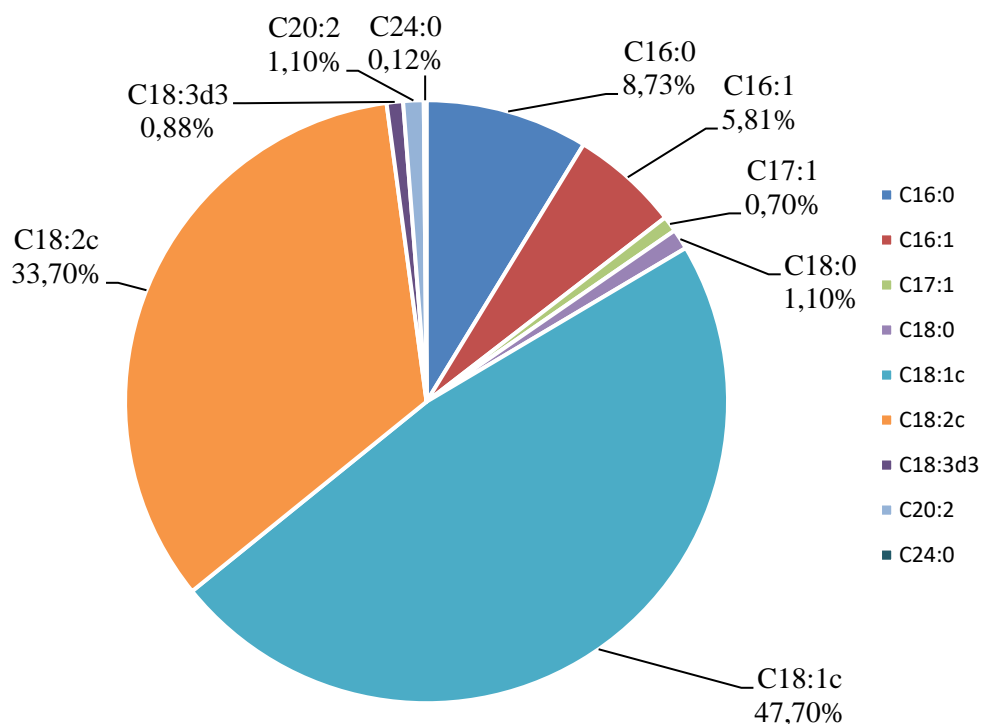
Obr. 82: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. andauensis* 129 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 15 °C



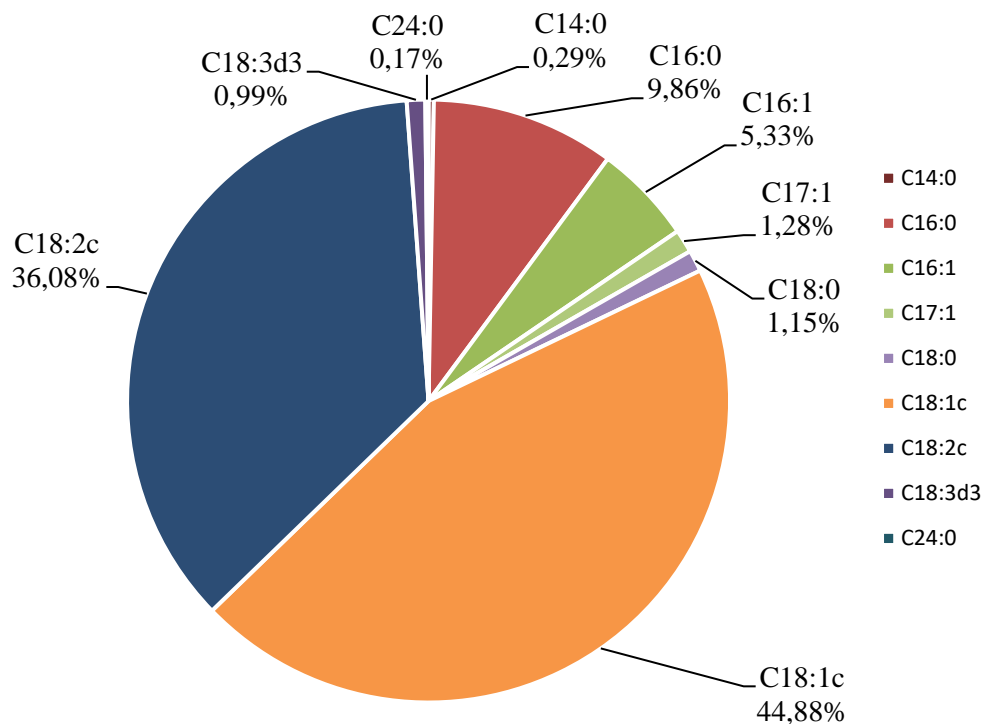
Obr. 83: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. pulcherrima* 145 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 15 °C



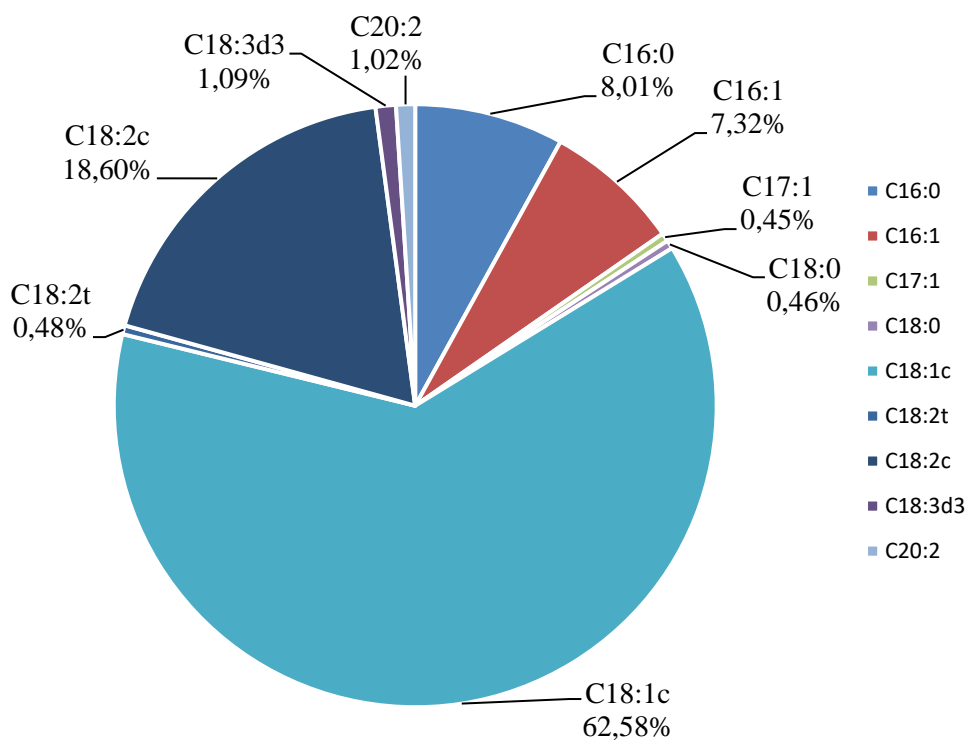
Obr. 84: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. pulcherrima* 145 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 15 °C



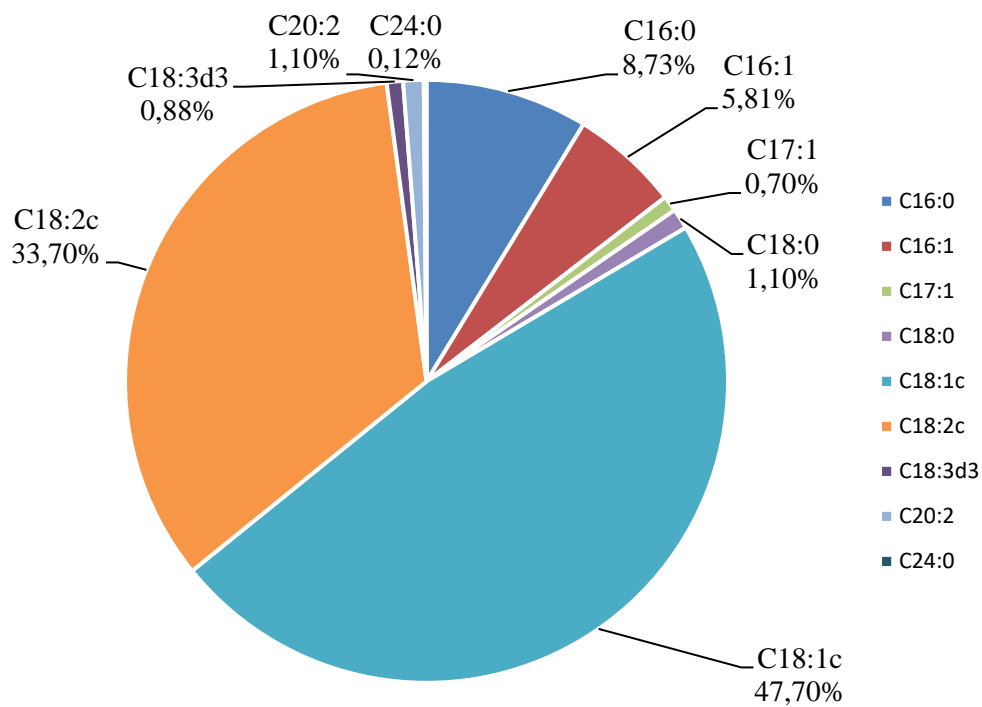
Obr. 85: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. pulcherrima* 147 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 15 °C



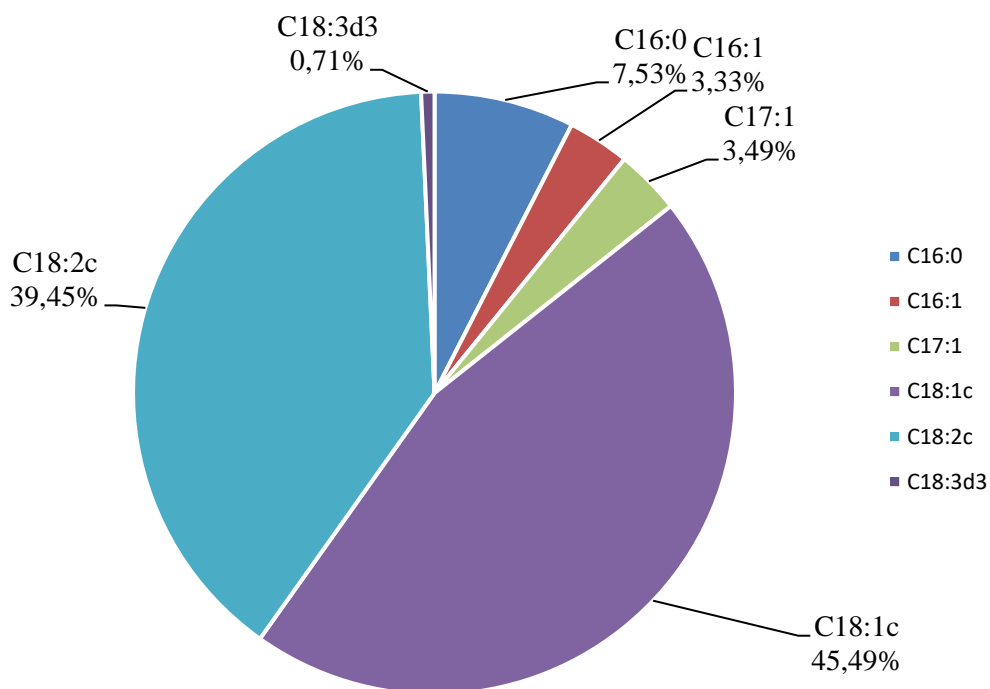
Obr. 86: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. pulcherrima* 147 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 15 °C



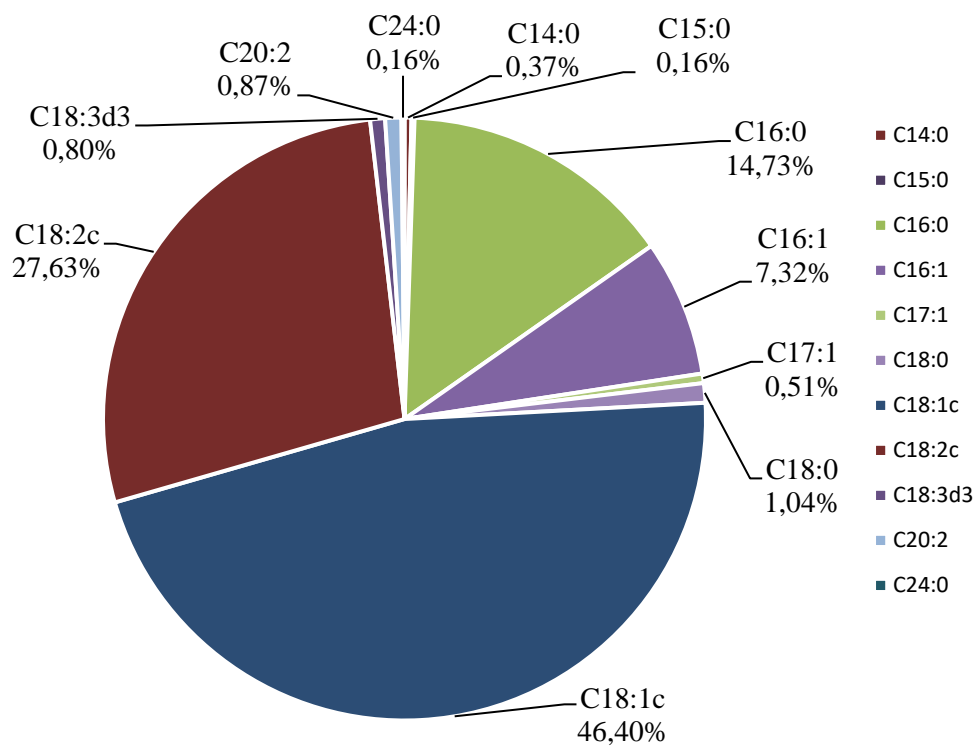
Obr. 87: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. pulcherrima* 149 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 15 °C



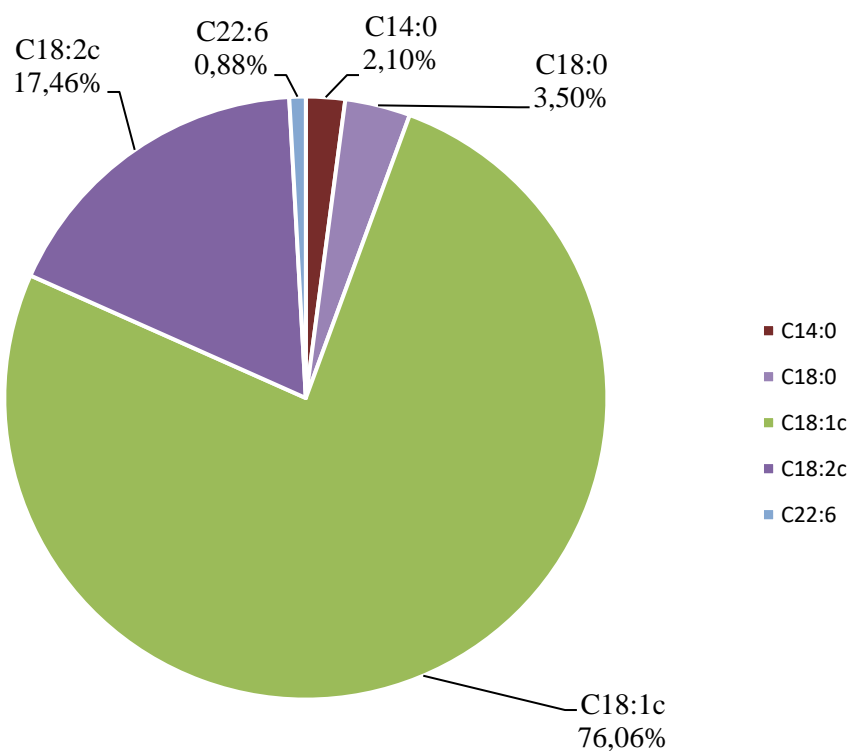
Obr. 88: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. pulcherrima* 149 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 15 °C



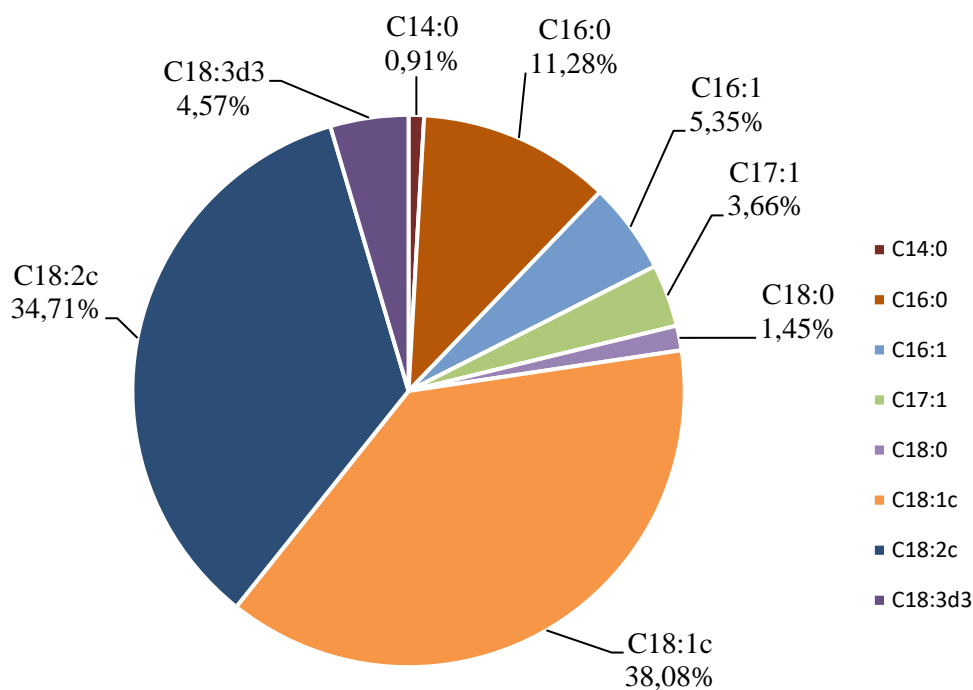
Obr. 89: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. chrysoperlae* 1158 při růstu na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 15 °C



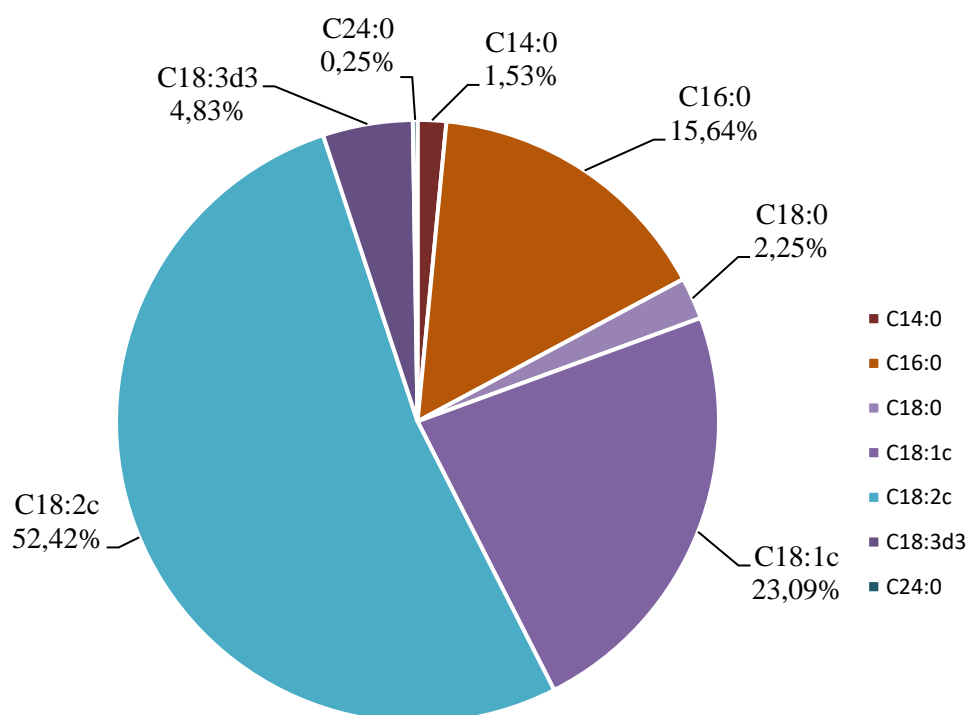
Obr. 90: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. chrysoperlae* 1158 při růstu na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 15 °C



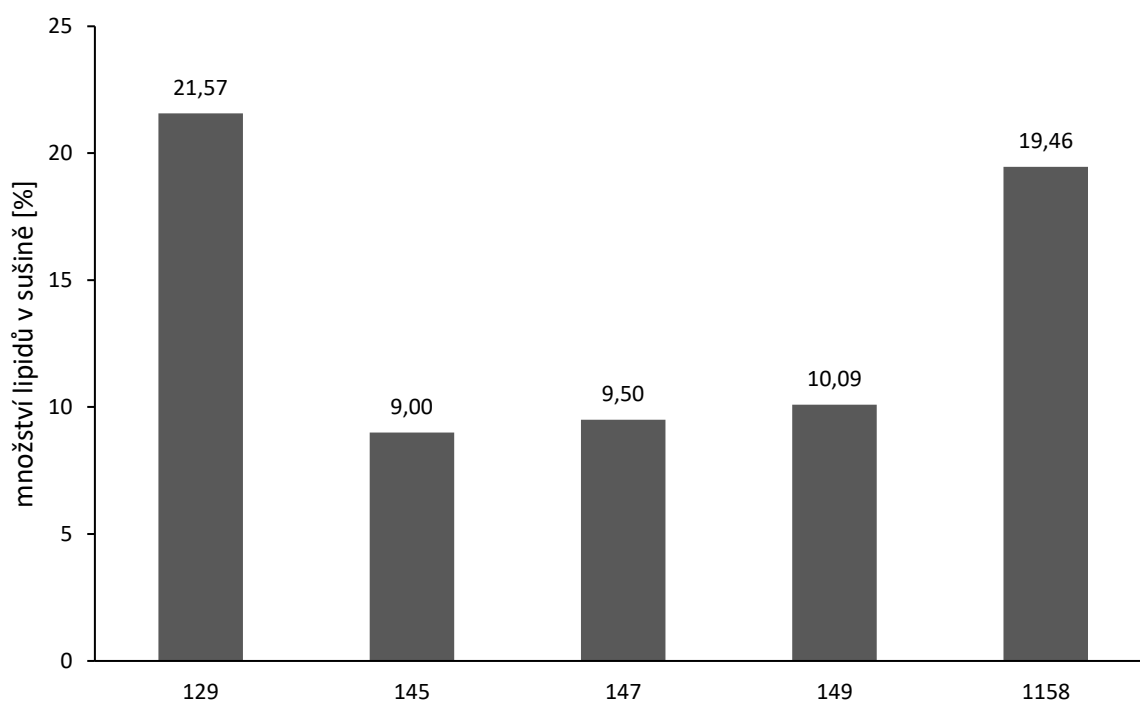
Obr. 91: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. chrysoperlae* 1158 při růstu na médiu obsahujícím tuk a teplotě 11 °C



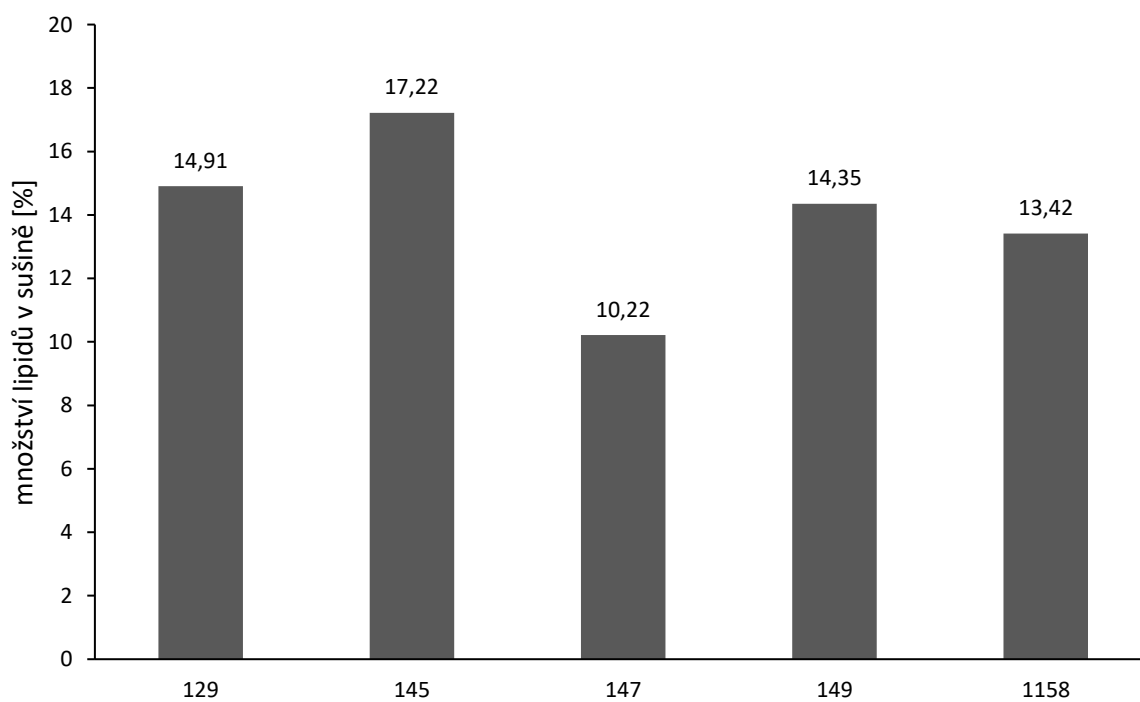
Obr. 92: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. chrysoperlae* 1158 při růstu na médiu obsahujícím kávu a teplotě 11 °C



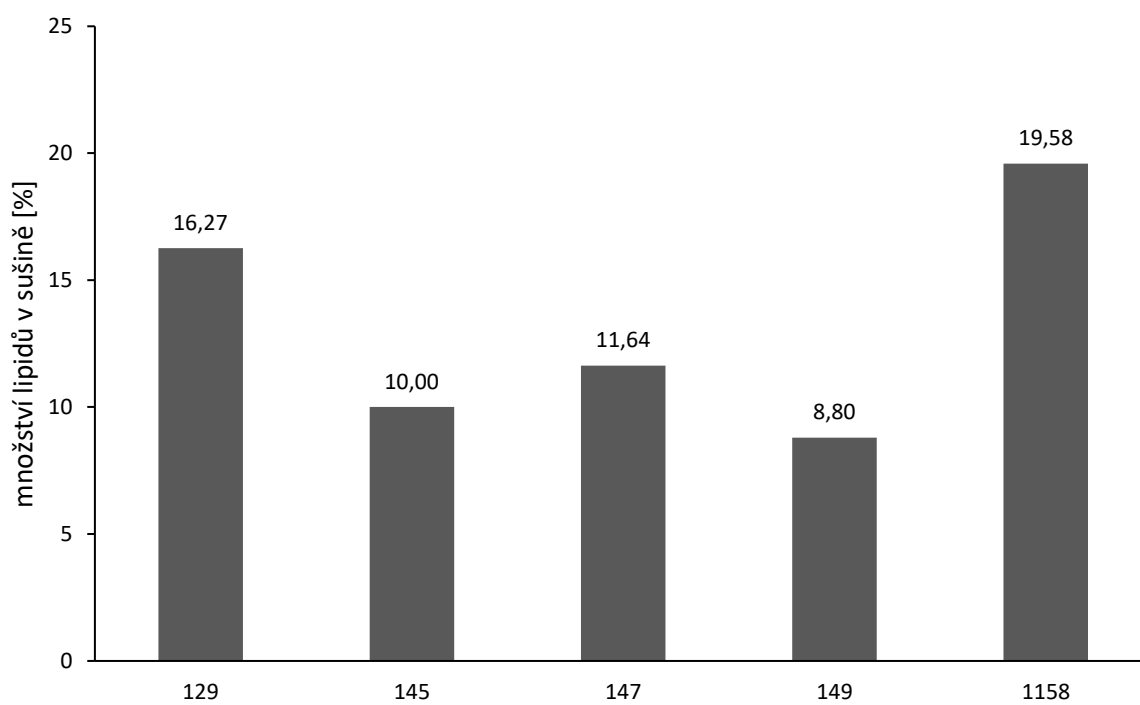
Obr. 93: Zastoupení mastných kyselin po ukončení kultivace u kmene *M. chrysoperlae* 1158 při růstu na médiu obsahujícím glycerol a teplotě 11 °C



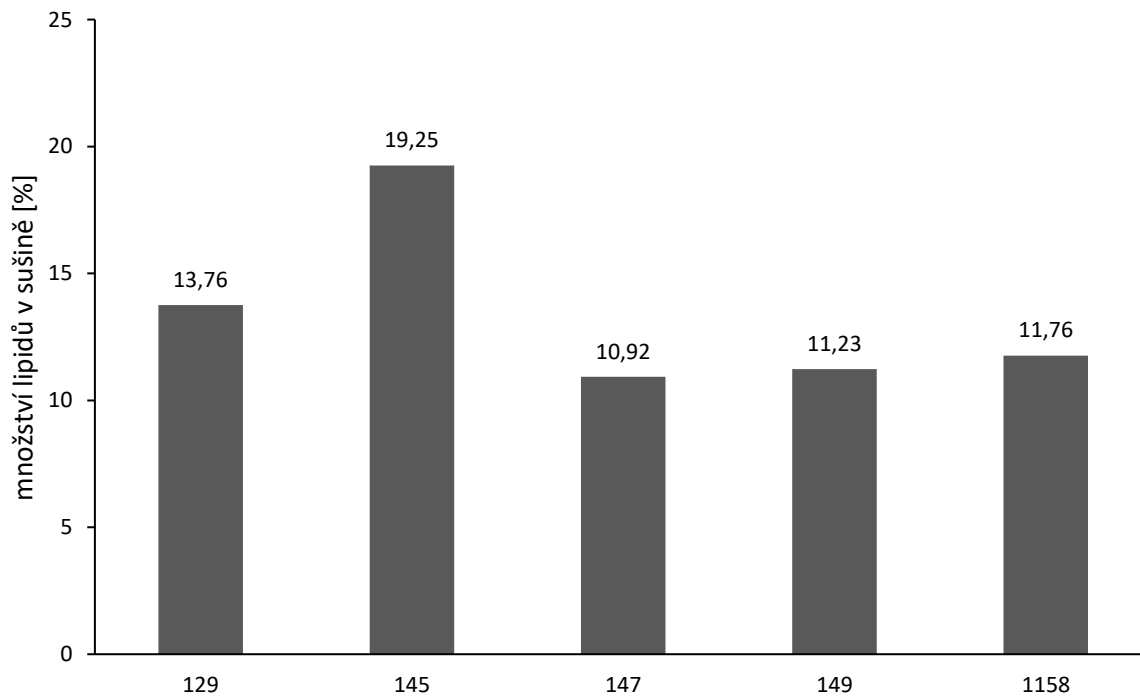
Obr. 94: Množství lipidů u jednotlivých kmenů při ukončení kultivace na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 8 °C



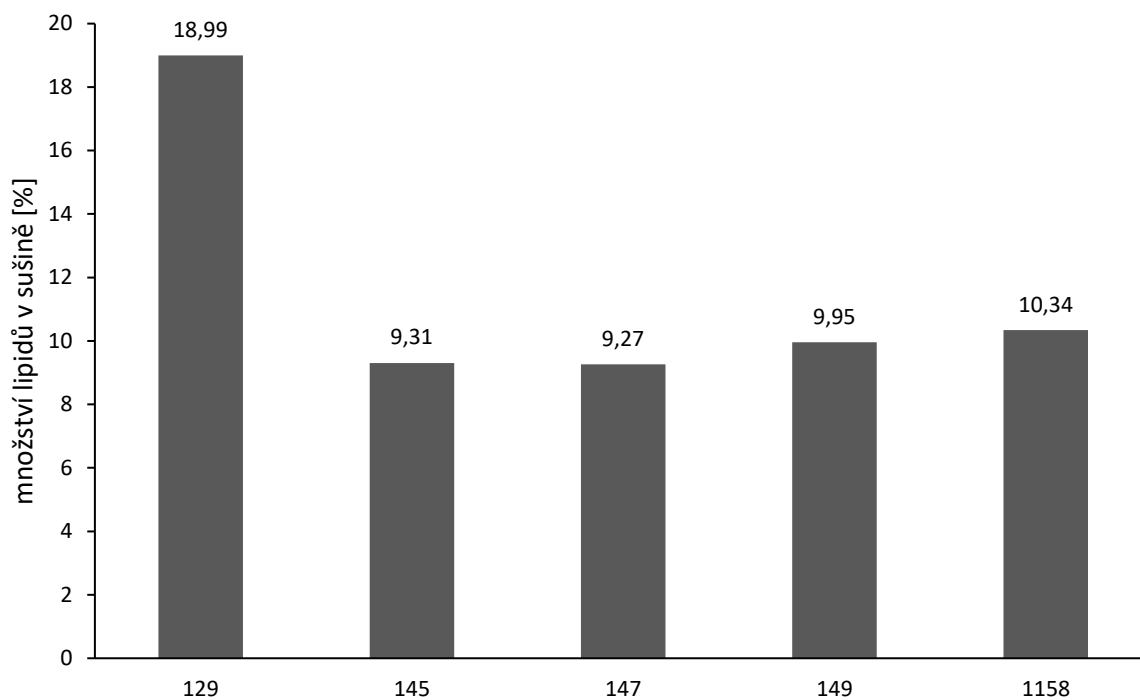
Obr. 95: Množství lipidů u jednotlivých kmenů při ukončení kultivace na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 8 °C



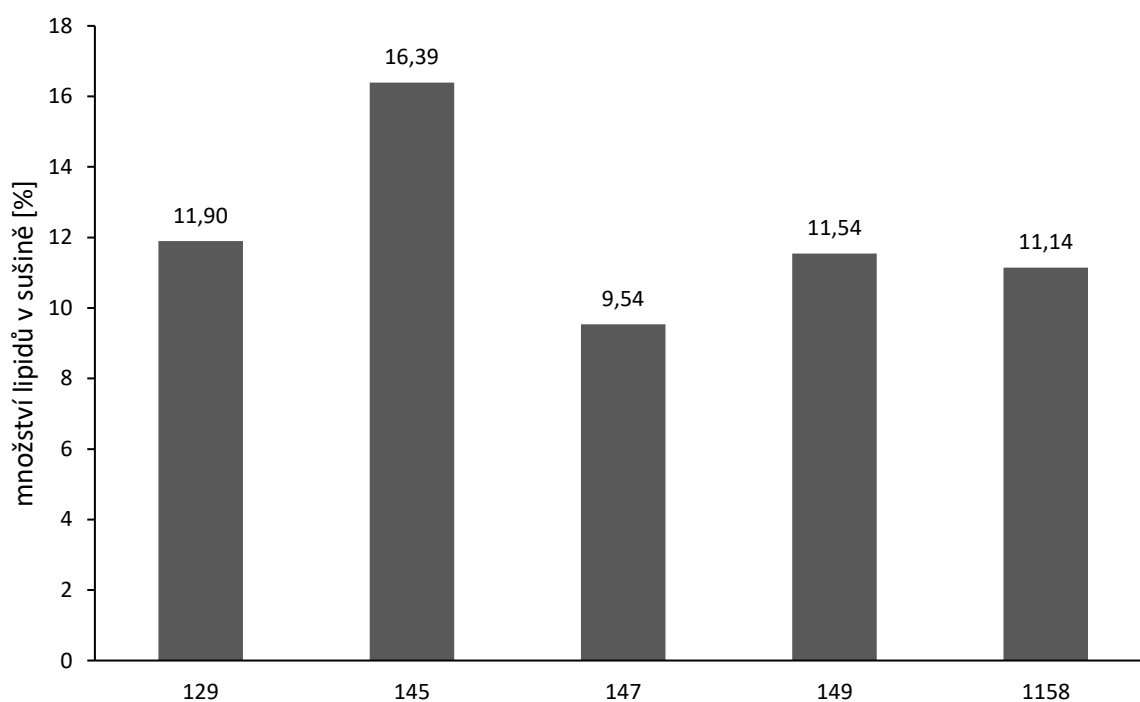
Obr. 96: Množství lipidů u jednotlivých kmenů při ukončení kultivace na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 11 °C



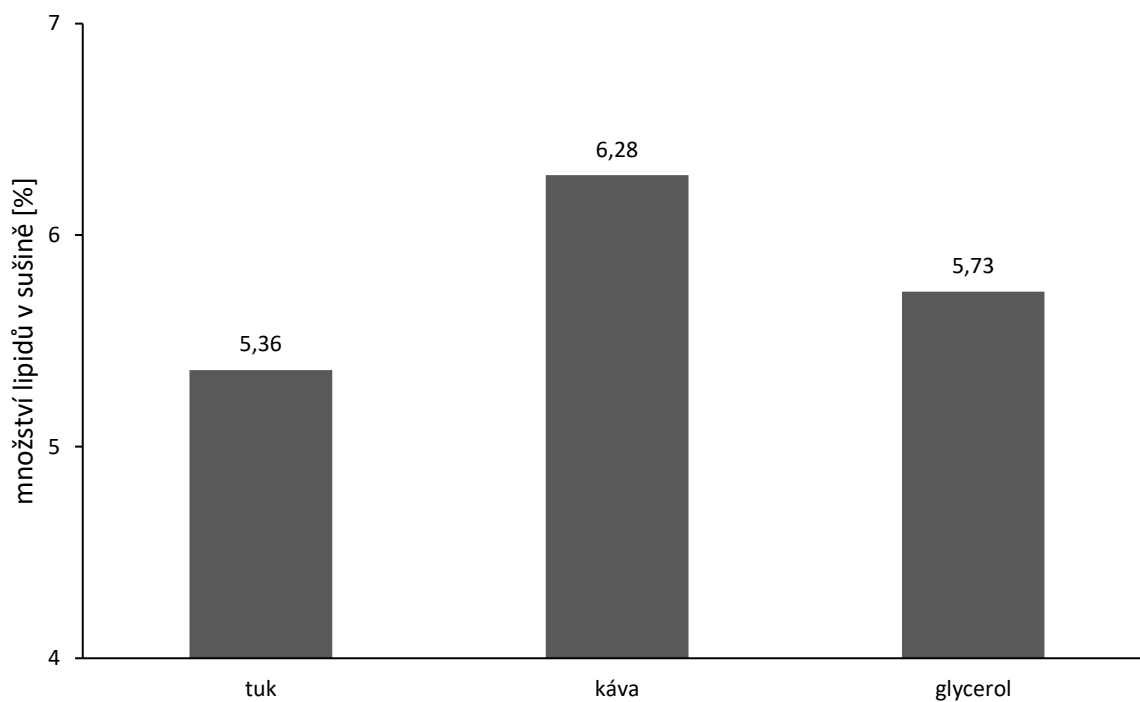
Obr. 97: Množství lipidů u jednotlivých kmenů při ukončení kultivace na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 11 °C



Obr. 98: Množství lipidů u jednotlivých kmenů při ukončení kultivace na médiu o poměru C/N = 100 a teplotě 15 °C



Obr. 99: Množství lipidů u jednotlivých kmenů při ukončení kultivace na médiu o poměru C/N = 150 a teplotě 15 °C



*Obr. 100: Množství lipidů u kmene *M. chrysoperlae* 1158 při ukončení kultivace na různých odpadních substrátech a teplotě 11 °C*