



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 BIOTECHNOLOGICKÉHO ZPRACOVÁNÍ
LIPIDICKÝCH POTRAVINÁŘSKÝCH ODPADŮ
KAROTENOGENNÍMI KVASINKAMI V LABORATORNÍM A
POLOPROVOZNÍM MĚŘÍTKU.**

OPTIMIZATION OF THE BIOTECHNOLOGICAL PROCESSING OF LIPIDIC FOOD WASTES BY
CAROTENOGENIC YEASTS ON A LABORATORY AND PILOT SCALE.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Žaneta Plhalová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1794/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Žaneta Plhalová**
Studijní program: Chemie přírodních látek
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Optimalizace biotechnologického zpracování lipidických potravinářských odpadů karotenogenními kvasinkami v laboratorním a poloprovozním měřítku.

Zadání diplomové práce:

1. Přehledná literární rešerše zaměřená na karotenogenní kvasinky a jejich využití při biotransformaci potravinářských odpadů
2. Screeningové kultivace vybraných kmenů karotenogenních kvasinek se zaměřením na nalezení vhodných produkčních kmenů
3. Optimalizace kultivačních podmínek v poloprovozních laboratorních bioreaktorech
4. Analýza vyprodukované mikrobiální biomasy a vyhodnocení výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 15.5.2023:

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

Bc. Žaneta Plhalová
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

Tato diplomová práce je zaměřena na sledování produkčních vlastností karotenogenních kvasinek při kultivacích za použití odpadních substrátů jako zdrojů organického uhlíku a energie. Mezi testované odpadní substráty patřily odpadní fritovací olej, kuřecí kafilerní odpadní tuk, kávový olej a kávový hydrolyzát získávaný z kávové sedliny a odpadní glycerol. Zkoumanými producenty byly kvasinky *Cystofilobasidium infirmominiatum* (CCY 17-18-4), *Cystofilobasidium macerans* (CCY 10-1-2), *Rhodotorula kratochvilovae* (CCY 20-2-26), *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 19-4-6), *Rhodotorula toruloides* (CCY 62-2-4), *Sporidiobolus pararoseus* (CCY 19-9-6), *Sporidiobolus metaroseus* (CCY 19-6-20) a *Sporidiobolus salmonicolor* (CCY 19-6-4). Mezi sledovanými metabolity byly karotenoidy, ergosterol, ubiquinon, tokoferol, lipidy, složení mastných kyselin a betaglukany. Dále byla také sledována lipázová aktivita.

Práce má dvě základní části: teoretickou a experimentální. V teoretické části jsou popsány jednotlivé rody, sledované metabolity a jejich funkce a použité odpadní substráty. V experimentální části byly popsány použité způsoby přípravy a úpravy odpadních substrátů, příprava médií, kultivace kvasinek, získání biomasy a její zpracování, příprava vzorků na jednotlivé analýzy a samotná analýza metabolitů.

Ze screeningových kultivací bylo zjištěno, že nejvhodnějšími kmeny pro kultivaci s využitím odpadních substrátů jsou *Sporidiobolus pararoseus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula toruloides* a *Cystofilobasidium macerans*. Nejvyšší produkce biomasy a výrazné obohacení biomasy o sledované metabolity dosahoval kmen *Sporidiobolus pararoseus*. Na základě screeningových kultivací bylo provedeno několik velkoobjemových kultivací v laboratorním bioreaktoru, kde nejlepšího nárůstu dosáhl kmen *Sporidiobolus pararoseus* (37,5) g/l.

Klíčová slova

Karotenogenní kvasinky, karotenoidy, tokoferol, ubiquinon, ergosterol, lipidy, betaglukany, kávový olej, kávový hydrolyzát, fritovací olej, kuřecí odpadní tuk, odpadní glycerol

Abstract

This thesis is aimed at monitoring the production characteristics of carotenogenic yeasts when cultured using waste substrates as sources of organic carbon and energy. The waste substrates tested included waste fryer oil, chicken rendering waste fat, coffee oil and coffee hydrolysate derived from coffee grounds and waste glycerol. The producers investigated were yeasts *Cystophilobasidium infirmominiatum* (CCY 17-18-4), *Cystophilobasidium macerans* (CCY 10-1-2), and *Rhodotorula kratochvilovae* (CCY 20-2-26), *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 19-4-6), *Rhodotorula toruloides* (CCY 62-2-4), *Sporidiobolus pararoseus* (CCY 19-9-6), *Sporidiobolus metaroseus* (CCY 19-6-20) and *Sporidiobolus salmonicolor* (CCY 19-6-4). Among the metabolites studied were carotenoids, ergosterol, ubiquinone, tocopherol, lipids, fatty acid composition and beta-glucans. Lipase activity was also monitored.

The thesis has two main parts: theoretical and experimental. The theoretical part describes the different genera, the metabolites studied and their functions, and the waste substrates used. In the experimental part, the methods used for the preparation and treatment of waste substrates, media preparation, yeast cultivation, biomass acquisition and processing, sample preparation for individual analyses, and the metabolite analysis itself were described.

From the screening cultures, it was found that the most suitable strains for cultivation using waste media were *Sporidiobolus pararoseus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula toruloides* and *Cystophilobasidium macerans*. The strain *Sporidiobolus pararoseus* achieved the highest biomass production and significant enrichment of biomass with the metabolites studied. Based on screening cultures, several large-scale cultures were performed in a laboratory bioreactor, where the best increase was achieved by the strain *Sporidiobolus pararoseus* (37.5) g/l.

Keywords

Carotenogenic yeast, carotenoids, tocopherol, ubiquinone, ergosterol, lipids, beta-glucans, coffee oil, coffee hydrolysate, frying oil, chicken waste fat, waste glycerol

PLHALOVÁ, Žaneta. Optimalizace biotechnologického zpracování lipidických potravinářských odpadů karotenogenními kvasinkami v laboratorním a poloprovozním měřítku. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149068>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Martin Szotkowski.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, a že 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

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu své diplomové práce Ing. Martinu Szotkowskému, Ph.D. za odborné vedení práce, trpělivost, ochotu při řešení problémů a cenné rady. Taktéž děkuji svému odbornému konzultantovi za pomoc s realizací experimentální části a cenné rady při vypracovávání. V neposlední řadě patří poděkování mé rodině, příteli a přátelům za podporu a trpělivost po celou dobu studia.

Obsah

1 ÚVOD	11
2 Teoretická část.....	12
2.1 Kvasinky.....	12
2.1.1. Cytologie kvasinek	12
2.1.2. Karotenogenní kvasinky	13
2.1.2.1 Rod Cystofilobasidium.....	13
2.1.2.2 Rod Rhodotorula.....	13
2.1.2.3 Rod Sporidiobolus	14
2.2 Sledované metabolity	15
2.2.1 Lipidy.....	15
2.2.1.1 Chemická struktura a vlastnosti.....	15
2.2.1.2 Mastné kyseliny	15
2.2.1.3 Mikrobiální lipidy	16
2.2.1.4 Biosyntéza a degradace lipidů	17
2.2.1.4.1 Syntéza mastných kyselin.....	17
2.2.1.4.1 Syntéza triacylglycerolů	18
2.2.1.4.3 Degradace mastných kyselin	19
2.2.2 Karotenoidy	19
2.2.2.1 Chemická struktura, vlastnosti a funkce karotenoidů.....	20
2.2.2.2 Komerční použití karotenoidů	21
2.2.2.3 Produkce karotenoidů	21
2.2.2.4 Biosyntéza karotenoidů	22
2.2.3 Ergosterol.....	24
2.2.3.1 Biosyntéza sterolů.....	25
2.2.4 Ubichinony	25
2.2.4.1 Biosyntéza ubichinonu	25
2.2.5 Tokoferol (vitamín E)	26
2.2.6 Betaglukany	26
2.2.6.1 Průmyslové využití betaglukanů	27
2.3 Odpadní substráty	27
2.3.1 Kávová sedlina	27
2.3.2 Fritovací olej.....	28

2.3.3 Odpadní kuřecí tuk	28
2.3.4 Odpadní glycerol	28
3 CÍL PRÁCE.....	29
4 Experimentální část	30
4.1 Použité chemikálie.....	30
4.1.1 Chemikálie použité k přípravě odpadních substrátů.....	30
4.1.2 Chemikálie použité ke kultivaci karotenogenních kvasinek	30
4.1.3 Chemikálie použité pro přípravu vzorků na GC a HPLC.....	30
4.1.4 Chemikálie použité pro stanovení lipázové aktivity.....	31
4.1.5 Chemikálie pro stanovení obsahu betaglukanů	31
4.2 Použité pomůcky a přístroje	31
4.2.1 Přístrojová technika a pomůcky pro přípravu odpadních substrátů	31
4.2.2 Přístrojová technika a pomůcky pro kultivaci a uchování biomasy	31
4.2.3 Přístrojová technika a pomůcky pro izolaci a analýzu karotenoidů a lipidů	31
4.2.4 Přístrojová technika a pomůcky pro stanovení lipázové aktivity a obsahu betaglukanů	32
4.3 Použité kmeny kvasinek	32
4.4 Zpracování odpadních substrátů.....	32
4.4.1 Fritovací olej.....	32
4.4.2 Kuřecí tuk	32
4.4.3 Odpadní glycerol	33
4.4.4 Kávový olej.....	33
4.4.5 Kávový hydrolyzát	33
4.4.5.1 Stanovení sacharidů dle Duboise.....	34
4.5 Kultivace.....	35
4.5.1 Screeningové kultivace.....	35
4.5.1.1 Inokulum I a II.....	35
4.5.1.2 Produkční média	36
4.5.1.3 Vnější podmínky.....	37
4.4.2 Kultivace ve fermentoru	37
4.4.2.1 Inokulum I a II.....	37
4.4.2.2 Produkční médium.....	37
4.4.2.3 Kultivační podmínky	37

4.4.3 Gravimetrické stanovení biomasy	38
4.4.3.1 Uskladnění biomasy	38
4.6 Extrakce, stanovení a analýza látek	39
4.6.1 Stanovení obsahu lipidů a profil mastných kyselin	39
4.6.1.1 Příprava vzorků na GC	39
4.6.1.2 Analýza na GC	39
4.6.2 Stanovení barviv a antioxidantů	40
4.6.2.2 Příprava vzorků na HPLC	40
4.6.2.3 Analýza na HPLC	40
4.6.3 Stanovení lipázové aktivity	41
4.6.4 Stanovení betaglukanů	42
4.6.4.1 Roztoky obsažené v kitu pro stanovení betaglukanů	42
4.6.4.2 Pomocné roztoky	42
4.6.4.3 Příprava reakčních roztoků	43
4.6.4.4 Stanovení celkových glukanů	43
4.6.4.5 Stanovení alfa-glukanů	43
5 Výsledky a diskuze	45
5.1 Analýza screeningových kultur karotenogenních kvasinek	45
5.1.1 Produkční vlastnosti kmene <i>Sporidiobolus pararoseus</i>	45
5.1.1.1 Produkce biomasy	45
5.1.1.2 Obsah lipidů v biomase	46
5.1.1.3 Karotenoidy a další lipofilní metabolity	46
5.1.1.4 Lipázová aktivita	48
5.1.1.5 Stanovení betaglukanů	48
5.1.1.6 Shrnutí	49
5.1.2 Produkční vlastnosti kmene <i>Sporidiobolus metaroseus</i>	50
5.1.2.1 Produkce biomasy	50
5.1.2.2 Obsah lipidů v biomase	51
5.1.2.3 Karotenoidy a další lipofilní metabolity	51
5.1.2.4 Lipázová aktivita	53
5.1.2.5 Stanovení betaglukanů	53
5.1.2.6 Shrnutí	54
5.1.3 Produkční vlastnosti kmene <i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	55

5.1.3.1	Produkce biomasy.....	55
5.1.3.2	Obsah lipidů.....	56
5.1.3.3	Karotenoidy a další lipofilní metabolity	56
5.1.3.4	Lipázová aktivita	58
5.1.3.5	Betaglukany	58
5.1.3.6	Shrnutí	59
5.1.4	Produkční vlastnosti kmene <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	60
5.1.4.1	Produkce biomasy.....	60
5.1.4.2	Obsah lipidů v biomase	61
5.1.4.3	Karotenoidy a další lipofilní metabolity	62
5.1.4.4	Lipázová aktivita	63
5.1.4.5	Betaglukany	64
5.1.4.6	Shrnutí	64
5.1.5.1	Produkce biomasy.....	65
4.1.5.2	Obsah lipidů v biomase	66
4.1.5.3	Karotenoidy a další lipofilní metabolity	66
4.1.5.4	Lipázová aktivita	68
4.1.5.5	Stanovení betaglukanů.....	68
4.1.5.6	Shrnutí	69
5.1.6	Produkční vlastnosti kmene <i>Rhodotorula toruloides</i>	70
5.1.6.1	Produkce biomasy.....	70
5.1.6.2	Obsah lipidů v biomase	71
4.1.6.3	Karotenoidy a další lipofilní metabolity	71
5.1.6.4	Lipázová aktivita	73
4.1.6.5	Stanovení betaglukanů.....	73
4.1.6.6	Shrnutí	74
4.1.7	Produkční vlastnosti kmene <i>Cystofilobasidium macerans</i>	75
4.1.7.1	Produkce biomasy.....	75
4.1.7.2	Obsah lipidů v biomase	76
4.1.7.3	Karotenoidy a další lipofilní metabolity	76
5.1.7.4	Lipázová aktivita	78
5.1.7.5	Stanovení betaglukanů.....	78
4.1.7.6	Shrnutí	79

4.1.8 Produkční vlastnosti kmene <i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	80
4.1.8.1 Produkce biomasy.....	80
4.1.8.2 Obsah lipidů v biomase	81
4.1.8.3 Karotenoidy a další lipofilní metabolity	81
4.1.8.4 Lipázová aktivita	83
4.1.8.5 Stanovení betaglukanů.....	83
4.1.8.6 Shrnutí	84
5.2 Analýzy fermentorových kultur	85
5.2.1 Fermentorová kultura kmene <i>Rhodotorula toruloides</i>	85
5.2.1.1 Produkce biomasy.....	86
5.2.1.2 Obsah lipidů.....	86
5.2.1.3 Karotenoidy a další lipofilní látky	87
5.2.1.4 Lipázová aktivita	89
5.2.1.5 Stanovení betaglukanů.....	89
5.2.1.6 Shrnutí	90
5.2.2 Fermentorová kultura kmene <i>Cystofilobasidium macerans</i>	91
5.2.2.1 Produkce biomasy.....	92
5.2.2.2 Obsah lipidů.....	92
5.2.2.3 Karotenoidy a lipofilní látky.....	94
5.2.2.4 Lipázová aktivita	96
5.2.2.5 Stanovení betaglukanů.....	96
5.2.2.6 Shrnutí	97
5.2.3 Fermentorová kultura kmene <i>Sporidiobolus pararoseus</i>	98
5.2.3.1 Produkce biomasy.....	99
5.2.3.2 Obsah lipidů.....	99
5.2.3.3 Karotenoidy a lipofilní látky.....	100
5.2.3.4 Lipázová aktivita	101
5.2.3.5 Obsah betaglukanů	102
5.2.3.6 Shrnutí	103
6 ZÁVĚR.....	104
7 Zdroje	109
8 Použité zkratky	115
9 PŘÍLOHY.....	116

1 ÚVOD

V posledních letech výrazně roste povědomí, zájem o zdravý životní styl a poptávka po potravinových doplncích, mezi nimiž jsou například i karotenoidy jako prekurzory pro vitamín A, polynenasycené mastné kyseliny, antioxidanty či prekurzory vitamínu D. Většina těchto látek je pro lidský organismus esenciální a je tedy nutné je přijímat v potravě. Přičemž v dnešní době u těchto látek převládá produkce pomocí chemické syntézy či extrakcí z rostlin. Syntetická výroba nabízí stabilní produkce, ale poskytuje ve většině případů méně bioaktivní formy požadovaných látek a celý koncept neodpovídá ekologickým postojům společnosti, které začínají výrazně rezonovat společností. Extrakce z přírodních zdrojů zajišťuje biologicky aktivní formy, ale problémem je nestabilita výtěžků, která je způsobena vnějšími faktory (teploty, srážky, škůdci) a zabírání velkého množství zemědělské půdy, která by mohla být využita lépe.

S rozšiřováním znalostí a rozvojem v oblastech biotechnologií, biochemie a genetických věd se rozvíjí možnost a snaha o uplatnění mikrobiálních produkcí. Kvasinky stejně jako většina eukaryotických buněk obsahují ubiquinon, dále ve své buněčné membráně obsahují ergosterol, který je prekurzorem vitamínu D. Karotenogenní kvasinky mají navíc vyvinutý enzymatický aparát umožňující produkci karotenoidů, betaglukanů a mikrobiálních lipidů, které obsahují velké množství polynenasycených mastných kyselin. Biomasa karotenogenních kvasinek je tedy zdrojem těchto esenciálních metabolitů a může sloužit jako komplexní doplněk stravy. Obohacená kvasinková biomasa je vhodná i jako aditivum v krmivářském průmyslu, pro doplnění esenciálních látek pro dobytek a drůbež za účelem zlepšení imunity a zlepšení senzorických vlastností masa a vajec. Extrakty přítomných lipofilních vitamínů, karotenoidů a ubiquinonu je také možné využít v kosmetickém průmyslu.

V posledních letech intenzivně roste zájem o cirkulární ekonomiku a valorizaci odpadů. Produkce obohacené biomasy karotenogenních kvasinek se provádí velkokapacitní kultivací a komerčně dostupné komplexní substráty jsou finančně nákladné. Z těchto důvodů je snaha o nalezení levnějších alternativ, přičemž mikroorganismy jsou často schopné využít i komplexní odpadní substráty z jiných výrobníků. Odpadní substráty z potravinářského průmyslu jsou velice komplexní a bohaté směsi a po úpravě jsou vhodným uhlíkatým substrátem pro biotechnologickou výrobu. Mezi vhodné odpadní substráty patří například kávový olej a kávový hydrolyzát získávané z kávové sedliny, odpadní fritovací olej či odpadní kuřecí tuk z kafilérií.

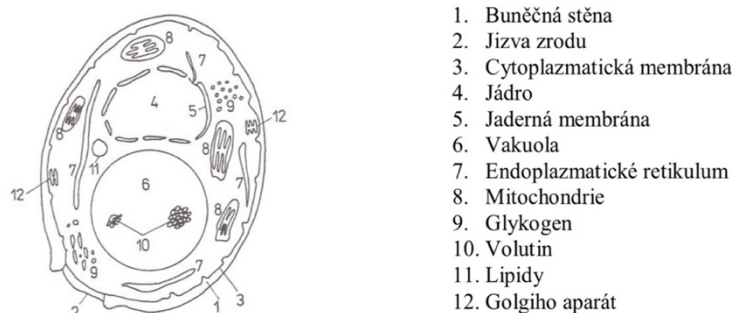
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou heterotrofní chemoorganotrofní jednobuněčné mikroorganismy, které se řadí do říše *Fungi*. Je známo přes 1500 druhů kvasinek, vyskytujících se po celém světě. Velikost jedné buňky se pohybuje v rozmezí 3-6 μm . Tvarově jsou kvasinky velice rozmanité. Nejčastěji mají buňky oválný, kulovitý, elipsoidní či tyčinkovitý tvar. Vliv na tvar i velikost buněk má prostředí i nutriční podmínky. Kvasinky se rozmnožují vegetativně či pohlavně. Vegetativní rozmnožování probíhá pučením či dělením, pohlavní probíhá pomocí spor. Buňky kvasinek se mohou vyskytovat jednotlivě, ale nejčastěji dochází ke shlukování do kolonií a tvoření pseudomycelia [1][2].

2.1.1. Cytologie kvasinek

Kvasinky jsou eukaryotní organismy. Buňka je chráněna silnou buněčnou stěnou, bez brv a bičíků. Buněčná stěna zajišťuje ochranu buňky před vnějšími vlivy a také zajišťuje komunikaci mezi buňkami v kolonii. Pod buněčnou stěnou se nachází cytoplazmatická membrána (Obrázek 1), která je tvořena fosfolipidovou dvojvrstvou, ve které jsou umístěny membránové proteiny pro transport živin, steroly, antioxidanty a signální molekuly. Cytoplazmatická membrána je semipermeabilní, je propustná pro malé molekuly a plyny. Větší molekuly prochází pomocí transportních kanálů. Buňka je vyplněna cytoplazmou, což je průhledná hmota, ve které jsou umístěny organely a enzymy. Nejvýznamnější organelou je jádro, jež je nositelem genetické informace a od zbytku molekuly je odděleno jadernou membránou s póry. Dále buňka obsahuje endoplazmatické retikulum (ER) tvořené soustavou membrán. Drsné retikulum je zodpovědné za syntézu a modifikaci proteinů. Hladké retikulum je zodpovědné za transformaci a modifikaci lipidů, sacharidů či karotenoidů. K vytvoření energie v buňce slouží mitochondrie, které jsou semiautonomní – mají svou vlastní genetickou informaci a samy se replikují. Golgiho aparát má měchýřkovitou strukturu a jeho funkcí je transport prekurzorů buněčné stěny z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu. Vakuola zabírá většinu buňky a funguje jako zásobárna prekurzorů, enzymů a dalších látek. Na počátku života buňky obsahuje buňka několik malých vakuol, které se postupně sjednocují a na konci je buňka vyplněna jednou velkou vakuolou. Pohyb organel v buňce je zajištěn pomocí cytoskeletu tvořeného proteinovými vlákny. V buňce se dále nacházejí enzymy, nukleosidy či ribozomy [1]-[4].



Obrázek 1: Schéma kvasinkové buňky [3]

2.1.2. Karotenogenní kvasinky

Karotenogenní kvasinky jsou řazeny do třídy *Basidiomycetes* a patří sem například rody *Cystofilobasidium*, *Sporidiobolus* či *Rhodotorula*. Karotenogenní kvasinky se vyznačují svou světle žlutou až červenou barvou, která je způsobena schopností produkce a akumulace karotenoidních barviv. Díky svému červenému zbarvení jsou také někdy nazývány „červené kvasinky“. Mezi nejvýznamnější karotenoidy produkované karotenogenními kvasinkami patří betakaroten, lykopen, torularhodin a torulen. Obsah jednotlivých karotenoidů v buňce závisí na typu kvasinky, živném médiu, podmínkách prostředí a intenzitě záření. Dalším významným znakem je vysoká produkce a akumulace lipidů s vysokým podílem mononenasycených a polynenasycených mastných kyselin, přičemž tyto látky mají význam ve farmakologickém, potravinářském i kosmetologickém průmyslu. Díky extracelulární lipázové aktivitě jsou schopny zpracovávat některé lipidické odpadní substráty [3]-[5].

2.1.2.1 Rod *Cystofilobasidium*

Kvasinky rodu *Cystofilobasidium* vytváří lososové, oranžové až skořicové hladké lesklé kolonie (Obrázek 2). Buňky mají protáhlý oválný tvar a některé kmeny jsou schopny tvořit pseudohyfy. Tyto kvasinky se mohou rozmnožovat vegetativně i pohlavně. Hlavním karotenoidním barvivem je torulen a jeho oxidované analogy. Některé kmeny jsou schopny zkvašovat cukry. Mezi zástupce tohoto kmene řadíme například *Cystofilobasidium macerans*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* či *Cystofilobasidium bisporidii* [2][4].

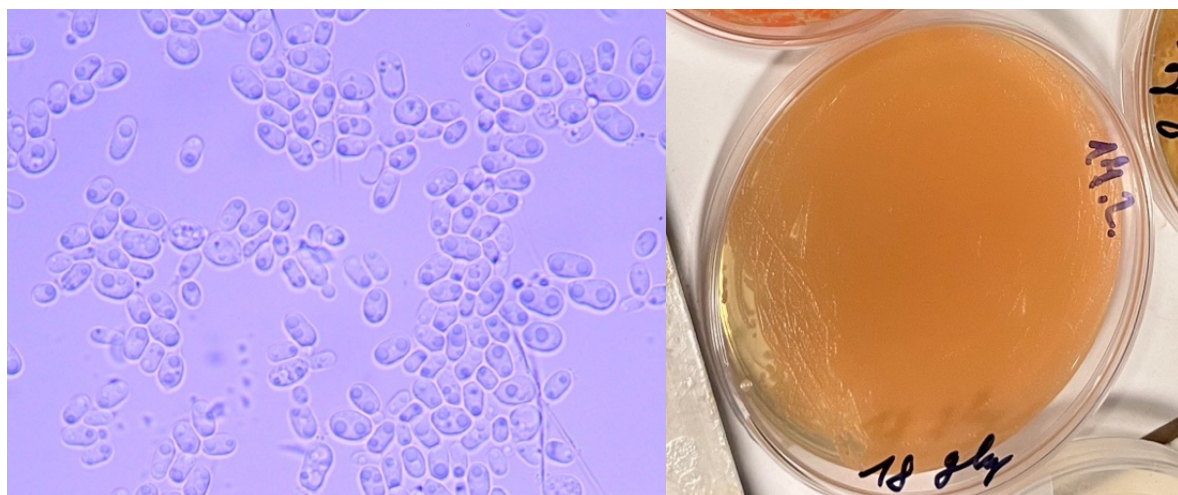


Obrázek 2: *Cystofilobasidium macerans* – snímek z mikroskopu a kultura na Petriho misce

2.1.2.2 Rod *Rhodotorula*

Kvasinky rodu *Rhodotorula* mají oválný až protáhlý tvar (Obrázek 3). Barva kolonií se pohybuje od žluté až po sytě červenou. Do tohoto kmene řadíme přes 160 kmenů. K nejznámějším zástupcům patří *Rhodotorula toruloides*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis* či *Rhodotorula kratochvilovae*. Tento rod se vyznačuje neschopností zkvašovat cukry a silně vyvinutým pentózovým cyklem.

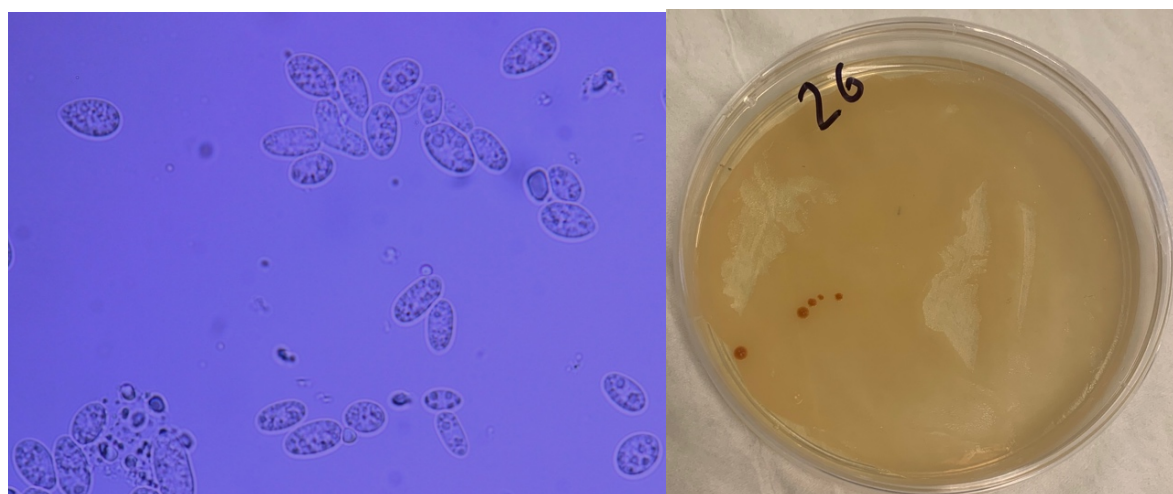
Je velice nenáročným rodem na živiny přítomné v médiu, hlavně na množství dusíku, díky tomuto faktu se vyskytují jak ve vzduchu, vodě, ale i půdě chudé na dusík. Rozmnožují se polárním či multilaterálním pučením. Produkovaná směs karotenoidů obsahuje hlavně torularhodin, torulen a betakaroten. Mají také vysokou schopnost produkce a akumulace lipidů s vysokým zastoupením polynenasycených mastných kyselin [1][3][4][6].



Obrázek 3: *Rhodotorula toruloides* – snímek z mikroskopu a kultura na Petriho misce

2.1.2.3 Rod *Sporidiobolus*

Rod *Sporidiobolus* je teleomorfní formou rodu *Sporobolomyces*. Do tohoto kmene patří například *Sporidiobolus pararoseus*, *Sporidiobolus metaroseus* či *Sporidiobolus salmonicolor*. Buňky mají oválný až válcovitý tvar (Obrázek 4). Kolonie mají žluté až sytě oranžové zbarvení a jsou ploché a hladké. Některé kmeny tvoří blastokonidie a některé jsou schopny vytvářet pravá mycelia. Zástupci rodu *Sporidiobolus* nejsou schopni zkvašovat cukry. Při produkci karotenoidů převažuje torularhodin, torulen a betakaroten [3][4][7].



Obrázek 4: *Sporidiobolus metaroseus* – snímek z mikroskopu a kultura na Petriho misce

2.2 Sledované metabolity

2.2.1 Lipidy

Lipidy jsou přírodní látky, které jsou jednou z hlavních složek všech živých systémů. Jde o širokou skupinu látek s rozmanitou strukturou a funkcemi. Tyto látky jsou rozpustné v hexanu či chloroformu, tudíž je snadné je oddělovat od zbytku biologického materiálu. Jde o produkty primárního metabolismu nebo jsou získávány z potravy. V živém organismu plní hned několik významných funkcí:

- **Stavební:** Lipidy jsou nepostradatelné při výstavbě a kompartmentaci buněk. Nejvýznamnější funkcí je tvorba fosfolipidových membrán, bez nichž by buňky nemohly existovat. Fosfolipidové dvojvrstvy jsou složeny z fosfolipidů (fosfoacylglyceroly, sfingomyeliny), sterolů (cholesterol, ergosterol) a glykosfingolipidů (gangliosidy, cerebrosidy).
- **Metabolická:** Jde o nepolární rozpouštědla, jež rozpouští lipofilní látky, mezi něž patří například vitamíny A, D, E a K a některé hormony.
- **Zásobní:** Jde o jednu z nejvýznamnějších funkcí lipidů. Lipidy jsou zásobárnou chemické energie. Energie je uchována ve vazbě mastných kyselin v triacylglycerolech. Odbouráním mastných kyselin β -oxidací dochází k uvolnění velkého množství energie.
- **Ochranná:** U vyšších organismů slouží jako tepelná izolace [8][9].

2.2.1.1 Chemická struktura a vlastnosti

Z chemického hlediska jde o estery vyšších mastných kyselin a alkoholů. Jde o nepolární látky, jsou tedy nerozpustné ve vodě a samy slouží jako nepolární rozpouštědla. Podle struktury je dělíme do tří základních skupin:

- a) **Jednoduché lipidy:** jde o acylglyceroly, tedy estery vyšších mastných kyselin a alkoholů. Dále je dělíme na tuky a oleje (alkoholem je glycerol) a vosky (alkoholovou složku tvoří vyšší alkoholy).
- b) **Komplexní lipidy:** Zde jsou zařazeny deriváty jednoduchých lipidů. Alkohol je zde esterifikován i jinou složkou, než je vyšší mastná kyselina. Řadíme zde fosfolipidy, lipoproteiny, glykolipidy či aminolipidy. Na rozdíl od jednoduchých lipidů mají amfifilní charakter – obsahují polární a nepolární část, část molekuly je tedy hydrofobní a část hydrofilní.
- c) **Odvozené lipidy:** Jde o rozmanitou skupinu látek jejichž hlavním znakem je jejich lipofilní povaha. Spadají sem například steroly, steroidní hormony, nepolární vitamíny, karotenoidy či ketolátky [8][9][10].

2.2.1.2 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou důležitým stavebním prvkem lipidů. Jde o monokarboxylové kyseliny s uhlíkatým řetězcem o délce 4 až 26 uhlíků. Mastné kyseliny je možné dělit podle počtu dvojných vazeb v uhlíkatém řetězci:

- **Nasycené (SFA):** ve svém řetězci se nevyskytuje dvojná vazba. Při laboratorní teplotě jde o pevné látky a díky absenci dvojných vazeb jde o velice stabilní struktury. Mezi zástupce patří například kyselina palmitová (16:0) či stearová (18:0).

- Mononenasycené (MUFA): ve svém řetězci obsahují jednu dvojnou vazbu. Při laboratorní teplotě jde o kapalné látky. Zástupcem je například kyselina olejová (18:1).
- Polynenasycené (PUFA): ve svém řetězci obsahují 2 a více dvojných vazeb. Za laboratorních podmínek jde o kapalné látky. Díky výskytu dvojných vazeb jsou náchylné k oxidaci. V těle snižují LDL cholesterol. K zástupcům patří například kyselina linolová a linoleová.

Mastné kyseliny plní v organismu nepostradatelné funkce. Dlouhý hydrofobní řetězec umožňuje výstavbu dvouvrstvé membránové struktury a umožňují tak kompartmentaci v buňce. Dále také slouží jako prekurzory pro bioaktivní sloučeniny, slouží tedy jako signální molekuly. Mastné kyseliny slouží jako zásobárna energie, jelikož vícenásobné vazby C-C obsahují mnoho energie, která může být uvolněna pomocí β -oxidace. Při β -oxidaci se odštěpují molekuly acetyl-CoA, které slouží jako prekurzory v anabolických drahách (např. izoprenoidní dráha) nebo je dále katabolizován v Krebsově cyklu.

Mastné kyseliny ve vysoké koncentraci působí v buňce jako detergent a mohou tak narušovat strukturu membrán, proto jsou v buňce uchovávány nejčastěji ve formě triacylglycerolů v lipidických kapičkách [8]-[11].

2.2.1.3 Mikrobiální lipidy

V posledních letech je kladen velký důraz na produkci mikrobiálních lipidů, které lze využít v potravinářském, farmaceutickém i petrochemickém průmyslu. Mikrobiální oleje jsou produkovány oleogenními mikroorganismy, což jsou mikroorganismy schopné produkovat a akumulovat alespoň 20 % lipidů v sušině. Některé kmeny kvasinek a mikrořas za ideálních podmínek mohou dosahovat až 70 % lipidů v sušině. Lipidy jsou vytvářeny převážně v růstové fázi po vyčerpání dusíku [12].

V potravinářském průmyslu se dají mikrobiální lipidy využít v doplňcích stravy a obohacování potravin o esenciální mastné kyseliny jako je kyselina linolová a α -linolenová, které se jinak vyskytují hlavně v semenech (len, mák, konopí, chia semínka) [12].

V petrochemickém průmyslu je v posledních letech snaha o výrobu biopaliv. Biopaliva první generace jsou vyráběna ze zemědělských produktů (kukuřice, třtina) pomocí chemických reakcí. Ale tato strategie není výhodná, jelikož tyto plodiny je ekonomičtější i ekologičtější využít v potravinářském průmyslu. Poté přišla na řadu biopaliva druhé generace, která vznikají pyrolýzou ze zemědělských odpadů (sláma, zbytky po zpracování dřeva). Vzniká syntézní plyn, který je možné převést na methanol a směsné alkoholy. Byl tedy vyřešen problém s využíváním potravinových zdrojů a využitím zemědělské půdy, ale výtěžnost těchto procesů je nižší než u biopaliv první generace a výsledné produkty jsou i nižší kvality. S novými vědeckými poznatky a snahou o valorizaci odpadů došlo k nástupu biopaliv třetí generace, která jsou produkována pomocí mikroorganismů z odpadů z různých průmyslových oblastí [13][14].

Kvasinky jsou schopné zpracovat různé uhlíkaté substráty včetně zemědělských a potravinářských odpadů. Pro produkci lipidů není nutné stálé osvětlování, tudíž není výroba zatížena náklady na umělé osvětlování. Mezi nejvíce studované oleogenní rody kvasinek patří *Rhodotorula*, *Yarrowia*, *Candida* či *Lipomyces*. Některé kmeny jsou schopny produkovat a akumulovat 70–75 % lipidů v sušině. Jediným omezením je schopnost produkce pouze

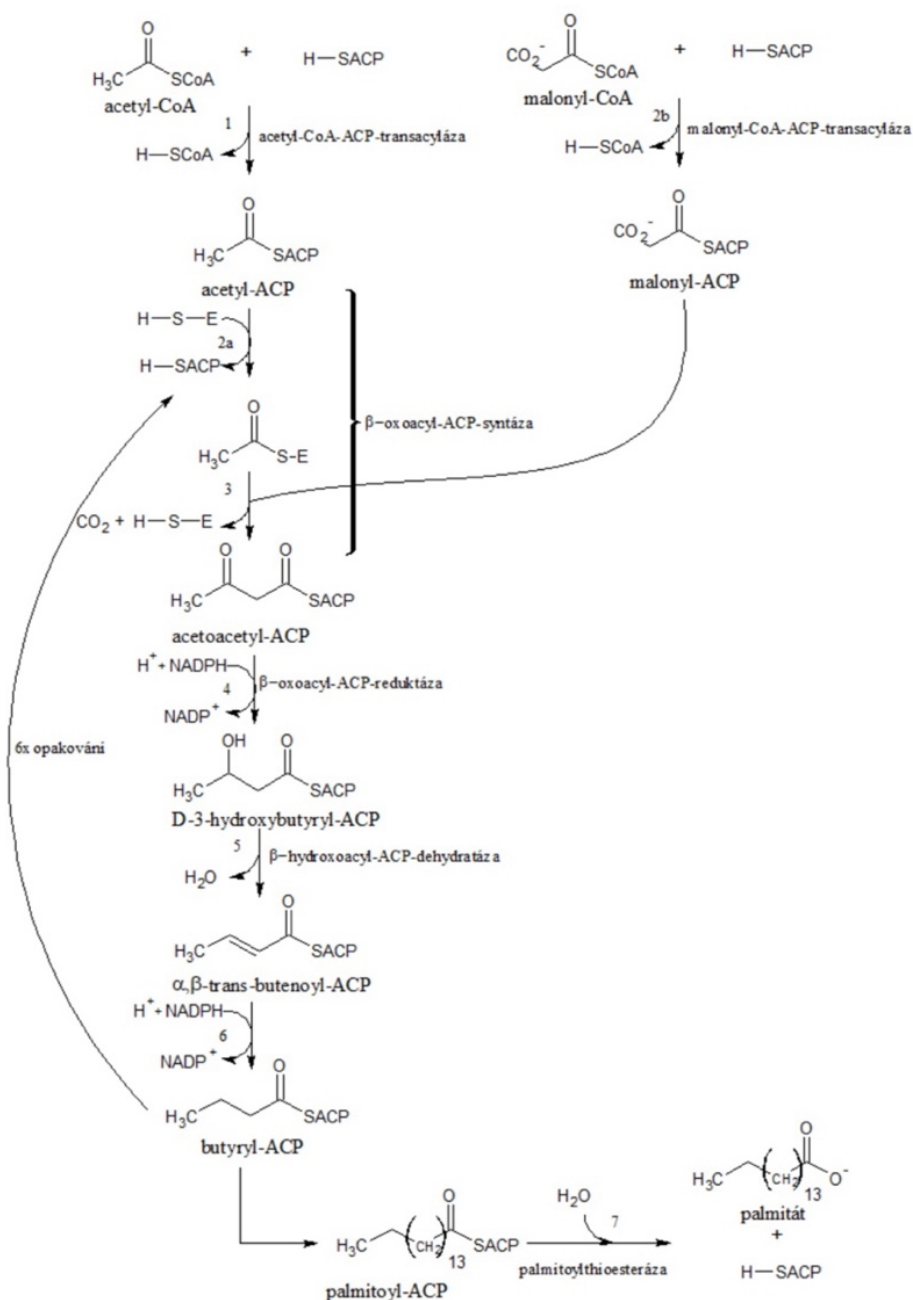
mastných kyselin se sudým počtem uhlíků v řetězci. Profil mastných kyselin se odvíjí od typu mikroorganismu (přítomný enzymatický aparát) a vnějších podmínkách [15][16].

2.2.1.4 Biosyntéza a degradace lipidů

Lipidy jsou velice rozmanitá skupina látek, a tedy je potřeba několik různých syntetických drah pro jednotlivé podskupiny. Nejvýznamnější a nejznámější drahou je biosyntéza triacylglycerolů. Tato biosyntéza probíhá v cytosolu buněk a je nutný dostatek acetyl-CoA a ATP v buňce. Biosyntéza triacylglycerolů má tři hlavní kroky: syntéza mastných kyselin, syntéza glycerolu a kondenzace mastných kyselin s glycerolem [8]-[10].

2.2.1.4.1 Syntéza mastných kyselin

Pro biosyntézu mastných kyselin je nutná dostatečná saturace systému živinami. Výchozí látkou pro syntézu mastných kyselin je acetyl-CoA. První molekula acetyl-CoA je pomocí enzymu acetyl-CoA-ACP-transacetylázy přeneseny na cysteinový zbytek enzymového komplexu FAS a CoA je odštěpen a vzniká acetyl-ACP. Pomocí acetyl-CoA-karboxylázy dochází ke karboxylaci druhé molekuly acetyl-CoA za vzniku malonyl-CoA, který je dále převeden pomocí malonyl-CoA-ACP-transferázy na malonyl-ACP. Tento krok poskytuje energii pro kondenzaci acetyl-ACP a malonyl-ACP. Současně vznik malonyl-CoA je nevratným krokem celé reakce a je tedy hlavním regulačním bodem syntézy mastných kyselin. Kondenzaci katalyzuje enzym β -oxoacyl-ACP-syntetáza a s kondenzací probíhá současně dekarboxylace a vzniká acetoacetyl-ACP. Následně je acetoacetyl-ACP upravován na komplexu FAS. Nejprve dochází k redukci oxoskupiny na třetím uhlíku pomocí enzymu β -oxoacyl-ACP-reduktázy až na β -hydroxybutyryl-ACP. Následně podléhá dehydrataci katalyzovanou enzymem β -hydroxyacyl-ACP-dehydrogenázou za vzniku α,β -trans-butenoyl-ACP. Dále dochází k redukci za katalýzy enoyl- α,β -reduktázou na butyryl-ACP. Sledem těchto kroků dojde při každém opakování cyklu k prodloužení řetězce o 2 uhlíky. Po šesti otočkách vznikne konečný produkt kyselina palmitová (Obrázek 5). Pro vznik kyseliny je nutné podstoupení reakce katalyzované acylsterázou, aby došlo k odštěpení ACP a navázání vody. Mikroorganismy dále obsahuje specifické enzymy, které kyselinu palmitovou transformují na další nasycené a nenasycené kyseliny [8]-[10][17].



Obrázek 5: Biosyntéza mastných kyselin [18]

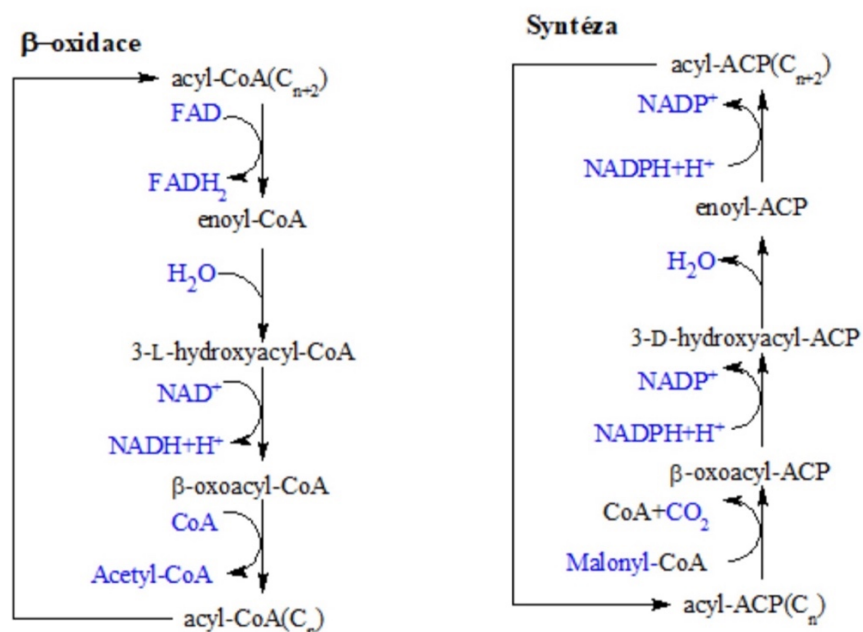
2.2.1.4.1 Syntéza triacylglycerolů

Pro syntézu triacylglycerolů jsou nutné prekurzorové molekuly: mastné kyseliny a aktivovaná forma glycerolu (glycerol-3-P, dihydroxyacetonfosfát). Aktivované formy glycerolu jsou převážně získávány z glykolýzy, popřípadě fosforylační syntézou pomocí glycerolkinázy. Dochází k esterifikaci glycerolu molekulami mastných kyselin, tato reakce je možná díky acyltransferázám. První esterifikace probíhá na aktivované formě navázáním mastné kyseliny za vzniku lysofosfatidové kyseliny. Druhou esterifikací vzniká kyselina fosfatidová.

Produkt je štěpen fosfatázou za vzniku diacylglycerolu, který podléhá poslední esterifikaci za vzniku triacylglycerolu. Kyselina fosfatidová může být využita pro syntézu složitých lipidů [8][10].

2.2.1.4.3 Degradace mastných kyselin

Odbourávání mastných kyselin probíhá pomocí procesu β -oxidace, který probíhá v mitochondriální matrix. Mastné kyseliny jsou z cytosolu transportovány do mitochondriální matrix pomocí karnitinového transportního systému. Mastná kyselina v cytosolu je aktivována koenzymem A pomocí acyl-CoA-syntázy za spotřebování ATP. Acyl-CoA se váže na karnitin za odštěpení koenzymu A a vzniku acylkarnitinu, který je transportován do mitochondriální matrix. Následně je acyl přenesen na koenzym A z mitochondriální rezervy za vzniku acylCoA a karnitin je navrácen do cytosolu. Prvním krokem β -oxidace je dehydrogenace acylCoA pomocí acyl-CoA-dehydrogenázy a oxidačního koenzymu FAD na enoyl-CoA (Obrázek 6). Následuje hydratace, kterou umožňuje enoyl-CoA-hydratáza za vzniku L-3-hydroxyacyl-CoA. Další reakcí je dehydrogenace za přispění β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenázy, kdy produktem je β -oxoacyl-CoA. V posledním kroku do reakce vstupuje další koenzym A a produkty reakce jsou acetyl-CoA a acyl-CoA o 2 uhlíky kratší než původní. Tuto reakci v buňce umožňuje enzym β -oxoacyl-CoA-thioláza. Tento mechanismus je opakován až do úplného odbourání na molekuly acetyl-CoA [8][10].



Obrázek 6: β -oxidace a syntéza mastných kyselin [18]

2.2.2 Karotenoidy

Karotenoidy spadají mezi lipofilní barviva žluté až červené barvy vyskytující se v rostlinách, mikroorganismech, houbách i v živočišných organismech. V buňkách se vyskytují díky své lipofilní povaze v membránách. V buňce zastávají hned několik velice významných funkcí. Díky dvojným vazbám v jejich molekulách slouží jako antioxidanty, mají vliv na snížení oxidačního stresu vychytáváním volných radikálů. Pro lidský organismus je významné, že jde

o prekurzory vitamínu A, jelikož lidské tělo není schopné samo produkovat karotenoidy, je tedy nutné je přijímat v potravě. Pro lidský organismus je nejpodstatnější betakaroten, který slouží právě jako prekurzor vitamínu A. Dále zabraňuje vzniku očních chorob, zlepšuje imunitní systém a má pozitivní vliv na pokožku [8][19][20].

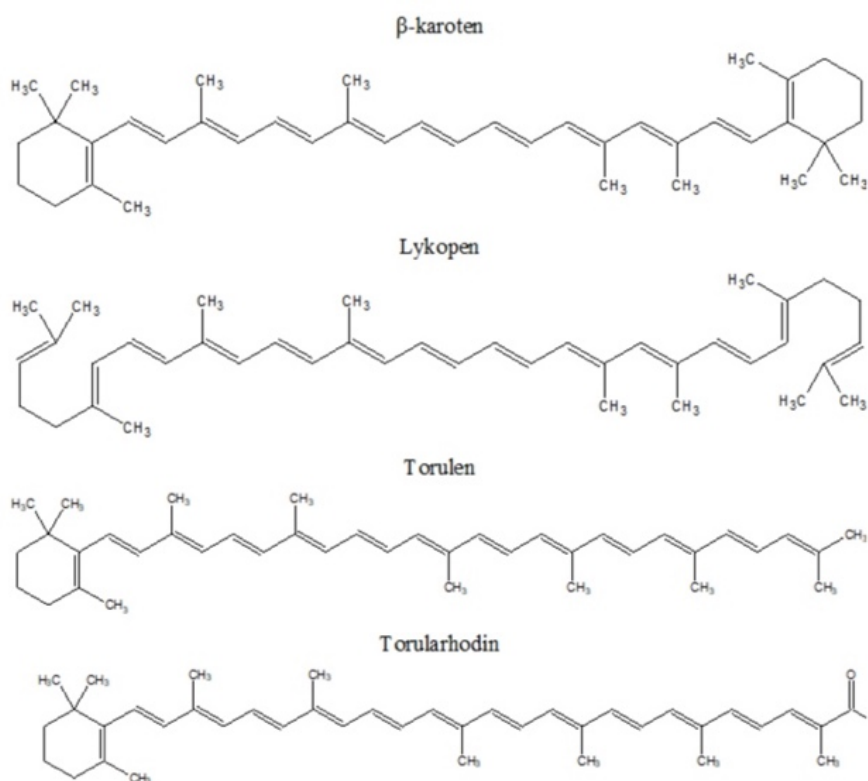
2.2.2.1 Chemická struktura, vlastnosti a funkce karotenoidů

Chemicky jsou karotenoidy řazeny mezi izoprenoidy s osmi izoprenoidními jednotkami tedy tetraterpeny (Obrázek 7). Ve své struktuře obsahují 40 uhlíků v polyenovém řetězci s konjugovaným systémem dvojných vazeb. Jde o nepolární látky nerozpustné ve vodě. Jsou nestabilní a jejich rozkladu napomáhají oxidační činidla a záření. Po osvětlení či zvýšení teploty dochází ke změně izomerace z *trans* na *cis*, což znemožňuje jejich biologickou aktivitu. Podle chemické struktury dělíme karotenoidy na [19]-[21]:

- Karoteny: jde o nesubstituované izoprenoidní řetězce. Mají žluté až červené zbarvení.
- Xantofyly: jsou kyslíkaté deriváty karotenů.

Podle polyenového řetězce karotenoidy dělíme na:

- Acyklické: ve své struktuře neobsahují cyklus. Patří sem lykopen, δ -karoten
- Monocyklické: jeden konec řetězce tvoří cyklus, například torularhodin a γ -karoten
- Bicyklické: oba konce řetězce jsou zakončeny cyklem. Patří sem například betakaroten



Obrázek 7: Strukturní vzorce některých karotenoidů [18]

2.2.2.2 Komerční použití karotenoidů

Díky zvýšení povědomí o benefitech karotenoidů a poptávce po kvalitních a nutričně bohatých potravinách a doplňcích stravy v posledních letech roste i poptávka po karotenoidech pro různé účely. V roce 2019 dosáhl globální trh s karotenoidy 1,5 miliardy USD, v roce 2026 je předpokládán nárůst na 2 miliardy USD [22][23].

V potravinářském průmyslu se karotenoidy využívají jako přírodní pigmenty pro zvýraznění barev při výrobě těstovin, sýrů, džusů či sladkostí. Největší růst využívání karotenoidů je aktuálně na trhu s nutraceutiky. Pravidelné užívání karotenoidů předchází či zpomaluje rozvoj chronických onemocnění a poškození buněk. Bylo zjištěno, že mají pozitivní vliv při předcházení či léčbě zánětlivých onemocnění, srdečních onemocnění, rakoviny, neurodegenerativních onemocnění či obezity. Díky své antioxidační aktivitě také snižuje riziko řady civilizačních a genetických onemocnění [24]-[28].

V kosmetickém průmyslu našly karotenoidy uplatnění také díky své antioxidační aktivitě. Využívají se jako aktivní složky s biologickou aktivitou v krémech či pleťových vodách. Díky schopnosti chránit pokožku před UV zářením a stárnutím se také využívají v opalovacích krémech [29][30].

Největší část vyprodukovaných karotenoidů se využívá v krmivářském průmyslu. Karotenoidy jsou využívány jako aditiva do krmiv pro zvířata jako je dobytek, drůbež či ryby. Prvním důvodem je zvýšení imunity a dále zlepšení senzorických a nutričních vlastností produkované potraviny. V akvakultuře se karotenoidy využívají k získání požadovaného zbarvení masa lososovitých ryb. Drůbeži jsou doplňovány karotenoidy pro oxidační stabilitu lipidů, prodloužení trvanlivosti vajec a dosažení žluto-oranžového zbarvení žloutků. Také byla prokázána vyšší produkce vajec [31][32].

2.2.2.3 Produkce karotenoidů

V současné době převažuje produkce karotenoidů pomocí chemické syntézy. Výhodou chemické syntézy je stabilní produkce, nízké náklady na výchozí materiály a není nutná extrakce. Chemicky syntetizované karotenoidy ale nemají stejnou biologickou aktivitu jako karotenoidy získané z přírodních zdrojů [22][26].

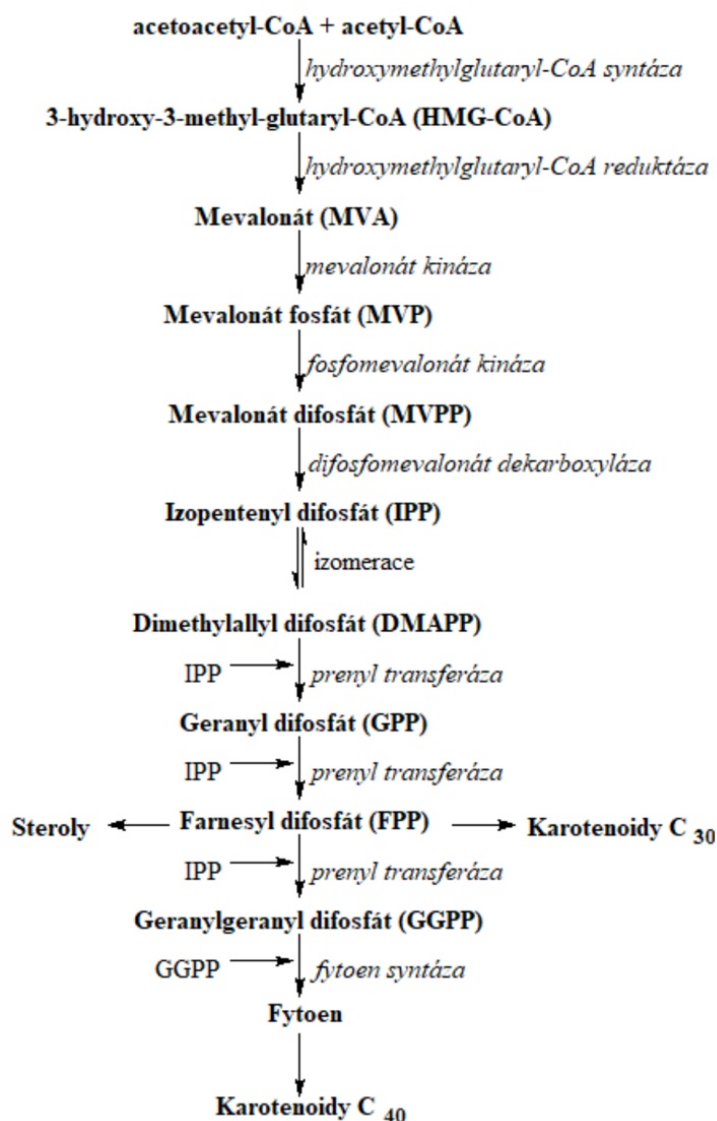
Přírodně produkované karotenoidy zastupují jen malé procento trhu, ale dochází k navyšování. Získávají se extrakcí z přírodních zdrojů jako jsou rostliny či řasy. Většinou jde o extrakce z rostlinných zdrojů, přičemž dochází k pěstování na velkých zemědělských plochách, které by mohly být lépe využity. Současně je tato produkce silně ovlivňována vnějšími vlivy jako jsou teplota, srážky a škůdci. Mikroorganismy a mikrořasy disponují širokou škálou karotenoidních metabolitů s vysokou biologickou aktivitou. Výhodou produkce pomocí mikroorganismů je možnost celoroční produkce, udržení stabilních kultivačních podmínek a využívání levných substrátů. S rostoucím ekologickým povědomím, snahou valorizace maxima odpadů a změně postoje k synteticky vyráběným přísadám roste snaha o využívání mikrobiálních producentů [22][26][33][34].

2.2.2.4 Biosyntéza karotenoidů

Karotenoidy jsou syntetizovány izoprenoidní drahou (Obrázek 8), jež spadá do sekundárního metabolismu a má dvě části. V první části dochází k syntéze aktivované formy izoprenu – isopentenylidifosfát (IPP). Ve druhé části probíhá kondenzace aktivních izoprenoidních jednotek. K jednotlivým karotenoidům je nutné provedení dalších úprav.

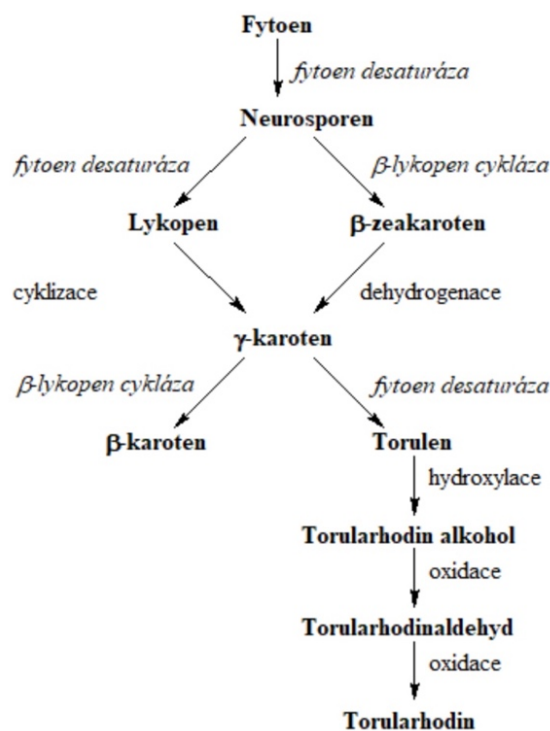
První část začíná aldolovou kondenzací acetylů ve formě acetyl-CoA pocházejícího z glykolýzy či degradace mastných kyselin. Kondenzací dvou acetyl-CoA vzniká acetoacetyl-CoA. Následně acetoacetyl-CoA kondenzuje s další molekulou acetyl-CoA za biokatalýzy enzymem hydroxymethylglutaryl-CoA-syntázou, přičemž vzniká 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA). Další reakce probíhá díky enzymu hydroxymethylglutaryl-CoA-reduktáze, HMG-CoA je redukován na mevalonát. Hydroxymethylglutaryl-CoA-reduktáza je hlavním regulačním enzymem této dráhy. Mevalonát je fosforylován pomocí mevalonát kinázy na mevalonát fosfát, který je znovu fosforylován pomocí fosfomevalonát kinázy na mevalonátdifosfát. První fáze je zakončena dekarboxylační reakcí za biokatalýzy difosfomevalonátdekarboxylázou na aktivní izoprenovou jednotku isopentenylidifosfát (IPP) a izomerázou může být přeměněn na dimethylallyldifosfát (DMAPP).

V druhé části izoprenoidní dráhy dochází ke kondenzaci aktivních izoprenových jednotek způsobě, „hlava-pata“. Kondenzací dvou aktivních jednotek vzniká geranyldifosfát (GPP). Připojením třetí IPP vzniká farnesyldifosfát (FPP). FPP slouží jako prekurzor pro syntézu sterolů a karotenoidů s 30 uhlíky. Třetí možností je připojení další IPP za vzniku geranylgeranyldifosfátu (GGPP). Následně dochází ke kondenzaci dvou GGPP za biokatalýzy fytoensyntázou na fytoen, který je prekurzorem karotenoidů se 40 uhlíky v řetězci [8][9][10][35].



Obrázek 8: Schéma izoprenoidní dráhy [18]

Fytoen je dehydrogenován na neurosporen a ten je dále dehydrogenován na lykopen (Obrázek 9), obě reakce probíhají pomocí fytoendesaturázy. Cyklizací na jenom konci řetězce lykopenu vznikne γ -karoten. Lykopen buď podléhá cyklizaci druhého konce za vzniku β -karotenu, nebo dehydrogenován na torulen. Torulen je dále hydroxylován a dvakrát oxidován za vzniku torularhodinu [8][9][10][35].

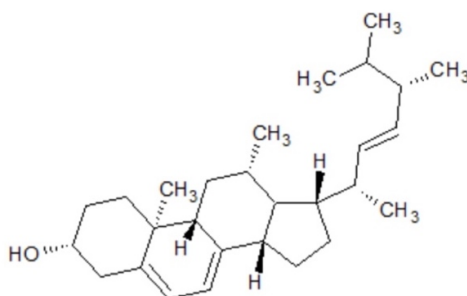


Obrázek 9: Schéma syntézy karotenoidů [18]

2.2.3 Ergosterol

Ergosterol svou strukturou spadá do skupiny sterolů. Jde o steroidní alkoholy, společným znakem sterolů je hydroxylová skupina na třetím uhlíku (Obrázek 10). Jde o mykosterol, vyskytuje se v kvasinkách, plísňích a houbách. Vyskytuje se v buněčných membránách, kde zajišťuje jejich fluiditu, bez sterolů by šlo o rigidnější struktury. Dále je ergosterol provitaminem vitamínu D2, který z něj vzniká po ozáření UV zářením [19][36][37].

Mnoho antimykotik míří na biosyntézu či funkčnost ergosterolu právě kvůli jeho nepostradatelnosti v kvasinkové či plísňové buňce. Současné takto zacílená antimykotika nijak neinteragují s lidskými buňkami [19].



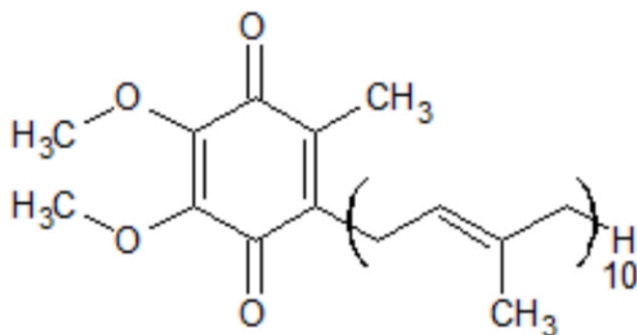
Obrázek 10: Strukturní vzorec ergosterolu [18]

2.2.3.1 Biosyntéza sterolů

Biosyntéza sterolů vychází z izoprenoidní dráhy. Kondenzací typu „hlava-hlava“ dvou farnesyldifosfátů pomocí skvalen syntázy vznikne hlavní prekurzor sterolů – skvalen. Skvalen dále podstupuje dvoufázovou cyklizaci a vzniká lanosterol a ten je následně řadou reakcí upravován na odpovídající mikrobiální sterol dle enzymatického aparátu daného organismu [38].

2.2.4 Ubichinony

Ubichinony jsou také známy jako koenzymy Q a jde o skupinu látek jejichž struktura obsahuje benzochinonové jádro s navázaným izoprenovým řetězcem (Obrázek 11), počet izoprenových jednotek v řetězci se uvádí jako dolní index v označení Q_n. Délka izoprenového řetězce závisí na typu organismu. Nejznámějším je koenzym Q₁₀, který je přítomný ve většině eukaryotických buněk. Tyto látky jsou velice dobře rozpustné v tucích. Základní funkcí ubichinonů v buňce je, že slouží jako přenašeč vodíku a elektronů v elektron-transportním řetězci. Také zabraňuje oxidaci LDL-cholesterolu a snižuje tak riziko kardiovaskulárních onemocnění. S vitamínem E se vyskytuje v lipidových částech buňky a napomáhá ochraně před peroxidací lipidů a podílí se na ochraně antioxidantů. Projev stárnutí kůže souvisí s úbytkem ubichinonu v buňkách, proto je často využíván v kosmetologickém průmyslu v přípravcích proti stárnutí kůže. Dále je využíván ve farmakologickém průmyslu, jelikož jeho nedostatek má vliv na rozvoj rakovinného bujení a pokles jeho koncentrace v srdečním svalu zvyšuje riziko kardiovaskulárních onemocnění [8][10][39][40].



Obrázek 11: Strukturní vzorec ubichinonu [18]

2.2.4.1 Biosyntéza ubichinonu

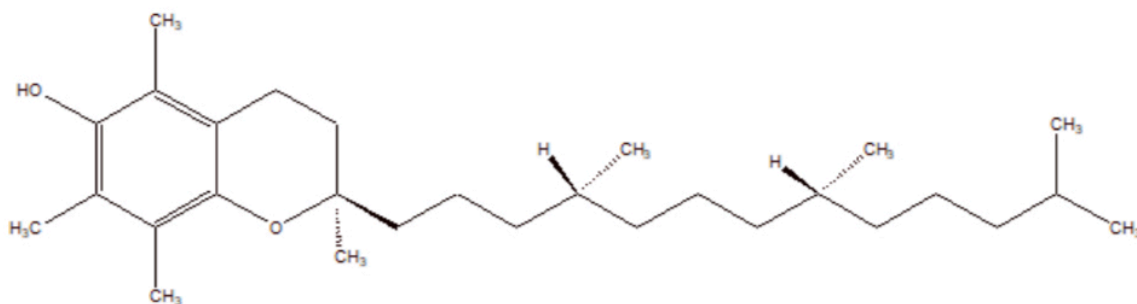
Mikrobiální syntéza ubichinonu probíhá pomocí dvou drah – šikimát-chorismátová dráha a izoprenoidní dráha. Chinonové jádro je syntetizováno šikimát-chorismátovou dráhou v cytoplasmě buňky a vstupními látkami jsou erytroza-4-fosfát a fosfoenolpyruvát. Tyto dvě molekuly spolu kondenzují a podléhají cyklizaci za vzniku šikimátu, který kondenzuje s další molekulou fosfoenolpyruvátu a vzniká chorismát. Z chorismátu se odštěpí pyruvát za vzniku kyseliny p-hydroxybenzoové. V izoprenoidní dráze vzniká polyprenylpyrofosfát a ten následně kondenzuje právě s kyselinou p-hydroxybenzoovou za vzniku o-polyprenylhydroxybenzenu. Ten podléhá oxidačním reakcím a je dvakrát methoxylován za vzniku ubichinonu [37][39].

2.2.5 Tokoferol (vitamín E)

Tokoferol neboli vitamín E spadá do skupiny lipofilních vitamínů a má izoprenoidní strukturu (Obrázek 12). Jde o látku esenciální pro organismus. Vitamín E je velmi dobrý antioxidant, který chrání buňky před oxidací a napomáhá ochraně lipidů před peroxidací. V lidském organismu je také významný pro správný vývoj mozku, periferních nervů, krevních buněk či kůže. Dále byla prokázána ochranná funkce při alergiích a zánětech plic a jater. V lidském těle má také vliv na vývoj pohlavních buněk [9][19][41][42].

Savci a drůbež, stejně jako člověk, nejsou schopni syntézy vitamínu E a je nutné jej dodávat v potravě. Je silným antioxidantem a má velký význam v oběhovém, imunitním, nervovém a svalovém systému. Dostatek vitamínu E má pozitivní vliv na plodnost a reprodukci, kdy chrání embryo i vaječný žloutek. Jako silný antioxidant také zmírňuje dopad oxidačního stresu při spermatogenezi. Vitamín E má také vliv na kvalitu vajec a masa. U masa zlepšuje antioxidační aktivitu masa i tuku a zabraňuje tak nežádoucí oxidaci, která vede ke vzniku oxidovaných forem cholesterolu a zabraňuje vzniku nežádoucích příchutí. V hovězím masu zabraňuje oxidaci metmyoglobinu, která vede k nežádoucím změnám barvy [41][43].

Největší koncentrace tokoferolu jsou v rostlinných olejích. V rostlinných deodorizovaných olejích a tucích je jeho obsah kolem 15 %. Čištění olejů se provádí pomocí extrakce či destilace. Koncentrování tokoferolu je prováděno pomocí iontoměničové úpravy [41][44][45].



Obrázek 12: Struktura vitamínu E [46]

2.2.6 Betaglukany

Betaglukany jsou polysacharidy tvořené monomerními jednotkami D-glukózy propojených β -glykosidickými vazbami. Jde o přírodní látky vyskytující se v houbách, řasách, kvasinkách či obilovinách. Chemická struktura se odvíjí od jejich původu. V buněčné stěně kvasinek, hub i plísní se vyskytují betaglukany s β -(1,3) vazbou v hlavním řetězci a postranními řetězci připojenými β -(1,6) glykosidickou vazbou a celá struktura je stabilizována vodíkovými můstky. Betaglukany se váží postranními řetězci na manany a hlavním řetězcem na chitin [47][48].

Betaglukany působí v organismu jako antioxidanty a mají imunomodulační účinky. Dále slouží jako prevence kardiovaskulárních onemocnění, podporují růst kožních buněk, regulují hladinu glukózy v krvi, snižují hladinu cholesterolu v krvi a mají protizánětlivé a protinádorové účinky [48][49].

2.2.6.1 Průmyslové využití betaglukanů

V potravinářském průmyslu je možné betaglukany využívat jako stabilizátory, emulzifikátory a zahušťovadla při přípravě polévek, omáček či dresinků. Dále je možné je využít jako zdroj vlákniny a slouží tak k obohacení nutričních vlastností. V kosmetickém průmyslu se využívá jejich schopnosti podpořit tvorbu kolagenu a hydratačních vlastností. Betaglukany tak snižují výskyt vrásek, akné, dermatitidy či ekzémů. V medicíně mají betaglukany potenciál při hojení ran a léčbě popálenin. Houbové betaglukany mají potenciál v protinádorové léčbě, díky schopnosti podpořit imunitní reakci. V krmivářském průmyslu by mohly betaglukany sloužit jako přídatné látky v krmivech pro zvýšení imunity [47][50]-[53].

2.3 Odpadní substráty

2.3.1 Kávová sedlina

Káva je po vodě druhým nejvíce konzumovaným nápojem na světě. V letech 2021 a 2022 spotřeba kávy dosáhla téměř 10 milionů tun s ročním nárůstem o 1 % od roku 2017. Maximálně 30 % hmotnosti kávových zrn může být extrahováno do kávového nápoje. Zbytek je odpad v podobě SCG (Spent coffee grounds), jehož složení je tvořeno převážně lignocelulózovými složkami, celkové složení SCG je uvedeno v Tabulce 1 [54].

Tabulka 1: Složení kávové sedliny (18)

Složka	Obsah (%)
Lignin	25-33
Hemicelulóza	30-40
Celulóza	8-13
Olej	10-20
Proteiny	7-14
Polyfenoly	2,5
Kofein	0,02

Použitá kávová sedlina většinou končí na skládkách. V posledních letech roste snaha o dosažení co nejmenší produkce odpadů a co největší využívání a valorizaci odpadů. SCG je využíváno buď jako celek jako pevné palivo, plnivo materiálů nebo na kompostování. Nelze ale kompostovat velká množství SCG, kvůli zbytkovému obsahu kofeinu, polyfenolů a antimikrobiálních látek, což může být pro půdu toxické. Druhou možností je rozdělení SCG do frakcí na olejovou, lignocelulózovou, proteinovou a alkaloidovou. Tyto frakce jsou pak recyklovány na základě konceptu biorafinerie. Vodnou extrakcí je možné získat kofein, polyfenoly či antioxidanty, jež je možné využít ve farmakologickém či kosmetickém průmyslu. Olejová frakce činí 10–20 % a získává extrakcí pomocí nepolárních rozpouštědel, je možné ji využít pro výrobu biopaliv. Lignocelulózovou frakci po úpravě na fermentovatelné sacharidy je možné využít jako zdroj organického uhlíku v biotechnologickém průmyslu, například pro produkci PHA či karotenoidů. K hydrolýze polysacharidových řetězců se nejčastěji využívá kyselá hydrolýza nebo enzymatická hydrolýza, popř. jejich kombinace. Zbýlá pevná frakce může být využita na výrobu biouhlu či pevných pelet [54][55][56].

2.3.2 Fritovací olej

Ke smažení a fritování se využívají rostlinné oleje, nejčastěji jde o slunečnicový, řepkový a palmový olej. Jen produkce slunečnicového oleje se ročně pohybuje kolem 20 milionů tun ročně a u řepkového kolem 30 milionů tun ročně. Přepálený fritovací olej už není možné dále využívat v potravinářském průmyslu, kvůli ztrátám cenných látek a vzniku karcinogenních látek [46][57][58].

Použité potravinové oleje jsou ekologickým problémem, jelikož často nejsou vhodně likvidovány. Nesprávná likvidace zatěžuje čističky odpadních vod a zvyšuje náklady na provoz. S vyšším důrazem na minimalizaci produkce odpadu a valorizaci vznikajících odpadů vzniklo v posledních letech mnoho postupů na udržitelnější postupy a využívání těchto odpadů. Odpadní fritovací oleje jsou nejčastěji využívány k výrobě biopaliv. S rostoucím zájmem o valorizaci odpadu a rozšiřování biotechnologií je stále častěji odpadní olej využíván jako zdroj organického uhlíku a energie při syntézách biomolekul pomocí mikroorganismů. Odpadní fritovací olej je možné využít například při výrobě enzymů – převážně lipáz, biosurfaktantů a bioplastů [59]-[62].

2.3.3 Odpadní kuřecí tuk

Odpadní kuřecí tuk vzniká extrakcí v kafilériích při zpracování odpadů z drůbežářského průmyslu. Složení tuku závisí na původu a potravě. Nejčastěji se tento odpad využívá k výrobě energie. První možností je jeho spalování, ale od tohoto způsobu zpracování se ustupuje a zvyšuje se produkce biopaliv pomocí transesterifikace tuku. Odpadní tuk je také možné využít jako zdroj organického uhlíku v biotechnologickém průmyslu, přičemž před použitím je vhodné provést hydrolýzu [63][64].

2.3.4 Odpadní glycerol

Odpadní glycerol vzniká při výrobě bionafty, při výrobě mýdel a při zpracování tuků a olejů. Na výrobu 10 kg bionafty připadá vznik 1 kg odpadního glycerolu. Kvůli zvýšené poptávce po bionaftě dochází k nadprodukci odpadního glycerolu. Ten se dá využít například jako hnojivo. Odpadní glycerol také je možné využít pro kultivaci biomasy jako zdroj uhlíku a dále také sodíku či draslíku [65]-[67].

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je optimalizace kultivace karotenogenních kvasinek na odpadních lipidických substrátech a analýza výsledné biomasy.

Dosažení vytyčeného cíle bylo řešeno pomocí jednotlivých dílčích kroků:

- Přehledná literární rešerše zaměřená na karotenogenní kvasinky a jejich využití při biotransformaci potravinářských odpadů.
- Screeningové kultivace vybraných kmenů karotenogenních kvasinek se zaměřením na nalezení vhodných produkčních kmenů.
- Optimalizace kultivačních podmínek v poloprovozních laboratorních bioreaktorech.
- Analýza vyprodukované mikrobiální biomasy a vyhodnocení výsledků.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité k přípravě odpadních substrátů

Izopropylalkohol p.a. Roth (SRN)
Hexan p.a., Lach-ner (Česká republika)
Celuláza z *Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich (SRN)
Hemiceluláza z *Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich (SRN)
Směs cellulázových enzymů, Sigma-Aldrich (SRN)
D-glukóza monohydrát p.a., Lach-ner (Česká republika)
Fenol, Lach-ner (Česká republika)
Kyselina sírová (96%), Lach-ner (Česká republika)
Odpadní kuřecí tuk, NOriolia (Norsko)
Odpadní glycerol (Česká republika)

4.1.2 Chemikálie použité ke kultivaci karotenogenních kvasinek

D-glukóza monohydrát p.a., Lach-ner (Česká republika)
Bakteriologický pepton, Duchefa Biochemie (Nizozemsko)
Glycerol, Penta (Česká republika)
Kvasničný autolyzát, Roth (SRN)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-ner (Česká republika)
Síran horečnatý heptahydrát p.a., Lach-ner (Česká republika)
Dusičnan draselný p.a., Penta (Česká republika)
Síran amonný p.a., Penta (Česká republika)
Chlorid železitý p.a., Lach-ner (Česká republika)
Jodid draselný p.a., Penta (Česká republika)
Kyselina boritá p.a., Lach-ner (Česká republika)
Tetrahydrát chloridu manganatého p.a., Lachema (Česká republika)
Tetrahydrát heptamolybdenanu amonného p.a., Lach-ner (Česká republika)
Pentahydrát síranu měďnatého p.a., Lach-ner (Česká republika)
Heptahydrát síranu zinečnatého p.a., Lach-ner (Česká republika)
Antifoam, Sigma-Aldrich (SRN)

4.1.3 Chemikálie použité pro přípravu vzorků na GC a HPLC

Heptadekanová kyselina, Sigma-Aldrich (SRN)
Kyselina sírová (96%), Lach-ner (Česká republika)
Tris-HCl, Penta (Česká republika)
Hydroxid sodný, Lach-ner (Česká republika)
Methanol p.a., Penta (Česká republika)
Chloroform p.a., Penta (Česká republika)
Acetonitril pro HPLC, Roth (SRN)
Ethylacetát pro HPLC, Roth (SRN)

Hexan pro HPLC, Carlo ERBA (Francie)
Methanol pro HPLC, Chem-Lab (Belgie)
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

4.1.4 Chemikálie použité pro stanovení lipázové aktivity

p-nitrofenol p.a., Alfa Aesar (USA)
p-nitrofenylpalmitát, Sigma-Aldrich (SRN)
SDS – Serva (SRN)
Triton-X – Sigma-Aldrich (SRN)

4.1.5 Chemikálie pro stanovení obsahu betaglukanů

β-Glucan Assay Kit
Kyselina sírová (96%), Lach-ner (Česká republika)
Hydroxid sodný p.a., Lach-ner (Česká republika)
Kyselina octová, p.a., Lachema (Česká republika)

4.2 Použité pomůcky a přístroje

4.2.1 Přístrojová technika a pomůcky pro přípravu odpadních substrátů

Aparatura dle Soxhleta
Vakuová odparka HB4 basic, HBA Labortechnik
Hřídelové míchadlo, Argolab AM20-D

4.2.2 Přístrojová technika a pomůcky pro kultivaci a uchování biomasy

Laboratorní analytické váhy Pioneer, OHAUS
Předvážky Scout Pro, OHAUS
Autokláv Systec
Laminární box Air Stream ESCO Class II BSC
Skříňová třepačka ZWYR-D2401, Labwirt
Třepačka WiseShake SHR-2D, Witeg
Fermentor RALF 7 l, BiOiNGENiRiNG
Mikroskop L II ooA, Intraco Micro
GKB Color Digital CCD kamera
Lucia Image active 5.0, Laboratory Imaging spol. s.r.o.
Centrifuga Z 36 HK, Hermle
Lyofilizátor FreeZone 4.5 l Freeze Dry Systém, Labconco
Vakuová pumpa k lyofilizátoru Vakuumbrand

4.2.3 Přístrojová technika a pomůcky pro izolaci a analýzu karotenoidů a lipidů

Vortex Fixed Speed Vortex Mixer, VXMNFS, OHAUS
Homogenizátor BeadBug, Benchmark Scientific

Centrifuga MIKRO 120, Hettich

Termoblok Dry Block Heater, OHAUS

GC/FID sestava: TRACE 1300 TM (Thermo Fisher, USA)

Kapilární kolona Zebron GC FAME, 30 m, 0,25 mm, 0,2 µm (Phenomenex)

HPLC/PDA sestava: Sestava Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher, USA)

DAD detektor řady Vanquish (Thermo Fisher, USA)

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

Držák předkolony – KJ0 – 4282, ECOM (ČR)

Předkolona – C18, AJ0 – 4287, Phenomenex

Vyhodnocovací software Chromeleon 7.2

4.2.4 Přístrojová technika a pomůcky pro stanovení lipázové aktivity a obsahu betaglukanů

ELISA Synergy HTX, BioTech

Automatická multichanel pipeta, Witeg

Automatické pipety, SOCOREX Swiss

Mikrotitrační 96 jamkové destičky

Spektrofotometr UV/VIS, Boeco

4.3 Použité kmeny kvasinek

Tabulka 2: Kmeny použitých kvasinek a jejich sbírkový kód

Název	Kód
<i>Cystofilobasidium infirmominium</i>	CCY 17-18-4
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	CCY 10-1-2
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	CCY 20-2-26
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CCY 19-4-6
<i>Rhodotorula toruloides</i>	CCY 62-2-4
<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	CCY 19-6-20
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	CCY 19-9-6
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	CCY 19-6-4

4.4 Zpracování odpadních substrátů

4.4.1 Fritovací olej

Použitý přepálený fritovací olej byl před použitím jako substrát zfiltrován za sníženého tlaku přes filtrační papír, aby se zbavil hrubých nečistot. Následně byl olej převeden do dělicí nálevky a byl do něj přidán chlorid sodný, tak aby se vytvořily 2 fáze a spodní vodná se oddělila a odstranila. Olej, jež byl zbaven vody, byl uchován pro další použití při teplotě 4–8 °C.

4.4.2 Kuřecí tuk

Kuřecí odpadní tuk byl získán jako odpadní substrát firmy Norillia (Norsko) v rámci mezinárodního projektu ByPROValue. Byl uchováván v lednici při teplotě 4–8 °C.

4.4.3 Odpadní glycerol

Byl získán v rámci spolupráce s komerčním partnerem, který se zabývá vývojem metod pro výrobu metylesterů mastných kyselin z rostlinných materiálů.

4.4.4 Kávový olej

Kávová sedlina byla získaná z Caffeteria Pellini (směs Arabica a Robusta). Odpadní sedlina byla vysušena v sušárně při 70 °C po dobu 24 hodin. Pro dosažení rozmělnění na jemné částice, byla vysušená kávová sedlina pomleta. Ze suché pomleté kávové sedliny byl následně extrahován kávový olej: 50 g pomleté kávové sedliny bylo extrahováno v Soxhletově aparatuře (Obrázek 13) pomocí směsi IPA:hexan 50:50 po dobu 90 minut. Extrakční směs byla odpařena pomocí vakuové odparky. Kávový olej byl uchován v lednici při teplotě 4-8 °C.



Obrázek 13: Soxhletova aparatura pro extrakci oleje a míchací aparatura pro přípravu kávového hydrolyzátu

4.4.5 Kávový hydrolyzáť

Proextrahovaná kávová sedlina byla vysušena v sušárně při 80 °C po dobu 24 hodin. Po vysušení bylo ve 2l sterilizační láhvi smícháno 300 g sedliny s 1 l 1% kyseliny sírové. Směs byla podrobena kyselé hydrolyze při 130 °C po dobu 90 minut v autoklávu. Po zchlazení bylo ve směsi upraveno pH na optimum pro funkci celuláz a hemiceluláz, jež byly do směsi po úpravě přidány. Směs se nechala promíchávat 24 h.

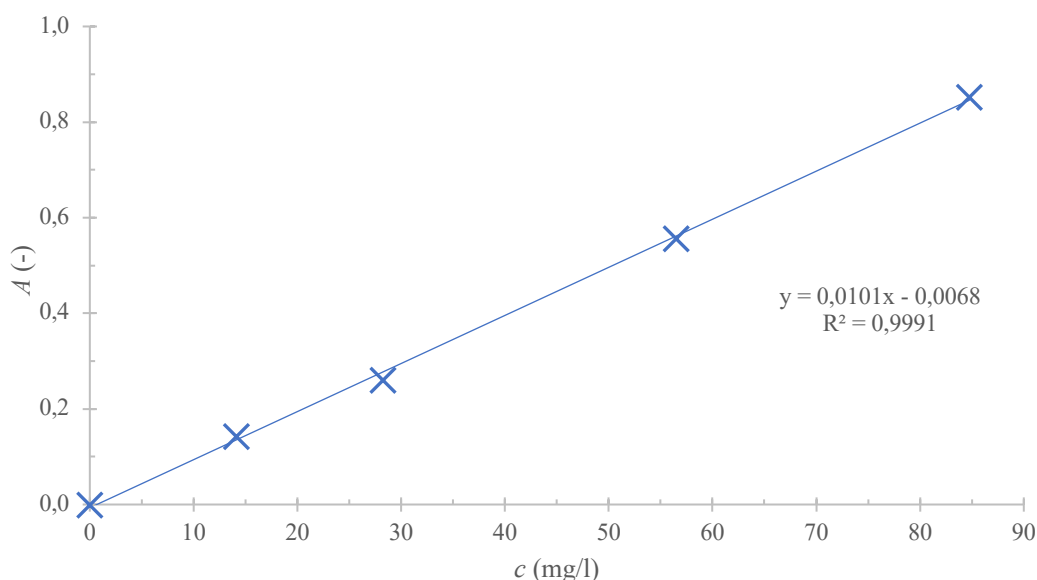
Vzniklá směs byla přefiltrována přes filtrační papír. Následně byly stanoveny sacharidy v hydrolyzátu dle Duboise. Kávový hydrolyzát byl uchován při teplotě kolem 0-4 °C.

4.4.5.1 Stanovení sacharidů dle Duboise

Celkové kvasinkami využitelné sacharidy v kávovém hydrolyzátu byly stanoveny spektrofotometricky dle Duboise. Nejprve byla připravena kalibrační řada pomocí glukózy. Zásobní roztok byl připraven o koncentraci 113 µg/ml. Kalibrační řada byla připravena ze zásobního roztoku glukózy a destilované vody na objem 1 ml podle Tabulky 3 do skleněných zkumavek. Vzorek hydrolyzátu byl 1000krát zředěn a do skleněné zkumavky bylo odpipetován 1 ml. Blank byl tvořen 1 ml destilované vody. Ke standardům, blanku i vzorkům byl přidán 1 ml 5% roztoku fenolu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Směs byla protřepána a na 1 hodinu uložena do tmy při laboratorní teplotě. Absorbance standardů i vzorků byla spektrofotometricky změřena při 490 nm proti blanku. V grafu 1 je uvedena kalibrační křivka. Výsledná koncentrace sacharidů byla vypočítána z Rovnice 1.

Tabulka 3: Míchání kalibračních roztoků, jejich výsledná koncentrace a absorbance

$V_{\text{zásobní}} \text{ (ml)}$	$V_{\text{voda}} \text{ (ml)}$	$c \text{ (}\mu\text{g/ml)}$	$A \text{ (-)}$
0,000	1,000	0,000	0,000
0,125	0,875	14,125	0,142
0,250	0,750	28,250	0,261
0,500	0,500	56,500	0,557
0,750	0,250	84,750	0,853
1,000	0,000	113,000	1,164



Graf 1: Kalibrační křivka pro stanovení cukrů dle Duboise

$$c = \frac{A + 0,0068}{0,0101} \text{ [mg/l]}$$

Rovnice 1: Rovnice pro výpočet výsledné koncentrace sacharidů v kávovém hydrolyzátu

4.5 Kultivace

4.5.1 Screeningové kultivace

4.5.1.1 Inokulum I a II

Pro kultivaci byla využita dvojstupňová inokulace. Složení inokulačních médií je uvedeno v Tabulce 4. Inokulum I bylo připraveno o objemu 50 ml do 250ml Erlenmayerovy baňky. Inokulum II bylo připraveno o objemu 125 ml do 500ml Erlenmayerovy baňky. K inokulu II byl navíc přidán 1 g fritovacího oleje, aby došlo k přizpůsobení enzymového aparátu na tukový substrát. Inokula byla sterilována v tlakovém hrnci při teplotě 120 °C po dobu 45 minut. Po jejich vychladnutí bylo inokulum I sterilně zaočkováno pěti kličkami kultury kvasinek z Petriho misky (Obrázek 14) v laminárním boxu. Kultivační doba inokula I byla 24 hodin. Poté bylo inokulum I sterilně přeočkováno do inokula II v očkovacím poměru 1:5. Kultivace inokula II trvala 24 h.

Tabulka 4: Složení inokulačního média

Složka	Množství (g/l)
Kvasničný autolýzát	10
Pepton	20
Glycerol	20



Obrázek 14: Narostlé Petriho misky

4.5.1.2 Produkční média

Produkční média byla připravována do 250ml Erlenmayerových baněk na výsledný objem 50 ml. Všechna média obsahovala minerální základ, jehož složení je uvedeno v Tabulce 5. Média se lišila v typu použitého odpadního uhlíkatého substrátu. Množství substrátů v daných médiích jsou uvedena v Tabulce 6. Média byla následně sterilována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Po vychladnutí bylo do produkčních médií sterilně v laminárním boxu přidáno 150 µl mikroelementového roztoku, jehož složení je uvedeno v Tabulce 7 a média byla zaočkována inokulem II v očkovacím poměru 1:10.

Tabulka 5: Složení minerálního média

Složka	Množství (g/l)
KH ₂ PO ₄	4,0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,7
KNO ₃	6,09

Tabulka 6: Navážky substrátů do jednotlivých typů médií

Médium	Množství (g/50 ml média)		Množství (ml/50 ml média)	
	Glycerol	Lipidický substrát	Kávový hydrolyzát	Odpadní glycerol
Kontrolní	2,32	-	-	-
FO	-	1,19	-	-
FO+G10%	0,23	1,06	-	-
FO+KH	-	1,06	2,67	-
KO	-	1,19	-	-
KO+G10%	0,23	1,06	-	-
KO+KH	-	1,06	2,67	-
KUŘ	-	1,19	-	-
KUŘ+G10%	0,23	1,06	-	-
KUŘ+KH	-	1,06	2,67	-
KH	-	-	26,7	-
OG	-	-	-	7,70

Tabulka 7: Složení mikroelementového roztoku

Složka	Množství (g/l)
H ₃ BO ₃	1,25
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	1,00
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,82
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0,50
FeCl ₃	0,30
KI	0,25
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,10

4.5.1.3 Vnější podmínky

Aby bylo docíleno homogenních podmínek, byla pro kultivaci využita skříňová třepačka. Kultivace probíhala při 25 °C a otáčkách 125 rpm. Z důvodů produkce karotenoidů bylo udržováno konstantní osvětlení teplým žlutým světlem. Kultivace probíhala 120 hodin.

4.4.2 Kultivace ve fermentoru

4.4.2.1 Inokulum I a II

Pro kultivaci ve fermentoru byla využita dvojstupňová inokulace. Složení inokulačních médií je uvedeno v Tabulce 4. U inokula II byla současně využita indukce lipázové aktivity pomocí 1 g fritovacího oleje. Inokulum I bylo připraveno o objemu 50 ml do 250ml Erlenmayerovy baňky a inokulum II o objemu 250 ml do 1l Erlenmayerovy baňky. Doba kultivace inokula I byla 24 h. Následně bylo zaočkováno inokulum II v poměru 1:5 sterilně v očkovacím boxu. Kultivační doba inokula II byla 24 hodin.

4.4.2.2 Produkční médium

Fermentorové kultivace probíhaly v laboratorním fermentoru s pracovním objemem 5 l (Obrázek 15). Složení produkčního média je uvedeno v Tabulce 8. Očkovací poměr byl zvolen 1:20. Do produkčního média byl sterilně přidán mikroelementový roztok (4 ml na litr média) jehož složení je uvedeno výše v Tabulce 7 a antifoam, aby se minimalizovalo pění.

Tabulka 8: Složení produkčního média pro poloprovozní kultivaci

Složka	Množství (na 5 l)
KH ₂ PO ₄	40,00 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	6,96 g
KNO ₃	30,47 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	19,91 g
Čistě lipidická média	
Olej/tuk	117,72 g
S přidavkem kávového hydrolyzátu	
Olej/tuk	105,94 g
Kávový hydrolyzát	458,25 ml

4.4.2.3 Kultivační podmínky

Teplota byla při kultivaci nastavena na 25 °C. Pomocí kyseliny a zásady bylo pH udržováno na hodnotu 6,5. Míchání bylo regulováno dle koncentrace kyslíku s maximálními otáčkami 600 ot/min. Pro zintenzivnění produkce karotenoidů byla kultura neustále osvětlována teplým žlutým světlem. Doba kultivace činila 5 dní (cca 120 h).



Obrázek 15: Poloprovazní fermentorová kultivace

4.4.3 Gravimetrické stanovení biomasy

Do 2ml plastové Eppendorfovy zkumavky byl napipetován 1 ml narostlé kultury z produkčního média. Vzorek byl odstředěn při 14000 ot/min po dobu 3 minut a supernatant byl slit. Vzorek byl promyt destilovanou vodou, znovu odstředěn a voda slita. Biomasa byla zamražena na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně po dobu 24 h lyofilizována. Lyofilizovaná biomasa byla zvážena a stanovena v jednotkách gram na litr kultury (g/l).

4.4.3.1 Uskladnění biomasy

Zbytek kultury byl stočen v 50 ml centrifugační zkumavce na 7000 ot/min po dobu 3 minut, aby by zajištěn dostatek biomasy pro analýzy. Supernatant byl odlit do 15 ml plastových zkumavek a zamražen. K vzorku bylo přidáno 20 ml destilované vody a vzorek byl znovu stočen a voda odlita. Biomasa byla zamražena a následně 24 h lyofilizována. Biomasa byla uchována v mrazicím boxu.

4.6 Extrakce, stanovení a analýza látek

4.6.1 Stanovení obsahu lipidů a profil mastných kyselin

Plynová chromatografie je separační metoda založená na rozdílných teplotách varu separovaných látek. Separovaný vzorek je injektován v kapalně podobě do nosného inertního plynu a je unášen separační kolonou. Separací kolony jsou nejčastěji kapilární křemičitanové kolony s vrstvou polyamidu a vnitřní stěna je tvořena stacionární fází. Kapilární kolony mají délku 10-100 m, což zajišťuje velkou separační účinnost. Po projití kolonou analyt doputuje na detektor, v našem případě plamenový ionizační detektor (FID). FID využívá principu spalování analytu mezi dvěma elektrodami, přičemž vznikají ionty, které zvyšují vodivost [68][69].

4.6.1.1 Příprava vzorků na GC

Pomocí analytických vah bylo naváženo 5-20 mg zmražené lyofilizované biomasy do 2ml krymplovacích vialek a bylo přidáno 1,8 ml transesterifikační směsi, o složení: 15% kyselina sírová v methanolu s přídavkem interního standardu kyseliny heptadekanové o koncentraci 0,5 mg/ml. Vzorek v zakrimpovaných vialkách byl zahříván při 85 °C na termobloku po dobu 2 hodin. Po vychladnutí byl obsah kvantitativně převeden do 5 ml šroubovací vialky. Ke vzorku bylo přidáno 0,5 ml 0,05 M hydroxidu sodného a 1 ml hexanu HPLC kvality. Směs byla na 10 minut umístěna na vortex pro extrakci esterů mastných kyselin do hexanu. Po rozdělení fází bylo z horní hexanové odpipetováno 0,1 ml směsi do 2ml šroubovací vialky a přidáno 0,9 ml hexanu HPLC kvality. Takto připravený vzorek byl podroben analýze mastných kyselin na plynovém chromatografu.

4.6.1.2 Analýza na GC

K zjištění obsahu lipidů v biomase a profilu mastných kyselin byla využita plynová chromatografie. Analýza probíhala na plynovém chromatografu TRACE 1300 TM s automatickým dávkovačem a splitter se split poměrem 10. K detekci byl využit plamenový ionizační detektor. K separaci methylesterů mastných kyselin byla použita kapilární kolona LION LN-FAME (30 m×0,25 mm×0,2 μm) a nosným plynem byl vodík s průtokem 0,5 ml/min. V Tabulce 9 je uveden teplotní program. Bylo využito metody interního standardu a externí kalibrace pomocí standardů Supleco FAME 37 mix. Data získaná pomocí programu Chromeleon byla převedena do MS Excel a vyhodnocena.

Tabulka 9: Teplotní program pro analýzu lipidů a profilu mastných kyselin

	Retenční čas (min)	Gradient (°C/min)	Teplota (°C)	Zadržení (min)
1	0,000	Start	-	-
2	1,000	0,0	60	1,0
3	3,625	40,0	125	1,0
4	8,625	5,0	140	2,0
5	19,736	4,5	190	0,0
6	22,236	25,0	240	0,5
7	22,300	Stop	-	-

4.6.2 Stanovení barviv a antioxidantů

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) slouží k separaci a identifikaci analytu a je založena na rozdílných afinitách analytů k mobilní a stacionární fázi. Analyt je unášen mobilní fází za zvýšeného tlaku separační náplňovou kolonou naplněnou stacionární fází, nejčastěji různě modifikovaným silikagelem. Pro kvalitní separaci je nutné správně zvolit poréznost a typ stacionární fáze. Mobilní fáze a stacionární fáze jsou opačných polarit. K analýze karotenoidů je využívána polární mobilní fáze a nepolární stacionární fáze, látky se tedy eluují od méně polární po nejvíce polární. K detekci se využívají fotometrické detektory, v našem případě PDA, který umožňuje snímat celé absorpční spektrum v reálném čase. Signál je zpracován a převáděn na data do počítače. Výstupem je chromatogram [68][69].

4.6.2.2 Příprava vzorků na HPLC

Do 2ml závitové plastové zkumavky bylo na analytických vahách odváženo 10-20 mg lyofilizované biomasy. Biomasa byla hydratována 1 ml destilované vody po dobu 30 minut. Vzorek byl stočen při 14000 ot/min po dobu 2 minut a voda odlita. Buňky byly rozrušeny chemicko-mechanickým procesem s využitím 1 ml p.a. methanolu, 0,5 ml skleněných kuliček a umístěním vzorku na dezintegrátor na 1,5 minuty. Po rozrušení byl vzorek kvantitativně převeden do 15ml centrifugační zkumavky za přídavku 2 ml chloroformu p.a. kvality a vzorek byl umístěn na multipoziční vortex na 15 minut, aby došlo k extrakci polárních látek do chloroformu. Následně byl přidán 1 ml destilované vody, vzorek byl protřepán a odstředěn při 3000 ot/min po dobu 1 minuty. Spodní chloroformová fáze byla převedena do 15ml skleněné zkumavky a chloroform byl odpařen při 45 °C v ochranné dusíkové atmosféře. Zbytek po odpařování byl rozpuštěn v 1 ml směsi ethylacetát:acetonitril 2:1 HPLC kvality a přefiltrován do 2ml skleněné vialky. K přefiltrování byl použit PTFE filtr. Vzorek ve šroubovací vialce byl umístěn na kapalinový chromatograf.

4.6.2.3 Analýza na HPLC

Ke stanovení barviv a polárních látek v biomase byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). K analýze byla použita sestava Dionex 3000 s DAD detektorem řady Vanquish od firmy Thermo Fisher. Separace probíhala na koloně Kinetex C18 EVO o rozměrech 150 mm, 4,6 mm a 2,6 μm při průtoku 1,2 ml/min a teplotě 25 °C. Bylo využito gradientové eluce podle Tabulky 10 s mobilními fázemi A a B. Mobilní fáze A byla tvořena acetonitrilem, TrisHCl (pH = 8) a methanolem v poměru 84:14:2 a mobilní fáze B byla složena z methanolu a ethylacetátu v poměru 60:40. Data získaná pomocí programu Chromeleon byla převedena do MS Excel a vyhodnocena na základě kalibračních řad standardů.

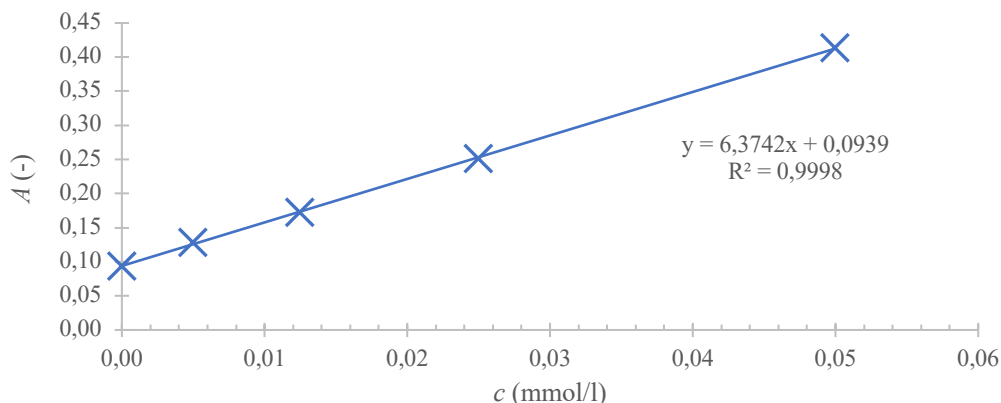
Tabulka 10: Gradientová rampa pro analýzu barviv pomocí HPLC

	Retenční čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
1	0,0	100	0
2	13,0	0	100
3	19,0	0	100
4	20,0	100	0
5	25,0	100	0

4.6.3 Stanovení lipázové aktivity

Pro stanovení lipázové aktivity byla využita kolorimetrická metoda s p-nitrofenylpalmitátem, založená na schopnosti lipáz štěpit tento substrát na žlutě zbarvený produkt (p-nitrofenol). Ten je následně spektrofotometricky stanoven [70].

Nejprve byla sestrojena kalibrační křivka pomocí p-nitrofenolu. Byly připraveny roztoky v rozmezí koncentrací 0,05 – 0,005 mmol/l a proměřeny při vlnové délce 410 nm na ELISA readru. Kalibrační křivka je vyobrazena v Grafu 2.



Graf 2: Kalibrační křivka p-nitrofenolu pro stanovení lipázové aktivity

Následně byl připraven substrát pro reakci. Do odměrné baňky o objemu 100 ml bylo naváženo 0,0135 g p-nitrofenylpalmitátu, 0,017 g SDS a 1 g Triton-X-100 a roztok byl doplněn po rysku deionizovanou vodou.

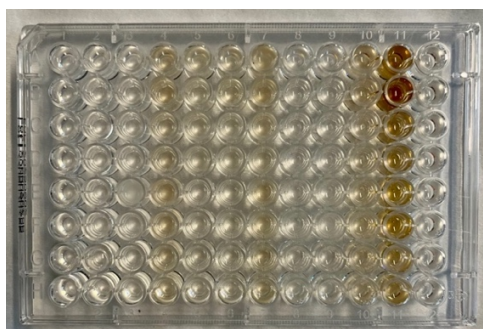
Do mikrotitrační destičky (Obrázek 16) bylo napipetováno 125 µl pufru (100mM tris-HCl, pH 7,2), 125 µl substrátu a 50 µl vzorku (supernatantu). K analýze byl využit ELISA reader temperovaný na 30 °C. Měření probíhalo 30 min v 5minutových intervalech a absorbance byla odečítána při 410 nm. Vzorec pro výpočet lipolytické aktivity enzymu je uveden níže (Rovnice 2).

$$a = \frac{A_{410} + d}{c \cdot V \cdot t} \text{ [U/ml]}$$

Rovnice 2: Rovnice pro výpočet lipolytické aktivity

A_{410} ... absorbance vzorku t ... doba inkubace vzorku s enzymem (min)

V ... objem vzorku (ml) c, d ... koeficienty z rovnice regresní přímky kalibrační křivky



Obrázek 16: Mikrotitrační destička pro stanovení lipázové aktivity

4.6.4 Stanovení betaglukanů

Enzymatické stanovení betaglukanů je založeno na hydrolýze buněčné stěny a následném rozštěpení řetězců až na monomerní jednotky D-glukózy. Obsah betaglukanů se určuje z rozdílu obsahu celkových glukanů a alfa-glukanů. Pro stanovení celkových glukanů je nutné provést kyselou hydrolýzu pomocí kyseliny sírové a ke konverzi polymerních řetězců na monomerní jednotky se využívá exo-1,3- β -D-glukanáza a β -glukosidáza. Následně jsou glukózové jednotky stanoveny pomocí amyloglukosidázy a invertázy s využitím GOPOD činidla. U stanovení alfa-glukanů se provádí místo kyselé hydrolýzy bazická hydrolýza na glukózu a fruktózu. [71]

Ke stanovení betaglukanů byla využita enzymatická metoda pomocí β -Glucan Assay Kit. Tento kit je určen pro stanovení betaglukanů v kvasinkách a houbách. [72]

4.6.4.1 Roztoky obsažené v kitu pro stanovení betaglukanů

Láhev 1: 2 ml suspenze síranu amonného s exo-1,3- β -glukanázou (100 U/ml) + β -glukosidázou (20 U/ml). Roztok musí být uchován při 4 °C.

Láhev 2: 20 ml 50% roztoku glycerolu s amyloglukosidázou (1630 U/ml) a invertázou (500 U/ml). Roztok byl uchován při 4 °C.

Láhev 3: 50 ml reakční pufr GOPOD o pH 7,4. Jeho součástí je kyselina p-hydroxybenzoová a azid sodný (0,09 %). Pufr je nutné uchovat při 4 °C.

Láhev 4: Enzymy činidel GOPOD v lyofilizované formě. Enzymy tvořila glukózooxidáza (GOD), peroxidáza (POD) a 4-aminoantipyrin. Skladovací teplota byla -10 °C.

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

Láhev 6: Kontrolní vzorek β -glukanů (2 g). Roztok byl uchován při pokojové teplotě.

4.6.4.2 Pomocné roztoky

Acetátový pufr (200 mM, pH 4,5): 11,6 ml ledové kyseliny octové (1,05 g/ml) bylo smícháno s 900 ml destilované vody. pH bylo upraveno pomocí 4 M hydroxidu sodného na hodnotu 4,5 a objem byl doplněn na 1 l. Roztok byl uchován při 4 °C.

Acetátový pufr (1,2 M, pH 3,8): 68,6 ml ledové kyseliny octové (1,05 g/ml) bylo smícháno s 800 ml destilované vody. K úpravě pH byl použit 4 M hydroxid sodný. Následně byl roztok doplněn na objem 1 l. Roztok byl uchován při 4 °C.

Hydroxid sodný (8,0 M): 320 g NaOH bylo rozpuštěno v 700 ml destilované vody. Příprava probíhala v digestoři za stálého míchání. Po vychlazení na pokojovou teplotu byl roztok doplněn na objem 1 l. Roztok byl uchován při 4 °C.

Hydroxid sodný (1,7 M): 68 g NaOH bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody. Příprava byla provedena v digestoři. Roztok byl uchován při 4 °C.

Kyselina sírová (12 M): 640 ml koncentrované kyseliny sírové byla přidána do 300 ml destilované vody. Příprava probíhala v digestoři. Následně byl objem doplněn na 1 l. Roztok byl uchován při 4 °C.

4.6.4.3 Příprava reakčních roztoků

- Do láhve 1 bylo přidáno 9 ml 200 mM acetátového pufru (pH = 4,5). Roztok byl následně rozdělen na alikvoty. Roztoky byly skladovány v PP zkumavkách v mrazicím boxu při teplotě -10 °C. Při správném skladování vydrží roztok stabilní 2 roky.
- Obsah láhve 2 není nijak upravován. Když je roztok uchován při 4 °C vydrží stabilní 2 roky.
- Obsah láhve 3 se naředil 1 l destilované vody (Roztok A).
- Obsah láhve 4 byl rozpuštěn v 20 ml roztoku A a kvantitativně se převeden do láhve se zbytkem roztoku A. Láhev byla zakryta hliníkovou folií, ale byl GOPOD ochráněn před světlem. Roztok uchovaný při teplotě 2–5 °C vydrží stabilní 3 měsíce.
- Obsah láhve 5 se použil ve formě dodání. Roztok vydrží stabilní 5 let při pokojové teplotě.
- Obsah láhve 6 byl použit ve formě dodání. Stabilita roztoku při pokojové teplotě je 5 let.

4.6.4.4 Stanovení celkových glukánů

- Do skleněných zkumavek bylo odváženo přibližně 90 mg vzorku a přidány 2 ml 12 M kyseliny sírové. Vzorek byl promíchán a uložen na 2 hodiny do ledové lázně.
- Ke vzorkům byly přidány 4 ml destilované vody a vzorky byly promíchány na vortexu. Následně bylo přidáno ještě 6 ml destilované vody a vzorky promíchány.
- Vzorky byly na 2 hodiny uloženy na termoblok vyhřátý na 100 °C. (Po 5 minutách byly uzávěry povoleny).
- Obsah zkumavek byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrných baněk pomocí 200 mM acetátového pufru o pH 4,5.
- Následně bylo ke vzorku přidáno 6 ml 8 M roztoku NaOH a objem doplněn pomocí 200 mM acetátového pufru o pH 4,5. Obsah byl promíchán a část odlita do centrifugační zkumavky.
- Odebraný vzorek byl centrifugován při 13 000 rpm po dobu 5 minut.
- Z centrifugační zkumavky bylo do čisté skleněné zkumavky odebráno 0,1 ml odstředěného extraktu a bylo přidáno 0,1 ml exo-1,3- β -glukanázy + β -glukosidázy v 200 mM acetátovém pufru. Obsah byl promíchán a vzorky byly 1 hodinu inkubovány při 40 °C.
- Do zkumavek byly přidány 3 ml činidla GOPOD a vzorky byly inkubovány při teplotě 40 °C po dobu 20 minut.
- Slepý vzorek byl připraven z 0,2 ml 200 mM acetátového pufru a 3 ml činidla GOPOD.
- Standart D-glukózy byl připraven z 0,1 ml standardu D-glukózy z kitu, 0,1 ml 200 mM acetátového pufru a 3 ml činidla GOPOD. Standart i blank prošly stejným procesem inkubace jako vzorky.
- Následně byla změřena absorbance při 510 nm proti slepému vzorku.

4.6.4.5 Stanovení alfa-glukanů

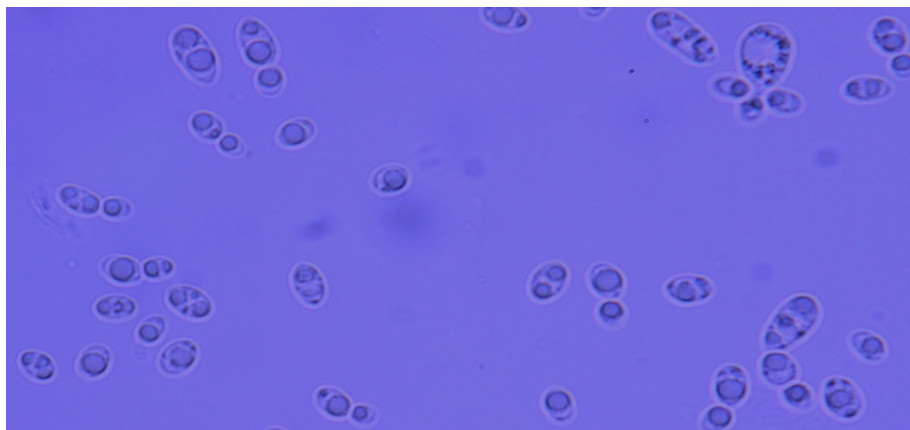
- Do skleněné zkumavky bylo naváženo přibližně 90 mg a byly přidány 2 ml 1,7 M NaOH. Obsah byl promíchán a vzorky byly uloženy na 20 min do ledové lázně.
- Ke vzorku bylo přidáno 8 ml 1,2 M acetátového pufru a 0,2 ml amyloglukosidázy + invertázy z kitu. Obsah byl promíchán a vzorky byly inkubovány 30 minut při 40 °C.

- 2 ml vzorku byly převedeny do centrifugační zkumavky a centrifugovány při 13 000 rpm po dobu 5 min.
- Následně bylo 0,1 ml odstředěného extraktu převedeno do skleněné zkumavky a bylo přidáno 0,1 ml 200 mM acetátového pufru, 3 ml činidla GOPOD a vzorky byly inkubovány při 40 °C po dobu 20 min.
- Standart D-glukózy byl připraven z 0,1 ml standardu D-glukózy z kitu, 0,1 ml 200 mM acetátového pufru a 3 ml činidla GOPOD. Standart i blank prošly stejným procesem inkubace jako vzorky.
- Následně byla změřena absorbance při 510 nm proti slepému vzorku.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Analýza screeningových kultivací karotenogenních kvasinek

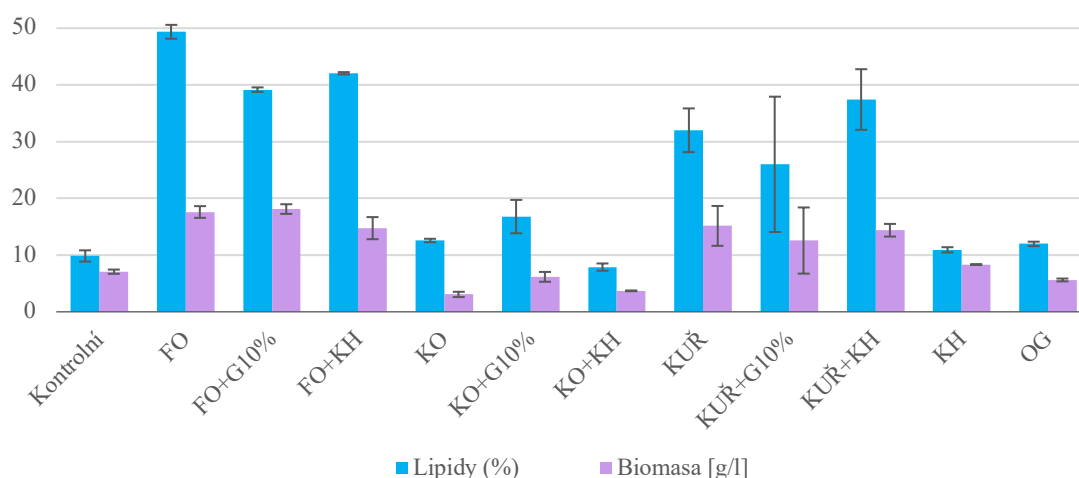
5.1.1 Produkční vlastnosti kmene *Sporidiobolus pararoseus*



Obrázek 17: Snímek kultury *Sporidiobolus pararoseus* na médiu FO+G10%

5.1.1.1 Produkce biomasy

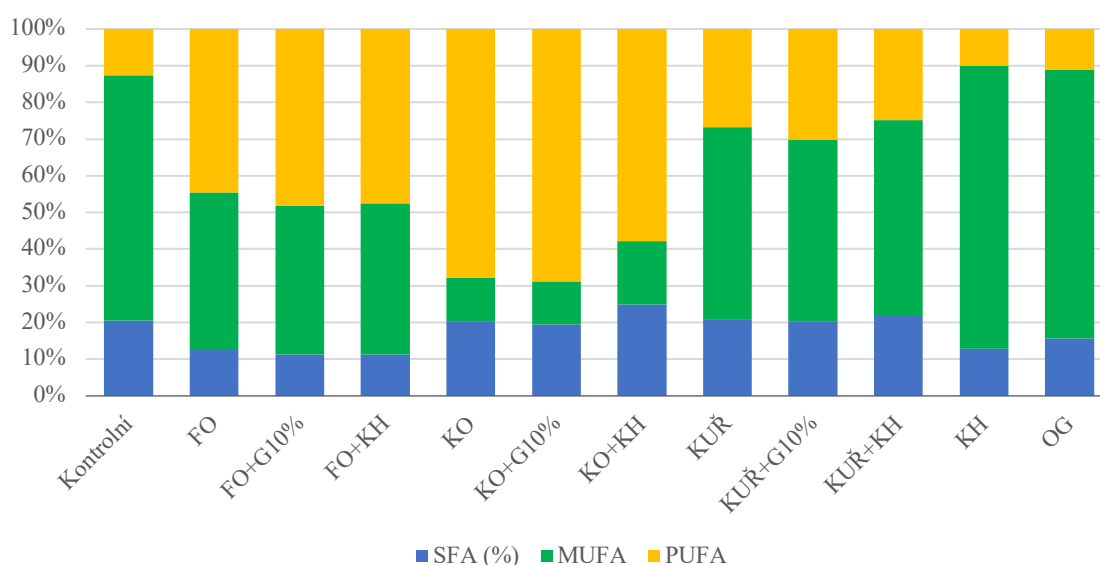
Z Grafu 3 je patrné že pro produkci biomasy kmene *Sporidiobolus pararoseus* jsou vhodná média obsahující jako odpadní substrát fritovací olej či kuřecí odpadní tuk. Nejvyšší produkce biomasy ($18,1 \pm 0,8$) g/l, bylo dosaženo při kultivaci na médiu s odpadním fritovacím olejem s 10 % přídavkem glycerolu. Při využití pouze odpadního fritovacího oleje, dosáhla produkce biomasy ($17,6 \pm 1,0$) g/l což je 2,5krát více než u kontrolního média. Navýšených výtěžků bylo dosaženo také při použití odpadního kuřecího tuku ($15,2 \pm 3,5$ g/l), kdy došlo k nárustu o 114 % oproti kontrolnímu médiu. Naopak při kultivaci s kávovým olejem jako odpadním substrátem docházelo k výraznému poklesu produkce biomasy. Při použití pouze kávového oleje, či jeho kombinace s kávovým hydrolyzátem bylo dosaženo pouze polovičního množství biomasy. Kultura při kultivaci na jednodušších substrátech jako je kávový hydrolyzát či odpadní glycerol nevykazovala signifikantní nárůst produkce biomasy (Příloha 1).



Graf 3: Produkce biomasy kmenem *Sporidiobolus pararoseus* a obsahu lipidů v biomase

5.1.1.2 Obsah lipidů v biomase

Při kultivaci na kontrolním glycerolovém médiu byl obsah lipidů v biomase kolem 10 % a profil mastných kyselin (Graf 4) v poměru přibližně 20 : 70 : 10 (SFA:MUFA:PUFA). Z Grafu 3 vyplývá, že pro obohacení biomasy kmene *Sporidiobolus pararoseus* lipidy, je výhodné použití odpadního fritovacího oleje jako substrátu (Obrázek 17). Při použití samotného odpadního fritovacího oleje bylo dosaženo nejvyššího obsahu lipidů a to ($49,4 \pm 1,2$) %. Současně využití fritovacího oleje vedlo k minimalizaci obsahu SFA na hodnoty 11-13 %. Při použití samotného odpadního kuřecího tuku bylo dosaženo obsahu lipidů ($32,0 \pm 3,9$) %, ale oproti fritovacímu oleji obsahoval vzorek méně PUFA (26,8 %) a více SFA (20,7 %) a MUFA (52,5 %). Kávoový olej napomáhá obohacení biomasy o PUFA téměř až na 70 %, ale celkový obsah lipidů je do 17 % a současně je produkce biomasy velice nízká. Důvodem je náročná dostupnost substrátu, jelikož při kultivační teplotě 25 °C není kávoový olej dokonale kapalný. Jednoduché odpadní substráty jako je kávoový hydrolyzát a odpadní glycerol nevykazují žádné výrazné obohacení oproti kontrolnímu glycerolovému médiu.

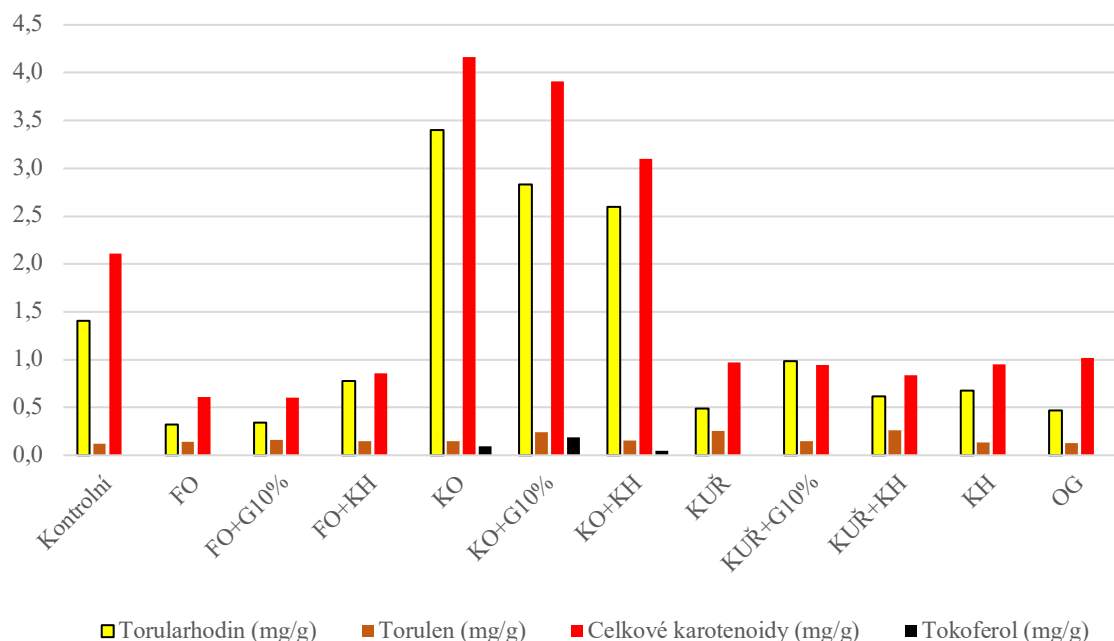


Graf 4: Složení lipidů v biomase kmene *Sporidiobolus pararoseus*

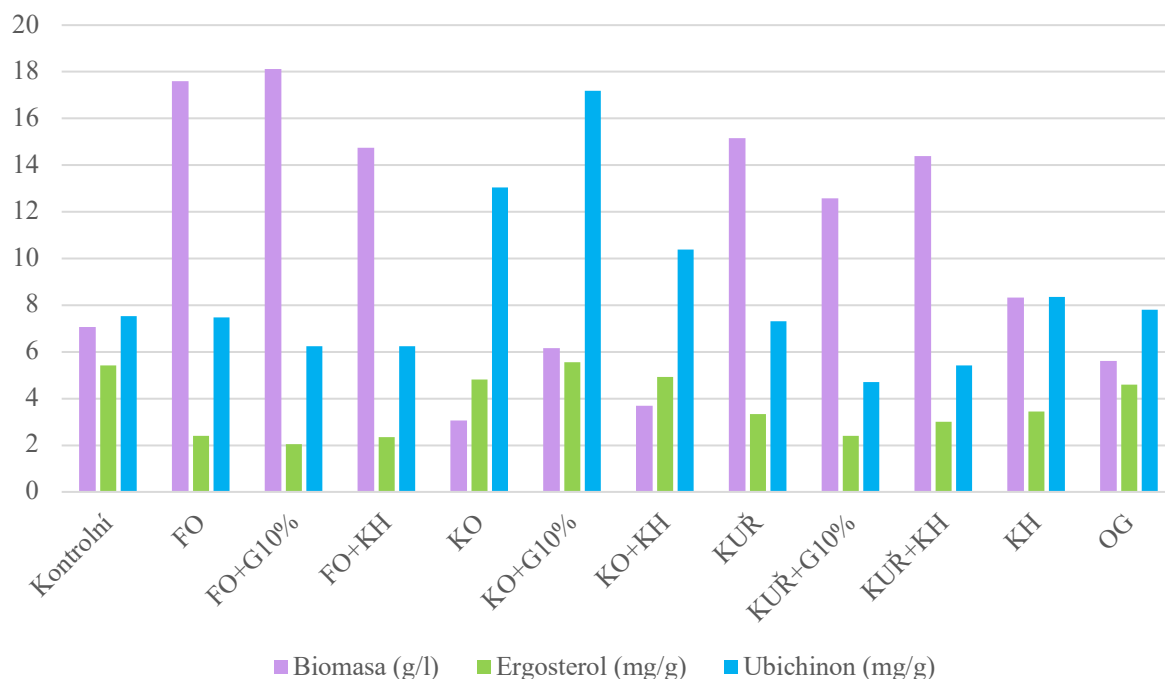
5.1.1.3 Karotenoidy a další lipofilní metabolity

Kultivací kmene *Sporidiobolus pararoseus* na médiích s kávoovým olejem dochází k zvýšení produkce karotenoidů (Příloha 2). Nejvíce karotenoidů (4,16 mg/g) bylo dosaženo za použití pouze kávoového oleje, což je dvojnásobek produkce než na kontrolním glycerolovém médiu. Majoritním karotenoidem u *Sporidiobolus pararoseus* byl torularhodin (Graf 5), přičemž při kultivaci na kávoovém oleji bylo dosaženo nejvyšší hodnoty a to 3,40 mg/g. Médium s kávoovým olejem a směsí kávoového oleje a kávoového hydrolyzátu zvyšuje produkci betakarotenu, kdy na médiu KO+KH bylo dosaženo 0,73 mg na gram biomasy. Kromě kávoového oleje a odpadního glycerolu, vede využití odpadních substrátů k snížení obsahu ergosterolu (v některých případech až o 50 %). Jak je z Grafu 6 patrné, kultivace s kávoovým olejem vede k významnému navýšení ubiquinonu v biomase. Při kultivaci pouze na kávoovém oleji bylo dosaženo 13,03 mg/l, což je o 73 % více než u kontrolního glycerolového média. Maximální

hodnoty 17,19 mg/g bylo dosaženo s použitím kávového oleje s 10% přídavkem glycerolu. Jelikož obsah ubiquinonu u kontrolní kultivace (chemicky čistý glycerol) a kultivace s odpadním glycerolem je velice podobný, bylo by možné dosáhnout podobného výsledku nahrazením chemicky čistého glycerolu ve směsi za odpadní glycerol. *Sporidiobolus pararoseus* velice špatně akumuloval tokoferol z kávového oleje, nejspíše kvůli problémům s distribucí oleje v médiu, a tak i jeho utilizací.



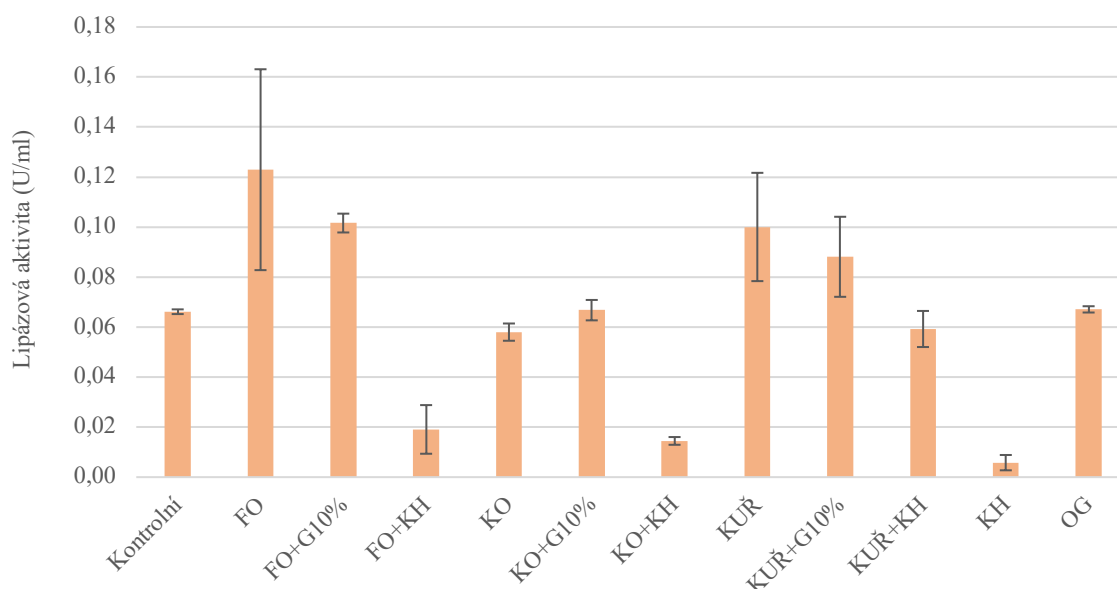
Graf 5: Produkce karotenoidů a akumulace tokoferolu kmenem *Sporidiobolus pararoseus*



Graf 6: Produkce lipofilních metabolitů kmenem *Sporidiobolus pararoseus*

5.1.1.4 Lipázová aktivita

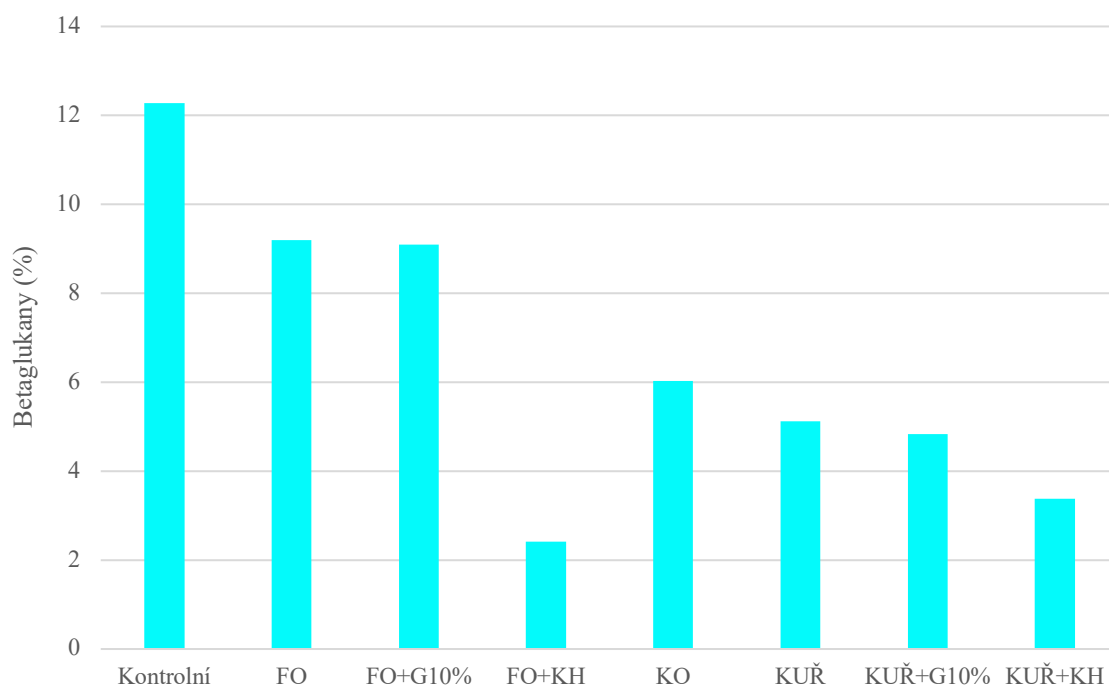
Hodnota lipázové aktivity se u kmene *Sporidiobolus pararoseus* kultivovaném na odpadních substrátech pohybovala v rozmezí 0,0058 – 0,1229 U/ml (Příloha 3). Můžeme pozorovat částečnou korelaci mezi lipázovou aktivitou, obsahem lipidů a produkcí biomasy. Nejvyšších hodnot lipázové aktivity bylo dosaženo na médiích, kde byly zaznamenány největší výtěžky biomasy s největšími obsahy lipidů. Snadno dostupné lipidické substráty (fritovací olej, kuřecí odpadní tuk) vedly k vyšší lipázové aktivitě. Nejvyšší hodnoty ($0,1229 \pm 0,402$) U/ml bylo dosaženo na médiu pouze s odpadním fritovacím olejem. Kávový olej vedl k velice nízkým aktivitám a tím pádem i k nízké produkci biomasy. V Grafu 7 můžeme pozorovat, že s přidávkou jednodušších substrátů dochází ve všech případech ke snížení lipázové aktivity. Aktivita lipáz v kontrolním médiu byla srovnatelná s lipázami v médiu s odpadním glycerolem. Nejnížší hodnoty bylo dosaženo při kultivaci se sacharidovým substrátem (kávový hydrolyzát) ($0,0058 \pm 0,0031$) U/ml.



Graf 7: Lipázová aktivita kmene *Sporidiobolus pararoseus*

5.1.1.5 Stanovení betaglukanů

Výsledky stanovení obsahu betaglukanů u vybraných kultivací kmene *Sporidiobolus pararoseus* jsou uvedeny v Grafu 8. Maximálního obsahu betaglukanů v biomase bylo dosaženo u kontrolního média a to 12,3 %. S použitím odpadních substrátů došlo ke snížení jejich obsahu v buněčné stěně. U tohoto kmene pozorujeme nejvyšší obsahy u kultivací na médiích s fritovacím olejem, následně s kávovým olejem a nejméně betaglukanů obsahovala biomasa naprodukováná na médiích s kuřecím odpadním tukem. Při použití čistě lipidického média s fritovacím olejem bylo dosaženo 9 %, při použití kávového oleje 6 % a u kuřecího tuku 5,1 %. Můžeme také pozorovat, že s přidávkou jednodušších substrátů dochází k dalšímu snížení obsahu betaglukanů v biomase.

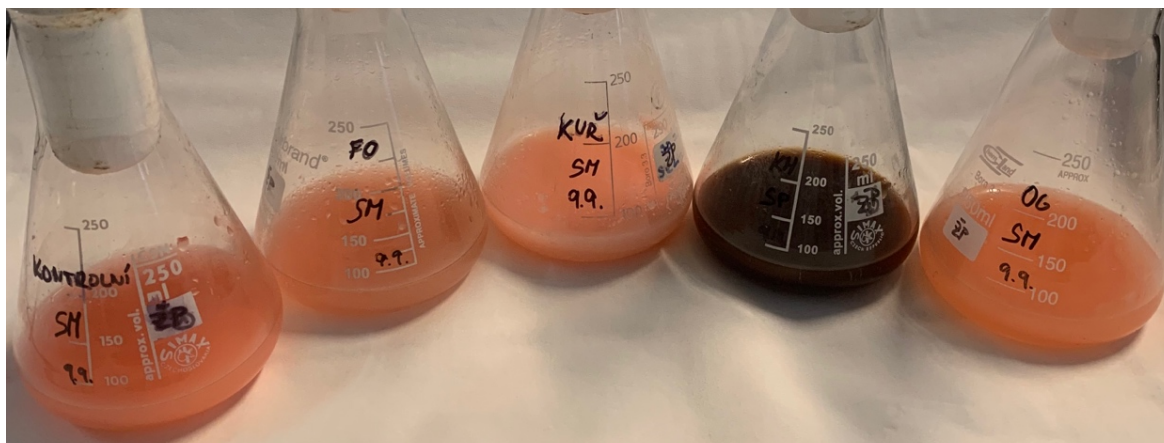


Graf 8: Obsah betaglukanů v buněčné stěně kmene *Sporidiobolus pararoseus*

5.1.1.6 Shrnutí

Kmen *Sporidiobolus pararoseus* je velmi vhodný pro kultivaci s využitím odpadních lipidických substrátů. Pro produkci biomasy jsou vhodné substráty jako odpadní fritovací olej či kuřecí odpadní tuk. Současně při využití těchto lipidických substrátů dochází k výrazným nárůstům obsahu lipidů v biomase. Naopak při použití kávového oleje dochází k poklesu produkce biomasy, ale biomasa je výrazně obohacena o karotenoidní metabolity, ubiquinon a polynenasycené mastné kyseliny (PUFA). Pro dosažení vyšší produkce biomasy při použití kávového oleje jako substrátu by bylo nutné zvýšit teplotu kultivace a zajistit emulzifikaci média, pro lepší dostupnost kávového oleje. Produkce a složení biomasy nakultivované na médiích s jednoduššími substráty (kávový hydrolyzát či odpadní glycerol) se nijak výrazně neliší od produkce na kontrolním glycerolovém médiu.

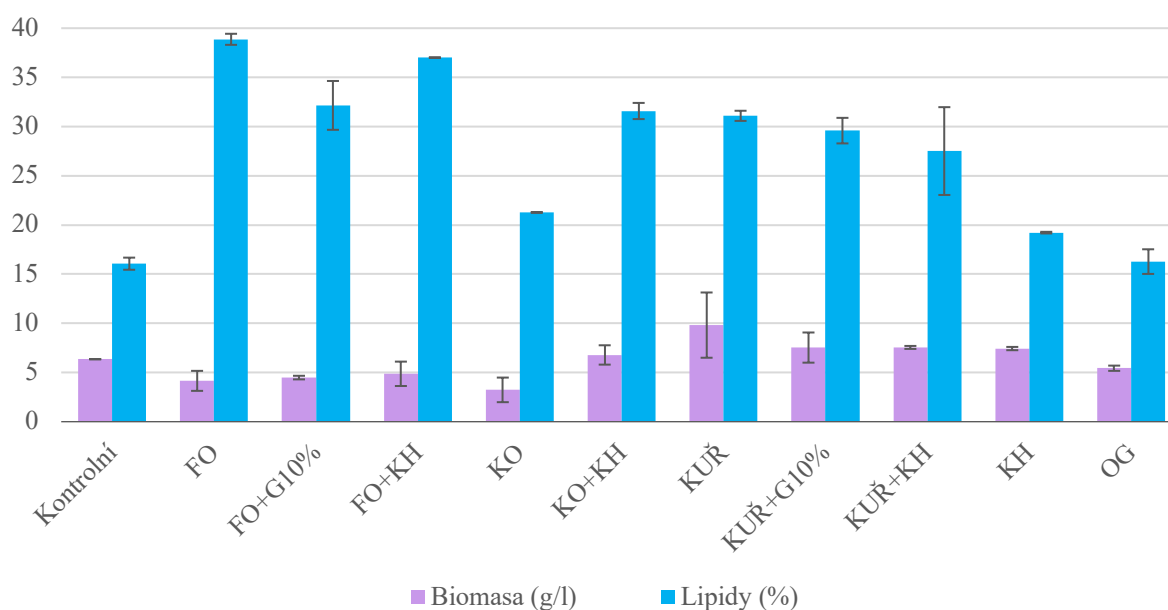
5.1.2 Produkční vlastnosti kmene *Sporidiobolus metaroseus*



Obrázek 18: Screeningová kultivace kmene *Sporidiobolus metaroseus* na čistě odpadních médiích

5.1.2.1 Produkce biomasy

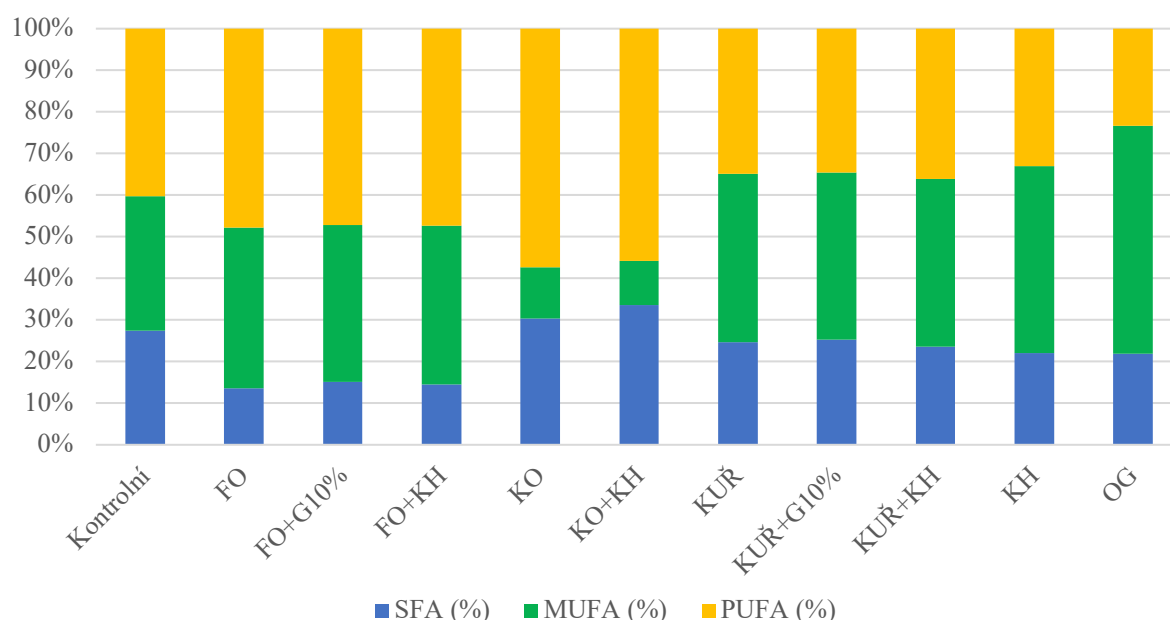
Při pohledu na Graf 9 je patrné, že kultivace kmene *Sporidiobolus metaroseus* na odpadních substrátech nijak výrazně nezvyšuje produkci biomasy (Příloha 4). U médií s kávovým olejem či odpadním fritovacím olejem dokonce došlo k poklesu produkce biomasy. U směsi kávového oleje a kávového hydrolyzátu bylo dosaženo podobných hodnot jako na kontrolním médiu, jelikož kávový hydrolyzát je jednoduchý sacharidový substrát, tudíž byl kvasinkami využit pro růst biomasy přednostně před kávovým olejem. Kultivace na kávovém oleji s 10% přídatkem glycerolu nebyla úspěšná z důvodu kontaminace. Vhodným substrátem pro navýšení produkce biomasy je odpadní kuřecí tuk. Maximální hodnoty bylo dosaženo u média se samotným odpadním kuřecím tukem a to $(9,8 \pm 3,3)$ g/l. Využití kuřecího odpadního tuku ve směsi s glycerolem či kávovým hydrolyzátem vede pouze k mírnému navýšení produkce biomasy oproti kontrolnímu glycerolovému médiu (6,3 g/l).



Graf 9: Produkce biomasy kmenem *Sporidiobolus metaroseus* a obsahu lipidů v biomase

5.1.2.2 Obsah lipidů v biomase

Biomasa naprodukována na kontrolním glycerolovém médiu vykazuje obsah lipidů ($16,1 \pm 0,6$) %. Použití odpadních lipidických substrátů zvyšuje obsah lipidů v biomase (Graf 10). Pro akumulaci lipidů do buněk je nejvhodnější použití odpadního fritovacího oleje, jehož fyzikální vlastnosti vedou k jeho snadnému zpracování kvasinkami. Současně dochází při jeho využití ke snížení SFA a navýšení UFA na přibližně 85 %. Nejvyššího obsahu lipidů bylo dosaženo za použití čistého odpadního fritovacího oleje a to ($38,9 \pm 0,6$) %. Podobné hodnoty bylo dosaženo za využití směsi odpadního fritovacího oleje a kávového hydrolyzátu a to ($37,0 \pm 0,5$) %. Jak už bylo zmíněno v přechozí části, kultivace na kuřecím tuku vede k nárstu produkce biomasy a obsah lipidů je jen mírně nižší než při použití fritovacího oleje a to ($31,6 \pm 0,8$) %, přičemž dochází oproti kontrolnímu médiu a médiím s odpadním fritovacím olejem k poklesu obsahu PUFA na 34,8 % a nárstu MUFA na 40,6 %. Kultivace na jednodušších odpadních substrátech (kávový hydrolyzát, odpadní glycerol) nevykazuje signifikantní rozdíly v obsahu lipidů vůči kontrolní kultivaci. Pouze u odpadního glycerolu bylo dosaženo maximálního obsahu MUFA a to 54,7 %, ale na úkor PUFA (23,4 %).

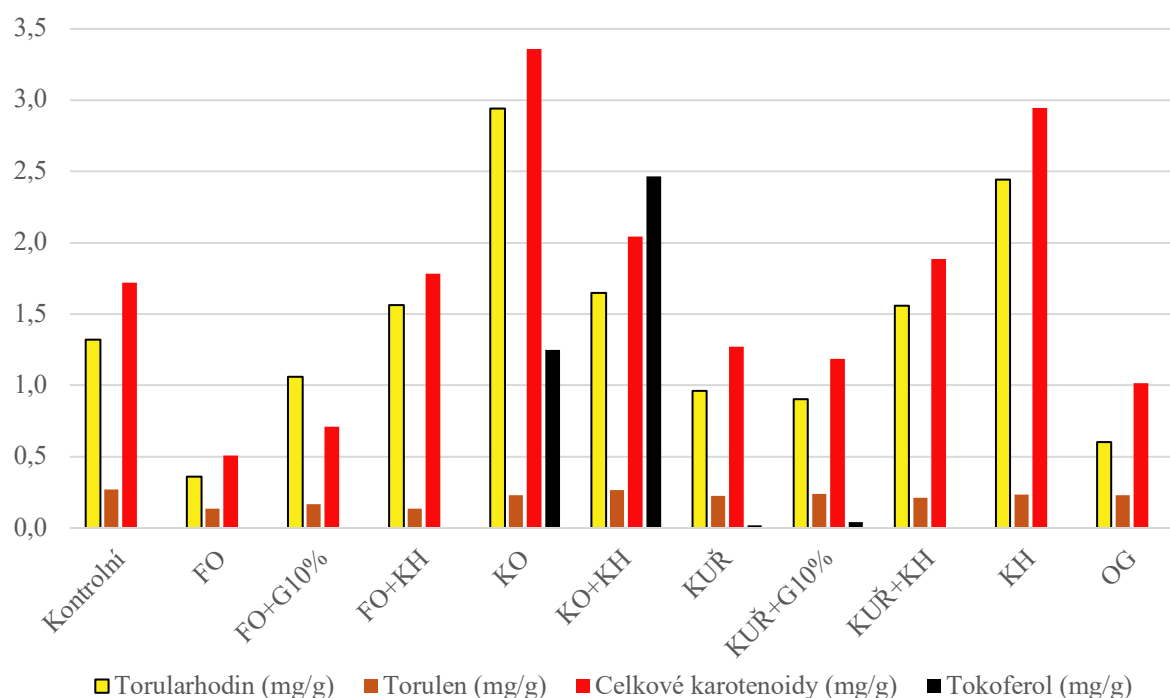


Graf 10: Složení lipidů v biomase kmene *Sporidiobolus metaroseus*

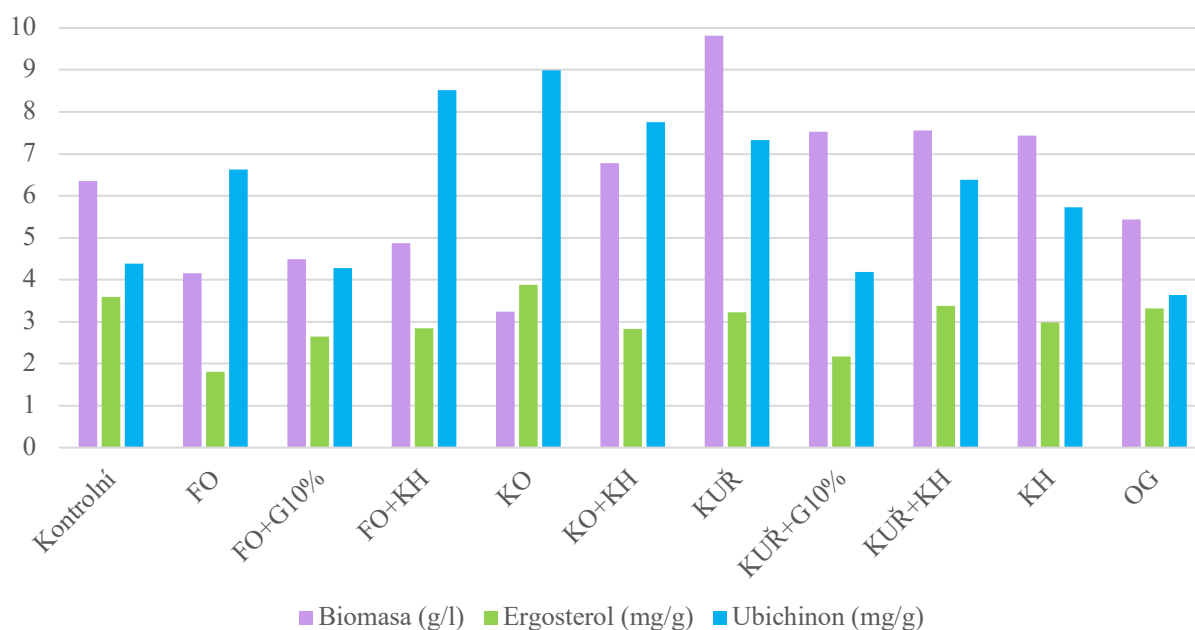
5.1.2.3 Karotenoidy a další lipofilní metabolity

Z Grafu 11 a 12 je patrné, že využití kávových odpadů jako substrátu vede k vyšší produkci karotenoidů, ergosterolu a ubiquinonu. Při použití kávového oleje je biomasa také obohacena o tokoferol, který je z kávového oleje kvasinkami akumulován. Nejlepších výtěžků bylo dosaženo při použití čistě kávového oleje. Obsah celkových karotenoidů byl 3,36 mg na gram biomasy (o 87 % více než na kontrolním médiu), z čehož majoritní zastoupení torularhodinu činilo 2,94 mg/g (nárůst o 121 % oproti kontrolnímu). Ergosterol dosáhl hodnoty 3,88 mg/g. U ubiquinonu bylo zaznamenáno zdvojnásobení jeho obsahu (8,99 mg/g). Akumulovaný tokoferol dosáhl hodnoty 1,25 mg/g.

I přes maximální hodnoty získané na médiu s kávovým olejem (Příloha 5), se kombinace kávového oleje a kávového hydrolyzátu zdá být výhodnější. Obsah karotenoidů je o 40 % menší než na kávovém oleji, ubichinonu o 14 % menší a ergosterolu o 27 %. Současně ale produkce biomasy na směsi je dvojnásobná stejně jako obsah akumulovaného tokoferolu (2,47 mg/g). Kultivace na samotném kávovém hydrolyzátu vykazovala druhý nejvyšší obsah karotenoidů a to 2,95 mg/g. Využití odpadního fritovacího oleje a kuřecího tuku není vhodné pro produkci karotenoidů (Obrázek 18) a lipofilních metabolitů, pro navýšení hodnot na úroveň kontrolního média je nutné využít jejich kombinaci s kávovým hydrolyzátem.



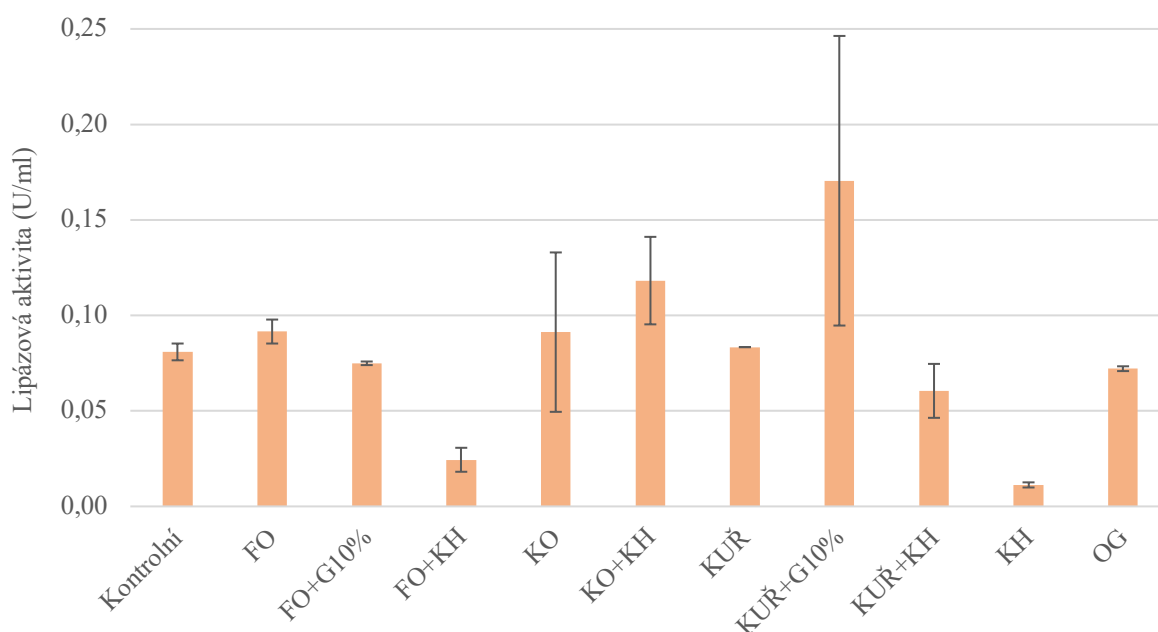
Graf 11: Produkce karotenoidů a akumulace tokoferolu kmenem *Sporidiobolus metaroseus*



Graf 12: Produkce biomasy a lipofilních metabolitů kmenem *Sporidiobolus metaroseus*

5.1.2.4 Lipázová aktivita

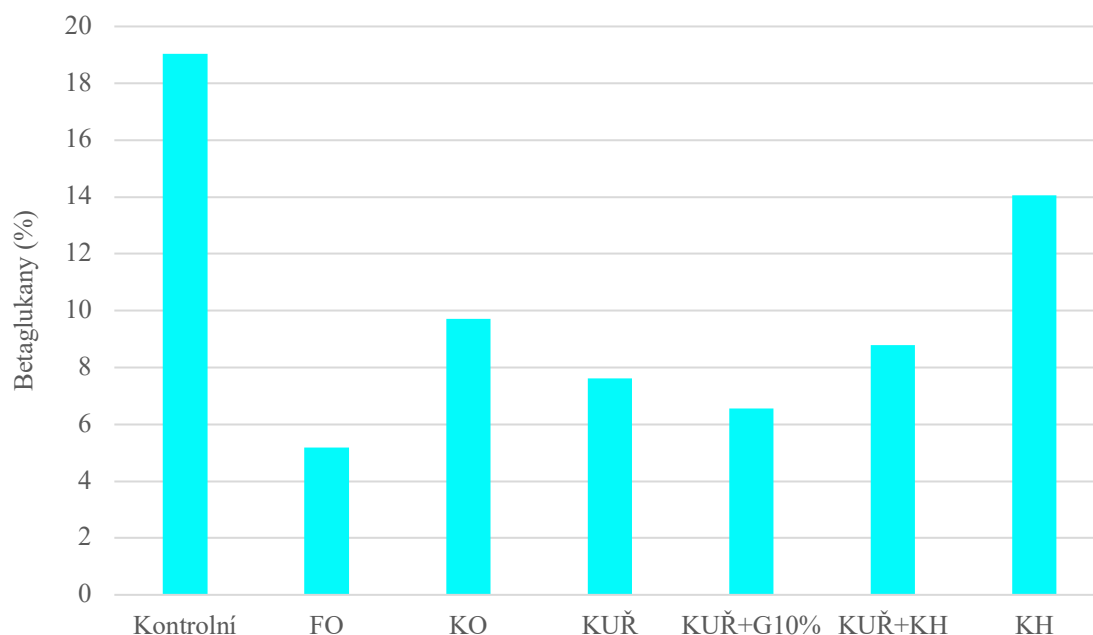
Průměrné hodnoty lipázové aktivity se u kultivací kmene *Sporidiobolus metaroseus* pohybovaly v rozmezí 0,0113-0,1705 U/ml (Příloha 6). Nejnižší lipázovou aktivitu vykazoval kmen na sacharidovém médiu (kávový hydrolyzát). U kontrolní kultivace bylo dosaženo hodnoty $(0,0809 \pm 0,0044)$ U/ml a u kultivací s lipidickými odpady bez přídavku jednodušších substrátů došlo jen k mírným nárůstům. Nejvyšší hodnoty (Graf 13) bylo dosaženo při kultivaci na kuřecím tuku s přídavkem glycerolu $(0,1705 \pm 0,0758)$ U/ml. Kmen *Sporidiobolus metaroseus* vykazuje vyšší hodnoty lipázové aktivity při použití kávového oleje, což je naopak, než je tomu u kmene *Sporidiobolus pararoseus*. Při použití kombinace kávového oleje s kávovým hydrolyzátem bylo dosaženo dokonce 2. nejvyšší hodnoty lipázové aktivity u tohoto kmene a to $(0,1182 \pm 0,0229)$ U/ml.



Graf 13: Lipázová aktivita kmene *Sporidiobolus metaroseus*

5.1.2.5 Stanovení betaglukanů

V Grafu 14 je uveden obsah betaglukanů u vybraných kultivací kmene *Sporidiobolus metaroseus*. Maximálního obsahu bylo dosaženo při kontrolní kultivaci (19,0 %) a můžeme vidět, že použití odpadních substrátů vede k nižšímu obsahu betaglukanů v buněčné stěně. Nevyššího obsahu na odpadním médiu bylo dosaženo při použití kávového hydrolyzátu a to 14,1 %. Z lipidických odpadních substrátů bylo nejvhodnější použití kávového oleje (9,7 %), naopak nejméně betaglukanů obsahovala biomasa naprodukována na médiu s fritovacím olejem a to 5,2 %. U kuřecího tuku pozorujeme, že přídavek kávového hydrolyzátu vedl k vyšším obsahům betaglukanů než při použití čistě lipidického média.

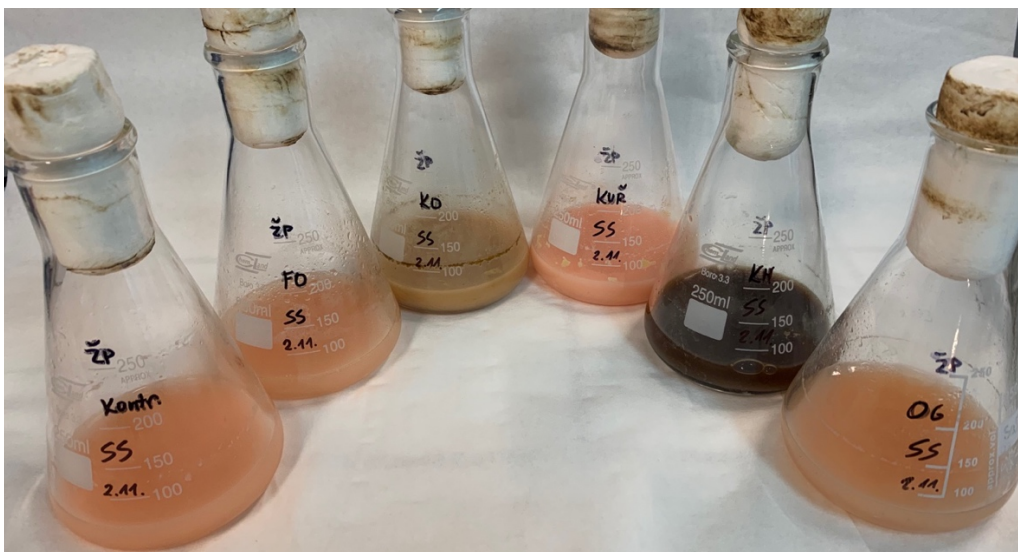


Graf 14: Obsah betaglukanů v buněčné stěně kmene *Sporidiobolus pararoseus*

4.1.2.6 Shrnutí

Nejvhodnějším substrátem pro obohacení biomasy kmene *Sporidiobolus metaroseus* je kombinace kávového oleje a kávového hydrolyzátu (9:1). Kultura nejprve spotřebovává sacharidový substrát (kávový hydrolyzát) pro růst biomasy a následně začne využívat lipidický substrát (kávový olej), který výrazně napomáhá obohacení biomasy o polynenasycené mastné kyseliny, tokoferol, karotenoidy, ergosterol i ubiquinon. Nejvýznamnější mastnou kyselinou obsaženou v biomase při této kultivaci byla kyselina linolová, která se řadí mezi omega 6 mastné kyseliny. Současně je tato kombinace ekonomicky výhodná, jelikož oba substráty pochází z jednoho odpadu – kávové sedliny a dojde tak k největšímu využití tohoto odpadu. Mírného zvýšení produkce biomasy s vyšším obsahem karotenoidů docílíme použitím pouze kávového hydrolyzátu, ale ostatní sledované parametry dosahují výrazně menších hodnot. Použití kuřecího odpadního tuku je výhodné pouze z pohledu produkce biomasy.

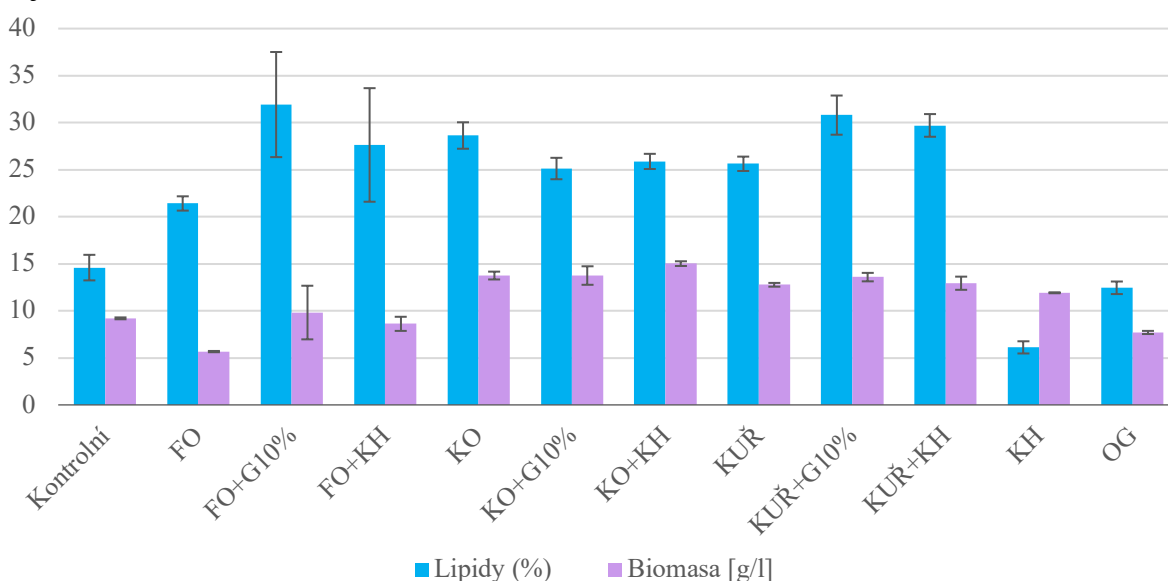
5.1.3 Produkční vlastnosti kmene *Sporidiobolus salmonicolor*



Obrázek 19: Screeningová kultivace kmene *Sporidiobolus salmonicolor* na čistě odpadních médiích

5.1.3.1 Produkce biomasy

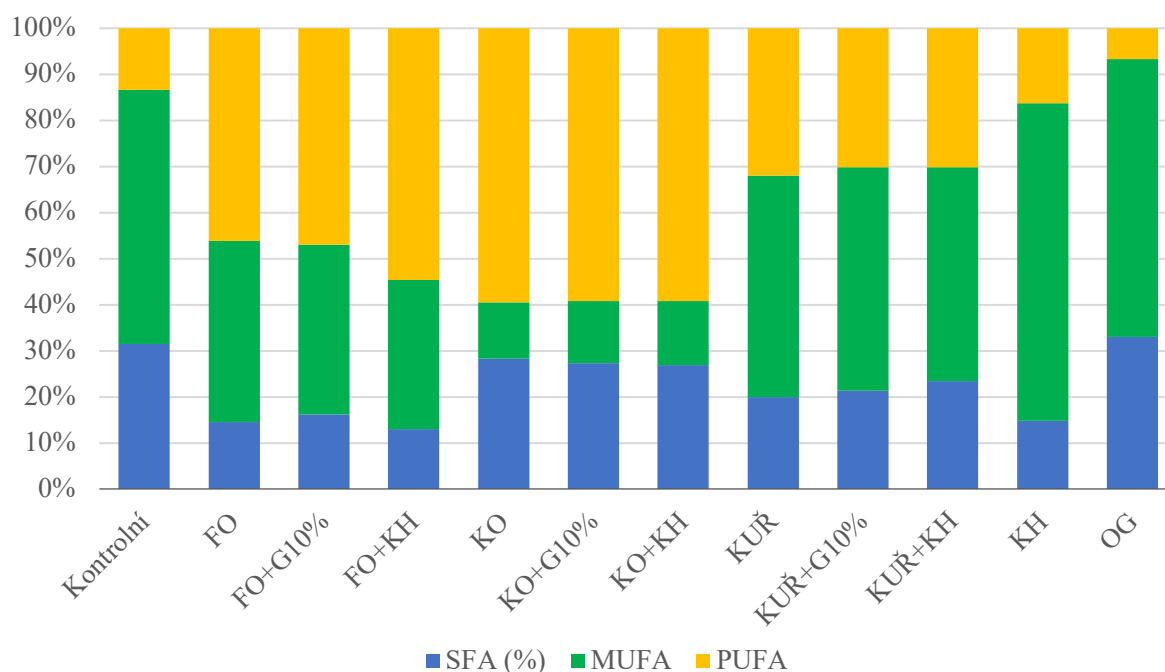
Kmen *Sporidiobolus salmonicolor* vykazuje dle Grafu 15 skvělou schopnost utilizace kávového oleje. Na čisté lipidickém médiu s kávovým olejem byla produkce biomasy ($13,8 \pm 0,4$) g/l. Maximálního výtěžku, který činil ($15,0 \pm 0,2$) g/l, bylo dosaženo na médiu s kávovým olejem s přidavkem kávového hydrolyzátu, který na počátku kultivace sloužil jako jednoduchý zdroj energie pro růst kultury. V tomto případě jde o 63% nárůst oproti kontrolnímu médiu. Druhým vhodným lipidickým substrátem byl kuřecí odpadní tuk. Při kultivaci na čistě lipidickém médiu bylo dosaženo výtěžku ($12,8 \pm 0,2$) g/l. I samotný kávový hydrolyzát vedl k nárůstu oproti kontrolnímu médiu o 30 %. Nevhodným substrátem se jeví odpadní fritovací olej.



Graf 15: Produkce biomasy kmenem *Sporidiobolus salmonicolor* a obsahu lipidů v biomase

5.1.3.2 Obsah lipidů

Kultivace kmene *Sporidiobolus salmonicolor* na kontrolním glycerolovém médiu poskytla ($14,8 \pm 0,2$) % lipidů s majoritním zastoupením mononenasycených mastných kyselin (55,23 %). Použití všech lipidických substrátů vedlo k navýšení obsahu lipidů. Maximální hodnoty bylo dosaženo při kultivaci na fritovacím oleji s přidavkem glycerolu ($31,9 \pm 5,6$) %. Z čistě odpadních médií byl výtěžek největší u odpadního kuřecího tuku s přidavkem kávového hydrolyzáta a to ($29,7 \pm 2,0$) % přičemž došlo k mírnému snížení obsahu SFA a MUFA, PUFA tak vzrostla na 30,21 %. K výraznému obohacení biomasy o polynenasycené mastné kyseliny vede využití kávového oleje (Příloha 7), v Grafu 16 můžeme vidět, že zastoupení PUFA u všech médií s kávovým olejem dosahovalo téměř 60 %. Maximální hodnoty bylo dosaženo při kultivaci pouze s kávovým olejem a to 59,5 % a obsah lipidů v biomase činil 28,6 %. Při kultivaci s největším výtěžkem biomasy (směs kávového oleje s kávovým hydrolyzátem) bylo dosaženo zastoupení lipidů ($25,9 \pm 0,8$) % a z toho PUFA tvořila 59,22 %.

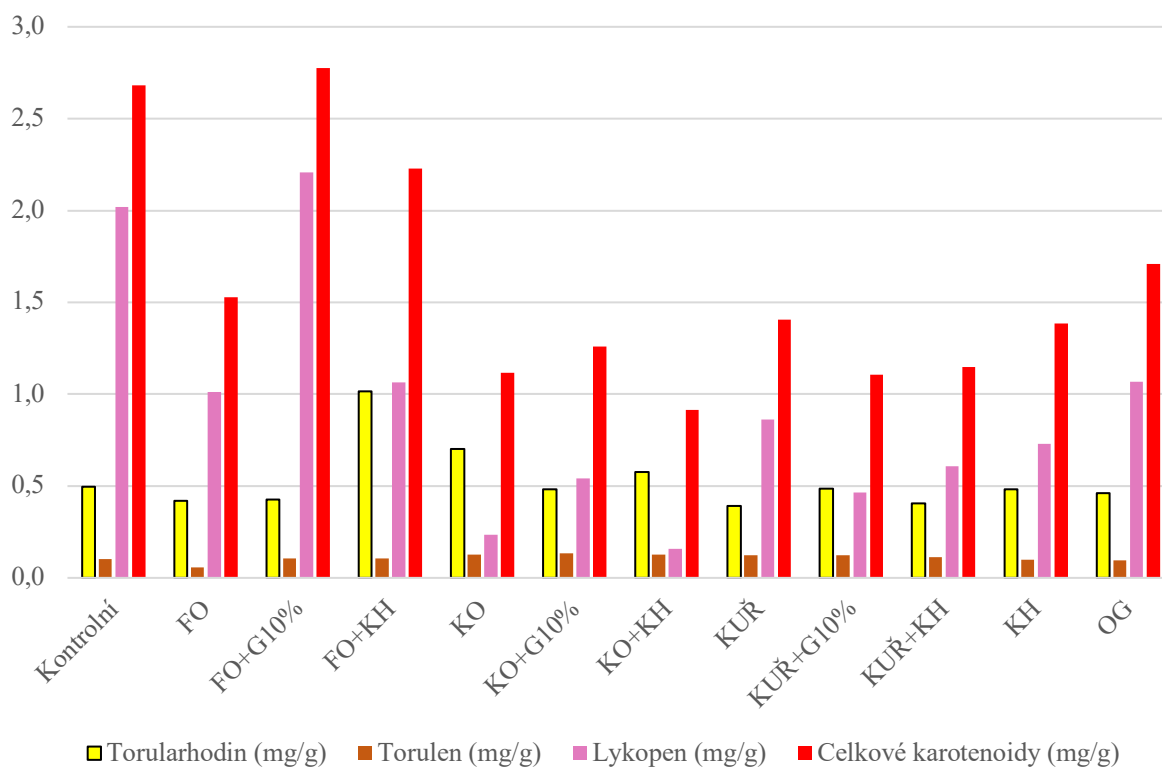


Graf 16: Složení lipidů v biomase kmene *Sporidiobolus salmonicolor*

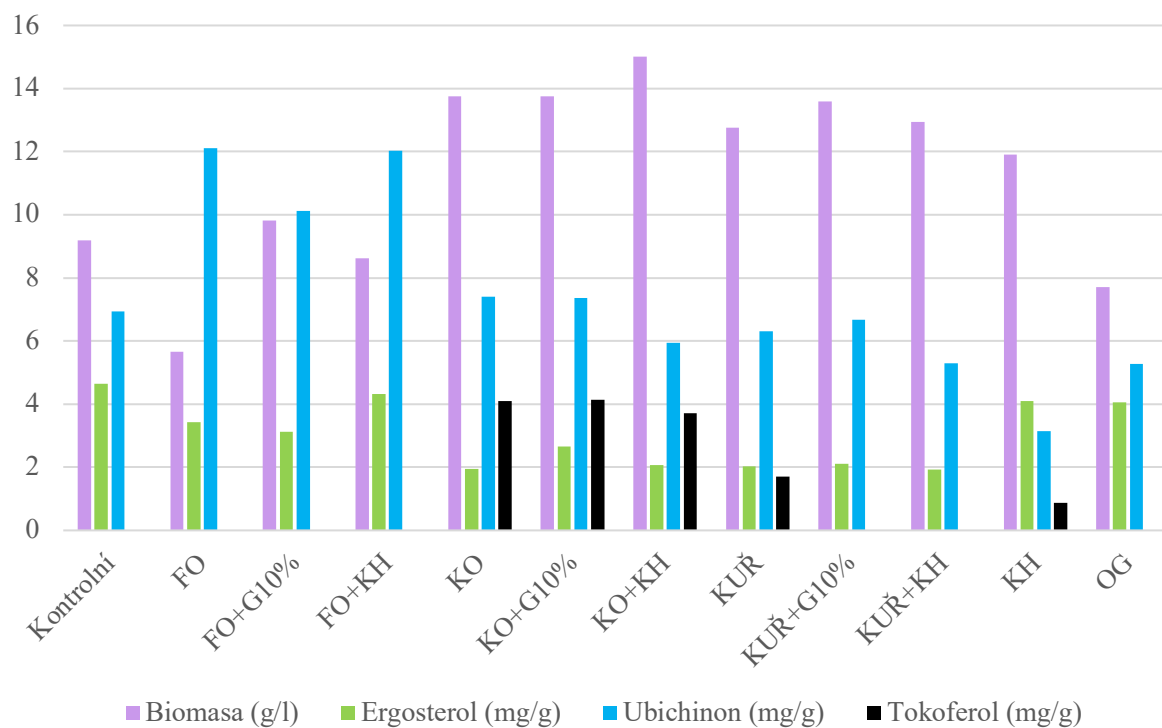
5.1.3.3 Karotenoidy a další lipofilní metabolity

U tohoto kmene nebyl pozorován signifikantní nárůst produkce karotenoidů či ergosterolu při kultivacích na odpadních substrátech (Obrázek 19). Při kontrolní kultivaci bylo dosaženo 2,68 mg karotenoidů na gram biomasy s majoritním zastoupením lykopenu (Graf 17), ergosterol dosáhl maximální hodnoty 4,64 mg/g biomasy. K výraznému nárůstu došlo u produkce ubiquinonu při použití odpadního fritovacího oleje (Graf 18). Při kultivaci pouze s fritovacím olejem bylo dosaženo 75% nárůstu (12,12 mg/g) a u kultivace s přidavkem kávového hydrolyzáta o 73,5 % (12,04 mg/g) oproti kontrolní kultivaci. Na směsi fritovacího oleje a kávového hydrolyzáta bylo současně dosaženo 3. největšího obsahu karotenoidů a to 2,23 mg/g a druhé nejvyšší produkce ergosterolu 4,33 mg/g. Použití kávového oleje vedlo ke snížení obsahu karotenoidů i ergosterolu, ale biomasa byla obohacena o tokoferol. Při

kultivaci jen s kávovým olejem byla koncentrace tokoferolu 4,1 mg/g, karotenoidy poklesly o více jak 40 % (Příloha 8).



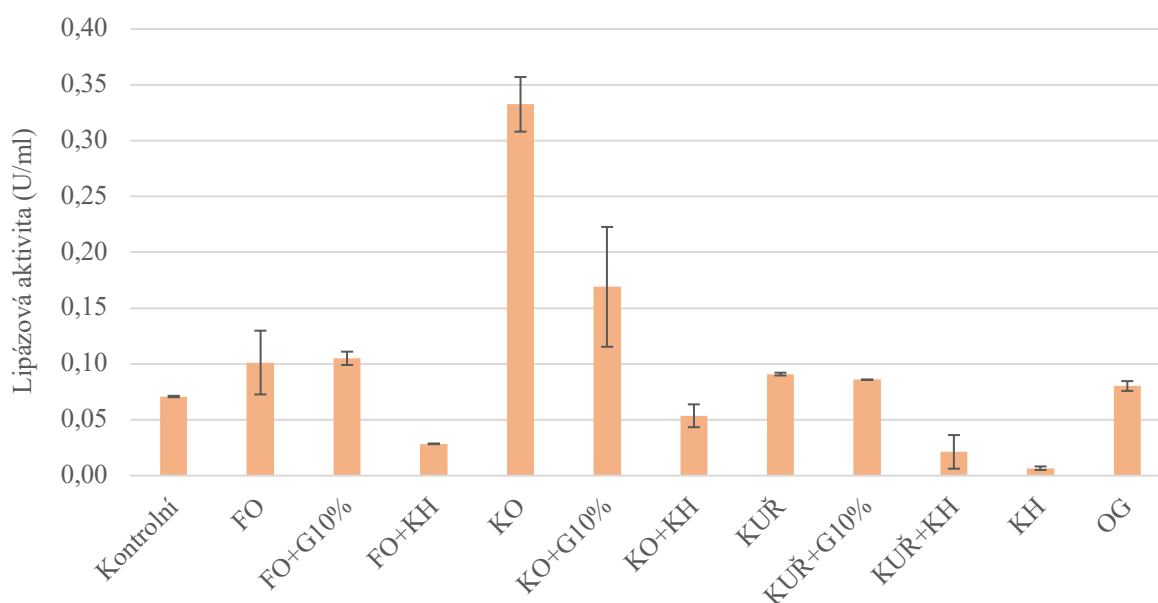
Graf 17: Produkce karotenoidů kmenem *Sporidiobolus salmonicolor*



Graf 18: Produkce biomasy, schopnost produkce a akumulace lipofilních metabolitů kmenem *Sporidiobolus salmonicolor*

5.1.3.4 Lipázová aktivita

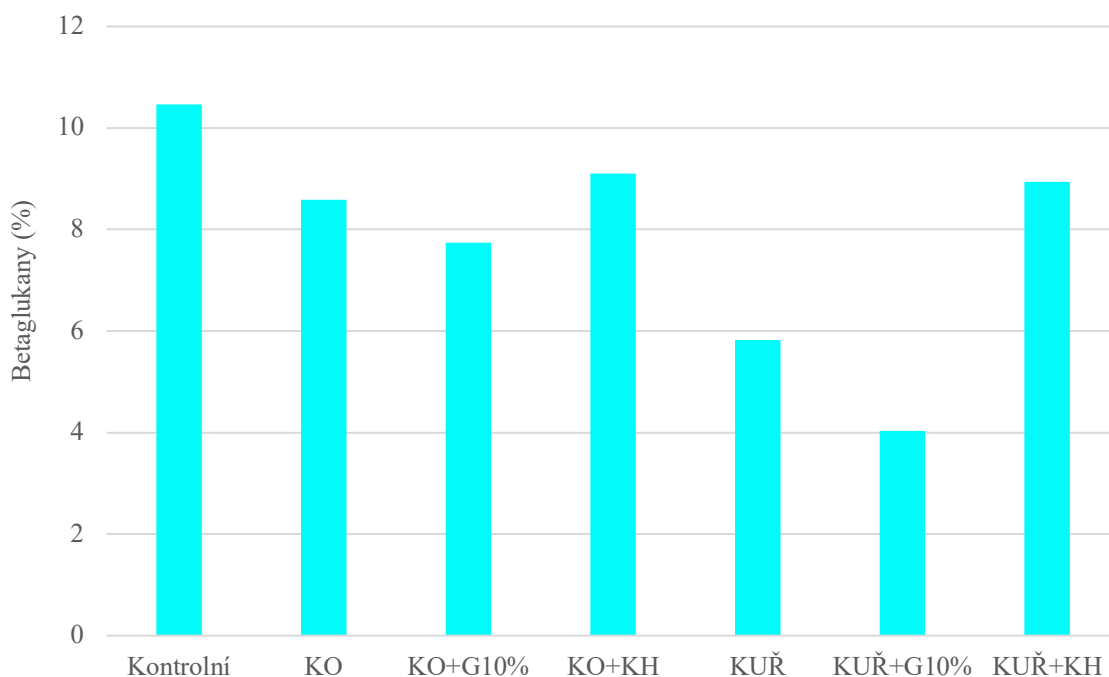
Hodnoty lipázové aktivity u kmene *Sporidiobolus salmonicolor* se pohybovaly v rozmezí 0,0066 – 0,3325 U/ml (Graf 19). Nejvyšší lipázová aktivita byla zjištěna na médiu s kávovým olejem bez přísad a to $(0,3325 \pm 0,0245)$ U/ml. U kultivací na kávovém oleji s přísadami pozorujeme snížení aktivity lipáz oproti čistě lipidickému médiu (Příloha 9). Také je zde patrná korelace lipázové aktivity a produkce biomasy. Výjimkou je médium KO+KH, kdy bylo dosaženo nejvyšší produkce biomasy, ale lipázová aktivita je nízká. To nám dokazuje, že kmen spotřebovával primárně sacharidový zdroj – kávový hydrolyzát a nebylo nutné produkovat velké množství lipáz. U kultivací s dalšími lipidickými substráty (fritovací olej, kuřecí tuk) nedošlo k výrazné změně lipázové aktivity mezi kultivacemi na čistém lipidickém médiu a s 10% přísadkou glycerolu. Přítomnost kávového hydrolyzáta vede k významnému snížení lipázové aktivity. Nejnižší aktivita byla zaznamenána u média pouze s kávovým hydrolyzátem a to $(0,0066 \pm 0,0016)$ U/ml. Při použití odpadního glycerolu nepozorujeme výrazné změny v lipázové aktivitě oproti kontrolnímu médiu s chemicky čistým glycerolem.



Graf 19: Lipázová aktivita kmene *Sporidiobolus salmonicolor*

5.1.3.5 Betaglуканы

Maximálního obsahu betaglukanů u kmene *Sporidiobolus salmonicolor* bylo dosaženo při kultivaci na kontrolním médiu a to 10,5 %. Dále bylo stanovení betaglukanů provedeno u médií s kávovým olejem a kuřecím odpadním tukem. V Grafu 20 můžeme pozorovat trend, kdy lipidická média s přísadkou sacharidů ve formě kávového hydrolyzáta vedou k vyšším hodnotám než u samotného lipidického média. Nejnižších obsahů bylo dosaženo za přísadku glycerolu k lipidickému substrátu. Z výsledků je patrné, že vyšších hodnot je docíleno při použití kávového oleje. Nejvyšší hodnoty na čistě odpadním médiu bylo dosaženo při kultivaci na kávovém oleji s přísadkou kávového hydrolyzáta a to 9,1 % betaglukanů v biomase.



Graf 20: Obsah betaglukanů v buněčné stěně kmene *Sporidiobolus salmonicolor*

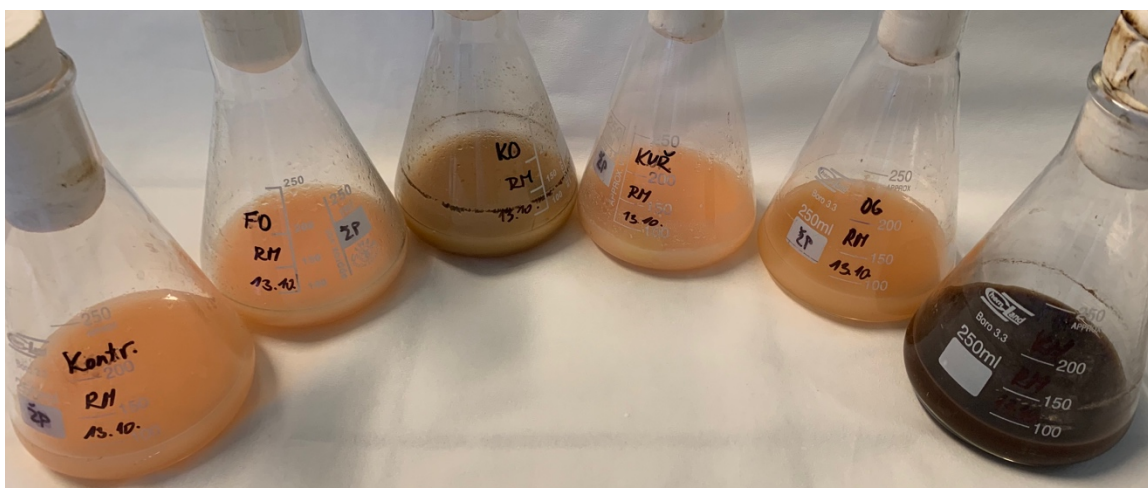
5.1.3.6 Shrnutí

Kmen *Sporidiobolus salmonicolor* vykazuje opačný trend než většina kmenů. Ty u kávového oleje převážně dosahují malých výtěžků biomasy, která obsahuje velké množství karotenoidů. *Sporidiobolus salmonicolor* dosahuje nejvyšších výtěžků biomasy právě na kávovém oleji a jeho směsích s jednoduššími substráty, ale karotenoidy jsou více produkovány u kontrolní kultivace a při využití fritovacího oleje či kuřecího odpadního tuku.

Pokud je cílem vysoká produkce biomasy je nejvhodnější využít ke kultivaci médium s kávovým olejem – $(13,8 \pm 0,4)$ g/l. Takto naprodukovaná biomasa je výrazně obohacena o polynenasycené mastné kyseliny s majoritním zastoupením kyseliny linolové a dále je biomasa výrazně obohacena o tokoferol. Obsah karotenoidů je 1,12 mg na gram biomasy a ubiquinon dosáhl 7,4 mg na gram biomasy.

Pro dosažení biomasy obohacené o karotenoidy je nejvhodnější využití média se směsí fritovacího oleje s přidavkem kávového hydrolyzátu. Produkce biomasy je pouze $(8,6 \pm 0,8)$ g/l, ale obsah PUFA je oproti kultivaci na kávovém oleji nižší jen o 5 % a současně obsah SFA je nejnižší. Takto naprodukovaná biomasa obsahovala více karotenoidů (2,23 mg/g), ergosterolu (4,33 mg/g) a ubiquinonu (12,04 mg/g).

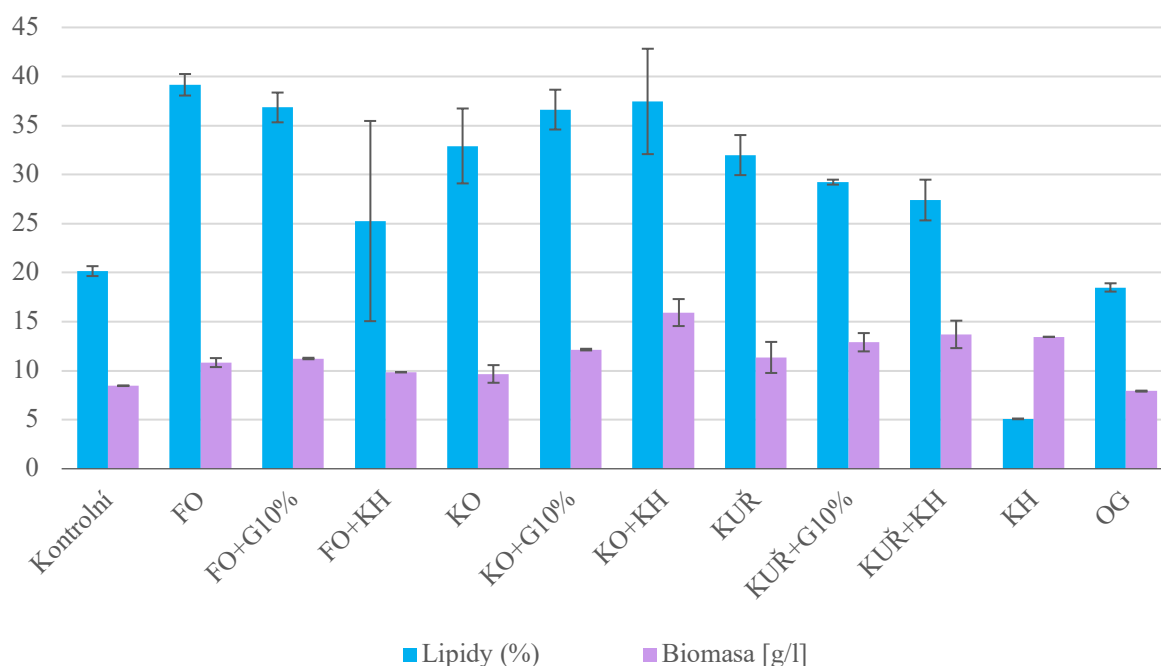
5.1.4 Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula mucilaginosa*



Obrázek 20: Screeningová kultivace kmene *Rhodotorula mucilaginosa* na odpadních médiích

5.1.4.1 Produkce biomasy

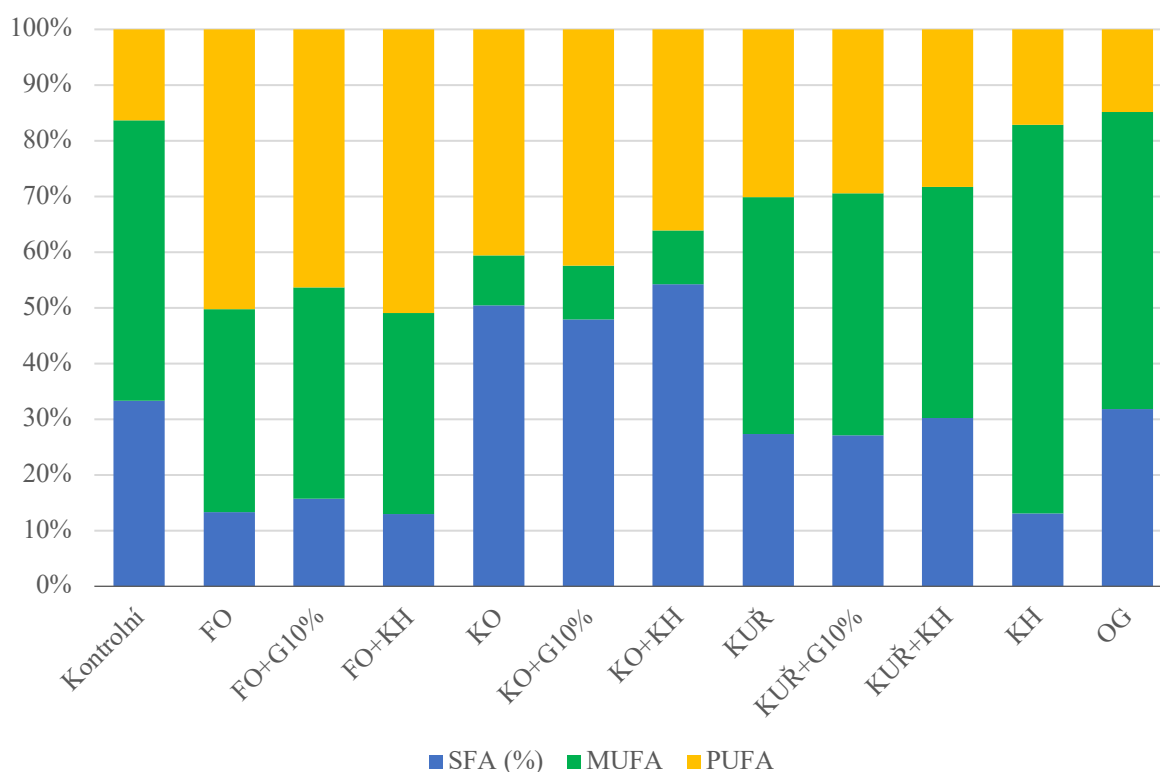
Z Grafu 20 je patrné, že pro kmen *Rhodotorula mucilaginosa* jsou odpadní substráty vhodné pro navýšení produkce biomasy. U všech médií, kromě odpadního glycerolu je možné pozorovat zvýšené produkce biomasy oproti kontrolní kultivaci. Nejvyšší produkce bylo dosaženo na médiu se směsí kávového oleje a kávového hydrolyzátu a to $(15,9 \pm 1,4)$ g/l biomasy, což je nárůst o 88 % oproti kontrolnímu glycerolovému médiu. Druhé nejvyšší hodnoty bylo dosaženo na směsi kuřecího tuku a kávového hydrolyzátu $(13,7 \pm 1,4)$ g/l. V obou případech můžeme pozorovat nárůst biomasy oproti kultivaci na samotném lipidickém substrátu. Kávový hydrolyzát, jako jednoduchý sacharidový substrát, je přednostně využíván a napomáhá růstu kultury.



Graf 20: Produkce biomasy kmenem *Rhodotorula mucilaginosa* a obsahu lipidů v biomase

5.1.4.2 Obsah lipidů v biomase

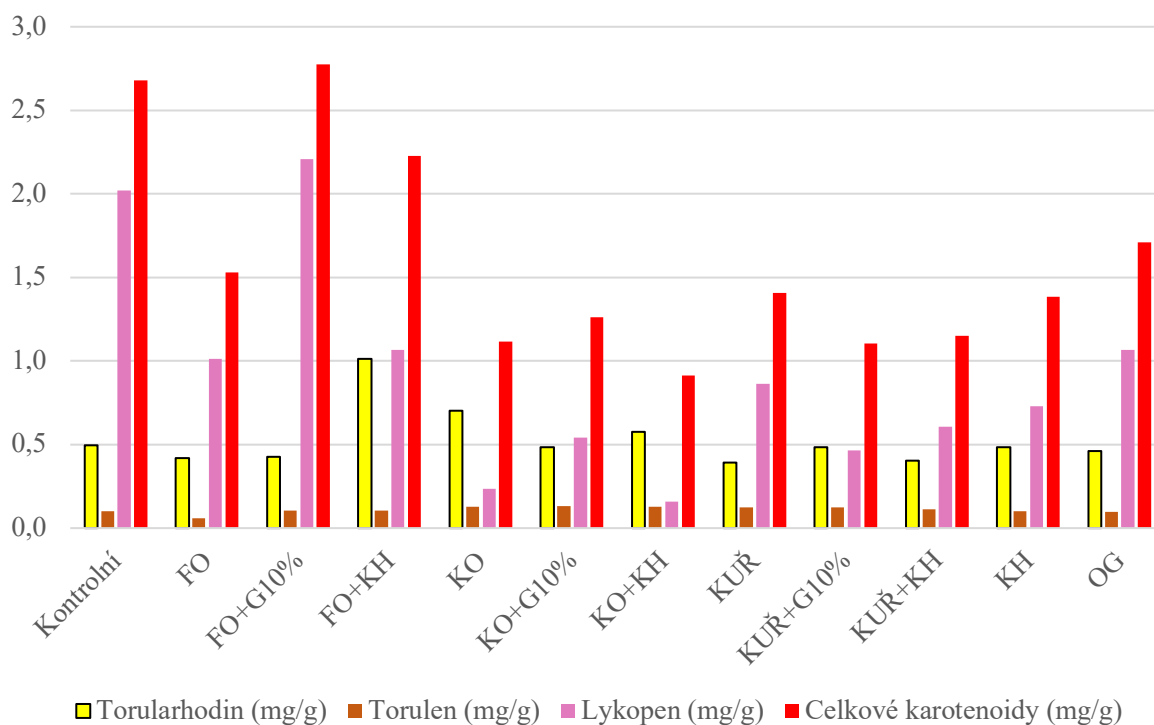
Z Grafu 20 je patrné, že využití odpadních lipidických substrátů výrazně navyšuje obsah lipidů v biomase. Při kultivaci na kontrolním glycerolovém médiu bylo dosaženo ($20,2 \pm 0,5$) % lipidů v biomase s dominantním zastoupením mononenasycených mastných kyselin (50,3 %) a velice nízkým zastoupením polynenasycených mastných kyselin (16,4 %). Velice podobných hodnot bylo dosaženo i při kultivaci na odpadním glycerolu. Využití odpadních lipidických substrátů vedlo k navýšení obsahu lipidů v biomase na 25–40 % (Příloha 10). Nejvyšší nárůst lipidů a současně navýšení PUFA bylo dosaženo za využití fritovacího oleje. Nejvíce lipidů obsahovala biomasa kmene *Rhodotorula mucilaginosa* kultivovaná pouze na odpadním fritovacím oleji a to ($39,2 \pm 1,1$) %, přičemž zastoupení PUFA bylo 50,2 %. Využití kávového oleje vedlo k nárustu obsahu lipidů nad 30 %, současně došlo k navýšení PUFA, ale ne tak výrazně jako u fritovacího oleje. Přídavek jednoduššího substrátu ke kávovému oleji napomohl nejen produkci biomasy, ale také jejímu obohacení o lipidy. Při kultivaci na kávovém oleji s kávovým hydrolyzátem bylo dosaženo nejen nejvyšší produkce biomasy, ale taktéž k druhému největšímu obsahu lipidů a to ($37,5 \pm 5,4$) %. Při kultivacích s obsahem kávového oleje můžeme pozorovat výrazné změny v profilu mastných kyselin oproti ostatním substrátům (Graf 21). Došlo k výraznému nárustu SFA na hodnoty kolem 50 %, obsah MUFA poklesl na < 10 % a PUFA se pohybovaly kolem 40 %.



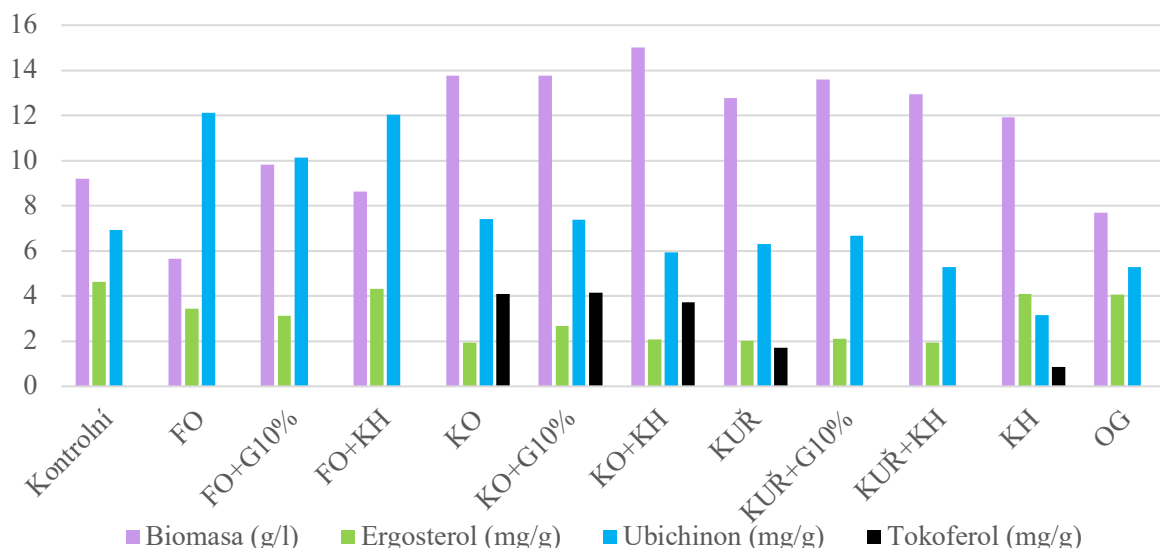
Graf 21: Složení lipidů v biomase kmene *Rhodotorula mucilaginosa*

5.1.4.3 Karotenoidy a další lipofilní metabolity

U kmene *Rhodotorula mucilaginosa* nedošlo při kultivacích na odpadních substrátech k zvýšení produkce karotenoidů (Obrázek 20, Příloha 11)). Nejvyšší hodnoty celkových karotenoidů bylo dosaženo na kontrolním glycerolovém médiu (4,8 mg/g) a následně na odpadním glycerolu (4,7 mg/g) u zbylých médií došlo k poklesu o 20–40 %. Ve všech případech pozorujeme majoritní zastoupení lykopenu až 97 % (Graf 22). Pouze na médiu s kávovým hydrolyzátem lykopen tvořil 58,4 % a torulen 40 %. U kultivace na odpadním glycerolu bylo dosaženo hodnoty 4,54 mg lykopenu na gram biomasy. Pro zvýšení obsahu ergosterolu u kmene *Rhodotorula mucilaginosa* je vhodné využití jednoduchých substrátů jako je glycerol či kávový hydrolyzát (Graf 23). Nejvyšší hodnoty bylo dosaženo při kultivaci na odpadním glycerolu (3,93 mg/g) a na kontrolním glycerolovém médiu (3,85 mg/g). Při použití odpadních lipidických substrátů došlo ke snížení obsahu ergosterolu, nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití odpadního fritovacího oleje s přidavkem kávového hydrolyzátu, kdy došlo ke snížení jen o 5 %. U kávového oleje či kuřecího tuku došlo k poklesům o 25–40 %. Pro obohacení biomasy o ubiquinon je vhodné použití kávového oleje, popř. odpadního fritovacího oleje. Naopak nevhodné substráty jsou odpadní kuřecí tuk, kávový hydrolyzát či odpadní glycerol. Při kultivaci na kávovém oleji bylo dosaženo produkce ubiquinonu 12 mg/g (nárůst o 140 % oproti kontrolnímu médiu). Kultivací na směsi kávového oleje s kávovým hydrolyzátem, jež se dosáhlo nejvyšší produkce biomasy (o 60 % více než na kávovém oleji), bylo dosaženo 8,54 mg/g ubiquinonu (pouze o 29 % méně než na kávovém oleji). Současně jsou média obsahující kávový olej vhodná pro obohacování biomasy o tokoferol, který je z něj kvasinkami akumulován. V případě média pouze s kávovým olejem to bylo 22,97 mg/g biomasy a při jeho kombinaci s kávovým hydrolyzátem 19,08 mg/g biomasy.



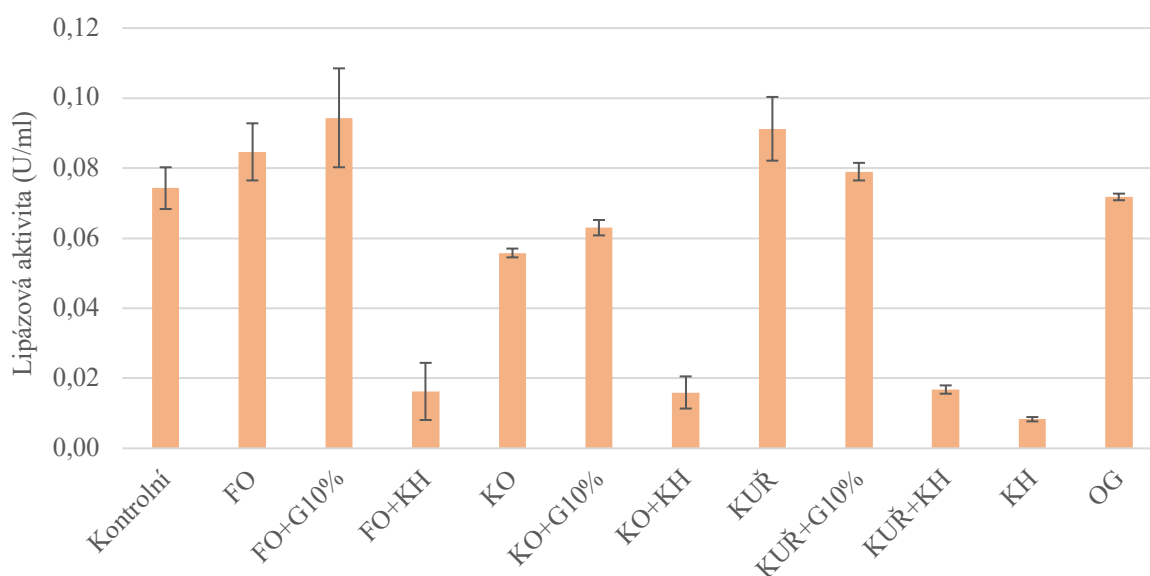
Graf 22: Produkce karotenoidů kmenem *Rhodotorula mucilaginosa*



Graf 23: Produkce biomasy, schopnost produkce a akumulace lipofilních metabolitů kmenem *Rhodotorula mucilaginosa*

5.1.4.4 Lipázová aktivita

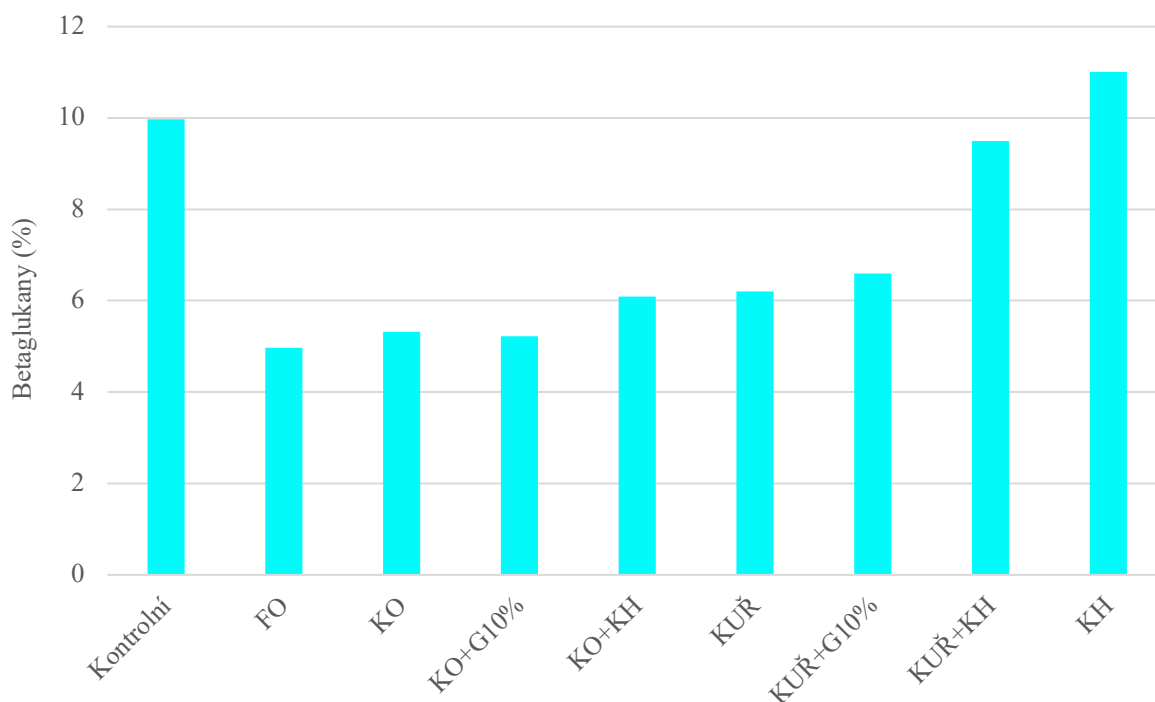
Lipázová aktivita kmene *Rhodotorula mucilaginosa* se pohybovala v rozmezí 0,0083 – 0,0944 U/ml (Příloha 12). Z Grafu 24 je patrné, že ani použití lipidických substrátů nevedlo k výraznému nárůstu. U kontrolní kultivace dosáhla lipázová aktivita hodnoty $(0,0743 \pm 0,0060)$ U/ml a nejvyšší aktivita byla zaznamenána při použití fritovacího oleje s přidavkem glycerolu $(0,0944 \pm 0,0141)$ U/ml. Z pohledu na data pro média s fritovacím olejem a kuřecím tukem je patrné, že vyšší lipázová aktivita vedla k zvýšené akumulaci lipidů. Taktéž je patrné, že přidavek kávového hydrolyzátu k lipidickým substrátům vede k výraznému snížení lipázové aktivity, kmen více zpracovává přítomné sacharidy. Lipázová aktivita při kultivaci na odpadním glycerolu dosahuje velice podobných hodnot jako při kultivaci na kontrolním médiu s chemicky čistým glycerolem.



Graf 24: Lipázová aktivita kmene *Rhodotorula mucilaginosa*

5.1.4.5 Betaglуканы

Kontrolní kultivace kmene *Rhodotorula mucilaginosa* vykazovala obsah betaglуканů 10,0 %. V Grafu 25 můžeme vidět, že využití sacharidového média (kávový hydrolyzát) došlo k navýšení obsahu betaglуканů na 11,0 %. Využití lipidických substrátů vedlo ke snížení obsahu betaglуканů. Nejvyšších obsahů na lipidických odpadních substrátech bylo dosaženo při použití kuřecího odpadního tuku (6,2 % čistě lipidické). Přídavek kávového hydrolyzátu k lipidickému substrátu zvyšuje obsah betaglуканů v biomase. Při kultivaci s kuřecím tukem s přídavkem kávového hydrolyzátu bylo dosaženo hodnoty 9,5 %, což je jen o 0,5 % méně než u kontrolní kultivace.

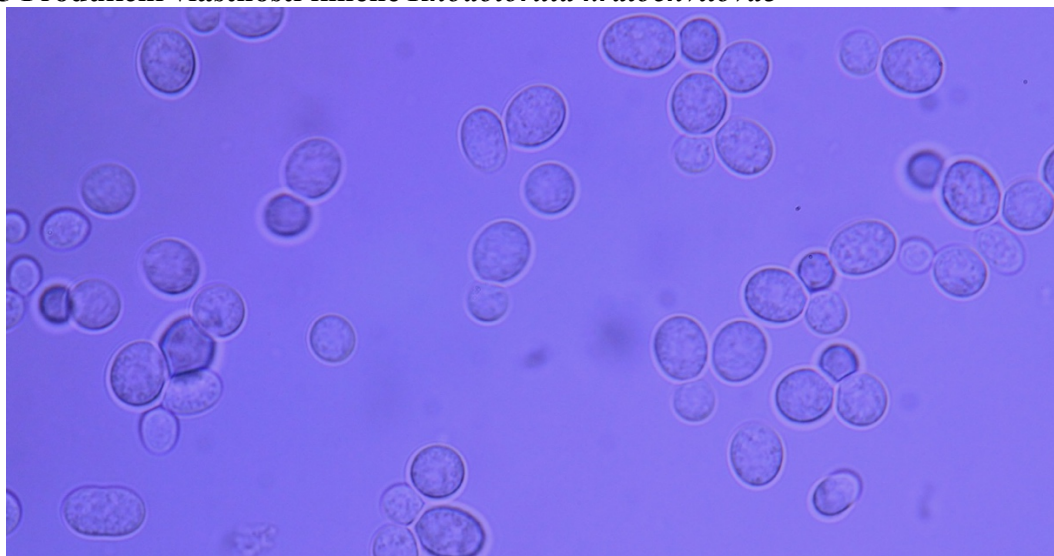


Graf 25: Obsah betaglуканů v buněčné stěně kmene *Rhodotorula mucilaginosa*

5.1.4.6 Shrnutí

Nejvhodnějším médiem pro kultivaci kmene *Rhodotorula mucilaginosa* je směs kávového oleje s kávoým hydrolyzátem. Při použití tohoto média bylo dosaženo nejvyšší produkce biomasy a současně druhého nejvyššího obsahu lipidů v biomase, neobvyklým jevem je ale vysoké zastoupení SFA. Biomasa je současně díky kávovému oleji obohacována o tokoferol, jehož obsah dosáhl hodnoty 19,08 mg na gram biomasy. Velice vhodným médiem pro kultivaci tohoto kmene je také kombinace odpadního fritovacího oleje jako substrátu. Při jeho použití bez přídavku jednoduššího substrátu bylo dosaženo nižší produkce biomasy ($10,8 \pm 0,5$) g/l, ale byl zaznamenán nejvyšší obsah lipidů ($39,2 \pm 1,1$) %. Takto vyprodukovaná biomasa je obohacena o polynenasycené mastné kyseliny, které tvořily přes 50 % obsahu lipidů a současně nasycené mastné kyseliny byly potlačeny na minimum. Zároveň zde bylo dosaženo nejvyšší produkce karotenoidů na médiích s obsahem lipidického substrátu. Kmen *Rhodotorula mucilaginosa* je vhodný pro produkci lykopenu, který byl majoritním karotenoidem (u ostatních kmenů je jím torularhodin).

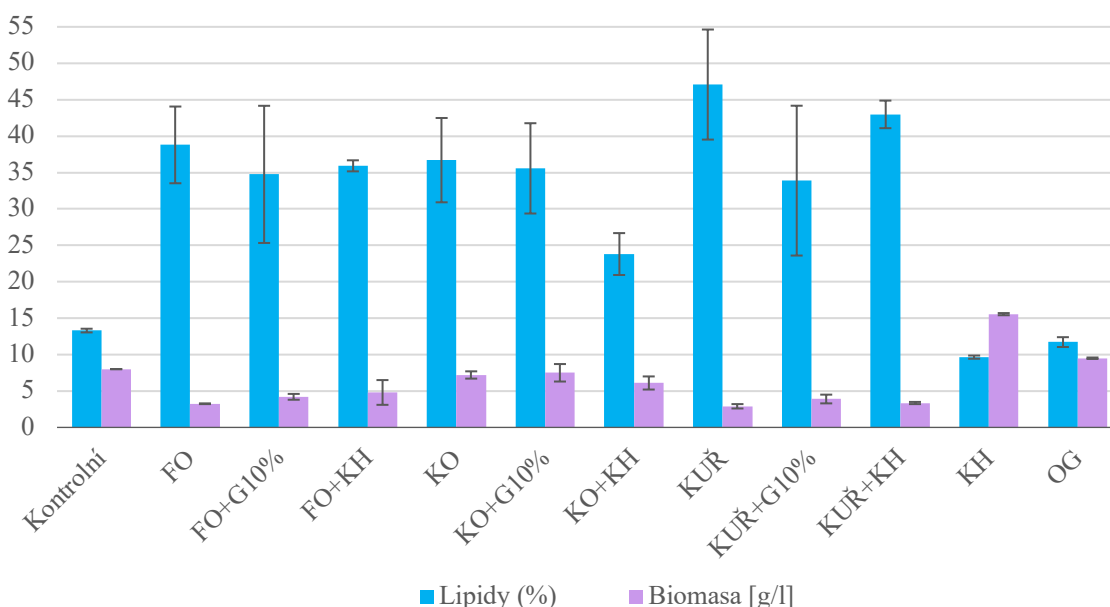
5.1.5 Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula kratochvilovae*



Obrázek 21: Snímek z mikroskopu kmene *Rhodotorula kratochvilovae* kultivovaném na médiu s kávovým hydrolyzátem

5.1.5.1 Produkce biomasy

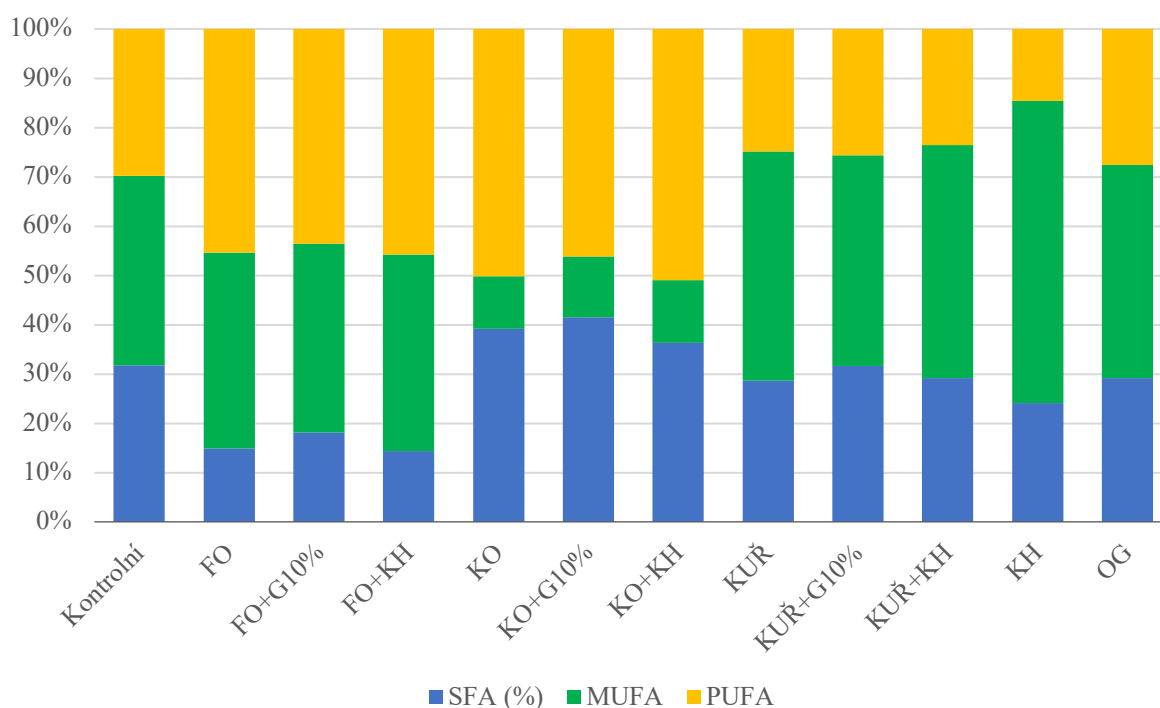
Z Grafu 26 je patrné, že pro produkci biomasy kmene *Rhodotorula kratochvilovae* je vhodné využít jednodušší odpadní substráty jako je kávový hydrolyzáat či odpadní glycerol (Obrázek 21). Nejvyšší hodnoty bylo dosaženo na kávovém hydrolyzátu a to $(15,6 \pm 0,1)$ g/l, u odpadního glycerolu to bylo $(9,5 \pm 0,1)$ g/l. Odpadní lipidické substráty nebyly pro produkci biomasy vhodné (Příloha 13). Nejméně vhodné je použití odpadního kuřecího tuku, kdy došlo k 50–60% poklesu produkce biomasy oproti kontrolnímu médiu, jelikož tuk ztuhl a byl méně dostupný pro utilizaci kvasinkami. Nejvhodnější z lipidických odpadních substrátů se jeví kávový olej, při jeho použití došlo k poklesu o 6–24 % (oproti kontrolnímu médiu). Při použití samotného kávového oleje bylo dosaženo hodnoty $(7,2 \pm 0,1)$ g/l média.



Graf 26: Produkce biomasy kmenem *Rhodotorula kratochvilovae* a obsahu lipidů v biomase

4.1.5.2 Obsah lipidů v biomase

Opačný trend oproti biomase pozorujeme u obsahu lipidů (Graf 26). Jednoduché substráty jako glycerol či kávový hydrolyzát vedou k obsahu lipidů kolem 10 %. Naopak při použití lipidických substrátů to bylo > 30 %. Nejvhodnějším substrátem pro zvýšení lipidů v biomase je kuřecí odpadní tuk, kdy při kultivaci bez přídavku jednodušších substrátů bylo dosaženo maximální hodnoty a to ($47,1 \pm 7,6$) %, ale dochází k poklesu PUFA a nárůstu MUFA oproti kontrolnímu médiu. Při použití fritovacího oleje bylo zjištěno, že biomasa obsahuje ($38,8 \pm 5,3$) % lipidů, přičemž bylo dosaženo snížení SFA na 15 % a navýšení PUFA na 45,3 %. Pro navýšení PUFA je nejvhodnější kultivace na kávovém oleji (Graf 27), kdy obsah lipidů činil ($36,7 \pm 5,8$) % a polynenasycené mastné kyseliny tvořily 50,25 %. Využití přídavku glycerolu sice vede k nárůstu produkce biomasy, ale došlo k poklesu obsahu lipidů.

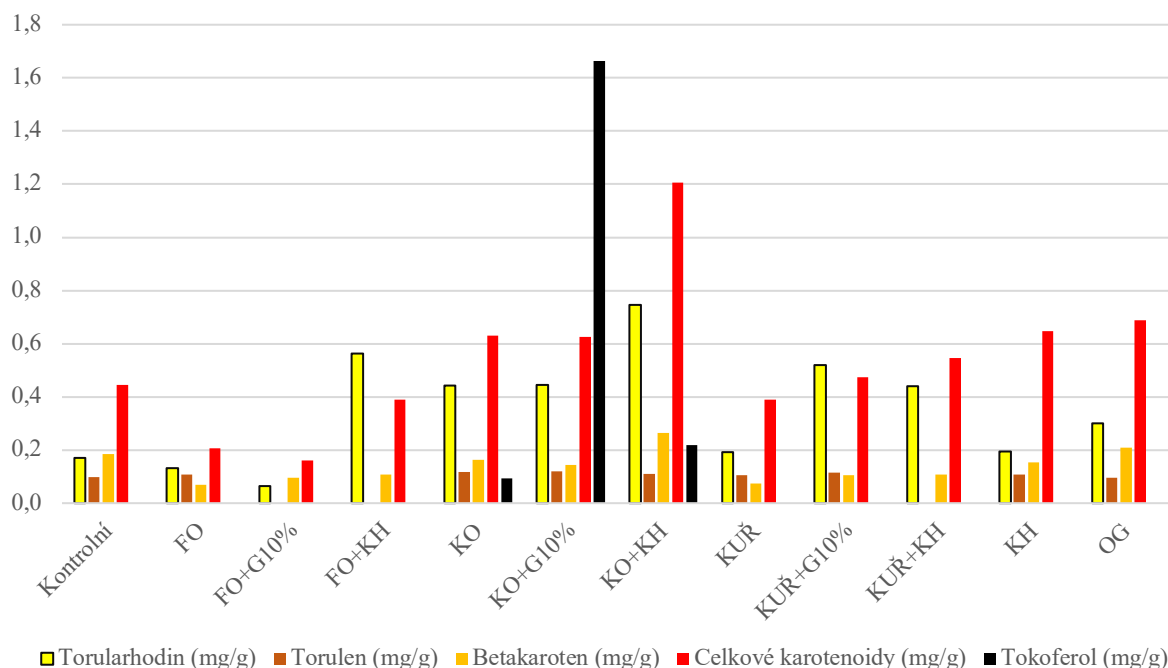


Graf 27: Složení lipidů v biomase kmene *Rhodotorula kratochvilovae*

4.1.5.3 Karotenoidy a další lipofilní metabolity

Kmen *Rhodotorula kratochvilovae* není vhodný pro produkci karotenoidů za stanovených podmínek a vybraných substrátů (Příloha 14). Při kontrolní kultivaci za využití glycerolu bylo dosaženo 0,44 mg/g. Kladný vliv na produkci karotenoidů měl kávový hydrolyzát a odpadní glycerol. Fritovací olej je naprosto nevhodným, jelikož obsah karotenoidů klesl na polovinu, s přídavkem kávového hydrolyzátu došlo k snížení pouze o 12,5 %. Kultivace na kuřecím tuku také vedla k malé produkci karotenoidů (Graf 28), s přídavkem hydrolyzátu došlo k 23% navýšení oproti kontrolní kultivaci. Kávový olej je nevhodnějším lipidickým substrátem. Maximálního obsahu karotenoidů bylo dosaženo na směsi kávového olej s kávovým hydrolyzátem a to 1,2 mg na gram biomasy, ale bez hydrolyzátu bylo dosaženo sotva poloviční hodnoty. Majoritním karotenoidem byl torularhodin, minoritní byl obsah betakarotenu a poté torulenu. Pro produkci ergosterolu je vhodné použití odpadního glycerolu (Graf 29), kdy bylo

dosaženo maximální hodnoty 3,75 mg/g. Naprosto nevhodné je použití fritovacího olej či kuřecího odpadního tuku. K produkci ubiquinonu je vhodné využít kávový olej s přídatkem jednoduššího substrátu. Při využití chemicky čistého glycerolu bylo dosaženo maximální hodnoty a to 9,64 mg/g, s kávovým hydrolyzátem to bylo 8,1 mg/g. Kmen jen velice neochotně akumuluje tokoferol při použití odpadních substrátů, na médiu KO+KH bylo dosaženo pouze 0,22 mg/g, akumulaci vyhovovalo použití směsi kávového oleje s glycerolem (1,66 mg/g).



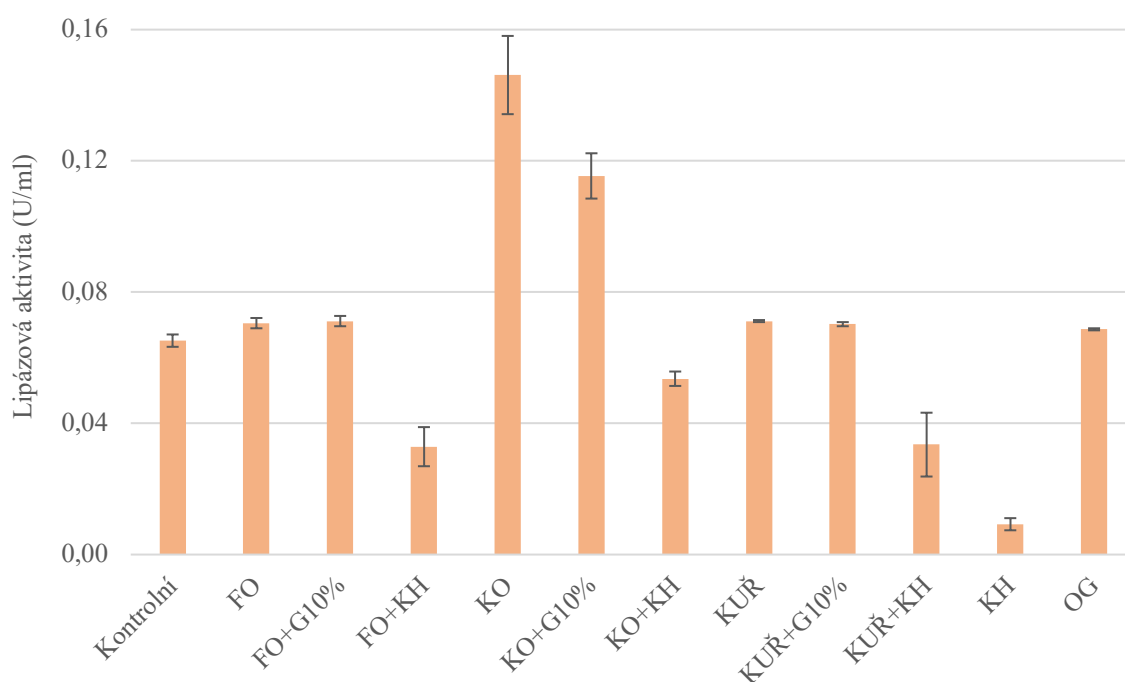
Graf 28: Produkce karotenoidů a akumulace tokoferolu kmenem *Rhodotorula kratochvilovae*



Graf 29: Produkce biomasy a schopnost produkce lipofilních metabolitů kmenem *Rhodotorula kratochvilovae*

4.1.5.4 Lipázová aktivita

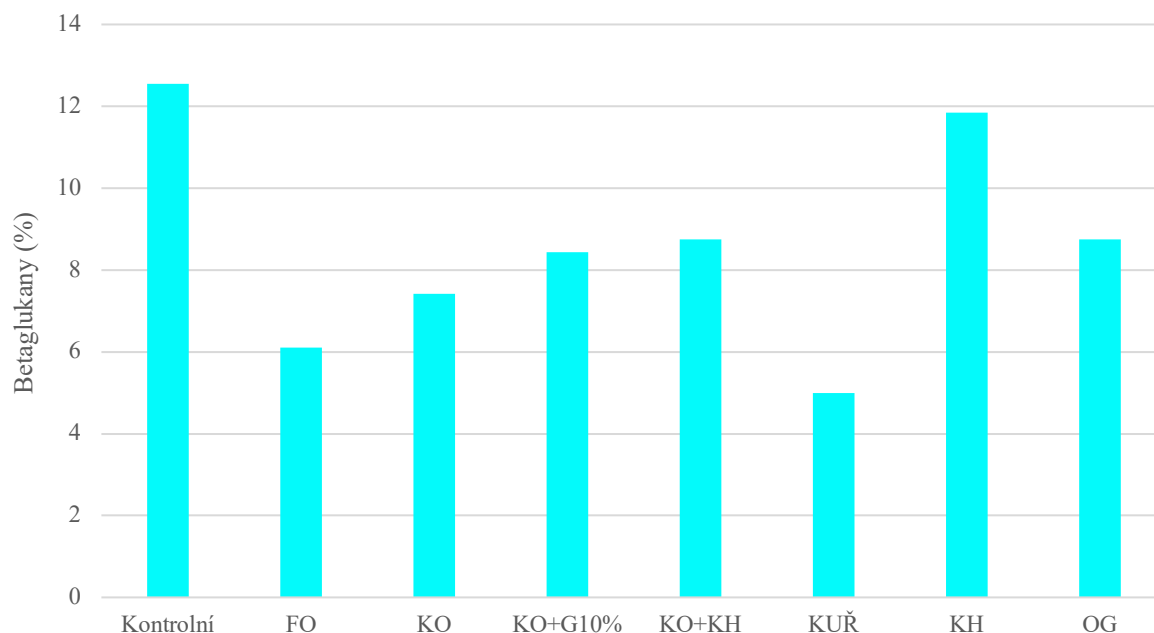
Lipázová aktivita kmene *Rhodotorula kratochvilovae* se při provedených kultivacích pohybovala v rozmezí 0,0093 – 0,1462 U/ml (Graf 30). K výraznému zvýšení došlo při kultivacích s kávovým olejem, kdy maximální hodnoty bylo dosaženo na čistě olejovém médiu a to na $(0,1462 \pm 0,0119)$ U/ml, je zde i patrný rozdíl mezi čistě lipidickým médiem a s přidavkem glycerolu. U ostatních lipidických substrátů tento trend nepozorujeme (Příloha 15). Lipázová aktivita u médií s fritovacím olejem a kuřecím tukem je stejná. U všech lipidických médií sledujeme výrazný pokles aktivity lipáz při přidavku kávového hydrolyzátu, lipázová aktivita nemusí být vysoká, jelikož je dostupný jednodušší sacharidový substrát. Nejnížší lipázová aktivita byla zaznamenána u kultivace na čistě sacharidovém médiu. U tohoto kmene nepozorujeme korelaci mezi produkcí biomasy a lipázovou aktivitou, jelikož pro růst kultury jsou vhodnější jednodušší substráty.



Graf 30: Lipázová aktivita kmene *Rhodotorula kratochvilovae*

4.1.5.5 Stanovení betaglukanů

Nejvyšší obsah betaglukanů byl stanoven při kultivaci na kontrolním glycerolovém médiu a to 12,6 % a s použitím odpadních substrátů došlo ke snížení obsahu betaglukanů v buněčné stěně. I když u většiny analýz kultivace na odpadním glycerolu vykazovala podobné výsledky jako kultivace na kontrolním médiu, u obsahu betaglukanů pozorujeme pokles o 4 %. U kultivací na odpadních substrátech byl zaznamenán nejvyšší obsah betaglukanů u kultivace na sacharidovém médiu (kávový hydrolyzát) a to 11,9 %. Z Grafu 31 je patrné, že z lipidických substrátů bylo nejlepších výsledků dosaženo za využití kávového oleje (7,4 %) a přidavky jednodušších substrátů vedly ke zvýšení obsahu betaglukanů. Při kultivaci na kombinaci kávového oleje a kávového hydrolyzátu bylo dosaženo obsahu betaglukanů 8,7 %.



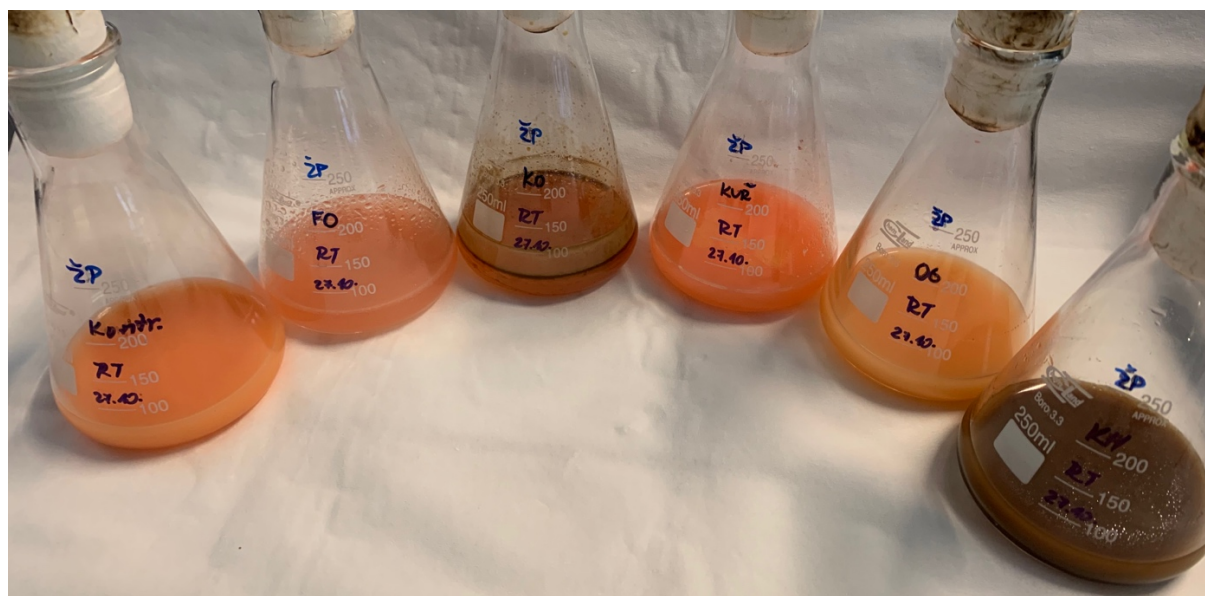
Graf 31: Obsah betaglukanů v buněčné stěně kmene *Rhodotorula kratochvilovae*

4.1.5.6 Shrnutí

Kmen *Rhodotorula kratochvilovae* není vhodný ke kultivacím na lipidických substrátech, z důvodu nízké produkce biomasy. Z pohledu metabolitů také nedošlo u většiny substrátů a jejich kombinací k dosažení zajímavých výsledků. Další nevýhodou tohoto kmene je nízká schopnost akumulace tokoferolu, kdy na čistě odpadních médiích s kávovým olejem bylo dosaženo jeho obsahu méně než 1 mg na gram biomasy.

Pro tento kmen je vhodné využití sacharidového odpadního substrátu – kávového hydrolyzátu. Při kultivaci pouze na kávovém hydrolyzátu, došlo k výraznému nárůstu výtěžku biomasy a současně byla tato biomasa mírně obohacena o karotenoidy, přičemž nedošlo k výraznému poklesu betaglukanů v buněčné stěně. Nejlepších výsledků s využitím lipidického substrátu bylo dosaženo kultivací na směsi kávového oleje s kávovým hydrolyzátem, kdy produkce biomasy byla sice nižší než při kontrolní kultivaci, ale biomasa obsahoval 3krát více karotenoidů s nejvyšším obsahem betakarotenu. Dále byla obohacena o lipidy s výrazným zastoupením polynenasycených mastných kyselin (51 %). Také došlo k téměř dvojnásobné produkci ubiquinonu.

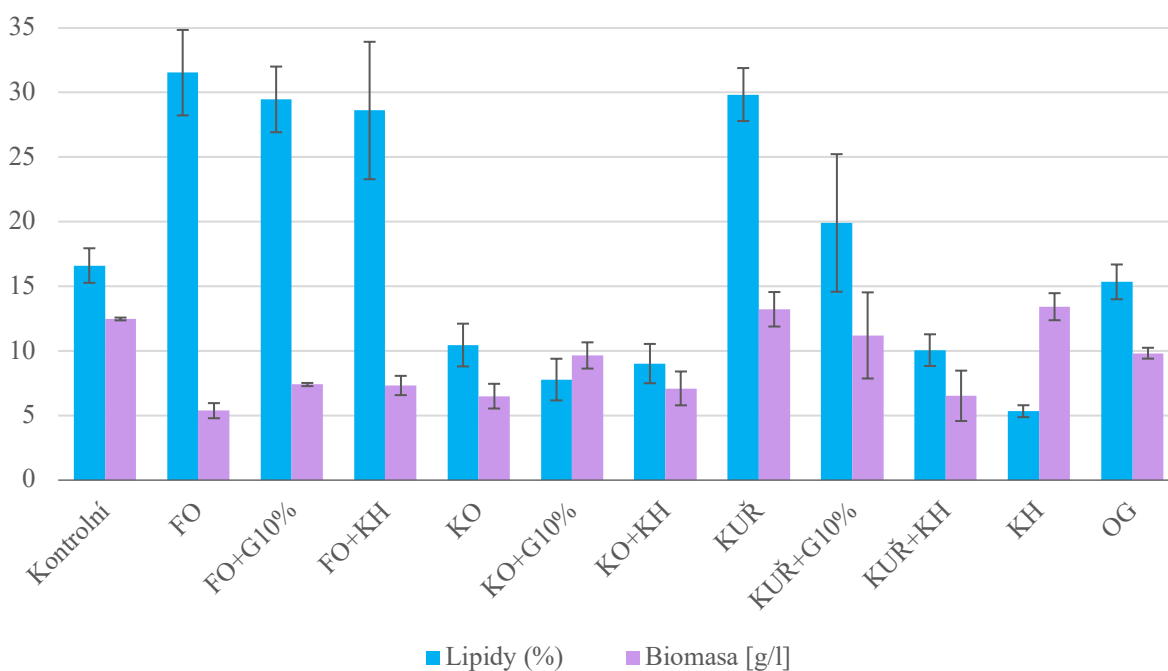
5.1.6 Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula toruloides*



Obrázek 22: Screeningová kultivace kmene *Rhodotorula toruloides* na odpadních médiích

5.1.6.1 Produkce biomasy

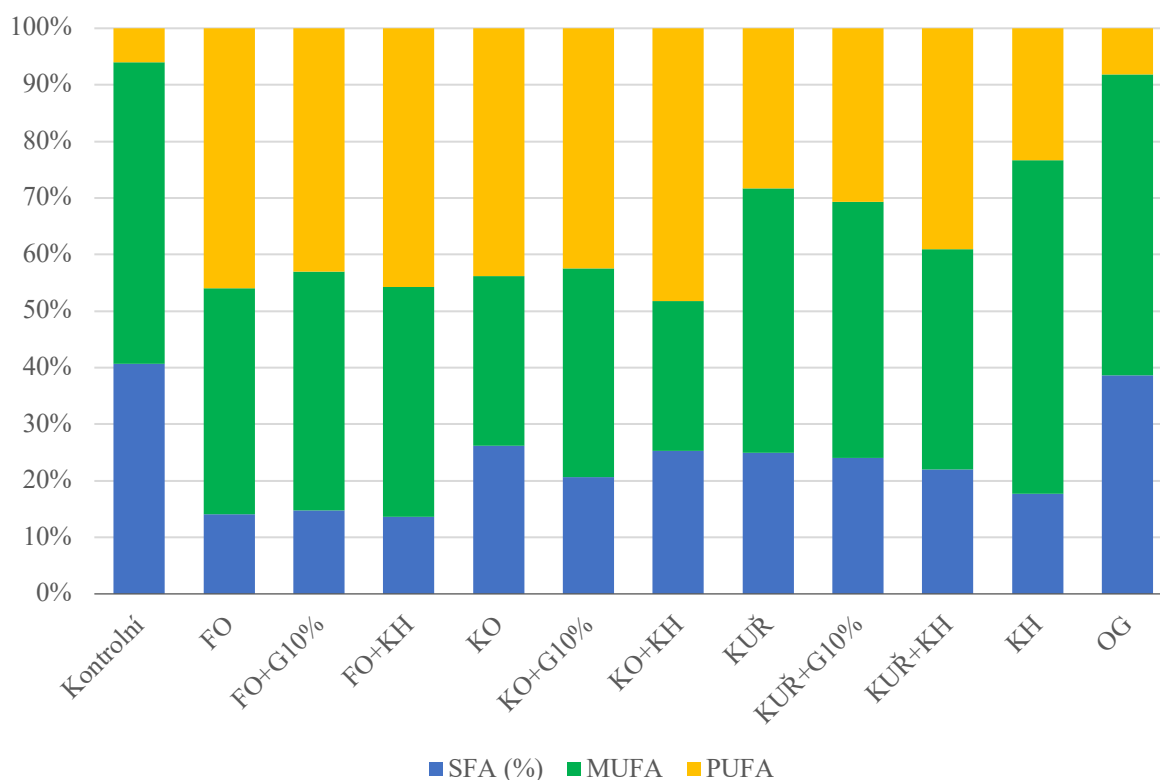
Produkce biomasy kmenem *Rhodotorula toruloides* na kontrolním médiu dosáhla hodnoty $(12,5 \pm 0,1)$ g/l. Vyšší produkce bylo dosaženo pouze za využití odpadního kuřecího tuku a to $(13,2 \pm 1,3)$ g/l, a na kávovém hydrolyzátu $(13,4 \pm 1,0)$ g/l. Nejnižších výsledků bylo dosaženo při kultivaci na odpadním fritovacím oleji (Příloha 16). O něco lepších výsledků bylo dosaženo při použití kávového oleje (důvodem bylo nejspíše ulpění oleje v tužší formě na stěnách kultivační nádoby a tím se stal hůře dostupný pro kvasinky).



Graf 32: Produkce biomasy kmenem *Rhodotorula toruloides* a obsahu lipidů v biomase

5.1.6.2 Obsah lipidů v biomase

Kontrolní kultivace poskytla biomasu s obsahem lipidů ($16,6 \pm 1,3$) % s profilem mastných kyselin přibližně 41 : 53 : 6 (SFA : MUFA : PUFA). Kultivace na odpadním glycerolu poskytuje biomasu o podobném složení, co se lipidů týče. K zvýšení obsahu lipidů v biomase vede použití odpadního fritovacího oleje a kuřecího tuku. V Grafu 32 pozorujeme maximální obsah lipidů na čistě olejovém médiu s fritovacím olejem a to ($31,5 \pm 3,3$) %, což činí nárůst o 90 % oproti kontrolnímu médiu. Podobného obsahu bylo dosaženo při použití odpadního kuřecího tuku a to ($29,9 \pm 2,1$) % což je nárůst o téměř 80 %. Z Grafu 33 je ale patrné, že biomasa kultivovaná na fritovacím oleji byla obohacena o polynenasycené mastné kyseliny (46,0 %) a došlo ke snížení SFA na 14,1 %. U biomasy vyprodukované na kuřecím tuku pozorujeme zvýšení PUFA pouze na 28,3 %. Kávoový olej vede ke sníženému obsahu lipidů v biomase, ale poskytuje PUFA k akumulaci. Při použití směsi kávového oleje s kávoým hydrolyzátem bylo dosaženo téměř 50 % PUFA.

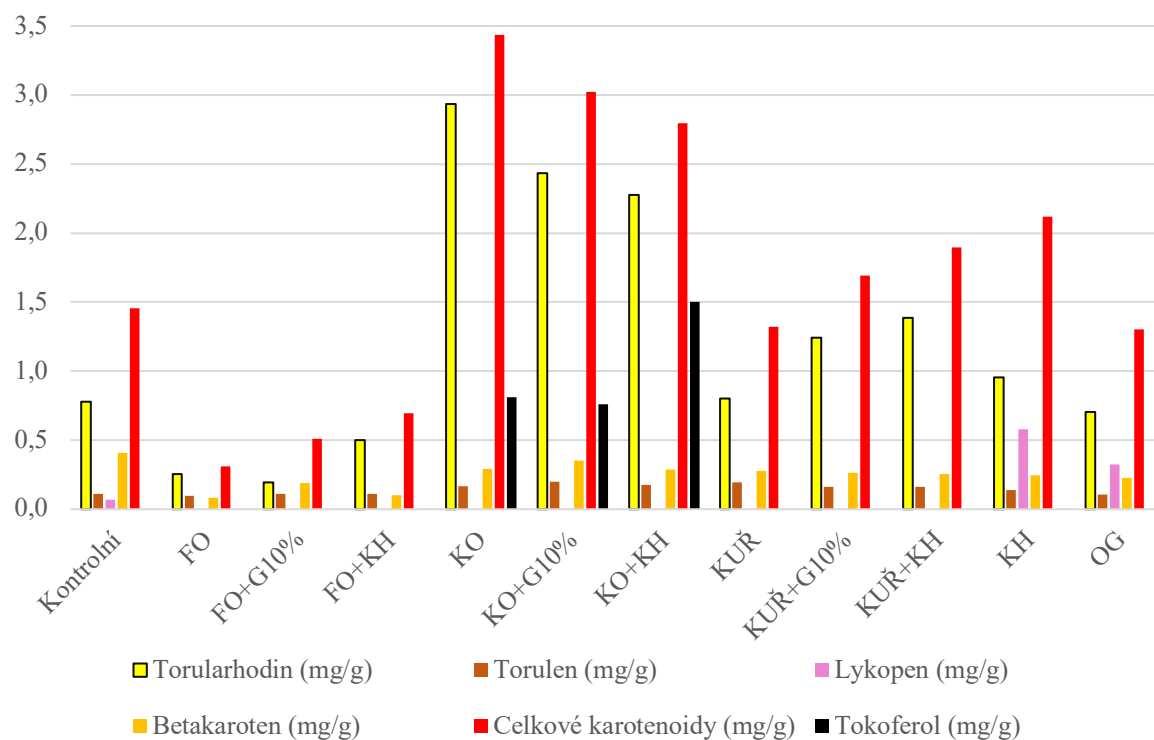


Graf 33: Složení lipidů v biomase kmene *Rhodotorula toruloides*

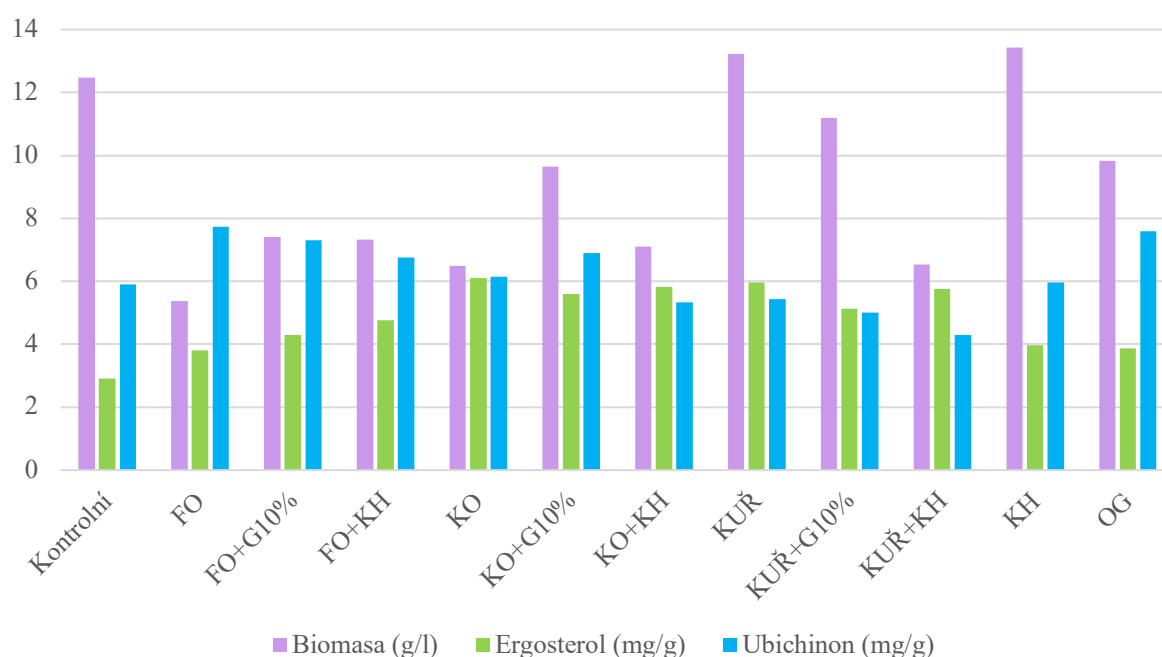
4.1.6.3 Karotenoidy a další lipofilní metabolity

Z výsledků analýzy pomocí HPLC bylo zjištěno, že využití kávového oleje vede k vyšší produkci karotenoidů, ergosterolu a akumulaci tokoferolu. Při kultivaci pouze s kávoým olejem bylo dosaženo nejvyššího obsahu karotenoidů 3,43 mg/g a to je o 136 % více oproti kontrolnímu médiu. Stejně tak produkce ergosterolu dosáhla maximální hodnoty 6,11 mg/l (nárůst o 110 %). Majoritním karotenoidem byl torularhodin, minoritní zastoupení betakarotenu a torulenu. *Rhodotorula toruloides* je schopna akumulovat tokoferol z kávového oleje (Graf 34). Nejvyšší hodnoty bylo dosaženo na médiu s kávoým olejem s přídavkem kávového

hydrolyzátu (1,5 mg/l). Pro produkci karotenoidů se neosvědčilo použití fritovacího oleje, kdy došlo k poklesu o 50–80 % (Příloha 17). Oproti tomu došlo k navýšení ubichinonu o 30 % (Graf 35). K navýšení u všech sledovaných metabolitů došlo při kultivaci na kávovém hydrolyzátu. Obsah karotenoidů byl 2,12 mg/g, přičemž majoritními byl torularhodin (0,96 mg/g) a lykopen (0,58 mg/g).



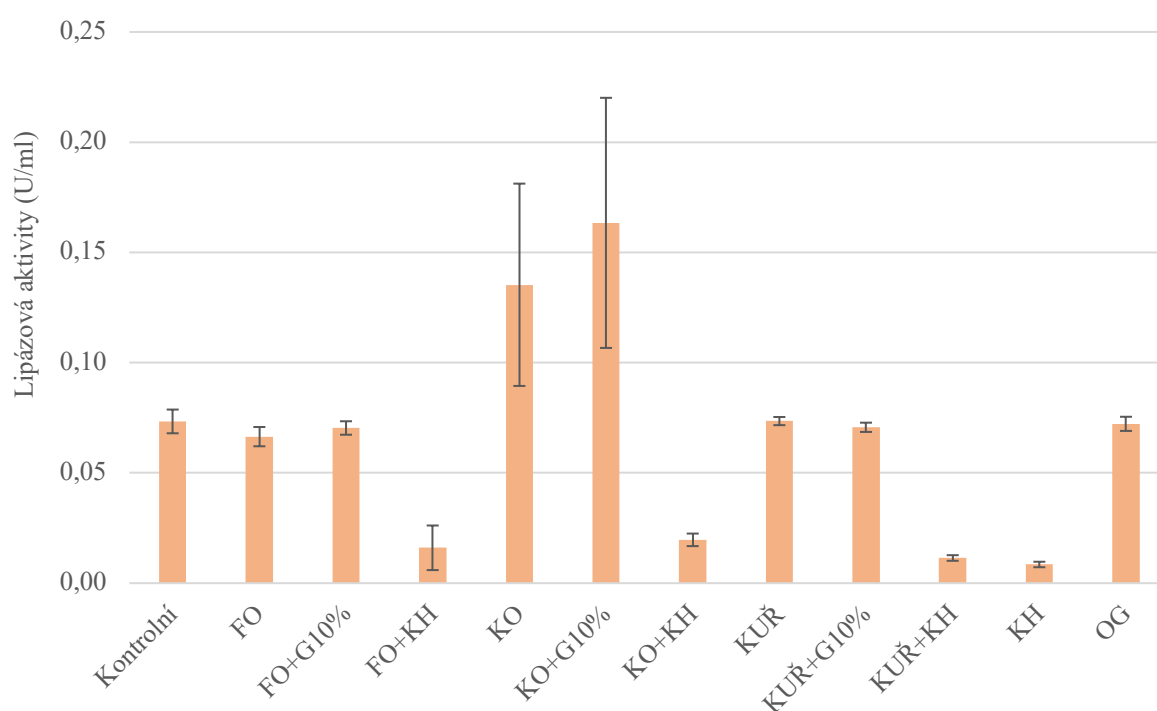
Graf 34: Produkce karotenoidů a akumulace tokoferolu kmenem *Rhodotorula toruloides*



Graf 35: Produkce biomasy a schopnost produkce lipofilních metabolitů kmenem *Rhodotorula toruloides*

5.1.6.4 Lipázová aktivita

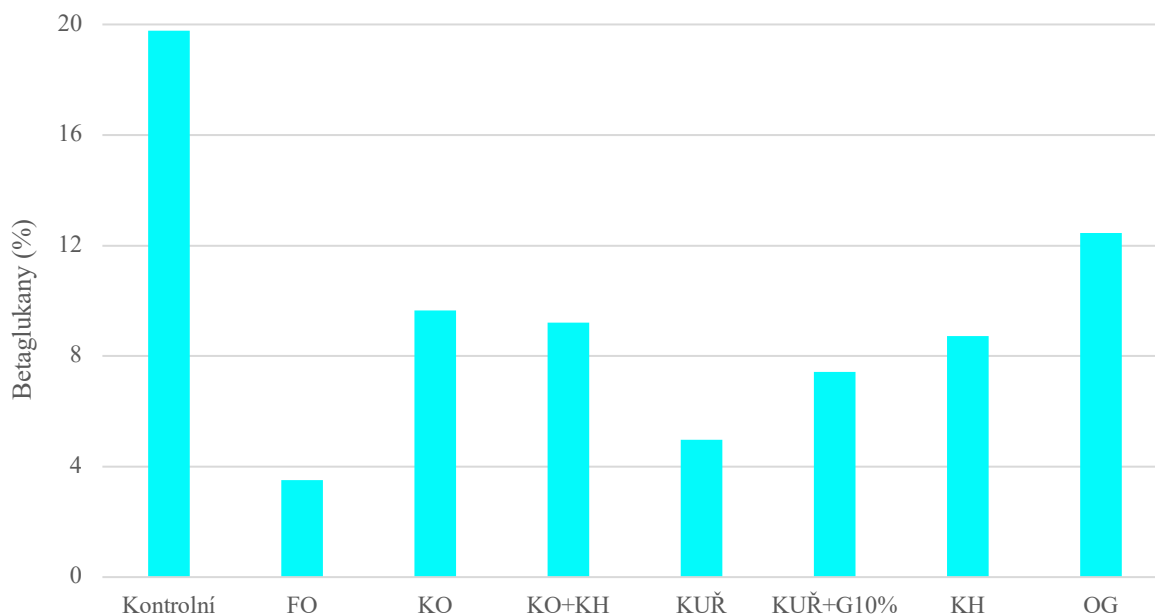
Kmen *Rhodotorula toruloides* vykazuje zvýšenou lipázovou aktivitu pouze u médií s kávovým olejem bez přídavku sacharidového substrátu (Graf 36). Při kultivaci s použitím kávového oleje s 10% přídavkem glycerolu bylo dosaženo hodnoty $(0,1634 \pm 0,0567)$ U/ml, při použití pouze kávového oleje $(0,1353 \pm 0,0459)$ U/ml. V tomto případě byla vyšší lipázová aktivita způsobena i zvýšenou produkcí biomasy. Na ostatních odpadních substrátech bylo dosaženo lipázové aktivity 0,0085 – 0,0735 U/ml (Příloha 18), přičemž u kontrolního média bylo dosaženo aktivity lipáz $(0,0734 \pm 0,0054)$ U/ml. Srovnatelné aktivity bylo dosaženo u všech kultivací s lipidickými substráty (bez přídavku sacharidového substrátu) a při kultivaci na odpadním glycerolu. Použití kávového hydrolyzátu vede k výraznému poklesu lipázové aktivity.



Graf 36: Lipázová aktivita kmene *Rhodotorula toruloides*

4.1.6.5 Stanovení betaglukanů

Kmen *Rhodotorula toruloides* vykazoval na kontrolním médiu obsah betaglukanů 19,8 %. Při použití odpadních substrátů můžeme pozorovat snížení obsahu betaglukanů v buněčné stěně (Graf 37). Z kultivací na odpadních substrátech byl nejvyšší obsah betaglukanů stanoven při použití odpadního glycerolu a to 12,4 %. Z lipidických substrátů je nejvhodnější kávový olej, kdy betaglukany tvořily 9,6 %. Oproti většině kmenů použití kávového hydrolyzátu nevedlo ke zvýšení obsahu betaglukanů oproti čistě lipidickým médiím. K největšímu poklesu obsahu betaglukanů vedlo použití fritovacího oleje (3,5 %).



Graf 37: Obsah betaglukanů v buněčné stěně kmene *Rhodotorula toruloides*

4.1.6.6 Shrnutí

Velice vhodným odpadním substrátem pro kultivaci kmene *Rhodotorula toruloides* je kuřecí odpadní tuk. Při jeho použití došlo k navýšení produkce biomasy a biomasa obsahovala téměř 30 % lipidů, přičemž došlo ke změně profilu mastných kyselin. Biomasa byla obohacena o polynenasycené mastné kyseliny na úkor nasycených. Co se týče lipofilních metabolitů, k navýšení oproti kontrolnímu médiu došlo pouze u ubiquinonu. Produkce ergosterolu a karotenoidů je velice podobná. Kultivaci na médiu s fritovacím olejem bylo dosaženo vysoké produkce biomasy, která je významně obohacena o lipidy a vysokým zastoupením polynenasycených mastných kyselin, ale produkce karotenoidů a lipofilních látek byla minimální. Výrazně obohacená biomasa byla produkována při kultivaci na kávovém oleji, kdy došlo k výraznému zvýšení produkce karotenoidů a ergosterolu, u produkce ubiquinonu pozorujeme jen mírné navýšení. Pro dosažení vyšších výtěžků by bylo vhodné zajistit emulzifikaci média. Zajímavých výsledků bylo dosaženo i při použití sacharidového média s kávovým hydrolyzátem, kdy bylo dosaženo nejvyšší produkce biomasy. Biomasa byla obohacena o karotenoidy a byla zaznamenána přítomnost lykopenu, který nebyl detekován při kultivacích na lipidických substrátech (Obrázek 22).

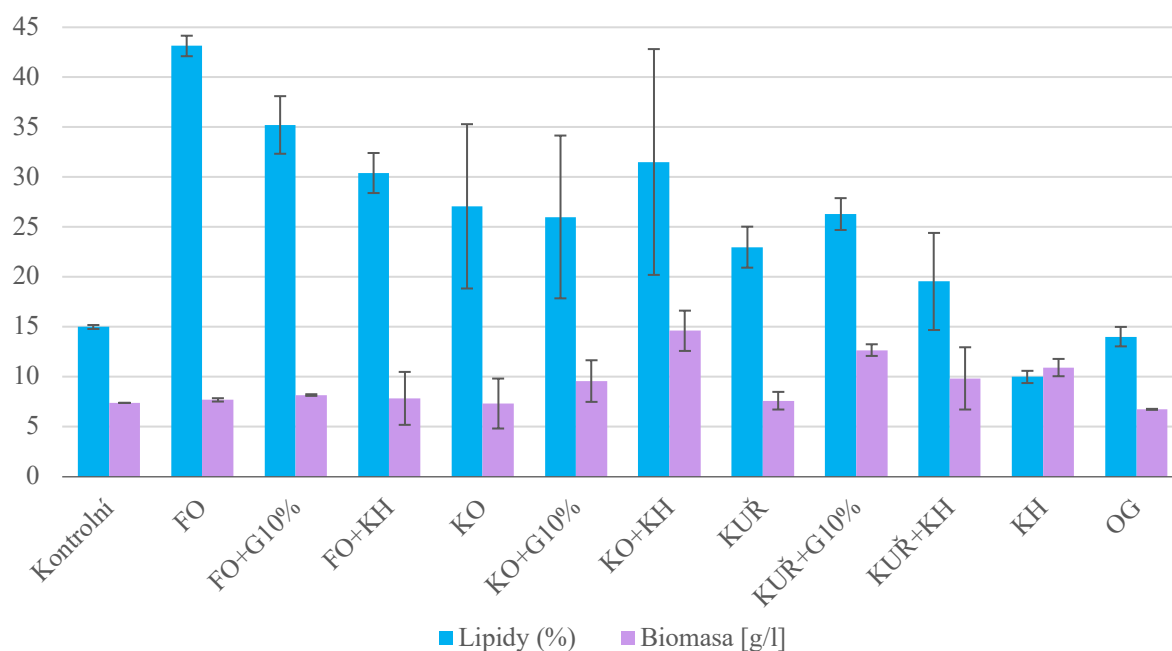
4.1.7 Produkční vlastnosti kmene *Cystofilobasidium macerans*



Obrázek 23: Screeningová kultivace kmene *Cystofilobasidium macerans* na odpadních médiích

4.1.7.1 Produkce biomasy

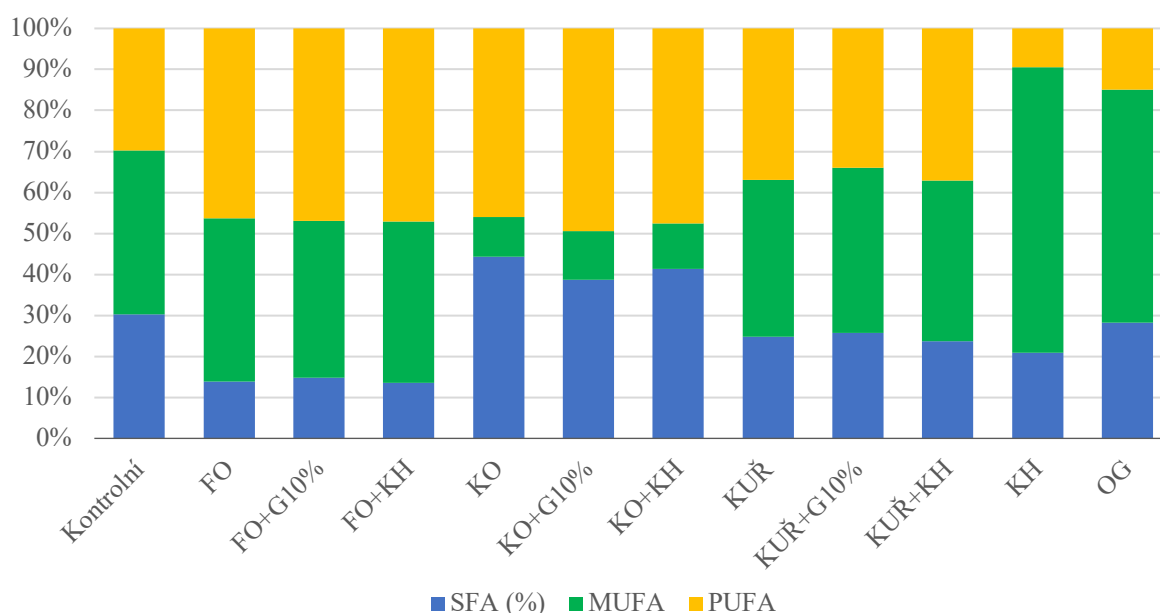
Pro zvýšení produkce biomasy u kmene *Cystofilobasidium macerans* je vhodné využití odpadního lipidického substrátu s přidavkem snadněji utilizovatelného substrátu (Příloha 19). Kontrolní kultivace vedla k výtěžku ($7,4 \pm 1,0$) g/l. Ke zdvojnásobení a dosažení maximálního výtěžku bylo dosaženo při použití kávového oleje s přidavkem kávového hydrolyzátu a to ($14,6 \pm 2,0$) g/l. Přitom kultivace na samotném kávovém oleji vedla k výtěžku podobnému jako u kontrolní kultivace a to ($7,3 \pm 2,5$) g/l. Na čistě sacharidovém médiu s kávovým hydrolyzátem bylo dosaženo produkce ($10,9 \pm 0,9$) g/l. Použití fritovacího oleje i ve směsích s jednodušším substrátem nevedlo k výraznému navýšení biomasy.



Graf 38: Produkce biomasy kmenem *Cystofilobasidium macerans* a obsahu lipidů v biomase

4.1.7.2 Obsah lipidů v biomase

Z Grafu 38 je patrné, že kultivace kmene *Cystofilobasidium macerans* na odpadních lipidických substrátech výrazně zvyšuje obsah lipidů v biomase a současně došlo k obohacení o PUFA. Při kultivaci na kontrolním médiu bylo dosaženo $(15,0 \pm 1,0)$ % lipidů v biomase se zastoupením SFA : MUFA : PUFA 30 : 40 : 30 (Graf 39). Největší obohacení biomasy o lipidy můžeme pozorovat při kultivaci na fritovacím oleji, bez přídavku jednoduššího substrátu a to $(43,1 \pm 1,0)$ %. Současně došlo ke snížení SFA na 13,8 % a navýšení PUFA na 46,3 %. Při kultivacích s kávovým olejem a jeho směsích došlo k výrazným změnám v profilu mastných kyselin. Obsah PUFA dosahoval téměř 50 %, ale došlo k výraznému poklesu MUFA na hodnoty kolem 10 % a SFA se zvýšila na hodnoty kolem 40 %. Při kultivaci na kávovém hydrolyzátu naopak byl zjištěn minimální obsah lipidů $(10,0 \pm 0,6)$ %, minimální obsah PUFA 9,42 % a bylo dosaženo maximální hodnoty MUFA a to téměř 70 %.

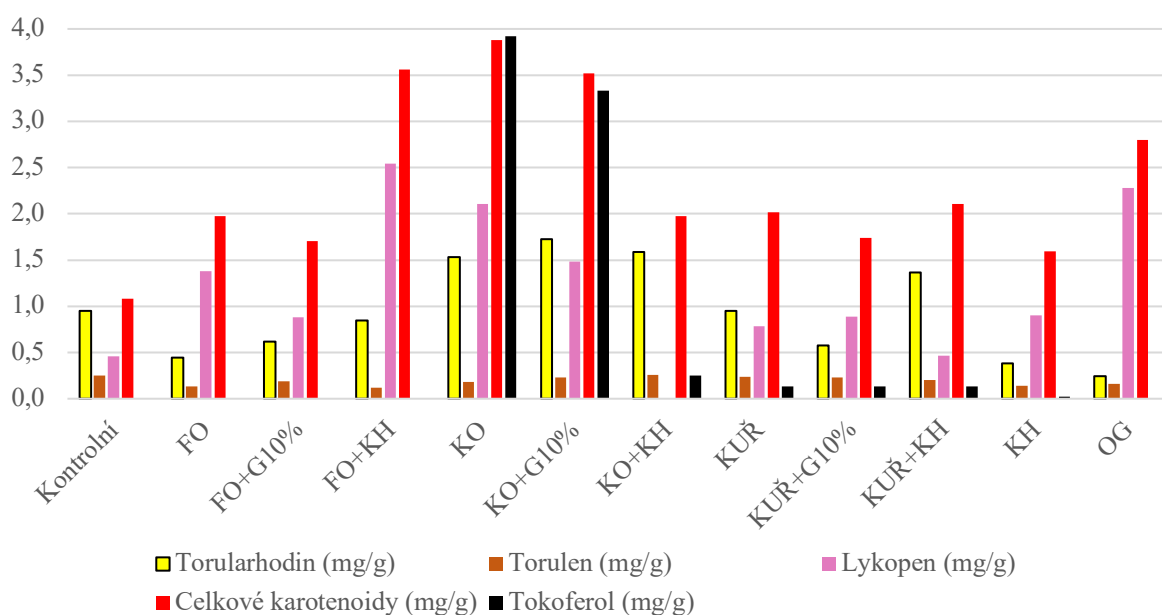


Graf 39: Složení lipidů v biomase kmene *Cystofilobasidium macerans*

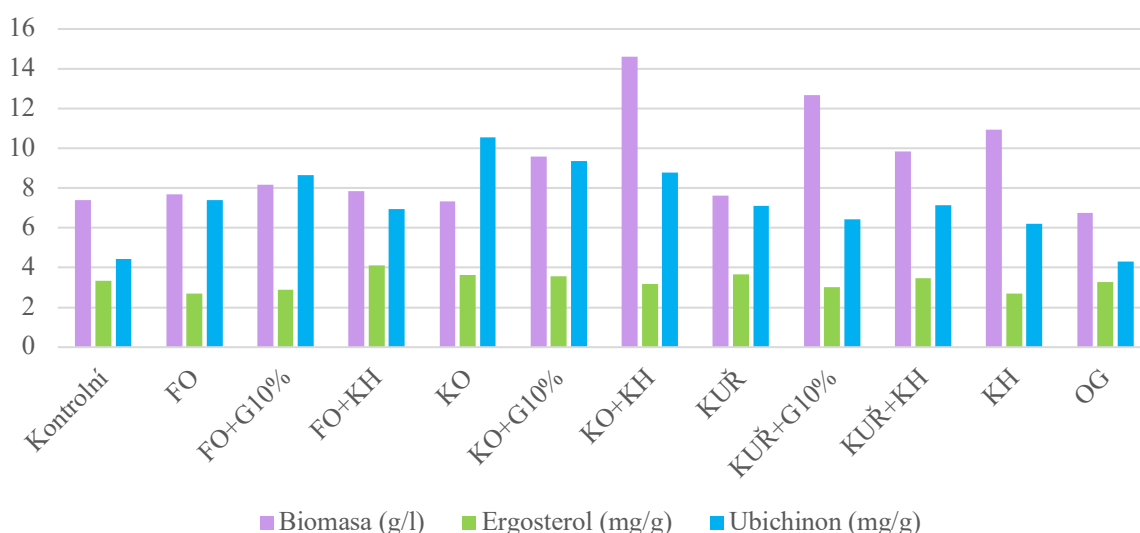
4.1.7.3 Karotenoidy a další lipofilní metabolity

Kmen *Cystofilobasidium macerans* vykazuje při kultivacích na všech odpadních substrátech zvýšení produkce karotenoidů (Obrázek 23). U kontrolní kultivace na glycerolovém médiu bylo dosaženo hodnoty 1,08 mg/g s majoritním zastoupením torularhodinu (0,95 mg/g) a minoritním zastoupením lykopenu (0,46 mg/g) a torulenu (0,25 mg/g). Největší zvýšení obsahu karotenoidů můžeme pozorovat (Graf 40) u kultivace na kávovém oleji a kombinaci fritovacího oleje s kávovým hydrolyzátem. Při kultivaci na čistém kávovém oleji pozorujeme produkci 3,88 mg/g, což je nárůst o 260 %. U směsi FO+KH pozorujeme 230% nárůst karotenoidů na 3,56 mg/g. Obě kultivace s majoritním zastoupením lykopenu, více jak 2 mg na gram biomasy. K velmi výraznému nárůstu karotenoidů došlo i při použití odpadního glycerolu, kdy produkce stoupla o 160 % na 2,8 mg/g. U fritovacího oleje i kuřecího tuku pozorujeme zvýšení obsahu karotenoidů u kultivaci s přídavkem kávového hydrolyzátu (Příloha 20). Při kultivaci na kombinaci odpadního fritovacího oleje a kávového hydrolyzátu byla vedle druhého

nejvyššího obsahu karotenoidů zjištěna druhá největší produkce ergosterolu a to 4,12 mg/g, což činí nárůst o 23 % oproti kontrolnímu médiu, přičemž u samotného fritovacího oleje či kávového hydrolyzátu vedlo ke snížení obsahu ergosterolu o téměř 20 %. Při použití kávového oleje došlo k 8,6% nárůstu a u kuřecího tuku 9,3 %. Pozitivní vliv odpadních substrátů můžeme pozorovat také na obsahu ubichinonu (Graf 41), pouze u odpadního glycerolu pozorujeme shodné výsledky s kontrolním médiem. Nejvýraznějších nárůstů bylo dosaženo na médiích obsahujících kávový olej (98–138 %), přičemž maximální hodnoty 10,55 mg/g bylo dosaženo při použití samotného kávového oleje. Na čistě odpadních médiích s kuřecím tukem či fritovacím olejem bylo dosaženo 60% nárůstu obsahu ubichinonu. U kmene *Cystofilobasidium macerans* pozorujeme dobrou schopnost akumulace tokoferolu z kávového oleje, na čistě olejovém médiu bylo dosaženo hodnoty 3,92 mg na gram biomasy.



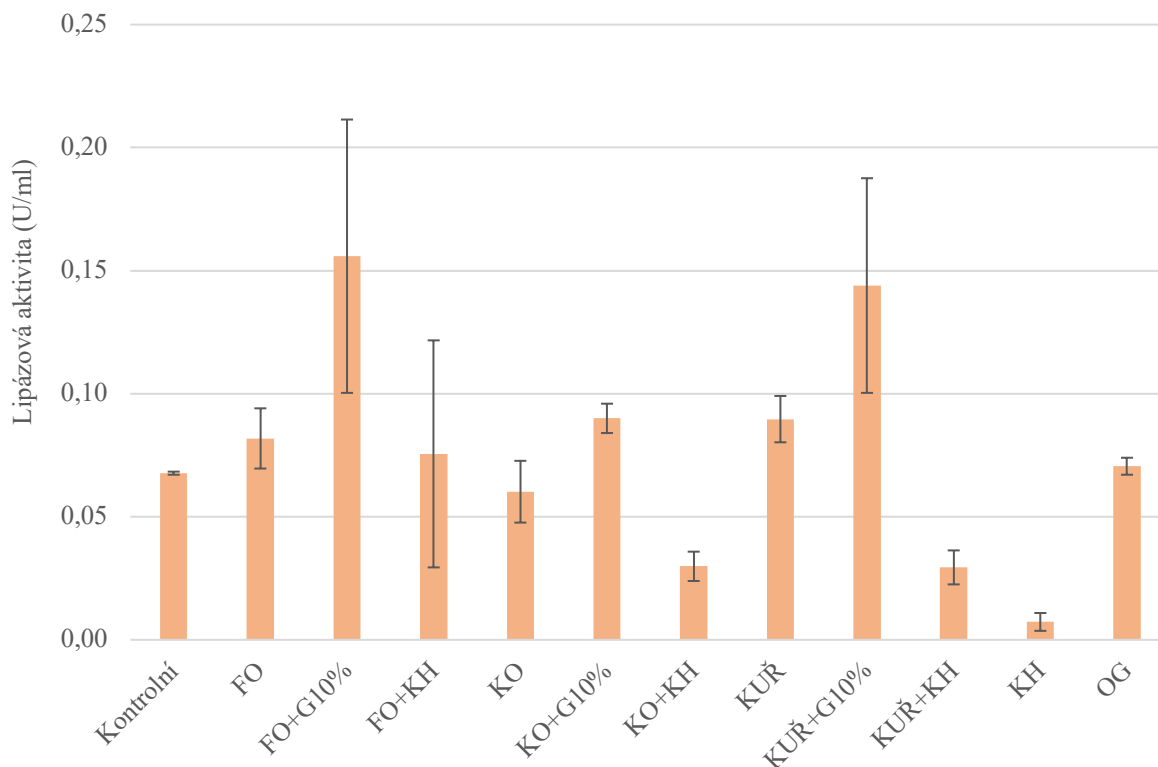
Graf 40: Produkce karotenoidů a akumulace tokoferolu kmenem *Cystofilobasidium macerans*



Graf 41: Produkce biomasy a schopnost produkce lipofilních metabolitů kmenem *Cystofilobasidium macerans*

5.1.7.4 Lipázová aktivita

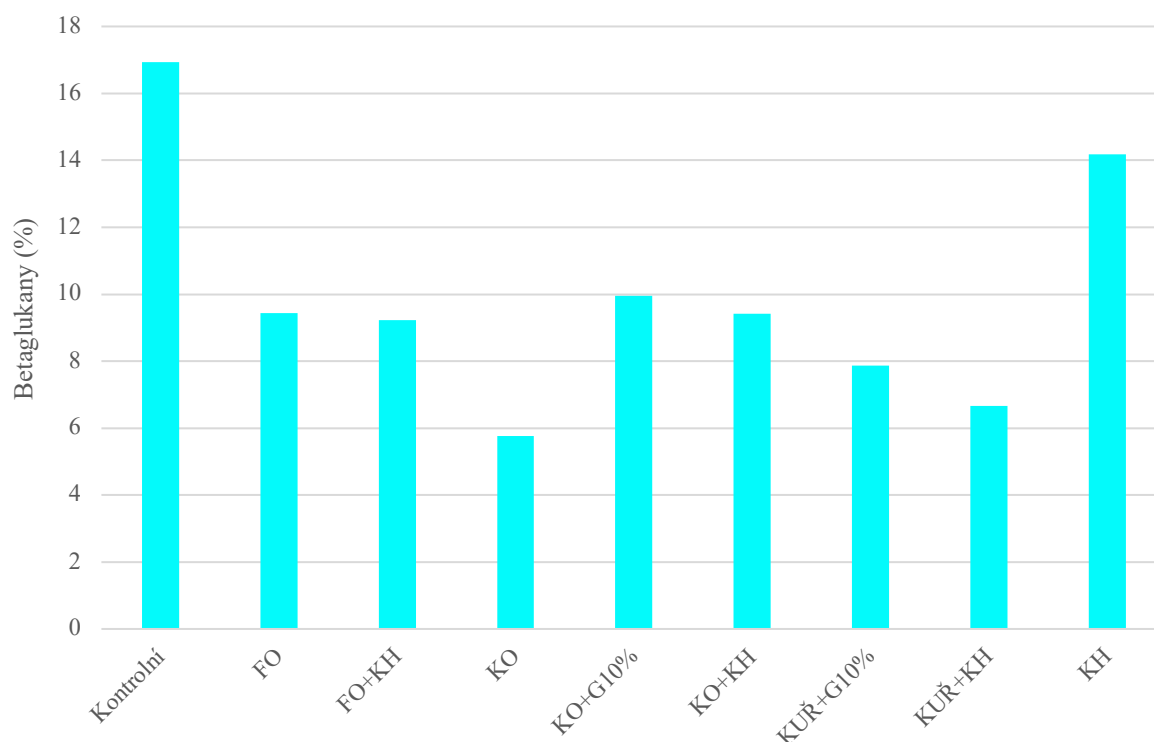
U kmene *Cystofilobasidium macerans* pozorujeme lipázovou aktivitu při kultivacích na odpadních substrátech v intervalu 0,0073 – 0,1559 U/ml (Příloha 21). Tento kmen vykazuje zajímavý trend, kdy nejvyšších hodnot u všech lipidických substrátů je dosaženo při kultivaci s přidavkem glycerolu. Nejvyšší hodnoty bylo dosaženo u média s fritovacím olejem. U médií s kávovým olejem je lipázová aktivita nejmenší se srovnatelnými kultivacemi s ostatními lipidickými substráty. Přídavek kávového hydrolyzátu vede ke snížení aktivity lipáz. Nejnížší lipázové aktivity bylo dosaženo na čistě sacharidovém médiu (Graf 42). Kultivace na odpadním glycerolu vykazuje srovnatelnou lipázovou aktivitu jako kontrolní kultivace.



Graf 42: Lipázová aktivita kmene *Cystofilobasidium macerans*

5.1.7.5 Stanovení betaglukanů

U kmene *Cystofilobasidium macerans* bylo na kontrolním médiu dosaženo obsahu betaglukanů 16,9 %. V Grafu 43 můžeme vidět, že z odpadních substrátů je nevhodnější kávový hydrolyzát, kdy došlo k nejmenšímu snížení a to na 14,2 %. U kultivací s použitím kávového oleje přídavek jednoduššího substrátu vede ke zvýšení obsahu betaglukanů oproti kontrolnímu médiu, 10 % glukanů bylo stanoveno u kultivace s přidavkem glycerolu. Oproti ostatním kmenům *Cystofilobasidium macerans* nevykazuje při použití fritovacího oleje výrazné snížení betaglukanů oproti ostatním odpadním substrátům.

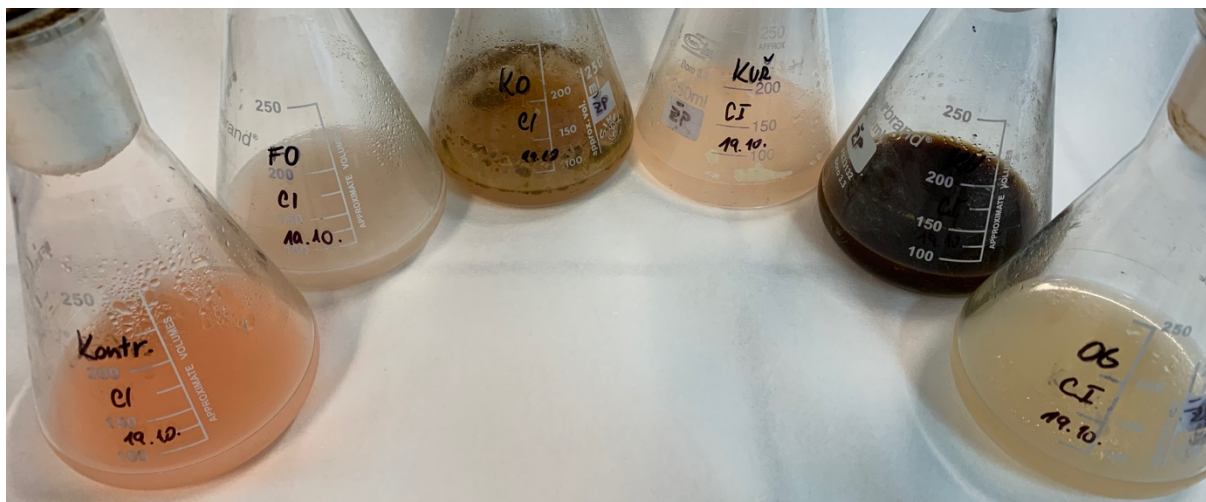


Graf 43: Obsah betaglukanů v buněčné stěně kmene *Cystofilobasidium macerans*

4.1.7.6 Shrnutí

Nejvhodnějším odpadním substrátem pro kmen *Cystofilobasidium macerans* je kombinace kávového oleje s kávovým hydrolyzátem, kdy díky přítomnosti sacharidového substrátu došlo k dosažení nejvyšší produkce biomasy a kávový olej napomohl k jejímu obohacení. Při této kombinaci bylo dosaženo 3. nejvyššího obsahu lipidů s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin, mírnému navýšení produkce karotenoidů a výraznému zvýšení obsahu ubichinonu. Při vyřešení problémů s dostupností kávového oleje pro utilizaci kvasinkami (ztekucení či emulzifikace), by bylo vhodné využití kávového oleje, kdy bylo dosaženo nejvyššího obsahu karotenoidů s majoritním zastoupením torularhodinu. Biomasa taktéž vykazuje výrazné obohacení o ubichinon a tokoferol, který byl akumulován z kávového oleje.

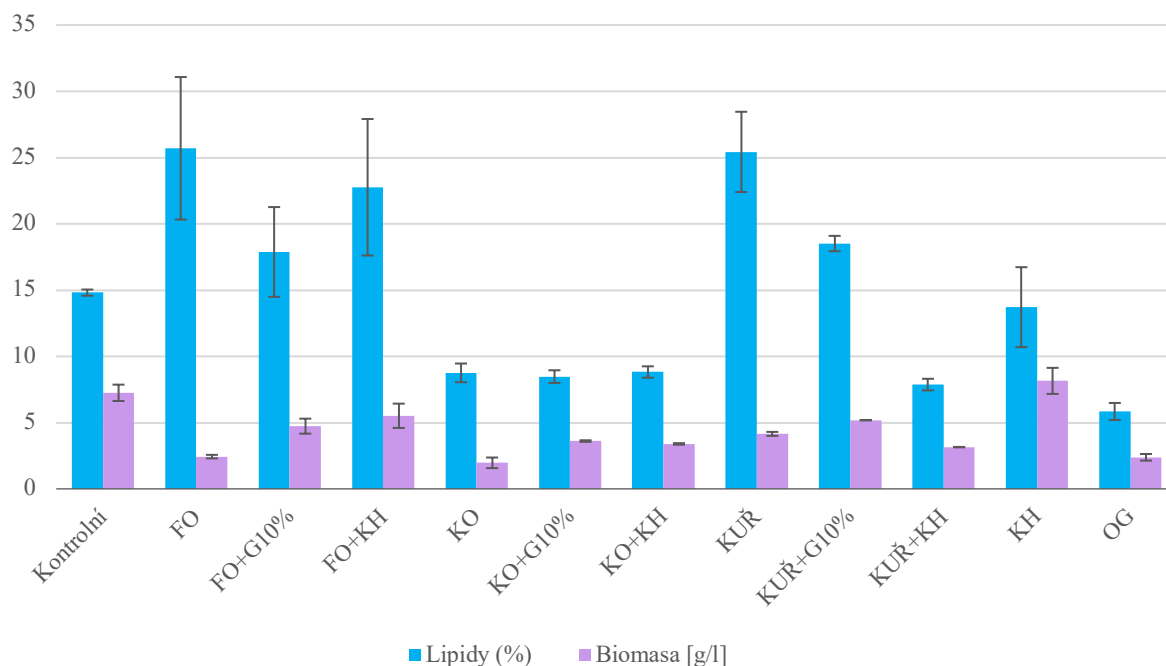
4.1.8 Produkční vlastnosti kmene *Cystofilobasidium infirmominiatum*



Obrázek 24: Screeningová kultivace kmene *Cystofilobasidium infirmominiatum* na odpadních médiích

4.1.8.1 Produkce biomasy

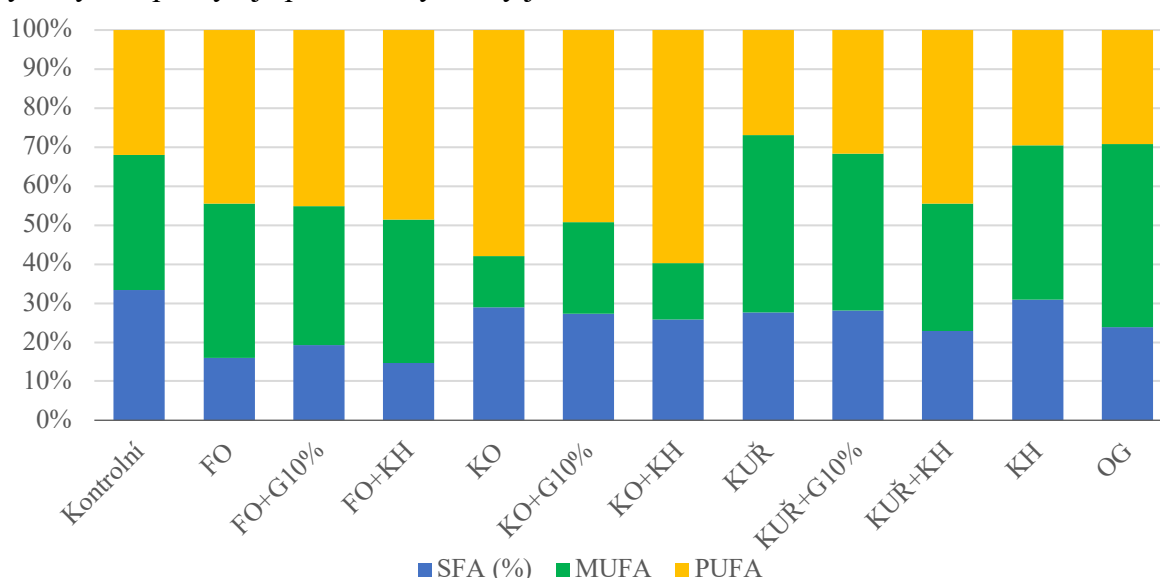
Pro zvýšení výtěžků biomasy u kmene *Cystofilobasidium infirmominiatum* není vhodné použití lipidických odpadních substrátů (Příloha 22). Ve všech případech došlo ke snížení produkce biomasy. Jediným odpadním substrátem, při jehož použití došlo ke zvýšení produkce biomasy byl kávový hydrolyzát s hodnotou $(8,1 \pm 1,0)$ g/l, což činí nárůst o 12,4 % oproti kontrolnímu médiu. Z lipidických médií bylo nejlepšího výsledku dosaženo při využití fritovacího oleje s přídavkem kávového hydrolyzátu a to $(5,5 \pm 0,9)$ g/l. Z čistě lipidických médií je nejvhodnější médium s kuřecím odpadním tukem s výtěžkem $(4,2 \pm 0,1)$ g/l.



Graf 44: Produkce biomasy kmenem *Cystofilobasidium infirmominiatum* a obsahu lipidů v biomase

4.1.8.2 Obsah lipidů v biomase

Kontrolní kultivace na glycerolovém médiu vedla k obsahu lipidů ($14,8 \pm 0,2$) % s vyrovnaným zastoupením SFA, MUFA a PUFA. Pro obohacení biomasy o lipidy je vhodné využít odpadní fritovací olej či kuřecí tuk. Maximální hodnoty bylo dosaženo při kultivaci na odpadním fritovacím oleji a to ($25,7 \pm 5,4$) %. Při použití kuřecího odpadního tuku bylo dosaženo hodnoty ($25,4 \pm 3,0$) %. Z Grafu 44 je patrné, že s přidavkem jednoduššího substrátu došlo ke snížení akumulace lipidů. U kombinace fritovacího oleje s kávovým hydrolyzátem došlo pouze k 3% snížení. Použití kávového oleje i ve směsích vedlo k snížení obsahu lipidů do 9 %, ale došlo k výrazné změně profilu mastných kyselin, kdy majoritní zastoupení tvořily PUFA (> 50 %), převážně na úkor MUFA (Graf 45). Maximální hodnoty 59,77 % PUFA bylo dosaženo za využití kombinace kávového oleje a kávového hydrolyzátu. Méně výrazné obohacení o polynenasycené mastné kyseliny bylo dosaženo i s použitím odpadního fritovacího oleje. V případě médií s obsahem fritovacího oleje, došlo k mírnému navýšení obsahu MUFA a PUFA dosahovala hodnot 44–49 %, SFA tak dosáhla nejnižších hodnot (15–20 %). Při použití kuřecího tuku pozorujeme majoritní zastoupení MUFA. Kultivace při použití kávového hydrolyzátu poskytuje podobné výsledky jako kontrolní kultivace.

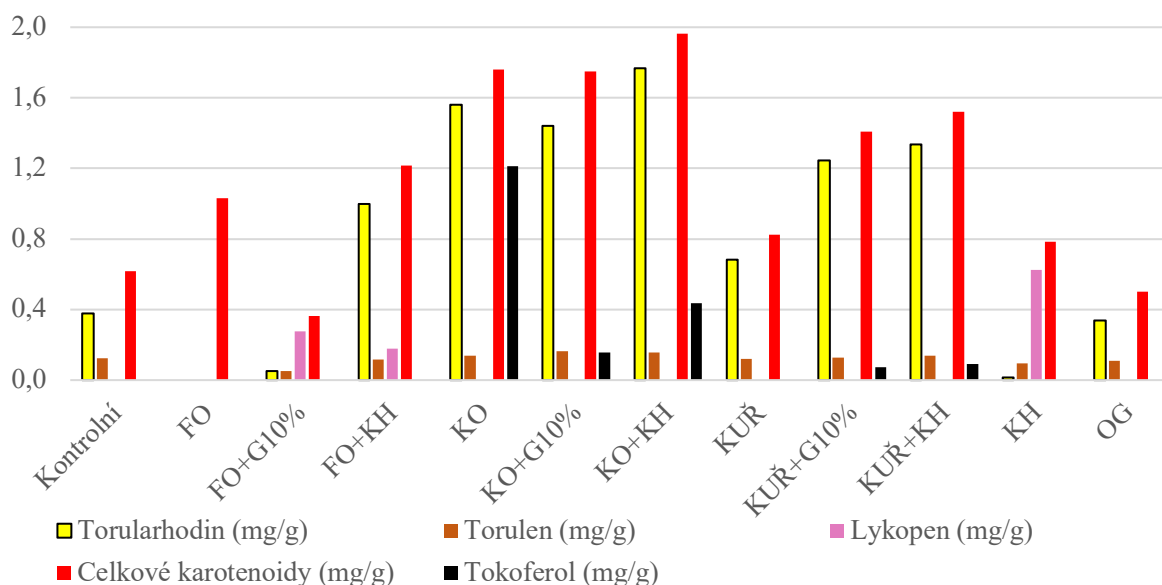


Graf 45: Složení lipidů v biomase kmene *Cystofilobasidium infirmominiatum*

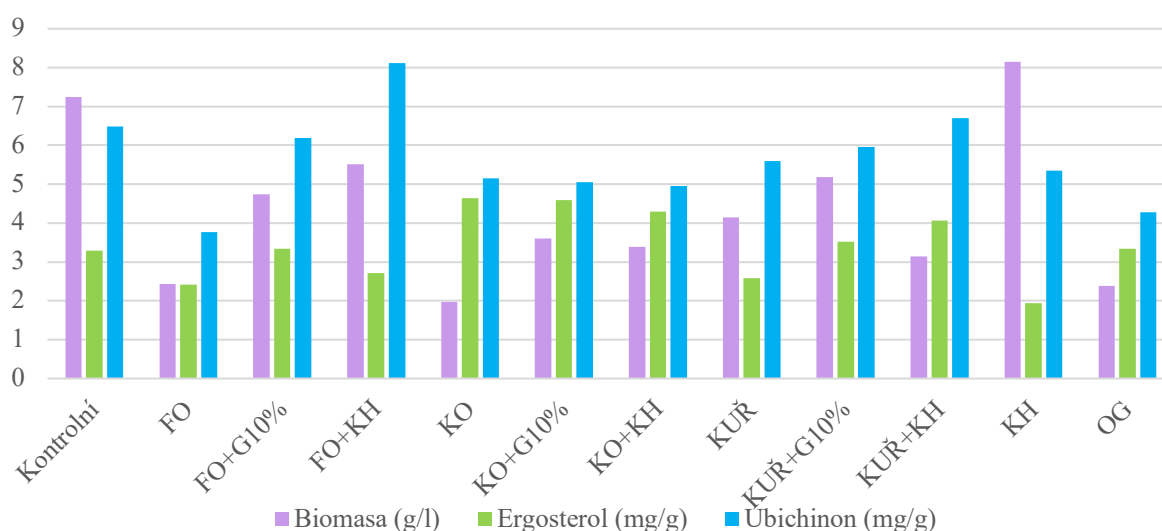
4.1.8.3 Karotenoidy a další lipofilní metabolity

Při kultivaci kmene *Cystofilobasidium infirmominiatum* na kontrolním médiu bylo dosaženo nízké produkce karotenoidů – 0,62 mg/g (Graf 46). K obohacení biomasy o karotenoidy je nejvhodnější použití kávového oleje a jeho směsí s jednodušším substrátem. Maximální hodnoty (1,96 mg/g) bylo dosaženo při použití kávového oleje s přidavkem kávového hydrolyzátu, což činí nárůst o 219 %. U médií s kávovým olejem a kávovým olejem s 10% přidavkem glycerolu pozorujeme nárůst o přibližně 186 % (1,75 mg/g). Výrazného nárůstu produkce karotenoidů bylo dosaženo taktéž při kultivaci s použitím kuřecího tuku s přidavkem kávového hydrolyzátu a to o 147 % na 1,52 mg/g. Z lipidických substrátů došlo k nejnižším nárůstům při použití fritovacího oleje (Obrázek 24). Při kultivacích s lipidickými substráty

majoritním karotenoidem byl torularhodin, při použití kávového hydrolyzátu byl majoritním karotenoidem lykopen (Příloha 23). Využití kávového oleje taktéž vedlo ke zvýšení obsahu ergosterolu. Maximální hodnoty 4,64 mg/g bylo dosaženo na čistě olejovém médiu (zvýšení o 41 % oproti kontrolnímu médiu). Použití kuřecího tuku nevedlo k významným navýšením obsahu ergosterolu (Graf 47). U fritovacího odpadního oleje došlo ke snížení produkce ergosterolu. Sacharidové médium (KH) vedlo k poklesu ergosterolu o 41 %. U kmene *Cystofilobasidium infirmominiatum* nedochází s použitím odpadních substrátů k zvýšení produkce ubiquinonu. Jediné zvýšení bylo pozorováno při použití fritovacího oleje s přidavkem kávového hydrolyzátu a to o 25 % na 8,11 mg/g. Při využití kávového oleje došlo také k obohacení biomasy o tokoferol, který byl kvasinkami akumulován z kávového oleje. Na čistě olejovém médiu bylo dosaženo hodnoty 1,21 mg/g.



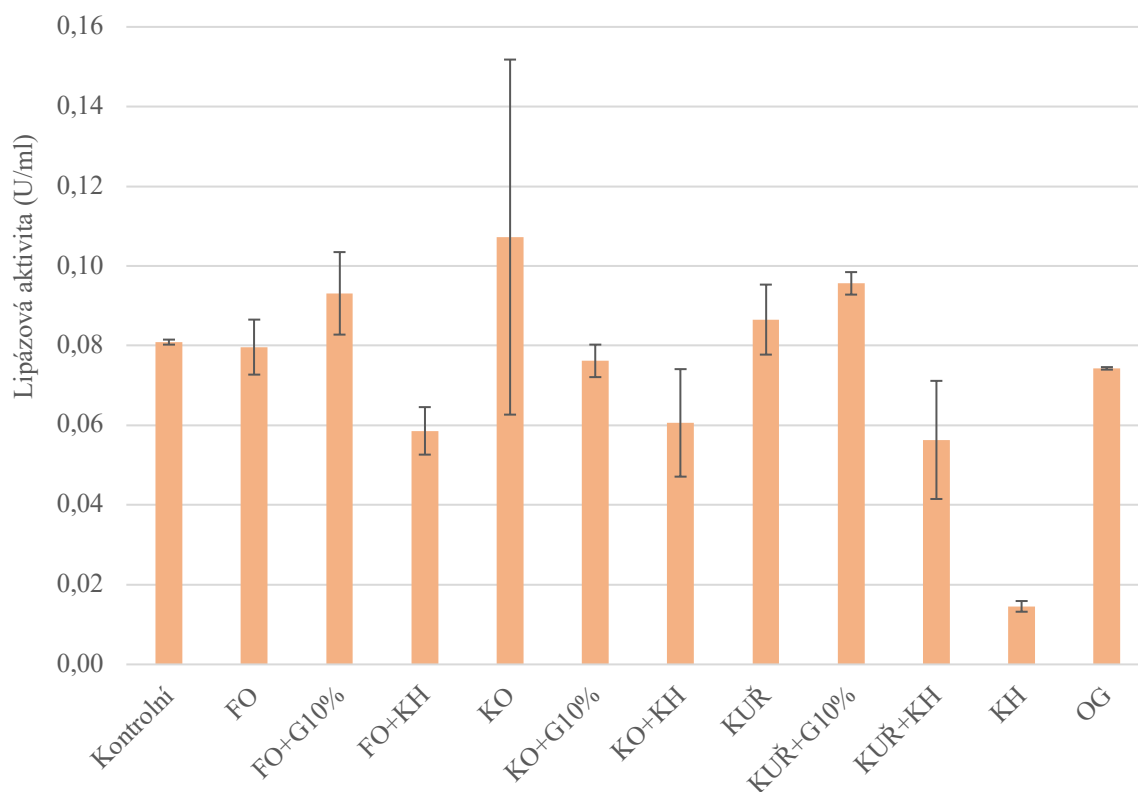
Graf 46: Produkce karotenoidů a akumulace tokoferolu kmenem *Cystofilobasidium infirmominiatum*



Graf 47: Produkce biomasy a schopnost produkce lipofilních metabolitů kmenem *Cystofilobasidium infirmominiatum*

4.1.8.4 Lipázová aktivita

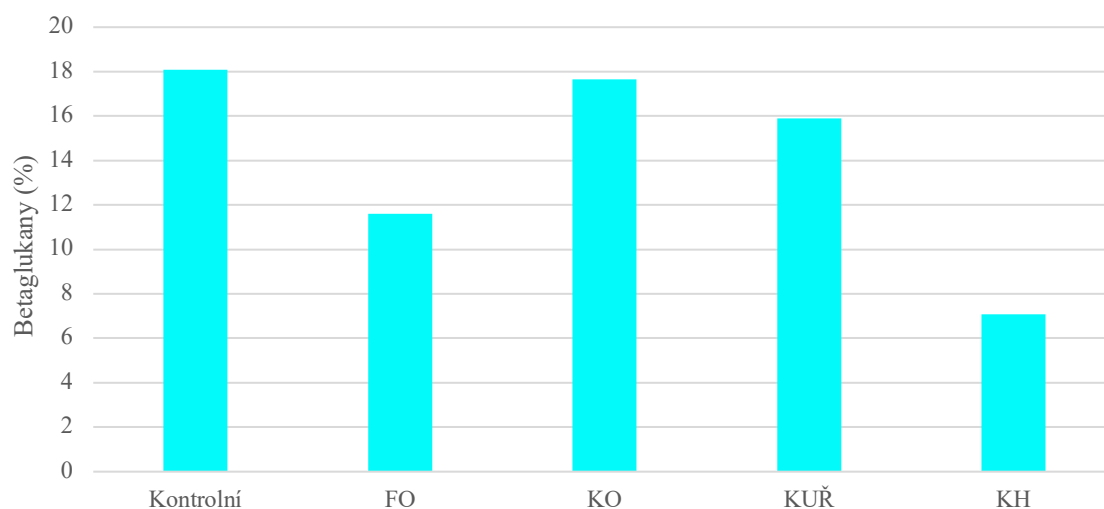
Lipázová aktivita kmene *Cystofilobasidium infirmominiatum* se pohybovala v intervalu 0,0146 – 0,1072 U/ml (Příloha 24). Kmen nevykazuje výrazné zvýšení aktivity lipáz při použití lipidických substrátů (Graf 48), což nejspíše zapříčinilo nízkou produkci biomasy. Největší zvýšení bylo zaznamenáno u kultivace na kávovém oleji, bez přídavku jednoduššího substrátu. U kultivací s fritovacím olejem a kuřecím tukem pozorujeme mírně vyšší aktivity lipáz při přídavku glycerolu. Kávový hydrolyzát zřetelně snižuje aktivitu lipáz, přičemž nejnižší aktivita byla zaznamenána u čistě sacharidové kultivace.



Graf 48: Lipázová aktivita kmene *Cystofilobasidium infirmominiatum*

4.1.8.5 Stanovení betaglukanů

Při kontrolní kultivaci bylo dosaženo obsahu betaglukanů 18,1 %. V Grafu 49 můžeme pozorovat, že nedošlo k výraznému poklesu při kultivacích s odpadními substráty (kávový olej, kuřecí tuk). Při kultivaci s kávovým olejem bylo dosaženo velice podobného obsahu betaglukanů a to 17,7 %. Nejnižší obsah byl stanoven na médiu s kávovým hydrolyzátem a to pouze 7,1 %.



Graf 49: Obsah betaglukanů v buněčné stěně kmene *Cystofilobasidium infirmominiatum*

4.1.8.6 Shrnutí

Pro kultivaci kmene *Cystofilobasidium infirmominiatum* je využití odpadních lipidických substrátů nevhodné. Kmen vykazuje nízkou lipolytickou aktivitu a není tak schopný využít tuk a využít jej k růstu kultury. Nejvíce obohacená biomasa byla získána při kultivaci na kávové oleji s přidavkem kávového hydrolyzátu, kdy by dosaženo maximálního obsahu karotenoidů, taktéž došlo k obohacení biomasy o ergosterol. Kmen vykazuje nízkou schopnost akumulace tokoferolu. Kmen *Cystofilobasidium infirmominiatum* vykazuje nejvyšší obsah betaglukanů v buněčné stěně ze všech sledovaných kmenů a současně využití odpadních substrátů jako zdrojů uhlíku nevede k tak výrazným poklesům obsahu betaglukanů.

5.2 Analýzy fermentorových kultivací

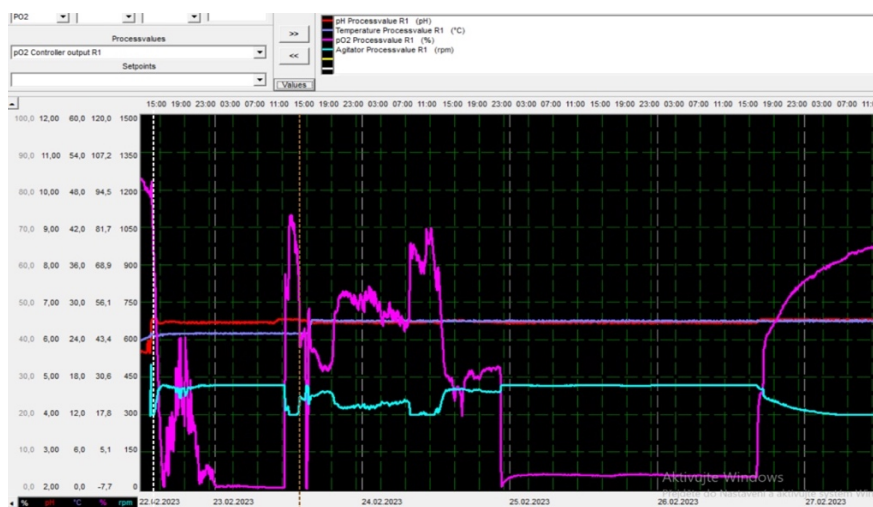
5.2.1 Fermentorová kultivace kmene *Rhodotorula toruloides*

Kmen *Rhodotorula toruloides* poskytuje dlouhodobě stabilně zajímavé výsledky. Pro kultivaci v laboratorním bioreaktoru o pracovním objemu 5 l byl zvolen jako odpadní substrát kávový olej, při jehož použití u screeningových kultivací bylo dosaženo vysoké produkce karotenoidů a ergosterolu. Současně je kávový olej vhodný pro navýšení obsahu PUFA. A tento kmen má vysokou schopnost akumulace tokoferolu z kávového oleje.

Po celou dobu kultivace byl zaznamenáván problém s dostupností kávového oleje pro kvasinky, který vytvořil fázové rozhraní (Obrázek 25) a byl tak velice obtížně dostupný pro zpracování kvasinkami. Současně teplota 25 °C není dostatečná pro dokonalé zkapalnění kávového oleje, což vedlo k jeho ulpívání na stěnách a nemohl tak být zpracován. Obrázek 26 znázorňuje průběh kultivace – pH, teplota, pO₂ a míchání. V průběhu prvního dne nejspíše došlo k ucpání přívodu vzduchu ztuhlým kávovým olejem. Z těchto důvodů byla teplota kultivace druhý den zvýšena na 27 °C. Ve 24. hodině byl proveden příkrm (100 g kávového oleje), aby došlo k vyrovnání ztrát. Bohužel se i přes zvýšení teploty nepovedlo přívod vzduchu dokonale uvolnit a po celou dobu kultivace jsme se potýkali s problémem při aeraci (obsah rozpuštěného kyslíku je v obrázku () znázorněn růžově), která vedla k zpomalení růstu biomasy a správnému fungování metabolismu.



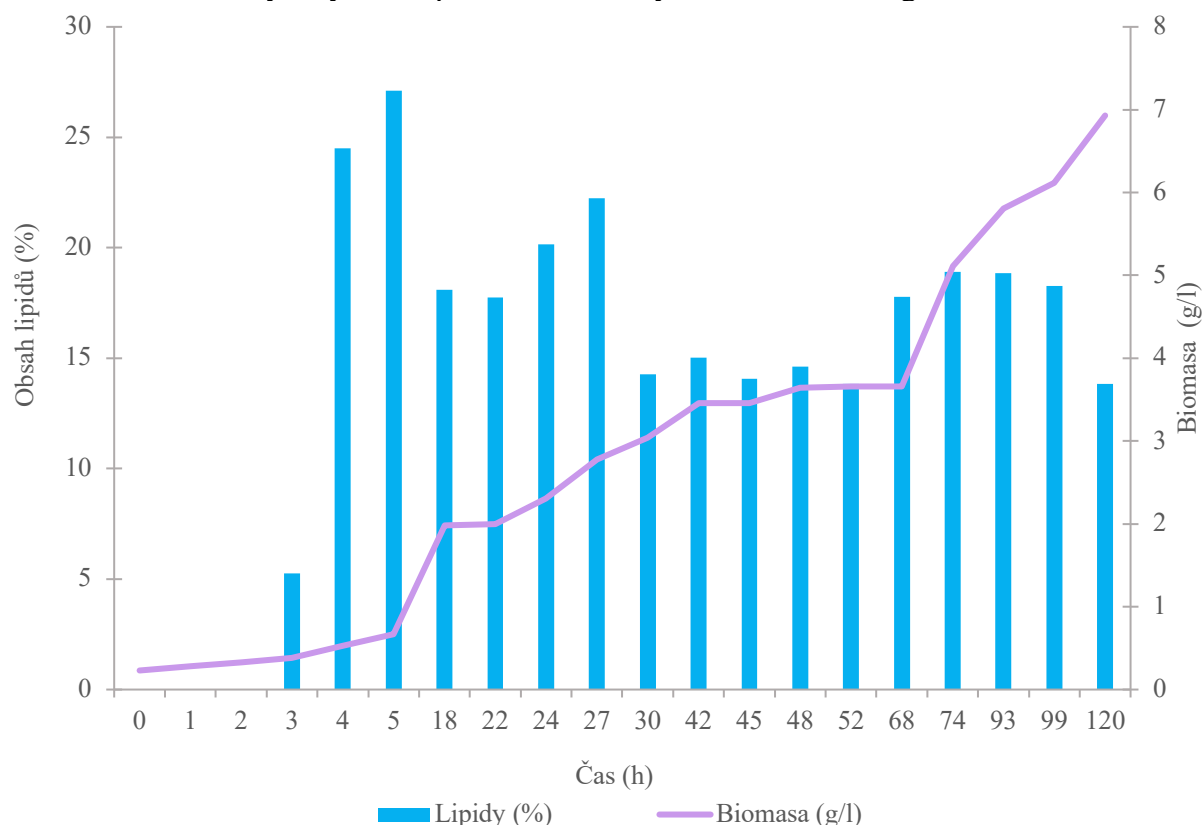
Obrázek 25: Fázové rozhraní minerálního média a kávového oleje



Obrázek 26: Výřez z ovládacího programu fermentoru, záznam parametrů kultivace

5.2.1.1 Produkce biomasy

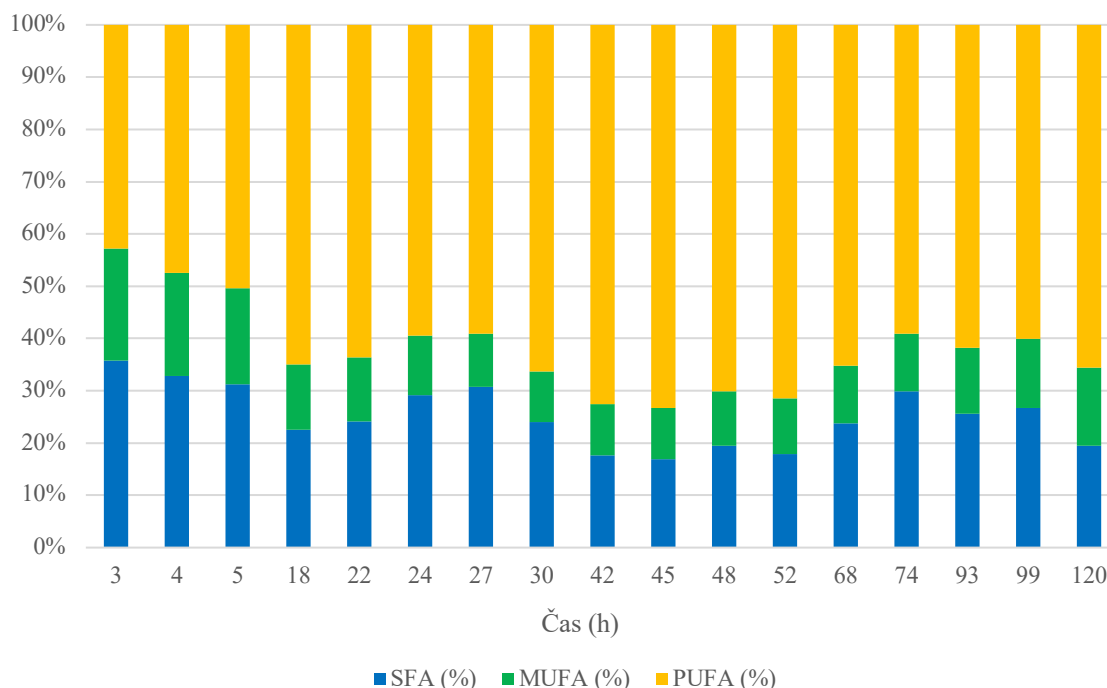
Mezi 0. a 3. hodinou můžeme pozorovat lag fázi. Zastavení růstu kultury je také viditelné mezi 48.-68. hodinou. Zrychlený růst kultury je viditelný mezi 3.-18. hodinou, kdy docházelo k nárůstu biomasy o 0,13 g/l za hodinu. Příkrmem v 24. hodině nedošlo k další lag fázi, naopak díky přidávku čerstvého tekutého kávového oleje došlo k zvýšení produkce biomasy a mezi 22.-27. hodinou biomasa narůstala rychlostí 0,16 g/l za hodinu. Nejvýraznější růst kultury je pozorován mezi 68. a 74. hodinou, kdy byl zaznamenán růst o 0,24 g/l za hodinu. Po 120 hodinách kultivace byla výsledná produkce biomasy stanovena na 6,9 g/l.



Graf 50: Produkce biomasy a zastoupení lipidů v biomase při fermentorové kultivaci kmene *Rhodotorula toruloides* na médiu s kávovým olejem

5.2.1.2 Obsah lipidů

Analýza lipidů byla z důvodu malých výtěžků prováděna od 3. hodiny kultivace. V Grafu 50 můžeme vidět, že v lag fázi nedocházelo k výrazné akumulaci lipidů, ve 3. hodině byl obsah lipidů 5,3 %. Poté došlo k výrazné akumulaci lipidů, kdy v 5. hodině bylo dosaženo maxima a to 27,1 %. Následně došlo k mírnému poklesu. Další nárůst nastal po přidávku kávového oleje do média, lokální maximum nastalo v 27. hodině, kdy bylo dosaženo 22,3 %. Následoval výrazný pokles na hodnoty kolem 14 % až do 68. hodiny, kdy s výrazným nárůstem biomasy došlo i k akumulaci lipidů. Mezi 68. a 99. hodinou se obsah lipidů pohyboval mezi 18-19 %. Následně kultura začala znovu využívat uskladněné lipidy (nejspíše z důvodu špatně dostupného kávového oleje na hladině) a došlo k poklesu zpět na 13,8 %.



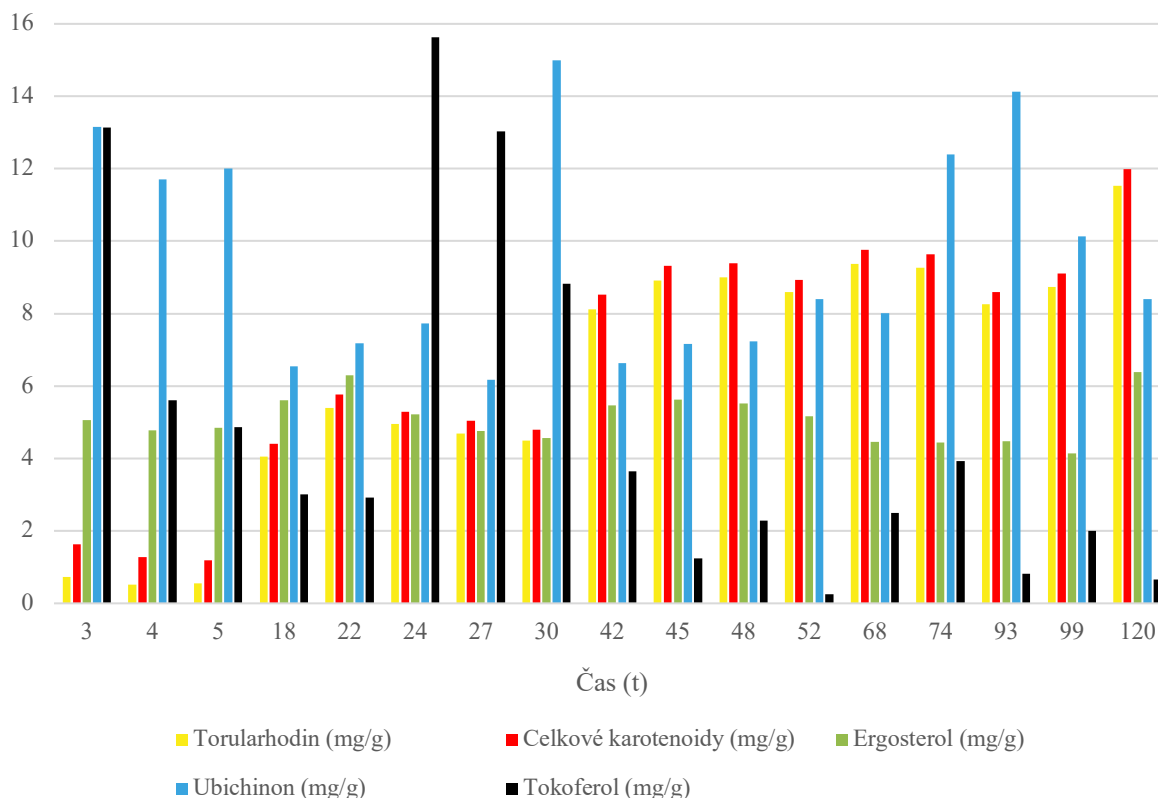
Graf 51: Složení lipidů v biomase při fermentorové kultivaci kmene Rhodotorula toruloides na médiu s kávovým olejem

Využití kávového oleje při kultivaci kmene *Rhodotorula toruloides* vede k výrazné změně profilu mastných kyselin. U screeningové kultivace bylo dosaženo obsahu PUFA 43,8 %, při fermentorové kultivaci došlo k ještě výraznější dominanci PUFA v profilu mastných kyselin. Jak vidíme v Grafu 51 na počátku kultivace ve 3. hodině bylo rozdělení 35,7 % SFA, 42,7 % MUFA a 42,7 % PUFA. Následně došlo k postupnému zvyšování PUFA až do 18. hodiny, hlavně na úkor MUFA. Následoval mírný pokles obsahu PUFA do 27. hodiny a poté, díky příkrmu v 24. hodině, došlo k výraznému obohacování biomasy až do 52. hodiny. Mezi 42. a 52. hodinou byl obsah PUFA stanoven na 70,1 – 73,3 %, přičemž maxima bylo dosaženo ve 45. hodině. Ve 45. hodině SFA dosáhla svého minima a to 16,9 % a MUFA tvořila pouze 9,8 %. Mezi 68. a 120. hodinou se ustanovily hodnoty PUFA kolem 60–65 %.

5.2.1.3 Karotenoidy a další lipofilní látky

Do 5. hodiny byl obsah karotenoidů do 1,6 mg na gram biomasy. Od 5. do 22. hodiny pozorujeme výrazný nárůstu produkce karotenoidů (Graf 52). K nejvýraznějšímu obohacení došlo mezi 5. a 18. hodinou došlo k nárůstu 0,34 mg na gram biomasy za hodinu. Lokální maximum bylo dosaženo v 22. hodině a to 5,77 mg/g. Do 30. hodiny docházelo k poklesu obsahu karotenoidů v biomase, kultura spotřebovávala energii na růst. K dalšímu výraznému zvýšení produkce biomasy došlo mezi 30. a 45. hodinou, kdy v průměru za hodinu došlo k nárůstu o 0,3 mg/g. Mezi 45. a 99. hodinou byl průměrný obsah karotenoidů 9,25 mg/g. Maximálního obsahu karotenoidů bylo dosaženo v 120. hodině a to 11,98 mg/g, což je o 250 % více než u screeningové kultivace. Majoritním karotenoidem u tohoto kmene byl torularhodin. Torulen byl pozorován pouze do 5. hodiny, jelikož slouží jako prekursor pro torularhodin. Lykopen je prekurzorem pro všechny ostatní sledované karotenoidy, ale po celou dobu jej bylo

možné detekovat v biomase, což naznačuje, že po celou dobu kultivace docházelo k produkci karotenoidů a rychlost metabolické přeměny lykopenu na ostatní karotenoidy je mnohem pomalejší než rychlost přeměny torulenu na torularhodin. Jedním z minoritních karotenoidů byl i betakaroten, který svého maxima dosáhl ve 120. hodině a to 0,2 mg/g.



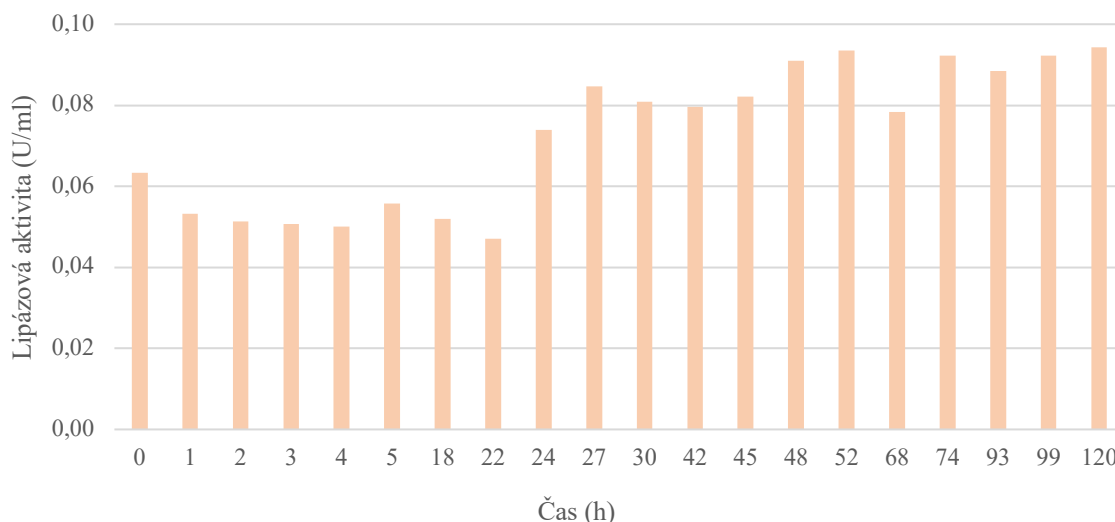
Graf 52: Schopnost produkce a akumulace karotenoidů, ergosterolu, ubichinonu a tokoferolu kmenem Rhodotorula toruloides při fermentorové kultivaci na médiu s kávovým olejem

Kávový olej jako odpadní substrát má výhodu díky obsahu tokoferolu, jež jsou karotenogenních kvasinky schopny akumulovat. Na počátku kultivace došlo k výrazné akumulaci tokoferolu, důvodem bude nejspíše jeho antioxidační aktivita, buňky ho naakumulují do zásoby, aby se v budoucnu měly, jak chránit proti oxidačnímu stresu. Ve 3. hodině byl obsah tokoferolu stanoven na 13,14 mg na gram biomasy. Následoval výrazný pokles a lokálního minima bylo dosaženo ve 22. hodině (2,93 mg/g). Po přidavku kávového oleje došlo k další rychlé akumulaci tokoferolu a bylo dosaženo maximálního obsahu 15,62 mg/g a následoval další pokles, nejspíše z důvodu využívání tokoferolu jako antioxidantu, ve 27. hodině byl obsah tokoferolu 13,03 mg/g. Dále už docházelo k výrazným poklesům. Při posledním odběru byl obsah tokoferolu pouze 0,65 mg/g.

U screeningové kultivace bylo dosaženo obsahu ergosterolu 6,12 mg/g, maximální hodnoty u fermentorové kultivace bylo na konci kultivace v 120. hodině stanoven obsah ergosterolu 6,38 mg/g. Nárůst obsahu ubichinonu koreluje s rychlostí růstu kultury. Nejvyšší hodnoty bylo dosaženo v 30. hodině, kdy obsah ubichinonu byl 15 mg na gram biomasy. Následoval výrazný pokles na 6,63 mg/g. A postupný nárůst, kdy lokálního maxima bylo dosaženo v 93. hodině a to 14,12 mg na gram biomasy.

5.2.1.4 Lipázová aktivita

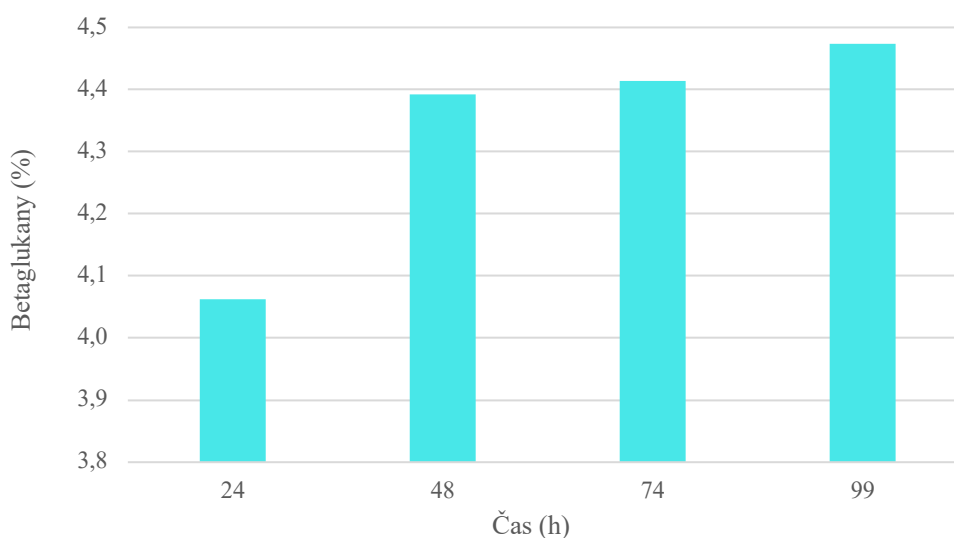
Lipázová aktivita kmene *Rhodotorula toruloides* se při kultivaci v bioreaktoru pohybovala v intervalu 0,0470 – 0,9340 U/ml (Graf 53). Minimální hodnota byla zaznamenána ve 22. hodině, před provedením příkrmu. Následně došlo k výraznému zvýšení aktivity, kdy mezi 22. a 27. hodinou je rozdíl 0,0377 U/ml právě v důsledku přidavku čerstvého substrátu. Aktivita lipáz koreluje s produkcí biomasy, v časech, kdy došlo k nárustu biomasy došlo i k zvýšení lipázové aktivity.



Graf 53: Hodnoty lipázové aktivity kmene *Rhodotorula toruloides* v průběhu fermentorové kultivace na médiu s kávovým olejem

5.2.1.5 Stanovení betaglukanů

U betaglukanů pozorujeme postupné navyšování jejich obsahu v buněčné stěně (Graf 54). Maximální stanovený obsah betaglukanů byl 4,47 % v 99. hodině. U screeningové kultivace bylo dosaženo 9,64 % betaglukanů.



Graf 54: Obsah betaglukanů v buněčné stěně kmene *Rhodotorula toruloides* při fermentorové kultivaci na médiu s kávovým olejem

5.2.1.6 Shrnutí

Při kultivaci kmene *Rhodotorula toruloides* vyvstal problémem s aerací a špatnou dostupností substrátu. I přes technické problémy bylo dosaženo podobného výtěžku biomasy jako po pětidenní baňkové kultivaci. Zajištěním dobré dostupnosti substrátu a stabilní aerace by došlo k navýšení produkce biomasy. V Tabulce 11 je uvedeno srovnání získaných výsledků ze screeningové pětidenní kultivace a z fermentorové kultivace po pěti dnech. Z uvedených dat lze vyvodit, že i přes technické problémy došlo u mnoho sledovaných parametrů k jejich zvýšení a došlo tak k výraznému obohacení biomasy. Největší nárůst pozorujeme u celkových karotenoidů, kdy jejich produkce u fermentorové kultivace byla čtyřnásobná. Došlo také k mírnému nárůstu obsahu lipidů v biomase a zároveň došlo k výraznému obohacení o polynenasycené mastné kyseliny.

	Screeningová kultivace	Fermentor
Biomasa (g/l)	6,5	6,9
Lipidy (%)	10,46	13,83
SFA (%)	26,21	19,46
MUFA (%)	29,95	14,95
PUFA (%)	43,84	65,59
Torularhodin (mg/g)	2,93	11,53
Torulen (mg/g)	0,17	-
Lykopen (mg/g)	-	0,18
Betakaroten (mg/g)	0,29	0,20
Celkové karotenoidy (mg/g)	3,43	11,98
Ergosterol (mg/g)	6,11	6,38
Ubichinon (mg/g)	6,14	8,41
Tokoferol (mg/g)	0,81	0,65
Lipázová aktivita (U/ml)	0,14	0,09

Tabulka 11: Srovnání sledovaných parametrů u screeningové kultivace a fermentorové kultivace kmene *Rhodotorula toruloides* na médiu s kávovým olejem

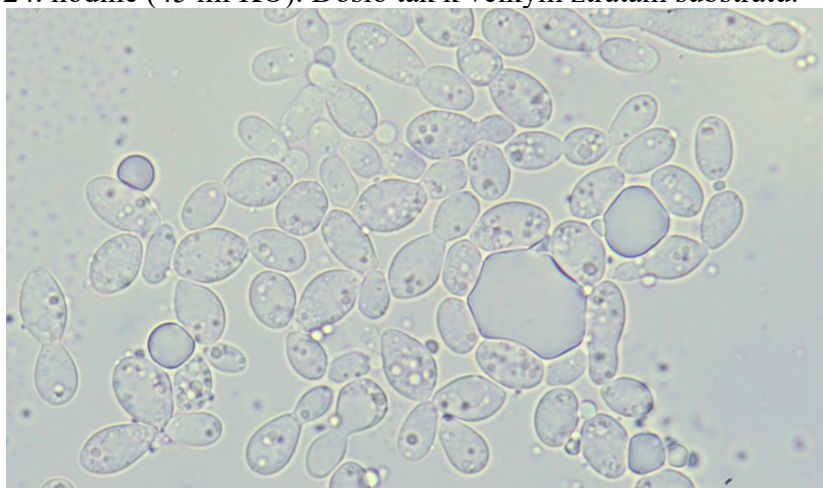
Pro získání nejvíce biomasy obohacené o karotenoidy, ergosterol a polynenasycené mastné kyseliny je nejvhodnější ukončit kultivaci ve 120. hodině. Biomasa s vysokým obsahem tokoferolu či ubichinonu byla detekována mezi 24. a 30. hodinou. V té chvíli byl obsah ostatních látek a celkový výtěžek biomasy mnohem menší. Pro zvýšení obsahu tokoferolu a ubichinonu ve 120. hodině by bylo vhodné provést příkrm malým množstvím kávového oleje v 115. hodině, aby došlo k akumulaci tokoferolu. Zvýšené hodnoty ubichinonu jsou taktéž pozorovány na počátku kultivace a po příkrmu. Veškeré naměřené hodnoty k fermentorové kultivaci kmene *Rhodotorula toruloides* jsou uvedeny v Příloze 25 až 27.

5.2.2 Fermentorová kultivace kmene *Cystofilobasidium macerans*

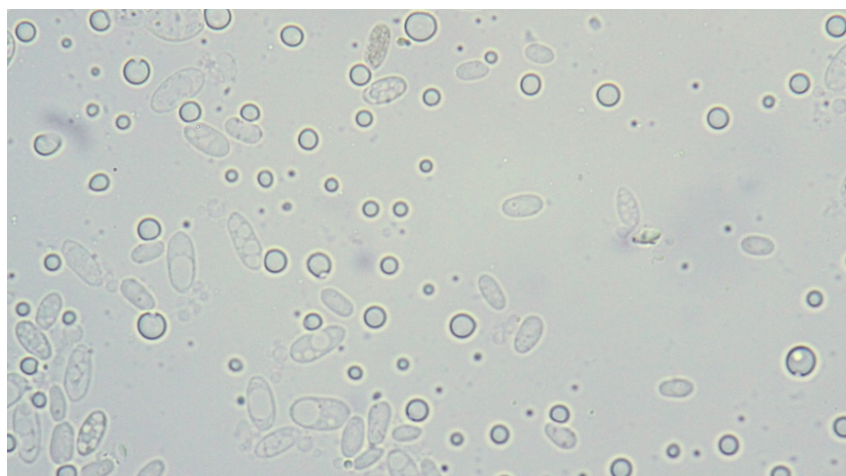
Po problémech při kultivaci kmene *Rhodotorula toruloides* se špatnou dostupností kávového oleje a ucpáním přívodu vzduchu bylo cílem dosáhnout možnosti velkoobjemové kultivace s kávovým olejem a dosažení emulzifikace média.

Pro nastartování růstu kultury je vhodné dodat i jednodušší substrát. Kávový olej a kávový hydrolyzát je možné získat z jednoho odpadu proto byla tato kombinace zvolena pro další velkoobjemovou kultivaci a kmen *Cystofilobasidium macerans* vykazoval výborné výsledky při screeningové kultivaci na této kombinaci substrátů. Při screeningových kultivacích kmen vykazoval vysokou produkci biomasy, která byla významně obohacena o lipidy s vysokým zastoupením PUFA a ubiquinonu. Dále vedle využití kávových odpadů k zvýšené produkci karotenoidních barviv a kávový olej je výborným zdrojem tokoferolu, který jsou karotenogenní kvasinky schopny akumulovat.

Pro dosažení požadovaných cílů byla teplota kultivace od začátku zvýšena na 27 °C a do média byl přidán potravinářský emulzifikátor slunečnicový lecitin. Problém s dostupností kávového oleje byl vyřešen (Obrázek 27, Obrázek 28), avšak vzniklá emulze vykazovala problémy s nadměrným pěněním i přes přidavek antifoamu. K silnému pění došlo ihned po příkrmu ve 24. hodině (45 ml KO). Došlo tak k velkým ztrátám substrátu.



Obrázek 27: Snímek z mikroskopu kultury při odběru ve 120 h

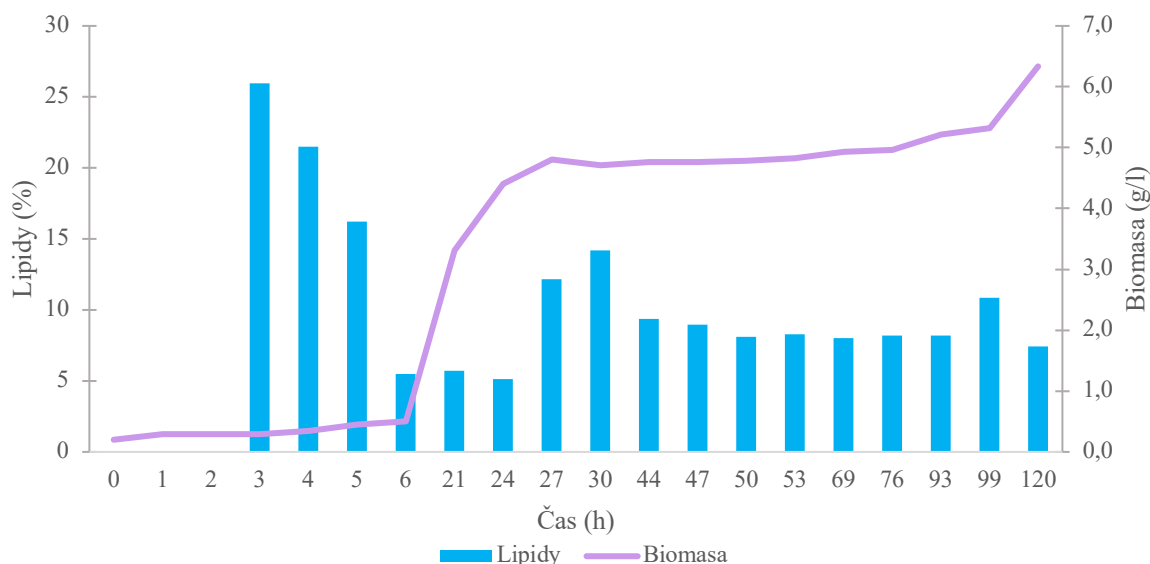


Obrázek 28: Snímek z mikroskopu dokazující emulzifikaci média

5.2.2.1 Produkce biomasy

Po pětidenní kultivaci bylo dosaženo výtěžku 6,3 g/l biomasy (Příloha 28). Při screeningové kultivaci na stejném médiu bylo dosaženo výtěžku 14,6 g/l, nižší výtěžek byl způsoben problémem s pěněním, kdy velká část substrátu vytvořila pěnu a ta zůstala v horní části fermentoru a kvasinky jej nemohly zpracovat a neměly tak dostatek zdroje energie pro růst.

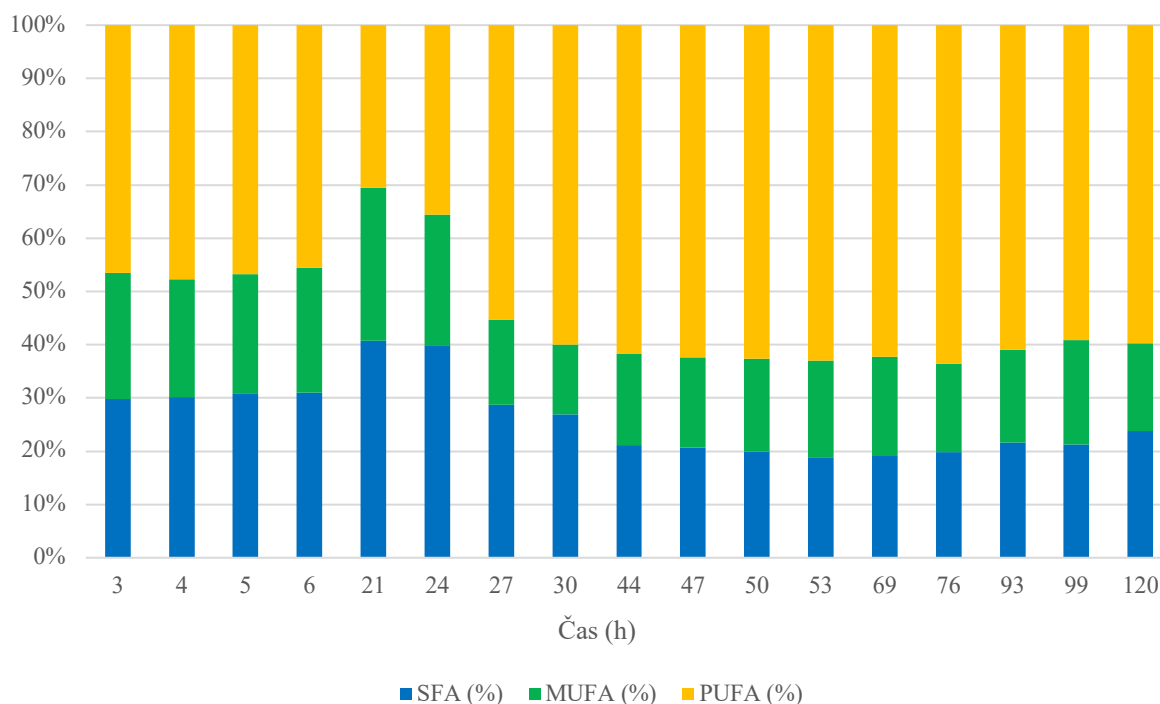
Mezi 1. a 4. hodinou lze pozorovat lag fázi a fázi počínajícího růstu (Graf 55), obsah biomasy se pohyboval do 0,3 g/l. Následně nastala exponenciální fáze mezi 5. a 27. hodinou, kdy bylo dosaženo 4,8 g/l biomasy. Největší rychlost růstu byla zaznamenána mezi 21. a 24. hodinou, kdy v průměru každou hodinu se zvýšil obsah biomasy o 0,37 g/l. Mezi 30. a 53. hodinou byla zaznamenána stacionární fáze, kdy se množství biomasy neměnilo. Díky fed-batch kultivaci můžeme mezi 53. a 93. hodinou pozorovat fázi zvýšeného růstu. Od 93. hodiny můžeme pozorovat začátek druhé exponenciální fáze. Dá se tedy předpokládat, že bylo možné dosáhnout vyššího výtěžku, kdyby kultivace nebyla ukončena.



Graf 55: Produkce biomasy a zastoupení lipidů v biomase při fermentorové kultivaci kmene *Cystofilobasidium macerans* na médiu s kávovým olejem s přidavkem kávového hydrolyzátu

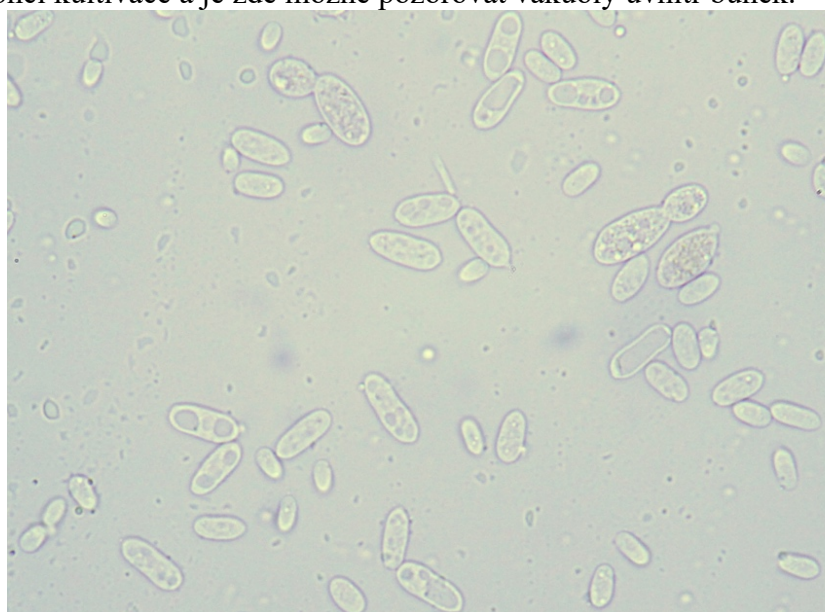
5.2.2.2 Obsah lipidů

Kvůli nedostatku biomasy na počátku kultivace bylo stanovení lipidů v biomase provedeno od 3. hodiny. Maximální obsah lipidů tak byl stanoven ve 3. hodině a to 25,96 % následoval postupný pokles až do příkrmu ve 24. hodině. Fed-batch provedený ve 24. hodině (45 ml kávového oleje) zapříčinil další akumulaci lipidů do biomasy. Lokálního maxima bylo dosaženo ve 30. hodině a to 14,2 %. Mezi 44. a 93. hodinou došlo k ustálení obsahu lipidů mezi 8,0 – 9,4 %. V 99. hodině došlo k mírnému nárůstu na 10,8 % a při ukončení kultivace byl zjištěn obsah lipidů 7,4 %.



Graf 56: Složení lipidů v biomase při fermentorové kultivaci kmene Rhodotorula toruloides na médiu s kávovým olejem

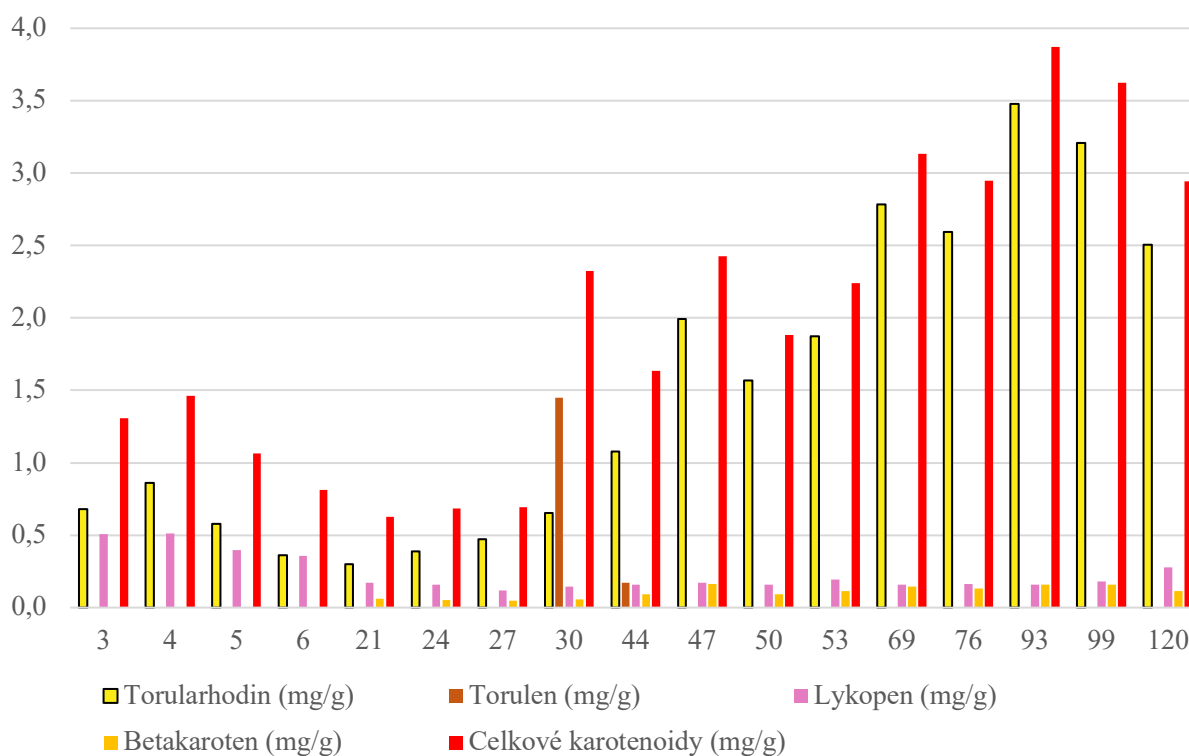
Na počátku kultivace (ve 3. hodině, předchozí odběry nedostatek biomasy na vzorky) byl stanoven profil mastných kyselin v poměru 30 : 24 : 46 (SFA : MUFA : PUFA). Do 24. hodiny docházelo k snížení obsahu polynenasycených mastných kyselin až na 35,5 % (Graf 56). Přídavkem kávového oleje došlo k výraznému nárůstu obsahu PUFA o 20 % v průběhu 3 hodin. Následně docházelo k postupnému nárůstu obsahu PUFA až do 76. hodiny, kdy bylo dosaženo maximálního obsahu PUFA a to 63,3 %. Následně došlo k mírnému poklesu a při ukončení kultivace ve 120. hodině byl obsah PUFA 59,7 %. Na Obrázku 29 můžeme vidět snímek pořízený na konci kultivace a je zde možné pozorovat vakuoly uvnitř buněk.



Obrázek 29: Snímek z mikroskopu kultury Cystofilobasidium macerans ve 120. hodině

5.2.2.3 Karotenoidy a lipofilní látky

Z důvodu malých výtěžků biomasy na počátku kultivace byly lipofilní látky stanovovány až od 3. hodiny, veškeré naměřené hodnoty jsou uvedeny v Příloze 29. Na počátku kultivace pozorujeme zvýšenou produkci karotenoidů mezi 3. a 4. hodinou, kde bylo dosaženo obsahu karotenoidů 1,46 mg/g (Graf 57). Mezi 4. a 27. hodinou došlo k postupnému poklesu obsahu karotenoidů až na 0,69 mg/g. Mezi 27. a 30. hodinou došlo k výraznému zvýšení produkce karotenoidů a to o 0,54 mg na gram biomasy za hodinu. Až do konce kultivace můžeme pozorovat kolísavý nárůst, přičemž maximální obsah karotenoidů byl stanoven v 93. hodině a to 3,87 mg/g. Obsah karotenoidů na konci kultivace činil 2,94 mg/g což je stále více než u screeningové kultivace na stejném médiu. Majoritní zastoupení mezi karotenoidy měl po celou dobu kultivace torularhodin. Minoritními karotenoidy byly lykopen, betakaroten a torulen. Na počátku kultivace (ve 3. hodině) bylo zastoupení torularhodinu a lykopenu téměř 1:1, s rostoucí dobou kultivace docházelo k zvyšování poměru ve prospěch torularhodinu.

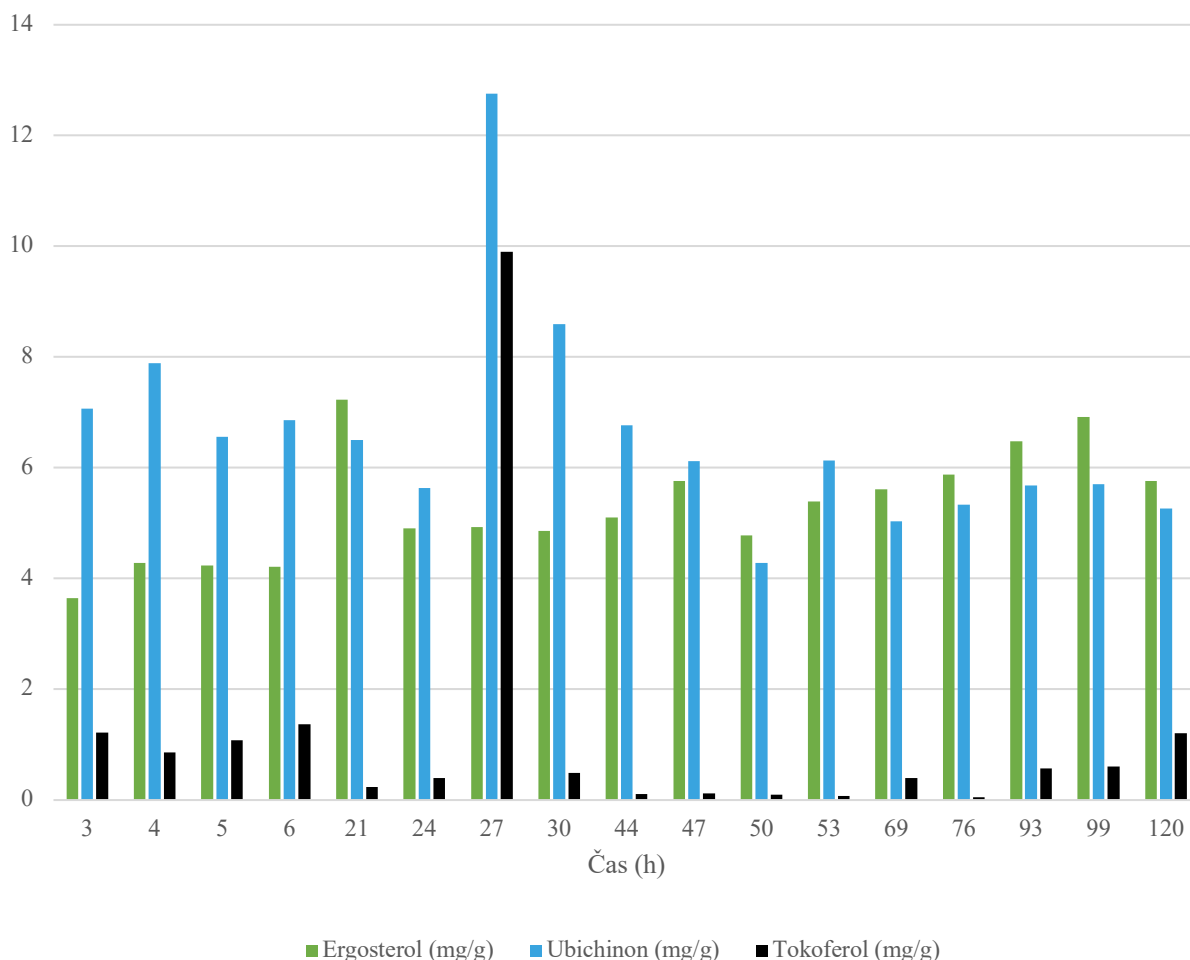


Graf 57: Produkce karotenoidů kmenem *Rhodotorula toruloides* při fermentorové kultivaci na médiu s kávovým olejem

Kmen *Cystofilobasidium macerans* je schopný akumulace tokoferolu z kávového oleje. Tokoferol je akumulován hned na počátku kultivace, mezi 3. a 6. hodinou byl obsah tokoferolu 0,9 – 1,4 mg na gram biomasy. Ve stacionární fázi byl obsah tokoferolu velice nízký. Na konci prvního dne kultivace došlo k výraznému snížení až na 0,2 mg/g. Po provedení příkrmu ve 24. hodině došlo k výrazné akumulaci tokoferolu kulturou. Maximálního obsahu tokoferolu bylo dosaženo ve 27. hodině a to 9,9 mg tokoferolu na gram biomasy. Následoval extrémní pokles až do 93. hodiny, kdy začal obsah tokoferolu narůstat. Obsah tokoferolu tedy koreluje s rychlostí růstu kultury. S výrazným zvýšením produkce biomasy na konci kultivace došlo i k zvýšení obsahu tokoferolu, ve 120. hodině byl stanoven na 1,2 mg/g. Tyto skutečnosti

naznačují, že buňka na svém počátku akumuluje tokoferol z kávového oleje a poté jej využívá jako antioxidant. Veškeré naměřené hodnoty jsou uvedeny v Příloze 30.

Obsah ubichinonu vykazuje podobný trend jako tokoferol (Graf 58). Na počátku kultivace je jeho obsah vyšší než na konci kultivace. Mezi 3. a 6. hodinou byl obsah ubichinonu v intervalu 6,6 – 7,9 mg na gram biomasy. Poté došlo k mírnému poklesu a po příkrmu v 24. hodině došlo k výraznému nárustu. Ve 27. hodině bylo dosaženo maximální hodnoty a to 12,8 mg/g. Následoval pokles až do 50. hodiny, kdy bylo dosaženo minimálního obsahu a to 4,3 mg/g. Mezi 53. a 120 hodinou kolísal obsah ubichinonu v intervalu 5,0 – 6,1 mg/g. Při posledním odběru byl obsah ubichinonu 5,3 mg na gram biomasy.

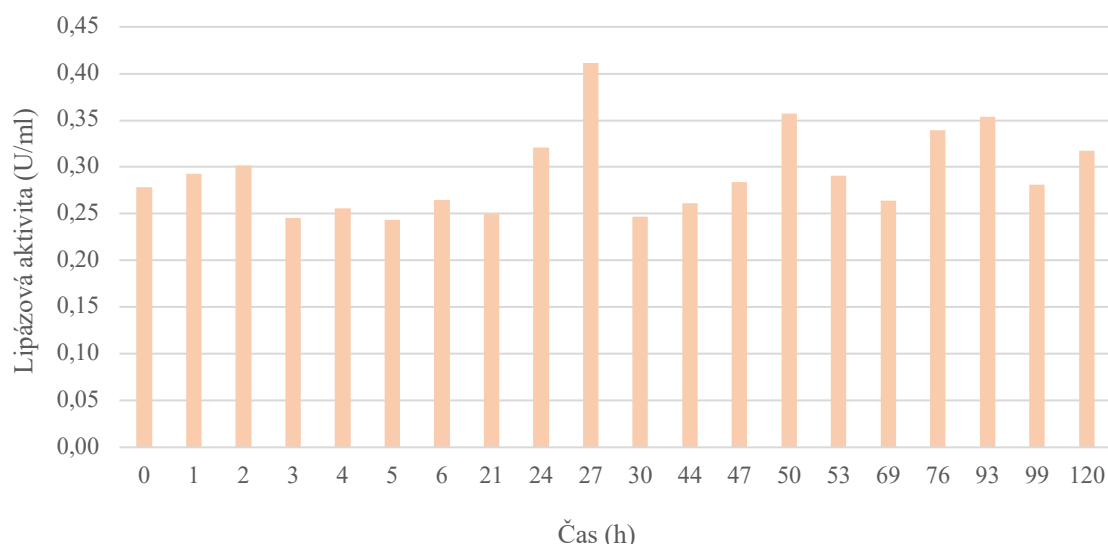


Graf 58: Schopnost produkce a akumulace tokoferolu, ergosterolu a ubichinonu kmenem Rhodotorula toruloides při fermentorové kultivaci na médiu s kávovým olejem

Obsah ergosterolu se pohyboval mezi 3,65 – 7,23 mg na gram biomasy. Maximální hodnoty bylo dosaženo ve 21. hodině. Produkce ergosterolu se zvyšovala v oblastech se zvýšenou rychlostí růstu kultury. V 99. hodině bylo dosaženo lokálního maxima a to 6,9 mg/g.

4.2.2.4 Lipázová aktivita

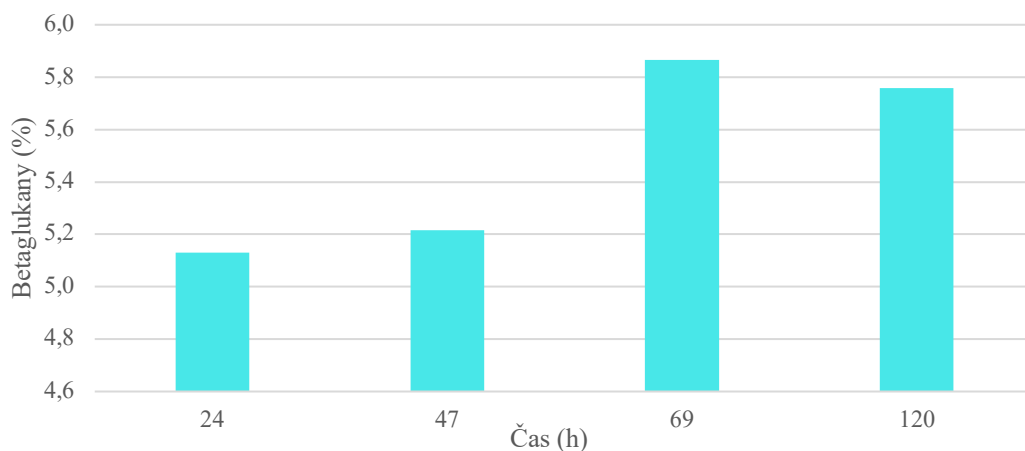
Lipázová aktivita kmene *Cystofilobasidium macerans* se při velkoobjemové kultivaci pohybovala v intervalu 0,2434 – 0,4116 U/ml (Graf 59). Maximální lipázové aktivity bylo dosaženo ve 27. hodině. Mezi 0. a 3. hodinou byla lipázová aktivita v intervalu 0,28 – 0,30 U/ml, následovalo mírné snížení. Poté mezi 24. a 27. hodinou bylo dosaženo nejvyšší lipázové aktivity, kultura obsahovala adaptované buňky a byl proveden příkrm. V médiu tudíž bylo velké množství lipidického substrátu a kvasinky se snažily jej zpracovat. Následoval výrazný pokles. Lokálního maxima pak bylo dosaženo v 50. hodině a v 93. hodině.



Graf 59: Hodnoty lipázové aktivity kmene *Cystofilobasidium macerans* v průběhu fermentorové kultivace na médiu s kávovým olejem s přidavkem kávového hydrolyzátu

4.2.2.5 Stanovení betaglukanů

Při screeningové baňkové kultivaci kmene *Cystofilobasidium macerans* na médiu s kávovým olejem s přidavkem kávového hydrolyzátu bylo po pětidenní kultivaci dosaženo obsahu betaglukanů 9,41 %. Při poloprovozní kultivaci bylo dosaženo maximálně 5,87 % v 69. hodině (Graf 60). Do 120. hodiny došlo k mírnému poklesu a to 5,76 %.



Graf 60: Obsah betaglukanů v buněčné stěně kmene *Cystofilobasidium macerans* při fermentorové kultivaci na médiu s kávovým olejem s přidavkem kávového hydrolyzátu

5.2.2.6 Shrnutí

Zvýšení teploty kultivace od počátku na 27 °C a přidání slunečnicového lecitinu vedlo ke vzniku emulze, ale lecitin zvýšil pěnivost. I přes velký přídavek antifoam přípravku se nepovedlo zabránit pění. Těsně po přidavku substrátu ve 24. hodině bylo nutné vypnout aeraci, aby bylo zabráněno úplnému vypění média. Aerace byla postupně zvyšována a regulována, ale i přes veškerou snahu byla kultura málo provzdušňována, a to vedlo k nižší produkci biomasy. Současně se z části substrátu se vytvořila pěna, která nebyla dále využívána. I tato skutečnost vedla ke snížení produkce biomasy.

Při screeningové baňkové kultivaci po 5 dnech byl výtěžek biomasy 14,6 g/l, u velkoobjemové kultivace po 120 hodinách byl výtěžek méně jak poloviční (6,3 g/l). Pro možnost využití kávového oleje při fermentorových kultivacích je nutné vyřešit problém s dostupností substrátu a pění. Je nutné otestovat jiné emulgátory.

V Tabulce 12 je uvedeno srovnání sledovaných parametrů při screeningové baňkové kultivaci po pěti dnech kultivace a velkoobjemové kultivace ve 120. hodině. Kultivace v bioreaktoru napomohla k zvýšení produkce karotenoidů a ergosterolu. Současně docházelo k vyšší akumulaci tokoferolu a polynenasycených mastných kyselin. Kvůli problémům s pění došlo ke snížení produkce biomasy, obsahu lipidů (na čtvrtinovou hodnotu) a ubiquinonu.

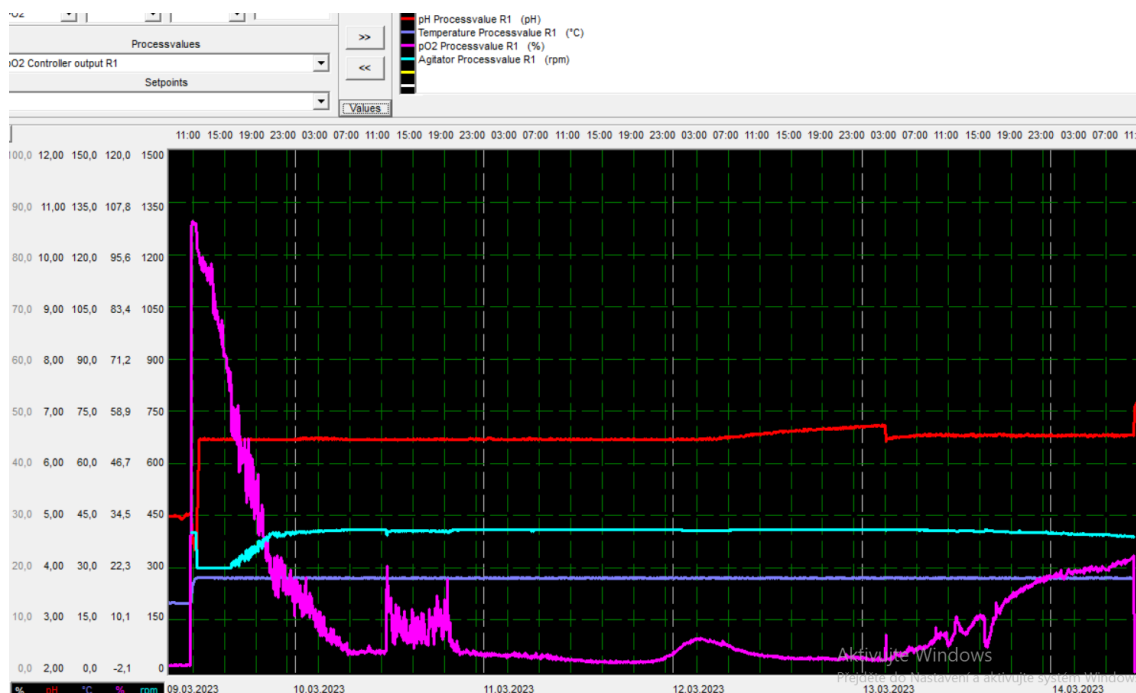
	Screeningová kultivace	Fermentor
Biomasa (g/l)	14,6	6,3
Lipidy (%)	31,52	7,43
SFA (%)	41,33	23,77
MUFA (%)	11,06	16,53
PUFA (%)	47,61	59,70
Torularhodin (mg/g)	1,59	2,51
Torulen (mg/g)	0,26	-
Lykopen (mg/g)	-	0,28
Betakaroten (mg/g)	-	0,11
Celkové karotenoidy (mg/g)	1,97	2,94
Ergosterol (mg/g)	3,16	5,76
Ubichinon (mg/g)	8,78	5,26
Tokoferol (mg/g)	0,25	1,21
Lipázová aktivita (U/ml)	0,03	0,32

*Tabulka 12: Srovnání sledovaných parametrů u screeningové kultivace a fermentorové kultivace kmene *Cystofilobasidium macerans* na médiu s kávovým olejem s přídavkem kávového hydrolyzátu*

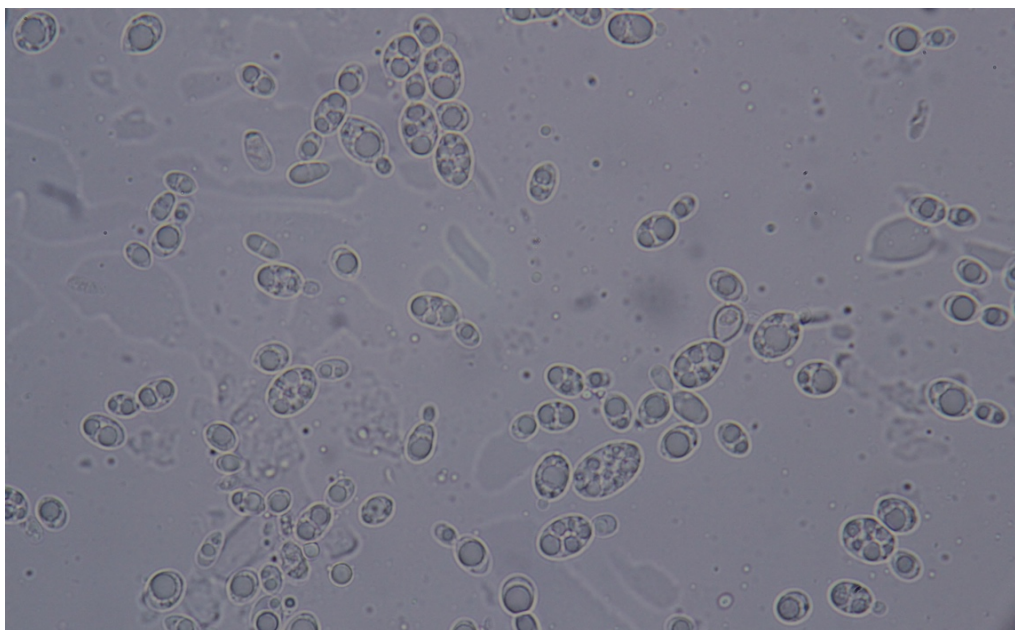
Při ukončení kultivace bylo dosaženo nejvyššího obsahu biomasy a biomasa byla v průměru velmi dobře obohacená o veškeré sledované látky. Pro dosažení biomasy více obohacené o tokoferol a ubiquinon by bylo nejvhodnější provedení malého přídavku kávového oleje asi 3 hodiny před ukončením kultivace.

5.2.3 Fermentorová kultivace kmene *Sporidiobolus pararoseus*

Pro poslední velkoobjemovou kultivaci bylo plánováno využití zástupce posledního zkoumaného rodu (*Sporidiobolus*) (Obrázek 31). Současně po předchozích problémech s kávovým olejem byl pro kultivaci upřednostněn kuřecí odpadní tuk jako lipidický substrát. Po předchozích zkušenostech je vhodné využít přídatku jednoduššího substrátu, proto jako médium byla zvolena kombinace kuřecího odpadního tuku s 10% přídatkem kávového hydrolyzátu. I u kuřecího tuku byl u screeningových kultivací problém s jeho nedokonalým roztáním, proto byla kultivační teplota nastavena na 27 °C (Obrázek 30).



Obrázek 30: Výřez z ovládacího programu fermentoru, záznam parametrů kultivace

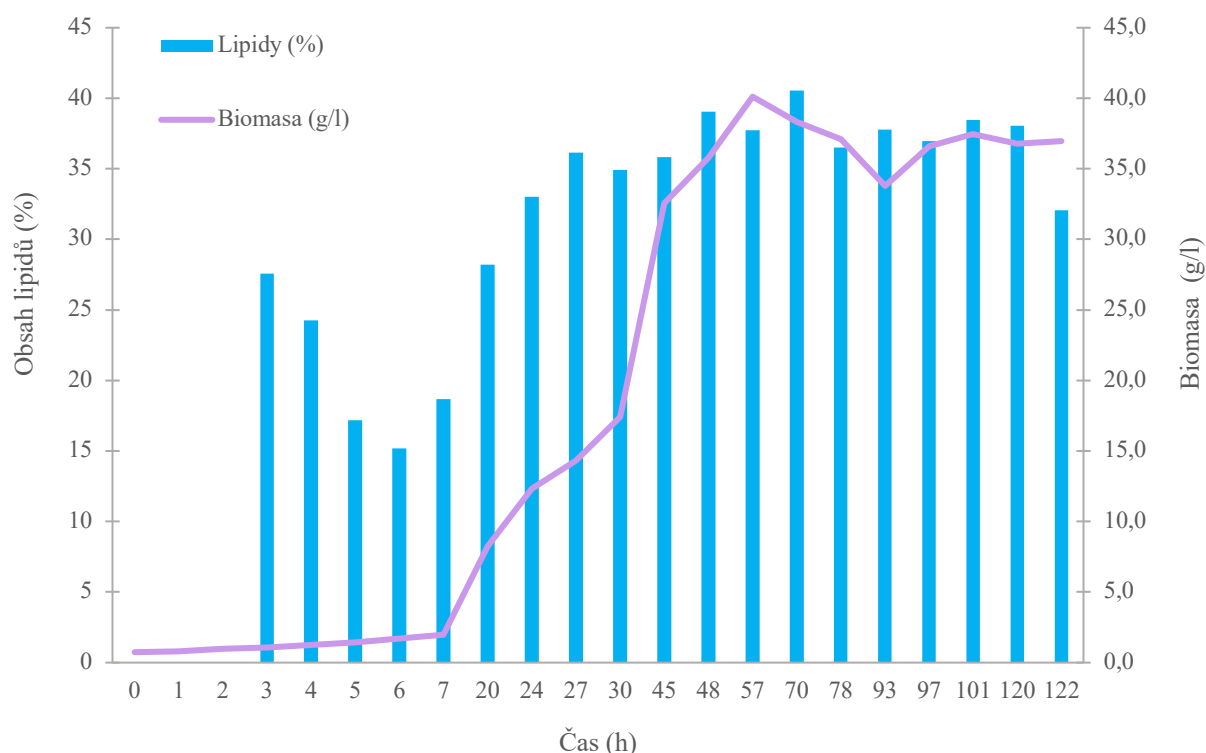


Obrázek 31: Snímek z mikroskopu kultury *Sporidiobolus pararoseus* – vakuoly

5.2.3.1 Produkce biomasy

Z Grafu 61 je parné že lag fáze (0.- 2. hodina) postupně přechází ve fázi zrychleného růstu (3. a 7. hodina). Následně mezi 7. a 20. hodinou začala exponenciální fáze, která byla díky přidavku kuřecího tuku ve 24. hodině prodloužena až do 57. hodiny, kdy bylo dosaženo maximální hodnoty obsahu biomasy a to 40,1 g/l. Od 57. do 122. hodiny můžeme pozorovat stacionární fázi. Při ukončování kultivace ve 122. hodině byla produkce biomasy stanovena na 37,0 g/l.

Kmen *Sporidiobolus pararoseus* kultivovaný na médiu s kuřecím tukem a kávovým hydrolyzátem v produkci biomasy při poloprovozní kultivaci dosáhl 2,5násobku produkce u screeningové baňkové kultivace.



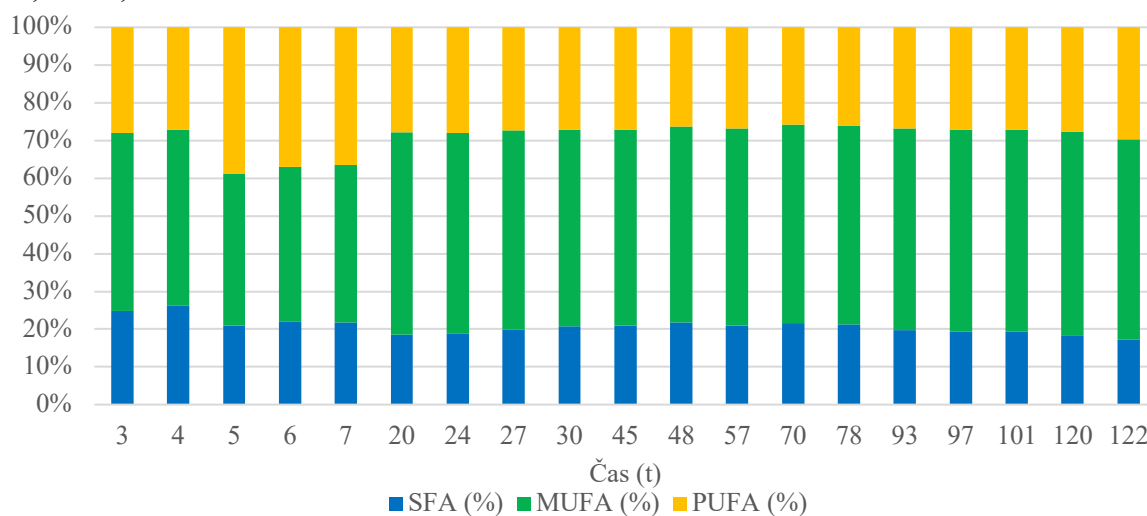
Graf 61: Produkce biomasy a zastoupení lipidů v biomase při fermentorové kultivace kmene *Sporidiobolus pararoseus* na médiu s kuřecím tukem s přidavkem kávového hydrolyzátu

5.2.3.2 Obsah lipidů

Z důvodu nedostatečné hmotnosti vzorků na počátku kultivace, bylo stanovení lipidů provedeno od 3. hodiny. Obsah lipidů na počátku kultivace (ve 3. hodině) byl 27,6 % a do 6. hodiny docházelo k postupnému poklesu až na 15,2 %. Poté došlo k výrazné akumulaci lipidů až do 70. hodiny, kdy bylo dosaženo maxima 40,6 %. Následoval mírný pokles, mezi 78. a 120. hodinou byl průměrný obsah lipidů 37,6 %. Po 120. hodině nastal pokles lipidů, což poukazuje na vyčerpání substrátu z média.

Na počátku kultivace byl poměr SFA : MUFA : PUFA stanoven na 25 : 47 : 28 (Graf 62). V 5. hodině bylo dosaženo maximálního obsahu PUFA a to 38,9 %. Poté nastal pokles

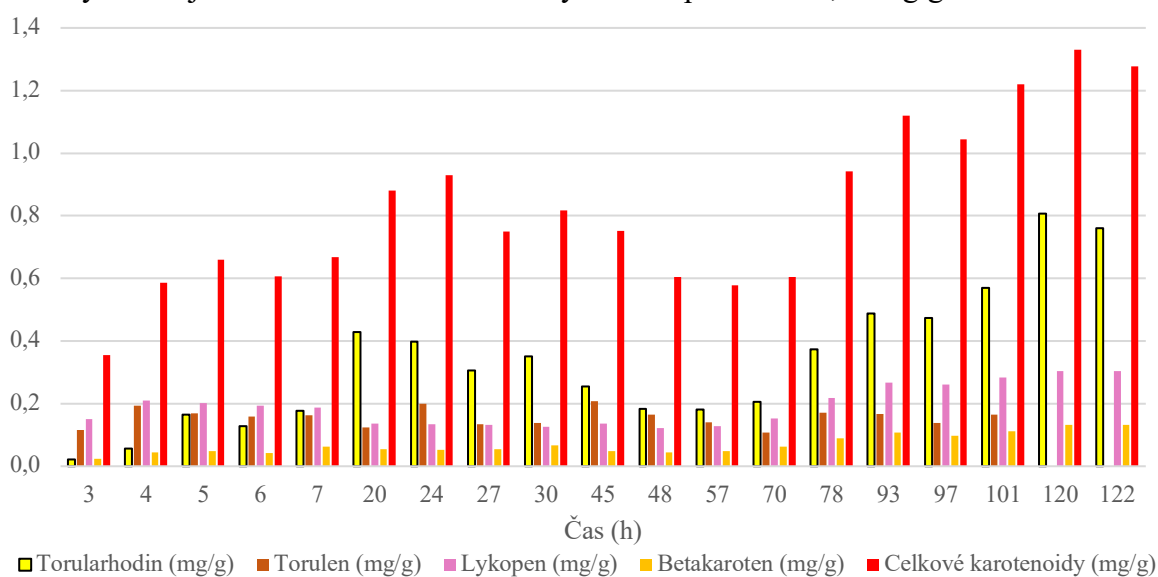
a ve 20. hodině bylo dosaženo 27,7 %. Od 27. až do 120. hodiny byl obsah PUFA v intervalu 25,8 – 27,8 %.



Graf 62: Složení lipidů v biomase při fermentorové kultivaci kmene *Sporidiobolus pararoseus* na médiu s kuřecím tukem s přidavkem kávového hydrolyzátu

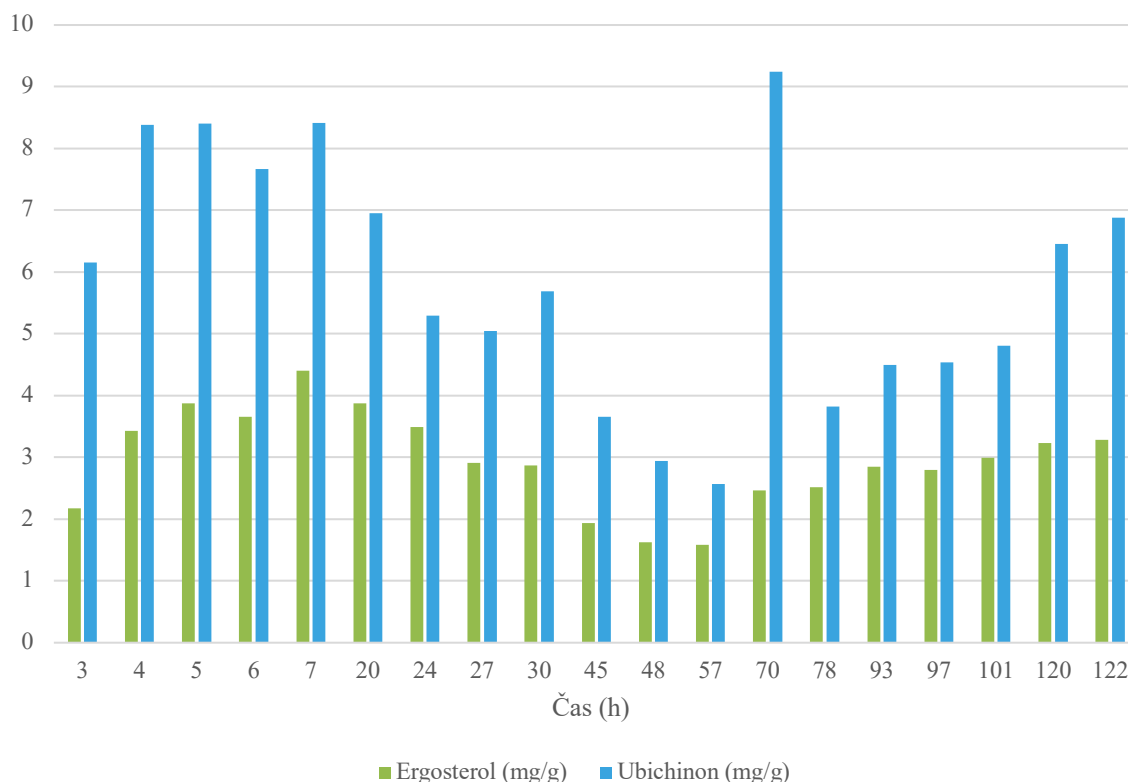
5.2.3.3 Karotenoidy a lipofilní látky

Z důvodu nízkých výtěžků při prvních odběrech bylo stanovení karotenoidů a lipofilních látek provedeno až od 3. hodiny, kdy obsah karotenoidů byl 0,36 mg na gram biomasy. Následoval růst produkce karotenoidů a ve 24. hodině bylo dosaženo 0,93 mg na gram biomasy. Ve 24. hodině byl proveden příkrm a kultura dále využívala energii z užívaného substrátu na růst kultury a tím došlo k poklesu obsahu karotenoidů až bylo v 57. hodině dosaženo lokálního minima 0,53 mg/g. Následně byla kultura ve stacionární fázi a došlo k výraznému nárůstu obsahu karotenoidů a ve 120. hodině bylo dosaženo maximální hodnoty a to 1,33 mg/g biomasy. Pozdější odběr ve 122. hodině už vykazoval pokles na 1,28 mg/g.



Graf 63: Produkce karotenoidů kmenem *Sporidiobolus pararoseus* při fermentorové kultivaci na médiu s kuřecím odpadním tukem s přidavkem kávového hydrolyzátu

Na počátku kultivace pozorujeme v Grafu 63 majoritní zastoupení lykopenu a následně torulenu, minoritní zastoupení bylo torularhodinu a betakarotenu. V 7. hodině byly torularhodin, torulen a lykopen ve velmi podobném obsahu. S dobou kultivace docházelo k zvyšování procentuálního zastoupení torularhodinu, který se stal dominantním karotenoidem.



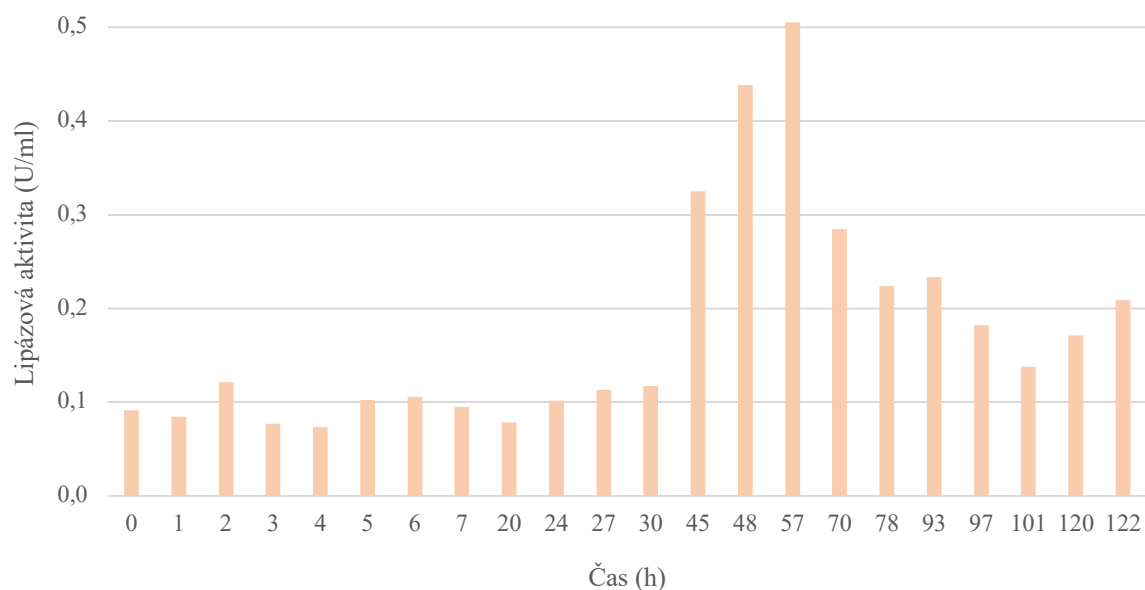
Graf 64: Schopnost produkce ergosterolu a ubichinonu kmenem Sporidiobolus pararoseus při fermentorové kultivaci na médiu s kuřecím tukem a přísadkou kávového hydrolyzátu

U ergosterolu pozorujeme v Grafu 64 maximální hodnoty mezi 5. a 24. hodinou, kdy se jeho obsah pohyboval v intervalu 3,7 - 4,4 mg/g přičemž nejvyšší hodnoty bylo dosaženo v 7. hodině. Následoval výrazný pokles a minimálního obsahu bylo dosaženo v 57. hodině a to 1,6 mg/g. Přičemž následoval mírný nárůst až do ukončení kultivace, kdy bylo dosaženo hodnoty 3,3 mg/g. U ubichinonu pozorujeme na počátku podobný trend. Na počátku kultivace (4.-7. hodina) byl obsah ubichinonu 7,6 – 8,4 mg/g, přičemž lokálního maxima bylo dosaženo v 7. hodině. Následoval pokles až do 57. hodiny, kdy bylo dosaženo minimálního obsahu a to 2,6 mg/g. V 70. hodině bylo dosaženo maximálního obsahu ubichinonu a to 9,2 mg/g. Poté došlo v průběhu 8 hodin k výraznému poklesu až na 3,8 mg/g a následoval postupný nárůst. Na konci kultivace bylo dosaženo 6,9 mg na gram biomasy.

5.2.3.4 Lipázová aktivita

Lipázová aktivita kmene *Sporidiobolus pararoseus* se při velkoobjemové kultivaci pohybovala v intervalu 0,0740 – 0,5051 U/ml (Graf 65). Nejnižší hodnoty bylo dosaženo ve 4. hodině, což naznačuje, že na počátku kultivace byl přednostně využíván jako substrát kávový hydrolyzát. K největším nárůstům docházelo od 45. hodiny, přičemž nejvyšší lipázové

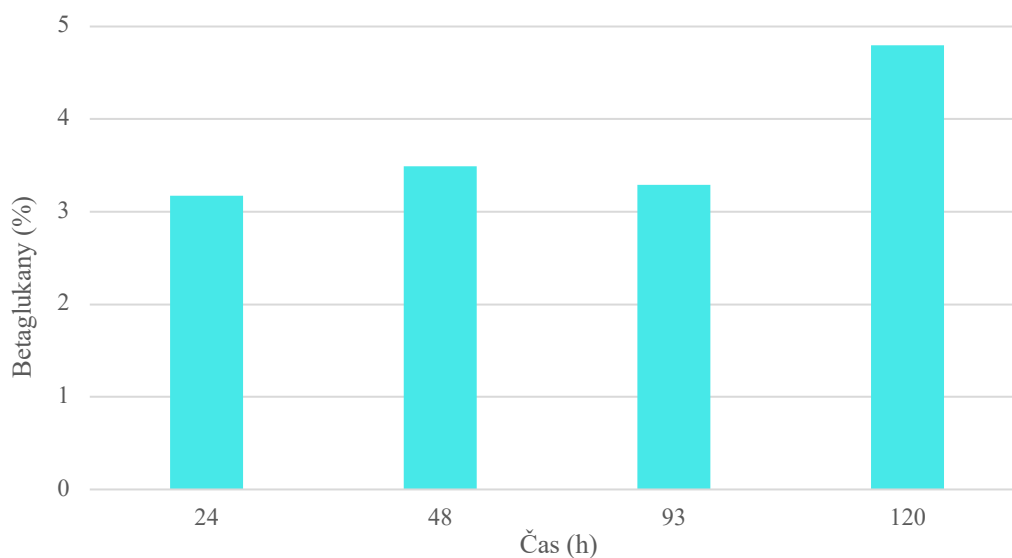
aktivity bylo dosaženo v 57. hodině. V oblasti vysoké aktivity lipáz docházelo k nejvyšším nárůstům biomasy a k výraznému navyšování obsahu lipidů v biomase.



Graf 65: Hodnoty lipázové aktivity kmene Sporidiobolus pararoseus v průběhu fermentorové kultivace na médiu s kuřecím tukem s přidavkem kávového hydrolyzátu

5.2.3.5 Obsah betaglukanů

Při screeningové kultivaci kmene *Sporidiobolus pararoseus* na médiu s kuřecím odpadním tukem s přidavkem kávového hydrolyzátu bylo po pětidenní kultivaci dosaženo obsahu betaglukanů v buněčné stěně 3,4 %. Při velkoobjemové kultivaci bylo stejného výsledku dosaženo už v 93. hodině (Graf 66). Do 120. hodiny došlo k nárůstu na 4,8 %. V této fázi kultivace došlo ke stacionární fázi a buňky budovaly pevnější buněčnou stěnu.



Graf 66: Obsah betaglukanů v buněčné stěně kmene Sporidiobolus pararoseus při fermentorové kultivaci na médiu s kuřecím tukem s přidavkem kávového hydrolyzátu

5.2.3.6 Shrnutí

Při poloprovozní kultivaci kmene *Sporidiobolus pararoseus* nedošlo k žádným výrazným problémům. Pěnění, které nastalo při příkrmu ve 24. hodině bylo utlumeno přidavkem antifoamu. Veškeré naměřené hodnoty jsou uvedeny v Příloze 31 až 33.

	Screeningová kultivace	Fermentor
Biomasa (g/l)	14,4	36,8
Lipidy (%)	37,43	38,06
SFA (%)	21,83	18,36
MUFA (%)	53,27	53,89
PUFA (%)	24,90	27,75
Torularhodin (mg/g)	0,61	0,81
Torulen (mg/g)	0,26	-
Lykopen (mg/g)	-	0,30
Betakaroten (mg/g)	0,17	0,13
Celkové karotenoidy (mg/g)	0,84	1,33
Ergosterol (mg/g)	3,01	3,23
Ubichinon (mg/g)	5,42	6,45
Betaglukany (%)	3,37	4,80
Lipázová aktivita (U/ml)	0,06	0,17

*Tabulka 13: Srovnání sledovaných parametrů u screeningové kultivace a fermentorové kultivace kmene *Sporidiobolus pararoseus* na médiu s kuřecím tukem s přidavkem kávového hydrolyzátu*

V tabulce můžeme vidět srovnání sledovaných výtěžků při screeningové baňkové kultivaci (po 5 dnech) a u poloprovozní fermentorové kultivace ve 120. hodině. Je zřejmé, že větší regulovatelnost celého systému a kontrolovaná aerace vedly k výraznému navýšení produkce biomasy a to 2,5×, oproti screeningové kultivaci. K výraznému navýšení obsahu došlo také u celkových karotenoidů, kdy byl zaznamenán nárůst o 60 %, přičemž u velkoobjemové kultivace byl po celou dobu detekován lykopen a na konci kultivace nebyl detekován torulen. U screeningové kultivace tomu bylo naopak. Mírnější nárůsty můžeme pozorovat u obsahu ubichinonu a betaglukanů. Obsah ergosterolu a lipidů byl velice podobný. K mírné změně došlo v profilu mastných kyselin, kdy došlo k mírnému nárůstu obsahu polynenasycených mastných kyselin na úkor nasycených mastných kyselin.

6 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na studium produkce biomasy a vybraných metabolitů karotenogenními kvasinkami při kultivacích s využitím odpadních převážně lipidických substrátů jako zdrojů uhlíku a energie.

Většina kmenů vykazovala v baňkových kultivacích alespoň na některém odpadním substrátu zvýšení produkce biomasy oproti kontrolnímu glycerolovému médiu. Z celkového pohledu můžeme říct, že odpadní substráty jsou vhodné pro navýšení produkce biomasy. Nejvýraznější navýšení produkce biomasy při kultivacích na odpadních substrátech (fritovací olej, kuřecí odpadní tuk a jejich směsi s jednoduššími substráty) pozorujeme u kmene *Sporidiobolus pararoseus* a to o 100 až 150 %. Při kultivaci na médiu pouze s odpadním fritovacím olejem bylo dosaženo ($17,6 \pm 1,0$) g/l, což činí nárůst o téměř 150 % a na médiu pouze s kuřecím odpadním tukem bylo dosaženo produkce biomasy ($15,2 \pm 3,5$) g/l (nárůst o 114 % oproti kontrole). Přídavkem sacharidového substrátu (kávový hydrolyzát) došlo pouze k mírnému poklesu nárůstu biomasy. Pro kmen *Sporidiobolus salmonicolor* je naopak vhodné použití kávových odpadů, popřípadě kuřecího odpadního tuku pro zvýšení produkce biomasy. Nejvyšší produkce biomasy bylo dosaženo při kultivaci na médiu s kávovým olejem s 10% přídavkem kávového hydrolyzátu ($15,0 \pm 0,2$) g/l, při kultivaci na médiu pouze s kávovým olejem bylo dosaženo ($13,8 \pm 0,4$) g/l. Kmen *Rhodotorula mucilaginosa* je co do produkce biomasy vhodný pro kultivace na médiích s lipidickým odpadním substrátem s přídavkem sacharidového substrátu. U kombinace kávového oleje s kávovým hydrolyzátem bylo dosaženo produkce biomasy ($15,9 \pm 1,4$) g/l a při kombinaci kuřecího odpadního tuku s kávovým hydrolyzátem ($13,7 \pm 1,4$) g/l. Kmeny *Rhodotorula kratochvilovae* a *Cystofilobasidium infirmominiatum* jsou naprosto nevhodné pro kultivaci na odpadních lipidických substrátech, mírné navýšení bylo pozorováno pouze na čistě sacharidovém médiu.

Pro navýšení obsahu lipidů v biomase je využití lipidických odpadů jako substrátů přínosné, oproti kontrolním médiím byl zaznamenán nárůst o 10–40 % v závislosti na použitém kmeni a substrátu. Nejvhodnější pro navýšení obsahu lipidů je fritovací olej, popřípadě kuřecí odpadní tuk. Přídavky jednodušších substrátů vedly ve většině případů ke snížení kumulace lipidů oproti čistě lipidickým médiím. Největší množství kumulovaných lipidů oproti kontrolnímu médiu bylo dosaženo u kmene *Sporidiobolus pararoseus*. Kultivací tohoto kmene na médiu s fritovacím olejem bylo dosaženo obsahu lipidů ($49,4 \pm 1,2$) % což činilo nárůst o 40 % oproti kontrolnímu médiu, při použití kuřecího tuku ve směsi s kávovým hydrolyzátem byl zaznamenán obsah lipidů ($32,0 \pm 2,0$) %. U kmene *Rhodotorula kratochvilovae* byl pozorován nárůst o 20–30 %, přičemž nejvhodnějším substrátem pro navýšení akumulace lipidů byl kuřecí odpadní tuk. U kultivace na médiu pouze s kuřecím tukem bylo dosaženo ($47,1 \pm 7,6$) %. Použití kávového oleje vedlo ve většině případů k nejmenšímu obohacení biomasy o lipidy. Nejvyššího obsahu lipidů na médiu pouze s kávovým olejem bylo dosaženo s kmenem *Rhodotorula kratochvilovae* a to ($36,7 \pm 5,8$) %.

Kávový olej sice ve většině případů neobohacuje biomasu o lipidy co do množství, ale je zdrojem polynenasycených mastných kyselin, které kvasinky přednostně akumulují. Dalším

vhodným substrátem pro zvýšení procentuálního zastoupení polynenasycených mastných kyselin v profilu mastných kyselin je fritovací olej. Maximálního zastoupení PUFA bylo dosaženo u kmene *Sporidiobolus pararoseus* kultivovaného na médiu s kávovým olejem a to 67,8 %, ale produkce biomasy byla velice nízká, a i zastoupení lipidů v biomase bylo nízké. Vhodnějším substrátem je případě tohoto kmene je použití fritovacího oleje či jeho kombinace s kávovým hydrolyzátem. Použití kávového oleje pro navýšení obsahu PUFA je nejvýhodnější u kmene *Sporidiobolus salmonicolor* kultivovaném na médiu s kávovým olejem, kdy při produkci biomasy ($13,8 \pm 0,4$) g/l, obsahu lipidů ($28,6 \pm 1,4$) % činilo zastoupení PUFA 59,5 %. Velice podobného výsledku bylo u tohoto kmene dosaženo na médiu s kombinací kávového oleje a hydrolyzátu.

Obecně se dá říct, že použití odpadních substrátů je vhodné pro zvýšení produkce karotenoidů. U většiny kmenů je nejvhodnější využití kávového oleje, popřípadě jeho směsí s jednoduššími substráty. Největší navýšení produkce karotenoidů oproti kontrolnímu médiu pozorujeme u kmene *Cystofilobasidium macerans*, kde byly u všech odpadních substrátů zaznamenány nárůsty o 50–260 %. Maximální hodnoty bylo dosaženo při kultivaci s využitím kávového oleje a to 3,88 mg na gram biomasy. Kmen *Sporidiobolus pararoseus* vykazuje nárůst produkce pouze na médiích s kávovým olejem, kdy maximální produkce byla zaznamenána na čistě olejovém médiu a to 4,16 mg/g. Podobný trend byl zaznamenán u kmene *Rhodotorula toruloides*, kde použití kávového oleje či kávového hydrolyzátu vede k vyšší produkci karotenoidů. Naopak použití kávového oleje mělo za následek výrazně menší produkci karotenoidů oproti kontrolnímu glycerolovému médiu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo kmenem *Rhodotorula mucilaginosa*, ale u tohoto kmene došlo použitím odpadních substrátů ke snížení produkce, ale i přes to, bylo dosahováno vysokých produkcí. Z odpadních substrátů bylo nejvyšší produkce dosaženo při použití odpadního glycerolu a to 4,7 mg/g. Lze tedy říci, že z pohledu produkce biomasy, lipidů a karotenoidů, je u tohoto kmene možné nahradit chemicky čistý glycerol za odpadní, bez výrazných změn v produkci. Nevhodnými kmeny pro produkci karotenoidů při použití odpadních substrátů jsou *Rhodotorula kratochvilovae* a *Cystofilobasidium infirmominatum*.

Ve většině případů je majoritním karotenoidem v kvasinkové biomase torularhodin v produkční dráze je také posledním a ostatní jsou jeho prekurzorem. U kmenů *Rhodotorula mucilaginosa* pozorujeme výrazné majoritní zastoupení lykopenu, u kmene *Cystofilobasidium macerans* byl majoritní současně s torularhodinem. Maximální obsah lykopenu na odpadním substrátu byl zaznamenán u kmene *Rhodotorula mucilaginosa* kultivovaném na odpadním glycerolu a to 4,54 mg/g. Lykopen nebyl naopak detekován u kmenů *Rhodotorula kratochvilovae* či *Sporidiobolus pararoseus*. Betakaroten byl ve všech případech majoritním karotenoidem, přičemž maximální produkce byly zaznamenány u kmene *Sporidiobolus pararoseus* při využití médií obsahujících kávový olej. Druhým nejvhodnějším kmenem se jeví *Rhodotorula toruloides*, taktéž při použití médií s kávovým olejem. U kmene *Rhodotorula mucilaginosa* pozorujeme opačný trend, jelikož byl stanoven vysoký obsah lykopenu a betakaroten se zde nevyskytoval.

Pro docílení biomasy obohacené ergosterolem za použití odpadních substrátů je nevhodnější využití kmene *Rhodotorula toruloides*, který při použití kávového oleje či kuřecího odpadního tuku a popřípadě jejich směsí s kávovým hydrolyzátem byl zaznamenán nárůst na dvojnásobek hodnoty oproti kontrolnímu glycerolovému médiu. Maximální hodnoty 6,11 mg na gram biomasy bylo dosaženo na médiu s kávovým hydrolyzátem. Kávová média mají vliv na navýšení produkce ergosterolu také u kmene *Cystofilobasidium infirmominiatum*, kdy pozorujeme nárůst o 30-40 %. Vysoké produkce ergosterolu byly zaznamenány také u kmene *Sporidiobolus pararoseus*, ale to pouze na kávových médiích a na kontrolním médiu. Maximální produkce byla dosažena na směsi kávového oleje s 10% přídavkem glycerolu a to 5,56 mg/g.

Využití odpadních substrátů je vhodné pro obohacení biomasy o ubichinony u všech kmenů. Nejlepším producentem z testovaných kmenů vychází kmen *Sporidiobolus pararoseus* v kombinaci s médii s kávovými odpady. Nejvyšší produkce bylo dosaženo na směsi kávového oleje a 10% přídavkem glycerolu (17,2 mg/g), přičemž chemicky čistý glycerol je možné nahradit odpadním glycerolem, jelikož u tohoto kmene nepozorujeme signifikantní rozdíly u sledovaných parametrů oproti kontrolnímu médiu. Kávový olej je vhodným substrátem pro obohacení biomasy o ubichinonu také u kmene *Rhodotorula mucilaginosa*. U kmene *Cystofilobasidium macerans* byl zaznamenán signifikantní nárůst obsahu ubichinonu u všech lipidických médiích. Při kultivacích na kávových médiích zaznamenán nárůst obsahu ubichinonu o 100-140 %, při použití fritovacího oleje činil nárůst 67-95 % a u kuřecího tuku kolem 60 %. U kmene *Sporidiobolus salmonicolor* nevede použití kávového oleje k výrazným navýšením, naopak je velice výhodné použití odpadního fritovacího oleje, kdy na čistě olejovém médiu bylo dosaženo produkce 12,1 mg ubichinonu na gram biomasy.

Velkou výhodou kávového oleje při kultivacích je, že slouží jako zdroj tokoferolu a karotenogenní kvasinky jsou schopny jej akumulovat, dochází tak k obohacení biomasy o tokoferol. Výbornou schopnost akumulace vykazuje kmen *Rhodotorula mucilaginosa*, kdy při použití kávového oleje bylo dosaženo obsahu 22,97 mg na gram biomasy, při použití jeho směsi s 10 % přídavkem kávového hydrolyzátu došlo jen k mírnému snížení a to na 19,1 mg/g, přičemž produkce biomasy je v případě směsi téměř dvojnásobná. U ostatních kmenů došlo k výrazně nižší akumulaci, nebo byl tokoferol již využit při kompenzaci oxidačního stresu. Druhým nejlepším kmenem se jeví *Sporidiobolus salmonicolor*, kdy na čistě olejovém médiu bylo dosaženo 4,1 mg tokoferolu na gram biomasy a u směsi s kávovým hydrolyzátem 3,7 mg/g. Podobných výsledků dosahoval kmen *Cystofilobasidium macerans* a to 3,9 mg/g v případě kultivace s kávovým olejem a 3,3 mg/g ve směsi s kávovým hydrolyzátem, ale produkce biomasy na čistě olejovém médiu je výrazně nižší.

Obsah betaglukanů v buněčné stěně karotenogenních kvasinek kultivovaných na kontrolním glycerolovém médiu se pohyboval v rozmezí 10,5-19,8 %. Nejvyšší obsahy byly zaznamenány u kmenů *Rhodotorula toruloides* (19,8 %), *Sporidiobolus metaroseus* (19,0 %) a *Cystofilobasidium infirmominiatum* (18,1 %). Nejnižších obsahy byly stanoveny u kmenů *Sporidiobolus salmonicolor* (10,5 %) a *Rhodotorula mucilaginosa* (11,0 %). Využití

komplexních odpadních substrátů vede ke snížení obsahu betaglukanů v buněčné stěně, jelikož je mnohem náročnější je využít a betaglukany naopak zpevňují buněčnou stěnu, což by vedlo k horší dostupnosti substrátů a náročnějšímu vyživování. Nejvhodnějším odpadním substrátem, u kterého bylo dosahováno nejmenších poklesů oproti kontrolnímu, byl kávový hydrolyzát, jelikož jde o mnohem jednodušší, a navíc sacharidový substrát, který je pro kvasinky jednodušeji využitelný. Nejvyšší obsah betaglukanů při kultivaci na médiu s kávovým hydrolyzátem bylo dosaženo u kmene *Cystofilobasidium macerans* (14,2 %) a u *Sporidiobolus metaroseus* (14,1 %). Výjimkou je kmen *Cystofilobasidium infirmominiatum*, který dosahoval minimálního snížení obsahu betaglukanů oproti kontrolnímu médiu (18,1 %) na čistě lipidických médiích a to 17,7 % při použití kávového oleje, 15,9 % s kuřecím odpadním tukem a 11,6 % při kultivaci na odpadním fritovacím oleji.

Kultivace na komplexních odpadních lipidických substrátech u všech kmenů vedlo k zvýšení aktivity extracelulárních lipáz, aby mohlo dojít k utilizaci lipidické složky a umožnila se tak možnost jejího využití. Maximální lipázové aktivity bylo dosaženo u kmene *Sporidiobolus salmonicolor* kultivovaném na čistě olejovém médiu s kávovým olejem a to 0,3325 U/ml. Zvýšení lipázové aktivity napomohlo zvýšení produkce biomasy o 50 % na 13,8 g/l. Výbornou aktivitu lipáz vykazuje kmen *Sporidiobolus pararoseus*, kdy aktivita lipáz při kultivaci na médiu pouze s fritovacím olejem dosáhla hodnoty 0,12 U/ml a produkce biomasy byla 17,6 g/l a u kuřecího tuku byla lipázová aktivita stanovena na 0,10 U/ml a produkce biomasy činila 15,2 %. Naopak u kmene *Rhodotorula toruloides* pozorujeme vyšší lipázovou aktivitu 0,16 U/ml, ale produkce biomasy činila pouze 9,7 g/l (pokles o 22 % oproti kontrolnímu médiu).

Z výsledků práce je patrné, že vybrané odpadní lipidické substráty jsou v mnoha případech vhodné pro zvýšení produkce biomasy a její obohacení o lipidy, polynenasycené mastné kyseliny, karotenoidy, ubichinon a ergosterol a při použití kávového oleje je obohacována i o tokoferol. Nejvíce obohacená biomasa byla produkováána kmenem *Sporidiobolus pararoseus* při kultivaci na médiu s kávovým olejem, kdy bylo v případě PUFA, karotenoidů, ubichinonu a ergosterolu dosahováno jedněch z nejvyšších obsahů. Problémem je nízká produkce biomasy z důvodu náročné dostupnosti substrátu. Tento problém by mělo být možné vyřešit zvýšením teploty, aby došlo k roztání kávového oleje a emulzifikací média, jelikož při použití více tekutých substrátů (fritovací olej, kuřecí tuk) bylo dosahováno nejvyšších produkcí biomasy.

V průběhu práce byly provedeny tři velkoobjemové kultivace v laboratorním bioreaktoru, aby bylo zjištěno, jak se systém chová ve větším objemu a s větší regulovatelností. U první kultivace byl využit kmen *Rhodotorula toruloides* a médium s kávovým olejem. Byl zjištěn problém s dostupností kávového oleje, jelikož se vytvořilo rozhraní fází a s postupným odebráním vzorků pro analýzy, ulpělo velké množství substrátů na stěnách bioreaktoru. Produkce biomasy dosahovala podobných hodnot jako u screeningové kultivace. Analýza biomasy ukázala, že byla produkováána biomasa s velice podobnými obsahy stanovovaných

metabolitů. I přes nízkou dostupnost substrátu došlo k signifikantnímu obohacení biomasy o karotenoidy a polynenasycené mastné kyseliny.

Druhá velkoobjemová kultivace proběhla s kmenem *Cystofilobasidium macerans*, který na médiu s kávovým olejem při screeningové kultivaci vykazoval výrazné obohacení biomasy o sledované metabolity. Po problémech v předchozí velkoobjemové kultivaci byla jako zdroj organického uhlíku zvolena směs kávového oleje s kávovým hydrolyzátem, aby byl na počátku přítomen jednodušší substrát pro navýšení produkce biomasy. Dále byla zvýšena kultivační teplota pro dosažení větší tekutosti kávového oleje a pro dosažení emulzifikace média byl využit lecitin. Lecitin vyřešil problém dostupnosti kávového oleje pro kvasinky, ale došlo k zvýšení pěnivosti. Pěnění vedlo k nižší dostupnosti substrátu, a to mělo za následek výrazně nižší produkci biomasy se snížením obsahu lipidů. I přes problémy s pěněním bylo dle analýz dosaženo obohacení biomasy o karotenoidy, polynenasycené mastné kyseliny, ergosterol a tokoferol. Emulzifikace média je tedy vhodným řešením pro úspěšné kultivace s kávovým olejem, ale je nutné otestovat další emulgátory, popřípadě jiné způsoby emulzifikace média.

Pro třetí velkoobjemovou kultivaci byl zvolen kmen *Sporidiobolus pararoseus*, ale kvůli problémům s kultivacemi s kávovým olejem byla jako zdroj organického uhlíku zvolena směs kuřecího odpadního tuku s přídavkem kávového hydrolyzátu. Kuřecí tuk má nižší teplotu tání, takže byl pro kvasinky jednodušejí dostupný. Kultura výrazně zvýšila produkci biomasy (až na 37,5 g/l) a dle analýz bylo dosaženo přibližně stejného obsahu lipidů, rozložení profilu mastných kyselin a produkce ergosterolu. Produkce karotenoidů a ubichinonu se mírně zvýšila.

Můžeme tedy říct, že s přechodem kultivací karotenogenních kvasinek do většího měřítká s větší regulovatelností systému je dosahováno vyšší produkce více obohacené biomasy o sledované metabolity.

7 ZDROJE

- [1] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-85605-71-6.
- [2] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. Bratislava: Alfa, 1982
- [3] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. Bratislava: Alfa, 1990. ISBN 80-05-00644-6.
- [4] KURTZMAN, C. P. a Jack W. FELL, ed. *The yeasts, a taxonomic study*. 4th rev. and engl. ed. Amsterdam: Elsevier, 1998, xviii, 1055 s. ISBN 0444813128.
- [5] MÁROVÁ, I., M. SZOTKOWSKI, M. VAŇEK, et al. Utilization of animal fat waste as carbon source by carotenogenic yeasts – a screening study. *The EuroBiotech Journal* [online]. 2017, 1, 310-318 [cit. 2023-05-01]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.24190/ISSN2564-615X/2017/04.08>
- [6] MAROVA, Ivana, Milan CERTIK a Emilia BREIEROV. Production of Enriched Biomass by Carotenogenic Yeasts - Application of Whole-Cell Yeast Biomass to Production of Pigments and Other Lipid Compounds. *Biomass - Detection, Production and Usage* [online]. InTech, 2011, 2011-09-09 [cit. 2023-05-01]. DOI: 10.5772/19235 ISBN 978-953-307-492-4. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/biomass-detection-production-and-usage/production-of-enriched-biomass-by-carotenogenic-yeasts-application-of-whole-cell-yeast-biomass-to-pr>
- [7] FELL, Jack W. a Adele Statzell TALLMAN. Heterothallism in the basidiomycetous yeast genus *Sporidiobolus* Nyland. *Current Microbiology* [online]. 1981, 5(2), 77-82 [cit. 2023-05-01]. DOI: 10.1007/BF01567423. ISSN 0343-8651. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01567423>
- [8] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. 4. české vyd. Jinočany, 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- [9] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [10] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [11] WANG, Yanan, Sufang ZHANG, Zhiwei ZHU, Hongwei SHEN, Xinping LIN, Xiang JIN, Xiang JIAO a Zongbao Kent ZHAO. Systems analysis of phosphate-limitation-induced lipid accumulation by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnology for Biofuels* [online]. 2018, 11(1) [cit. 2023-05-01]. ISSN 1754-6834. Dostupné z: doi:10.1186/s13068-018-1134-8
- [12] GHAZANI, Saeed M. a Alejandro G. MARANGONI. *Microbial lipids for foods* [online]. 2022, 119, 593-607 [cit. 2023-05-01]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2021.10.014
- [13] GUO, Mingxin, Weiping SONG a Jeremy BUHAIN. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2015, 42, 712-725 [cit. 2023-05-01]. ISSN 13640321. Dostupné z: doi:10.1016/j.rser.2014.10.013
- [14] MAJIDIAN, Parastoo, Meisam TABATABAEI, Mehrshad ZEINOLABEDINI, Mohammad Pooya NAGHSHBANDI a Yusuf CHISTI. Metabolic engineering of microorganisms for biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online].

- 2018, 82, 3863-3885 [cit. 2023-05-01]. ISSN 13640321. Dostupné z: doi:10.1016/j.rser.2017.10.085
- [15] AGEITOS, Jose Manuel, Juan Andres VALLEJO, Patricia VEIGA-CRESPO a Tomas G. VILLA. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2011, 90(4), 1219-1227 [cit. 2023-05-01]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-011-3200-z
- [16] ANSCHAU, Andréia. Lipids from oleaginous yeasts: production and encapsulation. *Nutrient Delivery* [online]. Elsevier, 2017, 2017, 749-794 [cit. 2023-05-01]. ISBN 9780128043042. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-804304-2.00020-2
- [17] FICHTLSCHERER, Fabienne, Christian WELLEIN, Maria MITTAG a Eckhart SCHWEIZER. A novel function of yeast fatty acid synthase. *European Journal of Biochemistry* [online]. 2000, 267(9), 2666-2671 [cit. 2023-05-01]. ISSN 00142956. Dostupné z: doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01282.x
- [18] HOLUB, Jiří. *Optimalizace kultivace karotenogenních kvasinek na směsných odpadních substrátech* [online]. Brno, 2020 [cit. 2021-7-29]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123930>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.
- [19] DRABINA, Pavel. *Bioorganická chemie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2020. ISBN 978-80-7560-316-6.
- [20] ROWLES, Joe L. a John W. ERDMAN. Carotenoids and their role in cancer prevention. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* [online]. 2020, 1865(11) [cit. 2023-05-01]. ISSN 13881981. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbalip.2020.158613
- [21] YAMAGUCHI, Masayoshi. *Carotenoids: properties, effects, and diseases*. New York: Nova Science Publishers, 2010. Biochemistry research trends series. ISBN 978-1-61209-713-8.
- [22] SATHASIVAM, Ramaraj a Jang-Seu KI. A Review of the Biological Activities of Microalgal Carotenoids and Their Potential Use in Healthcare and Cosmetic Industries. *Marine Drugs* [online]. 2018, 16(1) [cit. 2023-05-02]. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md16010026
- [23] Carotenoids Market by Type (Astaxanthin, Beta-Carotene, Lutein, Lycopene, Canthaxanthin, and Zeaxanthin), Application (Feed, Food & Beverages, Dietary Supplements, Cosmetics, and Pharmaceuticals), Source, Formulation, and Region – Global Forecast to 2026. Dostupné z: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/carotenoid-market-158421566.html>
- [24] IRWANDI JASWIR. Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011, 5(33). ISSN 19960875. Dostupné z: doi:10.5897/JMPRX11.011
- [25] JOHNSON, Elizabeth J. The Role of Carotenoids in Human Health. *Nutrition in Clinical Care*. 2002, 5(2), 56-65. ISSN 1096-6781. Dostupné z: doi:10.1046/j.1523-5408.2002.00004.x
- [26] NOVOVESKÁ, Lucie, Michael E. ROSS, Michele S. STANLEY, Rémi PRADELLES, Virginie WASIOLEK a Jean-François SASSI. Microalgal Carotenoids: A Review of Production, Current Markets, Regulations, and Future Direction. *Marine Drugs* [online]. 2019, 17(11) [cit. 2023-05-02]. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md17110640

- [27] EGGERSDORFER, Manfred a Adrian WYSS. Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2018, 652, 18-26 [cit. 2023-05-02]. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2018.06.001
- [28] FIEDOR, Joanna a Květoslava BURDA. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients* [online]. 2014, 6(2), 466-488 [cit. 2023-05-02]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu6020466
- [29] BIN-JUMAH, May, Suaad S. ALWAKEEL, Marius MOGA, Lavinia BUVNARIU, Nicu BIGIU a Muhammad ZIA-UL-HAQ. Application of Carotenoids in Cosmetics. *Carotenoids: Structure and Function in the Human Body* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2021, 2021-02-18, 747-756 [cit. 2023-05-02]. ISBN 978-3-030-46458-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-46459-2_24
- [30] STAHL, Wilhelm a Helmut SIES. B-Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2012, 96(5), 1179S-1184S. DOI: 10.3945/ajcn.112.034819. ISSN 0002-9165.
- [31] ENGLMAIEROVÁ, M., M. SKŘIVAN a I. BUBANCOVÁ. A comparison of lutein, spray-dried Chlorella, and synthetic carotenoids effects on yolk colour, oxidative stability, and reproductive performance of laying hens. *Czech Journal of Animal Science* [online]. 2013, 58(9), 412-419 [cit. 2023-05-02]. ISSN 12121819. Dostupné z: doi:10.17221/6941-CJAS
- [32] SURAI, P. F., B. K. SPEAKE a N. H. C. SPARKS. Carotenoids in Avian Nutrition and Embryonic Development. 1. Absorption, Availability and Levels in Plasma and Egg Yolk. *The Journal of Poultry Science* [online]. 2001, 38(1), 1-27 [cit. 2023-05-02]. ISSN 1346-7395. Dostupné z: doi:10.2141/jpsa.38.1
- [33] TORREGROSA-CRESPO, Javier, Zaida MONTERO, Juan FUENTES, Manuel REIG GARCÍA-GALBIS, Inés GARBAYO, Carlos VÍLCHEZ a Rosa MARTÍNEZ-ESPINOSA. Exploring the Valuable Carotenoids for the Large-Scale Production by Marine Microorganisms. *Marine Drugs*. 2018, 16(6). ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md16060203
- [34] MATA-GÓMEZ, Luis Carlos, Julio César MONTAÑEZ, Alejandro MÉNDEZ-ZAVALA a Cristóbal Noé AGUILAR. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*. 2014, 13(1). ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2859-13-12
- [35] CHANDRAN, Sunil S., James T. KEALEY a Christopher D. REEVES. Microbial production of isoprenoids. *Process Biochemistry* [online]. 2011, 46(9), 1703-1710 [cit. 2023-05-02]. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2011.05.012
- [36] DOHNAL, Vlastimil, Alena JEŽKOVÁ a Jiří SKLÁDANKA. Ergosterol: Klíčový steroid hub. *Kontakt*. 2009, 10(2), 449-454. ISSN 12124117. Dostupné z: doi:10.32725/kont.2008.066
- [37] VOET, Donald a Judith G. VOET. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0544-9.
- [38] DUPONT, Sebastien, Guillaume LEMETAIS, Thierry FERREIRA, Philippe CAYOT, Patrick GERVAIS a Laurent BENEY. ERGOSTEROL BIOSYNTHESIS: A FUNGAL PATHWAY FOR LIFE ON LAND?. *Evolution* [online]. 2012, 66(9), 2961-2968 [cit. 2023-05-02]. ISSN 00143820. Dostupné z: doi:10.1111/j.1558-5646.2012.01667.x

- [39] BENTINGER, Magnus, Michael TEKLE a Gustav DALLNER. Coenzyme Q – Biosynthesis and functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2010, 396(1), 74-79 [cit. 2023-05-02]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.147
- [40] KAGAN, Valerian E. a Peter J. QUINN, ed. *Coenzyme Q* [online]. CRC Press, 2000 [cit. 2023-05-02]. ISBN 9780429127885. Dostupné z: doi:10.1201/9781420036701
- [41] MÜLLER, Marc-André, Christian SCHÄFER, Gilberto LITTA, et al. 100 Years of Vitamin E: From Discovery to Commercialization. *European Journal of Organic Chemistry* [online]. 2022, 2022(45) [cit. 2023-05-02]. ISSN 1434-193X. Dostupné z: doi:10.1002/ejoc.202201190
- [42] SANYAL, Arun J., Naga CHALASANI, Kris V. KOWDLEY, et al. Pioglitazone, Vitamin E, or Placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis. *New England Journal of Medicine* [online]. 2010, 362(18), 1675-1685 [cit. 2023-05-02]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa0907929
- [43] SALES, J. a V. KOUKOLOVÁ. Dietary vitamin E and lipid and color stability of beef and pork: Modeling of relationships1. *Journal of Animal Science* [online]. 2011, 89(9), 2836-2848 [cit. 2023-05-02]. ISSN 0021-8812. Dostupné z: doi:10.2527/jas.2010-3335
- [44] GAVIN, Arnold M. Deodorization and finished oil handling. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 1981, 58(3Part1), 175-184 [cit. 2023-05-02]. ISSN 0003021X. Dostupné z: doi:10.1007/BF02582331
- [45] BONRATH, Werner a Thomas NETSCHER. Catalytic processes in vitamins synthesis and production. *Applied Catalysis A: General* [online]. 2005, 280(1), 55-73 [cit. 2023-05-02]. ISSN 0926860X. Dostupné z: doi:10.1016/j.apcata.2004.08.028
- [46] PLHALOVÁ, Žaneta. Metabolická adaptace karotenogenních kvasinek na nutriční stres indukovaný vybranými odpady potravinářského průmyslu. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131840>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Martin Szotkowski.
- [47] ZHU, Fengmei, Bin DU a Baojun XU. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocolloids* [online]. 2016, 52(2), 275-288 [cit. 2023-05-02]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2015.07.003
- [48] STONE, Bruce. *Chemistry, biochemistry, and biology of 1-3 beta glucans*. Amsterdam: Acad. Press, 2009. ISBN 9780123739711
- [49] BENCKO, Vladimír, Petr ŠÍMA a Bohumil TUREK. *Imunomodulační účinky betaglukanů*. Hygiena. 2016, roč. 16, čís. 4, s. 167–171.
- [50] VACLAV, Větvicka, Sima PETR a Vannucci LUCA. Beta Glucan as Therapeutic Food. *Therapeutic Foods* [online]. Elsevier, 2018, 2018, 239-256 [cit. 2023-05-02]. ISBN 9780128115176. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-811517-6.00008-8
- [51] PILLAI, R., M. REDMOND a J. RODING. Anti-Wrinkle Therapy: Significant New Findings in the Non-Invasive Cosmetic Treatment of Skin Wrinkles with Beta-Glucan. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2005, 27(5), 292-292 [cit. 2023-05-02]. ISSN 0142-5463. Dostupné z: doi:10.1111/j.1463-1318.2005.00268_3.x

- [52] DELATTE, Stephen J., Jill EVANS, André HEBRA, William ADAMSON, H.Biemann OTHERSEN a Edward P. TAGGE. Effectiveness of beta-glucan collagen for treatment of partial-thickness burns in children. *Journal of Pediatric Surgery* [online]. 2001, 36(1), 113-118 [cit. 2023-05-02]. ISSN 00223468. Dostupné z: doi:10.1053/jpsu.2001.20024
- [53] BELCARZ, Anna, Grażyna GINALSKA, Teodozja PYCKA, Aneta ZIMA, Anna ŚLÓSARCZYK, Izabela POLKOWSKA, Zofia PASZKIEWICZ a Wojciech PIEKARCZYK. Application of β -1,3-glucan in production of ceramics-based elastic composite for bone repair. *Open Life Sciences* [online]. 2013, 8(6), 534-548 [cit. 2023-05-02]. ISSN 2391-5412. Dostupné z: doi:10.2478/s11535-013-0169-2
- [54] JOHNSON, Kevin, Yang LIU a Mingming LU. A Review of Recent Advances in Spent Coffee Grounds Upcycle Technologies and Practices. *Frontiers in Chemical Engineering* [online]. 2022, 4 [cit. 2023-05-02]. ISSN 2673-2718. Dostupné z: doi:10.3389/fceng.2022.838605
- [55] MATA, Teresa M., António A. MARTINS a Nídia S. CAETANO. Bio-refinery approach for spent coffee grounds valorization. *Bioresource Technology* [online]. 2018, 247, 1077-1084 [cit. 2023-05-03]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2017.09.106
- [56] OBRUCA, Stanislav, Pavla BENESOVA, Dan KUCERA, Sinisa PETRIK a Ivana MAROVA. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. *New Biotechnology* [online]. 2015, 32(6), 569-574 [cit. 2023-05-03]. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2015.02.008
- [57] Production volume of sunflowerseed oil worldwide from 2012/13 to 2022/23. Dostupné z: <https://www.statista.com/statistics/613490/sunflowerseed-oil-production-volume-worldwide/>
- [58] Production volume of rapeseed oil worldwide from 2012/13 to 2022/23. Dostupné z: <https://www.statista.com/statistics/613487/rapeseed-oil-production-volume-worldwide/>
- [59] FRAGA, Jully L., Adejanildo da Silva PEREIRA, Marianne Mascarenhas DINIZ, Patrick FICKERS a Priscilla F.F. AMARAL. Valorization of urban waste oil by microbial conversions. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering* [online]. 2021, 4 [cit. 2023-05-03]. ISSN 26660164. Dostupné z: doi:10.1016/j.csee.2021.100145
- [60] JIN, Yueming, Senlin TIAN, Jiali GUO, Xiao REN, Xinyan LI a Shumei GAO. Synthesis, Characterization and Exploratory Application of Anionic Surfactant Fatty Acid Methyl Ester Sulfonate from Waste Cooking Oil. *Journal of Surfactants and Detergents* [online]. 2016, 19(3), 467-475 [cit. 2023-05-03]. ISSN 1097-3958. Dostupné z: doi:10.1007/s11743-016-1813-z
- [61] VERLINDEN, Rob AJ, David J HILL, Melvin A KENWARD, Craig D WILLIAMS, Zofia PIOTROWSKA-SEGET a Iza K RADECKA. Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. *AMB Express* [online]. 2011, 1(1) [cit. 2023-05-03]. ISSN 2191-0855. Dostupné z: doi:10.1186/2191-0855-1-11
- [62] SUCI, M, R ARBIANTI a H HERMANSYAH. Lipase production from *Bacillus subtilis* with submerged fermentation using waste cooking oil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* [online]. 2018, 105 [cit. 2023-05-03]. ISSN 1755-1307. Dostupné z: doi:10.1088/1755-1315/105/1/012126
- [63] SANDESH SURESH, K., P.V. SURESH a Tanaji G. KUDRE. Prospective ecofuel feedstocks for sustainable production. *Advances in Eco-Fuels for a Sustainable Environment*

- [online]. Elsevier, 2019, 2019, 89-117 [cit. 2023-05-03]. ISBN 9780081027288. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-102728-8.00004-8
- [64] KUMAR G., “Utilization of waste chicken fat for production of Fatty acid methyl ester: Waste to Energy”, *International Journal for Modern Trends in Science and Technology*, Vol. 05, Issue 06, June 2019, pp.-31-35.
- [65] EASTERLING, Emily R., W. Todd FRENCH, Rafael HERNANDEZ a Margarita LICHA. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology* [online]. 2009, 100(1), 356-361 [cit. 2023-05-03]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2008.05.030
- [66] KUMAR, Lalit R., Sravan Kumar YELLAPU, R.D. TYAGI a Xiaolei ZHANG. A review on variation in crude glycerol composition, bio-valorization of crude and purified glycerol as carbon source for lipid production. *Bioresource Technology* [online]. 2019, 293 [cit. 2023-05-03]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.122155
- [67] KAUR, Jaspreet, Anil Kumar SARMA, Mithilesh Kumar JHA a Poonam GERA. Valorisation of crude glycerol to value-added products: Perspectives of process technology, economics and environmental issues. *Biotechnology Reports* [online]. 2020, 27 [cit. 2023-05-03]. ISSN 2215017X. Dostupné z: doi:10.1016/j.btre.2020.e00487
- [68] KAŠTÁNEK, František. *Bioinženýrství*. Praha: Academia, 2001. ISBN 80-200-0768-7.
- [69] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [70] HERNÁNDEZ-GARCÍA, Samanta, María Inmaculada GARCÍA-GARCÍA a Francisco GARCÍA-CARMONA. An improved method to measure lipase activity in aqueous media. *Analytical Biochemistry* [online]. 2017, 530, 104-106 [cit. 2023-05-03]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2017.05.012
- [71] DANIELSON, Michael E., Rosmarie DAUTH, Natalie A. ELMASRY, Ryan R. LANGESLAY, Andrew S. MAGEE a Paul M. WILL. Enzymatic Method To Measure β -1,3- β -1,6-Glucan Content in Extracts and Formulated Products (GEM Assay). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, 58(19), 10305-10308 [cit. 2023-05-03]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf102003m
- [72] *MUSHROOM and YEAST BETA-GLUCAN ASSAY PROCEDURE*. www.megazyme.com [online]. 2021 [cit. 2021-7-2]. Dostupné z: https://www.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-YBGL_DATA.pdf

8 POUŽITÉ ZKRATKY

ACP	Acyl carrier protein – Protein přenášející acyly
ATP	Adenosintrifosfát
CoA	Koenzym A
DMAPP	Dimethylallyldifosfát
FID	Plamenový ionizační detektor
FO	Fritovací olej
FO+G10%	Směs fritovacího oleje a glycerolu (9:1)
FO+KH	Směs fritovacího oleje a kávového hydrolyzátu (9:1)
FPP	Farnesyldifosfát
GC	Plynová chromatografie
GGPP	Geranylgeranyldifosfát
GPP	Gerynyldifosfát
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl koenzym A
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IPA	Isopropylalkohol
IPP	Isopentenylidifosfát
KH	Kávový hydrolyzát
KO	Kávový olej
KO+G10%	Směs kávového oleje a glycerolu (9:1)
KO+KH	Směs kávového oleje s kávovým hydrolyzátem (9:1)
KUŘ	Kuřecí odpadní tuk
KUŘ+G10%	Směs kuřecího tuku s glycerolem (9:1)
KUŘ+KH	Směs kuřecího tuku a kávového hydrolyzátu (9:1)
MUFA	Mononenasycené mastné kyseliny
OG	Odpadní glycerol
PDA	Detektor diodového pole
PHA	Polyhydroxyalkanoát
PP	Polypropylen
PUFA	Polynenasycené mastné kyseliny
SCG	Spent coffee grounds – Použitá kávová sedlina
SFA	Nasycené mastné kyseliny
SRN	Spolková republika Německo
UFA	Nenasycené mastné kyseliny
USD	Americký dolar
UV	Ultrafialové záření
VIS	Viditelné záření

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Produkce biomasy, obsah lipidů a profil mastných kyselin screeningových kultivací kmene *Sporidiobolus pararoseus*

	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)
Kontrolní	7,1 ± 0,4	9,9 ± 1,0	20,5	66,9	12,6
FO	17,6 ± 1,0	49,4 ± 1,2	12,6	42,8	44,6
FO+G10%	18,1 ± 0,8	39,2 ± 0,4	11,3	40,4	48,3
FO+KH	14,8 ± 2,0	42,1 ± 0,2	11,3	41,1	47,6
KO	3,1 ± 0,5	12,6 ± 0,3	20,3	11,9	67,8
KO+G10%	6,2 ± 0,9	16,8 ± 2,9	19,4	11,7	68,9
KO+KH	3,7 ± 0,1	7,9 ± 0,6	24,8	17,3	57,8
KUŘ	15,2 ± 3,5	32,0 ± 3,9	20,7	52,5	26,7
KUŘ+G10%	12,6 ± 5,8	26,0 ± 11,9	20,1	49,6	30,3
KUŘ+KH	14,4 ± 1,1	37,4 ± 5,3	21,8	53,3	24,9
KH	8,3 ± 0,0	10,9 ± 0,5	12,8	77,2	10,0
OG	5,6 ± 0,2	12,0 ± 0,4	15,7	73,2	11,1

Příloha 2: Produkce karotenoidů při screeningových kultivacích kmenem *Sporidiobolus pararoseus*

	Sledované karotenoidy (mg/g)				
	Torularhodin	Torulen	Lykopen	Betakaroten	Celkové
Kontrolní	1,4047	0,1208	-	0,5144	2,1075
FO	0,3245	0,1430	-	0,2154	0,6101
FO+G10%	0,3427	0,1628	-	0,1810	0,6025
FO+KH	0,7779	0,1462	-	0,1675	0,8554
KO	3,4015	0,1485	-	0,5405	4,1629
KO+G10%	2,8283	0,2401	-	0,7345	3,9065
KO+KH	2,5977	0,1542	-	0,2982	3,0961
KUŘ	0,4856	0,2522	-	0,1766	0,9676
KUŘ+G10%	0,9849	0,1487	-	0,2199	0,9462
KUŘ+KH	0,6133	0,2581	-	0,1697	0,8401
KH	0,6735	0,1314	-	0,3957	0,9494
OG	0,4661	0,1264	-	0,3615	1,0190

Příloha 3: Produkce a akumulace lipofilních metabolitů, obsah betaglukanů a lipázová aktivita (α) při screeningových kultivacích kmenem *Sporidiobolus pararoseus*

	Sledované metabolity (mg/g)				
	Ergosterol	Ubichinon	Tokoferol	Betaglukany (%)	α (U/ml)
Kontrolní	5,4201	7,5215	-	12,3	0,0661
FO	2,4150	7,4748	-	9,2	0,1229
FO+G10%	2,0433	6,2298	-	9,1	0,1016
FO+KH	2,3543	6,2468	-	2,4	0,0191
KO	4,8107	13,0318	0,0933	6,0	0,0580
KO+G10%	5,5615	17,1903	0,1860	-	0,0668
KO+KH	4,9376	10,3933	0,0482	-	0,0145
KUŘ	3,3423	7,3180	-	5,1	0,1000
KUŘ+G10%	2,4123	4,7008	-	4,8	0,0881
KUŘ+KH	3,0147	5,4234	-	3,4	0,0592
KH	3,4541	8,3646	-	-	0,0058
OG	4,5983	7,8133	-	-	0,0671

Příloha 4: Produkce biomasy, obsah lipidů a profil mastných kyselin screeningových kultivací kmene *Sporidiobolus metaroseus*

	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)
Kontrolní	6,3 ± 0,0	16,1 ± 0,6	27,5	32,2	40,3
FO	4,1 ± 1,0	38,9 ± 0,6	13,6	38,6	47,8
FO+G10%	4,5 ± 0,2	32,2 ± 2,5	15,1	37,7	47,2
FO+KH	4,9 ± 1,2	37,0 ± 0,5	14,4	38,3	47,3
KO	3,2 ± 1,2	21,3 ± 0,5	30,4	12,3	57,3
KO+G10%	-	-	-	-	-
KO+KH	6,8 ± 1,0	31,6 ± 0,8	33,6	10,6	55,8
KUŘ	9,8 ± 3,3	31,1 ± 0,5	24,6	40,6	34,8
KUŘ+G10%	7,5 ± 1,5	29,6 ± 1,3	25,3	40,2	34,5
KUŘ+KH	7,5 ± 0,2	27,5 ± 4,5	23,6	40,3	36,2
KH	7,4 ± 0,2	19,2 ± 0,1	22,1	44,8	33,1
OG	5,4 ± 0,3	16,3 ± 1,3	21,9	54,7	23,4

Příloha 5: Produkce karotenoidů při screeningových kultivacích kmenem *Sporidiobolus metaroseus*

	Sledované karotenoidy (mg/g)				
	Torularhodin	Torulen	Lykopen	Betakaroten	Celkové
Kontrolní	1,3219	0,2702	-	0,0048	1,7198
FO	0,3614	0,1373	-	0,0026	0,5094
FO+G10%	1,0606	0,1671	-	-	0,7124
FO+KH	1,5610	0,1345	-	0,0063	1,7834
KO	2,9428	0,2312	-	0,0000	3,3600
KO+G10%	-	-	-	-	-
KO+KH	1,6492	0,2680	-	-	2,0424
KUŘ	0,9615	0,2268	-	0,0137	1,2728
KUŘ+G10%	0,9038	0,2380	-	-	1,1860
KUŘ+KH	1,5589	0,2115	-	0,0097	1,8853
KH	2,4447	0,2333	0,1511	-	2,9458
OG	0,6039	0,2318	-	0,0051	1,0152

Příloha 6: Produkce a akumulace lipofilních metabolitů, obsah betaglukanů a lipázová aktivita (*a*) při screeningových kultivacích kmenem *Sporidiobolus metaroseus*

	Sledované metabolity (mg/g)			Betaglуканы (%)	<i>a</i> (U/ml)
	Ergosterol	Ubichinon	Tokoferol		
Kontrolní	3,5852	4,3778	-	19,0	0,0809
FO	1,8068	6,6301	-	5,2	0,0916
FO+G10%	2,6514	4,2844	-	-	0,0749
FO+KH	2,8501	8,5235	-	-	0,0244
KO	3,8768	8,9884	1,2491	9,7	0,0912
KO+G10%	-	-	-	-	-
KO+KH	2,8213	7,7607	2,4671	-	0,1182
KUŘ	3,2183	7,3260	0,0191	7,6	0,0834
KUŘ+G10%	2,1744	4,1832	0,0409	6,6	0,1705
KUŘ+KH	3,3734	6,3771	-	8,8	0,0605
KH	2,9834	5,7254	-	14,1	0,0113
OG	3,3144	3,6328	-	-	0,0721

Příloha 7: Produkce biomasy, obsah lipidů a profil mastných kyselin screeningových kultivací kmene *Sporidiobolus salmonicolor*

	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)
Kontrolní	9,2 ± 0,1	14,6 ± 1,4	31,5	55,2	13,3
FO	5,7 ± 0,1	21,4 ± 0,8	14,6	39,3	46,2
FO+G10%	9,8 ± 2,9	31,9 ± 5,6	16,2	36,9	46,9
FO+KH	8,6 ± 0,8	27,6 ± 6,0	13,0	32,4	54,6
KO	13,8 ± 0,4	28,6 ± 1,4	28,3	12,1	59,5
KO+G10%	13,8 ± 1,0	25,1 ± 1,1	27,3	13,5	59,2
KO+KH	15,0 ± 0,2	25,9 ± 0,8	26,8	13,9	59,2
KUŘ	12,8 ± 0,2	25,6 ± 0,8	19,9	48,1	32,0
KUŘ+G10%	13,6 ± 0,5	30,8 ± 2,1	21,3	48,5	30,1
KUŘ+KH	12,9 ± 0,7	29,7 ± 1,2	23,4	46,4	30,2
KH	11,9 ± 0,0	6,1 ± 0,6	14,8	68,9	16,3
OG	7,7 ± 0,2	12,4 ± 0,7	32,9	60,4	6,7

Příloha 8: Produkce karotenoidů při screeningových kultivacích kmenem *Sporidiobolus salmonicolor*

	Sledované karotenoidy (mg/g)				
	Torularhodin	Torulen	Lykopen	Betakaroten	Celkové
Kontrolní	0,4970	0,1018	2,0199	0,0477	2,6796
FO	0,4190	0,0584	1,012	0,0217	1,5291
FO+G10%	0,4255	0,1056	2,2063	0,0157	2,7745
FO+KH	1,0140	0,1065	1,0651	0,0233	2,2282
KO	0,7015	0,1275	0,2359	0,0236	1,1177
KO+G10%	0,4822	0,1331	0,5401	0,0300	1,2611
KO+KH	0,5774	0,1260	0,1591	0,0210	0,9135
KUŘ	0,3933	0,1244	0,863	0,0106	1,4070
KUŘ+G10%	0,4846	0,1246	0,4641	0,0185	1,1048
KUŘ+KH	0,4038	0,1113	0,6082	0,0123	1,1491
KH	0,4829	0,1004	0,7309	0,0297	1,3855
OG	0,4620	0,0963	1,0661	0,0546	1,7101

Příloha 9: Produkce a akumulace lipofilních metabolitů, obsah betaglukanů a lipázová aktivita (*a*) při screeningových kultivacích kmenem *Sporidiobolus salmonicolor*

	Sledované metabolity (mg/g)				
	Ergosterol	Ubichinon	Tokoferol	Betaglukany (%)	<i>a</i> (U/ml)
Kontrolní	4,6398	6,9375	-	10,5	0,0709
FO	3,4285	12,1153	-	-	0,1013
FO+G10%	3,1277	10,1327	-	-	0,1051
FO+KH	4,3302	12,0359	-	-	0,0285
KO	1,9396	7,3993	4,0995	8,6	0,3325
KO+G10%	2,6604	7,3719	4,1417	7,7	0,1691
KO+KH	2,0772	5,9419	3,7227	9,1	0,0536
KUŘ	2,0272	6,3161	1,7110	5,8	0,0909
KUŘ+G10%	2,1103	6,6819	-	4,0	0,0859
KUŘ+KH	1,9295	5,2954	-	8,9	0,0213
KH	4,0909	3,1440	0,8669	-	0,0066
OG	4,0539	5,2777	-	-	0,0803

Příloha 10: Produkce biomasy, obsah lipidů a profil mastných kyselin screeningových kultivací kmene *Rhodotorula mucilaginosa*

	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)
Kontrolní	8,5 ± 0,0	20,2 ± 0,5	33,3	50,3	16,4
FO	10,8 ± 0,5	39,2 ± 1,1	13,4	36,4	50,2
FO+G10%	11,2 ± 0,1	36,8 ± 1,5	15,7	38,0	46,3
FO+KH	9,8 ± 0,0	25,3 ± 10,2	13,0	36,1	50,9
KO	9,7 ± 0,9	32,9 ± 3,8	50,4	8,9	40,6
KO+G10%	12,2 ± 0,1	36,6 ± 2,0	48,0	9,7	42,4
KO+KH	15,9 ± 1,4	37,5 ± 5,4	54,2	9,7	36,1
KUŘ	11,4 ± 1,6	32,0 ± 2,0	27,3	42,6	30,1
KUŘ+G10%	12,9 ± 0,9	29,2 ± 0,3	27,1	43,5	29,4
KUŘ+KH	13,7 ± 1,4	27,4 ± 2,1	30,3	41,4	28,3
KH	13,5 ± 0,0	5,1 ± 0,0	13,1	69,8	17,1
OG	7,9 ± 0,0	18,5 ± 0,4	31,8	53,4	14,8

Příloha 11: Produkce karotenoidů při screeningových kultivacích kmenem *Rhodotorula mucilaginosa*

	Sledované karotenoidy (mg/g)				
	Torularhodin	Torulen	Lykopen	Betakaroten	Celkové
Kontrolní	0,0180	0,0990	4,6681	-	4,8040
FO	1,6981	0,0983	3,6389	-	3,7915
FO+G10%	-	0,1040	3,5283	-	3,6693
FO+KH	0,2518	0,0955	2,5363	-	2,7838
KO	-	0,1039	3,5899	-	3,7217
KO+G10%	-	0,0975	3,4297	-	3,5494
KO+KH	-	0,0940	3,6114	-	3,7245
KUŘ	-	0,0972	2,7079	-	2,8164
KUŘ+G10%	-	0,0986	3,2671	-	3,4648
KUŘ+KH	-	0,0934	2,9257	-	3,0313
KH	1,0078	0,0990	1,4742	-	2,5257
OG	-	0,0986	4,538	-	4,7097

Příloha 12: Produkce a akumulace lipofilních metabolitů, obsah betaglukanů a lipázová aktivita (*a*) při screeningových kultivacích kmenem *Rhodotorula mucilaginosa*

	Sledované metabolity (mg/g)			Betaglуканы (%)	<i>a</i> (U/ml)
	Ergosterol	Ubichinon	Tokoferol		
Kontrolní	3,8486	4,9889	-	10,0	0,0743
FO	2,9409	6,6722	-	5,0	0,0847
FO+G10%	3,4810	7,3525	-	-	0,0944
FO+KH	3,6555	5,3825	-	-	0,0163
KO	2,9148	11,9908	22,9706	5,3	0,0558
KO+G10%	2,4587	7,9900	14,5218	5,2	0,0630
KO+KH	2,6860	8,5358	19,0799	6,1	0,0160
KUŘ	2,3728	3,8295	0,1738	6,2	0,0912
KUŘ+G10%	2,7929	4,7998	-	6,6	0,0790
KUŘ+KH	2,9259	4,4416	-	9,5	0,0168
KH	3,7287	2,6876	0,0610	11,0	0,0083
OG	3,9260	4,9325	-	-	0,0718

Příloha 13: Produkce biomasy, obsah lipidů a profil mastných kyselin screeningových kultivací kmene *Rhodotorula kratochvilovae*

	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)
Kontrolní	8,0 ± 0,0	13,3 ± 0,3	31,8	38,4	29,8
FO	3,3 ± 0,0	38,8 ± 5,3	14,9	39,8	45,3
FO+G10%	4,2 ± 0,4	34,7 ± 9,4	18,1	38,3	43,5
FO+KH	4,8 ± 1,7	35,9 ± 0,8	14,3	39,9	45,8
KO	7,2 ± 0,5	36,7 ± 5,8	39,2	10,6	50,2
KO+G10%	7,5 ± 1,2	35,6 ± 6,2	41,5	12,3	46,2
KO+KH	6,1 ± 0,9	23,8 ± 2,9	36,4	12,7	51,0
KUŘ	2,9 ± 0,3	47,1 ± 7,6	28,6	46,5	24,9
KUŘ+G10%	3,9 ± 0,6	33,9 ± 10,3	31,7	42,7	25,6
KUŘ+KH	3,4 ± 0,2	43,0 ± 1,9	29,1	47,4	23,5
KH	15,6 ± 0,1	9,6 ± 0,2	24,1	61,4	14,5
OG	9,5 ± 0,1	11,7 ± 0,7	29,1	43,3	27,5

Příloha 14: Produkce karotenoidů při screeningových kultivacích kmenem *Rhodotorula kratochvilovae*

	Sledované karotenoidy (mg/g)				
	Torularhodin	Torulen	Lykopen	Betakaroten	Celkové
Kontrolní	0,1711	0,0987	-	0,1836	0,4448
FO	0,1315	0,1072	-	0,0700	0,2059
FO+G10%	0,0638	-	-	0,0963	0,1600
FO+KH	0,5630	-	-	0,1073	0,3891
KO	0,4431	0,1162	-	0,1619	0,6296
KO+G10%	0,4459	0,1188	-	0,1428	0,6267
KO+KH	0,7451	0,1103	-	0,2647	1,2071
KUŘ	0,1926	0,1061	-	0,0733	0,3885
KUŘ+G10%	0,5197	0,1161	-	0,1060	0,4746
KUŘ+KH	0,4391	-	-	0,1089	0,5457
KH	0,1945	0,1065	-	0,1541	0,6464
OG	0,3010	0,0965	-	0,2096	0,6883

Příloha 15: Produkce a akumulace lipofilních metabolitů, obsah betaglukanů a lipázová aktivita (a) při screeningových kultivacích kmenem *Rhodotorula kratochvilovae*

	Sledované metabolity (mg/g)				
	Ergosterol	Ubichinon	Tokoferol	Betaglukany (%)	a (U/ml)
Kontrolní	3,5362	4,4967	-	12,6	0,0652
FO	1,9402	6,2135	-	6,1	0,0705
FO+G10%	2,5932	7,8687	-	-	0,0712
FO+KH	2,2595	6,1498	-	-	0,0329
KO	3,2491	7,0515	0,0927	7,4	0,1462
KO+G10%	3,2318	9,6493	1,6641	8,4	0,1154
KO+KH	3,0144	8,1049	0,2192	8,7	0,0536
KUŘ	1,7018	4,1750	-	5,0	0,0712
KUŘ+G10%	2,7512	4,5850	-	-	0,0702
KUŘ+KH	1,8722	4,7062	-	-	0,0335
KH	2,6693	3,7028	-	11,8	0,0093
OG	3,7485	5,3435	-	8,7	0,0687

Příloha 16: Produkce biomasy, obsah lipidů a profil mastných kyselin screeningových kultivací kmene *Rhodotorula toruloides*

	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)
Kontrolní	12,5 ± 0,1	16,6 ± 1,3	40,6	53,4	6,0
FO	5,4 ± 0,6	31,5 ± 3,3	14,1	40,0	46,0
FO+G10%	7,4 ± 0,1	29,5 ± 2,5	14,7	42,2	43,0
FO+KH	7,3 ± 0,7	28,6 ± 5,3	13,6	40,7	45,7
KO	6,5 ± 1,0	10,5 ± 1,7	26,2	29,9	43,8
KO+G10%	9,7 ± 1,0	7,8 ± 1,6	20,6	36,9	42,4
KO+KH	7,1 ± 1,3	9,0 ± 1,5	25,2	26,5	48,2
KUŘ	13,2 ± 1,3	29,8 ± 2,1	25,0	46,7	28,3
KUŘ+G10%	11,2 ± 3,3	19,9 ± 5,3	24,1	45,3	30,6
KUŘ+KH	6,5 ± 1,9	10,1 ± 1,2	22,0	38,9	39,1
KH	13,4 ± 1,0	5,3 ± 0,5	17,7	58,9	23,4
OG	9,8 ± 0,4	15,3 ± 1,3	38,6	53,2	8,2

Příloha 17: Produkce karotenoidů při screeningových kultivacích kmenem *Rhodotorula toruloides*

	Sledované karotenoidy (mg/g)				
	Torularhodin	Torulen	Lykopen	Betakaroten	Celkové
Kontrolní	0,7804	0,1122	0,0678	0,4093	1,4544
FO	0,2539	0,0990	-	0,0841	0,3109
FO+G10%	0,1948	0,1118	-	0,1899	0,5085
FO+KH	0,4996	0,1133	-	0,1011	0,6955
KO	2,9347	0,1666	-	0,2902	3,4342
KO+G10%	2,4359	0,1986	-	0,3507	3,0249
KO+KH	2,2778	0,1775	-	0,2892	2,7941
KUŘ	0,8009	0,1931	-	0,2768	1,3225
KUŘ+G10%	1,2420	0,1614	-	0,2621	1,6926
KUŘ+KH	1,3842	0,1611	-	0,2562	1,8951
KH	0,9566	0,1376	0,5772	0,2435	2,1186
OG	0,7052	0,1061	0,3259	0,2268	1,3008

Příloha 18: Produkce a akumulace lipofilních metabolitů, obsah betaglukanů a lipázová aktivita (a) při screeningových kultivacích kmenem *Rhodotorula toruloides*

	Sledované metabolity (mg/g)				
	Ergosterol	Ubichinon	Tokoferol	Betaglуканы (%)	a (U/ml)
Kontrolní	2,9040	5,9059	-	19,8	0,0734
FO	3,8036	7,7420	-	3,5	0,0665
FO+G10%	4,2902	7,2990	-	-	0,0704
FO+KH	4,7674	6,7573	-	-	0,0160
KO	6,1060	6,1420	0,8129	9,6	0,1353
KO+G10%	5,6036	6,8951	0,7621	-	0,1634
KO+KH	5,8236	5,3294	1,5036	9,2	0,0197
KUŘ	5,9698	5,4304	-	5,0	0,0735
KUŘ+G10%	5,1209	5,0151	-	7,4	0,0707
KUŘ+KH	5,7544	4,2884	-	-	0,0114
KH	3,9595	5,9541	-	8,7	0,0085
OG	3,8669	7,5902	-	12,4	0,0723

Příloha 19: Produkce biomasy, obsah lipidů a profil mastných kyselin screeningových kultivací kmene *Cystofilobasidium macerans*

	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)
Kontrolní	7,4 ± 0,0	15,0 ± 0,2	30,3	40,0	29,7
FO	7,7 ± 0,2	43,1 ± 1,0	13,8	39,8	46,3
FO+G10%	8,2 ± 0,1	35,2 ± 2,9	14,9	38,2	46,9
FO+KH	7,8 ± 2,6	30,4 ± 2,0	13,6	39,3	47,1
KO	7,3 ± 2,5	27,1 ± 8,2	44,3	9,6	46,0
KO+G10%	9,6 ± 2,1	26,0 ± 8,1	38,7	11,9	49,4
KO+KH	14,6 ± 2,0	31,5 ± 11,3	41,3	11,1	47,6
KUŘ	7,6 ± 0,9	23,0 ± 2,1	24,9	38,1	37,0
KUŘ+G10%	12,7 ± 0,6	26,3 ± 1,6	25,8	40,2	34,0
KUŘ+KH	9,8 ± 3,1	19,6 ± 4,9	23,8	39,1	37,1
KH	10,9 ± 0,9	10,0 ± 0,6	20,9	69,7	9,4
OG	6,7 ± 0,0	14,0 ± 1,0	28,2	56,9	14,9

Příloha 20: Produkce karotenoidů při screeningových kultivacích kmenem *Cystofilobasidium macerans*

	Sledované karotenoidy (mg/g)				
	Torularhodin	Torulen	Lykopen	Betakaroten	Celkové
Kontrolní	0,9503	0,2520	0,4578	-	1,0798
FO	0,4452	0,1346	1,3775	-	1,9723
FO+G10%	0,6197	0,1902	0,8786	-	1,7040
FO+KH	0,8491	0,1217	2,5408	-	3,5603
KO	1,5329	0,1840	2,1061	-	3,8817
KO+G10%	1,7264	0,2319	1,4825	-	3,5163
KO+KH	1,5875	0,2586	-	0,0020	1,9718
KUŘ	0,9494	0,2347	0,7822	-	2,0193
KUŘ+G10%	0,5760	0,2267	0,8882	-	1,7398
KUŘ+KH	1,3673	0,1995	0,4637	-	2,1068
KH	0,3806	0,1416	0,9022	-	1,5958
OG	0,2447	0,1627	2,2768	-	2,7992

Příloha 21: Produkce a akumulace lipofilních metabolitů, obsah betaglukanů a lipázová aktivita (α) při screeningových kultivacích kmenem *Cystofilobasidium macerans*

	Sledované metabolity (mg/g)			Betaglukany (%)	α (U/ml)
	Ergosterol	Ubichinon	Tokoferol		
Kontrolní	3,3440	4,4383	-	16,9	0,0677
FO	2,6793	7,4016	-	9,4	0,0818
FO+G10%	2,9007	8,6372	-	-	0,1559
FO+KH	4,1159	6,9564	-	9,2	0,0756
KO	3,6328	10,5543	3,9214	5,8	0,0602
KO+G10%	3,5600	9,3729	3,3311	10,0	0,0900
KO+KH	3,1643	8,7780	0,2533	9,4	0,0299
KUŘ	3,6542	7,1073	-	-	0,0897
KUŘ+G10%	3,0259	6,4232	-	7,9	0,1440
KUŘ+KH	3,4815	7,1535	-	6,7	0,0294
KH	2,7002	6,1929	-	14,2	0,0073
OG	3,2770	4,3076	-	-	0,0705

Příloha 22: Produkce biomasy, obsah lipidů a profil mastných kyselin screeningových kultivací kmene *Cystofilobasidium infirmominiatum*

	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)
Kontrolní	7,2 ± 0,6	14,8 ± 0,2	33,4	34,6	32,0
FO	2,4 ± 0,1	25,7 ± 5,4	16,1	39,4	44,5
FO+G10%	4,7 ± 0,6	17,9 ± 3,4	19,2	35,5	45,2
FO+KH	5,5 ± 0,9	22,8 ± 5,1	14,6	36,8	48,6
KO	2,0 ± 0,4	8,8 ± 0,7	29,0	13,1	57,9
KO+G10%	3,6 ± 0,1	8,5 ± 0,5	27,4	23,3	49,3
KO+KH	3,4 ± 0,1	8,8 ± 0,4	25,8	14,4	59,8
KUŘ	4,2 ± 0,1	25,4 ± 3,0	27,7	45,3	27,0
KUŘ+G10%	5,2 ± 0,0	18,5 ± 0,6	28,1	40,2	31,7
KUŘ+KH	3,2 ± 0,0	7,9 ± 0,4	22,9	32,7	44,5
KH	8,1 ± 1,0	13,7 ± 3,0	30,9	39,5	29,5
OG	2,4 ± 0,3	5,8 ± 0,6	23,8	47,0	29,2

Příloha 23: Produkce karotenoidů při screeningových kultivacích kmenem *Cystofilobasidium infirmominiatum*

	Sledované karotenoidy (mg/g)				
	Torularhodin	Torulen	Lykopen	Betakaroten	Celkové
Kontrolní	0,3790	0,1240	-	0,0185	0,6159
FO	-	-	-	-	1,0318
FO+G10%	0,0497	0,0526	0,2779	0,0047	0,3627
FO+KH	0,9992	0,1151	0,1784	0,0062	1,2158
KO	1,5625	0,1386	-	0,0136	1,7597
KO+G10%	1,4420	0,1642	-	0,0194	1,7504
KO+KH	1,7680	0,1581	-	0,0103	1,9648
KUŘ	0,6818	0,1218	-	0,0074	0,8251
KUŘ+G10%	1,2457	0,1286	-	0,0121	1,4091
KUŘ+KH	1,3344	0,1376	-	0,0168	1,5205
KH	0,0163	0,0953	0,6243	0,0040	0,7853
OG	0,3377	0,1087	-	0,0063	0,5014

Příloha 24: Produkce a akumulace lipofilních metabolitů, obsah betaglukanů a lipázová aktivita (*a*) při screeningových kultivacích kmenem *Cystofilobasidium infirmominiatum*

	Sledované metabolity (mg/g)				<i>a</i> (U/ml)
	Ergosterol	Ubichinon	Tokoferol	Betaglуканы (%)	
Kontrolní	3,2866	6,4807	-	18,1	0,0809
FO	2,4143	3,7690	-	11,6	0,0796
FO+G10%	3,3451	6,1923	-	-	0,0931
FO+KH	2,7125	8,1095	-	-	0,0586
KO	4,6435	5,1562	1,2116	17,6	0,1072
KO+G10%	4,5983	5,0588	0,1563	-	0,0762
KO+KH	4,2957	4,9540	0,4349	-	0,0606
KUŘ	2,5752	5,6012	-	15,9	0,0865
KUŘ+G10%	3,5128	5,9578	0,0718	-	0,0956
KUŘ+KH	4,0707	6,6964	0,0919	-	0,0563
KH	1,9402	5,3510	-	7,1	0,0146
OG	3,3443	4,2813	-	-	0,0743

Příloha 25: Produkce biomasy, obsah lipidů a profil mastných kyselin fermentorové kultivace *Rhodotorula toruloides* na médiu s kávovým olejem

Vzorek	Čas (t)	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)	α (U/ml)
F0	0	0,23	-	-	-	-	0,0633
F1	0,25	0,38	-	-	-	-	0,0596
F2	0,5	0,31	-	-	-	-	0,0539
F3	0,75	0,27	-	-	-	-	0,0527
F4	1	0,28	-	-	-	-	0,0533
F5	1,25	0,23	-	-	-	-	0,0545
F6	1,5	0,19	-	-	-	-	0,0608
F7	1,75	0,26	-	-	-	-	0,0552
F8	2	0,36	-	-	-	-	0,0514
F9	3	0,38	5,3	35,7	21,5	42,7	0,0508
F10	4	0,53	24,5	32,8	19,8	47,5	0,0501
F11	5	0,67	27,1	31,2	18,5	50,3	0,0558
F12	18	1,98	18,1	22,6	12,5	64,9	0,0520
F13	22	2,00	17,8	24,1	12,2	63,6	0,0470
F14	24	2,31	20,1	29,1	11,4	59,5	0,0740
F15	27	2,78	22,3	30,7	10,3	59,0	0,0847
F16	30	3,04	14,3	24,0	9,7	66,3	0,0809
F17	42	3,46	15,0	17,7	9,8	72,5	0,0796
F18	45	3,46	14,1	16,9	9,8	73,3	0,0821
F19	48	3,64	14,6	19,5	10,4	70,1	0,0909
F20	52	3,66	13,8	17,9	10,6	71,5	0,0934
F21	68	3,66	17,8	23,8	11,0	65,2	0,0784
F22	74	5,11	18,9	29,8	11,1	59,0	0,0922
F23	93	5,81	18,9	25,6	12,6	61,7	0,0884
F24	99	6,12	18,3	26,7	13,2	60,1	0,0922
F25	119	6,93	13,8	19,5	15,0	65,6	0,0943

Příloha 26: Produkce karotenoidů u fermentorové kultivace *Rhodotorula toruloides* na médiu s kávovým olejem

Vzorek	Čas (t)	Torularhodin	Torulen	Lykopen	Betakaroten	Celkové
F9	3	0,7251	0,2905	0,4152	0,0769	1,6382
F10	4	0,5121	0,2127	0,3796	0,0639	1,2740
F11	5	0,5467	0,1650	0,3204	0,0589	1,1867
F12	18	4,0580	-	0,1521	0,1190	4,4106
F13	22	5,4028	-	0,1955	0,1272	5,7693
F14	24	4,9455	-	0,2147	0,1021	5,2879
F15	27	4,6924	-	0,1828	0,1056	5,0383
F16	30	4,5015	-	0,1239	0,1009	4,7971
F17	42	8,1189	-	0,1457	0,1589	8,5301
F18	45	8,9102	-	0,1546	0,1697	9,3208
F19	48	8,9965	-	0,1555	0,1551	9,3854
F20	52	8,5865	-	0,1431	0,1440	8,9383
F21	68	9,3702	-	0,1675	0,1700	9,7615
F22	74	9,2708	-	0,1607	0,1615	9,6442
F23	93	8,2650	-	0,1535	0,1345	8,5900
F24	99	8,7434	-	0,1748	0,1514	9,1085
F25	119	11,5344	-	0,1825	0,1991	11,9844

Příloha 27: Produkce a akumulace lipofilních metabolitů a obsah betaglukanů u fermentorové kultivace *Rhodotorula toruloides* na médiu s kávovým olejem

Vzorek	Čas (t)	Ergosterol (mg/g)	Ubichinon (mg/g)	Tokoferol (mg/g)	Betaglukany (%)
F9	3	5,0554	13,1514	13,1394	-
F10	4	4,7813	11,7123	5,6064	-
F11	5	4,8434	12,0089	4,8645	-
F12	18	5,6088	6,5356	3,0112	-
F13	22	6,2970	7,1825	2,9253	-
F14	24	5,2166	7,7213	15,6234	4,0622
F15	27	4,7586	6,1725	13,0345	-
F16	30	4,5583	14,9927	8,8210	-
F17	42	5,4636	6,6250	3,6395	-
F18	45	5,6197	7,1571	1,2427	-
F19	48	5,5196	7,2344	2,2925	4,3924
F20	52	5,1740	8,4001	0,2459	-
F21	68	4,4497	8,0098	2,4983	-
F22	74	4,4362	12,4034	3,9269	4,414
F23	93	4,4714	14,1222	0,8244	-
F24	99	4,1482	10,1350	1,9988	4,4737
F25	119	6,3817	8,4084	0,6496	-

Příloha 28: Produkce biomasy, obsah lipidů a profil mastných kyselin fermentorové kultivace *Cystofilobasidium macerans* na médiu se směsí kávového oleje a kávového hydrolyzátu

Vzorek	Čas (t)	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)	α (U/ml)
C0	0	0,20	-	-	-	-	0,2786
C1	0,25	0,21	-	-	-	-	0,2547
C2	0,5	0,24	-	-	-	-	0,2660
C3	0,75	0,24	-	-	-	-	0,2986
C4	1	0,29	-	-	-	-	0,2930
C5	1,25	0,30	-	-	-	-	0,2917
C6	1,5	0,29	-	-	-	-	0,2905
C7	1,75	0,31	-	-	-	-	0,2848
C8	2	0,29	-	-	-	-	0,3018
C9	3	0,30	26,0	29,8	23,8	46,5	0,2453
C10	4	0,34	21,5	30,1	22,2	47,7	0,2560
C11	5	0,45	16,2	30,9	22,4	46,8	0,2434
C12	6	0,51	5,5	31,0	23,5	45,5	0,2648
C13	21	3,31	5,7	40,7	28,8	30,5	0,2497
C14	24	4,41	5,1	39,9	24,6	35,5	0,3206
C15	27	4,80	12,1	28,7	15,9	55,3	0,4116
C16	30	4,72	14,2	26,9	13,1	60,0	0,2472
C17	44	4,77	9,4	21,2	17,2	61,6	0,2610
C18	47	4,77	8,9	20,6	17,0	62,3	0,2836
C19	50	4,79	8,1	19,9	17,4	62,6	0,3570
C20	53	4,83	8,3	18,9	18,1	63,0	0,2905
C21	69	4,93	8,0	19,1	18,7	62,2	0,2641
C22	76	4,96	8,2	19,8	16,6	63,6	0,3394
C23	93	5,21	8,2	21,6	17,4	61,0	0,3539
C24	99	5,32	10,8	21,2	19,6	59,1	0,2811
C25	120	6,34	7,4	23,8	16,5	59,7	0,3175

Příloha 29: Produkce karotenoidů u fermentorové kultivace *Cystofilobasidium macerans* na médiu se směsí kávového oleje a kávového hydrolyzátu

Vzorek	Čas (t)	Torularhodin	Torulen	Lykopen	Betakaroten	Celkové
C9	3	0,6791	-	0,5062	-	1,3084
C10	4	0,8591	-	0,5119	-	1,4606
C11	5	0,5776	-	0,3959	-	1,0653
C12	6	0,3622	-	0,3591	-	0,8125
C13	21	0,3016	-	0,1708	0,0590	0,6273
C14	24	0,3866	-	0,1570	0,0513	0,6857
C15	27	0,4707	-	0,1163	0,0495	0,6921
C16	30	0,6524	1,4503	0,1448	0,0586	2,3262
C17	44	1,0781	0,1696	0,1586	0,0901	1,6353
C18	47	1,9938	-	0,1693	0,1614	2,4247
C19	50	1,5692	-	0,1601	0,0928	1,8800
C20	53	1,8721	-	0,1947	0,1136	2,2413
C21	69	2,7841	-	0,1583	0,1444	3,1312
C22	76	2,5943	-	0,1618	0,1322	2,9471
C23	93	3,4783	-	0,1572	0,1594	3,8703
C24	99	3,2105	-	0,1801	0,1586	3,6250
C25	120	2,5075	-	0,2755	0,1132	2,9439

Příloha 30: Produkce a akumulace lipofilních metabolitů a obsah betaglukanů u fermentorové kultivace *Cystofilobasidium macerans* na médiu se směsí kávového oleje a kávového hydrolyzátu

Vzorek	Čas (t)	Ergosterol (mg/g)	Ubichinon (mg/g)	Tokoferol (mg/g)	Betaglukany (%)
C9	3	3,6475	7,0708	1,2173	-
C10	4	4,2817	7,8873	0,8645	-
C11	5	4,2399	6,5577	1,0771	-
C12	6	4,2116	6,8573	1,3651	-
C13	21	7,2312	6,4997	0,2410	-
C14	24	4,9059	5,6291	0,4013	5,1312
C15	27	4,9300	12,7513	9,8947	-
C16	30	4,8633	8,5982	0,4906	-
C17	44	5,0994	6,7651	0,1070	-
C18	47	5,7668	6,1205	0,1175	5,2157
C19	50	4,7756	4,2810	0,0947	-
C20	53	5,3907	6,1278	0,0743	-
C21	69	5,6105	5,0388	0,3976	5,8662
C22	76	5,8798	5,3336	0,0544	-
C23	93	6,4758	5,6775	0,5668	-
C24	99	6,9173	5,7043	0,6088	-
C25	120	5,7629	5,2638	1,2065	5,7583

Příloha 31: Produkce biomasy, obsah lipidů a profil mastných kyselin fermentorové kultivace *Sporidiobolus pararoseus* na médiu se směsí kuřecího odpadního tuku a kávového hydrolyzátu

Vzorek	Čas (t)	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)	α (U/ml)
S0	0	0,74	-	-	-	-	0,0916
S1	0,25	0,83	-	-	-	-	0,1098
S2	0,5	0,98	-	-	-	-	0,1098
S3	0,75	0,75	-	-	-	-	0,1022
S4	1	0,85	-	-	-	-	0,0847
S5	1,25	0,85	-	-	-	-	0,0972
S6	1,5	1,08	-	-	-	-	0,0997
S7	1,75	1,20	-	-	-	-	0,1167
S8	2	1,00	-	-	-	-	0,1217
S9	3	1,08	27,6	24,9	47,1	28,0	0,0771
S10	4	1,26	24,3	26,1	46,7	27,2	0,0740
S11	5	1,45	17,2	21,0	40,1	38,9	0,1022
S12	6	1,69	15,2	21,9	41,1	37,0	0,1060
S13	7	1,97	18,7	21,8	41,8	36,4	0,0947
S14	20	8,26	28,2	18,5	53,7	27,8	0,0784
S15	24	12,33	33,0	18,9	53,1	28,0	0,1016
S16	27	14,31	36,2	20,0	52,8	27,3	0,1135
S17	30	17,39	34,9	20,8	52,1	27,1	0,1173
S18	45	32,57	35,8	20,9	51,9	27,2	0,3250
S19	48	35,80	39,1	21,9	51,8	26,4	0,4380
S20	57	40,12	37,7	20,9	52,3	26,8	0,5051
S21	70	38,34	40,6	21,6	52,6	25,8	0,2848
S22	78	37,09	36,5	21,3	52,6	26,1	0,2240
S23	93	33,78	37,8	19,8	53,4	26,8	0,2334
S24	97	36,61	36,9	19,4	53,4	27,1	0,1819
S25	101	37,47	38,5	19,5	53,4	27,1	0,1380
S26	120	36,79	38,1	18,4	53,9	27,7	0,1713
S27	122	36,98	32,1	17,2	53,2	29,6	0,2089

Příloha 32: Produkce karotenoidů u fermentorové kultivace *Sporidiobolus pararoseus* na médiu se směsí kuřecího odpadního tuku a kávového hydrolyzátu

Vzorek	Čas (t)	Torularhodin	Torulen	Lykopen	Betakaroten	Celkové
S9	3	0,0226	0,1150	0,1500	0,0248	0,3553
S10	4	0,0567	0,1940	0,2102	0,0450	0,5867
S11	5	0,1649	0,1700	0,2012	0,0474	0,6593
S12	6	0,1288	0,1578	0,1942	0,0416	0,6056
S13	7	0,1769	0,1633	0,1866	0,0619	0,6682
S14	20	0,4294	0,1244	0,1364	0,0539	0,8804
S15	24	0,3989	0,2006	0,1345	0,0530	0,9303
S16	27	0,3055	0,1334	0,1325	0,0535	0,7496
S17	30	0,3514	0,1391	0,1255	0,0658	0,8163
S18	45	0,2552	0,2076	0,1356	0,0480	0,7519
S19	48	0,1832	0,1648	0,1216	0,0438	0,6052
S20	57	0,1819	0,1413	0,1282	0,0473	0,5787
S21	70	0,2056	0,1067	0,1535	0,0625	0,6041
S22	78	0,3742	0,1716	0,2173	0,0885	0,9419
S23	93	0,4881	0,1663	0,2673	0,1066	1,1190
S24	97	0,4736	0,1382	0,2615	0,0979	1,0451
S25	101	0,5691	0,1642	0,2841	0,1110	1,2197
S26	120	0,8070	0,0000	0,3030	0,1323	1,3299
S27	122	0,7604	0,0000	0,3033	0,1325	1,2778

Příloha 33: Produkce lipofilních metabolitů a obsah betaglukanů u fermentorové kultivace *Sporidiobolus pararoseus* na médiu se směsí kuřecího odpadního tuku a kávového hydrolyzátu

Vzorek	Čas (t)	Ergosterol (mg/g)	Ubichinon (mg/g)	Betaglukany (%)
S9	3	2,1788	6,1551	-
S10	4	3,4312	8,3856	-
S11	5	3,8777	8,4024	-
S12	6	3,6579	7,6654	-
S13	7	4,4011	8,4139	-
S14	20	3,8720	6,9527	-
S15	24	3,4937	5,2933	3,1732
S16	27	2,9096	5,0487	-
S17	30	2,8664	5,6910	-
S18	45	1,9327	3,6569	-
S19	48	1,6288	2,9393	3,4881
S20	57	1,5888	2,5724	-
S21	70	2,4646	9,2479	3,2871
S22	78	2,5176	3,8268	-
S23	93	2,8523	4,4926	-
S24	97	2,7944	4,5407	-
S25	101	2,9945	4,8086	-
S26	120	3,2283	6,4528	4,7961
S27	122	3,2814	6,8758	-