



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

OPTIMALIZACE METOD IZOLACE A ANALÝZY BETA- GLUKANŮ PRODUKOVANÝCH KAROTENOGENNÍMI KVASINKAMI

OPTIMIZATION OF METHODS FOR THE ISOLATION AND ANALYSIS OF BETA-GLUCANS PRODUCED BY
CAROTENOGENIC YEASTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Eva Šimková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1798/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Eva Šimková**
Studijní program: Chemie přírodních látek
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Optimalizace metod izolace a analýzy beta–glukanů produkovaných karotenogenními kvasinkami

Zadání diplomové práce:

1. Přehledná literární rešerše zaměřená na karotenogenní kvasinky a jejich metabolity
2. Produkce obohacené kvasinkové biomasy v laboratorních bioreaktorech
3. Analýza složení produkované biomasy kvasinek
4. Optimalizace metod stanovení polysacharidů kvasinek
5. Optimalizace metod izolace beta–glukanů
6. Vyhodnocení výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Eva Šimková
studentka

Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce byla optimalizace metod izolace a analýzy polysacharidů β -glukanů produkovaných karotenogenními kvasinkami. V rámci experimentu byla vybrána jako produkční kmen kvasinka *Rhodotorula toruloides*, která byla kultivována v laboratorních bioreaktorech. V teoretické části je vypracována literární rešerše na téma karotenogenní kvasinky a metabolity, které produkují. Hlavním metabolitem, kterým se tato práce zabývá, je polysacharid β -glukan. β -glukany jsou polysacharidy, které tvoří v buňce kvasinky buněčnou stěnu. Jsou známy pro své imunostimulační účinky, antioxidační účinky, podporují hojení ran a pomáhají ke snížení hladiny cholesterolu a glukózy v krvi.

Experimentální část práce se zabývá kultivací kvasinkové biomasy, její charakterizací. Dále optimalizací enzymatického stanovení β -glukanů pomocí komerčního enzymatického kitu a izolacemi β -glukanů z kvasinkové biomasy. V rámci experimentu byly také dále vyvíjeny metody extrakce kvasinkové biomasy umožňující z malého vzorku kvasinkové biomasy jedním extrakčním postupem vyseparovat a analyzovat β -glukany, lipidy, lipidické látky a proteiny.

KLÍČOVÁ SLOVA

Karotenogenní kvasinky, β -glukany, polysacharidy, karotenoidy, lipidy, izolace, enzymatické stanovení

ABSTRACT

The aim of this thesis was to optimize the methods of isolation and analysis of β -glucan polysaccharides produced by carotenogenic yeasts. As part of the experiment, the yeast *Rhodotorula toruloides*, which was cultivated in laboratory bioreactors, was selected as the production strain. Theoretical part describes the subject of carotenogenic yeasts and the metabolites they produce. The main metabolite that this work deals with is the polysaccharide β -glucan. β -glucans are polysaccharides that form the cell wall in the yeast cell. They are known for their immunostimulating effects, antioxidant effects, promote wound healing and help lower cholesterol and blood glucose levels.

The experimental part of the work deals with the cultivation of yeast biomass and its characterization. Furthermore, optimization of the enzymatic determination of β -glucans using a commercial enzymatic kit and isolation of β -glucans from yeast biomass. As part of the experiment, yeast biomass extraction methods were also further developed, enabling the separation and analysis of β -glucans, lipids, lipidic substances and proteins from a small sample of yeast biomass in one extraction procedure.

KEY WORDS

Carotenogenic yeast, β -glucans, polysaccharides, carotenoids, lipids, isolation, enzymatic determination

ŠIMKOVÁ, Eva. Optimalizace metod izolace a analýzy beta-glukanů produkovaných karotenogenními kvasinkami [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-07]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149070>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Martin Szotkowski.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Martinu Szotkowskému, Ph.D. za odborné vedení práce, ochotu při řešení problémů, cenné rady, vstřícnost a trpělivost při vypracovávání diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat odborné konzultantce Ing. Pavlíně Sniegoňové, za pomoc při vypracovávání diplomové práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině, příteli a přátelům za trpělivost a podporu při studiu na vysoké škole.

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1	Kvasinky	10
2.1.1	Struktura a tvar kvasinky	10
2.1.2	Buněčná stěna kvasinek	10
2.1.3	Karotenogenní kvasinky	11
2.1.4	Vybraný kmen <i>Rhodotorula</i>	11
2.2	Biotechnologická kultivace.....	13
2.2.1	Růstová křivka	14
2.3	Studované metabolity karotenogenních kvasinek.....	15
2.3.1	Glukany	15
2.3.2	Lipidy	18
2.3.3	Triacylglyceroly	18
2.3.4	Mastné kyseliny	19
2.3.5	Karotenoidy.....	21
2.3.6	Ubichinon.....	23
2.3.7	Ergosterol	24
2.4	Analytické techniky pro stanovení mikrobiální biomasy.....	25
2.4.1	Spektrofotometrie.....	25
2.4.2	HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie).....	25
2.4.3	GC (plynová chromatografie)	26
2.4.4	Stanovení polysacharidů, exopolysacharidů	27
3	CÍL PRÁCE.....	28
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
4.1	Použité chemikálie	29
4.1.1	Chemikálie pro kultivaci	29
4.1.2	Chemikálie pro izolaci β -glukanů.....	29
4.1.3	Chemikálie pro stanovení karotenoidů.....	29
4.1.4	Chemikálie pro stanovení mastných kyselin.....	29
4.1.5	Chemikálie pro stanovení β -glukanů	30
4.1.6	Chemikálie pro stanovení cukrů dle Duboia.....	30
4.1.7	Chemikálie pro stanovení proteinů dle Biureta.....	30
4.2	Použité přístroje	30
4.3	Použitý kmen.....	31
4.4	Kultivace karotenogenních kmenů kvasinek	31
4.4.1	Inokulum I a II	31
4.4.2	Kultivace ve fermentorech	32
4.5	Gravimetrické stanovení biomasy.....	33

4.6	Postupy izolace β -glukanu	33
4.6.1	Izolace β -D-glukanu: Postup A.....	33
4.6.2	Izolace β -glukanu: Postup B	34
4.6.3	Izolace β -glukanu: Postup C	34
4.6.4	Izolace glukanu: Postup D	34
4.7	Postup stanovení karotenoidů pomocí HPLC	35
4.7.1	Extrakce karotenoidů	35
4.7.2	Analýza karotenoidů metodou HPLC/PDA	35
4.8	Postup stanovení mastných kyselin pomocí GC	36
4.8.1	Transesterifikace a extrakce mastných kyselin pro GC analýzu.....	36
4.8.2	Analýza mastných kyselin metodou GC/FID	36
4.9	Optimalizovaný postup stanovení β -glukanů.....	37
4.9.1	Postup stanovení β -glukanů pomocí enzymatického kitu.....	37
4.10	Stanovení cukrů dle Duboise	40
4.11	Stanovení celkových proteinů dle Biureta	40
4.12	Vývoj metody extrakce pro multiparametrickou analýzu kvasinkových metabolitů 41	
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	42
5.1	Kultivace v laboratorních fermentorech.....	42
5.1.1	Stanovení obsahu karotenoidů u biomasy.....	44
5.2	Analýza průběhu kultivace ve fermentoru 2	45
5.2.1	Analýza obsahu karotenoidů v průběhu kultivace F2	47
5.3	Analýza průběhu kultivace ve fermentoru 3	48
5.3.1	Analýza obsahu karotenoidů v průběhu kultivace F3	50
5.4	Optimalizace stanovení β -glukanů pomocí enzymatického kitu	51
5.4.1	Finanční náklady na optimalizovaný postup stanovení	51
5.4.2	Optimalizace navážky pro stanovení	51
5.4.3	Optimalizace separačního procesu.....	53
5.4.4	Časová náročnost metody	54
5.5	Optimalizace postupů izolace	55
5.6	Optimalizace postupu izolace β -D-glukanů postup A	55
5.6.1	Stanovení obsahu glukanů v izolantech A	57
5.6.2	Stanovení obsahu karotenoidů u izolantů A	58
5.6.3	Analýza jednotlivých odpadních supernatantů A	60
5.6.4	Mikroskopické zobrazení struktury v izolantech A	63
5.7	Optimalizace postupu izolace β -glukanů B	64
5.7.1	Stanovení obsahu glukanů v izolantech B	65
5.7.2	Stanovení obsahu karotenoidů u izolantů B.....	66

5.7.3	Analýza jednotlivých odpadních supernatantů B.....	68
5.7.4	Mikroskopické zobrazení struktury v izolantech B	71
5.8	Optimalizace postup izolace β -glukanů C	72
5.8.1	Stanovení obsahu glukanů v izolantech C	73
5.8.2	Stanovení obsahu karotenoidů u izolatů C.....	74
5.8.3	Analýza jednotlivých odpadních supernatantů C.....	76
5.8.4	Mikroskopické zobrazení struktury v izolantech C	78
5.9	Optimalizace postupu izolace β -glukanů D	79
5.9.1	Stanovení obsahu glukanů v izolantech D	80
5.9.2	Stanovení obsahu karotenoidů u izolatů D	81
5.9.3	Analýza jednotlivých odpadních supernatantů D	82
5.9.4	Mikroskopické zobrazení struktury v izolantech D	84
5.10	Orientační refraktometrické stanovení	85
5.11	Vývoj metody extrakce pro multiparametrickou analýzu kvasinkových metabolitů 85	
6	ZÁVĚR.....	89
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	91
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	94

1 ÚVOD

Současná politika na poli vědy je vedena především cestou udržitelnosti. I z tohoto důvodu obliba biotechnologické produkce mikroorganismů stále roste. Mezi takto produkované mikroorganismy patří také karotenogenní kvasinky. Karotenogenní kvasinky produkují důležité metabolity, jako jsou karotenoidy, lipidy či β -glukany. Tyto látky dále získávají uplatnění ve farmakologickém, kosmetickém i potravinářském průmyslu.

Velkoobjemová kultivace těchto mikroorganismů vyžaduje vysoké provozní i finanční náklady. Z tohoto důvodu se v poslední době intenzivně studuje, jak tyto náklady snížit. Jednou z možných cest by mohlo být využití odpadních substrátů z potravinářského průmyslu pro kultivaci. Tento substrát by v médiu sloužil jako zdroj živin. Díky využití těchto substrátů by docházelo k valorizaci odpadů a snížení nákladů na celý proces produkce biomasy a metabolitů.

Nadužívání antibiotik v posledních letech u lidí i u živočišné výroby způsobilo vznik a šíření bakterií, které jsou vůči antibiotikům odolné. Tato skutečnost přímo ohrožuje lidské zdraví. Z tohoto důvodu se objevila snaha o vývoj alternativ antibiotik. Jednou z možných alternativ by mohly být právě β -glukany díky jejich imunomodulačním účinkům. β -glukany jsou přírodní polysacharidy vyskytující se v buněčné stěně kvasinek, ale i třeba u hub či řas. Výzkumy potvrdily i další užitečné vlastnosti β -glukanů, jako jsou antioxidační účinky, podpora hojení ran, snižují hladiny cukru v krvi, snižují hladiny tuku v krvi a mnoho dalších. β -glukany jsou také zkoumány, jako potenciální látka pro léčbu alergií či jako podpůrná léčba při léčbě nádorů. I díky této skutečnosti se jim v poslední době dostává velké pozornosti. V současné době jsou β -glukany dostupné ve formě doplňků stravy.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Jedná se o heterotrofní jednobuněčné eukaryotické organismy patřící do říše *Fungi*. Kvasinky jsou jedním z nejrozšířenějších mikroorganismů na Zemi. Vyskytují se v půdě, vzduchu, mořské vodě, rostlinách, na zvířatech i v potravinách. Kvasinky žijí jednotlivě nebo v koloniích, kde se skládají do pseudomycelia či nepravého mycelia. Dokážou se rozmnožovat pohlavně (pučením) nebo nepohlavně (dělením). Kvasinky se využívají v potravinářském průmyslu při výrobě pekařského droždí, octa, lihu, vína či piva. Dále jejich využití nalezneme i v biotechnologickém průmyslu při výrobě enzymů, antibiotik, vitamínů, aminokyselin nebo bílkovin [1] [2] [3].

2.1.1 Struktura a tvar kvasinky

Tvar a velikost kvasinek závisí na druhu, prostředí a způsobu vegetativního rozmnožování. Buňky mají elipsoidní, vejčitý někdy až kulovitý tvar. Velikost kvasinek se pohybuje mezi 3-4 μm . Kvasinková buňka se skládá z pevné buněčné stěny, pod ní nalezneme cytoplazmatickou membránu. Vnitřek buňky je vyplněn cytoplazmou, ve které nalezneme jádro a další organely. Mezi organely, které jsou typické pro eukaryotické buňky, nalezneme endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, mitochondrie, plastidy a vakuolu [3] [4].

Buněčná stěna kvasinek je tvořena především polysacharidy, tato struktura dodává buňce tvar a chrání ji před okolními vlivy. Pod ní nalezneme cytoplazmatickou membránu složenou z fosfolipidické dvojvrstvy, do které jsou ukotveny proteiny, steroly a signální molekuly. Tato semipermeabilní membrána propouští malé molekuly a plyny. Větší molekuly se do buňky dostanou pomocí transportních kanálů. V cytoplazmě nalezneme buněčné organely, enzymy a zásobní látky. Mnoho důležitých syntéz, jako je syntéza karotenoidů, se odehrává v endoplazmatickém retikulu [3] [4].

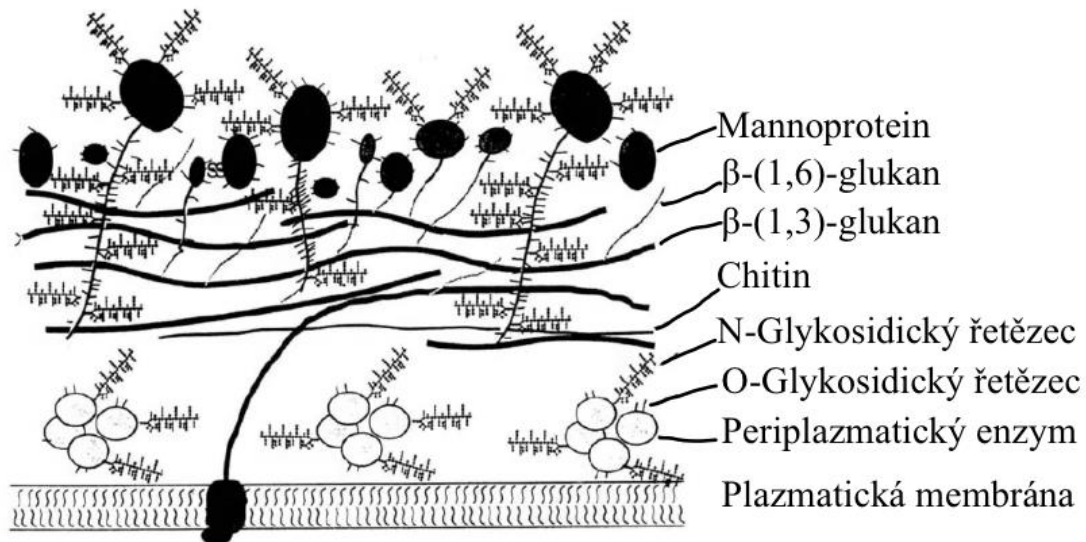
2.1.2 Buněčná stěna kvasinek

Jedná se o pevnou, polopropustnou strukturu složenou převážně z polysacharidů. Tato struktura dává buňce tvar a brání ji proti vlivům okolního prostředí jako jsou osmotické a mechanické síly. Dalšími funkcemi buněčné stěny jsou regulace růstu, regulace difúze a komunikace. Buněčná stěna kvasinek a hub se skládá z chitinu, β -glukanů a proteinů [3] [5].

Sušina buněčné stěny je přibližně z 80 % tvořena z polysacharidů. Polysacharidy se zde skládají do struktury vláken, která se splétají dohromady. Další složkou buněčné stěny jsou bílkoviny, které mají asi 10 % sušiny a vyplňují vláknitou strukturu polysacharidů. V buněčné stěně můžeme dále nalézt malé množství lipidů, fosfolipidů a fosforečnanů, které jsou na polysacharidy vázány esterovými vazbami. Hlavní složkou polysacharidů v buněčné stěně jsou β -(1,3)-glukany a β -(1,6)-glukany. Stavebními kameny β -glukanů jsou glukózové jednotky spojené glykosidickou vazbou. Dalšími polysacharidy v buněčné stěně jsou mannany, glukosaminy a chitiny [5].

V buněčné stěně mají β -glukany dvě funkce: β -(1,3)-glukany se svojí strukturou tvoří kostru buněčné stěny. Zatímco β -(1,6)-glukany tvoří díky své rozvětvené struktuře jakési lepidlo, které drží buněčnou stěnu pohromadě [6] [7].

Na obrázku je zobrazen průřez buněčnou stěnou. Nalezneme zde chitinovou vrstvu, na které leží vrstva propletených β -(1,3)-glukanů a β -(1,6)-glukanů. Vnější vrstva buněčné stěny je tvořena mannoproteiny [8].



Obrázek 1: Znárodnění buněčné stěny *Saccharomyces cerevisiae*. Obrázek byl převzat a přeložen z [8].

2.1.3 Karotenogenní kvasinky

Jedná se o kvasinky, které jsou schopné produkovat karotenoidní pigmenty. Karotenoidy se v kvasince produkují ve formě β -karotenu, torulenu, lykopenu a torularhodinu. Díky akumulaci těchto barviv kvasinka získává žluté až červené zbarvení, proto se tyto kvasinky označují jako červené kvasinky. Produkci pigmentů kvasinkou například ovlivňuje typ kvasinky, živné médium, podmínky prostředí a světelné spektrum. Tyto kvasinky patří do třídy *Basidiomycetes*, pod tuto třídu spadají rody *Cystofilobasidium*, *Rhodotorula* a *Sporobolomyces*. Tyto kvasinky se dále vyznačují vysokou produkcí lipidů, ve kterých se nachází vysoké množství polynenasycených a mononenasycených mastných kyselin. Díky obsahu těchto látek je lze využít ve farmaceutickém, potravinářském a kosmetickém průmyslu [4] [9] [10].

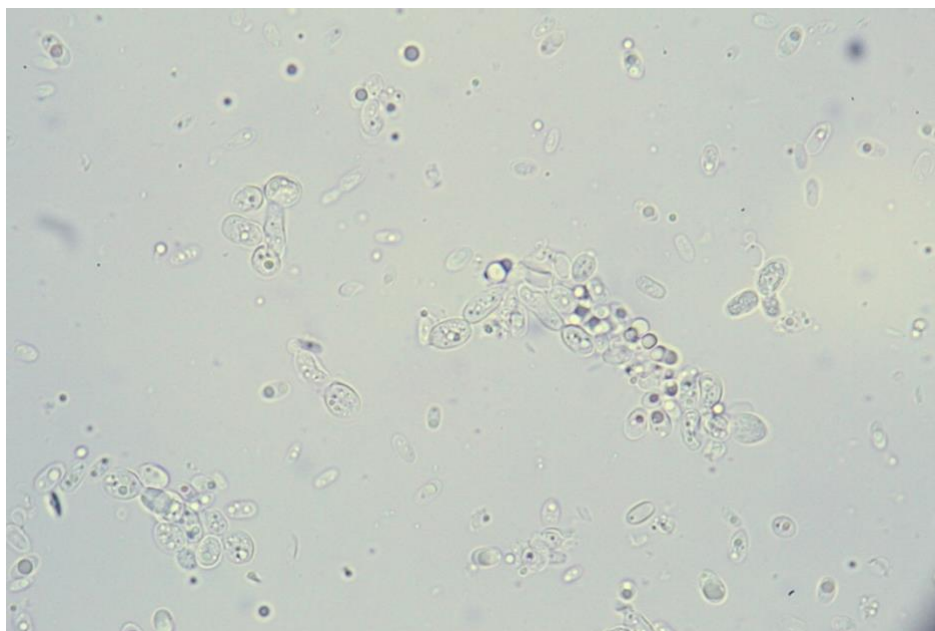
2.1.4 Vybraný kmen *Rhodotorula*

Kolonie těchto kvasinek se zbarvují do oranžova až červená, díky vyšší koncentraci karotenoidů. Tento kmen se vyskytuje v kvasinkové i myceliální formě. Tvoří vejčité buňky a rozmnožuje se za pomoci pučení. Tento kmen je velice slibný díky schopnosti akumulace lipidů a vysoké adaptabilitě na substráty. Tento rod je striktně aerobní, z tohoto důvodu nemůže fermentovat cukry a není schopen zpracovat laktózu. Kmen dokáže zpracovávat různé zdroje uhlíku, jako jsou monosacharidy (hexózy, pentózy), oligosacharidy (sacharóza, celobióza, maltóza), alkoholy (glycerol, mannitol, sorbitol) a organické kyseliny (acetát, laktát, sukcinát, citrát, mastné kyseliny). V jejich buňkách byla zjištěna zvýšená produkce koenzymu Q9 a Q10. Mezi zástupce tohoto kmenu patří *Rhodotorula toruloides*, *Rhodotorula Kratochviloe* nebo *Rhodotorula glutinis* [4] [9] [11] [12].

2.1.4.1 *Rhodotorula toruloides*

Poprvé byla izolována ze vzduchu v Dalianu v Číně v roce 1922 a pojmenovaná byla jako *Torula rubescen*. Později byla přejmenována. Vyskytuje se ve dvou formách, ve formě kvasinky nebo ve formě myceliální. V přírodě se vyskytuje také v dřevní hmotě borovice, půdě, mořské vodě, kyselých odpadních vodách nebo v listech rostlin [12].

Jedná se o karotenogenní kvasinku, která má velice dobrou schopnost produkce mikrobiálních lipidů a karotenoidů. Tato kvasinka primárně produkuje β -karoten, torulen a torularhodin, které jsou zajímavé pro potravinářský průmysl. Rovněž patří mezi slibné kandidáty na produkci mikrobiálního oleje jako alternativní nepotravinářské olejové suroviny pro výrobu bionafty. Tato kvasinka dokáže přeměnit rafinovaný a surový glycerol na lipidy. Díky této schopnosti je možné využít vedlejšího produktu glycerolu, který vzniká při výrobě bionafty, jako levného a udržitelného zdroje uhlíku pro výrobu mikrobiálního oleje. Tento olej využívá na výrobu bionafty [4] [11] [12] [13].



Obrázek 2: Kvasinka *Rhodotorula toruloides*.

2.2 Biotechnologická kultivace

Jedná se o proces kultivace mikroorganismů v biotechnologických fermentorech. V průběhu kultivace fermentor zajišťuje optimální podmínky pro růst a množení mikroorganismů. Tyto kultivace můžeme provádět v laboratorním měřítku, poloprovozním měřítku či provozním měřítku. Podle typu použité technologie pro kultivaci můžeme bioreaktory rozdělit na:

- A) Bioreaktory
 - a) Pro aerobní fermentaci
 - b) Pro anaerobní fermentaci
- B) Kultivační nádoby – využívané k velkokapacitní kultivaci buněk živočichů a rostlin
- C) Enzymové reaktory

Dále můžeme kultivační procesy rozdělit na:

- A) Batch kultivaci – jedná se o vsádkovou kultivaci, kdy jsou do bioreaktoru na počátku dodány všechny živiny a v průběhu kultivace není dále nic přidáváno ani odebíráno.
- B) Fed-batch kultivace – jedná se o kultivaci, v průběhu které jsou živiny do média přidávány.
- C) Kontinuální kultivace – je kultivace, u které jsou v průběhu kultivace živiny přidávány kontinuálně, a dále je kontinuálně odebírána biomasa. Proces kultivace je udržován dlouhodobě.

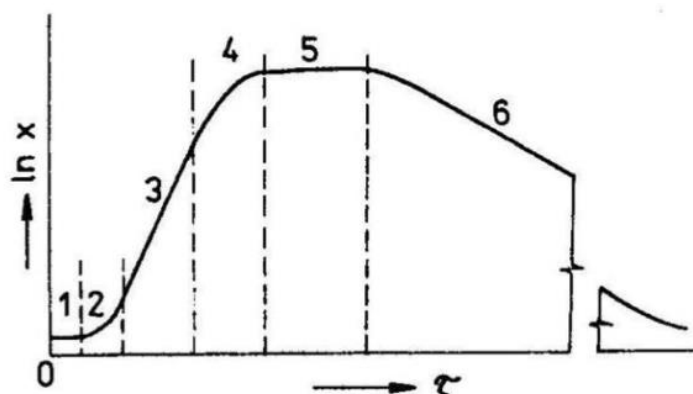
Kultivace kvasinek v bioreaktorech se provádí v laboratořích na základě výsledků z předchozích kultivací v malých laboratorních měřítcích. V bioreaktoru je dbáno na ideální podmínky pro růst. Pro kultivaci je nutné zajistit dostatečnou sterilitu prostředí, vhodné pH, teplotu, míchaní, přísun kyslíku i živin. Mezi hlavní živiny důležité pro kultivaci kvasinek patří C, N, P, S a stopové prvky. Uhlík se dodává například ve formě glukózy, glycerolu, melasy, syrovátky či ve formě slunečnicového oleje. Dusík můžeme dodat ve formě močoviny, amonných solí nebo jej můžeme dodávat ve formě komplexních zdrojů jako je kvasničný autolyzát. Fosfor se dodává ve formě fosforečnanů. Síra se do média dodává ve formě síranů. Průběh kultivace je monitorován pomocí různých sond v bioreaktoru [14] [15].



Obrázek 3: Bioreaktor při kultivaci kvasinky *Rhodotorula toruloides*.

2.2.1 Růstová křivka

Popisuje časovou závislost růstu mikrobiální kultury. První fáze se nazývá lag-fáze. V této fázi se kultura přizpůsobuje novým podmínkám a během této fáze nedochází k rozmnožování. V průběhu této fáze dochází k produkci série enzymů a dalších molekul, které umožňují buňce se přizpůsobit novým podmínkám v médiu. Délka lag-fáze závisí na složení produkčního média a množství přidaných látek, které působí na kulturu stresem. Dále také závisí na fyziologickém stavu buněk a jejich množství v médiu. Druhá fáze se nazývá fáze zrychleného růstu. V této fázi buňky kvasinek rychle rostou a intenzivně se množí. Následně kvasinky přecházejí do třetí fáze, kterou je exponenciální fáze růstu. V této fázi mají kvasinky kratší generační dobu a začínají produkovat primární metabolity. Mezi primární metabolity se řadí například lipidy, aminokyseliny, sacharidy a nukleové kyseliny. Tyto metabolity jsou nezbytné pro přežití organismu. Ve čtvrté fázi dochází ke zpomalení růstu, z důvodu nedostatku živin v médiu a růstová křivka přechází do stacionární fáze. Ve stacionární fázi se rychlost rozmnožování rovná rychlosti odumírání buněk. Kultura začíná tvořit sekundární metabolity, jako jsou alkaloidy, vitamíny, antibiotika nebo třeba rostlinná barviva. Poslední fáze v grafu růstové křivky je fáze odumírání, při které dochází k vyčerpání veškerých živin z média a kultura postupně odumírá [5] [14].



Obr. 6.1 Růstová křivka

τ – doba (h)

x – počet živých buněk v 1 ml

1 – lag-fáze

2 – fáze zrychlujícího se růstu

3 – exponenciální fáze růstu

4 – fáze zpomalujícího se růstu

5 – stacionární fáze růstu

6 – fáze odumírání

Obrázek 4: Růstová křivka, tento obrázek byl převzat z [5].

2.3 Studované metabolity karotenogenních kvasinek

2.3.1 Glukany

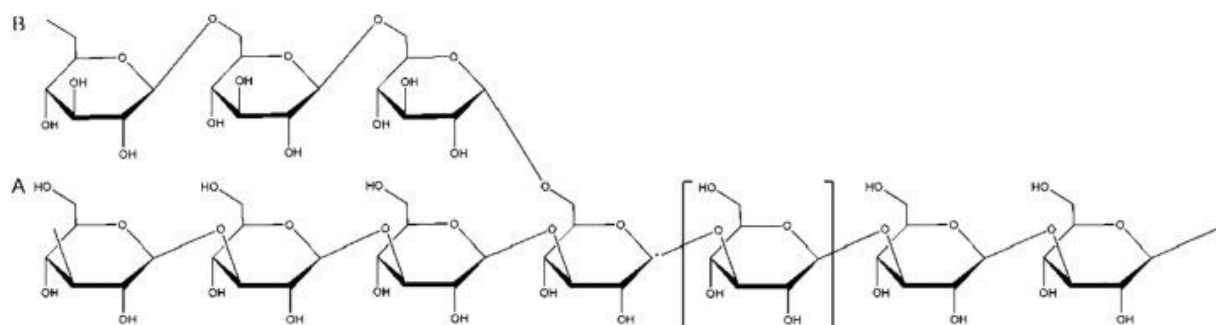
Jedná se o hojnou skupinu homopolysacharidů, jejichž základní jednotkou je glukóza. Tyto základní jednotky jsou spojeny glykosidickou vazbou. Heterogenita jednotlivých typů glukanů se projevuje typem vazeb, velikostí, stupněm větvení, konformací molekuly nebo biologickými vlastnostmi, ale i typem zdrojů, ze kterých je izolujeme [16] [17].

Výzkum se v současné době více zabývá studiem β -glukanů jejich izolacemi, způsoby využití a jejich biologickou aktivitou. Jednou z vlastností β -glukanů je jejich imunomodulační účinnost. Tato vlastnost je předpokladem jejich velkého potenciálu při léčbě nemocí, zranění či léčbě alergií. Velkým tématem je i studium β -glukanů v souvislosti s antibiotiky, neboť nadměrné užívání antibiotik způsobilo vznik a šíření kmenů bakterií, které jsou na antibiotika rezistentní. S tím by časem mohly pomoci právě β -glukany, které působí imunomodulátor. Navazují se na bílé krvinky a tím zvyšují jejich odolnost vůči bakteriím a virům. β -glukany můžeme nalézt v buněčných stěnách vyšších hub, kvasinek, rostlin, řas a bakterií [16] [17].

2.3.1.1 Struktura a vlastnosti β -glukanů

β -glukany jsou polysacharidy, které se skládají z monomerů glukózy spojených β -glykosidickou vazbou. Monomery glukóz se vážou v pozicích 1,3 a 1,6. Menší postranní řetězce se vážou do pozic 1,3; 1,4 a 1,6. Tedy β -(1,3)-glukany jsou spojeny β -(1,3)-glykosidickými vazbami a β -(1,6)-glukany jsou spojeny β -(1,6)-glykosidickými vazbami. Celá struktura je dále stabilizována za pomoci vodíkových můstků, kdy hlavní a postranní řetězce β -glukanů působením vodíkových můstků vytvářejí jednoduché a trojitě šroubovice [16] [17].

Stupeň větvení, prostorová struktura a délka postranních řetězců β -glukanů vyžadují další studium. Struktura polysacharidů β -glukanů závisí na zdroji a metodě izolace. Aktivita je ovlivněna stupněm větvení. Má imunostimulační, antimikrobiální, protinádorová, antioxidační a protizánětlivá aktivita [16] [17] [18].



Obrázek 5: A: β -(1,3)-glukan je hlavní řetězec; B: β -(1,6)-glukan je postranní řetězec [16].

2.3.1.2 *Biologický účinek*

Pilotní studie zjistily, že β -glukany a mannany z buněčné stěny kvasinek mohou působit na makrofágy a stimulovat tím nespecifickou imunitu organismu. β -glukany jsou přirozené aktivátory imunity, které mohou specificky i nespecificky posilovat imunitní systém za pomoci PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Na základě výzkumu bylo dále potvrzeno, že β -glukany a mannany mohou zlepšovat střevní prostředí, stimulovat vrozenou imunitu, adsorbovat mykotoxiny a podporovat hojení ran. Dále β -glukany snižují hladinu cukrů a tuků v krvi, předcházejí a napomáhají léčbě rakoviny a mají antioxidační účinky. V současné době byly vyvinuty obvazy na rány s obsahem β -glukanů, protiinfekční léčiva s obsahem β -glukanů, β -glukany se také využívají v doplňcích stravy pro zlepšení imunity a v živočišné výrobě pro prevenci nemocí zvířat [16].

Biologickou aktivitu lze dále zlepšit využitím chemické modifikace struktury. Kdy se při modifikaci upravuje struktura a snižuje délka řetězce polysacharidů. Metody izolace β -glukanů mohou narušit strukturu polysacharidů, modifikace je jeden ze způsobů, jak narušenou strukturu opravit [16].

2.3.1.3 *Biosyntéza β -glukanů*

Mechanismus syntézy β -glukanu není stále přesně objasněn. Celkový proces syntézy se částečně podobá syntéze chitinu. Proces syntézy β -glukanových řetězců probíhá v cytoplasmě. Tyto řetězce jsou dále přeneseny pomocí transmembránového enzymového komplexu do periplazmatického prostoru. Předpokládá se, že v periplazmatickém prostoru dochází k modifikaci struktury řetězce. Pro tvorbu buněčné stěny je zapotřebí struktury β -(1,3)-glykosidických vazeb pro tvorbu základní buněčné kostry, a β -(1,6)-glykosidických postranních vazeb pro spojování buněčné stěny [19] [20].

Tato syntéza je vícestupňový proces, který se skládá z iniciace, prodlužování řetězce a tvorby větví. Biosyntéza β -glukanů probíhá za pomoci glukansyntasy, prekurzorem je zde UDP-glukosa. β -(1,3)-glukan je syntetizován glukansyntasou vázanou k plasmatické membráně a rostoucí polymer se přesouvá do periplasmatického prostoru. Syntéza β -(1,6)-glukanu je zahajována v cytoplasmě v sekreční dráze. Glukanasy degradující glukany jsou lokalizovány v periplasmě. Zajištění mechanismu regulace obou typů enzymů nebylo doposud objasněno. U β -(1,3)-glukansyntasy výzkumy poukazují na roli malého GTP-vazebného Rho1 proteinu, jako regulační komponenty, která zřejmě v aktivním stavu aktivuje v plasmatické membráně lokalizovanou syntasu, která pak realizuje syntézu glukanového řetězce za jeho současného průchodu membránou. Rho1 protein je zároveň lokalizován s aktinovými políčky, což ukazuje na koordinaci mezi polarizovaným růstem buněčné stěny a morfogenezí [3] [19] [20].

2.3.1.4 Perspektiva do budoucna

Díky biologické aktivitě mají potenciál do budoucna. Je možné je využít v několika oblastech, jako imunitní stimulatory, regulatory při přípravě vakcíny, jako nosiče léčiv do makrofágů nebo jako přísada do krmiv [16] [18].

β -glukany se používají při léčbě metabolických onemocnění, jako jsou obezita, diabetes 2. typu a kardiovaskulárních onemocnění. β -glukany se používají díky jejich schopnosti snižovat cholesterol a regulovat cukr v krvi. Předmětem dalších studií je regulace střevní mikrobioty u metabolických onemocnění, tyto studie probíhají na zvířatech a v rámci klinických studií [16] [18].

2.3.1.5 Studie léčby Diabetes

Tato studie se zaměřuje na pacienty, kteří mají problémy s produkcí inzulínu. Nemoc Diabetes je chronické onemocnění, při kterém se ve slinivce břišní tvoří inzulín jen částečně nebo téměř vůbec. Toto onemocnění se rozděluje na dva typy. Prvním typem je Diabetes I. typu, při tomto onemocnění jsou pacienti závislí na injekčním podání inzulínu, neboť jejich tělo má této látky absolutní nedostatek. Druhým typem je Diabetes II. typu, zde se jedná o vytvoření určité rezistence na inzulín a relativní nedostatek inzulínu. Nejčastější příčinou onemocnění Diabetes II. typu bývá obezita [21].

Studie ukázaly, že β -glukany mohou snížit koncentraci glukózy v krvi. Rovněž bylo zjištěno, že β -(1,3)-glukany mohou významně snížit hladinu glukózy v krvi, díky inhibici exprese glukózového transportéru-1 už ve střevní sliznici a podporou syntézy jaterního glykogenu. Studie na diabetických myších prokázaly významné snížení hladiny glukózy v krvi. Dále bylo zjištěno, že přítomnost zbytků buněčných stěn kvasinek způsobilo zvýšení hladiny inzulínu u myší [16].

2.3.1.6 Studie léčby vysoké hladiny cholesterolu

Cholesterol je organická látka, která pomáhá tělu zpracovávat tuky a je důležitou složkou při tvorbě buněčných membrán. Dále se cholesterol v těle používá při tvorbě hormonů a vitamínů. Nalezneme ho u lidí především v játrech, nadledvinách a žlučníku. Cholesterol ovlivňuje metabolismus tuků a jeho zvýšená hladina má negativní vliv na kardiovaskulární systém [21].

Zvýšený cholesterol v krvi způsobuje hyperlipidémii. Ve studiích bylo zjištěno, že β -glukany dokáží významně snížit koncentraci celkového cholesterolu a dokáží regulovat expresi genů související s cholesterolem. β -glukany regulují proteinovou expresi p-AKT a p-AMPK, a tím snižují syntézu mastných kyselin a syntézu cholesterolu. V klinických studiích na lidech bylo zjištěno významné snížení koncentrace celkového cholesterolu. Dále bylo ve studiích na myších zjištěno, že zbytky buněčných stěn kvasinek po autolýze významně snížili celkový cholesterol v plazmě a játrech [16].

2.3.2 Lipidy

Jedná se o heterogenní skupinu organických látek nacházející se v organismech. Společně se sacharidy, bílkovinami a nukleovými kyselinami patří mezi základní kameny živých organismů. Jsou omezeně rozpustné ve vodě, ale dobře rozpustné v organických nepolárních rozpouštědlech. Díky jejich hydrofobnímu charakteru mohou být extrahovány z kvasinek do organických nepolárních rozpouštědel, jako jsou hexan, chloroform, ether nebo horký ethanol [15] [22].

Lipidy můžeme dělit na jednoduché, složené a odvozené. Mezi jednoduché spadají triacylglyceroly (tuky) a estery mastných kyselin s jednosytnými vyššími alkoholy (vosky). Mezi složené lipidy spadají fosfolipidy (fosfoacylglyceroly, sfingofosfolipidy), glykolipidy a lipoproteiny. Poslední skupinou jsou odvozené lipidy, mezi které řadíme isoprenoidy (terpeny, karotenoidy, steroidy, vitamíny rozpustné v tucích atd.). Lipidy plní v organismech mnoho funkcí. Jednou z funkcí lipidů v organismu je funkce strukturní, kdy lipidy vytváří v organismech biomembrány. Další funkcí lipidů je ochranná funkce, lipidy zde zabraňují mechanickému poškození a zabraňují nadměrné ztrátě tepla do okolí. Lipidy v organismech rovněž slouží jako zásobárna energie. A to díky energii, která je uložena v dlouhých uhlovodíkových řetězcích mastných kyselin a uvolňuje se za pomoci β -oxidace. Kromě těchto funkcí mohou mít lipidy i regulační funkci, kdy mohou tvořit steroidní hormony, eikosanoidy a vitamíny (A, D, E a K) [15] [22] [23].

2.3.3 Triacylglyceroly

Jedná se chemicky o triacylderiváty glycerolu, konkrétně se jedná o triestery glycerolu s vyššími mastnými kyselinami. Živočišné tyto tuky využívají k dlouhodobému uchování energie, díky dlouhým uhlíkatým řetězcům, které jsou méně oxidované než řetězce sacharidů. Díky tomu poskytují šestkrát vyšší energii než stejná hmotnost rezervního glykogenu [22].

Triacylglyceroly nalezneme převážně v tucích a olejích z rostlinných a živočišných zdrojů. Tyto látky jsou tvořeny směsí triacylglycerolů a většinou u nich nenalezneme volné mastné kyseliny. Podle profilu navázaných mastných kyselin mají TAG rozdílné vlastnosti. Mohou se lišit skupenstvím za pokojové teploty. Rostlinné oleje jsou za pokojové teploty tekuté díky vyššímu množství nasycených mastných kyselin. V porovnání s rostlinnými oleji obsahují tuhé živočišné tuky nižší množství nasycených mastných kyselin [22] [24].

2.3.4 Mastné kyseliny

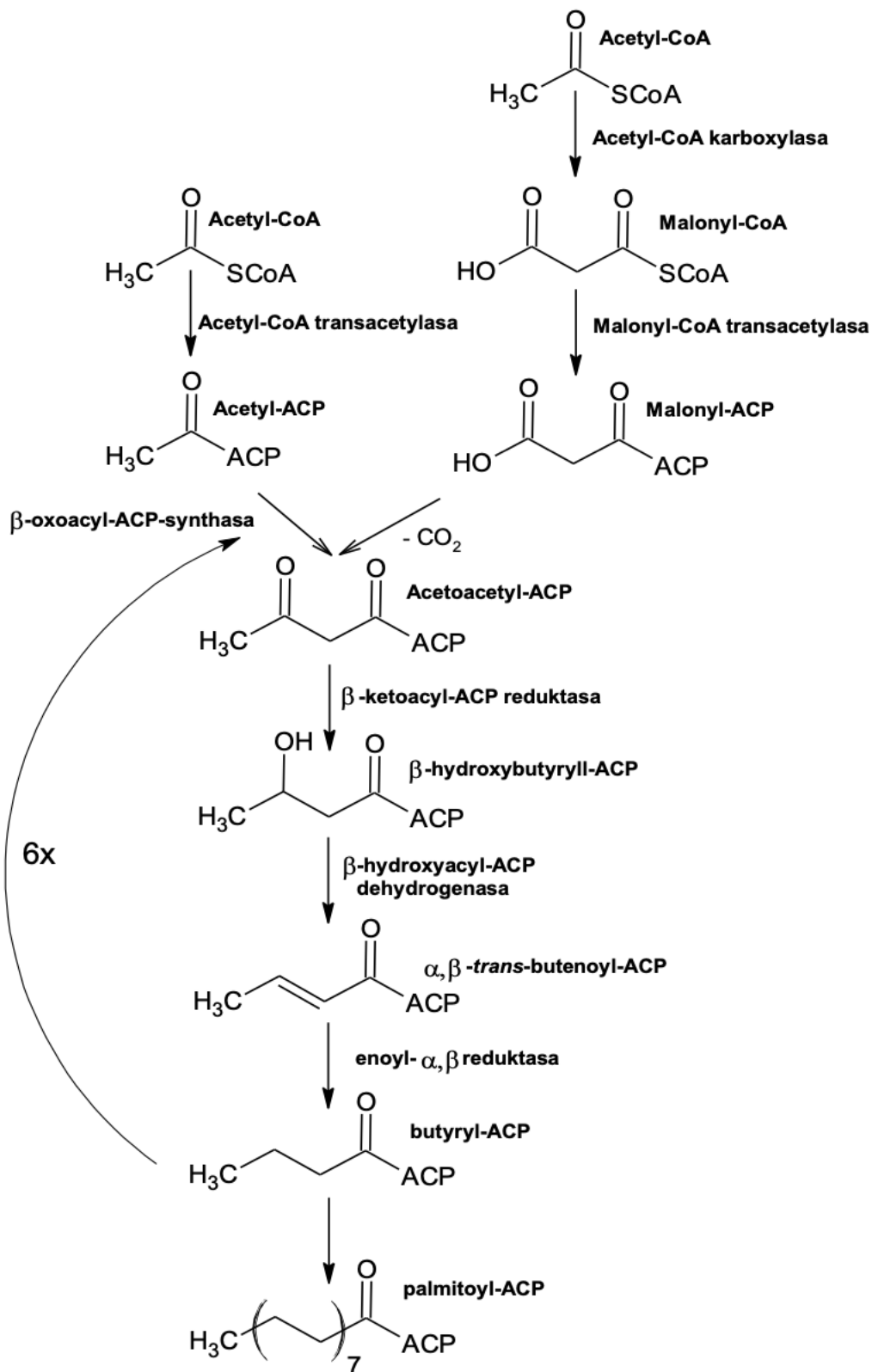
Mastné kyseliny jsou alifatické monokarboxylové kyseliny s dlouhým uhlovodíkovým řetězcem tvořeným ze 4 až 26 atomů. Tento řetězec je až na výjimky nevětvený. V přírodě nalezneme mastné kyseliny především se sudým počtem atomů. Mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků se vyskytují v přírodě málo, neboť biosyntéza mastných kyselin je založena na spojování dvojuhlíkatých jednotek. Mastné kyseliny se dělí na nasycené a nenasycené. Nasycené mastné kyseliny ve svých řetězcích obsahují pouze jednoduché vazby, zatímco nenasycené mastné kyseliny obsahují jednu či více dvojných vazeb. V případě, že obsahují pouze jednu dvojnou vazbu je nazýváme mononenasycené a v případě obsahu více dvojných vazeb polynenasycené mastné kyseliny [15] [24] [25].

Mezi nasycené mastné kyseliny patří kyseliny palmitová C₁₆ a kyselina stearová C₁₈. Nenasycené mastné kyseliny jsou především olejovité látky. Dvojnou vazbu či vazby nalezneme většinou zhruba v polovině molekuly. Dvojně vazby nalezneme obvykle mezi C₉ až C₁₅. Příkladem mononenasycených mastných kyselin je kyselina olejová C₁₈, která má dvojnou vazbu mezi 9. a 10. uhlíkem. Mezi polynenasycené mastné kyseliny patří kyselina linolová C₁₈, kyselina linolenová C₁₈ a kyselina arachidonová C₂₀ [4] [15] [25].

V organismech zastávají různé funkce, například slouží jako prekurzory biologicky aktivních látek, slouží jako zásobárna energie, zároveň díky jejich dlouhým uhlovodíkovým řetězcům pomáhají tvořit membránové dvojvrstvy. Jako zásobárna energie slouží díky vícenásobné vazby C-C, ve které se ukládá velké množství energie. Pro uvolnění této energie slouží proces zvaný β -oxidace, který se odehrává v mitochondriích. Při tomto procesu se rozštěpují dlouhé řetězce mastných kyselin za vzniku Acetyl-CoA. Molekuly Acetyl-CoA se dále používají v anabolických drahách jako je izoprenoidní dráha. Molekula Acetyl-CoA může být rovněž dále využita v katabolické dráze Krebsova cyklu za vzniku energie [15] [24] [25].

2.3.4.1 Biosyntéza mastných kyselin

Syntéza mastných kyselin probíhá v cytosolu buňky. Jedná se o anabolický děj, při kterém dochází ke spotřebě ATP. Prvním krokem syntézy je přeměna acetyl-CoA pomocí enzymu acetyl-CoA karboxylázy na tříuhlíkatou sloučeninu malonyl-CoA. Dále je potřeba upevnit malonyl-CoA na acyl-carrier protein (ACP). Tuto reakci katalyzuje enzym malonyl-CoA transacyláza, který katalyzuje přeměnu malonyl-CoA na malonyl-ACP. Podobným způsobem je dále přeměněna molekula acetyl-CoA na acetyl-ACP. Tyto nově vzniklé sloučeniny se spojí za vzniku C-C vazby a za současného odštěpení karboxylové skupiny za vzniku čtyřuhlíkaté sloučeniny β -oxoacyl-ACP. Následně dojde k redukci oxo skupiny vlivem katalýzy β -oxoacyl reductázy a současně dochází k oxidaci kofaktoru NADPH za zisku 3-hydroxyacyl-ACP. V dalším kroku za pomoci β -hydroxyacyl dehydrogenázy probíhá dehydratace za vzniku enoyl-ACP. Redukce acyl-ACP katalyzována enoyl-reduktázou. Celý postup se opakuje šestkrát, než vznikne šestnácti uhlíkatý palmitoyl-ACP. V závěrečném kroku dochází k hydrolytickému odštěpení ACP a vzniku konečného produktu kyseliny palmitové. Pro tvorbu dalších typů mastných kyselin jsou zapotřebí následně enzymově katalyzované úpravy [15] [22] [24].



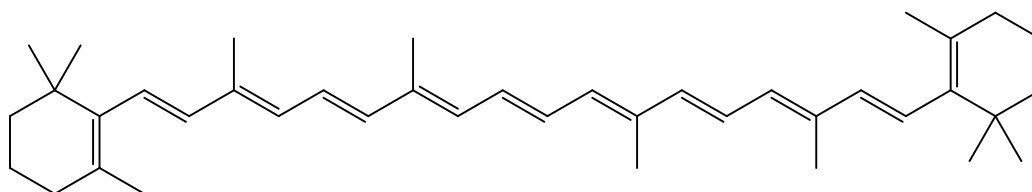
Obrázek 6: Biosyntéza mastných kyselin [4].

2.3.5 Karotenoidy

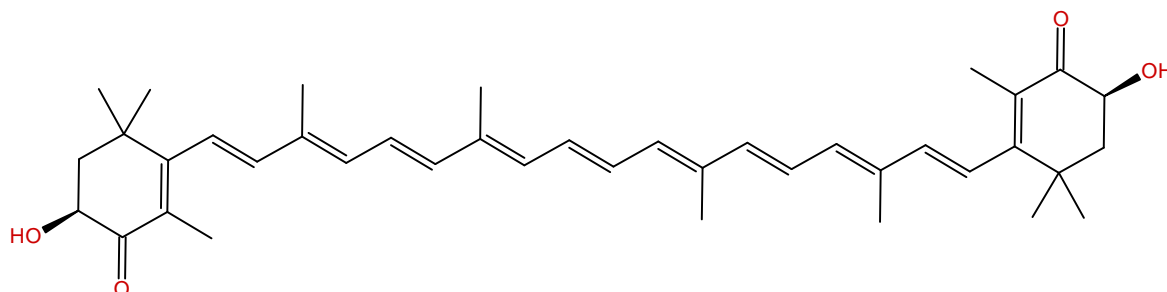
Karotenoidy jsou přírodní pigmenty, které nalezneme v nižších i vyšších organismech. Nalezneme je u sinic, kvasinek, bakterií, řas či rostlin. V buňce jsou karotenoidy uloženy v plazmatické membráně. Mají charakteristickou barvu žlutou až červenou. Nejznámějším zástupcem je β -karoten, který má typickou oranžovou barvu a můžeme ho najít v mrkvi. Karotenoidy se podílejí na přenosu energie při fotosyntéze, zároveň mají ochranný účinek proti UV záření. U rostlin zároveň slouží k lákání hmyzu na květy. U živočichů karotenoidy slouží jako provitamin A, neboť si sami neumějí vitamín A syntetizovat a musejí ho přijímat ze stravy. Karotenoidy v těle posilují imunitní systém, urychlují hojení ran a mají antioxidační účinky [10] [15].

Karotenoidy jsou produkty izoprenoidní dráhy, která je součástí primárního a sekundárního metabolismu. Tyto přírodní pigmenty jsou odvozené od terpenů. Skládají se z 8 izoprenových jednotek. Jsou to nenasycené alifatické, alicyklické uhlovodíky a jejich oxidační produkty. Většina karotenoidů spadá do skupiny tetraterpenů s 40ti uhlíkatou kostrou. Vlastnosti karotenoidů se odvozují od jejich struktury, zejména podle řetězce konjugovaných vazeb. Konjugovaný systém dvojných vazeb způsobuje barevnost těchto molekul. Karotenoidy jsou lipofilní látky, které jsou nerozpustné ve vodě, ale jsou rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Karotenoidy absorbují záření v oblasti 480 až 570 nm. Jednotlivá barviva lze oddělit chromatograficky [15].

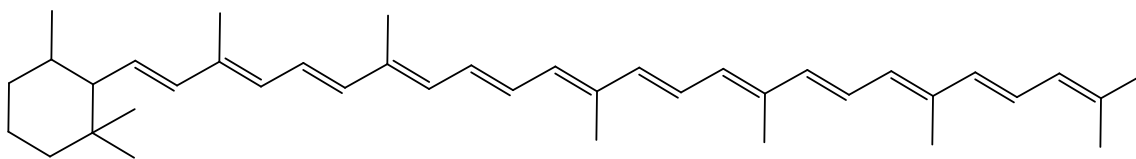
Dělí se na xanthofyly a karoteny. Karoteny jsou tvořeny uhlovodíkovými strukturami. Mezi zástupce karotenů patří β -karoten nebo třeba lykopen. Zatímco xanthofyly jsou kyslíkaté deriváty karotenů. Mezi jejich zástupce patří lutein, astaxantin či flavoxantin [4] [15].



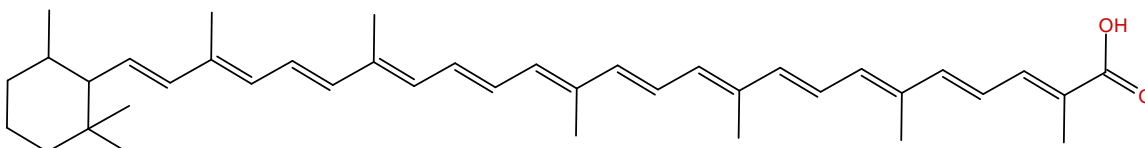
Obrázek 7: Struktura β -karotenu, vlastní zpracování dle [26].



Obrázek 8: Struktura astaxantinu, vlastní zpracování dle [27].



Obrázek 9: Struktura torulenu, vlastní zpracování dle [28].



Obrázek 10: Struktura torularhodinu, vlastní zpracování dle [29].

2.3.5.1 Biosyntéza karotenoidů

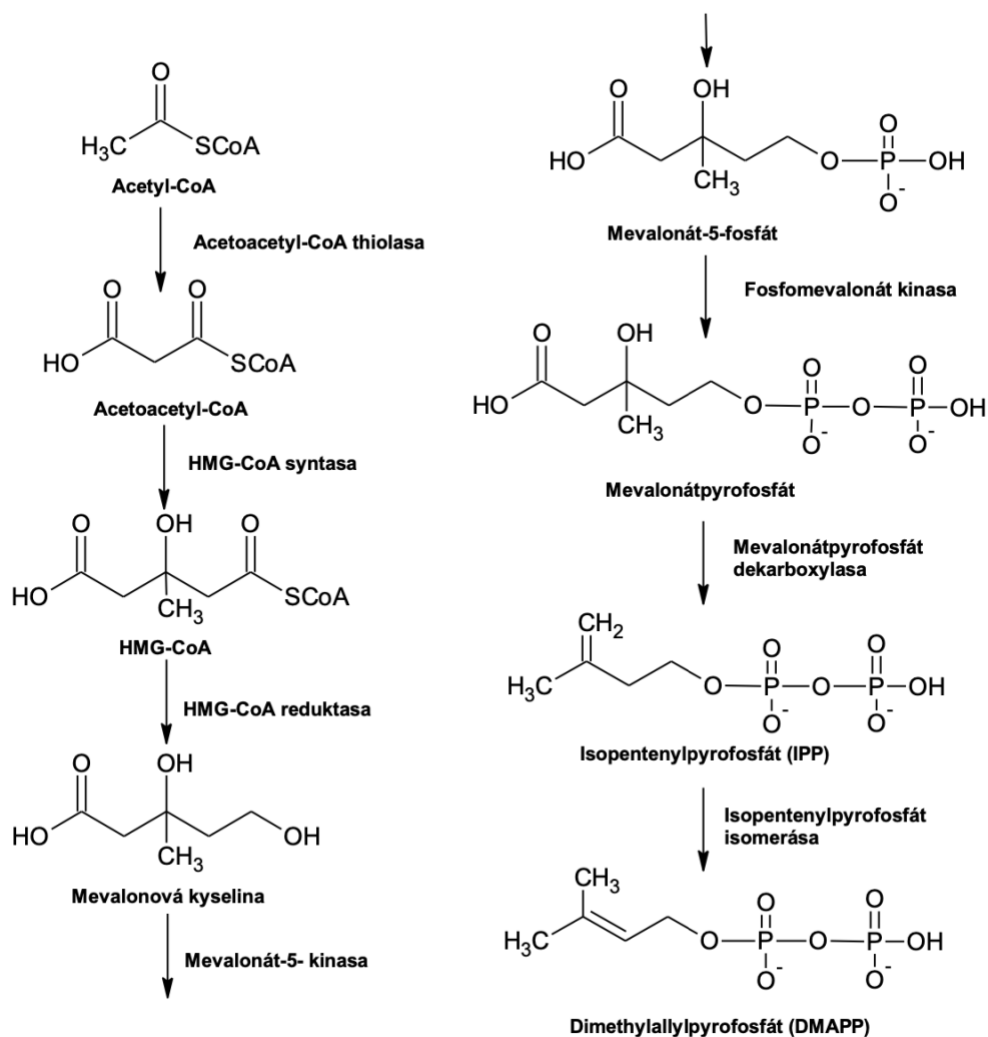
Karotenoidy jsou produkty izoprenové dráhy, která je součástí sekundárního metabolismu. Jedná se o dvoustupňový proces: prvním krokem je syntéza aktivního izoprenu ve formě isopentenylpyrofosfátu (IPP) nebo dimethylallylpyrofosfátu (DMAPP). Druhým krokem kondenzace aktivovaných izoprenových jednotek. Následnou úpravou poté vznikají jednotlivé deriváty karotenoidů. Izopren se využívá k syntéze karotenoidů, a dalších esenciálních molekul jako jsou steroly, steroidní hormony, elektronové transportéry nebo ubichinon [4] [15].

2.3.5.2 Mevalonátová syntéza

Jedná se o základní metabolickou dráhu mnoho bakterií a všech vyšších eukaryot. Tato dráha je umístěna na rozhraní hladkého endoplazmatického retikula a buněčné cytoplazmy. Mevalonátovou dráhu lze rozdělit na dvě části [4] [15].

První část mevalonátové dráhy začíná pro všechny produkty stejně. Vstupní molekulou a jediným zdrojem uhlíku pro tuto dráhu je acetyl-CoA. Dvě molekuly acetyl-CoA kondenzují za vzniku acetoacetyl-CoA. Acetoacetyl-CoA kondenzuje s třetí molekulou acetyl-CoA za vzniku β -hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Poslední krok této části je řízen enzymem HMG-CoA reduktázou. Tento enzym redukuje HMG-CoA na kyselinu mevalonovou za spotřeby 2 NADPH [15] [22].

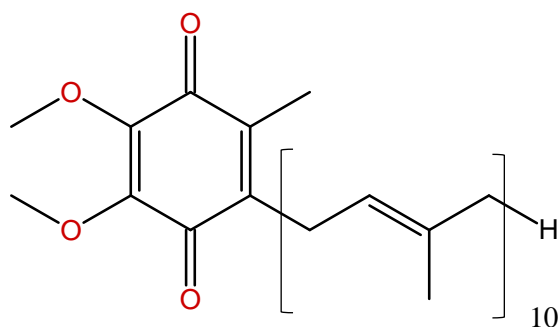
Druhá část mevalonátové dráhy je u každé skupiny organismů odlišná. U eukaryot dochází k dvojité fosforylaci kyseliny mevalonové za vzniku mevalonátpyrofosfátu za spotřeby 2 ATP. V dalším kroku dochází k dekarboxylaci spotřebou ATP za vzniku isopentenylpyrofosfátu (IPP). Izomerizační enzym v případě potřeby převádí IPP na DMAPP. Produkty této dráhy jsou isopentenylpyrofosfát (IPP) a dimethylallylpyrofosfát (DMAPP). Tyto látky se dále používají k syntéze izoprenoidů, prenylaci proteinů, N-glykosylaci nebo k syntéze hormonů [15] [22].



Obrázek 11: Mevalonátová dráha [4].

2.3.6 Ubichinon

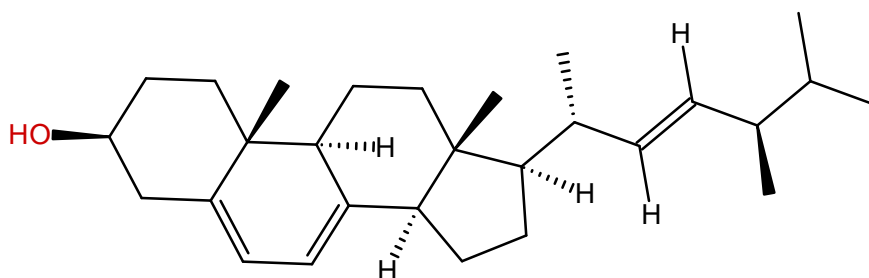
Těž známý pod názvem koenzym Q10. Jedná se o sloučeninu rozpustnou v tucích a řadí se mezi chinony. Má strukturu chinonového jádra a polyprenylového řetězce. Koenzym Q10 je důležitou součástí elektronového transportního řetězce v mitochondriích. Využívá se v procesu oxidativní fosforylace. Během tohoto procesu dochází k oxidaci redukovaných kofaktorů FADH_2 a NADH , z těchto kofaktorů je tvořeno ATP. Primární funkci ubichinonu nalezneme v dýchacím řetězci, kde je součástí elektronového transportního řetězce. První částí je chinonové jádro, díky kterému je koenzym Q10 schopný přijímat elektrony. Druhou částí je polyprenylový řetězec, který zvyšuje nepolární povahu molekuly. Díky tomu se může ubichinon nacházet v nepolární vnitřní části biomembrány. Využívá se v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. V kosmetickém průmyslu se využívá především v přípravcích proti stárnutí pokožky. Proces stárnutí kůže a organismu je spojen se snižováním hladiny ubichinonu v buňkách [30] [31].



Obrázek 12: Struktura ubichinonu, vlastní zpracování podle [32].

2.3.7 Ergosterol

Ergosterol se řadí do skupiny sterolů. Nalezneme ho v buněčných stěnách kvasinek, kde zajišťuje správnou funkci lipidické membrány. Jeho přítomnost ovlivňuje permeabilitu membrány a aktivitu membránových enzymů. Můžeme ho rovněž nalézt v cytosolu, kde napomáhá při látkové výměně. U kvasinek ergosterol reguluje proteinkinázu, která je v buňce potřebná k iniciaci růstu. Ergosterol je velice dobře rozpustný v tucích, ale je téměř nerozpustný ve vodě. Strukturou se podobá cholesterolu, ovšem liší se v methylové skupině, která je vázaná na uhlík C₂₄ a v přítomnosti dvou dvojných vazeb mezi uhlíky C₇-C₈ a C₂₂-C₂₃. Ergosterol je prekurzorem vitamínu D [33].



Obrázek 13: Struktura ergosterolu, vlastní zpracování podle [34].

2.4 Analytické techniky pro stanovení mikrobiální biomasy

2.4.1 Spektrofotometrie

Jedná se o analytickou metodu, které se využívá v řadě biochemických stanovení. Tato metoda využívá skutečnosti, že velké množství látek pohlcuje elektromagnetické záření. Principem této metody je právě absorpce záření vzorkem. Kdy paprsek, který prochází vzorkem, může být různé vlnové délky. Nejčastěji se pro paprsek využívá viditelné a ultrafialové spektrum, ale může se využít i infračervená oblast záření [35] [36].

Pohlčením energie paprsku dochází ve vzorku k excitaci elektronů v molekulových orbitalech do vyšších energetických vrstev. Excitované elektrony se následně vrací na svoji základní energetickou hladinu. Při tomto návratu dochází k vyzáření přebytečné energie, jako sekundární záření a teplo. Pro výpočet využíváme měrné veličiny absorbance, která udává, kolik měřený vzorek pohltil záření. K výpočtu se využívá Lambert-Beerův zákon:

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

kde A je absorbance, ε je molární absorpční koeficient, c je molární koncentrace a l je tloušťka stěny kyvety [35].

Míra absorpce záření o různých vlnových délkách, které vzorek pohltil se odvíjí od struktury sloučeniny. Množství absorpce záření určité vlnové délky, závisí na koncentraci rozpuštěné látky [35] [36].

Jako zdroj záření se využívá žárovka nebo xenonová výbojka, zdroj záření se volí podle rozsahu vlnových délek, které na měření potřebujeme. Další částí spektrofotometru je monochromátor, který se používá k úpravě polychromatického záření na monochromatické o námi požadované vlnové délce. Následně prochází paprsek kyvetou se vzorkem, kyveta se volí z vhodného materiálu tak, aby neovlivňovala naše měření. Po průchodu paprsku je měřeno za pomoci detektoru množství neabsorbovaného paprsku. Díky této hodnotě zjistíme množství absorbovaného záření. Spektrofotometrů je celá řada, pro stanovení vzorků v kyvetách se využívá jednopaprskového nebo vícepaprskového spektrofotometru. Pokud máme vzorky třeba na mikrotitračních destičkách, pak lze využít multipozičního měření za pomoci ELISA readeru [35] [36].

2.4.2 HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

Jedná se o chromatografickou metodu, která je vhodná k dělení kapalných a tuhých méně těkavých organických látek. Tyto látky musí být rozpustné ve vodě, organických rozpouštědlech nebo ve zředěných kyselinách. Principem této metody je separace analytů na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází. Stacionární fáze je nepohyblivá a zakotvená na chromatografické koloně. Mobilní fáze je kapalná, protéká kolonou a unáší sebou analyt. Vzorky jsou dávkovány za pomoci autosampleru do dávkovacího ventilu, odkud přechází do mobilní fáze. Mobilní fáze unáší jednotlivé složky vzorku na předkolonu, které se používá k ochraně kolony. Poté putuje na kolonu, kde dochází k separaci analytů na základě jejich rozdílných vlastností. Separované složky jsou detekovány v průtokové cele za pomoci detektoru. Výstupem z detektoru je chromatogram, jedná se o grafický záznam závislosti odezvy detektoru na retenčním čase. Při následném vyhodnocování se hodnotí plocha nebo výška píku [35] [36].

Hlavními částmi HPLC jsou: zásobník mobilní fáze, čerpadlo, autosampler, dávkovací ventil, předkolona, kolona (nerezová trubice naplněná stacionární fází, př. silikagel nebo oxid hlinitý), termostat, detektor (detektor volíme podle veličiny, kterou chceme měřit, běžně používané detektory: UV-VIS detektor, PDA detektor, refraktometrický detektor, fluorescenční detektor, hmotnostní spektrometr) a systém pro vyhodnocení dat [35] [36].

2.4.3 GC (plynová chromatografie)

Plynová chromatografie se řadí do skupiny chromatografických metod. Tato separační metoda se využívá k dělení a stanovení pevných látek, kapalných látek a plynů. Metoda je založena na dělení složek mezi plynou mobilní fází a stacionární fází (kapalná nebo tuhá fáze). Mobilní fází je inertní nosný plyn. Stacionární fáze je umístěna v koloně, tato kolona je oproti HPLC výrazně delší a tenčí. Jsou dva typy kolon: náplňové a kapilární. Náplňové kolony mají jako stacionární fází pevnou látku (aktivní uhlí, silikagel) nebo vysokovroucí kapalinu nanesenou v tenké vrstvě na pevném, inertním nosiči. Kapilární kolona má stacionární fází nanesenou v tenké vrstvě na vnitřní stěně křemenné kapiláry [35] [36].

Vzorky jsou dávkovány za pomoci autosampleru do lineru, kde je vzorek odpařen. Dále postupuje ve formě par a je unášen nosným plynem. Nosný plyn unáší složky vzorku kolonou, každá složka kolonou postupuje jinou rychlostí na základě distribuční konstanty K_D :

$$K_D = c_s/c_m,$$

kde c_s je koncentrace stacionární fáze a c_m je koncentrace mobilní fáze. Složky vzorku vstupují do detektoru v pořadí rostoucích hodnot distribučních konstant. Detektor detekuje koncentraci složek vzorku v nosném plynem. Výstupem je chromatogram, což je graf závislosti signálu detekce na čase. Vykreslené píky se dále určují, kdy poloha píku určuje druh látky a plocha píku určuje množství látky ve vzorku [35] [36].

2.4.4 Stanovení polysacharidů, exopolysacharidů

2.4.4.1 Enzymatické stanovení β -glukanu

Tato metoda od společnosti Megazyme se používá k měření celkových glukanů a α -glukanů v houbách a myceliích, kdy odečtem těchto hodnot získáme množství β -glukanů ve vzorku.

Metoda stanovení celkových glukanů se zakládá na řízené kyselé hydrolyze s H_2SO_4 . Kdy (1,3)- β -D-glukany, (1,6)- β -D-glukany a α -glukany se rozpustí v ledové kyselině sírové, následně se hydrolyzují v 2M H_2SO_4 . Zbylé fragmenty glukanů se kvantitativně hydrolyzují na glukózu pomocí směsi *exo*-1,3- β -glukanázy a β -glukosidázy. Díky tomu získáme množství celkových glukanů. α -glukan, který se skládá ze struktury podobné škrobu/glykogenu, volné glukózy a glukózy ze sacharózy. Tyto látky byly specificky měřeny po hydrolyze škrobu/glykogenu na D-glukózu a D-fruktózu pomocí amyloglukosidázy a invertázy. Glukóza je dále specificky obarvena pomocí činidla GOPOD a změřena spektrofotometricky. β -glukan byl stanoven na základě rozdílu celkového a α -glukanu [37] [38].

2.4.4.2 Stanovení neutrální cukrů dle Duboise

Tato metoda stanovení neutrálních cukrů je založena na dehydrataci cukrů kyselinou sírovou. Po dehydrataci v roztoku vznikne furfural nebo 5-hydroxymethylfurfural, tyto produkty následně kondenzují s fenolem za vzniku barevných kondenzačních produktů. Tyto barevné produkty se dále spektrofotometricky stanovují [39].

3 CÍL PRÁCE

V rámci této práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Přehledná literární rešerše zaměřená na karotenogenní kvasinky a jejich metabolity
- 2) Produkce obohacené kvasinkové biomasy v laboratorních bioreaktorech
- 3) Analýza složení produkované biomasy kvasinek
- 4) Optimalizace metod stanovení polysacharidů kvasinek
- 5) Optimalizace metod izolace beta-glukanů
- 6) Vyhodnocení výsledků

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie pro kultivaci

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, p.a., Lach:ner (ČR)

Dusičnan sodný p.a., Lach:ner (ČR)

Síran manganatý heptahydrát p.a., Lach:ner (ČR)

Odpadní glycerol (ČR)

Síran amonný p.a., Penta (ČR)

Kvasničný autolyzát, Roth (SRN)

Pepton, Himedia (India)

Glycerol, p.a., Penta (ČR)

4.1.2 Chemikálie pro izolaci β -glukanů

Chlorid sodný p.a., Lach:ner (ČR)

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, p.a., Lach:ner (ČR)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, p.a., Lach:ner (ČR)

Hexan, p.a., Lach:ner (ČR)

Isopropanol p.a., Lach:ner (ČR)

Aceton p.a., Penta (ČR)

Ethanol p.a., Penta (ČR)

Hydroxid sodný p.a., Lach:ner (ČR)

Kyselina octová, p.a., Lach:ner (ČR)

4.1.2.1 Použité enzymy

Trypsin from *Porcine Pancreas*, Sigma Aldrich (SRN)

Papain from *Papaya carica*, SERVA (SRN)

Bromelain from *pineapple stem*, SERVA (SRN)

4.1.3 Chemikálie pro stanovení karotenoidů

Methanol, p.a., Lachema (ČR)

Chloroform, p.a., Penta (ČR)

Acetonitril HPLC kvality, Lach:ner (ČR)

Ethylacetát HPLC kvality, Lach:ner (ČR)

Hexan, p.a., Lach:ner (ČR)

Trishydroxymethyl amino methan, p.a., Lach:ner (ČR)

4.1.4 Chemikálie pro stanovení mastných kyselin

Kyselina heptadekanová GC kvality, Sigma Aldrich (SRN)

Kyselina sírová (96 %), Lach:ner (ČR)

Methanol, p.a., Lachema (ČR)

Hydroxid sodný, p.a., Lach:ner (ČR)

Hexan, p.a., Lach:ner (ČR)

Vodík 5.5 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

Dusík 5.0 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

Vzduch 5.0 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

4.1.5 Chemikálie pro stanovení β -glukanů

Kyselina sírová (96 %), Lach:ner (ČR)

Hydroxid draselný p.a., Lach:ner (ČR)

Kyselina octová, p.a., Lachema (ČR)

Hydroxid sodný p.a., Lach:ner (ČR)

Sada kitu, K-YBGL (IRL)

4.1.6 Chemikálie pro stanovení cukrů dle Duboia

Fenol, Lach:ner (ČR)

Kyselina sírová (96 %), Lach:ner (ČR)

D-glukóza monohydrát p.a., Lach:ner (ČR)

4.1.7 Chemikálie pro stanovení proteinů dle Biureta

Chlorid sodný, p.a., Lachema (ČR)

Vinan draselný-sodný tetrahydrát, p.a., Lach:ner (ČR)

Hydroxid sodný, p.a., Lach:ner (ČR)

Síran měďnatý pentahydrát, p.a., Lach:ner (ČR)

Hovězí Albumin, Serva (SRN)

4.2 Použité přístroje

Analytické váhy, Boeco

Automatické pipety, Biohit (DE) a Discovery

Autokláv Systec

Centrifuga vysokorychlostní chlazená Z 36 HK, HERMILE Labortechnik

ELISA Synergy HTX, BioTech

Fermentor RALF 7 l, Bioingeniring

Homogenizátor BeadBug, Benchmark Scientific

Lyofilizátor FreeZone 4.5 l Freeze Dry Systém, Labconco

Magnetická míchačka Stir HP 10M

Centrifuga micro 120, Hettich (DE)

Mikroskop L II ooA, Itraco Micro

Mlýnek na kávu, Sencor

96jamkové mikrotitrační destičky, vwr (USA)

pH metr pH 50 VioLab

Předvážky Scout Pro, OHAUS

Vakuová odparka HB4 basic, HBA Labortechnik

Vortex, OHAUS

Spektrofotometr UV/VIS, Boeco

Sterilizační life box, Esco Technologies, Inc.
Stolní centrifuga, Hermile
Skříňová třepačka ZWYR-D2401, Labwirt
Termoblok SBH200D Stuart
Multikanálová pipeta (5-50 µl), Witeg (DE)
Ultrazvuková lázeň PS 02000, Powersonic s.r.o (SK)
HPLC/PDA sestava:

- Sestava Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fischer, USA)
- PDA detektor řady Vanquish (Thermo Fischer, USA)
- Kolona Kinetex C18 EVO 150 mm; 4,6 mm; 2,6 µm, Phenomenex (USA)
- Držák předkolony: KJ0-4282, Phenomenex (USA)
- Předkolona: C18, AJ0-4287, Phenomenex (USA)
- Filtry pro HPLC, PTFE 0,4 µm, Chromservis (ČR)
- Vyhodnocovací software Chromeleon 7.2

GC/FID sestava:

- TRACE 1300 TM (Thermo Fischer, USA)
- Kapilární kolona LION GC FAME, 30 m; 0,25 mm; 0,20 µm, Phenomenex (USA)
- Vyhodnocovací software Chromeleon 7.2

4.3 Použitý kmen

Rhodotorula toruloides CCY 062-002-004

4.4 Kultivace karotenogenních kmenů kvasinek

Před samotnou kultivací v bioreaktoru je nutné připravit kultivační médium, podle požadavků mikroorganismu. Další důležitou částí je příprava inokula. Inokulum neboli očkovací kultura je složená z námi vybraného produkčního kmene. Příprava inokula probíhá následujícím způsobem. Nejdříve se kmen kvasinky zaočkuje na Petriho misku s agarem, následně probíhá kultivace. Po uplynutí kultivace je kmen přeočkován do inokula, kde se dále množí, a takto připravená očkovací kultura v dostatečném množství je zaočkovávána do připraveného bioreaktoru.

Ke kultivaci byl vybrán kmen *Rhodotorula toruloides* jedná se o mezofilní a aerobní mikroorganismus. Kvasinky jsou kultivovány za optimalizovaných podmínek za neustálého třepání, laboratorní teploty a neustálého osvětlení pro produkci karotenoidů. Média byla nejdříve sterilována v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 40 minut při 121 °C.

4.4.1 Inokulum I a II

Prvním krokem byla příprava zásobního mikroorganismu na Petriho misky. Mikroorganismus se na Petriho misce nechal kultivovat 3 dny. A poté byla připravena inokulační média, která se vysterilovala. Inokulum I mělo objem 50 ml a v první fázi kultivace do něj bylo zaočkováno 5 kliček zvoleného kmene kvasinek ze zásobní kultury z Petriho misky. Kultivace inokula I probíhala 24 h, poté bylo inokulum I přeočkováno do inokula II v poměru 1:5.

Tabulka 1: Složení inokulačního média I a II.

Látka	Množství
Voda	1000 ml
Glycerol	20 g
Kvasničný autolyzát	10 g
Pepton	20 g

4.4.2 Kultivace ve fermentorech

Kultivace ve fermentoru probíhala po dobu 96 hodin. V průběhu kultivace byly odebírány vzorky v pravidelných intervalech. Tyto vzorky byly dále zpracovávány centrifugací pro oddělení biomasy od média. Následně byly vzorky biomasy promyty, lyofilizovány a podrobeny analýzám v závislosti na množství biomasy. Ze zjištěných množství biomasy v časech odběrů byla sestavena růstová křivka a u vzorků s dostatečným množstvím biomasy bylo provedeno stanovení karotenoidů, lipidů a glukánů.

Pro kultivaci byl vybrán fermentor o objemu 7 litrů. Pracovní objem byl zvolen na 5 litrů. Fermentorová nádoba byla před kultivací naplněna produkčním médiem a byly zapojeny sondy pro snímání hodnoty pH, teploty, a množství rozpuštěného kyslíku (pO_2). pH sonda byla kalibrována za pomoci standardů $pH = 4,01$ a $pH = 9,00$. Následně byla fermentorová nádoba umístěna do autoklávu a sterilována při $121\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut. Po sterilaci byla fermentorová nádoba připojena k řídicí jednotce. Ihned byla nakalibrována pO_2 sonda na hodnotu 0 %. Následně po vychlazení na kultivační teplotu, úpravě pH a intenzivní aeraci nakalibrována maximální teplota rozpuštěného kyslíku na 100 %. Pro regulaci pH byly použity zásobní roztoky 10% kyseliny sírové a hydroxidu draselného, které byly dávkovány za pomoci peristaltických čerpadel. Poté bylo přidáno inokulum a látka snižující pěnovost (antifoam). Jako externí zdroj světla se využila zářivka. Inokulum bylo přečerpáno do produkčního média a byla zahájena kultivace.

Tabulka 2: Složení produkčního média do fermentoru. Tabulka 3: Složení mikroelementového roztoku.

Látka	Množství
Voda	1000 ml
Odpadní glycerol	92,50 g
KH_2PO_4	8,00 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	1,50 g
$(NH_4)_2SO_4$	8,00 g
$NaNO_3$	10,12 g
Mikroelementový roztok	4 ml

Složka	Množství
Voda	1000 ml
H_3BO_3	1,25 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,10 g
KI	0,25 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,82 g
$FeCl_3$	0,30 g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0,50 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1,00 g

4.5 Gravimetrické stanovení biomasy

Pro stanovení produkce biomasy bylo odebráno 10 ml vzorku média z fermentoru. Vzorek byl zcentrifugován za pomoci centrifugy při 5000 rpm po dobu 3 minut. Supernatant byl slit a biomasa byla promyta 20 ml destilované vody a znovu zcentrifugována. Následně byl vzorek biomasy zamražen při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté lyofilizován. Po lyofilizaci byl vzorek zvážen na analytických vahách, a ze zjištěných hodnot byla sestavena růstová závislost biomasy na čase.

4.6 Postupy izolace β -glukanu

Izolace β -glukanů byla provedena pomocí 4 izolačních postupů, které byly navrženy na základě rešerše v dostupných literárních zdrojích zabývajících se problematikou izolace a identifikace β -glukanů.

4.6.1 Izolace β -D-glukanu: Postup A

Tento postup izolace byl inspirován touto prací [40], postup byl dále upraven dle potřeby našeho experimentu. Tento postup je založen na šetrné autolýze buněk kvasinek, poté následovala postupná extrakce jednotlivých komponent buněk. Předpokládaným vyizolovaným produktem jsou β -glukany s nezměněnou konformací.

Nejdříve bylo naváženo 20 g lyofilizované biomasy *Rhodotorula toruloides*, která byla kultivovaná ve fermentoru. K biomase byl přidán 3% roztok NaCl, dále byla směs zahřívána za stálého míchání 24 hodin při teplotě $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před dalším postupem byla směs krátce zahřáta na teplotu $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dále byla směs ochlazená na laboratorní teplotu, zcentrifugována a promyta destilovanou vodou. Dalším krokem byla úprava horkou vodou při teplotě $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 hodiny. Směs byla dále zcentrifugována a sediment byl doplněn roztokem 0,02 M fosfátového pufru o $\text{pH} = 7,5$. Takto připravená směs byla vložena do autoklávu na 4 hodiny při teplotě $121\text{ }^{\circ}\text{C}$. Směs byla dále ochlazená na teplotu $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, zcentrifugována a promyta destilovanou vodou.

V dalším kroku byla provedena vícenásobná extrakce sérií organických rozpouštědel s rozdílnou polaritou. Po odstranění lipidů byla směs β -glukanů podrobena proteolýze za pomoci roztoku trypsinu. Proteolýza probíhala 2 hodiny při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dále byla směs β -glukanů zcentrifugována, promyta a lyofilizována. Takto vyizolovaný β -glukan byl uložen při $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další analýzy.

4.6.2 Izolace β -glukanu: Postup B

Postup izolace byl inspirován článkem [41], dále byl postup upraven dle potřeby našeho experimentu. Tento postup je založen na méně šetrné metodě za použití kyselin a zásad.

Bylo naváženo 20 g lyofilizované biomasy *Rhodotorula toruloides*. Předúprava byla provedena alkalickým promytím s roztokem NaOH o pH= 10 po dobu 30 minut. Dále byla směs zcentrifugována a promyta destilovanou vodou. Dále byl přimíchán 3% roztok NaCl. Směs byla inkubována 24 hodin při teplotě 55 °C za stálého míchání. Po této době byl roztok 15 minut zahříván na 80 °C. Po ochlazení byla směs zcentrifugována a promyta destilovanou vodou. Dalším krokem byla alkalická úprava 1 M roztokem NaOH. Směs byla zahřívána po dobu 2 hodin za stálého míchání při teplotě 90 °C. Dále byla provedena kyselá hydrolyza 1 M kyselinou octovou za stálého míchání při teplotě 80 °C po dobu 2 hodin.

V dalším kroku byla provedena vícenásobná organická extrakce za pomoci série rozpouštědel s odlišnou polaritou. Dále probíhala proteolýza trypsinem. Proteolýza probíhala 2 hodiny při teplotě 37 °C. Takto připravený β -glukan byl zcentrifugován, promyt a zlyofilizován. Zlyofilizovaný β -glukan byl uložen při teplotě -30 °C pro další analýzy.

4.6.3 Izolace β -glukanu: Postup C

Tento postup izolace byl inspirován článkem [17]. Autolýza buňky se zde provádí horkou vodou. Bylo naváženo 20 g lyofilizované biomasy *Rhodotorula toruloides* a byla přidána deionizovaná voda. Autolýza buněk probíhala při teplotě 50 °C po dobu 48 h. Dalším krokem byla úprava suspenze na 15% w/w pevných látek pomocí deionizované vody. Dále byla suspenze vložena do autoklávu na teplotu 121 °C po dobu 6 h. Centrifugací byl získán čerstvý glukan, který se dále upravoval deproteinizací pomocí enzymů papainu a bromelainu. Získaný glukan byl vysušen lyofilizací a uložen v -30 °C pro další analýzy.

4.6.4 Izolace glukanu: Postup D

Postup D je založen na acidobazické metodě a byl inspirován článkem [16]. Nejdříve bylo naváženo 20 g lyofilizované biomasy *Rhodotorula toruloides*. Byla provedena autolýza 1 M NaOH při teplotě 90 °C po dobu 1 h. Po odstředění suspenze byl získán nerozpustný glukan. Supernatant byl smíchán s absolutním ethanolem v poměru 1:4, roztok byl nechán přes noc při teplotě 4 °C. Druhý den byl rozpustný glukan oddělen od supernatantu. Supernatant byl dále zpracován odpařením za získání mannanu. Nerozpustný glukan, rozpustný glukan a mannan byly dále vysušeny lyofilizací a uloženy v -30 °C pro další analýzy.

4.7 Postup stanovení karotenoidů pomocí HPLC

4.7.1 Extrakce karotenoidů

Prvním krokem této extrakce je extrakce dle Folche, při které jsou extrahovány ergosterol, ubichinon, karotenoidy a další nepolární látky. Pro extrakci bylo naváženo za pomoci analytických vah 20 mg biomasy do šroubovacích plastových vialek o objemu 2 ml. Biomasa byla ve vialkách hydratována 1 ml destilované vody po dobu 30 minut. Následně byla biomasa zcentrifugována a supernatant byl vylit. V dalším kroku bylo k biomase přidáno cca 0,5 ml skleněných kuliček a 1 ml methanolu. Plastové vialky byly umístěny na multipoziční vortex a po dobu 20 minut byly intenzivně protřepávány. Dále byly připraveny 15 ml zkumavky se zábrusem, do kterých byl celý obsah vialky přelit. Do zkumavek byly přidány 2 ml chloroformu a tato směs byla třepána 20 minut na vortexu. Dále byl přidán 1 ml destilované vody a vzorek byl zcentrifugován (1500 rpm, 1 minutu). Směs se rozdělila na 2 fáze a za pomoci pipety byla odebrána spodní chloroformová fáze do 15 ml zkumavky. Chloroform byl odpařen pod dusíkovou inertní atmosférou v termobloku při teplotě 35 °C. Odparek byl rozpuštěn ve 2 ml směsi HPLC rozpouštědel o složení 2:1 acetonitril:ethylacetát. Směs byla důkladně protřepávána na vortexu a přefiltrována přes PTFE filtr do skleněné vialky pro HPLC/GC. Takto připravený vzorek byl buď hned analyzován, nebo byl uskladněn v mrazničce při -40 °C.

4.7.2 Analýza karotenoidů metodou HPLC/PDA

Extrahované vzorky, které obsahovaly ergosterol, ubichinon a karotenoidy, byly analyzovány na HPLC. Pro analýzu byl použit HPLC značky Thermo Fischer Scientific, kolona byla použita kinetex EVO C18 o rozměrech 150 x 4,6 x 2,6 mm. Eluce probíhala v gradientovém módu o průtoku mobilní fáze 1,2 ml/min s dobou analýzy 25 minut. Vzorek byl detekován za pomoci detektoru fotodiodového pole (PDA) při vlnové délce 445 nm pro karotenoidy a 285 nm pro ergosterol a ubichinon. Na základě naměřených standardů a jejich kalibračních křivek byla provedena identifikace. Dále bylo provedeno kvantitativní stanovení vzorku. Celkové vyhodnocení vzorků se provádělo v programu Chromeleon 7.2.

Tabulka 4: Složení mobilní fáze pro HPLC.

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

Tabulka 5: Změna gradientu mobilní fáze v časových intervalech.

Čas analýzy (min)	MF A (%)	MF B (%)
0	100	0
13	0	100
19	0	100
20	100	0
25	100	0

4.8 Postup stanovení mastných kyselin pomocí GC

4.8.1 Transesterifikace a extrakce mastných kyselin pro GC analýzu

Stanovení lipidů je v této metodě založeno na transesterifikaci a extrakci mastných kyselin ze vzorku. Nejdříve bylo na analytických vahách naváženo 20 mg biomasy do krimplovacích vialek. Poté bylo přidáno 1,8 ml transesterifikační směsi s obsahem rozpuštěného inertního standardu C17 o koncentraci 0,5 mg/ml v 15% kyselině sírové v methanolu HPLC čistoty. Připravené krimplovací vialky byly pomocí krimplovacích kleští uzavřeny a vloženy do termobloku vyhřátého na 85 °C. V termobloku probíhala transesterifikace po dobu 2 hodin. Po vychlazení byl celý obsah krimplovacích vialek převeden do 4 ml vialky s 0,5 ml 0,05 M roztokem NaOH. Ke vzorku byl připipetován 1 ml HPLC hexanu. Následně byla směs 5 minut intenzivně třepána na vortexu. Po oddělení fází bylo 100 µl vrchní hexanové fáze odebráno do skleněné vialky pro HPLC/GC, kde bylo před přidáním napipetováno 900 µl HPLC hexanu. Takto připravený vzorek byl podroben GC analýze.

4.8.2 Analýza mastných kyselin metodou GC/FID

Na plynovém chromatografu byly analyzovány vzorky s obsahem methylesterů mastných kyselin. K analýze byl použit plynový chromatograf Thermo Scientific TRACETM Gas Chromatograph s autosamplerem Thermo Scientific A1 1310, automatický dávkovač se splitterem, kolona Lion-GC FAME o rozměrech 30 m x 0,25 mm x 0,2 µm, s plamenově ionizačním detektorem (FID).

Tabulka 6: Podmínky analýzy mastných kyselin metodou GC/FID.

Mobilní fáze	Průtok vodíku	1 ml/min
	Objem nástřiku vzorku	1 µl
	Teplota injektoru	240 °C s poměrem děliče toku 10
	Teplota detektoru	240 °C (průtok vzduchu 350 ml/min, průtok vodíku 30 ml/min, průtok dusíku 30 ml/min)
Teplotní program	60 °C po dobu 1 minuty	
	125 °C s teplotním gradientem 40 °C za minutu ($t_R = 3,625$ minut)	
	140 °C s teplotním gradientem 5 °C za minutu ($t_R = 8,625$ minut)	
	190 °C s teplotním gradientem 4,5 °C za minutu ($t_R = 19,736$ minut)	
	240 °C s teplotním gradientem 25 °C za minutu ($t_R = 22,236$ minut)	
	Udržení teploty při 240 °C po dobu 0,5 minuty ($t_R = 22,236$ minut)	
	Celková doba analýzy 22,3 minut	

4.9 Optimalizovaný postup stanovení β -glukanů

4.9.1 Postup stanovení β -glukanů pomocí enzymatického kitu

4.9.1.1 Roztoky obsažené v balení pro stanovení β -glukanů kitem

Láhev 1: 2 ml suspenze síranu amonného obsahující exo-1,3- β -glukanázu (100 U/ml) + β -glukosidázu (20 U/ml). Roztok vydrží stabilní 4 roky při teplotě 4 °C.

Láhev 2: 20 ml 50% roztoku glycerolu obsahujícího amyloglukosidázu (1630 U/ml) + roztok invertázy (500 U/ml). Roztok vydrží stabilní asi 2 roky při teplotě 4 °C nebo 4 roky při teplotě -10 °C.

Láhev 3: 50 ml reakční pufr GOPOD o pH= 7,4. Tento pufr obsahuje p-hydroxybenzoovou kyselinu a azid sodný (0,09 %). Pufr vydrží stabilní 4 roky při teplotě 4 °C.

Láhev 4: Enzymy činidel GOPOD ve formě lyofilizovaného prášku. Enzymy obsahují glukózooxidázu (GOD)+ peroxidázu (POD) + 4-aminoantipyrin. Enzymy jsou stabilní 5 let při teplotě pod -10 °C.

Láhev 5: Roztok kyseliny benzoové (0,2 %) se standardním roztokem D-glukózy (5 ml, 1 mg/ml). Roztok je stabilní 5 let, skladuje se při pokojové teplotě.

Láhev 6: Kontrolní vzorek β -glukanů (2 g). Stabilní 5 let při pokojové teplotě.

Příprava reakčních roztoků

1. Reakční roztok 1: do **lahve 1** se přidá 9 ml 200 mM acetátového pufru (pH= 4,5). Roztok je následně rozdělen na vhodné alikvoty a skladuje se v polypropylenových zkumavkách při teplotě -10 °C mezi použitím a v ledu při používání. Po naředění je činidlo stabilní 2 roky při teplotě pod -10 °C.
2. Reakční roztok 2: obsah **lahve 2** se použije ve formě dodání. Roztok vydrží stabilní 2 roky při 4 °C a 4 roky při -10 °C.
3. Obsah **lahve 3** se naředí 1 l destilované vody. Toto je **roztok 1**.
4. Reakční roztok 3: obsah **lahve 4** se rozpustí v 20 ml roztoku 1 a kvantitativně se převede do lahve obsahující zbytek roztoku 1. Lahve se zakryje hliníkovou fólií, aby se reagent GODPOD chránil před světlem. Vydrží stabilní 3 měsíce při teplotě 2-5 °C nebo 12 měsíců při teplotě -10 °C. Při skladování ve zmrzlé podobě se reagent rozdělí do vhodných alikvot. Rozmrazuje se vždy jen 1 alikvota. Když je činidlo čerstvé má světle žlutou nebo světle růžovou barvu. Během 2-3 měsíců při 4 °C bude mít tmavší růžovou barvu. Absorbance roztoku by měla být menší než 0,05 při odečtu proti destilované vodě.
5. Obsah **lahve 5** se použije ve formě dodání. Roztok vydrží stabilní 5 let při pokojové teplotě.
6. Obsah **lahve 6** se použije ve formě dodání. Roztok vydrží stabilní 5 let při pokojové teplotě.

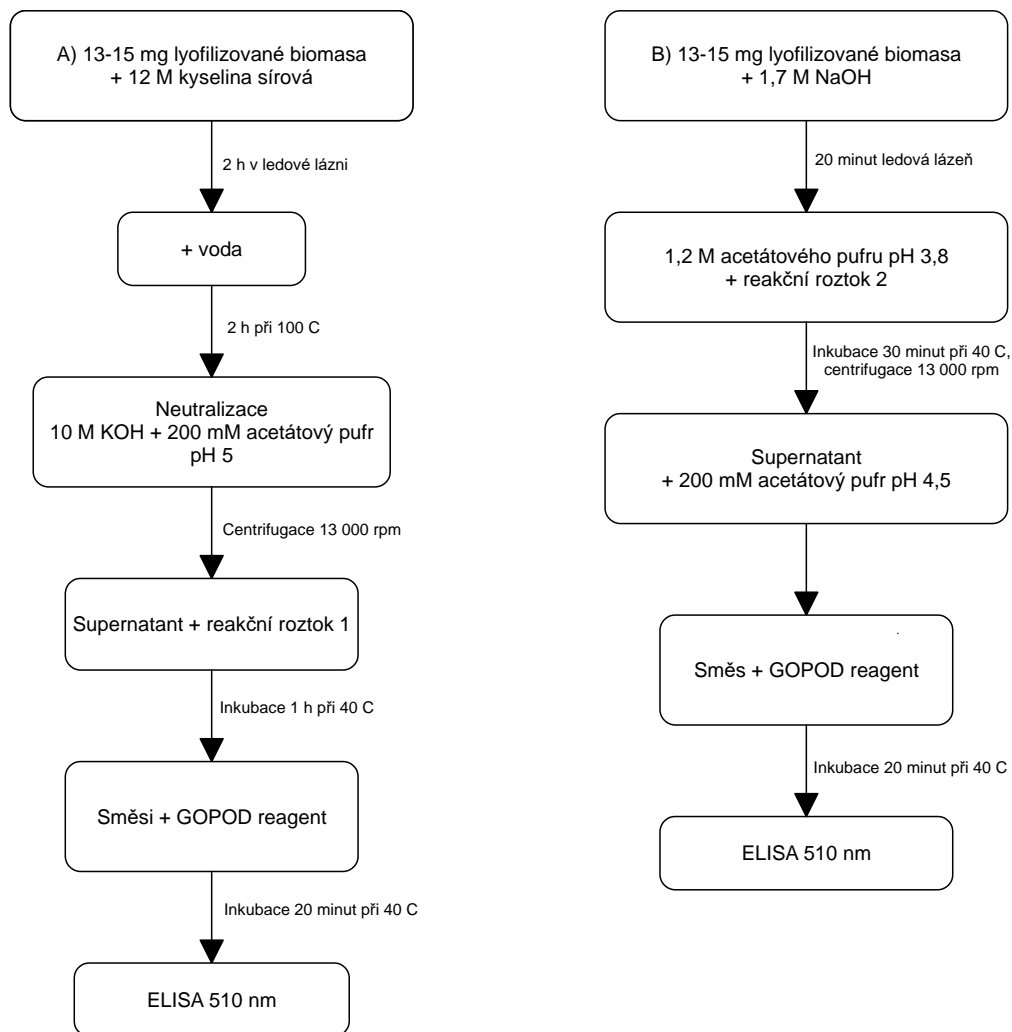
4.9.1.2 *Pomocné roztoky*

1. **Acetátový pufr (200 mM, pH= 4,5):** 11,6 ml ledové kyseliny octové (1,05 g/ml) se přidá do 900 ml destilované vody. Pomocí 4 M (16 g/100 ml) roztoku hydroxidu sodného je pH upraveno na 4,5. Objem je následně doplněn na 1 l. Roztok vydrží stabilní 1 rok při teplotě 4 °C.
2. **Acetátový pufr (200 mM, pH= 5):** 11,6 ml ledové kyseliny octové (1,05 g/ml) se přidá do 900 ml destilované vody. Pomocí 4 M (16 g/100 ml) roztoku hydroxidu sodného je pH upraveno na 4,5. Objem je následně doplněn na 1 l. Roztok vydrží stabilní 1 rok při teplotě 4 °C.
3. **Acetátový pufr (1,2 M, pH= 3,8):** 68,6 ml ledové kyseliny octové (1,05 g/ml) do 800 ml destilované vody. Pomocí 4 M hydroxidu sodného je pH upraveno na 3,8. Následně se objem doplněn destilovanou vodou na 1 l. Roztok vydrží stabilní 2 roky při pokojové teplotě.
4. **Hydroxid draselný (10,0 M):** 561,1 g KOH se přidá do 700 ml destilované vody. Příprava se provádí v digestoři za stálého míchání. Následně se nechá roztok vychladit na pokojovou teplotu a poté se doplňuje objem na 1 l. Roztok vydrží stabilní 2 roky při pokojové teplotě.
5. **Hydroxid sodný (1,7 M):** 68 g NaOH se přidá do 800 ml destilované vody a mícháním se rozpustí. Následně se objem upraví na 1 l. Roztok vydrží stabilní po dobu 2 let při pokojové teplotě.
6. **Kyselina sírová (12 M):** 640 ml koncentrované kyseliny sírové se přidá do 300 ml destilované vody. Přídavek kyseliny se provádí v digestoři, následně je objem doplněn na 1 l. Roztok vydrží stabilní 4 roky.

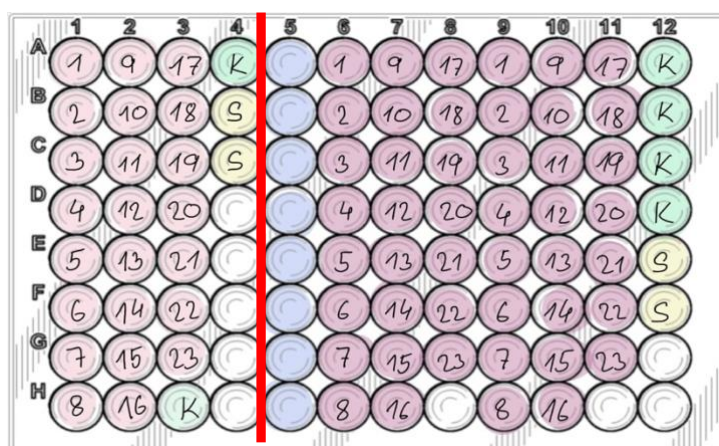
4.9.1.3 *Postup stanovení β -glukanů*

U stanovení celkových glukanů bylo nejdříve naváženo 13-15 mg lyofilizované biomasy, která se následně hydrolyzovala za použití 12 M ledově studené kyseliny sírové v ledové lázni po dobu 2 hodin. Díky této hydrolyze byl získán roztok glukanu, který byl následně doředěn vodou a zahřát na teplotu 100 °C po dobu 2 hodin. Získaná směs byla neutralizována za použití 10 M KOH a 200 mM acetátovým pufrem o pH 5. Byla získána směs D-glukózy a zbývající glukanové fragmenty. Zbývající glukanové fragmenty byly hydrolyzovány na glukózu za pomoci směsi exo-(1,3)- β -glukanázy a β -glukosidázy. V posledním kroku je D-glukóza oxidována reakčním činidlem GOPOD za vzniku barevného roztoku, u kterého je měřena absorbance na ELISA readeru při vlnové délce 510 nm.

U stanovení α -glukanů bylo naváženo 13-15 mg lyofilizované biomasy, která byla následně hydrolyzována za použití 1,7 M NaOH v ledové lázni po dobu 20 minut. Po uplynutí této doby byla směs neutralizována 1,2 M acetátovým pufrem. Dále byla přidána směs amyloglukosidázy a invertázy. Díky tomu byl ze směsi α -glukanů a sacharózy získán čistý roztok D-glukózy. U tohoto roztoku bylo dále upraveno pH, za pomoci 200 mM acetátového pufru o pH=4,5. D-glukóza byla oxidována reakčním činidlem GOPOD za vzniku barevného roztoku, u kterého je měřena absorbance na ELISA readeru při vlnové délce 510 nm.



Obrázek 14: Schéma postupů optimalizovaného stanovení β -glukanů za pomoci enzymatického kitu.



Obrázek 15: Návrh rozložení vzorků na 96jamkovou mikrotitrační destičku. V druhé polovině jsou závěrečné vzorky 10 μ l v duplikátech se 150 μ l činidla GOPOD. Světle růžové jsou vzorky extraktů po centrifugaci, zelené jsou kontrolní vzorky glukanů, žluté jsou standardy glukózy, modrý je blank, tmavě růžové jsou závěrečné vzorky

4.10 Stanovení cukrů dle Duboise

Principem této metody je dehydratace sacharidů za pomoci koncentrované kyseliny sírové, kdy vzniká furfural (v případě pentóz) nebo 5-hydroxy-methylfurfural (v případě hexóz). Při stanovení vzniká červené zbarvení díky kondenzaci furfuralu s fenolem. Absorbance byla měřena při 490 nm. Kalibrační řada byla připravena ze standardu manózy o koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Rozmezí koncentrací kalibrační řady bylo 0 až $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Do zkumavky byl napipetován 1 ml vzorku, 1 ml 5% fenolu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Blank obsahoval místo vzorku 1 ml destilované vody. Směs se nechala inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě ve tmě, poté byla změřena absorbance při 490 nm proti slepému vzorku.

4.11 Stanovení celkových proteinů dle Biureta

Principem této metody je tvorba fialově zbarvených komplexů chelátů mědi s bílkovinou. Nejdříve byla připravena kalibrační řada, kde se pipetovalo 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 a 2,5 ml bílkovinného standardu (3 mg/ml) a objem se doplnil vždy na 3 ml pomocí fyziologického roztoku. Do každé zkumavky se přidalo 0,3 ml Biuretova činidla. Takto připravena kalibrační řada se nechala 20-30 minut stát a po této době se změřila absorbance při 550 nm proti slepému vzorku. Při měření vzorku se vzorek připravil v duplikátu, vzorek se pipetoval o objemu 1 ml a doplnil se na 3 ml fyziologickým roztokem. Nakonec se přidalo 0,3 ml Biuretova činidla a vzorek se nechal 20-30 minut stát. Nakonec se změřila jeho absorbance při 550 nm proti slepému vzorku.

4.12 Vývoj metody extrakce pro multiparametrickou analýzu kvasinkových metabolitů

Cílem tohoto experimentálního zadání bylo navrhnout a optimalizovat extrakční postup, který by z jednoho vzorku kvasinkové lyofilizované biomasy byl schopen poskytnout vzorky pro víceparametrickou analýzu kvasinkových metabolitů. Po optimalizaci tohoto postupu by bylo možné zejména zkrátit čas celkové analýzy, snížit množství potřebné biomasy pro analýzu a dále také snížit spotřebu chemikálií.

Tento postup je založen na běžně využívaném postupu extrakce karotenoidů, který je uveden v kapitole 0. Při prvním optimalizaci procesu (pokus 1) bylo naváženo 30 mg na analytických vahách do šroubovacích plastových vialek o objemu 2 ml. Biomasa byla hydratována v 1 ml destilované vody po dobu 30 minut. Následně byla biomasa zcentrifugována a supernatant byl vylit. V dalším kroku bylo k biomase přidáno 0,5 ml skleněných kuliček a 1 ml methanolu. Plastové vialky se umístily na multipoziční vortex a po dobu 20 minut byly intenzivně protřepávány. Dále byly přidány 2 ml chloroformu a tato směs se nechala protřepávat na vortexu po dobu 20 minut. Po 20 minutách byl nahrazen 1 ml vody 1 ml 1,7 M hydroxidu sodného a přidán do směsi. Směs se nechala 10 minut třepat, poté byla zneutralizována za pomoci 1% kyseliny sírové a zcentrifugována. Směs se rozdělila na 2 fáze a za pomoci pipety byla odebrána spodní chloroformová fáze na stanovení karotenoidů a biomasa s kuličkami se dala lyofilizovat. Spodní chloroformová fáze se nechala odpařit při 35 °C v termobloku pod dusíkovou inertní atmosférou. Odparek byl rozpuštěn ve 2 ml směsi HPLC rozpouštědel o složení 2:1 acetonitril:ethylacetát. Směs byla poté důkladně protřepána na vortexu a přefiltrována přes PTFE filtr do skleněné vialky pro HPLC/GC.

Při druhé optimalizaci procesu (pokus 2), bylo navážené stejné množství biomasy. Neutralizace zde byla upravena po přidavku 1,7 M hydroxidu sodného, byla provedena neutralizace za pomoci 20 % kyseliny sírové. Odparek byl rozpuštěn se směsí HPLC rozpouštědel o složení 2:1 acetonitril:ethylacetát s přidavkem 1 ml hexanu.

Při třetí optimalizaci procesu (pokus 3), se zvýšila navážka kvasinkové biomasy na 100 mg. Toto zvýšení bylo nutné, neboť na tuto optimalizaci navazovalo stanovení lipidů v odebraném vzorku směsi, která se využívala ke stanovení karotenoidů. Odbarvené pelety zde byly zlyofilizovány a stanoveny pomocí optimalizovaného stanovení β -glukanů, který je uveden v kapitole 4.9.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

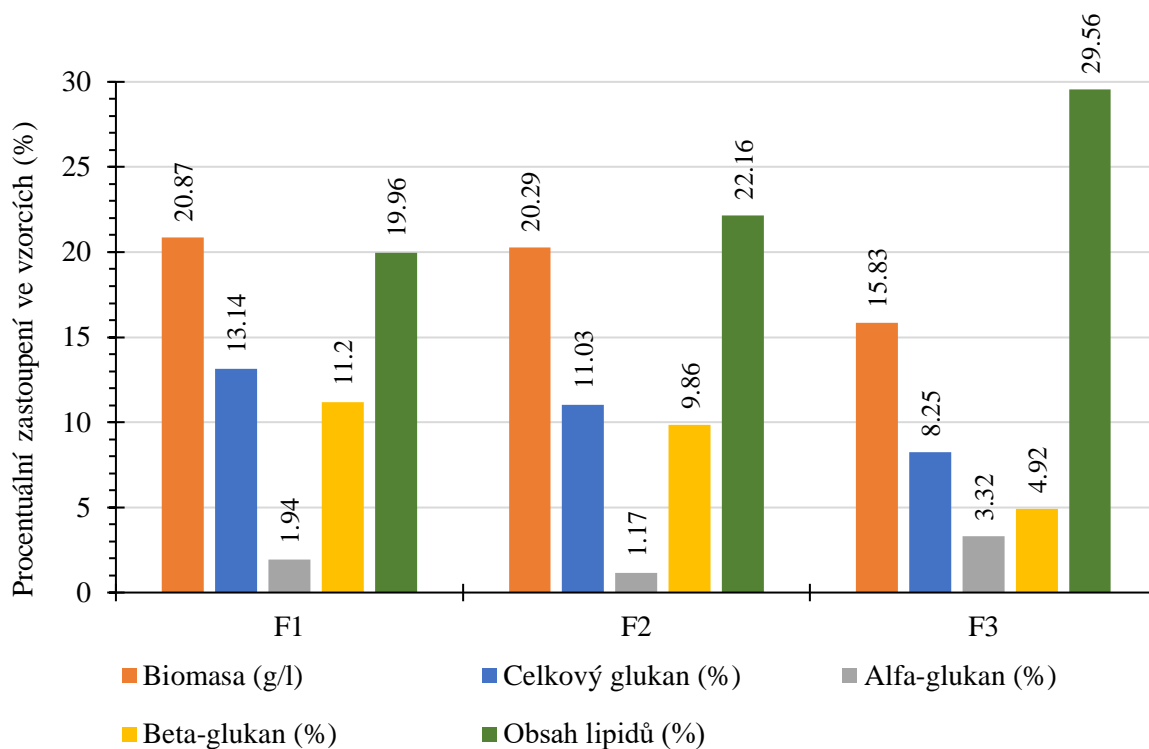
5.1 Kultivace v laboratorních fermentorech

V této práci probíhaly nejdříve 3 kultivace v laboratorním fermentoru o objemu 5 l. V grafu 1 a v grafu 2 je zaznamenána celková produkce biomasy, obsah lipidů a obsah glukánů ve fermentorech 1, 2 a 3. Jednalo se o 3 kultivace kvasinky *Rhodotorula toruloides* po dobu 96 hodin.

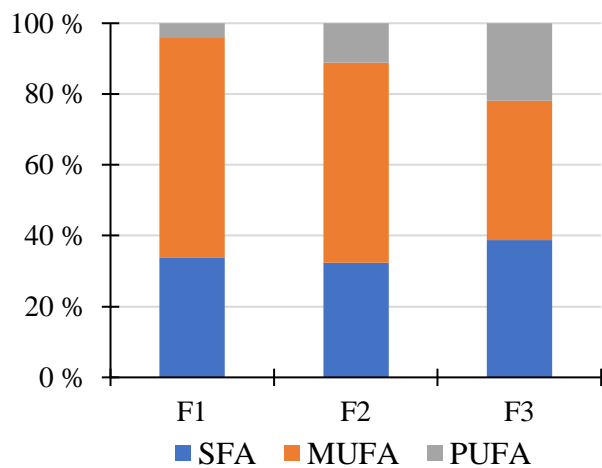
V případě první kultivace F1 se jednalo o vsádkovou kultivaci ve fermentoru, u které byl využíván odpadní glycerol. Nejdříve bylo namícháno 4,6 l produkčního média, do kterého se následně přidalo 400 ml odpadního glycerolu. Výtěžnost produkce biomasy kvasinky *Rhodotorula toruloides* po 96 hodinách kultivace byla 20,87 g/l. Obsah lipidů a obsah mastných kyselin v biomase byl stanoven za pomoci extrakčního postupu a měřen za pomoci plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem. Obsah lipidů v biomase byl 19,96 % (viz graf 1). Profil mastných kyselin v této kultivaci F1 byl v poměru 34 : 62 : 4 (SFA : MUFA : PUFA) (viz graf 2). Odpadní glycerol zvyšuje při kultivaci stres vyvíjený na kulturu kvasinek, díky kterému je přebytek uhlíkového zdroje ukládán kvasinkami do zásobních lipidů. Tato kultivace byla charakteristická vyšším obsahem MUFA neboli mononenasycených mastných kyselin. Dále byla tato biomasa stanovena na obsah glukánů za pomoci optimalizované enzymatické metody. Bylo zjištěno, že složení glukánů v biomase je 1,94 % α -glukánů a 11,2 % β -glukánů (viz graf 1).

V průběhu kultivace F2 bylo stejné množství odpadního glycerolu přidáváno postupně přes peristaltické čerpadlo v průběhu kultivace. Výtěžnost biomasy této kultivace byla 20,29 g/l. Obsah lipidů v kultivaci F2 byl 22,16 %. Profil mastných kyselin u kultivace F2 byl 32 : 57 : 11 (SFA : MUFA : PUFA). Oproti kultivaci F1 se zvýšil obsah PUFA a snížil obsah MUFA o 6 %, což bylo způsobeno dvojnásobným zvýšením obsahu kyseliny linolové. Zvýšení obsahu lipidů spolu se snížením obsahu MUFA a zvýšením obsahu PUFA neboli polynenasycených mastných kyselin, mohlo být způsobeno postupnými přídávky odpadního glycerolu. Díky postupným přídávám se snížil stres a zkrátila se mírně i lag fáze. Kvasinková kultura takto mohla produkovat stabilnější preferovanější profil mastných kyselin. Obsah glukánů při kultivaci F2 se oproti kultivaci F1 výrazně nezměnil. Došlo pouze k malému snížení obsahu β -glukánů na 9,86 %.

Kultivace F3 byla rovněž semi-kontinuální, ale byla zde snížena dávka přidávaného odpadního glycerolu na 350 ml. Výtěžnost této kultivace se celkově snížila na 15,83 g/l. Ovšem zajímavé bylo, že vzrostl obsah lipidů v biomase na 29,56 %, a rovněž se změnil i profil mastných kyselin na 39 : 39 : 22 (SFA : MUFA : PUFA). Porovnáním kultivace F3 s předchozími kultivacemi F1 a F2, pozorujeme cca 10% nárůst obsahu lipidů v biomase. Změna profilu mastných kyselin byla způsobena dvojnásobným zvýšením produkce kyseliny palmitové a kyseliny stearové. Zároveň byl zjištěn nárůst obsahu kyseliny linolové a linolenové. Zastoupení jednotlivých kyselin je obsaženo v tabulce 7. Ovšem výrazně se zde snížilo množství β -glukánů na 4,92 %. Toto snížení mohlo být způsobeno právě zvýšeným nárůstem lipidů v biomase. Buňka kvasinky nejspíše při zvýšené produkci lipidů netvořila velké buněčné stěny.



Graf 1: Výťažnost a sledované metabolity v kultivované biomase u fermentorů F1, F2 a F3.



Graf 2: Profil mastných kyselin.

Tabulka 7: Složení mastných kyselin u biomasy.

	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)
C14:0	1,34	1,34	1,34
C16:0	18,03	22,85	22,85
C18:0	11,91	11,99	11,99
C20:0	0,85	0,51	0,51
C24:0	1,66	2,12	2,12
C16:1	1,36	0,84	0,84
C18:1c	60,10	39,21	38,21
C20:1	0,48	0,26	0,26
C18:2c	3,04	17,70	17,70
C18:3d3	0,49	3,19	3,19
C20:2	0,00	0,21	0,21
C20:4	0,47	0,39	0,39
C22:6	0,27	0,38	0,38

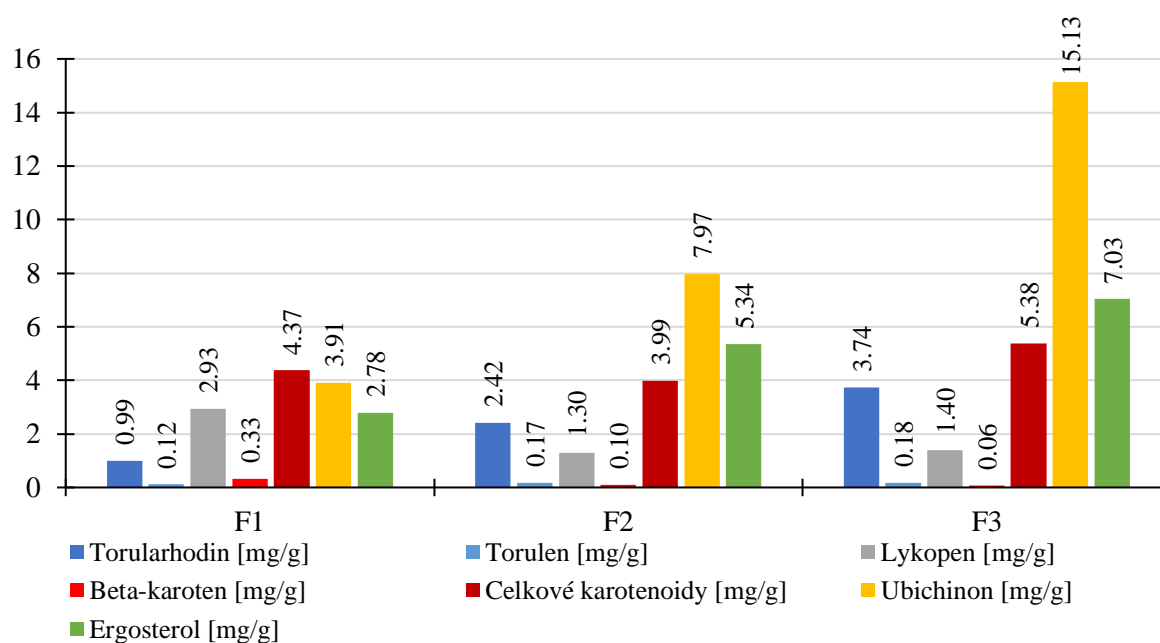
5.1.1 Stanovení obsahu karotenoidů u biomasy

Ke stanovení karotenoidů v biomase bylo využito extrakčního postupu a vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detektorem PDA, postup je dostupný v kapitole 0. Při kultivaci byla biomasa karotenogenní kvasinky *Rhodotorula toruloides* stresována přidavkem odpadního glycerolu, který způsobil především nárůst produkce lipidů, díky přebytku tuků. Oproti tomu došlo k poklesu produkce antioxidantních látek jako jsou karotenoidy. V grafu 3 nalezneme obsah karotenoidů u jednotlivých fermentorů F1, F2 a F3.

Z pohledu zastoupení karotenoidů v biomase se od sebe kultivace F1, F2 a F3 výrazně nelišily. Jediný výrazný rozdíl, který je zde vidět, je v obsahu ubichinonu. Obsah ubichinonu u kultivace F1 byl 3,91 mg/g biomasy, u kultivace F2 již vzrostl na hodnotu 7,97 mg/g biomasy a u kultivace F3 se zvýšil na hodnotu 15,13 mg/g biomasy. Nejspíše tento nárůst souvisí se způsobem kultivace. V případě kultivace F1 se jednalo o vsádkovou kultivaci. Zde bylo dodáno 400 ml odpadního glycerolu hned na začátku kultivace. Tento způsob nepodpořil zvýšený nárůst produkce žádné z antioxidantních látek.

U druhé kultivace F2 byl využit semi-kontinuální způsob kultivace, kdy byl odpadní glycerol přidáván postupně v množstvích 160 ml první den a 80 ml další dny (160-80-80-80). Tyto postupné přidávky v médiu snížily úroveň stresu a kultura se tak mohla lépe adaptovat na substrát, díky čemuž se u kultivace F2 také zvýšila produkce torularhodinu (2,42 mg/g biomasy), ubichinonu (7,97 mg/g biomasy) a ergosterolu (5,34 mg/g biomasy).

U kultivace F3 bylo sníženo množství odpadního glycerolu ze 400 ml na 350 ml, kdy první den bylo přidáno jen 150 ml a další dny bylo přidáváno 70 ml, 70 ml a 60 ml (150-70-70-60). Snížení přidavku odpadního glycerolu na začátku způsobilo vyšší produkci torularhodinu (3,74 mg/g biomasy), ubichinonu (15,13 mg/g biomasy), ergosterolu (7,03 mg/g biomasy) a celkových karotenoidů (5,38 mg/g biomasy).



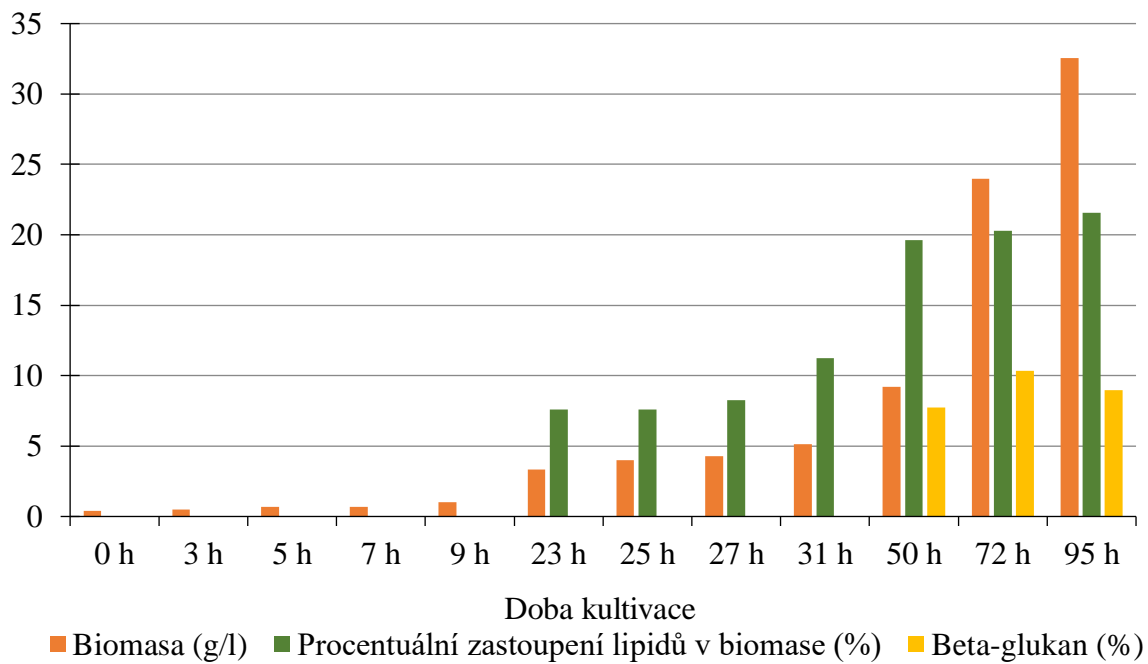
Graf 3: Obsah karotenoidů v kultivané biomase u fermentorů F1, F2 a F3.

5.2 Analýza průběhu kultivace ve fermentoru 2

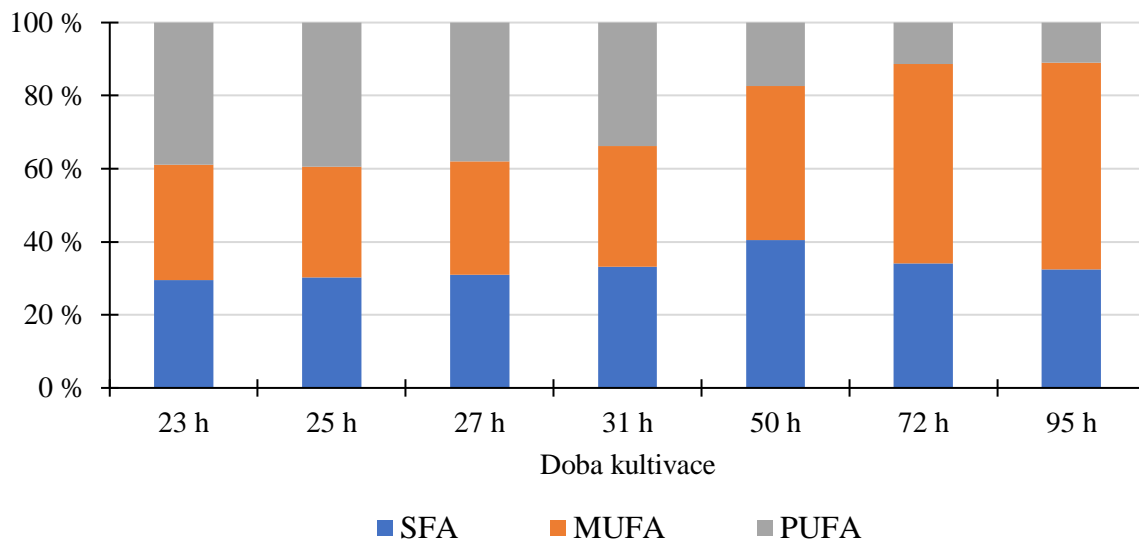
V průběhu kultivace F2 docházelo k postupným přídávům odpadního glycerolu. Na začátku kultivace bylo přidáno 160 ml, druhý den v 23. hodině bylo přidáno 80 ml, třetí den v 50. hodině bylo přidáno 80 ml a čtvrtý den v 72. hodině bylo přidáno 80 ml. V průběhu kultivace byly odebrány postupné vzorky v závislosti na čase, které byly dále přepočítány na výtěžnost biomasy v g/l.

V grafu 4 je znázorněn průběh nárůstu biomasy, procentuální zastoupení lipidů v biomase a procentuální obsah β -glukanů. Nejdříve bylo stanoveno množství biomasy v g/l, které bylo stanoveno v průběhu celé kultivace. V prvních 9 hodinách kultivace F2 je stále patrná lag fáze, kdy se karotenogenní kvasinky *Rhodotorula toruloides* adaptovaly na odpadní glycerol. V průběhu této adaptace, ještě kvasinky spotřebovávaly zbytek živin z YPD média, než přešly plně na odpadní glycerol. Byl zde výrazně zpomalen růst a množení kvasinek. Od 23. hodiny můžeme v grafu 4 vidět začátek exponenciální fáze růstu, která probíhala až do konce kultivace. A probíhala by i dále, až do stacionární fáze růstu, ale doba kultivace byla pevně nastavena na 96. hodin. Z tohoto důvodu byla kultivace ukončena již v exponenciální fázi růstu. V průběhu této fáze se kvasinky intenzivně rozmnožovaly a rostly. V této fázi stoupá procentuální zastoupení lipidů v biomase. V průběhu 23. hodiny bylo přidáno 80 ml odpadního glycerolu, po tomto přídávku se kvasinky adaptovaly na změnu v médiu, čímž se zpomalil růst a zpomalil se i nárůst lipidů v biomase. V průběhu 50. hodiny bylo přidáno dalších 80 ml odpadního glycerolu a v průběhu 72. hodiny byl přidán poslední přídavek 80 ml odpadního glycerolu. Množství biomasy se od 50. hodiny dále zvyšovalo, zatímco procentuální množství lipidů od 50. hodiny nevykazovalo výrazné změny. Lze tedy konstatovat, že v této kultivaci byla spotřeba energie kulturou kvasinek získána jen z odpadního glycerolu v médiu.

Procentuální množství β -glukanů bylo měřeno až u 50. hodiny kultivace, neboť ke stanovení v dřívějších časech nebylo získáno dostatečné množství vzorku. Je zde vidět lokální maximum v 72. hodině (10,36 %), po kterém procentuální obsah β -glukanů klesá. Tento jev lze vysvětlit tím, že kvasinky zpracovaly již většinu odpadního glycerolu. Díky tomu na kvasinky v médiu nebyl vyvíjen dostatečný osmotický stres, který poté inicioval hydrolyzu části buněčné stěny a její „zeštíhlení“. β -glukany stejně jako α -glukany mohou sloužit jako zdroj potřebné energie. V grafu 5 je znázorněn profil mastných kyselin v průběhu kultivace od 23. hodiny do 95. hodiny. V grafu vidíme postupné zvyšování obsahu MUFA a snižování obsahu PUFA. Odpadní glycerol zvyšuje stres v průběhu kultivace a zbytek tuků, který v médiu pochází z odpadního glycerolu, je kvasinkami primárně ukládán do struktur zásobních triacylglycerolů.



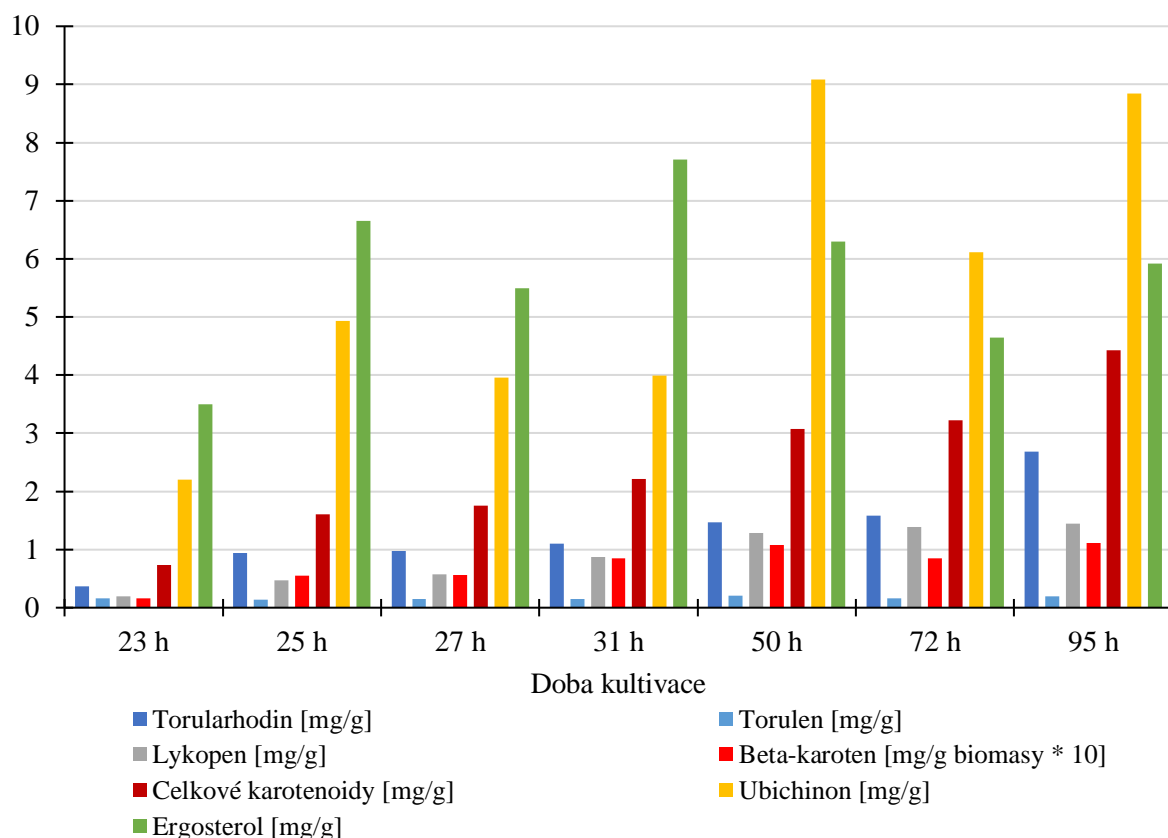
Graf 4: Analýza průběhu kultivace F2.



Graf 5: Analýza profilu mastných kyselin v průběhu kultivace F2.

5.2.1 Analýza obsahu karotenoidů v průběhu kultivace F2

V grafu 6 je znázorněn obsah karotenoidů v průběhu kultivace mezi 23. hodinou a 95. hodinou. Obsah torularhodinu se v průběhu kultivace kontinuálně zvyšuje. Produkce celkových karotenoidů v biomase se v průběhu kultivace také kontinuálně zvyšuje. V průběhu kultivace dosahuje obsah ubichinonu 2 lokálních maxim, a to v odběru z 25. hodiny (4,93 mg/g biomasy) a 50. hodiny (9,08 mg/g biomasy). Dvě lokální maxima dosahuje také ergosterol ve 25. hodině (6,66 mg/g) a v 31. hodině (7,70 mg/g). V 95. hodině dochází k nahromadění metabolitů způsobenému vyčerpáním živin.



Graf 6: Analýza obsahu karotenoidů v průběhu kultivace F2.

5.3 Analýza průběhu kultivace ve fermentoru 3

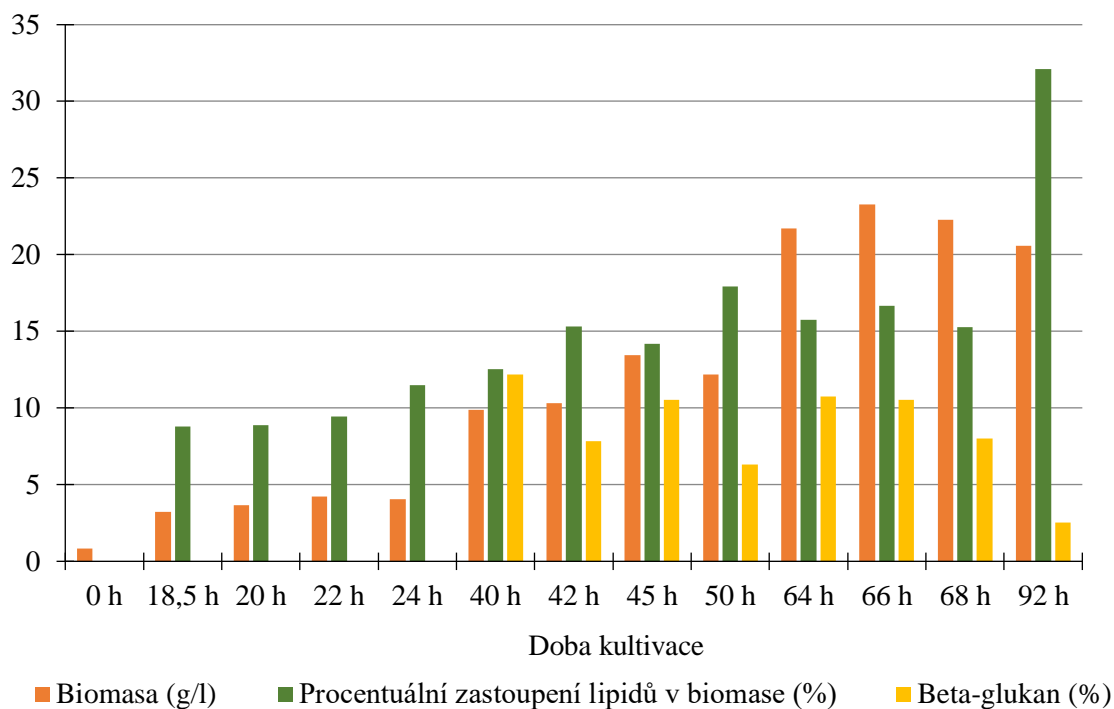
V průběhu kultivace F3 docházelo k postupným přidávkám odpadního glycerolu. Na začátku kultivace bylo přidáno 150 ml, druhý den v 18,5. hodině bylo přidáno 70 ml, třetí den ve 40. hodině bylo přidáno 70 ml a čtvrtý den v 66. hodině bylo přidáno 60 ml. Byly odebírány postupné vzorky v závislosti na čase, které byly dále přepočítány na výtěžnost biomasy g/l.

V grafu 7 je zaznamenán průběh kultivace z pohledu nárůstu biomasy, procentuální zastoupení lipidů v biomase a procentuální zastoupení β -glukanu. V prvních 24 hodinách je patrná velmi nízká rychlost růstu kultury. Tento zpomalený růst a množení bylo způsobeno adaptací kvasinek na odpadní glycerol, jenž obsahuje řadu látek, s inhibičními účinky, např. soli mastných kyselin. V průběhu této adaptace kvasinky spotřebovávaly zbytek živin z YPD média a začínaly spotřebovávat odpadní glycerol. Exponenciální fáze růstu začínala v 24. hodině a vrcholila v 66. hodině. Po této době je v grafu 7 vidět počátek stacionární fáze od 66. hodiny do 92. hodiny, ve které byla kultivace ukončena.

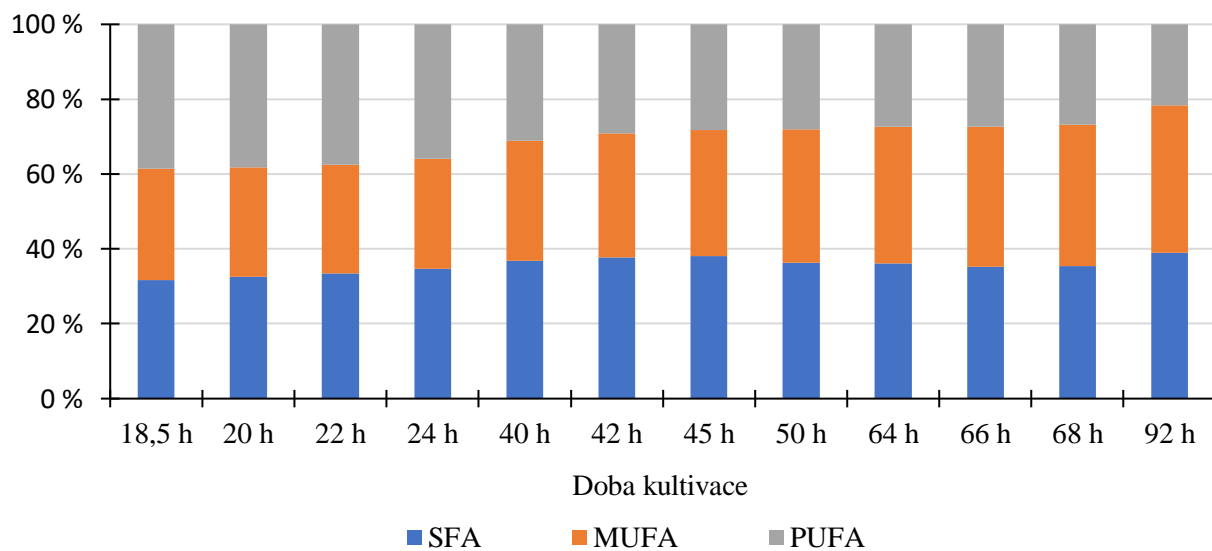
Z pohledu procentuálního zastoupení lipidů v biomase v průběhu kultivace, zde nalezneme 2 lokální maxima. První lokální maximum se nachází v 42. hodině (15,33 %) a druhé lokální maximum v 50. hodině (17,91 %). Velké množství lipidů v 92. hodině je způsobeno vyčerpáním dusíkatých zdrojů a omezením rychlosti množení. Přebytková energie se tak ukládala do formy lipidů. Množství lipidů zde tak výrazně vzrostlo z 15,27 % v 68. hodině na 32,10 % v 92. hodině.

U stanovení β -glukanů byla zjištěna 3 lokální maxima. První lokální maximum je ve 40. hodině (12,19 %), druhé lokální maximum je v 45. hodině (10,54 %) a třetí lokální maximum obsahu β -glukanů je v 64. hodině (10,75 %). Díky proměřené stacionární fázi v průběhu kultivace F3 pozorujeme pokles obsahu β -glukanů, který souvisel pravděpodobně s postupným úbytkem živin v médiu. Je proto pravděpodobné, že kultura začala od 50. hodiny spotřebovávat zásobní β -glukan v buněčných stěnách kvasinek. Tato spotřeba zásobního β -glukanu by tak mohla objasnit výrazné snížení obsahu β -glukanu v biomase.

V grafu 8 je znázorněn profil mastných kyselin v průběhu kultivace mezi 18,5. hodinou až 92. hodinou. Dále pozorujeme postupné mírné zvyšování zastoupení MUFA a snižování PUFA v biomase. To může být dáno asimilací MUFA z odpadního glycerolu, který byl připraven z živočišných tuků, které mají zvýšený obsah právě mononenasycených mastných kyselin oproti polynenasyceným mastným kyselinám.



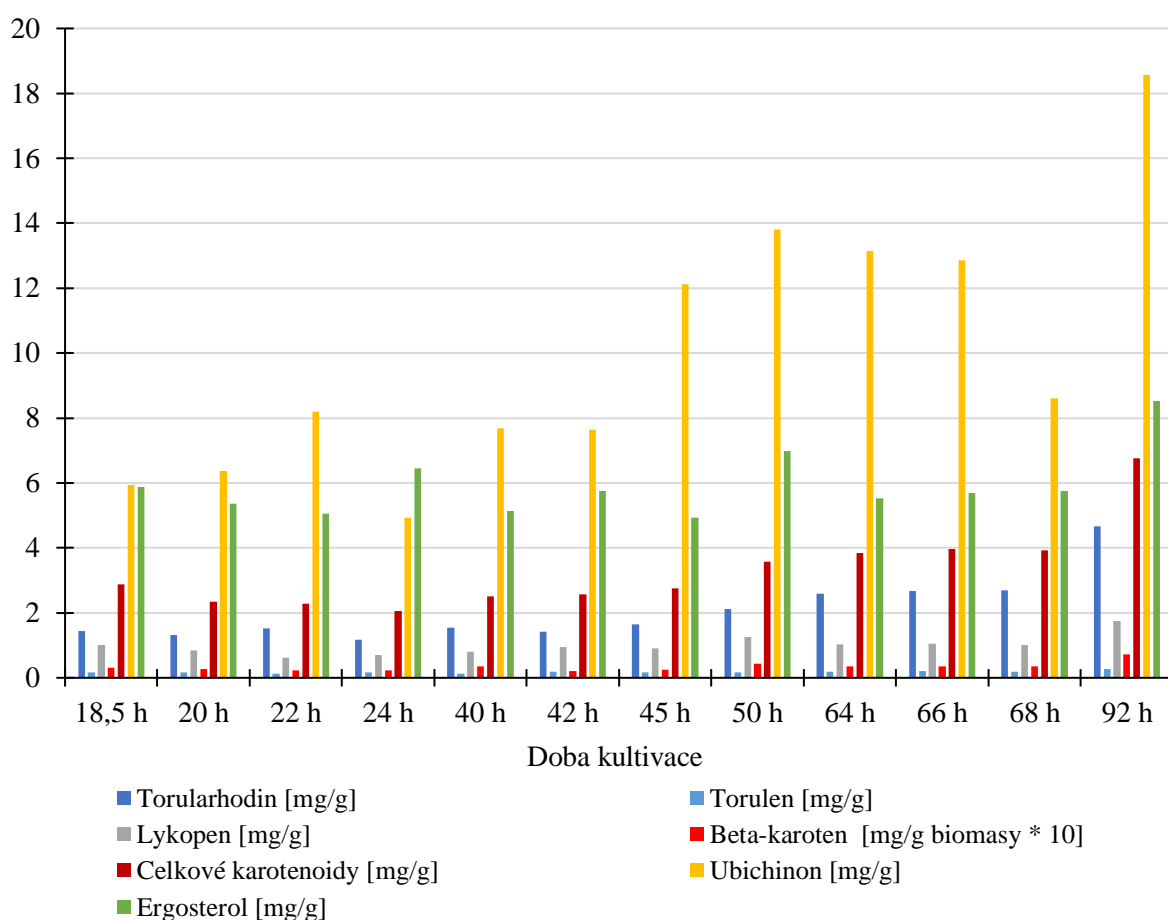
Graf 7: Analýza průběhu kultivace F3.



Graf 8: Analýza profilu mastných kyselin v průběhu kultivace F3.

5.3.1 Analýza obsahu karotenoidů v průběhu kultivace F3

V grafu 9 je znázorněn obsah karotenoidů v průběhu kultivace F3. V průběhu kultivace F3 se kontinuálně zvyšovalo množství torularhodinu a karotenoidů. U ubichinonu jsou v průběhu kultivace patrné 2 lokální maxima. První lokální maximum je v 22. hodině (8,21 mg/g biomasy) a druhé v 50. hodině (13,81 mg/g biomasy). U ergosterolu jsou zřetelná 2 lokální maxima a to v 24. hodině (6,44 mg/g biomasy) a v 50. hodině (6,98 mg/g biomasy). Lokální maximum u ubichinonu i u ergosterolu v 50. hodině souvisí se začátkem stacionární fáze, neboť v 50. hodině již začínaly docházet živiny a začínal se tak zpomalovat růst. Kvasinky při přechodu do stacionární fáze se přestávají rychle množit a začínají hromadit vhodné molekuly, například antioxidanty jako jsou ubichinon a karotenoidy.



Graf 9: Analýza obsahu karotenoidů v průběhu kultivace F3.

5.4 Optimalizace stanovení β -glukanů pomocí enzymatického kitu

Cílem této optimalizace enzymatického stanovení β -glukanů u kvasinek bylo uživatelům ušetřit čas při stanovení a snížit finanční náklady stanovení, při zachování spolehlivosti metody. Navážka vzorku na jednu část stanovení ze dvou se snížila oproti originálnímu postupu z 90 mg na 13–15 mg. Toto snížení navážky je pro stanovení velice důležité, neboť je potřeba stanovovat vzorky, které mají nízké výtěžky jako jsou průběžné odběry během kultivací ve fermentoru, či výtěžky kultivací v malých měřících. Je to též z důvodu, aby jejich výtěžnost biomasy pokryla všechna potřebná stanovení. Další velkou výhodou je získání možnosti opakování stanovení v případě chyby u stanovení.

Dalším cílem optimalizace bylo ušetření nákladů na stanovení, čehož bylo dosaženo snížením množství potřebných roztoků na stanovení. V originálním balení se počítá, že dodávané roztoky vydrží na stanovení cca 100 vzorků. V optimalizovaném postupu došlo ke snížení objemů roztoků při stanovení a dalším úpravám. Enzymatický kit díky tomu postačí na stanovení cca 600 vzorků.

5.4.1 Finanční náklady na optimalizovaný postup stanovení

Ke stanovení byl použit kit K-YBGL od společnosti Megazyme, který je určený pro stanovení β -glukanů kvasinek a hub. Tento kit stojí v současné době 270 € a slouží na stanovení 100 vzorků. Díky optimalizované metodě vydrží enzymatický kit na cca 600 vzorků. V porovnání s originálním postupem, je tento postup rychlejší, levnější a lze jím zpracovat více vzorků najednou. Zrychlení postupu je zajištěno především díky využití 96jamkové mikrotitrační destičky, multikanálové pipety a ELISA readeru.

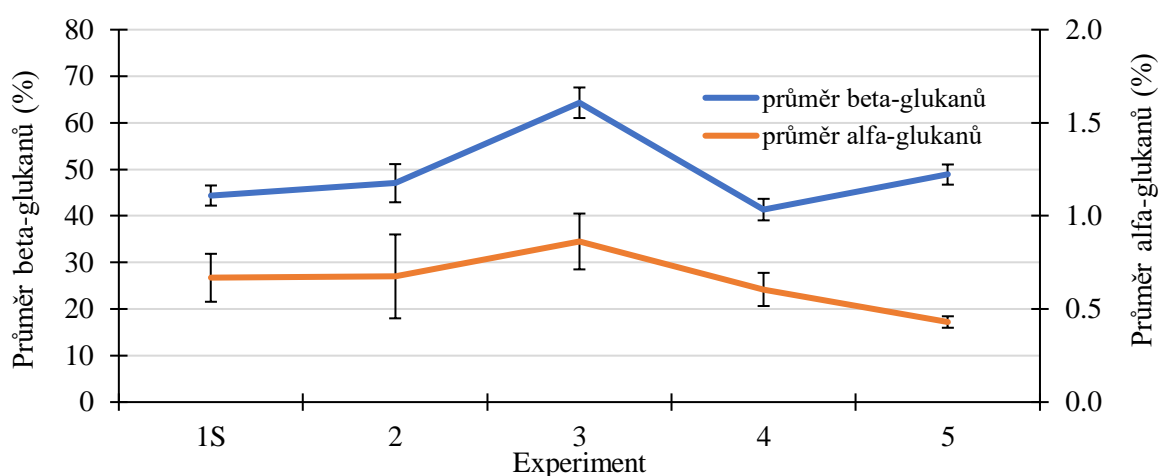
K této metodě je zapotřebí běžné laboratorní vybavení, jako jsou skleněné zkumavky se zábrusem, termoblok, pipety, vortex, sušárna, ELISA reader, mikrocentrifuga, 96jamkové mikrotitrační destičky a multikanálová pipeta.

Nejvíce nákladnou položkou v tomto stanovení je právě cena kitů. Cena jednoho kitu při přepočtu s aktuálním kurzem eura (1 euro = 23,60 Kč dne 2. 5. 2023, [42]) vychází na 6 372 Kč na cca 600 vzorků. Stanovení se tak aktuálně provádí po 23 vzorcích, a to z důvodu kompromisu mezi časovou náročností stanovení, počtem vzorků a s ohledem na použité vybavení. Ovšem počet vzorků, které jdou stanovit najednou jde zvýšit. Při započítání nákladů vychází jeden vzorek na přibližně 20 Kč, pokud použijeme vybavení, které už v laboratoři je.

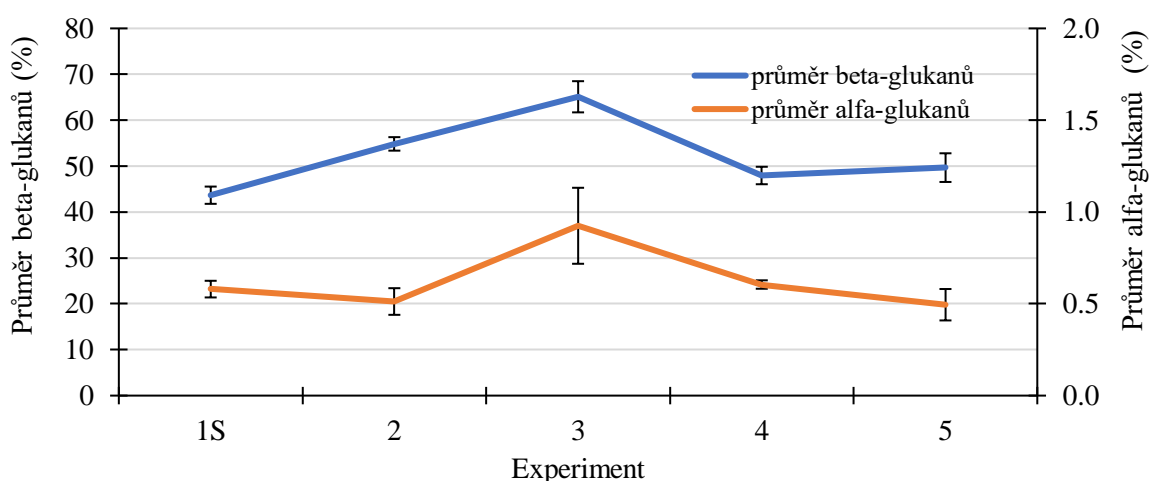
5.4.2 Optimalizace navážky pro stanovení

Optimalizace probíhala za použití kontrolních vzorků β -glukanů. Optimalizace probíhala v kvadrupletech, díky kterým byly následně vypočítány odchylky výsledků. Výsledky se srovnávaly s používaným postupem. Nejdříve byla testována možnost využití při stanovení 48jamková mikrotitrační destička nebo 96jamková destička. Metoda s 48jamkovou mikrotitrační destičkou byla nakonec zavrhnuta, neboť optimalizaci dostatečně nevyhovovala. Zvolená 96jamková mikrotitrační destička, byla označena za vhodnější variantu, která je rychlejší, levnější a praktičtější.

Dalším krokem byla optimalizace navážky pro stanovení. Při této optimalizaci bylo využíváno kontrolních vzorků gluknanů, které se standardně v kitech dodávají. Díky optimalizaci stanovení bylo vybráno nejvhodnější rozmezí navážky 13-15 mg lyofilizované biomasy pro stanovení. Po stanovení optimální navážky byla metoda využívána na stanovení kvasinkové biomasy. V grafu 10 je znázorněn průběh optimalizace navážky pro stanovení pomocí 96jamkové destičky experimentem 1S je zvolen průměr měřeného vzorku A standardním způsobem. Označením 2-5 jsou označeny jednotlivé pokusy. Nejvhodnějším experimentem byl označen experiment 4, ve kterém bylo naměřeno $41,31 \pm 2,30$ % β -glukanů ve vzorku. V grafu 11 je znázorněn podobný experiment jen se standardním vzorkem B z jiné várky enzymatického kitu. Zde rovněž vyšel jako nejvhodnější experiment 4, ve kterém bylo naměřeno $47,95 \pm 1,9$ %. Odchylka u enzymatického kitu společnosti Megazyme je výrobcem uváděna v rozmezí 4-5 %, tak díky této odchylce přesnosti, lze námi optimalizovaný postup využívat ke stanovení v laboratorních podmínkách.



Graf 10: Optimalizace navážky pro stanovení vzorek A, 96jamková destička.

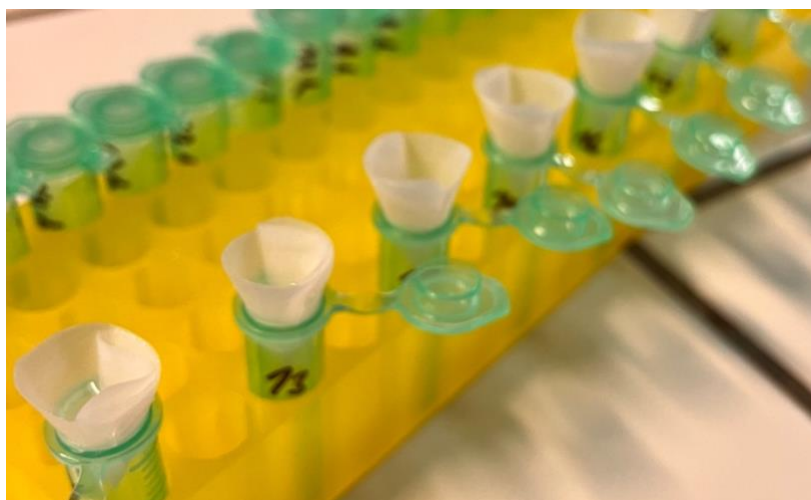


Graf 11: Optimalizace navážky pro stanovení vzorek B, 96jamková destička.

5.4.3 Optimalizace separačního procesu

Vzhledem k souběžně prováděným pracím zabývajících se valorizací odpadních olejů, i námi testovaného odpadního glycerolu, ve formě kultivací karotenogenních kvasinek. Bylo nutné tuto optimalizaci dále otestovat pro stanovení β -glukanů s přihlédnutím k obsahu lipidů ve vzorku.

Jelikož u kultivací na olejích nastal problém při oddělování sedimentu a supernatantu za pomoci mikrocentrifugy. Tuk zde plaval nahore a dále byl pozorován problém s usazením sedimentu. Proto bylo nutno vymyslet, jakým způsobem sediment od potřebného supernatantu oddělit. Jednou z možností, která byla vyzkoušená, byla možnost filtrace přes filtrační papír, zde bylo bohužel zjištěno, že z důvodu malých objemů, se při filtraci nedosáhne potřebného podtlaku pro její provedení.



Obrázek 16: Oddělování sedimentu od supernatantu za pomoci filtračního papíru.

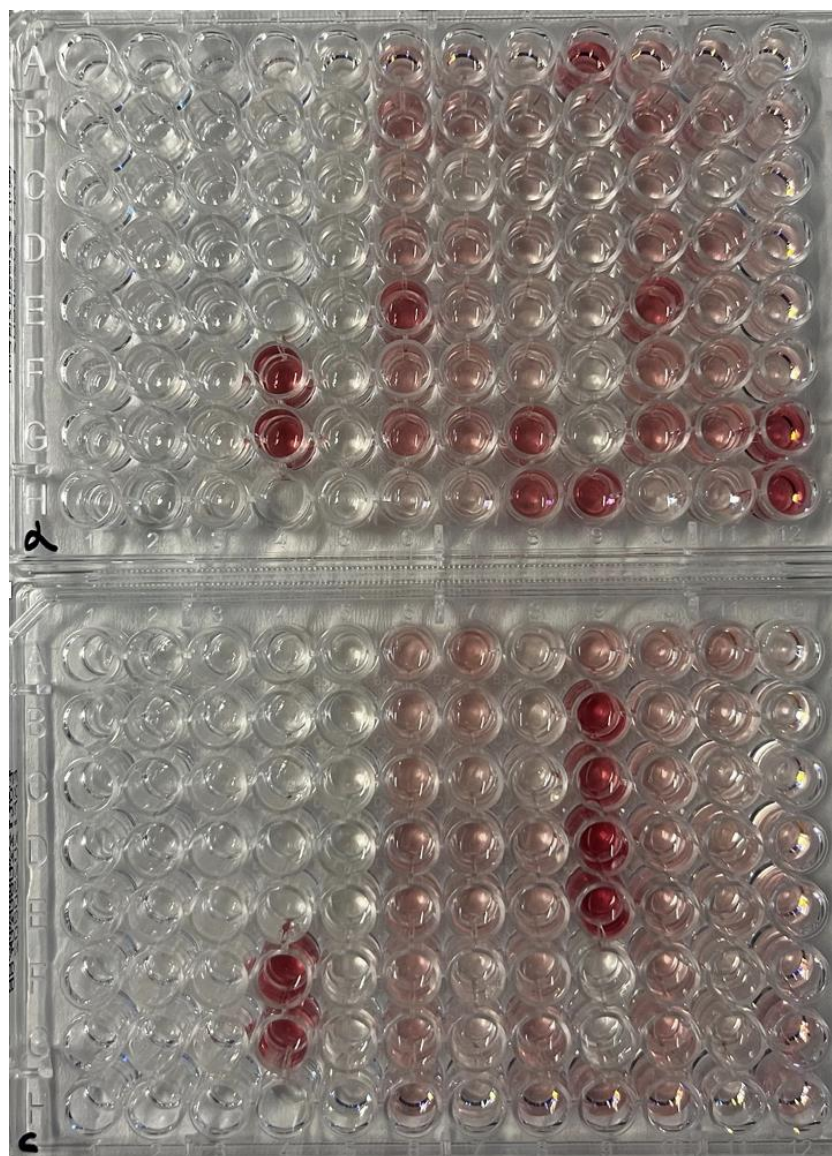
Následně byla testována další možnost, která se jevila velice slibně. A to možnost využití stříkačkových membránových filtrů. Jednalo se o nylonové filtry od společnosti Chromservis, které se dají nasadit na injekční stříkačku. Využití těchto filtrů se ukázalo jako snadná, rychlá a efektivní cesta k oddělení nesedimentujících nečistot v supernatantu. Při stanovení rovněž nebyla zjištěna změna v množství stanoveného β -glukanu oproti metodě s využitím centrifugy.



Obrázek 17: Injekční stříkačka s nylonovým filtrem.

5.4.4 Časová náročnost metody

Optimalizovaná metoda je časově méně náročná a v současné době ji lze provést při množství 23 vzorků za 8 hodin, a to i za předpokladu, že závěrečné měření provádíme v duplikátech a obě stanovení α -glukanů i celkových glukanů provádíme zároveň. To přináší pro laboratorního pracovníka, který stanovení provádí úlevu, neboť stanovení zvládne rychleji než za pomoci klasické metody. Při stanovení 23 vzorků, které by se v závěru duplikovaly pro minimalizaci chybovosti, by celé stanovení mohlo zabrat i 12 hodin. Další úsporu času nalezneme v přípravě pomocných roztoků, které se díky snížení množství objemů nemusí připravovat, tak často. Tuto úsporu můžeme počítat v řádu hodin.



Obrázek 18: 96jamkové mikrotitrační destičky po závěrečné inkubaci s činidlem GOPOD. Na horní destičce je vidět stanovení α -glukanů a v dolní destičce je vidět stanovení celkových glukanů.

5.5 Optimalizace postupů izolace

Pro níže popsané postupy bylo nejdříve nutné nakultivovat dostatek kvasinkové biomasy. Byla použita kvasinka *Rhodotorula toruloides*, která byla nakultivovaná v laboratorním fermentoru. Celkem bylo nakultivováno 500 g lyofilizované biomasy. Délka kultivace pro jednu vsádku byla stanovena na 96 hodin. Tato biomasa byla určena pro optimalizace procesů izolace a stanovení β -glukanů. Nakultivovaná lyofilizovaná biomasa byla šetrně rozemleta a zhomogenizována na homogenní směs. Tato biomasa byla skladována v uzavíratelných sáčcích při teplotě $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.6 Optimalizace postupu izolace β -D-glukanů postup A

Tato metoda měla být dle testovaných metod tou nejšetrnější metodou izolace při zachování konformace β -D-glukanů. Metoda byla časově velice náročná a zabrala 3 dny. Izolace se prováděla v triplikátech a pro izolaci bylo naváženo cca 20 g biomasy.

V tabulce 8 jsou uvedeny jednotlivé navážky a procentuální výtěžnosti izolací. Nejvyšší výtěžnost nalezneme u vzorku 2A po organické extrakci, která byla 22,27 %. U tohoto vzorku je ovšem pozorován nižší obsah sacharidů než u vzorku 3A po organické extrakci, který má sice nižší výtěžnost 17,26 %, ovšem zastoupení sacharidů ve vzorku je zde 86,22 %. Nejvyšší výtěžnost po působení trypsinu je u vzorku 3A-Trypsin a to 16,81 %. U tohoto vzorku je rovněž nejvyšší zastoupení sacharidů a to 87,31 %.

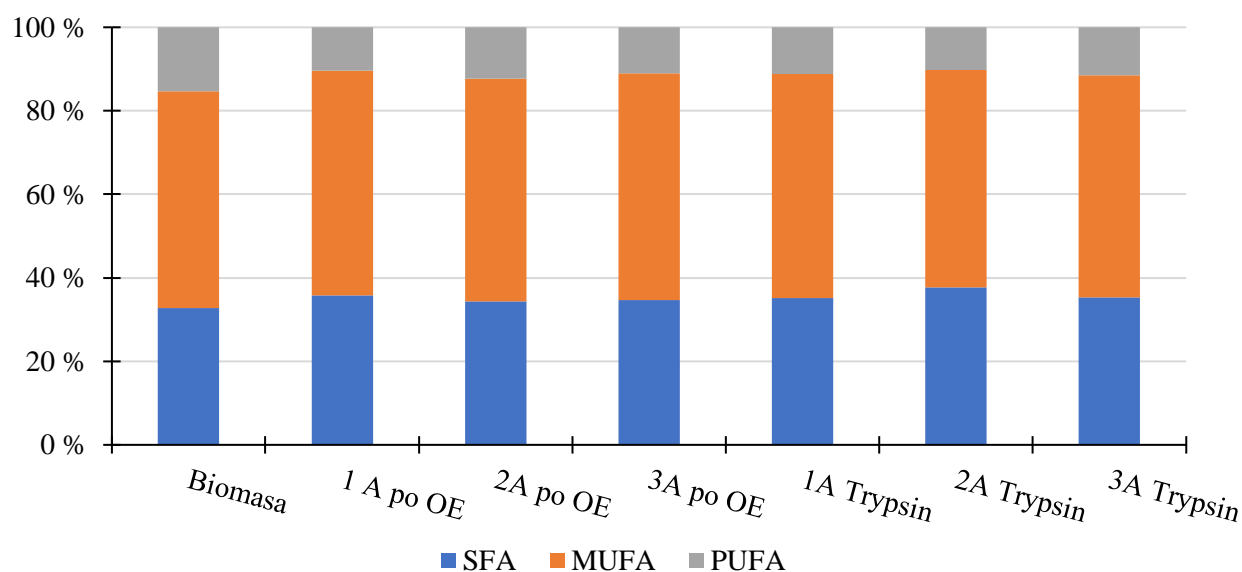
Z hlediska profilu mastných kyselin nemá tento způsob izolace na vzorky žádný vliv. V průběhu izolace nedochází k hydrolyze esterových vazeb. Profil mastných kyselin vzorků je v grafu 12.



Obrázek 19: Triplikáty 1A, 2A a 3A po autolýze 24 h za stálého míchání při $55\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabulka 8: Výtěžnost, obsah sacharidů, proteinů a lipidů u optimalizovaného postupu izolace β -glukanu A.

	Navážka (g)	Výtěžek (g)	Procentuální výtěžnost (%)	Obsah sacharidů (%)	Obsah proteinů (%)	Obsah lipidů (%)
Biomasa				34,72	11,61	21,29
1A po organické extrakci	20,63	2,81	13,62	43,99	1,55	13,46
2A po organické extrakci	20,34	4,53	22,27	24,77	0,45	9,98
3A po organické extrakci	20,05	3,46	17,26	86,22	0,54	13,71
1A Trypsin	20,63	3,34	16,19	67,02	1,29	15,08
2A Trypsin	20,34	2,3	11,31	46,89	0,67	9,2
3A Trypsin	20,05	3,37	16,81	87,31	0,56	13,79



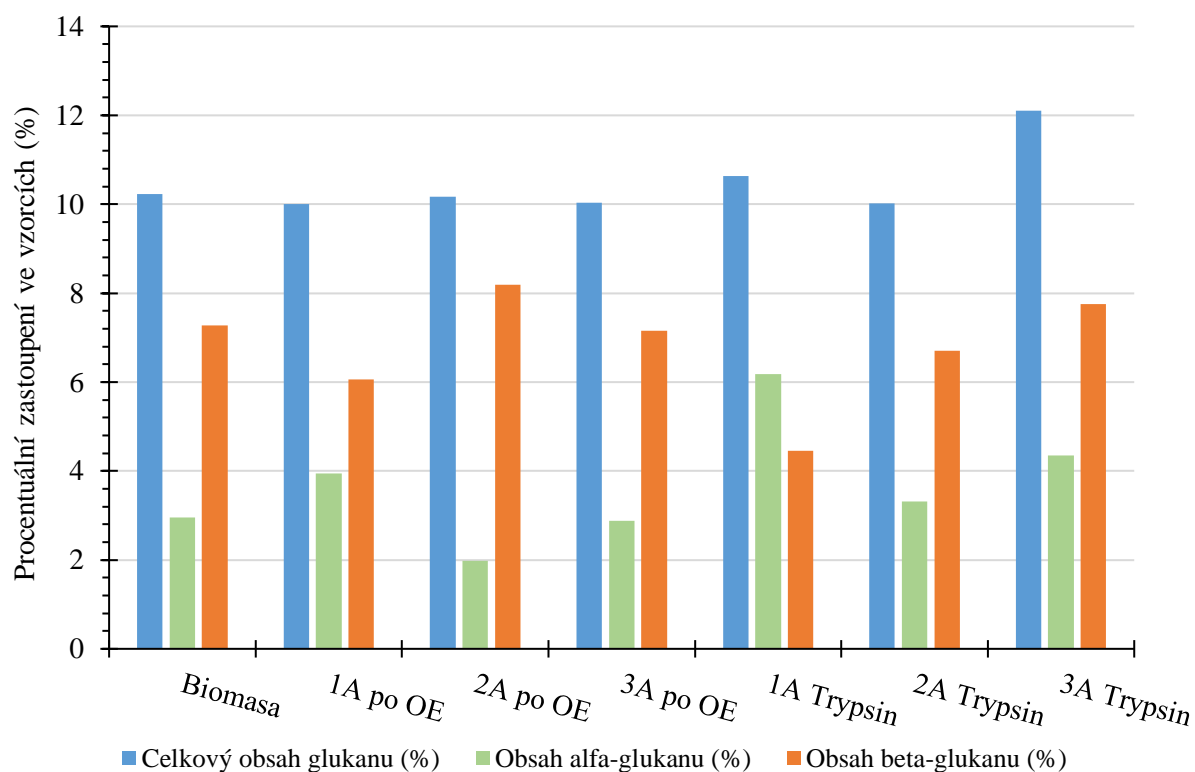
Graf 12: Profil mastných kyselin u izolantů A, označení OE je pro organickou extrakci, jako trypsin jsou označeny vzorky po proteolýze s trypsinem.

5.6.1 Stanovení obsahu glukanů v izolantech A

Ke stanovení β -glukanů byl použit optimalizovaný postup pro stanovení glukanů enzymatickým kitem od společnosti Megazyme. Obsah glukanů ve vzorcích byl stanoven u kontrolního vzorku biomasy, ze které se vzorky izolovaly. Dále se stanovení provádělo u vzorků po organické extrakci a u vzorků po proteolýze s trypsinem. Izolace se prováděly v triplicátech se stejným naváženým množstvím lyofilizované biomasy cca 20 g. V průběhu izolací, i po jejich ukončení, se ukázaly výrazné rozdíly u jednotlivých vzorků. V případě β -glukanů můžeme v grafu 13 pozorovat pokles i nárůst obsahu β -glukanů u jednotlivých vzorků. Tyto rozdíly, které nemají jasnou pravidelnost, by mohly být způsobené velkým množstvím zlyofilizované biomasy, kterou bylo nutné zhomogenizovat. I přes důkladnou homogenizaci mohlo nastat, že část vzorku měla menší obsah β -glukanů již v biomase před samotnou izolací. Neboť kultivace mikroorganismů probíhala v laboratorním reaktoru v několika vsádkách, aby bylo nakultivováno dostatečné množství biomasy pro izolace. Dalším možným vysvětlením může být samotná přesnost optimalizovaného enzymatického stanovení β -glukanů, která může být u nízkých obsahů β -glukanů zavádějící.

Nejvyššího obsahu β -glukanů bylo dosaženo u vzorku 2A po organické extrakci, tento vzorek měl obsah β -glukanů 8,19 %. A po následné proteolýze trypsinem jeho obsah β -glukanů klesnul na hodnotu 6,70 %.

Do budoucna by bylo dobré zvážit využití lepší rozrušovací techniky např. homogenizátoru. Tato technika by nám mohla zajistit lepší rozbití buněčných stěn a vyizolování čistých β -glukanů.



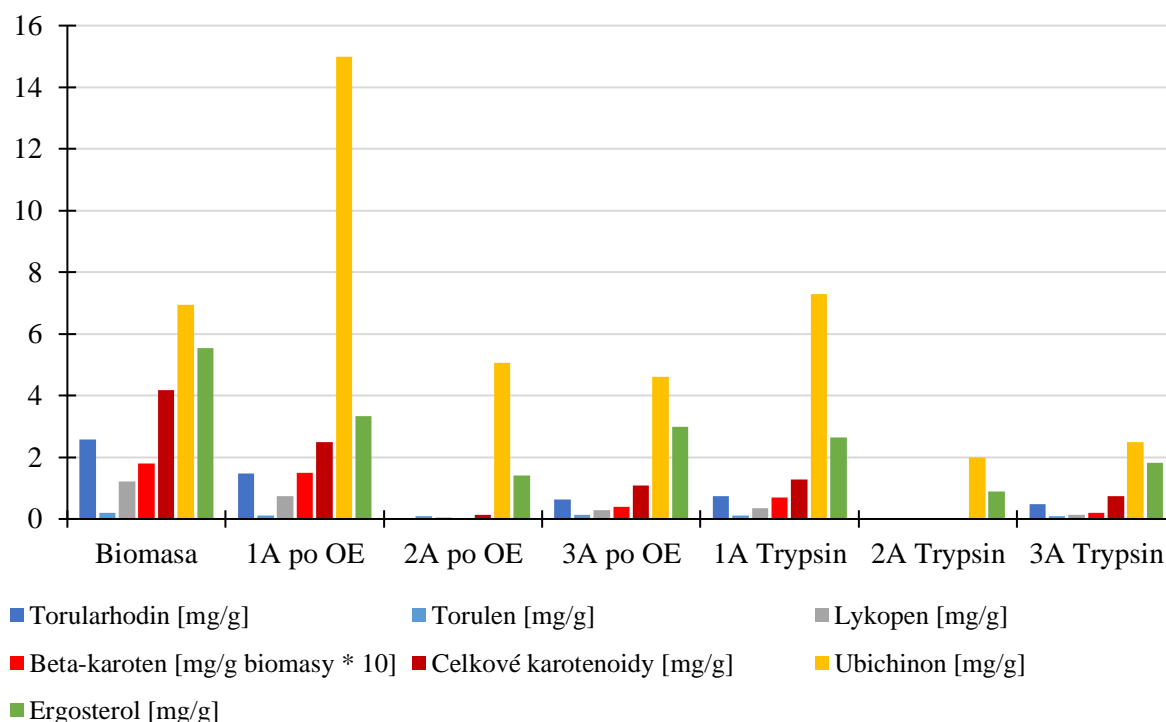
Graf 13: Obsah glukanů v izolantech A, označení OE je pro organickou extrakci, jako trypsin jsou označeny vzorky po proteolýze s trypsinem.

5.6.2 Stanovení obsahu karotenoidů u izolantů A

U stanovení karotenoidů u jednotlivých triplikátů je nejdříve potřeba se podívat na celý proces izolace, neboť se stalo, že v průběhu prvního kroku autolýzy se jeden ze vzorků odbarvil. Konkrétně se jednalo o 24 hodinovou autolýzu kvasinek s 3% NaCl při teplotě 55 °C vzorek 2A změnil barvu na béžovou. Zatímco vzorek 1A a 3A měl stále oranžovou barvu. Vzorky po autolýze jsou zobrazeny na obrázku 20. Důvod degradace karotenoidů u jednoho z triplikátů není znám. V detailu na obrázku 21 jsou vidět poslední zbytky karotenoidů u hladiny ve vzorku 2A.

Dalším náročným krokem pro karotenoidy byla úprava horkou vodou, u které byly vzorky po dobu 4 hodin vystaveny 121 °C v autoklávu. Vzorky po této úpravě jsou vidět na obrázku 22. Všechny vzorky po této úpravě výrazně ztmavly. Poté následovala organická extrakce a proteolýza.

V grafu 14 je znázorněné zastoupení karotenoidů v izolantech. Je zde znázorněno zastoupení srovnávacího vzorku biomasy, vzorků po organické extrakci a vzorků po proteolýze s trypsinem. U vzorku 1A po OE, což je označení pro vzorek po organické extrakci, je vidět rapidní nárůst množství ubichinonu ve vzorku oproti původní kontrolní biomase. Množství ubichinonu u toho vzorku bylo stanoveno na 15,00 mg/g biomasy. Ostatní látky ve vzorku klesly. U vzorku 2A po organické extrakci můžeme vidět, že karotenoidy jsou zde už jen ve zbytcích a spíše se jedná o zdegradované zbytky karotenoidů. V druhé části grafu jsou vidět výsledky po proteolýze enzymu trypsin. Ve vzorku 1A po působení trypsinu výrazně kleslo množství ubichinonu i ostatních látek. Hodnota ubichinonu u tohoto vzorku byla 7,30 mg/g biomasy.



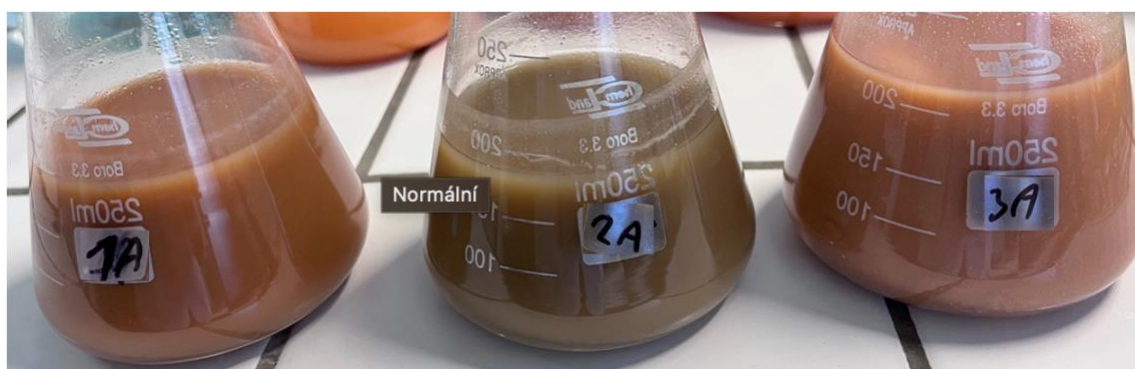
Graf 14: Zastoupení karotenoidů v izolantech A, označení OE je pro organickou extrakci, jako trypsin jsou označeny vzorky po proteolýze s trypsinem.



Obrázek 20: Izolanty A po 24 h autolýze.



Obrázek 21: Vzorek 2A po autolýze.



Obrázek 22: Triplikáty izolantů A před organickou extrakcí.



Obrázek 23: Lyofilizované izolanty A, označení OE je pro organickou extrakci, jako trypsin jsou označeny vzorky po proteolýze s trypsinem.

5.6.3 Analýza jednotlivých odpadních supernatantů A

V průběhu izolačního postupu A, byly odebírány vzorky odpadních supernatantů podle schématu na obrázku 24. Odebíraly se vždy dva vzorky po 1 ml. Vzorky se po odběru přemístily do zvážených skleněných zkumavek, ve kterých se rozpouštědlo odpařilo a bylo tak zjištěno, jak velké množství vyextrahované tuhé složky nalezneme v 1 ml odpadního supernatantu. Po odpaření a zvážení bylo provedeno stanovení obsahu karotenoidů a lipidů. Výsledky těchto stanovení jsou zobrazeny v tabulce 9. U vzorku bylo pozorováno odlišné složení metabolitů v odpadních supernatantech. Nejvyšší obsah lipidů v odpadním supernatantu byl zjištěn u organických extrakcí. Tento jev je dán afinitou lipidů a lipidických metabolitů k nepolárním a mírně polárním rozpouštědlům.

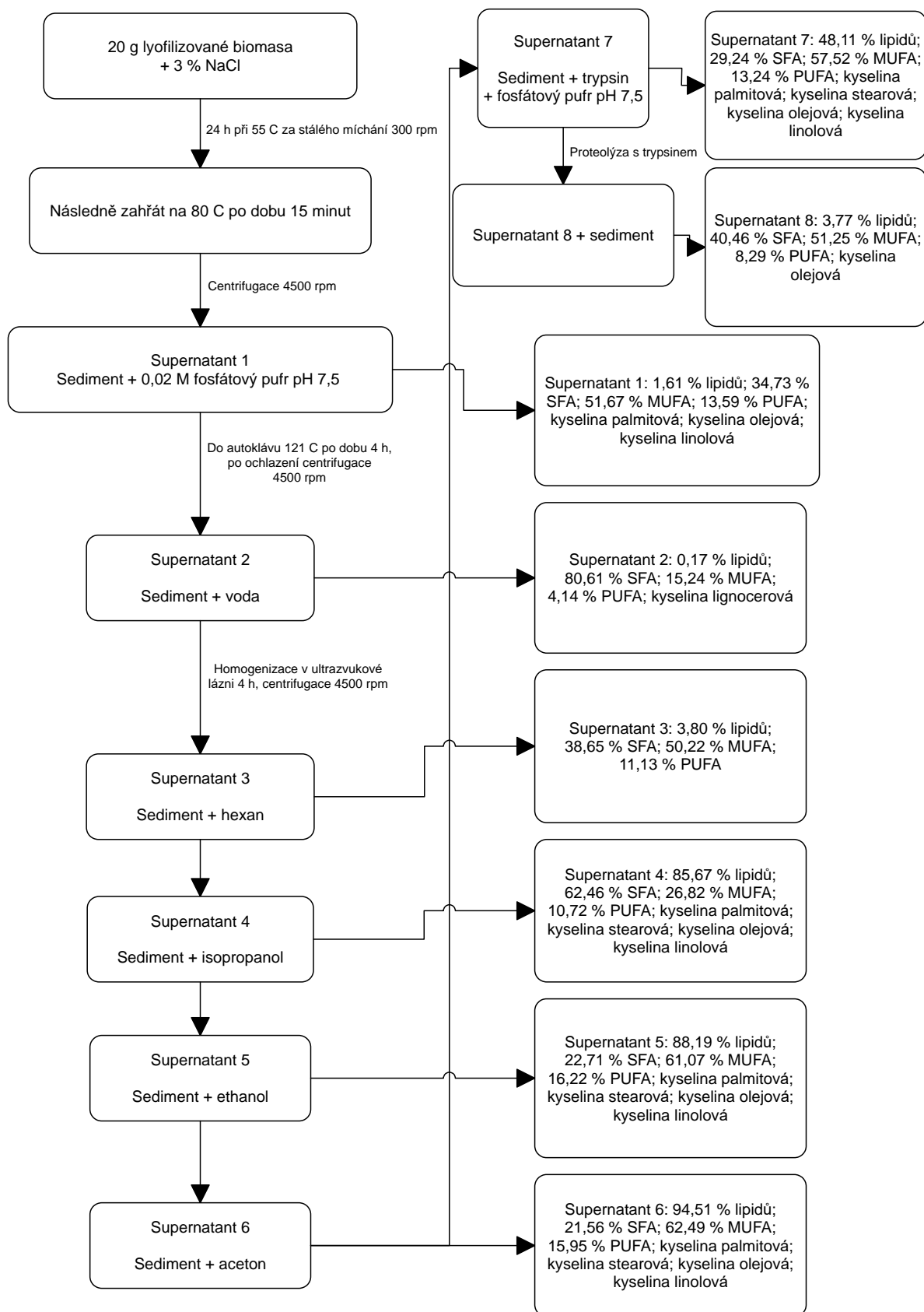
U vzorku 1A byl u supernatantu 4 zjištěn obsah lipidů 85,67 %, rovněž zde byl zjištěn obsah ubichinonu 0,73 mg/ml a ergosterolu 0,38 mg/ml. Pro tento proces byl využit hexan jako extrahovadlo, proto naměřené vyšší koncentrace lipidických metabolitů odpovídaly našim předpokladům. Obdobně byl zjištěn i vysoký obsah lipidů 88,19 % u supernatantu 5. Tento supernatant byl složen z isopropanolu. V supernatantu 5 byl dále zjištěn vysoký obsah ergosterolu 29,93 mg/ml, dále zde byl ve vyšší míře obsažen ubichinon (5,85 mg/ml), celkové karotenoidy (3,95 mg/ml) a torularhodinu (3,09 mg/ml). V supernatantu 6 byl také vysoký obsah lipidů 94,51 %, dále je zde obsažen ve vyšší míře ergosterol (30,57 mg/ml) a ubichinon (12,44 mg/ml). V supernatantu 6 byl obsažen ethanol. Posledním krokem organické extrakce byl přídavek acetonu, v tomto supernatantu 7 byl zjištěn obsah lipidů 48,11 %, dále zde byl zjištěn vysoký obsah ubichinonu 52,91 mg/ml a ergosterolu (8,46 mg/ml).

Dále byly stanovovány vzorky odpadních supernatantů z izolace vzorku 2A. Zde byl zjištěn vysoký obsah lipidů už u supernatantu 3 (28,08 %) před organickou extrakcí. U organické extrakce byl u vzorku supernatantu 4, zjištěn obsah lipidů 84,16 %, dále zde byl obsažen ubichinon (14,58 mg/ml) a ergosterol (7,67 mg/ml). U supernatantu 5 byl stanoven obsah lipidů na 91,64 %, dále v tomto kroku bylo od izolantu odděleno velké množství ergosterolu (23,74 mg/ml) a ubichinonu (12,09 mg/ml). Obsah lipidů v supernatantu 6 byl stanoven na 90,65 %, dále zde bylo stanoveno vysoké množství ubichinonu (35,50 mg/ml) a ergosterolu (11,65 mg/ml). V supernatantu 7 byl stanoven obsah lipidů 88,73 %, rovněž zde byl vysoký obsah ubichinonu 68,90 mg/ml.

Dále byly stanovovány odpadní supernatanty vzorku 3A. U těchto supernatantů nebyly naměřeny vysoké obsahy vyizolovaných lipidů. U supernatantu 4 byl obsah lipidů 65,79 % a obsah ergosterolu 6,44 mg/ml. Dále byl stanoven supernatant 5 u něj byl zjištěn obsah lipidů 33,40 % a obsah ergosterolu 2,25 mg/ml. U supernatantu 6 se obsah lipidů v odpadním supernatantu zvýšil na 93,76 % a byl zde zjištěn obsah 16,90 mg/ml ergosterolu. Posledním bodem organické extrakce byl supernatant 7, který měl obsah lipidů 88,42 %, 6,36 mg/ml ergosterolu a byl zde zjištěn vysoký obsah celkových karotenoidů 6,80 mg/ml.

Tabulka 9: Obsah sledovaných metabolitů u odpadních supernatantů po izolaci A.

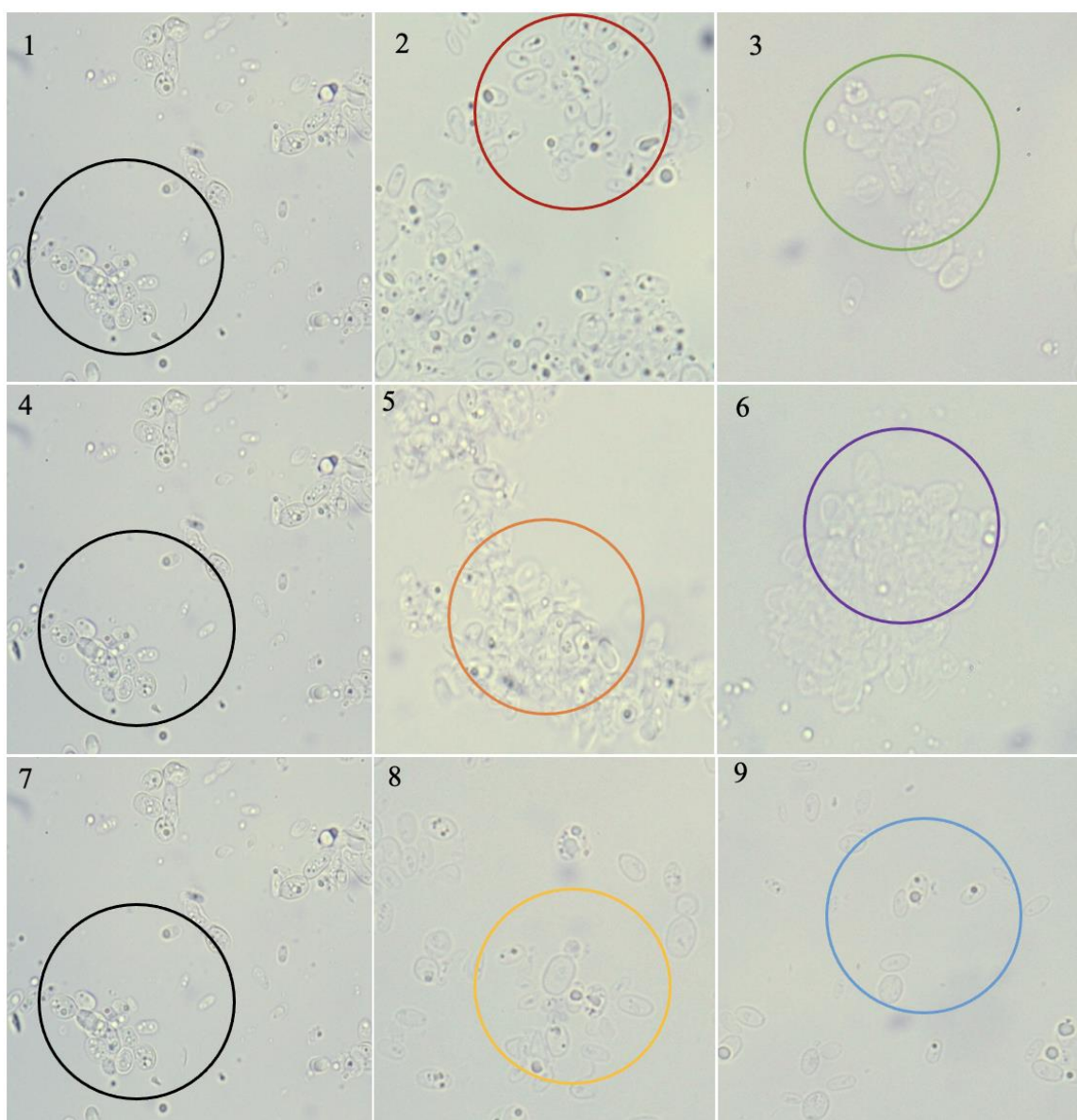
1A	Torularhodin (mg/ml)	Torulen (mg/ml)	Lykopen (mg/ml)	Beta-karoten (mg/ml)
Supernatant 1				
Supernatant 2				
Supernatant 3				
Supernatant 4				
Supernatant 5	3,09	0,67	0,20	
Supernatant 6				
Supernatant 7	2,83	1,89	2,95	0,33
Supernatant 8				
	Celkové karotenoidy (mg/ml)	Ubichinon (mg/ml)	Ergosterol (mg/ml)	Lipidy (%)
Supernatant 1			0,19	1,61
Supernatant 2				0,17
Supernatant 3				3,80
Supernatant 4		0,73	0,38	85,67
Supernatant 5	3,95	5,85	29,93	88,19
Supernatant 6		12,44	30,57	94,51
Supernatant 7	8,00	52,91	8,46	48,11
Supernatant 8			0,11	3,77
2A	Torularhodin (mg/ml)	Torulen (mg/ml)	Lykopen (mg/ml)	Beta-karoten (mg/ml)
Supernatant 1				
Supernatant 2			0,01	
Supernatant 3				
Supernatant 4				
Supernatant 5				
Supernatant 6		1,58		
Supernatant 7		1,65	0,60	
Supernatant 8				
	Celkové karotenoidy (mg/ml)	Ubichinon (mg/ml)	Ergosterol (mg/ml)	Lipidy (%)
Supernatant 1		0,06	0,14	2,81
Supernatant 2	0,02	0,07	0,01	0,63
Supernatant 3		0,16	0,09	28,08
Supernatant 4		14,58	7,67	84,16
Supernatant 5		12,09	23,74	91,64
Supernatant 6	1,58	35,50	11,65	90,65
Supernatant 7	2,52	68,90	7,87	88,73
Supernatant 8		0,93	0,12	2,54
3A	Torularhodin (mg/ml)	Torulen (mg/ml)	Lykopen (mg/ml)	Beta-karoten (mg/ml)
Supernatant 1				
Supernatant 2				
Supernatant 3				
Supernatant 4	0,40	0,33	0,24	
Supernatant 5		0,41	0,13	
Supernatant 6	2,70	0,67	0,31	
Supernatant 7	3,10	1,19	2,18	0,32
Supernatant 8				
	Celkové karotenoidy (mg/ml)	Ubichinon (mg/ml)	Ergosterol (mg/ml)	Lipidy (%)
Supernatant 1			0,05	2,16
Supernatant 2			0,01	3,61
Supernatant 3			0,03	3,13
Supernatant 4	0,98		6,44	65,79
Supernatant 5	0,54		2,25	33,40
Supernatant 6	3,69		16,90	93,76
Supernatant 7	6,80		6,36	88,42
Supernatant 8				0,68



Obrázek 24: Příklad schématické znázornění optimalizovaného procesu izolace A, dále je zde znázorněn obsah lipidů a profil mastných kyselin v jednotlivých supernatantech vzorku 1A.

5.6.4 Mikroskopické zobrazení struktury v izolantech A

Na obrázku 25 jsou vidět mikroskopické snímky biomasy a jednotlivých izolantů pod mikroskopem přes imerzní olej při zvětšení 100x. Na snímku 1, 4 a 7 v černém kolečku vidíme kontrolní biomasu kvasinky *Rhodotorula toruloides*, která byla použita k izolaci. Na snímku 2 v červeném kolečku je vidět izolant 1A po organické extrakci. Na snímku 5 v oranžovém kolečku je vidět izolant 2A po organické extrakci. Na snímku 8 ve žlutém kolečku je vidět izolant 3A po organické extrakci. U všech izolantů jsou pozorovány porušené struktury buněk, bez cytoplazmy a buněčných organel. Na snímku 3 v zeleném kolečku je vidět izolant 1A po proteolýze s trypsinem. Na snímku 6 ve fialovém kolečku je vidět izolant 2A po proteolýze s trypsinem. Na snímku 9 v modrém kolečku je vidět izolant 3A po proteolýze s trypsinem. U všech snímků po proteolýze jsou zbytky buněčných stěn kvasinek.



Obrázek 25: Sledováno pod mikroskopem přes imerzní olej zvětšení 100x: Optimalizace postupu izolace glukánů podle postupu A, 1, 4 a 7- lyofilizovaná biomasa, 2- 1A po organické extrakci, 3- 1A po trypsinu, 5- 2A po OE, 6- 2A po trypsinu, 8- 3A po OE, 9- 3A po trypsinu.

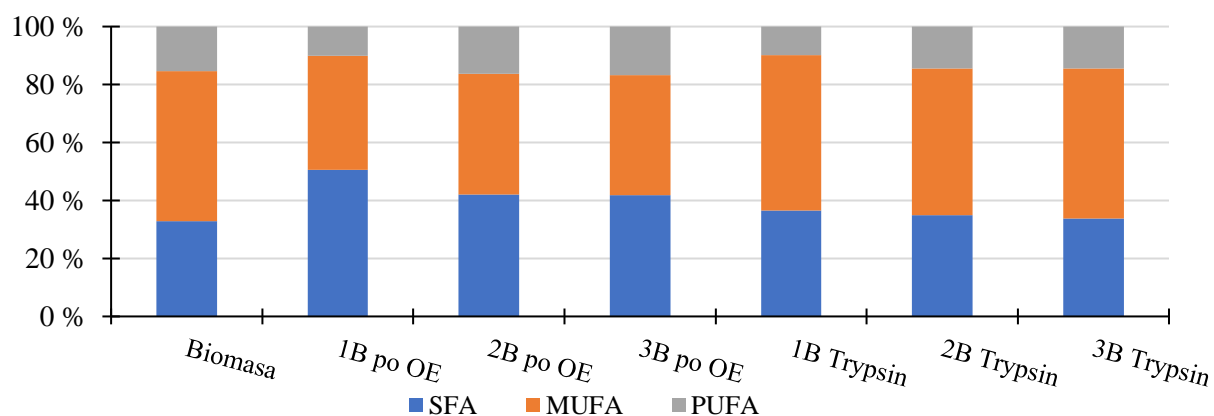
5.7 Optimalizace postupu izolace β -glukanů B

Tato metoda k izolaci využívá acidobazickou metodu narušení buněčné stěny. Izolace vzorků za pomoci této metody trvala 3 dny. Izolace byla prováděna v triplikátech, k izolaci bylo naváženo cca 20 g lyofilizované kvasinkové biomasy. V tabulce 10 jsou uvedeny navážky, procentuální výtěžky a sledované metabolity jednotlivých triplikátů. Izolanty byly testovány v lyofilizované formě po organické extrakci a po proteolýze s trypsinem. Nejvyšší výtěžnost izolace byla zjištěna u vzorku 3B po organické extrakci a to 17,51 %. U tohoto vzorku bylo rovněž naměřeno nejvyšší zastoupení sacharidů a to 81,33 %. Vzorek s nejvyšší výtěžkou po proteolýze s trypsinem byl vzorek 3B Trypsin s výtěžkem 15,57 %. Obsah sacharidů u toho vzorku byl 73,83 %.

V grafu 15 je zobrazen profil mastných kyselin u izolantů B. Z hlediska profilu mastných kyselin se kontrolní vzorek biomasy a izolanty výrazně neliší. Způsob izolace nemá na profil mastných kyselin žádný vliv. V průběhu izolace nedocházelo k hydrolýze esterových vazeb.

Tabulka 10: Výtěžnost, obsah sacharidů, proteinů a lipidů u optimalizovaného postupu izolace β -glukanu B.

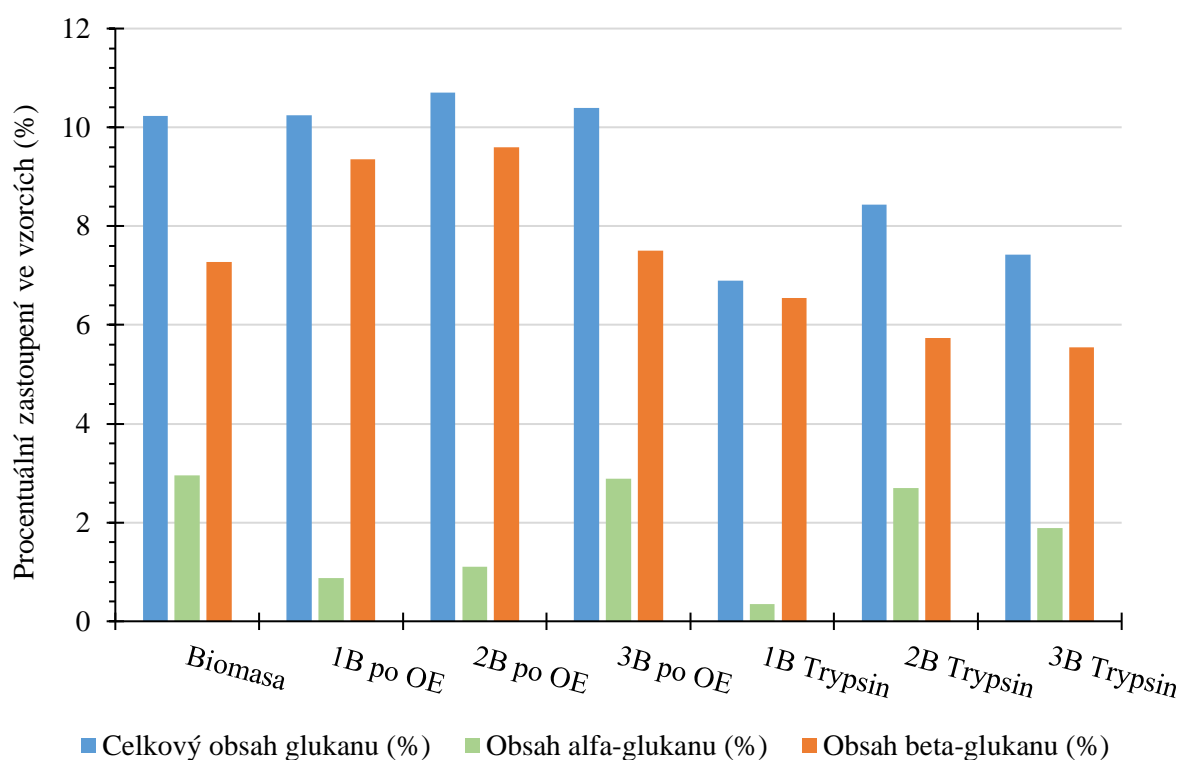
	Navážka (g)	Výtěžek (g)	Procentuální výtěžnost (%)	Obsah sacharidů (%)	Obsah proteinů (%)	Obsah lipidů (%)
Biomasa				34,72	11,61	21,29
1B po organické extrakci	20,02	2,83	14,14	17,08	0,15	3,22
2B po organické extrakci	20,13	3,17	15,75	17,62	0,11	1,75
3B po organické extrakci	20,04	3,51	17,51	81,33	0,20	1,88
1B Trypsin	20,02	2,21	11,04	49,27	0,17	11,08
2B Trypsin	20,13	2,78	13,81	64,62	0,35	3,56
3B Trypsin	20,04	3,12	15,57	73,83	0,16	3,62



Graf 15: Profil mastných kyselin v izolantech B, označení OE je pro organickou extrakci, jako trypsin jsou označeny vzorky po proteolýze s trypsinem.

5.7.1 Stanovení obsahu glukanů v izolantech B

Ke stanovení β -glukanů byl použit optimalizovaný postup pro stanovení glukanů enzymatickým kitem od společnosti Megazyme. Množství glukanů bylo stanoveno u kontrolního vzorku biomasy, která byla k izolaci použita. Dále bylo stanoveno množství glukanů v izolantech, výsledky toho stanovení jsou uvedeny v grafu 16. U dvou vzorků po organické izolaci byl zjištěn nárůst obsahu β -(1,3)-glukanu a β -(1,6)-glukanu ve vzorku. V kontrolní biomase byl obsah β -glukanů stanoven na 7,28 %. U vzorku 1B po organické extrakci byl zjištěn nárůst obsahu β -glukanů na 9,36 % a u vzorku 2B po organické extrakci bylo zjištěno 9,60 % β -glukanů. Působením enzymu trypsinu při proteolýze obsah β -glukanů klesnul u 1B Trypsin na 6,55 % β -glukanů a u 2B Trypsin, klesnul obsah β -glukanů až na 5,73 %. Rozdíly v obsahu β -glukanů u jednotlivých triplikátů mohly být způsobeny nedokonalou homogenizací zásobního vzorku biomasy, která se k izolacím používala. Nebo i chybovostí samotného stanovení.

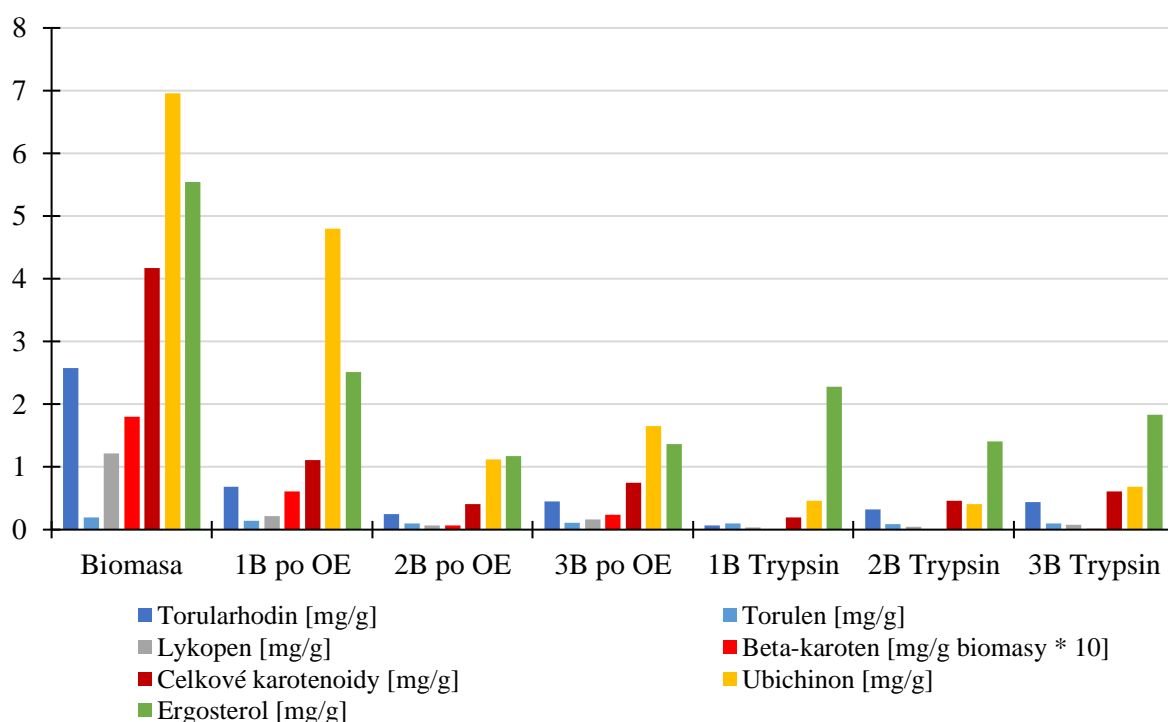


Graf 16: Obsah glukanů v izolantech B, označení OE je pro organickou extrakci, jako trypsin jsou označeny vzorky po proteolýze s trypsinem.

5.7.2 Stanovení obsahu karotenoidů u izolantů B

V průběhu procesu izolace se barva jednotlivých izolantů výrazně neměnila což je vidět na obrázku 26 a na obrázku 27. Biomasa byla nejdříve vystavena autolýze s 3% NaCl při teplotě 55 °C. Poté následovala bazická hydrolyza při teplotě 90 °C. Dalším krokem byla hydrolyza s roztokem kyseliny octové při teplotě 80 °C. Po těchto hydrolyzách následovala organická extrakce a proteolýza s trypsinem.

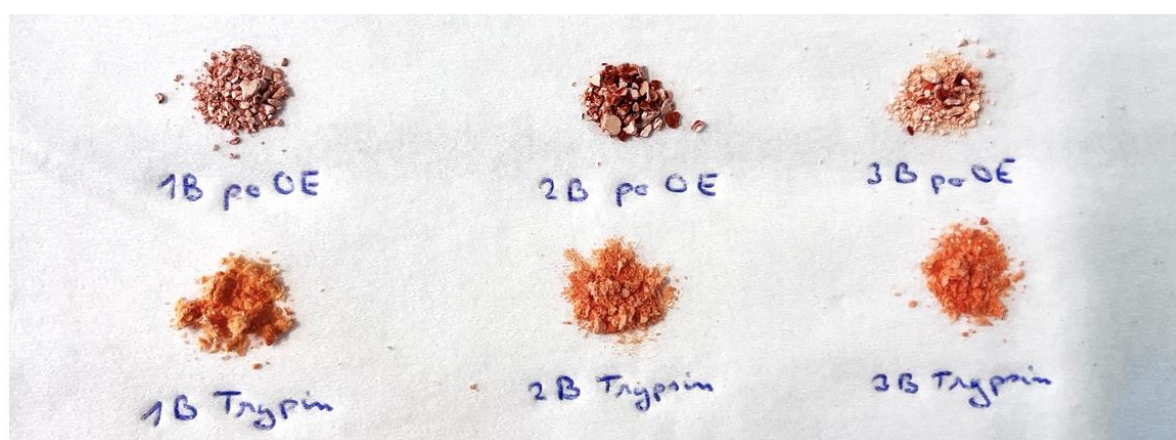
V grafu 17 je znázorněné zastoupení karotenoidů v izolantech B. Jako první vzorek je v grafu znázorněn obsah jednotlivých složek v kontrolním vzorku biomasy. Je zde vidět v porovnání s kontrolním vzorkem biomasy rapidní pokles obsahu karotenoidů ve vzorcích po organické extrakci a další pokles obsahu karotenoidů u vzorků po proteolýze. Nejvyšší zastoupení ubiquinonu u izolantů po organické extrakci má s hodnotou 4,79 mg/g biomasy vzorek 1B. Po proteolýze u tohoto vzorku 1B Trypsin klesnul obsah ubiquinonu na 0,46 mg/g biomasy. U izolantů po proteolýze výrazně neklesnul obsah ergosterolu. V případě vzorku 1B se obsah snížil z 2,51 mg/g biomasy na 2,28 mg/g biomasy, ale v případě izolantů 2B a 3B obsah ergosterolu vzrostl. U izolantu 2B z 1,18 mg/g biomasy na 1,41 mg/g biomasy a u vzorku 3B z 1,36 mg/g biomasy na 1,84 mg/g biomasy.



Graf 17: Obsah karotenoidů v izolantech B, označení OE je pro organickou extrakci, jako trypsin jsou označeny vzorky po proteolýze s trypsinem.



Obrázek 26: Izolanty B po proteolýze.



Obrázek 27: Lyofilizované izolanty B, označení OE je pro organickou extrakci, jako trypsin jsou označeny vzorky po proteolýze s trypsinem.

5.7.3 Analýza jednotlivých odpadních supernatantů B

V průběhu izolačního postupu B, byly odebírány vzorky odpadních supernatantů podle schématu na obrázku 28. Jejich zpracování se provádělo stejným způsobem jako u vzorku supernatantu A z kapitoly 5.6.3. Byly odebírány 2 vzorky po 1 ml, jeden na HPLC stanovení karotenoidů a druhý na GC stanovení lipidů. Jednotlivé obsahy karotenoidů a lipidů pro supernatanty jsou obsaženy v tabulce 11 a jsou vztaženy na 1 ml rozpouštědla. Nejvyšší obsah lipidů v odpadním supernatantu byl zjištěn u organických extrakcí. Shodně jako v předchozím postupu, vedly organické extrakce k vysokým výtěžkům vyextrahovaných lipidů a lipidických látek.

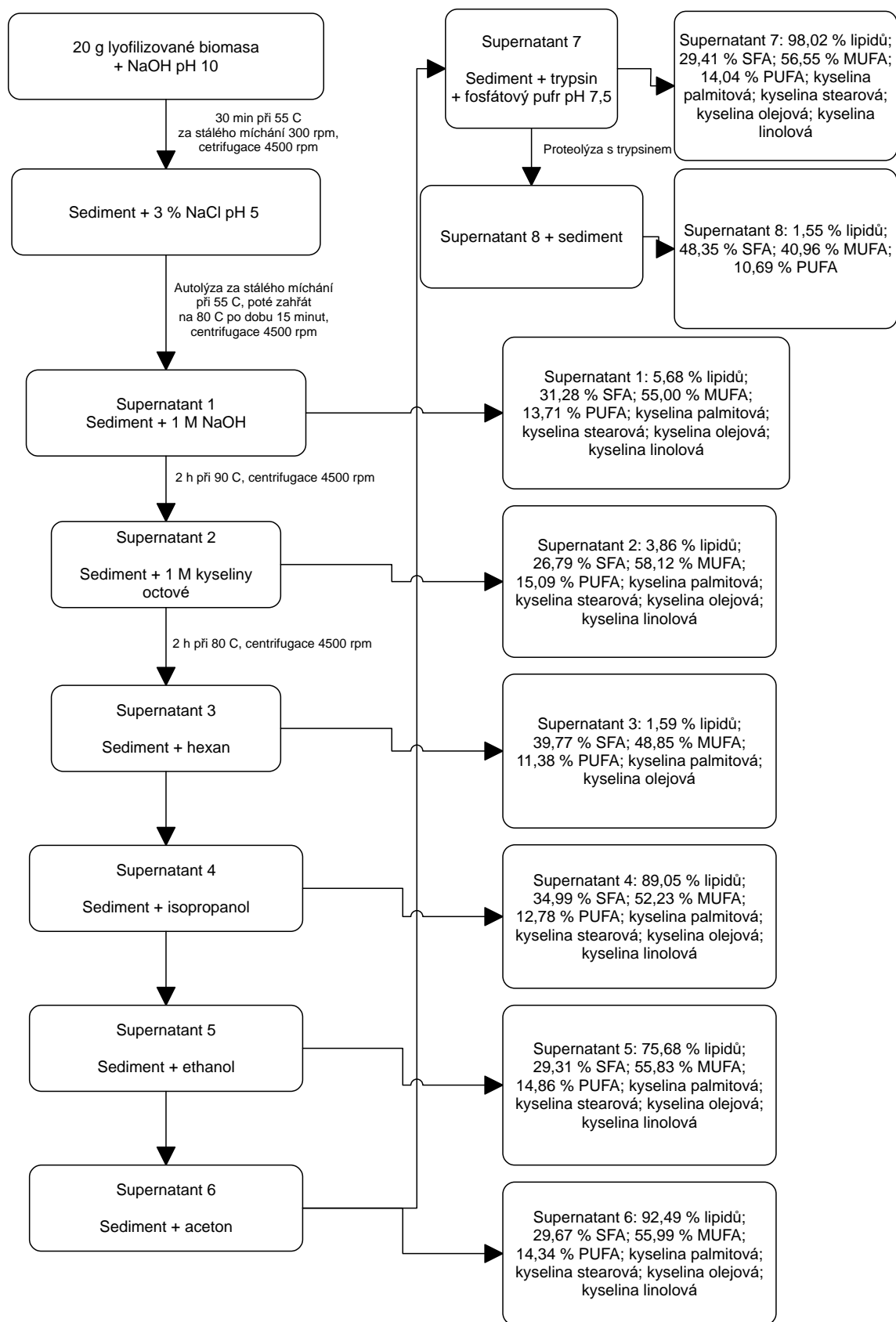
Nejdříve byly stanoveny vzorky supernatantů 1B. V supernatantu 4 byl zjištěn obsah lipidů 89,05 %, dále zde byl zjištěn obsah ubichinonu 16,69 mg/ml, ergosterolu 11,89 mg/ml a celkových karotenoidů 3,12 mg/ml. U supernatantu 5 byl stanoven obsah lipidů na 75,68 %. Dále byl u supernatantu 5 zjištěn vysoký obsah ubichinonu 45,12 mg/ml a ergosterolu 29,36 mg/ml, celkové karotenoidy zde byly stanoveny na 6,74 mg/ml. Obsah lipidů u supernatantu 6 byl stanoven na 92,49 %, dále zde byl stanoven ergosterol 24,83 mg/ml, ubichinon 33,78 mg/ml a celkové karotenoidy 6,57 mg/ml. Supernatant 7 měl obsah lipidů 98,02 %, dále zde byl stanoven ergosterol 17,90 mg/ml, ubichinon 15,95 mg/ml a celkové karotenoidy 3,84 mg/ml.

Dále byly stanovovány vzorky odpadních supernatantů z izolace vzorku 2B. U supernatantu 4 byl stanoven obsah lipidů na 90,52 %, dále zde byl stanoven obsah ubichinonu 13,46 mg/ml, ergosterolu 7,64 mg/ml a celkových karotenoidů 2,47 mg/ml. Dalším stanovovaným supernatantem byl supernatant 5, zde byl obsah lipidů 83,22 %, obsah ergosterolu zde byl 29,18 mg/ml, obsah ubichinonu zde byl 16,25 mg/ml a obsah celkových karotenoidů 4,33 mg/ml. U supernatantu 6 byl obsah lipidů 98,62 %, obsah ergosterolu 34,62 mg/ml, obsah ubichinonu 38,70 mg/ml a obsah celkových karotenoidů 5,85 mg/ml. U odpadního supernatantu 7 byl stanoven obsah lipidů na 90,03 %, tento vzorek měl vysoký obsah ubichinonu 192,96 mg/ml, ergosterolu zde bylo 88,38 mg/ml a celkových karotenoidů 39,88 mg/ml. Dále byl zde vysoký obsah torulenu 18,75 mg/ml, lykopenu 11,79 mg/ml a torularhodinu 9,45 mg/ml.

Dále byly stanovovány odpadní supernatanty vzorku 3B. U těchto vzorků byly nižší procentuální obsahy lipidů u organické extrakce. U supernatantu 4 byl stanoven obsah lipidů na 75,29 % a obsah ubichinonu zde byl 14,58 mg/ml. U vzorku supernatantu 5 byl stanoven obsah lipidů na 59,45 %, obsah ergosterolu zde byl 24,85 mg/ml a obsah ubichinonu zde byl 11,91 mg/ml. U supernatantu 6 byl stanoven obsah lipidů na 74,06 %, obsah ubichinonu zde byl 70,74 mg/ml, obsah ergosterolu byl 61,52 mg/ml a obsah celkových karotenoidů zde byl 11,25 mg/ml. V supernatantu 7 byl stanoven obsah lipidů na 91,03 %. Dále zde byl stanoven vysoký obsah ubichinonu 139,08 mg/ml ergosterolu 58,99 mg/ml a celkových karotenoidů 28,36 mg/ml.

Tabulka 11: Obsah sledovaných metabolitů u odpadních supernatantů po izolaci B.

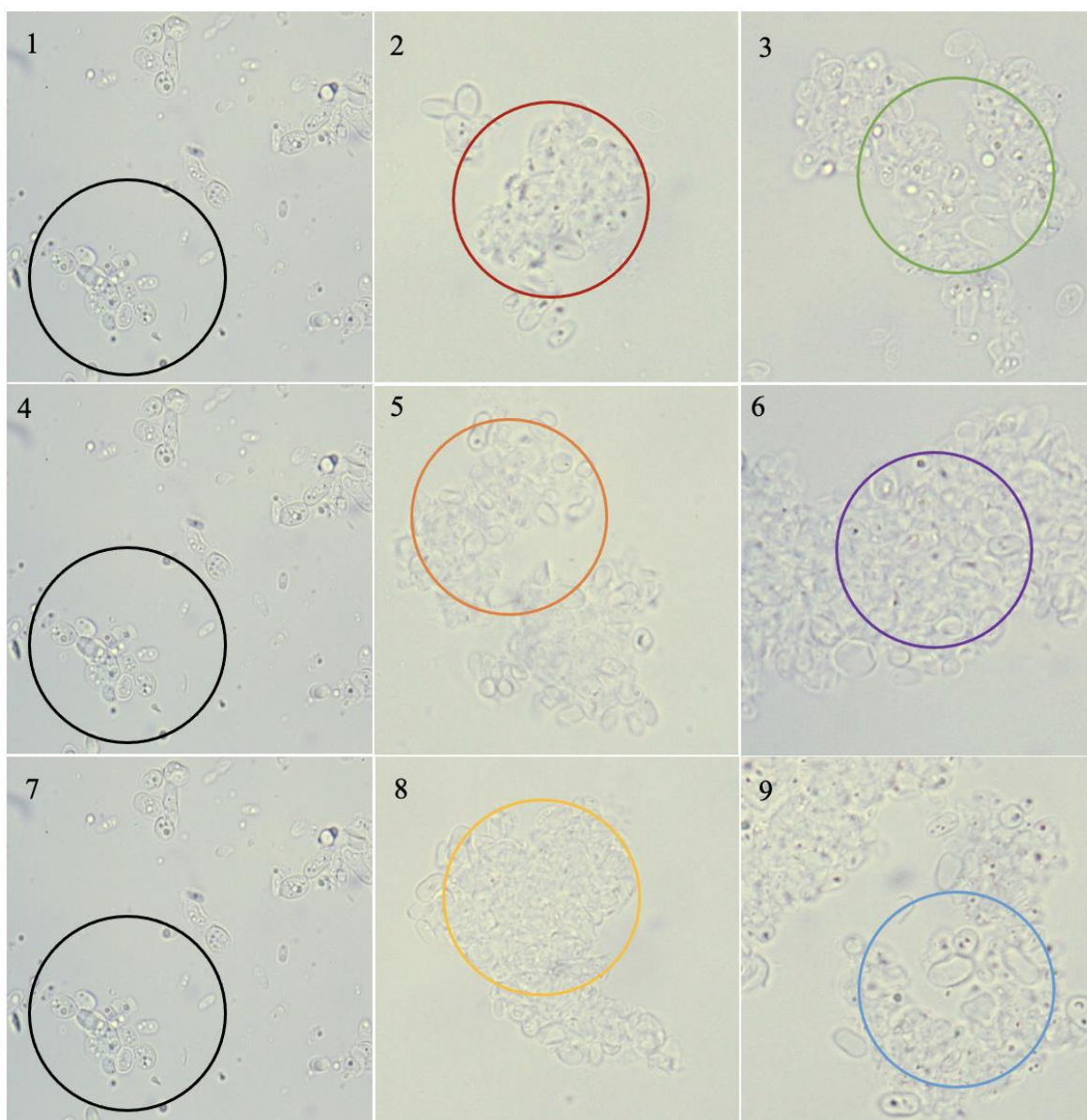
1B	Torularhodin (mg/ml)	Torulen (mg/ml)	Lykopen (mg/ml)	Beta-karoten (mg/ml)
Supernatant 1				
Supernatant 2				
Supernatant 3				
Supernatant 4	1,54	0,37	1,08	0,14
Supernatant 5	1,67	1,07	3,46	0,55
Supernatant 6	1,82	1,74	2,69	0,32
Supernatant 7	1,73	0,82	1,16	0,13
Supernatant 8				
	Celkové karotenoidy (mg/ml)	Ubichinon (mg/ml)	Ergosterol (mg/ml)	Lipidy (%)
Supernatant 1				5,68
Supernatant 2				3,86
Supernatant 3				1,59
Supernatant 4	3,12	16,69	11,89	89,05
Supernatant 5	6,74	45,12	29,36	75,68
Supernatant 6	6,57	33,78	24,83	92,49
Supernatant 7	3,84	15,95	17,90	98,02
Supernatant 8				1,55
2B	Torularhodin (mg/ml)	Torulen (mg/ml)	Lykopen (mg/ml)	Beta-karoten (mg/ml)
Supernatant 1				
Supernatant 2				
Supernatant 3				
Supernatant 4	0,33	1,27	0,88	
Supernatant 5	1,75	0,52	1,77	0,29
Supernatant 6		1,71	3,62	0,52
Supernatant 7	8,45	18,75	11,79	0,88
Supernatant 8				
	Celkové karotenoidy (mg/ml)	Ubichinon (mg/ml)	Ergosterol (mg/ml)	Lipidy (%)
Supernatant 1				2,38
Supernatant 2				1,50
Supernatant 3				1,80
Supernatant 4	2,47	13,46	7,64	90,52
Supernatant 5	4,33	16,25	29,18	83,22
Supernatant 6	5,85	38,70	34,62	98,62
Supernatant 7	39,88	192,96	88,38	90,03
Supernatant 8				0,33
3B	Torularhodin (mg/ml)	Torulen (mg/ml)	Lykopen (mg/ml)	Beta-karoten (mg/ml)
Supernatant 1				
Supernatant 2				
Supernatant 3				
Supernatant 4	1,57	0,25	1,31	0,18
Supernatant 5		0,35	1,22	0,19
Supernatant 6		4,27	6,25	0,73
Supernatant 7	6,04	12,56	9,02	0,74
Supernatant 8				
	Celkové karotenoidy (mg/ml)	Ubichinon (mg/ml)	Ergosterol (mg/ml)	Lipidy (%)
Supernatant 1				3,02
Supernatant 2				1,86
Supernatant 3				2,74
Supernatant 4	3,32	14,58	8,19	75,29
Supernatant 5	1,83	11,91	24,85	59,45
Supernatant 6	11,25	70,74	61,52	74,06
Supernatant 7	28,36	139,08	58,99	91,03
Supernatant 8				0,91



Obrázek 28: Příklad schématického znázornění optimalizovaného procesu izolace B, dále je zde znázorněn obsah lipidů a profil mastných kyselin v jednotlivých supernatantech vzorku 1B.

5.7.4 Mikroskopické zobrazení struktury v izolantech B

Na obrázku 29 jsou vidět mikroskopické snímky biomasy a jednotlivých izolantů při zvětšení 100x pod imerzním olejem. V prvním sloupci se nacházejí snímky 1, 4 a 7, což jsou kontrolní snímky biomasy kvasinky *Rhodotorula toruloides*, která byla použita na izolaci. Jednotlivé kvasinky zde jsou vidět v černém kolečku. Na snímku 2 je v červeném kolečku vidět izolant 1B po organické extrakci. Na snímku 5 je v oranžovém kolečku vidět izolant 2B po organické extrakci a na snímku 8 je ve žlutém kolečku vidět izolant 3B po organické extrakci. U všech izolantů po organické extrakci jsou vidět buněčné stěny bez buněčných organel. Na snímku 3 je v zeleném kolečku vidět izolant 1B po proteolýze trypsinem. Na dalším snímku 6 je ve fialovém kolečku vidět izolant 2B po proteolýze. A na snímku 9 je v modrém kolečku vidět izolant 3B po proteolýze. Na snímcích po proteolýze jsou vidět zbytky buněčných stěn.



Obrázek 29: Sledováno pod mikroskopem přes imerzní olej zvětšení 100x: Optimalizace postupu izolace glukaniů podle postupu B, 1, 4 a 7- lyofilizovaná biomasa, 2- 1B po organické extrakci, 3- 1B po trypsinu, 5- 2B po OE, 6- 2B po trypsinu, 8- 3B po OE, 9- 3B po trypsinu

5.8 Optimalizace postup izolace β -glukanů C

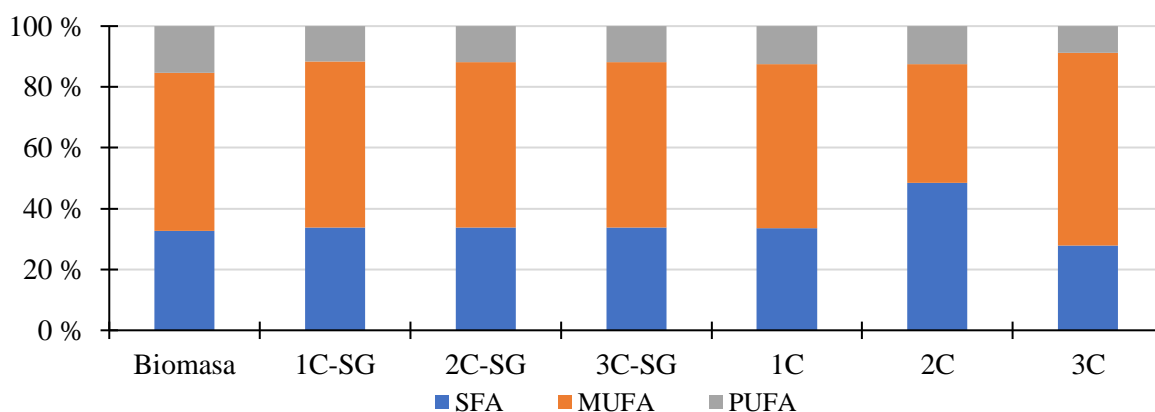
Samotný postup izolace zabral 4 dny. Izolace se prováděla v triplikátech a pro izolaci bylo naváženo cca 20 g biomasy. V průběhu izolace se prováděla autolýza v deionizované vodě při teplotě 55 °C po dobu 48 h. Za tuto dobu se buňka kvasinky měla otevřít. Po této době následovala úprava horkou vodou v autoklávu po dobu 6 h při teplotě 121 °C. Úprava horkou vodou měla za cíl rozrušit strukturu buněčných stěn. Takto upraveny byly získány první izolanty surového glukanu, které se dále lyofilizovaly. Zbytek izolantů byl vystaven působení enzymu bromelainu a papainu za účelem deproteinizace. Po této deproteinizaci byly izolanty dále upraveny lyofilizací a testovány.

V tabulce 12 jsou uvedeny jednotlivé navážky a procentuální výtěžnosti izolací. Nejvyšší výtěžnost surového glukanu nalezneme u vzorku 2C, která byla 30,27 %. Zastoupení sacharidů ve vzorku je zde 34,62 %. U vzorků po deproteinizaci je nejvyšší výtěžnost u izolantu 2C 30,11 %, který má obsah sacharidů 60,82 %.

Z hlediska profilu mastných kyselin nemá tento způsob izolace na vzorky žádný vliv. V průběhu izolace nedochází k hydrolyze esterových vazeb. Profil mastných kyselin ke vzorků je v grafu 18.

Tabulka 12: Výtěžnost, obsah sacharidů, proteinů a lipidů u optimalizovaného postupu izolace β -glukanu C.

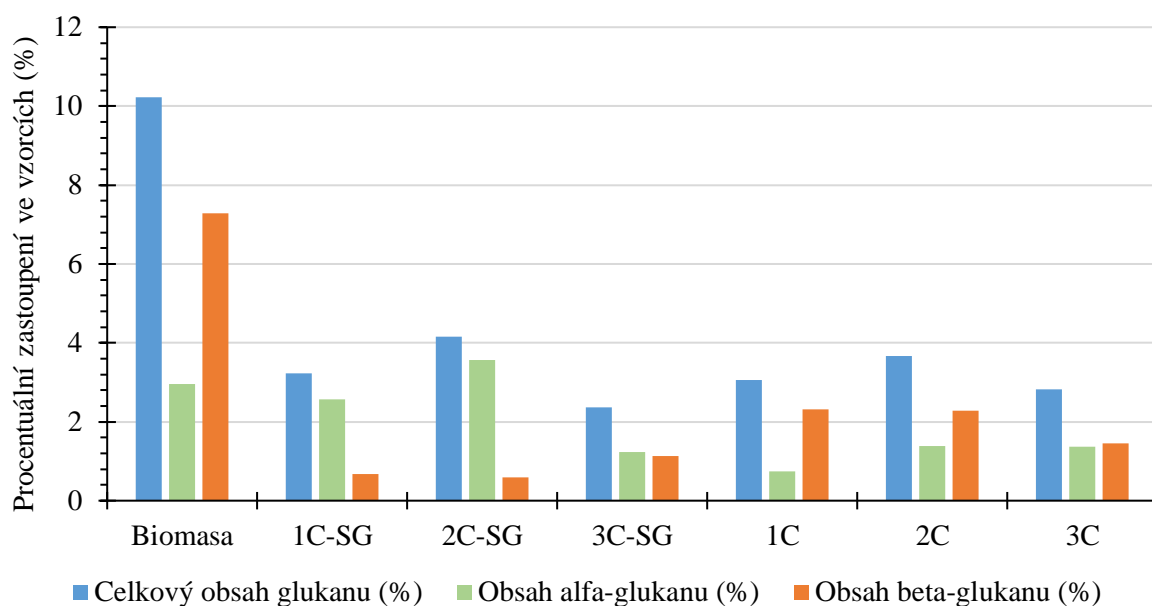
	Navážka biomasy (g)	Výtěžek (g)	Procentuální výtěžnost (%)	Obsah sacharidů (%)	Obsah proteinů (%)	Obsah lipidů (%)
Biomasa				34,72	11,61	21,29
1C surový glukan	20,32	6,07	29,87	32,70	0,24	54,95
2C surový glukan	20,09	6,08	30,27	34,62	0,10	51,49
3C surový glukan	20,01	6,03	30,15	30,62	0,18	49,28
1C	20,32	1,97	9,72	35,32	0,37	53,94
2C	20,09	6,05	30,11	60,82	0,99	8,66
3C	20,01	5,22	26,09	32,90	2,25	24,50



Graf 18: Profil mastných kyselin u izolantů C, C-SG v grafu označuje surový glukan vzorku C.

5.8.1 Stanovení obsahu glukanů v izolantech C

Ke stanovení β -glukanů byl použit optimalizovaný postup pro stanovení glukanů enzymatickým kitem od společnosti Megazyme. Množství glukanů bylo stanoveno u kontrolního vzorku biomasy, která byla k izolaci použita. Dále bylo stanoveno množství glukanů v izolantech, výsledky toho stanovení jsou uvedeny v grafu 19. V kontrolní biomase byl obsah β -glukanů stanoven na 7,28 %. U této izolace se nepodařilo vyizolovat vzorek s vyšším obsahem β -glukanů, než měl kontrolní vzorek biomasy. Obsah β -glukanů u izolantů surového glukanu byl výrazně nižší než u biomasy, teprve po deproteinizaci se obsah β -glukanu zvýšil. Za nízký obsah β -glukanů v izolantech může nejspíše vysoký obsah lipidů v jednotlivých vzorcích, který je uveden v tabulce 8. V rámci dalších optimalizací bude nutná delší a důkladnější deproteinizace spolu s důkladnějším rozrušením buněk. V grafu 19 můžeme vidět, že po deproteinizaci se zvýšil obsah β -glukanů u vzorku 1C z 0,67 % na 2,31 %. Ovšem i po deproteinizaci v tomto vzorku zůstává 53,94 % lipidů.

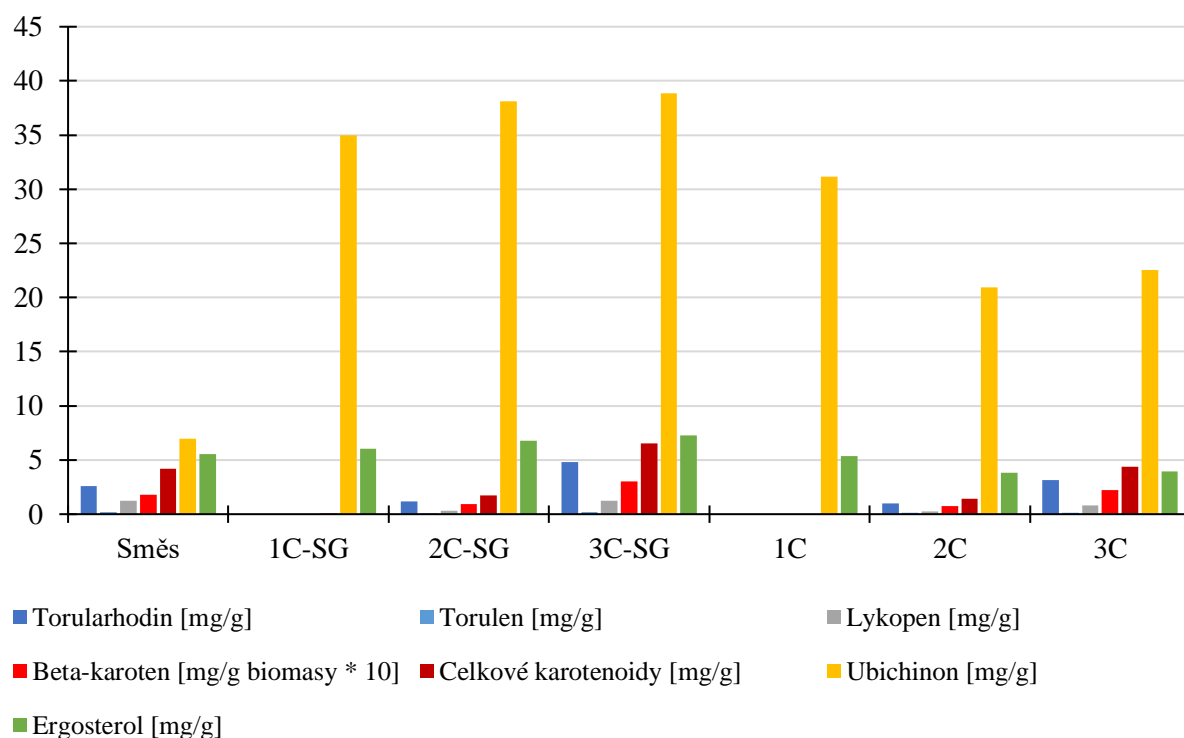


Graf 19: Obsah glukanů v izolantech C, C-SG v grafu označuje surový glukan vzorku C.

5.8.2 Stanovení obsahu karotenoidů u izolantů C

V průběhu izolačního postupu C se barva jednotlivých izolátů měnila, což bylo zajímavým pozorováním, neboť se jednalo o triplikáty, které byly dělány současně a působily na ně stejné podmínky. Jednotlivé vzorky nalezneme na obrázku 30, na obrázku 31 a na obrázku 32. Zbarvení jednotlivých vzorků odpovídá jejich obsahu karotenoidů. Během autolýzy došlo k úplné degradaci karotenoidů ve vzorku 1C a k částečné degradaci karotenoidů ve vzorku 2C. Zatímco vzorek 3C ve stejných podmínkách svoji barvu neztratil a karotenoidy zůstaly nezdegradované. Vlivem deproteinizace se obsah karotenoidů v izolantech snížil.

V grafu 20 je znázorněn obsah karotenoidů v kontrolním vzorku biomasy a v jednotlivých izolantech. Izolanty ve srovnání s kontrolním vzorkem biomasy mají výrazně vyšší obsah ubichinonu. U vzorku 3C-SG surového glukanu, také vzrostl obsah celkových karotenoidů z 4,16 mg/g biomasy na 6,51 mg/g biomasy. Po následné deproteinizaci obsah celkových karotenoidů u tohoto vzorku klesnul na 4,35 mg/g biomasy. Obsah ubichinonu se u tohoto vzorku, oproti kontrolní biomase, také zvýšil z 6,95 mg/g biomasy na 38,86 mg/g biomasy. Obsah ubichinonu se následně u vzorku 3C po deproteinizaci snížil na 22,54 mg/g biomasy.



Graf 20: Obsah karotenoidů v izolantech C, C-SG v grafu označuje surový glukau vzorku C.



Obrázek 30: Vzorky v průběhu izolace po autolýze.



Obrázek 31: Vzorky po úpravě horkou vodou.



Obrázek 32: Lyofilizované izolanty C, označení C-SG označuje vzorek surového glukanu vzorku C.

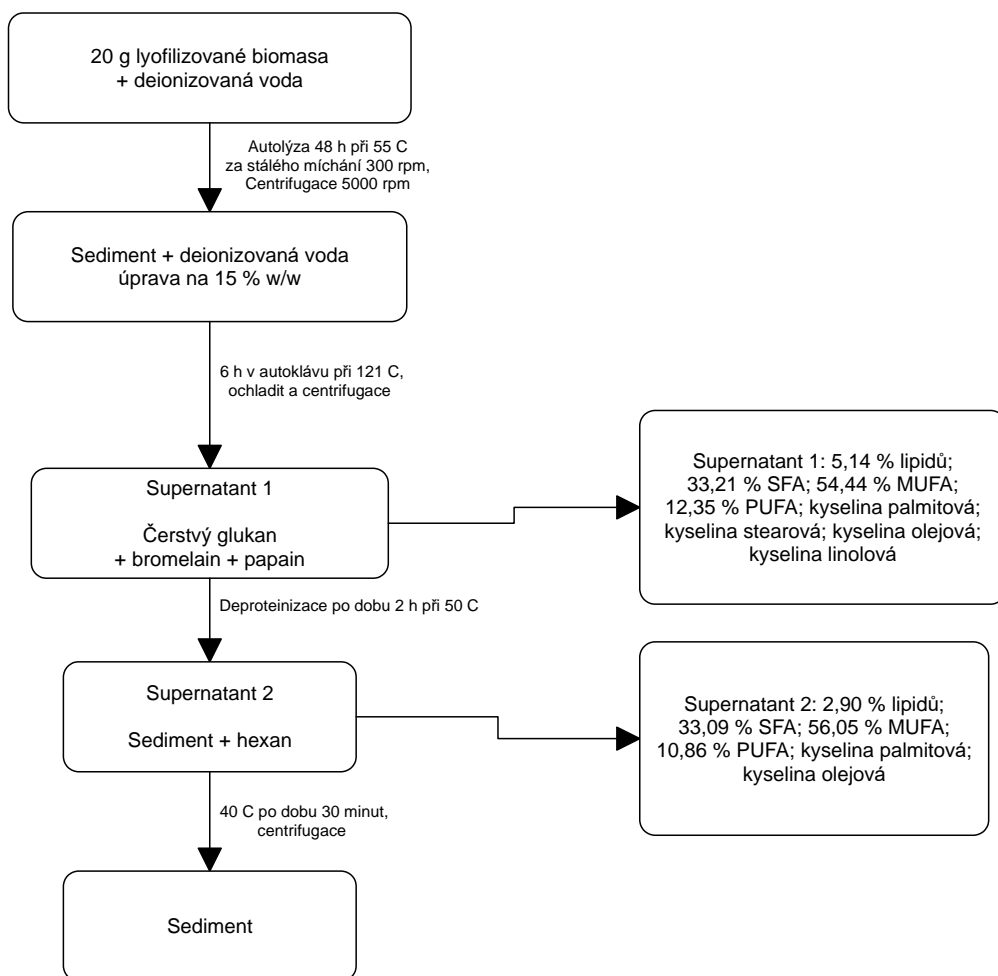
5.8.3 Analýza jednotlivých odpadních supernatantů C

V průběhu izolačního postupu C, byly odebírány vzorky odpadních supernatantů podle schématu na obrázku 33. Jejich zpracování se provádělo stejným způsobem jako u vzorku supernatantu A, které je uvedeno v kapitole 5.6.3. Byly odebírány 2 vzorky po 1 ml, jeden na HPLC stanovení karotenoidů a druhý na GC stanovení lipidů. Jednotlivé obsahy karotenoidů a lipidů pro supernatanty jsou obsaženy v tabulce 13. Oproti první a druhé optimalizaci se zde neprováděla organická extrakce. U každého vzorku byly odebírány pouze 2 vzorky supernatantů.

V supernatantu 1 vzorku 1C byl zjištěn obsah lipidů 5,14 %. U supernatantu 2 vzorku 1C byl zjištěn obsah lipidů 2,90 %. U supernatantu 1 vzorku 2C byl zjištěn obsah lipidů 4,59 %. U supernatantu 2 vzorku 2C byl obsah lipidů 1,98 %. Dále byly stanoveny vzorky z izolace 3C supernatant 1 měl obsah lipidů 9,22 % a dále na rozdíl od předchozích supernatantů obsahoval i ubichinon 0,11 mg/ml, ergosterol 0,56 mg/ml a celkové karotenoidy 0,40 mg/ml. U supernatantu 2 vzorku 3C byl stanoven obsah lipidů 2,64 %.

Tabulka 13: Obsah sledovaných metabolitů u odpadních supernatantů po izolaci C.

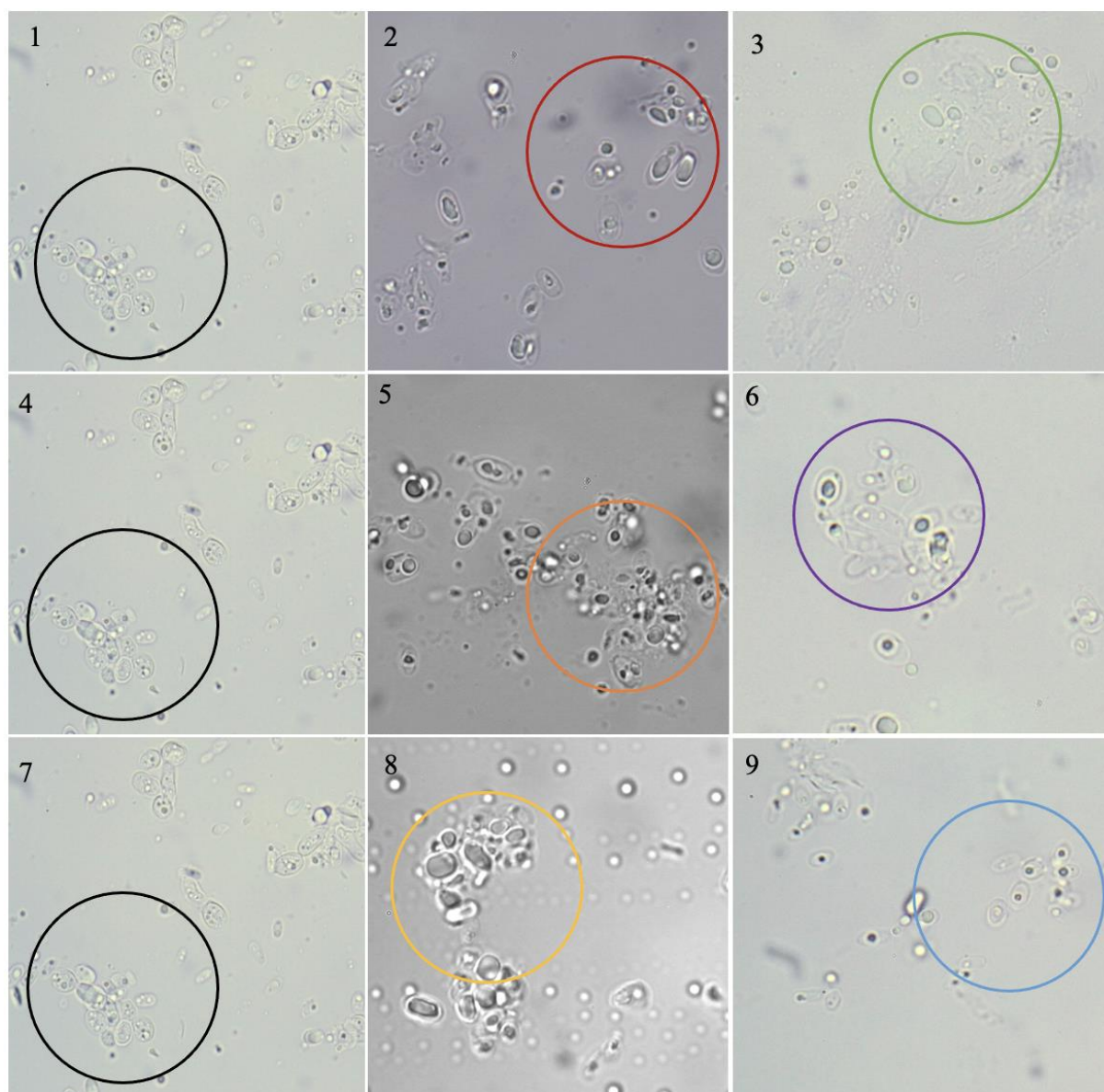
1C	Ubichinon (mg/ml)	Ergosterol (mg/ml)	Lipidy (%)
Supernatant 1	0,05	0,07	5,14
Supernatant 2			2,9
2C	Ubichinon (mg/ml)	Ergosterol (mg/ml)	Lipidy (%)
Supernatant 1	0,01	0,03	4,59
Supernatant 2			1,98
3C	Ubichinon (mg/ml)	Ergosterol (mg/ml)	Lipidy (%)
Supernatant 1	0,11	0,56	9,22
Supernatant 2			2,64
3C	Torularhodin (mg/ml)	Torulen (mg/ml)	Celkové karotenoidy (mg/ml)
Supernatant 1	0,33	0,04	0,40
Supernatant 2			



Obrázek 33: Příklad schématického znázornění optimalizovaného procesu izolace C, dále je zde znázorněn obsah lipidů a profil mastných kyselin v jednotlivých supernatantech vzorku 1C.

5.8.4 Mikroskopické zobrazení struktury v izolantech C

Na obrázku 34 jsou vidět mikroskopické snímky biomasy a jednotlivých izolantů při zvětšení 100x pod imerzním olejem. V prvním sloupci se nacházejí snímky 1, 4 a 7 s černým kolečkem, které znázorňují kontrolní vzorek lyofilizované biomasy kvasinky *Rhodotorula toruloides*, která byla použita na izolaci. Na snímku 2 je v červeném kolečku vidět izolant 1C surového glukanu. Na snímku 5 je v oranžovém kolečku vidět izolant 2C surový glukuan. A na snímku 8 je ve žlutém kolečku vidět izolant 3C surový glukuan. Jedná se o izolanty po autolýze ve vodě při 55 °C a úpravě horkou vodou v autoklávu při 121 °C po dobu 6 h. Na snímku 3 je v zeleném kolečku vidět izolant 1C po deproteinizaci. Na snímku 6 je ve fialovém kolečku vidět izolant 2C po deproteinizaci. Na snímku 9 je v modrém kolečku vidět izolant 3C po deproteinizaci.



Obrázek 34: Sledováno pod mikroskopem přes imerzní olej zvětšení 100x: Optimalizovaný postup izolace β -glukanu C, 1, 4 a 7- lyofilizovaná biomasa, 2- 1C surový glukuan, 3- 1C deproteinizovaný glukuan, 5- 2C surový glukuan, 6- 2C deproteinizovaný glukuan, 8- 3C surový glukuan, 8- 3C deproteinizovaný glukuan.

5.9 Optimalizace postupu izolace β -glukanů D

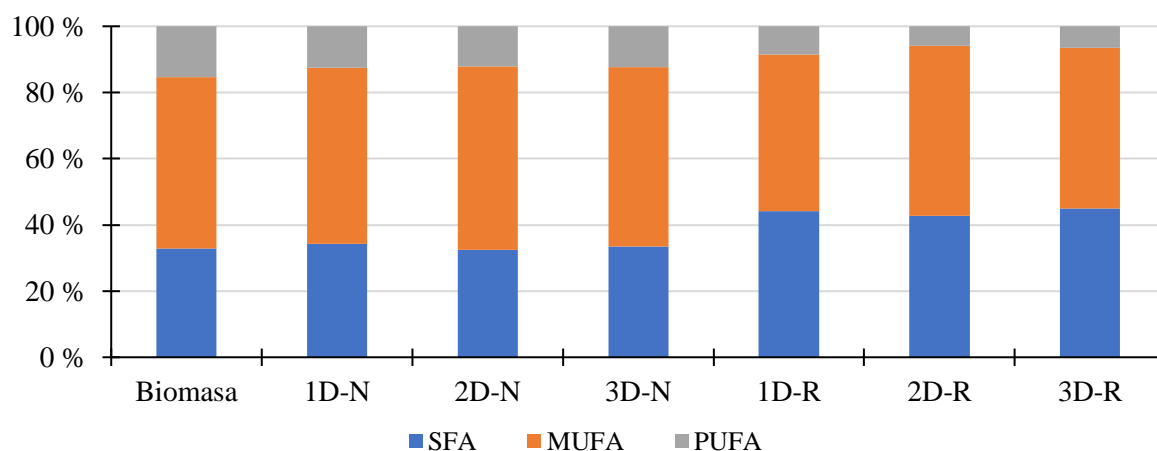
Tato metoda izolace využívala acidobazické metody oddělení nerozpustného a rozpustného glukanu. V prvním kroku byl za pomoci hydroxidu oddělen nerozpustný glukan ve formě sraženiny. Supernatant byl dále smíchán s ethanolem a nechán přes noc, kdy se v ethanolu vysrážel rozpustný glukan. Izolace se prováděla s triplikátech, za stejných podmínek a se stejnou navázkou biomasy.

V tabulce 14 je zaznamenána výtěžnost, která se u nerozpustného glukanu pohybovala okolo 60 %. Nejvyšší výtěžnost měl vzorek 3D-N a to 61,34 %. Obsah sacharidů v tomto vzorku byl 24,95 % a obsah lipidů 22,69 %. U izolantů rozpustného glukanu měl nejvyšší výtěžek vzorek 3D-R a to 6,57 % s obsahem sacharidů 25,49 %. Nejvyšší množství sacharidů ve vzorku měl vzorek rozpustného glukanu 2D-R a to 40,51 % s obsahem lipidů 7,07 %.

V grafu 21 je znázorněn profil mastných kyselin u jednotlivých izolantů. Zde je vidět, že nerozpustný glukan se od kontrolního vzorku biomasy v profilu mastných kyselin neliší. Zatímco u rozpustného glukanu je vidět nárůst obsahu SFA neboli nasycených mastných kyselin. Pravděpodobně docházelo při tomto procesu srážení ethanolem k částečné extrakci lipidů s vyšším obsahem SFA. Tento jev by bylo vhodné prostudovat.

Tabulka 14: Výtěžnost, obsah sacharidů, proteinů a lipidů u optimalizovaného postupu izolace β -glukanu D.

	Navážka biomasy (g)	Výtěžek (g)	Procentuální výtěžnost (%)	Obsah sacharidů (%)	Obsah proteinů (%)	Obsah lipidů (%)
Biomasa				34,72	11,61	21,29
1D nerozpustný glukan	20,15	11,86	58,86	17,13	0,44	26,64
2D nerozpustný glukan	20,12	11,69	58,10	15,42	0,37	26,74
3D nerozpustný glukan	20,23	12,41	61,34	24,95	1,14	22,69
1D rozpustný glukan	20,15	1,22	6,05	32,35	1,99	6,31
2D rozpustný glukan	20,12	1,00	4,97	40,51	1,04	7,07
3D rozpustný glukan	20,23	1,33	6,57	25,49	0,51	2,66

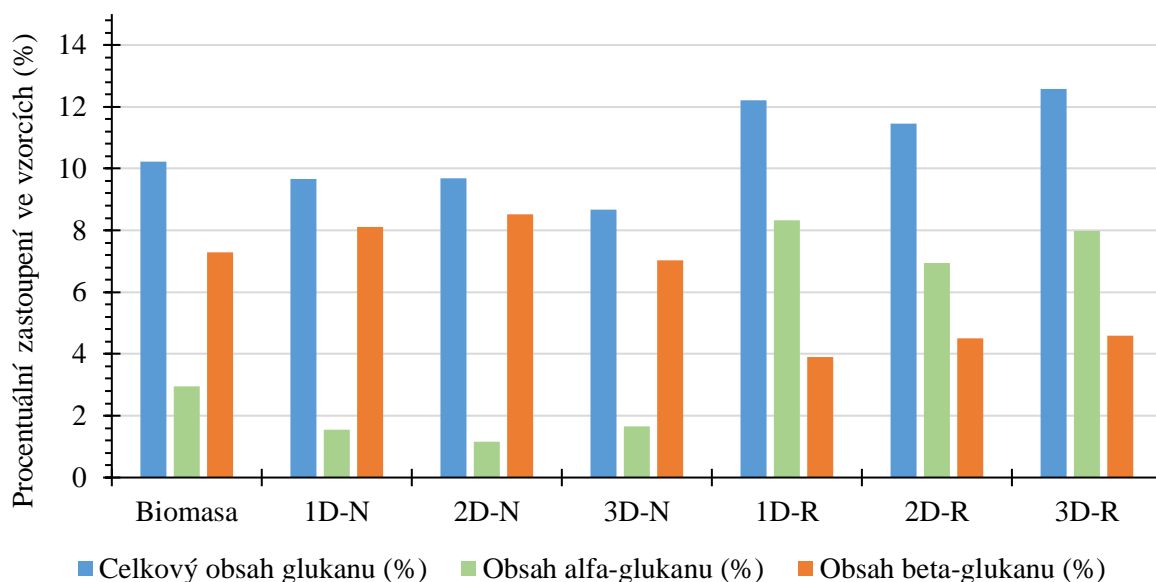


Graf 21: Profil mastných kyselin u izolantů D, D-N je označení pro nerozpustný glukan vzorku D, D-R je označení pro rozpustný glukan vzorku D.

5.9.1 Stanovení obsahu glukanů v izolantech D

Ke stanovení β -glukanů byl použit optimalizovaný postup pro stanovení glukanů enzymatickým kitem od společnosti Megazyme. Množství glukanů bylo stanoveno u kontrolního vzorku biomasy, která byla k izolaci použita. Dále bylo stanoveno množství glukanů v izolantech, výsledky toho stanovení jsou uvedeny v grafu 22. V kontrolní biomase byl obsah β -glukanů stanoven na 7,28 % a α -glukanů na 2,95 %. Nejvyšší obsah β -(1,3)-glukanů a β -(1,6)-glukanů měly izolanty nerozpustných glukanů. Zatímco v izolantech rozpustných glukanů výrazně převažoval obsah α -glukanů.

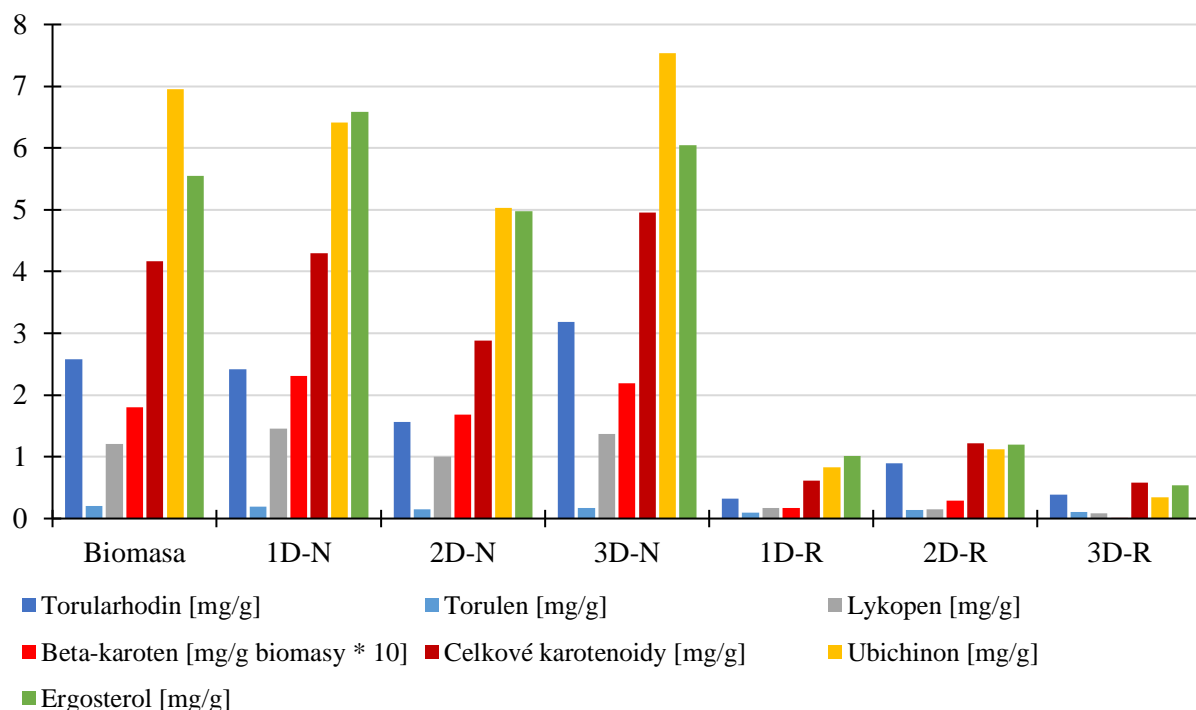
Nejvyšší obsah β -glukanů 8,53 % měl izolant 2D-N nerozpustného glukanu, tento obsah β -glukanů byl vyšší než v kontrolním vzorku biomasy. Nejvyšší obsah α -glukanů 8,33 % byl zjištěn u vzorku 1D-R rozpustného glukanu. Tento obsah α -glukanů ve vzorku byl výrazně vyšší než u kontrolního vzorku biomasy. Tohoto faktu, že v absolutním ethanolu se dá velice dobře vysrážet a vyizolovat α -glukan, je možno využít pro budoucí optimalizaci této metody a zvýšení její účinnosti a přesnosti.



Graf 22: Obsah glukanů v izolantech D, D-N je označení pro nerozpustný glukan vzorku D, D-R je označení pro rozpustný glukan vzorku D.

5.9.2 Stanovení obsahu karotenoidů u izolantů D

V grafu 23 nalezneme obsah karotenoidů u jednotlivých izolantů D. Obsah karotenoidů se stanovoval v kontrolním vzorku biomasy a v izolantech. U nerozpustných glukánů je vidět, že se obsah karotenoidů nijak výrazně nemění. Oproti tomu u rozpustných glukánů obsah karotenoidů klesnul. Nejvyšší obsah celkových karotenoidů 4,95 mg/g biomasy nalezneme u izolantu nerozpustného glukánu 3D-N. U tohoto vzorku je rovněž nejvyšší obsah torularhodinu 3,19 mg/g biomasy a nejvyšší obsah ubiquinonu 7,54 mg/g biomasy. Jednotlivé izolanty jsou zobrazeny na obrázku 35.



Graf 23: Obsah karotenoidů v izolantech D, D-N je nerozpustný glukán vzorku D, D-R je rozpustný glukán.



Obrázek 35: Lyofilizované izolanty D, D-N je označení pro nerozpustný glukán vzorku D, D-R je označení pro rozpustný glukán vzorku D.

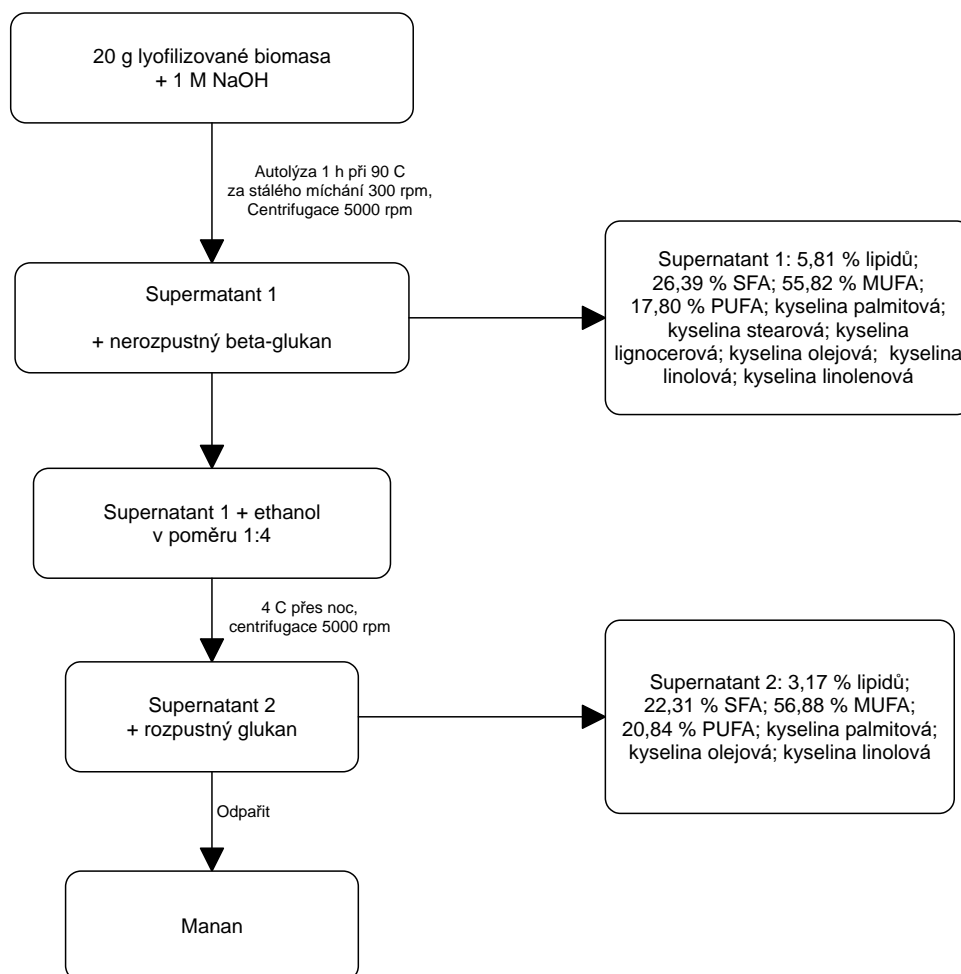
5.9.3 Analýza jednotlivých odpadních supernatantů D

U izolační metody D se využívalo acidobazické metody izolace. V průběhu izolačního postupu D, byly odebírány vzorky odpadních supernatantů podle schématu na obrázku 36. Jejich zpracování se provádělo stejným způsobem jako u vzorků supernatantu A. Byly odebírány vždy 2 vzorky po 1 ml, jeden na HPLC stanovení karotenoidů a druhý na GC stanovení lipidů. Jednotlivé obsahy karotenoidů a lipidů pro supernatanty jsou obsaženy v tabulce 15. Tato izolace byla zaměřena na dvou izolacích izolaci nerozpustného glukanu a izolaci rozpustného glukanu.

U supernatantu 1 u vzorku 1D byl zjištěn obsah lipidů 5,81 %. Dále byl stanoven supernatant 2, u kterého byl stanoven obsah lipidů v supernatantu na 3,17 % a obsah ergosterolu zde byl stanoven na 1,24 mg/ml. Následně byl stanoven supernatant 1 u vzorku 2D obsah lipidů zde byl 5,99 %, a dále byl zjištěn procentuální obsah lipidů 6,83 % u supernatantu 2. U vzorku 3D byl procentuální obsah lipidů 6,07 % v supernatantu 1. Procentuální obsah lipidů u supernatantu 2 byl 6,73 %.

Tabulka 15: Obsah sledovaných metabolitů u odpadních supernatantů po izolaci D.

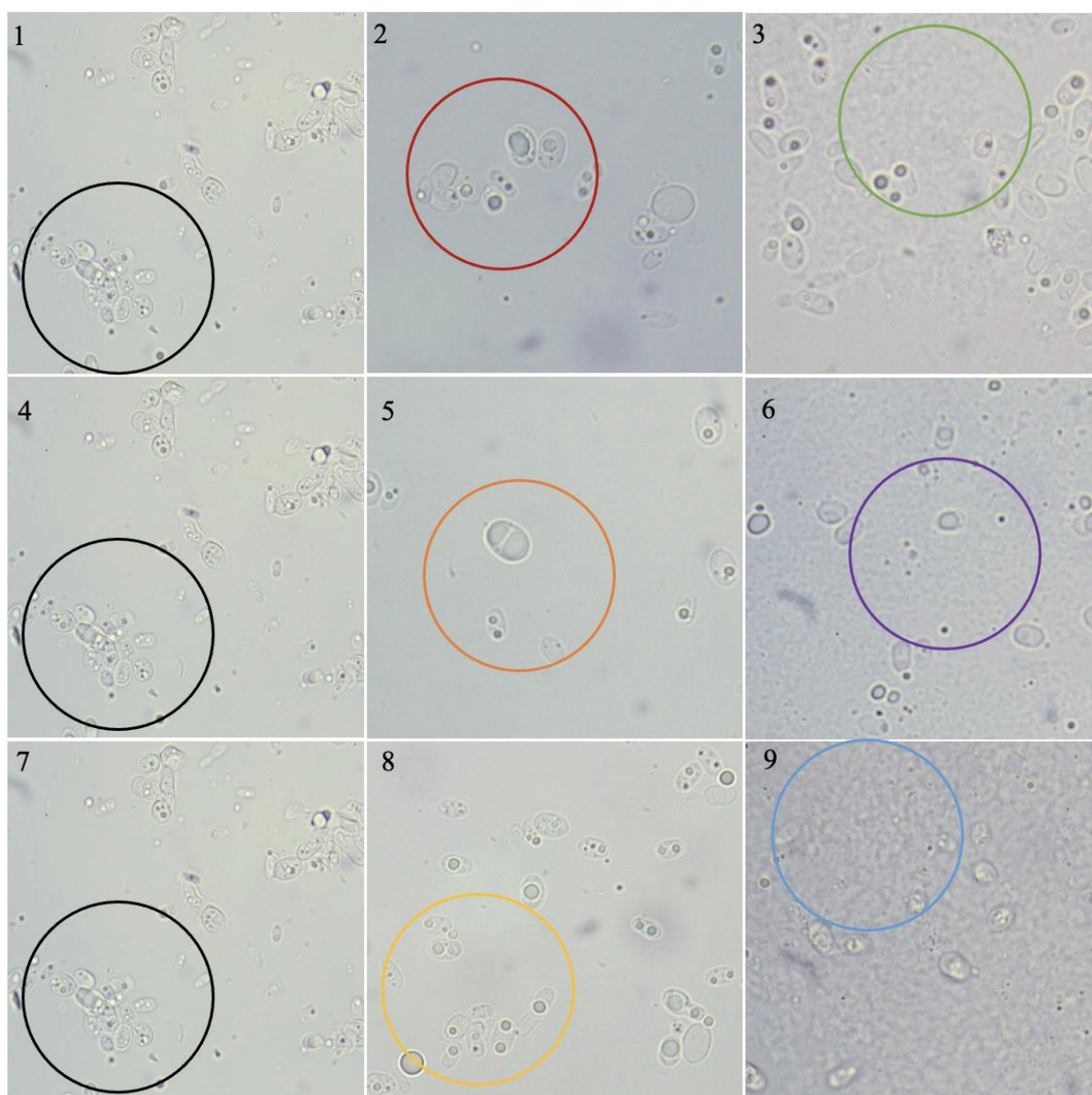
1D	Ubichinon (mg/ml)	Ergosterol (mg/ml)	Lipidy (%)
Supernatant 1			5,81
Supernatant 2		1,24	3,17
	Torulen (mg/ml)	Celkové karotenoidy (mg/ml)	Lykopen (mg/ml)
Supernatant 1			
Supernatant 2	0,44	0,56	0,11
2D	Ubichinon (mg/ml)	Ergosterol (mg/ml)	Lipidy (%)
Supernatant 1	0,03		5,99
Supernatant 2		0,62	6,83
	Torulen (mg/ml)	Celkové karotenoidy (mg/ml)	Lykopen (mg/ml)
Supernatant 1	0,03	0,03	
Supernatant 2	0,35	0,41	0,06
3D	Ubichinon (mg/ml)	Ergosterol (mg/ml)	Lipidy (%)
Supernatant 1	0,04	0,18	6,07
Supernatant 2		0,66	6,73
	Torulen (mg/ml)	Celkové karotenoidy (mg/ml)	Lykopen (mg/ml)
Supernatant 1	0,03	0,23	0,01
Supernatant 2	0,30	0,35	0,06



Obrázek 36: Příklad schématického znázornění optimalizovaného procesu izolace D, dále je zde znázorněn obsah lipidů a profil mastných kyselin v jednotlivých supernatantech vzorku 1D.

5.9.4 Mikroskopické zobrazení struktury v izolantech D

Na obrázku 37 jsou vidět mikroskopické snímky biomasy a jednotlivých izolantů při zvětšení 100x pod imerzním olejem. V prvním sloupci se nacházejí snímky 1, 4 a 7, což jsou kontrolní snímky biomasy kvasinky *Rhodotorula toruloides*, která byla použita na izolaci. Jednotlivé kvasinky zde jsou vidět v černém kolečku. Na snímku 2 je v červeném kolečku vidět izolant 1D-N, což jsou nerozpustné glukany. Na snímku 5 je v oranžovém kolečku vidět izolant 2D-N a na snímku 8 je ve žlutém kolečku vidět izolant 3D-N. Na snímku 3 je v zeleném kolečku vidět izolant 1D-R, což jsou rozpustné glukany. Na dalším snímku 6 je ve fialovém kolečku vidět izolant 2D-R a na snímku 9 je v modrém kolečku vidět izolant 3D-R.



Obrázek 37: Sledováno pod mikroskopem přes imerzní olej zvětšení 100x: Optimalizace postupu izolace glukánů podle postupu D, 1, 4 a 7- lyofilizovaná biomasa, 2- 1D nerozpustný glukan, 3- 1-D rozpustný glukan, 5- 2D nerozpustný glukan, 6- 2D rozpustný glukan, 8- 3D nerozpustný glukan, 9- 3D rozpustný glukan.

5.10 Orientační refraktometrické stanovení

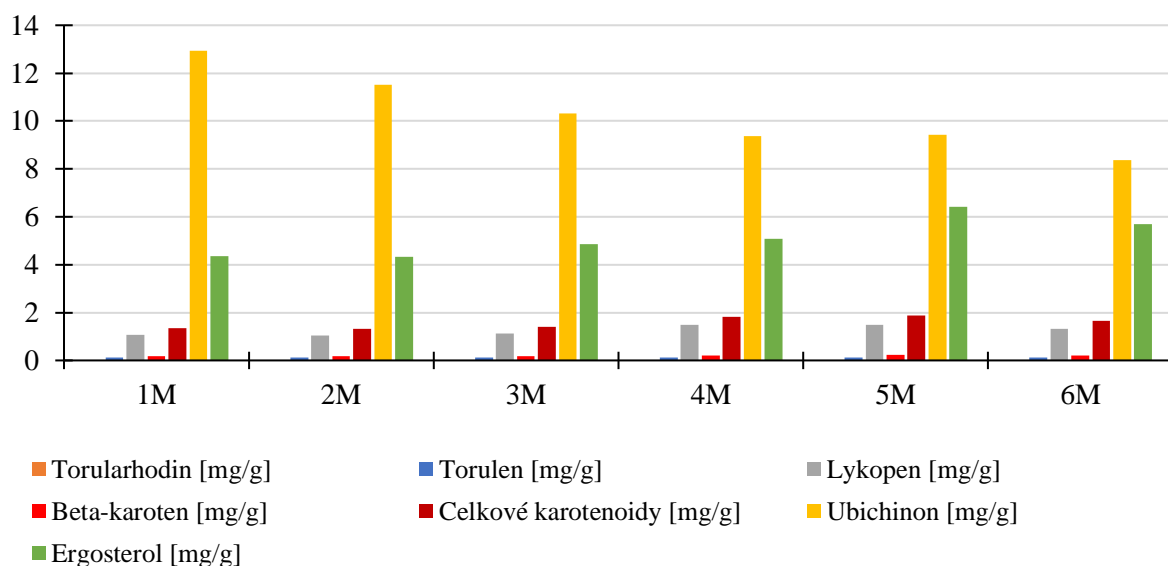
V průběhu optimalizací byla rovněž prověřována možnost orientačního stanovení sacharidů v kvasinkové biomase za pomoci refraktometru, kterým se běžně měří kvalita medu. Ukázalo se však, že pro měření našich vzorků toto není ideální volba, neboť β -glukan není rozpustný a stanovení bylo velice zavádějící. Proto byla tato volba pro orientační stanovení zamítnuta.

5.11 Vývoj metody extrakce pro multiparametrickou analýzu kvasinkových metabolitů

Tato optimalizace měla za cíl zefektivnit stanovení jednotlivých důležitých metabolitů na sebe navazujícím způsobem. Nejdříve byla provedena extrakce karotenoidů, v návaznosti na ni pokračovala extrakce lipidů a extrakce glukánů.

V grafu 24 je znázorněné zastoupení karotenoidů ve vzorcích M. Jedná se o vzorky, které byly při optimalizaci stanoveny. Vzorky 1M, 2M a 3M byly pokusem 1. Při jejich extrakci, byl k důkladnějšímu oddělení plazmatické membrány od buněčné stěny využit hydroxid sodný. Ovšem i přes veškerou snahu karotenoidy rozpustit ve směsi pro analýzu na HPLC, bylo možné karotenoidy rozpustit jen z malé části. Proto byl proveden pokus 2, kdy byla po přidavku hydroxidu provedena neutralizace. Neutralizace byla prováděna kvůli nutnosti poklesu pH a snížení tvorby micel v roztoku. Neutralizace částečně pomohla, ale bylo nutné k rozpuštění látek v roztoku využít ultrazvukové lázně. Vzorky z pokusu 2 jsou označeny jako 4M, 5M a 6M.

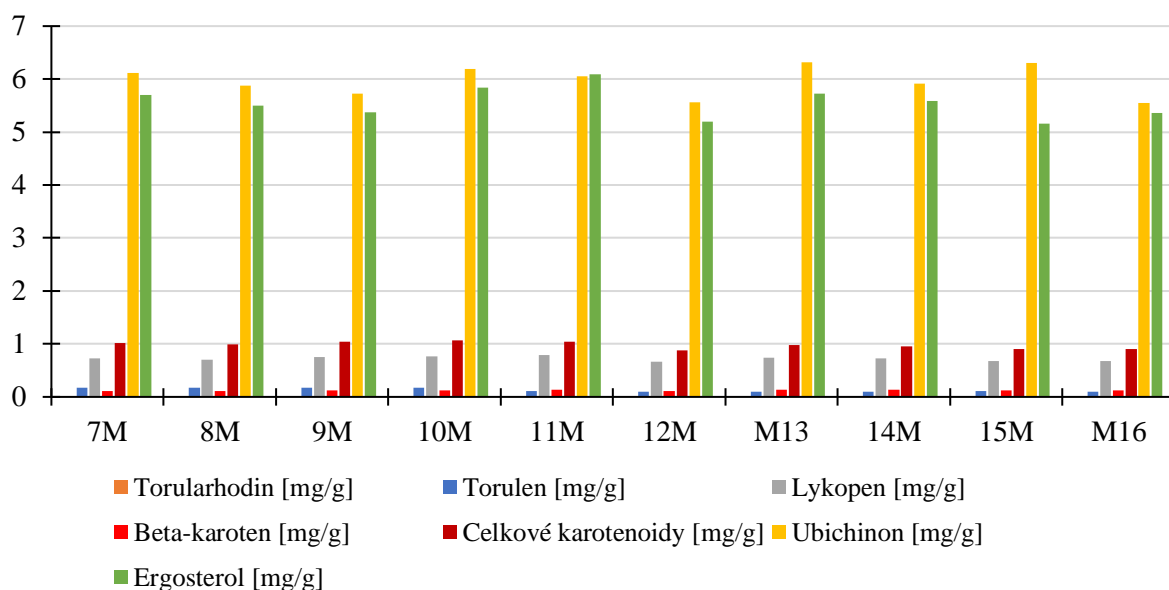
Nejvyšší zastoupení ubichinonu u vzorků pokusu 1 bylo zjištěno u vzorku 1M a to 12,92 mg/g biomasy. U vzorku 3M bylo zjištěno nejvyšší zastoupení ergosterolu 4,85 mg/g biomasy. Obsah celkových karotenoidů byl nejvyšší u vzorku 3M, jeho hodnota je 1,41 mg/g biomasy. U pokusu 2 po neutralizaci klesnul obsah ubichinonu na 9,36 mg/g biomasy. Naopak obsah ergosterolu a celkových karotenoidů po neutralizaci stoupl. Nejvyšší obsah ergosterolu u pokusu 2 byl naměřen u vzorku 5M a to 6,43 % a nejvyšší obsah celkových karotenoidů byl u vzorku 5M 6,43 mg/g biomasy.



Graf 24: Obsah karotenoidů ve vzorcích kvasinkové biomasy.

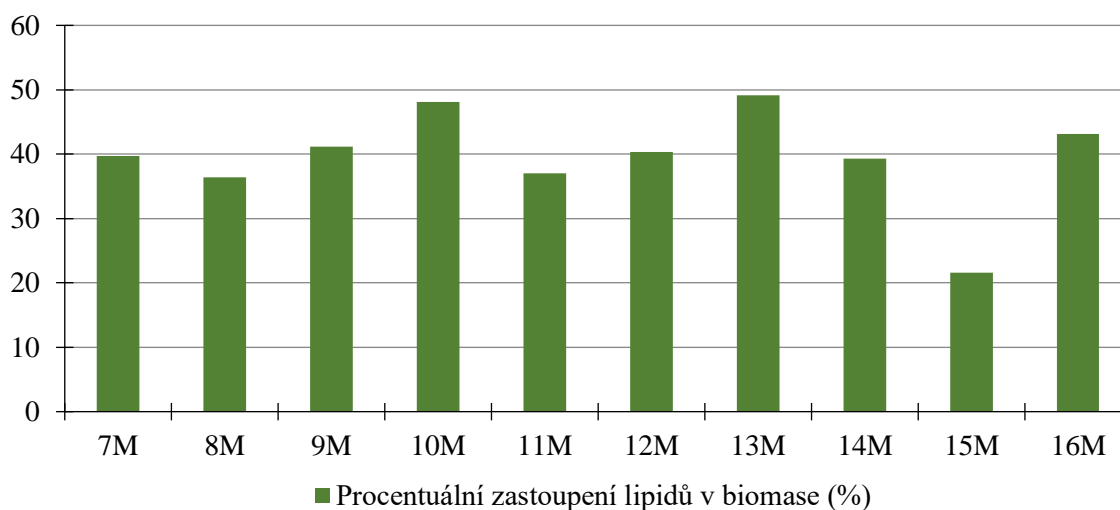
V návaznosti na pokus 1 a pokus 2, byl proveden pokus 3. Při tomto pokusu bylo naváženo větší množství biomasy, v průběhu optimalizace stanovení byly vzorky rozděleny pro stanovení na obsah karotenoidů za pomoci HPLC/PDA, na stanovení lipidů za pomoci GC/FID, a na stanovení glukozů za pomoci optimalizovaného enzymatického kitu. Optimalizované stanovení začalo za pomoci methanolu a zvážených skleněných kuliček, tato směs rozrušila buněčnou stěnu kvasinek. Následně byl využit chloroform pro extrakci karotenoidů a hydroxid pro lepší oddělení plazmatické membrány a buněčné stěny. Chloroformová fáze se spolu s vyextrahovanými karotenoidy odpařila a karotenoidy se rozpustily ve směsi rozpouštědel. První polovina objemu se použila na stanovení karotenoidů (viz graf 25) a druhá polovina se použila ke stanovení lipidů (viz graf 26 a graf 27). Po extrakci karotenoidů zbyla vodná fáze spolu s odbarvenými peletami buněčných stěn. Pelety se promyly a nechaly se lyofilizovat. Po lyofilizaci byl vzorek zvážen a bylo provedeno optimalizované stanovení glukozů (viz graf 28).

V grafu 25 je uvedeno zastoupení karotenoidů ve vzorcích pokusu 3. Z grafu je patrné, že zastoupení jednotlivých karotenoidů je při optimalizovaném postupu téměř totožné. Ovšem v porovnání s grafem 24 zde nalezneme malé rozdíly nejspíše byl zde problém s vyšší navázkou, která byla trojnásobná, ale tímto se budou zabývat další práce. V této diplomové práci se již toto hledisko zohlednit nestihlo.

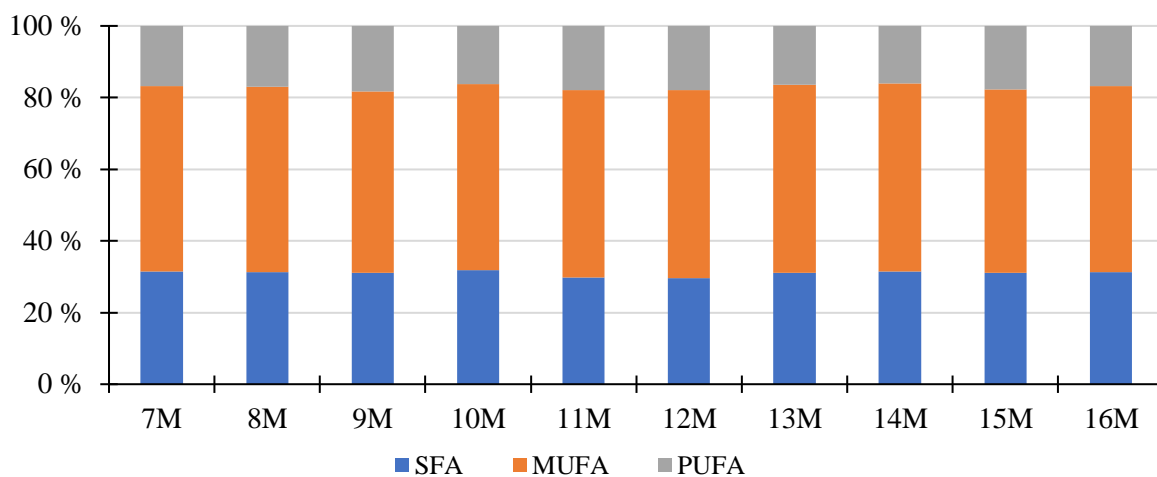


Graf 25: Obsah karotenoidů ve vzorcích kvasinkové biomasy M-optimalizace.

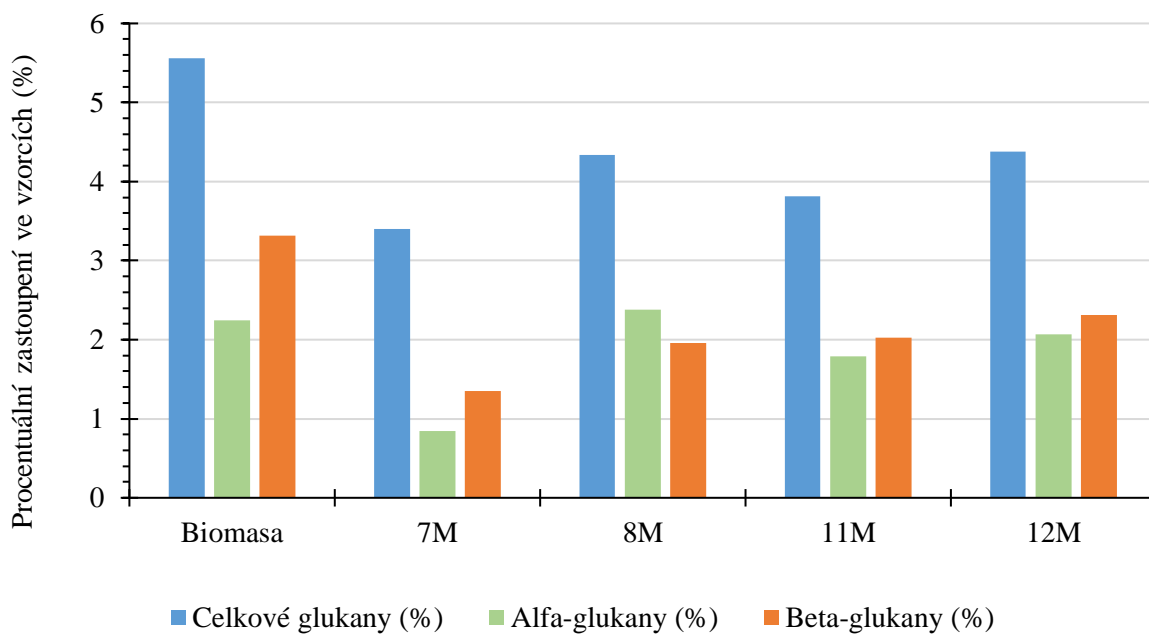
V grafu 26 je uvedeno procentuální zastoupení lipidů v biomase. Stanovení se provádělo v 8 stejných vzorcích s přibližně stejnou navázkou. Nejvyšší procentuální zastoupení lipidů ve vzorku bylo zjištěno u vzorku 13 M a to 49,17 % a v grafu 27 je zobrazený profil mastných kyselin k jednotlivým vzorkům pokusu 3, který byl u všech vzorků stejný. V grafu 28 nalezneme stanovení glukanů v použitých peletách kvasinek. Pro toto stanovení byly vybrány lyofilizované vzorky 7M, 8M, 11M a 12M. Největší problém byl oddělit skleněné kuličky od lyofilizované biomasy a navázat, tak pouze čistý vzorek pelet. I z tohoto důvodu byl zjištěn, ve srovnání s kontrolní biomasou, výrazně nižší obsah celkových glukanů, α -glukanů i β -glukanů a budou nutné další budoucí optimalizace tohoto procesu. Nejvyšší procentuální obsah celkových glukanů byl zjištěn u vzorku 8M 4,33 %, ale tento procentuální obsah je nízký v porovnání s kontrolní biomasou, ve které byl zjištěn procentuální obsah celkových glukanů 5,56 %. U tohoto vzorku byl také zjištěn nejvyšší procentuální obsah α -glukanů 2,38 %, tento procentuální obsah α -glukanů je v porovnání s kontrolní biomasou (2,25 %) o malinko vyšší. U vzorku 8M bylo zjištěno procentuální obsah β -glukanů 1,95 %, množství β -glukanů je zde nižší než v kontrolní biomasě (3,31 %).



Graf 26: Obsah lipidů M-optimalizace.



Graf 27: Profil mastných kyselin M-optimalizace.



Graf 28: Množství glukánů v použitéch kvasinkových peletách z optimalizovaného M-postupu stanovení karotenoidů.

6 ZÁVĚR

V diplomové práci na téma Optimalizace metod izolace a analýzy β -glukanů produkovaných karotenogenními kvasinkami byla zaměřena na optimalizaci metod extrakce a stanovení polysacharidů β -glukanů. V první části experimentu byla provedena série kultivací vybrané kvasinky *Rhodotorula toruloides* v laboratorním 7L bioreaktoru. Po dosažení dostatečného množství biomasy a charakterizace této lyofilizované homogenní biomasy, pokračovala experimentální práce optimalizací metody stanovení β -glukanů pomocí komerčně dodávaného enzymatického kitu od firmy Megazyme. Originální návod na toto stanovení uvádí, že kit při dodržení originálního postupu, postačí na stanovení cca 100 vzorků. Cílem bylo zoptimalizovat časovou náročnost, počet stanovení a celkovou cenu stanovení jednoho vzorku. Po provedení optimalizačních experimentů a vývoje upravené metody postačí jedno balení kitu na stanovení cca 600 vzorků. Chybovost tohoto stanovení využívající optimalizovanou metodu se pohybovala do 4 % procent. Ve srovnání s původním postupem dodaným výrobcem je deklarovaná odchylka srovnatelná s odchylkou výrobce, který uvádí odchylku také v řádu jednotek procent. Díky optimalizaci enzymatického stanovení se snížila cena z 6372 Kč/100 vzorků na 1062 Kč/100 vzorků. A snížila cena na stanovení jednoho vzorku na 20 Kč. Další část experimentu se zabývala optimalizací separačního postupu i pro vzorky biomasy kultivované na různých substrátech. A to hlavně díky skutečnosti, že v souběžně probíhajících pracích zabývajících valorizací odpadních substrátů karotenogenními kvasinkami, jako jsou kuřecí tuk, rostlinné odpadní oleje, peří nebo kávová sedlina. Separační postup bylo nutné optimalizovat, neboť např. přítomnost oleje zabraňovala sedimentaci za pomoci centrifugy. Nakonec bylo zvoleno oddělení supernatantu od sedimentu za pomoci stříkačkových membránových filtrů. Další výhodou optimalizovaného postupu bylo snížení časové náročnosti stanovení ze zhruba 12 hodin na 8 hodin při využití optimalizované metody a stanovení 23 vzorků, na které byla metoda optimalizována.

Experimentální část diplomové práce byla zaměřena také na optimalizaci izolačních postupů β -glukanů. Pro optimalizaci byly vybrány 4 izolační postupy, u kterých izolace probíhala v triplikátech. Bylo zjištěno, že i přes skutečnost, že izolace probíhaly v triplikátech ve stejných podmínkách a se stejnou homogenizovanou biomasou. Byly jednotlivé izolanty jiné. U postupu A byl rozdíl v izolantech vidět na první pohled, neboť již při autolýze se vzorek 2A plně odbarvil bez zjevných příčin, a ostatní vzorky zůstaly barevné. Tato změna zbarvení je vidět již u vzorků po autolýze (Obrázek 20) nebo u lyofilizovaných izolantů (Obrázek 23). Další odlišností u jednotlivých vzorků bylo množství vyizolovaných β -glukanů, nejvyšší množství vyizolovaných glukanů 8,19 % bylo zjištěno u odbarveného vzorku 2A po organické extrakci. Vzorky se dále lišily obsahem sacharidů, kdy nejvyšší obsah sacharidů byl zjištěn u vzorku 3A po proteolýze trypsinem 87,31 %, druhý nejvyšší obsah sacharidů měl vzorek 3A po organické extrakci 86,22 %. Zatímco u vzorku 2A po organické extrakci byl zjištěn obsah sacharidů pouze 24,77 %. Z hlediska profilu mastných kyselin se jednotlivé vzorky nelišily. U postupu izolace B se vzhledově jednotlivé triplikáty nelišily, ale byl zde rozdíl u obsahu vyizolovaného β -glukanu a u obsahu sacharidů ve vzorku. Nejvyšší obsah β -glukanů 9,60 % byl zjištěn u vzorku 2B po organické extrakci, následně po působení trypsinu zde obsah β -glukanů klesnul na hodnotu 5,73 %. Ovšem obsah sacharidů zde byl pouze 17,62 % a po proteolýze stoupl na 64,62 %. Můžeme předpokládat, že při působení trypsinu docházelo i ke změnám struktury

β -glukanů. Nejvyšší obsah sacharidů 81,33 % měl vzorek 3B po organické extrakci, obsah β -glukanů zde byl 7,50 %. Postup C, nebyl dostatečně účinný a celkově ze všech metod byly výsledky nejhorší. Zajímavým se jevil postup D, který do budoucna může posloužit pro další optimalizace izolací β -glukanů, neboť zde bylo zajímavé sledovat izolaci nerozpustného a rozpustného glukanu. Nejvyšší obsah β -glukanů byl zjištěn u vzorku 2D nerozpustného glukanu 8,53 %. U izolace rozpustného glukanů se podařilo vyizolovat velkou část rozpustného α -glukanu u vzorku 1D 8,33 %, zatímco β -glukanu tu zbylo jen 3,89 %. Toho bude možné využít při budoucí optimalizaci metody izolace.

Posledním bodem experimentální části práce byl vývoj metody extrakce pro multiparametrickou analýzu kvasinkových metabolitů. Tato optimalizace měla za cíl zefektivnit stanovení jednotlivých důležitých metabolitů, jako jsou lipidy, karotenoidy a β -glukany. Díky tomu je biomasu možné využít efektivněji a spotřebovat pro charakterizaci kvasinkové biomasy menší množství. Pilotní výsledky optimalizovaného postupu vykazovaly slibné výsledky. Nicméně je proces této optimalizace teprve na začátku a v rámci diplomové práce nebylo možné z časových důvodů provést další optimalizační kroky. Bude nutné se věnovat vývoji metody v budoucích experimentech.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] WALKER, G.M. Yeasts. In: Encyclopedia of Microbiology [online]. Elsevier, 2009, 2009, s. 478-491 [cit. 2023-04-21]. ISBN 9780123739445. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012373944-5.00335-7
- [2] COOPER, Chester R. Yeasts Pathogenic to Humans. In: The Yeasts [online]. Elsevier, 2011, 2011, s. 9-19 [cit. 2023-04-21]. ISBN 9780444521491. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-52149-1.00002-1
- [3] JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVIÁ. Úvod do biologie kvasinek. Univerzita Karlova v Praze: Nakladatelství Karolinum Praha 1, Ovocný trh 3, 1999. ISBN 80-7184-990-1.
- [4] SZOTKOWSKI, Martin. Řízená produkce lipidů a dalších lipidických látek pomocí vybraných druhů kvasinek a mikrořas. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/134986>. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.
- [5] 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.
- [6] WESSELS J.G.H. Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. New Phytology. 1993, 123, stránky 397-413.
- [7] GOW N.A., Gadd G.M. The Growing Fungus. London: Chapman & Hall, 1995. str. 496. ISBN: 0 412 46600 7.
- [8] KAVANAGH, Kevin. Fungi [online]. WILEY , 2005 [cit. 2023-04-21]. ISBN 0-470-86702-7. Dostupné z: <https://www.academia.edu/30129000/Fungi>
- [9] BYRTUSOVÁ, Dana. Studium produkce beta-glukanů a dalších polysacharidů pomocí kvasinek a mikrořas. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/129244>. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.
- [10] Byrtusová, D.; Sztokowski, M.; Kurowska, K.; Shapaval, V.; Márová, I. Rhodotorula kratochvilovae CCY 20-2-26—The Source of Multivariate Metabolites Microorganisms 2021, 9, 1280. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061280>
- [11] XU, Jingyang, Wei DU, Xuebing ZHAO a Dehua LIU. Exploration of sodium lignosulphonate's effects on lipid production by Rhodosporidium toruloides. Process Biochemistry [online]. 2015, 50(3), 424-431 [cit. 2023-04-21]. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2015.01.006
- [12] WEN, Zhiqiang, Sufang ZHANG, Chuks Kenneth ODOH, Mingjie JIN a Zongbao K ZHAO. Rhodosporidium toruloides - A potential red yeast chassis for lipids and beyond. FEMS Yeast Research [online]. 2020, 20(5) [cit. 2023-04-21]. ISSN 1567-1356. Dostupné z: doi:10.1093/femsyr/foaa038
- [13] DIAS, Carla, Beatriz P. NOBRE, José A.L. SANTOS, Teresa LOPES DA SILVA a Alberto REIS. Direct lipid and carotenoid extraction from Rhodosporidium toruloides broth culture after high pressure homogenization cell disruption: Strategies, methodologies, and yields. Biochemical Engineering Journal [online]. 2022, 189 [cit. 2023-04-21]. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2022.108712
- [14] KAŠTÁNEK, František. Bioinženýrství. Praha: Academia, 2001. ISBN 80-200-0768-PÁČA, J. Bioreactors. I. Classification of reactors. Kvasny Prumysl. 1987, 33(1), 20-21. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp1987006
- [15] VODRÁŽKA, Zdeněk. Biotechnologie. 2., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1991. ISBN 80-7080-121-2.
- [16] LIU, Yana, Qin WU, Xiangyun WU, et al. Structure, preparation, modification, and bioactivities of β -glucan and mannan from yeast cell wall: A review. International

- Journal of Biological Macromolecules [online]. 2021, 173, 445-456 [cit. 2023-04-21]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.01.125
- [17] FU, Wanchen, Guoqun ZHAO a Jinlong LIU. Effect of preparation methods on physiochemical and functional properties of yeast β -glucan. LWT [online]. 2022, 160 [cit. 2023-04-21]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2022.113284
- [18] CHEN, Chunhua, Xiaojun HUANG, Hui WANG, Fang GENG a Shaoping NIE. Effect of β -glucan on metabolic diseases: a review from the gut microbiota perspective. Current Opinion in Food Science [online]. 2022, 47 [cit. 2023-04-21]. ISSN 22147993. Dostupné z: doi:10.1016/j.cofs.2022.100907
- [19] PÉREZ, Pilar, Juan C.G. CORTÉS, Jose CANSADO a Juan C. RIBAS. Fission yeast cell wall biosynthesis and cell integrity signalling. The Cell Surface [online]. 2018, 4, 1-9 [cit. 2023-04-21]. ISSN 24682330. Dostupné z: doi:10.1016/j.tcs.2018.10.001
- [20] VETTER, János. The Mushroom Glucans: Molecules of High Biological and Medicinal Importance. Foods [online]. 2023, 12(5) [cit. 2023-04-21]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods12051009
- [21] VALÍČEK, P. Houby a jejich léčivé účinky. Benešov: Start, 2011. ISBN 978-80- 86231-54-9.
- [22] MCMURRY, John. Organická chemie. Přeložil Jan BUDKA, přeložil Radek CIBULKA, přeložil Dalimil DVOŘÁK, přeložil Jaroslav KVÍČALA, přeložil Pavel LHOTÁK, přeložil Jiří SVOBODA. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2015. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-4769-1.
- [23] LANDRIER, Jean-François, Julie MARCOTORCHINO a Franck TOURNIAIRE. Lipophilic Micronutrients and Adipose Tissue Biology. Nutrients [online]. 2012, 4(11), 1622-1649 [cit. 2023-04-21]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu4111622
- [24] MURRAY, Robert K. Harperova Biochemie. 23. vyd., (4. české vyd.), v H. Jinočany: H, 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- [25] DE CARVALHO, Carla a Maria CARAMUJO. The Various Roles of Fatty Acids. Molecules [online]. 2018, 23(10) [cit. 2023-04-21]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23102583
- [26] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 5280489, Beta-Carotene; [cited 2023 Apr. 28]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Beta-Carotene>
- [27] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 5281224, Astaxanthin; [cited 2023 Apr. 28]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Astaxanthin>
- [28] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 5281253, Torulene; [cited 2023 Apr. 28]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Torulene>
- [29] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 5281248, Torularhodin; [cited 2023 Apr. 28]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Torularhodin>
- [30] ZHANG, Xun, Ali Mohammad TOHARI, Fabio MARCHEGGIANI, Xinzhi ZHOU, James REILLY, Luca TIANO a Xinhua SHU. Therapeutic Potential of Co-enzyme Q10 in Retinal Diseases. Current Medicinal Chemistry [online]. 2017, 24(39) [cit. 2023-04-21]. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/0929867324666170801100516

- [31] MABUCHI, Hiroshi, Toshinori HIGASHIKATA, Masaaki KAWASHIRI, et al. Reduction of Serum Ubiquinol-10 and Ubiquinone-10 Levels by Atorvastatin in Hypercholesterolemic Patients. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* [online]. 2005, 12(2), 111-119 [cit. 2023-04-21]. ISSN 1880-3873. Dostupné z: doi:10.5551/jat.12.111
- [32] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 5281915, Coenzyme Q10; [cited 2023 Apr. 21]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Coenzyme-Q10>
- [33] DOHNAL, Vlastimil, Alena JEŽKOVÁ a Jiří SKLÁDANKA. ERGOSTEROL: KLÍČOVÝ STEROID HUB. *Popularizace vědy*. 2008, 2008(2), 449-454. ISSN 1212-4117.
- [34] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 444679, Ergosterol; [cited 2023 Apr. 21]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ergosterol>
- [35] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody. Třetí, upravené vydání*. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.
- [36] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Analytická chemie*. Přeložil Karel NESMĚRÁK, přeložil Václav ČERVENÝ, přeložil Tomáš KRÍŽEK, přeložil Eliška NOVÁKOVÁ. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0.
- [37] MCCLEARY, Barry V a Anna DRAGA. Measurement of β -Glucan in Mushrooms and Mycelial Products. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* [online]. 2016, 99(2), 364-373 [cit. 2023-04-21]. ISSN 1060-3271. Dostupné z: doi:10.5740/jaoacint.15-0289
- [38] MUSHROOM and YEAST BETA-GLUCAN ASSAY PROCEDURE. www.megazyme.com [online]. 2021 [cit. 2023-04-21]. Dostupné z: https://www.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-YBGL_DATA.pdf
- [39] KAŠ, J., M. KODÍČEK a O. VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: VŠCHT Praha, 2006. ISBN 80-7080-586-2.
- [40] LIU, X, Q WANG, S CUI a H LIU. A new isolation method of β -d-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Hydrocolloids* [online]. 2008, 22(2), 239-247 [cit. 2023-04-21]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2006.11.008
- [41] ZOHRI, Abdel-Naser, Hani MOUBASHER, Hanfy ABDEL-HAY a Mohamed ORBAN. Biotechnological β -glucan Production from Returned Baker's Yeast and Yeast Remaining after Ethanol Fermentation. *Egyptian Sugar Journal*. 2019, 13, 29-43. ISSN 2636-283X. Dostupné z: doi:10.21608/esugj.2019.219349
- [42] Kurz Eura, Euro EUR, aktuální kurzy koruny a měn. *Kurzycz* [online]. Praha: Kurzycz, spol. s r.o., AliaWeb, spol. s r.o. V, 2023 [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: <https://www.kurzycz.cz/kurzycz-men/nejlepsi-kurzycz/EUR-euro/>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACP – acyl-carrier protein
ATP – adenosintrifosfát
DMAPP – dimethylallylporofosfát
ELISA – Enzyme linked immuno sorbent assay
FID – Plamenový ionizační detektor
GC – plynová chromatografie
GOPOD – glukózaoxidáza/peroxidáza
HMG-CoA – β -hydroxymethylglutaryl koenzym A
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IPP – isopentenylpyrofosfát
MUFA – mononenasyčené mastné kyseliny
NADPH – koenzym nikotinamidadenindinukleotid
NG – nerozpustný glukan
OE – organická extrakce
p-AKT – proteinkináza B fosfát
p-AMPK – kináza aktivovaná adenosinmonofosfátem
PAMPs – pathogen-associated molecular patterns
PDA – detektor diodového pole
PUFA – polynenasycené mastné kyseliny
SFA – nasycené mastné kyseliny
SG – surový glukan
RG – rozpustný glukan
TAG – Triacylglycerol
UV – ultrafialové