



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

VYUŽITÍ RŮZNÝCH TYPŮ ODPADNÍCH PROTEINOVÝCH SUBSTRÁTŮ KVASINKAMI

UTILIZATION OF SOME WASTE PROTEIN MATERIALS BY RED YEASTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Erika Laššová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Holub, Ph.D.

BRNO 2025

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP2055/2024 Akademický rok: 2024/25
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Erika Laššová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Holub, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Využití různých typů odpadních proteinových substrátů kvasinkami

Zadání diplomové práce:

V rámci diplomové práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- Literární rešerše zaměřená na přehled biotechnologicky využitelných proteinových odpadních substrátů z potravinářství a zemědělství a na kvasinkové systémy, které je dokážou valorizovat.
- Selekce karotenogenních kmenů pro kultivační experimenty, návrhy složení média, možnosti aplikace proteinů jako zdroje nutrientů.
- Analýza růstu a metabolické aktivity vybraných kvasinek v přítomnosti proteinových substrátů různého typu v podmínkách nutričního stresu.
- Vyhodnocení výsledků – možnosti produkce obohacené kvasinkové biomasy s vyšším obsahem proteinů.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2025:

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

Bc. Erika Laššová
studentka

Ing. Jiří Holub, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2025

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Táto diplomová práca sa zaoberá produkciou mikrobiálnej biomasy pomocou vybraných kmeňov oleogénnych kvasiniek *Rhodotorula kratochvilovae* (CCY 20-2-26), *Rhodotorula toruloides* (CCY 62-2-4), *Metschnikowia pulcherrima clade* (CCY 029-002-149) kultivovaných na vedľajších proteínových produktoch potravinárskej výroby, ako sú srvátka, pivovarské droždie, ľanové výlisky a kuracie perie. Hlavným cieľom práce bolo optimalizovať podmienky kultivácie so zameraním na zvýšenie obsahu dusíkatých látok v kvasinkovej biomase a zároveň sledovať schopnosť jednotlivých kmeňov syntetizovať vybrané bioaktívne metabolity – lipidy, karotenoidy, β -glukány, ergosterol a ubichinón. Teoretická časť poskytuje prehľad biologických vlastností vybraných kmeňov kvasiniek, opisuje významné metabolity a ich metabolické dráhy a obsahuje charakterizáciu použitých vedľajších proteínových produktov. V experimentálnej časti boli odpadné substráty hydrolyzované a použité ako zdroj dusíka pre kultiváciu zvolených kvasiniek s následnou analýzou a zhodnotením získanej biomasy. V závislosti od typu odpadného substrátu sa preukázala rozdielna schopnosť jednotlivých kmeňov akumulovať dusík, s najvyššou akumuláciou dusíkatých látok – hrubej bielkoviny v biomase kvasinky *Rhodotorula toruloides* s 40,94 g/100 g biomasy, ktorá bola kultivovaná na hydrolyzáte ľanu a *Metschnikowia pulcherrima clade* s 39,27 g/100 g biomasy kultivovanej na hydrolyzáte srvátkového proteínu. Využitie potravinárskych odpadov ako alternatívnych surovín predstavuje ekonomicky prínosné riešenie v súlade s princípmi cirkulárnej ekonomiky.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

kvasinky, odpadné substráty, proteíny, lipidy, ergosterol, ubichinón, karotenoidy, β -glukány

ABSTRACT

This Diploma Thesis focuses on the production of microbial biomass using selected strains of oleaginous yeasts *Rhodotorula kratochvilovae* (CCY 20-2-26), *Rhodotorula toruloides* (CCY 62-2-4), and *Metschnikowia pulcherrima* clade (CCY 029-002-149), cultivated on protein-rich by-products from the food industry such as whey, brewer's yeast, flaxseed press meal, and chicken feathers. The main objective was to optimize cultivation conditions with an emphasis on increasing the nitrogen content in the yeast biomass, while also monitoring the ability of individual strains to synthesize selected bioactive metabolites—lipids, carotenoids, β -glucans, ergosterol, and ubiquinone. The theoretical part provides an overview of the biological characteristics of the selected yeast strains, describes the studied metabolites and their metabolic pathways, and characterizes the utilized protein-rich waste substrates. In the experimental section, the waste substrates were hydrolyzed and used as nitrogen sources for the cultivation of selected yeasts, followed by analysis and evaluation of the enriched biomass. Depending on the type of waste substrate, the ability of individual yeast strains to accumulate nitrogen varied, with the highest accumulation of nitrogenous compounds – crude protein – observed in the biomass of *Rhodotorula toruloides*, reaching 40.94 g/100 g of biomass when cultivated on flaxseed hydrolysate, and *Metschnikowia pulcherrima* clade, with 39.27 g/100 g of biomass when cultivated on whey protein hydrolysate. The use of food industry by-products as alternative raw materials represents an economically beneficial approach aligned with the principles of circular economy.

KEY WORDS

yeast, waste substrate, proteins, lipids, ergosterol, ubiquinone, carotenoids, β -glucans

LAŠŠOVÁ, Erika. *Využití různých typů odpadních proteinových substrátů kvasinkami*. Online, diplomová práce. Jiří HOLUB (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2025. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/162019>. [cit. 2025-05-05].

Čestné prehlásenie

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

.....
podpis študenta

Pod'akovanie

Touto formou by som rada prejavila vďaku svojmu vedúcemu Ing. Jiřímu Holubovi Ph.D. za odborné vedenie, ochotu a trpezlivosť pri riešení problematiky tejto práce. Taktiež by som rada poďakovala konzultantovi Ing. Janovi Obračajovi za cenné rady a usmernenie. V neposlednej rade by som rada poďakovala fakulte a predovšetkým ústavu ÚCHPBT za poskytnutie možnosti realizácie tejto práce.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČASŤ	10
2.1	Kvasinky	10
2.1.1	Fyziológia kvasiniek	10
2.1.2	Výživa kvasiniek	10
2.1.3	Rast kvasničnej kultúry	11
2.1.4	Rozmnožovanie kvasiniek.....	12
2.1.4.1	Nepohlavné rozmnožovanie kvasiniek	12
2.1.4.2	Pohlavné rozmnožovanie kvasiniek.....	12
2.1.5	Kvasinky rodu <i>Rodotorula</i>	12
2.1.6	Kvasinky rodu <i>Metschnikowia</i>	13
2.2	Významné metabolity vybraných kvasiniek.....	14
2.2.1	Lipidy	14
2.2.2	Mastné kyseliny.....	15
2.2.2.1	Nasýtené mastné kyseliny	15
2.2.2.2	Nenasýtené mastné kyseliny	16
2.2.2.3	B-oxidácia	16
2.2.2.4	Biosyntéza mastných kyselín.....	18
2.2.3	Karotenoidy	20
2.2.3.1	Biosyntéza karotenoidov mevalonátovou dráhou	21
2.2.4	Ergosterol	22
2.2.4.1	Biosyntéza ergosterolu.....	22
2.2.5	Ubichinón	22
2.2.5.1	Biosyntéza ubichinónu.....	23
2.2.6	β -glukány.....	23
2.3	Odpadné substráty	23
2.3.1	Bielkovinové odpadné substráty	23
2.3.1.1	Ľanové pokrutiny	23
2.3.1.2	Srvátka	24
2.3.1.2.1	Srvátkový proteín.....	25

2.3.1.3	Pivovarské droždie.....	25
2.3.1.4	Kuracie perie.....	25
2.4	Analytické metódy.....	26
2.4.1	Stanovenie dusíka Kjeldahlovou metódou.....	26
2.4.2	Plynová chromatografia.....	26
2.4.3	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia.....	26
3	CIEĽ PRÁCE.....	27
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	28
4.1	Chemikálie.....	28
4.1.1	Odpadné substráty.....	29
4.2	Pomôcky a prístroje.....	29
4.3	Druhy použitých mikroorganizmov.....	30
4.4	Príprava odpadných substrátov.....	30
4.4.1	Srvátka.....	30
4.4.2	Ľanové výlisky.....	30
4.4.2.1	Výsledok analýzy mastných kyselín ľanového oleja.....	31
4.4.3	Screeningové hydolyzáty.....	31
4.4.4	Stanovenie dusíku.....	32
4.4.4.1	Výsledky Kjeldahlovej metódy.....	32
4.4.5	Stanovenie C:N pomeru pomocou prvkovej analýzy.....	33
4.4.5.1	Výsledky prvkovej analýzy.....	33
4.4.6	Inokulácia.....	34
4.4.6.1	Kontrolné médiá.....	35
4.4.7	Produkčné médiá.....	36
4.5	Spracovanie a analýza biomasy.....	36
4.5.1	Stáčanie biomasy a gravimetrické stanovenie biomasy.....	36
4.5.2	Stanovenie obsahu dusíku v biomase Kjeldahlovou metódou.....	37
4.5.3	Analýza vzoriek na vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografi.....	37
4.5.3.1	Parametre analýzy vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie.....	37
4.5.4	Analýza mastných kyselín pomocou plynovej chromatografie.....	37
4.5.4.1	Parametre analýzy plynovej chromatografie.....	38
4.5.5	Stanovenie glukánov.....	38
4.5.5.1	Roztoky balenia kitu pre stanovenie glukánov.....	38

4.5.5.2	Pomocné roztoky pre stanovenie glukánov	39
4.5.5.3	α -glukány	39
4.5.5.4	Celkové glukány	39
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA	40
5.1	Obohatenie biomasy dusíkatými zložkami médiá	40
5.2	Stanovenie rastových a produkčných vlastností vybraných kvasiniek	42
5.2.1	Kvasinka <i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	42
5.2.1.1	Koncentrácia mikroprvkov u kontrolných médií kvasinky <i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	46
5.2.2	Kvasinka <i>Rhodotorula toruloides</i>	49
5.2.2.1	Koncentrácia mikroprvkov u kontrolných médií kvasinky <i>Rhodotorula toruloides</i>	52
5.2.3	Kvasinka <i>Metschnikowia Pulcherrima</i>	55
5.2.3.1	Koncentrácia mikroprvkov u kontrolných médií kvasinky <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	57
6	ZÁVER	61
7	ZDROJE POUŽITEJ LITERATÚRY	64
8	ZOZNAM SKRATIEK.....	70

1 ÚVOD

Vzhľadom na rastúci tlak na environmentálnu záťaž a maximalizáciu využitia odpadných surovín sa zvyšuje záujem o mikrobiálne technológie, ktoré umožňujú efektívne zhodnocovanie vedľajších produktov potravinárskeho priemyslu. Oleogénne kvasinky predstavujú sľubné mikroorganizmy s vysokou schopnosťou akumulovať lipidy, proteíny a ďalšie hodnotné bioaktívne látky. V tejto práci boli skúmané kmene: *Rhodotorula kratochvilovae* (CCY 20-2-26), *Rhodotorula toruloides* (CCY 62-2-4), *Metschnikowia pulcherrima clade* (CCY 029-002-149), ktoré patria medzi perspektívne druhy schopné využiť odpadné substráty bohaté na dusík a uhlík.

Tieto kvasinky sú známe svojou metabolickou prispôbovosťou, vďaka ktorej dokážu rásť na širokej škále vedľajších poľnohospodárskych a potravinárskych produktoch, medzi ktoré patrí srvátka, pivovarské kvasnice, ľanové výlisky či perie. Tieto substráty sú často považované za odpad a predstavujú záťaž pre životné prostredie, avšak súčasne môžu slúžiť ako výživné médium pre mikroorganizmy. Biotransformáciou týchto materiálov je možné produkovať hodnotnú mikrobiálnu biomasu s bioaktívnymi zložkami, čo prispieva k udržateľnosti biologických zdrojov.

Olejetvorné kvasinky majú schopnosť syntetizovať a hromadiť lipidy v podobe triacylglycerolov, ktoré môžu tvoriť značnú časť ich bunkovej hmoty. Tieto lipidy, často bohaté na mono- a polynenasýtené mastné kyseliny sú využiteľné ako funkčné zložky s pozitívnym účinkom na zdravie. Okrem lipidov produkujú tieto kvasinky aj ďalšie látky, ako sú karotenoidy s antioxidačnými vlastnosťami, β -glukány s imunitne podporujúcimi vlastnosťami, ergosterol ako prekursor vitamínu D₂ a ubichinón (koenzým Q10), ktorý hrá dôležitú úlohu v mitochondriálnom dýchaní a ochrane buniek pred oxidačným stresom.

Výroba biomasy bohatšej na dusíkaté látky je ďalším aspektom s vysokou pridanou hodnotou, najmä v oblasti krmív a v potravinových doplnkoch. Kultiváciou kvasiniek na vhodne upravených proteínových odpadných substrátoch je možné získať proteínmi obohatenú biomasu, ktorá predstavuje potencionálnu náhradu konvenčných zdrojov živočíšnych bielkovín.

Oleogénne kvasinky predstavujú sľubnú alternatívu ku tradičným technológiám spracovania odpadov vďaka ich schopnosti premieňať odpadné vedľajšie produkty na hodnotné produkty, ktoré majú potenciál širokého uplatnenia v rôznych odvetviach potravinárskeho, krmivárskeho i kozmetického priemyslu a tým prispievajú k udržateľnej cirkulačnej ekonomike znižovať odpad a enviromentálny dopad výrobných procesov.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Kvasinky

Kvasinky sú jednobunkové eukaryotické mikroorganizmy, patriace do ríše *Fungi*. Existuje cez 350 rôznych rodov kvasiniek z viac ako 2000 druhov „pravých“ kvasiniek, pričom tieto čísla neustále rastú. Kvasinky sú klasifikované ako heterotrofné organizmy, čo znamená, že využívajú ako zdroj energie organický materiál. Tieto organické materiály štiepia a následne trávia produkovaním rôznych lipolytických, glykolytických alebo proteolytických enzýmov, alebo priamym absorbovaním aminokyselín a jednoduchých sacharidov cez bunkovú stenu. Líšia sa bunkovou morfológiou, reprodukčnými procesmi aj enzymatickou vybavenosťou [1, 2, 3].

2.1.1 Fyziológia kvasiniek

Veľkosť kvasiniek sa pohybuje od 3 do 6 μm . Tvar tela je značne ovplyvnený ich vegetatívnym rozmnožovaním – pučaním alebo delením. Ďalšími významnými faktormi sú vek a kultivačné podmienky. Medzi najčastejšie tvary tela kvasiniek patria elipsovité, vajcovité a guľaté. Medzi menej časté patria dlho pretiahnuté, citónovité alebo trojuholníkovité tvary. Vplyvom prostredia majú tendenciu vytvárať zhľuky a klesať na dno nádoby médiá [2, 4].

Na povrchu kvasinkovej bunky sa nachádza bunková stena. Tá chráni bunku pred mechanickým poškodením a osmotickým tlakom. Hlavnou zložkou bunkovej steny tvoria polysacharidy v majoritnom zastúpení glukány, ktoré tvoria spleť štruktúru, ktorá je vyplnená bielkovinami. V menšom množstve sa tu nachádzajú aj lipidy, fosfolipidy a fosforečnany. Pod bunkovou stenou sa nachádza cytoplazmatická membrána, ktorá vytvára osmotické rozhranie medzi bunkou a vonkajším prostredím a je sídlom transportných mechanizmov. Voľne priepustná je len pre nenabitú malé molekuly. Je zložená primárne z lipidov a proteínov a vytvára členité výbežky do cytoplazmy. Cytoplazma v mladých bunkách sa javí ako homogénna priehľadná hmota. V starších bunkách sa objavujú zrníčka a vyznačujú sa zvýšenou vakuolizáciou. V cytoplazme sa nachádzajú všetky bunkové organely aj zrníčka rezervných látok [4].

2.1.2 Výživa kvasiniek

Životná činnosť mikroorganizmov závisí od vonkajšieho prostredia. Toto prostredie musí obsahovať všetky nevyhnutné makro a mikro živiny nutné pre syntézu bunkovej hmoty a dostatočné množstvo využiteľného zdroja energie. Napriek tomu, mikroorganizmy sú schopné adaptácie na rôzne podmienky a dokážu prispôbiť do určitej miery enzymatické vybavenie, zloženie a tvar svojich buniek [2].

Voda tvorí prostredie pre všetky metabolické reakcie a zohráva dôležitú úlohu pri správnom fungovaní fyziologických procesov v bunke. Na zabezpečenie optimálnej činnosti musí bunka udržiavať dostatočný obsah vody, ktorá tvorí až 85 % jej objemu – či už vo voľnej, alebo viazanej forme. Zníženie obsahu vody môže fyziologicky narušiť fungovanie bunky. Kvasinky nie sú schopné prijímať kyslík priamo zo vzduchu. Kyslík musí byť rozpustený v médiu, aby ho mohli prijímať a využiť na metabolické procesy [2, 5].

Kvasinky patria medzi chemoorganotrofné organizmy. Získavajú potrebný uhlík a dusík najčastejšie vo forme organických zlúčenín. Najvýznamnejším zdrojom uhlíku sú sacharidy, najmä hexózy, ako je D-glukóza, D-fruktóza, D-manóza. Okrem nich môžu kvasinky využívať aj alkoholy alebo organické kyseliny. Tieto látky slúžia ako energetický substrát na tvorbu ATP, ktorý je nevyhnutný pre bunkové procesy a rast mikroorganizmu [2, 5].

Dusík môže byť pre mikroorganizmy dostupný vo forme organických alebo anorganických zlúčenín. Medzi organické zdroje patria napríklad peptón či kvasničný autolyzát, ktoré poskytujú dusík vo forme aminokyselín a peptidov. Kvasinky nevyužívajú všetky aminokyseliny rovnako dobre. Spotreba rôznych aminokyselín závisí od druhu kvasinky. Z anorganických zlúčenín sa často využívajú amónne soli, ako napríklad fosforečnan amónny, ktorý dodáva dusík bez výraznej zmeny pH prostredia [5].

Pomer uhlíka k dusíku je kľúčovým faktorom pre rast a vývoj heterotrofnej mikrobiálnej kultúry. Molárny pomer uhlíka k dusíku v organickej hmote znamená množstvo uhlíka v pomere k množstvu prítomného dusíka. V organickej hmote je vždy viac uhlíka ako dusíka. Pomer uhlíka k dusíku sa zapisuje ako C:N a zvyčajne ide o jedno číslo, ktoré označuje, že na každý 1 mol dusíka v tejto organickej hmote pripadá dané molárne množstvo uhlíku [6, 7].

Fosfor je nevyhnutnou súčasťou viacerých bunkových zlúčenín, ako sú fosfoproteíny, fosfolipidy, nukleoproteíny a nukleové kyseliny. Jeho úlohou je väzba s organickými zlúčeninami, čím vznikajú látky s makroergickými väzbami, napríklad pyrofosforečnanové zlúčeniny, ktorých štiepením sa uvoľňuje energia potrebná pre bunkové procesy. Ako zdroj fosforu sa v živných médiách často používa KH_2PO_4 alebo kombinácia s K_2HPO_4 na udržanie stabilného pH prostredia [5].

Horčík tvorí približne 0,4 % sušiny kvasiniek. Pôsobí ako stimulátor viacerých enzymatických procesov a zohráva dôležitú úlohu pri aktivite fosfatáz. Do kultivačných médií sa najčastejšie pridáva vo forme síranu horečnatého (MgSO_4). Okrem horčíka sú pre správny rast a funkciu kvasiniek nevyhnutné aj ďalšie kationy ako draslík (K^+), sodík (Na^+), mangán (Mn^{2+}), vápnik (Ca^{2+}), železo (Fe^{3+}), kobalt (Co^{3+}), meď (Cu^{2+}) a zinok (Zn^{2+}), ktoré sú nevyhnutné na správne fungovanie enzymatických reakcií a bunkových procesov [2, 5].

Niektoré kvasinky môžu vyžadovať aj špecifické organické zlúčeniny, tzv. rastové látky. Tieto látky si kvasinky nedokážu syntetizovať samé, no sú nevyhnutné pre fungovanie bunkovej štruktúry a metabolizmu. Medzi rastové látky patria vitamíny ako biotín, thiamín, alebo určité aminokyseliny. Koncentrácia týchto vitamínov, potrebná pre optimálny rast, sa môže líšiť v závislosti od konkrétneho druhu kvasinky [2].

2.1.3 Rast kvasničnej kultúry

Priebeh rastu mikrobiálnej kultúry je možné sledovať stanovením prírastkov buniek v pravidelných časových intervaloch od zaočkovania médií. Grafickým vyjadrením tohto priebehu je rastová krivka. Táto krivka má niekoľko častí, ktoré závisia od počtu buniek na čase. Prvou fázou od zaočkovania kultúry je lag-fáza. Táto fáza sa vyznačuje len minimálnym zvýšením počtu buniek. Dôvodom je prispôsobovanie bunkového organizmu na nové prostredie. Dĺžka lag-fázy závisí od viacerých faktorov, ako je množstvo rastových látok v prostredí,

vhodnosť základných živín, schopnosť organizmu sa aklimatizovať a aj od počtu naočkovaných buniek. Čím sú podmienky vhodnejšie, tým je táto fáza kratšia. Na konci fázy sú bunky zväčšené a pripravené na množenie [2, 5].

Po lag-fáze nastáva fáza zrýchleného rastu a exponenciálna fáza. Vyznačujú sa najbujnejším rastom a najrýchlejším nárastom biomasy. Špecifická je najkratšia generačná doba, ktorá je behom celej exponenciálnej fázy konštantná. Po exponenciálnej časti nastáva spomalenie rastu až jeho úplné zastavenie. Nastáva stacionárna fáza. Pre rôzne mikroorganizmy je táto fáza rôzne dlhá a závisí to od citlivosti bunkovej kultúry k hladovaniu a akumulácii spodín metabolizmu, ktoré inhibujú množenie, prípadne dochádza k sporulácii. Po stacionárnej fáze nastáva fáza odumierania. Bunky rýchlejšie odumierajú ako pribúdajú. V médiu sa zvyšuje koncentrácia odpadných metabolitov a živiny ubúdajú. Na konci fázy odumierania nastáva smrť a zánik kultúry [2, 5].

2.1.4 Rozmnožovanie kvasiniek

Kvasinky ako eukaryotické organizmy sa rozmnožujú pohlavne alebo nepohlavne. Je to závislé od rodu kvasinky, dostupnosti živín a podmienok prostredia [8].

2.1.4.1 Nepohlavné rozmnožovanie kvasiniek

Väčšina rodov kvasiniek sa vegetatívne rozmnožuje pučaním. Pučanie je spôsob bunkového delenia, pri ktorom vzniká dcérska bunka priľahlá k materskej bunke, ktorá sama nemení svoj tvar počas rozmnožovania. Predstavuje extrémnu verziu asymetrického bunkového delenia. Pri pučaní dospelá bunka tvorí pupeň, spojený kanálikom, zvyčajne na jednom z opačných pólů guľovitých buniek. Pupene rastú, kým nedosiahnu veľkosť približne 2/3 materskej bunky, ale záleží od konkrétneho druhu. Keď sú všetky organely a genetický materiál zdvojený a presunutý do dcérskej bunky, procesom cytokinézy je dcérska bunka odpojená od materskej bunky a je identická s materskou bunkou, od ktorej sa odpojila [4, 8].

2.1.4.2 Pohlavné rozmnožovanie kvasiniek

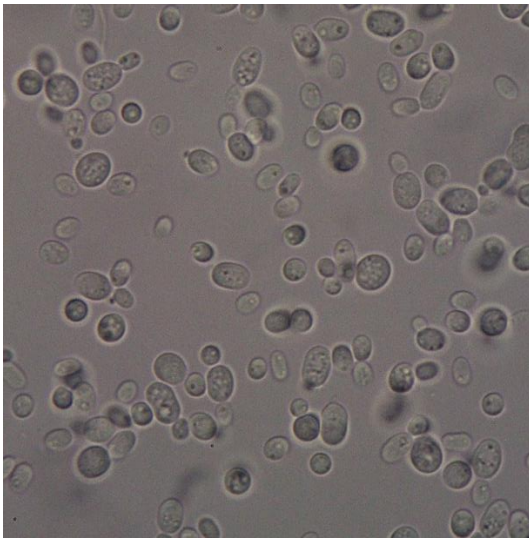
U väčšiny kvasiniek je taktiež známe pohlavné rozmnožovanie. Výsledkom sú pohlavné spóry. Morfológický prechod, ktorý vedie k sporulácii začína u 2 vegetatívnych buniek, pučiacich buniek, hýf poprípade pseudohýf. Jadrá týchto haploidných buniek splynú do diploidného jadra. Toto diploidné jadro tvorí základ spór. Diploidné jadro sa následne delí meiózou. Po skončení meiózy sa v cytoplazme nachádzajú štyri haploidné jadrá, ktoré sa môžu ešte mitoticky deliť. Tie sa procesom endopučania oddelia od spoločnej cytoplazmy a vznikajú spóry [4, 8].

2.1.5 Kvasinky rodu *Rhodotorula*

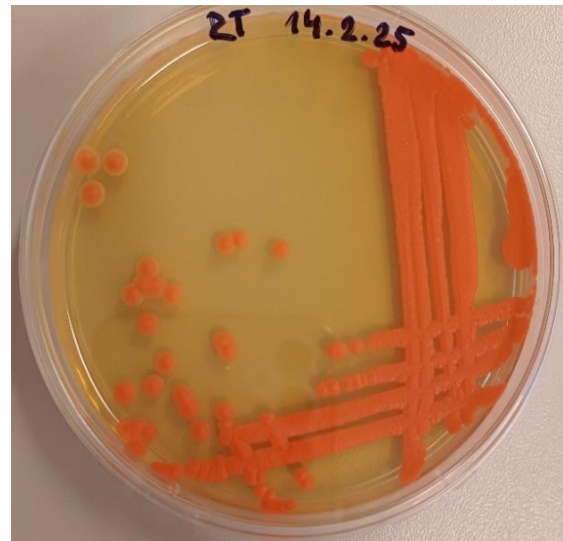
Rod *Rhodotorula* patrí medzi karoténogénne kvasinky, ktorých metabolizmus je prispôsobený na produkciu lipidových pigmentov – karoténov, ktoré sa vyznačujú farbami od žltej až po červenú. Medzi tieto pigmenty patrí napríklad β -karotén, torularhodin či lycopén, ktoré sa nachádzajú na vnútornej strane cytoplazmatickej membrány. Okrem pigmentov tieto kvasinky produkujú a akumulujú vysoké množstvá triacylglycerolov, ktoré môžu tvoriť viac než 60 % ich sušiny [9, 10].

Kvasinky rodu *Rhodotorula* sú striktne aeróbne a majú guľovitý alebo vajcovitý tvar. Rozmnožovanie prebieha prevažne pučaním, ktoré môže byť mnohostranné alebo sa

uskutočňuje na póloch buniek. Karoténogénne druhy kvasiniek nedokážu tvoriť pseudohýfy. Medzi najznámejších zástupcov tohto rodu patrí *Rhodotorula kratochvilovae* a *Rhodotorula toruloides* (Obrázok 1) a (Obrázok 2) [9, 10].



Obrázok 1: Mikroskopický záber kvasinky *Rhodotorula toruloides*

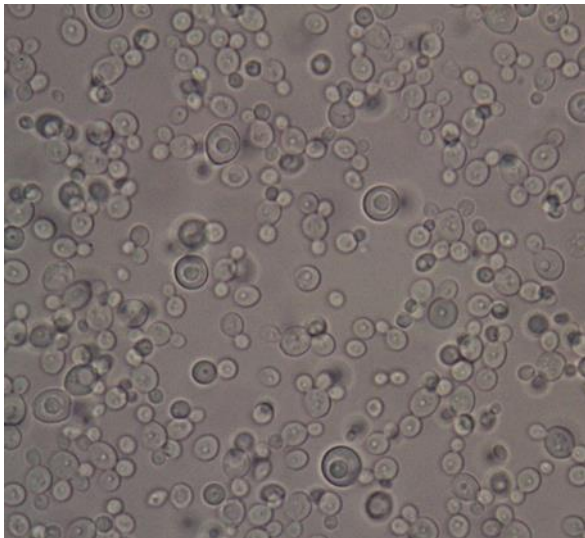


Obrázok 2: Záber Petriho misky kultúry *Rhodotorula toruloides*

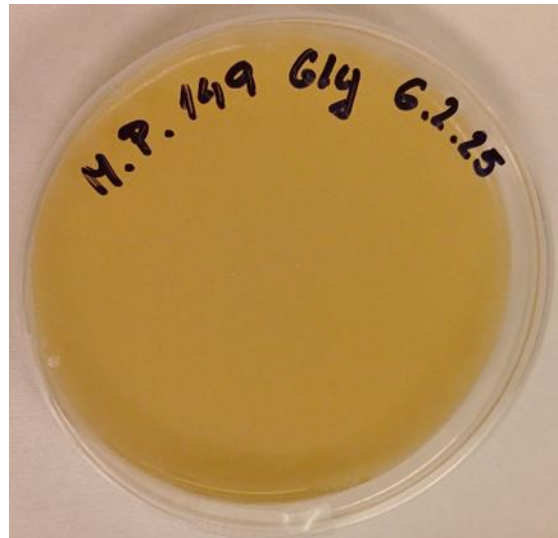
2.1.6 Kvasinky rodu Metschnikowia

Rod *Metschnikowia* zahŕňa 71 druhov pučiacich kvasiniek spolu s viacerými príbuznými kmeňmi. Ich bunky majú guľovitý až elipsoidný tvar a v závislosti od podmienok sa rozmnožujú rôznymi spôsobmi. Pri aeróbných podmienkach sa množia nepohlavným mnohostranným pučaním, zatiaľ čo v anaeróbnom prostredí môžu vytvárať pseudohýfy. Niektoré druhy formujú dlhé, aseptované zárodočné trubice, ktoré morfológicky pripomínajú pravé hýfy. Askospóry týchto kvasiniek sú charakteristické ihlovitým tvarom, ich konce môžu byť zúžené alebo asymetricky opuchnuté. V závislosti od druhu sa v ascuse tvorí jedna alebo dve spóry. Rod *Metschnikowia* má iba slabú schopnosť fermentácie a toleruje koncentráciu etanolu do 4 % [11, 12, 13].

Osobitnú skupinu v rámci tohto rodu predstavuje *M. pulcherrima clade* vyobrazenú na mikroskopickom zábere (Obrázok 3) a zábere Petriho misky (Obrázok 4). Tento rod je známy schopnosťou produkovať pulcherrimín – chelátový komplex kyseliny pulcherrimínovej a železitých iónov. Táto zlúčenina spôsobuje charakteristické sfarbenie kolónií od svetlofialovej až po gaštanovú, v závislosti od koncentrácie železa v prostredí. Pulcherrimín vykazuje antimikrobiálne účinky proti rôznym baktériám a hubám. Pri vystavení stresovým podmienkam dokážu tieto kvasinky syntetizovať značné množstvo lipidov [11, 13].



Obrázok 3: Mikroskopický snímok mikrobiálnej kultúry *Metschnikowia pulcherrima* clade



Obrázok 4: Petriho miska mikrobiálnej kultúry *Metschnikowia pulcherrima*

2.2 Významné metabolity vybraných kvasiniek

Skúmané druhy kvasiniek, konkrétne *Rhodotorula toruloides*, *Rhodotorula kratochvilovae* a *Metschnikowia pulcherrima*, sú známe svojou schopnosťou produkovať široké spektrum bioaktívnych látok. Tieto metabolity sa prirodzene akumulujú v biomase a zohrávajú dôležité úlohy v bunkovej fyziológii, pričom nachádzajú uplatnenie aj v rôznych oblastiach priemyslu. V rámci tejto práce boli sledované najmä mastné kyseliny, karotenoidy, ubichinón, ergosterol a β -glukány – teda látky, ktoré majú energetickú, antioxidačnú, membránovú alebo štrukturálnu funkciu. V nasledujúcich kapitolách je popísaný ich biologický význam, spôsob biosyntézy a potenciál ich produkcie v uvedených kmeňoch [59, 60, 61].

2.2.1 Lipidy

Lipidy sú malé organické molekuly s obmedzenou rozpustnosťou vo vode, ktoré možno izolovať z buniek a tkanív organizmu extrakciou nepolárnymi organickými rozpúšťadlami. Do tejto skupiny patria tuky, oleje, vosky, mnohé vitamíny a hormóny, ako aj väčšina nebielkovinových zložiek bunkových membrán. Rozdeľujú sa na jednoduché a zložené v závislosti od toho, či ich štruktúra pozostáva iba z lipidov alebo obsahuje aj nelipidickú zložku [15, 16].

Najrozšírenejšími lipidmi sú živočíšne tuky a rastlinné oleje, ktoré majú veľmi podobnú štruktúru. Chemicky ide o triacylglyceroly, teda estery glycerolu s tromi naviazanými karboxylovými kyselinami s dlhými uhlíkatými reťazcami mastných kyselín. U živočíchov predstavujú tuky hlavnú zásobáreň chemickej energie, pričom poskytujú až šesťkrát viac energie než rovnaké množstvo glykogénu [15, 16].

Funkcia lipidov v organizme je veľmi rozmanitá. Zložené lipidy sú súčasťou biologických membrán a plnia štrukturálnu úlohu. Tuky zohrávajú ochrannú funkciu ako tepelný a mechanický izolant, zatiaľ čo vosky na povrchu rastlín bránia nadmernému odparovaniu vody.

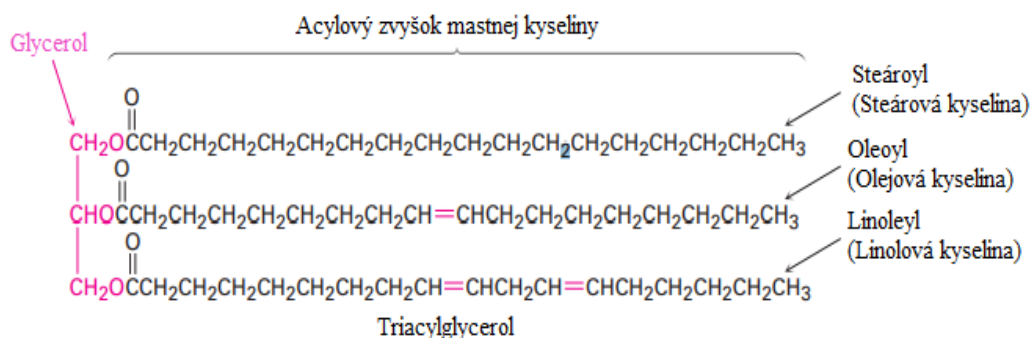
Lipidy majú aj regulačnú funkciu, ktorú zabezpečujú steroidy, hormóny, eikosanoidy a vitamíny A, D, E a K [16].

2.2.2 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny sú hydrofóbne zlúčeniny pozostávajúce z alifatického uhlíkového reťazca zakončeného karboxylovou skupinou. Sú hlavnými zložkami neterpenoidnej triedy lipidov. Ide o alifatické monokarboxylové kyseliny, ktoré možno získať hydrolyzou prírodných lipidov. V mikroorganizmoch bolo identifikovaných viac ako 500 rôznych typov mastných kyselín, no len niektoré z nich majú významnú biologickú funkciu, kde medzi významnú skupinu patria vyššie mastné kyseliny, ktoré obsahujú viac ako desať uhlíkových atómov [16, 17, 18].

Mastné kyseliny sa vo voľnej forme nevyskytujú, ale sú bežne prítomné vo forme esterov viazaných na glycerol (Obrázok 5), alkoholy alebo steroly. Okrem toho sú súčasťou komplexnejších štruktúr, ako sú lipopolysacharidy, fosfolipidy a lipoproteíny. Ich chemické vlastnosti sú ovplyvnené kombináciou hydrofóbnych (vodu odpudzujúcich) a hydrofilných (vo vode rozpustných) oblastí, čo im umožňuje plniť dôležité biologické funkcie [17].

Zloženie mastných kyselín v mikroorganizmoch je veľmi variabilné a závisí od substrátu a rastových podmienok. Rozlišujeme 2 hlavné typy mastných kyselín – nasýtené mastné kyseliny a nenasýtené mastné kyseliny, ktoré sa ešte delia na mononenasýtené a poly-nenasýtené [16, 17].



Obrázok 5: Štruktúrny vzorec triacylglycerolu [15]

2.2.2.1 Nasýtené mastné kyseliny

Nasýtené mastné kyseliny (SFA) sú charakteristické uhlíkovým reťazcom bez dvojitých väzieb, čo im dodáva stabilnú štruktúru. Za bežnej teploty sú v tuhom skupenstve. Sú súčasťou bunkových membrán a ich nasýtená konfigurácia prispieva k zníženiu tekutosti membrány. Zohrávajú dôležitú úlohu vo viacerých fyziologických procesoch, avšak nadmerný príjem nasýtených mastných kyselín môže mať negatívne účinky ako je zvýšenie celkového cholesterolu a podporou zápalových procesov v organizme [15, 19, 20].

Medzi hlavné nasýtené mastné kyseliny s dlhým reťazcom patria kyselina myristová (C14:0) a kyselina palmitová (C16:0), pričom práve kyselina palmitová je jednou z najrozšírenejších mastných kyselín v strave [19, 20].

2.2.2.2 Nenasýtené mastné kyseliny

Nenasýtené mastné kyseliny majú v svojej štruktúre jednu alebo viac dvojných väzieb. V klasifikácii nenasýtených mastných kyselín ich možno podľa počtu dvojitých väzieb rozdeliť na mononenasýtené mastné kyseliny s jednou dvojitou väzbou a polynenasýtené mastné kyseliny s 2 a viac dvojitými väzbami. Väčšina nenasýtených mastných kyselín sa prirodzene vyskytuje v cis konfigurácii, kde sú atómy vodíka pri dvojitej väzbe umiestnené na rovnakej strane. Táto dvojná väzba mierne ohýba uhol v opačnej časti 2 atómov vodíka. Čím má mastná kyselina viac dvojných väzieb, tým je ohyb väčší. Za bežnej teploty sa vyznačujú kvapalným skupenstvom. Nenasýtené mastné kyseliny, hlavne omega 3 mastné kyseliny majú priaznivé účinky na ľudský organizmus, znižujú riziko kardiovaskulárnych ochorení, bojujú proti zápalovým procesom a znižujú LDL cholesterol v tele [15, 20, 21].

Polynenasýtené mastné kyseliny (PUFA) sú triedou mastných kyselín, ktoré zahŕňajú omega-3, omega-6 mastné kyseliny podľa polohy prvej dvojitej väzby v karboxylovom reťazci od strany terminálneho metylu. Najrozšírenejšou polynenasýtenou mastnou kyselinou je kyselina linolová (C18:2) a kyselina arachidónová (C20:4). Medzi významné omega-3 patrí kyselina α -linolénová (C18:3), z ktorej sa v organizme syntetizuje kyselina eikosapentaénová (C20:5) a dokosahexaénová (C22:6). Kyselina linolová a linolénová sú pre človeka nevyhnutné, pretože bunky cicavcov nemajú schopnosť vytvoriť dvojnú väzbu pred deviaty uhlík reťazca mastných kyselín. [20, 21].

Mononenasýtené mastné kyseliny (MUFA) s jednou dvojnou väzbou zahŕňajú skupinu omega-9 mastných kyselín, kam patrí kyselina olejová (C18:1). Nepovažujú sa za esenciálne, pretože mnohé cicavce si dokážu tieto mastné kyseliny syntetizovať samé [21, 22].

2.2.2.3 B-oxidácia

β -oxidácia, známa aj ako Lynenova dráha (Obrázok 6), je kľúčová katabolická metabolická dráha zodpovedná za odbúravanie mastných kyselín. Tento proces prebieha v 2 hlavných fázach: aktivačná fáza prebiehajúca v cytosole a β -oxidácia prebiehajúca v mitochondriách. β -oxidácia je cyklická dráha, pri ktorom sa mastné kyseliny postupne skracujú o 2 uhlíkové atómy. Tento cyklus pokračuje, kým nie je celá mastná kyselina rozložená na acetylové zvyšky naviazané na koenzým A [15, 23].

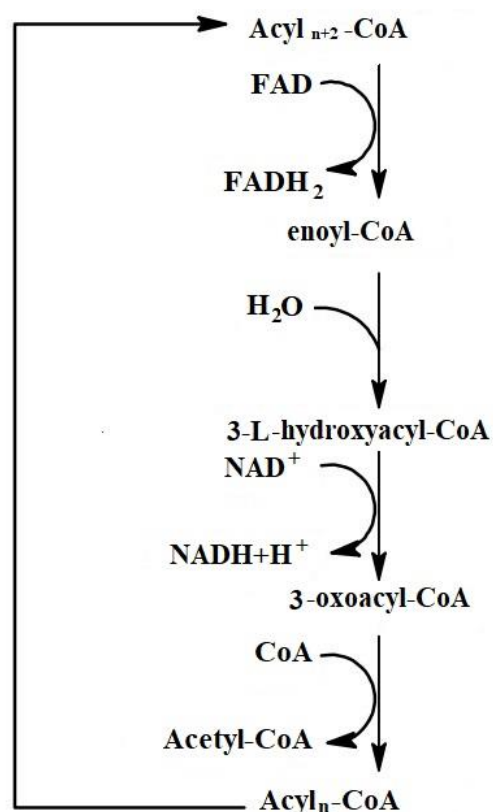
Aktivácia mastných kyselín, teda tvorba acyl-CoA, začína v cytosole konverziou mastnej kyseliny na vysokoenergetický thioester. Dĺžka reťazca mastnej kyseliny určuje typ vzniknutého acyl-CoA, pričom jeho aktiváciu zabezpečujú špecifické enzýmy zo skupiny syntetáz acyl-CoA prispôbené rôznym dĺžkam reťazca. Tento proces je katalyzovaný ligázou za prítomnosti CoA a ATP. Reakcia prebieha v 2 fázach. Najprv vzniká acyladenylát reakciou s ATP. V druhej fáze sa acyladenylát viaže na CoA, čím vzniká acyl-CoA a uvoľňuje sa AMP [16, 23].

Prenos acyl-CoA cez mitochondriálnu membránu zabezpečuje karnitín-acyltransferázový systém, v ktorom zohráva kľúčovú úlohu L-karnitín. Tento prenášač obsahuje hydroxylovú skupinu, na ktorú sa môže viazať aktivovaná mastná kyselina, čím vzniká acylkarnitín. Na vnútornom povrchu mitochondriálnej membrány sa nachádza karnitín-palmitoyltransferáza

II, ktorá katalyzuje spätnú reakciu – regeneráciu acyl-CoA, pričom sa L-karnitín uvoľní a môže byť opäť použitý [16, 23, 24].

Proces β -oxidácie začína oxidáciou β -uhlíka mastnej kyseliny, čo vedie k postupnému odštiepeniu dvojuhlíkových jednotiek ako acetyl-CoA. Acetyl-CoA následne vstupuje do Krebsovho cyklu, kde sa ďalej metabolizuje za účelom produkcie ATP [23, 24].

β -oxidácia pozostáva zo štyroch enzymatických krokov, pričom každý cyklus vedie k tvorbe acetyl-CoA a redukovaných kofaktorov NADH a FADH₂. Proces je katalyzovaný acyl-CoA dehydrogenázami, ktoré sú špecifické pre rôzne dĺžky mastných kyselín. V prvom kroku acyl-CoA dehydrogenáza oxiduje mastnú kyselinu za vzniku dvojnej väzby a tvorbe enoyl-CoA. V druhom kroku je tento enoyl-CoA hydratovaný enzýmom enoyl-CoA hydratázou, ktorý na dvojitú väzbu aduje vodu, čím vzniká 3-L-hydroxyacyl-CoA. Následne hydroxylová skupina na uhlíku C3 3-L-hydroxyacyl-SCoA je dehydrogenovaná na oxoskupinu, kde akceptor H⁺ je NAD⁺. V poslednom kroku sa pomocou thiolázy acylový zvyšok prenesie na sírny atóm HS- CoA, čím sa vytvorí acetyl-CoA a mastná kyselina sa skrúti o 2 uhlíky [23, 24].



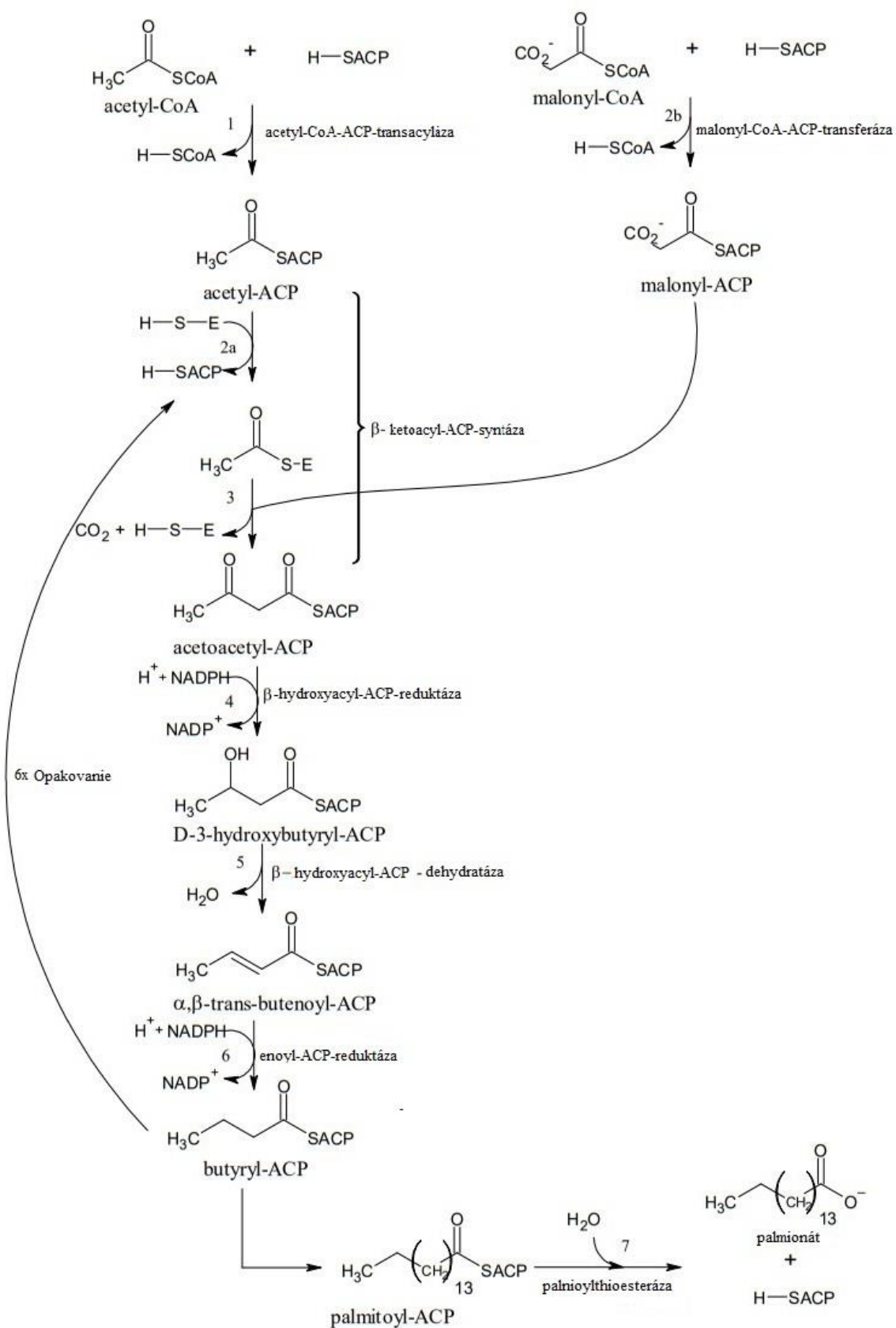
Obrázok 6: β -oxidácia mastných kyselín [16]

2.2.2.4 Biosyntéza mastných kyselín

Biosyntéza mastných kyselín (Obrázok 7) prebieha v cytosole. Východnou látkou je acetyl-CoA. Acetyl-CoA karboxyláza katalyzuje karboxyláciu acetyl-CoA na malonyl-CoA za využitia ATP. Pri biosyntéze nie sú acylové zvyšky viazané na voľný CoA, ale na proteíny nazývané aj ako proteínový prenášač acylu (ACP) [16, 23, 25].

Acetyl-CoA a malonyl-CoA sú substrátmi pre syntézu kyseliny palmitovej prostredníctvom série siedmich enzymatických reakcií, ktoré sú katalyzované enzymatickým komplexom známym ako syntáza mastných kyselín. Tento multienzýmový komplex pozostáva z 2 polypeptidových reťazcov prepojených nekovalentne. Vo vnútri diméru syntázy sa nachádzajú 2 katalytické domény, ktoré zabezpečujú celú sériu reakcií potrebných pre syntézu mastných kyselín [16, 25].

V procese biosyntézy sa z acetyl-CoA a malonyl-CoA vytvárajú medziprodukty, pričom postupne dochádza k predlžovaniu reťazca mastnej kyseliny o dve uhlíkové jednotky. Tieto medziprodukty sa viažu na proteín nosiču acylu a v ďalších cykloch dochádza k postupnému predlžovaniu reťazca. Keď sa reťazec mastnej kyseliny predĺži na požadovanú dĺžku, thioesterázová časť katalyzuje odštiepenie konečného produktu, ktorým je kyselina palmitová, lineárna nasýtená mastná kyselina so 16 uhlíkmi. Kyseliny s vyšším počtom uhlíkov vznikajú v endoplazmatickom retikulu. Nenasýtené mastné kyseliny vznikajú pôsobením desaturáz, ktoré zavádzajú dvojné väzby do reťazca mastnej kyseliny, čím vznikajú nenasýtené formy [16, 25].

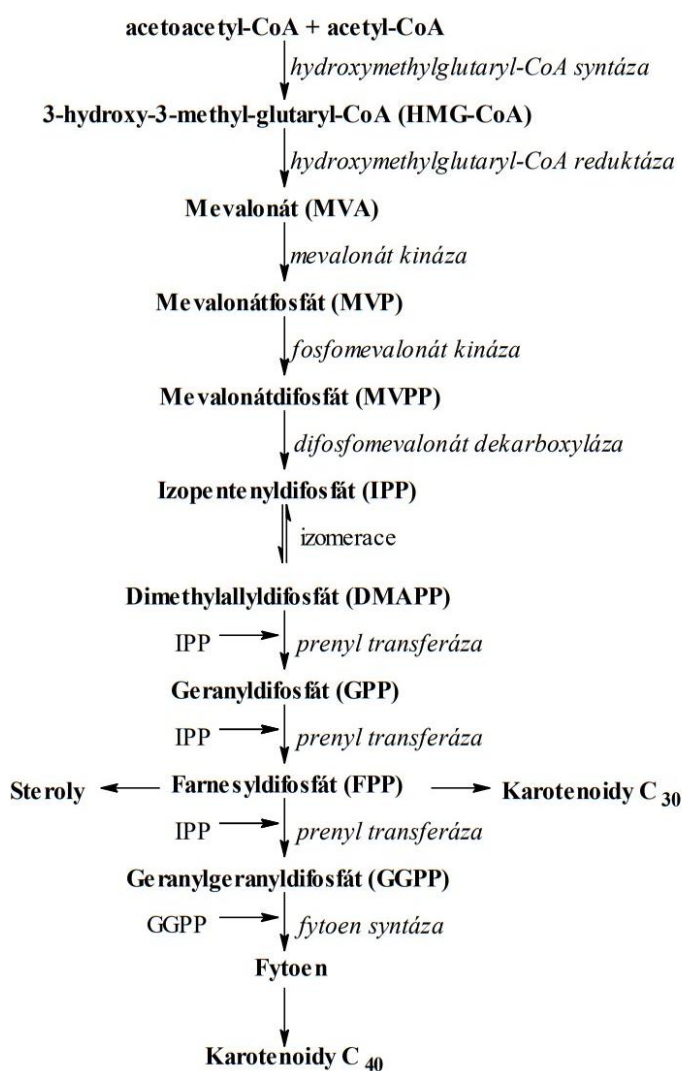


Obrázok 7: Syntéza mastných kyselín, kyseliny palmitovej [56]

2.2.3.1 Biosyntéza karotenoidov mevalonátovou dráhou

Biosyntéza karotenoidov (Obrázok 9) začína vytvorením isoprenoidnej jednoty. Východzu zlučeninou je acetyl-CoA vytvorený v mitochondriách. Z mitochondrií je cez citrát-malátového kyvadla do cytosolu. V cytosole sa acetyl-CoA účinkom HMG-CoA syntázy premení na 3-hydroxy-3-metyl glutaryl-CoA (HMG-CoA). Následne katalýzou HMG-CoA reduktázy vzniká mevalonát. Mevalonát kináza a v nasledujúcom kroku fosfomevalonát kináza fosforyluje mevalonát a vzniká difosfomevalonát [26, 23, 29].

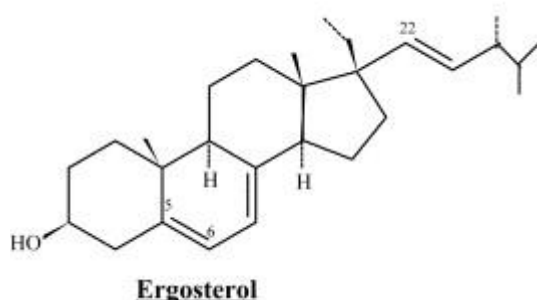
Premena mevalonátu na isopentenylidifosfát vyžaduje 3ATP na jednu isoprenoidnú jednotu. Tromi za sebou nasledujúcimi fosforiláciami vzniká 3-fosfo-5-pyrofosfomevalonát, ktorý sa následne dekarboxyluje a dehydratuje na izopentenylidifosfát (IPP), predstavujúci isoprenoidnú jednotku. Kondenzáciou izoprenoidných jednotiek vzniká izoprenoid. IPP sa izomerizuje na dimetylalldifosfát (DMAPP) pridaním 3 molekúl IPP do DMAPP, katalyzovaný prenyltransferázou na geranylgeranylidifosfát (GGPP), čo je prekursor monoterpenov. Kondenzáciou 2 molekúl GGPP vzniká fytoén (prvý C₄₀ karotén dráhy), ktorý sa následne desaturuje za vzniku lykopénu. Mnohé cyklické karotenoidy sú derivátmi lykopénu ako β- karotén, γ-karotén, torulen, torularhodin a astaxantín [16, 23, 29, 57].



Obrázok 9: Syntéza karotenoidov cez mevalonovú dráhu [57]

2.2.4 Ergosterol

Steroly sú základnými zložkami eukaryotických bunkových membrán, ktoré udržujú štruktúrnú integritu bunkových membrán, tekutosť a permeabilitu. Majú funkciu pri regulácii aktivity membránových enzýmov, tvorbe a funkcii lipidových raftov, transportu látok a bunkového cyklu. Najdôležitejším sterolom u zvierat je cholesterol. Rastlinné steroly sa nazývajú fytosteroly a najvýznamnejšie sú stigmasterol, sitosterol a kampesterol. Hlavným hubovým sterolom je ergosterol, (Obrázok 10), ktorý stimuluje rast a proliferáciu. Oproti cholesterolu má navyše dve dvojné väzby a metylovú skupinu. Ergosterol je identifikovaný ako imunoaktívny lipid, ktorý indukuje pyroptózu hostiteľských buniek, nekrotickú a zápalovú programovanú bunkovú smrť, taktiež ergosterol je nevyhnutný pre udržiavanie mitochondriálnej DNA u húb. Pri vystavení ultrafialovému žiareniu je ergosterol premieňaný na ergokalciferol a vitamín D₂ [31, 32, 33].



Obrázok 10: Štruktúrny vzorec ergosterolu [34]

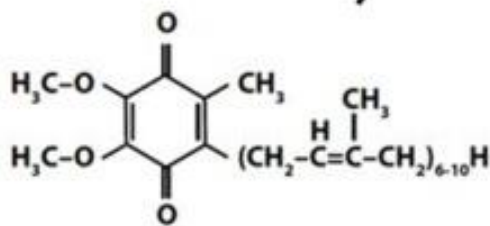
2.2.4.1 Biosyntéza ergosterolu

Biosyntéza ergosterolu prebieha v 3 hlavných krokoch v erytroplazmatickom retikulu. Proces začína syntézou mevalonátu, kde rýchlosť limitujúcim krokom je redukcia HMG-CoA reductázami. Druhým krokom je tvorba farnesylpyrofosfátu, kedy sa mevalonát premieňa na izoprenoidné jednoty, z ktorých sa syntetizuje farnesyldifosfát [31].

Spojením 2 molekúl farnesyldifosfu vzniká skvalén, ktorý sa za katalýzy skvalenepoxidázou a lanosterolsyntetázou mení na lanosterol. Sériou demetylačných, redukčných a desaturačných krokov sa premieňa cez medziprodukty, ako sú zymosterol, fekosterol a episterol až na výsledný produkt ergosterol, ktorý je prenesený do plazmatickej membrány. Biosyntéza ergosterolu závisí od kyslíka aj železa vo viacerých enzymatických krokoch [31].

2.2.5 Ubichinón

Ubichinón (Obrázok 11), taktiež nazývaný ako koenzým Q10 je antioxidant tvorený v živočíšnych bunkách. Molekula ubichinónu obsahuje chinónový kruh s polyizoprenoidným chvostom obsahujúcim 6-10 podjednotiek u rôznych druhov. V bunkách je kľúčovou zložkou mitochondriálneho elektróntransportného reťazca, vo svojej redukovanej forme je antioxidant v lipidických štruktúrach a chráni bunku pred oxidačným stresom a tvorí antioxidantnú ochranu proti lipoperoxidácii. Môže existovať v 3 rôznych oxidačných stavoch, plne oxidovanom stave (ubichinón), čiastočne redukovanom stave (ubisemichinón) a plne redukovanom stave (ubichinol) [35].



Obrázok 11: Štruktúrny vzorec ubichinónu [35]

2.2.5.1 Biosyntéza ubichinónu

Biosyntéza ubichinónu je iniciovaná v cytosole, kde sa premenou mevalonátu tvorí izoprénový koniec. Chinonový kruh vzniká z tyrosínu. Pripojenie izoprénového reťazca na chinónové jadro prebieha v mitochondriách a je katalizované polyprenyltransferázou obsahujúcu prenyltransferázovú doménu špecifickú pre biosyntézu ubichinónu.

Nemitochondriálny CoQ₁₀, ktorý funguje ako antioxidant rozpustný v lipidoch existuje vo svojej redukovanej forme ako ubichinol a je po oxidácii redukovaný buď selenoenzýmom tioredoxín reductázou 1 v cytosole, alebo NADPH-dependentným koenzýmom Q reductázou [35, 36].

2.2.6 β- glukány

β-glukány patria medzi rozpustnú i nerozpustnú vlákninu získavanú z bunkových stien rias, baktérií, húb, kvasiniek a rastlín. Jedná sa o polysacharidy na báze D-glukózy. Kvasinkové β- glukány patria medzi nerozpustnú vlákninu, ktorá môže slúžiť ako probiotikum. Štrukturálne sú lineárne hetero -β-D-glukány. Vykazujú významnú biologickú aktivitu, zatiaľ čo alfa- D- glukány ju nemajú. β-glukány vykazujú cytotoxické účinky na rakovinové bunky, sú využívané na zlepšenie účinnosti chemoterapeutík a posilňujú imunitný systém [36, 37, 38].

2.3 Odpadné substráty

2.3.1 Bielkovinové odpadné substráty

Proteínové odpadné substráty predstavujú významnú výzvu aj príležitosť v oblasti udržateľnosti a biohospodárstva. Obsahujú vysoké množstvo dusíka a cenné živiny, pričom ich recyklácia môže priniesť nové možnosti v potravinárskom, farmaceutickom a biotechnologickom priemysle. Hlavnými zdrojmi proteínového odpadu sú kuchynský odpad, priemyselný odpad a odpad z čistenia odpadových vôd. Medzi najvýznamnejšie priemyselné odvetvia produkujúce tento typ odpadu patria mliekarenský, mäsový, rybársky a poľnohospodársky sektor. Spracovanie proteínového odpadu zahŕňa hydrolyzačné a biokonverzné metódy, ktoré umožňujú jeho využitie v rôznych aplikáciách, vrátane bioplastov, biopalív, funkčných potravín a ako substrát pre kultiváciu mikroorganizmov [39].

2.3.1.1 Ľanové pokrútiny

Ľan je jednoročná rastlina z čeľade ľanovité (*Linaceae*), ktorá patrí medzi významné olejnaté a ekonomicky dôležité plodiny. V závislosti od účelu pestovania sa rozlišujú dve hlavné formy:

olejný ľan, pestovaný pre semená bohaté na nutričné a nutraceutické látky a textilný ľan, využívaný na získavanie vlákien na výrobu tkanín [40, 41].

Ľanové semená obsahujú vysoké množstvo oleja, približne 30 – 45 % hmotnosti semien, pričom najvýznamnejšou zložkou je α -linolénová kyselina, ktorá sa zaraďuje medzi omega-3 mastné kyseliny a tvorí až 50 % obsahu tuku semena [41].

Ľanový olej má antioxidantné vlastnosti, podporuje srdciový systém tým, že pomáha regulovať krvný tlak a znižuje hladinu cholesterolu. Má protizápalové účinky, podporuje trávenie a má pozitívne účinky na nervový systém. Pre jeho priaznivé účinky sa využíva v potravinárskom, kozmetickom aj farmaceutickom priemysle [41].

Ľanové pokrutiny sú vysoko výživný vedľajší produkt extrakcie oleja z ľanu bohatý na bielkoviny, ktorý činí až 35 % polynenasýtené mastných kyselín zvyškového oleja a vlákniny. Hlavným využitím ľanových pokrutín je krmivo pre zvieratá, ako sú prasatá a kone. Jedným z hlavných problémov pri používaní ľanových pokrutín ako krmiva pre zvieratá je jeho vysoký obsah kyanogénnych glykosidov, ktoré sú toxické, keď sa v tráviacom systéme metabolizujú na kyanovodík. Táto toxicita môže viesť k vážnym zdravotným problémom, ako je neurologické poškodenie, zväčšenie štítnej žľazy a narušený rast zvierat, čo obmedzuje použitie v krmivách [42].

2.3.1.2 Srvátka

Produkcia mliečnych výrobkov, vrátane širokej škály syrov, má značný ekonomický význam vzhľadom na rastúci globálny dopyt po týchto produktoch. Spracovanie mlieka z rôznych zvierat ako sú kravy, byvoly, ovce, kozy na syr vedie k vzniku miliárd litrov srvátky ročne [43].

Srvátka je tekutý vedľajší produkt žltozelenej farby pri výrobe syrov a tvarohov z mlieka. Dvomi základnými typmi srvátky sú sladká a kyslá srvátka. Rozdiel závisí od technologického procesu výroby. Sladká srvátka má pH približne 5,6 a pochádza z výroby väčšiny druhov tvrdých syrov alebo určitých kazeínových produktov. Táto srvátka vzniká pridaním syridla do mlieka. Syridlo je zmes enzýmov obsahujúcich proteázu chymozínu do mlieka. Tento prídavok syridla spôsobí narušenie kazeínového proteínu v micelách a uvoľnenie organických kyselín, minerálov a bielkovín do sladkej srvátky. Toto narušenie vedie k niekoľkonásobnému navýšeniu voľných aminokyselín v srvátke. Koagulácia kazeínu vyvolaná syridlom nastáva pri pH 6,5 [43, 44].

Kyslá srvátka vzniká buď mikrobiálnou aktivitou laktobacilov, alebo pridaním organických, alebo minerálnych kyselín, ako je kyselina mliečková alebo kyselina chlorovodíková. Koagulácia prebieha pri pH približne [43, 44].

Zloženie srvátky je bohaté na rozpustné bielkoviny, laktózu, vitamíny, minerály a tuky. Približne 20 % celkového obsahu bielkovín v mlieku zostáva v srvátke. Hlavnou zložkou srvátky je voda - 93 %. Sušina obsahuje približne 72 % laktózy, srvátkové bielkoviny 8-10 % a minerály 12-15 %, z čoho najväčšie zastúpenie má NaCl, KCl a vápenaté soli. Obsahuje aj malé množstvo kyseliny mliečnej a citrónovej, močoviny a vitamíny skupiny B. Zloženie srvátky je však veľmi premenlivé a závisí na veľa parametroch technologického procesu a pôvodu mlieka [43].

2.3.1.2.1 Srvátkový proteín

Mliečne bielkoviny sú primárne zložené z 2 hlavných skupín proteínov. Kazeín, ktorý je nerozpustný a tvorí 80 hm% celkového proteínu mlieka a srvátkového proteínu, ktorý je rozpustný [45].

Srvátkové proteíny sú globulárne molekuly s vysokým obsahom α -helix motívov, v ktorých sú kyslé/zásadité a hydrofóbne/hydrofilné aminokyseliny distribuované pomerne vyváženým spôsobom pozdĺž ich polypeptidových reťazcov. Najväčšie zastúpenie z bielkovín má β -laktoglobulín a α -laktalbumín. Ďalšími zastúpenými bielkovinami sú hovädzí sérový albumín a α -laktoferín. Skutočná koncentrácia srvátkových bielkovín závisí od druhu srvátky, zdroja mlieka, zloženia krmiva atď. [43, 45].

Srvátkový proteín vykazuje funkčné vlastnosti, ako sú gelovatenie, penenie, emulgácia a tvorba filmu. Môže zachytávať hydrofóbne a slabo polárne molekuly, ako sú vitamíny rozpustné v tukoch, mastné kyseliny, peptidy a kation [45].

2.3.1.3 Pivovarské droždie

Kvasinky, prevažne druh *Saccharomyces cerevisiae*, zohrávajú kľúčovú úlohu pri výrobe piva, kde premieňajú sacharidy zo sladu na alkohol. Po opakovanom použití však postupne strácajú svoju životaschopnosť a musia byť odstránené. Predstavujú približne 15 % celkového pivovarského odpadu [46, 47].

Tieto jednobunkové mikroorganizmy sú bohatým zdrojom živín – obsahujú približne 49 % bielkovín, 40 % sacharidov, 7 % minerálov a vitamínov a 4 % lipidov. Pivovarské droždie navyše obsahuje bioaktívne látky, ako sú β -glukány, známe pre svoje pozitívne účinky na imunitný systém [46, 47].

Jeho využitie ako proteínového doplnku v ľudskej strave je však obmedzené vysokým obsahom nukleových kyselín, ktorých nadmerný príjem môže viesť k zdravotným problémom, napríklad zvýšenej hladine kyseliny močovej. Preto sa pivovarské kvasinky najčastejšie využívajú ako lacný zdroj bielkovín v krmivách pre hospodárske zvieratá [46, 47].

2.3.1.4 Kuracie perie

Kuracie perie predstavuje významný odpadový produkt hydinárskeho priemyslu, pričom tvorí približne 5 – 7 % celkovej hmotnosti spracovanej hydiny [48].

Perie je bohaté na bielkoviny, ktoré tvoria v priemere 87 % jeho zloženia. Tieto bielkoviny sú však viazané v nestráviteľnej keratínovej štruktúre, čo sťažuje ich využitie. Keratín je nerozpustný a odolný voči väčšine proteáz, pretože jeho komplexná štruktúra obsahuje α -helixy a β -listy, ktoré sú spevnené disulfidovými väzbami [48, 49].

Hoci perie obsahuje vysoké množstvo bielkovín, má nízky obsah esenciálnych aminokyselín, ako sú lyzín, metionín a histidín. Na druhej strane, je bohaté na síru, a to vďaka vysokému obsahu cysteínu, elementárnej síry a selénu [49].

2.4 Analytické metódy

Pre charakterizáciu vhodnosti potravinárskych odpadov ako alternatívnych kultivačných substrátov je nevyhnutné poznať ich chemické zloženie. Rovnako dôležitá je metabolická charakterizácia biomasy získanej kultiváciou. Preto je potrebné zvoliť vhodné analytické metódy, ktoré umožňujú presné stanovenie vybraných zložiek substrátov, ako aj finálnej biomasy. Tieto metódy poskytujú informácie, nielen o zložení odpadného materiálu, ale aj o možnostiach jeho použitia na kultivácie, zložení finálnej biomasy a ich schopnosti akumulovať bioaktívne látky [63].

2.4.1 Stanovenie dusíka Kjeldahlovou metódou

Kjeldahlová metóda sa vyznačuje vysokou presnosťou, spoľahlivou reprodukovateľnosťou a širokou univerzálnosťou, vďaka čomu je efektívnou metódou na odhad bielkovín v potravinách. Jej princíp spočíva v premene voľného dusíka na amónne ióny. Celý proces prebieha v 3 základných fázach [50, 51].

Prvým krokom je premena organických materiálov vo vzorke na síran amónny. Pri tejto reakcii sa dusíkaté látky rozložia koncentrovanou kyselinou sírovou pri kontinuálnom zahrievaní na približne 420 °C. Uvoľňuje sa SO_2 , H_2O a CO_2 . Na urýchlenie mineralizácie sa používajú katalyzátory obsahujúce CuSO_4 a K_2SO_4 . Katalyzátor urýchľuje chemickú reakciu a oxidáciu organických zlúčenín a zvyšuje teplotu varu roztoku H_2SO_4 , čo umožňuje rýchlejšiu mineralizáciu pri vyšších teplotách. V druhom kroku sa síran amónny rozkladá vodou a hydroxidom sodným, čo spôsobí premenu síranových iónov na amoniak. NH_3 je destilovaná vodnou parou do kyseliny sírovej. V poslednom kroku sa amoniak stanovuje titračne [50, 51].

2.4.2 Plynová chromatografia

Plynová chromatografia je analytická metóda, ktorá umožňuje analyzovať prchavé látky. Používa sa najmä na stanovenie organických alebo anorganických látok so silnou tepelnou stabilitou a relatívne ľahkým splyňovaním. Používa sa ako na kvalitatívnu tak aj na kvantitatívnu analýzu. Prístroj obsahuje kapiláru so stacionárnou fázou z oxidu kremičitého. Vnútro kapiláry prechádza nosný plyn, zvyčajne dusík, ale používa sa i hélium alebo vodík. Separácia je závislá na interakciách vzorky medzi stacionárnou fázou a nosným plynom pri fixnej teplote alebo podľa teplotného programu. Medzi najpoužívanejšie detektory patrí FID (plameňovo-ionizačný detektor) a MS (hmotnostný spektrometer) [53, 54].

2.4.3 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) oddeľuje analyty podľa ich distribúcie medzi mobilnú kvapalnú fázu a stacionárnu pevnú fázu. Metóda je široko používaná na separáciu zmesí zlúčenín na identifikáciu, kvantifikáciu a čistenie jednotlivých zložiek zmesi. Citlivosť a presnosť výsledkov HPLC závisí od stacionárnej fázy, mobilnej fázy a detektora. Medzi využívané detektory patria DAD (detektor diódového poľa), MS (hmotnostný spektrometer) [53, 55].

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto práce je využitie rôznych typov odpadných bielkovinových substrátov pre kultiváciu vybraných druhov kvasiniek.

V rámci diplomovej práce budú nasledujúce čiastočné úlohy:

1. Literárne rešerše zamerané na prehľad biotechnologicky využiteľných proteínových odpadových substrátov z potravinárstva a poľnohospodárstva a na kvasinkové systémy, ktoré ich dokážu valorizovať.
2. Selekcia karoténogénnych kmeňov pre kultivačné experimenty, návrhy zloženia médiá, možnosti aplikácie proteínov ako zdroja nutričov.
3. Analýza rastu a metabolickej aktivity vybraných kvasiniek v prítomnosti proteínových substrátov rôzneho typu v podmienkach nutričného stresu.
4. Vyhodnotenie výsledkov – možnosti produkcie obohatenej kvasinkovej biomasy s vyšším obsahom proteínov.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Chemikálie

Hexán p.a., Lach-ner (ČR)

Izopropylalkohol p.a. Roth (SRN)

Kyselina sírová 96%, Lach-ner, s.r.o. (ČR)

Hydroxid sodný, Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Kvasničný autolyzát, Himedia (Indie)

Kazeínový peptón , Roth (Nemecko)

Glycerol bezvodý p.a., Lach-ner, s.r.o.(ČR)

Dihydrogénfosforečnan draselný p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)

Dusičnan sodný p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)

Síran horečnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, s.r.o l (ČR)

Etanol p.a., VWR International S.A.S.

Hexán pro HPLC, Sigma- Aldrich (SRN)

Metanol pro HPLC, Sigma- Aldrich (SRN)

Chloroform p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)

Etyl acetát pre HPLC, Sigma- Aldrich (SRN)

Acetonitril pre HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)

Tris HCl, p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)

Kyselina heptadekánová GC kvality, Sigma- Aldrich (SRN)

Vodík 5.5 SIAD v tlakovej bombe s redukčným ventilom

Vzduch 5.0 SIAD v tlakovej bombe s redukčným ventilom

Dusík 5.0 SIAD v tlakovej bombe s redukčným ventilom

Kyselina šťaveľová Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Sada kitu K-YBGL (IRL)

Kyselina octová, p.a., Lachema (ČR)

Chlorid sodný, p.a., Lach-ner (ČR)

Trypsin z bravčového pankreasu, Sigma- Aldrich (SRN)

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

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, p.a., Lach-ner (ČR)
β-karotén, analytický štandard, Sigma-Aldrich (SRN)
Ergosterol, analytický štandard, Sigma-Aldrich (SRN)
Lykopén, analytický štandard, Sigma-Aldrich (SRN)
Torularhodín, analytický štandard, Sigma-Aldrich (SRN)
Ubichinón, analytický štandard, Sigma-Aldrich (SRN)
Supelco 37 Component FAME Mix, analytický štandard, sigma-Aldrich (SRN)

4.1.1 Odpadné substráty

Kuracie perie (ČR)
Ľanové výlisky (ČR)
Srvátkový proteín (ČR)
Srvátka (SR)
Pivovarské droždie (ČR)

4.2 Pomôcky a prístroje

Predvážky Scout Pro, OHAUS
Aparatúra podľa Soxhleda
Autokláv Systec
Vákuová odparovačka HB4 basic, HBA Labortechnik
Centrifúga BioTech, (ČR)
Analyzátor prvkového zloženia EuroVector EA 3000 (EuroVector, IT)
Vapodest 500, C. (Gerhardt GmbH & Co. KG, SRN) Automatický titrátor Gerhardt (DE)
Kjeldatherm Block-Digestion Unit (Gerhardt GmbH & Co. KG, SRN)
Lyofilizátor Labconco FreeZone 4.5 Freeze Dryer (USA)
Analytické váhy Boeco (SRN)
Automatické pipety, Biohit (DE) a Discovery
Centrifúga BioTech, (ČR)
Termoblok VWR, (ČR)
Striekačkové filtre 0.4 μm PTFE Chromservis, (ČR)
Vortex/homogenizátor disruptor Genie, Scientific Industries, Inc. (USA)

HPLC/PDA sústava:

HPLC sústava (Thermo Fisher Scientific, USA)

Dionex Ultimate Series 3000 Pump

Dionex Ultimate Series 3000 Autosampler

Kolona Kinetex EVO C18 150 mm x 4,6 mm x 5,0 μm

Thermo Fisher Vanquish detector

Vyhodnocovací systém Chromeleon

TRACE GC/FID (Thermo Fisher Scientific, USA)

Kapilárna kolóna Lion-GC FAME 30 m x 0,25 mm x 0,2 μm

ELISA Synergy HTX, BioTech

4.3 Druhy použitých mikroorganizmov

Druhy kvasiniek boli získané zo zbierky kultúr kvasiniek, ktorá je súčasťou SAV v Bratislave.

1. *Rhodotorula kratochvilovae* (CCY 20-2-26)
2. *Rhodotorula toruloides* (CCY 62-2-4)
3. *Metschnikowia pulcherrima clade* (CCY 029-002-149)

4.4 Príprava odpadných substrátov

4.4.1 Srvátka

Surová srvátka bola vysterilizovaná v sterilizačnej fľaši v tlakovom hrnci pri nastavení variča na 140 °C počas 40 minút. Vyzrážané bielkoviny boli odfiltrované pomocou Büchnerovej nálevky. Filtrát bol opäť vysterilizovaný. Odfiltrovaná bielkovina bolo vysušená v sušiarňi. Po vychladnutí bola skladovaná v mrazničke.

4.4.2 Ľanové výlisky

Ľanové otruby obsahujú asi 30 % zvyškového oleja. Tento olej musí byť vyextrahovaný pred samotnou hydrolýzou. Na vyextrahovanie bola použitá Soxhledová metóda. Ľanové otruby boli navážené do patrón a zabezpečené vatou. Takto pripravené patróny boli vložené do soxhletovho extraktoru. Do spodnej časti bola pripevnená varná banka s dostatočným množstvom rozpúšťadla so zložením izopropanol a hexán v pomere 1:1. Po zapnutí topného hniezda a chladiča prebiehala extrakcia približne 2 a pol hodiny. Extrakcia bola ukončená po vizuálnej kontrole, kedy stúpajúce rozpúšťadlo v soxhledovom extraktore bolo takmer bezfarebné. Po dokončení cyklu bola aparatúra oddelená od topného miesta. Po vychladnutí boli patróny vložené do sušiarne do úplného vysušenia. Po vysušení bol obsah zvážený. Strata hmotnosti ľanových výliskov činila približne 26 %.

Vyextrahovaný olej v rozpúšťadle bol vložený na vákuovú odparku, bolo rozpúšťadlo regenerované. Olej bol preliaty do zbernej nádoby a skladovaný v chladničke. Zloženie

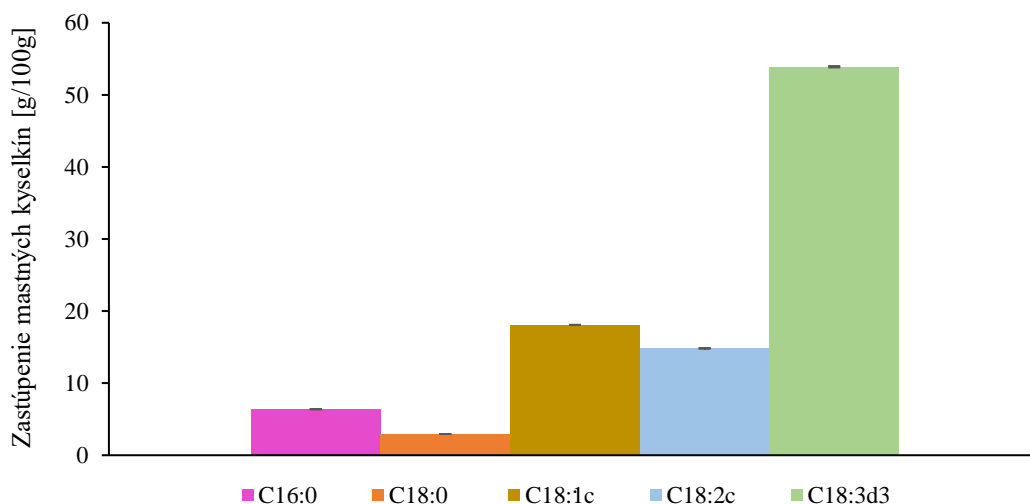
mastných kyselín bolo stanovené pomocou plynovej chromatografie, kedy boli vzorky pripravené postupom v (4.5.4)

4.4.2.1 Výsledok analýzy mastných kyselín ľanového oleja

Pomocou plynovej chromatografie s plameňovo ionizačným detektorom bolo stanovené zloženie mastných kyselín, ktoré je vyobrazené na grafe (Obrázok 12). V ľanovom oleji sa nachádza vysoké zastúpenie polynenasýtených mastných kyselín, primárne α -linolenová kyselina, ktorá patrí medzi omega-3-mastné kyseliny.

Čistota nášho vyextrahovaného oleja bola stanovená na 47,02 % triacylglycerolov vo vzorke. Pre množstvo potrebné pre kultivácie bolo usúdené, že zvyškové rozpúšťadlá by nemali robiť problém pri kultiváciách kvasiniek. Analýza prebiehal v duplikátoch z ktorých bola vypočítaná odchýlka.

Z týchto výsledkov bolo vypočítané potrebné množstvo ľanového oleja na nahradenie glycerínu v produkčných kultivačných médiách.



Obrázok 12 Graf zloženia mastných kyselín v ľanovom oleji

4.4.3 Screeningové hydolyzáty

Do sterilizačných nádob boli pripravené tri druhy hydolyzátov pre každý odpadný substrát (Tabuľka 1). Kyslý hydrolyzát bol vytrovený pomocou 1 % kyseliny sírovej. Pri kyslej hydrolýze bola koncentrácia odpadného substrátu 10 g/100 ml. Bázické hydrolyzáty boli pripravené pomocou 1 M hydroxidu sodného. Koncentrácia odpadného substrátu činila 10 g/100 ml a 20 g/100 ml.

Tabuľka 1: Hydrolyzované odpadné substráty

Odpadné substráty
Odtučnené ľanové výlisky
Komerčný srvátkový proteín
Pivovarské droždie
Kuracie perie

Takto prípravné hydrolyzáty boli uzavreté a hydrolyzované v autokláve pri 121 °C po dobu 15 minút. Po vychladnutí boli hydrolyzáty stočené v centrifúge pri 4500 ot/m po dobu 7 minút. Hydrolyzáty boli skladované v chladničke.

4.4.4 Stanovenie dusíku

Stanovenie dusíku a následné prepočítanie na hrubú bielkovinu bolo prevedené podľa Kjeldahlovej metódy (2.4.1). Každý hydrolyzát bol meraný jedenkrát.

Do sklenených trubíc určených na Kjeldahlovú metódu bolo napipetované 0,5 ml hydrolyzátu, 10 ml koncentrovanej kyseliny sírovej a 2 g Weiningerového katalyzátoru. Takto pripravené vzorky boli vložené na mineralizátor na režim múka. Mineralizácia prebiehala približne 2 a pol hodiny. Po vychladnutí boli trubice vybrané z mineralizátoru.

Do titračných baniek na 250 ml bolo napipetované 25 ml 0,05M kyseliny sírovej o presnej koncentrácii. Do prístroja na parnú destiláciu Kjeldahlovej aparatury bola vložená sklenená trubica a titračná banka. Bol spustený program múka. Po destilácii je obsah banky titrovaný 0,1 M roztokom hydroxidu sodného.

4.4.4.1 Výsledky Kjeldahlovej metódy

Z výsledkov stanovenia celkového dusíka podľa Kjeldahla (Tabuľka 2) bolo zistené, že najnižšiu účinnosť pre proteínové odpadné substrát má kyslá hydrolyza. Účinnosť bázičkej hydrolyzy bola lepšia u nižšieho pomeru odpadného substrátu. Taktiež, pri niektorých vzorkách ako ľanové výlisky bol vyšší pomer odpadného substrátu spojený s nárastom viskozity do takej miery, že nebolo možné s hydrolyzátom presne narábať pre príľnavosť na steny pipetovacích špičiek.

Pre ďalší postup v práci boli zvolené hydrolyzáty bázičné s pomerom 1:10. Taktiež ľanový hydrolyzát bol z praktických dôvodov zriedený 1:1 s vodou pre zníženie viskozity.

Tabuľka 2: Výsledky Kjeldahlovej metódy stanovenia celkového dusíku a hrubej bielkoviny

Hydrolyzát	Pomer odpadu	N [g/l]	Hrubá bielkovina [g/l]
Komerčný srvátkový hydrolyzát	1:10 NaOH	17,33	108,32
	2:10 NaOH	25,95	162,19
	1:10 H ₂ SO ₄	13,16	82,25
Srvátkový filtrát		13,30	83,12
Kuracie perie	1:10 NaOH	19,00	118,74
Pivovarské kvasnice	1:10 NaOH	13,02	82,25
	Autolýza+1:10 NaOH	13,16	83,12
Ľanové hydrolyzáty	1:10 NaOH	10,38	64,87
	2:10 NaOH (Hydrolyzát riedený 1:5 s vodou)	12,05	75,30
	1:10 H ₂ SO ₄	11,21	70,09

4.4.5 Stanovenie C:N pomeru pomocou prvkovej analýzy

Pre vybrané hydrolyzáty a srvátkový filtrát bol stanovený C:N pomer pomocou prvkovej analýzy na prístroji EuroVector EA 3000 (EuroVector, Italy).

Do centrifugálnej skúmavky bolo napipetované 5 ml pripravených hydrolyzáto a navážený 1 g pôvodných nespracovaných odpadných substrátov. Takto pripravené skúmavky boli zamrazené a zlyofilizované na lyofilizátore. Zlyofilizované hydrolyzáty boli zhomogenizované. Stanovenie bolo prevedené metódou z článku [62].

Z každej vzorky bolo navážené 50 mg po 3 opakovaníach. Ako štandard bol použitý sulfanilamid. Prvková analýza prebiehala pri 980 °C pri konštantnom prúde hélia. Separácia plynov N₂, CO₂ prebiehala v chromatografickej kolóne s teplotne vodivostným detektorom.

4.4.5.1 Výsledky prvkovej analýzy

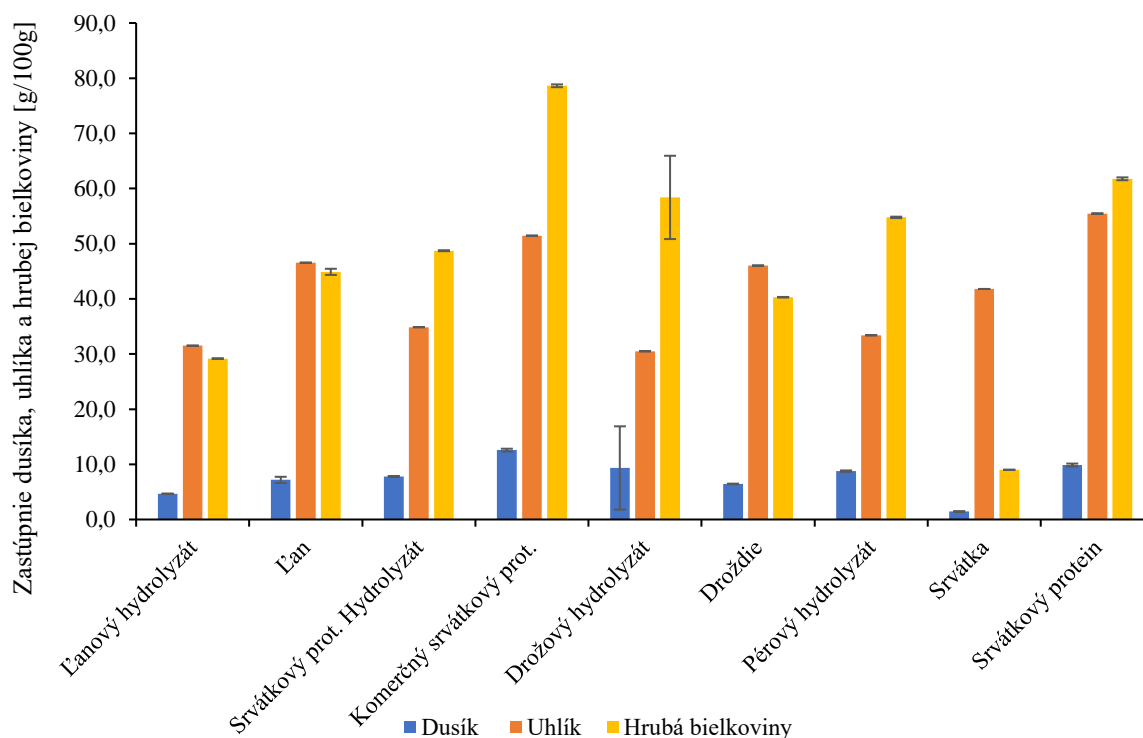
Tabuľka 3 Percentuálne zloženie Dusíku a uhlíku hydrolyzáto a odpadov

Vzorka	C [%]	N [%]
Ľanový hydrolyzát	31,505 ± 0,002	4,666±0,036
Ľan	46,547±0,001	7,183±0,557
Srv. proteín hydrolyzát	34,859±0,001	7,796±0,087
Komerčný srvátkový proteín	51,443±0,010	12,579±0,253
Drožd'ový hydrolyzát	30,495±0,006	16,008±7,06
Pivovarské droždie	46,019±0,007	6,446±0,053
Pérový hydrolyzát	33,394±0,005	8,762±0,127
Srvátka	41,787±0,007	1,441±0,027
Srvátkový proteín	55,452±0,006	9,881±0,259

Pomocou prvkovej analýzy bolo stanovené percentuálne zastúpenie dusíku a uhlíku vo vybraných proteínových odpadoch a hydrolyzátoch s výsledkami v (Tabuľka 3). Cieľom týchto meraní bolo zistiť, že presné množstvo týchto prvkov pre výpočet C:N pomeru v produkčných médiách pre kultivácie. Bolo zistené že priemerná účinnosť bávickej hydrolyzy 1 M NaOH bola 62 % oproti pôvodným odpadným substrátom. Obsah hrubej bielkoviny pre hydrolyzáty na grafe (Obrázok:13) sa pohyboval od 29 g na 100 g sušiny pri ľanovom hydrolyzáte po 78,6 29 g na 100 g sušiny hydrolyzáto komerčného srvátkového proteínu. Srvátkový proteín získaný zo skúmanej srvátky obsahoval 61,7 g na 100 g, čo je o 21,5 % nižšia hodnota oproti komerčnému srvátkovému proteínu.

Najvyšší obsah uhlíka bol stanovený v srvátkovom proteíne, kde dosahoval hodnotu 55, 5 g/100 g sušiny. Tento zvýšený obsah uhlíka môže byť zapríčinený nedostatočnou purifikáciou proteínového koncentráto, kde mohol zostať reziduálny tuk zo srvátky. Najnižšie

hodnoty uhlíka boli stanovené v ľanovom hydrolyzáte, kedy sa polysacharidové štruktúry nedokázali hydrolyzovať pri použití daného typu hydrolýzy.



Obrázok:13 Graf výsledkov prvkovej analýzy pre dusík a uhlík a hodnota hrubej bielkoviny hydrolyzáatov a pôvodných odpadných substrátov.

4.4.6 Inokulácia

Pre prípravu inokul bola použitá dvojitá inokulácia. Podľa (Tabuľka 4) bolo prichystané YPD médium pre inokulačné médiá I a II. Objem inokul I činil 60 ml, ktorý bol pripravený do 250 ml Ferlenmeyerovej banky. Objem inokula II činil 300 ml. Takto pripravené médiá boli uzavreté zátkou a prikryté alobalom. Následne boli vysterilizované po dobu 40 minút pri 140 °C v tlakovom hrnci. Po vychladnutí bolo inokulum II uskladnené v chladničke. Inokulum I bolo vložené to *flowboxu* a vysvietené UV svetlom po dobu 20 minút. Očkovanie z Petriho misky bolo vykonané za sterilných podmienok. Na každých 10 ml YPD médiá pripadla 1 kľučka kultúry z Petriho misky. Inokulačné médium I podrobené intenzívnemu trepaniu na recipročnej trepačke pri 120 rpm. Po 24 hodinách bolo inokulum I sterilne preočkované do YPD médiá inokula II, totožným postupom a očkovacím pomerom 1:5. Po 24 hodinách bolo inokulum II prichystané na očkovanie produkčných médií.

Tabuľka 4 Zloženie inokulačného médiá

Zložka	Koncentrácia [g/l]
Pepton	20
Glycerol	20
Kvasničný autolyzáat	10

4.4.6.1 Kontrolné médiá

Boli pripravené 3 glycerolové kontrolné médiá a 3 olejové kontrolné médiá s pomerom C:N 13, ktoré sa líšia koncentráciou mikroprvkov. Množstvo oleja bolo prepočítané z výsledkov plynovej chromatografie. Všetky vzorky boli robené v duplikátoch.

Kontrolné médiá boli pripravené podľa (Tabuľka 6) a (Tabuľka 7) do 250 ml Erlenových baniek. Takto pripravené médiá boli uzatvorené zátkou a zaobalované alobalom. Sterilizácia prebehla v tlakovom hrnci počas 40 minút na 140 °C. Po vychladení boli sterilne zaočkované v očkovacom boxe 10 ml inokula II a pripipetované mikroelementy 50 µl, 100 µl alebo 500 µl. Zloženie roztoku mikroelementov sa nachádza v (Tabuľka 5). Banky boli podrobené intenzívnemu trepaniu na recipročnej trepačke pri 120 rpm po dobu 96 hodín.

Tabuľka 5 Zloženie roztoku mikroelementov

Zložka	Koncentrácia [g/l]
H ₃ BO ₃	1,25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,00
MnCl ₂ ·4H 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 ·5H ₂ O	0,10

Tabuľka 6: Zloženie glycerolových kontrolných médií

Glycerolová kontrola	
Zložka	Koncentrácia [g/l]
Glycerol	24,05
KH ₂ PO ₄	4,00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,70
NaNO ₃	5,12

Tabuľka 7: Zloženie olejových kontrolných médií

Olejová kontrola	
Zložka	Koncentrácia [g/l]
Ľanový olej	25,70
KH ₂ PO ₄	4,00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,70
NaNO ₃	5,12

4.4.7 Produkčné médiá

Produkčné médiá boli prichystané z výsledkov prvkovej analýzy a výsledkov plynovej chromatografie ľanového oleja. Všetky vzorky boli robené v duplikátoch.

Podľa (Tabuľka 8) boli pripravené médiá do 250 ml Erlenmeyerových baniek, boli zazátkované a obalené alobalom. Následne boli sterilizované 40 minút pri 120 °C a po vychladnutí zaočkované 10 ml inokula II a bolo pridané 50 µl mikroelementov. Po zaočkovaní boli vložené na trepačky po dobu 96 hodín.

Tabuľka 8: Zloženie produkčných glycerolových a olejových proteínových médií

Médium	Hydrolyzát [ml/l]	Filtrát [ml/l]	Glycerol [g/l]	Olej [g/l]	KH ₂ PO ₄ [g/l]	MgSO ₄ ·7H ₂ O [g/l]
Ľan-Glycerol	315,20	0	9,49	0	4,00	0,70
Srv. proteín-Glycerol	79,57	0	14,41	0		
Perie-Glycerol	70,70	0	15,83	0		
Droždie-Glycerol	138,77	0	8,15	0		
Srvátka	24,2	2,87	0	0		
Ľan-Olej	315,20	0	0	10,13		
Srv.proteín-Olej	79,57	0	0	15,40		
Perie-Olej	70,70	0	0	16,91		
Droždie-Olej	138,77	0	0	7,62		

4.5 Spracovanie a analýza biomasy

4.5.1 Stáčanie biomasy a gravimetrické stanovenie biomasy

Biomasa bola preliata do 50 ml centrifugálnych skúmaviek a centrifugovaná po dobu 6 minút pri 3000 ot/minútu. Supernatant bol zliaty. Biomasa bola dvakrát premytá pomocou destilovanej vody, scentrifovaná a prevedená do 2 ml Eppendorfových skúmaviek. Následne bola zamrzená pri teplote -80 °C a zlyofilizovaná na lyofilizátore.

Na gravimetrické stanovenie bol z produkčného médiá odobratý 1 ml do Eppendorfových skúmaviek v duplikátoch. Supernatant bol stočený pri 13000 ot/minútu po dobu 1 minútu a bol dvakrát premytý pomocou destilovanej vody. Po poslednom stočení boli vzorky zmrazené v -80 °C a zlyofilizované na lyofilizátore. Po zlyofilizovaní boli vzorky zvážené na analytických váhach.

4.5.2 Stanovenie obsahu dusíku v biomase Kjeldahlovou metódou

Do sklenených trubíc na mineralizáciu bolo navážených 200 mg zlyofilizovanej biomasy v duplicitnom meraní. Následný postup je totožný s postupom (4.4.4)

4.5.3 Analýza vzoriek na vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografii

Analýza karoténoidov, ergosteroli a ubichinónu prebiehala na prístroji vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s detektorom diódového poľa (2.4.3). Vzorky boli vyhodnotené na základe predmetných štandardov a kalibračných kriviek. Chybová úsečka bola stanovená z meraní nakultivovaných duplikátov biomasy.

Do závitových 2 ml plastových skúmaviek bolo navážené 15-20 mg zlyofilizovanej biomasy. Biomasa bola hydratovaná po dobu 30 minút pridaním 1 ml H₂O. Následne bola biomasa centrifugovaná po dobu 1 minúty na 14000 ot/minútu a supernatant bol zliaty. K hydratovanej biomase bol pridaný 1 ml metanolu a približne 0,5 ml sklenených guľôčok. Skúmavky boli vložené na vortex po dobu 15 minút pri 2850rpm. Následne bol obsah skúmaviek kvantitatívne prevedený do 15 ml centrifugálnych skúmaviek spolu s 2 ml chloroformu p.a.. Centrifugálne skúmavky boli vložené na multipozičný vortex a po dobu 10 minút sa trepli pri 1000 rpm. Do skúmaviek bol pridaný 1 ml H₂O a boli ručne premiešané. Vzorky boli centrifugované po dobu 1 minúty na 2700 ot/minútu. Do sklenej skúmavky bola odpipetovaná dolná chloroformová fáza a boli umiestnené na termoblok nastavený na 45 °C. Do skúmaviek boli zavedené zároveň ihly na prívod N₂. Po kompletnom odparení chloroformu bol k vzorkám napipetovaný 1 ml zmesi etylacetát: acetonitril v pomere 2:1. Vzorky boli prefiltrované cez PTFE filter do sklenených závitových 2 ml vialiek.

4.5.3.1 Parametre analýzy vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie

Pre analýzu HPLC/DAD bol použitý prístroj Dionex UltiMate 3000 od firmy Thermo Fisher Scientific. Kolóna bola použitá Kinetex C18 EVO 150 mm x 4,6 mm x 5 µm s gradientovou elúciou. Prietok mobilnej fázy činil 1,2 ml/minútu pri teplote 25 °C so zložením mobilnej fázy v (Tabuľka 9). Detekcia bola prevedená pomocou detektoru diódového poľa (DAD) so systémom fotodiód. Program na vyhodnotenie výsledkov bol Chromeleon 7.2 a MS Excel.

Tabuľka 9: Zloženie mobilných fázy pre prístroj HPLC/DAD

Mobilná fáza	Látka	Objem [%]
A	Acetonitril	84
	Tris HCl 100mM	14
	Metanol	2
B	Etylacetát	60
	Metanol	40

4.5.4 Analýza mastných kyselín pomocou plynovej chromatografie

Analýza mastných kyselín prebiehala pomocou prístroja plynovej chromatografie s plameňovoionizačným detektorom (2.4.2). Vyhodnocovanie prebiehalo na základe predmetných štandardov a kalibračných kriviek. Chybová úsečka bola stanovená z meraní nakultivovaných duplikátov biomasy.

Do krimpovacích vialiek bolo navážených 12-18 mg zlyofilizovanej biomasy. K biomase bolo napipetovaných 1,8 ml transesterifikačnej zmesi s obsahom vnútorného štandardu C₁₇ (kyseliny heptadekánovej) o koncentracii 0,5 mg/ml. Vialky boli uzavreté krimpovacím viečkom a boli umiestnené na 85 °C vyhriaty termoblok po dobu 2 hodín. Po vychladnutí vialiek boli odkrimpované a ich obsah bol kvantitatívne prevedený do 5 ml závitových vialiek. K vzorkám bolo pridaných 0,5 ml 0,5 M NaOH a 1 ml HPLC hexánu. Vialky boli uzatvorené viečkom a boli vložené na multipozičný vortex po dobu 5 minút. Po ustálení fázy bolo z hornej hexánovej fázy odobrané 100 µl do 2 ml skrutkovacej vialky a bolo doplnené do 1 ml HPLC hexánom.

4.5.4.1 Parametre analýzy plynovej chromatografie

Pre analýzu bol využitý prístroj TRACE GC/FID od firmy Thermo Fisher s plameňovo-ionizačným detektorom. Bola využitá kolóna Lion - GC FAME 30 m x 0,25 mm x 0,2 µm s prietokom nosného plynu vodíku 1 ml/minútu. Analýza využívala teplotný program (Tabuľka 10). Pri analýze bola využitá metóda interného štandardu pomocou mastnej kyseliny C₁₇, ktorú kvasinky nedokážu prirodzene produkovať a vyhodnotenie prebiehalo v programe Chromeleon 7.2 a MS Excel.

Tabuľka 10: Teplotný program analýzy mastných kyselín plynovej chromatografie

Retenčný čas [min]	Gradient [°C/minútu]	Cieľová teplota [°C]	Čas zdržania [min]
0,000	Run	-	-
1,000	0,00	60,0	1,00
3,625	40,00	125,0	1,00
8,625	5,00	140,0	2,00
19,736	4,50	190,0	0,00
22,236	25,00	240,0	0,50
22,300	Stop	-	-

4.5.5 Stanovenie glukánov

Na stanovenie beta-glukánov bolo využité komerčného kitu. Metóda je založená na degradácií celkových glukánov a α-glukánov na D-glukózové jednotky. Spektrofotometrickým stanovením sú potom stanovené tieto množstvá, ktoré sú následne od seba odčítané. Odčítaním α-glukánov od celkových glukánov dostaneme množstvo β-D-glukánov vo vzorke. Odchýlky boli stanovená z priemernej hodnoty. Chybová úsečka bola stanovená z meraní nakultivovaných duplikátov biomasy [58].

4.5.5.1 Roztoky balenia kitu pre stanovenie glukánov

- Fľaša 1: 2 ml suspenzie síranu amónneho obsahujúceho exo-1,3- β-glukánázu (100 U/ml) a β-glukosidázu (20 U/ml).
- Fľaša 2: 20 ml 50 % roztoku glycerolu obsahujúceho amyloglukosidázu (1630 U/ml) a roztok enzýmu invertázy (500 U/ml).
- Fľaša 3: 50 ml reakčný pufor GOPOD o pH= 7,4. Pufor obsahuje p-hydroxybenzoovú kyselinu a azid sodný (0,09 %).

- Fľaša 4: Enzýmy činidiel GOPOD formou lyofilizovaného prášku. Enzýmy obsahujú glukózooxidázu (GOD), peroxidázu (POD) a 4-aminoantipyrin.
- Fľaša 5: Roztok kyseliny benzóovej (0,2 %) so štandardným roztokom D-glukózy (5 ml, 1 mg/ml).
- Fľaša 6: Štandard β -glukánv pre kontrolu merania (2 g).

4.5.5.2 Pomocné roztoky pre stanovenie glukánov

Pred začatím postupu boli pripravené roztoky nižšie:

- Kyselina sírová (12 M).
- Hydroxid sodný (1,7 M).
- Hydroxid draselný (10,0 M).
- Acetátový pufor (200 mM, pH= 4,5).
- Acetátový pufor (200 mM, pH= 5).
- Acetátový pufor (1,2 M, pH= 3,8).

Zároveň na prípravu reagentu GOPOD bolo do fľaše č. 1 z kitu pridaných 9 ml 200 mM acetátového puforu. Obsah fľaše č. 3 bol nariadený na 1 l destilovanej vody. Enzýmy roztoku č. 4 boli rozpustené v 20 ml roztoku 1 a následne kvantitatívne prevedené do fľaše č. 1 so zvyšným roztokom. Postup stanovenia prebiehal podľa návodu uvedeného v návode od výrobcu [58].

4.5.5.3 α -glukány

Do sklenených skúmaviek bolo navážených 13-15 mg zlyofilizovanej biomasy. K biomase bolo napipetovaných 1,7 M NaOH a boli po dobu 20 minút vložené do ľadovej lázne. Následne bolo pridaných 1,2 M acetátového puforu a enzýmy invertázy. Vzorky boli po dobu 30 minút udržiavané pri 40 °C. Vzorky boli následne zcentrifugované pri 13 000 ot/minútu po dobu 5 minút. Po centrifugácii bol odobratý daný objem a bolo pripipetované činidlo GOPOD. Vzorky boli inkubované po dobu 20 minút pri 40 °C. Meranie absorbancie prebiehalo pri 510 nm oproti slepej vzorke.

4.5.5.4 Celkové glukány

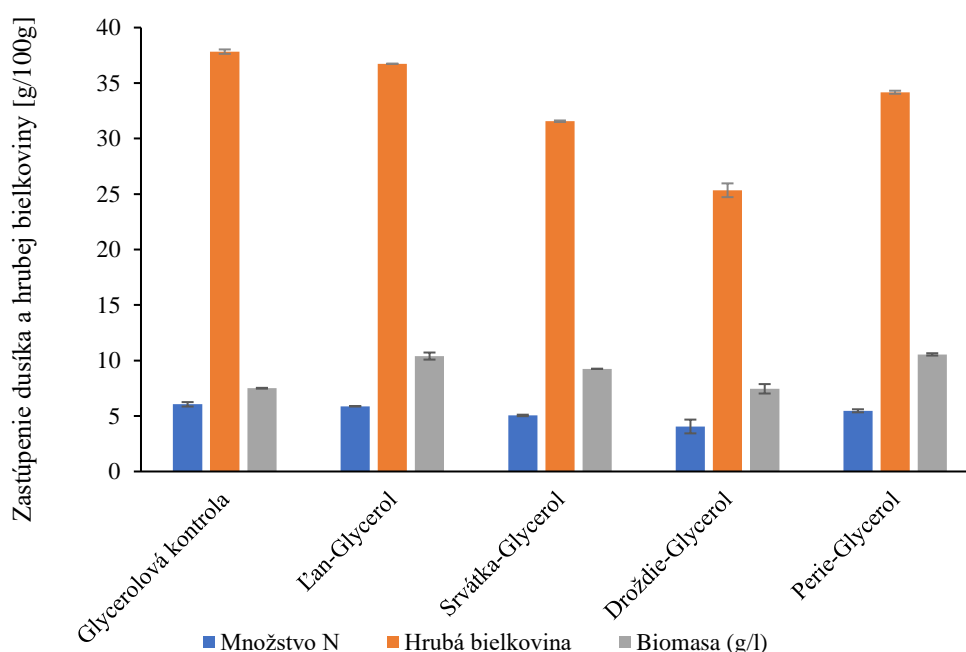
Do sklenených skúmaviek bolo navážené 13-15 mg lyofilizovanej biomasy a bola pripipetovaná 12 M kyselina sírová. Skúmavky boli vložené do ľadovej lázne po dobu 2 hodín. Následne bola pridaná voda a vzorky boli inkubované pri teplote 100°C po dobu 2 hodín. Následne bola zmes neutralizovaná hydroxidom a bol pridaný 200mM acetátový pufor. Vzorky boli centrifugované po dobu 5 minút pri 13 000 ot/minútu. Následne bolo odobraté dané množstvo sцентрифugovanej vzorky a bola pridaná exo-zmes z fľaše 1 (4.5.5.1) . Takto pripravené vzorky boli inkubované pri 40 °C po dobu 1 hodiny. Po inkubácii bolo pridané činidlo GOPOD a skúmavky boli znovu inkubované pri 40 °C po dobu 20 minút. Následne bola zmeraná absorbancia pri 510 nm oproti slepej vzorke acetátového puforu.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Obohatenie biomasy dusíkatými zložkami médiá

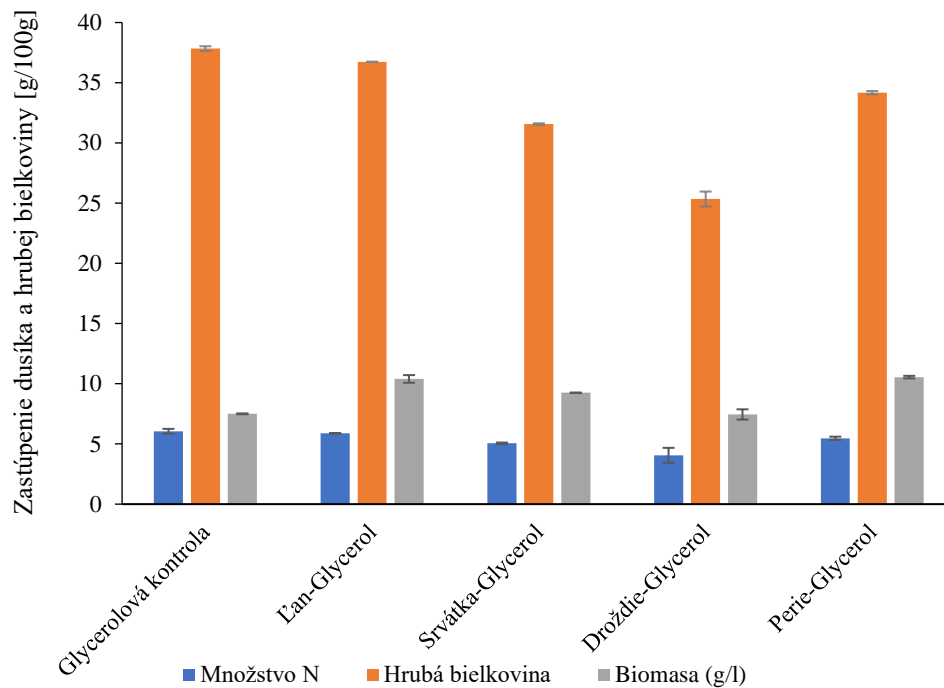
Súčasťou tejto práce bolo obohatenie kvasinkovej biomasy o dusíkaté látky, ako sú proteíny, prostredníctvom suplementácie kultivačných médií hydrolyzátmi bohatými o proteín. Obsah dusíka po kultivácii v zlyofilizovanej biomase bol stanovený Kjeldahlovou metódou. Pôvodná hypotéza pochádzala z predpokladu, že obohatením médiá hydrolyzátmi bohatými na dusík sa zvýši hodnota aj v kvasinkovej biomase v porovnaní s kontrolnou vzorkou s minerálnym zdrojom dusíka.

Vo vzorkách biomasy kvasinky *Rhodoturula kratochvilovae*, v grafe (Obrázok 14), nedošlo k nárastu dusíkatých látok v biomase. Biomasa s anorganickým zdrojom dusíka mala najvyšší obsah hrubej bielkoviny, a to 37,83 g/100 g biomasy. Porovnateľný výsledok dosahovala vzorka s ľanovým hydrolyzátom s obsahom 36,74 g/100 g biomasy a pérovým hydrolyzátom 34,17 g/100g biomasy.



Obrázok 14: Graf stanovenia obsahu dusíka a hrubej bielkoviny pre kvasinku *Rhodoturula kratochvilovae*

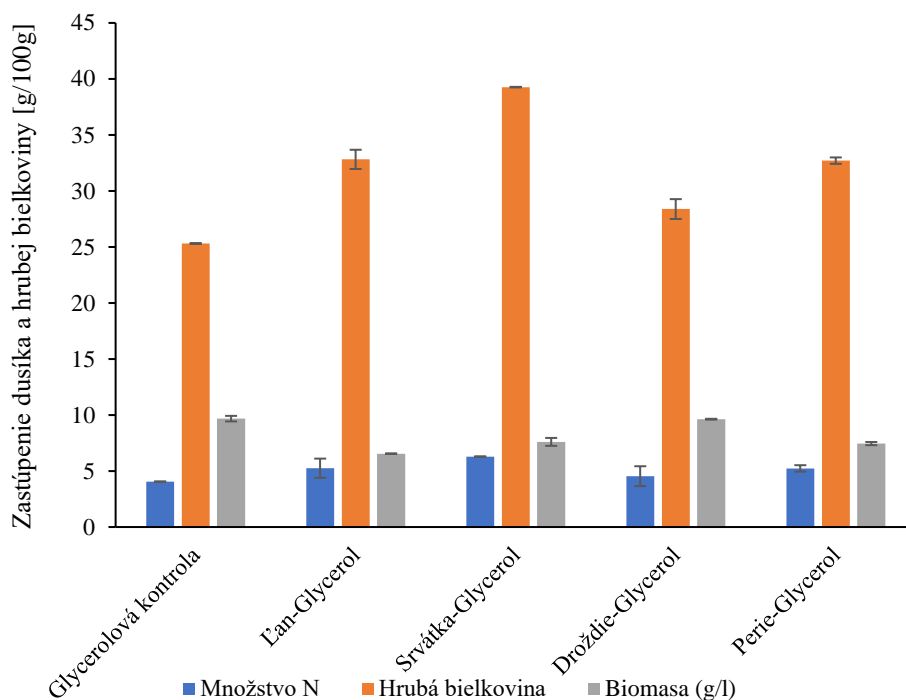
V grafe (Obrázok 15) dosiahla kvasinka *Rhodotorula, toruloides* najvyššie zastúpenie hrubej bielkoviny zo všetkých vzoriek s najvyšším vo vzorke s ľanovým hydrolyzátom so 40,94 g/100 g biomasy, čo je navýšenie o 10,5 % oproti kontrole a pérovým hydrolyzátom so 38,20 g/100 g.



Obrázok 15: Graf stanovenia obsahu dusíka a hrubej bielkoviny pre kvasinku *Rhodoturulula toruloides*

Kvasinka *Metschnikowia pulcherrima*, ako je vidieť na grafe (Obrázok 16) mala najvyššie rozdiely medzi kontrolou a biomasou z hydrolyzátov. Kontrolná biomasa dosahovala hodnotu hrubej bielkoviny 25,31 g/100 biomasy. Najvyššie zastúpenie hrubej bielkoviny v biomase sa nachádzalo v biomase z médiá s hydrolyzátom srvátkového proteínu, a to 39,27 g/100 g biomasy, čo je nárast o 35,5 %.

Na základe týchto výsledkov môžeme predpokladať, že pridaním proteínových hydrolyzátov do médiá karotenoidných kvasiniek nezvýšime signifikantne obsah dusíku v biomase. Na druhú stranu, dokážeme týmito hydrolyzátmi nahradiť syntetický zdroj uhlíku za odpadný substrát s veľmi podobnými výsledkami. Oproti tomu, kvasinka *Metschnikowia pulcherrima clade* vykazovala prudký nárast v obsahu dusíka v biomase za použitia organického zdroja dusíka z odpadných substrátov s najlepšimi výsledkami s hydrolyzátom srvátkového proteínu.



Obrázok 16: Graf stanovenia obsahu dusíka a hrubej bielkoviny pre kvasinku *Metschnikowia pulcherrima*

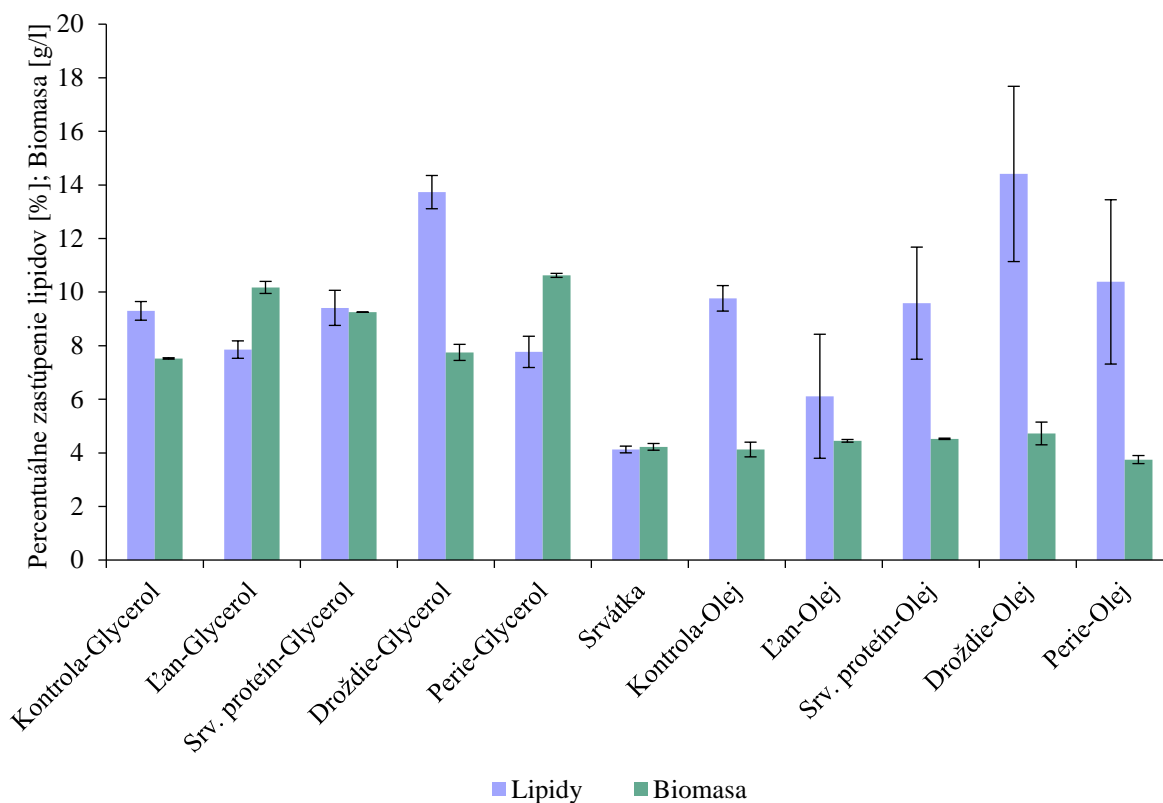
5.2 Stanovenie rastových a produkčných vlastností vybraných kvasiniek

Cieľom tejto časti práce bolo analyzovať a zhodnotiť rast a produkciu uvedených metabolitov v biomase pri kultivácii za stresových podmienok pri pomere C:N 13, pri ktorých boli do médií pridávané proteinové hydrolyzáty ako zdroj dusíkatých látok.

5.2.1 Kvasinka *Rhodotorula kratochvilovae*

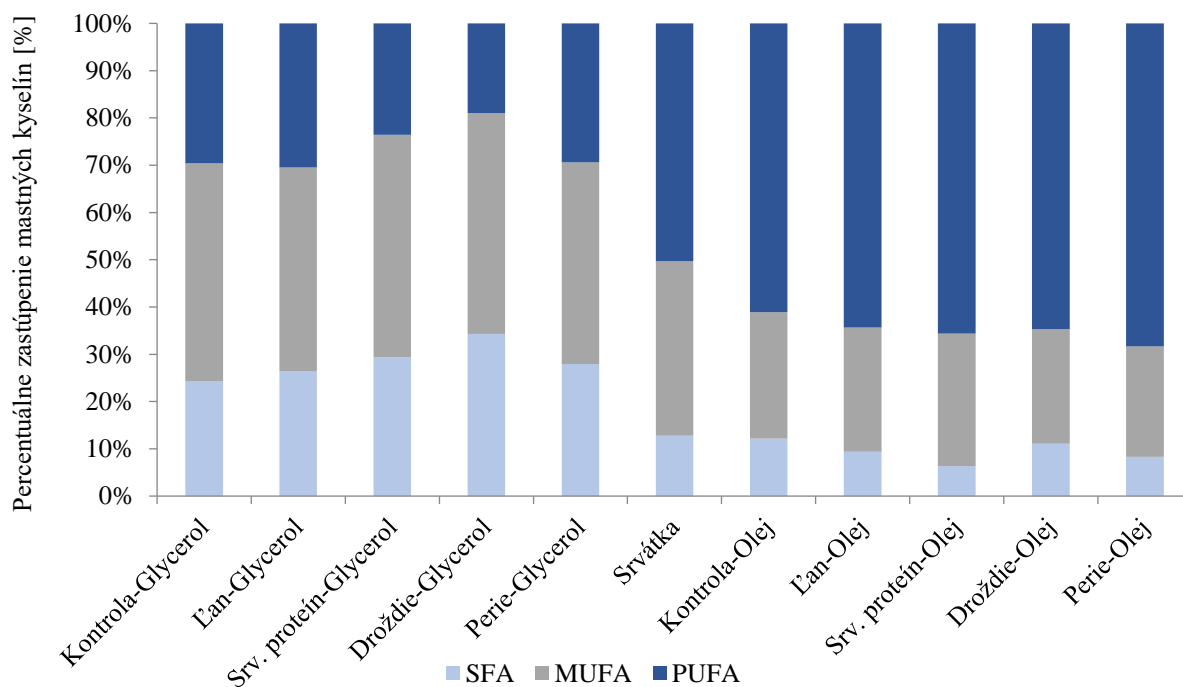
Ako je vidieť na grafe (Obrázok 17), produkcia biomasy bola značne ovplyvnená zdrojom uhlíka počas kultivácií. *Rhodotorula kratochvilovae* nedokázala využiť olejový zdroj uhlíku ľanového oleja, ani laktózu v srvátke, čo sa odzrkadlilo na výslednej biomase všetkých olejových vzoriek. Na druhú stranu, pri použití glycerolu bol rast biomasy značne navýšený. Použitím proteínových hydrolyzáto v kombinácii s glycerolom sa zvýšila produkcia biomasy s najvyšším nárastom pri vzorky perie-glycerol s 10,63 g/l, čo je navýšenie o 29,2 % a pri vzorky ľan-glycerol s koncentráciou biomasy 10,18 g/l, čo je 26 % nárast oproti kontrole-glycerol.

Produkcia lipidov bola taktiež značne ovplyvnená zdrojom uhlíka. Pri olejových médiách sú očividné odchýlky meraní, čo mohlo byť spôsobené zvyškovým olejom na povrchu biomasy. Pri glycerolových médiách s hydrolyzátni dochádzalo k miernemu znižovaniu produkcie lipidov v biomase pri vzorkách ľan-glycerol a perie-glycerol. Vzorka srv. proteín- glycerol mala takmer totožné percentuálne zastúpenie lipidov, a to 9,41 %. Zvýšenie nastalo pri vzorke droždie-glycerol, ktorá dosahovala percentuálne zastúpenie lipidov 13,73 %.



Obrázok 17: Graf produkcie biomasy a zastúpenie lipidov pri stresových podmienkach kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*

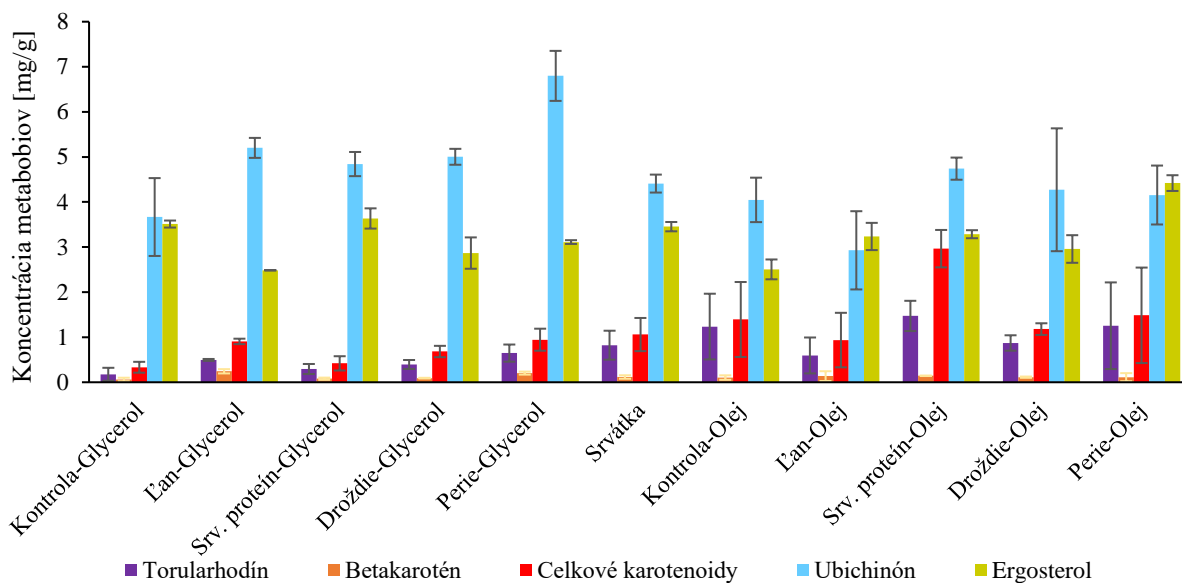
Zastúpenie mastných kyselín v biomase podľa saturácie, ako je vidieť na grafe (Obrázok 18), bolo značne ovplyvnené použitím ľanového oleja, ktorý sám o sebe obsahuje vysoké množstvo PUFA, a to hlavne kyseliny α -linolenovej, ktorá sa nachádzala vo veľkom množstve i v olejových vzorkách produkčných médií. Najvyššie zastúpenie PUFA obsahovala vzorka perie-olej s 68,33 %, avšak všetky olejové médiá mali podobnú hodnotu PUFA. V glycerolových médiách bolo zastúpenie mastných kyselín značne iné. Zvýšil sa pomer MUFA a SFA na úkor PUFA. Vzorky ľan-glycerol, perie-glycerol, kontrola-glycerol vykazovali takmer totožné zastúpenie mastných kyselín. Zastúpenie mastných kyselín pre kontrolné médium bolo PUFA 29,58 %, MUFA 46,06 %, a SFA 24,37 %.



Obrázok 18: Graf zloženia mastných kyselín podľa saturácie pre kvasinku *Rhodotorula kratochvilovae*

Ako je vidieť na grafe (Obrázok 19), produkcia karotenoidov bola značne obmedzená pri všetkých vzorkách, čo naznačuje, že pomer C:N 13 nie je priaznivý pre produkciu karotenoidov. Z glycerolových vzoriek mala najvyššie zastúpenie karotenoidov vzorka perie-glycerol, a to 0,94 mg/g. V nepriaznivých podmienkach olejového zdroju uhlíku bolo zastúpenie karotenoidov vyššie, s najvyššou koncentráciou 2,96 mg/g biomasy, a to pri vzorke srv. proteín- olej.

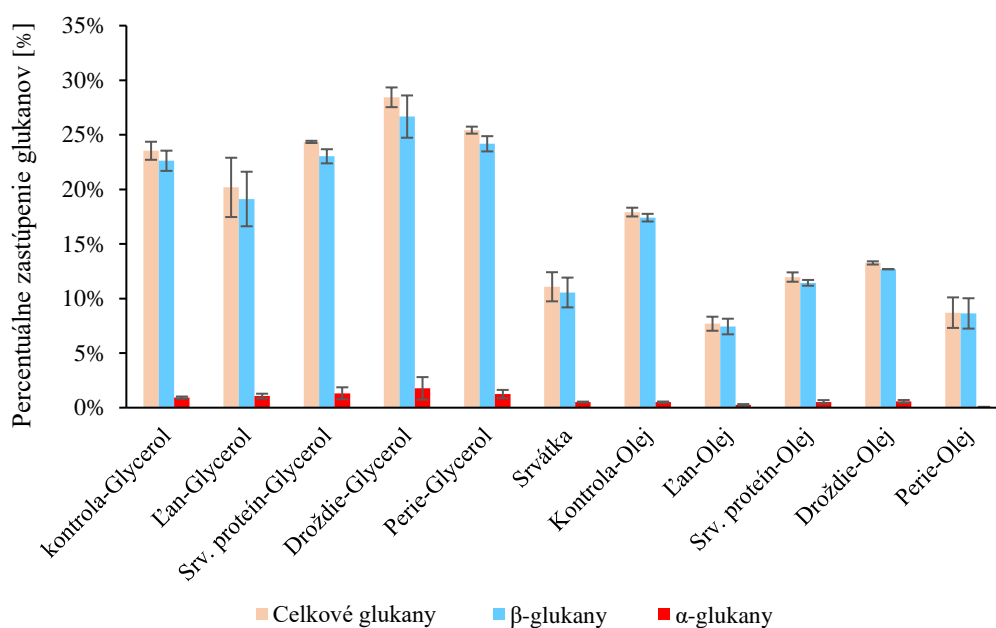
Obsah ubichinónu bol pri glycerolových médiách vyšší ako pri olejových. Použitie proteínových hydrolyzátov zvýšilo produkciu ubichinónu s najvyšším zastúpením pri vzorke perie- glycerol s 6,78 mg/g, čo je o 46 % vyššia produkcia ako pri vzorke kontrola-glycerol. U väčšiny vzoriek sa významne nezmenila produkcia ergosterolu pri zmene zdroja uhlíka. Vo všeobecnosti však olejové médiá mali mierne vyššie hodnoty ergosterolu. Najvyššia hodnota ergosterolu bola nameraná vo vzorke perie-olej, a to 4,42 mg/g, čo je o 43 % vyššia hodnota ako pri vzorke kontrola-olej.



Obrázok 19: Graf zastúpenia karotenoidov ergosterolu a ubichinónu v kvasinke *Rhodotorula kratochvilovae*

Na grafe (Obrázok 20) je vidieť zastúpenie glukánov v bunkovej stene kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*. Produkcia glukánov bola značne ovplyvnená zdrojom uhlíka produkčných médií. Vzorky, ktoré používali ako zdroj uhlíka glycerol vykazovali značný nárast v produkcii glukánov a hlavne β -glukánov. Najvyššie zastúpenie β -glukánov vykazovala vzorka drożdže- glycerol s 26,67 % a vzorka perie-glycerol s 24,17 % oproti kontrola-glycerol, ktorá dosahovala 22,62 % β -glukánov v biomase. Mierny pokles produkcie β -glukánov bol zaznamenaný pri vzorke ľan-glycerol, kde hodnota β -glukánov klesla na 19,12 %.

Použitie ľanového oleja v kombinácii s hydrolyzátmi značne znížilo produkciu β -glukánov oproti kontrole-olej. Najvyššie zníženie bolo zaznamenané pri vzorke ľan olej s 7,43 % β - glukánov.



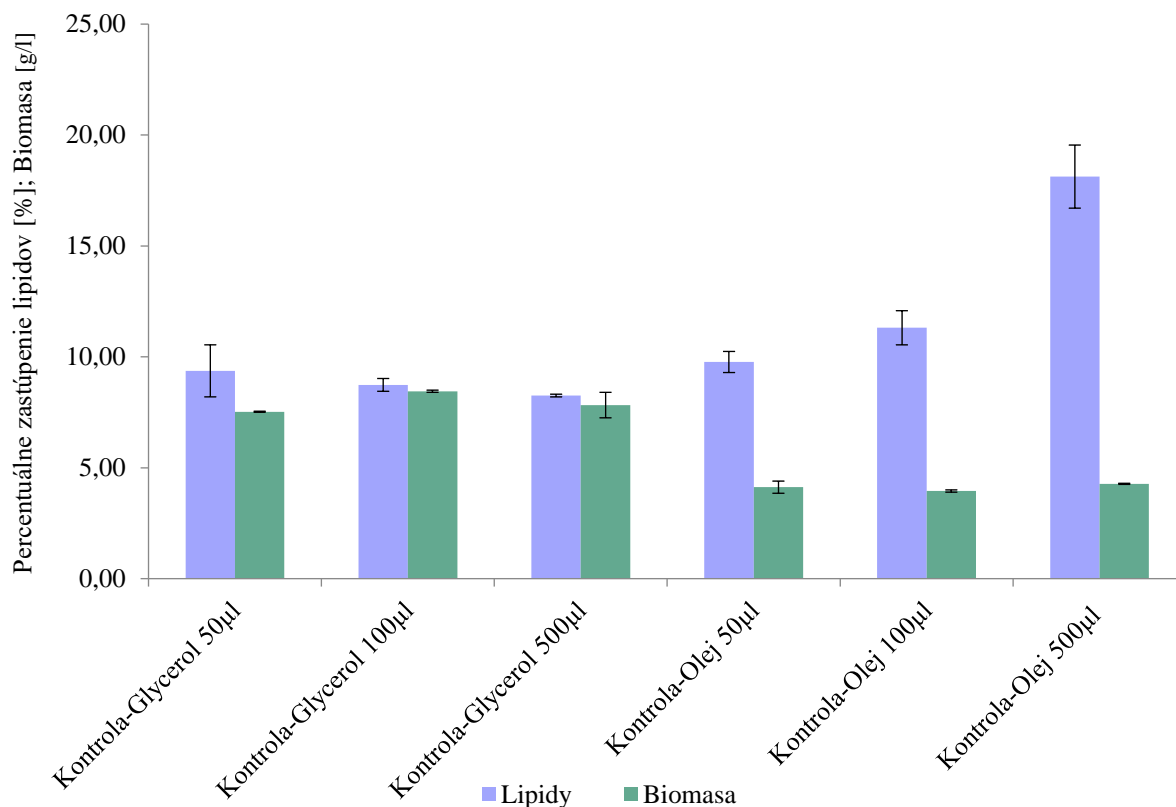
Obrázok 20: Graf zastúpenia glukánov v biomase kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*

5.2.1.1 Koncentrácia mikroprvkov u kontrolných médií kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*

V tejto časti práce boli porovnávané vzorky kontrol s rozdielnym pridaním roztoku mikroelementov. Zmena koncentrácie mikroelementov mala rozličné výsledky pre glycerolové a olejové médiá.

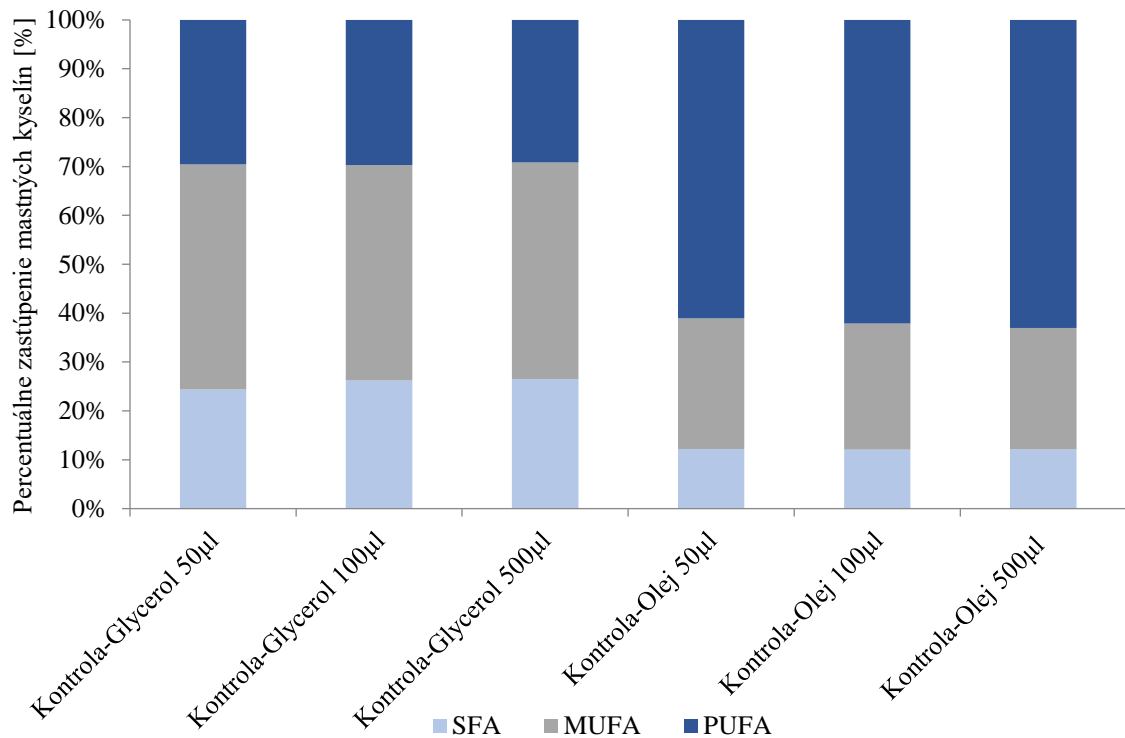
Glycerolové médiá, ako je vidieť na grafe (Obrázok 21) mali najvyššiu produkciu biomasy pri pridaní 100 μ l mikroelementov s 8,45 g/l. Najnižšie zastúpenie v glycerolových médiách mala vzorka glycerol 50 μ l s 7,53 g/l. V olejových médiách bola zmena produkcie biomasy zanedbateľná a pohybovala sa okolo 4,11 g/l.

Pri glycerolových médiách mala najvyššie zastúpenie lipidov vzorka kontrola- glycerol 50 μ l s 9,37 %. Vzorky kontrola-glycerol 100 μ l dosahovala 8,74 % a kontrola-glycerol 500 μ l dosahovala 8,25 %. Z toho vyplýva že vyššia koncentrácia mikroelementov mala veľmi mierne inhibičné účinky produkcie lipidov v glycerolových médiách. Olejové médiá mali presne opačné výsledky. Najvyššiu produkciu lipidov dosahovala vzorka kontrola-olej 500 μ l s hodnotou 18,13 mg/g a najnižšiu kontrola-olej 50 μ l s 9,77 mg/g.



Obrázok 21: Graf produkcie biomasy a zastúpenie lipidov kontrolných médií kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*

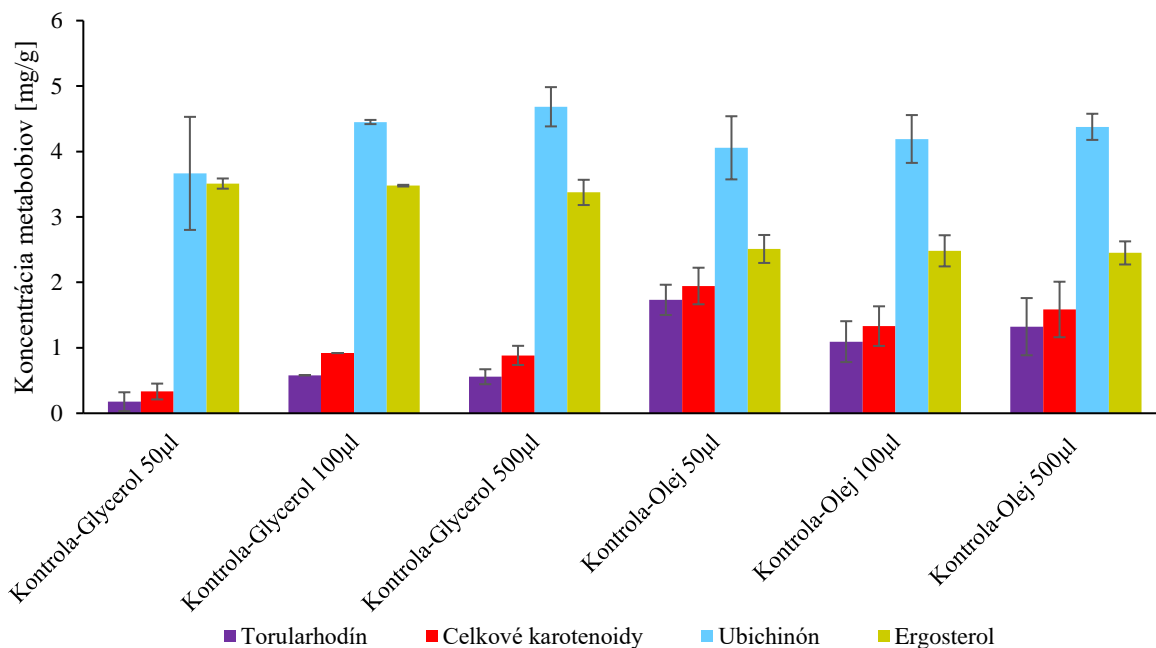
Na grafe (Obrázok 22) vidíme zastúpenie mastných kyselín pre kontrolné médiá. Z týchto údajov vyplýva, že koncentrácia mikroelementov v médiách nemá reálny vplyv na zloženie mastných kyselín.



Obrázok 22 Graf zloženia mastných kyselín podľa saturácie pre kontrolné médiá kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*

Na druhú stranu ako vidíme na grafe (Obrázok 23), koncentrácia mikroelementov mala značný vplyv na produkciu karotenoidov. V médiách s glycerolovým zdrojom uhlíka, bola koncentráciou mikroelementov najvyššia pri vzorke kontrola-glycerol 100 µl kedy syntetizovala 0,92 mg/g karotenoidov, čo je 64 % nárast oproti vzorke kontrola-glycerol 50 µl.

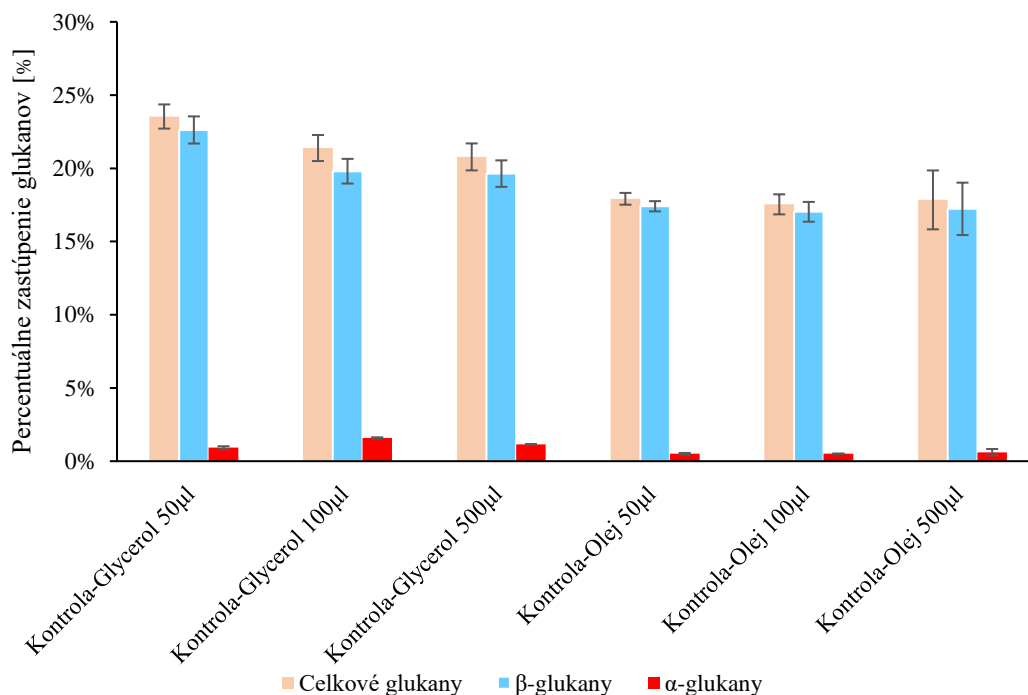
Kontrolné olejové médiá vykazovali opačný charakter. S rastúcou koncentráciou mikroelementov klesla produkcia karotenoidov. Najvyššie zastúpenie karotenoidov v olejových médiách mala vzorka k. olej 50 µl s 1,94 mg/g.



Obrázok 23: Graf zastúpenia karotenoidov, ergosterolu a ubichinónu v kontrolných médiách kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*

Zastúpenie glukánov v biomase kontrolných médií vidíme na grafe (Obrázok 24). V rámci glycerolových kontrolných médií mala najvyššie zastúpenie β -glukánov vzorka kontrola-glycerol 50 μ l s 22,62 %. Najnižšie zastúpenie β -glukánov mala vzorka kontrola-glycerol 100 μ l s 19,64 %.

V olejových médiách nie je zaznamenaný trend, ktorý by určil zlepšenie alebo zhoršenie produkcie glukánov na základe zmeny koncentrácie mikroelementov.

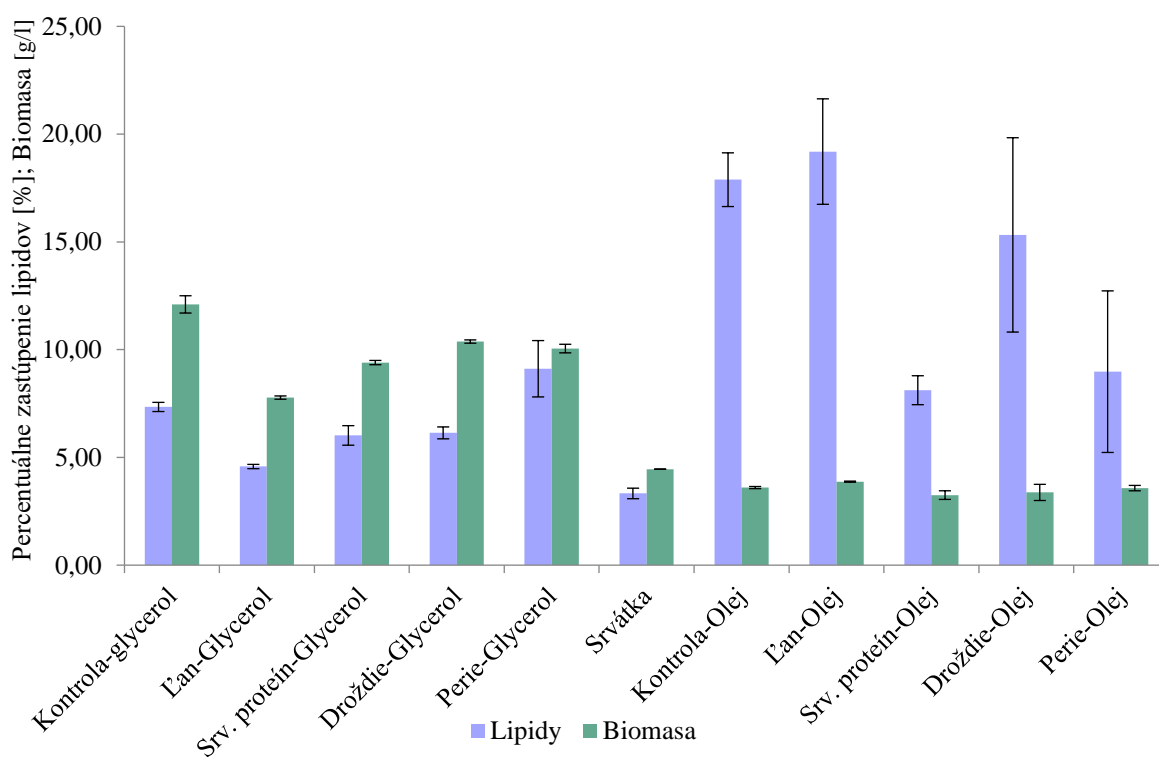


Obrázok 24: Zastúpenie glukánov v kontrolných médiách kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*

5.2.2 Kvasinka *Rhodotorula toruloides*

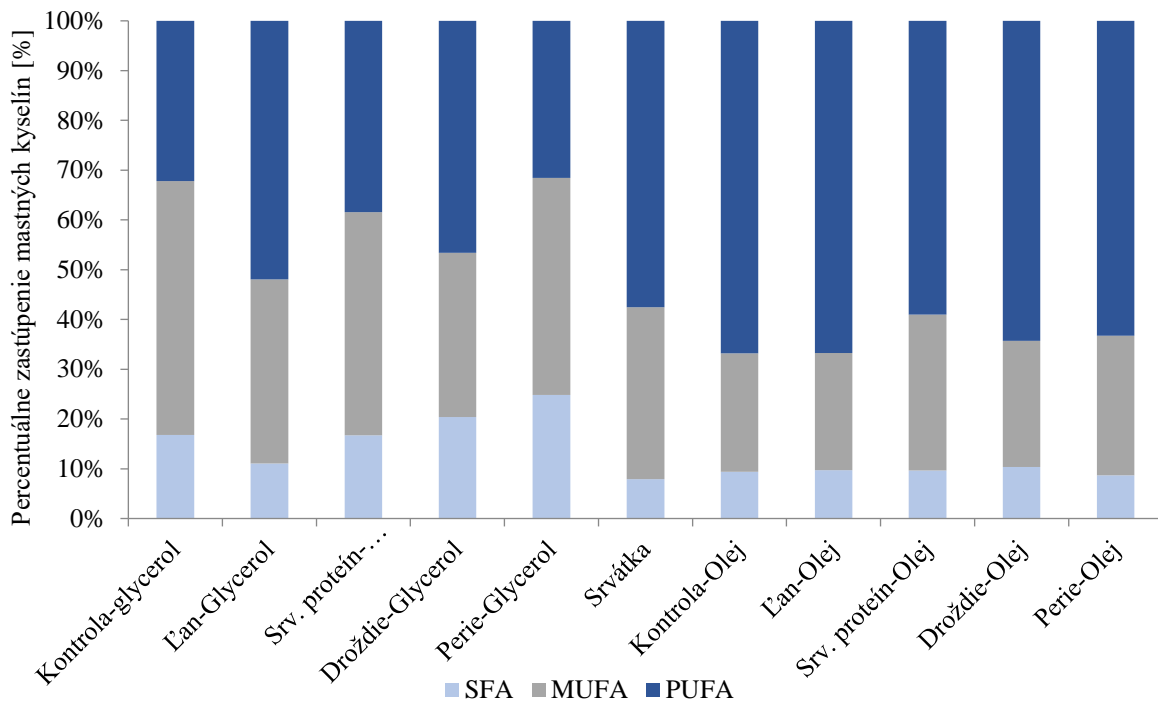
Ako je vidieť na grafe (Obrázok 25) *Rhodotorula toruloides* nebola schopná využiť olejový zdroj uhlíku, čo je vidieť podľa hodnôt biomasy, kedy všetky olejové médiá vyprodukovali biomasu medzi 3-4 g/l. Oproti tomu, glycerolové médiá mali vyšiu produkciu biomasy s najvyšším zastúpením vo vzorke kontrola-glycerol s 12,1 g/l. Najvyšší rast v glycerolových produkčných médiách vykazovali vzorky droždie-glycerol s 10,38 g/l a perie-glycerol s 10,05 g/l.

Rovnako ako pri *Rhodotorula kratochvilovae*, i táto kvasinka vykazuje vyššiu produkciu lipidov vo vzorkách s ľanovým olejom. Najvyššie zastúpenie lipidov vykazuje vzorka ľan-olej s 19,19 % lipidov. Oproti tomu glycerolové médiá vykazovali nižšiu produkciu lipidov, a to i v porovnaní s kvasinkou *Rhodotorula kratochvilovae*. Najvyššiu produkciu z glycerolových vzoriek vykazovala vzorka perie-glycerol s 9,11 %.



Obrázok 25: Graf produkcie biomasy a zastúpenie lipidov pri stresových podmienkach kvasinky *Rhodotorula toruloides*

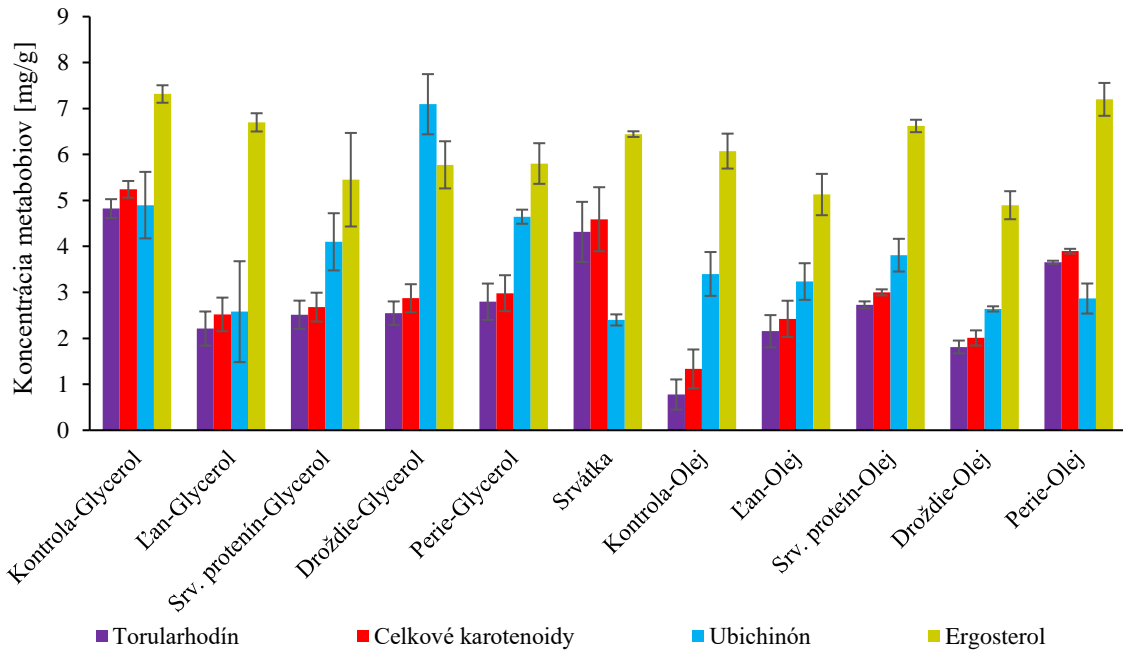
Zo zastúpenia mastných kyselín podľa saturácie, na grafe (Obrázok 26) vidíme, že olejové vzorky a srvátková vzorka sú taktiež ovplyvnené zdrojom uhlíka, ako tomu bolo pri kvasinke *Rhodotorula kratochvilovae*. Táto zmena ovplyvnila produkciu PUFA v biomase kvasinky. Najvyššie zastúpenie PUFA sa nachádza vo vzorke ľan-olej s 66,77 %. S pomedzi glycerolových médií má taktiež najvyššie zastúpenie vzorka ľan-glycerol s 51,94 %. Najnižšie zastúpenie PUFA vykazuje vzorka perie-glycerol s 31,54 %, taktiež v tejto vzorke sa nachádza aj najvyššie zastúpenie SFA a to 24,8%.



Obrázok 26: Graf zloženia mastných kyselín podľa saturácie pre kvasinku *Rhodotorula toruloides*

Ako vidíme na grafe (Obrázok 27), kvasinka *Rhodotorula toruloides* pri daných podmienkach produkuje vyššie množstvo karotenoidov ako kvasinka *Rhodotorula krotocvilovae*. Najviac karotenoidov produkuje vzorka kontrola-glycerol s 5,24 mg/g a srvátka s 4,59 mg/g. Pri olejových médiách vidíme nárast karodénoidov oproti kontrolnej vzorke. Najvyššie zastúpenie z olejových vzoriek dosahuje vzorka perie-olej a to 3,9 mg/g, čo je o 66 % viac ako v kontrolnej vzorke kontrola-olej.

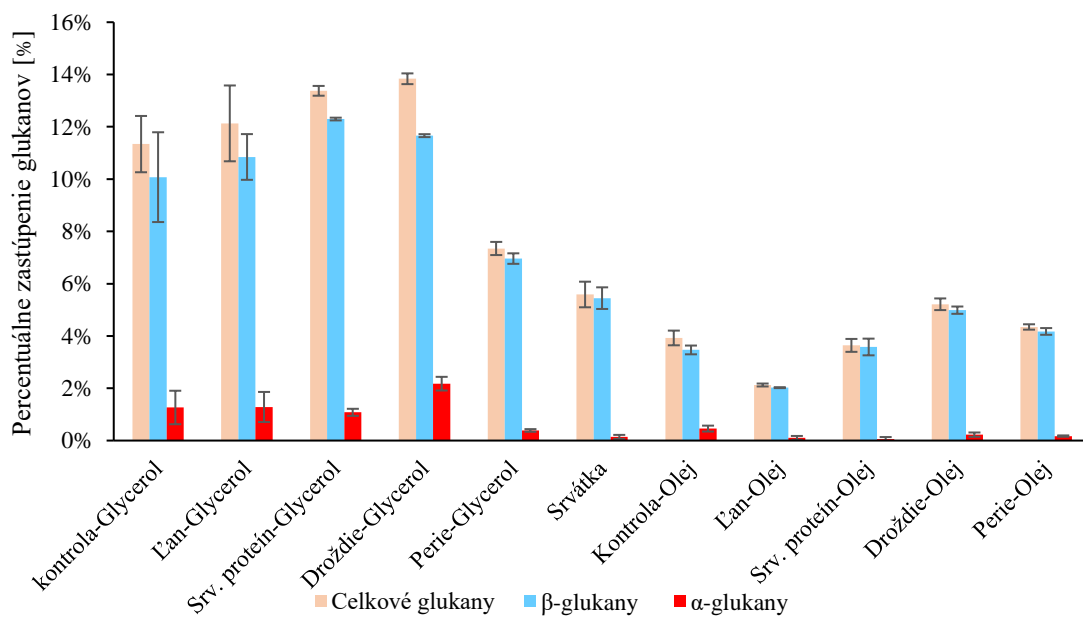
Produkcia ergosterolu má podobný priebeh ako karotenoidov, kedy najvyššie zastúpenie sa nachádza vo vzorke kontrola-glycerol s 7,32 mg/g. Vzorky hydrolyzátov v kombinácii s glycerolom mali oproti kontrole nižšie zastúpenie ergosterolu s najnižším poklesom vo vzorke lan- glycerol s 6,70 mg/g a srvátka s 6,44 mg/g. Pri olejových médií vidíme že najvyšší nárast ergosterolu sa nachádza pri vzorke perie-olej s 7,20 mg/g čo je nárast o 16 % oproti vzorke kontrola-olej a pre srv. proteín-olej s 6,62 mg/g s nárastom 8%. Najvyššiu produkciu zo všetkých vzoriek dosiahla vzorka drożdže- glycerol s 7,09 mg/g, čo je oproti kontrole navýšenie o 31%.



Obrázok 27: Graf zastúpenia karotenoidov a ergosterolu a ubichinónu v kvasinke *Rhodotorula toruloides*

Kvasinka *Rhodotorula toruloides* na grafe (Obrázok 28) vykazuje celkovo nižšiu produkciu glukánov oproti *Rhodotorule kratochvilovae*. Taktiež tu vznikol pokles glukánov pri vzorke perie-glycerol, ktorý sa u kvasinky *Rhodotorule kratochvilova* nenachádza. Najvyššie zastúpenie glukánov v glycerolových médiách vyprodukovala vzorka drożdže-glycerol s 11,66 % β -glukánov a srvátka-glycerol s 12,30 % β -glukánov.

Pri olejových médiách vidíme podobný priebeh ako pri glycerolových médiách, i keď produkcia bola výrazne slabšia, to značí ovplyvnenie produkcie β -glukánov hydrolyzátni. Najvyššie zastúpenie β -glukánov dosiahli vzorky drożdže-olej s 4,99 % a perie-olej s 4,17 %.

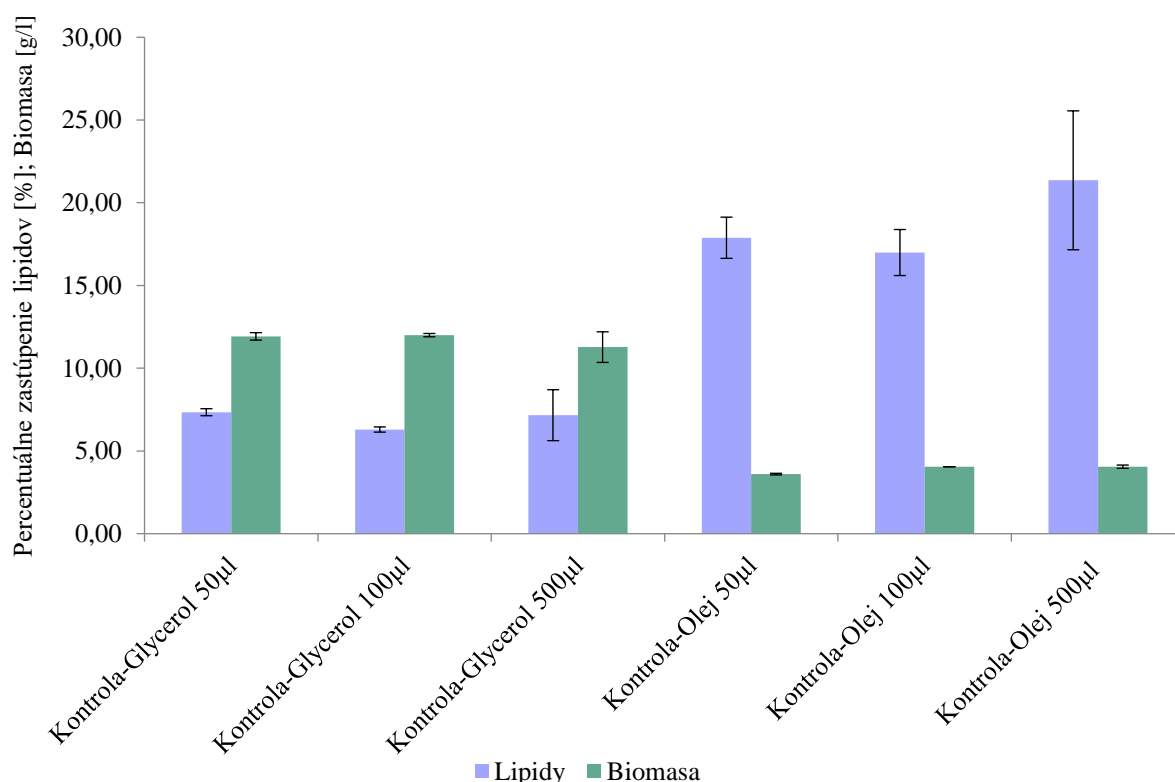


Obrázok 28: Graf zastúpenia glukánov v biomase kvasinky *Rhodotorula toruloides*

5.2.2.1 Koncentrácia mikroprvkov u kontrolných médií kvasinky *Rhodotorula toruloides*

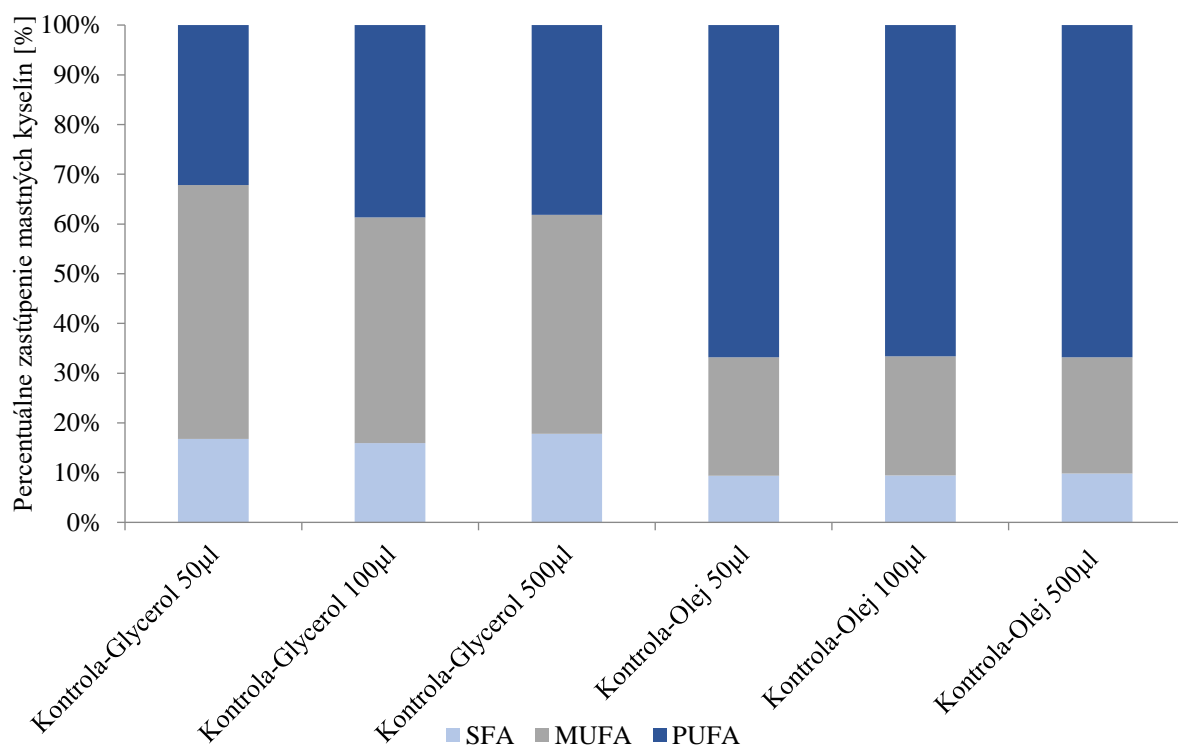
Ako vidieť na grafe (Obrázok 29), výťažnosť biomasy vzhľadom na koncentráciu mikroelementov sa pre glycerolové médiá prakticky nezmenila a dosahovala hodnotu blízku 12 g/l. Pri olejových médiách vidíme veľmi mierny nárast biomasy vzorky kontroly-olej 100 µl a kontroly-olej 500 µl oproti K.-olej 50 µl, keby vzniklo navýšenie o 11%.

Pri glycerolových médiách je najvyššie zastúpenie lipidov pri použití 50 µl mikroelementov, so zastúpením 7,34 %. Najnižší nárast lipidov bol pri použití 100 µl mikroelementov, kedy zastúpenie bolo 6,29 % lipidov. Olejové médiá mali najvyšší nárast obsahu lipidov pri použití 500 µl a to so zastúpením 21,36 %. Najnižšie zastúpenie lipidov sa nachádzalo vo vzorke s 100 µl a to 16,99 %.



Obrázok 29: Graf zloženia mastných kyselín podľa saturácie pre kontrolné médiá kvasinky *Rhodotorula toruloides*

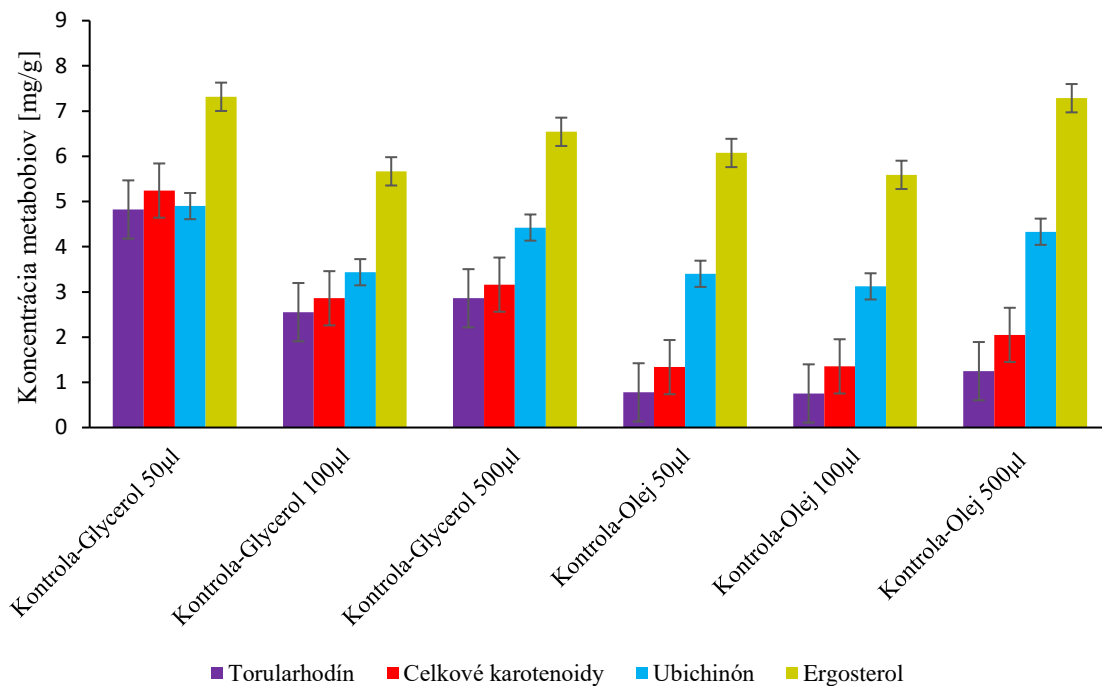
Na grafe (Obrázok 30) je vidieť, že zastúpenie mastných kyselín sa pri koncentrácií mikroelementov významne nemenilo. Výnimkou je v glycerolových médiách vzorka kontrola- glycerol 50 µl, ktorá vykazovala nižšie zastúpenie PUFA, a to 32,19 %, oproti vyšším koncentráciám mikroelementov, kde sa percentuálne zastúpenie PUFA pohybovalo okolo 38%. Olejové médiá vykazovali prakticky rovnaké zastúpenia mastných kyselín, a to pre priemerne 66,74 % PUFA, 23,72 % MUFA a 9,54 % SFA.



Obrázok 30: Graf zloženia mastných kyselín podľa saturácie pre kontrolné médiá kvasinky *Rhodotorula toruloides*

Na grafe (Obrázok 31) je vidieť, že najvyššie zastúpenie karotenoidov i ergosterolu bolo vyprodukované pri glycerolových médiách pri vzorke kontrola-glycerol 50 µl mikroelementov s výťažnosťou karotenoidov 5,24 mg/g a ergosterolu 7,32 mg/g. Najnižší výťažok bol zaznamenaný v glycerolových médiách pri vzorke kontrola-glycerol 100 µl, a to karotenoidov 2,86 mg/g a ergosterolu 6,54 mg/g.

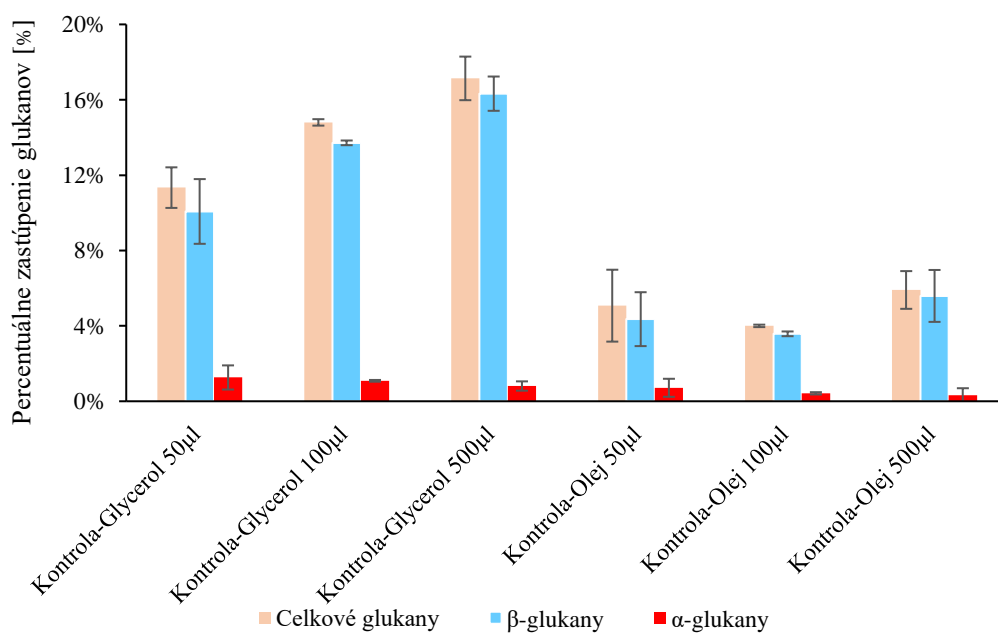
V olejových médiách vidíme postupný nárast karotenoidov pri zvyšujúcich sa dávkach mikroelementov. Najvyšší nárast produkcie karotenoidov u olejových kontrol bol zaznamenaný pri vzorke kontrola-olej 500 µl, a to 2,05 mg/g. Pri tejto vzorke bol zaznamenaný i najvyšší obsah ergosterolu pri olejových médiách a to 7,28 mg/g.



Obrázok 31: Graf zastúpenia karotenoidov, ergosterolu a ubichinónu v kontrolných médiách kvasinky *Rhodotorula toruloides*

Ako vidíme na grafe (Obrázok 32), u glycerolových kontrol dochádzalo k zvýšeniu syntézy glukánov s vyšším obsahom mikroelementov. Pri vzorke kontrola-glycerol 500 µl došlo k výšenej produkcii β -glukánov, a to na 16,33 % čo je oproti kontrole-glycerol 50 µl nárast o 6,26 %.

Olejové médiá produkovali len zanedbateľné množstvo glukánov a najvyšším zastúpením β - glukánov bolo zaznamenané pri kontrole-olej 500 µl a to 5,59 %. Najnižšia produkcia bola zaznamenaná pri kontrole-oleja 100 µl s výtťažkom 3,58 %.



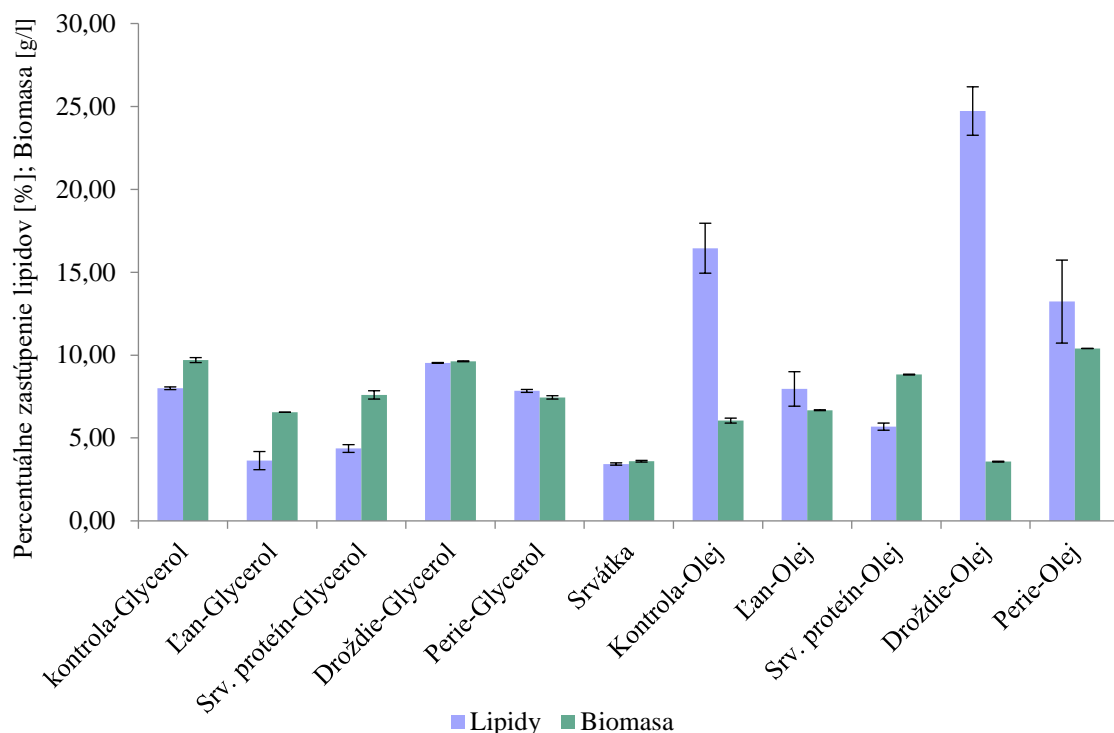
Obrázok 32: Graf zastúpenie glukánov v kontrolných médiách kvasinky *Rhodotorula toruloides*

5.2.3 Kvasinka *Metschnikowia Pulcherrima*

Na grafe (Obrázok 33) môžeme vidieť, že v porovnaní s karotenogénnymi kvasinkami tejto práce dokázala v niektorých prípadoch produkovať biomasu i s olejovým zdrojom uhlíka. Sú to vzorky srv. proteín- olej s 8,83 g/l a perie-olej s 10,4 g/l, čo je nárast biomasy až o 42 / oproti kontrole-oleja. Glycerolové médiá vykazovali najvyšší nárast biomasy pri vzorkách droždie- glycerol s koncentráciou 9,63 g/l. Ostatné glycerolové vzorky vykazovali zníženie akumulácie biomasy oproti kontrole-glycerola, ktorá má 9,7 g/l.

Najvyššie zastúpenie lipidov v biomase mala z glycerolových vzoriek vzorka droždie-glycerol, a to 9,53 %. Ostatné médiá vykazovali nižšie zastúpenie lipidov v biomase. Najnižšie zastúpenie lipidov glycerolových vzoriek mala vzorka ľan-glycerol s 3,64 %. a srv. proteín-glycerol s 4,36 %.

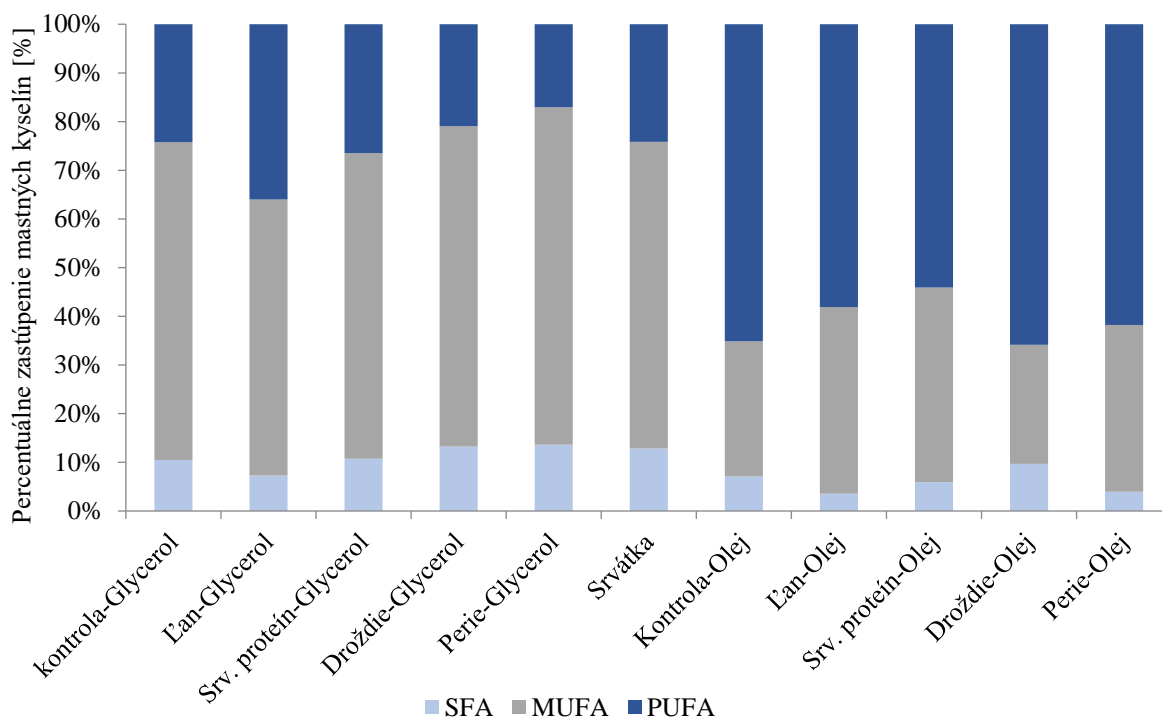
Taktiež, pri olejových médiách vidíme, že najvyššie zastúpenie lipidov má vzorka droždie-olej s 24,72 % lipidov a najnižšie zastúpenie vzorka ľan-olej s 7,96 % a srv. proteín-olej s 8,83 %.



Obrázok 33: Graf produkcie biomasy a zastúpenie lipidov pri stresových podmienkach kvasinky *Metschnikowia Pulcherrima*

Ako vidíme na grafe (Obrázok 34), *Metschnikowia pulcherrima clade* produkuje vyššie množstvo MUFA, hlavne u glycerolových vzoriek, oproti karoténogénnym kvasinkám tejto práce. Z glycerolových médií najvyššie zastúpenie MUFA sa nachádza vo vzorke perie- glycerol s 69,37 %. Najvyššie zastúpenie PUFA z glycerolových médií vykazuje vzorka ľan-glycerol a to 36%.

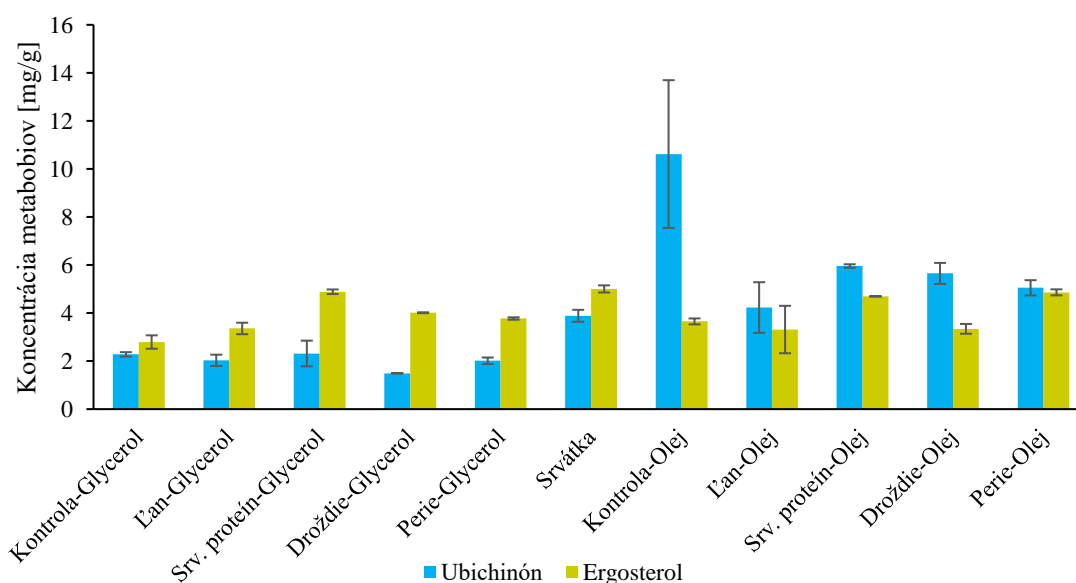
Oproti tomu v olejových médiách stále dominuje PUFA s najvyšším zastúpením pri vzorke droždie-olej s percentuálnym zastúpením 65,85%. Ostatné médiá majú voči kontrole-oleja nižšie zastúpenie PUFA.



Obrázok 34 Graf zloženia mastných kyselín podľa saturácie pre kvasinku *Metschnikowia Pulcherrima*

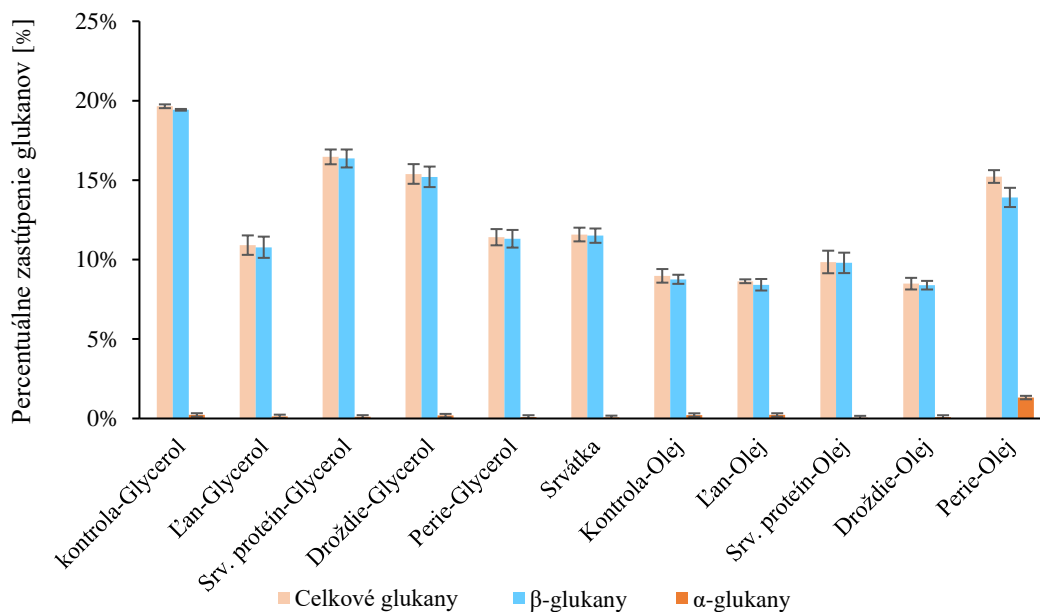
Ako je vidieť na grafe (Obrázok 35), produkcia ergosterolu i ubichinónu je nízka pre túto kvasinku. V glycerolových médiách dosahuje najvyššie zastúpenie ergosterol vo vzorke srv. proteín- glycerol, a to 4,88 mg/g a ubichinón v rovnakej vzorke 2,32. Srvátkové médium dosahovalo zastúpenie ergosterolu 5 mg/g a ubichinónu 3,88 mg/g.

Pri olejových médiách vidíme zvýšenú produkciu ubichinónu s najvyšším zastúpením, mimo kontrolnej vzorky vo vzorke srv. proteín-olej s 5,96 mg/g, Produkcia ergosterolu sa výrazne nemenila za použitia medzi uhlíkovými zdrojmi glycerolu a olejom.



Obrázok 35: Graf zastúpenia ergosterolu a ubichinónu v kvasinke *Metschnikowia pulcherrima*

Produkcia glukánov je zobrazená na grafe (Obrázok 36). Tu môžeme vidieť, že najvyššia produkcia glukánov a hlavne β -glukánov sa nachádza pri vzorke kontrola-glycerol s 19,43 % zastúpením β -glukánov. Ostatné glycerolové vzorky vykazovali nižšie zastúpenie s najnižším u vzoriek srv. proteín-glycerol so zastúpením 16,37 % β -glukánov. Olejové médiá mali celkovo nižšie zastúpenie glukánov, i keď nie s tak významným, rozdielom ako u karoténogénnych kvasiniek, výnimkou je vzorka perie-olej, ktorej zastúpenie β -glukánov dosiahlo 13,91 % Oproti kontrolnej vzorke, ktorá dosiahla len 8,76 % β -glukánov.



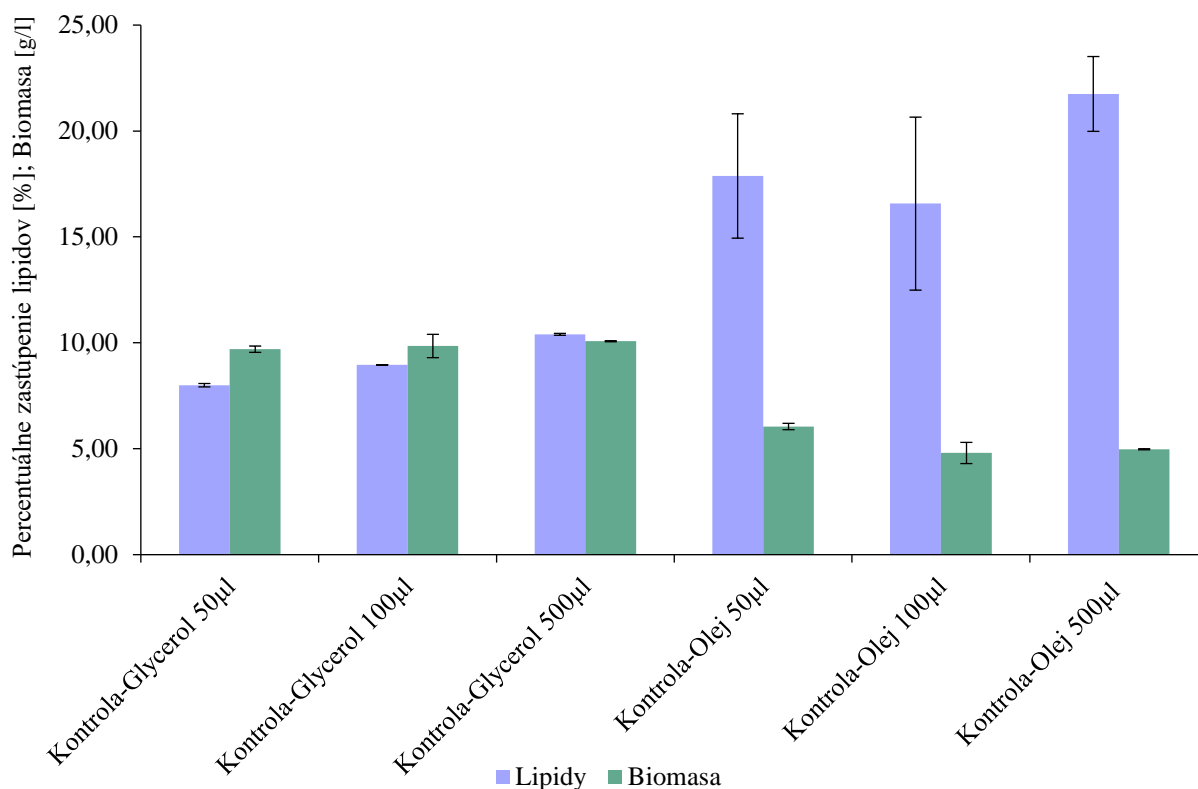
Obrázok 36: Graf zastúpenia glukánov v biomase kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*

5.2.3.1 Koncentrácia mikroprvkov u kontrolných médií kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*

Rast biomasy kvasinky *Metschnikowia pulcherrima clade* v grafe (Obrázok 37) je vidieť, že pri glycerolových médiách s rastúcou koncentráciou mikroelementov rastie i biomasa. Vzorka k.- glycerol 50 μ l dosiahla nárastu 9,7 g/l biomasy pričom, kontrola glycerol dosiahla 10,08 g/l médiá. Pre olejové médiá bola zaznamenaná najvyššia koncentrácia biomasy pri použití 50 μ l mikroelementov, pričom po pridaní 100 μ l a 500 μ l sa koncentrácia biomasy výrazne nemenila a dosiahla pre kontrolu-olej 100 μ l 4,80 g/l a pre kontrolu-olej 500 μ l 4,98 g/l.

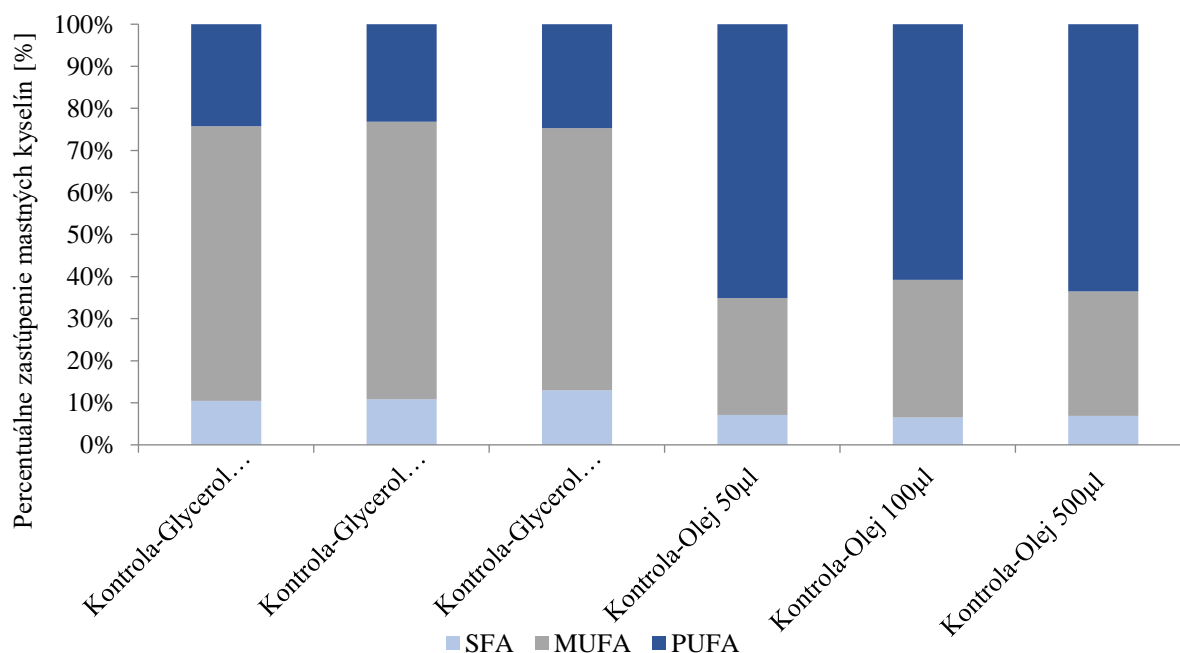
Pre glycerolové médiá, rovnako ako pri produkcii biomasy, tak i produkcia lipidov stúpala s koncentráciou mikroelementov v médiu. Pre kontrolu-glycerol 500 μ l bolo zaznamenané zastúpenie lipidov 10,40 % a pre kontrolu-glycerol 50 μ l 8,00 %.

V olejových médiách bolo taktiež najvyššie zastúpenie lipidov pri pridaní 500 μ l mikroelementov, ktoré dosiahlo 21,75 % zastúpenie lipidov, ale najnižšie zastúpenie lipidov dosiahla vzorka kontrola-olej 100 μ l s 16,57 %.



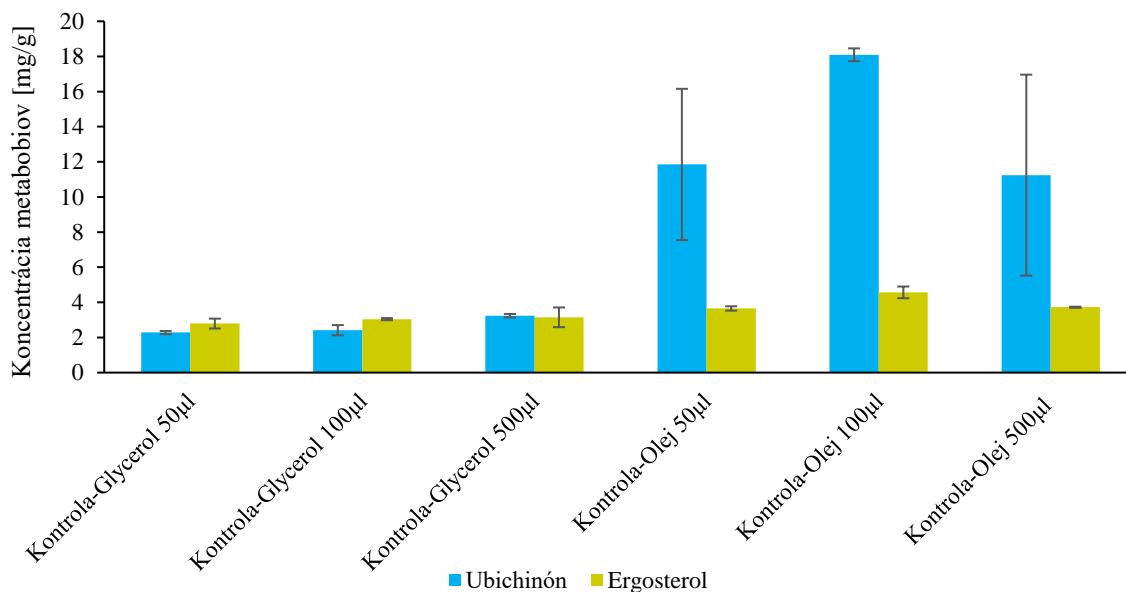
Obrázok 37: Graf produkcie biomasy a zastúpenie lipidov kontrolných médií kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*

Zastúpenie mastných kyselín, na grafe (Obrázok 38) sa v glycerolových médiách pri použití rozličných objemov mikroelementov zmenilo len nepatrne. Olejové médiá vykazovali zmeny v pomere, pričom najvyšší podiel PUFA bol zaznamenaný v kontrole-olej 50 µl a to 65,12 % a najnižší podiel v kontrole-olej 100 µl kde dosiahla len 60,4 %.



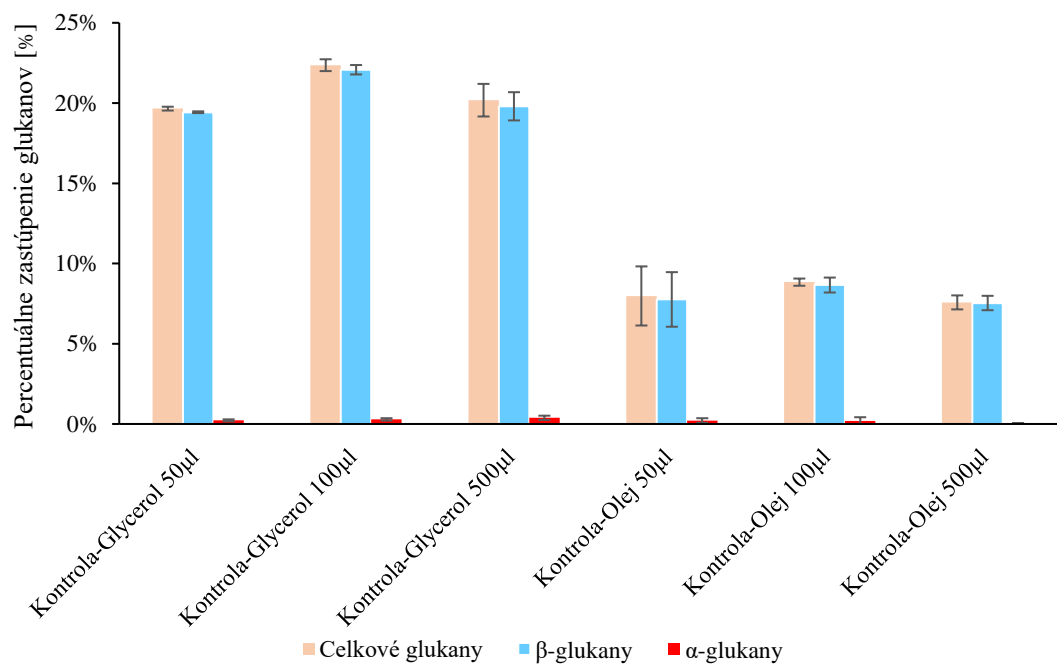
Obrázok 38: Graf zloženia mastných kyselín podľa saturácie pre kontrolné médiá kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*

Na grafe (Obrázok 39) vidíme, že objem použitého roztoku mikroelementov ovplyvnil mierne produkciu ergosterolu a ubichinónu. Produkcia oboch metabolitov sa v glycerolových kontrolách zvýšila s rastúcim objemom mikroelementov. Kontrola-glycerol 50 μ l dosahovala hodnoty 2,79 mg/g ergosterolu a 2,28 mg/g ubichinónu pričom kontrola-glycerol 500 μ l dosiahla 3,15 mg/g ergosterolu a 3,24 mg/g ubichinónu. V olejových médiách najvyššie zastúpenie ubichinónu a ergosterolu bolo dosiahnuté vo vzorke kontroly-oleja 100 μ l s výťažkom ergosterolu 4,57 mg/g a ubichinónu 18,09 mg/g. Najnižšie zastúpenie ubichinónu a ergosterolu mala vzorka kontrola-olej 50 μ l s výťažkom ergosterolu 3,65 mg/g a ubichinónu 11,85 mg/g.



Obrázok 39: Graf zastúpenia ergosterolu a ubichinónu v kontrolných médiách kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*

Na grafe (Obrázok 40) môžeme vidieť, že pri glycerolových médiách mala vzorka kontrola-glycerol 50 μ l nižší obsah glukánov, a to 19,43 % β -glukánov ako pri vyšších objemoch roztoku mikroelementov. Najvyššie zastúpenie glukánov bolo zistené vo vzorke kontrola-glycerol 100 μ l, kedy hodnota β -glukánov dosiahla 22,08 %. Olejové médiá vykazovali veľmi podobný trend, kedy najvyššie dosiahnuté zastúpenie glukánov dosiahla vzorka s prídavkom 100 μ l mikroelementov, a to 8,66 % β -glukánov oproti vzorke s najnižším zastúpením β -glukánov, kontroly-oleja 500 μ l s 7,54 % β -glukánov.



Obrázok 40: Graf zastúpenia glukánov v kontrolných médiách kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*

6 ZÁVER

Cieľom tejto práce bolo overiť potenciál odpadných proteínových substrátov ako lacnú alternatívu nutričov pre kultiváciu vybraných kmeňov kvasiniek: *Rhodotorula kratochvilovae* (CCY 20-2-26), *Rhodotorula toruloides* (CCY 62-2-4) a *Metschnikowia pulcherrima clade* (CCY 029-002-149). V experimentálnej časti bol sledovaný rast, metabolická aktivita a schopnosť tvorby obohatenej kvasinkovej biomasy za podmienok nutričného stresu, pričom sa porovnávali rôzne typy bielkovinových substrátov, a to ľanové výlisky, srvátkový proteín, srvátka, pivovarské droždie a perie.

V prvej časti tejto práce bola venovaná pozornosť obohateniu biomasy kvasiniek o dusíkaté látky- proteíny prostredníctvom suplementácie kultivačných produkčných médií proteínovými hydrolyzátmi s C:N pomerom 13. Obsah dusíka bol stanovený Kjeldahlovou metódou v lyofilizovanej biomase po kultivácii. Výsledky ukázali rozdielnu schopnosť použitých kmeňov akumulovať dusík v závislosti od použitého zdroja. Zatiaľ čo *Rhodotorula kratochvilovae* (CCY 20-2-26) nedosiahla zvýšenie obsahu hrubej bielkoviny oproti kontrole, *Rhodotorula toruloides* (CCY 62-2-4) vykázala pozitívnu reakciu najmä na ľanový hydrolyzát s nárastom o 10 % oproti kontrole. Najlepšiu odpoveď však dosiahla kvasinka *Metschnikowia pulcherrima clade* (CCY 029-002-149), kde aplikácia srvátkového hydrolyzáta viedla k nárastu obsahu hrubej bielkoviny až o 35 % oproti kontrole. Tieto výsledky naznačujú, že účinok proteínových hydrolyzátov je druhovo špecifický, pričom u niektorých kmeňov môžu efektívne nahradiť anorganický dusík a zároveň zvýšiť nutričnú hodnotu biomasy.

V druhej časti bola vyhodnotená schopnosť vybraných kvasiniek produkovať biomasu, lipidy, karotenoidy, ergosterol, ubichinón β -glukány a profil mastných kyselín pri stresových podmienkach produkčných médií.

Za stresových podmienok olejových produkčných médií obohatených o proteínové hydrolyzáty sa ukázalo, že tieto podmienky nie sú optimálne na produkciu biomasy pri skúmaných kmeňoch oleogénnych kvasiniek. Oba karoténogénne kmeňe *Rhodotorula kratochvilovae* i *Rhodotorula toruloides*, vykazovali minimálny rast, čo naznačuje ich obmedzenú schopnosť efektívne využívať olejnaté zdroje uhlíka v kombinácii s hydrolyzátmi. Naopak, kmeň *Metschnikowia pulcherrima clade* ako jediný preukázal zvýšenú produkciu biomasy, predovšetkým pri kombinácii ľanového oleja s hydrolyzátom peria alebo pivovarského droždia. Zastúpenie mastných kyselín bolo značne ovplyvnené použitím ľanového oleja, kedy olejové médiá vykazovali zvýšenú akumuláciu polynenasýtených mastných kyselín.

Kvasinka *Rhodotorula kratochvilovae* mala najvyššie zastúpenie mastných kyselín vo vzorkách hydrolyzáta pivovarského droždia, kedy pri použití olejného zdroja uhlíku narástol na 14,41 %. Pri glycerolovom zdoji uhlíku vzrástol na 13,73 %. Produkcia karotenoidov bola u tohto kmeňa značne nízka. Taktiež, produkcia ergosterolu a ubichinónu bola značne obmedzená s najvyšším zastúpením ergosterolu pri vzorke perie-olej s 4,42 mg/g a ubichinónu pri vzorke perie-glycerol s 6,80 mg/g. Na druhú stranu, všetky glycerolové médiá tohto kmeňa vykazovali vysokú produkciu β -glukánov s najvyšším zastúpením pri vzorke droždie-glycerol s 26,67 % a to aj oproti ostatným skúmaným kvasinkám.

Kvasinka *Rhodotorula toruloides* vykazuje najvyššie zastúpenie lipidov v médiu ľan-olej s 19,19 %, pri použití iných hydrolyzátoov bola táto hodnota nižšia. U glycerolových médií bola zaznamenaná nízka produkcia lipidov. Na druhú stranu, táto kvasinka produkovala za daných podmienok prirodzene vyššie množstvo karotenoidov, ktoré bolo najvyššie pri vzorke srvátky s 4,59 mg/g. V glycerolových médiách je zaznamenaný klesajúci trend karotenoidov a ergosterolu pri použití hydrolyzátoov. Pri olejových médiách sa produkcia karotenoidov značne zvýšila oproti vzorke kontrola-olej s najlepšimi výsledkami pri vzorke perie-olej. Produkcia β -glukánov bola nižšia ako u kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*, ale je na nej vidieť veľmi podobný trend.

Kvasinka *Metschnikowia pulcherrima clade* produkovala zvýšené množstvo lipidov len za určitých kombinácií nutrientov. Najvyššie zastúpenie lipidov mala vo vzorke droždie-olej a to 24,72 %, čo je najvyššie zastúpenie lipidov zo všetkých použitých kvasiniek. Produkcia ergosterolu i ubichinónu bola nízka. Produkcia ergosterolu a ubichinónu bola porovnateľná s produkciou kmeňa *Rhodotorula kratochvilovae*. Percentuálne zastúpenie β -glukánov u glycerolových médií klesalo pri použití hydrolyzátoov. Pri olejových médiách nastal nárast β -glukánov s najvyšším pri vzorke perie-olej na 13,91 %

Na základe získaných výsledkov možno konštatovať, že jednotlivé kmene kvasiniek vykazovali rozdielnu odpoveď na zvolené kultivačné podmienky s použitím proteínových odpadných hydrolyzátoov. *Rhodotorula kratochvilovae* sa ukázala ako najvhodnejšia pre produkciu β -glukánov, zatiaľ čo *Rhodotorula toruloides* dosiahla priaznivé výsledky najmä v produkcii lipidov, karotenoidov a ergosterolu. *Metschnikowia pulcherrima clade* vykazovala taktiež priaznivé výsledky syntézy lipidov a taktiež utilizácie olejového zdroja uhlíka na produkciu biomasy.

V poslednej časti práce bol zisťovaný vplyv mikroelementov na rast a produkciu vybraných kvasiniek. Z výsledkov môžeme usúdiť, že koncentrácia mikroelementov má značný vplyv na správanie kvasiniek a je rozličná pre olejové a glycerolové médiá.

Produkcia biomasy a zastúpenie mastných kyselín neboli prakticky ovplyvnené zmenou objemu mikroelementov. Na druhú stranu, produkcia lipidov sa výrazne zmenila. Všetky kvasinky kultivované s olejovým zdrojom uhlíka vykazovali vyššiu produkciu lipidov pri použití 500 μ l roztoku mikroelementov. Zastúpenie lipidov v kontrolných médiách s glycerolom sa významne nemenilo. Karoténogénne kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae* a *Rhodotorula toruloides* mali najvyššie zastúpenie lipidov pri 50 μ l, avšak kvasinka *Metschnikowia pulcherrima clade* mala najvyššie zastúpenie lipidov pri 500 μ l.

Zmeny produkcií karotenoidov, ubichinónu a β -glukánov boli značne závislé i od samotného kmeňa kvasinky.

Rhodotorula kratochvilovae produkovala najvyššie množstvo karotenoidov, ubichinónu pri použití 500 μ l v glycerolových médiách. V olejových médiách však vykazovala najvyššiu produkciu metabolitov pri použití 50 μ l mikroelementov. Produkcia β -glukánov sa značne nemenila, ale u glycerolových médií je vidieť mierny pokles produkcie β -glukánov s použitím vyššieho objemu roztoku mikroelementov.

Rhodotorula toruloides produkovala najvyššiu koncentráciu karotenoidov i ubichinónu v glycerolových médiách pri použití 50 μ l mikroelementov. V olejových kontrolných médiách to bolo presne naopak a najvyššiu koncentráciu dosahovala pri použití 500 μ l. Pre výťažnosť β -glukánov je najlepšie použiť 500 μ l mikroelementov.

Kvasinku *Metschnikowia pulcherrima clade* je najvýhodnejšie kultivovať pre produkciu ubichinónu a β -glukánov, so 100 μ l roztoku mikroelementov, kedy dosahuje najlepšie výsledky produkcie týchto metabolitov, či už sa jedná o olejové alebo glycerolové médiá.

Použitie rozličných objemov mikroelementov sa ukázalo ako dôležitý parameter pri kultivácii obohatenej kvasinkovej biomasy, ktorým ide ovplyvniť produkcia metabolitov vybraných kvasiniek. Optimálne množstvo závisí od požadovaného metabolitu, druhu kvasinky i od uzlíkatého zdroja.

Celkovo možno povedať, že vybrané oleogénne kvasinky sú schopné utilizovať odpadné substráty bohaté na dusík a dokážu ich inkorporovať do svojej biomasy. Tieto kvasinky boli taktiež schopné za daných podmienok produkcie bioaktívnych látok, ktoré majú veľký potenciál v potravinárskom, krmivárskom alebo kozmetickom priemysle.

7 ZDROJE POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] BOEKHOUT, Teun; AMEND, Anthony S.; EL BAIDOURI, Fouad; GABALDÓN, Toni; GEML, József et al. Trends in yeast diversity discovery. Online. *Fungal Diversity*. 2022, roč. 114, č. 1, s. 491-537. ISSN 1560-2745. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00494-6>. [cit. 2025-04-30].
- [2] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 3. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6
- [3] SHURSON, G.C. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. Online. *Animal Feed Science and Technology*. 2018, roč. 235, s. 60-76. ISSN 03778401. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.11.010>. [cit. 2024-10-09].
- [4] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. Taxonómia kvasiniek a kvasinkových mikroorganizmov. Bratislava: Alfa, 1990. ISBN 80-05-00644-6.
- [5] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky a kvasinkové mikroorganizmy*. Bratislava: Alfa, 1982.
- [6] DEBBARMA, Reshmi; SINGH, Soibam Khogen; WAIKHOM, Gusheinzed; BISWAS, Pradyut; MEENA, D.K. et al. Biofloc technology: a strategic way to waste recycling in aquaculture. Online. In: *Advances in Resting-state Functional MRI*. Elsevier, 2023, s. 395-419. ISBN 9780323991452. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99145-2.00017-3>. [cit. 2025-04-01].
- [7] BRUST, Gerald E. Management Strategies for Organic Vegetable Fertility. Online. In: *Safety and Practice for Organic Food*. Elsevier, 2019, s. 193-212. ISBN 9780128120606. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812060-6.00009-X>. [cit. 2025-04-01].
- [8] KNOP, Michael. Yeast cell morphology and sexual reproduction – A short overview and some considerations. Online. *C R Biol*. 2011, roč. 334, č. 8-9, s. 599-606. ISSN 1768-3238. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.crv.2011.05.007>. [cit. 2024-12-08].
- [9] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkových mikroorganizmov*. Bratislava: Alfa, 1990. ISBN 80-05-00644-6.
- [10] WANKHEDE, Lachi; BHARDWAJ, Gaurav; SAINI, Rahul; OSORIO-GONZALEZ, Carlos S. a BRAR, Satinder Kaur. Technological modes and processes to enhance the *Rhodospiridium toruloides* based lipid accumulation. Online. *Microbiological Research*. 2024, roč. 287. ISSN 09445013. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127840>. [cit. 2024-12-12].
- [11] SIPICZKI, Matthias. Taxonomic Revision of the pulcherrima Clade of *Metschnikowia* (Fungi): Merger of Species. Online. *Taxonomy*. 2022, roč. 2, č. 1, s. 107-123. ISSN 2673-6500. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/taxonomy2010009>. [cit. 2025-02-10].
- [12] LACHANCE, Marc-André. *Metschnikowia*. Online. In: *The Yeasts*. Elsevier, 2011, s. 575-620. ISBN 9780444521491. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00046-X>. [cit. 2025-02-10].
- [13] VICENTE, Javier; RUIZ, Javier; BELDA, Ignacio; BENITO-VÁZQUEZ, Iván; MARQUINA, Domingo et al. The Genus *Metschnikowia* in Enology.

- Online. *Microorganisms*. 2020, roč. 8, č. 7. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071038>. [cit. 2025-02-10].
- [14] NĚMCOVÁ, Andrea; SZOTKOWSKI, Martin; SAMEK, Ota; CAGÁŇOVÁ, Linda; SIPICZKI, Matthias et al. Use of Waste Substrates for the Lipid Production by Yeasts of the Genus *Metschnikowia*—Screening Study. Online. *Microorganisms*. 2021, roč. 9, č. 11. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112295>. [cit. 2025-02-10].
- [15] MCMURRY, John. *Organická chemie*. Překlady vysokoškolských učebnic. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2015. ISBN 978-80-214-4769-1.
- [16] KODÍČEK, Milan; VALENTOVÁ, Olga a HYNEK, Radovan. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. 3. přepracované vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2022. ISBN 978-80-7592-124-6.
- [17] SANDHIR, R. METABOLIC PATHWAYS | Lipid Metabolism. Online. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, 2014, s. 520-534. ISBN 9780123847331. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00200-7>. [cit. 2025-03-12].
- [18] PAPOUTSIS, Konstantinos; ZHANG, Jinyuan; BOWYER, Michael C.; BRUNTON, Nigel; GIBNEY, Eileen R. et al. Fruit, vegetables, and mushrooms for the preparation of extracts with α -amylase and α -glucosidase inhibition properties: A review. Online. *Food Chemistry*. 2021, roč. 338. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128119>. [cit. 2025-03-12].
- [19] DEVERS, Patricia M. a BROWN, Warren M. Fatty Acid Profiling. Online. In: *Textbook of Natural Medicine*. Elsevier, 2020, 127-133.e2. ISBN 9780323523424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-43044-9.00013-3>. [cit. 2025-03-12].
- [20] LOTTENBERG, Ana Maria; AFONSO, Milessa da Silva; LAVRADOR, Maria Silvia Ferrari; MACHADO, Roberta Marcondes a NAKANDAKARE, Edna Regina. The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. Online. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012, roč. 23, č. 9, s. 1027-1040. ISSN 09552863. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.004>. [cit. 2025-03-12].
- [21] LIU, Yao; SHEN, Na; XIN, Huawei; YU, Lili; XU, Qing et al. Unsaturated fatty acids in natural edible resources, a systematic review of classification, resources, biosynthesis, biological activities and application. Online. *Food Bioscience*. 2023, roč. 53. ISSN 22124292. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102790>. [cit. 2025-03-12].
- [22] KOUTSOS • , Elizabeth; GELIS • , Stacey a ECHOLS, Michael Scott. Advancements in nutrition and nutritional therapy. Online. In: *Current Therapy in Avian Medicine and Surgery*. Elsevier, 2016, s. 142-176. ISBN 9781455746712. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4671-2.00013-6>. [cit. 2025-03-29].
- [23] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie: Živý systém jako chemický stroj*. Sv. 2. Praha: Academia, 1992. ISBN 80-200-0441-6.
- [24] VASILJEVSKI, Emily R.; SUMMERS, Matthew A.; LITTLE, David G. a SCHINDELER, Aaron. Lipid storage myopathies: Current treatments and future

- directions. Online. *Progress in Lipid Research*. 2018, roč. 72, s. 1-17. ISSN 01637827. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.08.001>. [cit. 2025-03-30].
- [25] LAGE, Ricardo; DIÉGUEZ, Carlos; VIDAL-PUIG, Antonio a LÓPEZ, Miguel. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. Online. *Trends in Molecular Medicine*. 2008, roč. 14, č. 12, s. 539-549. ISSN 14714914. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.09.007>. [cit. 2025-03-30].
- [26] HUANG, Jiayin; HU, Zhiheng; LI, Gaoshang; HU, Lingping; CHEN, Jianchu et al. Make your packaging colorful and multifunctional: The molecular interaction and properties characterization of natural colorant-based films and their applications in food industry. Online. *Trends in Food Science & Technology*. 2022, roč. 124, s. 259-277. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.04.028>. [cit. 2025-03-30].
- [27] PAGELS, Fernando a GUEDES, A. Catarina. B-Carotene from *Dunaliella*: Production, applications in food/feed, and recent advances. Online. In: *Handbook of Food and Feed from Microalgae*. Elsevier, 2023, s. 203-219. ISBN 9780323991964. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99196-4.00020-6>. [cit. 2025-03-30].
- [28] ARYEE, Alberta NA; AGYEI, Dominic a AKANBI, Taiwo O. Recovery and utilization of seaweed pigments in food processing. Online. *Current Opinion in Food Science*. 2018, roč. 19, s. 113-119. ISSN 22147993. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.03.013>. [cit. 2025-03-30].
- [29] MATA-GÓMEZ, Luis Carlos; MONTAÑEZ, Julio César; MÉNDEZ-ZAVALA, Alejandro a AGUILAR, Cristóbal Noé. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. Online. *Microbial Cell Factories*. 2014, roč. 13, č. 1. ISSN 1475-2859. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-12>. [cit. 2025-03-31].
- [30] BUFKA, Jiří; VAŇKOVÁ, Lenka; SÝKORA, Josef a KRÍŽKOVÁ, Věra. Exploring carotenoids: Metabolism, antioxidants, and impacts on human health. Online. *Journal of Functional Foods*. 2024, roč. 118. ISSN 17564646. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106284>. [cit. 2025-03-31].
- [31] JORDÁ, Tania a PUIG, Sergi. Regulation of Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Online. *Genes*. 2020, roč. 11, č. 7. ISSN 2073-4425. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/genes11070795>. [cit. 2025-03-31].
- [32] RÓG, Tomasz; PASENKIEWICZ-GIERULA, Marta; VATTULAINEN, Ilpo a KARTTUNEN, Mikko. Ordering effects of cholesterol and its analogues. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2009, roč. 1788, č. 1, s. 97-121. ISSN 00052736. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.08.022>. [cit. 2025-03-31].
- [33] SITKOFF, Anna. Medicinal Mushrooms. Online. In: *Textbook of Natural Medicine*. Elsevier, 2020, 679-692.e6. ISBN 9780323523424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-43044-9.00090-X>. [cit. 2025-03-31].
- [34] TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.M. a TEW, K.D. Phytosterols in the prevention of human pathologies. Online. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2003, roč. 57, č. 8, s. 321-325. ISSN 07533322. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(03\)00104-5](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(03)00104-5). [cit. 2025-03-31].

- [35] AASETH, Jan; ALEXANDER, Jan a ALEHAGEN, Urban. Coenzyme Q10 supplementation – In ageing and disease. Online. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2021, roč. 197. ISSN 00476374. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111521>. [cit. 2025-03-31].
- [36] SAHEBKAR, Amirhossein; SERBAN, Maria-Corina; GLUBA-BRZÓZKA, Anna; MIKHAILIDIS, Dimitri P.; CICERO, Arrigo F. et al. Lipid-modifying effects of nutraceuticals: An evidence-based approach. Online. *Nutrition*. 2016, roč. 32, č. 11-12, s. 1179-1192. ISSN 08999007. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.04.007>. [cit. 2025-03-31].
- [37] DHAPTE, Vividha a POKHARKAR, Varsha. Microbe-Based Versatile Polymeric Bionanoplatfroms in Anticancer Therapy. Online. In: *Polymeric Nanoparticles as a Promising Tool for Anti-cancer Therapeutics*. Elsevier, 2019, s. 281-292. ISBN 9780128169636. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816963-6.00013-3>. [cit. 2025-03-31].
- [38] HE, Liuyang; ZHU, Zhichao a QI, Chunjian. B-Glucan—A promising immunocyte-targeting drug delivery vehicle: Superiority, applications and future prospects. Online. *Carbohydrate Polymers*. 2024, roč. 339. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122252>. [cit. 2025-04-01].
- [39] ZHOU, Jing; LI, Dapeng; ZHANG, Xuemeng; LIU, Chao a CHEN, Yinguang. Valorization of protein-rich waste and its application. Online. *Science of The Total Environment*. 2023, roč. 901. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166141>. [cit. 2024-05-13].
- [40] ZHAO, Qian; LI, Shuyao; WANG, Fu; LU, Jianyu; TAN, Guofei et al. Transcriptome analysis and physiological response to heat and cold stress in flax (*Linum usitatissimum* L) at the seedling stage. Online. *Environmental and Experimental Botany*. 2025, roč. 229. ISSN 00988472. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2024.106076>. [cit. 2025-03-02].
- [41] LAMBRECHT, Darlei Michalski; SGARBOSSA, Jaqueline; DIEI, Maria Inês; DAL'COL LÚCIO, Alessandro; CASSOL, Jéssica Cezar et al. Experimental plan for oilseed flax in multi-environment trials. Online. *European Journal of Agronomy*. 2023, roč. 151. ISSN 11610301. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.eja.2023.126989>. [cit. 2025-03-02].
- [42] XU, Lei; WEI, Zixi; GUO, Yao; GUO, Baozhu; CAI, Long et al. Effects of dietary supplementation with fermented flaxseed meal on the growth performance, immune function, and intestinal microbiota of growing pigs. Online. *Animal Feed Science and Technology*. 2024, roč. 316. ISSN 03778401. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2024.116079>.
- [43] ZHAO, Changhui; CHEN, Nan a ASHAOLU, Tolulope Joshua. Whey proteins and peptides in health-promoting functions – A review. Online. *International Dairy Journal*. 2022, roč. 126. ISSN 09586946. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105269>. [cit. 2022-04-08].
- [44] RYAN, Michael P. a WALSH, Gary. The biotechnological potential of whey. Online. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2016, roč. 15, č. 3, s.

- 479-498. ISSN 1569-1705. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9402-1>. [cit. 2025-03-06].
- [45] MADUREIRA, Ana R.; PEREIRA, Cláudia I.; GOMES, Ana M.P.; PINTADO, Manuela E. a XAVIER MALCATA, F. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. Online. *Food Research International*. 2007, roč. 40, č. 10, s. 1197-1211. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.005>. [cit. 2025-03-06].
- [46] WEI, Guozheng; SHANG, Wenqi; XIE, Zhengjie; ZHANG, Mengran; DAN, Meiling et al. Unlocking high-value components from Brewer's spent yeast for innovative food applications. Online. *Food Bioscience*. 2024, roč. 59. ISSN 22124292. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104047>.
- [47] MEENA, D.K.; HASSAN, M.A.; DAS, B.K.; SAHOO, A.K.; SATVIK, K. et al. Distillery coproduct in fish nutrition: strategies for transforming waste into wealth. Online. In: *Advances in Resting-state Functional MRI*. Elsevier, 2023, s. 467-512. ISBN 9780323991452. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99145-2.00013-6>. [cit. 2025-03-11].
- [48] ROMANO, Nicholas. Alternative and new sources of feedstuffs. Online. In: *Enzymes in Human and Animal Nutrition*. Elsevier, 2018, s. 381-401. ISBN 9780128054192. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00019-8>. [cit. 2025-03-11].
- [49] PEARL, G.G. BY-PRODUCTS | Inedible. Online. In: *Encyclopedia of Meat Sciences*. Elsevier, 2004, s. 112-125. ISBN 9780124649705. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B0-12-464970-X/00047-7>. [cit. 2025-03-11].
- [50] ALTUNTAS, Semin a HAPOGLU, Hale. Kefir-Type Drinks From Whey. Online. In: *Non-Alcoholic Beverages*. Elsevier, 2019, s. 185-226. ISBN 9780128152706. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815270-6.00007-4>. [cit. 2025-04-01].
- [51] PITHER, R.J. FOOD AND NUTRITIONAL ANALYSIS | Vegetables and Legumes. Online. In: *Encyclopedia of Analytical Science*. Elsevier, 2005, s. 320-328. ISBN 9780123693976. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00188-6>. [cit. 2025-04-01].
- [52] CHRISTIAN, Gary D. *Analytical chemistry*. 5th ed. New York: John Wiley, 1994. ISBN 0-471-59761-9.
- [53] HELL, Johannes; KNEIFEL, Wolfgang; ROSENAU, Thomas a BÖHMDORFER, Stefan. Analytical techniques for the elucidation of wheat bran constituents and their structural features with emphasis on dietary fiber – A review. Online. *Trends in Food Science & Technology*. 2014, roč. 35, č. 2, s. 102-113. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.10.012>. [cit. 2025-04-01].
- [54] LI, Daoliang a LIU, Shuangyin. Groundwater Quality Detection. Online. In: *Water Quality Monitoring and Management*. Elsevier, 2019, s. 269-302. ISBN 9780128113301. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811330-1.00011-9>. [cit. 2025-04-01].
- [55] HUSSAIN, Nisar; SUN, Da-Wen a PU, Hongbin. Classical and emerging non-destructive technologies for safety and quality evaluation of cereals: A review of recent

- applications. Online. *Trends in Food Science & Technology*. 2019, roč. 91, s. 598-608. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.018>. [cit. 2025-04-01].
- [56] VOET, Donald; VOETOVÁ, Judith G a VOETOVÁ, Judit G. Biochemie. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995. ISBN 80-85605-44-9.
- [57] Rhodotorula glutinis—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100(14), 6103-6117. DOI: 10.1007/s00253-016-7611-8. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7611-8>.
- [58] MUSHROOM and YEAST BETA-GLUCAN ASSAY PROCEDURE. www.megazyme.com [online]. Megazyme, February 2021 [cit. 2023-04-28]. Dostupné z: https://www.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-YBGL_DATA.pdf
- [59] HERNÁNDEZ-ALMANZA, Ayerim; MONTAÑEZ-SÁENZ, Julio; MARTÍNEZ-ÁVILA, Cristian; RODRÍGUEZ-HERRERA, Raúl a AGUILAR, Cristóbal N. Carotenoid production by Rhodotorula glutinis YB-252 in solid-state fermentation. Online. *Food Bioscience*. 2014, roč. 7, s. 31-36. ISSN 22124292. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2014.04.001>. [cit. 2025-05-01].
- [60] HOLUB, Jiří; SZOTKOWSKI, Martin; CHUJANOV, Oleg; ŠPAČKOVÁ, Dominika; SNIEGOŇOVÁ, Pavlína et al. Production of Enriched Biomass by Carotenogenic Yeasts Cultivated on by-Products of Poultry Processing—A Screening Study. Online. *Microorganisms*. 2023, roč. 11, č. 2. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020321>. [cit. 2025-05-01].
- [61] LI, Qian; WANG, Danyang; LIU, Xiaolei; LI, Anjie a CHANDRAN, Kartik. Enhanced lipid accumulation in *Metschnikowia pulcherrima* using volatile fatty acids under non-sterile repeated batch cultivation. Online. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2021, roč. 163. ISSN 09648305. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105256>. [cit. 2025-05-01].
- [62] VOSTREJS, Pavel; ADAMCOVÁ, Dana; VAVERKOVÁ, Magdalena Daria; ENEV, Vojtech; KALINA, Michal et al. Active biodegradable packaging films modified with grape seeds lignin. Online. *RSC Advances*. 2020, roč. 10, č. 49, s. 29202-29213. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D0RA04074F>. [cit. 2025-05-01].
- [63] MOONSAMY, T.A.; RAJAURIA, G.; PRIYADARSHINI, Anushree a JANSEN, M.A.K. Food waste: analysis of the complex and variable composition of a promising feedstock for valorisation. Online. *Food and Bioproducts Processing*. 2024, roč. 148, s. 31-42. ISSN 09603085. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2024.08.012>. [cit. 2025-05-04].

8 ZOZNAM SKRATIEK

ACP	proteínový prenášač acylu
DAD	Detektor diódového poľa
DMAPP	Dimetylallyldifosfát
FID	Plameňový ionizačný detektor
GC	Plynová chromatografia
GGPP	Geranylgeranyldifosfát
HMG	3-hydroxy-3-methylglutaryl
HPLC	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
IPP	Izopentenylpyrofosfát
MS	Hmotnostný spektrometer
MUFA	Mononasýtené mastné kyseliny
PUFA	Polynasýtené mastné kyseliny
SFA	Nasýtené mastné kyseliny