



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLÓGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VYUŽITÍ ODPADNÍCH SUBSTRÁTŮ K PRODUKCI
LIPIDICKÝCH LÁTEK KVASINKAMI RODU
METSCHNIKOWIA**

USING OF WASTE SUBSTRATES FOR THE LIPID PRODUCTION BY METSCHNIKOWIA YEASTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Linda Cagáňová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1289/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Linda Cagáňová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Využití odpadních substrátů k produkci lipidických látek kvasinkami rodu *Metschnikowia*

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Rešerše – přehled mikrobiálních producentů významných lipidů, mikrobiální lipázy, funkce a průmyslové využití lipidických látek
- 2) Stanovení růstových charakteristik kvasinek rodu *Metschnikowia*
- 3) Optimalizace produkce lipidických látek kvasinkami rodu *Metschnikowia* s využitím vybraných typů odpadních substrátů jako zdroje uhlíku
- 4) Analýza metabolitů instrumentálními technikami

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019:

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

Bc. Linda Cagáňová
student(ka)

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práca bola zameraná na štúdium biotechnologického využitia odpadných substrátov k produkcii lipidov kvasinkami rodu *Metschnikowia*. Odpadné suroviny a ich následná transformácia na produkty s pridanou hodnotou akými sú napríklad mikrobiálne lipidy sú v súčasnosti považované za alternatívny zdroj výroby biopalív. Experimentálna časť bola preto zameraná na skúmanie vplyvu uhlíkatého zdroja k riadenej nadprodukcii lipidov prostredníctvom kvasiniek rodu *Metschnikowia*. Celkovo bolo vybraných dvanásť zástupcov tohto rodu. Pre časť kmeňov, konkrétne kvasinky *M. pulcherrima* 145, *M. pulcherrima* 147, *M. pulcherrima* 149, *M. andauensis* 129 a *M. fructicola* 15, zo zbierky kultúr kvasiniek (CCY - Culture Collection of Yeast) boli prevedené aj rastové charakteristiky, ktoré, môžu slúžiť pre pochopenie fyziológie samotných kvasinkových kmeňov a v budúcnosti napomôcť pri ďalšej analýze produkovaných metabolitov. Zvyšné kmene *M. chrysoperlae* 1158, *M. pulcherrima* 1232, *M. fructicola* 1235, *M. andauensis* 1241, *M. sinensis* 1244, *M. zizyphicola* 1247 a *M. shanxiensis* 1250 pochádzali zo zbierky CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands). Kultivácia bola prevádzaná na odpadnom živočíšnom tuku, glycerole a srvátke s rôznymi pomermi C/N. Pre vyššie výtťažky lipidov boli jednotlivé kmene kultivované za podmienok zníženej teploty (15°C) po dobu 14 dní. Obsah vyprodukovaných lipidov bol stanovovaný technikou plynovej chromatografie a Ramanovou spektroskopiou. Ako najvhodnejší substrát pre tvorbu mikrobiálnych lipidov bolo vyhodnotené médium s obsahom glycerolu, kde množstvo naakumulovaných lipidov predstavovalo v bunkách kvasinky *M. pulcherrima* 1232 36,31%. U kvasiniek rodu *Metschnikowia* bol zároveň prevedený aj kvantitatívny screening enzýmovej aktivity lipáz za použitia spektrofotometrickej metódy s *p*-NPP. Riadená produkcia lipolytických enzýmov bola sledovaná s využitím dvoch typov médií: odpadný tuk a odpadný tuk s prídavkom emulzifikátora (Tween 80). Záver práce bol doplnený o analýzu karyotypu kvasiniek rodu *Metschnikowia* pomocou techniky pulznej gélovej elektroforézy.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

kvasinky, *Metschnikowia*, odpadné substráty, lipidy, GC, lipázy

ABSTRACT

This thesis was focused on study of biotechnological utilization of waste substrates to produce lipids by yeast of the genus *Metschnikowia*. Waste materials and their subsequent transformation into high value-added products such as microbial lipids are currently considered as an alternative source for biofuel production. Therefore, the experimental part was aimed at investigating the influence of a carbon source to the controlled overproduction of lipids by yeast *Metschnikowia*. Total of 12 yeast strains of the genus *Metschnikowia* were selected. Yeast strains *M. pulcherrima*, *M. pulcherrima* 147, *M. pulcherrima* 149, *M. andauensis* 129 a *M. fructicola* 15 were purchased from Culture Collection of Yeasts (CCY, Bratislava, Slovakia). The growth characteristics of this yeast strains were also studied. It may serve to better understanding of the physiology of the yeast strains and also to help in further analysis of the produced metabolites. The other strains *M. chrysoperlae* 1158, *M. pulcherrima* 1232, *M. fructicola* 1235, *M. andauensis* 1241, *M. sinensis* 1244, *M. zizyphicola* 1247 a *M. shanxiensis* 1250 were purchased from CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands). Yeast strains were cultivated on crude animal fat, glycerol and cheese whey under conditions of different C/N ratios. Because of higher lipid yields, cultivation was carried out at 14°C for 14 days. The accumulated lipid content was determined by gas chromatography and Raman spectroscopy. The glycerol-containing medium was evaluated as the most suitable for microbial lipids production. The total amount of lipids present in cells of *M. pulcherrima* 1232 was 36,31%. At the same time, quantitative screening of lipase enzymatic activity in *Metschnikowia* yeast was performed using spectrophotometric method with *p*-NPP. Controlled production of lipolytic enzymes has been monitored by using two types of media: crude animal fat and crude animal fat with addition of emulsifier (Tween 80). The conclusion of the work was supplemented by analysis of the karyotype of yeasts of the genus *Metschnikowia* using the technique of pulsed gel electrophoresis.

KEYWORDS

yeasts, *Metschnikowia*, waste substrates, lipids, GC, lipases

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.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemické VUT v Brně a môže byť použitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať vedúcej diplomovej práce Ing. Andrei Háronikovej, Ph.D za odborné vedenie a cenné rady pri spracovávaní tejto práce. Ďalej by som sa chcela poďakovať Ing. Denise Romanovskej a Ing. Marekovi Raptovi za pomoc počas riešenia experimentálnej časti. V neposlednej rade patrí veľká vďaka mojej rodine za podporu počas celého štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1	Kvasinky.....	9
2.1.1	Metabolizmus kvasiniek.....	9
2.1.2	Rozmnožovanie kvasiniek.....	9
2.1.3	Kvasinky rodu <i>Metschnikowia</i>	10
2.2	Metódy kultivácie kvasiniek.....	13
2.2.1	Kultivačné médiá.....	13
2.2.2	Príprava kultivačných médií.....	14
2.2.3	Kultivačné zariadenia	14
2.2.4	Rastové charakteristiky	14
2.3	Lipidy	16
2.3.1	Mikrobiálna produkcia lipidov	16
2.3.1.1	Oleogénne mikroorganizmy	17
2.3.2	Biochemický proces akumulácie lipidov v oleogénnych kvasinkách	17
2.3.3	Profil lipidov produkovaných oleogénnymi mikroorganizmami	20
2.4	Lipolytické enzýmy	21
2.4.1	Lipázy v priemysle	21
2.4.2	Mikrobiálni producenti lipáz	22
2.4.3	Faktory ovplyvňujúce produkciu lipáz	23
2.5	Odpadné substráty	24
2.5.1	Srvátka.....	24
2.5.2	Odpadný glycerol	25
2.5.3	Odpadný živočíšny tuk.....	25
2.6	Plynová chromatografia.....	26
2.6.1	Inštrumentácia plynovej chromatografie	26
2.7	Ramanova spektroskopia.....	27
2.8	Pulzná gélová elektroforéza	29
3	CIELE PRÁCE	31
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	32
4.1	Použité chemikálie a materiály.....	32
4.2	Použité prístroje a pomôcky	33
4.3	Použité kmene kvasiniek	33
4.4	Stanovenie rastových kriviek kvasiniek rodu <i>Metschnikowia</i>	34

4.4.1	Stanovenie zákalu turbidimetricky	34
4.4.2	Spracovanie biomasy	34
4.5	Produkcia lipidov kvasinkami rodu <i>Metschnikowia</i>	35
4.5.1	Kultivácia kvasiniek na optimálnom médiu	35
4.5.1.1	Inokulum	35
4.5.1.2	Produkčné médium	35
4.5.1.3	Spracovanie odpadnej srvátky	37
4.5.1.4	Spracovanie odpadného tuku	38
4.5.1.5	Spracovanie biomasy z produkčných médií	38
4.5.2	Stanovenie enzýmovej aktivity lipáz	39
4.5.2.1	Stanovenie kalibračnej krivky p-nitrofenolu	39
4.5.2.2	Príprava substrátu	39
4.5.2.3	Stanovenie lipolytickej aktivity	39
4.5.3	Analýza lipidov technikou Ramanovej spektroskopie	39
4.5.4	Izolácia DNA kvasiniek rodu <i>Metschnikowia</i>	39
4.5.5	Pulzná gélová elektroforéza	40
4.5.6	Vizualizácia gélu PFGE	40
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA	41
5.1	Rastové charakteristiky	41
5.1.1	Rastová krivka kvasinky <i>Metschnikowia pulcherrima</i> 145	41
5.1.2	Rastová krivka kvasinky <i>Metschnikowia pulcherrima</i> 147	42
5.2	Produkcia lipidických látok kvasinkami rodu <i>Metschnikowia</i>	44
5.2.1	Screening produkcie lipidov s využitím glukózy a glycerolu	47
5.2.1.1	Analýza profilu mastných kyselín produkovaných na glukóze a glycerole	52
5.2.2	Screening produkcie lipidov s využitím odpadnej srvátky	58
5.2.3	Kultivácia kvasiniek rodu <i>Metschnikowia</i> na odpadnom živočíšnom tuku	60
5.2.3.1	Produkcia lipolytických enzýmov kvasinkami rodu <i>Metschnikowia</i>	61
5.2.3.2	Produkcia lipidov s využitím odpadného živočíšneho tuku	66
5.2.3.3	Analýza profilu mastných kyselín produkovaných na tukových médiách	68
5.3	Analýza zastúpenia mastných kyselín technikou Ramanovej spektroskopie	72
5.4	Karyotypová charakterizácia kvasiniek rodu <i>Metschnikowia</i>	78
6	ZÁVER	83
7	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	85
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	92
9	PRÍLOHY	93

1 ÚVOD

Lipidy sú látky nachádzajúce sa všade okolo nás, sú prítomné v našom každodennom živote. Vyskytujú sa v potravinách kde ako významné zložky tvoria chuť, arómu či textúru, v rôznych detergentoch, kozmetike a možno ich použiť aj ako biopalivá. Lipidy je možné získavať z rôznych obnoviteľných zdrojov ako napríklad rastlinné oleje či mikroorganizmy. Používanie olejnin k produkcii rastlinných olejov na výrobu biopalív sa však stretáva so skepticizmom a nepochopením obyvateľstva. Jednou z príčin je fakt, že pri použití rastlinných olejov ako náhrad za fosílnu surovinu, musí byť zloženie rastlín modifikované pomocou technológie rekombinantných génov. Práve geneticky modifikované rastliny predstavujú pre ľudstvo potenciálne riziko, čím sa stávajú nevhodnými k ich aplikácii aj napriek veľkým pokrokom v oblasti biotechnológie zelených rastlín. Tieto úskalia však môžu byť prekonávané prostredníctvom mikroorganizmov, ktoré sú geneticky ľahko upraviteľné a ich použitie ako GMO je oveľa viac akceptovateľné [1]. K produkcii mikrobiálnych olejov sa využívajú predovšetkým jednobunkové organizmy ako sú kvasinky, huby (plesne) alebo riasy.

Niektoré kvasinky sú schopné akumulovať viac ako 20% svojej biomasy vo forme lipidov. Nazývajú sa tzv. oleogénne kvasinky, ktorých lipidy sú tvorené prevažne triacylglycerolmi (TAG) často označovaných aj ako singel-cell oils (SCO) a voľnými masnými kyselinami (FFA). Vďaka chemickej podobnosti SCO s rastlinnými olejmi je v súčasnosti čoraz väčšia pozornosť venovaná ich využitiu v oleochemickom priemysle k výrobe biopalív. Výraznú bariéru pri komercializácii SCO predstavujú však najmä vysoké náklady spojené s ich výrobou. Rovnako ako pri iných procesoch aj u produkcie lipidov prostredníctvom kvasiniek bývajú výrobné náklady negatívne ovplyvňované cenami surovín. Aby sa zmiernil tento problém, výroba sa zameriava predovšetkým na utilizáciu ľahko dostupných surovín, ktoré vo veľkom množstve vznikajú ako odpadný produkt z rôznych odvetí priemyslu [2]. Okrem odpadných substrátov môžu kvasinky vďaka svojej vysokej tolerancii obsahu cukru a schopnosti využívať rôzne zdroje uhlíka a dusíka rásť aj na iných substrátoch. Z jednoduchých substrátov využívajú najmä fermentovateľné monosacharidy (glukóza, xylóza, manóza, arabinóza), glycerol či organické kyseliny [1,2]. Výhody používania kvasiniek spočívajú aj v tom, že väčšina z nich nevyžaduje svetlo. Tým sa podstatne znižujú vstupné náklady a je umožnená 24 hodinová produkcia. Okrem toho kvasinky majú schopnosť rásť v pomerne krátkom čase za ľahších kultivačných podmienok [1].

Predmetom tejto práce bolo skúmanie využitia odpadných substrátov k produkcii lipidov kvasinkami rodu *Metschnikowia*. Produkčné vlastnosti boli celkovo skúmané a porovnávané u dvanástich kvasinkových kmeňov.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Kvasinky

Identifikácia, pomenovanie, zaraďovanie kvasiniek do evolučného systému a určovanie ich priemyselných vlastností je dôležité pre mnohé oblasti vedy predovšetkým biotechnológie, medicínu, a potravinárstvo. V súčasnosti je známych asi 750 druhov kvasiniek a môžeme predpokladať, že ešte veľa ďalších druhov čaká na svoje objavenie [3]. Kvasinky tvoria v prírode prevládajúcu skupinu mikroorganizmov, ktoré sa podieľajú na rozklade jednoduchých sacharidov. Zaraďujeme medzi ne dôležité priemyselné organizmy, patogény a laboratórne organizmy slúžiace ako obecný model pre pochopenie eukaryotických buniek [4].

Kvasinky sú obecné charakterizované ako eukaryotické heterotrófne jednobunkové organizmy zaraďované do ríše húb [3]. Tvar buniek je rozličný a daný predovšetkým rodovou príslušnosťou, môže však byť ovplyvnený aj spôsobom vegetatívneho rozmnožovania alebo vonkajšími podmienkami, napr. zloženie živného média, pH, povrchové napätie alebo redoxný potenciál [5]. Medzi základné tvary, ktoré bunky kvasiniek nadobúdajú patrí elipsoidný, vajcovitý až guľovitý tvar, menej časté sú tvary valcovité, trojuholníkovité, citrónovité alebo pretiahnuté [5,6]. Povrch kvasinkovej bunky je tvorený silnou a pevnou bunkovou stenou, pod ňou sa nachádza cytoplazmatická membrána a cytoplazma, ktorá obsahuje množstvo membránových štruktúr ako je jadro, mitochondrie, vakuoly, endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát. Cytoplazma niektorých druhov kvasiniek obsahuje aj zásobné látky vo forme zrníčok, napríklad volutín (polymetafosfát), glykogén alebo tuk (*Rhodotorula*) [6].

2.1.1 Metabolizmus kvasiniek

Kvasinky tvoria vysoko heterogénnu a komplexnú metabolickú skupinu. Rovnako ako u iných heterogénnych organizmov aj u kvasiniek je uhlíkový a energetický metabolizmus prepojený, čo znamená, že anabolizmus úzko súvisí s katabolizmom. Molekuly ATP slúžiace ako zdroj energie pre všetky metabolické procesy bunky sa získavajú oxidáciou organických molekúl, ktoré zároveň predstavujú aj zdroj uhlíka pre biosyntézu. V prírode sa nachádza široká škála uhlíkatých látok, ktoré môžu podporiť rast kvasiniek, ale prednostne metabolizujú cukry. Medzi takéto látky patria napríklad polyoly, alkoholy, organické kyseliny a aminokyseliny. Ako zdroj uhlíka sú však najviac využívané cukry vo forme hexóz (glukóza, fruktóza, galaktóza alebo manóza), disacharidy (maltóza, sacharóza), alebo zlúčeniny s domou uhlíkovými atómami ako etanol alebo octan [4,7].

Univerzálnym zdrojom uhlíka pre kvasinky je teda glukóza, ktorá je glykolýzou premenená na pyruvát. Behom glykolýzy bunka produkuje ATP a NADH bez účasti molekulárneho kyslíka. Vo väčšine organizmov je pyruvát transportovaný do mitochondrií, kde je premieňaný na acetyl-CoA a CO₂, a tie sa následne oxidujú v prítomnosti molekulového kyslíka na CO₂ a H₂O. U niektorých kvasiniek však pyruvát vstupuje do alkoholovej fermentačnej dráhy. Obecné je teda možno povedať, že v závislosti na podmienkach môžu kvasinky využívať cukry na fermentáciu alebo dýchacie procesy. Ako príklad možno uviesť kvasinku *Yarrowia lipolytica*, ktorá využíva pyruvát iba pri respirácii, naopak *Saccharomyces cerevisiae* a jej podobné druhy sú prevažne fermentačnými kvasinkami. Proces respirácie je energeticky viac priaznivejší ako fermentácia, preto väčšina organizmov využíva fermentáciu iba vtedy, keď klesá dostupnosť kyslíka. Niektoré druhy kvasiniek, ako už spomínaná *Saccharomyces cerevisiae* a jej podobné, však môžu uprednostňovať fermentáciu aj napriek dostatku kyslíka, čím dochádza ku kvaseniu cukrov za aeróbnych podmienok [4,7].

2.1.2 Rozmnožovanie kvasiniek

Väčšina kvasiniek sa rozmnožuje vegetatívne pučaním alebo delením, existujú však aj niektoré kvasinkové druhy rozmnožujúce sa pohlavne [3].

Vegetatívne rozmnožovanie

Rozmnožovanie pučaním spočíva v tom, že na povrchu materskej bunky sa vytvorí púčik, ktorý sa postupne zväčšuje a narastá. Dochádza k mitotickému rozdeleniu jadra a k fragmentácií bunkových organel, pričom časť prechádza do dcérskej bunky. Akonáhle pupeň dorastie do požadovaných rozmerov, oddeľuje sa od materskej bunky pričom v mieste separácie vzniká na materskej bunke jazva [5,6]. Rozsah zjazvenia indikuje vek bunky, pretože práve počet jaziev korešponduje s počtom dcérskeho buniek, ktoré sa vytvorili na jej povrchu [6]. V oblasti zjazvenia už bunka nie je schopná vytvoriť nový púčik, takže pokiaľ je jej povrch zdeformovaný natoľko, že nemá žiadne nezjazvené miesto, rozmnožovanie kvasiniek sa zastaví [8]. Pokiaľ sú zabezpečené optimálne rastové podmienky, celý proces delenia buniek trvá približne dve hodiny [9]. Podľa miesta výskytu puku na bunke rozdeľujeme pučanie na monopolárne, bipolárne a multipolárne [9].

Ďalšou formou vegetatívneho rozmnožovania kvasiniek je priehradkové delenie, ktoré je typické pre rod *Schizosaccharomyces* [6]. Kvasinkové bunky postupne rastú v smere svojej dĺžky a následne po dosiahnutí požadovaných rozmerov sa jadro mitoticky rozdelí. Jadrá putujú do protiláhlých pólov bunky pričom v strede bunky sa vytvára priehradka (septum) a bunková stena. Tvorbou septa dochádza k rozdeleniu materskej bunky na dve rovnaké dcérske bunky [6].

Pohlavné rozmnožovanie

Okrem nepohlavného rozmnožovania môžeme u viacerých kvasinkových kmeňov pozorovať aj pohlavné rozmnožovanie, pri ktorom sa tvoria pohlavné spóry. U väčšiny kvasiniek vznikajú pohlavné spóry endogénne a bývajú umiestnené vo vreckách alebo askách. Tvar asiiek je charakteristický pre jednotlivé rody a konkrétne aská kvasiniek rodu *Metschnikowia* bývajú dlhé a kyjovité [3]. Kvasinky schopné vytvárať askospóry sa zaraďujú medzi *Ascomycotina* [6]. Niektoré kvasinkové rody naopak vytvárajú pohlavné exospóry, ktoré bývajú umiestnené vnútri sporotvorných buniek. Rody tvoriace exospóry sa zaraďujú medzi *Basidiomycotina* [9].

2.1.3 Kvasinky rodu *Metschnikowia*

Rod *Metschnikowia* z čeľade *Metschnikowiaceae* je tvorený kvasinkovými druhmi, ktoré boli zhromažďované po dobu troch desaťročí naprieč širokými biogeografickými zónami. V súčasnosti je popísaných približne 40 druhov tohto rodu, avšak ich taxonómia nebola úplne preštudovaná [10]. Medzi jednotlivými druhmi rodu *Metschnikowia* existuje pomerne málo rozdielov v ich fyziologických črtách [11]. Kvasinky rodu *Metschnikowia* sa prirodzene vyskytujú voľne v prírode aj vo vodnom prostredí. Vodné druhy bývajú zvyčajne patogénne a môžu sa vyskytovať na telách kôrovcov, rýb prípadne na riasach. Väčšina druhov bolo izolovaných zo suchozemského prostredia, kde bol preukázaný ich bezprostredný výskyt na kvetoch, ovocí, prípadne v kutikulách opelivého hmyzu [12,13].

Kvasinky rodu *Metschnikowia* sa môžu rozmnožovať pohlavne aj nepohlavne. Pohlavné rozmnožovanie je prevažne charakteristické tvorbou predĺžených asiiek, v ktorých dochádza k produkcii jednej alebo dvoch askospór ihlicovitého tvaru. Dlhé ihlicovité askospóry však nie sú typická pre všetky kvasinkové kmene. Príkladom je *Metschnikowia lachancei*, ktorej spóry majú vretenovitý tvar s úzkym rozšírením [10]. Kvasinky sa môžu rozmnožovať aj nepohlavne multilaterálnym pučaním. Vytvárajú sa bunky sférického, hruškovitého alebo kosákovitého tvaru. Vzniknuté pseudohýfy sú väčšinou zle vyvinuté, chýbajú iba zriedkavo. Niektoré kmene kvasiniek *Metschnikowia* majú schopnosť tvoriť dlhé zárodoky pripomínajúce skutočné hýfy [10].

Väčšina druhov kvasiniek rodu *Metschnikowia* využíva ako zdroj uhlíku pre svoj rast sacharózu, galaktózu, trehalózu, maltózu, melezitózu, celobiózu, salicilín, sorbózu, D-manitol, D-glukitol a N-acetyl-D-glukosoamín [14].

Tab. 1: Príklady kvasinkových kmeňov rodu *Metschnikowia* izolovaných zo suchozemského prostredia [14]

	Zdroj	Oblasť výskytu
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	bobule hrozna rastlina pôda	Rakúsko, Nemecko, Grécko, Španielsko, Taliansko, Brazília, Portugalsko, Slovenská republika
<i>Metschnikowia sinensis</i>	bobule hrozna rastlina pôda	Rusko
<i>Metschnikowia viticola</i>	bobule hrozna rastlina	Maďarsko, Rakúsko, Rusko
<i>Metschnikowia lopburiensis</i>	ryža	Lopburi, Thajsko
<i>Metschnikowia saccharicola</i>	cukrová trstina	Suphan Buri, Thajsko

Tab. 2: Príklady kvasinkových kmeňov rodu *Metschnikowia* izolovaných z vodného prostredia [14]

	Zdroj	Oblasť výskytu
<i>Metschnikowia</i> sp.	sediment	Tichý oceán
<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	piesok z pláží morská voda	Florida, USA; Point Reyes, California
<i>Metschnikowia krissii</i>	morská voda	La Jolla, California
<i>Metschnikowia reukafii</i>	sediment	Juhočínske more
<i>Metschnikowia zobellii</i>	morská voda	La Jolla, California, USA; Škótsko
<i>Metschnikowia australis</i>	riasy, morská voda morské bezstavovce	Antarktída

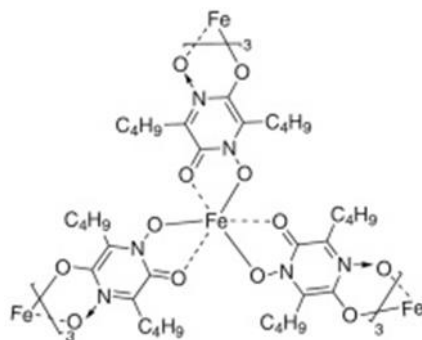
Metschnikowia pulcherrima

Metschnikowia pulcherrima je suchozemská kvasinka, ktorá sa prevažne vyskytuje v častiach rastlinných materiálov bohatých na živiny. Práve tieto časti rastlín ako napr. ovocie, kvety, nektár alebo peľ slúžia ako zdroj potravy pre širokú škálu hmyzu, pomocou ktorého sú kvasinky následne ďalej rozširované [10,15]. Spomedzi rôznych druhov ovocia sú hroznové bobule jedným z najoptimálnejších substrátov pre pôsobenie a rast tejto kvasinky [15]. Okrem rastlinných zdrojov bola prítomnosť *M. pulcherrima* detegovaná aj na tele ľudského pacienta [16]. Rozmnožuje sa pučaním.

Táto kvasinka sa v poslednom čase stáva terčom záujmu vďaka svojím antimikrobiálnym účinkom [17]. Pôsobenie jej širokospektrálnych inhibičných účinkov bolo preukázané voči rôznym mikroorganizmom. *M. pulcherrima* je schopná pôsobiť proti plesniam ako napríklad *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., či *Botrytis cinerea* [10,17]. Najmä z tohto dôvodu vzbudzuje pozornosť pri uplatnení ako prirodzené biokontrolné činidlo, ktoré v súčasnosti nahrádza rôzne pesticídy

a zároveň inhibuje pozberovú hnilobu ovocia [10,16]. Okrem plesní pôsobí *M. pulcherrima* inhibične aj voči rade kvasinkových kmeňov z rodu *Pichia*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Sacharomycodes*, *Torulaspóra* alebo *Brettanomyces* [15].

Antimikrobiálne vlastnosti kvasinky *M. pulcherrima* súvisia najmä s produkciou pulcherimínu, ktorého chemická štruktúra je znázornená na Obr. 1: Chemická štruktúra pulcherimínu Pulcherimín je červený pigment, ktorý nie je rozpustný vo vode ani v organických rozpúšťadlách, rozpúšťa sa iba v alkalických činidlách [18]. Obecné je charakterizovaný ako železitá soľ kyseliny pulcherimovej (2,5-diizobutyl-3,6-dihydroxypyrazin-1,4-dioxid), ktorá s iónmi železa (III) vytvára v rastovom médiu chelátový komplex [16,19]. Tvorba pigmentu úzko súvisí s obsahom železa v médiu, a taktiež závisí aj na type produkčného kmeňa. Okrem kvasinky *Metschnikowia pulcherrima* môže byť pigment produkovaný aj kmeňom *Kluyveromyces marxianus*, či baktériou *Bacillus subtilis* [16,18]. Tvorbou komplexu dochádza k inhibícií rastu baktérií, húb, kvasiniek a klíčeniu spór, čím je zabezpečená ochrana voči pozberovým patogénom [16]. Prekursorom vzniku pulcherimínu je kyselina pulcherimová. Po reakcii so železitými iónmi z média sa okolo kolónií začínajú vytvárať červenohnedé kruhy obsahujúce už spomínaný vo vode nerozpustný komplex železitých iónov a pulcherimovej kyseliny-pulcherimín [19].



Obr. 1: Chemická štruktúra pulcherimínu [20]

Metschnikowia andauensis

Morfologicky aj fyziologicky je *Metschnikowia andauensis* podobná druhu *Metschnikowia pulcherrima*. Ich bunky sú charakteristické guľovitým až oválnym tvarom, pričom sa môžu vyskytovať buď jednotlivo alebo vo dvojiciach. Na tuhých živných pôdach vytvárajú biele až krémové kolónie s hladkým povrchom. Podobne ako u *Metschnikowia pulcherrima* bola produkcia pulcherimínu preukázaná aj kultiváciou *Metschnikowia andauensis* na živných médiách. Ako zdroj uhlíka pre rast u tejto kvasinky môžu byť využité monosacharidy (glukóza), disacharidy (maltóza), oligosacharidy (celobióza) či glykosidy v podobe salicínu [21]. *Metschnikowia andauensis* je kvasinkový druh, ktorého názov bol odvodený od miesta jeho výskytu. Pôvodne bola *Metschnikowia andauensis* vyizolovaná z tiel húseníc a ich exkrementov z oblasti dedinky Andau v Rakúsku [21]. V súvislosti *Metschnikowia andauensis* boli vypracované rôzne štúdie, ktoré sa zmeriavali najmä na jej výskyt a následné možné využitie. Bolo preukázané, že táto kvasinka môže byť izolovaná aj z plodov či listov ovocia a konkrétne bola získaná z epifytických mikroorganizmov nachádzajúcich sa na povrchu jablák a citrusov [22].

Keďže pozberové straty spôsobené činnosťou patogénov predstavujú v súčasnosti veľký problém, cielene sa vyvíjajú metódy, ktoré by účinne a hlavne šetrne k životnému prostrediu boli schopné tieto straty znižovať, prípadne eliminovať. Jednou z týchto metód je aj biologická kontrola, ktorá bola vyvinutá ako alternatíva k používaniu syntetických fungicídnych a chemických prípravkov, pričom ako biokontrolné činidlá boli využívané mikroorganizmy [22]. Medzi skupinu mikroorganizmov pôsobiacich ako biokontrolné činidlá patrí aj *Metschnikowia andauensis*, ktorá pôsobí proti významným

pozberovým patogénom napádajúcich prevažne jablká a citrusové plody. Kvasinka preukázala schopnosť pôsobiť proti *P. expansum*, kedy účinne znižovala výskyt modrej plesne na jablkách a hruškách, a aj proti *P. digitatum* a *P. italicum* ako patogénom citrusových plodov [22].

Metschnikowia fructicola

Rovnako ako u predchádzajúceho kvasinkového druhu, *Metschnikowia fructicola* vykazuje taktiež veľmi podobné morfológické a fyziologické znaky kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*. Často býva označovaná aj ako jej „sesterský“ druh. Kultiváciou na tuhých živných médiách kvasinkové bunky nadobúdajú guľovitý až elipsoidný tvar. Vyskytovať sa môžu buď jednotlivito, vo dvojiciach alebo môžu byť vytvárať menšie zoskupenia. *Metschnikowia fructicola* patrí taktiež do skupiny mikroorganizmov pôsobiacich ako biokontrolné činidlá voči pozberovým chorobám vyvolaných patogénmi. Vyskytuje sa prevažne na bobuliach hrozna, kde inhibuje rast plesne *Botrytis cinerea*, ktorá napáda uskladnené plody a spôsobuje ich hnilobu [10]. Účinok *Metschnikowia fructicola* ako biokontrolného činidla spočíva v stimulácii produkcie reaktívnych metabolitov kyslíka, ktoré sa vytvárajú predovšetkým v povrchových poraneniach plodov a okolo nich. Vysoká produkcia O_2^- kvasinkovými antagonistami vyvoláva v poranenom ovocnom tkanive oxidatívne vzplanutie, čím sa v hostiteľskom organizme aktivujú jeho obranné mechanizmy [23].

2.2 Metódy kultivácie kvasiniek

Kultiváciou kvasiniek sa rozumie ich cielené udržiavanie a rozmnožovanie za laboratórnych podmienok. V rámci kultivácie je potreba mikroorganizmom nahradiť ich prirodzené prostredie, ktoré im pôvodne poskytoval hostiteľský organizmus. Rôzne mikroorganizmy majú rozličné požiadavky na rast, množenie a metabolizmus, a preto je nutné zvoliť vhodné živné médium tak, aby tieto požiadavky splňovalo. Obecne platí, že čím viac bude zloženie kultivačného média podobné jeho prirodzeným podmienkam, tým lepšie bude mikroorganizmus rásť v podmienkach *in vitro* [24].

2.2.1 Kultivačné médiá

Ku kultivácii mikroorganizmov v laboratórnych podmienkach sa používajú sterilné živné médiá a sterilné zariadenia. Zloženie kultivačných živných médií musí vyhovovať požiadavkám daného mikroorganizmu na výživu, pH, osmotický tlak a ďalšie fyzikálno-chemické podmienky. Média by mali byť izotonické a mali by obsahovať zdroj uhlíka a dusíku v koncentráciách a forme optimálnej pre mikroorganizmus, potrebné biogénne prvky, rastové faktory a dostatok vody [24].

Kultivačné médium heterotrofných mikroorganizmov musí okrem biogénnych prvkov a rastových faktorov obsahovať aj zdroj uhlíka. Kvasinky ako chemoorganotrófne organizmy získavajú uhlík a energiu oxidáciou organických zlúčenín, ktoré sa v živných médiách najčastejšie vyskytujú vo forme jednoduchých cukrov alebo polysacharidov. Ďalšou nevyhnutnou súčasťou kultivačných médií je aj dusík. Jeho prítomnosť v médiu je dôležitá najmä z hľadiska syntézy proteínov, aminokyselín, DNA a RNA. Ako zdroj dusíku môžu mikroorganizmy využívať vzdušný dusík, dusitany, dusičnany alebo organické látky ako sú aminokyseliny, peptidy, peptóny až natívne bielkoviny. Pre väčšinu heterotrofných mikroorganizmov, a teda aj pre kvasinky, sú najvhodnejším dusíkatým zdrojom predovšetkým amónne soli. Fungovanie mikroorganizmov si okrem iného vyžaduje aj prítomnosť minerálnych látok, ako sú fosfor vo forme kyseliny fosforečnej a horčík. Spoločne sa podieľajú na prenose energie sprostredkovanou adenosíntrifosfátom, pri nedostatku môže dochádzať k spomaleniu rastu. Do živného média sú pridávané aj biogénne prvky draslík, vápnik, železo, chlór, molybdén, zinok, meď, kobalt, bór a nikel vo forme solí v malých koncentráciách [24].

Najdôležitejšou komponentnou pri príprave kultivačných médií je voda. Priamo ovplyvňuje vývoj, rast a množenie mikroorganizmov, preto je potrebné používať vodu s vysokým stupňom akosti. Destilovaná voda sa používa pri príprave syntetických a špecifických pôd s presne definovaným

zložením, kde sa ako zdroj uhlíka slúži glukóza a zdrojom dusíka je $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ alebo NH_4Cl . Pokiaľ je potreba zabezpečiť mikroorganizmom špecifické požiadavky na stopové prvky používa sa redestilovaná voda alebo deionizovaná voda. Príprava polysyntetických médií alebo médií na špeciálne účely si vyžaduje prídavok peptónov, rôznych extraktov a hydrolyzátov zabezpečujúcich optimálnu výživu mikroorganizmov [24].

2.2.2 Príprava kultivačných médií

Kultivačné médiá sa pripravujú buď zo základných ingrediencií, alebo z komerčne dostupných dehydratovaných prípravkov v nádobách s minimálne dvojnásobným objemom ako je plánovaný obsah médiá. Postupne dochádza k rozpúšťaniu všetkých komponent v destilovanej alebo deionizovanej vode. Následne po rozpustení všetkých ingrediencií sa v médiu upravuje hodnota pH, ktorá je dôležitá pre rast mikroorganizmov. Väčšina mikroorganizmov vyžaduje pre svoj rast médiá s neutrálnou reakciou, niektoré druhy však vyžadujú kyslé prípadne mierne alkalické médiá. Baktérie sú schopné rásť pri pH 7-7,4, kvasinky a mikromycéty vyžadujú slabo kyslé prostredie pH 4,5-6. Hodnota pH sa upravuje v studenom médiu prídavkom 1M hydroxidu alebo kyseliny, pričom typ hydroxidu alebo kyseliny, ktoré majú byť použité určuje samotné zloženie média. Po úprave pH sa banky so živným médium vysterilizujú, behom procesu sterilizácie však môže dochádzať k poklesu pH pôd o 0,1-0,3. Sterilizácia médií sa najčastejšie prevádza autoklávaním pri pretlaku 0,1-0,15 MPa za teploty 121-128 °C. Pokiaľ sú pripravované živné médiá s vysokým obsahom cukrov alebo tepelne labilných látok, k sterilizácii sa využíva prúdiaca para. V Kochovom hrnci alebo autokláve je médium sterilizované pri teplote 100°C po dobu 30 min. tri dni po sebe, pričom ventil pre paru zostáva otvorený [24].

Pri príprave pevných médií sa ako stužovacie komponenty najčastejšie používa agar (15-20g/l), želatína alebo gél kyseliny kremičitej. Vysterilizované kultivačné médiá sú následne v sterilnom boxe v blízkosti kahanu rozlievané na Petriho misky, pričom hrúbka agarovej platne by mala byť 3-4 mm. Platne sa nechajú stuhnúť vo vodorovnej polohe a uchovávajú sa v temnom, bezprašnom, suchom a pokiaľ možno chladnom prostredí. Pre dlhodobé uchovávanie agarových platní je vhodné umiestniť ich do chladničky [25].

2.2.3 Kultivačné zariadenia

Pre kultiváciu kultúr naočkovaných na pevných médiách sa využívajú termostaty prípadne termostatované boxy. Nastavením vhodnej optimálnej teploty pre daný mikroorganizmus dochádza k jeho pomnoženiu. Optimálna teplota pre kultiváciu kvasiniek sa pohybuje v rozmedzí 25-30°C. Aeróbne kultivácie v tekutých pôdach prebiehajú na trepacích zariadeniach [24].

2.2.4 Rastové charakteristiky

Rast a množenie mikroorganizmov môžu byť pozitívne ovplyvnené kultivačnými podmienkami. Všeobecne platí, že pri dodržaní optimálnych podmienok sa mikroorganizmy rozmnožujú vysokou rýchlosťou. Priebeh rozmnožovania sa vyjadruje pomocou rastovej krivky, ktorá predstavuje grafické znázornenie vzrastu počtu živých buniek v závislosti na čase, za optimálnych kultivačných podmienok. Rastovú krivku môžeme teda charakterizovať ako závislosť logaritmu živých buniek prípadne optickej hustoty (osa y) v 1 ml kultúry na čase (osa x) [25].

Rastovú krivku znázornenú na Obr. 2 charakterizujú určité úseky nazývané ako rastové fázy (I-VI):

I. Lag - fáza (adaptačná, prípravná)

Po prenesení kvasinkovej kultúry do čerstvého produkčného média dochádza k zahájeniu začiatku lag-fázy nazývanej aj adaptačná alebo prípravná fáza. V tejto fáze sú bunky aktívne, ale nedochádza k ich množeniu. Počet buniek zostáva konštantný, no môže dochádzať aj k miernemu poklesu buniek, spôsobeného odumieraním. Behom lag-fázy sa bunky prispôbujú novým podmienkam, aktivuje sa ich enzýmový systém, a taktiež sa zvyšuje aj ich metabolická aktivita. Dĺžka lag - fázy závisí na rôznych

faktoroch ako sú napríklad počet životaschopných buniek, prítomnosť poškodených buniek, druh mikroorganizmu, veľkosť a zloženie inokula [25].

II. Fáza zrýchleného rastu

Fáza zrýchleného rastu predstavuje prechodovú fázu medzi lag - fázou a exponenciálnou fázou. Bunky sa už adaptovali na nové prostredie, zvyšuje sa ich rastová rýchlosť a začínajú sa postupne deliť [25].

III. Fáza exponenciálneho rastu (logaritmická, log fáza)

V logaritmickej fáze sú už bunky plne adaptované na nové prostredie, ich generačná doba je najkratšia a behom celej fáze konštantná. V priebehu log-fázy populácia exponenciálne narastá a prakticky nedochádza k žiadnemu odumieraniu buniek. Na konci fázy rýchlosť množenia nadobúda maximálne hodnoty. Exponenciálna fáza je závislá na prístupe živín, bunky sa množia čo najrýchlejšie pokiaľ sú všetky živiny v médiu voľne dostupné. K ukončeniu exponenciálnej fázy dochádza v momente poklesu koncentrácie živín pod určitú hodnotu, prípadne keď sa nahromadia metabolické produkty v takom množstve, že sa naruší stály stav množenia a rastu buniek [25].

IV. Fáza spomaleného rastu

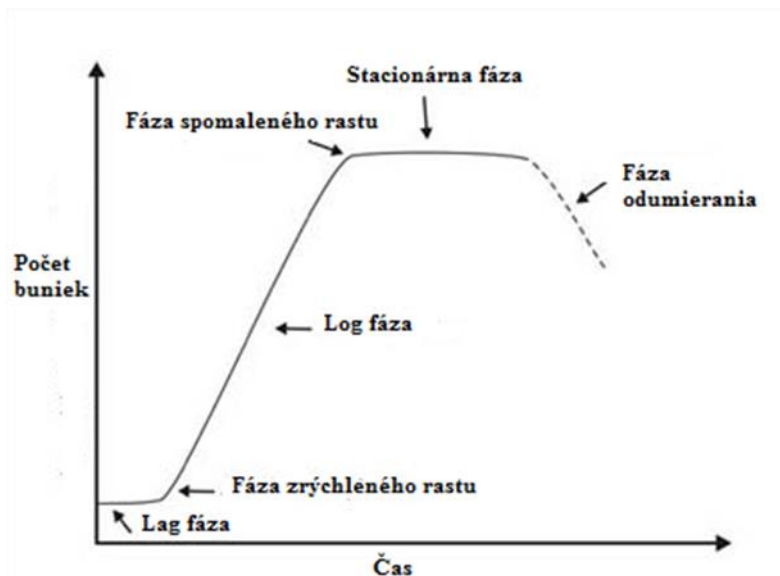
Fáza spomaleného rastu je charakterizovaná ako prechod medzi logaritmickou a stacionárnou fázou. V tejto fáze dochádza k vyčerpaniu živín, takže rast buniek je spomalený a v médiu sa začína vyskytovať čoraz viac odumretých buniek [25].

V. Stacionárna fáza

Stacionárna fáza predstavuje úsek rastovej krivky, kedy je koncentrácia buniek prípadne biomasy konštantná. Bunky vstupujú do stacionárnej fázy po vyčerpaní substrátu z rastového média alebo keď začnú vznikajú produkty metabolizmu inhibujúce rast. Behom stacionárnej fázy sa rast buniek môže spomaliť prípadne až úplne zastaviť. Dĺžka stacionárnej fázy môže byť u rôznych mikroorganizmov odlišná, závisí predovšetkým na ich citlivosti k hladovaniu a miere nepriaznivých podmienok prostredia [25].

IV. Fáza odumierania (fáza poklesu)

Fáza odumierania je spojená so zastavením metabolickej aktivity a s vyčerpaním energetických rezerv, bunky sa prestávajú množiť a postupne prevyšuje počet odumretých buniek. Odumieranie prebieha exponenciálnou rýchlosťou niekoľko týždňov či mesiacov [25].



Obr. 2: Rastová krivka mikroorganizmov [26]

2.3 Lipidy

Lipidy (z gréckeho lipos- tučný) sú heterogénna skupina prirodzene sa vyskytujúcich zlúčenín zahŕňajúca tuky, vosky, steroly, monoglyceridy, diglyceridy, fosfolipidy a ďalšie. Rovnako ako sacharidy a bielkoviny, aj lipidy patria medzi makronutrienty nevyhnutné pre každý organizmus, ktoré plnia radu dôležitých funkcií [27]. Lipidy slúžia predovšetkým ako hlavná zásobná forma energie a uhlíka, a taktiež tvoria aj podstatnú súčasť biologických membrán všetkých organel [27,28].

2.3.1 Mikrobiálna produkcia lipidov

Mikrobiálne lipidy často označované aj termínom „mikrobiálne oleje“ sú intracelulárne zásobné lipidy tvorené prevažne triacylglycerolmi [27]. Schopnosť produkovať a hromadiť lipidy vo svojich štruktúrach majú rôzne organizmy nazývané tzv. oleogénne organizmy, medzi ktoré patria autotrofné mikroorganizmy a heterotrofné kvasinky [27,29]. Za určitých podmienok sú mikroorganizmy schopné produkovať veľké množstvo lipidov, pričom ich akumulácia predstavuje viac ako 20 až 80% z celkovej biomasy [27]. Lipidy produkované mikrobiálne sa v súčasnosti stávajú terčom záujmu najmä kvôli svojmu veľkému potenciálu využitia v biotechnologických aplikáciách. Svoje uplatnenie nachádzajú v rôznych odvetviach priemyslu od potravinárstva, cez chemický priemysel až po výrobu pohonných látok. V potravinárskom priemysle sú široko využívané polynenasýtené mastné kyseliny, ktoré tvoria nevyhnutnú zložku ľudskej výživy a vo veľkom množstve môžu byť produkované práve biotechnologicky pomocou geneticky modifikovaných kvasiniek prípadne určitými zygomycétami. Z metabolizmu lipidov môžu byť ďalej odvodené rôzne špecifické chemické látky s vysokou hodnotou ako napríklad Ω -3 mastné kyseliny, mastné alkoholy alebo karotény, ktoré taktiež možno použiť ako prísady do potravín alebo krmív. Všeobecne môžu byť lipidy naviazané aj na iné biomolekuly. Naviazaním sacharidového reťazca na molekulu lipidu vznikajú glykolipidy. Glykolipidy sú schopné vytvárať biosurfaktanty, ktoré nachádzajú uplatnenie pri bioremediácii znečistených pôd prípadne môžu byť použité aj ako antimikrobiálne látky. Naviazanie lipidovej zložky na proteíny umožňuje vznik lipoproteínov, ktoré sú nevyhnutné pre životaschopnosť eukaryotických buniek a uplatňujú sa aj pri výrobe antifungálnych liekov [27].

V súčasnej dobe sa čoraz viac využívajú lipidy pre produkciu biopalív ako je bionafta či tryskové palivo [27]. Lipidy pre tieto účely sú získavané predovšetkým z olejnatých rastlín, živočíšnych tukov a odpadných olejov z potravinárskeho priemyslu [29]. Predpokladá sa však, že tieto zdroje, vzhľadom na zvyšujúce sa nároky, v budúcnosti nebudú schopné pokryť požiadavky na palivový a chemický priemysel. Navyše používanie jedlých olejov získaných z potravinových zdrojov ako napr. repka, sója či palma olejnatá sa stretáva s nepochopením a kritikou verejnosti. Dôvodom sú najmä obavy z využívania orných pôd určených pre pestovanie plodín slúžiacich na výživu ľudí a bezpečnosti potravín. Keďže svetová populácia neustále rastie, veľkým problémom je zabezpečiť aj zvýšenie výnosnosti plodín tak, aby bola dostatočne pokrytá obživa obyvateľstva. Vyspelé krajiny sa preto čoraz viac snažia o rozvoj bioenergetiky a biopalív, ktoré by boli schopné úplne nahradiť, prípadne znížiť používanie neobnoviteľných zdrojov energie – fosilných palív. Používanie obnoviteľných zdrojov energie súčasne obmedzuje aj emisie skleníkových plynov, ktoré výrazne prispievajú ku klimatickým zmenám. Do budúcnosti sa ako jedny z potenciálnych producentov biopalív javia aj oleogénne mikroorganizmy, a to najmä oleogénne kvasinky, ktoré produkciou lipidov môžu znižovať používanie fosilných palív [29].

2.3.1.1 Oleogénne mikroorganizmy

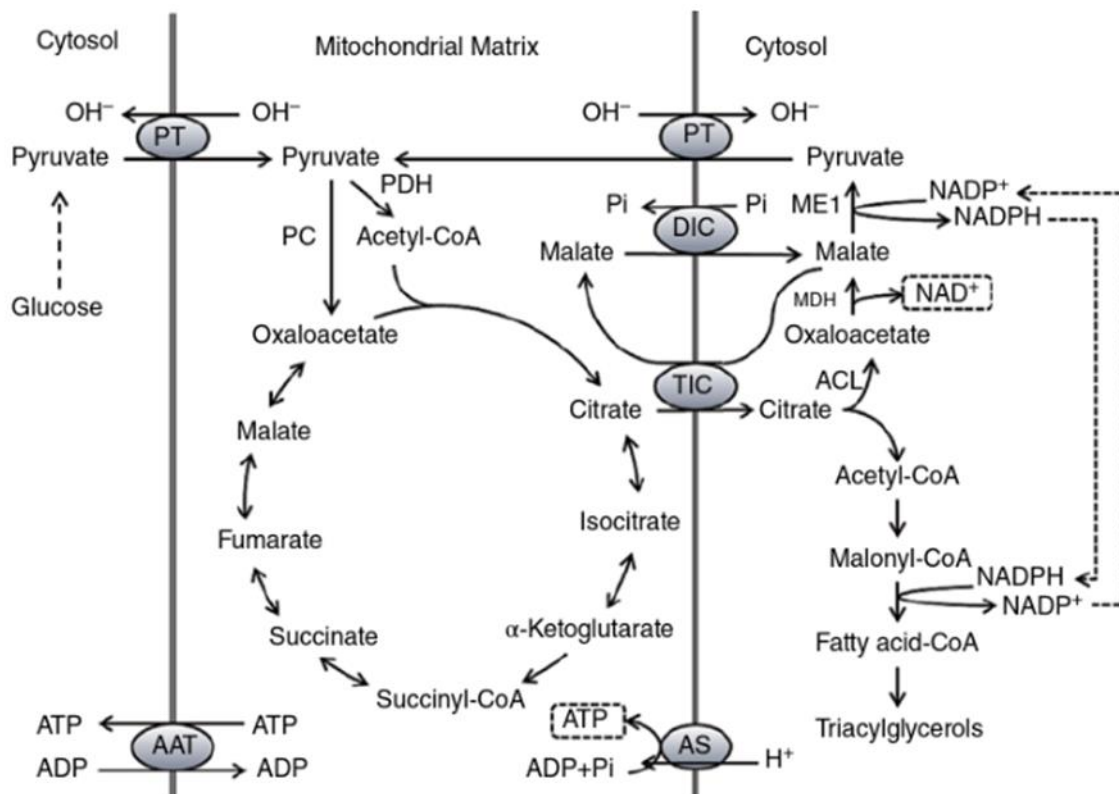
Väčšina oleogénnych mikroorganizmy patriacich do ríše húb boli primárne izolované, aby z rôznych substrátov umožnili produkciu zlúčenín odvodených od lipidov. Následne boli vyvíjané rôzne metódy genetickej modifikácie húb, ktoré mali zlepšiť akumuláciu lipidov v organizme, prípadne by prevádzali neoleogénne huby na organizmy schopné oleje zhromažďovať [27]. Najvýznamnejšími oleogénnymi mikroorganizmami z ríše húb schopných akumulácie viac ako 20% svojej biomasy vo forme lipidov sú ascomycéty, basidiomycéty a zygomycéty. Medzi hlavných zástupcov askomycétnych oleogénnych kvasiniek možno zaradiť kvasinky *Yarrowia lipolytica*, *Lipomyces lipofer* a *Lipomyces starkeyi*, zatiaľ čo bazidiomycétna kvasinky patria prevažne do rodu *Phaffia*, *Rhodotorula/Rhodospiridium* a *Sporobolomyces* [27]. Oleogénne kvasinky patria medzi významných producentov lipidov, ktoré vo forme olejov akumulujú vnútri svojej bunky, zatiaľ čo vláknité huby produkujú skôr dlhšie polynenasýtené mastné kyseliny. Výhoda oleogénnych mikroorganizmov spočíva v ich širokej rozmanitosti používania substrátov. K produkcii a následnej akumulácii lipidov možno využiť okrem glukózy aj xylózu, glycerol, organické kyseliny, polymérne zlúčeniny ako napríklad škrob, alebo hydrofóbne zlúčeniny v podobe alkánov [27].

2.3.2 Biochemický proces akumulácie lipidov v oleogénnych kvasinkách

Množstvo lipidov, ktoré sa získava z oleogénnych kvasiniek je v značnej miere ovplyvnené environmentálnymi podmienkami rastu daného organizmu, a taktiež fyzikálnymi podmienkami ako sú pH, kyslík, teplota alebo koncentrácia stopových prvkov a anorganických solí. V biotechnologickom procese je preto žiadúce, aby bolo definované optimálne kultivačné médium, ktoré bude podporovať rast mikroorganizmov a následnú produkciu lipidov [27,29]. Niektoré druhy oleogénnych kvasiniek majú predispozíciu na nepretržitú produkciu intracelulárnych lipidov, zatiaľ čo drvivá väčšina kvasiniek tvorí lipidy ako stresovú odpoveď, ktorá bola vyvolaná náhlou zmenou prostredia. K samotnému procesu akumulácie lipidov v mikroorganizme dochádza v momente, keď sú z rastového média vyčerpané všetky živiny potrebné pre trvalý rast. Touto živinou býva často dusík, ktorý je potrebný najmä pre replikáciu DNA, syntézu RNA a syntézu bielkovín. Limitáciou dusíkatého zdroja v médiu sa zastavuje proliferácia buniek, postupne sa spomaľuje až obmedzuje rast a rovnako je zastavená aj syntéza nukleových kyselín [29].

Pokiaľ sa však v médiu vyskytuje nadbytok uhlíku napr. vo forme glukózy, toto nadbytočné množstvo sú bunky schopné asimilovať a premeniť na zásobné lipidy, ktoré sa akumulujú vo vakuolách buniek. U niektorých kvasiniek však proces akumulácie nemusí byť obmedzený limitáciou dusíkatého

zdroja. Príkladom je kvasinka *Cryptococcus terricola*, ktorá dokáže akumulovať lipidy už behom svojho exponenciálneho rastu pred samotným vyčerpaním zdroja dusíku z kultivačného média [29]. Kľúčovým medziproduktom biosyntézy mastných kyselín pomocou oleogénnych mikroorganizmov je acetyl-CoA. [27,29]. V porovnaní s neoleogénnymi mikroorganizmami sú oleogénne mikroorganizmy schopné produkovať podstatne väčšie množstvo makroergickej zlúčeniny [29]. Ako primárny zdroj energie môže byť použitá glukóza, ktorá vstupuje do glykolýzy, pomocou ktorej je vo viacstupňovom procese molekula hexózy prevádzaná až na molekulu pyruvátu (Obr. 3). Pyruvát môže následne prejsť do mitochondrií, kde je pomocou cyklu trikarboxylových kyselín (TCA) karboxyláciou katalyzovanou pyruvátkarboxylázou (PC) prevádzaný na oxalacetát, alebo môže byť konvertovaný prostredníctvom pyruvátdehydrogenázy (PDH) na acetyl-CoA. Postupne dochádza k akumulácii citrátu v mitochondriách a pri nadmernom množstve je citrát pomocou trikarboxylátového nosiča prevádzaný z mitochondrií do cytosolu výmenou za malát. V cytosole následne ATP-citrát lyáza štiepi citrát za vzniku oxalacetátu a acetyl-CoA ako počiatočného metabolitu pre syntézu lipidov. ATP-citrát lyáza (ATP-CL) je komplex viacerých enzýmov nachádzajúci sa iba v oleogénnych mikrobiálnych kmeňoch a jej prítomnosť sa využíva ako biologický marker olejnatosti. Pokiaľ limitujeme dusíkaté látky v mikroorganizmoch, ktoré neobsahujú ATP-CL nadbytok intracelulárne vzniknutej kyseliny citrónovej sa vylučuje z bunky do kultivačného média. Produkcia kyseliny citrónovej do média bola pozorovaná u plesne *Aspergillus niger* a u kvasinky *Candida sp.* a napomohla ďalšej klasifikácii či už kvasiniek alebo iných húb do skupiny organizmov schopných akumulovať lipidy alebo do skupiny organizmov schopných produkovať kyselinu citrónovú. Vzniknutý acetyl-CoA v oleogénnych organizmoch pokračuje ďalej procesom lipogenézy a zvyšný oxalacetát je v cytosole prevádzaný pomocou malátu späť na pyruvát, pri reakcii je generovaný CO_2 a NADPH. Premenu malátu na pyruvát katalyzuje prítomnosť jablčného enzýmu, ktorý zároveň kontroluje hladinu akumulácie lipidov. Jablčný enzým môže opakovane vstúpiť do TCA a generovať redukčné činidlo NADPH potrebné k predĺženiu alkylového reťazca mastnej kyseliny. Rovnako ako ATP-citrát lyáza aj jablčný enzým zabezpečuje olejnatosť mikroorganizmov [29].

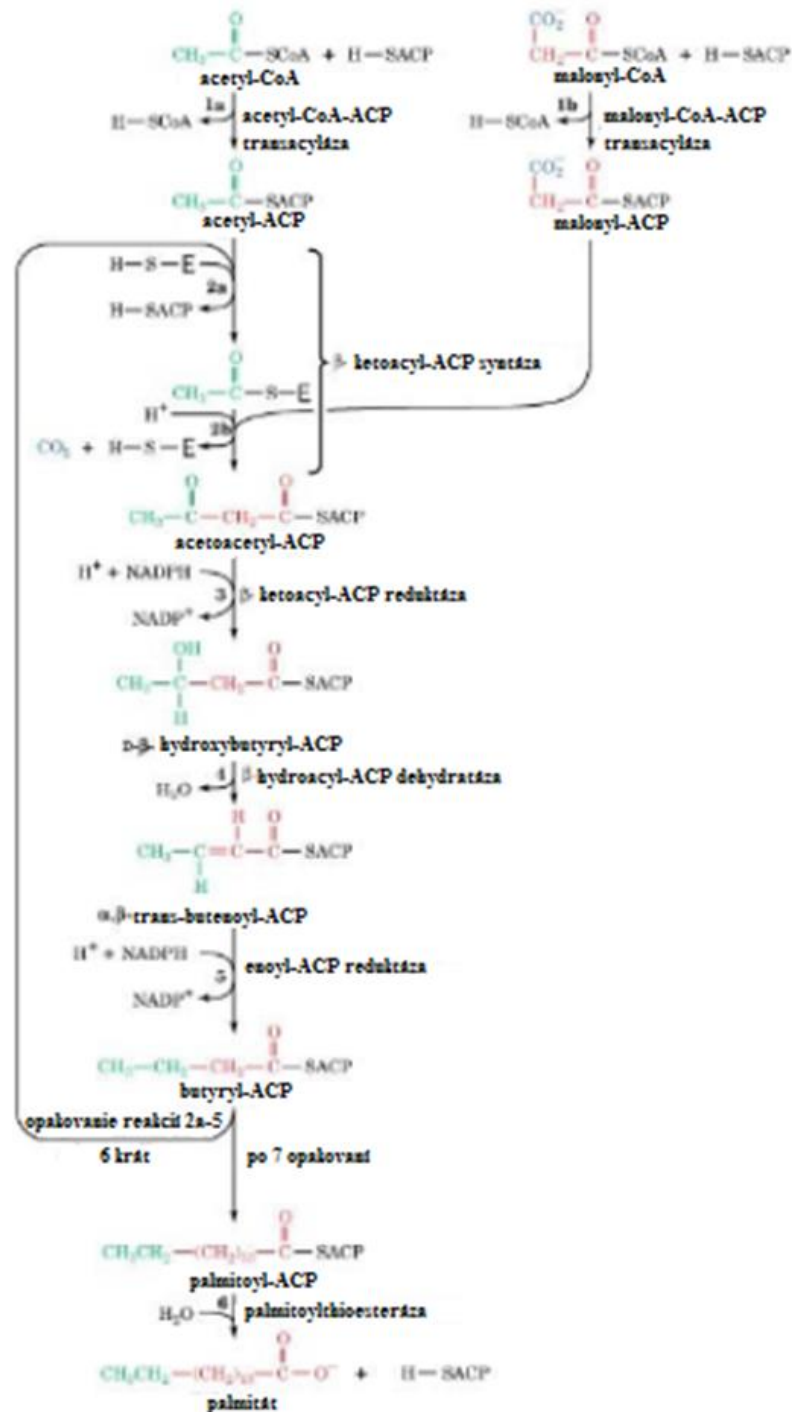


Obr. 3: Biosyntéza triacylglycerolov oleogénnymi kvasinkami [29]

Samotný proces biosyntézy mastných kyselín z acetyl-CoA prebieha v cytoplazme po reverznej β -oxidácii. Z acetyl-CoA (Obr. 4) je pomocou acetyl-CoA-karboxylázy syntetizovaný ATP závislý substrát malonyl-CoA, pričom reakcia je katalyzovaná multifunkčným enzýmovým komplexom - syntáza mastných kyselín (FAS komplex). Reakcia premeny acetyl-CoA je závislá na ATP a vyžaduje prítomnosť biotínu pre fixáciu CO_2 . Hlavnou funkciou FAS-u je predlžovanie reťazca acetyl-CoA o dva uhlíky pričom v každom kroku sa spotrebuje redukčné činidlo NADPH. Syntéza zvyčajne začína z acetyl-CoA pričom vznikajú mastné kyseliny s párnym počtom uhlíkov, pokiaľ sa však použije napríklad propionyl-CoA vznikajú mastné kyseliny s nepárnym počtom uhlíkatých atómov [27,28].

Za katalýzy acetyl-CoA-ACP-transacylázy je fragment acetyl-CoA prenášaný na ACP syntázu mastnej kyseliny za vzniku reaktívnejšej častice acetyl-ACP. Následne je acetylový zvyšok z ACP prenesený na cysteínový zvyšok viazaný na enzýmovom komplexe syntázy mastných kyselín (FAS komplex) pričom dochádza k uvoľneniu ACP. Druhý krok biosyntézy je katalyzovaný enzýmom malonyl CoA-ACP-transacyláza a dochádza k prenosu malonátu z malonyl-CoA na ACP. Vzniknutý malonyl-ACP je pomocou konjugačných enzýmov pripojený na komplex FAS, ktorý obsahuje acetyl z acetyl-CoA. Kondenzáciou acetyl-CoA a malonyl-ACP vzniká acetoacetyl-ACP, pri reakcii katalyzovanej β -oxoacyl-ACP-syntházou sa uvoľňuje CO_2 čím dochádza k dekarboxylácii. Pôvodný acetyl-CoA obsahujúci 2 uhlíky je pomocou malonyl-CoA predĺžený o dva uhlíky pričom jeden uhlík sa odštiepuje vo forme CO_2 . Následnými reakciami je acetoacetyl-CoA na komplexe FAS ďalej spracovávaný. Prostredníctvom β -oxoacyl-ACP-reduktázy sa redukuje za vzniku β -D-hydroxybutyryl-ACP, ktorý podlieha dehydratácii katalyzovanej β -hydroacyl-ACP-dehydratázou a vzniká α - β -trans-butenoyl-ACP. Redukciou α - β -trans-butenoyl-ACP za katalýzy enoyl-ACP-reduktázy na butyryl-ACP. Behom tejto reakcie dochádza k oxidácii NADPH na NADP. Uhlíkatý reťazec (butyryl) naviazaný na ACP sa prenáša na cysteínový zvyšok a cyklus reakcií sa opakuje 6 krát. Zakaždým sa reťazec predĺži o 2 atómy uhlíka získaných z malonyl-CoA. Na konci 7. cyklu je reakcia kompletná a produkuje sa 16-uhlíkatá nasýtená mastná kyselina – palmitát, naviazaný na ACP. Za hydratácie a následnej katalýzy

palmitoylthioesterázou sa palmitát oddeľuje z komplexu FAS, čím sa ukončuje syntéza palmitátu [28,30].



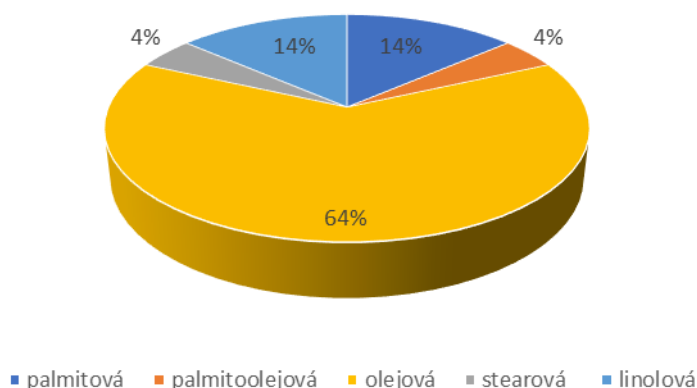
Obr. 4: Biosyntéza mastných kyselín [30]

2.3.3 Profil lipidov produkovaných oleogénnymi mikroorganizmami

Lipidický profil bionafy môže byť rôzny a líši sa v závislosti od typu producenta. Pokiaľ sa na výrobu použijú suchozemské plodiny, profil je relatívne jednoduchý. Prevažnú väčšinu tvoria C16-C20 mastné kyseliny pričom majoritné zastúpenie má palmitová kyselina, stearová kyselina, olejová kyselina, kyselina linolenová a eruková kyselina. Väčšiu variabilitu vykazujú lipidy produkované mikroriasami,

pričom obsah mastných kyselín je závislý na type použitej riasy a na kultivačných podmienkach. Lipidy mikrorias bežne obsahujú C6-C24 reťazce a prítomné môžu byť aj nenasýtené estery so šiestimi dvojitými väzbami. Hlavnou zložkou mikrobiálnych lipidov sú rovnako ako u rastlinných olejov triacylglyceridy, okrem nich však môžu obsahovať aj voľné mastné kyseliny, neutrálne lipidy (mono- a diglyceridy), steroly, uhľovodíky a polárne lipidy (fosfolipidy, sfingolipidy, glykolipidy). Lipidy produkované oleogénnymi kvasinkami sú tvorené C16 a C18 mastnými kyselinami (Obr. 5). Zastúpenie kyseliny palmitovej (C16) predstavuje približne 15-25% celkových lipidov, zatiaľ čo palmitolejová kyselina (C16:1) tvorí menej ako 5% hmotnosti lipidov. Najväčšie zastúpenie v bunkách kvasiniek má kyselina olejová (C18:1), ktorá tvorí až 70% hm. V pomerne menšom zastúpení sa vyskytuje stearová kyselina (C18:0) v koncentráciách 5-8% hm. a kyselina linolová (C18:2) 15-25% hm. Polynenasýtené mastné kyseliny ako napr. kyselina α -linolenová (C18:3) v oleogénnych kvasinkách nie je bežne produkovaná. Zloženie lipidov je však veľmi relatívne a môže kolísať v závislosti na druhu kvasiniek prípadne aj v závislosti na rôznych kmeňoch. Profil mastných kyselín ovplyvňujú aj podmienky prostredia, fáza rastu daného mikroorganizmu či substrát. Všeobecne oleje vyprodukované kvasinkami majú podobný profil ako rastlinné oleje (napr. repkový a slnečnicový), čím sa stávajú vhodnou náhradou za vstupnú surovinu pre výrobu biopalív [29].

Profil mastných kyselín produkovaných oleogénnymi kvasinkami



Obr. 5: Približné zastúpenie mastných kyselín produkovaných oleogénnymi kvasinkami

2.4 Lipolytické enzýmy

Lipázy označované tiež ako triacylglycerolacylhydrolázy (EC 3.1.1.3) patria do skupiny enzýmov katalyzujúce úplnú alebo čiastočnú hydrolýzu tukov a olejov na voľné mastné kyseliny, diacylglyceroly, monoacylglyceroly a glycerol. Za určitých podmienok sa môžu účastniť aj pri rôznych syntetických reakciách ako je esterifikácia, transesterifikácia, aminolýza v organických rozpúšťadlách a laktonizácia [31,32].

2.4.1 Lipázy v priemysle

V súčasnosti sú lipázy podrobne skúmané najmä vďaka ich potenciálnemu využitiu v priemyselných aplikáciách [31]. Uplatnenie našli v rôznych odvetviach od potravinárskeho priemyslu až po výrobu biopalív, liečiv, v kozmetickom a textilnom priemysle kde môžu pôsobiť ako katalyzátory vysokej špecifickosti a selektivity [33,34]. Pre potravinársky priemysel majú lipázy dôležitý význam ako modifikátory chuti, náhrady emulgátorov, pri výrobe vína sa podieľajú na tvorbe charakteristických esterov, využívajú sa aj pri syntéze štruktúrnych lipidov, mliečnych tukov a pri zraní syra [34].

Kozmetický priemysel využíva ich schopnosť fungovať ako aktívne zložky alebo ako biokatalyzátory pri produkcii kozmetických chemikálií najmä esterov, aromatických zlúčenín a účinných látok [35].

2.4.2 Mikrobiálni producenti lipáz

Príroda poskytuje širokú biodiverzitu mikrobiálnych zdrojov a ich biokatalytický potenciál bol už po stáročia využívaný pri výrobe chleba, vína, octu a ďalších bežných produktov. Enzýmy produkované mikroorganizmami sa postupne stali terčom záujmu využitia najmä v priemysle a medicíne. Zvýšená pozornosť venovaná mikrobiálnym enzýmom je podmienená radou ich pozitívnych vlastností ako je napr. stabilita a katalytická aktivita. Ďalším faktorom, ktorý podmieňuje záujem o aplikáciu týchto látok súvisí aj s výrobou a optimalizáciou, ktorá je podstatne ľahšia v porovnaní s enzýmami získavanými z rastlinných alebo živočíšnych zdrojov [34,36].

Lipázy sú široko rozšírené v prírode a môžeme ich nájsť v jednobunkových aj mnohobunkových organizmoch. Medzi hlavných producentov lipáz patria rôzne rastliny, zvieratá a mikroorganizmy. Z hľadiska mikrobiálnej produkcie priemyselných enzýmov a ich následnej aplikácie sú však za jedny z najdôležitejších zdrojov týchto látok považované práve kvasinky, baktérie a rôzne huby. Množstvo extracelulárne produkovaných lipáz je vždy individuálne a závisí najmä na výbere kmeňa, zložení rastového média a kultivačných podmienkach. Ďalšími nemenej dôležitými faktormi, ktoré ovplyvňujú produkciu lipáz sú zdroje uhlíka a dusíka, teplota a pH prostredia [37]. Výskyt kvasiniek produkujúcich lipázy nazývaných aj lipolytické kvasinky bol preukázaný najmä v lokalitách kontaminovaných olejom. Zdrojom týchto kvasiniek môže byť napr. pôda kontaminovaná olejom, prípadne odpady z tovární produkujúce rastlinné oleje, mliečne odpady, olejnaté semená alebo rozkladajúce sa potraviny [38]. Prehľad niektorých mikrobiálnych producentov lipáz a ich následne využitie v priemysle je uvedené v Tab. 3.

Tab. 3: Mikrobiálni producenti lipáz a ich aplikácia v potravinárskom priemysle [34]

Zdroj	Aplikácia v potravinárskom priemysle
<i>Aspergillus oryzae</i>	Syntéza nasýtených mastných kyselín
<i>Bacillus subtilis</i>	Výroba chleba
<i>Candida antarctica</i>	Obohatenie olejov a tukov
<i>Chromobacterium Viscosum</i>	Syntéza aromatických a chuťových látok
<i>Candida rugosa</i>	Náhrada tuku v ľudskom mlieku
<i>Candida lipolytica</i>	Zrenie syra, produkcia mastných kyselín
<i>Humicola lanuginosa</i>	Nehydrogenované tuhé tuky
<i>Penicillium camembertii</i>	Produkcia glycerolglykolipidov Syntéza nasýtených triacylglyceridov
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Nehydrogenované tuhé tuky
<i>Pseudomonas sp.</i>	Spracovanie potravín a výroba oleja
<i>Rhizomucor javanicus (meih)</i>	Nehydrogenované tuhé tuky
<i>Penicillium roquefortii</i>	Vývoj vône v mliečnych produktoch Zrenie syra
<i>Rhizomucor miehei</i>	Obohatenie olejov a tukov Náhrady kakaového masla
<i>Mucor miehei</i>	Syntéza bioaktívnych molekúl Obohatenie olejov a tukov Náhrady kakaového masla Syntéza bioaktívnych molekúl
<i>Candida rugosa</i>	Zrenie syra

2.4.3 Faktory ovplyvňujúce produkciu lipáz

Činnosť mikroorganizmov býva veľmi často ovplyvňovaná prostredím, v ktorom žijú. Behom svojho pôsobenia môžu byť vystavené rôznym nutričným či fyzikálnym podmienkam, ktoré istým spôsobom dokážu modifikovať výťažnosť produkcie lipáz, či už indukciou alebo potlačením syntézy enzýmov. Každý mikroorganizmus vyžaduje iný zdroj uhlíka, aby bol schopný nasyntetizovať enzýmy v čo najväčšom množstve. Pri príprave kultivačného médiá je preto vždy potrebné vybrať vhodné uhlíkaté a dusíkaté zdroje tak, aby bol podporený predovšetkým rast mikroorganizmov, a aby boli výtázky produktu čo najvyššie [39,40].

Zdroj uhlíku

Mikrobiálne lipázy, patriace väčšinou do skupiny induktívnych extracelulárnych enzýmov, sú primárne produkované za prítomnosti zdroja uhlíku v podobe lipidických substrátov ako sú oleje, triacylglyceroly, masné kyseliny, hydrolyzovateľné estery, tweeny prípadne glycerol. So zvyšujúcou sa koncentráciou lipidov sa zvyšuje aj aktivita intra- a extracelulárnych lipáz. Aj napriek tomu, že nadmerné množstvo lipidov v substráte môže byť cytotoxické, zdroj lipidového uhlíku sa javí ako nevyhnutná zložka pre dosiahnutie vysokých výťažkov lipolytických enzýmov. Toto pravidlo však neplatí u všetkých mikrobiálnych druhov. Aj napriek tomu, že lipidický substrát môže zvýšiť hladinu vyprodukovaných enzýmov, nie vždy je tvorba enzýmov závislá práve na pridaní toho substrátu do kultivačného médiá [40].

Ako vhodné médiá pre produkciu lipáz s čo najvyššími výtázkami sa ukázali aj rastlinné oleje. Obecne je známe, že s rastúcim zastúpením esterov masných kyselín C18:n v príslušnom oleji sa zvyšuje aj syntéza lipáz. Spomedzi rastlinných olejov vykazoval najlepšie indukčné účinky na produkciu enzýmov práve olivový olej, pretože s vyšším obsahom nenasýtených masných kyselín v oleji sa zvyšovala aj intracelulárna a extracelulárna aktivita lipáz [40]. Na produkciu lipolytických enzýmov môže pozitívne vplyvať aj obsah iných uhlíkatých substrátov ako napríklad glukóza, cukerné alkoholy, polysacharidy, srvátka či ďalšie komplexné zdroje. Samotné jednoduché cukry ako zdroj uhlíku však ale nie sú moc využívané, skôr sa používajú už spomínané lipidové substráty [40,41].

Zdroj dusíku

Tvorba lipáz je častokrát závislá aj na zdroji použitého dusíku. Pozitívny vplyv na produkciu lipáz bol zistený napríklad u kvasinkového kmeňa *Candida* pri použití kazeínu, sójovej múčky či síranu amónneho [42]. Väčší stimulačný účinok na produkciu lipáz bol pozorovaný aj u kvasinky *Yarrowia lipolytica* pri použití komplexných organických zdrojov dusíku ako peptónu a tryptónu [43]. Použitie anorganických alebo organických dusíkatých zdrojov však nezabezpečuje výhradne iba pozitívne účinky v procese tvorby lipolytických enzýmov. Z hľadiska produkcie lipáz môže prítomnosť dusíkatých látok u niektorých mikroorganizmov pôsobiť aj inhibične. Tento jav bol pozorovaný u baktérii *Pseudomonas gessardii*, *Bacillus sp.* a plesne *Penicillium citrinum* kedy po pridaní močoviny, chloridu amónneho, síranu amónneho bola tvorba lipáz značne inhibovaná [44,45].

pH a teplota

Teplota a pH sú ďalšími nemenej dôležitými faktormi ovplyvňujúce produkciu lipolytických enzýmov. Hodnoty týchto parametrov sa môžu u jednotlivých mikroorganizmov značne odlišovať, závisí to predovšetkým na type producenta a na prostredí, v ktorom sa vyskytuje [46].

Lipázy sú aktívne v širokom rozmedzí pH a teploty. Obecne sa stability týchto enzýmov približne pohybujú v hodnotách pH 4-11, pričom za najoptimálnejšiu hodnotu je považované neutrálne pH. Z hľadiska teplotných stabilití môžu byť lipázy produkované pri teplotách pohybujúcich sa od 10 až do

96 °C 46. Napríklad najvyššia produkcia lipáz u kvasinky *Yarrowia lipolytica* bola zaznamenaná pri dodržaní teplotných podmienok 20°C a pH 6,0, zatiaľ čo pre kvasinku *Kluyveromyces marxianus* boli ako najlepšie podmienky pre produkciu enzýmu stanovené teploty 32,5°C a pH 6,4 [47,48].

2.5 Odpadné substráty

Odpad z rôznych odvetví a najmä potravinárskeho priemyslu predstavuje pre ľudstvo čoraz väčšiu globálnu výzvu kvôli svojej nestabilnej povahe a nadmernému hromadeniu sa. Keďže množstvo odpadu sa rapídne zvyšuje úmerne s rýchlym nárastom svetovej populácie a ekonomiky, v súčasnosti sa stáva terčom záujmu snaha o jeho následné zhodnocovanie a konverziu na produkty s pridanou hodnotou či energiu [49,50]. Postupne sú rozvíjané nové smery, ktoré by namiesto nákladnej likvidácie odpadu mohli zlepšovať kvalitu vyradeného materiálu pomocou bežného spracovania alebo biotechnológií [51]. Odpadné substráty sa vyznačujú svojou bohatou organickou povahou, čím predstavujú jeden z najbohatších zdrojov energie. Každoročná akumulácia veľkého množstva organickej biomasy vedie k zhoršeniu životného prostredia a k strate potenciálne cenného materiálu, ktorý by mohol byť použitý v produkcii látok s pridanou hodnotou [52]. Predpokladá sa, že množstvo zásobnej energie obsiahnutej v odpadoch, by v budúcnosti mohlo byť dostačujúce pre uspokojenie energetických potrieb ľudstva. Biotechnologickou výrobou chemikálií, farmaceutických výrobkov, pohonných hmôt a energie z lacných a ľahko dostupných odpadných surovín sa výrazne zníži naša závislosť na neobnoviteľných zdrojoch energie ako sú ropa či palivá na báze uhlia [50,52].

Poľnohospodárske plodiny ako ryža, kukurica, pšenica a iné obilniny, cukrová repa a trstina či zemiaky, primárne určené ako substrát pre potravinársky priemysel, sa dnes využívajú v škrobových a cukrových rafinériách s cieľom produkcie čistých uhl'ohydrátových surovín (škroby, sacharidy atď.). Nemenej významné je však aj ich použitie v priemyslových fermentačných procesoch, ktoré tieto suroviny prevádzajú na cenné chemické produkty ako biopalivá, bioetanol, či organické rozpúšťadlá ako biobutanol [52]. Významnými substrátmi sú aj odpadné živočíšne tuky, rastlinné oleje či lignocelulóзовé materiály. Utilizáciou lignocelulózy hubami možno dosiahnuť produkciu enzýmov, energie alebo krmív s lepšou stráviteľnosťou pre zvieratá. Zároveň slúžia aj ako zdroj pre biosyntézu priemyslovo významných produktov ako je glukóza, fruktóza, 5-HMF, či už spomínaného bioetanolu a biobutanolu [51]. Práve všetky tieto spomenuté vedľajšie alebo odpadné produkty sú hlavným zdrojom živín pre mikroorganizmy, ktoré hrajú dôležitú rolu pri nakladaní s odpadmi. V biotechnologickom procese sa využívajú pri recyklácii živých materiálov a spracovaní priemyselného odpadu. Keďže všetky prírodne vyrábané látky sú biologicky odbúrateľné, predpokladá sa, že môžu byť rozkladané živými organizmami ako sú baktérie, kvasinky a huby. Mikroorganizmy využívajú odpadné substráty na produkciu požadovaných produktov [53].

2.5.1 Srvátka

Srvátka je žltozelené kvapalné mliečne sérum, ktoré vzniká ako vedľajší produkt pri výrobe syrov alebo kazeínu z mlieka. Nažltlá farba srvátky je spôsobená obsahom riboflavínu (vitamínu B2). Podľa spôsobu spracovania, ktorý sa používa pri odstraňovaní kazeínu z mlieka rozlišujeme dva hlavné typy srvátky - sladká a kyslá. Sladká srvátka má pH približne 5,6 a získava sa pri výrobe väčšiny druhov syrov a niektorých kazeínových výrobkov, zatiaľ čo pH kyslej srvátky sa pohybuje okolo 4,5. Oba druhy srvátky sa líšia v obsahu minerálnych látok, pH a zložení frakcie srvátkových proteínov. Hlavnou zložkou sladkej a kyslej srvátky je voda, ktorá tvorí približne 93% celkového objemu. Druhou najviac zastúpenou zložkou srvátky je laktóza s obsahom 70-72%, srvátkové bielkoviny predstavujú 8-10% a minerálne látky tvoria 12-15% z celkového obsahu pevných látok. Chemické zloženie srvátky sa líši v závislosti na type použitého mlieka a spôsobe spracovania srvátky [54]. Srvátka patrí medzi vysoko

znečisťujúce vedľajšie produkty pochádzajúce z potravinárskeho priemyslu, ktoré zaťažujú životné prostredie. V posledných desaťročiach sa preto biotechnologický výskum zameriava na využitie srvátky ako odpadného substrátu k produkcii komodít s pridanou hodnotou. Laktóza prítomná v srvátke môže slúžiť ako zdroj uhlíka pre rast a syntézu mnohých produktov v rôznych biotechnologických procesoch. Biokonverziu srvátky prípadne laktózy možno produkovať bioetanol, ocot, antibiotiká (nisín), povrchovo aktívne látky ako soforolipidy, polyhydroxyalkanáty (PHA), prípadne kyselinu mliečnu vo forme kyseliny polymliečnej (PLA) [54].

2.5.2 Odpadný glycerol

Glycerol (alebo glycerín) vzniká ako vedľajší produkt pri výrobe bionafty, bioetanolu a oleo-chemikálií. Prirodzene sa vyskytuje v živočíšnych tukoch a olejoch vo forme triglyceridov, ktoré sú tvorené tromi mastnými kyselinami spojenými s tromi hydroxylovými skupinami glycerolu cez esterovú väzbu. V priemyselných aplikáciách je glycerol izolovaný z molekúl triacylglyceridov rozštiepením esterových väzieb chemickými alebo biologickými procesmi. Následne sa mastné kyseliny prítomné v triglyceridoch môžu previesť na iné látky, napríklad zmydelnením na mydlo alebo transesterifikáciou na bionaftu. Priemysel výroby biopalív je hlavným zdrojom hromadenia surového glycerolu, ktorý obsahuje množstvo nežiadúcich prímiesí. Čistenie surového glycerolu je veľmi nákladné a nevhodné, čo sa odráža aj na cene čistého glycerolu, ktorá je v súčasnosti pomerne vysoká. Čistý glycerol sa používa pri výrobe potravín, nápojov, liečiv či kozmetiky [55].

Konverzia glycerolu na produkty s vyššou hodnotou môže byť realizovaná buď biologickými alebo chemickými premenami. Obecne sú uprednostňované skôr biologické premeny, pretože pri nich vzniká menej chemických kontaminantov, konverzie prebiehajú pri vyšších reakčných špecifikách, nižších teplotách a tlaku. Surový glycerol získaný biotransformáciou zároveň slúži ako zdroj uhlíka pre mikrobiálne fermentácie. Niektoré mikroorganizmy sú schopné využívať glycerol ako substrát pre syntézu vysoko hodnotných chemikálií ako 1,3-propándiol, jantárová kyselina, propiónová kyselina, biosurfaktanty či polyhydroxybutyráty (PHB) [55].

2.5.3 Odpadný živočíšny tuk

Odpadný živočíšny tuk patrí medzi jeden z mnohých vedľajších produktov mäsového priemyslu, ktoré sú produkované behom porážky zvierat. Ako vedľajšie produkty možno definovať časti tela zvierat, ktoré nie je možné predávať ako mäso prípadne mäsové výrobky. Len v európskych štátoch je ročne spracovávaných približne 16 miliónov ton medziproduktov mäsovej výroby pričom poprednými spracovateľmi sú krajiny ako Nemecko, Francúzsko, Spojené kráľovstvo a Španielsko. Vznikajúce medziprodukty možno rozdeliť do 3 kategórií. Vedľajšie živočíšne produkty z kategórie 1 sú považované za najviac rizikové a platia pre ne najprísnejšie bezpečnostné predpisy. Keďže táto kategória zahŕňa ďalej aj materiály, ktoré boli kontaminované nečistotami pochádzajúcimi z environmentálneho prostredia, je povolené používať ich výhradne na výrobu energie. Pod kategóriu 2 spadajú vedľajšie produkty z bitúnkov a telá mŕtvych zvierat a môžu sa uplatňovať na technické účely. Do poslednej tretej kategórie je zaradený materiál pochádzajúci zo zvierat zabitých na ľudskú spotrebu, ale zároveň je považovaný za vedľajší produkt, ktorý nie je určený na ľudskú spotrebu. Odpadný živočíšny tuk z kategórie 3 môže byť použitý na kŕmne účely, pri výrobe náterov, čistiacich prostriedkov, lepidiel, v kozmetickom priemysle na výrobu mydiel, šampónov či iných kozmetických prostriedkov. Čoraz viac však živočíšny tuk nachádza uplatnenie pri výrobe energie a v olechemickom priemysle pri výrobe bionafty. Bionafta následne slúži buď ako obnoviteľné alternatívne palivo, nahrádzajúce naftu získavanú z fosílnych palív, alebo sa môže použiť ako doplnok fosílnych palív. V súčasnosti sa spoločnosť vo všetkých priemyselných odvetviach snaží o čo možno najväčšiu minimalizáciu odpadu. Výnimkou nie je ani mäsový priemysel, kde vznikajúci odpadný materiál môže byť ďalej premieňaný na produkt s pridanou hodnotou. S tým súvisí aj možnosť využitia

živočišnych tukov, pokladajúcich sa za jednu z najudržateľnejších surovín pre produkciu bionafty, ktorá v porovnaní s fosílnymi palivami znižuje emisie oxidu uhličitého až o 88% [56].

2.6 Plynová chromatografia

Plynová chromatografia patrí medzi hlavné analytické techniky separácie zmesí zlúčenín na jednotlivé zložky, ich následnú detekciu, identifikáciu a kvantitatívne stanovenie. Výstupom chromatografickej analýzy je chromatogram (grafický obraz), ktorý obsahuje informácie o výškach a plochách pík, ich molekulárnej identite atď [57,58]. Systém plynovej chromatografie je tvorený dvoma fázami : inertným nosným plynom nazývaným aj mobilná fáza a nemiešateľnou stacionárnou fázou (kvapalná alebo tuhá), ktorá je umiestnená v kolóne. Princípom GC je separácia analytov medzi mobilnú a stacionárnou fázou v závislosti na ich afinite k obom fázam. Zlúčeniny, ktoré teda majú vyššiu afinitu k stacionárnej fáze sú v systéme zadržované dlhšie a eluujú sa neskôr [59]. Na analýzu pomocou GC sú vhodné iba tie zlúčeniny, ktoré sa môžu odpariť aj bez rozkladu. Patrí sem väčšina rozpúšťadiel, pesticídov, esenciálne oleje, uhľovodíkové palivá či mnohé lieky. U niektorých zlúčenín ako napríklad kyseliny, aminokyseliny, amidy, mastné kyseliny, fenolické látky, vitamíny, sacharidy a steroidy je potreba často previesť derivatizáciu, čím sa zvýši ich prchavosť [60]. Plynová chromatografia sa ukázala byť účinnou, flexibilnou a citlivou technikou, ktorá je široko využívaná aj v aplikáciách určených na analýzu vzoriek potravín [57,58]. Jedná sa predovšetkým o kvantitatívnu alebo kvalitatívnu analýzu zloženia potravín, prírodných produktov, potravinárskych aditív či aromatických látok. Táto technika sa sústreďuje aj na identifikáciu a kvantifikáciu rôznych kontaminantov ako sú pesticídy, fumiganty, veterinárne liečivá, enviromentálne kontaminanty a iné, ktoré by sa v potravinách mohli objaviť ako nežiadúce reziduá [57,58]. Plynová chromatografia je štandardnou a pravdepodobne najvhodnejšou technikou na analýzu profilu mastných kyselín či už jednoduchých alebo komplexných vzoriek. S použitím plameňovo ionizačného detektoru (FID) je možné dosiahnuť presnú kvantifikáciu derivátov mastných kyselín ako sú napríklad methylestery mastných kyselín (FAME). Spojením GC-FID sa ďalej analyzujú aj voľné mastné kyseliny (FFA) a parciálne acylglyceroly ako sú monoacylglyceroly (MAG) alebo diacylglyceroly (DAG) [61].

2.6.1 Inštrumentácia plynovej chromatografie

Inertný nosný plyn nepretržite prúdi zo zdroja cez vstrekovací otvor, kolónu a detektor, pričom jeho prietok je regulovaný aby sa zaistili reprodukovateľné retenčné časy a minimalizoval sa posun detektora [62]. Zdrojom nosného plynu (mobilná fáza) je tlaková fľaša, ktorá obvykle obsahuje dusík, vodík, hélium či argón. V plynovej chromatografii je nevyhnutné používať plyny s vysokou čistotou, pretože stopy akýchkoľvek nečistôt ako je kyslík alebo voda môžu interagovať s rozpustenými látkami a priamo poškodzovať stacionárnu fázu prípadne narúšať odozvu detektoru. Pri voľbe nosného plynu hrá taktiež dôležitú úlohu jeho netoxičita, bezpečnosť pri práci a nižšia cena. Pokiaľ je nutné dosiahnuť rýchlejšiu separáciu, vhodným nosným plynom je hélium, dusík je však lacnejšia varianta. Rýchlu separáciu zabezpečuje aj vodík, jeho hlavnou nevýhodou je však horľavosť prípadne schopnosť hydrogenácie niektorých látok, ktoré sa detegujú navyše. Výberom vhodného nosného plynu následne ovplyvňujeme aj druh kolóny a typ detektoru, ktorý bude následne používaný [59,60]. Za zdrojom nosného plynu sa nachádza čistiace zariadenie, ktoré slúži k zachytávaniu nečistôt a vlhkosti z nosného plynu.

Inertný nosný plyn nepretržite prúdi zo zdroja cez vstrekovací otvor, kolónu a detektor, pričom jeho prietok je regulovaný aby sa zaistili reprodukovateľné retenčné časy a minimalizoval sa posun detektora. Meranie a regulácia prietoku nosného plynu je dôležitá pre účinnosť kolóny aj pre kvalitatívnu analýzu. Nastavením správnej lineárnej rýchlosti plynu pomocou zmeny prietoku je zabezpečená aj účinnosť kolóny [59,62].

Za regulačným mechanizmom sa nachádza dávkovacie zariadenie. V dávkovacom zariadení (injektore) sú zlúčeniny odparované v čo najkratšom čase a pomocou prúdu nosného plynu premiestnené do kolóny. K zavedeniu vzorky do prúdu nosného plynu slúži injekčná stiekačka, ktorou dávkuje roztoky cez pryžové septum, dochádza k tzv. nástreku vzorky. Na dávkovanie plynných vzoriek sa používajú plynotesné injekčné striekačky. Existuje niekoľko metód nástreku vzoriek. Nástrek vzorky môže byť prevádzaný buď priamo do kolóny (on column), alebo pomocou deliča (split)/ bez deliča (splitless) toku. Nástrek do kolóny sa používa najmä u náplňových kolón, je možné ho využiť však aj pre kapilárne kolóny, nástrek pomocou deliča alebo bez deliča je typický pre kapilárne kolóny. Pri dávkovaní vzorky pomocou deliča toku je na kolónu privádzaná iba časť nastreknutej vzorky. Zvyšná časť uniká cez delený otvor do atmosféry a ide do odpadu. V režime splitless dochádza k odpareniu celej vzorky a tá následne putuje na kolónu [60,62].

Po odparení v injektore je vzorka prúdom nosného plynu prenášaná na kolónu, kde dochádza k jej rozdeleniu medzi mobilnú a stacionárnu fázu. V plynovej chromatografii sa používajú dva typy kolón – náplňové a kapilárne [62]. Náplňové kolóny sa najčastejšie vyrábajú z nehrdzavejúcej ocele najmä kvôli svojej pevnosti. Existujú však aj kolóny vyrobené zo skla, ktoré sú inertnejšie. Používajú sa najmä pri stanovovaní vzoriek (napr. stopové pesticídy alebo biomedicínske vzorky), ktoré by mohli reagovať s oceľou. Dĺžka náplňových kolón sa pohybuje v rozmedzí 1-3 m a vnútorný priemer kolóny môže byť 2 až 3 mm. Vnútro kolóny je vyplnené stacionárnou fázou, ktorá je potiahnutá tenkým filmom kvapaliny. Ako náplň sa zvyčajne používa silikagel, grafitizované sadze alebo oxid hlinitý (alumina). Nosiče kvapalnej fázy bývajú na báze oxidu kremičitého (kremelina) [60,63]. V kapilárnych kolónach sa žiadna náplň nenachádza, nosičom stacionárnej fázy sú steny kolóny. Dĺžka kolóny môže byť v rozmedzí 15-60 m. Takto dlhé kolóny umožňujú efektívnu separáciu komplexných zmesí vzoriek, pre väčšinu aplikácií však stačí aj kratšia 30 m kolóna. Vnútorný priemer kolóny je 0,1-0,6 mm a hrúbka stacionárnej fázy, ktorá pokrýva steny kolóny sa pohybuje približne okolo 0,25 – 0,5 μm . Kapilárne kolóny vyrábané z taveného oxidu kremičitého sú najviac inertné [60,62]. Podľa uloženia stacionárnej fázy rozlišujeme tri typy kapilárnych kolón: kolóny, kde vnútorná stena je potiahnutá stacionárnou fázou tvorenou vrstvou pórovitého materiálu napr. aluminy (PLOT- *Porous Layer Open Tubular*); kolóny, ktoré majú na vnútornej stene vrstvu nosiča s kvapalinou (SCOT- *Support Coated Open Tubular*) a kolóny, ktorých vnútorná stena je pokrytá rovnomerným tenkým filmom kvapalnej stacionárnej fázy (WCOT -*Wall Coated Open Tubular*) [58,60].

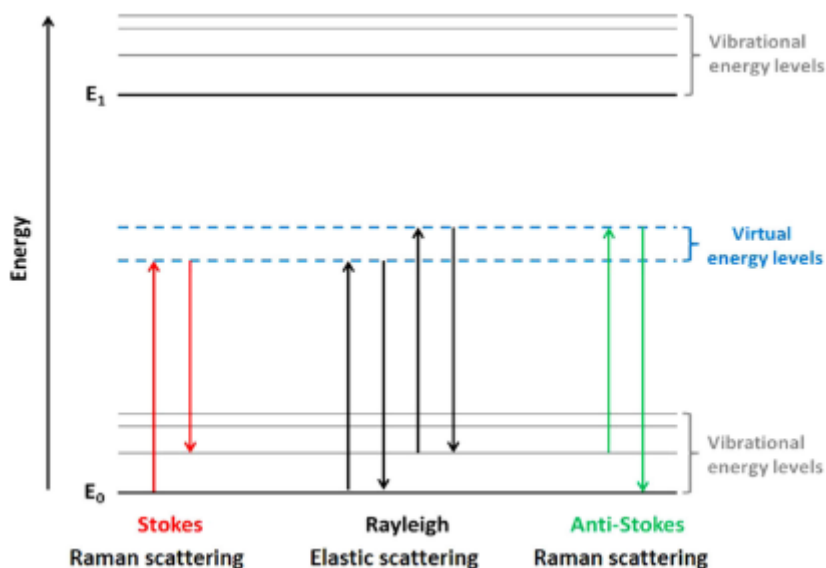
Nosný plyn spolu so vzorkou prechádzajú z kolóny do detektoru. V detektore dochádza k detekcii látok v nosnom plyne pričom sa následne vyšle elektrický signál. Signál potom prechádza do dátového systému, ktor generuje písomný záznam analýzy - chromatogram. Najčastejšie používané detektory v plynovej chromatografii sú :plameňovo -ionizačný detektor (FID), tepelne-vodivostný detektor (TCD) a detektor elektrónového záchytu (ECD) [60,62]. Existuje však mnoho ďalších detektorov ako napríklad plameňový ionizačný detektor s alkalickým kovom (AFID), bezplameňový detektor s alkalickým kovom (TID), fotoionizačný detektor (PID) či atómový emisný detektor (AED). V predloženej diplomovej práci bol použitý FID detektor, ktorý je zároveň aj najrozšírenejším detektorom v GC. Tento detektor je veľmi citlivý, má schopnosť detegovať prakticky všetky látky v širokom rozmedzí koncentrácií s výnimkou plynov a anorganických látok. Pri tomto detektore je vhodné ako nosný plyn použiť dusík, môžu sa však použiť aj ostatné nosné plyny [60].

2.7 Ramanova spektroskopia

Ramanova spektroskopia, zaraďujúca sa medzi metódy vibračnej molekulovej spektroskopie, je technika založená na nepružnom rozptyle monochromatického žiarenia známeho ako Ramanov rozptyl. Používa sa k pozorovaniu vibračných, rotačných a iných nízkofrekvenčných stavov molekuly. Ako doplnková metóda k infračervenej spektrometrii nachádza uplatnenie najmä pri identifikácii látok, určovaní ich štruktúry a zloženia. Ramanova spektroskopia sa ďalej bežne používa v oblasti rôznych

vied pri analýze pevných látok (kovy, polovodiče, kryštalické či amorfné materiály), kvapalných látok (roztoky vodné aj nevodné), plynov alebo pri analýze povrchov či biologických systémov. Hlavnou výhodou tejto techniky je schopnosť ľahko a rýchlo analyzovať vzorku bez toho, aby dochádzalo k problémom s jej spracovaním [63]. Princíp Ramanovej spektroskopie spočíva v meraní rozptýleného žiarenia vznikajúceho interakciou monochromatického žiarenia z viditeľnej až blízkej IČ oblasti s molekulami vzorky pričom dochádza k zmene vibračných a rotačných stavov molekuly. Ako zdroj monochromatického žiarenia býva v tejto technike využívaný laser s vlnovou dĺžkou pohybujúcou sa od 532 do 785 nm [64].

Pri dopadne žiarenia na vzorku môže dochádzať k čiastočnej absorpcii žiarenia, prechodu alebo rozptylu žiarenia do všetkých smerov [64]. Interakcia žiarenia s molekulami spôsobuje indukciu krátkodobého prechodu molekuly do excitovaného energetického stavu. Molekula môže späť prechádzať do počiatočného základného stavu pričom sa uvoľnenie fotón s rovnakou vlnovou dĺžkou, akú mal fotón spôsobujúci excitovaný stav molekuly. Tento proces je známy ako Rayleigov (alebo elastický, pružný) rozptyl. Keďže pri nepružnom rozptyle svetla nedochádza k prenosu energie medzi dopadajúcim fotónom a molekulou, Rayleigov rozptyl neposkytuje žiadne informácie o skúmaných molekulách. Prechod molekúl z excitovaného energetického stavu späť do základného stavu môže prebehnúť aj neelastickým (nepružným) spôsobom nazývanom aj Ramanov rozptyl, ktorý má za následok zmenu vibračného a rotačného stavu molekuly. Nepružnou zrážkou fotónu s molekulou je molekula excitovaná z počiatočného stavu do excitovaného energetického stavu. Pri relaxácii následne molekula emituje fotón čím sa dostáva do koncového (vibračného alebo rotačného) stavu, ktorý sa však od počiatočného energetického stavu molekuly odlišuje. Energetický rozdiel, ktorý vzniká medzi počiatočným a koncovým stavom spôsobuje posun frekvencie emitovaných fotónov ďalej od excitačnej frekvencie. Pokiaľ teda koncový vibračný stav nadobúda vyššie (resp. nižšie) hodnoty energie v porovnaní s počiatočným stavom, emitovaný fotón bude posunutý k nižším (resp. vyšším) frekvenciám. V Ramanovom spektre môžeme následne pozorovať oblasť s nižšou frekvenciou tzv. Stokesova oblasť alebo oblasť s vyššími frekvenciami Anti-Stokesova oblasť [63,65]. Jednotlivé energetické prechody Ramanovho rozptylu sú znázornené na Obr. 6.



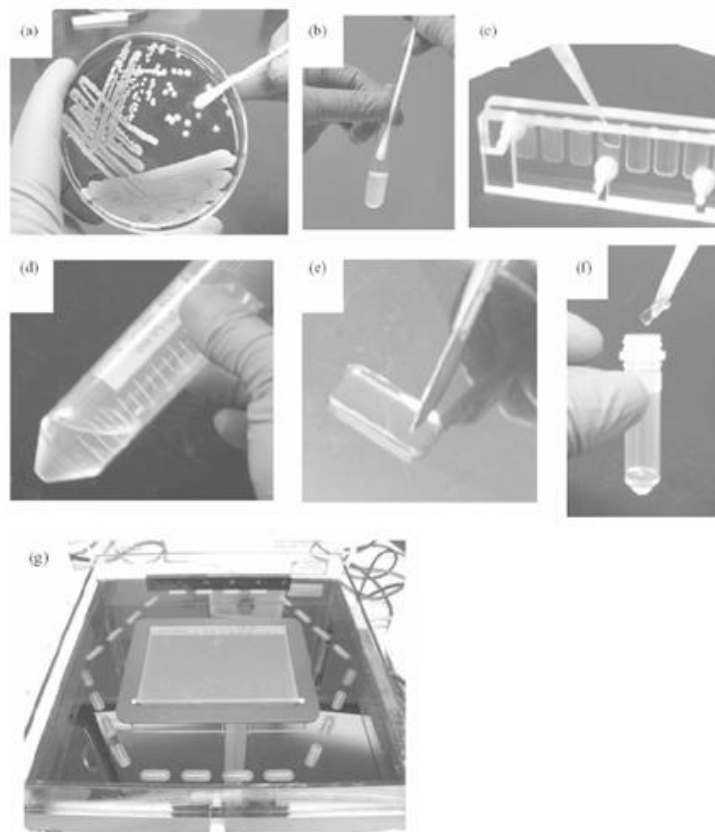
Obr. 6: Diagram energetických prechodov Ramanovho rozptylu [66]

2.8 Pulzná gélová elektroforéza

Elektroforéza patrí medzi často využívané separačné techniky slúžiace k analýze nukleových kyselín a zmesí proteínov. Jej použitie nachádza uplatnenie v biologickom a biochemickom výskume, farmakológii, forennej medicíne, pri kontrole potravín či v molekulárnej biológii. Princíp elektroforézy spočíva v migrácii nabitých molekúl alebo častíc k opačne nabitej elektróde pod vplyvom elektrického poľa. Vzhľadom k rozdielnym nábojom a hmotnostiam budú rôzne molekuly či častice v zmesi migrovať rôznou rýchlosťou, čím dôjde k ich rozdeleniu na jednotlivé frakcie. Mieru migračnej rýchlosti vyjadruje elektroforetická pohyblivosť, ktorá môže byť ovplyvnená typom pufru, jeho koncentráciou či pH, teplotou ale aj povahou nosného materiálu. Samotná elektroforéza môže prebiehať vo voľných roztokoch alebo v stabilizačných médiách ako sú napríklad gély [67]. Pri konvenčnej gélovej elektroforéze molekuly DNA migrujú tuhou maticou za použitia statického elektrického poľa. Použitím polyakrylamidových gélov sa separujú nukleové kyseliny o dĺžke približne 1 kb. Taktiež aj pri rôznych zriedených agarózových géloch je rozlíšenie fragmentov limitované veľkosťou približne do 50-100 kb. Existuje však mnoho štúdií, v ktorých je často potreba separovať fragmenty DNA s veľkosťou >100 kb. Preto bola vyvinutá technika pulznej gélovej elektroforézy (PFGE), ktorá využíva striedavé elektrické pole k separácii veľkých fragmentov DNA na agarózových géloch. Kým štandardná gélová elektroforéza obvykle štípe fragmenty do veľkosti 50 kb, PFGE štípe nukleové kyseliny vo veľkosti >12 Mb [68,69]. Vzhľadom na schopnosť rozlišovať veľké molekuly DNA viedlo prvé použitie PFGE k získaniu elektroforetických karyotypov kvasiniek, húb a iných jednobunkových parazitov. Technika PFGE umožnila stanovenie veľkosti a počtu chromozomálnych DNA u kvasiniek ako *Sacharomyces cerevisiae*, *Sacharomyces pombe* či *Candida albicans* [70]. Postupom času sa okrem analýzy eukaryotických buniek začala PFGE venovať aj vyšším bunkám. V súčasnej dobe nachádza táto širokospektrálna technika uplatnenie pri genomike eukaryotických aj prokaryotických buniek. Bežne sa používa aj pri štúdiu a charakterizácii genómu niektorých húb, ľudských chromozómov či v epidemiologických štúdiách k typizácii patogénnych organizmov [69,70].

Postupom času bola metóda PFGE vylepšovaná, pričom sa vyvinuli aj jej viaceré variácie a modifikácie. Najbežnejším a dnes pravdepodobne aj najpoužívanejším modelom z nich je tzv. elektrický homogénny oblúk (CHEF). Jednotka CHEF je tvorená 24 elektródami, ktoré sú rovnomerne rozmiestnené okolo šesťuholníkového obrysu. Všetky elektródy sú k napájaciemu zdroju pripojené pomocou externých kruhových odporov. Tieto prstence sú následne zodpovedné za reguláciu napätia na elektródach. Prepínaním prúdu medzi elektródami následne dochádza k migrácii DNA cik-cakovým pohybom pod uhlom 120°, čím je uľahčená separácia väčších fragmentov. Na pohyb DNA v PFGE vplýva viacero faktorov ako napríklad koncentrácia agarózy, teplota, intenzita elektrického poľa, doba pulzu či uhol a doba preorientovania sa DNA. Čas potrebný k preorientovaniu sa molekúl DNA je závislý na ich veľkosti. Veľké molekuly sa teda preorientávajú pomalšie ako menšie molekuly a rovnako je oneskorená aj ich migrácia vzhľadom na menšie molekuly [68,69].

Pulzná gélová elektroforéza sa štandardne začína odobratím buniek z narastenej kolónie. Bunky sú následne ďalej upravované a suspendované v pufri určenom k štandardizácii. Pripravené bunkové suspenzie sú potom zmiešané s roztavenou agarózou a napipetované do plastových foriem. Po zatuhnutí sa tuhé bločky obsahujúce bunky z formy vylúpnu a inkubujú v enzýmoch a detergentoch aby došlo k ich lýze. Po prebehnutí lyzačného procesu sa bločky ešte niekoľko krát premyjú a nanesú na agarózový gél, kde prebieha samotná elektroforéza. Väčšie fragmenty sa pohybujú pomalšie v porovnaní s malými fragmentmi, ktoré sa cez agarózovú maticu pohybujú podstatne rýchlejšie. K vizualizácii a zafarbneiu gélu sa používa fluorescenčné interkalačné farbivo ako je napr. etídiumbromid [69]. Postup analýzy pulznou gélovou elektroforézou je znázornený na Obr. 7.



Obr. 7: Postup PFGE analýzy. (A) Odber buniek . (B) Optimalizácia bunkovej suspenzie. (C) Príprava agarózových bločkov. (D) Lýza buniek za použitia detergentu. (E) Úprava bločku určeného k analýze. (F) Premývanie agarózových bločkov. (G) Vloženie bločku do komôrky gélu a elektroforéza v jednotke CHEF [69]

3 CIELE PRÁCE

Cieľom predloženej diplomovej práce na tému využitia odpadných substrátov k produkcii lipidických látok kvasinkami rodu *Metschnikowia* je riešenie nasledujúcich čiastkových úloh:

- prehľadná rešerš mikrobiálnych producentov významných lipidov, mikrobiálnych lipáz, funkcia a priemyslové využitie lipidických látok
- stanovenie rastových charakteristík kvasiniek rodu *Metschnikowia*
- optimalizácia produkcie lipidických látok kvasinkami rodu *Metschnikowia* s využitím vybraných typov odpadných substrátov ako zdroj uhlíka
- analýza metabolitov inštrumentálnymi technikami

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité chemikálie a materiály

Agaróza low melting , Serva (SRN)
Agaróza Premium,Serva (SRN)
Bakteriologický agar, Himedia (India)
Beta-merkapt ethanol, Serva (SRN)
Cell Lytic Y, Sigma-Aldrich (SRN)
D-glukóza monohydrát p.a., Penta (ČR)
Dihydrogénfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Ethidium bromid, Serva (SRN)
Glycerol, Sigma –Aldrich (SRN)
Hexán pre HPLC, VWR Chemicals (FR)
Hydrogénfosforečnan didraselný p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Hydrogénfosforečnan disodný p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Hydroxid sodný,Lach-Ner s.r.o. (ČR)
CHEF DNA Size Marker, BioRad(USA), Schizosaccharomyces pombe (3 chromozómy, 3,5-5,7Mb)
Chelaton 3 (EDTA) p. a, Lachema (ČR)
Chlorid sodný p.a., Lachema (ČR)
Chlorid vápenatý p.a., Lachema (ČR)
Chlorid železitý, Katedra analytické Farmaceutické fakulty UK (SR)
Chloroform pre HPLC, VWR Chemicals (FR)
Kvasničný autolyzát, Himedia (India)
Kyselina boritá, Chemapol (ČR)
Kyselina citrónová, Sigma-aldrich (SRN)
Kyselina heptadekánová, Sigma –Aldrich (SRN)
Kyselina sírová 96%, p.a., Penta (ČR)
Lytikáza, Sigma-Aldrich (SRN)
Metanol p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Metanol pre HPLC, Lach-Ner s.r.o. (ČR)
N-laurylsarcosine, Sigma-Aldrich (SRN)
Odpadný živočíšny tuk, NorskProtein Company (NO)
Pepton aus Casein, Roth (SRN)
p-nitrofenol, Sigma Aldrich (SRN)
p-nitrofenylpalmitát, Sigma Aldrich (SRN)
Proteináza K, Sigma-Aldrich (SRN)
Síran horečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Síran zinočnatý heptahydrát p.a., Lachema (ČR)
Sorbitol, Sigma-Aldrich (SRN)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), Penta (ČR)

4.2 Použité prístroje a pomôcky

Analytické váhy Boeco (SRN)
Azur c200, Azur Biosystems (USA)
Centrifuga U-32R, Boeco (DE)
Centrifuga Z36HK, Hermle Labortechnik GmbH, (SRN)
ELISA Reader BioTek ELx808
FID detektor, kapilárna kolóna DB-WAX o rozmeroch 30m x 0,32mm x 0,5µm
GKB Color Digital CCD kamera (Taiwan)
Chladiaci box, GuzzantiGZ19(ČR)
Inkubátor s trepačkou, Heidolph (SRN)
Laminárny box Aura mini(IT)
Lucia Image active 5.0, Laboratory Imaging spol. s.r.o. (ČR)
Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)
Mikrovlnná rúra, MT1705 B Professor (CZ)
Orbitálne trepaný inkubátor, Labwit (AU)
Plynový chromatografTRACE GC ThermoQuest Italia S. p. A (IT)
Podložné sklíčko CaF-Raman grade, Crystran (UK)
Renishaw Invia system (UK)
Systém MicroTime 200, Picoquant GmbH, objektív s vodnou imerziou Olympus UPLSAPO 60XW
Termoblok, SBH200D, Stuart (UK)
Thermostatic cooler Julabo, F12 Labortechnik GmbH, (SRN)
Trepáčka IKA Yellow Line (SRN)
Trepáčka, VWR Mini Shaker (FR)T
Ultrazvuk, PS0200, Powersonic s.r.o. (SK)
Vodná lázeň, TW2 Julabo Labortechnik GmbH (SRN)
Vortex, Labnet (USA)
Vortex-Genie 2, Scientific Industries (USA)
Zostava PFGE, Pharmacia Biotech (SWE):
Gene Navigator, Pharmacia Biotech, (SWE)
GN Controller, Pharmacia Biotech, (SWE)
Programmable Power Supply, MP-500V, (SWE)

4.3 Použité kmene kvasiniek

Metschnikowia pulcherrima CCY 029-002-145
Metschnikowia pulcherrima CCY 029-002-147
Metschnikowia pulcherrima CCY 029-002-149
Metschnikowia andauensis CCY 029-002-129
Metschnikowia fructicola CCY 029-002-015
Metschnikowia chrysoperlae CBS 9803 (11-1158)
Metschnikowia pulcherrima CBS 5833 (11-1232)
Metschnikowia fructicola CBS 8853 (11-1235)
Metschnikowia andauensis HA 1657 (11-1241)
Metschnikowia sinensis CBS 10357 (11-1244)
Metschnikowia zizyphicola CBS 10358 (11-1247)
Metschnikowia shanxiensis CBS 10359 (11-1250)

4.4 Stanovenie rastových kriviek kvasiniek rodu *Metschnikowia*

Rastové krivky boli stanovované rovnako pre kvasinkové kmene (*M. pulcherrima* 145, *M. pulcherrima* 147, *M. pulcherrima* 149, *M. andauensis* 129 a *M. fructicola* 15) postupom uvedeným v kapitole 2.2.4. U jednotlivých kmeňov boli stanovované dve rastové krivky- rastová krivka za laboratórnej teploty (25°C) a za zníženej teploty (15°C). Médiá s optimálnym zložením uvedeným v Tab. 4 boli zaočkované pripravenými inokulami v pomere 1:5 a v presne stanovených časových intervaloch boli vykonávané odbery za sterilných podmienok.

Tab. 4: Zloženie kultivačného média

Zložka	Množstvo
Glukóza	20 g
Bakteriologický peptón	5 g
Kvasničný extrakt	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂	0,1 g
MgSO ₄	0,5 g
Destilovaná voda	1000 ml

4.4.1 Stanovenie zákalu turbidimetricky

Z kultivačných médií bol vždy odobratý 1 ml vzorky, ktorý bol vodou vhodne nariadený tak, aby sa neprekročil rozsah lineárnej odozvy spektrofotometru. Absorbancia bola zmeraná pri vlnovej dĺžke 630 nm, ako blank bola použitá destilovaná voda.

4.4.2 Spracovanie biomasy

Z kultivačných médií bola okrem vzorky na stanovenie zákalu odobratá aj vzorka na stanovenie biomasy o objeme 10 ml. Následne bola vzorka centrifugovaná pri otáčkach 5000 rpm po dobu 5 minút. Bunky boli následne premyté destilovanou vodou a opäť scentrifugované. Takto upravená biomasa bola rozsuspendovaná v 1 ml vody a prevedená na vopred zvaženu kovovú misku. Miska s biomasou bola umiestnená do sušiarne, kde bola vzorka sušená pri teplote 60 °C do konštantnej hmotnosti. Po vysušení bola vzorka umiestnená do exikátora a následne zvažovaná na analytických váhach. Z rozdielov hmotností bolo stanovené množstvo vyprodukovanej biomasy.

4.5 Produkcia lipidov kvasinkami rodu *Metschnikowia*

4.5.1 Kultivácia kvasiniek na optimálnom médiu

Použitý kmene kvasiniek rodu *Metschnikowia* sa zaraďujú medzi mezofilné aeróbne mikroorganizmy. Ich kultivácia prebiehala v tekutom médiu na trepačkách za laboratórnej teploty. Všetky médiá boli pred samotným očkovaním vysterilizované v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 45 minút.

4.5.1.1 Inokulum

Pred samotnou kultiváciou boli pre všetky vyššie uvedené kmene pripravené inokulá o objeme 50 ml podľa zloženia uvedeného v Tab. 4. V očkovačom boxe boli vysterilované médiá naočkované 3 kličkami zo zásobných kultúr uchovávaných v Petriho miskách. Následne boli inokulá kultivované za neustáleho trepania po dobu 24 hodín pri laboratórnej teplote.

4.5.1.2 Produkčné médium

Pripravené inokulá boli použité k zaočkovaniu produkčných médií v pomere 1:5. K sledovaniu produkcie lipidických látok kvasinkami rodu *Metschnikowia* bolo použitých niekoľko typov produkčných médií pričom vo všetkých médiách bolo ponechané rovnaké zastúpenie solí uvedených v Tab. 5. Pre kvasinkové kmene (*M. chrysoperlae* 1158, *M. pulcherrima* 1232, *M. fructicola* 1235, *M. andauensis* 1241, *M. sinensis* 1244, *M. zizyphicola* 1247, *M. shanxiensis* 1250, *M. fructicola* 15) boli zvlášť pripravené médiá so zachovaním pomeru C/N – 97 a 150, pričom ako zdroj uhlíka tu vystupovala glukóza. Pre tieto kmene boli taktiež pripravené aj médiá so zachovaným pomerom C/N – 24, 97 a 150 kde ako zdroj uhlíka vystupoval glycerol. Jednotlivé zloženia týchto médií sú uvedené v Tab. 6. Ďalej boli všetky kvasinkové kmene kultivované aj na odpadných substrátoch pričom ako zdroj C bol použitý odpadný tuk a srvátka. Kultivácie na uvedených substrátoch boli u všetkých skúmaných kmeňov prevedené duplicitne. Zloženie jednotlivých médií s použitými odpadnými substrátmi je uvedené v Tab. 7.

Tab. 5: Zloženie produkčného médiá

Zložka	Množstvo
KH ₂ PO ₄	7 g
Na ₂ HPO ₄	2,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2 g
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,15 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,02 g
Destilovaná voda	1000 ml

Tab. 6: Pomery C/N použité ku kultivácii

Označenie	Množstvo (g/l)			
	Glukóza	Glycerol	Kvasničný extrakt	Peptón
CN 24 gly	-	90	10,0	5,0
CN 97 gly	-	30	1,0	2,0
CN 150 gly	-	30	1,0	1,0
CN 97 glu	30	-	0,34	0,68
CN 150 glu	30	-	0,34	0,34

Tab. 7: Zloženie médií obsahujúce odpadné substráty

Označenie	Množstvo (g/l)			
	Srvátka	Tuk	Kvasničný extrakt	Peptón
Srvátka	21,8	-	10,0	5,0
CN 24 tuk	-	47,0	10,0	5,0
CN 97 tuk	-	45,0	1,0	2,0
CN 150 tuk	-	46,0	1,0	1,0

Tab. 8: Zloženie médií pre stanovenie lipázovej aktivity

Označenie	Množstvo (g/l)				
	Glukóza	Tuk	Tween 80	Kvasničný extrakt	Peptón
Kontrola	20	-	-	10,0	5,0
Tukové médium	-	50	-	1,0	2,0
Tuk+ Tween 80	-	50	15	1,0	2,0



Obr. 8: Substráty použité ku kultivácii kvasiniek zľava: odpadný živočíšny tuk, lyofilizovaná srvátka, glycerol



Obr. 9: Produkčné médiá kvasiniek kultivovaných za nižšej teploty (15°C)

4.5.1.3 Spracovanie odpadnej srvátky

Navážka lyofilizovanej srvátky bola rozpustená v destilovanej vode a prefiltrovaná cez membránový filter (0,45 μm). Vzorka bola analyzovaná pomocou HPLC na kolóne Rezex naplnenej reverznou fázou ROA Organic Acid 8% (300x7,8 mm) pri teplote 60°C. Na kolónu bola vzorka aplikovaná nástrekom do dávkovacieho ventilu s objemom slučky 20 μl . Elúcia prebiehala izokraticky pri prietoku mobilnej fázy 1 ml/min. Ako mobilná fáza bol použitý 5 mM roztok kyseliny sírovej v miliQ vode. K detekcii bol využitý refraktometrický detektor. Z chromatogramu bol zistený obsah laktózy a glukózy v navážke vzorky, ktorý bol ďalej použitý k výpočtu zloženia médií tak, aby bol zachovaný pomer C/N odpovedajúci optimálnemu médiu obsahujúcemu glukózu.

Okrem analýzy pomocou vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie bol u vzorky srvátky zisťovaný aj obsah dusíka pomocou Kjehldalovej metódy. Navážka jedného gramu vzorky s presnosťou na štyri desatinné miesta bola kvantitatívne prevedená do mineralizačnej trubice. Ku vzorke boli pridané aj 2 g Weinigerovho katalyzátoru k urýchleniu mineralizácie a 10 ml koncentrovanej kyseliny sírovej. Mineralizačná trubica bola vložená do mineralizačnej jednotky KT-8s. Celkový čas mineralizácie predstavoval 3 h, postup jednotlivých krokov je uvedený v Tab. 9. Po získaní mineralizátu boli do mineralizačnej trubice pridané 3 kvapky roztoku fenolftaleínu a následne bola trubica umiestnená do destilačného prístroja Vapodest 200, v ktorom bol postupne pridávaný 33% hydroxid sodný do vzniku fialového zafarbenia. Do destilačného systému bola umiestnená aj predloha s obsahom 25 ml štandardizovanej kyseliny sírovej, do ktorej bol behom procesu destilácie zachytávaný amoniak. Po ukončení destilácie bola predloha s kyselinou sírovou a zachyteným amoniakom titrovaná

štandardizovaným 0,1 M odmerným roztokom hydroxidu sodného na Tashirov indikátor do trvalého žltého sfarbenia. Zo spotreby odmerného roztoku NaOH bol zistený obsah dusíka vo vzorke srvátky. Celkovo bola vzorka srvátky mineralizovaná a destilovaná 6 krát.

Získané výsledky obsahu C pomocou HPLC a obsahu N podľa Kjehldala vo vzorke srvátky boli použité na výpočet optimálnej navážky srvátky tak, aby mohla byť použitá ako náhradný substrát za glukózu s dodržaním C/N pomeru v optimálnom médiu. Zloženie médiá, kde ako zdroj uhlíka bola použitá odpadná srvátka je uvedené v Tab. 7.

Tab. 9. Priebeh mineralizácie vzorky srvátky

Krok č.	Priebeh	Čas [h]
1	Zahrievanie na 250 °C	0,5
2	Zahrievanie na 330 °C	0,5
3	Mineralizácia 400 °C	1,5
4	Chladienie na laboratórnu teplotu	0,5
Celkový čas mineralizácie		3

4.5.1.4 Spracovanie odpadného tuku

Navážka odpadného tuku s presnosťou na štyri desatinné miesta bola kvantitatívne prevedená do odmernej banky a doplnená po rysku chloroformom. Do krymplovacej skúmavky bol z pripraveného odmerného roztoku odpipetovaný 1 ml vzorky a následne bolo pridaných 0,8 ml transesterifikačnej zmesi. Transesterifikačná zmes bola pripravená z 15% H₂SO₄ v metanole pre HPLC a 0,5 mg/ml kyseliny heptadekánovej označovanej ako interný štandard. Skúmavky obsahujúce vzorku a transesterifikačnú zmes boli zakrymplované a inkubované v termobloku pri 85°C po dobu dvoch hodín. Po prebehnutí transesterifikácie sa vzorka nechala voľne vychladnúť. Medzitým bolo do 4 ml vialiek napipetovaných 0,5 ml 0,05 M roztoku NaOH, ku ktorému bol následne pridaný celý obsah krymplovacej vialky a 1 ml chloroformu. Zmes bola intenzívne pretrepaná na multipozečnom vortexe. Po oddelení fáz bolo z dolnej chloroformovej fáze odpipetovaných 0,1 ml do vialiek pre GC. Takto pripravená vzorka bola doplnená 0,9 ml chloroformu a analyzovaná pomocou systému plynovej chromatografie s FID detektorom. Z výsledkov analýzy bol zistený obsah uhlíkatého zdroja v odpadnom tuku, na základe ktorého boli vypočítané navážky tuku do kultivačných médií so zachovaným pomerom C/N 24, 90, 150. Jednotlivé zloženia médií obsahujúce odpadný tuk ako náhradu glukózy sú uvedené v Tab. 7.

4.5.1.5 Spracovanie biomasy z produkčných médií

Po ukončení kultivácie na odpadných substrátoch bolo z produkčných médií odobratých 15 ml na stanovenie vyprodukovanej biomasy a obsahu lipidov pomocou GC. Pri kultiváciach na odpadnom tuku bola odobratá suspenzia buniek premytá hexánom z dôvodu odstránenia prebytočného tuku z povrchu buniek kvasiniek. V centrifugačných skúmavkách bol objem média stočený pri 4500 rpm po dobu 5 minút. Po zliatí supernatantu bol obsah skúmavky ešte raz premytý vodou a opäť scentrifugovaný. Získaná biomasa bola rozsuspendovaná v 1 ml destilovanej vody a kvantitatívne prevedená do predom zväženej mikroskúmavky typu Eppendorf., ktorá bola umiestnená do mraziaceho boxu. Po dokonalom zamrazení boli vzorky umiestnené do lyofilizačnej banky, ktorá bola upevnená do lyofilizátoru. Po dosiahnutí vákua boli vzorky na 24 hodín ponechané k lyofilizácii až do úplného odparenia vody.

Vysušené mikroskúmavky s biomasou boli zvážené a z hmotnostného rozdielu bolo stanovené množstvo biomasy, ktoré kvasinky vyprodukovali v g/l.

Navážka biomasy (8-18 mg) bola následne použitá k stanoveniu lipidov pomocou plynového chromatografu postupom uvedeným v kapitole 4.5.1.4. Rozdiel spočíval jedine v použití hexánu namiesto chloroformu.

4.5.2 Stanovenie enzýmovej aktivity lipáz

Enzýmová aktivita lipáz bola stanovená pomocou spektrofotometrickej metódy s *p*-nitrofenylpalmitátom. Lipolytické enzýmy sú schopné štiepiť tento substrát pričom vzniká žltá sfarbený *p*-nitrofenol, ktorý sa stanoví spektrofotometricky pri 405 nm.

4.5.2.1 Stanovenie kalibračnej krivky *p*-nitrofenolu

Pre zostrojenie kalibračnej krivky bol použitý základný roztok *p*-nitrofenolu o koncentrácií 0,5 mmol/l. Kalibračná rada *p*-nitrofenolu bola pripravená nariadením základného roztoku 50mM Tris-HCl pufrum s pH 8,5 na koncentrácie v rozmedzí 0,005 až 0,05 mmol/l. Absorbancia bola zmeraná na spektrofotometri ELISA reader proti pufru pri vlnovej dĺžke 405 nm.

4.5.2.2 Príprava substrátu

Lipázový substrát bol pripravený navážením 0,017 g SDS, 0,0135 g *p*-nitrofenylpamidátu a 1 g Triton-X-100 do odmernej banky na 100 ml a doplnený destilovanou vodou. Pripravený roztok bol uchovávaný pri teplote 4° C po dobu 3 dní.

4.5.2.3 Stanovenie lipolytickej aktivity

Do mikrotitračnej doštičky bolo napipetovaných 125 µl Tris- HCl pufru, 125 µl lipázového substrátu a 50 µl supernatantu. V priebehu 1 hodiny bol v 5 minútových intervaloch meraný nárast absorbancie pri 405 nm na zariadení ELISA reader. Jednotka aktivity bola definovaná ako množstvo enzýmu katalyzujúce premenu substrátu sprevádzanú nárastom absorbancie v čase.

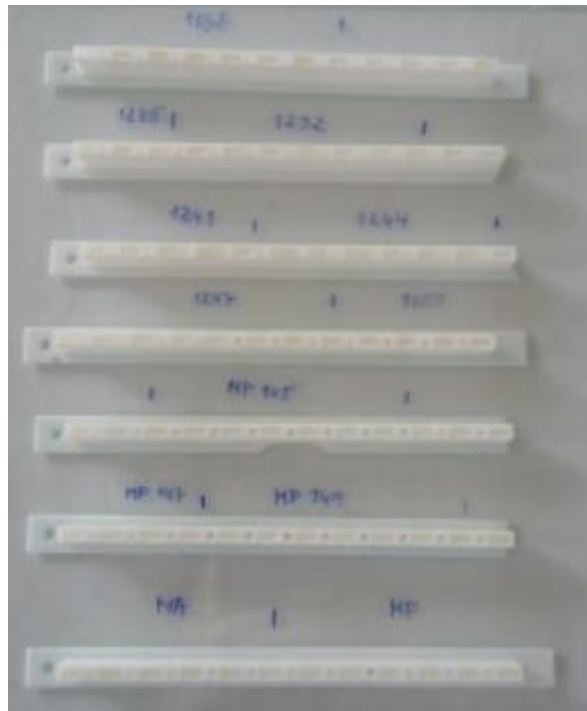
4.5.3 Analýza lipidov technikou Ramanovej spektroskopie

Z kultivačných médií bol odobratý objem 0,5 ml, ktorý bol následne scentrifugovaný pri otáčkach 5000 rpm po dobu 2 minút. Supernatant bol zliaty a bunky boli ešte raz premyté destilovanou vodou a opäť stočené. Takto upravená biomasa bola použitá k analýze lipidov Ramanovou spektroskopiou. Vzorka bola nanosená na CaF podložné sklíčko. Po vysušení bola vzorka analyzovaná spektrometrom Renishaw Invia system. Ako excitačný zdroj bol použitý laser s vlnovou dĺžkou 785 nm, objektív x50 a expozícia 5 až 20 sekúnd v závislosti na kvalite vzoriek. Spektrá boli snímané v rozsahu 700-1800 cm⁻¹.

4.5.4 Izolácia DNA kvasiniek rodu *Metschnikowia*

Pre všetky kvasinkové kmene bolo pripravené inokulum o zložení uvedenom v Tab. 4: Zloženie kultivačného média. Média boli kultivované pri laboratórnej teplote po dobu 24 hodín. Z nakultivovaných médií bolo za sterilných podmienok odobratých 1,3.10⁹ buniek kultúry do centrifugačných skúmavok. Bunky boli následne scentrifugované po dobu 5 minút pri 5000 rpm za laboratórnej teploty. Po premytí buniek 5 ml MQ vody boli skúmavky opäť scentrifugované. Po odliatí supernatantu boli bunky rozsuspendované v TE pufri (100mM Tris, 100mM EDTA, pH=8,0). Skúmavky boli doplnené 2,1 ml MQ vody tak, aby bol výsledný objem 3,5 ml. K rozsuspendovaným bunkám bolo napipetovaných 17,5 µl beta-merkaptóetanolu. Takto pripravená zmes bola za mierneho trepania inkubovaná pri 30° C po dobu 30 minút. Po inkubácii boli bunky opäť scentrifugované a rozsuspendované v 4 ml CPES pufru (40 mM kyselina citrónová, 120 mM Na₂HPO₄, pH=6, 20 mM EDTA, 1,2M sorbitol). Po prebehnutí centrifugácie boli získané bunky rozsuspendované v 500 µl CPES

pufri, ktorého pH bolo upravené na 7,5. K bunkám bolo pridaných 28,8 μ l čerstvo pripravené roztoku enzýmu lytikázy. Následne bola pripravená zmes za mierneho trepania inkubovaná pri 25 °C po dobu 30 minút. Medzitým bol pripravený 2% roztok low melting agarózy v CPES pufri, ktorý bol po ukončení inkubácie napipetovaný ku všetkým vzorkám v objeme 0,5 ml. Vzorky spolu s roztokom agarózy boli napipetované do formičiek určených na prípravu bločkov (Obr. 10) a umiestnené do chladničky, kde boli ponechané do stuhnutia. Po stuhnutí boli bločky z formy vylúpnuté do mikroskúmaviek typu Eppendorf obsahujúcich 1 ml lyzačného pufru s Proteinázou K. Bločky boli následne v skúmavkách inkubované pri 50 °C po dobu 24 hodín. Po inkubácii bol lyzačný pufr zliaty a bločky boli umiestnené do 2 ml TE pufru. Bločky s TE pufrom boli ponechané 20 minút pri 50°C. Po premytí bločkov TE pufrom ešte dvakrát boli bločky pripravené k použitiu. Príprava agarózových bločkov je zachytená na Obr. 10.



Obr. 10: Príprava agarózových bločkov obsahujúcich kvasinkovú DNA

4.5.5 Pulzná gélová elektroforéza

Pre spustenie pulznej gélovej elektroforézy bol pripravený 1% agarózový gél v 1x TBE pufri (50 g Tris, 27,5 g H_3BO_3 , 20 ml 0,5 M EDTA, 1000ml MQ voda). Pripravený roztok agarózy bol naliaty do formy s hrebeňom. Po stuhnutí boli do komôrok gélu postupne zavádzané pripravené bločky obsahujúce kvasinkovú DNA. Ako štandard bol použitý CHEF DNA Size Marker kvasinky *Schizosacharomyces pombe*. Elektroforetická vaňa naplnená TBE pufrom bola vychladená na 10 °C. Po vychladnutí bol do vane umiestnený gél so vzorkami a hexagonálna elektróda. Elektroforéza bola spustená na prístroji Gene Navigator po nastavení parametrov (pulzný čas, doba separácie).

4.5.6 Vizualizácia gélu PFGE

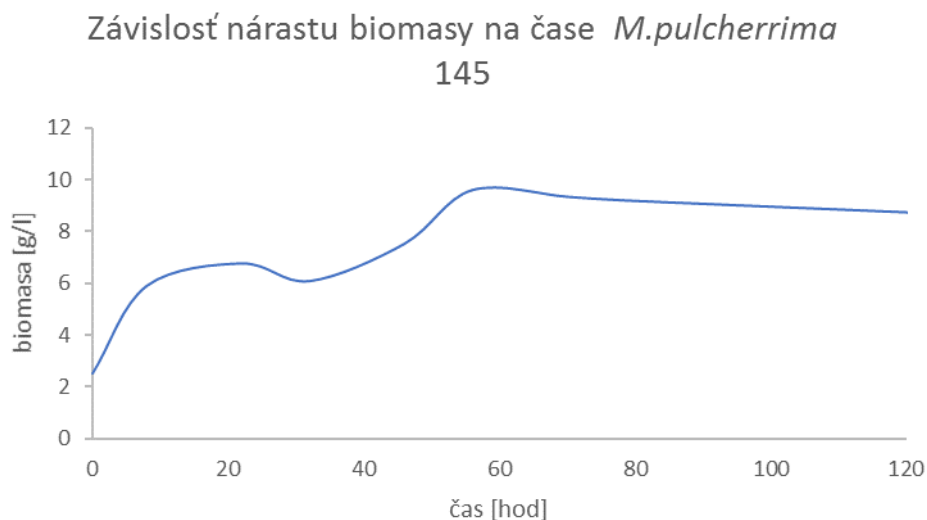
Po ukončení pulznej elektroforézy, bol gél s bločkami umiestnený do vodného roztoku EtBr (100 μ l). Farbenie gélu prebiehalo v lázni po dobu 20 minút za neustáleho trepania. Takto ofarbený gél bol umiestnený do vizualizačného zariadenia Azur c200 a vyfotografovaný.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Rastové charakteristiky

Stanovenie rastových charakteristík vybraných mikroorganizmov je dôležité pre analýzu produkcie vybraných metabolitov, a taktiež pre pochopenie fyziológie skúmaných kmeňov kvasiniek. Rastová krivka vyjadruje závislosť nárastu biomasy na čase. Postupne boli stanovené rastové krivky u piatich kmeňov *M. pulcherrima* 145, *M. pulcherrima* 147, *M. pulcherrima* 149, *M. andauensis* 129 a *M. fructicola* 15. U jednotlivých kmeňov boli zostavené aj kalibračné krivky, vyjadrujúce závislosť množstva vyprodukovanej biomasy na zákale rôzne koncentrovaných roztokov kvasiniek.

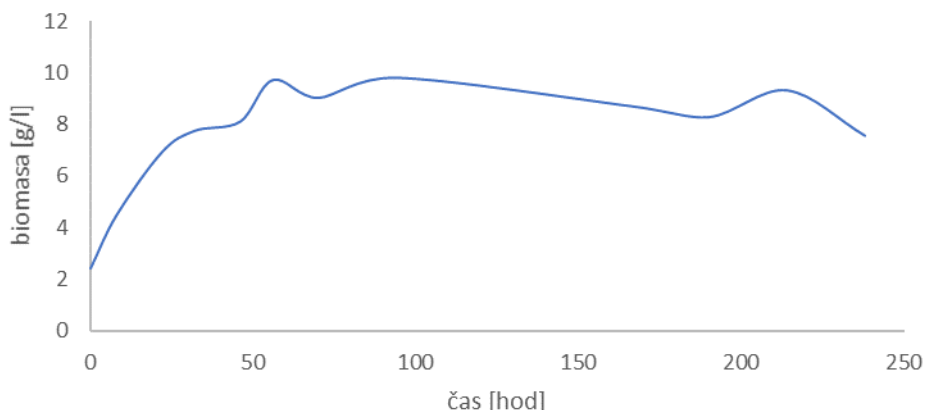
5.1.1 Rastová krivka kvasinky *Metschnikowia pulcherrima* 145



Obr.11: Závislosť nárastu biomasy na čase kvasinka *Metschnikowia pulcherrima* 145 (25°C)

Priložený Obr.11 znázorňuje rastovú krivku kmeňa *M. pulcherrima* 145, stanovovanú za laboratórnej teploty. Začiatok kultivácie kvasiniek je typický adaptačnou fázou (lag-fázou). Postupne kvasinky prechádzali do fázy exponenciálneho rastu, pričom maximum log fáze dosiahli v 56. hodine kultivácie s produkciou biomasy 9,59 g/l. Po prekročení 56. hodiny rastu bol pozorovaný nástup predĺženej stacionárnej fázy, behom ktorej už nedochádzalo k výraznému biomasy. Kvasinky kmeňa *Metschnikowia* boli kultivované 7 dní za laboratórnej teploty (25 °C).

Závislosť nárastu biomasy na čase *M. pulcherrima*
145 (15°C)

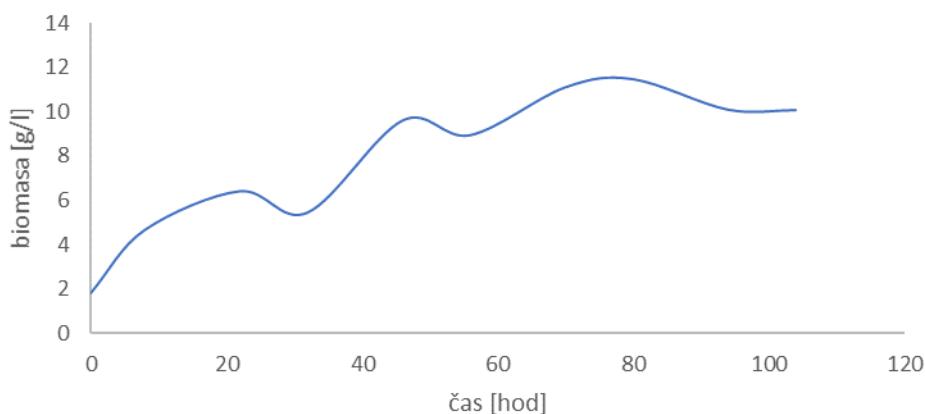


Obr. 12: Závislosť nárastu biomasy na čase kvasinka *Metschnikowia pulcherrima* 145 (15°C)

Pre kmeň *M. pulcherrima* 145 bola stanovovaná aj rastová krivka s odlišnými podmienkami kultivácie ako pri laboratórnej teplote znázornená na Obr. 12. Kultivácia prebiehala 14 dní za zníženej teploty (15°C). Prvé 3 dni boli kvasinky kultivované za laboratórnej teploty a následne boli prenesené na trepačku do prostredia s nízkou teplotou. Priebeh kultivácie je znázornený na priloženom obrázku. Rastová krivka kmeňa *M. pulcherrima* 145 za zníženej teploty vykazuje charakter diauxie. Prvé maximum exponenciálnej fáze bolo pozorované v 56. hodine kultivácie s produkciou biomasy 9,72 g/l. Toto maximum bolo dosiahnuté na tretí deň kultivácie krátko pred umiestnením produkčného média do chladu. Keďže bol spotrebovaný najjednoduchší uhlíkatý substrát vo forme glukózy došlo k dlhému zastaveniu rastovej fáze. Behom lag fáze sa kvasinky adaptovali na nové podmienky prostredia so zníženou teplotou a vytvorili si potrebné enzýmy pre utilizáciu iného uhlíkatého zdroja. Druhé maximum exponenciálnej fáze bolo pozorované na 10. deň kultivácie s produkciou biomasy 9,32 g/l.

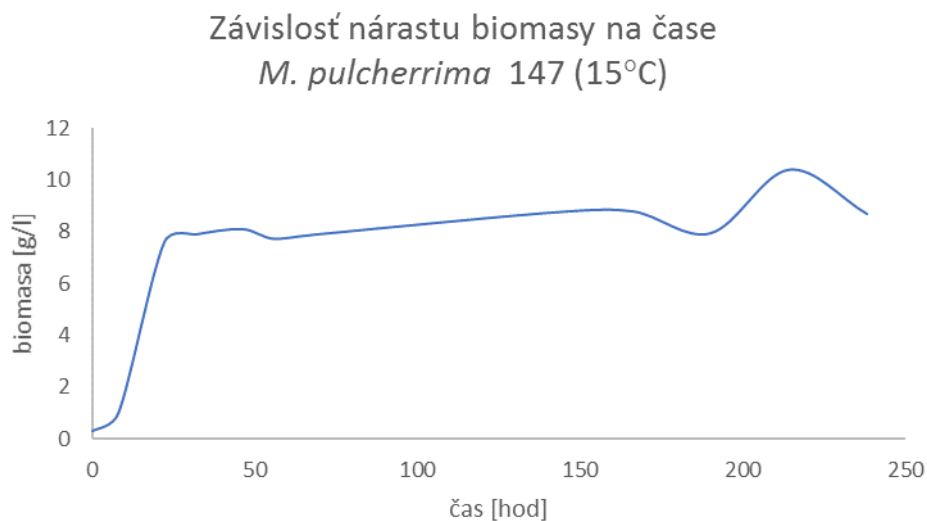
5.1.2 Rastová krivka kvasinky *Metschnikowia pulcherrima* 147

Závislosť nárastu biomasy na čase
M. pulcherrima 147



Obr. 13 Závislosť nárastu biomasy na čase kvasinka *Metschnikowia pulcherrima* 147(25°C)

Na základe Obr. 13 môžeme určiť, že aj rastová krivka *M. pulcherrima* 147 vykazuje charakter diauxie. Mikroorganizmy môžu ako zdroj živín využívať rôzne substráty vrátane cukrov. Diauxový rast je pozorovaný práve vtedy, keď ich kultivácia prebieha v chemicky definovanom médiu obsahujúcom dva rôzne uhlíkaté zdroje (napr. cukry, alebo cukry a lipidy) [26]. Najčastejšie používaným cukrom, ktorý je zároveň aj najúčinnější pre rast mikroorganizmov je glukóza. Prítomnosť glukózy aktívne inhibuje alternatívne formy metabolizmu a po jej vyčerpaní z média dochádza k syntéze nových enzýmov potrebných k metabolizácii iných cukrov alebo lipidov [71,72]. Jav diauxie je preto charakterizovaný prítomnosťou dvoch fáz exponenciálneho rastu, medzi ktorými dochádza k dlhému zastaveniu rastu a nastáva opakovanie lag fázy [71]. Kultiváciou za laboratórnej teploty bol stanovený dvojitý nárast rastovej krivky. Najvyššia hodnota vyprodukovanej biomasy predstavovala 9,59 g/l a bola pozorovaná po 3- dňovej kultivácii v 46. hodine. Po ukončení druhej adaptačnej fázy, ktorá trvala približne 46 hodín sa množstvo biomasy v médiu zvýšilo pričom nepresiahlo hodnotu 11,45 g/l. Tento jav bol pozorovaný 4. deň po začatí kultivácie v 80- tej hodine od začiatku kultivácie.



Obr. 14: Závislosť nárastu biomasy na čase kvasinka *Metschnikowia pulcherrima* 147 (15°C)

Rastová krivka kmeňa *M. pulcherrima* 147 za podmienok zníženej teploty je znázornená na priloženom Obr. 14. Rovnako ako u rastovej krivky, ktorá bola stanovená za laboratórnej teploty dosahuje rastová krivka za nižších teplôt prvé maximum exponenciálnej fázy v 46. hodine kultivácie. Jednotlivé krivky sa líšia iba množstvom vyprodukovanej biomasy. Kým u laboratórnej teploty predstavovala biomasa 9,59 g/l, z grafu vidíme, že tu hodnota nepresiahla 8,11 g/l biomasy. Výrazné zvýšenie biomasy 10,41 g/l bolo pozorované až v druhom maxime exponenciálnej fázy po 214. hodine od začiatku kultivácie.

Rastové krivky ostatných skúmaných kmeňov vykazovali podobný charakter. Získané rovnice regresie pre jednotlivé kmene za rôznych teplotných podmienok sú uvedené v Tab. 10.

Na začiatku kultivácie za laboratórnej teploty sa kvasinky *M. pulcherima* 149 nachádzali v adaptačnej fáze (lag- fáza), ktorá trvala približne do 5. hodiny. Postupne prechádzali do fázy exponenciálneho rastu dosahujúcej maximum v 80. hodine od začiatku kultivácie s produkciou biomasy 9,92 g/l. Po dosiahnutí prvého maxima exponenciálnej fázy medzi 80. a 94. hodinu kultivácie bol vyčerpaný prvý uhlíkatý substrát (glukóza), čím poklesla koncentrácia biomasy na 8,62g/l. Keďže utilizácia glukózy bola pre bunky energeticky menej náročná, po znížení jej koncentrácie bola naštartovaná druhá lag-fáza. Medzi jednotlivými logaritmickejšími fázami prebehla adaptácia buniek na podmienky potrebné k utilizácii iného uhlíkatého substrátu obsiahnutého v médiu (peptón a kvasničný extrakt ako zdroj C). Druhé maximum exponenciálnej fázy bolo dosiahnuté v 104. hodine kultivácie

pričom produkcia biomasy neprekročila množstvo 9,24 g/l. Po prekročení 105. hodiny rastu bol pozorovaný nástup predĺženej stacionárnej fáze, behom ktorej došlo k miernemu nárastu biomasy.

Rovnako ako v prípade rastovej krivky stanovovanej za laboratórnej teploty aj rastová krivka kmeňa *M. pulcherrima* 149 za zníženej teploty vykazuje charakter diauxie. Prvé maximum exponenciálnej fáze bolo pozorované v 56. hodine kultivácie s produkciou biomasy 9,88 g/l. Toto maximum bolo dosiahnuté na tretí deň kultivácie krátko pred umiestnením produkčného média do chladu. Keďže bol spotrebovaný najjednoduchší uhlíkatý substrát vo forme glukózy došlo k dlhému zastaveniu rastovej fáze. Behom lag fáze sa kvasinky adaptovali na nové podmienky prostredia so zníženou teplotou. Druhé maximum exponenciálnej fáze bolo pozorované na 8. deň kultivácie s produkciou biomasy 9,08 g/l. Behom predĺženej stacionárnej fáze ktorá bola pozorovaná po 166. hodine kultivácie došlo ešte k miernemu nárastu množstva biomasy, táto hodnota však nebola vyššia ako 8,87 g/l.

U rastovej krivky kmeňa *M. andauensis* 129 (25°C) bolo prvé maximum produkcie biomasy dosiahnuté na tretí deň od začiatku kultivácie s hodnotou biomasy 9,33 g/l. Druhá najväčšia produkcia biomasy bola pozorovaná na štvrtý deň kultivácie v 80. hodine, pričom bola zaznamenaná hodnota 10,77 g/l.

U *M. andauensis* 129 bola prvá exponenciálna fáza pozorovaná v 32. hodine kultivácie s produkciou biomasy 7,79 g/l. Rovnako ako u kmeňa *M. pulcherrima* 149 aj *M. andauensis* 129 dosiahla prvé maximum exponenciálnej fáze ešte za podmienok laboratórnej teploty pred umiestnením do prostredia so zníženou teplotou. Na 8. deň kultivácie v 166. hodine došlo k druhému rastovému maximu kedy bolo vyprodukovaných 10,27 g/l biomasy. Po prechode kvasinkových buniek do stacionárnej fáze sa množstvo vyprodukovanej biomasy viditeľne nezvyšovalo.

Pri kultivácii *M. fructicola* 15 za laboratórnej teploty bolo maximum 1. exponenciálnej fáze pozorované na tretí deň kultivácie s produkciou biomasy nepresahujúcou hodnotu 7,36 g/l, zatiaľ čo druhé maximum exponenciálnej fáze bolo pozorované až v posledný, siedmy deň kultivácie s produkciou biomasy 8,42 g/l.

Rastová krivka *M. fructicola* 15 stanovovaná za zníženej teploty taktiež vykazovala dvojstupňový nárast. Prvé výraznejšie maximum bolo dosiahnuté na štvrtý deň od začiatku kultivácie krátko po umiestnení do prostredia s nižšou teplotou. Množstvo vyprodukovanej biomasy predstavovalo 9,0 g/l. Kvasinkové bunky potom prešli do druhej adaptačnej fáze, pričom druhé maximum exponenciálnej fáze dosiahli na 8. deň kultivácie, pričom množstvo biomasy neprekročilo hodnotu 8,16 g/l.

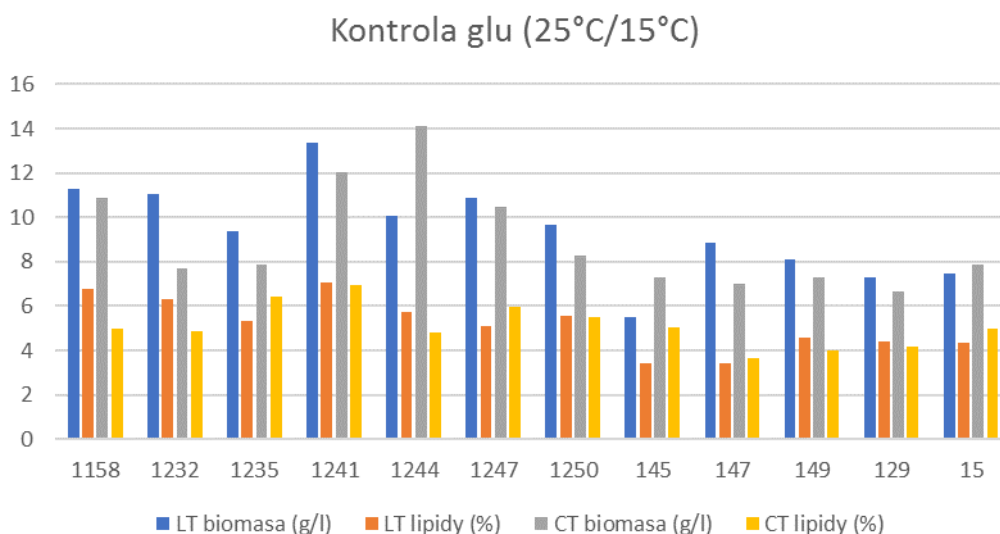
Tab. 10: Regresné rovnice

Kmeň	Regresná rovnica	
	Laboratórna teplota (25°C)	Znížená teplota (15°C)
<i>M. pulcherrima</i> 145	$y=1,8237x-3,3605$	$y=1,2639x+2,335$
<i>M. pulcherrima</i> 147	$y=1,9053x+4,2601$	$y=2,0217x+0,4253$
<i>M. pulcherrima</i> 149	$y=1,6496x+4,1209$	$y=1,2948x+6,9381$
<i>M. andauensis</i> 129	$y=2,1948x+1,5707$	$y=2,0656x+2,2891$
<i>M. fructicola</i> 15	$y=2,0363x-1,4625$	$y=1,9463x-1,0684$

5.2 Produkcia lipidických látok kvasinkami rodu *Metschnikowia*

Vyčerpanie energie pochádzajúcej z fosílnych palív predstavuje v súčasnosti pre ľudstvo čoraz väčšie riziko. Preto sú na palivový priemysel kladené vysoké požiadavky s cieľom vyvinúť alternatívne zdroje

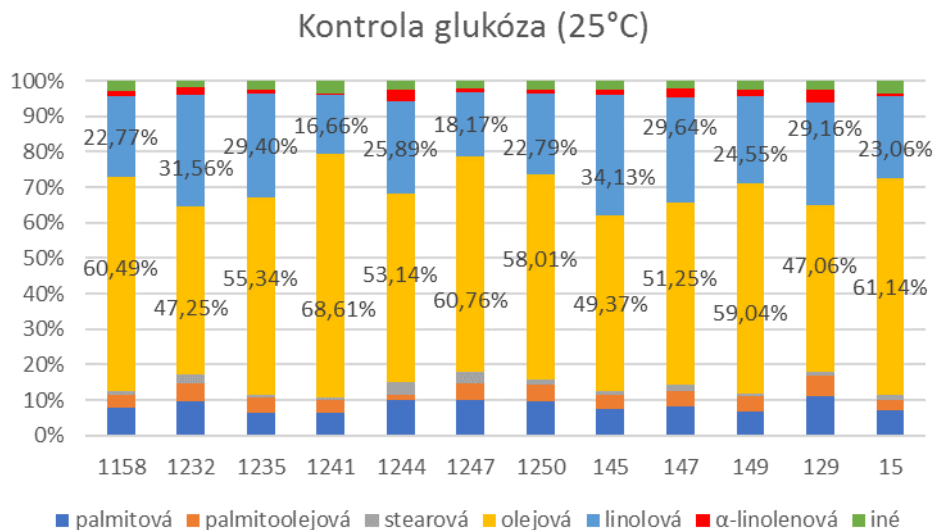
energie, ktorých zloženie aj využívanie by bolo priaznivejšie voči životnému prostrediu. Jednými z týchto obnoviteľných zdrojov energie sú aj biopalivá [73,74]. Mikroorganizmy ako riasy, kvasinky, baktérie a huby majú schopnosť akumulovať lipidy za špecifických kultivačných podmienok. Práve lipidy produkované mikroorganizmami by v blízkej budúcnosti mohli predstavovať potenciálnu zásobnú surovinu určenú k výrobe týchto biopalív. V súčasnosti je preto používanie mikrobiálnych lipidov predmetom rozsiahleho výskumu s cieľom znížiť výrobné náklady spojené s fermentačnými procesmi. Jedným a veľmi dôležitým spôsobom ako znižovať náklady na spracovanie je využívanie odpadných substrátov ako zdrojov uhlíka [73]. Predložená práca sa preto zaoberala skúmaním využitia lacných a voľne dostupných odpadných materiálov k produkcii a následnej akumulácii lipidických látok vybranými kmeňmi kvasiniek rodu *Metschnikowia*. Produkciu lipidov u olejnatých kvasiniek ovplyvňuje rada faktorov ako zdroj uhlíka, dusíka, pomer C/N, prevzdušňovanie v médiu, teplota či pH. Rôzne štúdie sa preto snažia optimalizovať kultivačné podmienky tak, aby bolo dosiahnutá čo možno najvyššia produkcia lipidov v bunkách kvasiniek [75]. Akumulácia lipidov je zvyčajne optimálna pri molárnom pomere C/N > 65 a blízkom 100 [74]. Kultivačné médiá boli volené tak, aby v médiu zostal zachovaný pomer C/N 24, 97, a 150. Ako hlavný zdroj uhlíka bol využívaný odpadný tuk, srvátka, glycerol a v kontrolných médiách bola používaná glukóza. Rôzne štúdie preukázali, že s nižšou teplotou stúpa produkcia lipidov, preto boli kultivácie prevádzané za podmienok zníženej teploty (15°C) 76. Získané vzorky biomasy boli lyofilizované a ďalej spracované postupom uvedeným v kapitole 4.5.1.5 Využitím odpadných substrátov s rôznymi pomermi C/N bola u jednotlivých kmeňov sledovaná a porovnávaná produkcia biomasy (g/l) a lipidov (%). Pomocou metódy plynovej chromatografie s FID detektorom bol u vzoriek analyzovaný aj profil mastných kyselín na základe ktorého boli získané mastné kyseliny triedené do troch skupín - MUFA (mononenasýtené mastné kyseliny), PUFA (polynenasýtené mastné kyseliny) a SFA (nasýtené mastné kyseliny).



Obr. 15: Porovnanie produkcie biomasy a lipidov v rámci kultivácie na kontrolných glukózových médiách s rozdielnymi teplotnými podmienkami

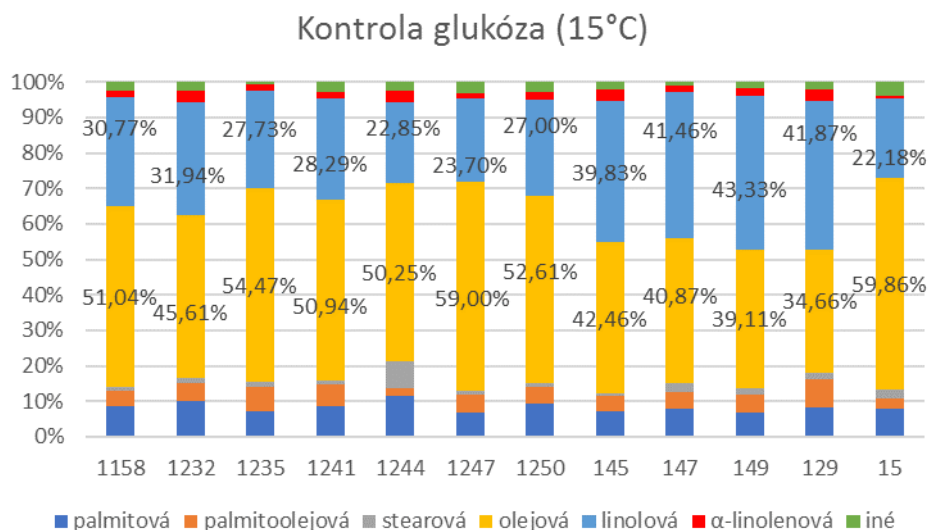
Obr. 15 znázorňuje produkciu biomasy a lipidov na kontrolných médiách, kde ako zdroj uhlíka vystupovala glukóza. Kultivácia kontrolných médií prebiehala za rozdielných teplotných podmienok – za laboratórnej (25°C) a zníženej teploty (15°C). Z Obr. 15 je možné vidieť, že vyššia produkcia biomasy bola dosiahnutá kultiváciou za laboratórnej teploty. Výnimku tvorili iba kmene *M. sinensis* 1244, *M. pulcherrima* 145 a *M. fructicola* 15, ktorým pre vyššiu produkciu biomasy vyhovovali znížené teplotné podmienky (15°C). Celkovo najvyššie množstvo biomasy bolo zaznamenané za zníženej teploty u kvasinky *M. sinensis* 1244 s produkciou biomasy 14,13 g/l. S rozdielom pár g/l bola druhým najvyšším producentom kvasinka *M. andauensis* 1241 kde množstvo biomasy predstavovalo 13,36 g/l.

Ako už bolo spomínané teplotné podmienky kultivácií boli volené s ohľadom na produkciu lipidov. Aj napriek tomu, že rôzne štúdiá preukázali vyššiu produkciu lipidov za podmienok 15°C, tento predpoklad nebol na kontrolných médiách potvrdený u všetkých skúmaných kvasiniek. Kvasinkovým kmeňom *M. chrysoperlae* 1158, *M. pulcherrima* 1232, *M. andauensis* 1241, *M. sinensis* 1244, *M. shanxiensis* 1250, *M. pulcherrima* 149 a *M. andauensis* 129 vyhovovali pre vyššiu produkciu lipidov podmienky laboratórnej teploty. Naopak u kvasiniek *M. fructicola* 1235, *M. zizyphicola* 1247, *M. pulcherrima* 145 a *M. fructicola* 15 bol obsah lipidov vyšší kultiváciou za zníženej teploty. Celkovo bolo najviac lipidov obsiahnutých v bunkách kvasinky *M. andauensis* 1241 (7,08%). Za zníženej teploty táto kvasinka vyprodukovala 6,98% lipidov, čím sa zároveň stala aj najvyšším producentom lipidov za zníženej teploty v porovnaní s ostatnými kvasinkami.



Obr. 16: Percentuálne zastúpenie mastných kyselín u jednotlivých kvasiniek kultivovaných na kontrolnom glukózovom médiu (25°C)

Profil mastných kyselín bol stanovovaný na kontrolných médiách za laboratórnej a zníženej teploty, kde ako hlavný zdroj uhlíka vystupovala glukóza. Na Obr. 16 je možné vidieť % zastúpenie jednotlivých mastných kyselín stanovených metódou plynovej chromatografie v bunkách kvasiniek kultivovaných za laboratórnej teploty (25°C). U všetkých kmeňov bola preukázaná prítomnosť palmitovej kyseliny, ktorej obsah v jednotlivých kvasinkách tvoril od 6,30% (kvasinka *M. andauensis* 1241) do 11,14% (*M. andauensis* 129). O niečo menšie zastúpenie tvorili palmitoolejová a stearová kyselina, ktorých najvyšší obsah bol stanovený u kvasinky *M. andauensis* 129 - 5,92% a kvasinky *M. sinensis* 1244 - 3,61%. Spomedzi všetkých nameraných kyselín mala v kvasinkových bunkách najvyššie zastúpenie olejová kyselina. U niektorých kmeňov tvorila viac ako polovicu % profilu mastných kyselín. Najvyššia akumulácia olejovej kyseliny bola zaznamenaná u kmeňa *M. andauensis* 1241 s obsahom 68,61%. V bunkách kvasiniek bola v značnom množstve naakumulovaná aj kyselina linolová, ktorej obsah sa pohyboval od 16,66% (*M. andauensis* 1241) do 34,13% (*M. pulcherrima* 145).

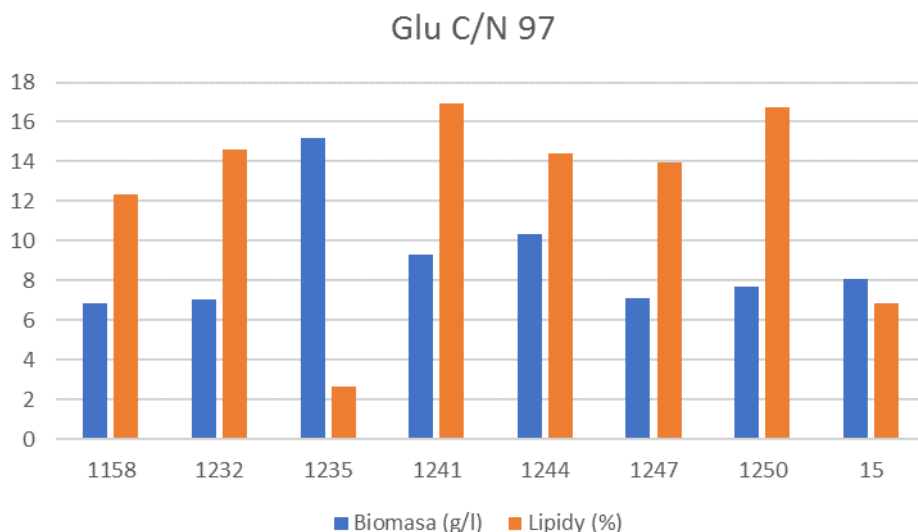


Obr. 17: Percentuálne zastúpenie mastných kyselín u jednotlivých kvasiniek kultivovaných na kontrolnom glukózovom médiu (15°C)

Kultivácia na kontrolnom médiu bola prevedená aj za znížených teplotných podmienok (15°C). Profil získaných mastných kyselín zobrazuje Obr. 17. U všetkých skúmaných kmeňov bola rovnako ako aj pri glukóze (25°C) potvrdená najvyššia produkcia olejovej kyseliny. Použitie glukózového média za znížených podmienok malo na produkciu kyseliny pravdepodobne mierne limitačný účinok. Kým kultiváciou na glukóze (25°C) bolo dosiahnutého maximálneho obsahu olejovej kyseliny 68,61% (*M. andauensis* 1241), v prípade zníženej teploty bolo maximum kyseliny zaznamenané u kmeňa *M. fructicola* 15 kde predstavovala 59,86%. U kmeňa *M. andauensis* 1241, ktorý bol predtým najvyšším producentom bol zaznamenaný pokles obsahu olejovej kyseliny o takmer 17,70%. Na kontrolnom médiu bola potvrdená rovnako aj produkcia linolovej kyseliny. Z Obr. 17 je možné vidieť, že najvyššia produkcia (43,33% z celkového obsahu mastných kyselín) bola potvrdená u kmeňa *M. pulcherrima* 149 čo je v porovnaní s kmeňom *M. pulcherrima* 145, ktorý bol najvyšším producentom na glukóze (25°C) o 9,20% viac. Možno teda konštatovať, že nižšie teplotné podmienky boli vyhovujúcejšie pre produkciu kyseliny linolovej. V malom zastúpení boli tvorené aj α-linolenová kyselina a stearová kyselina. U všetkých kmeňov bola taktiež potvrdená prítomnosť palmitovej kyseliny s obsahom 6,87% (*M. pulcherrima* 149) - 11,48% (*M. sinensis* 1244).

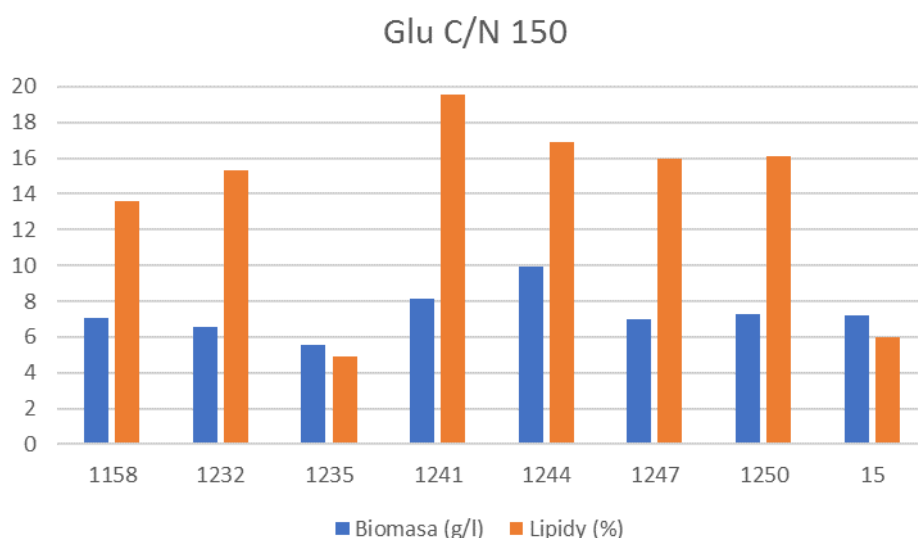
5.2.1 Screening produkcie lipidov s využitím glukózy a glycerolu

Osem kmeňov kvasiniek rodu *Metschnikowia* bolo kultivovaných v médiách kde ako hlavný zdroj uhlíka bola použitá glukóza. V jednotlivých médiách boli použité rôzne obsahy peptónu a kvasničného extraktu predstavujúce zdroj dusíka v závislosti na vybraných pomeroch C/N 97 a 150.



Obr. 18: Porovnanie produkcie biomasy a lipidov na glukózových médiách s C/N pomerom 97

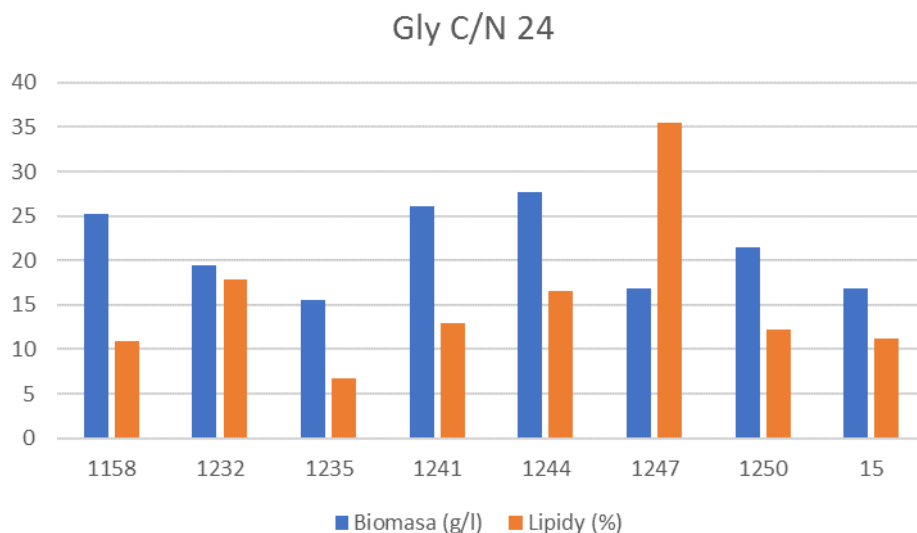
Kultiváciou kvasiniek na médiách s glukózou s pomerom C/N 97 za znížených teplotných podmienok (15°C) bola dosiahnutá pomerne vysoká produkcia lipidov. Takmer všetky použité kmene boli schopné tvorby viac ako 12% lipidov na objem biomasy s výnimkou kmeňov *M. fructicola* 15 a *M. fructicola* 1235 kde bola zaznamenaná pomerne nízka produkcia mikrobiálnych lipidov. Z Obr. 18 je možné vidieť, že najnižšia produkcia lipidov a zároveň najvyššia produkcia biomasy bola zaznamenaná práve u kmeňa *M. fructicola* 1235. Produkcia biomasy u kvasinky *M. fructicola* 1235 predstavovala 15,20 g/l zatiaľ čo vyprodukované lipidy tvorili obsah iba 2,66 % (0,40 g/l) z celkovej hmotnosti biomasy. Druhé najnižšie množstvo lipidov zo všetkých kultivovaných kmeňov bolo zaznamenané u kvasinky *M. fructicola* 15, ktoré tvorilo 6,86 % (0,55 g/l) z celkových 8,09 g/l biomasy. Najvyššia produkcia lipidov na glukózovom médiu s C/N 97 bola pozorovaná u kvasinky *M. andauensis* 1241 s obsahom lipidov 16,95% (1,57 g/l), s rozdielom 0,18% bola zaznamenaná produkcia lipidov kvasinkou *M. shanxiensis* 1250, ktorá predstavovala 16,77% (1,29 g/l). V porovnaní s kvasinkou 1235 boli najnižšie výtťažky biomasy pozorované u kvasiniek *M. chrysoperlae* 1158 (6,85 g/l), *M. pulcherrima* 1232 (7,02 g/l) a *M. zizyphicola* 1247 (7,10 g/l).



Obr. 19: Porovnanie produkcie biomasy a lipidov na glukózových médiách s C/N pomerom 150

Zvýšením pomeru C/N 150 v glukózovom médiu boli taktiež pozorované pomerne vysoké produkcie mikrobiálnych lipidov (pozri Obr. 19). Rovnako ako u predchádzajúceho kultivačného média s C/N pomerom 97 bola producentom s najvyšším % zastúpením lipidov kvasinka *M. andauensis* 1241. Na glukózovom médiu C/N 150 bola zaznamenaná produkcia biomasy 8,16 g/l a % zastúpenie lipidov tvorilo 19,58 % (1,60 g/l). Pri porovnaní produktivity biomasy či lipidov kvasinky *M. andauensis* 1241 na rozdielnych C/N pomeroch je vidieť, že síce produkcia lipidov bola vyššia na C/N 150 väčšie množstvo biomasy však bolo zaznamenané na pomere C/N 97. Tento jav bol spôsobený nižším obsahom dusíkatého zdroja v médiu C/N 150 čím došlo k jeho rýchlemu vyčerpaniu, bunky zastavili svoj rast a začali sa akumulovať lipidy. V zásade na oboch kultivačných médiách nedochádzalo k výrazným odchýlkam v produkcii lipidov alebo biomasy. Najvyššia produkcia biomasy bola pri tejto kultivácii zaznamenaná u kmeňa *M. sinensis* 1244 s produkciou biomasy 9,93 g/l, najnižšie hodnoty biomasy vykazovala kvasinka *M. fructicola* 1235 5,56 g/l. Produkcia mikrobiálnych lipidov dosahovala najnižšie hodnoty u kmeňa *M. fructicola* 1235, a to konkrétne 4,89 % (0,27 g/l).

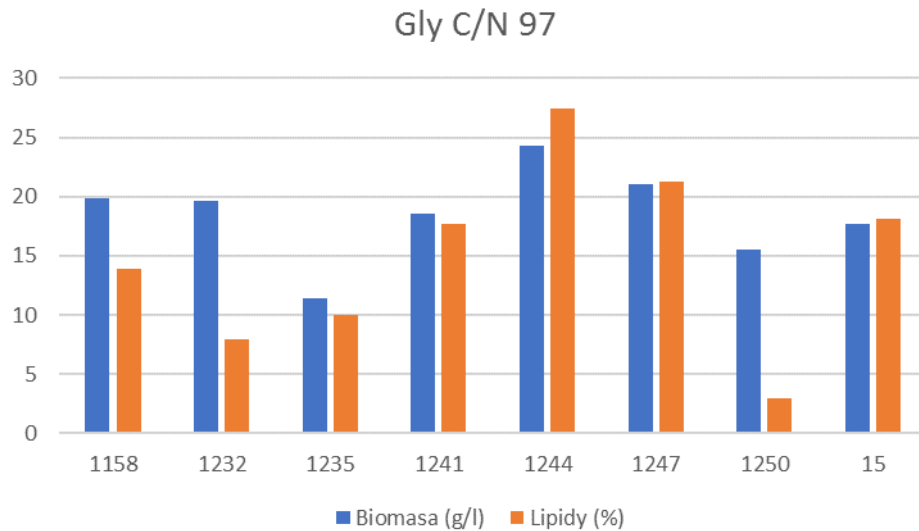
Z toho môžeme usúdiť, že kvasinky vykazovali na médiách s rovnakým substrátom podobný trend. Zmenou pomeru C/N sa menilo iba % zastúpenie lipidov a produkcia biomasy. Obecne pri vyšších C/N pomeroch vykazovali kvasinky väčšiu % produkciu mikrobiálnych lipidov.



Obr.20: Porovnanie produkcie biomasy a lipidov na glycerolových médiách s C/N pomerom 24

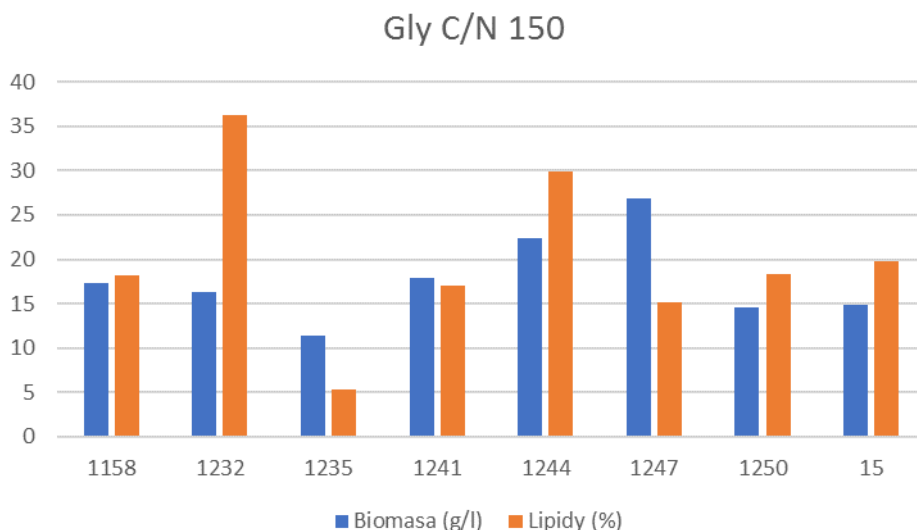
Z Obr.20 je možné vidieť % zastúpenie lipidov a hmotnostné zastúpenie biomasy vyprodukovaných jednotlivými kmeňmi behom kultivácie na glycerolových médiách. Hlavným zdrojom uhlíka v týchto médiách bol práve glycerol, pričom ďalšie zložky médiá boli prispôbené predom stanoveným C/N pomerom. Kultivácie v médiách s obsahom glycerolu konkrétne prebiehali na pomeroch C/N 24, 97 a 150. U všetkých kmeňov kultivovaných na glycerolovom médiu s C/N 24 bola zaznamenaná pomerne vysoká produkcia biomasy v g/l. Najviac biomasy s objemom 27,71 g/l bolo vyprodukované kvasinkou *M. sinensis* 1244, s malým rozdielom sa ako druhý najväčší producent javí kmeň *M. andauensis* 1241 kde bolo dosiahnutých 26,13 g/l. Výrazne vysoká bola aj produkcia u kmeňa *M. chrysoperlae* 1158, ktorá predstavovala 25,27 g/ biomasy. Z kultivácie na glycerole s C/N 24 boli najnižšie hodnoty biomasy zaznamenané u kmeňa *M. fructicola* 1235 a to konkrétne 15,54 g/l. Za daných kultivačných podmienok bolo rovnaké množstvo vyprodukovanej biomasy preukázané u kmeňa *M. fructicola* 15 a *M. zizyphicola* 1247, kedy obsah biomasy u oboch kmeňov činil 16,87 g/l. Napriek rovnakým množstvám biomasy však u týchto kmeňov neboli preukázané zhodné produkčné vlastnosti v rámci tvorby lipidických látok. U kmeňa *M. zizyphicola* 1247 bolo nasyntetizovaných až 35,54 % lipidov z celkového obsahu biomasy čo bola zároveň aj najvyššia nameraná hodnota obsahu lipidov predstavujúca 6,00 g/l

celkovej biomasy. U kmeňa *M. fructicola* 15 bola produkcia mastných kyselín výrazne nižšia takmer o 24,3% a činila 11,24% lipidov vzťahnutých na celkovú biomasu. Celkovo najnižšie množstvo lipidov bolo vyprodukované kvasinkou *M. shanxiensis* 1250. Obsah mastných kyselín u tejto kvasinky tvoril 6,70 % z celkovej biomasy čo je približne 1,04 g/l.



Obr. 21: Porovnanie produkcie biomasy a lipidov na glycerolových médiách s C/N pomerom 97

V glycerolových médiách s C/N 97 bol taktiež pozorovaný podobný trend ako pri médiách s rovnakým substrátom a C/N 24. V porovnaní s médiami, kde ako hlavný zdroj uhlíka vystupovala glukóza, boli na glycerole dosiahnuté vyššie výťažky biomasy a zároveň aj vyššie výťažky mikrobiálnych lipidov (pozri Obr. 21). Možno teda tvrdiť, že obsah glycerolu efektívne podporil mikrobiálny rast u všetkých skúmaných kmeňov. Najviac biomasy bolo vyprodukované kmeňom *M. sinensis* 1244 rovnako ako u predchádzajúceho média. Celková hmotnosť biomasy tvorila 24,35 g/l. Najnižšia produkcia biomasy bola zaznamenaná u kmeňa *M. fructicola* 1235 11,45 g/l, opäť opakujúci sa trend ako pri glycerolových médiách s C/N 24 kde bol najnižším producentom biomasy kmeň *M. fructicola* 1235 s 15,54 g/l. V produkcii lipidov bolo ako najnižšie vyprodukované množstvo vyhodnotené percentuálne zastúpenie mastných kyselín v biomase kvasinky *M. zizyphicola* 1250, tvoriace 2,95 % (0,46 g/l). Najviac lipidov akumulovala kvasinka *M. sinensis* 1244 pričom hmotnostná koncentrácia bola stanovená na 6,69 g/l, čo predstavuje 27,49% z celkového podielu biomasy.



Obr. 22: Porovnanie produkcie biomasy a lipidov na glycerolových médiách s C/N pomerom 150

Priložený Obr. 22 znázorňuje množstvo vyprodukovanej biomasy a obsah akumulovaných lipidov v priebehu kultivácie kvasiniek na glycerole ako hlavného zdroja uhlíka s najvyšším pomerom C/N 150. Obdobne ako na predchádzajúcich glycerolových médiách aj pri tejto kultivácii bol pozorovaný pomerne veľký nárast biomasy a množstva intracelulárne nasyntetizovaných lipidických látok. Najväčšie produkčné vlastnosti v rámci biomasy vykazovala kvasinka *M. zizyphicola* 1247 s množstvom 26,87 g/l. Porovnaním tvorby biomasy na všetkých glycerolových médiách s rozdielnymi pomermi C/N možno ako najnižšieho producenta označiť kvasinku *M. fructicola* 1235. Rovnako ako pri pomere C/N 24 a 97 aj u C/N 150 boli u nej zaznamenané najnižšie hodnoty vytvorenej biomasy 11,43 g/l spomedzi všetkých kmeňov kultivovaných za rovnakých podmienok. Aj napriek tomu, že najväčšie množstvo biomasy bolo zaznamenané u kmeňa *M. zizyphicola* 1247 nemožno ho však označiť aj za najväčšieho producenta lipidov. Množstvo lipidov naakumulovaných kmeňom *M. zizyphicola* 1247 bolo takmer 2,5x menšie ako množstvo, ktoré bolo namerané u kvasinky *M. pulcherrima* 1232 predstavujúce 36,31%. V porovnaní s ostatnými kmeňmi bola výrazne znížená schopnosť akumulácie lipidov preukázaná u kmeňa *M. fructicola* 1235, kde bola biomasa tvorená obsahom 5,31% mastných kyselín.

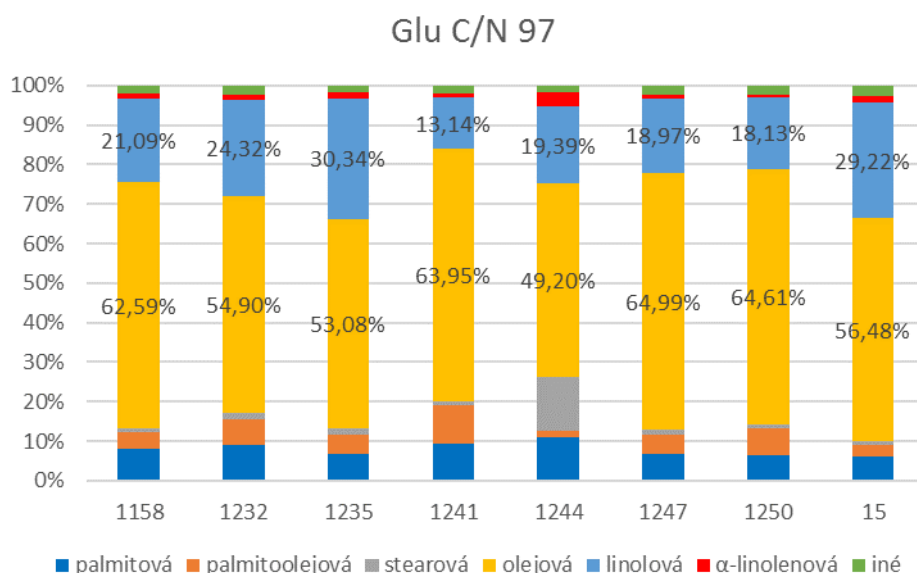
V biotechnologickom procese slúži glycerol ako jeden z mnohých potenciálnych zdrojov pre produkciu mikrobiálnych lipidov prostredníctvom oleogénnych mikroorganizmov. Z tohto dôvodu bola preto schopnosť utilizovať čistý alebo surový glycerol predmetom viacerých štúdií. Takýmto skúmaniam bola podrobená aj kvasinka *M. pulcherrima*, ktorej obsah lipidov bol po 14-dňovej kultivácii za znížených podmienok (15°C) stanovený na 40%. Tým sa potvrdilo, že kvasinka je schopná rásť a zároveň utilizovať glycerol obsiahnutý v médiách vo vysokej koncentrácii [76]. V predloženej diplomovej práci vykazovala najlepšie produkčné vlastnosti kvasinka *M. pulcherrima* 1232, pričom obsah naakumulovaných lipidov v jej bunkách predstavoval až 36,31%. Porovnaním s citovanou štúdiou nie je pozorovaný markantný rozdiel v množstve vyprodukovaných lipidov. Mierna odlišnosť vo výťažku lipidov mohla súvisieť s typom použitého kmeňa a rovnako aj s koncentráciou glycerolu v kultivačnom médiu. Ďalšia štúdia kvasinky *M. pulcherrima* preukázala pomerne nízky obsah naakumulovaných mikrobiálnych lipidov. Ku kultivácii (144 h, 28°C) bolo použité médium s odpadným glycerolom s C/N pomerom 118. S produkciou 10,70% lipidov bolo optimalizáciou toto médium vyhodnotené ako najlepšie [77]. Vzájomné porovnávanie štúdií a výsledkov práce dokazuje, že pomer C/N, teplotné podmienky a samotná doba kultivácie výrazne ovplyvňujú produkciu lipidov v oleogénnych kvasinkách. Vysoké výťažky lipidov na médiách, kde glycerol vystupoval ako primárny zdroj uhlíka boli preukázané u iných kvasiniek ako napr. *Yarrowia lipolytica*, *Candida curvata* či

Rhodotorula graminis. Kultiváciou na glycerole predstavovali výtťažky mikrobiálnych lipidov od 28 do 53% obsahu biomasy [76].

Predchádzajúca diplomová práca sa taktiež zaoberala riadenou produkciou lipidov na glukózových a glycerolových médiách. Najvyšší výtťažok na glycerolových médiách bol dosiahnutý kvasinkou *M. pulcherrima* 149 s výtťažkom 11,40% [78]. V predloženej diplomovej práci dosahovali u niektorých kmeňov naakumulované lipidy podstatne vyššie hodnoty. Najvyššia hodnota u kmeňa *M. pulcherrima* 1232 bola viac ako trojnásobná (36,31%) v porovnaní s citovanou prácou. Porovnaním s citovanou prácou boli v rámci akumulácie lipidov na glukózových médiách pozorované rovnaké trendy. So zvyšujúcim sa C/N pomerom sa u väčšiny kmeňov zvyšovalo aj množstvo naakumulovaných lipidov [78].

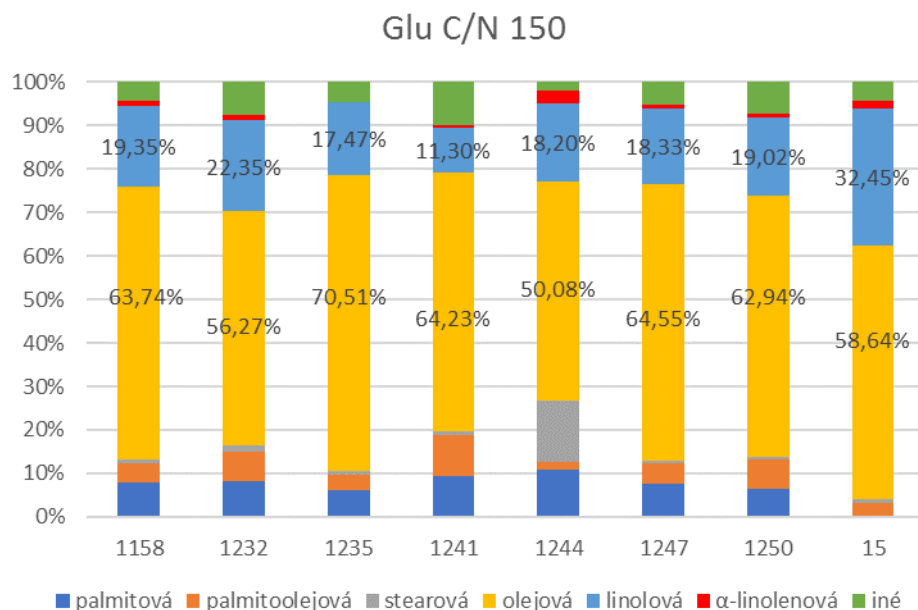
5.2.1.1 Analýza profilu mastných kyselín produkovaných na glukóze a glycerole

Pomocou techniky plynovej chromatografie bol u jednotlivých kmeňov kultivovaných na glukóze a glycerole ako hlavný zdroj uhlíka stanovený profil mastných kyselín. V závislosti na type použitého média a pomere C/N boli u skúmaných kmeňov vzájomne porovnávané ich produkčné vlastnosti.



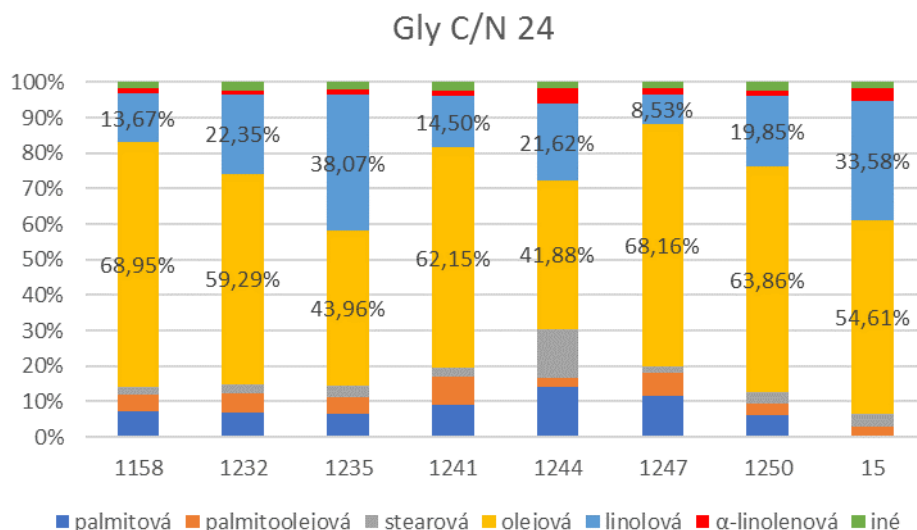
Obr. 23: Percentuálne zastúpenie mastných kyselín u jednotlivých kvasiniek kultivovaných na glukózovom médiu C/N 97

Pri kultiváciách na glukóze C/N 97 vykazovali všetky skúmané kmene vysokú akumuláciu olejovej kyseliny, pričom najvyššie množstvo tejto kyseliny bolo zaznamenané u kmeňa *M. zizyphicola* 1247 (Obr. 23). Obsah olejovej kyseliny tvoril 64,99% zo všetkých mastných kyselín. U všetkých skúmaných kmeňov bola preukázaná aj prítomnosť kyseliny linolovej ktorej obsah pohyboval približne okolo 20%. Najväčšie množstvo bolo zaznamenané u kmeňa *M. fructicola* 1235 (30,34%). Pri kultivácií na glukózových médiách s C/N 97 bola zaznamenaná aj produkcia palmitovej kyseliny palmitoolejovej kyseliny, stearovej kyseliny (C18:0- najvyšší producent *M. sinensis* 1244 až 13,48% čo je v porovnaní s ostatnými kmeňmi pomerne vysoko pretože u ostatných sa obsah pohyboval okolo 2%. U všetkých kmeňov bola preukázaná taktiež aj produkcia kyseliny α-linolenovej kyseliny. V malom zastúpení bola u všetkých kmeňov preukázaná aj prítomnosť elaidovej a lignocerovej kyseliny. Na rozdiel od ostatných kmeňov bola u kmeňa *M. pulcherrima* 1232 preukázaná prítomnosť nervonovej kyseliny a linolelaidovej kyseliny. Kmeň *M. sinensis* 1244 bol zas špeciálny produkciou behenovej kyseliny. Ďalej bola preukázaná aj prítomnosť pentadekánovej, myristovej a cis-11-eikosenovej kyseliny.



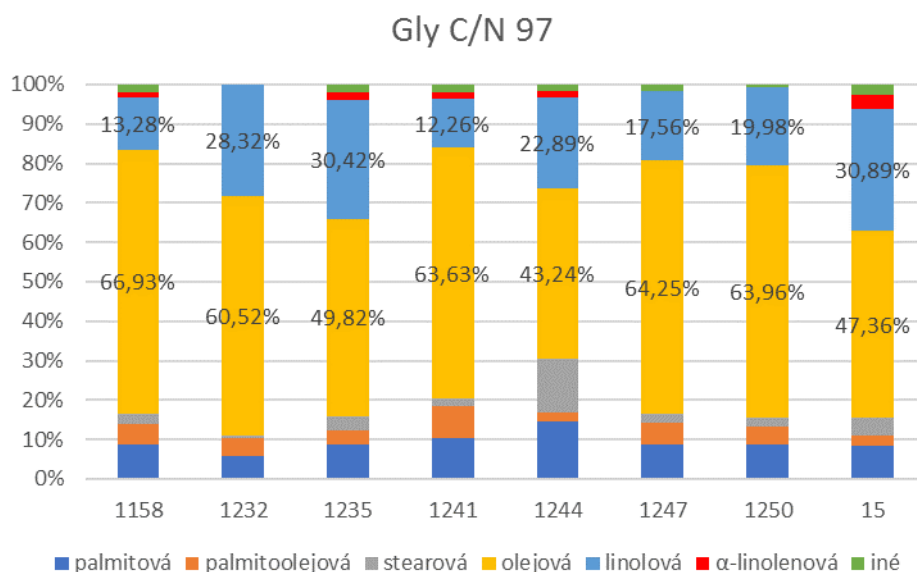
Obr. 24: Percentuálne zastúpenie mastných kyselín u jednotlivých kvasiniek kultivovaných na glukózovom médiu C/N 150

Podobný profil získaných mastných kyselín znázornenom na Obr. 24 bol zaznamenaný aj skúmaním kvasinkových kmeňov kultivovaných na glukózových médiách s vyšším C/N 150. Opäť bola u všetkých kmeňov najviac produkovaná olejová kyselina, pričom najväčšie množstvo bolo naakumulované v biomase kvasinky *M. fructicola* 1235. V porovnaní s výťažkom, ktorý bol u tohto kmeňa zaznamenaný na predchádzajúcom glukózovom médiu s C/N 97 došlo zmenou k vyššiemu pomeru C/N k takmer 18% navýšeniu produkcie olejovej kyseliny. S výnimkou kmeňa *M. zizyphicola* 1247 bolo vyššie množstvo olejovej kyseliny zaznamenané u všetkých producentov kultivovaných v podmienkach glukózy s C/N 150. Prítomnosť linolovej kyseliny vo väčšom množstve bola taktiež opäť zaznamenaná u všetkých kmeňov. Trend akumulácie linolovej kyseliny bol v porovnaní glukózových médií s C/N 97 a 150 však opačný ako v prípade olejovej kyseliny. Zvýšením C/N na 150 bol u všetkých kmeňov zistený pokles akumulácie linolovej kyseliny. Výnimku tvorili iba dva kmene – *M. shanxiensis* 1250 a *M. fructicola* 15, u ktorých bol zistený mierny nárast produkcie linolovej kyseliny porovnaním s glukózou C/N 97. Zvýšenie C/N na 150 malo podobný účinok na produkciu stearovej kyseliny ako kultivácia na C/N 97. Najväčším producentom bol rovnako ako v predchádzajúcom prípade kmeň *M. sinensis* 1244. Ďalšou mastnou kyselinou s významným zastúpením v kvasinkových bunkách bola aj palmitová kyselina. Prítomnosť tejto kyseliny nebola preukázaná u kmeňa *M. fructicola* 15 kde pravdepodobne podmienky živín v médiu neboli vhodné k produkcii tejto kyseliny.



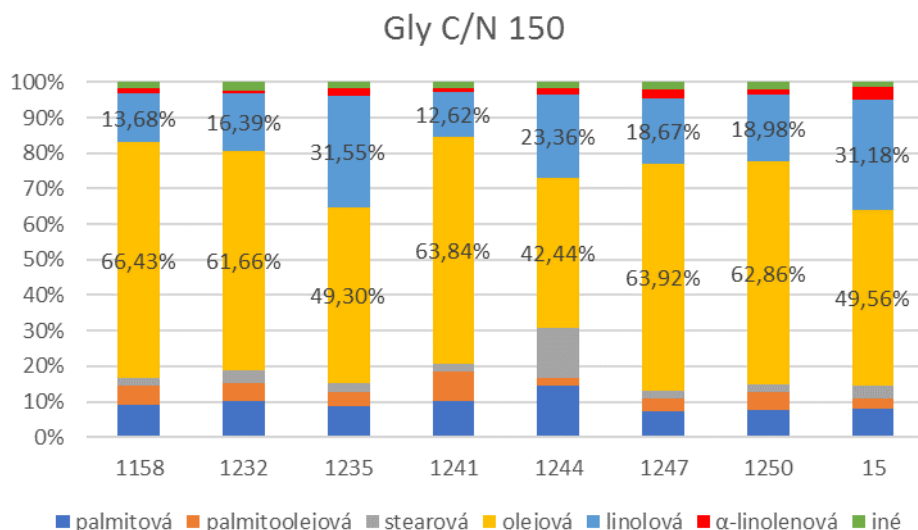
Obr. 25: Percentuálne zastúpenie mastných kyselín u jednotlivých kvasiniek kultivovaných na glycerolovom médiu C/N 24

Obsah mastných kyselín v bunkách kvasiniek rodu *Metschnikowia* nasyntetizovaných v priebehu kultivácie na glycerolovom médiu C/N 24 zobrazuje graf na Obr. 25. U všetkých skúmaných kvasinkových kmeňov s výnimkou *M. fructicola* 15 bola preukázaná produkcia palmitovej kyseliny, ktorá nepresahovala viac ako 15% obsahu všetkých mastných kyselín. Pomocou metódy plynovej chromatografie bola ďalej zistená prítomnosť palmitoolejovej kyseliny v najvyššom množstve 8,07% u kmeňa *M. andauensis* 1241. Spomedzi všetkých nameraných mastných kyselín bola u všetkých kmeňov najviac akumulovaná olejová kyselina, ktorá u skúmaných kmeňov tvorila viac ako polovicu obsahu mastných kyselín. Jedine v prípade kmeňov *M. fructicola* 1235 a *M. sinensis* 1244 bol obsah olejovej kyseliny 43,96% a 41,88%. Vybrané kvasinky rodu *Metschnikowia* preukázali schopnosť taktiež akumulovať značné množstvo linolovej kyseliny, ktorej obsah sa pohyboval v závislosti na jednotlivých kmeňoch od 8,53% (*M. zizyphicola* 1247) až do 38,07% (*M. fructicola* 1235). Glycerolové médium sa ukázalo ako vhodný substrát aj k tvorbe nižšieho množstva kyseliny α-linolenovej, pričom jej najvyššie zastúpenie bolo zistené v biomase vyprodukovanej kvasinkou *M. sinensis* 1244 (4,40%).



Obr. 26: Percentuálne zastúpenie mastných kyselín u jednotlivých kvasiniek kultivovaných na glycerolovom médiu C/N 97

Schopnosť akumulovať lipidy v bunkách kvasiniek bola pozorovaná aj v rámci kultivácie na glycerolových médiách s C/N 97. Porovnanie profilu získaných mastných kyselín z biomasy jednotlivých kmeňov je znázornené na Obr. 26. Pri produkcii kyseliny hexadekánovej nemožno tvrdiť, že u všetkých kmeňov došlo pri zvýšení C/N k stimulácii produkcie tejto kyseliny. U niektorých kmeňov bola naopak syntéza palmitovej kyseliny glycerolovým médiom s C/N 97 limitovaná v porovnaní s glycerolom C/N 24. Nižšie výtťažky boli zaznamenané konkrétne u kmeňa *M. pulcherrima* 1232, *M. zizyphicola* 1247 a *M. fructicola* 15. Zvyšné kmene dosahovali vyššie výtťažky na médiách s vyšším C/N. Úplne rovnaký trend bol pozorovaný aj pri produkcii palmitoolejovej kyseliny. Kmene, ktoré vykazovali nízku produkciu kyseliny hexadekánovej na glycerole C/N 97 (*M. pulcherrima* 1232, *M. shanxiensis* 1247 a *M. fructicola* 15) akumulovali rovnako aj nízke množstvo kyseliny palmitoolejovej v porovnaní s glycerolom C/N 24. U ostatných kmeňov s výnimkou kvasinky *M. pulcherrima* 1235, bola opäť produkcia kyseliny zvýšeným C/N mierne podporená. Limitácia dusíkatého zdroja ovplyvnila aj obsah vyprodukovanej stearovej kyseliny. Zníženie množstva peptónu a kvasničného extraktu malo pozitívny vplyv na produkciu tejto kyseliny u kvasiniek *M. chrysoperlae* 1158, *M. shanxiensis* 1250, *M. fructicola* 1235 a *M. fructicola* 15 u ktorých bolo dosiahnuté jej vyššie % zastúpenie v biomase v porovnaní s výtťažkami získanými na glycerole C/N 24. Naopak, pri porovnaní s glycerolovým médiom C/N 24 je možné pozorovať, že zvýšenie C/N malo u kmeňov *M. pulcherrima* 1232, *M. shanxiensis* 1250, *M. andauensis* 1241 a *M. sinensis* 1244 negatívnejší vplyv na % obsah stearovej kyseliny. Aj na médiách s glycerolom a zvýšením C/N bola opäť u všetkých skúmaných kvasiniek v najväčšom zastúpení zistená prítomnosť olejovej kyseliny. V produkcii na glycerole C/N 24 a glycerole C/N 97 boli tiež zistené mierne odchýlky u jednotlivých kmeňov. Kultiváciou na glycerole C/N 97 boli o niečo väčšie množstvá zistené v biomase kvasiniek *M. pulcherrima* 1232, *M. shanxiensis* 1250, *M. fructicola* 1235 a *M. sinensis* 1244, nižšie množstvá zas u kvasiniek *M. chrysoperlae* 1158, *M. zizyphicola* 1247, *M. andauensis* 1241 a *M. fructicola* 15. Ďalšou mastnou kyselinou, ktorá tvorila podstatnú časť lipidických látok prítomných v biomase bola linolová kyselina. Obsah kyseliny sa v bunkách pohyboval v rozmedzí 12,26 – 30,89%. Súčasťou buniek bolo aj malé množstvo α-linolenovej kyseliny, ktorej výskyt však nebol potvrdený u troch skúmaných kmeňov (*M. pulcherrima* 1232, *M. zizyphicola* 1247 a *M. shanxiensis* 1250).



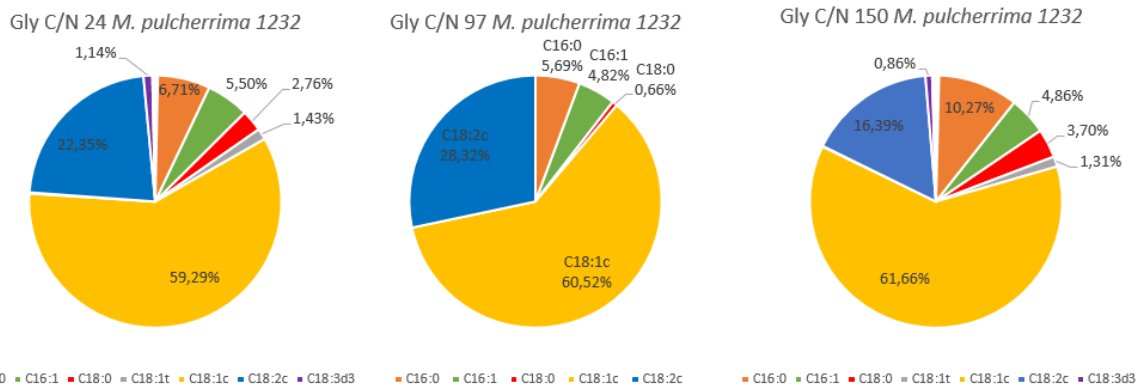
Obr. 27: Percentuálne zastúpenie mastných kyselín u jednotlivých kvasiniek kultivovaných na glycerolovom médiu C/N 150

Kultivácia na glycerolovom médiu s C/N 150 poskytla podobný profil mastných kyselín ako aj v predchádzajúcich kultiváciách (pozri Obr. 27). Najvyššie percentuálne zastúpenie dosahovala olejová kyselina, plynovou chromatografiou bol zaznamenaný aj značný obsah linolej, palmitovej a palmitoolejovej kyseliny. V menšom množstve boli zastúpené aj stearová a α-linolenová kyselina.

Vybrané kmene kvasiniek rodu *Metschnikowia* boli kultivované na troch rôznych médiách kde bol ako hlavný zdroj uhlíka použitý glycerol. Jednotlivé médiá sa od seba líšili v závislosti na množstve použitého dusíka, ktorý slúžil ako limitujúci faktor pre produkciu lipidických látok. Pomocou techniky plynovej chromatografie bol vo všetkých médiách s C/N 24, 97 a 150 stanovený profil mastných kyselín a ich množstvo, ktoré bolo počas procesu kultivácie naakumulované vo vnútri kvasinkových buniek. Na základe získaných výsledkov je teda možné produkciu jednotlivých kmeňov vzájomne porovnávať, prípadne určiť, ktoré podmienky boli najvyhovujúcejšie pre intracelulárnu syntézu mastných kyselín. Ako je možné vidieť z Obr. 25, Obr. 26 a Obr. 27 hlavnou mastnou kyselinou produkovanou behom kultivácie u všetkých kmeňov bola kyselina olejová. Významne zastúpenie mastných kyselín tvorila aj linolová kyselina, ktorá bola taktiež prítomná u všetkých skúmaných kmeňov kultivovaných na všetkých troch glycerolových médiách. Výnimkou bola iba kvasinka *M. fructicola* 15, ktorá túto kyselinu neprodukovala pri kultivácii na najnižšom C/N 24. Ďalšími významnými kyselinami obsiahnutými v kvasinkovej biomase o vyšších množstvách boli aj palmitová, palmitoolejová a stearová kyselina. Metódou plynovej chromatografie bolo zistené, že práve týchto päť mastných kyselín tvorilo hlavný profil zastúpenia mastných kyselín všetkých skúmaných kvasiniek rodu *Metschnikowia* použitých v práci.

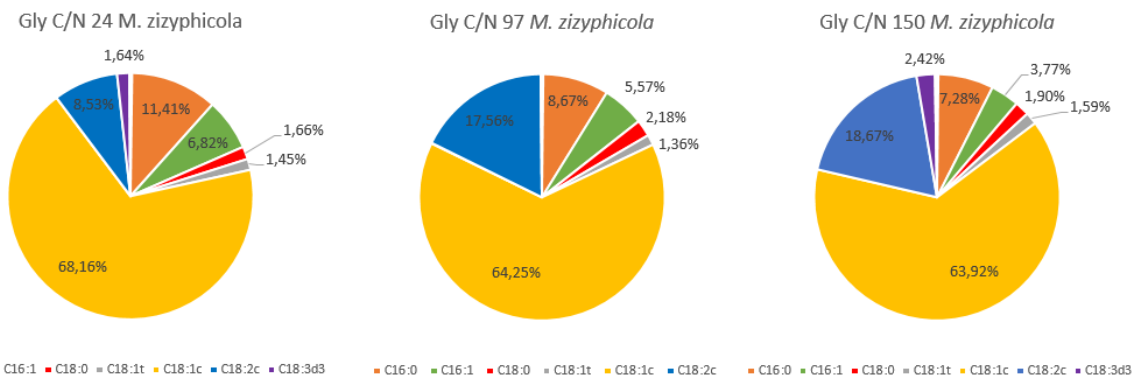
Z Obr. 23, až Obr. 27 je možné vidieť, že všetky kmene vykazovali veľmi podobnú produkciu mastných kyselín na oboch typoch médií (glukóza, glycerol). Výnimkou bola iba kvasinka *M. sinensis* 1244, u ktorej je zreteľne vidieť, že produkcia niektorých typov mastných kyselín bola odlišná. Ako jediný kmeň bola schopná na všetkých glukózových aj glycerolových médiách produkovať najvyšší obsah palmitovej a stearovej kyseliny. Zároveň bola na týchto médiách aj najnižším producentom olejovej kyseliny. Odlišnosť v produkcii mastných kyselín by teda mohla pravdepodobne súvisieť s genetickou výbavou tejto kvasinky.

Podobný profil mastných kyselín kultiváciou na glycerole aj glukóze bol získaný aj v predošlej diplomovej práci zameranej na produkciu lipidov kvasinkami rodu *Metschnikowia* [78]. Najviac zastúpenou kyselinou bola rovnako ako je znázornené na Obr. 23 a Obr. 27 olejová a linolová kyselina. Určité zastúpenie profilu tvorili aj palmitová, stearová a palmitoolejová kyselina.



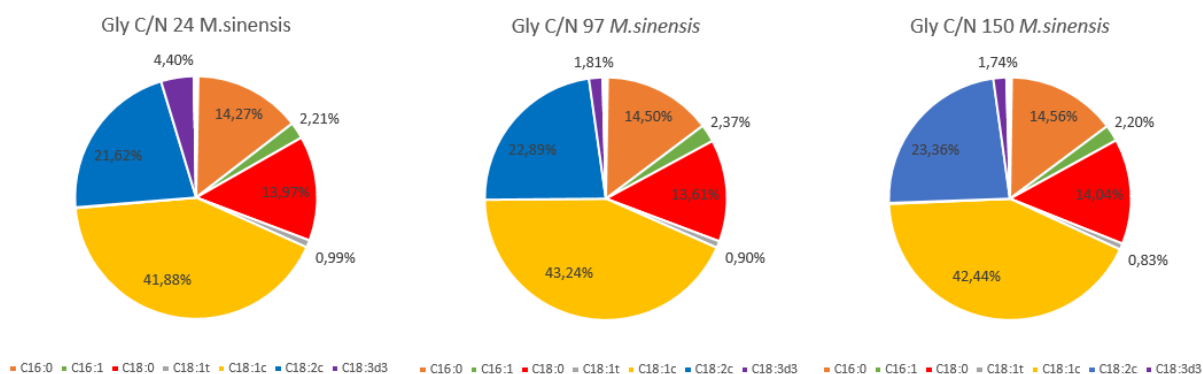
Obr. 28: Profil mastných kyselín kvasinky *M. pulcherrima* 1232 na glycerolových médiách C/N 24, 97 a 150. C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitolejová kyselina; C18:0 – stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina

U kvasinky *M. pulcherrima* 1232 bola produkcia kyseliny olejovej podporená rastúcim C/N, kde na médiu 150 bolo zaznamenané jej najvyššie % zastúpenie (61,66%). Obr. 28 znázorňuje, že obsah palmitovej a stearovej kyseliny bol taktiež najvyšší v médiu C/N 150 a zároveň najnižší na C/N 97. Naopak pri palmitolejovej kyseline bola najvyššia produkcia dosiahnutá na najnižšom C/N 24 a najnižšia opäť na C/N 97. Pomer C/N 97 však priaznivo vplýval na produkciu linolovej kyseliny, ktorá tu dosahovala svoje maximum 28,32%. Zvýšením C/N na 150 však jej produkcia poklesla takmer o 12%. Kultiváciou *M. pulcherrima* 1232 na glycerole bol získaný rozmanitejší profil MK. Médiá s C/N 24 a 150 podporili produkciu stopového množstva iných mastných kyselín patriacich do skupiny SFA, MUFA a PUFA.



Obr. 29: Profil mastných kyselín kvasinky *M. zizyphicola* na glycerolových médiách C/N 24, 97 a 150. C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitolejová kyselina; C18:0 – stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina

V porovnaní s kvasinkou *M. pulcherrima* 1232 (Obr. 28) bola produkcia olejovej zvyšujúcim sa C/N u kvasinky *M. zizyphicola* 1232 (Obr. 29) negatívne ovplyvnená. So stúpajúcim C/N klesal aj obsah palmitovej a palmitolejovej kyseliny. Pozitívny vplyv zvyšujúceho C/N bol však preukázaný pri tvorbe linolovej kyseliny, kde so vzrastajúcim C/N rástlo aj % zastúpenie kyseliny. Priamy vplyv C/N na produkciu stearovej kyseliny nebol preukázaný, pretože so zvyšujúcim sa C/N nedochádzalo ani k poklesu ani k rastu jej produkcie. Najvyššia produkcia bola zaznamenaná na médiu s C/N 97, u C/N 24 boli zaznamenané jej najnižšie hodnoty. Profil MK kvasinky *M. zizyphicola* 1247 bol na všetkých troch médiách z veľkej časti tvorený MUFA-mi, ktorých obsah sa pohyboval okolo 70%. Zvyšné % tvorili predovšetkým PUFA a z menšej časti SFA. V prípade glycerolového média C/N 24 bolo však u *M. zizyphicola* 1232 pozorované vyššie % zastúpenie SFA (13,36%) ako PUFA (10,17%).

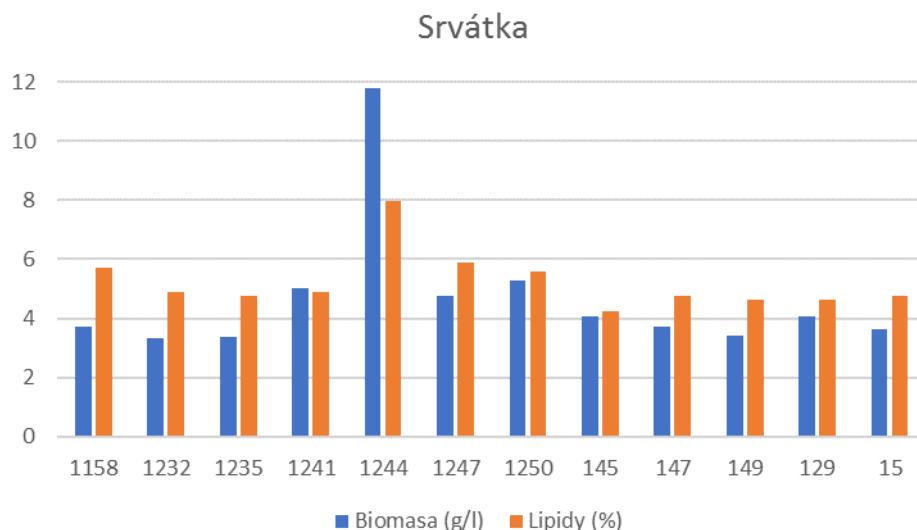


Obr. 30: Profil mastných kyselín kvasinky *M. sinensis* na glycerolových médiách C/N 24, 97 a 150. C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitolejová kyselina; C18:0 – stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina

Zvýšenie prípadne zníženie C/N nemalo u kvasinky *M. sinensis* 1244 priamy vplyv na produkciu olejovej kyseliny, keďže jej najvyšší obsah bol zaznamenaný na médiu s C/N 97 (pozri Obr. 30). Zvýšením na C/N 150 produkcia mierne poklesla a na najnižšom C/N bolo zaznamenané najnižšie % zastúpenie spomedzi všetkých troch médií. Zvyšujúci pomer C/N však priaznivo vplýval na produkciu palmitovej a linolovej kyseliny, ktorých obsah úmerne rástol aj so stúpajúcim C/N. U kyseliny palmitoleovej bola zaznamenaná najvyššia produkcia na médiu s C/N 97, pričom zvýšením C/N na 150 dosiahla produkcia palmitolejovej kyseliny svoje minimum. Stearová kyselina bola kvasinkou *M. sinensis* 1244 najviac produkovaná na médiách s CN 150, na médiách s C/N 97 však dosiahla pri porovnaní všetkých troch médií najnižšie hodnoty. Aj v tomto prípade boli na jednotlivých médiách produkované stopové množstvá niektorých SFA, MUFA a PUFA. Profil mastných kyselín ďalších skúmaných kmeňov znázorňujú Obr. 72 - Obr. 76, ktoré sú uvedené v sekcii PRÍLOHY.

5.2.2 Screening produkcie lipidov s využitím odpadnej srvátky

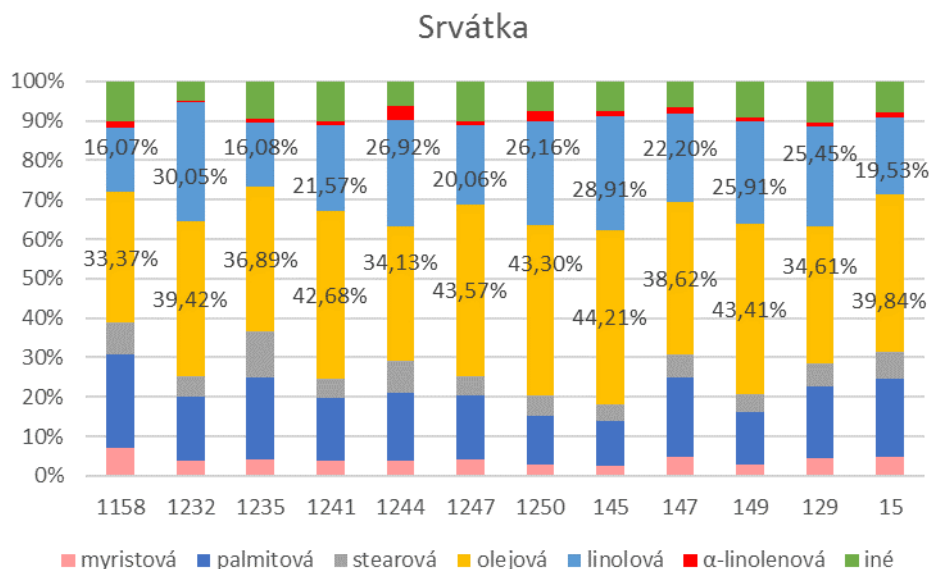
Produkcia lipidických látok a biomasy bola sledovaná aj na odpadnom substráte v podobe srvátky. Srvátka predstavuje hlavný vedľajší produkt pochádzajúci z mliekarenského priemyslu, ktorý je produkovaný vo veľkých a neustále sa zvyšujúcich množstvách. Väčšina srvátky je spracovávaná v procese likvidácie, čím dochádza k výraznému znečisteniu životného prostredia kvôli organickej záťaži, a taktiež aj k strate významných mliečnych zložiek s vysokou nutričnou hodnotou. V súčasnosti je teda zvýšená pozornosť venovaná vývoju účinných a nízko nákladových metód, ktoré by boli schopné odstraňovať srvátku bez negatívnych environmentálnych dopadov. Jednou z možností je aj proces biotechnologickej valorizácie srvátky, pri ktorom sa súčasne znižuje znečistenie a taktiež dochádza k produkcii mikrobiálnych metabolitov s pridanou hodnotou. Jedným z cieľom práce bol screening potenciálnej využitia odpadnej srvátky ako primárneho zdroja uhlíku k produkcii mikrobiálnej biomasy (single-cell protein - SCP) a lipidov (single-cell oil – SCO) kvasinkami rodu *Metschnikowia*.



Obr. 31: Porovnanie produkcie biomasy a lipidov na srvátkovom médiu

Z grafu znázorneného na Obr. 31 je možné vidieť, že všetky kultivované kmene boli schopné rásť na srvátkovom médiu, pričom produkcia biomasy sa pohybovala od 3,32-11,79 g/l. Získané výsledky taktiež indikujú, že srvátka bola vhodným substrátom aj pre akumuláciu značného množstva lipidov v mikrobiálnych bunkách. Najnižšia hodnota biomasy bola zaznamenaná u kmeňa *M. pulcherrima* 1232 s obsahom mikrobiálnych lipidov 4,87 % celkovej biomasy. Zo získaných výsledkov bolo zistené, že najvyšším producentom biomasy bol kmeň *M. sinensis* 1244, kde hmotnosť suchej biomasy zaznamenala nárast na 11,79 g/l. Zároveň bola u tejto kvasinky preukázaná aj najvyššia produkcia lipidov v kvasinkových bunkách ktoré tvorili 7,96% predstavujúcich 0,94 g/l. Najnižšia akumulácia intracelulárnych lipidických látok, ktoré tvorili 4,26 % (0,17 g/l) bola pozorovaná u kvasinky *M. pulcherrima* 145.

V súčasnosti nie je známe, že by kvasinky rodu *Metschnikowia* patrili medzi mikroorganizmy, ktoré sú schopné výhradne a vo vysokej miere využívať pre svoj rast čistú laktózu ako hlavný substrát. Pri kultivácii bola použitá neupravená lyofilizovaná srvátka. Keďže väčšina kvasiniek rastie najmä na glukózových médiách, je možné predpokladať že vyššie výťažky ako biomasy tak aj mikrobiálnych lipidov by bolo možné dosiahnuť na médiách s hydrolyzovanou prípadne inak upravenou srvátkou. Externý prídavok laktázy do média by mohol spôsobiť štiepenie laktózy na jednoduché cukry glukózu a galaktózu, čo by mohlo byť pre kvasinky rodu *Metschnikowia* výhodnejšie z hľadiska lepšiemu prístupu a využitiu jednoduchých cukrov. Vyššie výťažky mikrobiálnych lipidov by mohli byť taktiež dosiahnuté väčšou limitáciou externých anorganických zlúčenín obsahujúcich dusík. Proces uskladňovania lipidov býva často ovplyvnený obsahom cukrov. V porovnaní s kultiváciou na médiách kde bola ako hlavný substrát použitá čistá glukóza bolo dosiahnutých vyšších hodnôt vyprodukovanej biomasy v porovnaní so srvátkovými médiami.



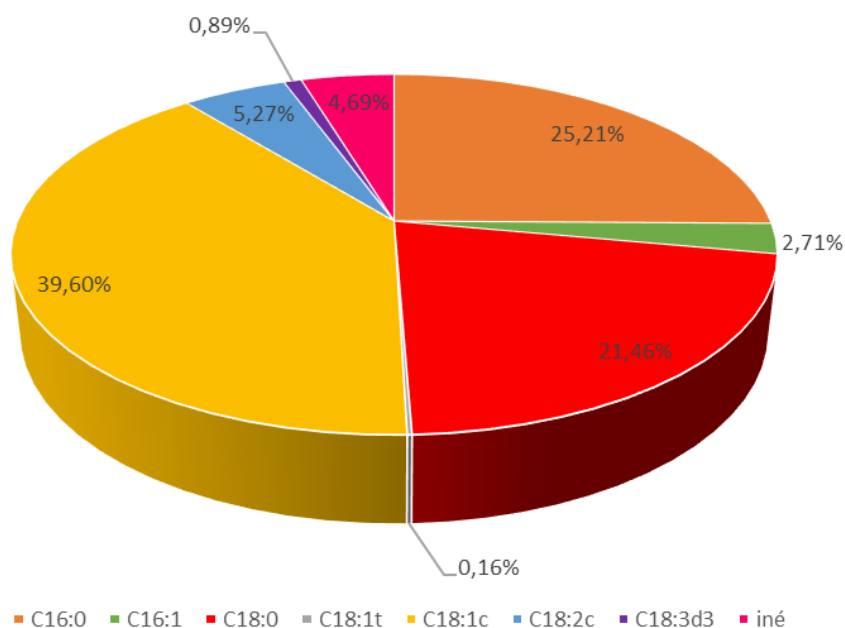
Obr. 32: Percentuálne zastúpenie mastných kyselín v bunkách kvasiniek kultivovaných na srvátkovom médiu

Kvasinky rodu *Metschnikowia* boli kultivované s cieľom produkcie lipidických látok aj na odpadnom substráte v podobe srvátky. Ku kultivácii bola využitá čistá lyofilizovaná srvátka bez akejkoľvek úpravy. Profil získaných mastných kyselín z biomás jednotlivých kmeňov je zobrazený na Obr. 32. Využitie srvátky ako primárneho zdroja uhlíka viedlo k produkcii veľkého množstva rozličných mastných kyselín. U všetkých kmeňov bola potvrdená prítomnosť myristovej kyseliny so zastúpením od 2,50% do 6,94%. V podstatne väčšom množstve tvorila profil mastných kyselín hexadekánová kyselina, ktorá sa v najväčšom množstve nachádzala u kmeňa *M. chrysoperlae* 1158, kde tvorila 23,94%. Menšie množstvo spomedzi naakumulovaných kyselín predstavovala stearová kyselina. Rovnako ako aj u predchádzajúcich kultivácií, najviac zastúpenou kyselinou bola aj v prípade srvátkových médií kyselina olejová. Zastúpenie tejto kyseliny sa u kmeňov pohybovalo od 33,37% (*M. chrysoperlae* 1158) až do 44,21% (*M. pulcherrima* 145). Z Obr. 32 je možno pozorovať, že významné množstvá boli zaznamenané aj v prípade produkcie linolovej kyseliny. Najvyšším producentom bola kvasinka 1232 so zastúpením 30,05%, najnižšími producentmi boli kvasinky *M. chrysoperlae* 1158 a *M. fructicola* 1235 so zastúpením linolovej kyseliny 16,07% a 16,08%. V malom množstve (0,61%- 3,64%) bola v biomase všetkých kvasiniek zastúpená aj α-linolenová kyselina. Jednotlivé kvasinky boli zaujímavé aj produkciou iných kyselín patriacich do skupín SFA, MUFA a PUFA, ktoré však tvorili veľmi malé % zastúpenia mastných kyselín.

5.2.3 Kultivácia kvasiniek rodu *Metschnikowia* na odpadnom živočíšnom tuku

Pred samotnou kultiváciou kvasiniek rodu *Metschnikowia* na živočíšnom tuku bol tento odpadný substrát podrobený analýze plynovou chromatografiou s FID detektorom. Cieľom analýzy bolo zistiť obsah uhlíka v tuku, ktorý vo vhodnom pomere C/N nahradí v kultivačných médiách uhlík z glukózy. Celkový obsah uhlíka v tuku pochádzajúci z triacylglycerolov bol stanovený na 76,78%. Jednotlivé zastúpenie mastných kyselín, ktoré tvorili TAG je zobrazené na Obr. 33.

Profil MK odpadného živočíšneho tuku



Obr. 33: Profil mastných kyselín odpadného živočíšneho tuku

Získaný profil MK z odpadného živočíšneho tuku znázorňuje Obr. 33. Odpadný tuk bol tvorený predovšetkým SFA, ktoré predstavovali 50,53% všetkých MK, v menšom zastúpení 43,20% boli obsiahnuté MUFA. Zastúpenie PUFA bolo pomerne nízke a tvorili iba 6,27% MK. Hlavnými zástupcami SFA v odpadnom tuku boli kyselina palmitová (25,21%) a kyselina stearová (21,46%). Menší % podiel tvorila aj kyselina myristová (2,43%), v stopovom množstve boli obsiahnuté kyseliny ako lignocerová, laurová, oktánová, pentadekánová, behenová a trikosanová. Najvyšší % podiel zo všetkých mastných kyselín predstavovala olejová kyselina (39,60%), ktorá patrí medzi mononenasytené MK. Ďalšou MUFA, ktorá bola v malom množstve obsiahnutá vo vzorke živočíšneho tuku je aj palmitoolejová kyselina. Jej % zastúpenie tvorilo iba 2,71%. V oveľa menšom množstve boli obsiahnuté ďalšie mononenasytené MK ako myristoolejová, elaidová, cis-11-eikosenová a nervonová kyselina. Ako už bolo spomínané obsah PUFA v živočíšnom tuku bol pomerne nízky. Tvorila ho predovšetkým linolová kyselina (5,27%). Z menej zastúpených PUFA možno spomenúť aj α -linolénovú, arachovú a dokosahehexaenovú kyselinu.

5.2.3.1 Produkcia lipolytických enzýmov kvasinkami rodu *Metschnikowia*

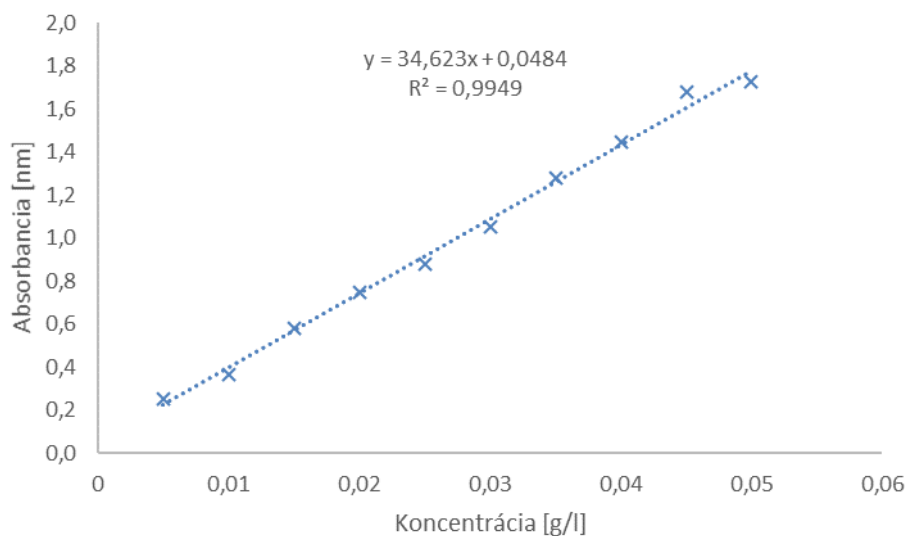
Pri spektrofotometrickom stanovení lipázovej aktivity sú využívané najmä syntetické lipázové substráty. Enzymaticky katalyzovanou hydrolýzou dochádza k premene týchto substrátov na produkty, ktoré je možné detegovať spektrofotometricky. Ako substráty najčastejšie slúžia p-nitrofenylové a naftylové estery mastných kyselín s dlhým uhlíkatým reťazcom. Lipolýzou p-nitrofenyl esterov (lauráty, palmitáty, oleáty) vzniká žltý sfarbený p-nitrofenol, ktorý je možné stanoviť spektrofotometricky pri 405-410 nm [79].

U vybraných kvasiniek rodu *Metschnikowia* bol v kvapalnom produkčnom médiu prevedený kvantitatívny screening enzymovej aktivity lipáz za použitia už spomínanej spektrofotometrickej metódy s p-nitrofenylpalmitátom. Následne bolo zmerané množstvo p-nitrofenolu, ktoré sa uvoľnilo pôsobením enzýmu na p-NPP. Lipázová aktivita u jednotlivých kmeňov bola vyjadrená v jednotkách nmol/ml.min. Keďže produkcia lipáz je ovplyvnená rôznymi faktormi ako napríklad zdroj uhlík, dusík, obsah iónov kovov, inkubačná teplota, povrchovo aktívne látky (surfaktanty) a pH, podmienky behom experimentu boli postupne optimalizované s cieľom dosiahnuť čo možno najvyššie enzymové aktivity.

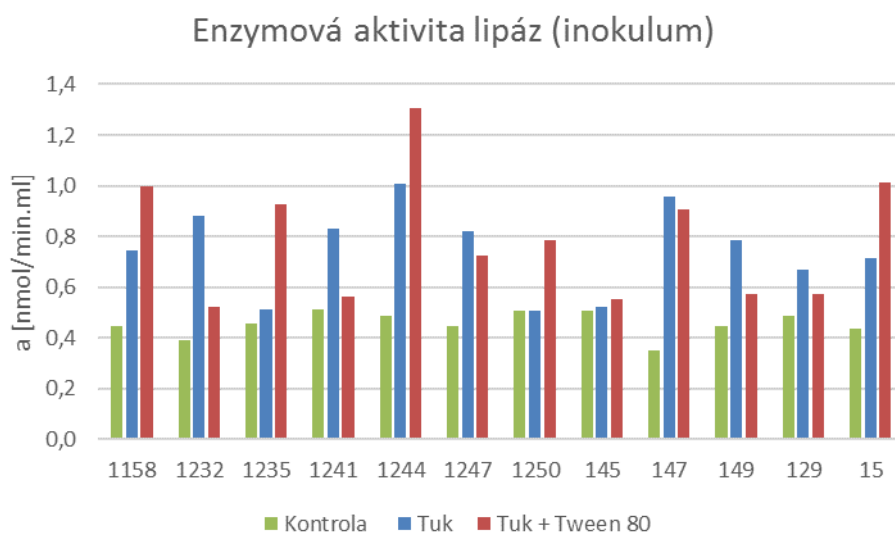
Pre produkciu lipáz boli v predloženej práci študované tri typy médií: glukóza (kontrola), odpadný tuk, odpadný tuk s prídavkom Tweenu 80.

Tab. 11: Kalibračná krivka *p*-nitrofenolu

Koncentrácia (g/l)	0,005	0,010	0,015	0,020	0,025	0,030	0,035	0,04	0,045	0,050
Absorbancia (405 nm)	0,252	0,367	0,578	0,745	0,879	1,053	1,280	1,446	1,678	1,727



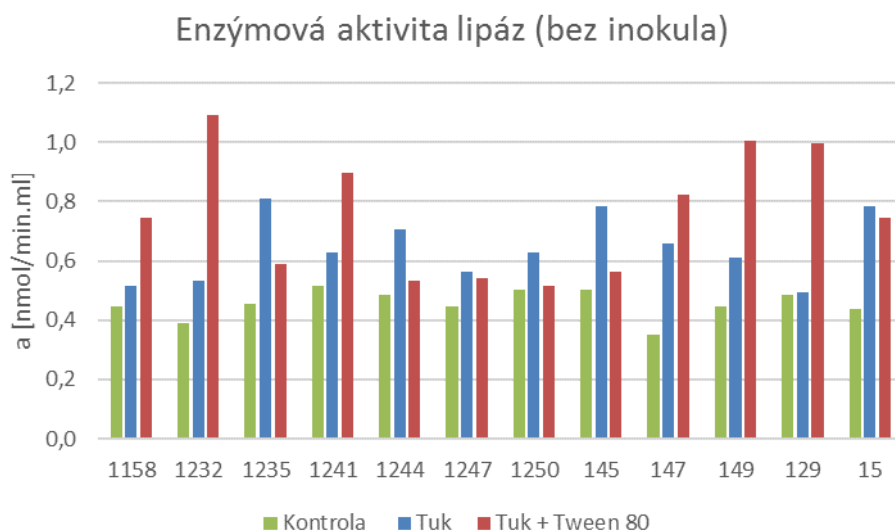
Obr. 34: Kalibračná krivka *p*-nitrofenolu



Obr. 35: Enzymová aktivita lipáz (inokulum)

Pre stanovenie enzymovej aktivity lipáz kvasiniek rodu *Metschnikowia* boli použité kultivačné médiá obsahujúce ako hlavný zdroj uhlíka odpadný tuk. Do jednej kultivačnej série obsahujúcej tuk bol navyše pridaný aj emulzifikátor vo forme polysorbátu 80 (Tween 80). Na Obr. 35 je možné vidieť porovnanie lipolytickej aktivity, ktorú kvasinky vykazovali na tukových médiách a na médiách s prídavkom Tweenu 80. U všetkých kmeňov kultivovaných na už spomínaných substrátoch bola potvrdená

produkcia lipázy. Z Obr. 35 je možné vidieť, že celkovo najnižšia enzýmová aktivita lipáz na čistom odpadnom tuku bola zaznamenaná u kmeňa *M. shanxiensis* 1250 – (0,505 nmol/min·ml). Aj napriek tomu, že lipidové substráty väčšinou podporujú produkciu lipáz, v tomto prípade kvasinka produkovala malé množstvo lipolytických enzýmov. Tukový substrát predstavoval pre túto kvasinku pravdepodobne zložitý uhlíkatý zdroj, preto nebola schopná rásť a vytvárať viac nových buniek, ktoré by produkovali väčšie množstvo lipáz. Prídavkom Tweenu do média však môžeme pozorovať zvýšenie lipázovej aktivity na hodnotu 0,784 nmol/min·ml. Je teda možné predpokladať, že v prítomnosti emulzifikátora u tohto kmeňa došlo k efektívnejšiemu využitiu odpadného tuku, čím sa zvýšil aj počet buniek produkujúcich lipázy. Podobný trend lipázových aktivít možno pozorovať aj u ďalších skúmaných kmeňov – *M. chrysoperlae* 1158, *M. fructicola* 1235, *M. sinensis* 1244, *M. pulcherrima* 145 a *M. fructicola* 15. V porovnaní s tukovým médiom bola vyššia lipázová aktivita u týchto kmeňov pozorovaná na médiu s polysorbátom. Tween čiastočne prispel k lepšej emulgácii tukového média, čím viac buniek získalo lepší prístup k tuku, a tým bola u týchto kmeňov zaznamenaná vyššia lipázová aktivita. Výnimku tvorili kmene *M. pulcherrima* 1232, *M. andauensis* 1241, *M. zizyphicola* 1247, *M. pulcherrima* 147, *M. pulcherrima* 149, *M. andauensis* 129, u ktorých bola enzýmová aktivita vyššia na čistých tukových médiách. U týchto kmeňov sa preukázalo, že sú schopné využívať tukové médium pre ďalší rast aj bez nutnosti prídania látky, ktorá by im uľahčila prístup k substrátu a tým pádom je pozorovaná aj vyššia produkcia lipáz. Najvyššia lipolytická aktivita pozorovaná na čistom tukovom médiu bola zaznamenaná u kmeňa *M. sinensis* 1244 s hodnotou 1,005 nmol/min·ml. U tohto kmeňa bola zároveň pozorovaná aj najvyššia enzýmová aktivita lipáz na médiách obsahujúcich Tween 80, kde predstavovala 1,304 nmol/min·ml. Na tomto príklade môžeme pozorovať pozitívny vplyv emulgačných vlastností Tweenu 80. Ten môže okrem iného vystupovať v médiách aj ako zdroj uhlíka čím môže byť kladne ovplyvnená aj produkcia lipáz. Kvasinky vyžadujú pre svoj rast uhlík, čím viac uhlíka, tým viac môžu rásť, a tým väčšia produkcia enzýmov. Najnižšia lipázová aktivita na tukových médiách s Tweenom bola zaznamenaná u kmeňa *M. pulcherrima* 1232- 0,524 nmol/min·ml. Z Obr. 35 je možné vidieť, že pomerne vysoká enzýmová aktivita lipáz bola pozorovaná u všetkých kvasiniek kultivovaných na kontrolných médiách, kde ako zdroj uhlíka vystupovala glukóza. Kvasinkám boli pravdepodobne vytvorené vhodné podmienky pre rast v dôsledku čoho bola pozorovaná aj produkcia lipáz. Lipázové aktivity pozorované na kontrolných médiách v ani jednom prípade neprekročili aktivity namerané na médiách s čistým tukom a s prídavkom Tweenu. Z toho môžeme usúdiť, že v porovnaní s kontrolnými médiami lipidový substrát čiastočne indukoval produkciu lipolytických enzýmov.

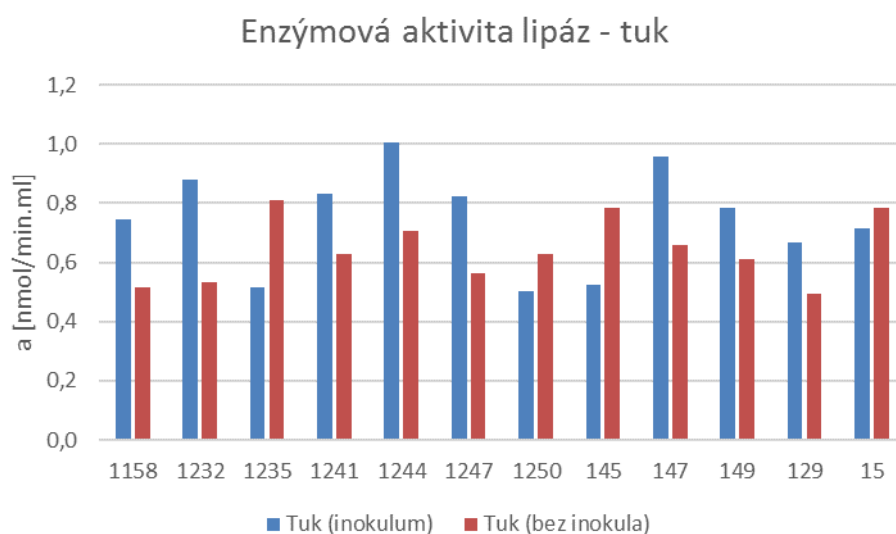


Obr. 36: Enzýmová aktivita lipáz (bez inokula)

Obr. 36 znázorňuje enzýmovú aktivitu lipáz kvasiniek rodu *Metschnikowia*. U týchto typov médií nebolo k zaočkovaniu použité 24 h inokulum, ale kultúry boli do médií prenesené priamo zo zásobnej Petriho misky. Tým, že kvasinky nemali prístup ku glukóze ani k zvyšným zložkám pochádzajúcich z inokula boli čiastočne vystavené stresovým podmienkam. Porovnanie produkcie lipáz v závislosti na spôsobe očkovania bude diskutované v nasledujúcich odsekoch.

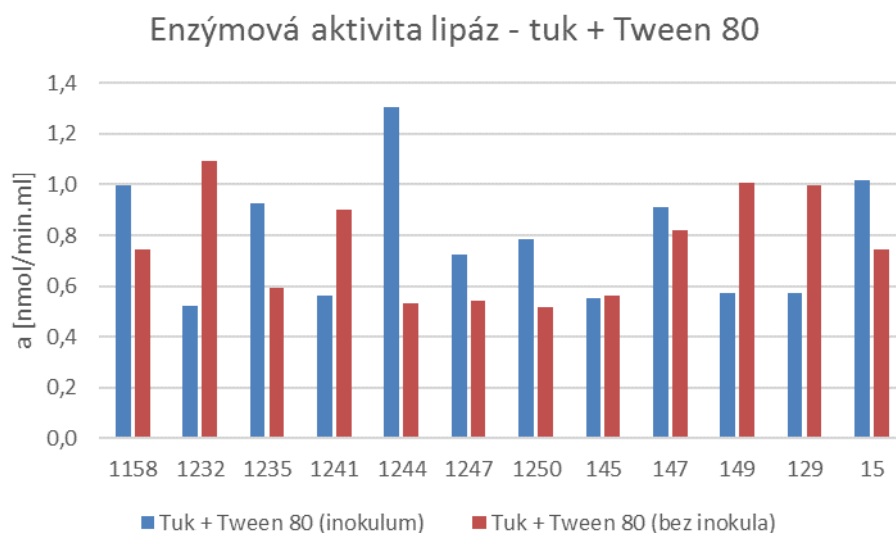
Rovnako ako v prípade inokulových médií, aj tu môžeme pozorovať, že všetky kvasinky produkovali lipázy. Najnižšia lipolytická aktivita na tukovom médiu bola zaznamenaná u kmeňa *M. andauensis* 129 s hodnotou 0,495 nmol/min.ml. U tejto kvasinky možno pozorovať aj veľmi príbuzné hodnoty enzýmovej aktivity lipáz na kontrolnom médiu ($a=0,486$ nmol/min· ml). Lipidový substrát vo forme odpadného tuku u tejto kvasinky pravdepodobne moc nepodporoval syntézu lipáz, zvýšenú produkciu možno pozorovať až po pridaní emulgátoru do média, kde došlo k dvojnásobnému nárastu produkcie lipáz. Prídavok emulgátoru mal pozitívny účinok aj u iných skúmaných kvasinkových kmeňov. Obr. 36 znázorňuje, že vyššie enzýmové aktivity na médiách s tweenom boli v porovnaní s čistým tukom sledované u kmeňov *M. chrysoperlae* 1158, *M. pulcherrima* 1232, *M. andauensis* 1241, *M. pulcherrima* 147, *M. pulcherrima* 149, *M. andauensis* 129. Naopak ostatným kmeňov k vyšším lipázovým aktivitám vyhovovala skôr prítomnosť čistého tuku. Ten najviac stimuloval produkciu enzýmu u kmeňa *M. fructicola* 1235, kde aktivita dosahovala hodnoty 0,813 nmol/min.ml. V prípade médií s Tweenom bola najvyššia aktivita pozorovaná u kmeňa *M. pulcherrima* 1232 (1,092 nmol/min.ml), najnižšia u kmeňa *M. shanxiensis* 1250 (0,514 nmol/min.ml).

V porovnaní s inými kvasinkami boli namerané enzýmové aktivity lipáz kvasiniek rodu *Metschnikowia* pomerne malé. U kvasinky *Y. lipolytica* bola po 72 h kultivácií produkcia extracelulárnych lipáz stanovená na $2,8 \cdot 10^4$ nmol/min.ml, u jej mutantných kmeňov bola produkcia zvýšená dokonca až na $1 \cdot 10^6$ nmol/min.ml [80]. Pomerne vysoká produkcia lipolytických enzýmov bola zaznamenaná aj u kvasinky *C. rugosa*. Jej kultiváciou na palmitovej kyseline, ako hlavný zdroj uhlíka, predstavovala extracelulárna lipáza $4,3 \cdot 10^3$ nmol/min.ml [81]. Zo získaných výsledkov bola v predloženej práci najvyššia produkcia lipáz stanovená na 1,304 nmol/min.ml u kvasinky *M. sinensis* 1244. Aktivita lipáz môže byť ovplyvnená viacerými faktormi ako napríklad zloženie a pH kultivačného média, doba kultivácie, teplota a v neposlednom rade aj genetickou výbavou kvasinkovej bunky.



Obr. 37: Porovnanie enzýmovej aktivity lipáz na odpadnom tuku s inokulom / bez inokula

Nasledujúci Obr. 37 pojednáva produkciu lipolytických enzýmov na tukových médiách v závislosti na spôsobe naočkovania produkčných médií. U jednej sady médií bolo k naočkovaní použité predom pripravené 24 h inokulum zásobných kultúr, kým v druhej sade médií boli kvasinkové bunky prevedené priamo do produkčných médií zo zásobných Petriho misiek. Z Obr. 37 môžeme vidieť, že u siedmich kvasinkových kmeňov bola výrazne vyššia enzýmová aktivita zaznamenaná na médiách, kde bolo k očkovaní použité 24 h inokulum. Súčasne na inokulovanom médiu bola zaznamenaná aj najvyššia lipolytická aktivita u kmeňa *M. sinensis* 1244. Z toho vyplýva, že pri produkcii lipáz pravdepodobne kvasinky využívali aj zdroj uhlíka vo forme glukózy, ktorá bola v malom množstve prenesená do produkčného média. Glukóza spolu s tukom vytvorili kvasinkám vhodné podmienky pre rast a množenie, čím bola zabezpečená aj vyššia produkcia enzýmu. Vyššia enzýmová aktivita mohla byť spôsobená aj tým, že do média už boli prenášané čiastočne narastené bunky. Tým pádom sa v médiu nachádzalo väčšie množstvo buniek, ktoré mohli produkovať lipázy. Najvyššej produkcie lipáz bolo dosiahnutého u kvasinky *M. sinensis* 1244, o niečo menšie množstvá produkovala kvasinka *M. pulcherrima* 147 a *M. pulcherrima* 1232. V médiách, kde bola kultúra zaočkovaná zo zásobných Petriho misiek, boli bunky vystavené miernym stresovým podmienkam. Keďže boli prenesené rovno do médií pravdepodobne vyžadovali dlhší čas, kým sa adaptovali na tukové prostredie a dostali sa do fázy vhodnej pre produkciu enzýmu. Rovnako bola v týchto médiách pravdepodobne produkcia limitovaná aj z dôvodu, že sa v nich nachádzalo menšie množstvo buniek v porovnaní s inokulovanými médiami. Tento trend však nebol pozorovaný u všetkých skúmaných kmeňov. Kvasinky *M. fructicola* 1235, *M. shanxiensis* 1250, *M. pulcherrima* 145 a *M. fructicola* 15 preukázali vyššie lipázové aktivity na médiách, kde sa zvyšková glukóza nenachádzala. Možno práve tým, že boli kvasinky vystavené väčšiemu stresu bola produkcia lipáz stimulovaná. Vzhľadom k tomu, že mali k dispozícii iba odpadný tuk, museli sa tak rýchlo adaptovať na nové prostredie a začať produkovať enzýmy potrebné k tomu, aby mohli ďalej utilizovať tuk ako zdroj uhlíka. Najvyššia enzýmová aktivita na médiách obsahujúcich iba tuk bez ďalších zvyškových látok bola pozorovaná u kmeňa *M. fructicola* 1235, o niečo menešia aktivita lipáz bola pozorovaná u kmeňov *M. pulcherrima* 145 a *M. fructicola* 15.



Obr. 38: Porovnanie enzýmovej aktivity lipáz na odpadnom tukus prídavkom Tweenu 80 s inokulom / bez inokula

Obr. 38 znázorňuje enzýmovú aktivitu lipáz pozorovanú na tukových médiách s prídavkom Tweenu 80 ako emulgátoru. Vzájomne sú medzi sebou porovnávané médiá obsahujúce zvyškovú glukózu z inokula a čisté tukovo-tweenové médiá bez obsahu glukózy. Z Obr. 38 je možné vidieť že rovnako ako pri tukových médiách, aj tu je u väčšiny kmeňov zaznamenaná vyššia enzýmová aktivita v prípade médií s malým obsahom zvyškovej glukózy. Konkrétne najvyššia enzýmová aktivita bola pozorovaná u kmeňa *M. sinensis* 1244, pomerne vysoké hodnoty enzýmových aktivít boli dosiahnuté aj u kmeňov *M.*

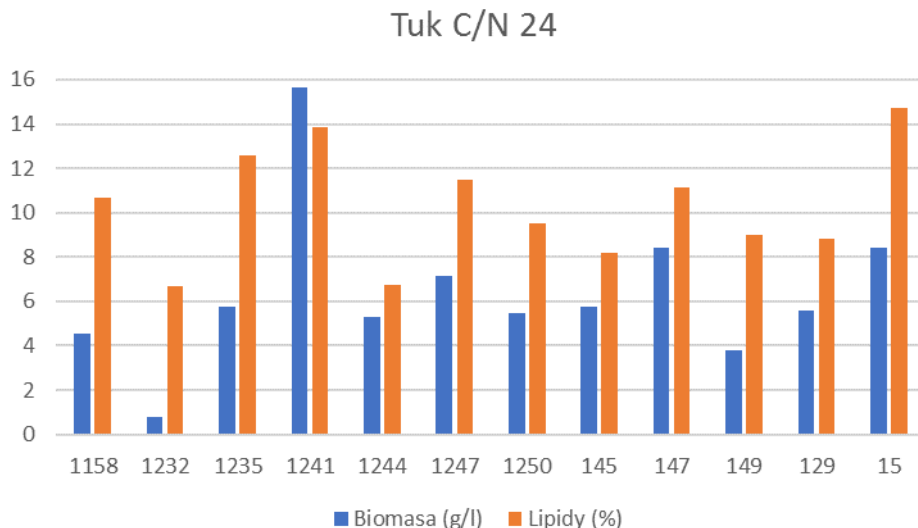
chrysoperlae 1158 a *M. fructicola* 15. Veľmi podobné enzýmové aktivity ako na médiách s inokulom či bez boli pozorované u kmeňa *M. pulcherrima* 145. Prídavok Tweenu mal teda obdobný účinok na produkciu lipáz v oboch typoch médií a ani malý obsah glukózy tu výrazne neovplyvnil syntézu enzýmu. Výnimku však opäť tvorili niektoré kmene (*M. pulcherrima* 1232, *M. andauensis* 1241, *M. pulcherrima* 149, *M. pulcherrima* 145, *M. andauensis* 129), ktorým k produkcii lipáz vyhovovalo viac tukovo-tweenove médium bez zvyškovvej glukózy. Tieto kmene sa dokázali adaptovať na podmienky médiá a boli schopné produkcie väčšieho množstva lipáz. Najvyššia enzýmová aktivita na médiách bez inokula bola pozorovaná u kmeňa *M. pulcherrima* 1232, vyššie hodnoty dosahovali aj kvasinky *M. pulcherrima* 149 a *M. andauensis* 129.

Zo získaných výsledkov však nemožno presne určiť a definovať, ktoré podmienky pre produkciu lipáz vyhovovali kvasinkám rodu *Metschnikowia* najviac. Priložené grafy zobrazujú, že lipázové aktivity boli rozdielne v závislosti na jednotlivých kmeňoch. Kým jednému kmeňu mohli vyhovovať tukové médiá so zvyškovou glukózou, u druhého kmeňa to mohlo byť zas opačne a zložky týchto médií boli pre produkciu vyššieho množstva lipáz nedostačujúce. Globálne teda nemožno definovať presné podmienky zvýšenia lipázovej aktivity, ktoré by platili rovnako pre všetky kvasinkové kmene v tomto rode. Keďže každý jeden kmeň kvasiniek z rodu *Metschnikowia* je jedinečný, má aj rozdielne nároky na zdroj uhlíka, živiny a podobne.

Väčšina kvasiniek vykazuje vyššie hodnoty lipázovej aktivity behom neskoršej exponenciálnej fáze. Najnižšie hodnoty aktivít dosahujú kvasinky v lag fáze a v skoršej exponenciálnej fáze [82]. Jednou z možných príčin nižších lipázových aktivít mohol byť aj fakt, že aktivita nebola pozorovaná práve behom neskoršej exponenciálnej fáze rastovej krivky. Vzorky z jednotlivých kultivačných médií boli odoberané po 7- dennej kultivácii kedy sa bunky už pravdepodobne nachádzali v neskoršej stacionárnej fáze až vo fáze odumierania. Vplyv na produkciu lipáz má aj použitý zdroj uhlíka. Prídavkom väčšieho množstva glukózy ako zdroja energie by lipázová aktivita mohla u niektorých kmeňov stúpnuť. Pre zvýšenie aktivity extracelulárnych lipáz sa často do média pridávajú aj povrchovo aktívne látky [82,83]. V predloženej práci bol pri skúmaní lipázových aktivít použitý Tween 80 (neiónový polyoxyetylénový detergent), ktorý stimuluje biosyntézu a sekréciu lipáz pretože zvyšuje permeabilitu buniek a uľahčuje export lipázy cez bunkovú membránu. Rôzne štúdie preukázali, že vhodným uhlíkatým substrátom, ktorý dokáže zvyšovať syntézu lipáz je olivový olej. Ten obsahuje približne 55-83% olejovej kyseliny, ktorá pôsobí ako induktor pre tvorbu génu kódujúceho syntézu lipáz [82,83]. U niektorých kvasiniek bola skúmaná aj produkcie lipáz za použitia glycerolu. Keďže vzniká ako odpadný produkt pri výrobe biopalív v súčasnosti predstavuje jednu z nízkonákladových surovín, ktoré by mikrobiálnymi konverziami mohli byť využité na produkty s pridanou hodnotou. Pri použití samotného glycerolu pre syntézu lipáz však boli preukázané jeho inhibičné účinky, preto sa často používa s inými látkami ktoré naopak syntézu aktivujú napr. olivový olej [82,83].

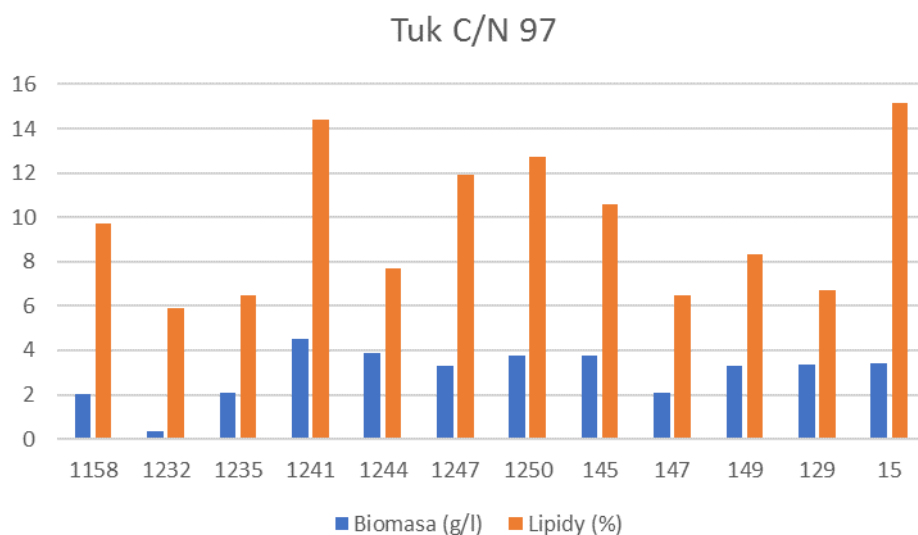
5.2.3.2 Produkcia lipidov s využitím odpadného živočíšneho tuku

Kultivácia kvasiniek rodu *Metschnikowia* bola prevádzaná aj na médiách, kde bol ako hlavný zdroj uhlíka použitý odpadný živočíšny tuk získaný zo spoločnosti NorskProtein, Nórsko. So vzrastajúcim rozmachom mäsového priemyslu vzniká čoraz viac a viac živočíšneho tuku ako vedľajšieho produktu, ktorý sa v súčasnosti považuje za jeden z hlavných zdrojov pri výrobe bionafty. Z chemického hľadiska sú živočíšne tuky triacylglyceroly, v ktorých je glycerol esterifikovaný tromi masnými kyselinami. Živočíšne tuky sú charakteristické vyšším obsahom nasýtených masných kyselín alebo masných kyselín s dlhým reťazcom [56].



Obr. 39: Porovnanie produkcie biomasy a lipidov na tukovom médiu s C/N pomerom 24

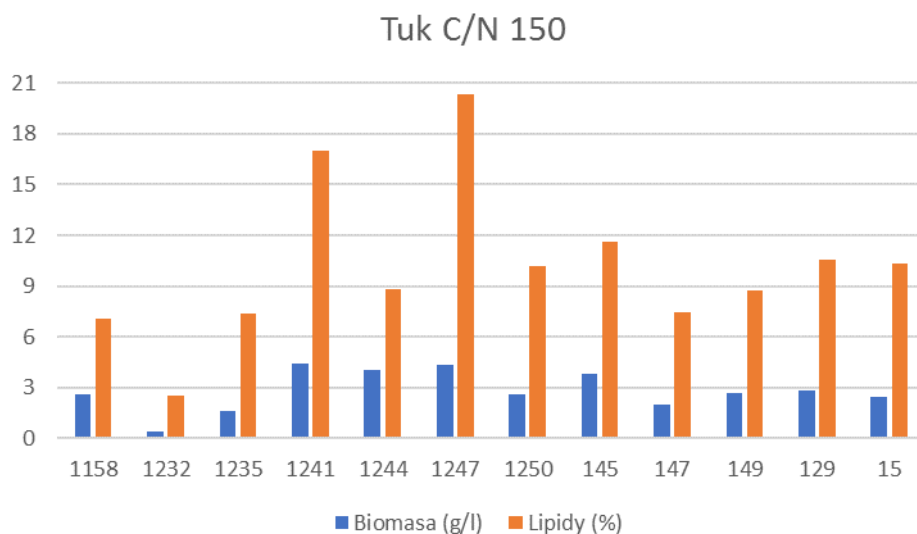
Opäť boli médiá pripravené s účelom zachovania vybraného pomeru C/N a konkrétne boli použité pomery 24, 97 a 150. Z Obr. 39 je možné vidieť, že produkcia mikrobiálnej biomasy u kmeňa *M. pulcherrima* 1232 sa pohybovala vo výťažku 0,77 g/l čo je zároveň aj najnižšie zaznamenané množstvo v rámci kultivácií na tukových médiách s C/N 24. V porovnaní s najvyšším producentom biomasy kvasinkou *M. andauensis* 1241 boli výťažky biomasy u *M. pulcherrima* 1232 približne 20-krát nižšie. S najvyššou produkciou biomasy 15,67 g/l bola kvasinka *M. andauensis* 1241 druhým najvyšším producentom mikrobiálnych lipidov, ktoré predstavovali 13,86 % celkovej hmotnosti vysušenej biomasy (2,17 g/l). Najväčšia akumulácia lipidických látok v kvasinkovej bunke bola zistená u kmeňa *M. fructicola* 15, ktoré tvorili 14,69 %.



Obr. 40: Porovnanie produkcie biomasy a lipidov na tukovom médiu s C/N pomerom 97

U tukového média C/N 97 vykazovala najvyššiu produkciu lipidov kvasinka *M. fructicola* 15. Obsah lipidov tvoril 15,15% hmotnosti biomasy, ktorý predstavoval 0,52 g/l. Druhá najvyššia produkcia lipidov bola zaznamenaná u kvasinky *M. andauensis* 1241 kde lipidy predstavovali 14,39 %. Obr. 40 znázorňuje, že všetky kvasinky boli schopné akumulácie viac ako 5% lipidov vo svojich bunkách. Najvyššia produkcia biomasy (4,50 g/l) bola dosiahnutá u kvasinky *M. andauensis* 1241. Najmenej biomasy vyprodukovala kvasinka *M. pulcherrima* 1232 (0,37 g/l), ktorá bola zároveň aj najmenším

producentom lipidov. Množstvo naakumulovaných lipidov u kvasinky *M. pulcherrima* 1232 predstavovalo 5,92%.



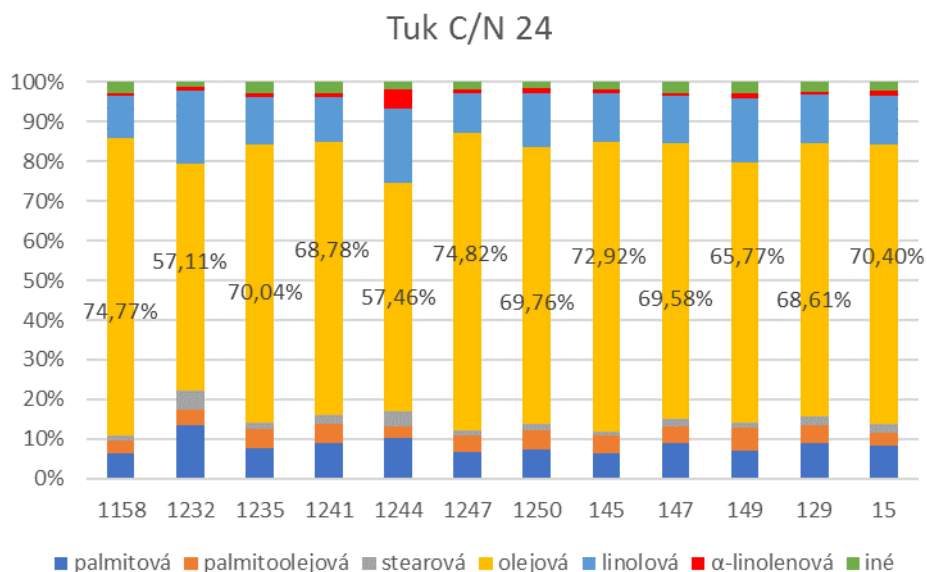
Obr. 41: Porovnanie produkcie biomasy a lipidov na tukovom médiu s C/N pomerom 150

V rámci porovnávania tukových médií boli na pomere C/N dosiahnuté relatívne najnižšie výt'azky biomasy. Podobne ako u predchádzajúcich kultivačných médií s tukom bola opäť zaznamenaná najnižšia produkcia biomasy u kmeňa *M. pulcherrima* 1232. Konkrétne na tomto médiu bolo získané najmenšie množstvo suchej biomasy, ktorá tvorila iba 0,35 g/l. Zároveň bolo v tejto biomase zaznamenaná aj najnižšia akumulácia lipidov 2,48 % (0,01 g/l). Na priloženom Obr. 41 je možno vidieť, že hodnoty vyprodukovaných biomás u všetkých skúmaných kmeňov vykazujú pomerne nízke hodnoty. Najvyššia dosiahnutá hodnota biomasy sa pohybovala okolo 4,38 g/l. Limitáciou dusíkatého zdroja v médiách s obsahom tuku C/N 150 došlo k miernemu zvýšeniu akumulácie lipidov v bunkách kvasiniek. Celkovo bolo zo všetkých tukových médií na pomere C/N 150 zaznamenané najväčšie množstvo lipidov pohybujúce sa okolo 20,35% (0,88 g/l) u kvasinky *M. zizyphicola* 1247 a zároveň aj najnižšie množstvo lipidov vyprodukovaných kvasinkou *M. pulcherrima* 1232.

Najnižšia produkcia biomasy bola zaznamenaná kultiváciou na odpadnom tukovom substráte. Tento jav mohol byť spôsobený tým, že kvasinky pravdepodobne neboli schopné v dostatočnom množstve utilizovať čistý tuk. Uhlík obsiahnutý v substráte bol pre ne ťažko dostupný, čo sa odrazilo na množstve vyprodukovanej biomasy. Pre lepšie sprístupnenie tuku kvasinkám by bolo vhodné použiť emulzifikátor, ktorý by zabezpečil lepšiu disperziu tukových častí vo vodnej fáze kultivačného média. Ako emulgačné činidlo na prípravu stabilných emulzií typu olej vo vode je možné využiť polysorbát 20, 80 (Tween 20, 80). Ďalšou z možností ako zvýšiť produkciu biomasy na tukovom substráte by mohlo byť jeho použitie vo forme hydrolyzátov (kyselý/bázický). Keďže kvasinky preukázali pomerne vysoké produkčné vlastnosti na médiách s glycerolom, po hydrolýze tuku by mohol práve glycerol vystupovať ako hlavný uhlíkatý zdroj pre utilizáciu kvasinkami. Hydrolýza tuku by však mohla byť prevádzaná aj prostredníctvom prídavku externej lipázy do média.

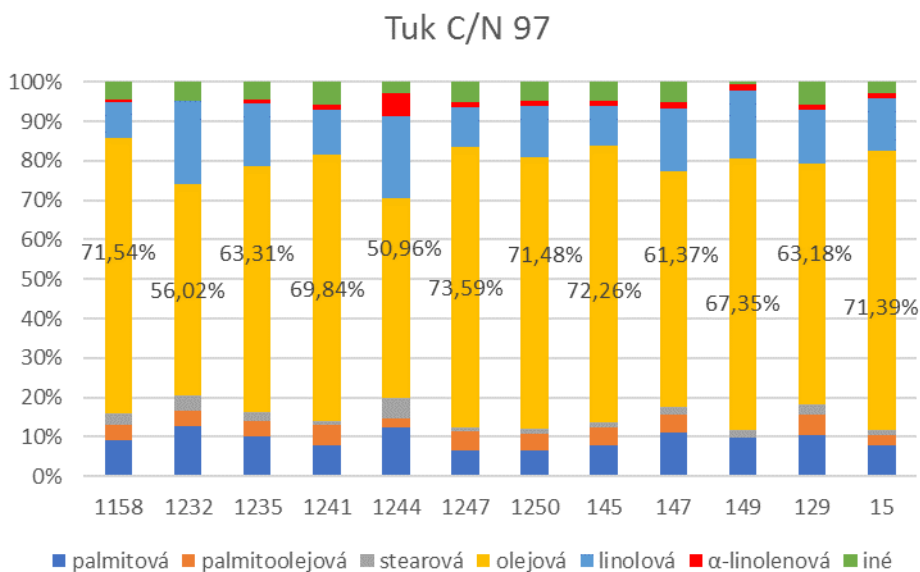
5.2.3.3 Analýza profilu mastných kyselín produkovaných na tukových médiách

Pomocou techniky plynovej chromatografie bol u všetkých študovaných kvasiniek rodu *Metschnikowia* sledovaný profil mastných kyselín naakumulovaných v bunkách. Profil mastných kyselín bol medzi kmeňmi vzájomne porovnávaný podľa použitého typu média. Získané výsledky boli zhrnuté do grafov, ktoré zachytávajú percentuálne zastúpenie jednotlivých mastných kyselín.



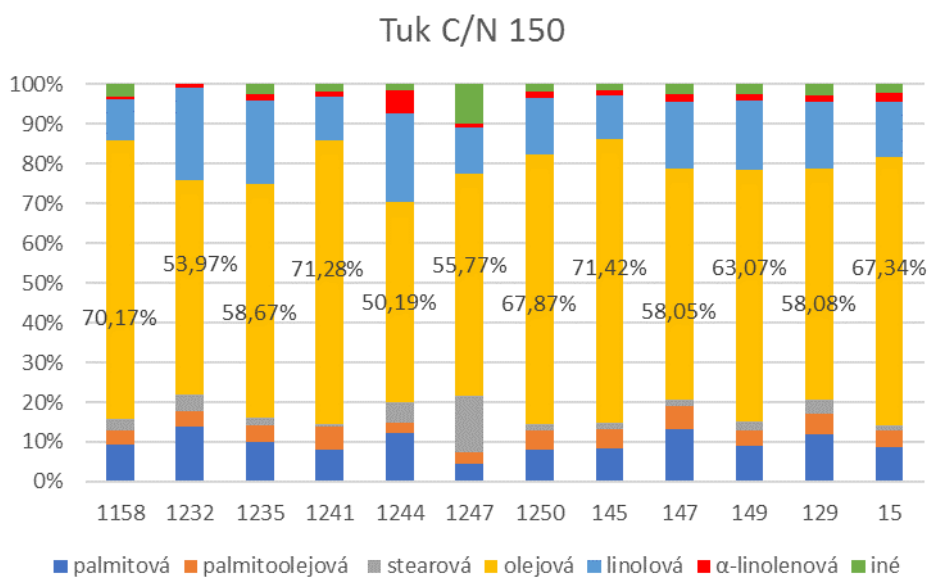
Obr. 42: Percentuálne zastúpenie mastných kyselín v bunkách kvasiniek kultivovaných na tukovom médiu s C/N pomerom 24

Profil mastných kyselín získaných kultiváciou kvasiniek na odpadnom tuku s C/N 24 znázorňuje Obr. 42. U všetkých skúmaných kmeňov sa potvrdila prítomnosť palmitovej a palmitoolejovej kyseliny. V malom množstve bola u všetkých kvasiniek zastúpená aj kyselina stearová. Spomedzi všetkých mastných kyselín bola najviac produkovaná olejová kyselina. V bunkách niektorých kvasiniek jej obsah tvoril zastúpenie až 74,82 % (*M. zizyphicola* 1247), 74,77% (*M. chrysoperlae* 1158) a 72,92% (*M. pulcherrima* 145) z celkových mastných kyselín. Pri kultivácii na C/N 24 tvorilo zastúpenie olejovej kyseliny u všetkých kmeňov vždy viac ako polovicu obsahu mastných kyselín. Najnižším producentom bol kmeň *M. pulcherrima* 1232, u ktorého bola olejová kyselina zastúpená 57,11%. Rovnako ako aj u iných kultivácií na tukovom médiu preukázali kvasinky rodu *Metschnikowia* schopnosť produkovať linolovú a α -linolenovú kyselinu. Z Obr. 42 je možné vidieť, že v porovnaní produkcie týchto dvoch kyselín bola v značne vyššom množstve produkovaná kyselina linolová, pričom jej najvyššie zastúpenie bolo zistené v bunkách kvasinky *M. sinensis* 1244 (18,73%). Obsah α -linolenovej kyseliny sa pohyboval v rozmedzí od 0,83% (*M. pulcherrima* 147) do 4,68% (*M. sinensis* 1244).



Obr. 43: Percentuálne zastúpenie mastných kyselín v bunkách kvasiniek kultivovaných na tukovom médiu s C/N pomerom 97

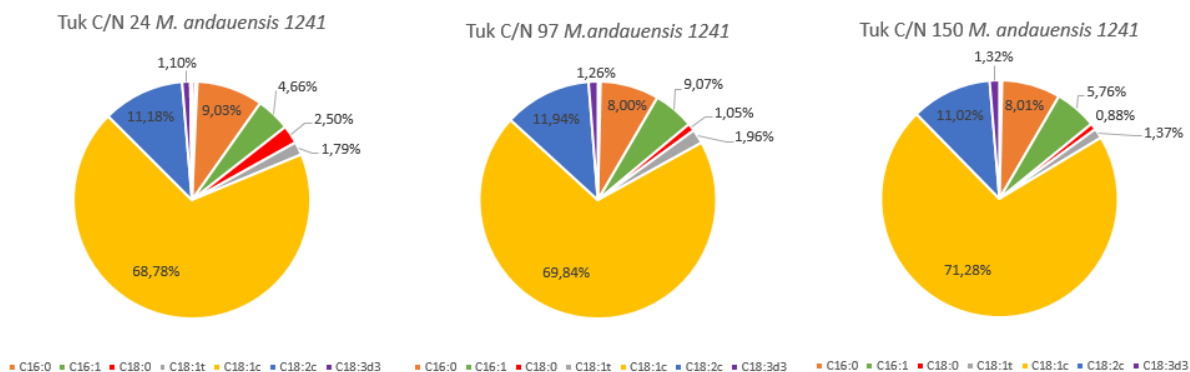
Zvýšením C/N na 97 v tukovom médiu boli získané mastné kyseliny, ktorých % zastúpenie je možné vidieť na Obr. 43. Rovnako ako aj pri médiu s nižším C/N kvasinky vykazovali podobný trend v produkcii mastných kyselín. Opäť bola u všetkých skúmaných kvasiniek zistená prítomnosť olejovej, palmitovej, stearovej a palmitoolejovej kyseliny. V porovnaní s produkciou stearovej a palmitoolejovej kyseliny na tukovom médiu C/N 24 je možné u niektorých kmeňov pozorovať mierny pokles obsahu týchto kyselín zvýšením C/N. U všetkých skúmaných kmeňov bola potvrdená aj prítomnosť linolovej kyseliny. Určité % zastúpenie tvorila v biomase aj kyselina α -linolenová s výnimkou kmeňa *M. pulcherrima* 1232 u ktorého jej prítomnosť nebola preukázaná. Rovnako ako pri C/N 24 (Obr. 42) aj u C/N 97 (Obr. 43) bol u kmeňa *M. sinensis* 1244 spomedzi ostatných kvasiniek pozorovaný zvýšený obsah Ω -3 mastnej α -linolenovej kyseliny. Pri C/N 24 predstavoval obsah α -linolenovej kyseliny 4,68% u C/N 97 sa obsah mierne zvýšil na 5,93%.



Obr. 44: Percentuálne zastúpenie mastných kyselín v bunkách kvasiniek kultivovaných na tukovom médiu s C/N pomerom 150

Obr. 44 znázorňuje obsah mastných kyselín vyskytujúcich sa v biomase kvasiniek, kultivovaných na tukovom médiu v C/N 150. Aj na tomto médiu bola zaznamenaná produkcia palmitovej, palmitoolejovej a stearovej kyseliny. U kmeňa *M. pulcherrima* 1232 bola pozorovaná pomerne vysoká produkcia palmitovej kyseliny v porovnaní s výťažkami získanými na médiách s C/N 97 a 150. Na tukovom médiu s C/N 150 bol dosiahnutý výťažok kyseliny palmitovej až 29,87%. Pomerne zvýšené výťažky boli zaznamenané aj pri produkcii stearovej kyseliny pohybujúce sa od 0,88% (*M. andauensis* 1241) do 14,06% (*M. zizyphicola* 1247). Najvyššie zastúpenie spomedzi všetkých mastných kyselín mala opäť olejová kyselina. Obsah olejovej kyseliny dosahoval u kvasinky *M. pulcherrima* 145 až 71,42%. Najväčšie množstvo linolovej kyseliny bolo zaznamenané u kvasinky *M. fructicola* 1235 s 21,12%. Z Obr. 44 je možné vidieť, že prítomnosť α -linolenovej kyseliny bola v menšom množstve preukázaná v bunkách všetkých skúmaných kvasiniek, najviac však bola obsiahnutá opäť u kvasinky *M. sinensis* 1244 (5,67%).

Rovnako ako v prípade kultivácií na glycerole, aj pri použití odpadného tuku ako substrátu boli vytvorené tri typy médií s rozdielnymi C/N 24, 97 a 150. Opäť bolo skúmané % zastúpenie a profil mastných kyselín, ktoré boli vytvorené v kvasinkových bunkách behom kultivácie. Zo získaných výsledkov možno vidieť že kvasinky rodu *Metschnikowia* produkovali najmä olejovú kyselinu. Okrem olejovej kyseliny boli získané aj značné výťažky linolovej, palmitovej, palmitoolejovej a stearovej kyseliny. V rámci kultivácií je možno pozorovať že najvyššie zastúpenie tvorili MUFA. So zvyšujúcim sa C/N pomerom však ich obsah v bunkách postupne mierne klesal. Druhou najzastúpenejšou skupinou bola PUFA, ktorej obsah sa s rastúcim C/N zvyšoval. Výnimkou boli iba niektoré kmene, pri ktorých bola najnižší obsah PUFA zaznamenaný na C/N 97. Poslednú skupinu tvorili SFA. U týchto kyselín nemožno však presne určiť, či s rastúcim C/N sa ich obsah zvyšoval/znižoval. Obsah SFA sa menil v závislosti na jednotlivých kmeňoch.

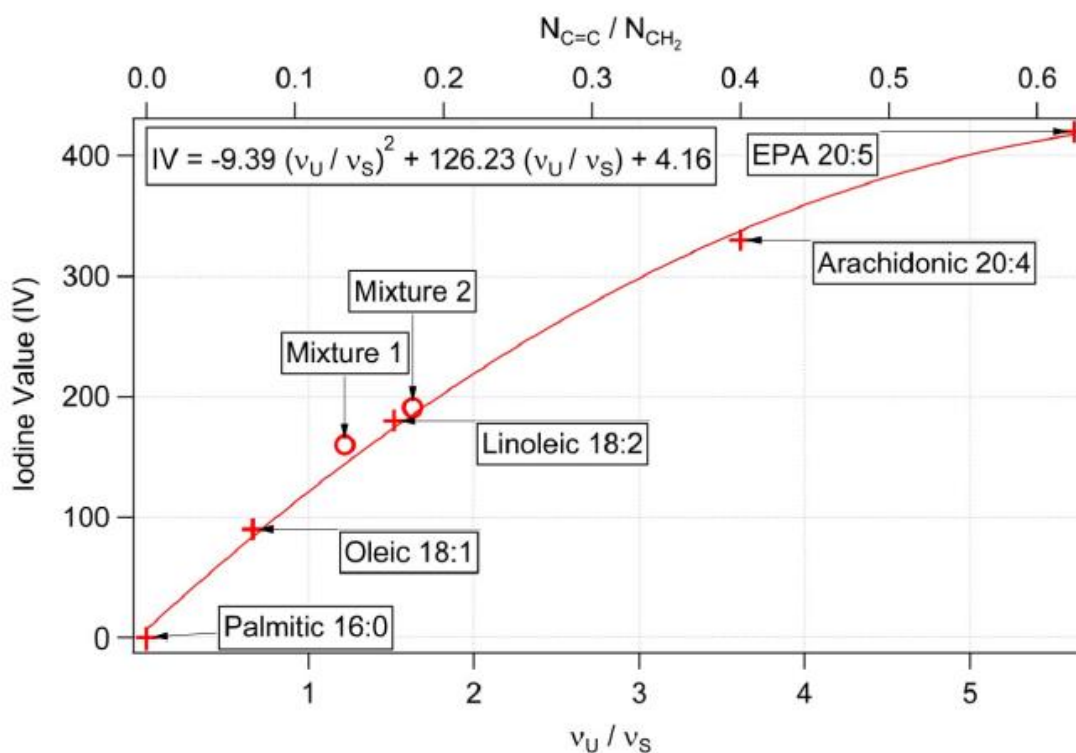


Obr. 45: Profil mastných kyselín kvasinky *M. andauensis* 1241 na tukových médiách C/N 24, 97 a 150. C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitoolejová kyselina; C18:0 – stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina

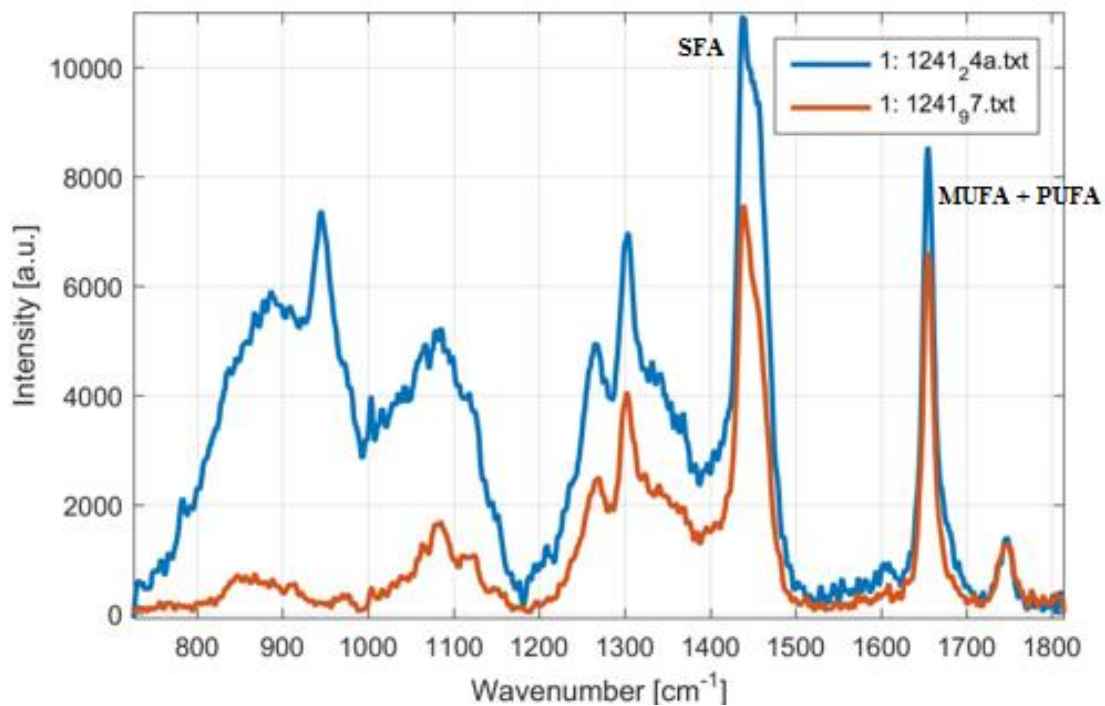
So zvyšujúcim sa C/N sa u kvasinky *M. andauensis* 1241 zvyšovala aj produkcia olejovej kyseliny ktorá svoje maximum dosiahla na médiu s C/N 150 (71,28%). Najvyššia produkcia linolovej kyseliny bola pozorovaná na médiu C/N 97, tvorba palmitovej kyseliny bola viac podporená médiom s C/N 24. Pre tvorbu kyseliny palmitoolejovej kyseliny sa ako najvhodnejšie javilo tukové médium C/N 97. Aj pri tomto kmeni pozorujeme produkciu stearovej kyseliny s hodnotami od 0,88% do 2,50% (pozri Obr. 45). U všetkých kvasiniek kultivovaných na tukových médiách bola produkcia lipidov veľmi podobná, zastúpenie jednotlivých mastných kyselín je znázornené na Obr. 77 - Obr. 87 v sekcii PRÍLOHY.

5.3 Analýza zastúpenia mastných kyselín technikou Ramanovej spektroskopie

Ramanova spektroskopia predstavuje alternatívnu metódu, ktorou možno ľahko detekovať lipidy. Táto technika poskytuje rýchly prehľad o nasýtenosti prípadne nenasýtenosti lipidov obsiahnutých v kvasinkových bunkách. V predloženej diplomovej práci bolo na Ústave prístrojovej techniky akadémie vied Českej republiky skúmané celkové zastúpenie nasýtených a nenasýtených MK naakumulovaných v jednotlivých bunkách kvasiniek rodu *Metschnikowia*. Získané spektrum obsahovalo špecifické Ramanové spektrálne píky ktorých intenzita odpovedala nasýtenosti a nenasýtenosti uhlíkatých väzieb obsiahnutých v lipidoch. Na základe pomeru nasýtených a nenasýtených C-C väzieb bol odhadnutý stupeň nenasýtenosti lipidov tzv. jódové číslo. Používajú sa k tomu spektrálne píky ν_U pri 1656 cm^{-1} (úmerné množstvu nenasýtených väzieb C=C) a ν_S pri 1445 cm^{-1} (úmerný množstvu nasýtených väzieb C-C). Jódové číslo jednotlivých vzoriek bolo stanovené pomocou rovnice uvedenej na Obr. 46. Do diplomovej práce bolo vybraných iba pár Ramanových spektier intracelulárnych lipidov kvasiniek rodu *Metschnikowia* (Obr. 47 - Obr. 51), ktoré slúžili k porovnaniu produkčných vlastností kvasiniek na rôznych substrátoch.



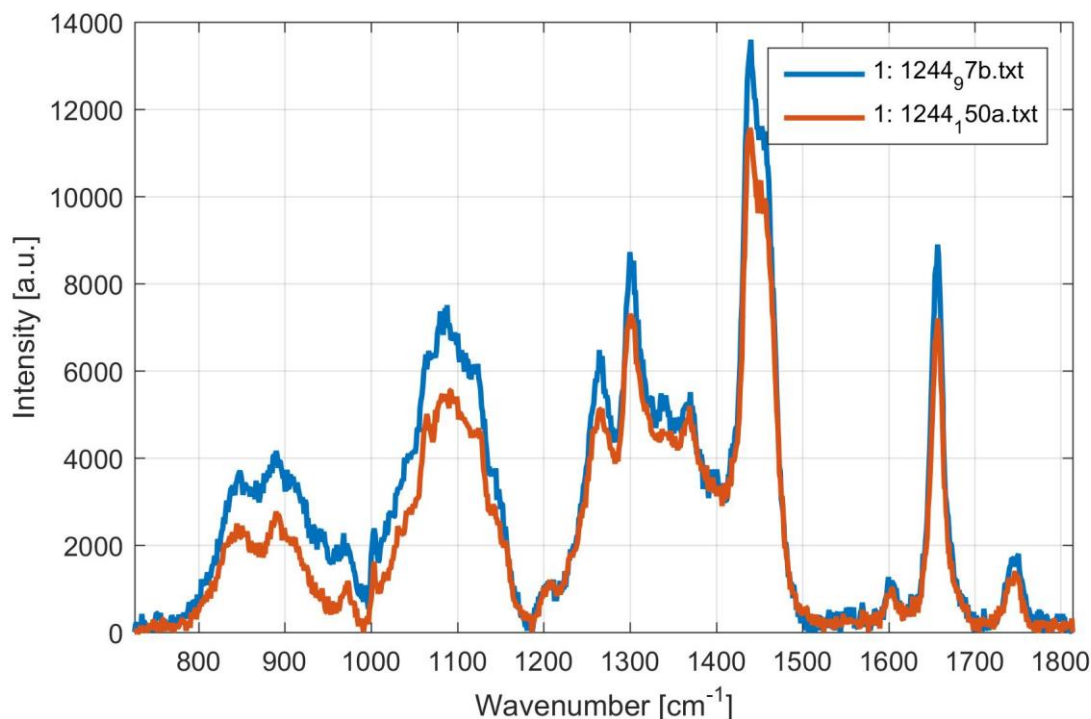
Obr. 46: Kalibračná krivka pre určenie jódového čísla 84



Obr. 47: Ramanovo rozptylové spektrum intracelulárnych lipidov kvasinky *M. andauensis* 1241 (tuk C/N 24 a 97)

Tab. 12: Jódové číslo a zastúpenie SFA, MUFA a PUFA u kvasinky *M. andauensis* 1241 na tukových médiách s rozdielnym C/N pomerom

Kmeň	Médium	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)	Jódové číslo
1241	Tuk C/N 24	10,53	76,77	12,70	99,13
1241	Tuk C/N 97	9,42	77,38	13,20	99,99

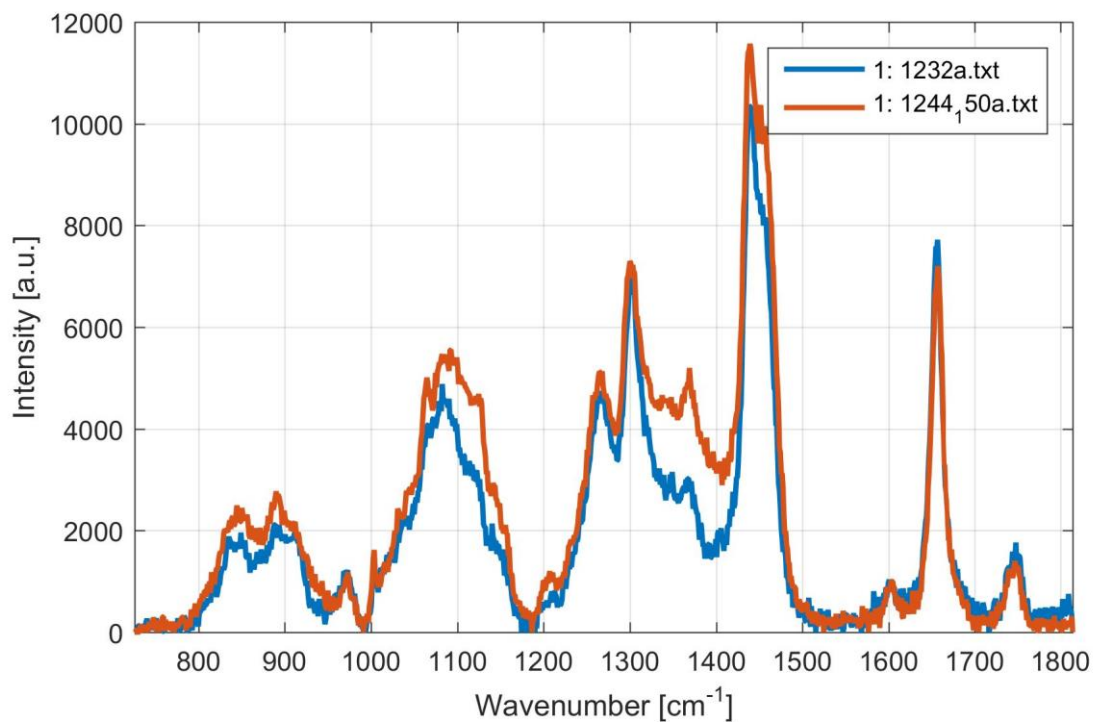


Obr. 48: Ramanovo rozptyľové spektrum intracelulárnych lipidov kvasinky *M. sinensis* 1244 (gly C/N 97 a 150)

Tab. 13: Jódové číslo a zastúpenie SFA, MUFA a PUFA u kvasinky *M. sinensis* 1244 na glycerolových médiách s rozdielnym C/N pomerom

Kmeň	Médium	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)	Jódové číslo
1244	Gly C/N 97	18,38	54,54	27,08	80,77
1244	Gly C/N 150	18,12	53,69	28,19	81,57

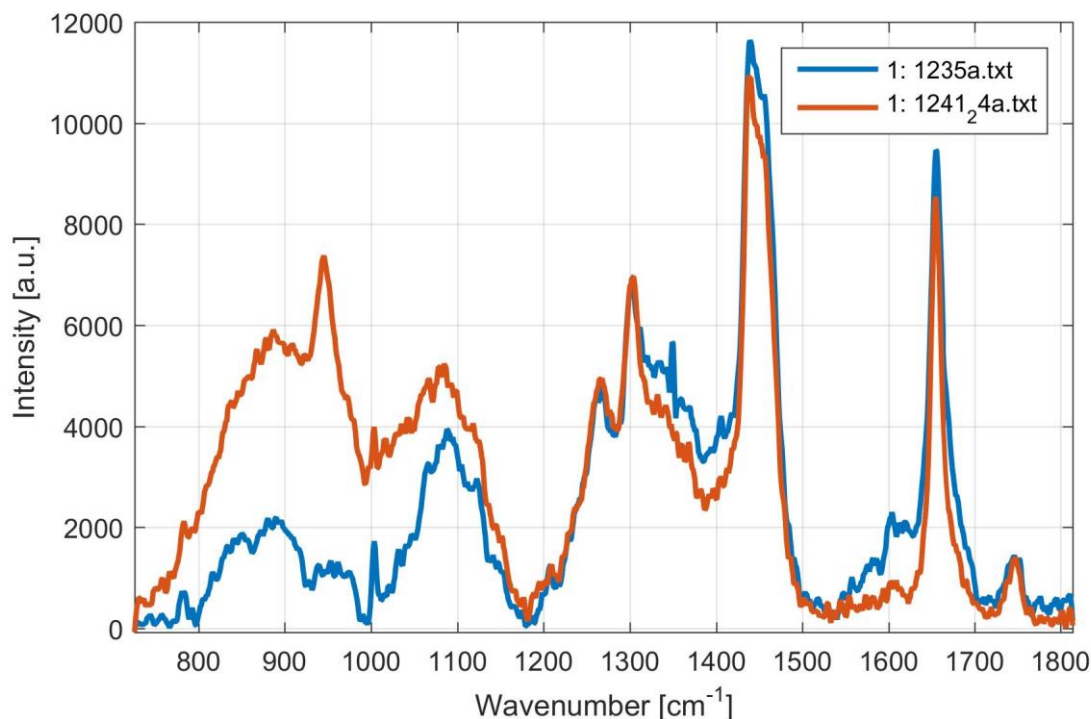
Obr. 47 a Obr. 48 znázorňujú Ramanové spektrá získané z intracelulárnych lipidov kvasiniek *M. andauensis* 1241 a *M. sinensis* 1244, ktoré boli kultivované na médiách s rovnakým odpadným substrátom. Z obrázkov je vidieť, že u jednotlivých druhov sa pomery Ramanových spektrálnych pík ν_U a ν_S líšia. Kmeň *M. andauensis* 1241 obsahoval vyššie množstvo nenasýtených uhlíkatých väzieb na médiu s tukom C/N 97. U kmeňa *M. sinensis* 1244 bol vyššie zastúpenie nenasýtených uhlíkatých väzieb pozorované na médiu s glycerolom C/N 150. Môžeme teda tvrdiť, že vyššie pomery C/N či už na tukových alebo glycerolových médiách boli vhodnejšie pre tvorbu nenasýtených mastných kyselín. Z Tab. 12 a Tab. 13 je možné vidieť, že hodnoty jódových čísel sa u oboch kmeňov líšia len minimálne, čo bolo spôsobené podobným zložením a množstvom mastných kyselín obsiahnutých v kvasinkových bunkách.



Obr. 49: Ramanovo rozptylové spektrum intracelulárnych lipidov kvasinky *M. sinensis* 1244 a *M. pulcherrima* 1232 na glycerolovom médiu C/N 150

Tab. 14: Jódové číslo a zastúpenie SFA, MUFA a PUFA u kvasinky *M. andauensis* 1244 a *M. pulcherrima* 1232 na glycerolových médiách s C/N pomerom 150

Kmeň	Médium	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)	Jódové číslo
1244	Gly C/N 150	18,12	53,69	28,19	75,74
1232	Gly C/N 150	14,63	67,99	17,39	97,15

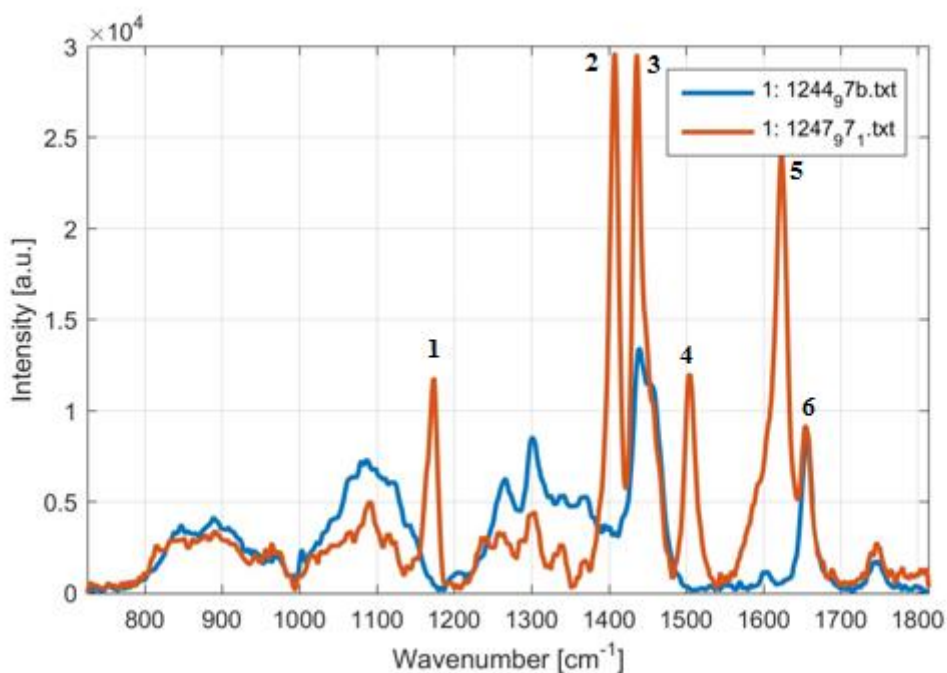


Obr. 50: Ramanovo rozptylové spektrum intracelulárnych lipidov kvasinky *M. fructicola* 1235 a *M. andauensis* 1241 na tukovom médiu C/N 24

Tab. 15: Jódové číslo a zastúpenie SFA, MUFA a PUFA u kvasinky *M. fructicola* 1235 a *M. andauensis* 1241 na tukových médiách s C/N pomerom 24

Kmeň	Médium	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)	Jódové číslo
1235	Tuk C/N 24	9,98	77,04	12,98	101,58
1241	Tuk C/N 24	10,53	76,77	12,70	96,09

Obr. 49 a Obr. 50 znázorňujú Ramanové spektrá kvasiniek *M. sinensis* 1244, *M. pulcherrima* 1232, *M. fructicola* 1235 a *M. andauensis* 1241, pričom každá dvojica bola kultivovaná na rovnakých odpadných substrátoch. Porovnaním kultivácie na glycerole C/N 150 bolo preukázané, že väčšie množstvo nenasýtených MK bolo obsiahnuté v bunkách kvasiniek *M. pulcherrima* 1232. Pri tukových médiách C/N 24 veľké odlišnosti v produkcii mastných kyselín neboli, mierne vyššia nenasýtenosť bola pozorovaná u kmeňa *M. fructicola* 1235. Jednotlivé zastúpenia SFA, MUFA, PUFA sú uvedené v Tab. 14 a Tab. 15.

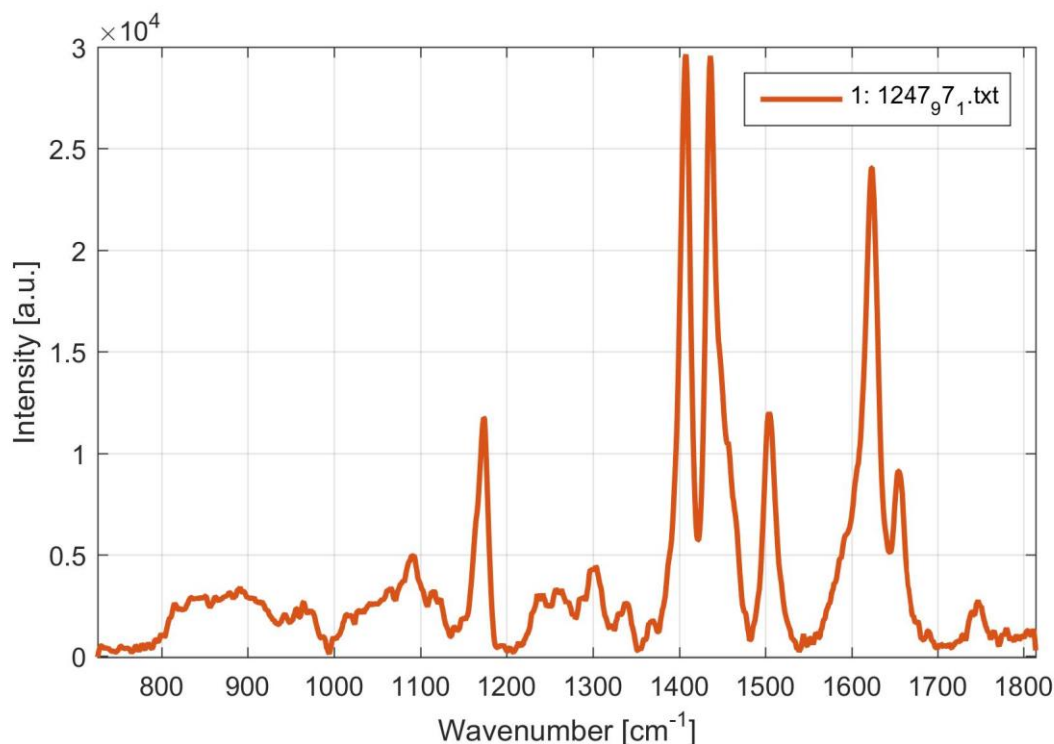


Obr. 51: Ramanovo rozptylové spektrum intracelulárnych lipidov kvasinky *M. sinensis* 1244 a *M. zizyphicola* 1247 na glycerolovom médiu C/N 97

Obr. 51 znázorňuje Ramanovo spektrum, v ktorom bol u kmeňa *M. zizyphicola* 1247 kultivovanom na glycerolovom médiu C/N 97 pozorovaný výskyt pulcherimínu (píky č.1,2,3,4,5,6). Špecifické píky pulcherimínu sa nachádzajú prevažne na 1400 cm⁻¹. Pre porovnanie je uvedené aj Ramanovo spektrum kvasinky *M. sinensis* 1244 rovnako kultivovanej na glycerole C/N 97, kde však píky pulcherimínu pozorované neboli. Tento jav môže byť spôsobený genetickým vybavením kvasinkového bunky. Kým kvasinka *M. zizyphicola* 1247 má výbavu k produkcii červeného pigmentu v prítomnosti železa v médiu, kvasinka *M. sinensis* 1244 nie je schopná pulcherimín tvoriť a je možné ju kultivovať jedine v bezpigmentovom stave (Obr. 52). Samotné Ramanovo spektrum zachytávajúce píky pulcherimínu je uvedené na Obr. 53.



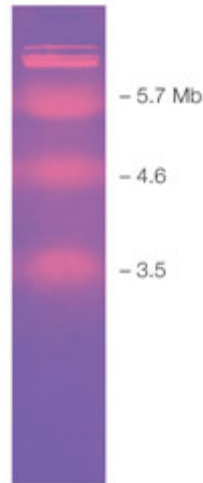
Obr. 52: zľava: kvasinka *M. zizyphicola* 1247 tvoriaca pulcherimín, kvasinka *M. sinensis* 1244 bez produkcie pulcherimínu



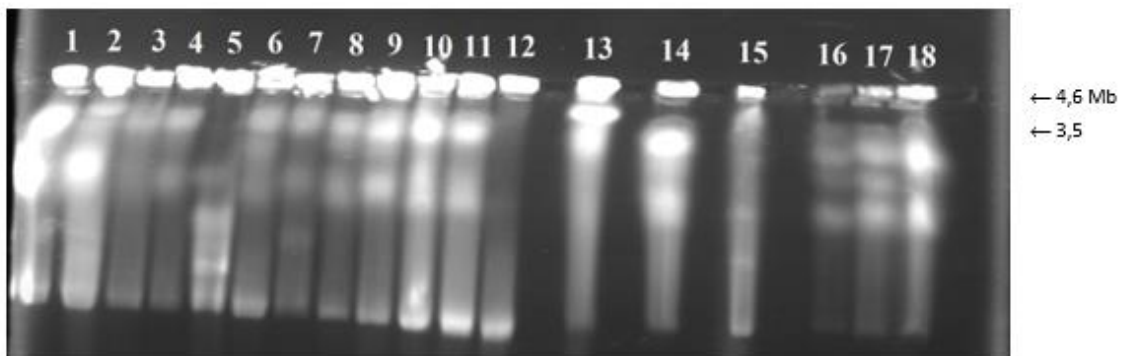
Obr. 53: Ramanovo rozptylové spektrum kvasinky *M. zizyphicola* 1247 tvoriacej na glycerolovom médiu C/N 97 červený pigment pulcherimín

5.4 Karyotypová charakterizácia kvasiniek rodu *Metschnikowia*

Jedným z cieľov tejto diplomovej práce bola aj analýza elektroforetických karyotypov vybraných kmeňov kvasiniek rodu *Metschnikowia*. Karyotypizácia slúži k určeniu veľkosti a počtu chromozómov. Už niekoľko rokov je využívaná k charakterizácii, diferenciacii alebo identifikácii eukaryotických organizmov. V súčasnosti patrí medzi techniky používané pre charakterizáciu rôznych organizmov ako napríklad aj kvasiniek. PFGE je pre karyotypizáciu využívaná najmä preto, že umožňuje separáciu kvasinkových chromozómov až do veľkosti niekoľkých Mb. Použitím štandardov s definovanou veľkosťou chromozomálnych DNA kvasiniek ako napríklad *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* alebo *Hansenula wingei* je stanovenie veľkosti chromozómov pomocou PFGE pomerne presné [85]. Pri PFGE dochádza na agarózovom géli k separácii chromozomálnej DNA podľa jej veľkosti. V závislosti na počte a veľkosti chromozómov, ktoré kvasinka obsahuje sa získavajú špecifické bandy [86]. Aby došlo k správnej analýze karyotypu kvasiniek je potreba správne pripraviť vzorky chromozomálnej DNA jednotlivých kmeňov. DNA by nemala byť nejako degradovaná prípadne naštiepená a vo vzorke by sa mala nachádzať v dostatočnej koncentrácii. Z tohto dôvodu boli k príprave agarózových bločkov použité bunky kvasiniek z 24 h inokula v množstve $1,3 \cdot 10^9$ buniek/ml. Ako štandard na určenie veľkosti chromozomálnej DNA kvasiniek rodu *Metschnikowia* bola použitá DNA kvasinky *S. pombe* (CHEF DNA Size Marker Obr. 54).



Obr. 54: DNA Size Marker *Schizosaccharomyces pombe* [87]



- | | |
|---------|---|
| 1. 1158 | 10. 149 |
| 2. 1232 | 11. 129 |
| 3. 1235 | 12. 15 |
| 4. 1241 | 13. štandard CHEF DNA Size Marker <i>S. pombe</i> |
| 5. 1244 | 14. 15 |
| 6. 1247 | 15. 145 |
| 7. 1250 | 16. 147 |
| 8. 145 | 17. 149 |
| 9. 147 | 18. 129 |

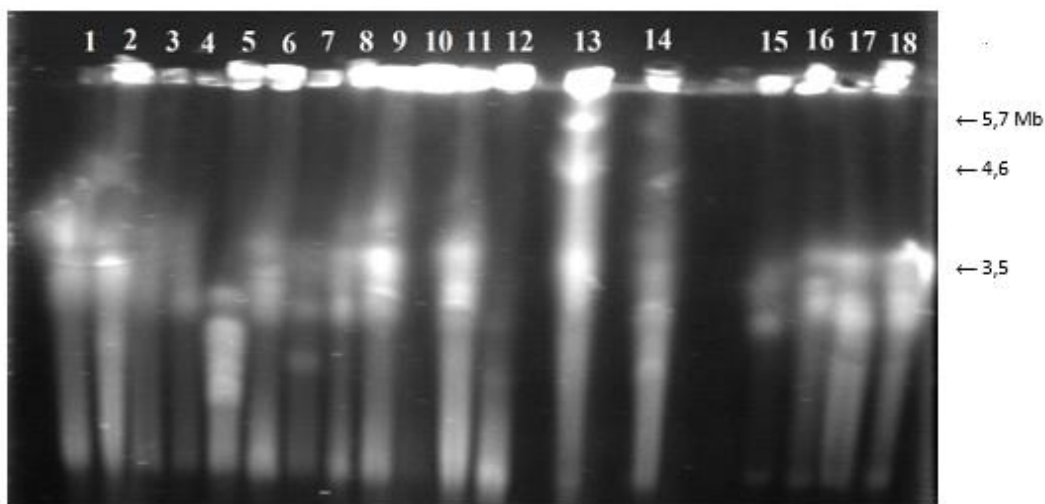
Podmienky separácie:

1% géľ, 0,08 M TBE
 48 h, 2400 s, 42 V
 70 h, 3000 s, 42 V
 48 h, 3300 s, 42 V

Obr. 55: Separácia chromozómov kvasiniek rodu *Metschnikowia* pomocou metódy PFGE (napätie 42 V)

Prvý prevedený experiment separácie chromozómov izolovaných z buniek kvasiniek rodu *Metschnikowia* pomocou pulznej gélovej elektroforézy je znázornený na Obr. 55. Celkovo bolo separácií podrobených 12 kvasinkových kmeňov pričom u kmeňov *M. pulcherrima* 145, *M. pulcherrima* 147, *M. pulcherrima* 149, *M. andauensis* 129 a *M. fructicola* 15 boli k separácii využité dva typy agarózových bločkov. Bločky kvasiniek označených na Obr. 55 číslami 8-12 boli pripravené za použitia enzýmu lytikázy, zatiaľ čo bločky označené číslami 14-18 boli vystavené pôsobeniu zymolyázy. Podrobný postup izolácie kvasinkovej DNA ako aj príprava agarózových bločkov je uvedená v kapitole 4.5.4. Separácia chromozómálnej DNA prebiehala po dobu 166 hodín v 3 štádiách pričom v každom štádiu boli nastavené rozdielne pulzné časy. Jednotlivé podmienky separácie sú uvedené na Obr. 55. Pri

prvom spustení PFGE bolo použité pulzné napätie 42 V, čím pravdepodobne nedošlo k dostatočnej separácii chromozómov v gélovej matrici. Z Obr. 55 je možné vidieť, že dráha separácie bola pomerne malá, preto bola veľkosť vkladaneho napätia v ďalších experimentoch optimalizovaná. Elektroforetická karyotypizácia *S. pombe* preukázala, že kvasinka má tri bandy chromozomálnej DNA vo veľkosti pohybujúcej sa od 3,5-5,7 Mb [88]. Pulzná elektroforéza na Obr. 55 však znázorňuje iba dva bandy štandardu označeného číslom 13. V prvých úsekoch PFGE pravdepodobne došlo k zlúčeniu bandov, ktoré predstavovali chromozomálnu DNA o veľkosti 5,7 a 4,6 Mb. Tento jav mohol byť spôsobený vložení nízkeho napätia. Zo štandardu je jasne pozorovaný a rozpoznateľný iba band predstavujúci chromozomálnu DNA o veľkosti 3,5 Mb. Práve s týmto bandom boli porovnávané aj ostatné vzorky kvasiniek rodu *Metschnikowia*. Najzreteľnejšie boli pozorované chromozómy kvasiniek *M. chrysoerlae* 1158, *M. pulcherrima* 147, *M. pulcherrima* 149, *M. andauensis* 129, *M. fructicola* 15 (zymolyáza) a *M. andauensis* 129 (zymolyáza) u ktorých bola veľkosť stanovená na približne 3,5 Mb. U kvasiniek *M. pulcherrima* 1232, *M. andauensis* 1241, *M. zizyphicola* 1247, MS 1250, *M. pulcherrima* 145 a *M. pulcherrima* 147 (zymolyáza) je tiež možné čiastočne pozorovať chromozómy vo veľkosti približne 3,5 Mb aj napriek tomu, že bandy neboli tak výrazné ako u predchádzajúcich kmeňov. Tento jav mohol byť spôsobený napríklad nižšou koncentráciou DNA v pripravených bločkoch. Na Obr. 55 je ďalej možné vidieť, že u niektorých kvasiniek neboli pozorované vôbec žiadne chromozómy. Agarózové bločky kmeňov *M. fructicola* 1235, *M. sinensis* 1244, *M. fructicola* 15, *M. pulcherrima* 145 (zymolyáza) a *M. pulcherrima* 147 (zymolyáza) obsahovali pravdepodobne degradovanú DNA, čo sa pri vizuálnej detekcii prejavilo tvorbou rozmazaných pásov.



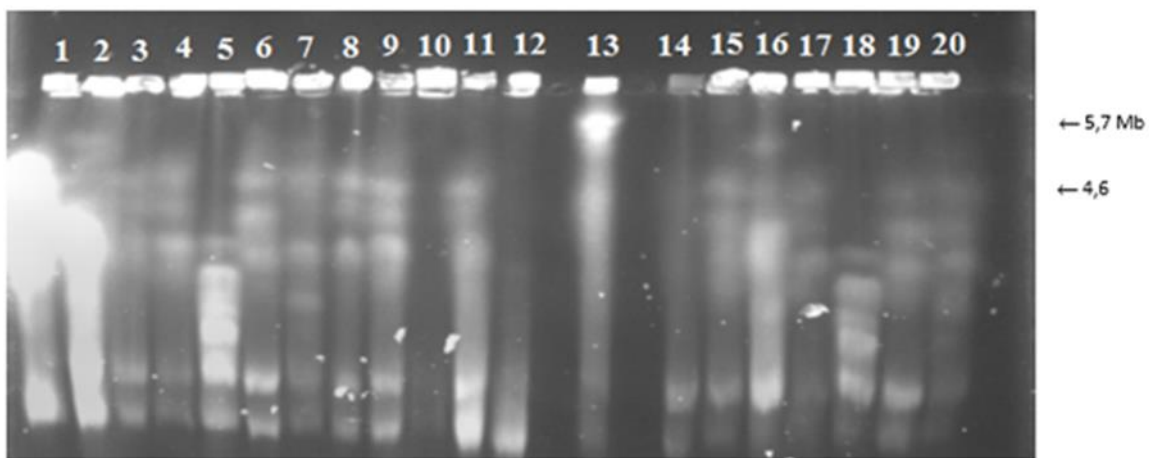
- | | |
|---------|---|
| 1. 1158 | 10. 149 |
| 2. 1232 | 11. 129 |
| 3. 1235 | 12. 15 |
| 4. 1241 | 13. štandard CHEF DNA Size Marker <i>S. pombe</i> |
| 5. 1244 | 14. 15 |
| 6. 1247 | 15. 145 |
| 7. 1250 | 16. 147 |
| 8. 145 | 17. 149 |
| 9. 147 | 18. 129 |

Podmienky separácie:
 1% géľ, 0,08 M TBE
 48 h, 2400 s, 65 V
 70 h, 3000 s, 65V
 48 h, 3300 s, 65V

Obr. 56: Separácia chromozómov kvasiniek rodu *Metschnikowia* pomocou metódy PFGE (napätie 65V)

Na Obr. 56 je možné vidieť, že separačné dráhy boli pri použití vyššieho vloženého napätia podstatne dlhšie ako pri prvej PFGE na Obr. 55. Možno teda predpokladať, že vyššie vložené napätie bolo

dostačujúce k tomu, aby sa chromozómy v matrici gélu lepšie separovali. Rovnako u použitého štandardu došlo k separácii všetkých troch chromozómov vo veľkosti 3,5-5,7 Mb. Čitateľné boli iba chromozómy kvasiniek *M. pulcherrima* 1232, *M. pulcherrima* 147, *M. andauensis* 129 a *M. andauensis* 129 (zymolyáza). Aj napriek tomu, že bandy sú mierne rozmazané, u týchto kmeňov bola veľkosť separovaných chromozómov približne 3,5 Mb. Separácia chromozomálnej DNA u zvyšných kvasiniek však úspešná nebola. Separáciou vznikli iba rozmazané pásy u ktorých nie je možné zreteľne rozlíšiť veľkosť chromozómov. Tento jav mohol byť spôsobený degradáciou DNA, ku ktorej došlo už behom procesu izolácie z buniek. Prípadná chyba mohla nastať aj pri pipetovaní suspenzie vzoriek vyizolovanej DNA do formy na prípravu agarózových bločkov, kedy DNA nebola rovnomerne rozptýlená v roztoku. Tým pádom mohli bločky obsahovať nízku koncentráciu DNA, čo sa mohlo prejaviť v znemožnení vizuálneho zobrazenia chromozómov. Pre lepšie rozlíšenie jednotlivých chromozómov by mohlo byť vhodné použitie napríklad koncentrovanejšieho gélu (1,1%). Koncentrovanejší gél však na druhej strane môže negatívne ovplyvniť elektroforetickú mobilitu.



- | | |
|---------|---|
| 1. 1158 | 11. 129 |
| 2. 1232 | 12. 15 |
| 3. 1235 | 13. štandard CHEF DNA Size Marker <i>S. pombe</i> |
| 4. 1241 | 14. 1158 |
| 5. 1244 | 15. 1235 |
| 6. 1247 | 16. 1232 |
| 7. 1250 | 17. 1241 |
| 8. 145 | 18. 1244 |
| 9. 147 | 19. 1247 |
| 10. 149 | 20. 1250 |

Podmienky separácie:

1% gél, 0,08 M TBE
 48 h, 2400 s, 55 V
 70 h, 3000 s, 55 V
 48 h, 3300 s, 55 V

Obr. 57: Separácia chromozómov kvasiniek rodu *Metschnikowia* pomocou metódy PFGE (napätie 55V)

Obr. 57 znázorňuje separáciu chromozómov kvasiniek rodu *Metschnikowia* pomocou PFGE pri vložení napätia 55 V. Toto napätie sa ukázalo ako najoptimálnejšie z hľadiska separácie chromozómov. V porovnaní so separáciami kde bolo vložené napätie 42 V (Obr. 55) a 65 V (Obr. 56) bola separačná dráha chromozómov dostatočne dlhá a zároveň aj jednotlivé bandy boli zreteľnejšie a lepšie identifikovateľnejšie. Pri prevedení tohto experimente však nedošlo k separácii všetkých chromozómov kvasinky *S. pombe*, ktorá slúžila ako štandard. Namiesto troch chromozómov boli pri vizualizácii gélu jasne pozorovaný iba chromozóm veľkosti 5,7 Mb. Chromozóm veľkosti 4,6 Mb bol prítomný tiež aj napriek tomu, že jeho band nebol taký výrazný ako u chromozómu 5,7 Mb. Chromozóm o veľkosti 3,5 Mb v štandarde rozpoznaný nebol, pravdepodobne došlo k jeho degradácii počas procesu izolácie. Elektroforetický karyotyp bol stanovovaný u dvanástich kvasinkových kmeňov, pričom prvých sedem kmeňov (čísla 1-7) bolo nanesených duplicitne aj do komôrok označených číslami 14-20. Na

základe Obr. 57 je možné rozpoznať menej výrazné bandy u kvasiniek *M. chrysoerlae* 1158, *M. pulcherrima* 1232, *M. fructicola* 1235, *M. andauensis* 1241, *M. zizyphicola* 1247, *M. shanxiensis* 1250, *M. pulcherrima* 145, *M. pulcherrima* 147, ktoré približne odpovedali veľkosti chromozómu 4,6 Mb. U ostatných kvasiniek je vidieť iba rozmazané pásy spôsobené degradáciou DNA. Vizualizáciou gélu boli u kvasiniek rodu *Metschnikowia* pozorované aj iné mierne výrazné bandy, ktoré by mohli odpovedať určitej veľkosti chromozómov. U kvasinky *M. sinensis* 1244, *M. zizyphicola* 1247 a *M. pulcherrima* 147 možno rozlíšiť 5 bandov a u kvasiniek *M. pulcherrima* 145 a *M. shanxiensis* 1250 po 4 bandy. V dôsledku použitia štandardu, ktorý obsahoval iba tri chromozómy však nie je možné rozpoznať ich veľkosť. Nadväzujúce práce by mohli využiť tieto poznatky k ďalšej analýze karyotypu kvasiniek rodu *Metschnikowia*. Použitie iného štandardu ako napríklad kvasinka *H. wingei* za stanovených separačných podmienok by mohlo viesť k presnejšiemu určeniu veľkosti chromozómov u skúmaných kvasiniek. Keďže u niektorých pripravených vzoriek kvasiniek nebola detegovaná prítomnosť DNA, ďalšie práce by mohli byť zamerané na optimalizáciu jej izolácie z buniek. Pri izolácii prevedenej v rámci experimentálnej časti mohla byť získaná DNA buď degradovaná, prípadne použitý enzým nemusel byť dostačujúci k dezintegrácii bunkovej steny. V ďalších postupoch by teda enzým lytikáza mohol byť nahradený silnejším a účinnejším enzýmom - zymolázou.

6 ZÁVER

V rámci predloženej diplomovej práce bola študovaná produkcia lipidických látok vybranými kvasinkami rodu *Metschnikowia*. V rámci kultivácií boli ako hlavný zdroj uhlíka prednostne využívané odpadné substráty. Keďže odpad a jeho následná likvidácia predstavujú v súčasnosti veľký globálny problém, práca sa primárne zameriavala na jeho zužitkovanie a konverziu na produkty s pridanou hodnotou. Produkčné vlastnosti kvasiniek rodu *Metschnikowia* boli skúmané na troch typoch médií s rozdielnymi C/N pomermi. Ku kultiváciám bol použitý odpadný živočíšny tuk, srvátka a glycerol. Pre kontrolu boli využívané médiá obsahujúce glukózu. Okrem produkcie lipidov boli skúmané enzýmové aktivity a u piatich vybraných kmeňov rastové charakteristiky. Ku koncu práce bol u jednotlivých kmeňov analyzovaný karyotyp prostredníctvom elektroforetických metód.

Jednotlivé skúmané kmene boli porovnávané z hľadiska produkcie biomasy na rôznych substrátoch s rozdielnymi C/N pomermi. Kvasinky pre svoj rast vyžadujú prítomnosť rastových faktorov ako je uhlík a dusík. Pokiaľ dochádza k limitácii dusíkatého zdroja, kvasinky zastavujú svoj rast, nevznikajú nové bunky, znižuje sa aj produkcia biomasy a dochádza k akumulácii metabolitov. Pri kultivácií na glycerole boli najvyššie výťažky biomasy zaznamenané na médiu s najnižším C/N pomerom. So zvyšujúcim sa pomerom na C/N 97 a 150 dochádzalo k postupnému znižovaniu obsahu vyprodukovanej biomasy. Celkovo najvyššia produkcia biomasy bola zaznamenaná na už spomínanom médiu C/N 24, kde kvasinka *M. sinensis* 1244 vyprodukovala 27,71 g/l biomasy. Výnimku na glycerolových médiách tvorila kvasinka *M. zizyphicola* 1247, u ktorej bol pozorovaný opačný trend, teda s rastúcim C/N rástla aj produkcia biomasy. Kultiváciami na substráte v podobe odpadného živočíšneho tuku boli rovnako dosiahnuté vyššie výťažky biomás na médiách s nižším C/N pomerom. Najväčším producentom biomasy na tukovom médiu bola kvasinka *M. andauensis* 1241, kde sa obsah vyprodukovanej biomasy pohyboval okolo 15,67 g/l. Pri srvátkových médiách nebol používaný rozdielny pomer C/N. Kultivácie boli prevádzané čisto iba s cieľom nahradiť glukózu odpadnou srvátkou tak, aby sa C/N pomer nelíšil od optimálneho média. Aj napriek uvedeným skutočnostiam možno srvátku ako odpadný produkt z mliekarenského priemyslu zaradiť medzi vhodné substráty pre utilizáciu kvasinkami. U ôsmich vybraných kmeňov (*M. chrysoperlae* 1158, *M. pulcherrima* 1232, *M. fructicola* 1235, *M. andauensis* 1241, *M. sinensis* 1244, *M. zizyphicola* 1247, *M. shanxiensis* 1250 a *M. fructicola* 15) bol prevedený screening na glukóze, kde boli skúmané produkčné vlastnosti na médiách s C/N pomerom 97 a 150. Glukóza - optimálny zdroj uhlíka, rovnako slúžila ako vhodný substrát pre tvorbu biomasy. Najviac biomasy bolo vyprodukovanej na nižšom C/N 97 pomere kvasinkou *M. fructicola* 1235.

Cieľ práce bol primárne zameraný na produkciu a analýzu lipidov. Všetky kmene prejavili schopnosť asimilovať použité substráty ako zdroj uhlíka a tvorili žiadané metabolity. Kvasinky boli kultivované za podmienok zníženej teploty (15°C) po dobu 14 dní, s cieľom zabezpečiť čo najvhodnejšie podmienky pre riadenú nadprodukcii lipidov. Najväčšia produkcia lipidov bola pozorovaná na glycerolových médiách, kde obsah naakumulovaných lipidov v bunkách kvasinky *M. pulcherrima* 1232 tvoril 36,31% (C/N 150). Druhá najvyššia produkcia bola zaznamenaná na glycerolovom médiu C/N 24, kde obsah naakumulovaných lipidov u kvasinky *M. zizyphicola* 1247 predstavoval 35,54%. Porovnaním glycerolových médií bolo preukázané, že produkcia lipidov stúpala so zvyšujúcim sa C/N pomerom. Bolo to spôsobené tým, že so zvyšovaním C/N pomeru sa znižoval dusíkatý zdroj, čím sa zastavil rast buniek a došlo k akumulácii lipidov. Lipidy boli v značnej miere produkované aj na médiách s tukovým substrátom. Najväčšia produkcia bola pozorovaná opäť na pomere C/N 150, kde lipidy tvorili v kvasinke *M. zizyphicola* 1247 20,35%. So znižujúcim C/N v dôsledku zvyšovania obsahu dusíkatého zdroja produkcia lipidov na tukových médiách opäť klesala. Produkcia lipidov bola sledovaná aj s možnosťou využitia srvátky ako zdroja uhlíka. Na týchto médiách bol pozorovaný podstatne menší % obsah lipidov v porovnaní s glycerolovými a tukovými médiami. Cieľom prípravy srvátkového média bolo dosiahnuť podmienky podobné optimálnemu médiu s glukózou. Pomer C/N bol preto v srvátkovom médiu výrazne nižší, čo sa prejavilo v neprospech produkcie lipidov. Zástupcom s najvyšším % obsahom

naakumulovaných lipidov bola kvasinka *M. sinensis* 1244 (7,96%). Pomerne vysoké percentuálne zastúpenie lipidov v kvasinkových bunkách bolo pozorované aj pri kultiváciách na čistej glukóze. Prítomnosť jednoduchého monosacharidu ako hlavného zdroja uhlíka vytvoril vhodné podmienky pre akumuláciu lipidov predovšetkým u kvasinky *M. andauensis* 1241, ktorej biomasa bola z 19,58% tvorená lipidmi. Zo získaných výsledkov je možné vidieť, že všetky použité substráty sa prejavili ako vhodné pre produkciu lipidických látok. Pre ďalšie nadväzujúce práce by teda už spomínané substráty po miernej úprave a modifikácií mohli predstavovať sľubný základ pre riadenú nadprodukciu lipidických látok kvasinkami rodu *Metschnikowia*.

Analýzou profilu produkovaných mastných kyselín kvasinkami rodu *Metschnikowia* bola u všetkých kmeňov pozorovaná istá podobnosť v zastúpení aj približnom % obsahu mastných kyselín. Jedinú výnimku tvoril kmeň *M. sinensis* 1244, ktorý určitú odlišnosť vykazoval na všetkých kultivačných médiách bez ohľadu na použitý zdroj uhlíka. Spomedzi všetkých kmeňov bol na každom médiu najvyšším producentom α -linolenovej kyseliny, ktorá patrí k významným Ω -3 mastným kyselinám a zároveň bol takmer vždy najnižším producentom olejovej kyseliny.

Keďže kvasinky rodu *Metschnikowia* preukázali potenciálnu schopnosť utilizovať odpadné substráty vo forme živočíšneho tuku, v rámci práce bola sledovaná aj ich schopnosť produkovať hydrolytické enzýmy - lipázy. K produkcii lipáz boli využívané médiá obsahujúce samotný odpadný tuk a médiá, kde bol k tuku pridaný polysorbát 80 (Tween 80). Pri sledovaní enzýmovej aktivity boli k očkovaniu využité dva spôsoby prevodu kultúry do médií. Jedna séria produkčných médií bola očkovaná predom pripraveným 24 h inokulom, zatiaľ čo druhá séria bol pripravená priamym prenesením kultúry zo zásobnej Petriho misky do médií. Tým boli kvasinky vystavené väčším stresovým podmienkam, keďže nemali prístup k zbytkovej glukóze a živinám z inokula. Enzýmová aktivita lipáz bola stanovená po ukončení kultivácie spektrofotometrickou metódou za použitia *p*-NPP. Porovnávaním enzýmových aktivít stanovených v médiách zaočkovaných inokulom bola najvyššia lipázová aktivita (1,304 nmol/min.ml) zaznamenaná u kvasinky *M. sinensis* 1244 s prídavkom Tweenu 80. Aktivita lipáz pozorovaná na médiách bez inokula bola najvyššia pre kvasinku *M. pulcherrima* 1232 opäť na médiách obsahujúcich Tween 80 (1,092 nmol/min.ml). V rámci diskusie boli zvlášť porovnávané produkčné vlastnosti na čistých tukových médiách a médiách s Tweenom obsahujúcich inokulum/bez inokula. V prípade tukových médií aj médií s Tweenom vyhovovali väčšine skúmaných kmeňov pre vyššiu enzýmovú aktivitu podmienky očkovania s inokulom. Namerané enzýmové aktivity u kvasiniek rodu *Metschnikowia* boli v porovnaní s inými kvasinkami produkujúcimi lipázy pomerne nízke. Kým u kvasinky *Y. lipolytica* alebo *C. rugosa* boli lipázy produkované v rádoch 10^3 a viac nmol/min.ml, u kmeňov kvasiniek rodu *Metschnikowia* nepresiahla produkcia $>1,4$ nmol/min.ml.

Produkcia lipidov bola u niekoľko vybraných vzoriek podrobená aj analýze prostredníctvom Ramanovej spektroskopie na Ústave prístrojovej techniky akadémie vied Českej republiky. Keďže táto metóda je schopná pomerne rýchlo, spoľahlivo a nedeštruktívne detegovať lipidy, bola využitá k skúmaniu zastúpenia nenasýtených a nasýtených mastných kyselín. Pomerom obsahu nasýtených a nenasýtených C-C väzieb bol u vybraných vzoriek stanovený stupeň nenasýtenosti, tzv. jódové číslo, ktoré určuje kvalitu tukov a olejov.

Elektroforetická karyotypizácia je užitočným nástrojom pre analýzu štruktúry chromozómov DNA kvasiniek. Záver práce bol preto doplnený o charakterizáciu karyotypu vybraných kvasiniek rodu *Metschnikowia* pomocou techniky pulznej gélovej elektroforézy. Behom práce bol optimalizovaný postup pre izoláciu kvasinkovej DNA a rovnako boli optimalizované aj podmienky separácie. U niektorých skúmaných kmeňov však nebolo dosiahnutej úplnej charakterizácie karyotypu z dôvodu degradácie izolovanej DNA. Ďalšia optimalizácia separácie DNA pomocou pulznej gélovej elektroforézy by mohla spočívať vo využití zymolýzy, ako silnejšieho a účinnejšieho enzýmu k rozrušeniu bunkových stien.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. BRUDER, Stefan, Silke HACKENSCHMIDT, Eva J. MOLDENHAUER a Johannes KABISCH. Conventional and Oleaginous Yeasts as Platforms for Lipid Modification and Production. *Lipid Modification by Enzymes and Engineered Microbes* [online]. UK: Elsevier, 2018, 2018, s. 257-292 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/B978-0-12-813167-1.00012-8. ISBN 9780128131671. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128131671000128>
2. ANSCHAU, Andréia. Lipids from oleaginous yeasts: production and encapsulation. *Nutrient Delivery* [online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 749-794 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/B978-0-12-804304-2.00020-2. ISBN 9780128043042. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128043042000202>
3. BOEKHOUT, T. a V. ROBERT. *Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects*. Boca Raton: CRC Press, 2003. ISBN 0849319269. e-ISBN 9781845698485.
4. PISKUR, Jure a Concetta COMPAGNO. *Molecular mechanisms in yeast carbon metabolism*. New York: Springer, 2014, 328 s. ISBN 9783642550126.
5. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Yeasts and Yeast-like Organisms*. 2nd ed. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1990, 528 s. ISBN 0-89573-229-7
6. ŠPICKÝ, Matej a Július ŠUBÍK. *Genetika kvasiniek*. Bratislava: Veda, 1992. ISBN 80-224-0396-2.
7. ROSA, Carlos a Péter GÁBOR. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. London: Springer, 2006, 578 s. The Yeast Handbook Ser. ISBN 9783540261001.
8. MCKANE, Larry a Judy KANDEL. *Microbiology: essentials and Applications*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, c1996. ISBN 0-07-045154-0
9. ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologie*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6
10. Kurtzman, Cletus P., Jack W Fell, and Teun Boekhout. *The Yeasts : a Taxonomic Study*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. ISBN 978-0-444-52149-1.
11. Kuan CS, Ismail R, Kwan Z, Yew SM, Yeo SK, Chan CL, et al. (2016) Isolation and Characterization of an Atypical *Metschnikowia* sp. Strain from the Skin Scraping of a Dermatitis Patient. *PLoS ONE* 11(6): e0156119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156119>
12. YAMAN, M. a R. RADEK. Identification, distribution and occurrence of the ascomycete *Metschnikowia typographi* in the great spruce bark beetle, *Dendroctonus micans*. *Folia Microbiologica* [online]. 2008, 53(5), 427-432. DOI: 10.1007/s12223-008-0065-3. ISSN 0015-5632. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12223-008-0065-3>
13. MENDONÇA-HAGLER, L. C., A. N. HAGLER a C. P. KURTZMAN. Phylogeny of *Metschnikowia* Species Estimated from Partial rRNA Sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. 1993, 43(2), 368-373. DOI: 10.1099/00207713-43-2-368. ISSN 0020-7713. Dostupné z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-43-2-368>
14. Buzzini, P., Lachance, M., & Yurkov, A. (Eds.). *Yeasts in natural ecosystems: diversity*. Cham: Springer International Publishing, 2017, 504 s. ISBN 978-3-319-62683-3. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com>
15. ORO, L., M. CIANI a F. COMITINI. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2014, 116(5), 1209-1217. DOI: 10.1111/jam.12446. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12446>
16. SAVINI, Vincenzo, Marijke HENDRICKX, Maurizio SISTI, et al. An atypical, pigment-producing *Metschnikowia* strain from a leukaemia patient. *Medical Mycology* [online]. 2013, 51(4), 438-443.

- DOI: 10.3109/13693786.2012.733429. ISSN 1369-3786. Dostupné z:
<https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.3109/13693786.2012.733429>
17. PAWLIKOWSKA, Ewelina a Dorota KREGIEL. Enzymatic profiles and antimicrobial activity of the yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *Acta Innovations*. 2017, **17**(23), 17-24. ISSN 2300-5599.
 18. Kluyver, A. J., van der Walt, J. P., & van Triet, A. J. Pulcherrimin, The Pigment of *Candida Pulcherrima*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1953, **39**(7), 583-93.
 19. MELVYDAS, Vytautas, Ramune STANEVICIENE, Algima BALYNAITE, Jurate VAICIUNIENE a Rasa GARJONYTE. Formation of self-organized periodic patterns around yeasts secreting a precursor of a red pigment. *Microbiological Research* [online]. 2016, **193**, 87-93 [cit. 2019-01-09]. DOI: 10.1016/j.micres.2016.09.007. ISSN 09445013. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501316304141>
 20. FENG, Xinxin, Yumei HU, Yingying ZHENG, et al. Structural and Functional Analysis of *Bacillus subtilis* YisP Reveals a Role of Its Product in Biofilm Production. *Chemistry & Biology* [online]. 2014, **21**(11), 1557-1563 [cit. 2019-01-09]. DOI: 10.1016/j.chembiol.2014.08.018. ISSN 10745521. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074552114003226>
 21. MOLNÁR, Orsolya a Hansjörg PRILLINGER. Analysis of yeast isolates related to *Metschnikowia pulcherrima* using the partial sequences of the large subunit rDNA and the actin gene; description of *Metschnikowia andauensis* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 2005, **28**(8), 717-726 [cit. 2019-01-11]. DOI: 10.1016/j.syapm.2005.05.009. ISSN 07232020. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0723202005000950>
 22. MANSO, T. a C. NUNES. METSCHNIKOWIA ANDAUENSIS: A NOVEL BIOCONTROL AGENT OF FRUIT POSTHARVEST DISEASES. *Acta Horticulturae* [online]. 2011, (905), 261-268 [cit. 2019-01-11]. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.905.28. ISSN 0567-7572. Dostupné z:
https://www.actahort.org/books/905/905_28.htm
 23. MACARISIN, Dumitru, Samir DROBY, Gary BAUCHAN a Michael WISNIEWSKI. Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist–fruit interaction: A new role for reactive oxygen species in postharvest biocontrol?. *Postharvest Biology and Technology* [online]. 2010, **58**(3), 194-202 [cit. 2019-01-12]. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2010.07.008. ISSN 09255214. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925521410001584>
 24. VESELÁ, Mária. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. Vyd. 3. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2004. ISBN 80-214-2567-9.
 25. ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Mikrobiologie v technologii vod*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004. ISBN 80-7080-534-x.
 26. CUNNINGHAM, Alfred B.; LENNOX, John E.; ROSS, Rockford J.. *Montana State University* [online]. [cit. 16.1.2019]. Dostupný na [www: https://www.cs.montana.edu/webworks/projects/stevesbook/contents/chapters/chapter002/section002/black/page001.htm](https://www.cs.montana.edu/webworks/projects/stevesbook/contents/chapters/chapter002/section002/black/page001.htm)
 27. SIBIRNY, Andriy A. *Biotechnology of yeasts and filamentous fungi*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2017, 415 s. ISBN 9783319588285.
 28. SATYANARAYANA, U. a U. Chakrapani CHAKRAPANI. *Biochemistry* [online]. 4th ed. India: Elsevier Science & Technology, 2013, 810 s. [cit. 2019-01-22]. ISBN 9788131237137. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/mzk/detail.action?docID=1723468#>
 29. LOVE, John. *Biofuels and bioenergy*. Chichester, West Sussex: John Wiley, 2017, 326 s. ISBN 9781118350560.
 30. VOET, Donald a Judith G. VOET. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-85605-44-9
 31. VILLENEUVE, Pierre, Jean M MUDERHWA, Jean GRAILLE a Michael J HAAS. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* [online]. 2000, **9**(4-6), 113-148. DOI:

- 10.1016/S1381-1177(99)00107-1. ISSN 13811177. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381117799001071>
32. GUPTA, Rani, Arti KUMARI, Poonam SYAL a Yogesh SINGH. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress in Lipid Research* [online]. 2015, 57, 40-54. DOI: 10.1016/j.plipres.2014.12.001. ISSN 01637827. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782714000630>
33. MÜLLER, Günter a Stefan PETRY. *Lipases and phospholipases in drug development: from biochemistry to molecular pharmacology*. Weinheim: Wiley-VCH, c2004, 356 s. ISBN 9783527306770.
34. RAY, Ramesh C a Cristina M ROSELL. *Microbial enzyme technology in food applications*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, CRC Press is an imprint of the Taylor & Francis Group, an informa business, [2017], 521 s. ISBN 9781498749831.
35. ANSORGE-SCHUMACHER, Marion B. a Oliver THUM. Immobilised lipases in the cosmetics industry. *Chemical Society Reviews* [online]. 2013, 42(15), 6475-6490. DOI: 10.1039/c3cs35484a. ISSN 0306-0012. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3cs35484a>
36. SINGH, Rajendra, Manoj KUMAR, Anshumali MITTAL a Praveen Kumar MEHTA. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 *Biotech* [online]. 2016, 6(2), 1-15. DOI: 10.1007/s13205-016-0485-8. ISSN 2190-572X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-016-0485-8>
37. CIHANGIR, Nilüfer a Elif SARIKAYA. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2004, 20(2), 193-197. DOI: 10.1023/B:WIBI.0000021781.61031.3a. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/B:WIBI.0000021781.61031.3a>
38. Sumita T. Lipases, its sources, properties and applications: A review. *Int J Scientific Engr Research*. 2012;3(7):6-9
39. HASAN, Fariha, Aamer Ali SHAH a Abdul HAMEED. Influence of culture conditions on lipase production by *Bacillus* sp. FH5. *Annals of Microbiology*. 2006, 56(3), 247-252. DOI: 10.1007/BF03175013. ISSN 1590-4261. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF03175013>
40. ZAREVCKA, Marie. Olive Oil as Inductor of Microbial Lipase. BOSKOU, Dimitrios, ed. *Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*. InTech, 2012, 2012-02-01, s. 457-470. DOI: 10.5772/30109. ISBN 978-953-307-921-9. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/olive-oil-constituents-quality-health-properties-and-bioconversions/olive-oil-as-inductor-of-microbial-lipase>
41. GHANEM, Essam H., Hashim A. AL-SAYED a Kareema M. SALEH. N alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2000, 16(5), 459-464. DOI: 10.1023/A:1008947620734. ISSN 09593993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1008947620734>
42. TAN, Tianwei, Mu ZHANG, Bingwu WANG, Chunhua YING a Li DENG. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Process Biochemistry*. 2003, 39(4), 459-465. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00091-8. ISSN 13595113.
43. TURKI, Saoussen, Ines Ben KRAEIM, Frederic WEECKERS, Philippe THONART a HÉLA KALLEL. Isolation of bioactive peptides from tryptone that modulate lipase production in *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*. 2009, 100(10), 2724-2731. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.12.053. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852408011358>
44. RAMANI, K., L. JOHN KENNEDY, M. RAMAKRISHNAN a G. SEKARAN. Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. *Process Biochemistry*. 2010, 45(10), 1683-1691. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.06.023. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511310002527>

45. SZTAJER, Helena a Irena MALISZEWSKA. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. *Biotechnology Letters*. 1989, **11**(12), 895-898. DOI: 10.1007/BF01026848. ISSN 0141-5492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01026848>
46. PATIL, K.J., CHOPDA, M.Z., MAHAJAN, R.T.: Lipase biodiversity. *Indian J. Sci. Technol.*, vol. 4, no. 8, pp. 971–982, 2011.
47. SATHISH YADAV, K.N., M.G. ADSUL, K.B. BASTAWDE, D.D. JADHAV, H.V. THULASIRAM a D.V. GOKHALE. Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. *Bioresource Technology*. 2011, **102**(22), 10663-10670. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.09.013. ISSN 09608524.
48. STERGIOU, Panagiota-Yiolanda, Athanasios FOUKIS, Helen SKLIVANITI, Paraskevi ZACHARAKI, Maria PAPAGIANNI a Emmanuel M. PAPAMICHAEL. Experimental Investigation and Optimization of Process Variables Affecting the Production of Extracellular Lipase by *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012, **168**(3), 672-680. DOI: 10.1007/s12010-012-9808-3. ISSN 0273-2289.
49. TRZCINSKI, Antoine P. *Biofuels from food waste: applications of saccharification using fungal solid state fermentation*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, CRC Press is an imprint of the Taylor & Francis Group, an informa business, [2018], 137 s. ISBN 9781138093720.
50. GHOSH, Sadhan Kumar. *Utilization and management of bioresources: Proceedings of 6th ICONSWM 2016*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2017, 333 s. ISBN 9789811053481.
51. PRASAD, M.N.V. a Kaimin SHIH. *Environmental materials and waste: resource recovery and pollution prevention*. Waltham, MA: Elsevier, 2016. ISBN 9780128038376.
52. NIGAM, Poonam Singh a Ashok PANDEY. *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: utilisation of agro-residues*. Netherlands: Springer, c2009, 475 s. ISBN 9781402099427.
53. ADEBAYO, F.O. a S.O. OBIEKEZIE. Microorganisms in Waste Management. *Research Journal of Science and Technology*[online]. 2018, **10**(1), 28-39 [cit. 2019-01-24]. DOI: 10.5958/2349-2988.2018.00005.0. ISSN 0975-4393. Dostupné z: <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:rjst&volume=10&issue=1&article=005>
54. RYAN, Michael P. a Gary WALSH. The biotechnological potential of whey. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* [online]. 2016, **15**(3), 479-498 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1007/s11157-016-9402-1. ISSN 1569-1705. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11157-016-9402-1>
55. BLASCHEK, Hans P., Thaddeus C. EZEJI, J. Rgen SCHEFFRAN a Jürgen SCHEFFRAN. *Biofuels from Agricultural Wastes and Byproducts*. John Wiley & Sons, Incorporated, 2016, 276 s. ISBN 9780813822716.
56. WOODGATE, Stephen L. a Johan T. VAN DER VEEN. Fats and Oils - Animal Based. CLARK, Stephanie, Stephanie JUNG a Buddhi LAMSAL, ed. *Food Processing* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2014, 2014-04-11, s. 481-499 [cit. 2019-04-01]. DOI: 10.1002/9781118846315.ch21. ISSN 9781118846315. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118846315.ch21>
57. LEHOTAY, Steven J a Jana HAJŠLOVÁ. Application of gas chromatography in food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2002, **21**(9-10), 686-697 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/S0165-9936(02)00805-1. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993602008051>
58. CORDERO, Chiara, Erica LIBERTO, Barbara SGORBINI, Patrizia RUBIOLO a Carlo BICCHI. Gas Chromatography. *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications* [online]. USA: Elsevier, 2012, 2012, s. 311-373 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/B978-0-12-384862-8.00011-X. ISBN 9780123848628. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012384862800011X>
59. RUIZ-MATUTE, A.I., S. RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, M.L. SANZ a A.C. SORIA. Chromatographic Technique: Gas Chromatography (GC). *Modern Techniques for Food Authentication* [online]. 2nd ed.

- Elsevier, 2018, 2018, s. 415-458 [cit. 2019-02-17]. DOI: 10.1016/B978-0-12-814264-6.00012-8. ISBN 9780128142646. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128142646000128>
60. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2
61. CRUZ-HERNANDEZ, Cristina a Frédéric DESTAILLATS. Analysis of Lipids by Gas Chromatography. *Gas Chromatography* [online]. USA: Elsevier, 2012, 2012, s. 529-544 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1016/B978-0-12-385540-4.00023-7. ISBN 9780123855404. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123855404000237>
62. MCNAIR, Harold Monroe a James M. MILLER. *Basic gas chromatography*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: John Wiley, 2009. ISBN 9780470439548.
63. GOH, P.S., A.F. ISMAIL a B.C. NG. Raman Spectroscopy. *Membrane Characterization* [online]. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2017, 2017, s. 31-46 [cit. 2019-03-04]. DOI: 10.1016/B978-0-444-63776-5.00002-4. ISBN 9780444637765. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444637765000024>
64. SCHULZ, Hartwig. Spectroscopic Technique: Raman Spectroscopy. *Modern Techniques for Food Authentication* [online]. 2nd ed. Elsevier, 2018, 2018, s. 139-191 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1016/B978-0-12-814264-6.00005-0. ISBN 9780128142646. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128142646000050>
65. EMBER, Katherine J. I., Marieke A. HOEVE, Sarah L. MCAUGHTRIE, et al. Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review. *Npj Regenerative Medicine* [online]. 2017, 2(1), 1-10 [cit. 2019-03-03]. DOI: 10.1038/s41536-017-0014-3. ISSN 2057-3995. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41536-017-0014-3>
66. JOHN, Nebu a Sony GEORGE. Raman Spectroscopy. *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization* [online]. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2017, 2017, s. 95-127 [cit. 2019-03-04]. DOI: 10.1016/B978-0-323-46140-5.00005-4. ISBN 9780323461405. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323461405000054>
67. WESTERMEIER, Reiner. *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations*. Fifth edition. Weinheim: Wiley-VCH, [2016]. ISBN 9783527338801.
68. JOGDAND, S.N. *Gene Biotechnology* [online]. Global Media, 2008, 417 s. [cit. 2019-04-15]. ISBN 9789350432570. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/natl-ebooks/reader.action?docID=3011089>
69. FOLEY, Steven L., Anne Y. CHEN, Shabbir SIMJEE a Marcus J. ZERVOS, ed. *Molecular Techniques for the Study of Hospital-Acquired Infection* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2011, 249 s. [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1002/9781118063842. ISBN 9781118063842. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118063842>
70. Lopez-Canovas, M.B. Martinez Benitez, J.A. Herrera Isidron, E.F. Soto, Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, present, and future, *Analytical Biochemistry* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.02.020>
71. Chu D, Barnes DJ. The lag-phase during diauxic growth is a trade-off between fast adaptation and high growth rate. *Scientific Reports*. 2016;6:25191. doi:10.1038/srep25191.
72. AccessScience Editors. (2015). Diauxic growth (diauxie). In AccessScience. McGraw-Hill Education. <https://doi.org/10.1036/1097-8542.BR0105151>
73. MUNIRAJ, Iniya Kumar, Siva Kumar UTHANDI, Zhenhu HU, Liwen XIAO a Xinmin ZHAN. Microbial lipid production from renewable and waste materials for second-generation biodiesel feedstock. *Environmental Technology Reviews* [online]. 2015, 4(1), 1-16 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1080/21622515.2015.1018340. ISSN 2162-2515. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21622515.2015.1018340>
74. JIN, Mingjie, Patricia J. SLININGER, Bruce S. DIEN, Suresh WAGHMODE, Bryan R. MOSER, Andrea ORJUELA, Leonardo da Costa SOUSA a Venkatesh BALAN. Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: feasibility and challenges. *Trends in Biotechnology* [online]. 2015, 33(1), 43-54 [cit. 2019-

- 04-20]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.11.005. ISSN 01677799. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779914002315>
75. YAMADA, Ryosuke, Azusa YAMAUCHI, Tomomi KASHIHARA a Hiroyasu OGINO. Evaluation of lipid production from xylose and glucose/xylose mixed sugar in various oleaginous yeasts and improvement of lipid production by UV mutagenesis. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2017, **128**, 76-82 [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.1016/j.bej.2017.09.010. ISSN 1369703X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X17302371>
76. SANTAMAURO, Fabio, Fraeya M WHIFFIN, Rod J SCOTT a Christopher J CHUCK. Low-cost lipid production by an oleaginous yeast cultured in non-sterile conditions using model waste resources. *Biotechnology for Biofuels* [online]. 2014, **7**(1), 34 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1186/1754-6834-7-34. ISSN 1754-6834. Dostupné z: <http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-7-34>
77. 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* [online]. 2016, **66**(4), 1409-1418. DOI: 10.1007/s13213-016-1228-0. ISSN 1590-4261. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13213-016-1228-0>
78. GONOVÁ, D. *Studium produkce lipidických látek z odpadních substrátů pomocí kvasinek rodu Metschnikowia*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 99s. Vedoucí diplomové práce Ing. Andrea Hároniková, Ph.D..
79. STOYTICHEVA, M., G. MONTERO, R. ZLATEV, Jose A. LEON a V. GOCHEV. Analytical Methods for Lipases Activity Determination: A Review. *Current Analytical Chemistry* [online]. 2012, **8**(3), 400-407 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.2174/157341112801264879. ISSN 15734110. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1573-4110&volume=8&issue=3&spage=400>
80. DESTAIN, J., D. ROBLAIN a P. THONART. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters* [online]. 1997, **19**(2), 105-108. DOI: 10.1023/A:1018339709368. ISSN 01415492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1018339709368>
81. DALMAU, E, J.L MONTESINOS, M LOTTI a C CASAS. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2000, **26**(9-10), 657-663 [cit. 2019-04-13]. DOI: 10.1016/S0141-0229(00)00156-3. ISSN 01410229. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022900001563>
82. FABISZEWSKA, A. U., I. A. STOLARZEWICZ, W. M. ZAMOJSKA a E. BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK. Carbon source impact on *Yarrowia lipolytica* KKP 379 lipase production. *Applied Biochemistry and Microbiology* [online]. 2014, **50**(4), 404-410 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1134/S000368381404005X. ISSN 0003-6838. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S000368381404005X>
83. FABISZEWSKA, Agata Urszula, Danuta KOTYRBA a Dorota NOWAK. Assortment of carbon sources in medium for *Yarrowia lipolytica* lipase production: A statistical approach. *Annals of Microbiology* [online]. 2015, **65**(3), 1495-1503 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1007/s13213-014-0988-7. ISSN 1590-4261. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13213-014-0988-7>
84. SAMEK, Ota, Alexandr JONÁŠ, Zdeněk PILÁT, Pavel ZEMÁNEK, Ladislav NEDBAL, Jan TRÍSKA, Petr KOTAS a Martin TRTÍLEK. Raman Microspectroscopy of Individual Algal Cells: Sensing Unsaturation of Storage Lipids in vivo. *Sensors* [online]. 2010, **10**(9), 8635-8651 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.3390/s100908635. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/10/9/8635>
85. MEHRABI, Rahim, Masatoki TAGA, Mostafa AGHAEI, Pierre J. G. M. DE WIT a Gert H. J. KEMA. Karyotyping Methods for Fungi. BOLTON, Melvin D. a Bart P.H.J. THOMMA, ed. *Plant Fungal Pathogens* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2012, 2012-11-23, s. 591-602 [cit. 2019-04-27]. *Methods in Molecular Biology*. DOI: 10.1007/978-1-61779-501-5_37. ISBN 978-1-61779-500-8. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-501-5_37

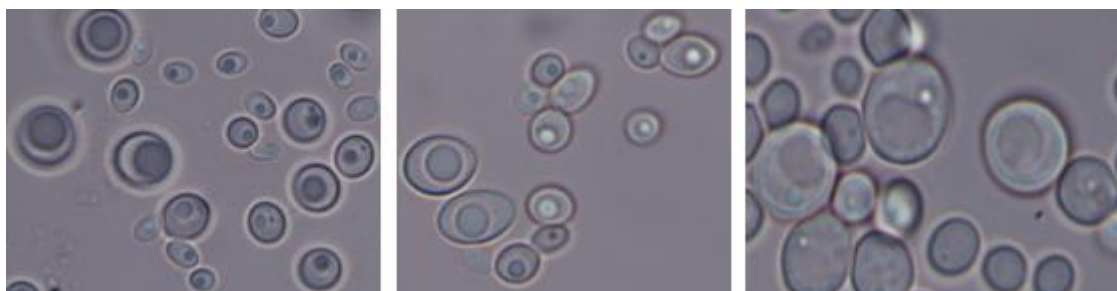
86. ZIMMERMANN, Martin a Philippe FOURNIER. Electrophoretic Karyotyping of Yeasts. WOLF, Klaus. *Nonconventional Yeasts in Biotechnology* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996, 1996, s. 101-116 [cit. 2019-04-27]. DOI: 10.1007/978-3-642-79856-6_3. ISBN 978-3-642-79858-0. Dostupné z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-79856-6_3
87. *Bio Rad* [online]. [cit. 27.4.2019]. Dostupný na: <http://www.bio-rad.com/en-sk/sku/1703633-chef-dna-size-marker?ID=1703633>
88. BARNETT, J. A. a Linda BARNETT. *Yeast research: a historical overview*. Washington, DC: ASM Press, c2011. ISBN 9781555815165.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

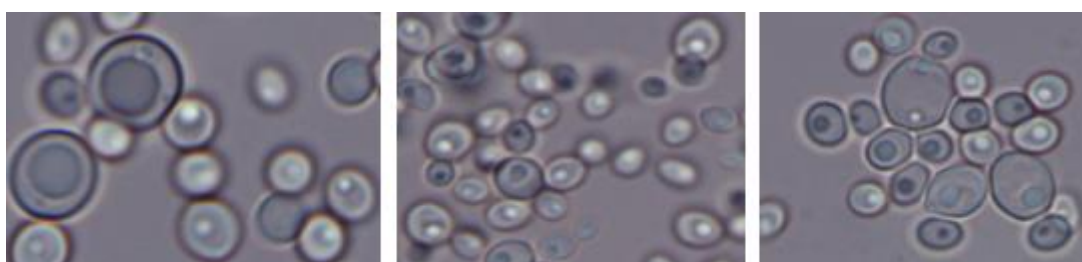
ATP	adenozíntrifosfát
ATP-CL	ATP-citrátlyáza
DAG	diacylglyceroly
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FAME	methylestery mastných kyselín
FFA	voľné mastné kyseliny
FID	plameňovo-ionizačný detektor
GC	plynová chromatografia
MAG	monoacylglyceroly
NADH	nikotínamidadeníninukleotid
PDH	pyruvátdehydrogenáza
PFGE	pulzná gélová elektroforéza
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHB	polyhydroxybutyrát
PLA	kyselina polymliečna
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -nitrofenylpalmitát
RNA	ribonukleová kyselina
SCO	single cell oils
TAG	triacylglyceroly

9 PRÍLOHY

Príloha 1: Mikroskopický pohľad na bunky kvasiniek rodu *Metschnikowia* kultivovaných s cieľom produkcie lipidov



Obr. 58: Mikroskopický pohľad na kvasinky kultivované na odpadných substrátoch. Zľava: 1158 Gly C/N 150; 1232 Gly C/N 24; 1235 Gly C/N 24



Obr. 59: Mikroskopický pohľad na kvasinky kultivované na odpadných substrátoch. Zľava: 1241 Gly C/N 24; 1244 Glu C/N 150, 1247 Gly C/N 24

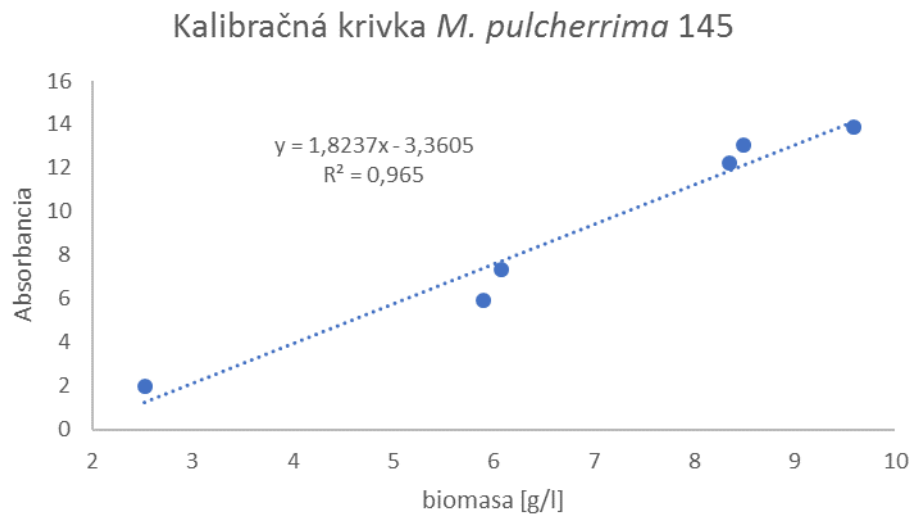


Obr. 60: Mikroskopický pohľad na kvasinky kultivované na odpadných substrátoch. Zľava: 1250 Glu C/N 97; 145 Tuk C/N 24, 147 Tuk C/N 150

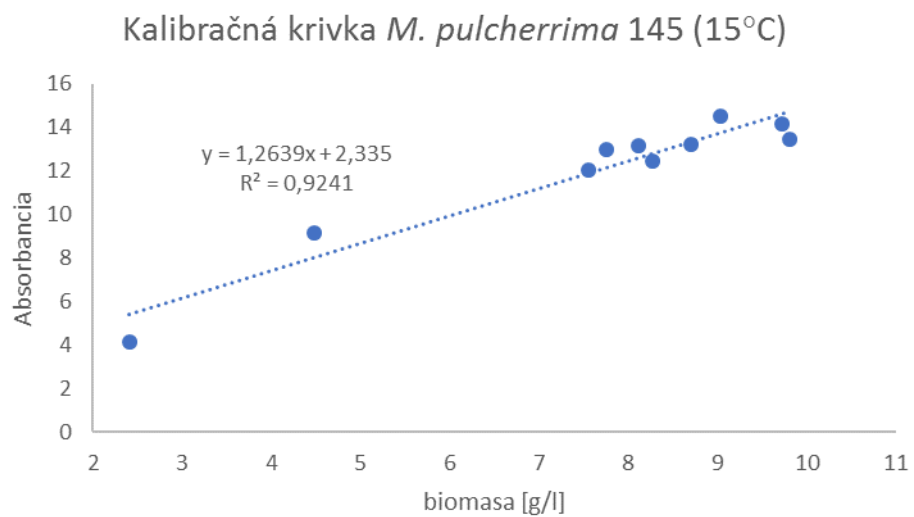


Obr. 61: Mikroskopický pohľad na kvasinky kultivované na odpadných substrátoch. Zľava: 149 Tuk C/N 24; 129 Tuk C/N 24; 15 Tuk C/N 97

Príloha 2: Kalibračné krivky kvasinky *M. pulcherrima* 145 za laboratórnej (25°C) a zníženej (15°C) teploty

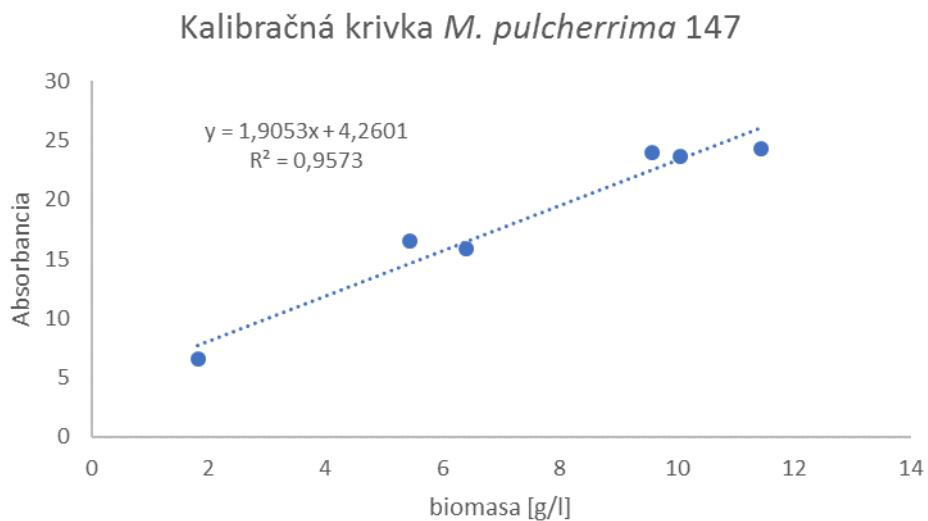


Obr. 62: Kalibračná krivka *M. pulcherrima* 145 (25°C)

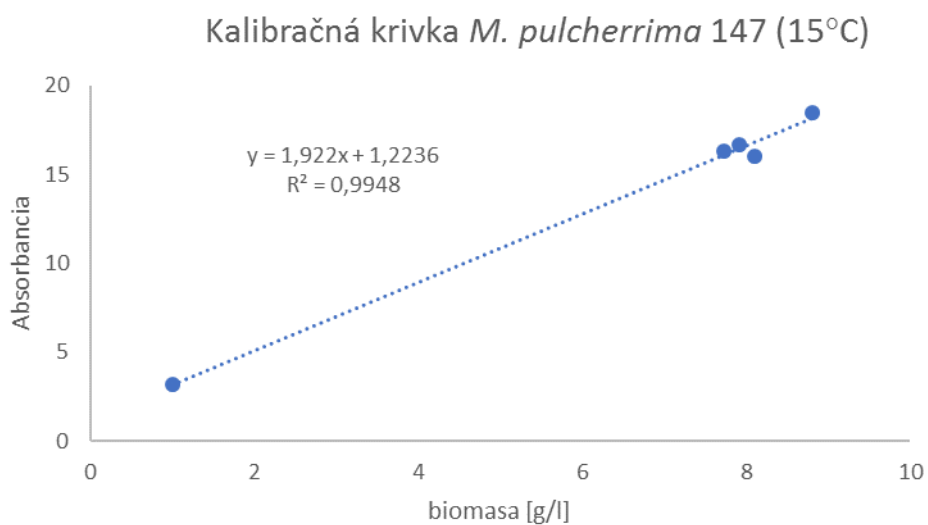


Obr. 63: Kalibračná krivka *M. pulcherrima* 145 (15°C)

Príloha 3: Kalibračné krivky kvasinky *M. pulcherrima* 147 za laboratórnej (25°C) a zníženej (15°C) teploty

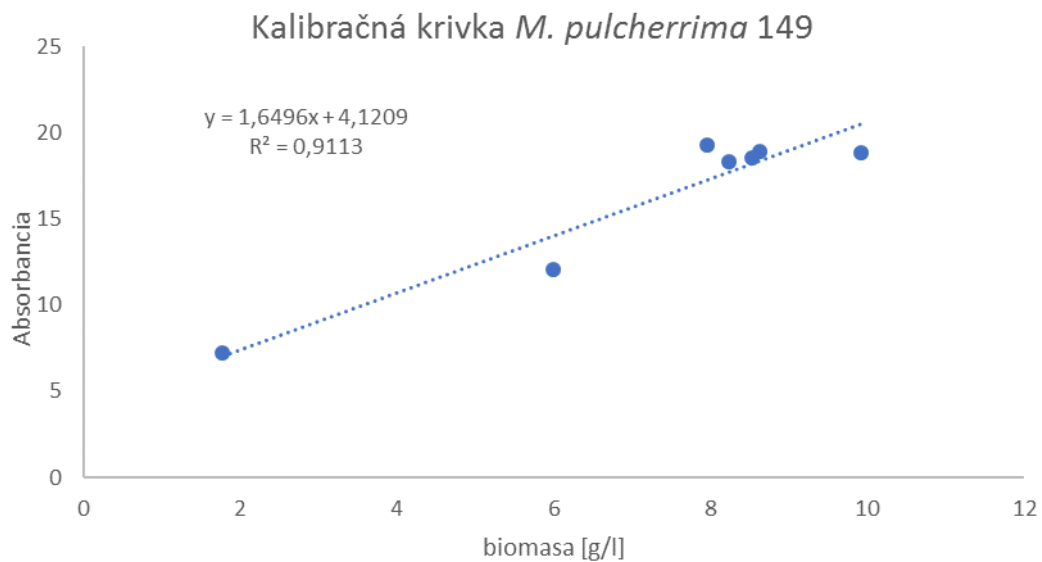


Obr. 64: Kalibračná krivka *M. pulcherrima* 147 (25°C)

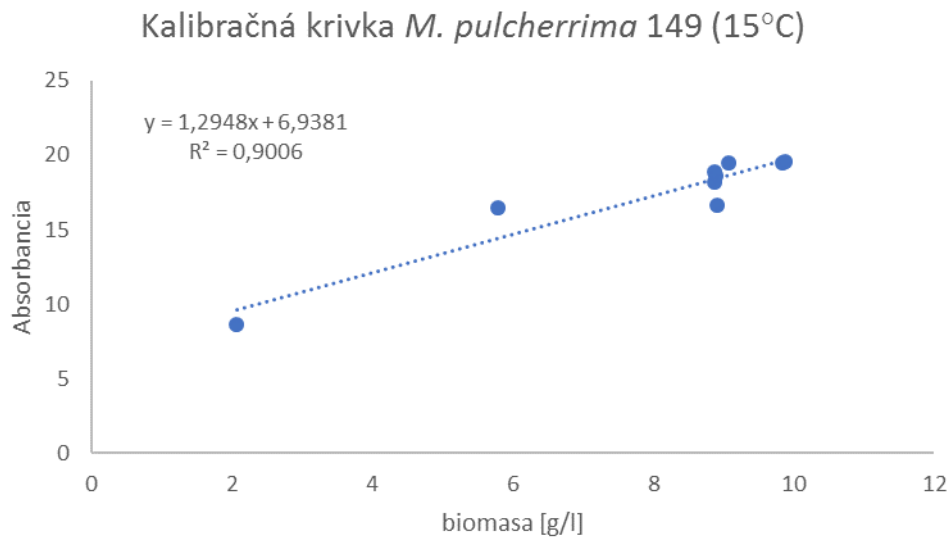


Obr. 65: Kalibračná krivka *M. pulcherrima* 147 (15°C)

Príloha 4: Kalibračné krivky kvasinky *M. pulcherrima* 149 za laboratórnej (25°C) a zníženej (15°C) teploty

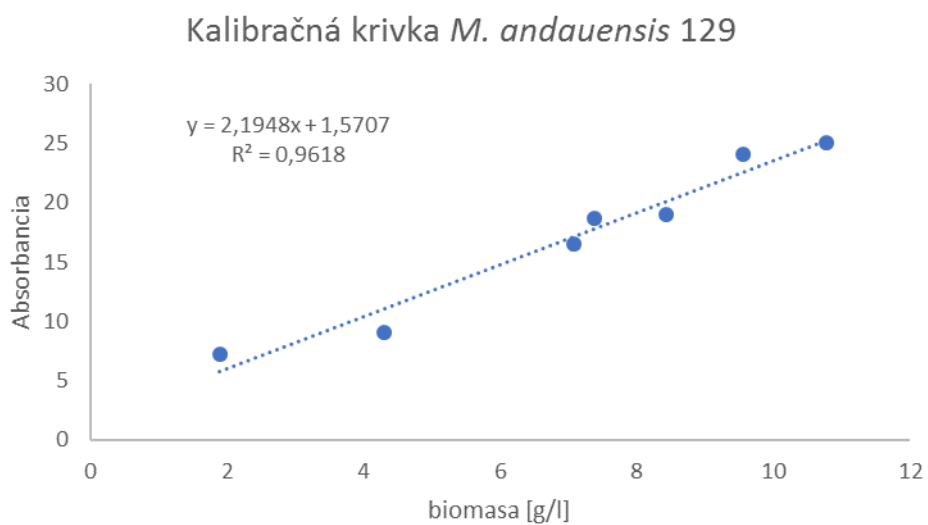


Obr. 66: Kalibračná krivka *M. pulcherrima* 149 (25°C)

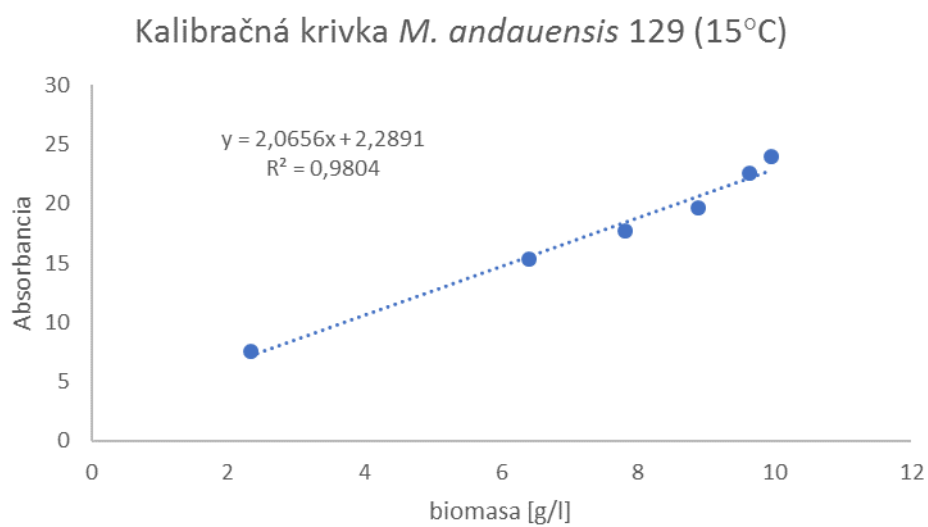


Obr. 67: Kalibračná krivka *M. pulcherrima* 149 (15°C)

Príloha 5: Kalibračné krivky kvasinky *M. andauensis* 129 za laboratórnej (25°C) a zníženej (15°C) teploty

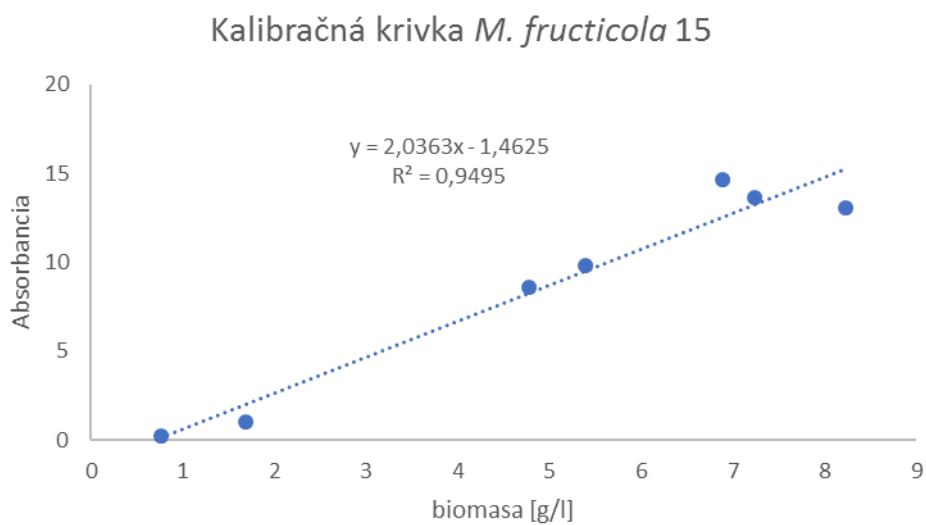


Obr. 68: Kalibračná krivka *M. andauensis* (25°C)

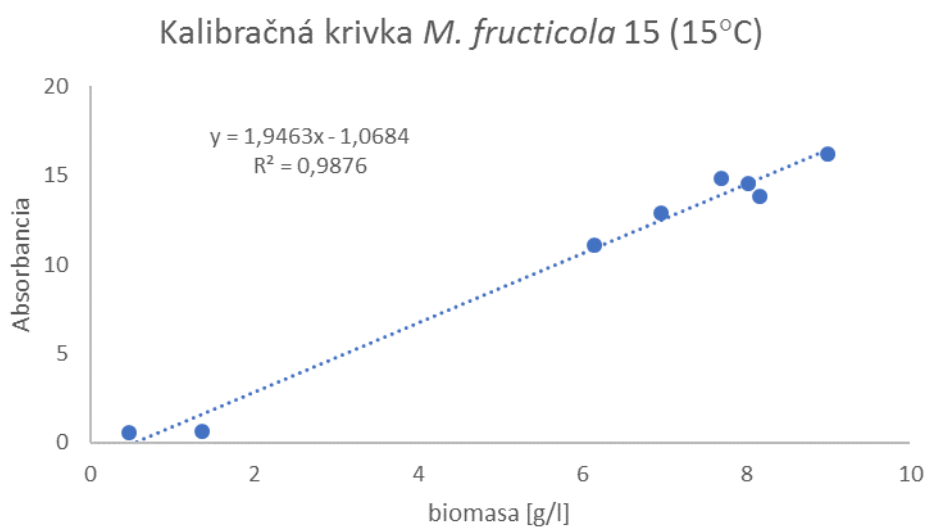


Obr. 69: Kalibračná krivka *M. andauensis* (15°C)

Príloha 6: Kalibračné krivky kvasinky *M. fructicola* 15 za laboratórnej (25°C) a zníženej (15°C) teploty



Obr. 70: Kalibračná krivka *M. fructicola* (25°C)



Obr. 71: Kalibračná krivka *M. fructicola* (15°C)

Príloha 7: Produkcia biomasy a lipidov kvasinkami rodu *Metschnikowia* na glycerolových a glukózových médiách s rozdielnym C/N pomerom

Médiá									
Gly CN/24				Gly C/N 97			Gly C/N 150		
Kmeň	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	Lipidy (g/l)	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	Lipidy (g/l)	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	Lipidy (g/l)
1158	25,27±1,23	10,98±1,56	2,77±0,02	19,90±2,56	13,88±2,03	2,76±0,05	17,34±3,24	18,13±2,68	3,14±0,7
1232	19,38±2,69	17,83±2,56	3,46±0,07	19,65±2,10	7,90±2,10	1,55±0,04	16,31±2,55	36,31±1,22	5,92±0,3
1235	15,54±1,36	6,70±1,65	1,04±0,02	11,45±1,52	10,01±1,25	1,15±0,02	11,43±1,56	5,31±2,52	0,61±0,4
1241	26,13±1,98	13,01±1,23	3,40±0,02	18,61±3,45	17,72±2,36	3,30±0,08	17,97±3,59	16,98±2,44	3,05±0,9
1244	27,71±1,45	16,60±2,32	4,60±0,03	24,35±1,78	27,49±1,57	6,69±0,03	22,41±1,03	29,92±1,30	6,71±0,1
1247	16,87±2,23	35,54±1,24	6,00±0,03	21,09±2,95	21,27±1,93	4,48±0,06	26,87±1,41	15,14±1,15	4,07±0,2
1250	21,53±1,74	12,21±2,23	2,63±0,04	15,52±1,30	2,95±2,95	0,46±0,04	14,61±3,05	18,34±1,65	2,68±0,05
MF	16,87±2,85	11,24±1,15	1,90±0,03	15±2,06	17,65±2,87	18,09±0,06	3,19±2,26	15±1,07	14,89±0,02
Glu CN/97				Glu C/N 150					
1158	6,85±2,96	12,33±2,41	0,85±0,07	7,07±3,10	13,58±2,54	0,96±0,08			
1232	7,02±2,30	14,59±1,96	1,02±0,05	6,53±2,57	15,36±2,96	1,00±0,08			
1235	15,20±2,05	2,66±1,47	0,40±0,03	5,56±1,98	4,89±1,63	0,27±0,03			
1241	9,28±1,49	16,95±2,21	1,57±0,03	8,16±2,07	19,58±3,45	1,60±0,07			
1244	10,31±1,23	14,39±2,95	1,48±0,04	9,93±3,59	16,89±2,54	1,68±0,09			
1247	7,10±2,74	13,96±1,36	0,99±0,04	7,02±1,45	15,96±2,20	1,12±0,03			
1250	7,72±2,09	16,77±2,98	1,29±0,06	7,26±2,99	16,08±3,63	1,17±0,11			
MF	8,09±1,56	6,86±3,05	0,55±0,05	7,22±2,44	6,00±1,79	0,43±0,04			

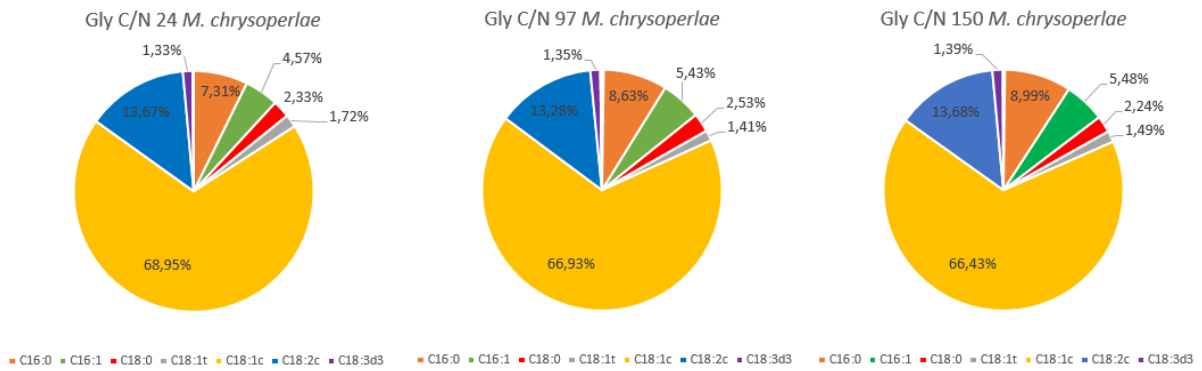
Príloha 8: Produkcia biomasy a lipidov kvasinkami rodu *Metschnikowia* na médiách s odpadným tukom a rozdielnymi C/N pomermi

Média									
Kmeň	Tuk CN/24			Tuk C/N 97			Tuk C/N 150		
	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	Lipidy (g/l)	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	Lipidy (g/l)	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	Lipidy (g/l)
1158	4,57±2,63	10,68±3,85	0,49±0,10	2,01±3,33	9,72±3,45	0,19±0,11	2,60±1,64	7,08±1,75	0,18±0,03
1232	0,77±3,10	6,67±2,74	0,05±0,08	0,37±2,15	5,92±2,04	0,02±0,04	0,35±2,75	2,48±2,99	0,01±0,08
1235	5,73±1,64	12,56±1,52	0,72±0,02	2,07±3,45	6,46±1,77	0,13±0,06	1,57±2,03	7,35±3,65	0,12±0,07
1241	15,67±2,44	13,86±1,99	2,17±0,05	4,50±2,36	14,39±1,35	0,65±0,03	4,38±3,59	17,02±3,42	0,75±0,12
1244	5,33±2,85	6,75±3,84	0,36±0,11	3,89±2,87	7,71±3,25	0,30±0,09	4,07±2,75	8,79±2,78	0,36±0,08
1247	7,16±3,47	11,50±3,55	0,82±0,12	3,31±2,95	11,91±1,65	0,39±0,05	4,31±1,65	20,35±1,06	0,88±0,02
1250	5,49±1,52	9,51±2,74	0,52±0,04	3,76±1,54	12,74±1,94	0,48±0,03	2,61±2,45	10,19±1,38	0,27±0,03
145	5,78±3,93	8,20±1,08	0,47±0,04	3,75±2,02	10,57±1,27	0,40±0,03	3,84±1,03	11,61±3,52	0,45±0,04
147	8,40±2,25	11,16±2,55	0,94±0,06	2,10±2,62	6,51±2,45	0,14±0,06	1,99±3,64	7,45±2,78	0,15±0,10
149	3,81±1,13	8,97±3,44	0,34±0,04	3,28±3,17	8,34±1,34	0,27±0,04	2,65±2,52	8,70±2,14	0,23±0,05
129	5,56±2,74	8,80±2,04	0,49±0,06	3,36±1,98	6,73±1,88	0,23±0,04	2,84±2,47	10,5±3,33	0,30±0,08
15	8,41±2,56	14,69±1,31	1,24±0,03	3,41±1,67	15,15±3,14	0,52±0,05	2,43±1,98	10,32±1,56	0,25±0,03

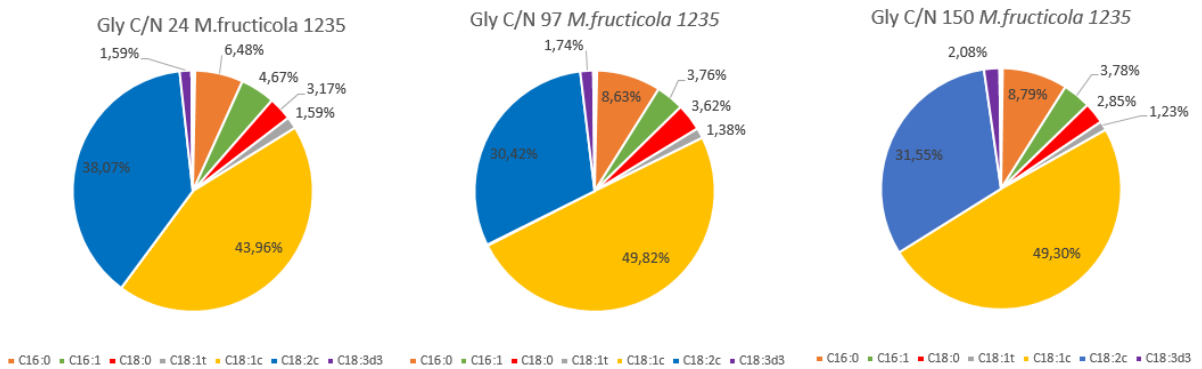
Príloha 9: *Produkcia biomasy a lipidov kvasinkami rodu Metschnikowia na kontrolných médiách (glukóza) a na médiách obsahujúcich srvátku*

Médiá									
Kontrola (25°C)			Kontrola (15°C)			Srvátka			
Kmeň	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	Lipidy (g/l)	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	Lipidy (g/l)	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	Lipidy (g/l)
1158	11,28±1,85	6,78±2,53	0,77±0,05	10,90±2,78	5,01±1,64	0,55±0,05	3,74±3,45	5,70±1,36	0,21±0,05
1232	11,07±1,23	6,33±1,79	0,70±0,02	7,72±2,54	4,84±2,09	0,37±0,05	3,32±1,26	4,87±2,58	0,16±0,03
1235	9,40±2,50	5,35±2,65	0,50±0,07	7,87±2,32	6,45±1,39	0,51±0,03	3,39±3,78	4,76±3,73	0,16±0,14
1241	13,36±3,14	7,08±3,16	0,95±0,10	12,06±2,94	6,98±3,56	0,84±0,10	5,03±2,65	4,91±1,24	0,25±0,03
1244	10,07±2,63	5,75±2,77	0,58±0,07	14,13±3,12	4,79±3,28	0,68±0,10	11,79±2,14	7,96±2,67	0,94±0,06
1247	10,89±1,58	5,12±2,53	0,56±0,04	10,49±1,09	5,97±2,89	0,63±0,03	4,75±1,95	5,89±3,41	0,28±0,07
1250	9,69±2,99	5,57±1,39	0,54±0,04	8,31±2,46	5,53±1,27	0,46±0,03	5,29±2,33	5,58±2,93	0,30±0,07
145	5,50±2,23	3,44±1,99	0,19±0,04	7,31±3,95	5,05±1,09	0,37±0,04	4,07±3,51	4,26±1,45	0,17±0,05
147	8,85±2,56	3,40±2,46	0,30±0,06	7,02±2,56	3,67±3,31	0,26±0,08	3,71±2,45	4,77±2,63	0,18±0,06
149	8,11±1,65	4,58±2,13	0,37±0,04	7,31±2,09	3,98±3,36	0,29±0,07	3,42±2,22	4,64±1,25	0,16±0,03
129	7,32±3,02	4,38±3,16	0,32±0,10	6,64±1,05	4,16±3,59	0,28±0,04	4,07±3,10	4,63±3,71	0,19±0,12
15	7,45±1,85	4,35±2,35	0,32±0,04	7,89±1,63	5,00±2,44	0,39±0,04	3,62±1,63	4,76±1,91	0,17±0,03

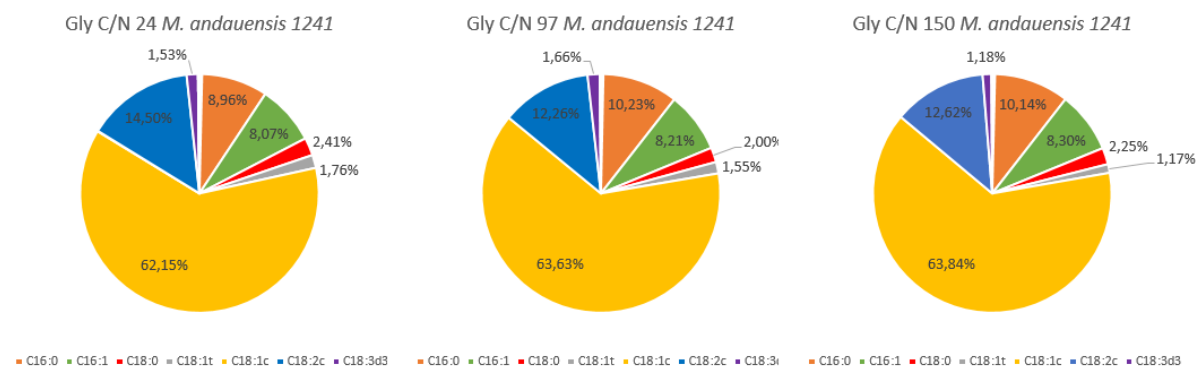
Príloha 10: Profil mastných kyselín kvasiniek kultivovaných na glycerole C/N 24, 97 a 150



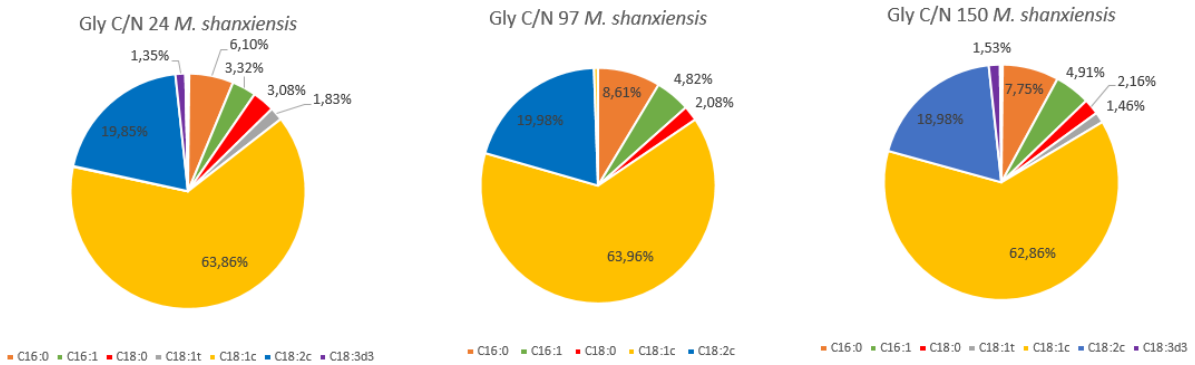
Obr. 72: Profil mastných kyselín kvasinky *M. chrysoperlae* na glycerolových médiách C/N 24, 97 a 150. C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitoolejová kyselina; C18:0 – stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina



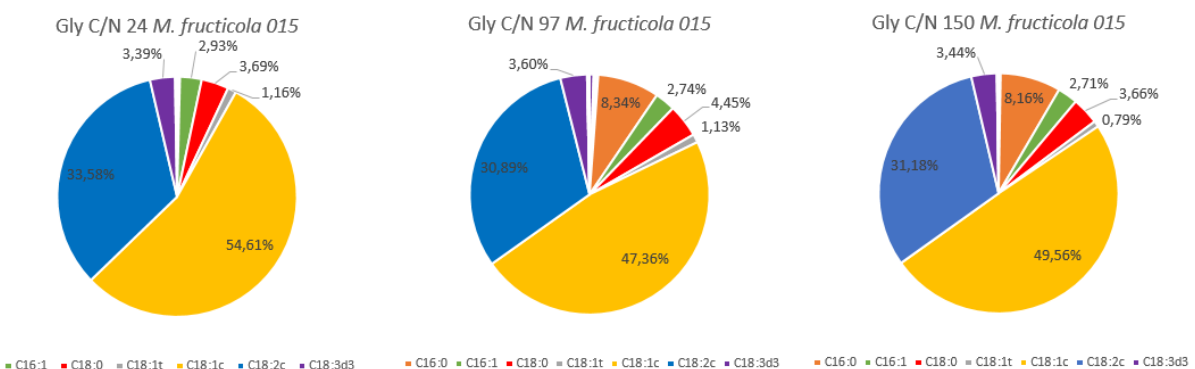
Obr. 73: Profil mastných kyselín kvasinky *M. fructicola* 1235 na glycerolových médiách C/N 24, 97 a 150. C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitoolejová kyselina; C18:0– stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina



Obr. 74: Profil mastných kyselín kvasinky *M. andauensis* 1241 na glycerolových médiách C/N 24, 97 a 150. C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitoolejová kyselina; C18:0 – stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina

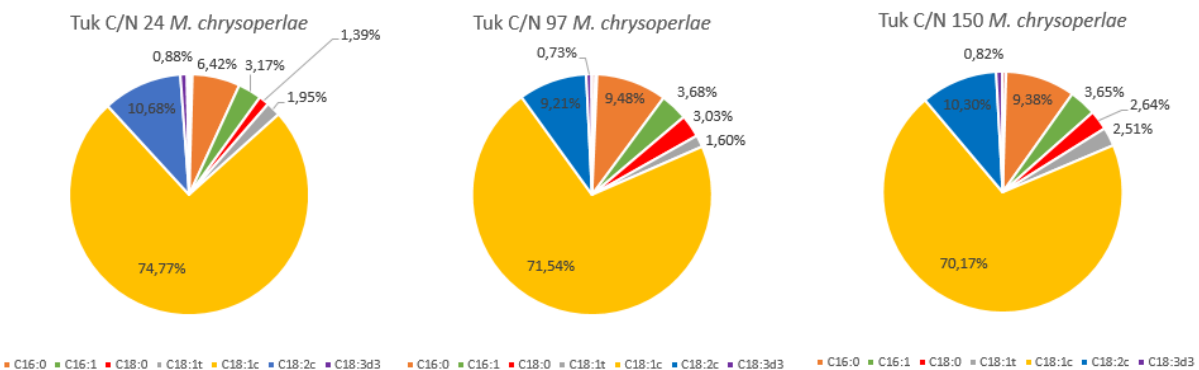


Obr. 75: Profil mastných kyselín kvasinky *M. shanxiensis* 1250 na glycerolových médiách C/N 24, 97 a 150. C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitoolejová kyselina; C18:0 – stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina



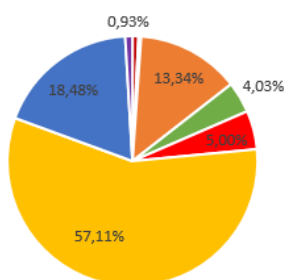
Obr. 76: Profil mastných kyselín kvasinky *M. fructicola* 15 na glycerolových médiách C/N 24, 97 a 150. C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitoolejová kyselina; C18:0 – stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina

Príloha 11: Profil mastných kyselín kvasiniek kultivovaných na odpadnom živočíšnom tuku C/N 24, 97 a 150

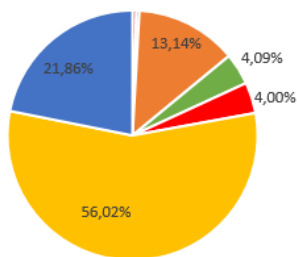


Obr. 77: Profil mastných kyselín kvasinky *M. chrysoperlae* 1158 na tukových médiách C/N 24, 97 a 150. C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitoolejová kyselina; C18:0 – stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina

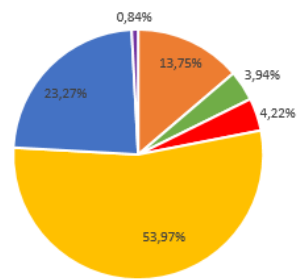
Tuk C/N 24 *M. pulcherrima* 1232



Tuk C/N 97 *M. pulcherrima* 1232



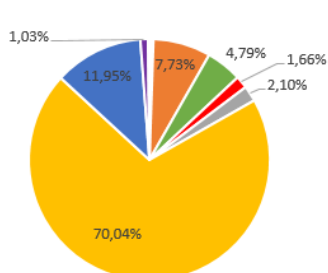
Tuk C/N 150 *M. pulcherrima* 1232



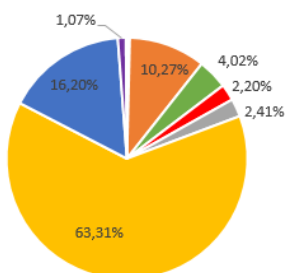
■ C16:0 ■ C16:1 ■ C18:0 ■ C18:1t ■ C18:1c ■ C18:2c ■ C18:3d3

Obr. 78: Profil mastných kyselin kvasinky *M. pulcherrima* 1232 na tukových médiích C/N 24, 97 a 150. C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitoolejová kyselina; C18:0 – stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina

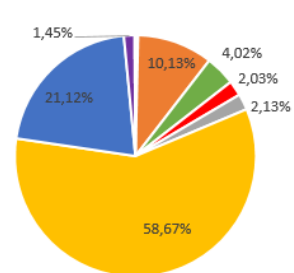
Tuk C/N 24 *M. fructicola* 1235



Tuk C/N 97 *M. fructicola* 1235



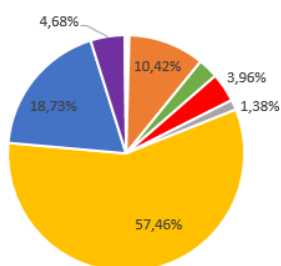
Tuk C/N 150 *M. fructicola* 1235



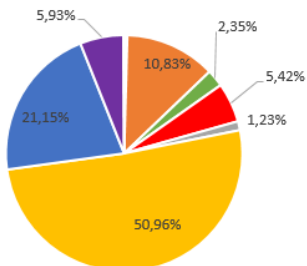
■ C16:0 ■ C16:1 ■ C18:0 ■ C18:1t ■ C18:1c ■ C18:2c ■ C18:3d3

Obr. 79: Profil mastných kyselin kvasinky *M. fructicola* 1235 na tukových médiích C/N 24, 97 a 150. C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitoolejová kyselina; C18:0 – stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina

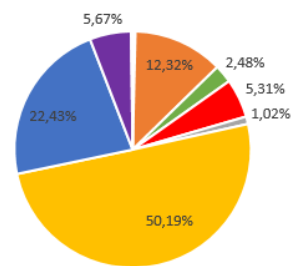
Tuk C/N 24 *M. sinensis*



Tuk C/N 97 *M. sinensis*

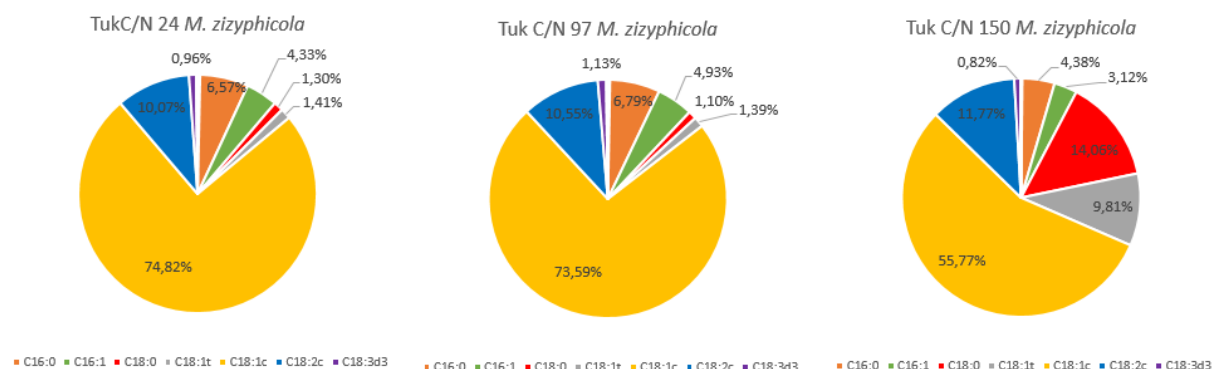


Tuk C/N 150 *M. sinensis*

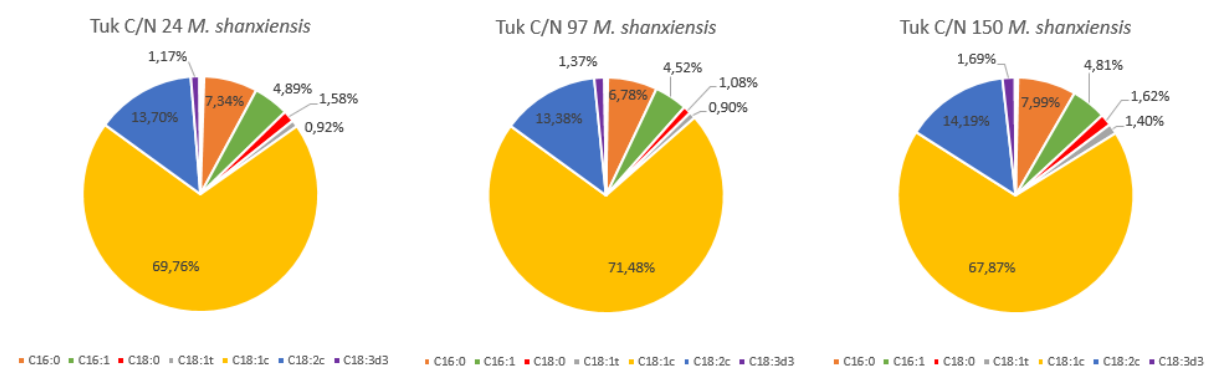


■ C16:0 ■ C16:1 ■ C18:0 ■ C18:1t ■ C18:1c ■ C18:2c ■ C18:3d3

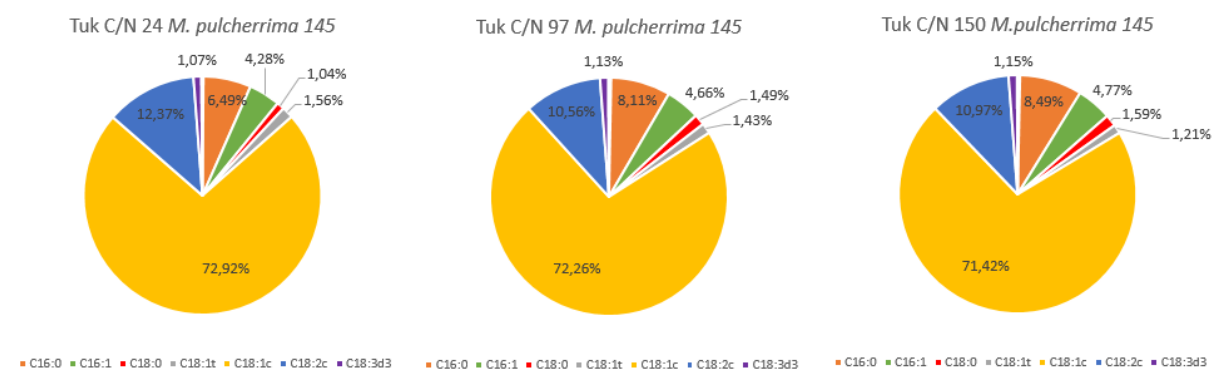
Obr. 80: Profil mastných kyselin kvasinky *M. sinensis* 1244 na tukových médiích C/N 24, 97 a 150. C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitoolejová kyselina; C18:0 – stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina



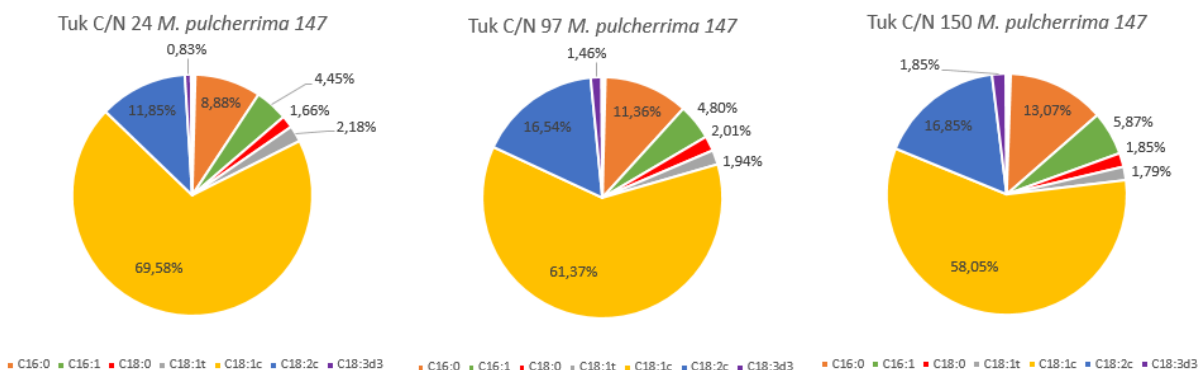
Obr. 81: Profil mastných kyselín kvasinky *M. zizyphicola* na tukových médiách C/N 24, 97 a 150. C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitolejová kyselina; C18:0 – stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina



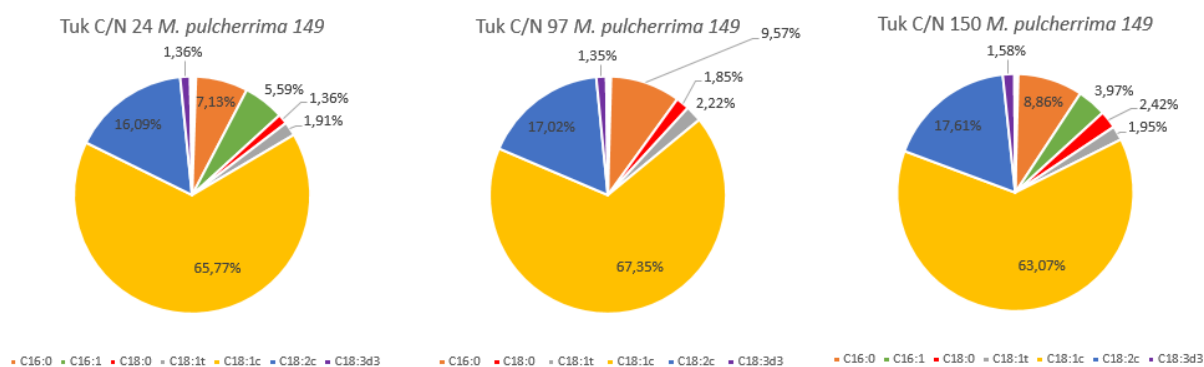
Obr. 82: Profil mastných kyselín kvasinky *M. shanxiensis* na tukových médiách C/N 24, 97 a 150. C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitolejová kyselina; C18:0 – stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina



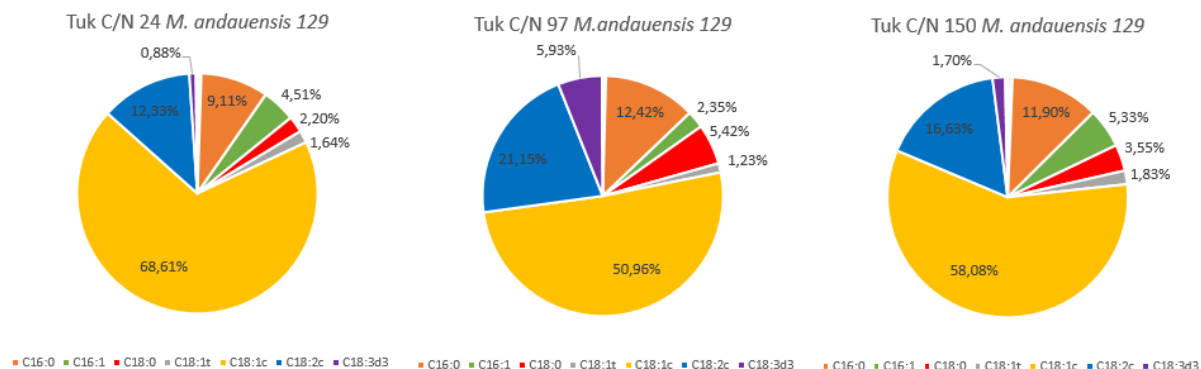
Obr. 83: Profil mastných kyselín kvasinky *M. pulcherrima 145* na tukových médiách C/N 24, 97 a 150. C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitolejová kyselina; C18:0 – stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina



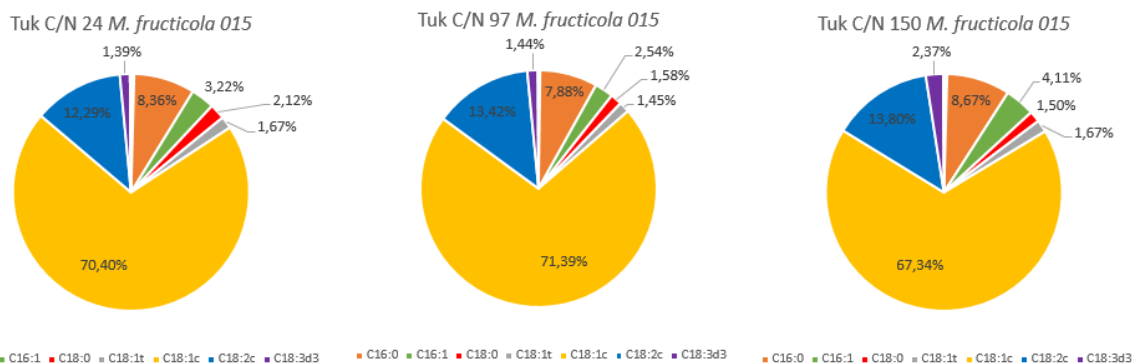
Obr. 84: Profil mastných kyselín kvasinky *M. pulcherrima* 147 na tukových médiách C/N 24, 97 a 150. C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitoolejová kyselina; C18:0 – stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina



Obr. 85: Profil mastných kyselín kvasinky *M. pulcherrima* 149 na tukových médiách C/N 24, 97 a 150. C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitoolejová kyselina; C18:0 – stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina



Obr. 86: Profil mastných kyselín kvasinky *M. pulcherrima* 149 na tukových médiách C/N 24, 97 a 150. C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitoolejová kyselina; C18:0 – stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina



Obr. 87: Profil mastných kyselin kvasinky *M. fructicola* 15 na tukových médiách C/N 24, 97 a 150.
 C16:0- palmitová kyselina; C16:1- palmitoolejová kyselina; C18:0 – stearová kyselina; C18:1t- elaidová kyselina; C18:1c- olejová kyselina; C18:2c- linolová kyselina; C18:3d3- α -linolenová kyselina