



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

TRANSFORMACE ODPADŮ PIVOVARSKÉHO PRŮMYSLU KAROTENOGENNÍMI KVASINKAMI

TRANSFORMATION OF BREWERY INDUSTRY WASTE BY CAROTENOGENIC YEASTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kateřina Šnejdrlová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Holub

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1989/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Kateřina Šnejdrová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Chemie a analýza přírodních látek
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Holub**

Název bakalářské práce:

Transformace odpadů pivovarského průmyslu karotenogenními kvasinkami

Zadání bakalářské práce:

Přehledná literární rešerše zaměřená na využití odpadů produkovaných pivovarským průmyslem, popis karotenogenních kvasinek a jejich biotechnologické využití.

Optimalizace metod předúpravy pivovarských odpadů.

Produkce biomasy karotenogenních kvasinek na odpadech z pivovarského průmyslu.

Analýza produkované biomasy.

Vyhodnocení výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

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

Kateřina Šnejdrová
studentka

Ing. Jiří Holub
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Karotenoidy jsou jedny z metabolitů, které produkují karotenogenní kvasinky. Jedná se o hodnotné látky, které se využívají v potravinářském i farmaceutickém průmyslu. Využití odpadů a vedlejších produktu jako substrátu pro kultivaci karotenogenních kvasinek může snížit celkové náklady na produkci karotenoidů. Vedlejší produkty pivovarského průmyslu se díky svému nutričnímu složení jeví jako materiály vhodné pro použití při kultivaci mikroorganismů. Práce je rozdělena na část teoretickou a praktickou. Teoretická část se zaměřuje na popis kvasinek, jejich metabolitů a jednotlivých substrátů. Praktická část je pak zaměřena na kultivaci karotenogenních kvasinek na hydrolyzátu pivovarského mláta a na kvasničných extraktech připravených ze sedimentovaných pivovarských kvasnic. V experimentální části byly použity tyto kmeny: *Cystofilobasidium infirmominiatum* CCY 17-18-4, *Sporidiobolus salmonicolor* CCY 19-4-25, *Sporobolomyces shibatanus* CCY 19-9-6, *Rhodotorula kratochvilovae* CCY 20-2-26, *Rhodotorula mucilaginoso* CCY 20-7-31, *Rhodotorula toruloides* CCY 62-2-4. Výsledky získané v rámci této práce pomocí pokročilých chromatografických metod naznačují, že upravené pivovarské mláto a kvasničný extrakt připravený z pivovarských kvasnic jsou vhodné substráty pro kultivaci karotenogenních kvasinek. Připravený kvasničný extrakt může také sloužit jako zdroj veškerého dusíku při kultivaci, bez negativního vlivu na sledované parametry.

Klíčová slova: karotenogenní kvasinky, karotenoidy, pivovarnictví, pivovarské mláto, pivovarské kvasnice

ABSTRACT

Carotenoids are one of the metabolites produced by carotenogenic yeasts. These are valuable substances that are used in the food and pharmaceutical industries. The use of waste and by-product as substrate for cultivation of carotenogenic yeasts can reduce the overall cost of carotenoid production. The by-products of the brewing industry, due to their nutritional composition, appear to be suitable materials for use in the cultivation of microorganisms. The work is divided into theoretical and practical parts. The theoretical part focuses on the description of yeasts, their metabolites and individual substrates. The practical part focuses on the cultivation of carotenogenic yeasts on brewer's spent grain hydrolysate and on yeast extracts prepared from brewer's spent yeast. Following yeasts were used in the practical part: *Cystofilobasidium infirmominatum* CCY 17-18-4, *Sporidiobolus salmonicolor* CCY 19-4-25, *Sporobolomyces shibatanus* CCY 19-9-6, *Rhodotorula kratochvilovae* CCY 20-2-26, *Rhodotorula mucilaginosa* CCY 20-7-31, *Rhodotorula toruloides* CCY 62-2-4. The results obtained in this work using advanced chromatographic methods suggest that treated brewer's spent grain and yeast extract prepared from brewer's spent yeast are suitable substrates for the cultivation of carotenogenic yeasts. The prepared yeast extract can also serve as a source of total nitrogen during cultivation, without negatively affecting the monitored parameters.

Key words: red yeast, carotenoids, brewing, brewers' spent grain, brewers' spent yeasts

ŠNEJDRLOVÁ, Kateřina. *Transformace odpadů pivovarského průmyslu karotenogenními kvasinkami*. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156705>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Jiří Holub.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu Ing. Jiřímu Holubovi za odborné vedení a rady, dále svému konzultantovi Ing. Janu Obračajovi a všem členům týmu za ochotu a trpělivost. Velké díky patří mému partnerovi, který byl po čas celého studia mou oporou společně s mými rodiči, kterým patří vzdát holt také za podporu při studiu. V neposlední řadě děkuji kamarádům, díky kterým bylo bakalářské studium nezapomenutelným zážitkem.

OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Kvasinky	9
2.1.1	Cytologie kvasinek	9
2.1.2	Rozmnožování kvasinek.....	10
2.1.3	Karotenogenní kvasinky	10
2.1.4	Kultivace kvasinek	12
2.2	Metabolity produkované kvasinkami.....	12
2.2.1	Karotenoidy	12
2.2.2	Lipidy.....	13
2.2.3	β -glukany.....	14
2.2.4	Ergosterol.....	14
2.2.5	Ubichinon	14
2.2.6	Skvalen	14
2.3	Pivovarnictví.....	14
2.3.1	Výroba piva	14
2.4	Vedlejší produkty v pivovarském průmyslu	15
2.4.1	Mláto.....	15
2.4.2	Chmelové mláto.....	16
2.4.3	Hrubé a jemné kaly vylučované z mladiny.....	16
2.4.4	Sedimentované kvasnice.....	16
2.4.5	Křemelinové kaly	17
2.4.6	Odpadní voda.....	17
2.5	Metody analýzy.....	17
2.5.1	Extrakce.....	17
2.5.2	Transesterifikace.....	17
2.5.3	HPLC/DAD	17
2.5.4	GC/FID	18
2.5.5	Mikroskopické metody	18
3	Cíl práce	19
4	Experimentální část.....	20
4.1	Použité chemikálie	20
4.1.1	Chemikálie použité pro kultivaci kvasinek.....	20
4.1.2	Chemikálie použití pro extrakce a analýzu pomocí HPLC a gC	20
4.2	Použité přístroje a pomůcky.....	20
4.2.1	Přístroje použité pro kultivaci.....	20

4.2.2	Přístroje a pomůcky použité pro izolaci a analýzu metabolitů a analýzu předupravených odpadů	21
4.3	Použité kmeny kvasinek.....	21
4.4	Zpracování odpadních substrátů	21
4.4.1	Předúprava mláta	21
4.4.2	Předúprava pivovarských kvasnic	21
4.5	Kultivace vybraných druhů karotenogenních kvasinek	22
4.5.1	Inokulum I a inokulum II.....	22
4.5.2	Produkční média	23
4.6	Kultivace za použití připraveného kvasničného extraktu	23
4.7	Zpracování biomasy.....	24
4.7.1	Gravimetrické stanovení biomasy	24
4.7.2	Extrakce pro stanovení lipidů pomocí GC.....	24
4.7.3	Stanovení karotenoidů, sterolů a ubichinonu pomocí HPLC	25
5	Výsledky a diskuze.....	27
5.1	Analýza hydrolyzátu mláta	27
5.2	Kultivace karotenogenních kvasinek na produkčních médiích s přidavkem hydrolyzátu mláta	27
5.2.1	Kmen <i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	27
5.2.2	Kmen <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	28
5.2.3	Kmen <i>Rhodotorula toruloides</i>	30
5.2.4	Kmen <i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	32
5.2.5	Kmen <i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	33
5.2.6	Kmen <i>Sporobolomyces shibatanus</i>	35
5.3	Příprava kvasničného extraktu	37
5.4	Kultivace kmene <i>Rhodotorula toruloides</i> na produkčních médiích s přidavkem připraveného kvasničného extraktu	39
6	Závěr.....	48
7	Použité zdroje a literatura.....	50
8	Seznam použitých zkratk.....	55

1 ÚVOD

Pivo je alkoholický nápoj, jedná se o celosvětově nejoblíbenější alkoholický nápoj a je také jedním z pěti nejčastěji konzumujících nápojů na světě. Odhadovaná celková světová produkce piva je více než 2 miliardy hektolitrů. S rostoucí produkcí piva roste také množství vznikajících vedlejších produktů a odpadů. Valorizace odpadů je jedním z principů cirkulární ekonomiky a je i předmětem této bakalářské práce chápat odpady a vedlejší produkty jako možné výchozí látky a nacházet tak pro tyto materiály nové využití.

Jednou z možností, jak transformovat odpady potravinářského průmyslu, je využití těchto materiálů jako substráty pro kultivace karotenogenních kvasinek a tím získání cenných metabolitů. Karotenogenní kvasinky jsou kromě produkce karotenoidů, jako je například torulen, torularhodin či β -karoten, schopny produkovat také značné množství lipidů, ubichinon a steroly. Odpady potravinářského průmyslu často obsahují příznivé nutriční složení, mohou tedy nahradit část komerčního kultivačního média. Vedlejší produkty pivovarského průmyslu, které z největší části představuje pivovarské mláto a dále pivovarské kvasnice, mohou sloužit jako zdroj uhlíku a dusíku.

Karotenoidy jsou hodnotné látky, které nachází své v potravinářském i farmaceutickém průmyslu, kosmetice a také v potravinových doplňcích, díky jejich pozitivnímu vlivu na lidské zdraví a krásu. Karotenoidy jsou přírodní barviva, známé pro své antioxidační účinky, mnohé karotenoidy jsou také prekurzorem vitamínu A.

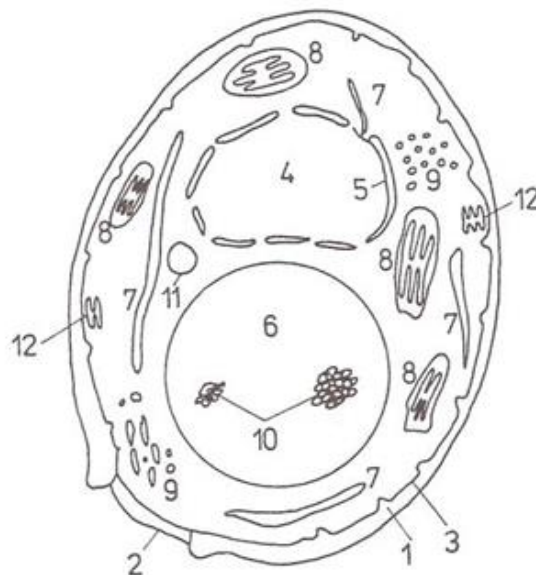
Tato práce se zabývá optimalizací předúpravy pivovarského mláta a pivovarských kvasnic tak, aby byly vhodně upravené pro použití při kultivaci karotenogenních kvasinek. Pivovarské mláto obsahuje především polysacharidy, které se při hydrolýze štěpí na monosacharidy. Upravené pivovarské mláto tak může sloužit jako náhrada klasického uhlíkatého zdroje v kultivačních médiích. Pivovarské kvasnice jsou bohaté na bílkoviny, vhodnou úpravou se tak dá připravit kvasničný extrakt, který se používá při kultivacích mikroorganismů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní organismy, které řadíme do říše *Fungi*. Český název byl odvozen od schopnosti kvašení cukrů, kterou disponuje většina rodů kvasinek [1]. Obecně se jedná o jednobuněčné organismy, které na rozdíl od některých plísní nebo hub neprodukují sekundární toxické metabolity [1]. Tvar buněk závisí na způsobu vegetativního rozmnožování, může být ovlivněn stářím buňky a způsobem kultivace. Přesto však i v kultuře jednoho kmene kvasinek dochází k variabilitě. U některých druhů nebo rodů se vyskytuje tzv. pravé mycelium, které vzniká příčným dělením protáhlých buněk. Jiné rody a kmeny vytvářejí pseudomycelium, což jsou dlouhá zaškrcovaná vlákna vzniklá pučením protáhlých buněk na pólech [1]. Od pravého mycelia se pseudomycelium liší řadou morfologických znaků jako například průřezem hyfy. Tvorba pseudomycelia je obvykle důsledkem nedostatku živin. Historie kvasinek, a především jejich použití k výrobě nápojů sahá několik tisíc let nazpět. Dnes se kvasinky používají k výrobě nápojů, tedy piva, vína, lihu, ale také k výrobě pekařského droždí či krmné biomasy. Podle typu rozmnožování dělíme kvasinky na askomycety, basidiomycety a deuteromycety neboli anamorfní kvasinky [3].

2.1.1 Cytologie kvasinek



Obrázek 1: schéma kvasinkové buňky, 1 – buněčná stěna, 2 – jizva zrodu, 3 – cytoplazmatická membrána, 4 – jádro, 5 – jaderná membrána, 6 – vakuola, 7 – endoplazmatické retikulum, 8 – mitochondrie, 9 – glykogen, 10 – volutin, 11 – lipidy, 12 – golgiho aparát [1]

Kvasinkové buňky se od bakteriálních buněk liší svou velikostí, obvykle dosahují 3 až 15 μm . Některé rody kvasinek, jako jsou například *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, tvoří pouzdra složená z polysacharidů, nejedná se však o součást buněčné stěny. Buňka kvasinky se skládá z pevné buněčné stěny sloužící především jako ochrana proti mechanickému poškození. Struktura buněčné stěny je tvořena vlákny polysacharidů spletenými do husté a pevné sítě, která je vyplněna bílkoviny. Kromě zmiňovaných polysacharidů, což jsou nejčastěji glukany, a bílkovin, obsahuje buněčná stěna v menší míře také lipidy, fosfolipidy a fosforečnany. Cytoplazmatická membrána je tenká, složená z lipidů a bílkovin. Díky své selektivní propustnosti vytváří osmotické rozhraní mezi vnějším prostředím a buňkou. Cytoplazmatická membrána je místem, kde probíhají transportní mechanismy. Cytoplazma obsahuje membránové struktury, mezi které řadíme například endoplazmatické retikulum. Jedná se

o systém dvojité membrány, na jejich vnějším povrchu najdeme agregáty ribozomů tzv. polyzomy. Dále se v cytoplazmě nachází mitochondrie, což jsou strukturální útvary obklopené dvěma membránami. V mitochondriích probíhá oxidační fosforylace a jsou sídlem dýchacích enzymů. Vakuoly jsou jedny z nejnápadnějších složek cytoplazmy kvasinek. U starších buněk mohou zaujímat většinu prostoru buňky. Jejich počet a velikost se stárnutím buňky mění. Zatímco mladé buňky obsahují několik malých vakuol, starší buňky se vyznačují jednou velkou vakuolou. V neposlední řadě se v cytoplazmě nachází také golgiho aparát, jehož význam spočívá v transportu prekurzorů buněčné stěny z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu. Jádro buňky odděluje od cytoplazmy dvojitá jaderná membrána [1].

2.1.2 Rozmnožování kvasinek

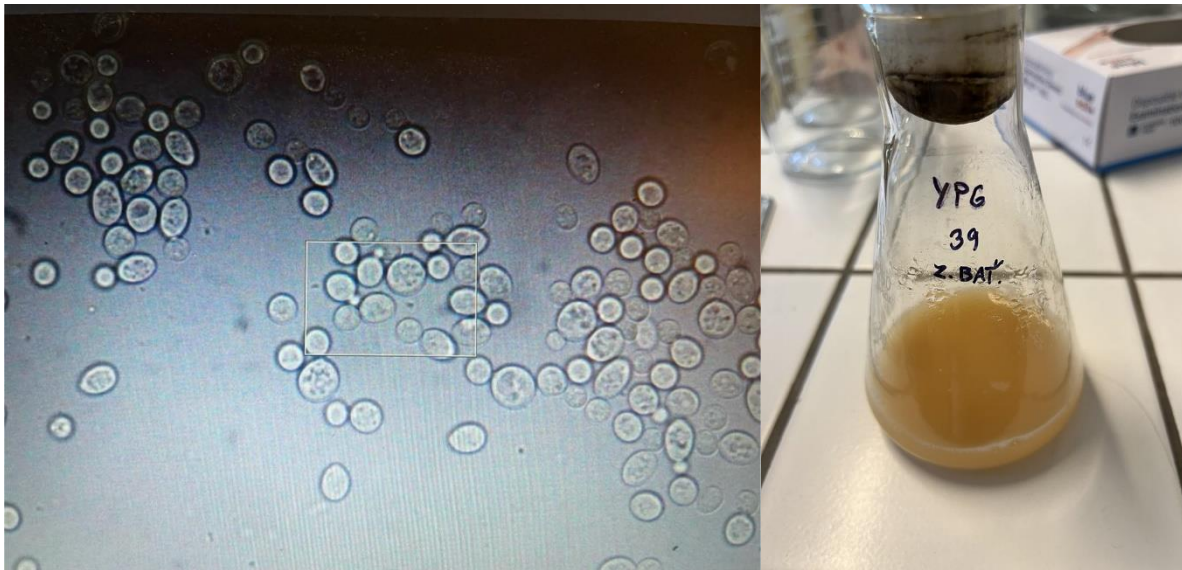
Existují dva základní typy rozmnožování. Jedná se o vegetativní rozmnožování pučením či dělením a sexuální fruktifikace s vytvářením asků nebo bazidií. Sexuální reprodukce se objevuje u teleomorfních forem, které řadí mezi Ascomycetes a Basidiomycetes. Při sexuální reprodukci dojde k párové reakci za vzniku zygoty, z něj se pak vytváří askus nebo bazidium. V asku dochází k tvorbě askospór, označované také jako endospory, naopak na bazidiu se vytváří exospory neboli bazidiospory [4].

2.1.3 Karotenogenní kvasinky

Karotenogenní kvasinky jsou rozsáhlá heterogenní skupina kvasinek, většinou z kmene *Basidiomycota* [5]. Mají schopnost akumulovat karotenoidní barviva, díky kterým získávají typické žluté, oranžové nebo červené zbarvení [6]. Z toho důvodu se jim často přezdívá červené kvasinky. Obecně se červené kvasinky dají izolovat ze vzduchu, fytoplánu nebo rozkládajících se rostlinných zbytků [7]. Červené kvasinky vykazují řadu biotechnologicky významných vlastností. Kromě produkce karotenoidů představují významné producenty biomasy, enzymů, lipidů, bionaft a vonných látek. Mají také vysokou toleranci k oxidativnímu stresu a schopnost rozkládat mykotoxiny [8].

2.1.3.1 Rod *Rhodotorula*

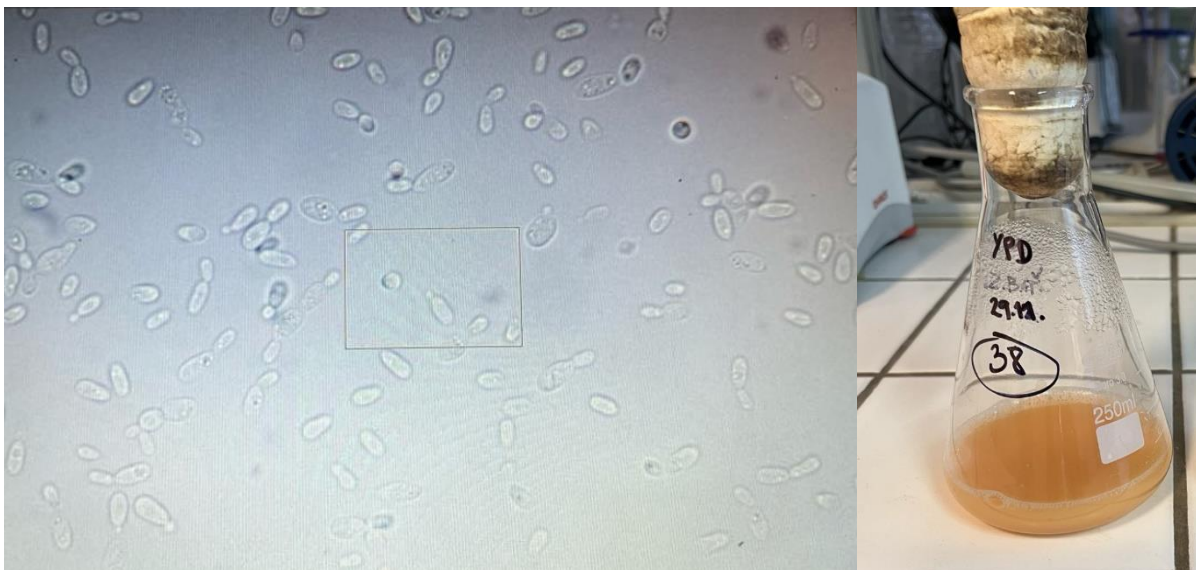
Rod *Rhodotorula* se řadí do oddělení *Basidiomycota* [9]. V přírodě jsou tyto kvasinky velmi rozšířeny, izolovány byly z řady zdrojů, jako je například půda, vzduch, dále z rostlin a ovoce, ale také z kůže, plic, moči či nehtů lidí. Kvasinky rodu *Rhodotorula* byly donedávna považovány za avirulentní saprofyty, dnes je řadíme mezi oportunní patogeny [10][11]. Za nově vznikající patogeny považujeme například *Rhodotorula mucilaginosa*, většina druhů tohoto rodu jsou však nepatogenní [12]. Rod *Rhodotorula* je v poslední době hojně studován, jelikož kvasinky tohoto rodu mají schopnost využít řadu substrátů včetně odpadních a produkovat cenné metabolity. Zástupci rodu *Rhodotorula* jsou například *Rhodotorula kratochvilovae* a *Rhodotorula toruloides* [13].



Obrázek 2: *Rhodotorula kratochvilovae* pod mikroskopem a v kultivačním médiu

2.1.3.2 Rod *Sporobolomyces*

Kvasinky patřící do rodu *Sporobolomyces* a *Sporidiobolus* jsou mikroorganismy, které mají nízké nutriční nároky a jsou obecně klasifikovány jako prototrofy. Kolonie rodu *Sporobolomyces* mají krémovou, žlutohnědou, lososovou, oranžovou, růžovou nebo červenou barvu. Tvar buněk je kulovitý, elipsoidní nebo válcovitý. Rozmnožují se nejčastěji nepohlavním pučením, pohlavní rozmnožování rodu *Sporobolomyces* neprobíhá. Všechny druhy rodu *Sporobolomyces* vytvářejí symetricky bilaterální balistokonidie [14].



Obrázek 3: *Sporobolomyces shibatanus* pod mikroskopem a v kultivačním médiu

2.1.3.3 Rod *Sporidiobolus*

Kvasinky rodu *Sporidiobolus* mají vejčitý, podlouhlý nebo elipsoidní tvar. Kolonie mají oranžovou, růžovou nebo červenou barvu. Rozmnožují se nepohlavním pučením či tvorbou balistokonidií nebo pohlavním rozmnožováním, kdy tvoří kulovité teliospory. Mezi zástupce řadíme například *Sporidiobolus salmonicolor* [14].



Obrázek 4: *Sporidiobolus salmonicolor* pod mikroskopem a v kultivačním médiu

2.1.3.4 Rod *Cystofilobasidium*

Rod *Cystofilobasidium* byl vytvořen k začlenění dvou kvasinek dříve řazených k rodu *Rhodospiridium*. Jedná se konkrétně o *Cystofilobasidium bisporidii* and *Cystofilobasidium capitatum*, které se vyznačují tvorbou teliospor. Zástupci tohoto rodu produkují bazidie podobné filobazidiím. V současné době se do rodu *Cystofilobasidium* řadí také *Cystofilobasidium infirmominiatum*, které bylo taktéž přesunuté z rodu *Rhodospiridium* [15].

2.1.4 Kultivace kvasinek

Kvasinky jsou nejčastěji spojeny s fermentací cukrů, především glukózy a sacharózy, jsou však schopny využít jako nutriční zdroj i další látky, mezi které patří některé alkoholy, organické kyseliny, uhlovodíky nebo aromatické sloučeniny. Většina druhu kvasinek není schopná zpracovávat komplexní sacharidy jako je škrob, existují však druhy, které ke svému růstu využívají tuky [2]. Biosyntéza karotenoidů je ovlivněna mnoha faktory kromě zdroje uhlíku a dusíku je potřeba zajistit dostatečnou aeraci, jelikož produkce karotenoidů je aerobní proces. Také teplota ovlivňuje růst buněk a tvorbu metabolitů. Produkce karotenoidů je pozitivně ovlivněna také světlem, především bílé světlo vyvolá u organismů produkci karotenoidů, jelikož mají fotoprotektivní funkci [16].

2.2 Metabolity produkované kvasinkami

2.2.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou přírodní barviva syntetizovaná rostlinami a mnohými mikroorganismy. Dělíme je na karoteny, které ve své struktuře mají přítomny pouze atomy uhlíku a vodíku, a dále xantofyly, které jsou jejich kyslíkatými deriváty tedy například alkoholy, aldehydy, ketony epoxidy nebo jiné sloučeniny [6]. Většina karotenoidů jsou lipofilní C40 tetraterpeny. Některé karotenoidy jsou prekurzory vitamínu A. Karotenoidy řadíme mezi bioaktivní fotochemikálie, které snižují riziko degenerativních onemocnění, kam patří například rakovina nebo kardiovaskulární onemocnění [16]. Karotenoidy jsou lokalizované v intracelulárních kapénkách lipidů. Díky své barvě a řadě vlastností představují karotenoidy cennou skupinu molekul pro průmyslové využití. V průmyslovém měřítku jsou využívány jako aditiva do farmaceutických, potravinářských, chemických výrobků a krmiv [7]. Obecně se karotenoidní pigmenty nacházejí ve fotosyntetických systémech vyšších rostlin, řas a fototrofních bakterií, nefotosyntetické organismy využívají karotenoidy pro jejich ochranné funkci. Poskytují ochranu před fotooxidačním poškozením při růstu na světle a vzduchu [17]. Karotenoidy se získávají extrakcí ze zeleniny nebo chemickou syntézou, avšak mikrobiální produkce není na rozdíl od prvních dvou zmíněných vázaná na geografické podmínky a zároveň nepředstavuje takové riziko bezpečnosti

jako chemická syntéza. Komerční produkce mikrobiálních karotenoidů je vysoce efektivní, jelikož celý proces lze snadno regulovat [16].

2.2.1.1 Karoteny

Nejjednodušším zástupcem karotenů je polynenasycený acyklický uhlíkatý řetězec známý jako fytoen, který vzniká syntézou dvou molekul geranylgeranyldifosfátu. Trans-izomerací a následnou oxidací získáme lykopen, který je finálním produktem biosyntézy. Acyklické karoteny kromě lykopenu, který najdeme například v rajčatech nebo vodním melounu, jsou v potravinách přítomny pouze v malém množství. Protože jsou α -karoten, β -karoten a γ -karoten prekursorů retinolu, plní také funkci jako provitamin a [18].

2.2.1.2 Xantofyly

Xantofyly vznikají biochemickou oxidací karotenů. Xantofyly vzniklé jako deriváty acyklických karotenů se v potravinách taktéž objevují pouze v malém množství. Například v již dříve zmiňovaných rajčatech najdeme xantofyly jako jsou 1,2-epoxylycopen nebo 1,2-epoxyfytoen [18].

2.2.2 Lipidy

Lipidy jsou molekuly rozpustné v organických rozpouštědlech, jedná se o skupinu látek, které mají širokou škálu použití a jsou rozmanité strukturou. V buňkách lipidy ovlivňují strukturu a funkci proteinů na základě specifické interakce mezi proteiny a lipidy. Primární role lipidů je tvorba semipermeabilní membrány, která je tvořena především fosfolipidy. Mezi lipidy řadíme kromě fosfolipidů také triacylglyceroly, vosky, sfingolipidy a steroly. Triacylglyceroly jsou složeny ze tří molekul mastných kyselin vázaných esterovou vazbou na molekulu glycerolu [19][20]. Lipidy, především triacylglyceroly a deriváty mastných kyselin, se dříve získávaly z rostlin a živočišných tuků. Mikrobiální produkce tuků má proti extrakci z olejnin a rostlin mnoho výhod, jako je například kratší výrobní cyklus a větší strukturální rozmanitost [21]. Některé druhy kvasinek, takzvané oleogenní kvasinky, mají schopnost akumulovat až 70 % lipidů v suché biomase, přičemž jejich složení se podobá rostlinným olejům. Obecně lze říct, že olej produkovaný mikroorganismy by se mohl stát jednou z potenciálních surovin pro výrobu bionafty [22].

2.2.2.1 Mastné kyseliny a jejich syntéza

Mastné kyseliny dělíme podle nasycenosti na nasycené (SFA, z anglického *saturated fatty acids*), mononenasycené (MUFA z anglického *monounsaturated fatty acids*) a polynenasycené mastné kyseliny (PUFA, z anglického *polyunsaturated fatty acids*). Ačkoliv je známo přes 1000 mastných kyselin, běžně se jich vyskytuje 20 až 50. Přirozeně se vyskytující mastné kyseliny mají většinou nerozvětvené uhlíkaté řetězce se sudým počtem uhlíků, který se nejčastěji pohybuje v rozmezí od 12 do 22 uhlíků, najdou se však i mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků nebo s rozvětveným řetězcem. U nenasyčených mastných kyselin se dvojná vazba většinou vyskytuje v konfiguraci *cis*. Mezi nasycené mastné kyseliny řadíme například kyselinu máselnou, kyselinu palmitovou nebo kyselinu stearovou. Zástupce skupiny mononenasycených mastných kyselin je například kyselina olejová, mezi polynenasycené mastné kyseliny patří kyselina linolová, kyselina α -linolenová nebo kyselina arachidonová [23]. Syntéza mastných kyselin *de novo* probíhá v cytosolu pomocí enzymového komplexu syntáza mastných kyselin (FAS, z anglického *fatty acid synthase*). Původ acetyl-CoA může u oleogenních a neoleogenních kvasinek rozdílný, neboť oleogenní kvasinky zpravidla vykazují extracelulární lipázovou aktivitu, jsou tedy schopné štěpit lipidické substráty a využívat je jako zdroje uhlíku. Zatímco neoleogenní kvasinky získávají acetyl-CoA především z glykolýzy zkvasitelných cukrů anebo produkují acetyl-CoA cytosolickou pyruvát-acetaldehyd-acetátovou cestou, u oleogenních kvasinek existuje ještě doplňkový zdroj acetyl-CoA, jehož prekursorem je přebytečný citrát exportovaný z Krebsova cyklu ven z mitochondrie. Citrát je v cytosolu štěpen ATP citrát lyázou, enzymem, který je přítomný ve všech dosud studovaných oleogenních mikroorganismech. Syntéza *de novo* zajišťuje syntézu prekursorů mastných kyselin, jako je acetyl-CoA a malonyl-CoA a prodloužení jejich uhlíkatého řetězce. Tyto prekursorů

jsou shromažďovány za vzniku triacylglycerolů a systerolesterů. Neutrální lipidy jsou ukládány ve specializovaném kompartmentu a slouží jako zásoba energie. V přítomnosti vnějších zdrojů mastných kyselin či olejů přistupují k takzvané ex novo dráze, kdy tyto substráty inkorporují a modifikují za účelem skladování a akumulace [24].

2.2.3 β -glukany

β -glukany jsou neškrobové polysacharidy složené z monomerů β -D-glukózy spojených glykosidickými vazbami β (1 \rightarrow 3), případně (1 \rightarrow 6) do řetězců, které mohou být rozvětvené i nerozvětvené. Nejznámějším zdrojem β -glukanů jsou cereálie, nachází se také v buněčné stěně mikroorganismů. β -glukany se liší rozpustností, molekulovou hmotností a větvením podle toho, z jakého zdroje byly izolovány. β -glukany slouží ve stravě jako zdroj rozpustné vlákniny, jsou jim však přisuzovány i některé příznivé účinky na zdraví [25].

2.2.4 Ergosterol

Ergosterol je nejrozšířenější sterol v buněčných membránách hub, tj. mykosterolem. Steroly neboli steroidní alkoholy, kam se ergosterol spolu s fytosterolem či cholesterolem řadí, jsou podskupinou steroidů, nejrozšířenější a nejdůležitější skupinou isoprenoidů. Ergosterol reguluje propustnost a fluiditu a stabilizuje strukturu buněčné membrány [26]. Ergosterol je důležitý pro růst a adaptaci proti stresu. Jedná se o důležitý metabolit s vysokou tržní hodnotou, jelikož své uplatnění nachází například ve farmacii, jako prekurzor vitamínu D2 a steroidních hormonů. Ergosterol taktéž ovlivňuje absorpci a utilizaci nutrientů. Ergosterol bývá uložen v kapkách v cytoplazmě, kde slouží jako sterolový rezervoár, který udržuje balance mezi intracelulárními steroly [27].

2.2.5 Ubichinon

Ubichinon, taktéž známý jako koenzym Q, je součástí elektronového transportního řetězce v mitochondriích a hraje klíčovou roli v generování energie [28]. Z chemického hlediska se jedná o lipid. Skládá se z kondenzovaného aromatického jádra a hydrofobního řetězce tvořeného izoprenovými jednotkami. Koenzym Q může být syntetizován chemickou, semi-chemickou nebo mikrobiální cestou [29].

2.2.6 Skvalen

Skvalen je triterpen, jedná se o polynenasycený uhlovodík složený ze šesti izoprenových jednotek. Nachází se v rybím oleji, a především ve žraločích játrech. Skvalen je prekurzorem syntézy sterolů, steroidů a ubichinonu [30]. V buňkách plní funkci antioxidantu, slouží jako ochrana proti volným radikálům a reaktivním formám kyslíku. Využití nachází skvalen v potravinářství, kosmetice i medicíně [31].

2.3 Pivovarnictví

Pivo je jedním z pěti nejvíce konzumovaných nápojů na celém světě. Údaje z roku 2018 ukazují, že roční celosvětová produkce piva přesahuje 1,94 miliard hl. Taková velká produkce dělá pivovarnictví jeden z nejvýznamnějších průmyslů s velkým vlivem na ekonomiku [32].

2.3.1 Výroba piva

Hlavním cílem při výrobě piva je převést složité polysacharidy obsažené ve výchozích surovinách na jednoduché cukry, které jsou dále fermentovány pomocí kvasinek za vzniku alkoholu a oxidu uhličitého. Pivo se vyrábí ze čtyř základních surovin, kterými jsou slad, chmel, voda a kvasnice. Slad v tradičních pivovarech se vyrábí z ječmene, nazývá se světlý slad plzeňského typu. Sladovací proces se skládá z namáčení, klíčení a následného sušení neboli hvozdní ječmene. Během klíčení dochází ke štěpení buněčných stěn a tvorbě enzymů. Důsledkem je křehnutí obilného zrna, enzymy se dále využijí mj. ke štěpení molekul škrobu. V závislosti na průběhu hvozdní, a především teploty sušícího vzduchu, vznikají jednotlivé druhy sladů odlišující se zejména barvou. Sladová zrna jsou rozemleta na mouku během procesu zvaný šrotování. Vystírání je proces, kdy se šrot smíchá

s vodou. Cílem rmutování je rozštěpit a převést optimální množství polymerních sloučenin do extraktu, působením mechanických, chemických, fyzikálních, a především enzymatických dějů. Nejvýznamnějším proces rmutování je štěpení škrobu amylolytickými enzymy za vytvoření maltózy a dextrinů [32][33].

Po rmutování následuje v procesu přípravy mladiny scezování. Jedná se o filtraci a oddělení tekuté složky od pevného podílu tzv. mláta. Tekutý podíl zvaný sladina se vaří s chmelem při chmelovaru. Při tomto procesu dochází k řadě chemických a biochemických reakcí, jako je například Maillardova reakce, zvýšení acidity, izomerace hořkých látek chmele především α -hořkých kyselin apod., jejich výsledek se dále promítá ve složení mladiny a má vliv na vlastnosti piva. Po dovaření mladiny se odděluje chmelové mláto. Mladina se před zakvašením musí zchladit na zákvasnou teplotu, z mladiny se vylučují jemné a hrubé kaly a mladina se sytí kyslíkem. Fermentace mladiny za vzniku piva probíhá ve dvou fázích. První nazýváme hlavní kvašení, druhou fází je dokvašování a ležení piva. Spodní kvašení piva probíhá s kvasinkami *Saccharomyces pastorianus*, které sedají ke dnu. Naopak *Saccharomyces cerevisiae* jsou vyplavovány na hladině a používají se tak pro svrchně kvašená piva. Produktem kvašení je mladé pivo, během ležení v ležáckých tancích a v chladných teplotách dochází k dotváření výsledné chuti a sycení oxidem uhličitým [34].

2.4 Vedlejší produkty v pivovarském průmyslu

Při procesu výroby piva vznikají i vedlejší produkty. Hlavním vedlejším produktem je mláto, v menším zastoupení potom získáváme použité kvasinky a sladový květ, hrubé a jemné kaly, křemelinový kal a odpadní voda. Všechny tyto vedlejší produkty mají velký potenciál k dalšímu zpracování, jelikož mají vysokou výživovou hodnotu [33].

2.4.1 Mláto

Na 100 litrů piva připadá přibližně 20 kg mokrého mláta s obsahem vody v rozmezí 75 až 80 %. Mláto představuje 85 % odpadů z pivovaru. Mláto se skládá z pluch, endospermu a koagulovaných látek při rmutování. Chemické složení mláta je proměnlivé v závislosti na odrůdě ječmene a době sklizně, podmínkách sladování a rmutování, druhu a kvalitě druhotných surovin přidávaných v pivovarském procesu. Nicméně je známo, že tento vedlejší produkt rostlinného původu obsahuje značné množství cenných složek, které zůstávají v pivovarském procesu nevyužity [35]. Obecně lze říct, že se jedná o lignocelulózový materiál, jehož hlavní komponenty představují vlákninu (hemicelulózu a celulózu), proteiny a lignin [36]. Vzhledem k vysokému obsahu vody, který se pohybuje okolo 80 %, se jedná o nestálý materiál s trvanlivostí 7 až 9 dní [37].

Tabulka 1: chemické složení mláta udávané v procentech v sušině

Proteiny	Lipidy	Vláknina	Sacharidy	Lignin	prach	zdroj
23,44	7,73	14,3	-	-	2,5	[38]
22,44 ± 2,70	5,30 ± 0,18	-	46,52	19,57 ± 0,94	3,54 ± 0,02	[39]
31,81 ± 0,46	-	-	-	12,72 ± 2,00	3,07 ± 0,03	[40]
25,70 ± 0,81	-	-	-	13,12 ± 0,54	3,38 ± 0,08	[40]
24,69 ± 1,04	-	-	-	19,40 ± 0,34	4,18 ± 0,03	[41]

Mláto také obsahuje fosfor, vápník, hořčík, železo, měď, draslík, zinek a mangan. Přítomné jsou i některé vitamíny, jako například biotin, niacin, riboflavin thiamin, kyselina listová, kyselina panthotenová a pyridoxin [38][42].

2.4.1.1 Využití mláta

Díky tomu, že mláto je bohaté na bílkoviny i sacharidy, je jeho hlavní a nejjednodušší využití jako krmivo pro zvířata. Jako krmivo lze mláto využít přímo v mokré formě nebo jako suchý materiál.

V kombinaci s levnými zdroji dusíku, jako je například močovina, je možné poskytnout všechny základní aminokyseliny potřebné pro výživu zvířat [43]. Mláto může být inkorporováno také do lidské stravy například u chleba či sušenek, díky čemuž dojde k navýšení vlákniny v těchto produktech [44]. Mláto nachází své využití také jako substrát pro kultivaci mikroorganismů a produkci enzymů nebo při fermentačních procesech [37]. Ekologicky přijatelná technologie zpracování mláta je kompostování, která přeměňuje tento materiál na užitečný zemědělský produkt. Jedná se o jednoduchou metodu s nízkými náklady. Deficit dusíku může být v tomto případě doplněn kompostováním například s drůbežím trusem [45].

2.4.2 Chmelové mláto

Chmelové mláto se odděluje od mladiny po dovaření. Tuhé zbytky mletých a granulovaných chmelů se odstraňují v usazovacích a vířivých kádích. Z 1 kg chmele se získá přibližně 7 kg mláta s obsahem vody 80 až 85 %. Chmelové mláto se skládá z dusíkatých látek, vlákniny, látek extrahovatelných diethyletherem a popela. Dříve se využívalo na kypření půdy, prodávalo se se sladovým mlátem nebo se spalovalo. V dnešní době se vzhledem k malému používání hlávkového chmelu nejčastěji vyváží do odpadů [33].

2.4.3 Hrubé a jemné kaly vylučované z mladiny

Hrubé kaly se vylučují při chlazení mladiny na zákvasnou teplotu působením vířivého pohybu. Velikost částic hrubého kalu je 30 až 40 μm . Množství hrubých kalů se udává v rozmezí 150 až 400 g na hl mladiny. Vznik jemných kalů je vratný, při zahřívání se rozpouštějí [33].

2.4.4 Sedimentované kvasnice

Ze sedimentovaných kvasnic se nejprve odstraní vrchní část tzv. horní špínka, poté se ze středního jádra odeberou kvasinky, které se mohou používat k zakvašování dalších várek. Poslední část tvoří tzv. spodní špínka. Obě špínky jsou odpadem, který se skládá z mrtvých a oslabených kvasinek, cizích mikroorganismů a vysrážených hořkých kalů. Obsahují 70 až 75 % vody, sušina je bohatá na bílkoviny, které představují 40 až 45 %, některé zdroje uvádí i 60 % sušiny, dále obsahuje sacharidy a lipidy. Sedimentované kvasnice jsou známé jako dobrý zdroj vitamínů skupiny B, obsahují především vitamíny B3, B6 a B9, může se vyskytovat i B2 a B12, na konkrétní složení má však vliv přirozená variabilita složení sedimentovaných kvasnic, dále stáří a zdraví buněk. Výsledky mohou být ovlivněny také metodami přípravy vzorku a použitými analytickými metodami. Z minerálních látek najdeme v sedimentovaných kvasnicích draslík, sodík, hořčík, vápník, železo, chrom, mangan, kobalt, molybden, zinek, měď a selen. Sedimentované kvasnice se díky svému obsahu volných aminokyselin a peptidů nebo díky antioxidačním vlastnostem využívají v potravinářství a krmivech, kde slouží jako levný zdroj proteinů, minerálů a vitamínů skupiny B [33][46].

2.4.4.1 Využití sedimentovaných kvasnic

Stěny buněk kvasnic jsou bohaté na β -D-glukany. Izolací β -D-glukanů z kvasnic by mohly pivovary získávat další příjmy, jelikož se jedná o produkt s vysokou tržní hodnotou. Izolace probíhá v alkalickém prostředí za vysokého tlaku. β -glukany mohou zlepšit některé vlastnosti potravinářských výrobků, tím, že působí jako zahušňovač, emulgátory, látky, které vážou olej nebo zadržují vodu. Bylo dokázáno, že extrakt ze sedimentovaných kvasnic je slibný zdroj bioaktivních složek, protože obsahuje vyvážený profil aminokyselin spolu s dalšími funkčními složkami, jako jsou fenolické látky, flavonoidy, karotenoidy a peptidy. Hydrolyzát připravený enzymatickou hydrolyzou vykazuje významné antioxidační a antidiabetické vlastnosti, proto může být potenciálně použit pro přípravu funkčních potravin a potravinových doplňků. Sedimentované kvasnice jsou vhodné jako výchozí látka pro přípravu kvasničného extraktu, jelikož jsou bohaté na nutrienty a cenově výhodné. Kvasničný extrakt je možné připravit autolýzou za zvýšené teploty nebo pomocí mechanických metod, například buněčných mlýnů nebo sonotrodových metod. Kvasničný extrakt z pivovarských kvasnic se využívá jako náhražka komerčního kvasničného autolýzátu při kultivacích například při výrobě ethanolu [47].

2.4.5 Křemelinové kaly

Křemelina je minerální ruda složená z mikroskopických křemičitých organismů usazených v období třetihor. V praxi se používá k filtrování piva, kdy se odstraňují látky působící zákal a zvyšuje se celková stabilita piva. Vzniklý křemelinový kal se skládá kromě křemeliny také ze zbytků kvasnic a suspendovaných látek. Na jeden litr piva se spotřebuje 1 až 2 gramy křemeliny a vznikne tak přibližně 17 g křemelinového kalu. Využití křemelinových kalů je primárně v zemědělství, kde díky obsahu organického dusíku spolu s dalšími nutrienty nahrazují anorganická hnojiva [48].

2.4.6 Odpadní voda

Moderní pivovary spotřebují na výrobu 1 litru piva 4 až 7 litrů vody. Celková spotřeba vody závisí na mnoha proměnných, mezi které patří například typ piva, způsob balení a pasterování aj. Kromě vody využívané při samotném procesu výroby piva, tedy například při rmutování, se do celkové spotřeby zahrnuje i voda používaná na mytí obalových materiálů, oplach a čištění technologických zařízení, mytí podlah a chlazení [49]. Spotřeba vody se dá rozdělit vodu procesní, která představuje 2/3 celkové spotřeby vody, a vodu použitou k čištění a sanitaci, která zaujímá třetinu celkové spotřeby [50]. Z literatury vyplývá, že odpadní voda z pivovarů je vhodná například pro kultivaci karotenogenních kvasinek pro produkci lipidů i karotenoidů. Vzorky vody byly odebrány po scezení a promývání [51].

2.5 Metody analýzy

2.5.1 Extrakce

Extrakce je analytická metoda, která se využívá při přípravě vzorků. Cílem extrakce je izolovat analyt ze vzorku, zároveň také dojde k odstranění ostatních látek, které by mohly interferovat s analytem, zatímco analyty jsou převedeny na formu vhodnou k analýze. Extrakce hraje velkou roli pro získávání kvalitních analytických informací [52]. Pro extrakci nepolárních antioxidantů je potřeba narušit buňky pomocí fyzikálních, chemických nebo biologických metod, poté jsou karotenoidy extrahovány a odděleny od zbytků buněk. Rozpouštědlo je důležitý faktor při extrakci a vybírá se na základě charakteru analytu. Jelikož karotenoidy jsou hydrofobní látky, většinou se volí jako extrahovadlo těkavá organická rozpouštědla jako je například aceton, petrolether nebo hexan. Jelikož karotenoidy jsou hydrofobní látky, většinou se volí jako extrahovadlo těkavá organická rozpouštědla jako je například aceton, chloroform, petrolether nebo hexan [53].

2.5.2 Transesterifikace

Transesterifikace je katalyzovaná organická reakce, kde reaktanty jsou ester a alkohol. Během reakce dochází k výměně alkoxy skupiny na esteru. Jako katalyzátor se využívá silná kyselina nebo silná báze, pro dosažení velkých výtěžků se alkohol přidává v nadbytku. Transesterifikace není omezena na laboratorní měřítko, ale využívá se i v průmyslu například pro výrobu PET (polyethylentereftalátu). Při kysele katalyzované reakci dochází k protonaci karbonylové skupiny, vznikne karbokation, který je atakován nukleofilním alkoholem. Bazicky katalyzovaná transesterifikace je proti kysele katalyzované reakci rychlejší, v průmyslu má proto větší zastoupení. Reakcí báze s alkoholem dojde ke vzniku alkoxidu. Nukleofilní alkoxid atakuje karbonylovou skupinu triglyceridu, z něj pak vzniká alkylester a odpovídající anion diglyceridu. Deprotonací katalyzátoru dojde k jeho regeneraci, čímž začne další cyklus [54].

2.5.3 HPLC/DAD

Vysokoučinná kapalinová chromatografie, z anglického *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC, patří do skupiny separačních analytických metod, jejichž princip spočívá v rozdílné distribuci látek mezi stacionární a mobilní fází. Při HPLC je mobilní fáze přiváděna pomocí čerpadel za vysokého tlaku, tím dochází k účinné separaci. Při použití mobilní fáze s konstantním složením mluvíme o takzvané izokratické eluci, pokud se eluční síla mobilní fáze zvyšuje, jedná se o gradientovou eluci. V moderní kapalinové chromatografii se používá řada separačních módů. Ačkoliv se mnohé z nich těší větší oblibě, systém s reverzními fázemi stále představuje majoritní

separační techniku. Detektory bývají většinou spektrofotometrické, v posledních letech se větší oblibě těší taktéž hmotnostně spektrometrická detekce. Detektory s diodovým polem (DAD či PDA) mají schopnost snímat celé spektrum v reálném čase [55].

2.5.4 GC/FID

Plynová chromatografie se taktéž řadí mezi separační metody. Při této metodě dochází k distribuci analytů mezi plynnou mobilní fází a stacionární fází, která bývá v kapalném nebo pevném skupenství. Dříve používané náplňové kolony jsou v dnešní praxi nahrazeny účinnějšími kapilárními kolonami. V plynové chromatografii se využívá řada detektorů, z nichž nejčastější je použití plamenově ionizačního detektoru (FID). Dále se používá tepelně vodivostní detektor, hmotnostně spektrometrický detektor nebo detektor elektronového záhytu [56].

2.5.5 Mikroskopické metody

Mikroskopické metody jsou hojně používané metody pro studium mikroorganismů, struktury jejich buněk, subcelulárních útvarů apod. K tomu se využívá buď světelný mikroskop, jeho modifikace nebo elektronový mikroskop. Světelný mikroskop nám umožňuje pozorovat tvar, velikost a uspořádání živých i barvených buněk, jeho rozlišovací schopnost však závisí na více faktor, z nichž velký vliv hraje vlnová délka světla [57].

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je zhodnotit využití odpadů pivovarského průmyslu při kultivaci karotenogenních kvasinek. Dosažení tohoto cíle je řešeno dílčími kroky:

- Zpracování literární rešerše zaměřené na využití odpadů produkovaných pivovarským průmyslem, popis karotenogenních kvasinek a jejich biotechnologického využití.
- Optimalizace metod předúpravy pivovarských odpadů.
- Produkce biomasy karotenogenních kvasinek na odpadech z pivovarského průmyslu.
- Analýza produkované biomasy.
- Vyhodnocení výsledků.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité pro kultivaci kvasinek

Agar, Roth (SRN)
Glycerol bezvodý, Penta (ČR)
D-glukóza monohydrát p.a., Lach-ner (ČR)
Pepton aus Casein, Roth (Německo)
Kvasničný autolyzát, Himedia (Indie)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-ner (ČR)
Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Lach-ner (ČR)
Síran amonný p.a., Penta (ČR)
Dusičnan sodný p.a., Lach-ner (ČR)
Pivovarské mláto (ČR)
Pivovarské kvasnice (ČR)
Pivovarské kvasnice granulované, MIKROP (ČR)
Celluase, enzyme blend, Sigma-Aldrich (SRN)
Hemicellulase from *Asperigillus niger*, Sigma-Aldrich (SRN)

4.1.2 Chemikálie použití pro extrakce a analýzu pomocí HPLC a GC a analýzu předupravených odpadů

Methanol pro HPLC, Chem-Lab (Belgie)
Kyseliny sírová 96%, Lach-ner (ČR)
Heptadekanová kyselina gC kvality, Sigma-Aldrich (SRN)
Hydroxid sodný, Lach-ner (ČR)
Fenolftalein 1%
Tashiro indikátor
Weinigerův katalyzátor (90 g síranu sodného, 7 g síranu rtuťnatého, 1,5 g síranu měďnatého, 1,5 g selenu)
Hexan pro HPLC, Carlo ERBA (Francie)
Methanol p.a., Penta (ČR)
Chloroform p.a., Lach-ner (ČR)
Ethanol p.a., VWR International S.A.S.
Ethylacetát pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)
Acetonitril pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)
Tris HCl p.a., Lach-ner (ČR)
Fenol, LachNer (ČR)
Dusík 5.0 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem
Dusík 4.0 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem
Vodík 5.5 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem
Vzduch 5.0 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

4.2 Použité přístroje a pomůcky

4.2.1 Přístroje použité pro kultivaci

Syntech Autokláv (USA)
Předvážky Scout, Ohaus
Magnetická míchačka SBS-MR-1500, Steinberg Systems
Mikroskop L II 00A, Intraco Micro (SRN)
GKB Color Digital CCD kamera (Tchajwan)
Lucia Image active 5.0 Laboratory imaging spol. s.r.o. (ČR)

Analytické váhy Boeco (SRN)
Box Aura mini BioTech (ČR)
Třepačka Yellow line (SRN)
Vortex disruptor genie, Scientific Industries, Inc. (USA)

4.2.2 Přístroje a pomůcky použité pro izolaci a analýzu metabolitů a analýzu předupravených odpadů

Analytické váhy Boeco (SRN)
Lyofilizátor Labconco FreeZone Č.Ř Freeze Dryer (USA)
Automatické pipety, Biohit (DE) a Discovery
Termoblok VWR (ČR)
Centrifuga BioTech (ČR)
Stříkačkové filtry 0,4 µm PTFE Chromservis (ČR)
Vortex disruptor genie, Scientific Industries, Inc. (USA)
HPLC/DAD sestava:

- HPLC sestava (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Dionex Ultimate Serie 3000 Pump
- Dionex Ultimate Serie 3000 Autosampler
- Kolona Kinetex EVO C18 150 mm x 4,6 mm x 5,0 µm
- Thermo Fisher Vanquish detector
- Program Chromeleon

GC/FID sestava:

- TRACE gC/FID (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Kapilární kolona Lion-GC FAME 30 m x 0,25 mm x 0,2 µm

VAPODEST 500, C. Gerhardt GmbH & Co. KG (Německo)

KJELDATHERM BLOCK-DIGESTION UNIT, C. Gerhardt GmbH & Co. KG (Německo)

4.3 Použité kmeny kvasinek

Cystofilobasidium infirmominiatum CCY 17-18-4

Sporidiobolus salmonicolor CCY 19-4-25

Sporobolomyces shibatanus CCY 19-9-6

Rhodotorula kratochvilovae CCY 20-2-26

Rhodotorula mucilaginosa CCY 20-7-31

Rhodotorula toruloides CCY 62-2-4

4.4 Zpracování odpadních substrátů

4.4.1 Předúprava mláta

Mláto, které bylo získáno z místního pivovaru bylo vysušeno v sušárně při teplotě 70 °C, po vysušení bylo mláto namleto. Na hydrolýzu bylo použito 400 g namletého mláta, 1500 ml vody a 15 ml 1% kyseliny sírové. Hydrolýza byla provedena v autoklávu. Následně bylo u hydrolyzátu upraveno pH na hodnotu 5, byly přidány enzymy, konkrétně hemicelulázy a celulózy. Směs byla míchána za teploty míchadla 40 až 45 °C po dobu 48 hodin. Vzniklý produkt enzymatické hydrolýzy byl filtrován za sníženého tlaku. Filtrát byl skladován v mrazicím boxu. U hydrolyzovaného mláta byl stanoven celkový obsah sacharidů metodou dle Duboise. K 1 ml roztoku vzorku, blanku či standardu byl přidán 1 ml 5% fenolu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Směs byla protřepána a ponechána stát po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Absorbance byla měřena při 490 nm. Celkové sacharidy byly stanoveny na základě předem stanovené kalibrační závislosti.

4.4.2 Předúprava pivovarských kvasnic

Kvasnice odebrané z místního pivovaru byly centrifugovány při 7 000 ot./min po dobu 5 min. Poté byly dvakrát promyty studenou vodou a nakonec jednou fosfátovým pufrům. Fosfátový pufr byl připraven

150mM o pH 5 a 6. Kvasnice byly smíchány s fosfátovým pufrem tak, aby výsledná suspenze měla 10 % hm. V první části experimentu byly suspenze s oběma pufrů míchány na magnetických míchačkách při rychlosti 300 otáček za minutu a laboratorní teplotě. Vzorky byly odebrány na začátku, tedy v čase T_0 , poté po 24, 96 a 168 hodinách. Druhá část experimentu probíhala obdobně, teplota však byla zvolena 50 °C. Vzorky byly odebrány v začátku experimentu v čase T_0 , poté po 24, 48 a 72 hodinách. Experiment byl proveden taktéž s granulovanými pivovarskými kvasnicemi při laboratorní teplotě i při teplotě 50 °C. Pivovarské kvasnice granulované měly složení: kvasnice sušené (*Saccharomyces cerevisiae*), pšeničný šrot, kukuřičný šrot, řepkový olej. Deklarovaný obsah hrubého proteinu byl dle údajů výrobce 25,50 %. Vzorky byly u granulovaných kvasnic odebírány stejně.

4.4.2.1 Analýza celkového množství dusíku Kjeldahlovou metodou

Vzorky odebrané během experimentu byly analyzovány Kjeldahlovou metodou pro stanovení celkového množství dusíku. Do mineralizačních trubic bylo naváženo nebo odměřeno přesné množství vzorku a spolu s Weiningerovým katalyzátorem a kyselinou sírovou byly vzorky mineralizované pomocí Kjeldahlovy mineralizační jednotky Kjeldatherm. K mineralizátu byl přidán indikátor fenoltalein, poté se mineralizační trubice vložila do přístroje VAPODEST 500 k provedení destilace amoniaku vodní parou. Jímání destilovaného amoniaku probíhala do titrační baňky se známým množstvím kyseliny sírové. Po dokončení destilace byla provedena titrace kyseliny sírové standardizovaným odměrným roztokem hydroxidu sodného za použití Tashirova indikátoru. Množství celkového dusíku bylo vypočteno ze spotřeby odměrného roztoku.

4.5 Kultivace vybraných druhů karotenogenních kvasinek

Karotenogenní kvasinky byly skladovány při teplotě -80 °C v kryovialkách. Kvasinky z kryovialek byly zaočkovány na YPD agarové plotny a ponechány růst přibližně 3 až 4 dny. Kultivace karotenogenních kvasinek probíhala pomocí dvojí inokulace, tedy za použití dvou submerzních inokulí.

4.5.1 Inokulum I a inokulum II

Inokulum I a inokulum II byly připraveny jako YPD média, složení média je uvedeno níže (viz Tabulka 1). Inokulum I bylo připraveno o objemu 50 ml média do 250ml Erlenmeyrovy baňky. Inokulum II bylo připraveno o stejném složení média v celkovém objemu 100 ml do 500ml Erlenmeyrovy baňky. Erlenmeyrovy baňky byly uzavřeny buničitou zátkou a opatřeny alobalem, následně byla provedena sterilace v tlakovém hrnci při teplotě na vařiči 140 °C po dobu 45 min. Po vychladnutí médi a byla baňka s Inokulem I zaočkována v očkovacím boxu. K očkování byla použita kultura z agarové plotny na Petriho misce, byl použit poměr 1 klička s kulturou na 10 ml média. Takto zaočkované Inokulum I bylo umístěno na recipročnou třepačku s konstantní rychlostí třepání 115 ot./min. Po uplynutí 24 hodin byla provedena mikroskopická kontrola vzorku kultury z inokula I, aby byla odhalena případná bakteriální kontaminace. Po provedení této kontroly bylo inokulum I použito k zaočkování vysterilovaného Inokula II v inokulačním poměru 1:5. Inokulum II bylo umístěno opět na 24 hodin na recipročnou třepačku se stejným nastavením jako v případě inokula I.

Tabulka 2: složení YPD média

složka	množství
voda	1000 ml
pepton	20 g
Kvasničný autolyzát	10 g
glycerol	20 g

4.5.2 Produkční média

Produkční médium bylo připraveno dle tabulky uvedené níže (Tabulka 3), která udává základní složení každého produkčního média. Produkční médium bylo připraveno dle tabulky uvedené níže (Tabulka 3), která udává základní složení každého produkčního média. Uhlíkatý zdroj se u jednotlivých médií lišil, dvě produkční média obsahovala glycerol, další dvě glukózu a poslední dvě obsahovaly připravený hydrolyzát mláta. Množství uhlíkaté složky udává Tabulka 4, která zároveň ukazuje, že dvě produkční média obsahující stejný uhlíkatý zdroj se lišily C/N poměrem. Produkční médium bylo připraveno o objemu 50 ml do 250 ml Erlenmeyrovky baňky. Tyto baňky s produkčními médii byly opatřeny buničitou zátkou, alobalem a byly sterilovány stejně jako Inokulum I a II. K zaočkování produkčních médií bylo použito Inokulum II, které bylo nejprve mikroskopicky zkontrolováno pro odhalení případné bakteriální kontaminace. Po vychladnutí produkčních médií bylo provedeno očkování v očkovacím boxu v inokulačním poměru 1:10. Zaočkováná produkční média byla umístěna na třepačku, kde probíhala kultivace po dobu 96 hodin.

Tabulka 3: složení základního produkčního média

složka	množství
voda	1000 ml
KH_2PO_4	4 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,392 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4 g
NaNO_3	10 g
Kvasničný extrakt	2 g
Mikroelementový roztok	10 ml

Tabulka 4: uhlíkaté zdroje pro jednotlivá produkční média v množství na 1000 ml

pořadí baňky	označení	složka	množství
1	1GLY	glycerol	92,04 g
2	2GLY	glycerol	46,02 g
3	3GLU	glukoza	91,04 g
4	4GLU	glukoza	46,02 g
5	5HM	hydrolyzát mláta	91,04 g
6	6HM	hydrolyzát mláta	46,02 g

4.6 Kultivace za použití připraveného kvasničného extraktu

Karotenogenní kvasinkový kmen *Rhodotorula toruloides* byl vybrán pro kultivaci na produkčních médiích obsahujících připravený kvasniční extrakt. Na základně pilotního experimentu byla určena vhodná metoda předúpravy kvasnic granulovaných i čerstvých z pivovaru. Granulované kvasnice byly rozsuspendovány v 150mM fosfátovém pufru o pH 6, čerstvé pivní kvasnice z místního pivovaru byly rozsuspendovány v 150mM fosfátovém pufru o pH 5, obě suspenze byly míchány po dobu 24 hodin při teplotě 50 °C. Připravené kvasničné extrakty byly analyzovány Kjeldahlovou metodou pro stanovení množství celkového dusíku. Poté byly kvasničné extrakty použity v kultivacích jako náhražka komerčního kvasničného autolyzátu nebo jako náhražka všech zdrojů dusíku. Pro kultivace čistě pouze na kvasničných extraktech byly testovány dvoje množství dusíku, a to trojnásobné množství dusíku (ekvivalent 10 g NaNO_3 a 4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) a klasické množství dusíku (ekvivalent 1,33 g NaNO_3 a 3,33 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) viz Tabulka 5.

Tabulka 5: množství jednotlivých komponentů produkčních médií rozdělených dle složení do skupin, kom. KE značí komerční kvasničný autolyzát, gran KE znamená připravený kvasničný extrakt z granulovaných pivních kvasnic, STB KE značí kvasničný extrakt připravený z čerstvých kvasnic z místního pivovaru, množství je udávané na 1000 ml vody

č.	označení	množství látky v gramech					množství v ml	
		KH ₂ PO ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O	(NH ₄) ₂ SO ₄	NaNO ₃	kom. KE	gran. KE	STB KE
1	KLAS	4	1,39	1,33	3,33	2	-	-
2	GR(KV)	4	1,39	1,33	3,33	-	130,33	-
3	STB(KV)	4	1,39	1,33	3,33	-	-	33,322
4	STB-N	4	1,39	-	-	-	-	166,65
5	GRAN-N	4	1,39	-	-	-	672,83	-
6	STB(3KV)	4	1,39	4	10	-	-	33,32
7	STB-3N	4	1,39	-	-	-	-	433,3
8	KONT	4	1,39	4	10	2	-	-

Každá kultivační skupina byla s ohledem na uhlíkatý zdroj složena z baněk 1 až 4, jak je udává Tabulka 4, kultivace probíhala v duplikátech. Dále se složení médií rozdělovalo do skupin podle lišícího se dusíkatého zdroje a jeho množství (viz Tabulka 5). Skupina 1 byla kontrolní, tedy obsahovala komerční kvasničný autolyzát, u skupiny 2 a 3 byl komerční kvasničný autolyzát nahrazen kvasničným extraktem z granulovaných pivovarských kvasnic, respektive z čerstvých pivovarských kvasnic. Ve skupině číslo 4 byly nahrazeny všechny dusíkaté zdroje kvasničným extraktem z čerstvých pivovarských kvasnic, u skupiny 5 byly nahrazeny kvasničným extraktem z granulovaných pivovarských kvasnic. Pro skupiny 6 a 7 bylo použito vyšší množství celkového dusíku, které je shodné se složením produkčních médií při kultivacích na předupraveném pivovarském mlátě. Ve skupině 6 byl pouze kvasničný extrakt nahrazen připraveným kvasničným extraktem z čerstvých pivních kvasnic, ve skupině 7 pak připravený kvasničný extrakt nahrazoval veškeré množství dusíku. Skupina 8 byla provedena pouze v jednotlivých stanoveních jako kontrola a pro účely srovnání výsledků kultivaci s kultivací stejného kmene v rámci první části, tedy na pivovarském mlátě.

4.7 Zpracování biomasy

Po ukončení kultivace byla biomasa zpracována. Nejprve byly odebrány vzorky pro gravimetrické stanovení množství vzniklé biomasy. Zbýlé množství kultury bylo převedeno do 50ml centrifugačních zkumavek a centrifugováno při 7000-8000 ot./min, po dobu 3 minuty. Supernatant byl dolit, sediment rozsuspendován v destilované vodě a opět zcentrifugován. Po odlití supernatantu byl sediment rozsuspendován v malém množství destilované vody a biomasa byla převedena do 2ml Eppendorf zkumavky. Tyto zkumavky byly centrifugovány při 13 000 ot./min po dobu 3 min, supernatant byl odlit a poté byly zkumavky umístěny do mrazicího boxu s teplotou -80 °C. Takto připravené vzorky byly po zmrazení lyofilizovány do úplného vysušení.

4.7.1 Gravimetrické stanovení biomasy

Pro gravimetrické stanovení biomasy byl odebrán 1 ml kultury do 2ml Eppendorf zkumavek, které byly centrifugované po dobu 3 min při 12 000 ot./min. Poté byl supernatant odlit, sediment byl rozsuspendován v destilované vodě a znovu centrifugován. Po odlití supernatantu byly vzorky umístěny do mrazicího boxu s teplotou - 80 °C, po zmrazení byly vzorky lyofilizovány do úplného vysušení. Před opětovným použitím byly veškeré vzorky uchovávány v mrazícím boxu. Lyofilizovaná biomasa byla převedena do předem zvážených čistých Eppendorf zkumavek, na analytických vahách bylo zjištěno množství biomasy v mg v 1 ml, což odpovídá množství v g/l.

4.7.2 Extrakce pro stanovení lipidů pomocí GC

Do skleněných krimpovacích vialek bylo naváženo 10-15 mg lyofilizované biomasy, ke které bylo přidáno 1,8 ml transesterifikační směsi a vialky byly zakripovány. Transesterifikační směs obsahuje kyselinu heptadekanovou jako interní standard o koncentraci 0,5 g/l, který je rozpuštěný

v 15% kyselině sírové v HPLC methanolu. Vialky byly umístěny na 2 hodiny na termoblok s konstantní teplotou 85 °C. Po vychladnutí vialek byl jejich obsah kvantitativně převeden do 5ml skleněných vialek, bylo přidáno 0,5 ml 0,05M NaOH a 1 ml HPLC hexanu. Vialky byly umístěny na 10 minut na multipoziční vortex, aby došlo k oddělení fází. Z horní hexanové fáze bylo odpipetováno 100 µl do skleněných šroubovacích vialek, které byly doplněny 900 µl HPLC hexanu. Takto připravený vzorek byl uchovávan v mrazícím boxu, poté byl analyzován pomocí plynové chromatografie.

Analýza mastných kyselin probíhala pomocí GC/FID. Připravené vzorky byly umístěny do autoassembleru Trace 1300 TM, jako kolona byla použita Lion GC Fame 30 m x 0,25 mm x 0,2 µm. Mobilní fází byl vodík o průtoku 1 ml/min. Teplotní program pro GC analýzu mastných kyselin a lipidů je uveden níže (viz Tabulka 6). Identifikace jednotlivých mastných kyselin probíhala pomocí interního standardu, k vyhodnocení byl použit program Chromeleon 7.2 a následně MS Excel.

Tabulka 6: Teplotní program pro analýzu mastných kyselin a lipidů pomocí plynové chromatografie

	retenční čas [min]	gradient [°C/min]	teplota [°C]	zadržetí [min]
1	0,000	Start	-	-
2	1,000	0,00	60,0	1,0
3	3,625	40,00	125,0	1,0
4	8,625	5,00	140,0	2,0
5	19,736	4,50	190,0	0,0
6	22,236	25,00	240,0	0,50
7	22,300	Stop	-	-

4.7.3 Stanovení karotenoidů, sterolů a ubichinonu pomocí HPLC

Do 2ml plastových centrifugačních zkumavek bylo naváženo 15-20 mg lyofilizované biomasy, která se rozsuspendovala v 1 ml destilované vody. Vialky byly po dobu 30 min uchovány ve tmě pro rehydrataci, poté byly centrifugovány na 12 000 ot./min po dobu 3 minut. Supernatant byl odlit a vialky byly doplněny 1 ml p.a. methanolu a bylo přidáno přibližně 0,5 ml skleněných kuliček. Zkumavky byly umístěny na 3 cykly na dezintegrátor při 3000 ot./min po dobu 30 sekund. Obsah 2ml zkumavek byl kvantitativně převeden do 15ml plastových centrifugačních zkumavek, do kterých byly přidány 2 ml směsi chloroformu, která obsahuje 99 % chloroformu a 1 % etanolu. Zkumavky byly umístěny na multipoziční vortex na 10 minut. Poté byl přidán 1 ml destilované vody. Zkumavky byly centrifugovány při 1500 ot./min po dobu 1 minuty. Obsah se rozdělil na dvě fáze, spodní chloroformová fáze byla odpipetována do 15ml skleněných zkumavek, které byly umístěny na termoblok při 45 °C opatřený přívodem stlačeného dusíku pro odpaření chloroformu. Zbytek po úplném odpaření rozpouštědla byl rozpuštěn v 1 ml směsi na HPLC složené z acetonitrilu a ethylacetátu v poměru 1:2. Po promíchání zkumavek na vortexu byla směs filtrována přes PTFE filtr do skleněných šroubovacích vialek. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí kapalinového chromatografu.

Připravené vzorky byly umístěny do HPLC autosampleru. Analýza probíhala na přístroji Dionex UltiMate 3000 od výrobce Thermo Fisher Scientific. Použitá kolona byla Kinetex C18 EVO 150 mm x 4,6 mm x 5 µm s využitím gradientové eluce. Program gradientové eluce je uveden v tabulce níže (viz Tabulka 7). Průtok mobilní fáze byl 1,2 ml/min za teploty 25 °C. Složení mobilní fáze je uvedeno v tabulce níže (viz Tabulka 8). Detekce probíhala pomocí PDA detektoru se systémem fotodiod. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Chromeleon 7.2 a následně MS Excelu.

Tabulka 7: Program gradientové eluce pro HPLC/DAD analýzu

	Retenční čas [min]	Mobilní faze a [%]	Mobilní faze B [%]
1	0,0	100	0
2	13,0	0	100
3	19,0	0	100
4	20,0	100	0
5	25,0	100	0

Tabulka 8: Složení mobilních fází pro analýzu pomocí HPLC/DAD

Mobilní faze	Látka	Objem [%]
A	Methanol	2
	Acetonitril	84
	Tris HCl 100 mM	14
B	Methanol	60
	Ethylacetát	40

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Analýza hydrolyzátu mláta

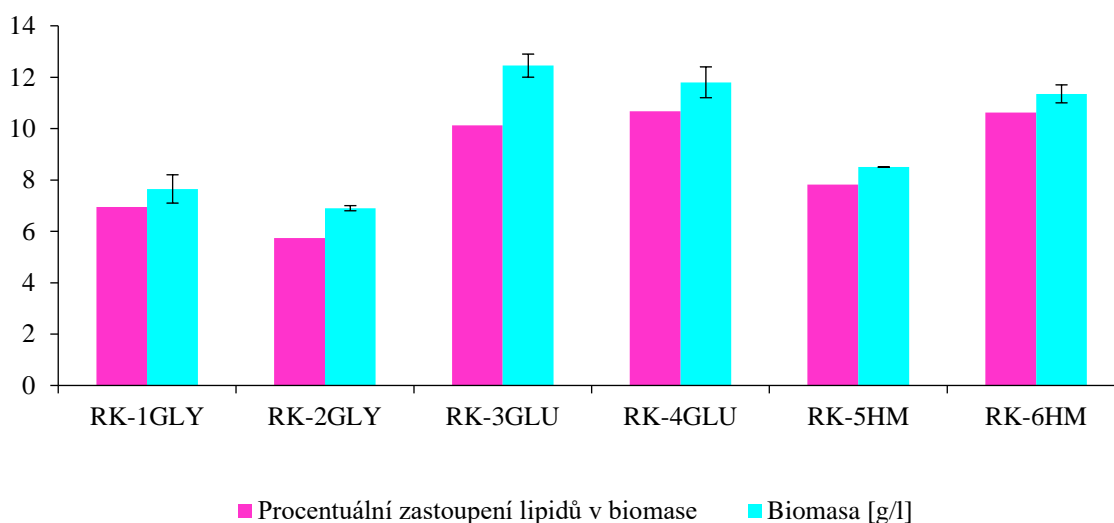
Mláto bylo po kyselé a enzymatické hydrolyze filtrováno. V kapalném podílu bylo metodou dle Dubiose stanoveno množství sacharidů, které odpovídalo 25 ± 3 g/l. Hydrolyzát mláta byl používán pro kultivace jako náhrada klasického uhlíkatého zdroje. Zbytek uhlíkatého zdroje byl doplněn glukózou na požadované množství.

5.2 Kultivace karotenogenních kvasinek na produkčních médiích s přidavkem hydrolyzátu mláta

Cílem tohoto experimentu bylo porovnat, jak budou různé kmeny karotenogenních kvasinek růst v závislosti na typu a množství uhlíkatého zdroje. Produkční médium tedy obsahovalo jako uhlíkatý zdroj hydrolyzát mláta a porovnání probíhalo u produkčních médií, kde byl uhlíkatý zdroj glukóza či glycerol v odpovídajícím množství. Zároveň v rámci téhož experimentu byly využity společně různé zdroje dusíku a v množství odpovídající trojnásobku běžného složení produkčního média.

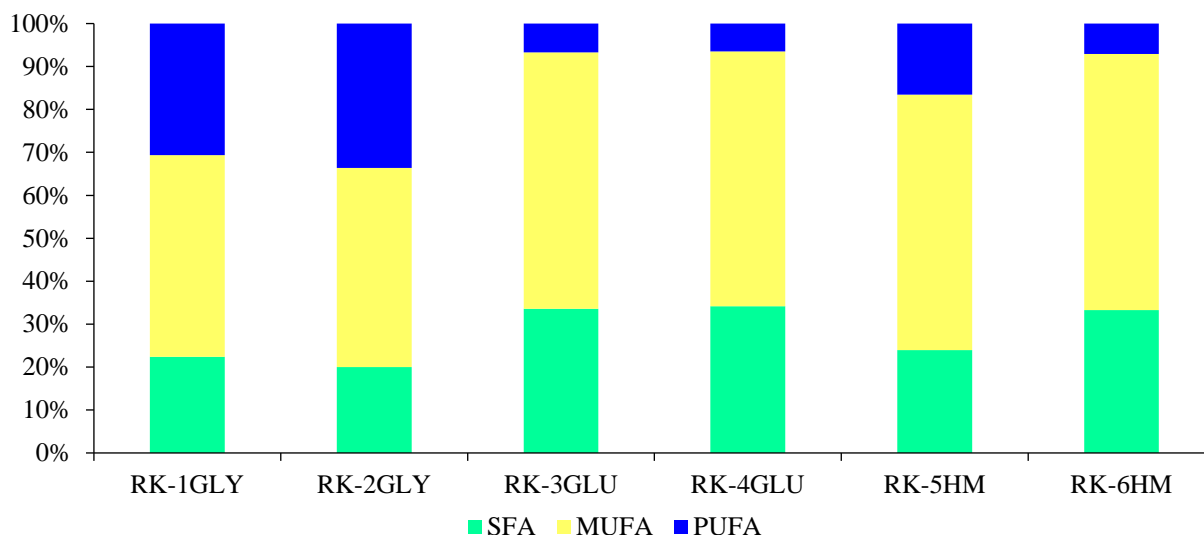
5.2.1 Kmen *Rhodotorula kratochvilovae*

U kvasinek kmene *Rhodotorula kratochvilovae* byl dle grafického znázornění níže (viz Graf 1) pozorován největší nárůst biomasy u produkčních médií s glukózou jako uhlíkatým zdrojem (12,45 g/l pro RK-3GLU a 11,8 g/l pro RK-4GLU). Hydrolyzát mláta však v tomto případě vykazuje lepší výsledky v celkové biomase než při použití glycerolu jako uhlíkatého zdroje, jelikož RK-6HM vykazovalo 11,35 g/l, RK-5HM 8,5 g/l, zatím média s glycerol pouze 7,65 g/l pro RK-1GLY a 6,9 g/l pro RK-2GLY.



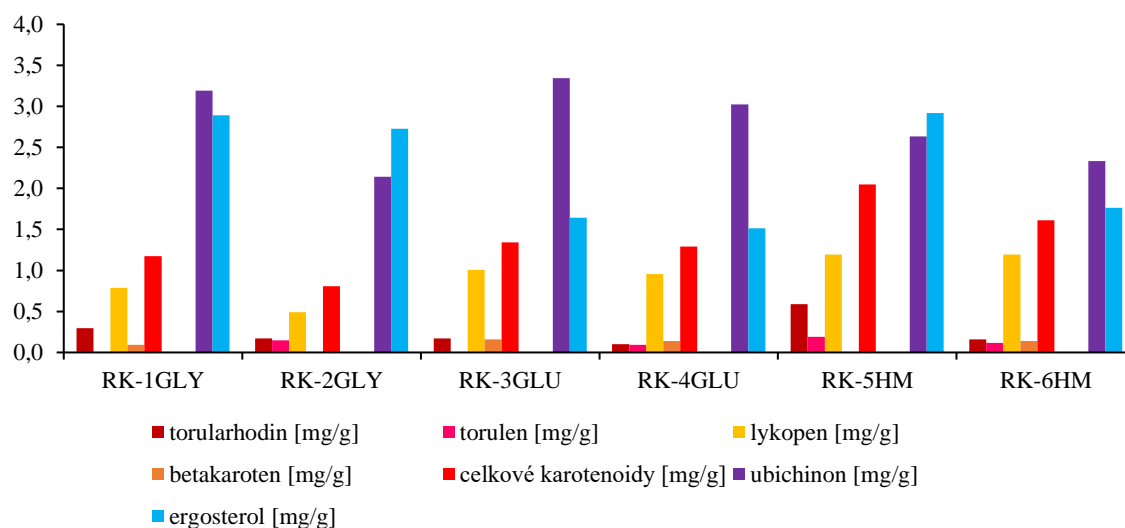
Graf 1: grafické znázornění množství produkované biomasy v gramech na liter a procentuální zastoupení lipidů v biomase pro kmen *Rhodotorula kratochvilovae*

Procentuální zastoupení mastných kyselin se pro jednotlivé uhlíkaté zdroje liší, avšak z grafu níže (Graf 2) vyplývá, že pro glycerol a glukózu nemá množství uhlíkatého zdroje vliv na výsledné zastoupení mastných kyselin v biomase. U produkčních médií s hydrolyzátem mláta je vliv patrný, jelikož při vyšší C/N poměr indikuje menší zastoupení SFA v biomase, pro RK-5HM je zastoupení SFA 24 %, zatímco pro RK-6HM 33 %.



Graf 2: grafické znázornění procentuálního zastoupení nenasycených mastných kyselin (SFA), mononenasycených mastných kyselin (MUFA) a polynenasycených mastných kyselin (PUFA) pro kmen *Rhodotorula kratochvilovae*

Analyzováním biomasy pomocí metody HPLC (viz Graf 3) bylo zjištěno, že produkční médium s použitím hydrolyzátu mláta ve větším C/N poměru, tedy médium RK-5HM, obsahovalo největší množství celkových karotenoidů (2,05 mg/g). V tomto produkčním médiu bylo dosaženo největšího zastoupení lykopenu a torularhodinu. Množství ergosterolu dosahovalo podobných hodnot jako při použití glycerolu, jelikož pro RK-5HM to bylo 2,92 mg/g a pro RK-1GLY 2,89 mg/g. Množství ubichinonu byl jediný sledovaný ukazatel, který pro produkční médium RK-5HM nedosahoval tak velkých výsledků jako pro média obsahující glukózu (tedy RK-3GLU a RK-4GLU) a pro médium RK-1GLY, pro RK-5HM to bylo 2,6 mg/g, zatímco pro RK-1GLY 3,2 mg/g.

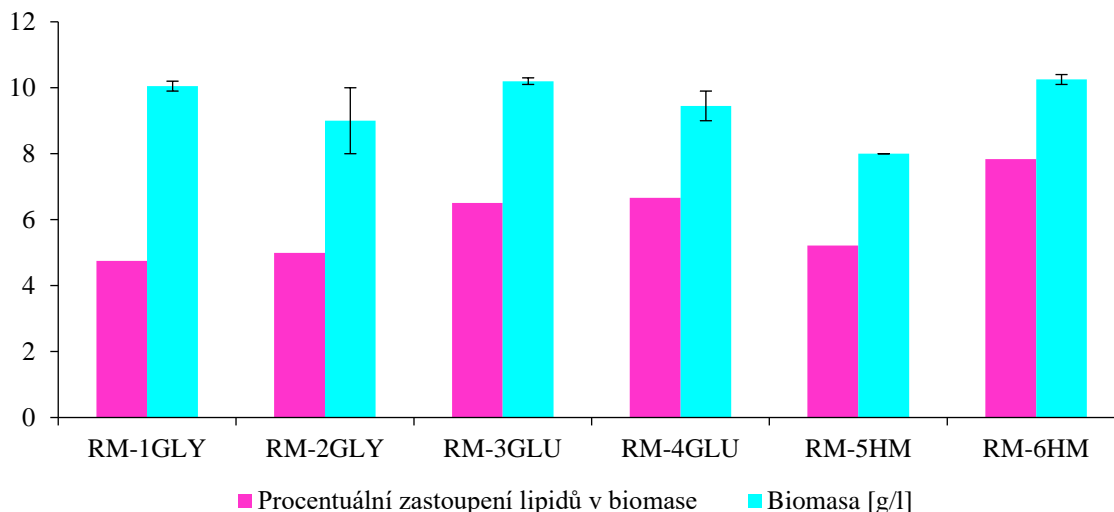


Graf 3: grafické znázornění vybraných metabolitů v miligramech na gram biomasy pro kmen *Rhodotorula kratochvilovae*

5.2.2 Kmen *Rhodotorula mucilaginosa*

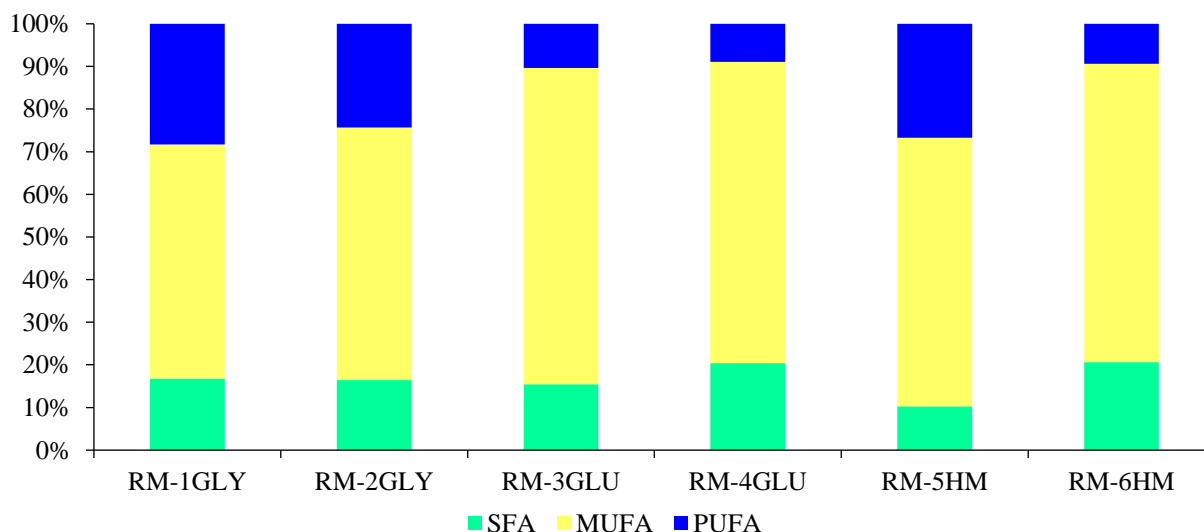
Výsledky kultivace kmene *Rhodotorula mucilaginosa* jsou patrné na grafech níže. Z grafického znázornění (viz Graf 4) vyplývá, že největší zaznamenaný nárůst biomasy byl pro produkční médium RM-6HM, tedy s obsahem hydrolyzátu mláta (10,25 g/l). Ačkoliv pro glycerol a glukózu platí, že větší množství uhlíkatého zdroje, které odpovídá produkčním médiím 1GLY a 3GLU, vede k větším výtěžkům biomasy, při použití hydrolyzátu mláta tato korelace neplatí. Podobně jako tomu bylo u kmene *Rhodotorula kratochvilovae* (viz Graf 1), výtěžky produkčního média 6HM

jsou větší než výtěžky produkčního média 5HM. V porovnání s kmenem *Rhodotorula kratochvilovae* bylo procentuální zastoupení lipidů v biomase pro kmen *Rhodotorula mucilaginosa* nižší. Nejvyšší zaznamenaná hodnota procentuálního zastoupení lipidů v biomase byla pro RM-6HM a činila 7,8 %. U kmene *Rhodotorula kratochvilovae* byla hodnota pro produkční médium RK-6HM 10,6 %, nejvyšší hodnota však byla zaznamenaná u produkčního média RK-4GLU, konkrétně 10,7 %.



Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin (viz Graf 5) ukazuje, že největší podíl mají MUFA, které představují 55 % až 74 %. Nejvíce zastoupeny jsou MUFA u glukózových produkčních médií. Podíl SFA byl na úkor MUFA snížen. Nejvíce SFA je zastoupených v produkčním médiu RM-6HM, kde představuje 21 %, pro kmen *Rhodotorula kratochvilovae* představovaly SFA v médiu RK-6HM 33 %. Můžeme tedy obecně sledovat pokles SFA a nárůst zastoupení MUFA v produkčních médiích u kmene *Rhodotorula mucilaginosa* oproti kmenu *Rhodotorula kratochvilovae*.

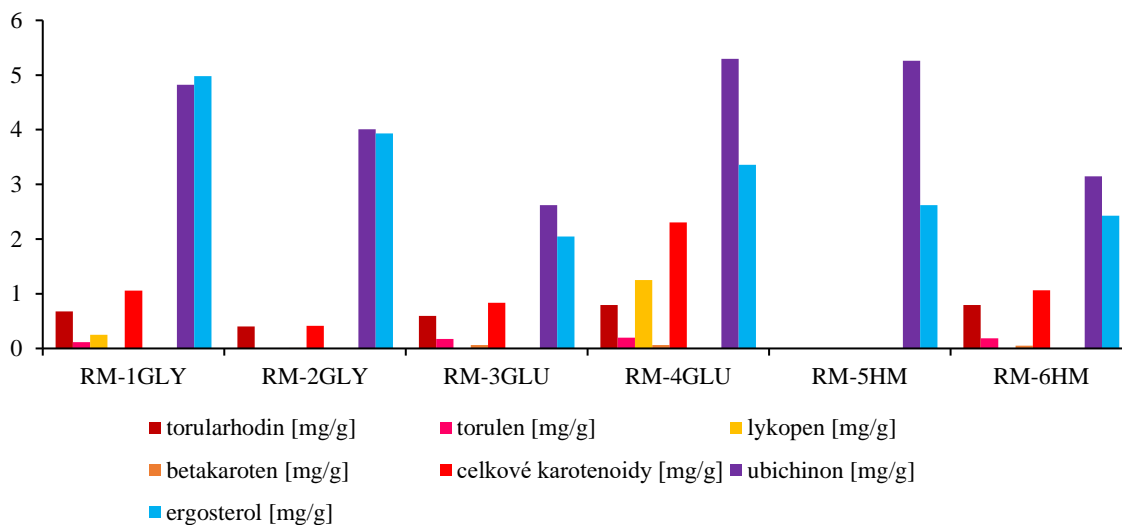
Graf 4: grafické znázornění množství produkované biomasy v gramech na litr a procentuální zastoupení lipidů v biomase pro kmen *Rhodotorula mucilaginosa*



Graf 5: grafické znázornění procentuálního zastoupení nenasycených mastných kyselin (SFA), mononenasycených mastných kyselin (MUFA) a polynenasycených mastných kyselin (PUFA) pro kmen *Rhodotorula mucilaginosa*

Zastoupení sledovaných metabolitů v biomase, které jsou pro kmen *Rhodotorula kratochvilovae* uvedeny v grafickém znázornění níže (Graf 6), při použití hydrolyzátu mláta byl v porovnání s kmenem *Rhodotorula kratochvilovae* nižší. Pro RM-5HM nebyly zaznamenány žádné karotenoidy,

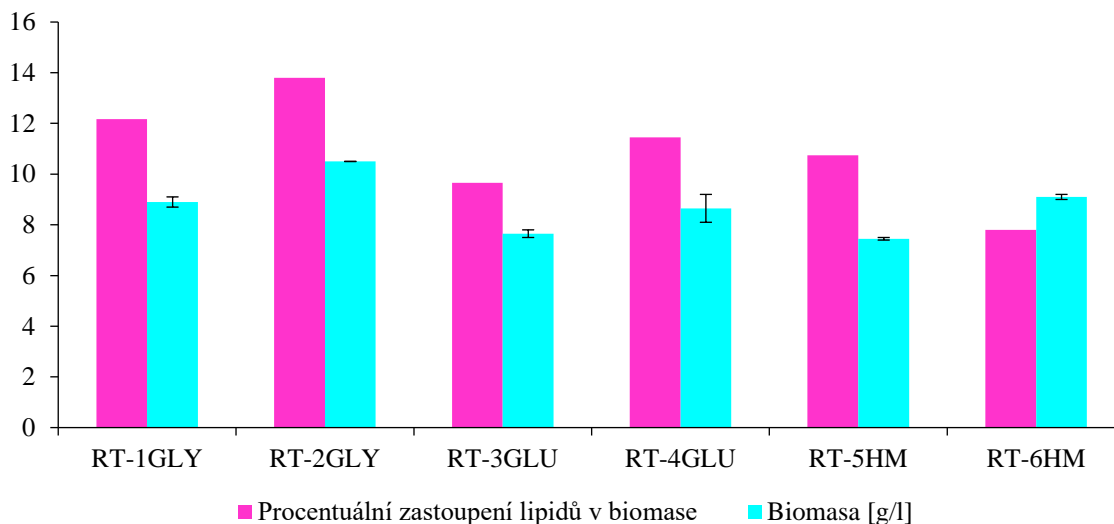
avšak ubichinon byl zde zastoupen ve velkém množství (5,26 mg/g). Ačkoliv celkové množství karotenoidů bylo pro všechny produkční média u kmene *Rhodotorula mucilaginosa* nižší než u kmene *Rhodotorula kratochvilovae*, u ergosterolu a ubichinonu byly zjištěny až dvojnásobné hodnoty pro RM-5HM (5,3 mg/g) v porovnání s RK-5HM (2,6 mg/g).



Graf 6: grafické znázornění vybraných metabolitů v miligramech na gram biomasy pro kmen *Rhodotorula mucilaginosa*

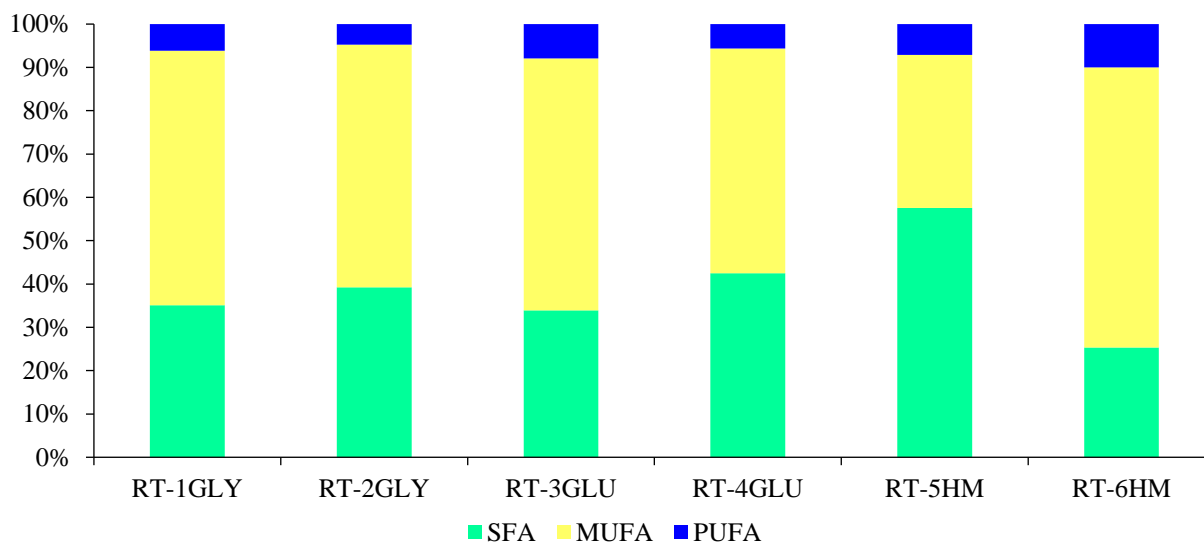
5.2.3 Kmen *Rhodotorula toruloides*

Kultivace kmene *Rhodotorula toruloides* vykazovala dosud nejnižší výsledky biomasy (viz Graf 7). Pro produkční médium RT-6HM bylo zjištěno 9,1 gramů biomasy na litr, zatímco u RM-6HM to bylo 10,25 g/l a pro RK-6HM dokonce 11,35 g/l. Na rozdíl od předchozích kmenů zde dochází k většímu nárůstu biomasy u médií s glycerolem, kdežto například u kmene *Rhodotorula kratochvilovae* byl sledován větší nárůst pro média s glukózou. Ačkoliv množství biomasy je stále větší pro RT-6HM proti RT-5HM, u procentuálního zastoupení lipidů v biomase lze pozorovat velký nárůst pro médium RT-5HM. U kmene *Rhodotorula kratochvilovae* bylo pro RM-6HM zjištěno 7,8 % lipidů v biomase, tato hodnota odpovídá i pro médium RT-6HM. Médium RM-5HM mělo procentuální zastoupení lipidů 5,2 %, u RT-5HM je to již 10,7 %. Nejvyšší procentuální zastoupení bylo dosaženo u média RT-2GLY. Z dat lze tedy vyčíst, že nižší množství glycerolu má pozitivní vliv jak na celkové množství biomasy, tak na procentuální zastoupení lipidů v biomase.



Graf 7: grafické znázornění množství produkované biomasy v gramech na liter a procentuální zastoupení lipidů v biomase pro kmen *Rhodotorula toruloides*

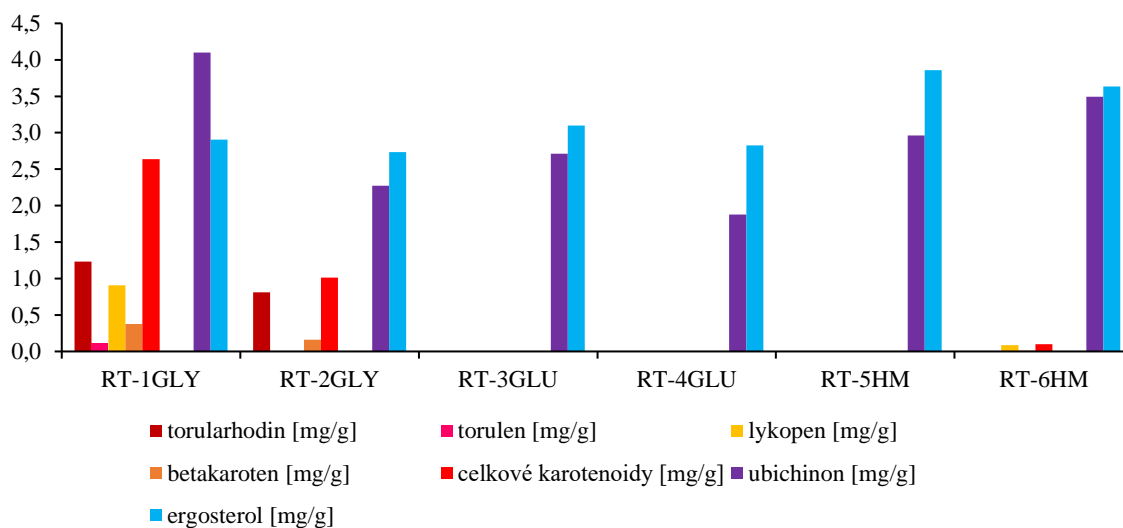
Zatímco pro předchozí kmeny (viz Graf 2 a Graf 5) byly pro produkční média s označením 1GLY, 2GLY a 5HM pozorovány vyšší hodnoty PUFA než pro ostatní média, u kmene *Rhodotorula toruloides* (viz Graf 8) nebyl v zastoupení PUFA sledován signifikantní rozdíl v rámci jednotlivých médií. Nejvyšší hodnota MUFA byla pro RT-6HM 65 %, tedy došlo k mírnému poklesu zastoupení MUFA ve prospěch SFA ve srovnání s kmenem *Rhodotorula mucilaginosa*. Ve srovnání s kmenem *Rhodotorula kratochvilovae* jsou však hodnoty MUFA vyšší. U produkčního média RT-5HM byla zjištěna dosud nejvyšší hodnota procentuálního zastoupení SFA, která odpovídá 58 %.



Graf 8: grafické znázornění procentuálního zastoupení nenasycených mastných kyselin (SFA), mononenasycených mastných kyselin (MUFA) a polynenasycených mastných kyselin (PUFA) pro kmen *Rhodotorula toruloides*

Z hlediska celkového množství karotenoidů byl sledován signifikantní pokles pro glukózová média i média s hydrolyzátem mláta proti předchozím použitým kmenům (Graf 9). Pro kmen *Rhodotorula toruloides* byly karotenoidy stanoveny pouze pro RT-6HM (0,1 mg/g) a média s glycerolem, přičemž u RM-6HM bylo stanoveno 1,0 mg/g a pro RK-6HM 1,6 mg celkových karotenoidů na gram biomasy. Došlo však nárůstu množství ergosterolu u médií s obsahem hydrolyzáta mláta v porovnání s kmenem *Rhodotorula mucilaginosa* (RT-5HM obsahovaly 3,9 mg/g, RM-5HM 2,6 mg/g), avšak

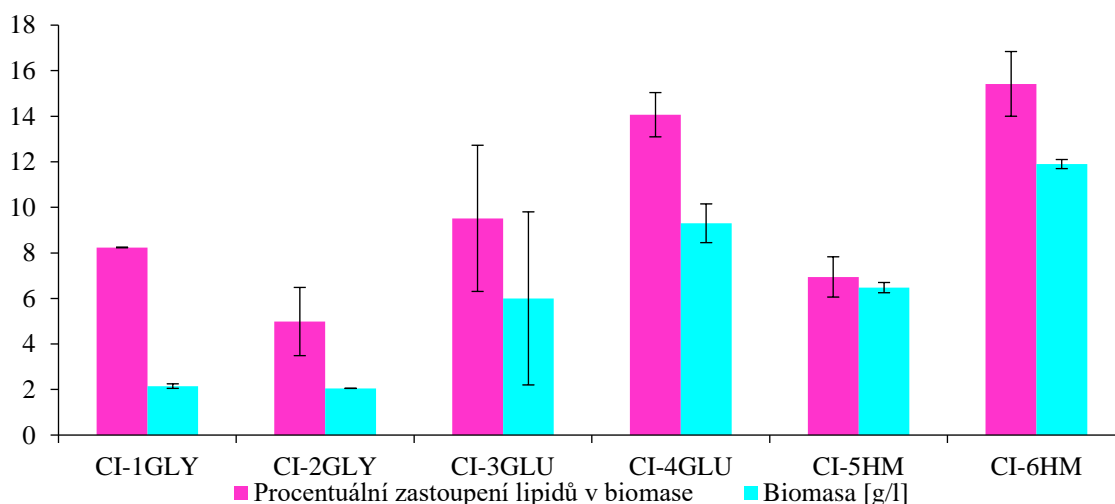
množství ubiquinonu proti kultivaci za použití kmene *Rhodotorula mucilaginosa* u médií s přidavkem hydrolyzátu mláta kleslo (pro RM-5HM 5,26 mg/g, pro RT-5HM 3,86 mg/g). Pro produkční médium RT-1GLY však bylo dosaženo dosud nejlepších výsledků v celkovém množství karotenoidů (2,64 mg/g).



Graf 9: grafické znázornění vybraných metabolitů v miligramech na gram biomasy pro kmen *Rhodotorula toruloides*

5.2.4 Kmen *Cystofilobasidium infirmominiatum*

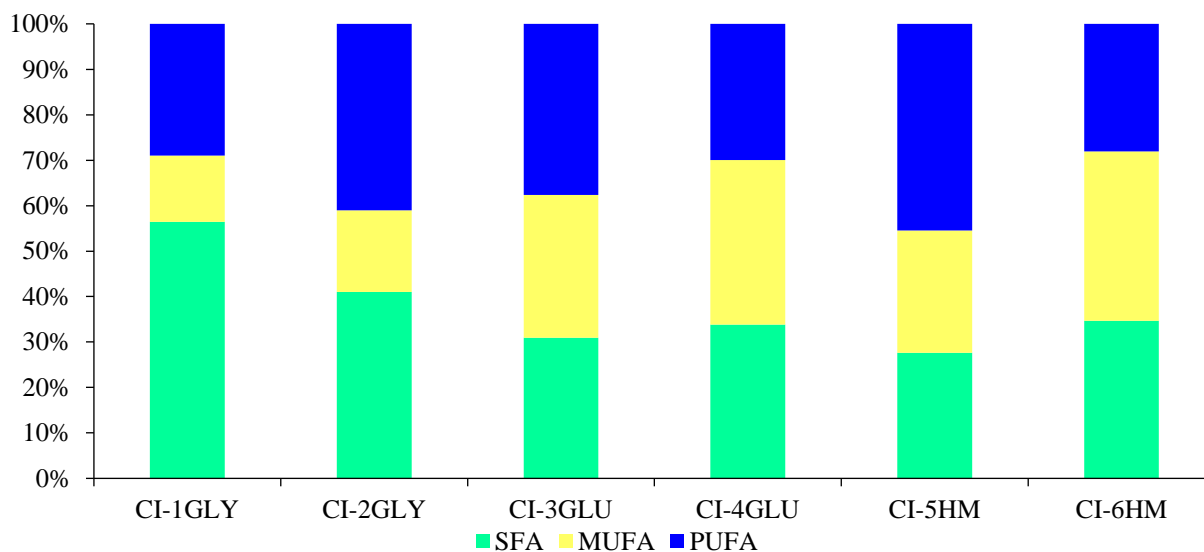
Z grafického znázornění nárůstu biomasy pro kmen *Cystofilobasidium infirmominiatum* (Graf 10) je zřejmé, že glycerol není vhodný uhlíkatý zdroj pro tento kmen. Nárůst biomasy u CI-1GLY dosahoval pouze 2,15 g/l. U CI-6HM bylo množství biomasy 11,9 g/l, což je větší hodnota než u RT-6HM i RM-6HM. Pro tuto kultivaci se jednalo o největší nárůst biomasy. Zároveň byl pro toto produkční médium zaznamenán největší procentuální podíl lipidů v biomase, který odpovídal 15,42 %. Nejen že se jedná o nejvyšší hodnotu z této kultivace, ale je to zároveň nejvyšší dosažená hodnota ze všech dosavadních kultivací



Graf 10: grafické znázornění množství produkované biomasy v gramech na litr a procentuální zastoupení lipidů v biomase pro kmen *Cystofilobasidium infirmominiatum*

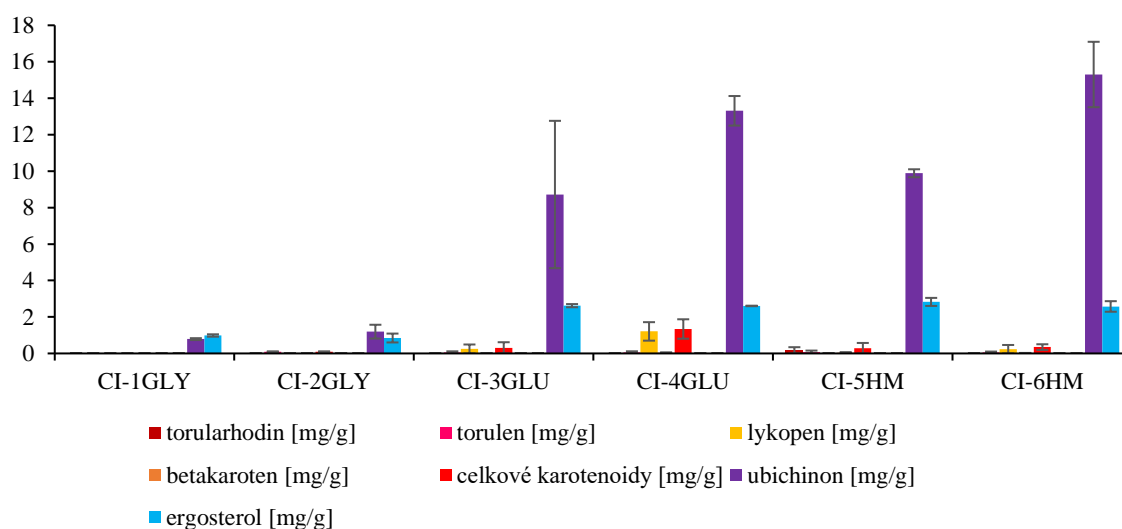
Pro kultivace kmenů rodu *Rhodotorula* bylo typické vysoké zastoupení MUFA. Jak vypovídá Graf 11, pro kmen *Cystofilobasidium infirmominiatum* bylo zjištěno spíše větší zastoupení SFA a PUFA.

Největší zastoupení SFA bylo u média CI-1GLY (56 %). Největší zastoupení PUFA bylo u CI-5HM (45 %), u média CI-6HM bylo naopak nejvíce MUFA (37 %).



Graf 11: grafické znázornění procentuálního zastoupení nenasycených mastných kyselin (SFA), mononenasycených mastných kyselin (MUFA) a polynenasycených mastných kyselin (PUFA) pro kmen *Cystofilobasidium infirmominatum*

Grafické znázornění sledovaných metabolitů (viz Graf 12) ještě potvrzuje, že na médiích s glycerolem nejen, že nedochází k nárůstu biomasy v takovém množství, jako je tomu u ostatních produkčních médií této kultivace, ale také, že biomasa obsahovala zanedbatelné množství karotenoidů a pouze malé množství ergosterolu a ubichinonu. U ostatních produkčních médií bylo dosažené množství celkových karotenoidů menší, nejvyšší hodnota byla naměřena pro médium CI-4GLU a odpovídala 1,34 mg/g biomasy, zatímco u předchozích kultivací byly vždy nejvyšší hodnoty větší než 2 mg/g. Poprvé však dochází k zaznamenání tak vysokých hodnot pro ubichinon. Nejvyšší hodnota pro ubichinon dosahuje 15,3 mg/g pro médium CI-6HM.

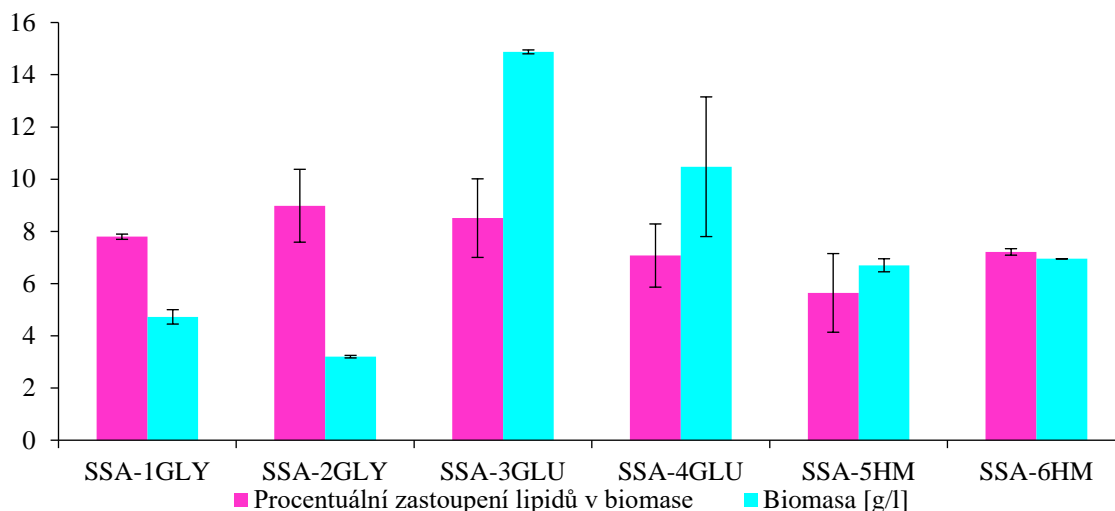


Graf 12: grafické znázornění vybraných metabolitů v miligramech na gram biomasy pro kmen *Cystofilobasidium infirmominatum*

5.2.5 Kmen *Sporidiobolus salmonicolor*

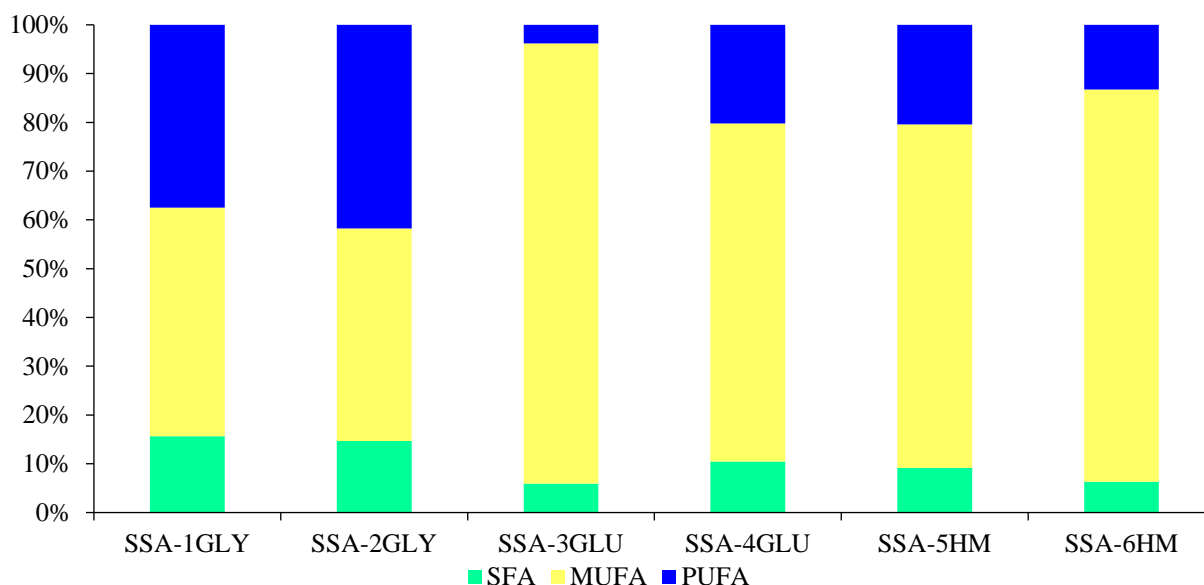
U kultivace kmene *Sporidiobolus salmonicolor* se poprvé ze všech dosavadních kultivací objevuje hodnota biomasy blízká se 15 g/l, která byla dosažena u média SSA-3GLU (viz Graf 13). Nejnižší

výsledky množství produkované biomasy byly naměřeny podobně jako u kmene *Cystofilobasidium infirmominiatum* na médiích s glycerolem jako uhlíkatým zdrojem. V porovnání s glukózovými médii byly však nízké výsledky naměřeny i u médií s hydrolyzátem mláta. Nehledě však na výsledky množství produkované biomasy, procentuální zastoupení lipidů v biomase bylo v rámci této kultivace rozdílné jen málo. Nejnižší výsledek byl naměřen u SSA-5HM s hodnotu 5,6 %, u ostatních medií byly výsledky v rozmezí 7,1 až 9,0 %.



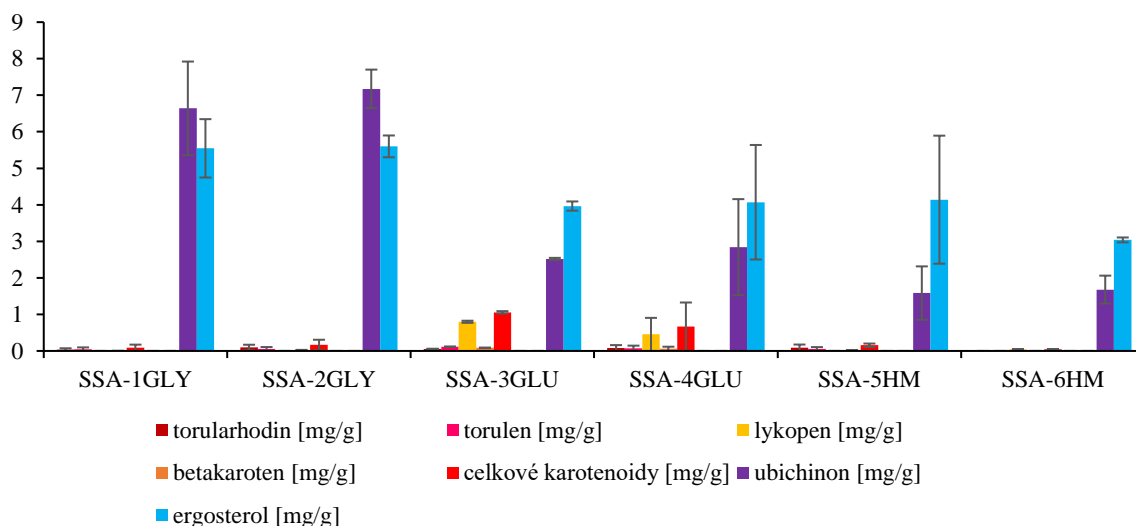
Graf 13: grafické znázornění množství produkované biomasy v gramech na litr a procentuální zastoupení lipidů v biomase pro kmen *Sporidiobolus salmonicolor*

U procentuálního zastoupení mastných kyselin (Graf 14) lze sledovat podobně jako u kmenů rodu *Rhodotorula* největší podíl MUFA. Pro médium SSA-3GLU se jedná dokonce o více než 90 %. U produkčních medií dosahují hodnoty MUFA 70 % pro SSA-5HM, respektive 80 % pro SSA-6HM. Zvýšení procentuálního zastoupení MUFA bylo především na úkor SFA, které dosahují nejvyššího zastoupení 15,6 % u média SSA-1GLY. Zastoupení PUFA je proti kmenu *Cystofilobasidium infirmomoniatum* nižší, více se podobá spíše procentuálnímu zastoupení u kmenů rodu *Rhodotorula*. Zastoupení PUFA je proti kmenu *Cystofilobasidium infirmomoniatum* nižší, s výjimkou u glycerolových medií, kde dosahují srovnatelných zastoupení, více se podobá spíše procentuálnímu zastoupení u kmenů rodu *Rhodotorula*.



Graf 14: grafické znázornění procentuálního zastoupení nenasycených mastných kyselin (SFA), mononenasycených mastných kyselin (MUFA) a polynenasycených mastných kyselin (PUFA) pro kmen *Sporidiobolus salmonicolor*

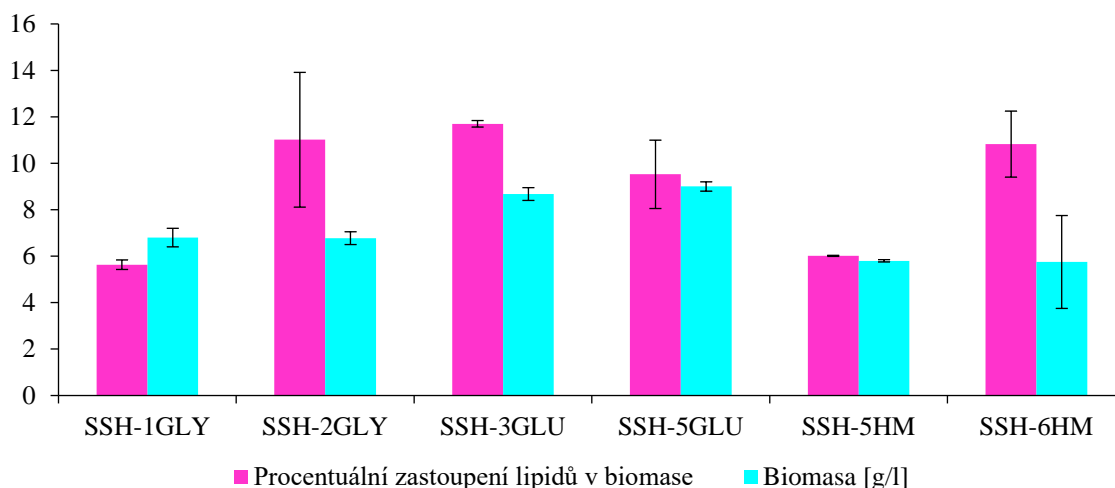
Celkové karotenoidy byly u kmene *Sporidiobolus salmonicolor* pozorovány jen v malém množství, nejvíce na médiích s glukózou (viz Graf 15). Je pozoruhodné, že ačkoliv množství produkované biomasy bylo u médií s glycerolem nízké, biomasa obsahovala největší množství ergosterolu a ubichinonu ze všech produkčních médií této kultivace. Produkční média s glukózou a hydrolyzátem mláta sice obsahují malé množství karotenoidů, ergosterol a uchinon, v porovnání s médii u kmene *Cystofilobasidium infirmominiatum*, jedná se ovšem o malé výtěžky. U média CI-6HM bylo změřeno 15,3 mg ubichinonu na gram biomasy, kdežto u SSA-6HM bylo naměřeno pouze 1,7 mg/g.



Graf 15: grafické znázornění vybraných metabolitů v miligramech na gram biomasy pro kmen *Sporidiobolus salmonicolor*

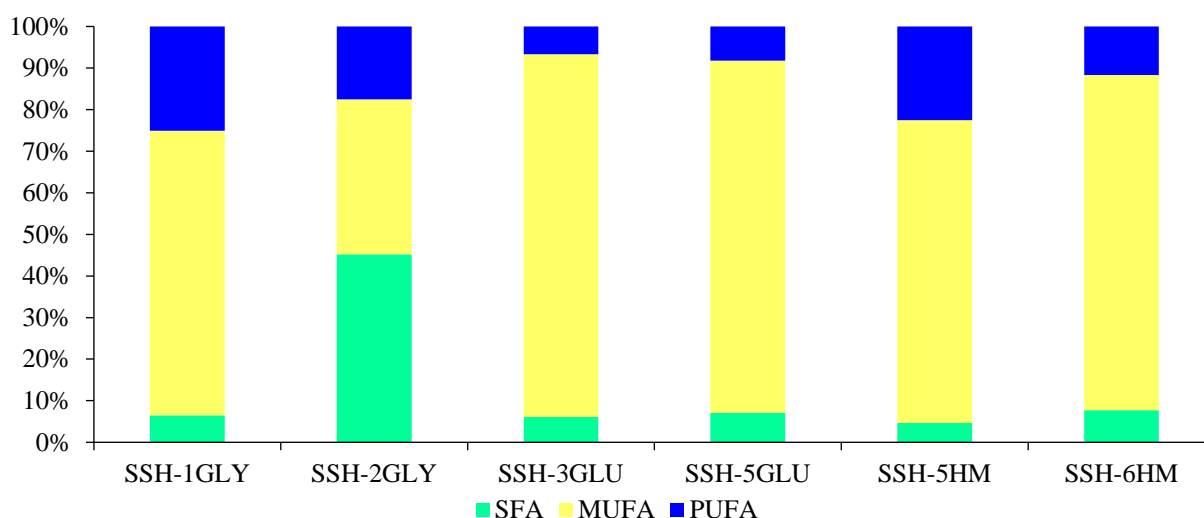
5.2.6 Kmen *Sporobolomyces shibatanus*

Na médiích s hydrolyzátem mláta u kmene *Sporobolomyces shibatanus* bylo zaznamenáno množství biomasy shodně 5,8 g/l (Graf 16). Tyto výsledky se ze všech kultivací řadí k těm nejhorším. Média s glycerol i média s glukózou v tomto případě vykazovala vyšší výsledky. Procentuální zastoupení lipidů v biomase bylo nejvyšší u SSH-3GLU, kde bylo naměřeno 11,7 %.



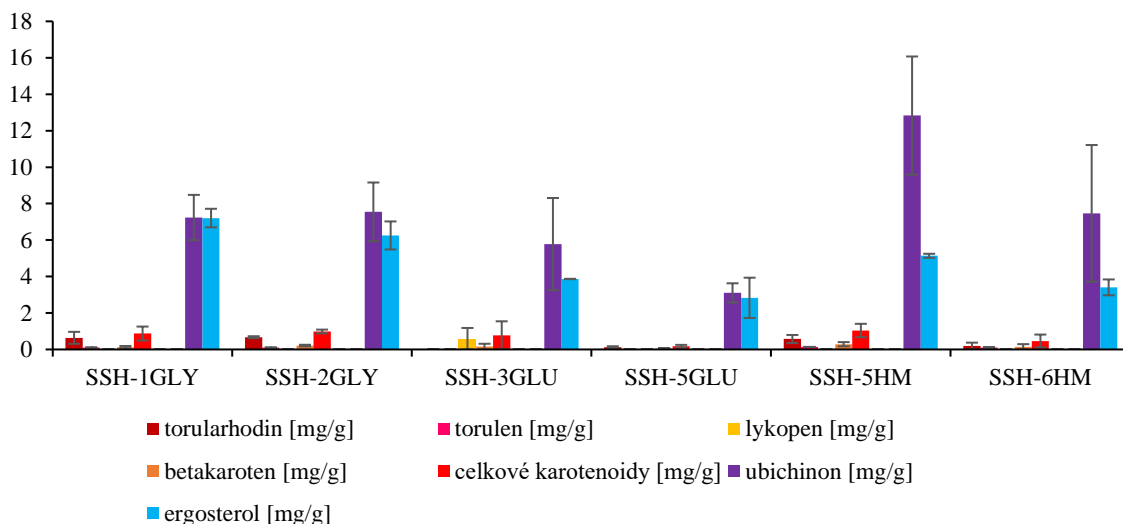
Graf 16: grafické znázornění množství produkované biomasy v gramech na litr a procentuální zastoupení lipidů v biomase pro kmen *Sporobolomyces shibatanus*

Oproti ostatní kmenům můžeme u kmene *Sporobolomyces shibatanus* pozorovat velmi nízké zastoupení SFA u všech produkčních médií kromě SSH-2GLY (viz Graf 17). Převládají MUFA, které pro glukózová média a média s mlátem představují 70 až 87 %.



Graf 17: grafické znázornění procentuálního zastoupení nenasycených mastných kyselin (SFA), mononenasycených mastných kyselin (MUFA) a polyenasycených mastných kyselin (PUFA) pro kmen *Sporobolomyces shibatanus*

Podobně jako tomu bylo u kmene *Cystofilobasidium infirmominatum* a *Sporidiobolus salmonicolor*, i u kmene *Sporobolomyces shibatanus* jsou výsledky celkových karotenoidů nízké. Nejvyšší hodnota (1 mg/g) byla naměřena u médií SSH-2GLY a SSH-5HM (viz Graf 18). Podobně jako u kmene *Sporidiobolus salmonicolor* se hodnoty ubichinonu na glycerolových médií pohybují okolo 7 mg/g. Nejvyšší hodnota ubichinonu byla naměřena u média SSH-5HM, kde bylo stanoveno 12,8 mg/g ubichinonu. Množství ubichinonu i ergosterolu je pro obě média s hydrolyzátem mláta větší, než tomu bylo u kmene *Sporidiobolus salmonicolor*. Kmen *Sporobolomyces shibatanus* vykazuje také lepší výsledky u média 5HM než kmen *Cystofilobasidium infirmominiatum*. U CI-6HM bylo zaznamenáno větší množství ubichinonu, avšak množství ergosterolu bylo větší u SSH-6HM.

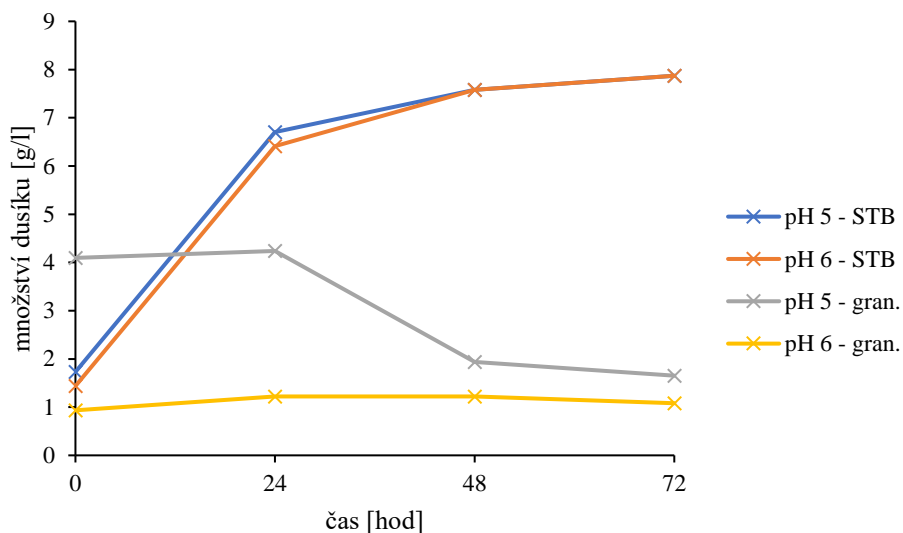


Graf 18: grafické znázornění vybraných metabolitů v miligramech na gram biomasy pro kmen *Sporobolomyces shibatanus*

Při kultivaci kmenů *Rhodotorula kratochvilovae*, *Rhodotorula mucilaginosa* a *Rhodotorula toruloides* sice nebyly hodnoty ubichinonu a ergosterolu tak velké, jako u kmenů *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Sporidiobolus salmonicolor* a *Sporobolomyces shibatanus*, zato však byly naměřeny lepší výsledky pro celkové karotenoidy.

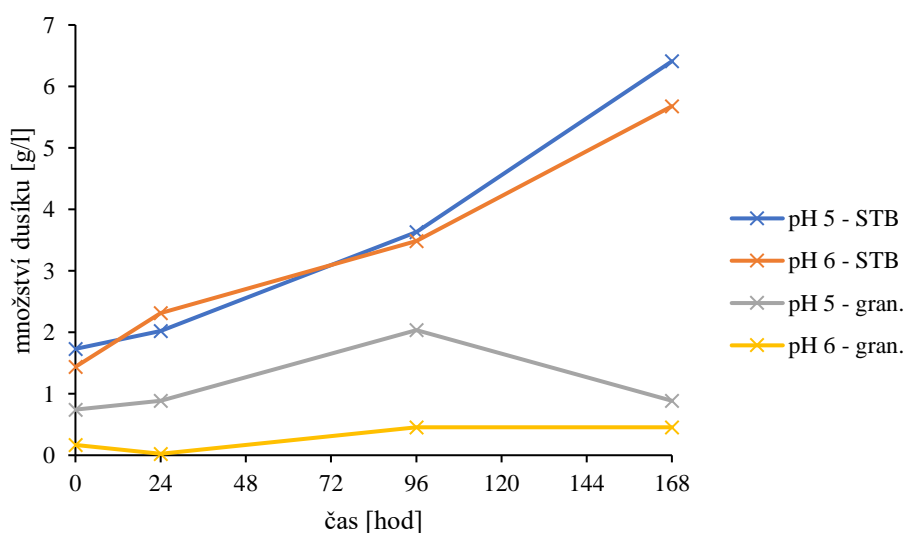
5.3 Příprava kvasničného extraktu

Příprava kvasničného extraktu byla zahájena screeningem. Čerstvé kvasnice a granulované kvasnice se rozsuspenderovaly v pufru o dvou rozdílných hodnotách pH. Experiment probíhal nejprve při teplotě 50 °C. Při této teplotě byly odebrány vzorky pro analýzu metodou dle Kjeldahla. Závislost množství dusíku na čase experimentu je vynesena v grafu níže (viz Graf 19). Čerstvé kvasnice měly na začátku experimentu rozdílné hodnoty celkového množství dusíku. Pro pH 5 byla hodnota větší než pro pH 6, tento stav byl dodržen také při analýze po 24 hodinách experimentu. Při analýze dalších vzorků bylo stanoveno stejné množství celkového dusíku při obou hodnotách pH. Největší nárůst množství celkového dusíku byl sledován v prvních 24 hodinách experimentu, přírůstek za dalších 24 hodin experimentu již nebyl tak patrný. Suspenze granulovaných kvasnic nevykazovala takový nárůst jako čerstvé kvasnice, množství dusíku se pro pH 6 po čas experimentu měnilo jen velmi málo, pro pH 5 celkové množství dusíku klesalo, což nebylo účelem experimentu.



Graf 19: Závislost množství dusíku na době trvání experimentu přípravy kvasničného extraktu při teplotě 50 °C, STB značí kvasničný extrakt z čerstvých kvasnic, gran. Značí kvasničných extrakt připravený z granulovaných kvasnic

Graf 20 znázorňuje závislost množství dusíku na čase experimentu při laboratorní teplotě. Předpokládalo se, že experiment bude mít pomalejší přírůstek, proto byl prováděn déle než experiment při teplotě 50 °C. Podobně jako u předchozí závislosti i zde jsou počáteční hodnoty pro čerstvé kvasnice větší než pro granulované kvasnice. U suspenze z čerstvých kvasnic pozorujeme pozvolný nárůst celkového množství dusíku. Po prvních 24 hodinách byl větší přírůstek pozorován u pH 6, další hodnoty však ukazují větší výtěžky při pH 5. V čase 168 hodin, tedy na konci experimentu, byly výsledky celkového množství dusíku srovnatelné s hodnotami po 24 hodinách experimentu při teplotě 50 °C. Výsledky pro suspenzi granulovaných kvasnic nebyly konzistentní a množství celkového dusíku stanoveného v kapalném podílu kolísalo. Podobně jako v experimentu při teplotě 50 °C ani zde, při laboratorní teplotě, není patrný signifikantní přírůstek na konci experimentu.



Graf 20: Závislost množství dusíku na době trvání experimentu při laboratorní teplotě, STB značí kvasničný extrakt z čerstvých kvasnic, gran. Značí kvasničných extrakt připravený z granulovaných kvasnic

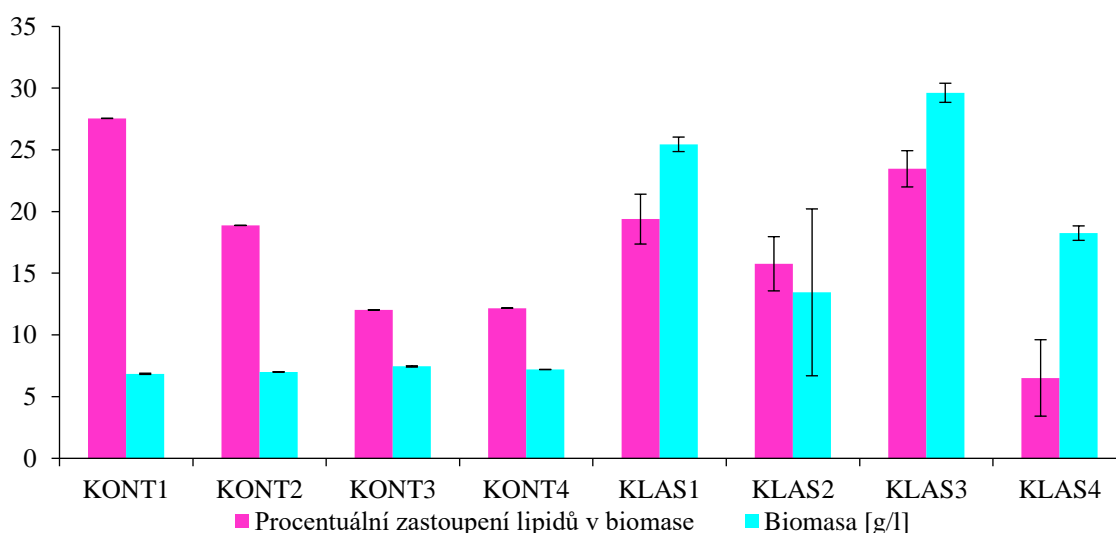
Na základě screeningu bylo zjištěno, že největší nárůst celkového množství dusíku je zaznamenáván v případě teplotě 50 °C a čase 24 hodin. Rozdíly mezi jednotlivými pH nebyly příliš patrné. Graf 19 vykazuje stejnou směrnici pro pH 5 i 6 pro čerstvé kvasnice v rozmezí 0 až 24 hodin, pro pH 6 je

však v následných časech zaznamenám ještě další nárůst, proto bylo pro další experiment vybráno pH 6. Pro granulované kvasnice bylo vybráno pH 5. Vzhledem k velmi nízkým a nekonzistentním výsledkům pro granulované kvasnice bylo pro přípravu kvasničného extraktu pro kultivace použito množství 20 hm. %. Výsledné množství dusíku v kvasničném extraktu z čerstvých kvasnic bylo $6,3 \pm 0$ g/l, pro kvasničný extrakt z granulovaných kvasnic to bylo $1,6 \pm 0,3$ g/l.

5.4 Kultivace kmene *Rhodotorula toruloides* na produkčních médiích s přidavkem připraveného kvasničného extraktu

Pro screening kultivací za použití kvasničného extraktu byl vybrán kmen kaortenogenní kvasinky *Rhodotorula toruloides*, který je v současné době hojně používán v celé řadě experimentů, i v kultivacích za použití hydrolyzátu mláta vykazoval dobré výsledky z hlediska zkoumaných parametrů. Kultivace následujících produkčních médií za použití připravených kvasničných extraktů byla provedena za stejných podmínek, aby bylo možné porovnat jednotlivé sledované ukazatele.

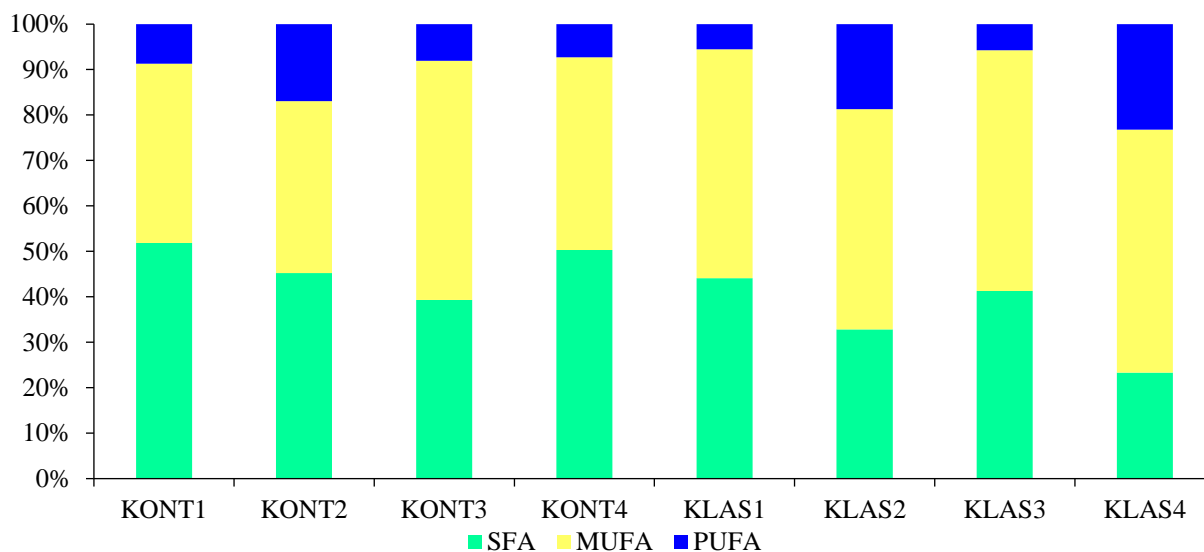
Jak je však vidět na grafu níže (viz Graf 21), který srovnává použití stejných médií jako Graf 1 a klasického média s třetinovým množstvím dusíku, výsledky celkové biomasy pro standardní médium se standardním množstvím dusíku (médiá s označením KLAS) jsou vyšší než při použití trojnásobného množství dusíku z více různých zdrojů. Zde jde vidět, že nárůst biomasy při trojnásobném množství dusíku (označení KONT v Graf 21) se pohybuje okolo 7 g/l, v Graf 1 bylo množství biomasy v rozmezí 7 až 12 g/l. Při této kultivaci byl narozdíl od první kultivace kmene *Rhodotorula toruloides* zaznamenám větší procentuální zastoupení lipidů v produkované biomase. V médiu KONT1 bylo zaznamenáno vůbec největší zastoupení lipidů v biomase z grafického znázornění (viz Graf 21), kde hodnota dosahovala 27,55 %. Největší množství biomasy bylo zaznamenáno i média KLAS3, kde uhlíkatým zdrojem byla glukóza (29,6 g/l) (viz Tabulka 4), avšak i u média KLAS2, které mělo z médií označených KLAS nejmenší nárůst biomasy (13,45 g/l) lze pozorovat lepší výsledky, než pro média KONT.



Graf 21: grafické znázornění množství produkované biomasy v gramech na litr a procentuální zastoupení lipidů v biomase pro srovnávací médium a klasické médium

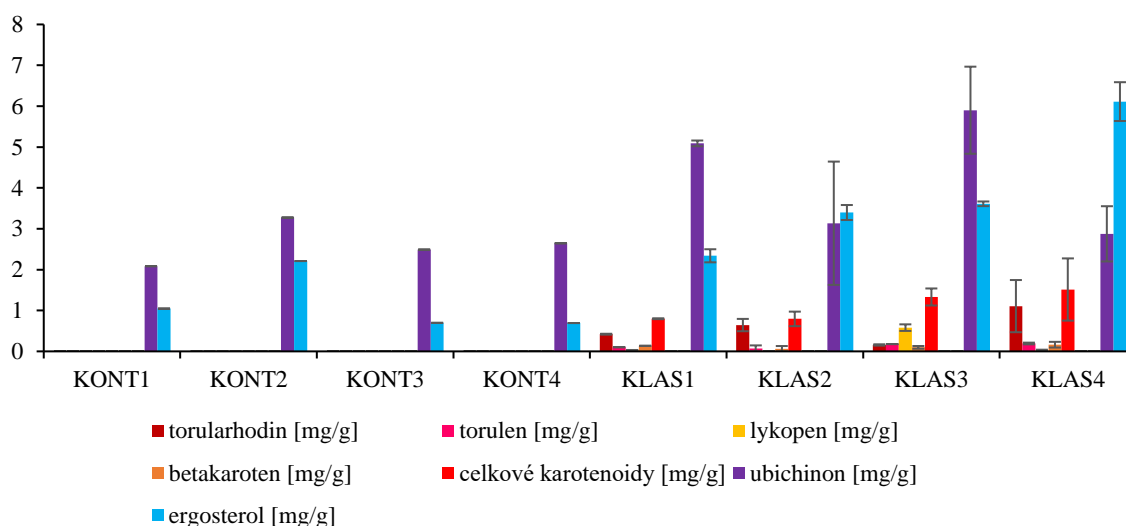
Na rozdíl od první kultivace kmene *Rhodotorula toruloides* (viz Graf 2) je v níže uvedeném grafickém srovnání (viz Graf 22) sledován větší podíl SFA na úkor nižšího podílu MUFA u médií s označením KONT. Mezi médii uvedenými v grafickém znázornění je vidět rozdíl médií srovnávacích (označení KONT), které mají podíl SFA v rozmezí 40 až 52 %, zatímco standardní médium (označení KLAS) dosahuje procentuálního zastoupení SFA v rozmezí 23 až 44 %. Zastoupení MUFA je

v tomto grafu u všech médií v rozmezí 38 až 53 %, zatímco v první kultivaci (viz Graf 2) v rozmezí 52 až 59 %.



Graf 22: grafické znázornění procentuálního zastoupení nenasycených mastných kyselin (SFA), mononenasycených mastných kyselin (MUFA) a polynenasycených mastných kyselin (PUFA) pro srovnávací médium a klasické médium

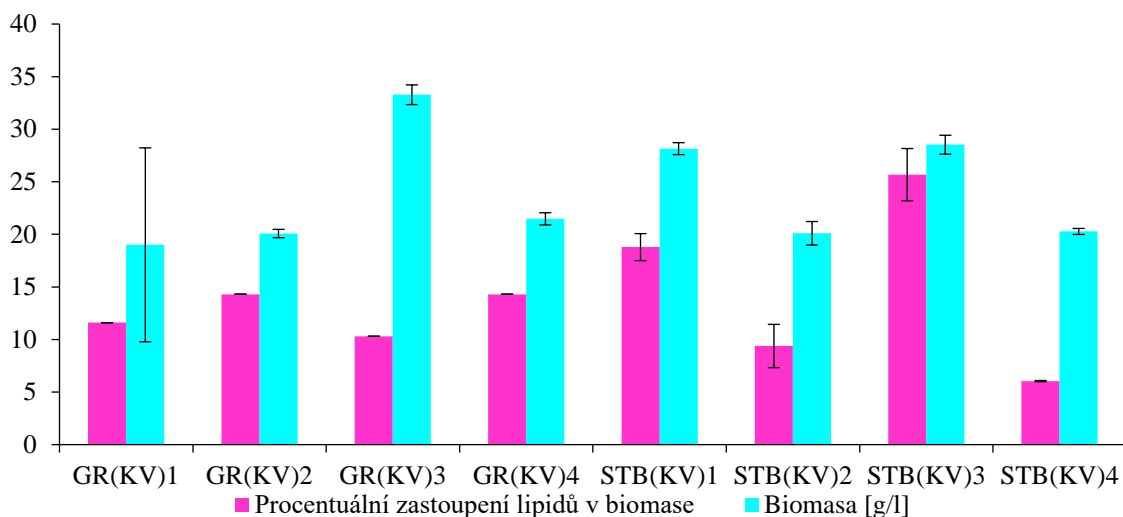
Z hlediska sledovaných metabolitů (viz Graf 23) jsou výsledky pro klasické médium lepší než pro srovnávací médium. U srovnávacího média nebyly změřeny žádné karotenoidy, což ovšem neodpovídá výsledkům z grafického znázornění metabolitů z první kultivace kmene *Rhodotorula toruloides* (viz Graf 3), kde bylo v glycerolových a glukózových médiích naměřeno 1 až 2,6 mg/g celkových karotenoidů. Množství ubichinonu v porovnání s první kultivací odpovídá naměřeným výsledkům v grafu níže (viz Graf 23). Pro klasické médium, které bylo kultivováno za stejných podmínek jako médium srovnávací, byly naměřeny výsledky sledovaných metabolitů větší. Nejvíce celkových karotenoidů bylo naměřeno pro médium KLAS4, kde hodnota byla 1,5 mg/g.



Graf 23: grafické znázornění vybraných metabolitů v miligramech na gram biomasy pro srovnávací médium a klasické médium

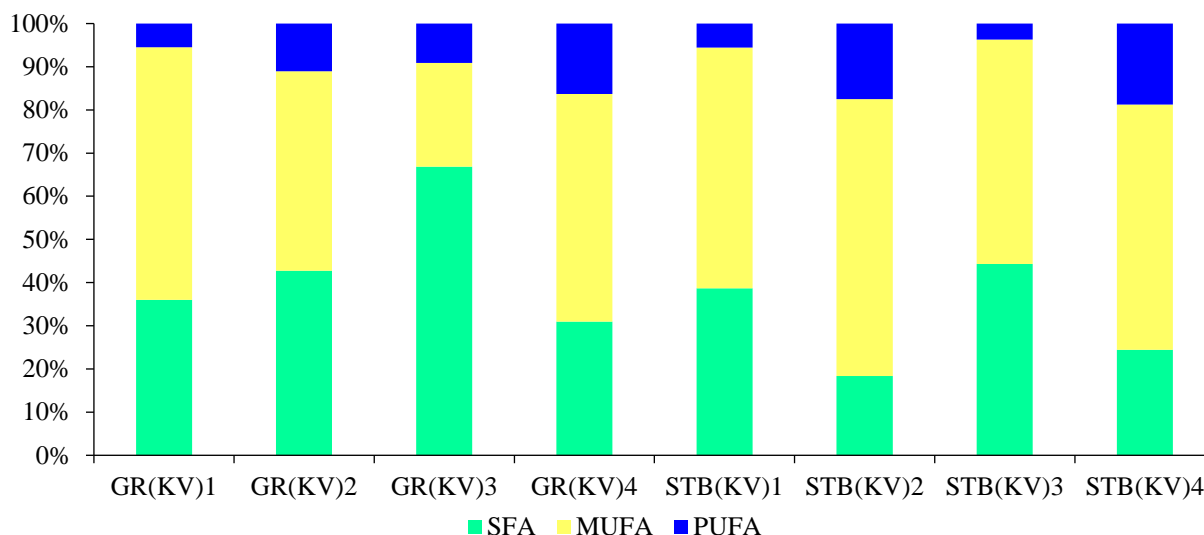
Glukóza jako uhlíkatý zdroj vykazovala největší celkovou biomasu v následujícím grafickém znázornění (viz Graf 24), jelikož největší hodnota 33 g/l byla zjištěna pro kultivaci za použití glukózy a kvasničného extraktu z granulovaných kvasnic (médium GR(KV)3) a při použití kvasničného extraktu z čerstvých pивní kvasnic byla největší hodnota 29 g/l taktéž

pro glukózu (médium STB(KV)3). Médium GR(KV)3 tak vykazovalo větší množství biomasy než médium KLAS3, které obsahovalo komerční kvasničný autolyzát. Médium STB(KV)3 také vykazuje 25,7 % lipidů v biomase, což je největší hodnota níže uvedeného grafického znázornění. V médiu GR(KV)3 byly lipidy zastoupeny pouze ve výši 10,3 %. Při použití kvasničného extraktu z granulovaných kvasnic jsou výsledky procentuálního zastoupení lipidů v biomase relativně konzistentní nehlédě na uhlíkatý zdroj média. Pohybují se v rozmezí 10 až 14 %. U médií s kvasničným extraktem z čerstvých pivních kvasnic lze pozorovat, že větší množství uhlíkatého zdroje v médiu, což odpovídá médiím označených STB(KV)2 a STB(KV)4 vedle k nižším výsledkům v procentuálním zastoupení lipidů v biomase.



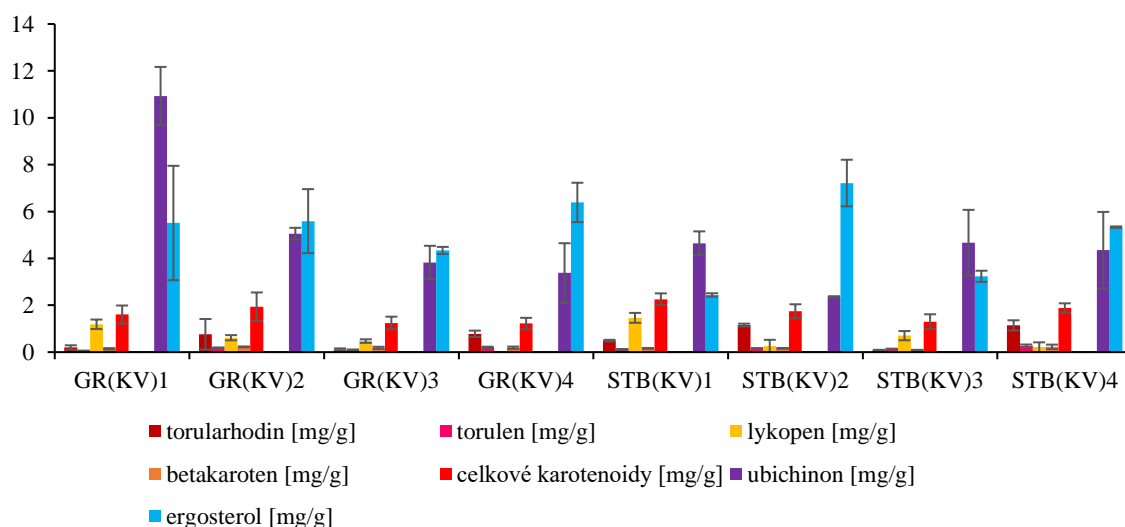
Graf 24: grafické znázornění množství produkované biomasy v gramech na liter a procentuální zastoupení lipidů v biomase pro médium obsahující kvasničný extrakt z granulovaných kvasnic, respektive z čerstvých kvasnic místo komerčního kvasničného autolyzátu

Médium GR(KV)3, které mělo relativně nízké zastoupení lipidů v biomase, avšak nejvyšší množství biomasy v gramech na liter, obsahovalo nejvíce SFA ze sady médií obsahujících připravený kvasničný extrakt namísto komerčního kvasničného autolyzátu (67 %) (viz Graf 25). Nejvíce MUFA obsahovalo produkční médium STB(KV)2 (64 %). Médium STB(KV)4 obsahovalo nejvíce zastoupené PUFA (19 %) z grafického znázornění níže, avšak ne více než médium KLAS4 (23 %) (viz Graf 22).



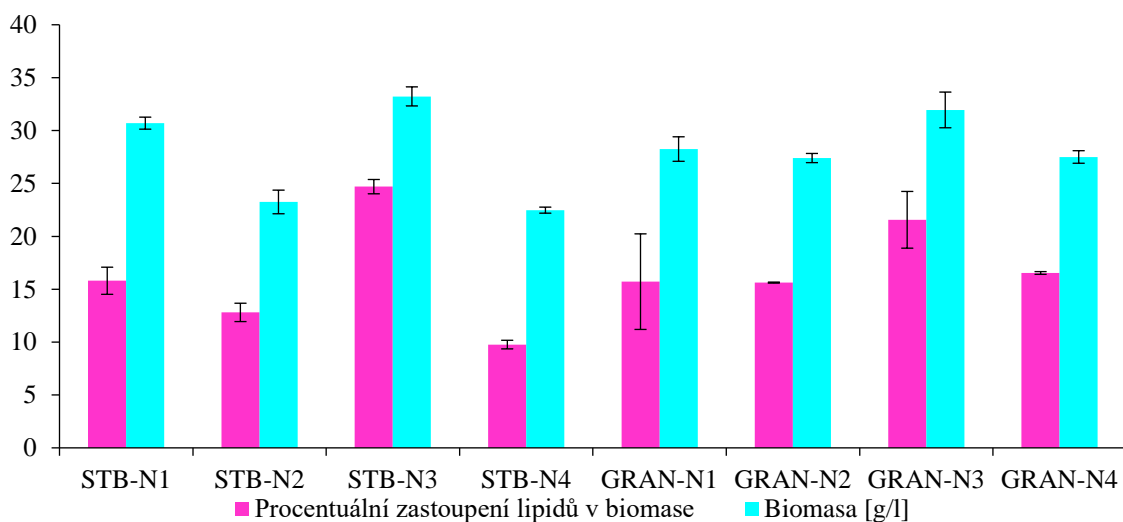
Graf 25: grafické znázornění procentuálního zastoupení nenasycených mastných kyselin (SFA), mononenasycených mastných kyselin (MUFA) a polynenasycených mastných kyselin (PUFA) pro médium obsahující kvasničný extrakt z granulovaných kvasnic, respektive z čerstvých kvasnic místo komerčního kvasničného autolyzátu

Nejvíce celkových karotenoidů bylo stanoveno v médiu STB(KV)1, kde hodnota byla více než 2,2 mg/g. Více celkových karotenoidů, než byly v médiu KLAS4 (viz Graf 23) bylo stanoveno v celkem 5 z následujících 8 produkčních médií (viz Graf 26). Méně než 1,5 mg/g celkových karotenoidů bylo stanoveno v médiích STB(KV)3, GR(KV)3 a GR(KV)4. Všechna tato média měla jako uhlíkatý zdroj glukózu. Z těchto dat tedy lze vyvodit, že glycerol se jeví v kombinaci s připravenými kvasničnými extrakty jako vhodné produkční médium pro produkci karotenoidů. Z hlediska množství ubichinonu bylo pouze médium GR(KV)3 vyhodnoceno lépe než klasické médium. Množství stanoveného ubichinonu v médiu GR(KV)3 bylo 10,9 mg/g, zatímco k média KLAS3 byla hodnota 5,9 mg/g. Z hlediska množství stanoveného ergosterolu v biomase si dobře vedla média STB(KV)2 a GR(KV)4, kde množství ergosterolu bylo stanoveno na 7,2 respektive 6,4 mg/g. Obě tyto hodnoty byly větší než množství ergosterolu v médiu KLAS4, kde hodnota byla 6,1 mg/g a představovala tak největší hodnotu množství ergosterolu z grafického znázornění výše (viz Graf 23)



Graf 26: grafické znázornění vybraných metabolitů v miligramech na gram biomasy pro médium obsahující kvasničný extrakt z granulovaných kvasnic, respektive z čerstvých kvasnic místo komerčního kvasničného autolyzátu

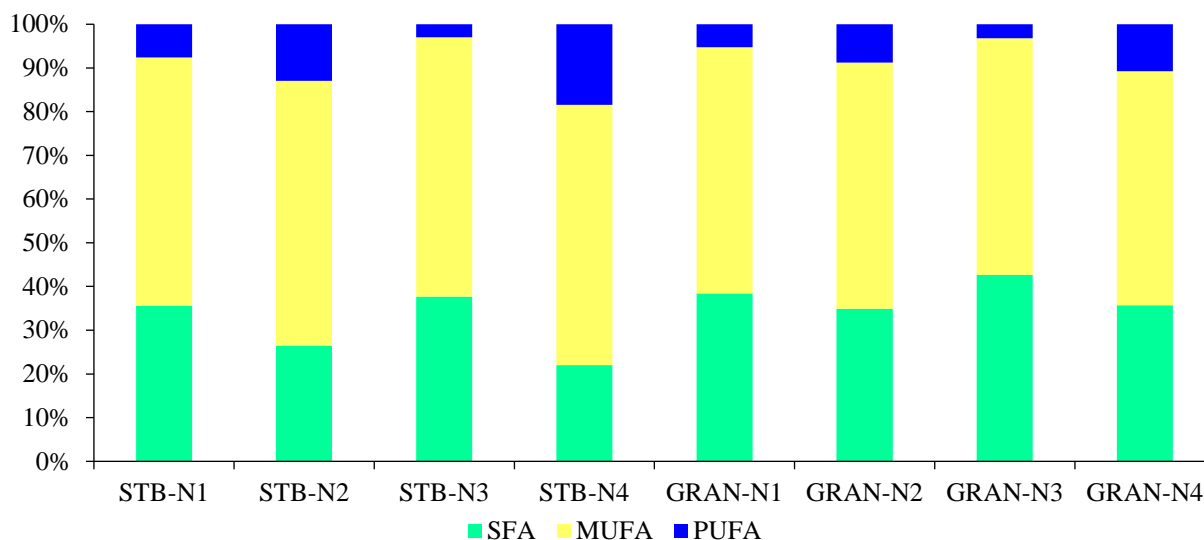
Grafické znázornění níže porovnává média s kvasničným extraktem z čerstvých pivních kvasnic, respektive z granulovaných pivních kvasnic, při použití v množství odpovídajícím celkovému dusíku v klasickém médiu. Nejvíce produkované biomasy z Graf 27 bylo u média STB-N3, kde uhlíkatým zdrojem tedy byla glukóza (33 g/l). Glycerol i glukóza ve vyšších C/N poměrech, což odpovídá médiím označených N1 a N3 pro jednotlivé kvasničné extrakty, vedly k větším výtěžkům celkové biomasy. Také procentuální zastoupení lipidů v biomase bylo největší pro STB-N3 a GRAN-N3. Média STB-N3, GRAN-N3 a STB-N1 vedly k většímu množství produkované biomasy než médium klasické KLAS3. Z hlediska procentuálního zastoupení lipidů v biomase médium STB-N3 také předčilo médium klasické KLAS3. Z těchto dat lze vyvodit, že nahrazení celkového dusíku pouze připraveným kvasničným extraktem vede k výsledkům lepším než při použití klasického produkčního média. Výsledky celkové biomasy média STB-N3 byly spolu s médiem GR(KV)3 nejvyšší dosud dosažené výsledky v rámci kultivací v druhé části práce, tedy při použití kvasničných extraktů. Procentuální zastoupení lipidů v biomase bylo po srovnání Graf 24 a Graf 27 největší u média STB(KV)3, kde byla hodnota 25,7 %, avšak médium STB-N3 dosahuje druhé nejvyšší hodnoty 24,7 %.



Graf 27: grafické znázornění množství produkované biomasy v gramech na litr a procentuální zastoupení lipidů v biomase pro kvasničný extrakt z čerstvých, respektive granulovaných kvasnic v množství zastupující všechny uhlíkaté zdroje

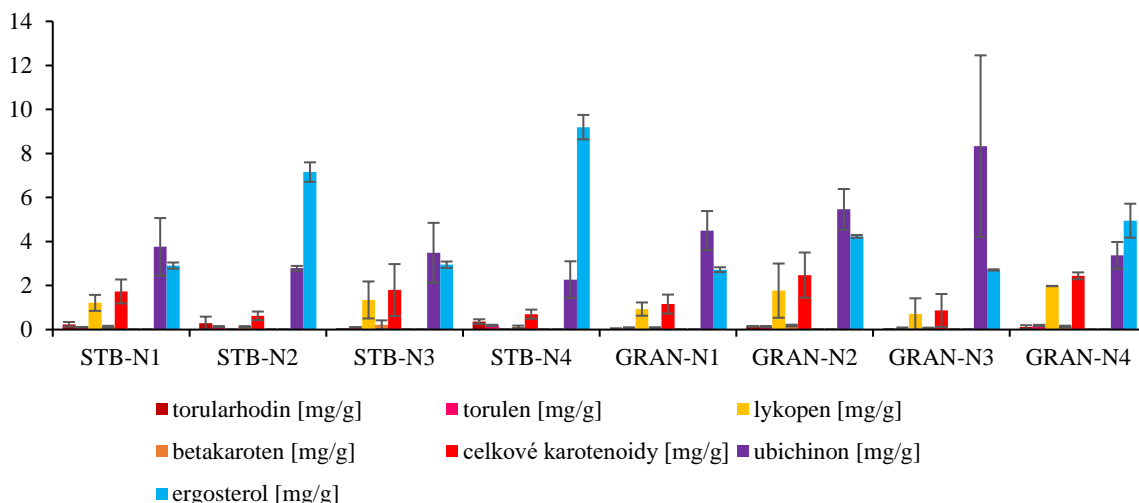
Graf 28 ukazuje procentuální zastoupení mastných kyselin v biomase. Nejvíce SFA bylo stanoveno u média GRAN-N3 (43 %), nejvíce MUFA u média STB-N2 (61 %) a nejvíce PUFA u média STB-N4 (18 %). Z dat vyplývá, že pokud je uhlíkatým zdrojem glukóza, dochází zpravidla k větší produkci SFA než je tomu u glycerolových médií. U všech médií znázorněných níže je

zastoupení MUFA v rozmezí 53 až 60 %, avšak při použití glycerolových produkčních médií dochází k většímu zastoupení PUFA na úkor SFA.



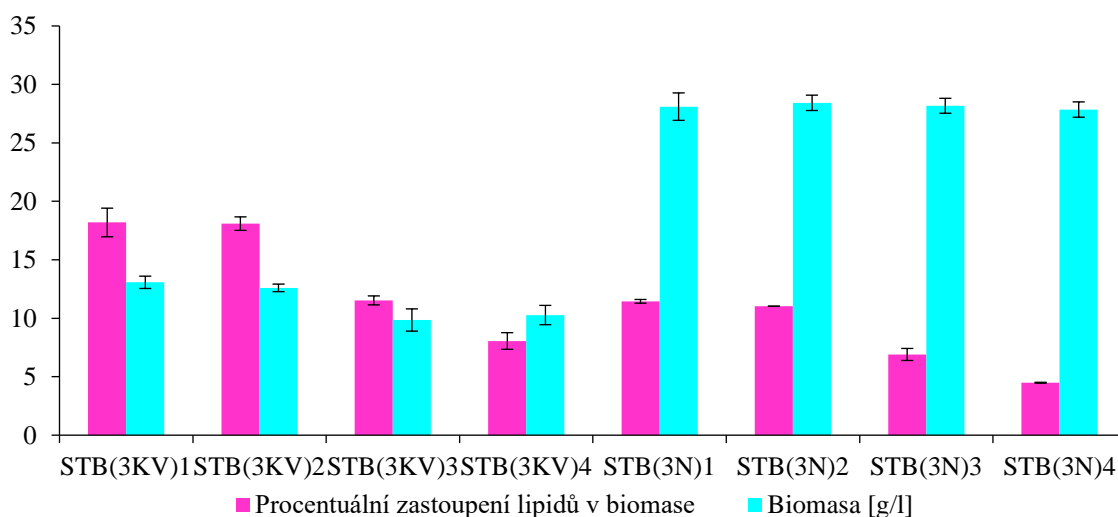
Graf 28: grafické znázornění procentuálního zastoupení nenasycených mastných kyselin (SFA), mononenasycených mastných kyselin (MUFA) a polynenasycených mastných kyselin (PUFA) pro kvasničný extrakt z čerstvých, respektive granulovaných kvasnic v množství zastupující všechny uhlíkaté zdroje

Nejvíce celkových produkovaných karotenoidů (viz Graf 29) bylo možné pozorovat u média GRAN-N2 a GRAN-N4, které mají 2,5 mg/g. Z médií při použití kvasničného extraktu z čerstvých pivních kvasnic si nejlépe co do produkovaných metabolitů vedly média STB-N3 a STB-N1, pro STB-N3 to bylo 1,8 mg/g a 1,7 mg/g pro STB-N1. Tedy zatímco přidání kvasničného extraktu z granulovaných kvasnic vedlo k většímu zisku karotenoidů v kombinaci s menším množstvím uhlíkatého zdroje, u kvasničného extraktu z čerstvých pivních kvasnic byly dosaženy vyšší výsledky celkových karotenoidů v kombinaci s vyšším množstvím uhlíkatého zdroje. Také při porovnání výsledků s Graf 26 lze vyvodit, že média GRAN-N2 a GRAN-N4 dosahují vyšší celkové produkce karotenoidů než média z grafu výše. Z hlediska produkce ubichinonu si vedla média označená GRAN lépe než média STB, jelikož dosažené množství bylo až 8,3 mg/g pro médium GRAN-N3. Naopak z hlediska ergosterolu se zdá médium STB-N4 nejvhodnější z médií znázorněných v Graf 29, zde bylo stanoveno množství 9,2 mg ergosterolu na gram biomasy. Jedná se zároveň o množství větší, než bylo zjištěno u médií z Graf 26, kde bylo největší množství ergosterolu u STB(KV)3 (7,2 mg/g), množství ubichinonu v médiu GRAN-N3 však není vyšší než hodnota 10,9 mg/g u média GR(KV)1.



Graf 29: grafické znázornění vybraných metabolitů v miligramech na gram biomasy pro kvasničný extrakt z čerstvých, respektive granulovaných kvasnic v množství zastupující všechny uhlikaté zdroje

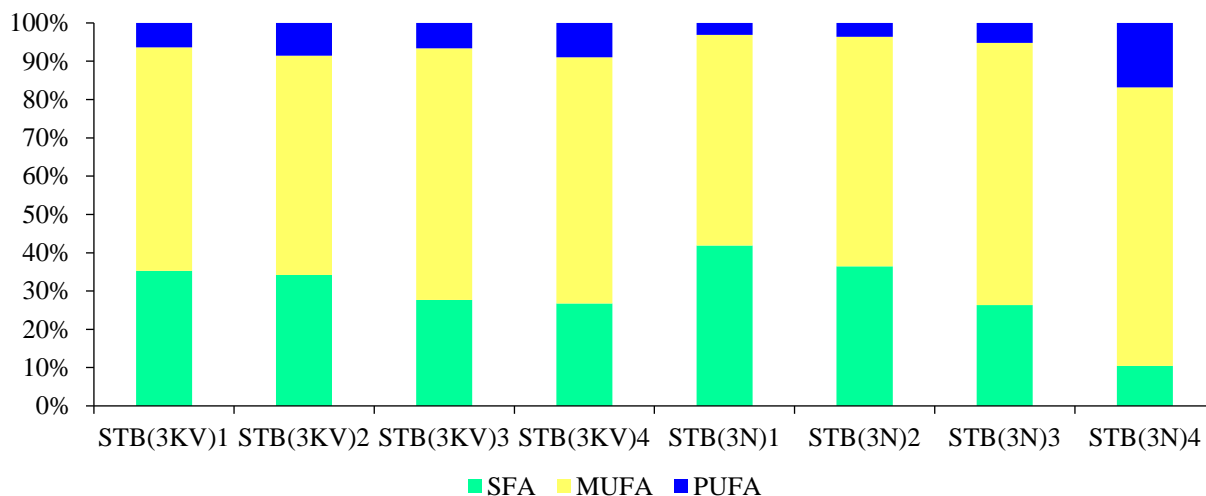
V následujícím grafu (viz Graf 30) je vidět porovnání média, kde byl komerční kvasničný autolyzát z média kontrolního nahrazen připraveným kvasničným extraktem z čerstvých pivních kvasnic (označeno jako STB(3KV)), a média, kde byl veškerý dusík nahrazen ekvivalentním množstvím kvasničného extraktu z čerstvých pivních kvasnic (označeno STB(3N)). Média STB(3KV) v porovnání s médii STB(3N) vedly k nižšímu zisku biomasy, která dosahovala nejvyšší hodnoty 13 g/l u média STB(3KV)1. Naopak u médií STB(3N) byly hodnoty v rozmezí 27,9 ž 28,3 g/l. Avšak procentuální zastoupení lipidů v biomase bylo nejvyšší u glycerolových médií STB(3KV)1 a STB(3KV)2. Přesto tyto hodnoty nejsou vyšší než hodnota 27,5 % u kontrolního média s komerčním kvasničným autolyzátém KONT1. Větší množství kvasničného extraktu, které odpovídá většímu množství celkového dusíku, dle výsledků nevede k většímu zisku celkové biomasy ani k většímu procentuálnímu zastoupení lipidů v dané biomase.



Graf 30: grafické znázornění množství produkované biomasy v gramech na liter a procentuální zastoupení lipidů v biomase pro kvasničný extrakt z čerstvých pivovarských kvasnic místo komerčního kvasničného autolyzáta za použití trojnásobného množství dusíku a místo všech zdrojů dusíku při použití trojnásobného množství dusíku

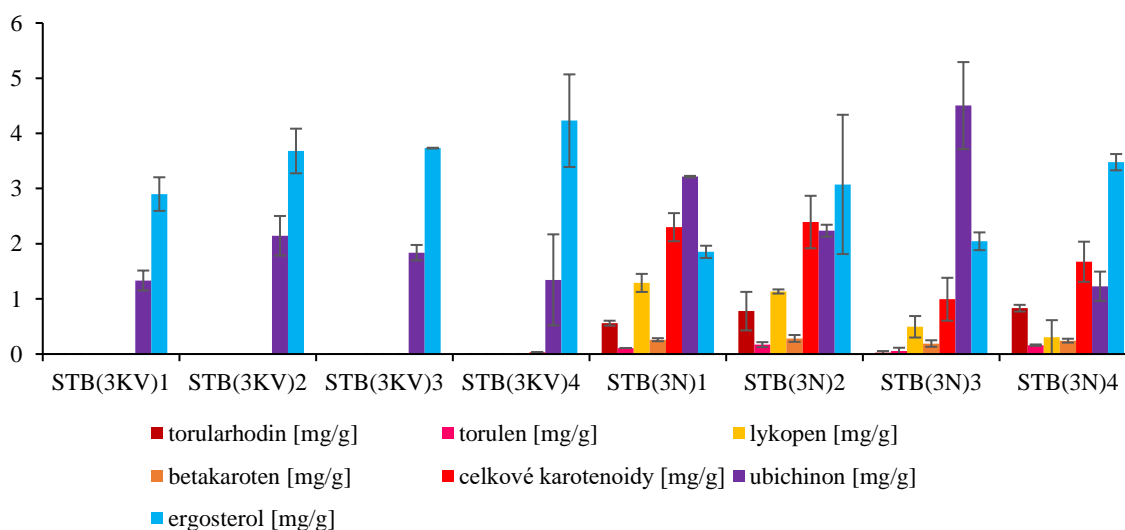
Jak je zobrazeno v grafu níže, největší podíl mastných kyselin představuje MUFA. MUFA představují u médií zobrazených v Graf 31 55 až 73 %, což je více než bylo stanoveno u kontrolních médií, kde se

hodnoty MUFA pohybovaly v rozmezí 38 až 53 %. Větší zastoupení MUFA v Graf 31 je na úkor SFA, které dosahují hodnot 10 až 42 %, zatímco u kontrolních médií představují 40 až 52 %.



Graf 31 grafické znázornění procentuálního zastoupení nenasycených mastných kyselin (SFA), mononenasycených mastných kyselin (MUFA) a polynenasycených mastných kyselin (PUFA) pro kvasničný extrakt z čerstvých pivovarských kvasnic místo komerčního kvasničního autolyzátu za použití trojnásobného množství dusíku a místo všech zdrojů dusíku při použití trojnásobného množství dusíku

Celkové karotenoidy se u médií STB(3KV)1, STB(3KV)2 a STB(3KV)3 nepodařilo stanovit (viz Graf 32), hodnota pro STB(3KV)4 je 0,03 mg/g, přičemž u médií STB(3N) byla nejnižší naměřené hodnota 1 mg/g u média STB(3N)3 a nejvyšší 2,4 mg/g u media STB(3N)2. U médií STB(3KV) se hodnoty ubichinonu pohybovaly v rozmezí 1,3 až 2,1 mg/g, nejvyšší množství ubichinonu bylo stanoveno v médiu STB(3N)3, které bylo rovno 4,5 mg/g. Ačkoliv média STB(3N) obsahují větší množství celkových karotenoidů i ubichinonu, u ergosterolu dosahují maximálně hodnoty 3 mg/g, médium STB(3KV)4 však dosahuje 4,3 mg ergosterolu na gram biomasy. Média STB(3N) mají v porovnání s médií KONT vyšší výsledky celkových karotenoidů. Z hlediska ubichinonu předčí kontrolní médium pouze médium STB(3N)3. Ergosterol je u všech médií zobrazených v Graf 32 vyšší než 1,9 mg/g, přičemž pouze kontrolní médium KONT2 dosahuje této hodnoty.



Graf 32: grafické znázornění vybraných metabolitů v miligramech na gram biomasy pro kmen kvasničný extrakt z čerstvých pivovarských kvasnic místo komerčního kvasničního autolyzátu za použití trojnásobného množství dusíku a místo všech zdrojů dusíku při použití trojnásobného množství dusíku

Ze všech výše uvedených médií v rámci kultivace druhé části práce, tedy za použití kvasničných extraktů, si z hlediska produkce celkové biomasy nejlépe vedla média GR(KV)3, STB-N3 a GRAN-N3, které dosáhly více než 32 g/l. Největší výtěžnost biomasy tedy byla pro kombinaci glukózy jako uhlíkatého zdroje spolu s kvasničným extraktem. Z hlediska procentuálního zastoupení lipidů v biomase bylo nejlepších výsledků dosaženo u médií STB(KV)3 (25,7 %) a STB-N3 (24,7 %). I v tomto případě se osvědčila kombinace většího množství glukózy, z dat vychází, že použití kvasničného extraktu z čerstvých kvasnic vede k většímu procentuálnímu zastoupení lipidů v produkované biomase. Celkové karotenoidy byly nejvíce produkovány médiem GRAN-N2, zde je tedy patrný rozdíl, který je způsobem použitým uhlíkatým zdrojem. Zatímco kombinace glukózy ve větším množství a kvasničného extraktu z granulovaných kvasnic vede k velkému množství biomasy, která je také relativně bohatá na lipidy, při použití glycerolu byly zjištěny lepší výsledky s ohledem na produkci karotenoidů, z nichž v největším množství byl produkován lykopen, dále pak torularhodin, torulen a beta-karoten. Množství ubichinonu bylo největší v biomase z média GR(KV)1, kde hodnota přesahovala 10,9 mg/g. Ubichinon tedy měl tendenci se objevovat spíše v biomase z produkčních médií s větším množstvím glycerolu či glukózy, avšak ergosterol se vyskytoval ve větším množství spíše u médií s menším množstvím uhlíkatého zdroje, nejvíce pak u média STB-N4.

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na nalezení vhodné metody předúpravy vedlejších produktů pivovarů a zkoumání jejich využití při kultivaci karotenogenních kvasinek. Experimentální část byla rozdělena na dvě části. První část byla zaměřena na předúpravu pivovarského mláta a sledování využití pivovarského mláta jako alternativního uhlíkatého zdroje. V rámci této části byly využívány vybrané druhy karotenogenních kvasinek: *Cystofilobasidium infirmominiatum* CCY 17-18-4; *Sporidiobolus salmonicolor* CCY 19-4-25; *Sporobolomyces shibatanus* CCY 19-9-6; *Rhodotorula kratochvilovae* CCY 20-2-26; *Rhodotorula mucilaginosa* CCY 20-7-31; *Rhodotorula toruloides* CCY 62-2-4. Zároveň se v této části experimentu využívalo kultivační médium, které nestandardně bylo složené z více rozdílných zdrojů dusíku v trojnásobném množství, konkrétně síranu amonného, dusičnanu sodného za přídavku kvasničného autolyzátu. Druhý oddíl experimentální části byl zaměřen na předúpravu pivovarských kvasnic a vytvoření kvasničného extraktu, který by mohl sloužit jako náhrada komerčně dostupného kvasničného autolyzátu. Kvasničný extrakt byl připraven z čerstvých pivovarských kvasnic odebraných z místního pivovaru a také z granulovaných pivovarských kvasnic. Oba připravené kvasničné extrakty byly následně přidány do produkčních médií jednak v množství místo kvasničného autolyzátu tak, aby bylo produkční médium obohaceno o ekvivalentní množství dusíku, dále pak v množství odpovídajícímu celkovému klasickému i trojnásobnému množství dusíku v minerálním kultivačním médiu. Kultivace byla provedena s využitím kmene karotenogenní kvasinky *Rhodotorula toruloides*. Pro všechna produkční média bylo využito stejné inokulum a stejné kultivační podmínky, díky tomu bylo možné porovnat všechna produkční média připravená v této části a srovnat sledované parametry se standardními médii.

V první části experimentu ze všech vybraných kmenů prokazoval nejvyšší produkci biomasy na produkčním médiu s obsahem hydrolyzátu mláta kmen *Cystofilobasidium infirmominiatum*. U média CI-6HM, kde byl obsah hydrolyzátu mláta 46,02 g/l, bylo stanoveno množství produkované biomasy na 11,9 g/l, přičemž v produkčním médiu s glukózou v množství shodně 46,02 g/l bylo stanoveno 9,3 g/l produkované biomasy. Největší množství produkované biomasy ze všech produkčních médií v první části experimentu bylo stanoveno u média SSA-3GLU, tedy pro kmen *Sporidiobolus salmonicolor*, u něhož byla hodnota ve výši 14,9 g/l. Biomasa produkovaná stejným kmenem na produkčním médiu s glycerolem v množství 46,02 g/l byla 2,05 g/l. Druhé největší stanovené množství biomasy v produkčním médiu s hydrolyzátem mláta bylo pro médium RK-6HM, tedy při použití kmene *Rhodotorula kratochvilovae*. Zde však narozdíl od produkčních médií kmene *Cystofilobasidium infirmominiatum* pozorujeme, že srovnávací médium s glukózou jako uhlíkatým zdrojem vykazuje větší produkci biomasy. Pro médium RK-6HM bylo stanoveno množství biomasy 11,35 g/l, pro médium RK-3GLU však 12,45 g/l. Médium CI-6HM dosahuje také ze všech produkčních médií z první části experimentu největší podíl lipidů v biomase, konkrétně 15,42 %. Média CI-5HM a CI-6HM vykazovaly ze všech produkčních médií s obsahem hydrolyzátu mláta největší podíl polynenasycených mastných kyselin. Karotenoidy byly nejvíce z médií s obsahem hydrolyzátu mláta vyprodukovány u RK-5HM. Hodnota celkových karotenoidů přesahovala 2 mg na gram biomasy. V rámci této kultivace vedlo i médium RK-6HM z hlediska množství karotenoidů v biomase k lepším výsledkům než kontrolní média s konvenčními uhlíkatými zdroji. V médiu RK-5HM byl nejvíce zastoupený lykopen v množství 1,2 mg/g, dále torularhodin představoval 0,6 mg/g a torulen 0,2 mg/g. Ergosterol byl nejvíce z médií s hydrolyzátem mláta vyprodukován u SSH-5HM, kde tvořil 5,1 mg/g, avšak při stejné kultivaci bylo při použití glycerolu dosaženo lepšího výsledku, konkrétně u média SSH-1GLY byl stanovena hodnota ergosterolu na 7,2 mg/g. Ubichinon u média CI-6HM tvořil 15,3 mg/g biomasy, jedná se o vůbec největší stanovené množství ubichinonu ze všech produkčních médií v první části. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že použití hydrolyzátu mláta vykazuje lepší výsledky, než klasické uhlíkaté zdroje především pro kmen *Cystofilobasidium infirmominiatum* a to především z hlediska výtěžnosti biomasy a také zisku ubichinonu. Dále výsledky naznačují za vhodnou kombinaci použití kmene *Rhodotorula kratochvilovae* na médiu 5HM, tedy s přídavkem hydrolyzátu mláta, jelikož jak je

zmíněno výše, celkové množství stanovených karotenoidů bylo větší při použití hydrolyzátu mláta jako uhlíkatého zdroje než při využití glycerolu či glukózy.

Kvasničný extrakt z čerstvých i granulovaných kvasnic byl v rámci pilotního experimentu připraven o 10 hm. % a dvou rozdílných teplotách, tedy při 50 °C a laboratorní teplotě. Na základě vzorků odebraných po čas experimentu a jejich analýzy metodou dle Kjeldahla pro stanovení celkového obsahu dusíku, byly stanoveny optimální podmínky pro přípravu kvasničného extraktu. Kvasničný extrakt byl připraven při teplotě 50 °C a čase 24 hodin. Jelikož byly během pilotního experimentu hodnoty celkového množství dusíku pro kvasničný extrakt z granulovaných kvasnic v porovnání s kvasničným extraktem z čerstvých kvasnic malé, byl kvasničný extrakt z granulovaných kvasnic připraven o 20 hm. %.

V druhé části experimentu probíhala kultivace za použití komerčního kvasničného autolyzáta ve srovnání s připravenými kvasničnými extrakty jak z čerstvých, tak z granulovaných kvasnic. Již z prvních výsledků bylo zřejmé, že použití množství dusíku odpovídající trojnásobku standardního obsahu dusíku v kultivačních médiích má negativní vliv na celkové množství produkované biomasy, což může být následek vyššího osmotického stresu, který je způsoben zvýšenou koncentrací solí obsahujících dusík. U médií KONT lze pozorovat nárůst přibližně 7 g/l, zatímco u KLAS3, kde bylo pouze třetinové množství dusíku, bylo stanoveno 30 g/l. V rámci celé kultivace všech médií z druhé části experimentu bylo u ostatních médií stanoveno více biomasy než u médií srovnávacích označených KONT. Kvasničný extrakt z granulovaných kvasnic jevil v případě média GR(KV)3 největší množství produkované biomasy, konkrétně 33,3 g/l, tedy v kombinaci s glukózou. Vysokého množství biomasy bylo také dosaženo při použití kvasničného extraktu z čerstvých pивních kvasnic u média STB-N3 i při použití kvasničného extraktu granulovaného místo všech dusíkatých zdrojů u média GRAN-N3. Celkem bylo stanoveno 33,2 g/l pro STB-N3, respektive 32,0 g/l pro GRAN-N3. Z těchto výsledků lze tedy vyvodit že oba připravené kvasničné extrakty při použití jako jediného zdroje dusíku vedou k větším výtěžkům biomasy, než když média obsahovala dusík z minerálních zdrojů. Avšak z hlediska procentuálního zastoupení lipidů v biomase žádné z produkčních médií nedosahuje tak velkého zastoupení lipidů jako médium srovnávací KONT1. Největší množství celkových karotenoidů bylo stanoveno u média GRAN-N2 a GRAN-N4, kde hodnoty dosahovaly 2,47 mg/g respektive 2,44 mg/g, zatímco u média GRAN-N3, které prokazovalo největší produkci biomasy, bylo stanoveno 0,9 mg/g. Více než 2,3 mg/g celkových karotenoidů bylo také stanoveno u médií s kvasničným extraktem z čerstvých pивních kvasnic, tedy u médií STB(3N)2, STB(3N)1. Médium GRAN-N3 také dosahovalo 8,3 mg ubichinonu na gram biomasy, což je druhý nejlepší výsledek celé kultivace. Naopak více ergosterolu bylo produkovaného při použití kvasničného extraktu z čerstvých kvasnic, nejvíce u STB-N4 9,2 mg/g. Lze tedy říci, že pro dosažení největších výtěžků celkových karotenoidů lze použít nahrazení veškerého množství dusíku kvasničným extraktem z granulovaných kvasnic. Celkově se použití kvasničného extraktu z granulovaných kvasnic jeví jako lepší alternativa než použití kvasničného extraktu z čerstvých pивovarských kvasnic.

Pro budoucí experimenty by bylo vhodné otestovat scale-up nejlepších zjištěných produkčních podmínek do měřítek laboratorního bioreaktoru, aby bylo možné nastínit využití těchto potravinářských odpadů karotenogenními kvasinkami pro průmyslové využití.

7 POUŽITÉ ZDROJE A LITERATURA

- [1] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [2] PERRICONE, Marianne, Mariangela gALLO, Maria Rosaria CORBO, Milena SINIGAGLIA a Antonio BEVILACQUA, 2017. Yeasts. *The Microbiological Quality of Food* [online]. Elsevier, 121-131 [cit. 2023-11-17]. ISBN 9780081005026. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100502-6.00008-X
- [3] JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVIÁ, 1999. *Úvod do biologie kvasinek*. Karolinun. ISBN 80-7184-990-1.
- [4] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna, 1990. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkových mikroorganizmov*. Bratislava: Alfa. ISBN 80-05-00644-6.
- [5] SZOTKOWSKI, Martin, Dana BYRTUSOVA, Andrea HARONIKOVA, Marie VYSOKA, Marek RAPTA, Volha SHAPAVAL a Ivana MAROVA, 2019. Study of Metabolic Adaptation of Red Yeasts to Waste Animal Fat Substrate. *Microorganisms* [online]. 7(11) [cit. 2023-11-17]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms7110578
- [6] MAROVA, Ivana, Milan CERTIK a Emilia BREIEROV, 2011. Production of Enriched Biomass by Carotenogenic Yeasts - Application of Whole-Cell Yeast Biomass to Production of Pigments and Other Lipid Compounds. In: MATOVIC, Miodrag Darko, ed. *Biomass - Detection, Production and Usage* [online]. InTech, 2011-09-09 [cit. 2023-11-17]. ISBN 978-953-307-492-4. Dostupné z: doi:10.5772/19235
- [7] MANNAZZU, Ilaria, Sara LANDOLFO, Teresa Lopes DA SILVA a Pietro BUZZINI, 2015. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 31(11), 1665-1673 [cit. 2024-02-19]. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-015-1927-x
- [8] CAMIOLO, Salvatore, Merje TOOME-HELLER, M. Catherine AIME, Sajeet HARIDAS, Igor V. gRIGORIEV, Andrea PORCEDDU a Ilaria MANNAZZU, 2019. An analysis of codon bias in six red yeast species. *Yeast* [online]. 36(1), 53-64 [cit. 2024-02-27]. ISSN 0749-503X. Dostupné z: doi:10.1002/yea.3359
- [9] IOANNOU, Petros, Rodanthi VAMVOUKAKI a George SAMONIS. Rhodotorula species infections in humans: a systematic review. *Mycoses* [online]. 2019, 62(2), 90-100 [cit. 2023-11-17]. ISSN 0933-7407. Dostupné z: doi:10.1111/myc.12856
- [10] NUNES, Jorge Meneses, Fernando César BIZERRA, Renata Carmona e FERREIRA a Arnaldo Lopes COLOMBO. Molecular Identification, Antifungal Susceptibility Profile, and Biofilm Formation of Clinical and Environmental Rhodotorula Species Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2013, 57(1), 382-389 [cit. 2023-11-17]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.01647-12
- [11] GALÁN-SÁNCHEZ, Fátima, Pedro GARCÍA-MARTOS, Claudio RODRÍGUEZ-RAMOS, Pilar MARÍN-CASANOVA a Jose MIRA-GUTIÉRREZ. Microbiological Characteristics and Susceptibility Patterns of Strains of Rhodotorula Isolated from Clinical Samples. *Mycopathologia* [online]. 145(3), 109-112 [cit. 2023-11-17]. ISSN 0301486X. Dostupné z: doi:10.1023/A:1007059005753
- [12] BISWAS, S K; YOKOYAMA, K; NISHIMURA, K a MIYAJI, M. Molecular phylogenetics of the genus Rhodotorula and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *Online. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001, roč. 51, č. 3, s. 1191-1199. ISSN 1466-5026. Dostupné z: https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-1191. [cit. 2024-02-28]

- [13] BYRTUSOVÁ, Dana; SZOTKOWSKI, Martin; KUROWSKA, Klára; SHAPAVAL, Volha a MÁROVÁ, Ivana. Rhodotorula kratochvilovae CCY 20-2-26—The Source of Multifunctional Metabolites. Online. Microorganisms. 2021, roč. 9, č. 6. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061280>. [cit. 2024-02-28].
- [14] KOT, Anna M., Marek KIELISZEK, Kamil PIWOWAREK, Stanisław BŁAŻEJAK a Cassamo Ussemame MUSSAGY. Sporobolomyces and Sporidiobolus – non-conventional yeasts for use in industries. Fungal Biology Reviews [online]. 2021, 37, 41-58 [cit. 2023-11-17]. ISSN 17494613. Dostupné z: [doi:10.1016/j.fbr.2021.06.001](https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.06.001)
- [15] SAMPAIO, J P, M GADANHO a R BAUER, 2001. Taxonomic studies on the genus Cystofilobasidium: description of Cystofilobasidium ferigula sp. nov. and clarification of the status of Cystofilobasidium lari-marini. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [online]. 2001-01-01, 51(1), 221-229 [cit. 2024-02-25]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: [doi:10.1099/00207713-51-1-221](https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-221)
- [16] MATA-GÓMEZ, Luis Carlos, Julio César MONTAÑEZ, Alejandro MÉNDEZ-ZAVALA a Cristóbal Noé AGUILAR, 2014. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. Microbial Cell Factories [online]. 13(1) [cit. 2024-02-25]. ISSN 1475-2859. Dostupné z: [doi:10.1186/1475-2859-13-12](https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-12)
- [17] MAROVA, I., M. CARNECKA, A. HALIENOVA, M. CERTIK, T. DVORAKOVA a A. HARONIKOVA, 2012. Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. Journal of Environmental Management [online]. 95, S338-S342 [cit. 2024-02-19]. ISSN 03014797. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jenvman.2011.06.018](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.018)
- [18] VELÍŠEK, Jan. The Chemistry of food. 1. Chichester: Wiley, 2014. ISBN 978-1- 118-38384-1
- [19] SARGENT, John R., Douglas R. TOCHER a J. Gordon BELL, 2003. The Lipids. In: Fish Nutrition [online]. Elsevier, s. 181-257 [cit. 2024-03-04]. ISBN 9780123196521. Dostupné z: [doi:10.1016/B978-012319652-1/50005-7](https://doi.org/10.1016/B978-012319652-1/50005-7)
- [20] VANCE, Dennis E., Jean E. VANCE a G. BERNARDI, ed., 2002. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. Elsevier. ISBN 978-0-444-51138-6.
- [21] WEN, Zhiqiang, Sufang ZHANG, Chuks Kenneth ODOH, Mingjie JIN a Zongbao K ZHAO, 2020. Rhodosporidium toruloides - a potential red yeast chassis for lipids and beyond. FEMS Yeast Research [online]. 2020-08-01, 20(5) [cit. 2024-02-25]. ISSN 1567-1356. Dostupné z: [doi:10.1093/femsyr/foaa038](https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa038)
- [22] CAPUSONI, Claudia, Valentina RODIGHIERO, Daniela CUCCHETTI, Silvia GALAFASSI, Daniele BIANCHI, Giuliana FRANZOSI a Concetta COMPAGNO, 2017. Characterization of lipid accumulation and lipidome analysis in the oleaginous yeasts Rhodosporidium azoricum and Trichosporon oleaginosus. Bioresource Technology [online]. 238, 281-289 [cit. 2024-02-25]. ISSN 09608524. Dostupné z: [doi:10.1016/j.biortech.2017.03.188](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.188)
- [23] GUNSTONE, F.D., 1996. Fatty Acid and Lipid Chemistry [online]. Springer Science+Business Media Dordrecht [cit. 2024-03-04]. ISBN 978-1-4615-4131-8. Dostupné z: [doi:10.1007/978-1-4615-4131-8](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4131-8)
- [24] BEOPOULOS, Athanasios, Jean-Marc NICAUD a Claude GAILLARDIN, 2011. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. Applied Microbiology and Biotechnology [online]. 90(4), 1193-1206 [cit. 2024-03-03]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: [doi:10.1007/s00253-011-3212-8](https://doi.org/10.1007/s00253-011-3212-8)
- [25] KAUR, Ramandeep, Minaxi SHARMA, Dawei JI, Min XU a Dominic AGYEI, 2020. Structural Features, Modification, and Functionalities of Beta-Glucan. Fibers [online]. 8(1) [cit. 2024-02-25]. ISSN 2079-6439. Dostupné z: [doi:10.3390/fib8010001](https://doi.org/10.3390/fib8010001)
- [26] RODRIGUES, Marcio L., 2018. The Multifunctional Fungal Ergosterol. MBio [online]. 2018-11-07, 9(5), e01755-18 [cit. 2024-02-25]. ISSN 2161-2129. Dostupné z: [doi:10.1128/mBio.01755-18](https://doi.org/10.1128/mBio.01755-18)

- [27] HU, Zhihong, Bin HE, Long MA, Yunlong SUN, Yali NIU a Bin ZENG, 2017. Recent Advances in Ergosterol Biosynthesis and Regulation Mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian Journal of Microbiology* [online]. 57(3), 270-277 [cit. 2024-02-25]. ISSN 0046-8991. Dostupné z: doi:10.1007/s12088-017-0657-1
- [28] WANG, Ying a Siegfried HEKIMI, 2019. The Complexity of Making Ubiquinone. *Trends in Endocrinology & Metabolism* [online]. 30(12), 929-943 [cit. 2024-02-26]. ISSN 10432760. Dostupné z: doi:10.1016/j.tem.2019.08.009
- [29] CHOI, Jin-Ho, Yeon-Woo RYU a Jin-Ho SEO, 2005. Biotechnological production and applications of coenzyme Q10. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 68(1), 9-15 [cit. 2024-03-04]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-005-1946-x
- [30] SPANOVA, Miroslava, Tibor CZABANY, Günther ZELLNIG, Erich LEITNER, Ivan HAPALA a Günther DAUM, 2010. Effect of Lipid Particle Biogenesis on the Subcellular Distribution of Squalene in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 285(9), 6127-6133 [cit. 2024-02-25]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M109.074229
- [31] XU, Wen, Xi MA a Yang WANG, 2016. Production of squalene by microbes: an update. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 32(12) [cit. 2024-02-26]. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-016-2155-8
- [32] RACHWAŁ, Kamila, Adam WAŚKO, Klaudia GUSTAW a Magdalena POLAK-BERECKA, 2020. Utilization of brewery wastes in food industry. *PeerJ* [online]. 8 [cit. 2023-11-17]. ISSN 2167-8359. Dostupné z: doi:10.7717/peerj.9427
- [33] BASAŘOVÁ, Gabriela, Jan ŠAVEL, Petr BASAŘ, Pavlína BASAŘOVÁ a Adam BROŽ, 2022. Pivovarství: teorie a praxe výroby piva. Třetí, doplněné a upravené vydání. Praha: Havlíček Brain Team. ISBN 978-80-87109-77-9.
- [34] KINČL, Tomáš, 2022. Praxe výroby piva nejen v malých pivovarech. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7592-122-2.
- [35] FĂRCAȘ, Anca C.; SOCACI, Sonia A.; DULF, Francisc V.; TOFANĂ, Maria; MUDURA, Elena et al. Volatile profile, fatty acids composition and total phenolics content of brewers' spent grain by-product with potential use in the development of new functional foods. *Online. Journal of Cereal Science*. 2015, roč. 64, s. 34-42. ISSN 07335210. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.04.003>. [cit. 2024-02-13]
- [36] LYNCH, Kieran M., Eric J. STEFFEN a Elke K. ARENDT, 2016. Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 122(4), 553-568 [cit. 2024-02-13]. ISSN 0046-9750. Dostupné z: doi:10.1002/jib.363
- [37] CHETRARIU, Anuța a Adriana DABIJA, 2020. Brewer's Spent Grains: Possibilities of Valorization, a Review. *Applied Sciences* [online]. 10(16) [cit. 2024-02-13]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app10165619z
- [38] ZHICHKIN, K, V NOSOV a L ZHICHKINA, 2019. Waste management system in the brewing industry. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* [online]. 2019-11-01, 337(1) [cit. 2024-02-13]. ISSN 1755-1307. Dostupné z: doi:10.1088/1755-1315/337/1/012009
- [39] QIN, Fen, Astrid Z. JOHANSEN a Solange I. MUSSATTO, 2018. Evaluation of different pretreatment strategies for protein extraction from brewer's spent grains. *Industrial Crops and Products* [online]. 125, 443-453 [cit. 2024-02-13]. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2018.09.017
- [40] PAZ, Alicia, Sabrina DA SILVA SABO, Marisol VALLEJO, Emilio MARGUET, Ricardo PINHEIRO DE SOUZA OLIVEIRA a José Manuel DOMÍNGUEZ, 2018. Using brewer's spent grain to formulate culture media for the production of bacteriocins using Patagonian strains. *LWT* [online]. 96, 166-174 [cit. 2024-02-13]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2018.05.027

- [41] MENESES, Nuno G.T., Silvia MARTINS, José A. TEIXEIRA a Solange I. MUSSATTO, 2013. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology* [online]. 108, 152-158 [cit. 2024-02-13]. ISSN 13835866. Dostupné z: doi:10.1016/j.seppur.2013.02.015
- [42] STEWART, Graham G. a Fergus G. PRIEST, ed., 2006. *Handbook of Brewing* [online]. 2nd Edition. CRC Press [cit. 2024-02-13]. ISBN 9780429116179. Dostupné z: doi:10.1201/9781420015171. 670-729.
- [43] MUSSATTO, Solange I, 2014. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 94(7), 1264-1275 [cit. 2024-02-13]. ISSN 00225142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.6486
- [44] ÖZTÜRK, S., Ö. ÖZBOY, İ CAVIDOĞLU a H. KÖKSEL, 2002. Effects of Brewer's Spent Grain on the Quality and Dietary Fibre Content of Cookies. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 108(1), 23-27 [cit. 2024-02-13]. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.2002.tb00116.x
- [45] NIGAM, Poonam Singh, 2017. An overview: Recycling of solid barley waste generated as a by-product in distillery and brewery. *Waste Management* [online]. 62, 255-261 [cit. 2024-02-13]. ISSN 0956053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2017.02.018
- [46] JAEGER, Alice, Elke K. ARENDT, Emanuele ZANNINI a Aylin W. SAHIN, 2020. Brewer's Spent Yeast (BSY), an Underutilized Brewing By-Product. *Fermentation* [online]. 6(4) [cit. 2024-02-26]. ISSN 2311-5637. Dostupné z: doi:10.3390/fermentation6040123
- [47] PULIGUNDLA, Pradeep, Chulkyoon MOK a Sungkwon PARK, 2020. Advances in the valorization of spent brewer's yeast. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* [online]. 62 [cit. 2024-03-03]. ISSN 14668564. Dostupné z: doi:10.1016/j.ifset.2020.102350
- [48] DESSALEW, Gashaw, Abebe BEYENE, Amsalu NEBIYU a Morgan L. RUELLE, 2017. Use of industrial diatomite wastes from beer production to improve soil fertility and cereal yields. *Journal of Cleaner Production* [online]. 157, 22-29 [cit. 2024-02-27]. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2017.04.116
- [49] Germán Giner Santonja, Panagiotis Karlis, Kristine Raunkjær Stubdrup, Thomas Brinkmann, Serge Roudier; Best Available Techniques (BAT) Reference Document for the Food, Drink and Milk Industries; EUR 29978 EN; doi:10.2760/243911.
- [50] Devolli, Ariola. (2018). Evaluation of brewery waste and its reduction methods. *Albanian j. agric. sci.* ISSN: 2218-2020 Volume 17, Special issue (2018). 506-514.
- [51] SCHNEIDER, T., S. GRAEFF-HÖNNINGER, W.T. FRENCH, R. HERNANDEZ, N. MERKT, W. CLAUPEIN, M. HETRICK a P. PHAM, 2013. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. *Energy* [online]. 61, 34-43 [cit. 2024-02-06]. ISSN 03605442. Dostupné z: doi:10.1016/j.energy.2012.12.026
- [52] RAYNIE, Douglas E., 2006. Modern Extraction Techniques. *Analytical Chemistry* [online]. 2006-06-01, 78(12), 3997-4004 [cit. 2024-03-07]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac060641y
- [53] MUSSAGY, Cassamo Ussemame, James WINTERBURN, Valéria Carvalho SANTOS-EBINUMA a Jorge Fernando Brandão PEREIRA, 2019. Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 103(3), 1095-1114 [cit. 2024-03-07]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-018-9557-5
- [54] SCHUCHARDT, Ulf, Ricardo SERCHELI a Rogério Matheus VARGAS, 1998. Transesterification of vegetable oils: a review. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online]. 9(3) [cit. 2024-03-07]. ISSN 0103-5053. Dostupné z: doi:10.1590/S0103-50531998000300002

- [55] NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA a Petr ČESLA, 2021. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek. ISBN 978-80-270-8559-0.
- [56] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH, 2019. Analytická chemie. Přeložil Karel NESMĚRÁK, přeložil Václav ČERVENÝ, přeložil Tomáš KRÍŽEK, přeložil Eliška NOVÁKOVÁ. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7592-043-0.
- [57] VESELÁ, Mária, 2004. Praktikum z obecné mikrobiologie. Vyd. 3. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. ISBN 80-214-2567-9.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
SFA	nasycené mastné kyseliny
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
DAD	detektor diodového pole
FID	plamenově ionizační detektor
C/N poměr	poměr uhlíku k dusíku
KLAS	produkčním médiem se standardním množstvím dusíku
KONT	kontrolní médium s trojnásobným množstvím dusíku
STB	kvasničný extrakt z čerstvých pivovarských kvasnic
GRAN	kvasničný extrakt z granulovaných kvasnic
CoA	koenzym A