



Středoškolská technika 2023

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

Využití karotenogenních kvasinek v cirkulární ekonomice a biotransformace potravinářských odpadů

Jakub Šlégr

Střední průmyslová škola chemická
Vranovská 65, Brno

Anotace

V teoretické části této práce jsou popsány konkrétní typy karotenogenních kvasinek, jejich výskyt, ale i jejich vlivy. Práce seznamuje čtenáře se strukturou buněk kvasinek, jejich vlastnostmi a druhy chemickým složením buněk kvasinek. Speciální a velmi významnou část, teoretické části tvoří kapitola o betaglukanech, které mají velký potenciál, v léčení některých závažných chorob. Praktická část je zaměřená na produkci prostředí pro množení kvasinek, práci s nimi, tak aby se co nejméně narušilo jejich přirozené prostředí. Zahrnuje kompletní postup od jejich využití, přes jejich analýzu, zpracování vedlejších produktů nebo znovu využití některých použitých složek jako například biomasy. Součástí praktické části jsou i mnohé možné analýzy nebo například detailní popis extrakce karotenoidů pro HPLC (*vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii*). Součástí jsou také tabulky a fotky z praktické práce v laboratoři na FCH VUT.

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Využití karotenogenních kvasinek v cirkulární ekonomice a biotransformace potravinářských odpadů

Jakub Šlégr
Jihomoravský kraj

Brno,

2023

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Využití karotenogenních kvasinek v cirkulární ekonomice a biotransformace potravinářských odpadů

Use of carotenogenic yeasts in circular economy and biotransformation of food waste

Autor: Jakub Šlégr

Škola: Střední průmyslová škola chemická Brno, Vranovská 65, 614 00, Brno

Kraj: Jihomoravský

Konzultant: Ing. Martin Szotkowski, Ph.D., Mgr. Olga Strouhalová

Brno, 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V městě Brně dne

Jakub Šlégr

Poděkování

V této sekci bych rád poděkoval všem, kteří se podíleli na této práci, tedy, hlavně panu doktoru Martinu Szotkowskému za možnost spolupracovat s ním na mé práci SOČ na Fakultě chemické, Vysokého učení technického, dále pak paní magistře Olze Strouhalové za konzultace v rámci naší školy. Speciální poděkování, však patří Vysokému učení technickému v Brně, že mi umožnilo na této práci pracovat.

Anotace

V teoretické části této práce jsou popsány konkrétní typy karotenogenních kvasinek, jejich výskyt, ale i jejich vlivy. Práce seznamuje čtenáře se strukturou buněk kvasinek, jejich vlastnostmi a druhy chemickým složením buněk kvasinek. Speciální a velmi významnou část, teoretické části tvoří kapitola o betaglukanech, které mají velký potenciál, v léčení některých závažných chorob.

Praktická část je zaměřená na produkci prostředí pro množení kvasinek, práci s nimi, tak aby se co nejméně narušilo jejich přirozené prostředí. Zahrnuje kompletní postup od jejich využití, přes jejich analýzu, zpracování vedlejších produktů nebo znovu využití některých použitých složek jako například biomasy. Součástí praktické části jsou i mnohé možné analýzy nebo například detailní popis extrakce karotenoidů pro HLPC (*vysokoučinnou kapalinovou chromatografii*). Součástí jsou také tabulky a fotky z praktické práce v laboratoři na FCH VUT.

Klíčová slova

- **Extrakce**-separační metoda založená na předpokladu, že jedna nebo více kapalných nebo pevných látek, které chceme separovat, se rozpouští v kapalině, která se s původní směsí nemísí, nebo se mísí jen omezeně
- **HPLC**-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- **GC**-Plynová chromatografie
- **Kvasinka**-jednobuněčný houbový mikroorganismus
- **Hydrolyza**-rozkladná reakce, při které se spotřebovává voda; např. celulóza se při hydrolyze štěpí na kratší řetězce – až na monomery
- **Inokulace**-naočkování (*očkování kvasinek do YPD média*)
- **YPD**-kvasnicový extrakt pepton-dextróza je médium pro růst kvasinek, obsahuje kvasnicový extrakt, pepton, dvakrát destilovanou vodu a glukózu (dextrózu)
- **Glukóza**-monosacharid
- **Destilovaná voda**-typ vody, která byla díky změně skupenství na vodní páru zbavena rozpuštěných minerálních látek a následně ochlazením znovu zkapalněna. Někdy tak bývá nepřesně nazývaná výrobně méně nákladná demineralizovaná voda využívaná k podobným účelům.
- **Agar**-přírodní polysacharid (*lineární polymer galaktózy*) s vysokou gelující schopností
- **Biomasa**-směs látek tvořících těla všech organismů, jak rostlin, bakterií, sinic a hub, tak i živočichů
- **Karotenoidy**-barviva rostlin, hub, řas, mikroorganismů a živočichů; jde o lipofilní organické látky ze skupiny tetraterpenoidů

Annotation

The theoretical part of this work describes specific types of organic yeast, their occurrence, but also their influences. The work introduces the reader to the structure of the yeast cells, their properties and the types of yeast cells' chemical composition. A special and very significant part, the theoretical parts form a chapter on betaglucans, which have great potential, in the treatment of some serious diseases.

The practical part is focused production of the environment for yeast to multiply, work with, so as to cause the least disturbance to their natural habitat. It involves a complete process from their use, through their analysis, processing of by-products or reuse of certain used ingredients such as biomass. The practical part also includes many possible analyses or, for example, a detailed description of carotenoid extraction for HLPC (high performance liquid chromatography). Tables and pictures from practical work in the laboratory at FCH VUT are also included.

Keywords

- **Extraction**-separation method based on the assumption that one or more liquid or solids we want to separate dissolve in a liquid that does not mix with the original mixture, or is mixed only in a limited way
- **HLPC**-high performance liquid chromatography
- **GC**-gas chromatography
- **Yeast**-single cellfungal microorganism
- **Hydrolysis**-decomposition reaction where water is consumed; e.g. cellulose splits into shorter chains during hydrolysis - except for monomers
- **Inoculation**-inoculation (*yeast vaccination to YPD media*)
- **YPD**-yeast pepton-dextrose extract is a medium for yeast growth, containing yeast extract, peptone, double distilled water and glucose (dextrose)
- **Glucose**-monosaccharide
- **Distilled water**-type of water that has been removed from dissolved minerals and subsequently re-liquefied by cooling due to a change in state to water vapour. This is sometimes known inaccurately as production less expensive demineralised water used for similar purposes.
- **Agar**-natural polysaccharide (*linear polymer of galactose*) with high gelling capacity
- **Biomass**-mixture of body-forming substances of all organisms, both plants, bacteria, sinks and fungi, as well as animals
- **Carotenoid**-dyes of plants, fungi, algae, microorganisms and animals; lipophilic organics from the tetraterpenoid group

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Teoretická Část	11
2.1	Kvasinky.....	11
2.1.1	Cytologie kvasinek.....	11
2.2	Biomasa.....	12
2.3	Karotenoidy.....	13
2.3.1	Karoteny.....	13
2.3.2	Xanthofyly	14
2.4	Lipidy	14
2.5	Betaglukany.....	15
2.5.1	Betaglukany a cholesterol	15
2.5.2	Vliv betaglukanů na cukrovku	16
2.5.3	Vliv betaglukanů na vysoký krevní tlak	16
2.5.4	Betaglukany a rakovina.....	16
3	Praktická Část	17
3.1	Použité chemikálie a přístroje	17
3.2	Chemikálie použité ke kultivaci kvasinek.....	17
3.3	Chemikálie použité pro přípravu vzorků a analýzu (HPLC, GC).....	17
3.3.1	Použité pomůcky a přístroje.....	17
3.4	Zpracování kávové sedliny.....	18
3.4.1	Sušení a extrakce.....	18
3.4.2	Kyselá hydrolyza.....	18
3.4.3	Enzymatická hydrolyza.....	18
3.5	Kultivace kvasinkového kmene <i>Rhodospodium toruloides</i> (CCY 62-2-4).....	19
3.5.1	Inokulace.....	19
3.5.2	Metoda inokulace.....	19
3.5.3	Kultivace v produkčních médiích	19
3.6	Zpracování biomasy	20
3.6.1	Gravimetrické stanovení biomasy.....	20
3.6.2	Zpracování vzorku	20
3.6.3	Analýza sacharidů metodou HPLC/RI.....	21
3.7	Extrakce karotenoidů pro HPLC	21
3.8	Analýza karotenoidů metodou HPLC/PDA	22
3.9	Transesterifikace a extrakce mastných kyselin pro GC analýzu.....	22
3.10	Analýza mastných kyselin metodou GC/FID	23
4	Výsledková část	24

4.1	Screeningové kultivace: První fáze	24
4.2	Screeningové kultivace: Druhá fáze.....	25
4.3	Třetí fáze – řízená kultivace v bioreaktoru.....	27
4.3.1	Kultivace v bioreaktorech	27
5	Závěr	31
6	Použitá literatura	32
7	Seznam obrázků a tabulek.....	33

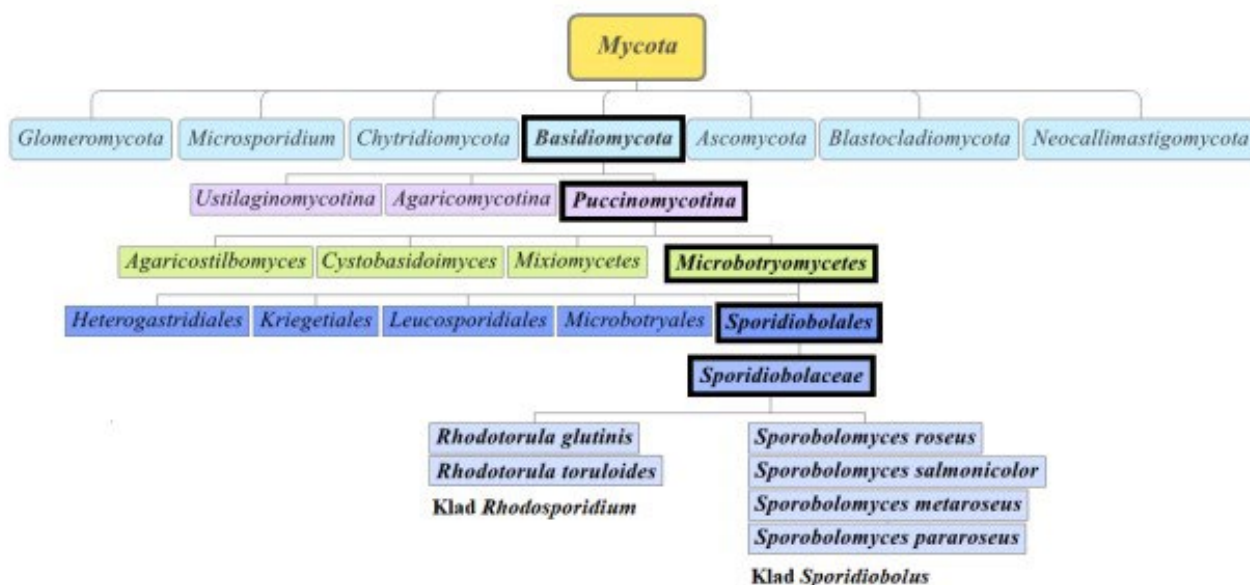
1 ÚVOD

Biotechnologický průmysl využívá biologické procesy v nejrůznějších odvětvích jako potravinářství, farmaceutický průmysl, medicína, zemědělství nebo odpadové hospodářství. Kvůli vzrůstající spotřebě se zásoby postupně vyčerpávají, a proto vzrůstá zájem o využití biomasy jako obnovitelného zdroje energie, ale také i jako zásobárna potřebných chemických látek pro člověka. Kvasinky jsou schopny využívat odpadní substráty především z potravinářského průmyslu, za tvorby přírodních chemických látek s pozitivními účinky. Karotenoidní rody kvasinek syntetizují provitaminy A, které hrají důležitou roli v lidském organismu. Karotenoidy jsou důležité nejen pro zrak, ale také chrání kůži před působením světelného záření. K zajištění správné funkce imunitního systému a metabolismu vápníku či fosforu, se uplatňují provitaminy D. Produkce ergosterolu, jakožto provitaminu D a provitaminů A, je podstatná zejména pro farmaceutický průmysl. Jejich využití je možné ve farmaceutickém průmyslu jako potravinové doplňky atd. Další významnou látkou produkovanou kvasinkami je koenzym Q, jež se uplatňuje při tvorbě energie a jako účinný antioxidant. Některé látky, které jsou v kvasinkách obsaženy, jako jsou například betaglukany, by mohly mít poměrně dost velký potenciál při léčení některých chorob, jako jsou cukrovka, rakovina nebo třeba velký obsah cholesterolu v krvi či, při léčbě hypertenze, tedy zvýšeného krevního tlaku.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Kvasinky patří mezi eukaryotní **chemoheterotrofní** jednobuněčné nižší houby. V přírodě jsou velmi rozšířené, známe více než 500 druhů tvořících přibližně 37 rodů. Buňky kvasinek a kvasinkových organismů jsou velmi různorodé. Tvar buněk se mění podle vnějších podmínek a souvisí také s funkcí buňky. Kvasinky mění svůj tvar i během svého vývoje. Můžeme pozorovat například oválné, elipsoidní či kulovité tvary. Rozlišujeme dvě hlavní třídy kvasinek a kvasinkovitých organismů: *Ascomycetes* a *Basidiomycetes*. Používanými kvasinky byly kvasinky kmene *Rhodosporidium toruloides*. [1]



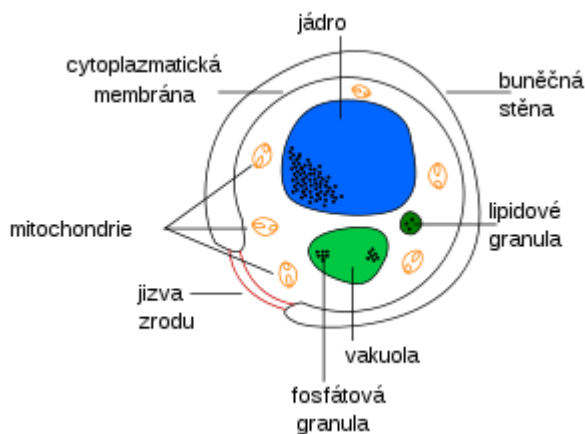
Obrázek 1: Zařazení kvasinkového kmene *Rhodosporidium toruloides* v taxonomii (Zdroj: Bc. Monika Roubalová. Studium metabolismu karotenogenních kvasinek na molekulární úrovni. Brno, 2017. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.)

2.1.1 Cytologie kvasinek

Buňky jsou základní strukturální a funkční jednotky každého živého organismu. Eukaryotické buňky se od prokaryotických odlišují obsahem membránových organel, které buňce dávají vyšší úroveň organizace, než mají buňky prokaryot. Všechny mikrobiální buňky jsou odděleny silnou a pevnou strukturou, kterou nazýváme buněčná stěna. Buněčná stěna bakterií se skládá z polysacharidů, malého množství lipidů, fosfolipidů a proteinů. V případě kvasinek jsou hlavní složkou buněčné stěny u všech kvasinek glukany, dále u některých druhů jsou přítomny také mannany, glukosamin nebo chitin. Buněčná stěna chrání buňky před vnějšími vlivy a před působením osmotického tlaku vnějšího prostředí. Pod buněčnou stěnou se nachází cytoplazmatická membrána obsahující malé póry, skládá se z fosfolipidů, proteinů a dalších molekul. Vytváří velké množství vychlípenin, jež vybíhají do cytoplazmy. Těmito póry mohou volně difundovat pouze nízkomolekulární látky, které jsou elektricky neutrální (lipofilní). Lipidová složka membrány umožňuje transport látek, které jsou rozpustné v tucích. Ostatní látky se transportují do buňky pomocí bílkovinných nosičů speciálními transportními mechanismy.

Uvnitř buňky se nachází cytoplazma, průhledná homogenní hmota obsahující vodný roztok enzymů, rezervních látek, dále vedlejší produkty metabolismů a ribozomy, na nichž dochází k syntéze bílkovin. Vodné prostředí buňky je důležité pro průběh chemických reakcí jako např. enzymové procesy uvnitř buňky. Systém dvojité membrány nazývaný jako endoplazmatické retikulum obsahuje na jeho povrchu zrníčka polyzomů, v nichž dochází k syntéze bílkovin.

Další organelou přítomnou v cytoplazmě kvasinek jsou mitochondrie. Obsahují vnější a vnitřní membránu a vnitřní tvoří vchlípeniny nazývané kristy. Jsou tvořeny proteiny, lipidy, fosfolipidy, RNA a DNA. Nacházejí se zde např. enzymy dýchacího řetězce a oxidativní fosforylace. Vakuola kvasinek je ve většině případů kulovitý membránovitý útvar. Mladé nebo pučící buňky obsahují malé, ale zato četné vakuoly, naopak starší buňky obsahují jednu velkou vakuolu. Uvnitř najdeme chemické látky jako hydrolytické enzymy, polyfosfáty, draselné ionty, aminokyseliny, puriny a jiné. Golgiho aparát mající tvar plochého měchýřku nebo cisteren uložených vedle sebe slouží pro transport prekurzorů buněčné stěny z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu a také řady dalších látek. U kvasinek obsahuje jádro dvojitou membránu s velkými póry, uvnitř jádra je jadérko srpkovitého tvaru. [1]



Obrázek 2: Stavba buněk kvasinek (Zdroj: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Kvasinky>)

2.2 Biomasa

Veškerý organický materiál zde na planetě rostlinné a živočišné zbytky, dřevo a mikrobiální kultury se označuje jako biomasa. Bílkoviny, tuky a sacharidy jsou její hlavní součástí. Korelace těchto složek závisí na druhu organismu a podmínkách kultivace. Mikrobní biomasa je vhodným doplňkovým zdrojem bílkovin získaných z procesů, ve kterých se bakterie, kvasinky nebo řasy pěstují ve velkém množství. Biomasa z kvasinek se ve velké míře používá jako doplněk proteinů v krmivech pro zvířata nebo také v lidské výživě. Běžné kmeny používané jako zdroj proteinů jsou kupříkladu *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida utilis*. [2]



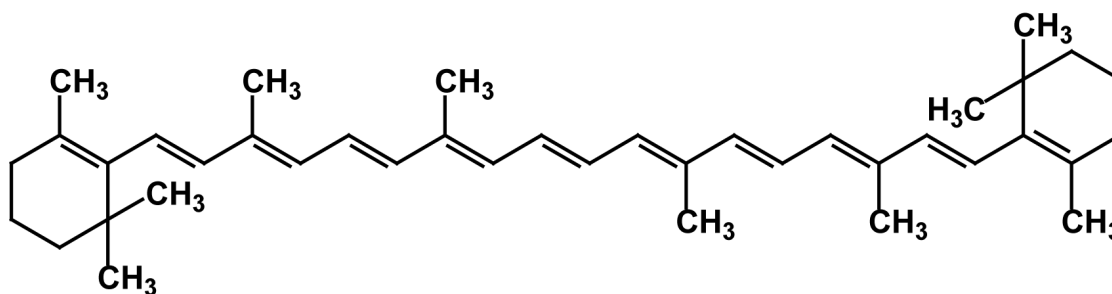
Obrázek 3: *Saccharomyces Cerevisiae* (Zdroj: <https://biologydictionary.net/saccharomyces-cerevisiae/>)

2.3 Karotenoidy

Karotenoidní látky jsou nenasycené uhlovodíky, které řadíme mezi terpeny obsahující 8 izoprenových jednotek. Díky systému konjugovaných vazeb dochází u těchto látek k absorpci elektromagnetického záření a tím zvyšují účinnost jeho zachycování. Mají hydrofobní nepolární molekuly a živočichové je nejsou schopni sami syntetizovat, pouze dokážou tyto pigmenty transformovat na látky s odlišnou strukturou. Najdeme je jako žluté, oranžové a červené pigmenty lipofilní povahy v rostlinách, houbách, řasách, mikroorganismech a také v tělech živočichů, a to například v tělech ryb. V rostlinných fotosyntetizujících pletivech se vyskytují společně s chlorofyly v organelách nazývaných chloroplasty. Dnes je známo přes 700 karotenoidních pigmentů vyskytujících se v přírodě, přibližně 50 sloučenin řadíme mezi prekurzory vitamínu A, proto tyto látky označujeme jako retinoidy. Díky antioxidačním vlastnostem přispívají k prevenci proti degenerativním onemocněním a rakovině, kde karotenoidy slouží jako lapače volných kyslíkatých radikálů (toxické formy kyslíku). Obsahují je všechny zelené rostliny i mnohé fotosyntetické bakterie, jsou doprovodnými barvivy chlorofylu. Karotenoidy dělíme do dvou skupin: Karoteny a Xanthofyly. [2]

2.3.1 Karoteny

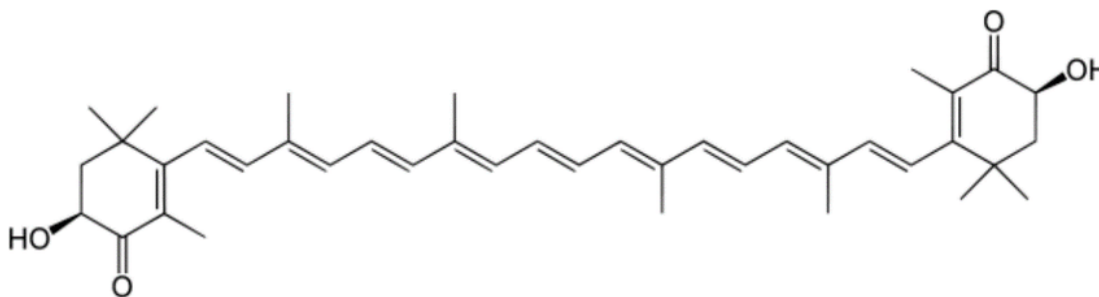
Karoteny jsou z chemického hlediska uhlovodíky s nejméně 40 atomy uhlíku. Do této skupiny řadíme nejjednodušší acyklický polynenasycený uhlovodík lykopen. Další karoteny se tvoří cyklizací z acyklických Ψ -karotenů enzymově katalyzovanou reakcí. Dochází-li k cyklizaci na obou koncích molekuly, vznikají struktury β -karotenu a α -karotenu, pokud pouze na jednom konci vzniká γ -karoten. Mezi nejvýznamnější provitaminy A, můžeme řadit β -karoten, který se většinou vyskytuje v přítomnosti α -karotenu, γ -karotenu, a dalších provitaminů. Dále mezi karoteny řadíme torulen a torularhodin, které patří mezi karotenoidní pigmenty a mají podobnou funkci jako provitaminy A. Torularhodin vzniká oxidací torulenu, který je odvozen přímo z γ -karotenu. Torulen je hlavní karotenoid rodů *Rhodotorula* a *Rhodospiridium*. Dále je mnoho rodů, kde je torulen a torularhodin syntetizován rovněž, jako například *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Sporobolomyces roseus* a *Rhodotorula rubra*. [3]



Obrázek 4: beta-karoten (Zdroj: vlastní vytvořeno v programu ChemSketch)

2.3.2 Xanthofyly

Xanthofyly vznikají primárně biochemickou oxidací karotenů. Řadíme je mezi kyslíkaté deriváty odvozené od acyklických karotenů. Mezi dihydroxysubstituované pigmenty můžeme zařadit zeaxanthin, dále lutein a astaxanthin. Astaxanthin je produkován řasami, bakteriemi a houbami. Nachází se především v živočišných tkáních u krabů, raků, humrů, lososů, krevet atd. Využívá se ke krmným účelům hospodářských zvířat. Je produkován především červenou kvasinkou *Phaffia rhodozyma*. Počáteční výtěžky astaxanthinu produkované *Phaffia rhodozyma* jsou méně než $500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Nárůst výtěžku je možný optimalizací kultivačního substrátu a vhodných podmínek pro růst. [3]



Obrázek 5: Astaxanthin (Zdroj: <https://www.watson-int.com/astaxanthin-cas-472-61-7/>)

2.4 Lipidy

Lipidy patří mezi důležitou skupinu chemických látek, jsou ve vodě nerozpustné, ale naopak dobře rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Mezi hlavní biologické funkce lipidů patří zdroj a rezerva energie, strukturní a ochranné funkce. Ne všechny mikroorganismy mohou být považovány za bohaté zdroje lipidů, i když stejně jako ve všech živých buňkách, jsou v nich obsaženy složené lipidy pro základní fungování membránových organel. Z přibližně 600 druhů různých rodů kvasinek, pouze 25 z nich je schopno akumulovat více než 25 % lipidů. Hlavním lipidem, který je akumulován v buňkách, je triacylglycerol. Triacylglyceroly jsou hlavní složkou tuků a olejů, kde glycerol je esterifikován mastnými kyselinami. Kromě produkce triacylglycerolů jsou kvasinky schopny syntetizovat fosfolipidy (2–10 % celkových lipidů) s malým množstvím sterolů a jejich esterů. Kvasinky se zdají být snadno využitelný mikroorganismus pro produkci lipidů, vzhledem k jejich rychlé akumulaci. Tyto vlastnosti mohou být výhodné pro izolaci a následné zpracování pro výrobu bionafty. Některé z těchto lipidů jsou tvořeny mononenasyčenými a polynenasycenými mastnými kyselinami. [3]

2.5 Betaglukany

Betaglukany jsou přírodní komplexní polysacharidy a věda se jim v poslední době poměrně hodně věnuje kvůli jejich imunomodulačním schopnostem. Výsledky tohoto i dalších výzkumů jsou více než povzbudivé. Mezi zdroje, které patří mezi nejbohatší zástupce betaglukanů, můžeme zmínit obiloviny (oves a ječmen), řadu hub, kvasinky a mořské řasy. Při zkoumání, jestli záleží na původu betaglukanů, se zjistilo, že důležitá je čistota produktu, ale jestli pochází z obilí nebo kvasnic není přitom až tak důležité. Velmi často se používají betaglukany z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, protože jsou pro náš organismus nejpřirozenější. Betaglukany mají schopnost podpořit obranné reakce organismu, které působí proti bakteriálním a parazitárním chorobám. Při výběru betaglukanů je třeba vybírat co nejčistší produkt a v ideálním případě ho konzumovat společně s vitamínem C a resveratrolem. To, že betaglukany mají příznivé biologické účinky, je známé delší dobu, ale vědci se mu více začali věnovat až od poloviny 20. století.

Betaglukany mají široké využití: posilují imunitní systém v případě fyzického a emočního stresu, chronické únavy, ale také při léčbě jako je ozařování nebo chemoterapie. Betaglukany snižují vysoký cholesterol, diabetes, pomáhají zvládat rakovinu, HIV/AIDS. Betaglukany se podávají intravenózně po operacích, aby se zabránilo infekci. Betaglukany jsou složeny z jednoduchých sacharidů. Glukózy jsou pospojovány především vazbou beta-1,3, proto získaly název beta-1,3-D-glukany. Betaglukany jsou označovány jako modifikátory biologické odpovědi. Jedná se o přírodní látky – polysacharidy, které se objevují v buněčných stěnách, mořských řasách, houbách nebo třeba kvasinkách. Nejrozšířenějšími přípravky jsou ty, které obsahují betaglukan izolovaný z pekařských a pivovarských kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Ty jsou našemu tělu totiž nejpřirozenější a také biologicky nejaktivnější jsou právě betaglukany se základním řetězcem z molekul glukózy pospojované vazbou 1,3 a s postranním glukózovým řetězcem v pozici 1,6. Makrofágy patří mezi hlavní části imunitního systému. Lidské tělo obsahuje ve tkáních, orgánech, krvi a lymfě miliardy makrofágů. Jedná se vlastně o první obrannou linii imunitní odpovědi. A právě betaglukany patří mezi nejčastější přírodní aktivátory těchto makrofágů. Jsou vysoce ceněné hlavně pro svou imunomodulační aktivitu a pro antikarcinogenní působení. Řadí se mezi takzvané PAMP – pathogen associated molecular patterns (s patogenem asociované molekulární vzory). Imunitní systém je rozpoznává s tím, že ihned zahajuje imunitní odpověď. [4]

2.5.1 Betaglukany a cholesterol

Bylo zjištěno, že při užívání betaglukanů z kvasinek nebo ječmene dochází k poklesu hladiny celkového cholesterolu a lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) neboli „špatného“ cholesterolu. Toho bylo dosaženo u osob s vysokým cholesterolem po několika týdnech léčby. Existuje ale i výzkum, který výše uvedené popírá. Vědci se domnívají, že tento rozdíl je způsoben způsobem zpracování produktu s betaglukany a jeho čistota. Zvýšené hladiny lipoproteinů v celkové a nízké hustotě (LDL – „špatný“ cholesterol) se mají za základní rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění. Studie zkoumala β-glukany z ovsa především pro jeho diskutovaný potenciál snižovat cholesterol.

Ve výsledku bylo zjištěno, že studie provedené během posledních 13 let podporují návrh, že příjem ovesných β-glukanů v denních dávkách (kolem 3 g) může snížit hladinu celkového cholesterolu a lipoproteinů s nízkou hustotou plazmy (LDL) o 5 až 10 % u normo-cholesterolemických nebo hypercholesterolemických subjektů. Studie ukázaly, že spotřeba ovsa je v průměru spojena s 5% a 7% snížením celkové hladiny LDL cholesterolu. Významná vědecká dohoda nadále podporuje vztah mezi hladinou β-glukanů a hladinou cholesterolu v krvi, přičemž novější údaje jsou v souladu s předchozími závěry FDA (US Food and Drug Administration) JHCI (Joint Health Claims Initiative). [5]

2.5.2 Vliv betaglukanů na cukrovku

Diabetes mellitus je typický vysokou hladinou glukózy v krvi. Doprovází ho projevy jako je žízeň, častější močení a úbytek hmotnosti. Příčinou je špatné zásobování inzulínem, snížení transportu glukózy z krve do svalových a tukových buněk. Riziko spočívá hlavně ve vzniku kardiovaskulárních onemocnění, vysokém tlaku, zvýšením lipidů. Z výsledků vyplývá, že betaglуканы eliminují tyto faktory. Kromě toho podporují hojení ran a mají vliv na ischemickou chorobu srdeční. Důležité je tyto souvislosti dále zkoumat a využívat čisté betaglуканы. Protože onemocnění cukrovkou, speciálně 2. typu, je civilizačním problémem, vyplatí se využít potenciálů, které nové možnosti nabízejí. A betaglуканы by mezi ně mohly patřit. Betaglуканы snižují hladinu glukózy u diabetických pacientů. Lepší výsledky závisely na delším časovém období. [4] [6]

2.5.3 Vliv betaglukanů na vysoký krevní tlak

Zdá se, že betaglуканы snižují krevní tlak u některých lidí s vyšším indexem tělesné hmotnosti. Randomizovaná, dvojitě zaslepená, kontrolovaná klinická studie – 97 mužů a žen s klidovým systolickým krevním tlakem 130-179 mm Hg, nebo diastolickým krevním tlakem 85-109 mm Hg konzumovalo po 12 týdnů potraviny s ovesnými betaglуканы nebo kontrolní potraviny. Během léčby nebyly pozorovány žádné významné rozdíly u oxidativního stresu a výsledky naznačují také příznivé účinky potravin s ovesnými betaglуканы na metabolismus uhlohydrátů a na krevní tlak u obézních subjektů. [7]

2.5.4 Betaglуканы a rakovina

Imunitní systém organismu chrání před negativními vlivy z okolí. Jestliže je ale rakovina agresivní, nemusí být imunitní odpověď dostatečně silná, aby zničila všechny rakovinné buňky. Medicíně se rakovinu stále daří těžko zvládat, navíc léčba v podobě chemoterapie nebo radioterapie je pro organismus často velmi zatěžující. Při hledání možností, jak léčbu a následnou péči podpořit, se využívají i betaglуканы. Rakovina postihuje buňky, které bojují s infekcemi, čímž se oslabuje imunitní systém. Jednou z možností je využít i modifikátory biologické odpovědi. Jedná o formu imunoterapie, která tím, že posiluje imunitní systém, tak v důsledku vyvolává obrannou odezvu. Mezi tyto modifikátory patří i betaglуканы.

Imunomodulační účinky betaglukanů prošly testováním na nejrůznějších zvířatech a mezi zvířaty není prozatím znám druh, který by odolával příznivému vlivu těchto látek. Zjistilo se, že betaglуканы jsou schopny zpomalit růst rakovinných buněk a zabránit tak šíření do dalších částí těla. Léčba betaglуканы se pro velký potenciál stále podrobně zkoumá na zvířatech. Vliv betaglukanů na rakovinu je velmi zajímavý. Klinicky bylo prokázáno, že metastázám brání několika způsoby: jedná se o cytotoxicitu, kdy dochází ke stimulaci bílých krvinek, aby zastavily růst nádorů. Právě NK buňky (natural killer cells) jsou rozhodující pro snížení aktivity rakovinných buněk, vyhledávají a kontrolují nádory, a následně je ničí. Antiangiogeneze brání rakovinným buňkám rozvíjet síť krevních cév, což je nutné k bujení nádorů. Bylo zjištěno, že při léčbě chemoterapií následná péče pomocí betaglukanů poskytuje obnovu poškozené kostní dřeni tím, že stimuluje tvorbu červených krvinek. Nádorové buňky a další hostitelské buňky nemají povrchovou složku v podobě betaglukanů, což může být důvodem pro zranitelnost rakoviny. [4]

Rakovina plic je častou příčinou úmrtí na rakovinu. Vědci na myších modelech zkoumali kombinaci betaglukanů s léčbou bevacizumabem u lidského karcinomu plic. Terapeutická účinnost betaglukanů společně s bevacizumabem byla prokázána i u orthotopického karcinomu plic. Výsledky vypovídají o

možnosti terapeutických přínosů pro rakovinu plic, kdy roste účinnost bevacizumabu díky využití betaglukanů a společně mohou poskytnout lepší terapeutické přínosy. [6]

3 PRAKTICKÁ ČÁST

Během praktické části byly prováděny kultivační experimenty v laboratorním měřítku v Erlenmeyerových baňkách, na které bylo navázáno řízenou kultivací ve fermentoru. Výsledky kultivací byly měřeny pomocí kapalinové a plynové chromatografie, ELISA spektroskopie a postupy, které tyto měření předcházely, tyto postupy byly popsány v teoretické části.

3.1 Použité chemikálie a přístroje

3.2 Chemikálie použité ke kultivaci kvasinek

Kvasničný autolyzát, Roth (SRN)

Glycerol p.a., Lach-ner (Česká Republika)

Bakteriologický pepton, Duchefa Biochemie (Nizozemsko)

Síran amonný p.a., Penta (Česká Republika)

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-ner (Česká Republika)

Síran horečnatý heptahydrát p.a., Lach-ner (Česká Republika)

3.3 Chemikálie použité pro přípravu vzorků a analýzu (HPLC, GC)

Methanol p.a, Penta (Česká Republika)

Chlorofom p.a. Penta (Česká Republika)

Ethylacetát pro HPLC, Roth (SRN)

Acetonitril pro HPLC, Chem-Lab (Belgie)

Heptadekanová kyselina, Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina sírová 96%, Lach-ner (Česká Republika)

Methanol pro HPLC, Chem-Lab (Belgie)

Hydroxid sodný, Lach-ner (Česká Republika)

Hexan pro HPLC, Carlo ERBA (Francie)

Tris-HCl, Penta (Česká republika)

3.3.1 Použité pomůcky a přístroje

Předvážky Scout, Ohaus

Analytické váhy Boeco

Autokláv Systec

Laminární box Air Stream ESCO Class II BSC

Skříňová třepačka ZWYR-D2401, Labwirt

Třepačka WiseShake SHR-2D, Witeg

Mikroskop L II ooA, Intraco Micro

GKB Color Digital CCD kamera

Lucia Image active 5.0, Laboratory Imaging spol. s r.o.

Centrifuga Z 36 HK, Hermle
Lyofilizátor FreeZone 4.5 l Freeze Dry Systém, Labconco
Vakuová pumpa k lyofilizátoru Vakuumbrand
Homogenizátor BeadBug, Benchmark Scientific
Vortex Fixed Speed Vortex Mixer, VXMNFS, Ohaus
Termoblok Dry Block Heater, Ohaus
Fermentor RALF 7 l, BiOiNGENiRiNG
Vakuová odparka HB4 basic, HBA Labortechnik
Aparatura dle Soxhleta
HPLC/PDA sestava: Sestava Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fischer, USA)
GC/FID sestava: TRACE 1300 TM (Thermo Fischer, USA)
Vyhodnocovací software Chromeleon 7.2

3.4 Zpracování kávové sedliny

3.4.1 Sušení a extrakce

Kávová sedlina byla získána jako odpad z kávovaru na Ústavu chemie potravin a biotechnologií. Vlhká kávová sedlina byla ponechána k vysušení v horkovzdušné sušárně při teplotě 70 °C po dobu dvou dnů za občasného promísení. Sedlina zbavená vlhkosti byla poté nejemno rozemleta pomocí elektrického domácího mlýnku BOSH. Nejemno namletá sedlina byla podrobena extrakci kávového oleje v Soxhletově aparatuře v extrakční směsi o složení hexan ku izopropanolu (1:1). Patrony se sedlinou zbavenou tuků byly vysušeny v sušárně.

3.4.2 Kyselá hydrolýza

Po extrakci a vysušení bylo odváženo 200 g kávové sedliny, jež bylo vsypáno do dvoulitrové sterilační láhve s 1 litrem 1% kyseliny sírové. Takto vytvořená směs byla důkladně promísená, vložena do autoklávu a podrobena kyselé hydrolýze při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Po zchladnutí na laboratorní teplotu (21 °C) bylo v hydrolyzátu upraveno pH na hodnotu 5,5 pomocí hydroxidu draselného.

3.4.3 Enzymatická hydrolýza

Po úpravě pH byl hydrolyzát kvantitativně převeden do dvoulitrové kádinky vyhřívané magnetickou míchačkou s ohřevem za stálého míchání hřidelovou míchačkou (350 rpm). Po vyhřátí na 45 °C byly do směsi přidány enzymy v podobě hemiceluláz a celuláz. Takto vzniklá směs byla ponechána za stálého ohřevu a míchání k hydrolýze do viditelného rozkladu celulózy a hemicelulózy (výrazné zvýšení viskozity). Vzniklý hydrolyzát byl zfiltrován za sníženého tlaku a filtrát byl analyzován metodou HPLC/RI, na jejímž výstupu bylo možno zjistit koncentraci využitelných cukrů (glukózy, manózy, galaktózy a arabinózy). Na základě získaných dat o množství cukrů, byl hydrolyzát zahuštěn na požadovanou koncentraci pomocí vakuové odparky.

3.5 Kultivace kvasinkového kmene *Rhodosporidium toruloides* (CCY 62-2-4)

3.5.1 Inokulace

Na počátku bylo ve vysokotlakých hrncích vysterilováno YPD-agarové médium, jež bylo rozlito do sterilních Petriho misek. Na vychladlé agarové plotny bylo následně zaočkováno několik kliček ze zásobních kultur z kryozkumavek. Po optimálním namnožení buněk (2-3 dny) byly kultury na agarových plotnách připraveny k přeočkování do kapalných inokulačních YPD médií, připravených a vysterilovaných v Erlenmeyerových baňkách. Přeočkování bylo provedeno v poměru 1 klička kultury na 10 ml média. Složení YPD inokulačních médií je uvedeno v Tabulka 1.

Tabulka 1: Složení YPD médií.

Typ média	Složky	Množství	
YPD agarové médium	Agar	15 g	
	YPD kapalné médium	Glukóza	20 g
		Bakteriologický pepton	10 g
		Kvasničný autolyzát	20 g
		Destilovaná voda	1000 ml

3.5.2 Metoda inokulace

V rámci screeningových kultivací v laboratorním měřítku byly provedeny série kultivací v Erlenmeyerových baňkách, které byly zaměřeny na optimalizaci složení média. V rámci těchto kultivací byly provedeny 3 fáze kultivací zaměřené na optimalizaci složení kultivačního média. V těchto experimentech byl jako základ využit hydrolyzát kávové sedliny, který sloužil jako primární zdroj uhlíku. Dále byl do média v různých objemech a poměrech přidáván kávový olej. Jako srovnání byl využit odpadní fritovací olej (řepkový). Druhá fáze experimentů byla zaměřena na studium vlivu přídatku mikroelementů do média a přídatku výživného zdroje kvasničného autolyzátu. V poslední fázi byly otestovány doba kultivace a inokulační poměr. Na základě screeningových kultivací byly nejlepší podmínky převedeny do laboratorního velkoobjemového fermentoru. Kultivace probíhala za řízených podmínek. U screeningových kultivací bylo první inokulační médium (I₁) užito v množství 50 ml a druhé inokulační médium (I₂) v množství 125 ml se zaočkováním 25 ml z I₁ do I₂. Vždy bylo dodrženo pravidlo inokulačního poměru 1:5. Produkční média o objemu 50 ml byla zaočkována 10 ml inokulačního média. V experimentech s různými inokulačními poměry bylo množství inokula závislé na zvoleném poměru.

3.5.3 Kultivace v produkčních médiích

Kultivace v produkčních médiích probíhala v Erlenmeyerových baňkách a bioreaktoru RALF od firmy Bioengineering. Pro očkovaní produkčních médií byl pro Erlenmeyerovy baňky zvolen poměr 1:10 a pro bioreaktor poměr 1:20. Produkční média byla připravována v objemu 50 ml do 250 ml Erlenmayerových baněk, které byly sterilovány v tlakovém hrnci po dobu 15 minut při 121°C. Produkční média se lišila složením uhlíkatého zdroje a dodatečným přídatkem živin v podobě mikroelementového roztoku a kvasničného autolyzátu. Pro první fázi kultivací, byla kvasinka kultivována na různých kombinacích kávového hydrolyzátu a odpadních olejů. Jako kontrola zde sloužilo umělé kontrolní glukózové médium. Pro kultivace byly využity hydrolyzát kávové sedliny a následně odpadní fritovací řepkový olej a kávový olej získaný extrakcí z použité kávové sedliny.

V této fázi kultivace byly připraveny kombinace kávového hydrolyzátu a oleje v poměrech 10:90; 15:85; 20:80; 25:75 a 30:70. Cílem bylo otestovat, jaký vliv bude navýšení obsahu jednoduchého uhlíkatého zdroje na produkci biomasy a sledovaných metabolitů. V druhé fázi byly pro otestování dále přidávky mikroelementového roztoku a kvasničného autolyzátu do média. Ve finální fázi, po vyhodnocení screeningových kultivací byla provedena bioreaktorová kultivace.

Tabulka 2: Minerální základ produkčního média

Složka	Množství (g/l)
KH_2PO_4	4,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,7
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,0

Tabulka 3: Příklad navážek kávového hydrolyzátu a odpadních substrátů do jednotlivých typů produkčních médií

Médium	Navážka (g/50 ml média)	
	Sacharid	Lipidický substrát
Kontrolní glukozové	2,3230	0
Poměr 10/90	0,2323	1,5996
Poměr 15/85	0,3485	1,0665
Poměr 20/80	0,5646	0,8888

3.6 Zpracování biomasy

3.6.1 Gravimetrické stanovení biomasy

Odebrané vzorky byly důkladně protřepány na vortexu a následně z nich byl pipetou odebrán 1 ml média do předem zvážené (na analytických vahách) 2ml plastové zkumavky. Zkumavky s takto odebranými vzorky byly odstředěny (10 000 ot/min; 3 min), supernatant byl odlit, obsah byl promyt 1 ml destilované vody, rozsuspendován a odstředěn. Promývací procedura byla případně opakována, dokud nebyl supernatant po promytí čirý a bezbarvý. Zkumavka s buněčným sedimentem byla ponechána na 20 minut v hlubokomrazicím boxu (o teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$). Zkumavky se zmraženým obsahem byly vloženy do lyofilizátoru a lyofilizovány do kompletního vysušení biomasy (cca 2 dny). Zkumavky s vysušeným obsahem byly zváženy na analytických vahách a z rozdílů hmotností byla určena koncentrace biomasy v médiu.

3.6.2 Zpracování vzorku

Vzorek byl po odběru ke gravimetrickému zpracování odstředěn (7000 ot/min; 3 min), ze supernatantu byly odebrány cca 2 ml k analýze zbytkových cukrů na sestavě HPLC/RI. Zbytek supernatantu byl vylit a sediment byl rozsuspendován ve 20 ml destilované vody. Vzorek byl opět odstředěn a supernatant byl vylit. Promývací procedura byla opakována, dokud nebyl supernatant po promytí čirý a bezbarvý. Biomasa byla následně převedena do 2ml plastové zkumavky, zmrazena na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ a zlyofilizována. Zlyofilizovaná biomasa byla uskladněna v mrazničce.

3.6.3 Analýza sacharidů metodou HPLC/RI

Vzorky se zbytkovým cukrem či glycerolem byly dvakrát naředěny a přefiltrovány přes nylonový filtr. Takto připravené vzorky byly o objemu 20 μ l dávkovány na HPLC sestavu Dionex UltiMate 3000 od firmy Thermo Fischer Scientific s RI detektorem. Vzorek byl analyzován na koloně Rezex ROA Organic acids s rozměry 300x7,8 mm při teplotě 60 °C, průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min a době analýzy 10 minut. Mobilní fáze byla složena z 0,005 M kyseliny sírové rozpuštěné v MiliQ vodě.



Obrázek 6: Kapalinový chromatograf Dionex UltiMate 3000 (Zdroj: vlastní foto)

3.7 Extrakce karotenoidů pro HPLC

Karotenoidy, ergosterol a ubiquinon byly extrahovány zároveň v jednom vzorku pomocí extrakce dle Folche. Nejprve se na analytických vahách odvážíla biomasa v rozmezí množství 5-17 mg do šroubovacích plastových vialek o objemu 2 ml. Biomasa ve vialkách byla hydratována 1 ml destilované vody po dobu 30 minut. Poté byla biomasa zcentrifugována a supernatant byl vylit. K hydratované biomase bylo následně přidáno cca 0,5 ml skleněných kuliček a 1 ml methanolu. Vialky se směsí byly intenzivně protřepány na multipozičním vortexu po dobu 20 minut. Následovalo přelití celého obsahu vialky do 15 ml zkumavky se závitkem, do níž byly napipetovány 2 ml chloroformu.

Vzniklá směs byla opět 20 minut třepána na vortexu. Po protřepání následovalo přidání 1 ml destilované vody a centrifugace vzorku (1500 ot/min, 1 min). Po rozdělení směsi na dvě fáze, byla pomocí pipety odebrána do 15 ml zkumavky spodní chloroformová fáze. Chloroform byl odpařen na termobloku vyhřátém na 35 °C stlačeným dusíkem. Odparek byl rozpuštěn ve 2 ml směsi HPLC rozpouštědel o složení acetonitril ku ethylacetátu (2:1). Směs rozpouštědel byla s odparkem důkladně protřepána na vortexu a přefiltrována přes PTFE filtr do skleněné vialky pro HPLC/GC. Takto připravený vzorek byl buď uskladněn v mrazničce či ihned zanalyzován.

3.8 Analýza karotenoidů metodou HPLC/PDA

Vzorky s obsahem karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu byly podrobeny analýze na HPLC značky Thermo Fischer Scientific, na koloně kinetex EVO C18 o rozměrech 150x4,6x2,6 mm. Eluce probíhala v gradientovém módu o průtoku mobilní fáze 1,2 ml/min a dobou analýzy 25 minut. Složení mobilních fází vyobrazuje Tabulka 4. Změna gradientu mobilní fáze na koloně je ukázána v

Tabulka. Detekce probíhala na PDA detektoru při vlnových délkách 450 nm pro karotenoidy a 280 nm pro ergosterol a ubichinon. Identifikace a kvantitativní stanovení bylo provedeno na základě předem naměřených standardů a jejich kalibračních křivek. Vyhodnocení pak probíhalo v programu Chromeleon.

Tabulka 4: Složení mobilních fází.

Mobilní fáze	složka	% (obj)
A	Methanol	2
	Acetonitril	84
	100 mM trisHCl pufr o pH 8	14
B	Methanol	60
	Ethylacetát	40

Tabulka 5: Schéma gradientové eluce analýzy karotenoidů.

Čas analýzy [min]	MF A [%]	MF B [%]
0	100	0
13	0	100
19	0	100
20	100	0
25	100	0

3.9 Transesterifikace a extrakce mastných kyselin pro GC analýzu

Do krimpovacích vialek byla na analytických vahách navážena lyofilizovaná biomasa v rozmezí hmotností 5-17 mg. Dále bylo do krimpovací vialky napipetováno 1,8 ml transesterifikační směsi s obsahem interního standardu C:17 o koncentraci 0,5 mg/ml rozpuštěného v 15 % kyselině sírové v HPLC methanolu. Takto vzniklá směs byla zakrimpována a ponechána k transesterifikaci v termobloku při teplotě 85 °C na 2 hodiny. Následně po vychladnutí směsi byl celý obsah krimpovací vialky převeden do 4ml vialky s 0,5 ml 0,05 M roztoku NaOH. Ke směsi se dále připipetoval 1 ml HPLC hexanu. Vzniklá směs byla 5 minut intenzivně třepána na vortexu.

Po oddělení fází bylo z vialky odebráno 100 µl vrchní hexanové fáze do skleněné vialky pro HPLC/GC s předem napipetovanými 900 µl HPLC hexanu. Takto vzniklé vzorky byly připraveny pro analýzu na GC.

3.10 Analýza mastných kyselin metodou GC/FID

Vzorky s methylestery mastných kyselin byly podrobeny analýze na plynovém chromatografu Thermo Scientific TRACETM Gas Chromatograph, vybaveném autosamplerem Thermo Scientific AI 1310, automatickým dávkovačem se splitterem, kolonou Zebron ZB-FAME o rozměrech 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm a plamenově ionizačním detektorem (FID).

Analýza byla provedena za těchto podmínek:

- Mobilní fáze (nosný plyn) – vodík o stálém průtoku 1 ml/min
- Objem nástřiku vzorku 1 μl
- Teplota injektoru 250 °C, poměr děliče toku 10
- Teplota na detektoru 260 °C s průtoky plynů 350 ml/min u vzduchu, 35 ml/min u vodíku a 30 ml/min u dusíku
- Teplotní program: 80 °C udržováno 1 minutu ($t_R=1$ min), poté zvýšení teploty na 140 °C s gradientem 15 °C/min ($t_R=5$ min), následované dalším zvýšením na 190 °C s gradientem 3 °C/min ($t_R=21,7$ min), dále zvýšení na teplotu 260 °C s teplotním gradientem 25 °C/min a udržením teploty po dobu 1 minuty ($t_R=25,5$ min); celková doba analýzy 25,5 minut



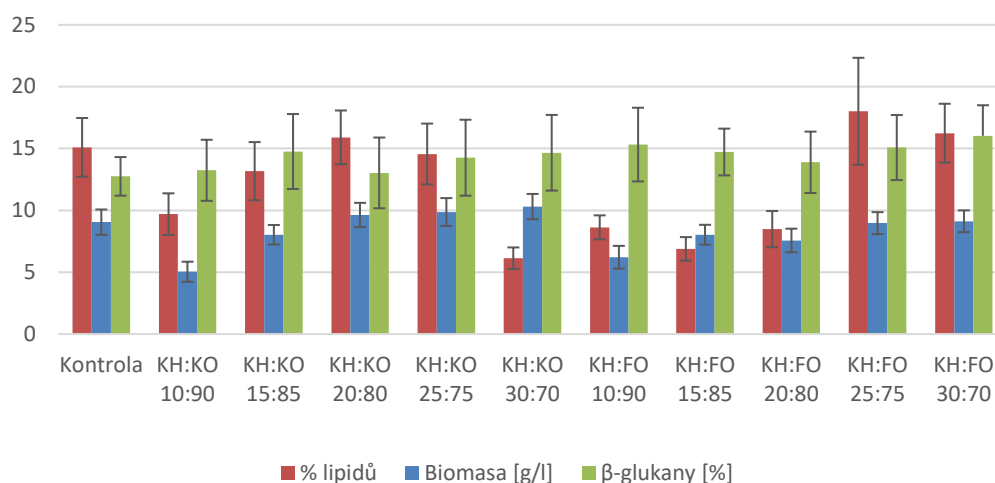
Obrázek 7: Plynový chromatograf Trace GC 1300TM (Zdroj: vlastní foto)

4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST

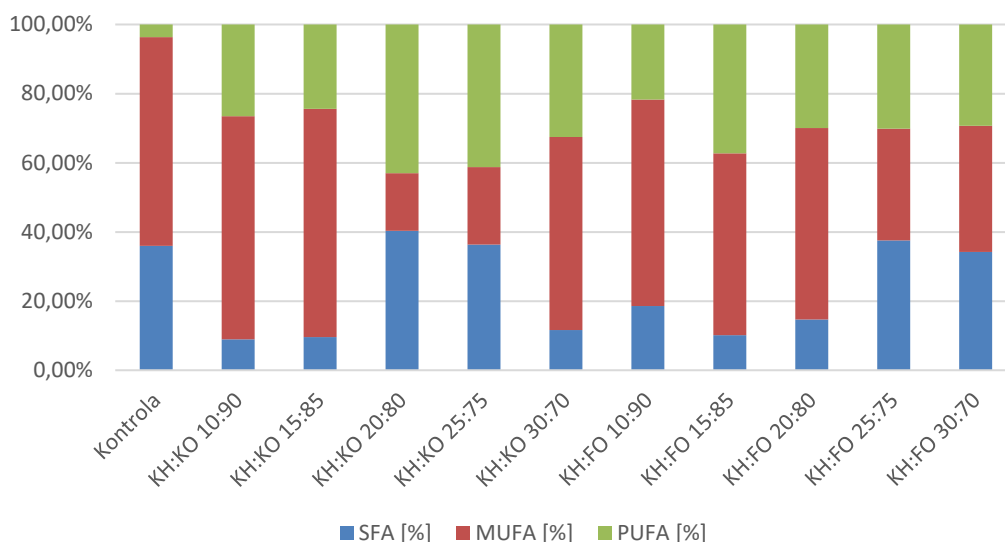
V této části jsou uvedeny výsledky experimentů provedených v této práci. Laboratorní kultivace v baňkách byly provedeny v triplicátech dle postupu uvedeném v experimentální části. Výsledky jsou uvedeny jako průměr hodnot se směrodatnou odchylkou. Bioreaktorová kultivace byla provedena v duplikátu, kdy výsledky jsou prezentovány samostatně.

4.1 Screeningové kultivace: První fáze

Na Grafech 1 a 2 společně s Tabulkou 6 je vyobrazena produkce metabolitů kvasinkovou biomasou kmene *Rhodosporidium toruloides* produkovanou na médiích s obsahem odpadních substrátů. S klesajícím zastoupením olejnaté složky v médiu v rámci uhlíkatého substrátu je pozorovatelný trend rostoucího nárůstu biomasy. Nejvýznamnější produkce biomasy byly pozorovány na médiích s obsahem KH:KO 30:70 (10,3 g/l) a KH:KO 25:75 (9,87 g/l). Nejvyšší obsah lipidů byl pozorován na médiích KH:FO 25:75 (18,01 %) a KH:FO 30:70 (16,24 %). Nejvýznamnější produkce betaglukanů byly zaznamenány na médiích s obsahem fritovacího oleje, a to konkrétně na médiích KH:FO 30:70 (16,03 %) a KH:FO 10:90 (15,32 %). Nejvyšší procentuální zastoupení nasycených mastných kyselin (SFA) bylo zaznamenáno u biomasy kultivované na médiu KH:KO 20:80 (40,32 %). Mononenasycených mastných kyselin (MUFA) bylo z pohledu zastoupení biomasou nejvíce kumulováno na médiu KH:KO 15:85 (66,04 %). Polynenasycených mastných kyselin bylo poměrově nejvíce kumulováno v biomase rostoucí na médiu KH:KO 20:80 (42,97 %). Množství celkových karotenoidů dosahovalo nejvyšších produkcí na médiích KH:FO 20:80 (11,256 mg/g) a KH:FO 30:70 (10,912 mg/g). Ubichinon byl nejvíce kumulován na médiích s obsahem fritovacího oleje KH:FO 25:75 (10,224 mg/g) a KH:FO 30:70 (9,532 mg/g). Produkce ergosterolu dosahovala u experimentálních médií stabilních hodnot (hodnotami okolo 4,5 až 7,8 mg/g) s maximy na médiích KH:KO 30:70 (7,758 mg/g) a KH:FO 30:70 (7,739 mg/g).



Graf 1: Produkce biomasy, procentuální zastoupení lipidů a produkce betaglukanů kvasinkovou biomasou při různém poměrovém zastoupení odpadních uhlíkatých substrátů v médiu.



Graf 2: Složení lipidů v biomase při kultivacích na médiích s odpadním substrátem s přidavkem kávového hydrolygátu

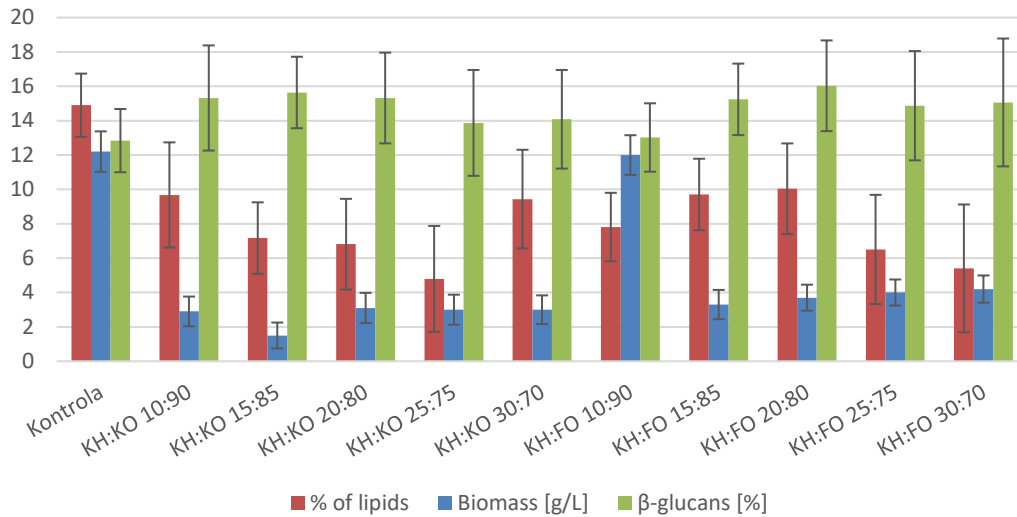
Tabulka 6: Tabulka ke screeningové kultivaci v první fázi.

Vzorek	Betakaroten [mg/g]	Torularhodin [mg/g]	Karotenoidy [mg/g]	Ubichinon [mg/g]	Ergosterol [mg/g]
Kontrola	0.262±0.018	2.745±0.244	4.961±0.474	3.371±0.299	1.881±0.164
KH:KO 10:90	0.138±0.01	2.692±0.26	2.948±0.226	2.024±0.143	6.059±0.586
KH:KO 15:85	0.315±0.022	5.604±0.62	6.091±0.437	2.705±0.241	4.667±0.507
KH:KO 20:80	0.2±0.014	4.182±0.305	4.544±0.431	3.741±0.371	4.464±0.511
KH:KO 25:75	0.365±0.027	5.395±0.494	5.957±0.592	2.56±0.231	5.528±0.455
KH:KO 30:70	0.409±0.03	7.213±0.868	7.904±1.036	4.785±0.436	7.758±0.856
KH:FO 10:90	0.351±0.026	5.38±0.384	6.109±0.701	5.142±0.485	6.195±0.542
KH:FO 15:85	0.481±0.034	7.806±1.002	8.611±0.624	4.971±0.375	7.134±0.683
KH:FO 20:80	0.746±0.053	10.232±1.65	11.256±1.662	3.964±0.419	6.854±0.489
KH:FO 25:75	0.385±0.028	6.455±0.659	7.084±0.891	10.224±1.023	7.114±0.536
KH:FO 30:70	0.637±0.048	8.48±0.663	10.912±0.769	9.532±1.088	7.739±1.069

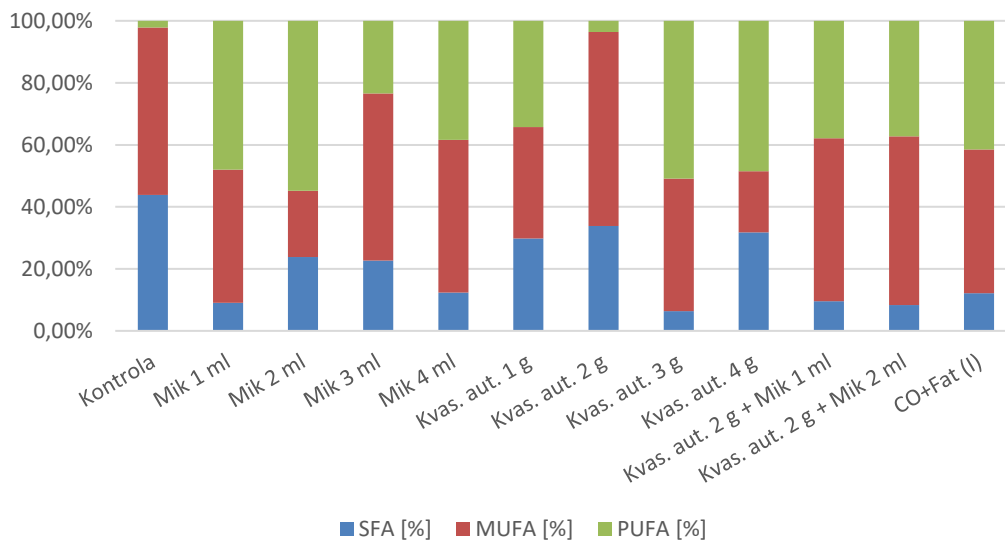
4.2 Screeningové kultivace: Druhá fáze

Na Grafech 3 a 4 společně s Tabulkou 7 jsou vyobrazeny kultivace s přidavkem mikroelementového roztoku a kvasničného autolyzátu. Nevyšší produkce biomasy byla pozorována na médiu Kvas. aut. 3 g (17,05 g/l). Nejvýznamnější produkce lipidů v experimentálním médiu byla pozorována v biomase kultivované na médiu Kvas. aut. 1 g (10,04 %). Nejvyšší zastoupení beta-glukanů v biomase bylo na médiu Kvas. aut. 4 g (17,04 %). Nejvyšší zastoupení SFA z experimentálních médií bylo na

médiu Kvas. aut. 2 g (33,79 %). Nejvýznamnější kumulace MUFA byla pozorována na médiu Kvas. aut. 2 g (62,64 %). PUFA bylo nejvíce zastoupeno v biomase kultivované na médiu Mik 3 ml (54,86 %). Nejvyšší produkce karotenoidů byla na médiu Kvas. aut. 2 g + Mik 1 ml (9,323 mg/g). Ubichinon byl v nejvyšším množství produkován na médiu Mik 1 ml (8,091 mg/g). Ergosterol dosahoval nejvyšší kumulace na médiu Kvas. aut. 2 g + Mik 2 ml (8,023 mg/g).



Graf 3: Produkce biomasy, procentuální zastoupení lipidů a produkce betaglukanů kvasinkovou biomasou v médiích s různým přídatkem mikroelementového roztoku, kvasničného autolyzátu,



Graf 4: Složení lipidů v kvasinkové biomase kultivované v médiích s různým přídatkem mikroelementového roztoku, kvasničného autolyzátu.

Tabulka 7: Tabulka ke screeningové kultivaci v druhé fázi.

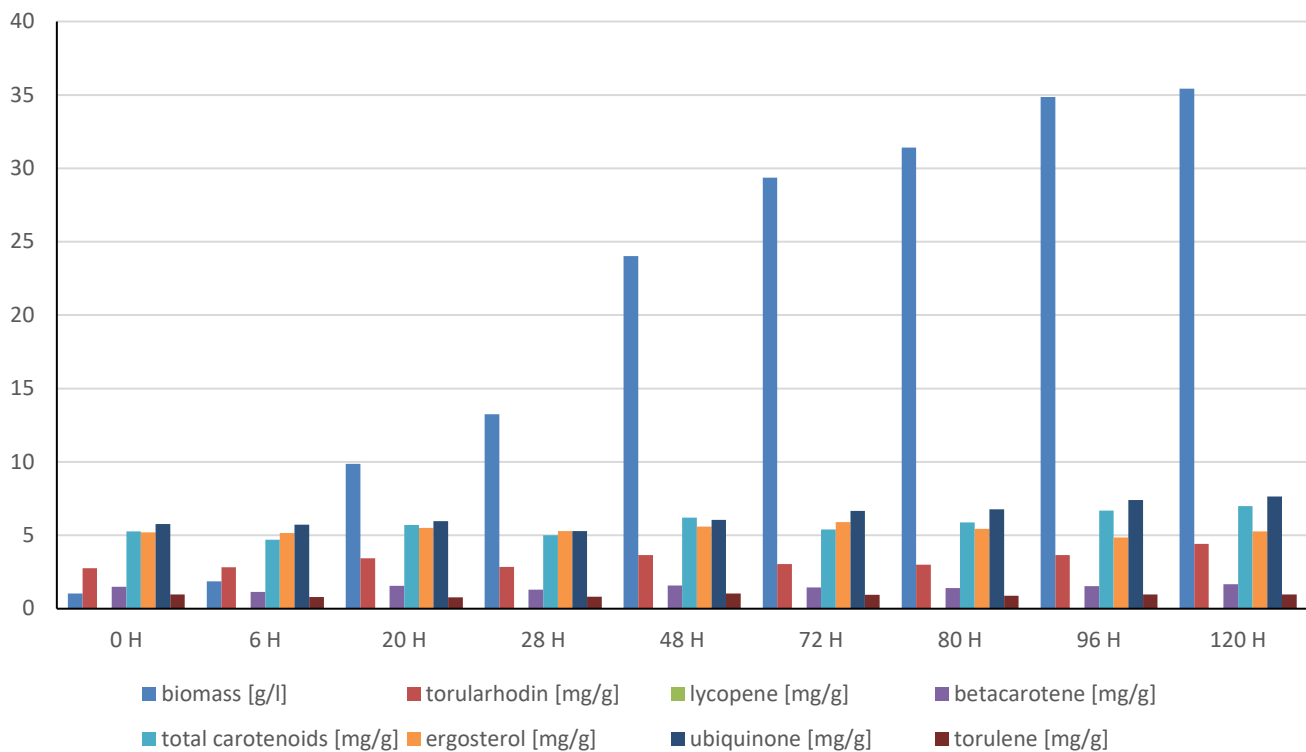
Vzorek	Betakaroten [mg/g]	Torularhodin [mg/g]	Karotenoidy [mg/g]	Ubichinon [mg/g]	Ergosterol [mg/g]
Kontrola	0.467±0.033	2.65±0.209	6.484±0.486	5.479±0.415	2.318±0.181
Mik 1 ml	0.087±0.006	0.745±0.052	0.843±0.064	8.091±0.611	4.703±0.372
Mik 2 ml	0.446±0.033	6.091±0.672	6.735±0.679	2.175±0.171	7.08±0.89
Mik 3 ml	0.225±0.016	4.017±0.303	4.423±0.468	2.409±0.215	7.097±0.597
Mik 4 ml	0.198±0.014	3.745±0.325	4.1±0.391	3.051±0.265	7.488±0.711
Kvas. aut. 1 g	0.356±0.025	6.526±0.814	7.597±0.898	2.881±0.243	7.72±0.542
Kvas. aut. 2 g	0.602±0.046	3.339±0.289	4.382±0.385	4.391±0.463	2.987±0.219
Kvas. aut. 3 g	0.001±0	0.903±0.067	1.367±0.106	5.653±0.636	5.066±0.548
Kvas. aut. 4 g	0.408±0.029	6.377±0.806	6.966±0.874	4.606±0.362	6.558±0.609
Kvas. aut. 2 g + Mik 1 ml	0.424±0.03	8.688±0.902	9.323±0.919	4.917±0.542	8.644±0.9
Kvas. aut. 2 g + Mik 2 ml	0.357±0.026	6.144±0.617	7.026±0.642	3.661±0.368	8.023±0.758

4.3 Třetí fáze – řízená kultivace v bioreaktoru

4.3.1 Kultivace v bioreaktorech

4.3.1.1 První bioreaktorová kultivace kmene *Rhodospiridium toruloides*

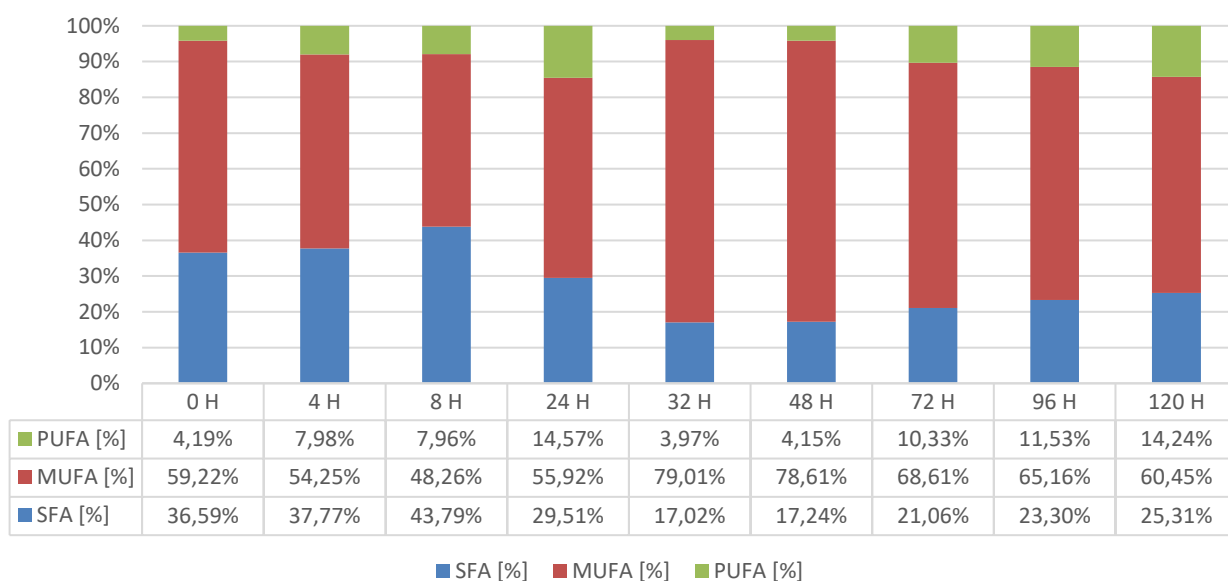
Na Grafech 5 a 6 společně s Tabulkou 8 je vyobrazena první fermentorová kultivace. Nevyšší produkce biomasy byla pozorována ve 120. h (35,42 g/l). Nejvýznamnější produkce lipidů byla pozorována v biomase v 0. h (19,87 %). Nejvyšší zastoupení betaglukanů v biomase bylo v 96. h (18,06 %). Nejvyšší zastoupení SFA bylo pozorováno v 8. h (43,79 %). Nejvýznamnější kumulace MUFA byla pozorována v 32. h (79,01 %). PUFA bylo nejvíce zastoupeno v biomase ve 24. h (14,57 %). Nejvyšší produkce karotenoidů byla ve 120. h (6,995 mg/g). Ubichinon byl v nejvyšším množství produkován ve 120. h (7,633 mg/g). Ergosterol dosahoval nejvyšší kumulace v 72. h (5,897 mg/g).



Graf 5: Obsah jednotlivých metabolitů zjištěných v kvasinkách pomocí metody HPLC

Tabulka 8: Profil glukánů, mastných kyselin společně s nárůstem biomasy v průběhu kultivace.

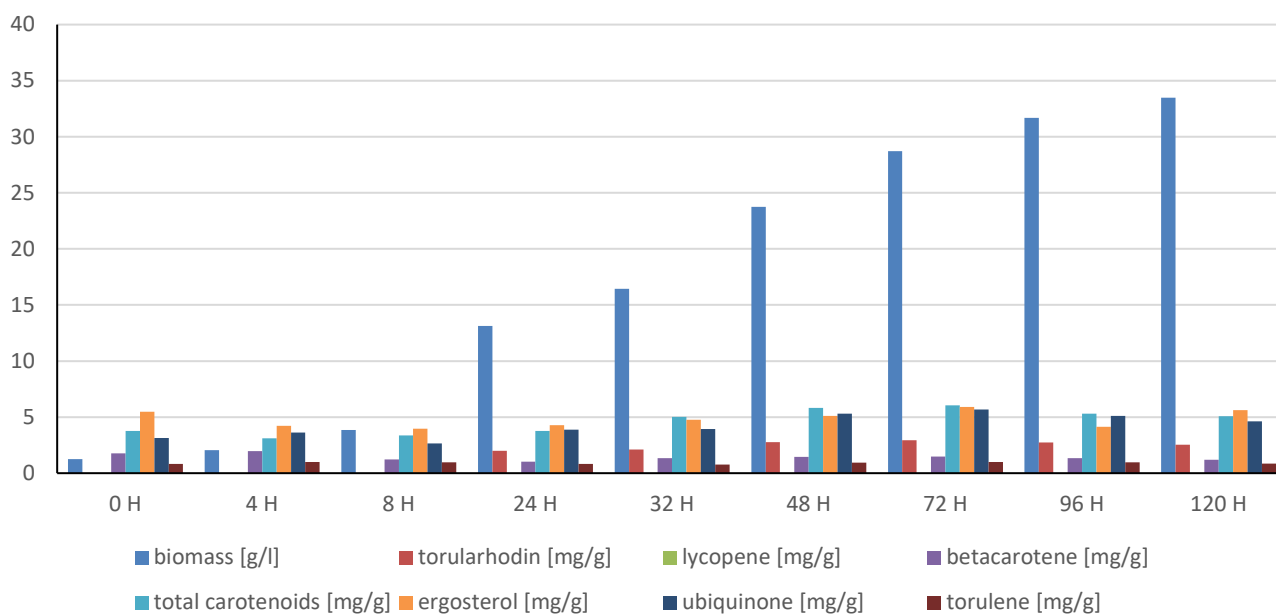
1. Bioreaktor	β -glukany [%]	α -glukany [%]	Lipidy [%]	Biomasa [g/L]	SFA [%]	MUFA [%]	PUFA [%]
0 H	15,26	8,75	19,873	1,03	36,59%	59,22%	4,19%
4 H	16,28	7,64	10,793	1,87	37,77%	54,25%	7,98%
8 H	15,84	6,98	12,204	9,87	43,79%	48,26%	7,96%
24 H	16,03	7,48	8,711	13,25	29,51%	55,92%	14,57%
32 H	16,92	5,06	6,816	24,02	17,02%	79,01%	3,97%
48 H	17,55	4,87	3,804	29,37	17,24%	78,61%	4,15%
72 H	17,86	6,12	4,384	31,42	21,06%	68,61%	10,33%
96 H	18,06	5,46	4,682	34,85	23,30%	65,16%	11,53%
120 H	17,64	5,03	8,469	35,42	25,31%	60,45%	14,24%



Graf 6: Profil mastných kyselin

4.3.1.2 Druhá bioreaktorová kultivace kmene *Rhodospiridium toruloides*

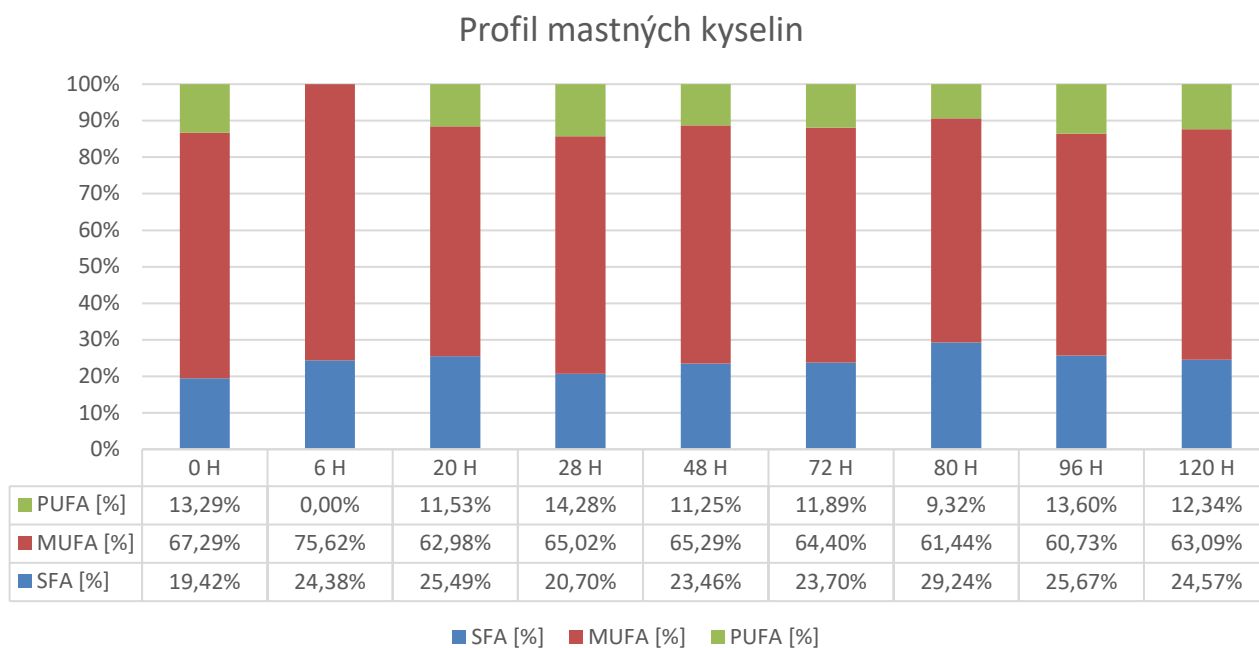
Na Grafech 7 a 8 společně s Tabulkou 9 je vyobrazena první fermentorová kultivace. Nevyšší produkce biomasy byla pozorována ve 120. h (33,49 g/l). Nejvýznamnější produkce lipidů byla pozorována v biomase v 0. h (21,31 %). Nejvyšší zastoupení beta-glukanů v biomase bylo v 28. h (18,01 %). Nejvyšší zastoupení SFA bylo pozorováno v 80. h (29,24 %). Nejvýznamnější kumulace MUFA byla pozorována v 6. h (75,62 %). PUFA bylo nejvíce zastoupeno v biomase ve 28. h (14,28 %). Nejvyšší produkce karotenoidů byla ve 72. h (6,042 mg/g). Ubichinon byl v nejvyšším množství produkován v 72. h (5,677 mg/g). Ergosterol dosahoval nejvyšší kumulace v 72. h (5,913 mg/g).



Graf 7: Množství jednotlivých metabolitů zjištěných v kvasinkách pomocí metody HPLC.

Tabulka 9: Profil glukánů, mastných kyselin společně s nárůstem biomasy v průběhu kultivace.

2. fermentor	β -glucans [%]	α -glucans [%]	Lipidy [%]	Biomasa [g/L]	SFA [%]	MUFA [%]	PUFA [%]
0 H	16,97	4,03	21,315	1,25	19,42%	67,29%	13,29%
6 H	17,59	4,51	16,248	2,04	24,38%	75,62%	0,00%
20 H	16,87	3,05	11,843	3,86	25,49%	62,98%	11,53%
28 H	18,01	2,98	8,016	13,12	20,70%	65,02%	14,28%
48 H	17,64	3,48	7,080	16,45	23,46%	65,29%	11,25%
72 H	17,08	2,97	5,801	23,76	23,70%	64,40%	11,89%
80 H	17,34	4,06	6,428	28,71	29,24%	61,44%	9,32%
96 H	16,98	3,15	8,426	31,68	25,67%	60,73%	13,60%
120 H	17,21	2,87	9,248	33,49	24,57%	63,09%	12,34%



Graf 8: Profil mastných kyselin

5 ZÁVĚR

V posledních letech se v souvislosti s masivním nárůstem populace také rapidně rozrůstají všechna odvětví průmyslu a v důsledku tedy i množství produkováných průmyslových odpadů, jejichž množství každým rokem vzrůstá. Konvenční metody zpracování těchto odpadů často zahrnují výrazné emise CO₂ a výrazně tak zvyšují zátěž životního prostředí. Z tohoto důvodu se čím dál více hledají cesty k přechodu z lineárního modelu ekonomiky na cirkulární, jehož koncept spočívá ve valorizaci odpadů na cenné produkty, které mohou být znovu využívány. V oblasti biotechnologie se tento koncept může uplatnit při kultivaci mikroorganismů, které jsou schopny produkce bioaktivních látek, které mají pozitivní účinky nejen na lidské zdraví. Při přidávání odpadních substrátů do médií jako náhražka syntetických substrátů dochází nejen ke snížení kultivačních nákladů, ale i významné modulaci chování mikroorganismů vlivem vystavení stresovým faktorům, jež jsou indukována přítomností komplexních substrátů. Stresové faktory vyvolávají akumulaci určitých látek, jako jsou například sekundárních lipidických metabolitů v buňkách mikroorganismů. V této studii byl zkoumán vliv potravinářských odpadních substrátů na kmen karotenogenní kvasinky *Rhodospodium toruloides*.

Na základě screeningových kultivací byly vybrány média s nejlepšími výsledky, které byly posuzovány především na základě produkce biomasy a produkováných karotenoidů. Na základě těchto výsledků byly provedeny velkoobjemové kultivace, aby byla ověřena využitelnost výsledků v průmyslovém měřítku. V první fermentorové kultivaci byla pozorována nevyšší produkce biomasy ve 120. h (35,42 g/l), stejně tak karotenoidů (6,995 mg/g). Zastoupení glukánů a sterolů dle očekávání rostlo s délkou kultivace. V případě druhého fermentoru byla nevyšší produkce biomasy byla pozorována opět ve 120. h (33,49 g/l), ale z hlediska produkce metabolitů by bylo vhodné ukončit kultivaci po 72 hodinách, kdy bylo dosaženo nejvyšší produkce karotenoidů (6,042 mg/g), ubichinonu (5,677 mg/g) a ergosterolu (5,913 mg/g).

Na základě získaných výsledků je zjevné, že kvasinky kmene *Rhodospodium toruloides* jsou schopny využít lipidické odpadní substráty a produkovat značné množství biomasy i cenných metabolitů, proto je tento způsob kultivace vhodný pro další výzkum za účelem další optimalizace média a v důsledku pak maximalizace produkčních schopností těchto kvasinek.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KOČKOVÁ-Kratochvílová, Anna. Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1990. ISBN 80-05-00644-6.
- [2] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [3] VODRÁŽKA, Zdeněk. Biochemie. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1
- [4] Effects of beta-glucans on the immune system, Akramiene D, Kondrotas A, Didziapetriene J, Kevelaitis E., Medicina (Kaunas). 2007;43(8):597-606
- [5] Effect of yeast-derived beta-glucan in conjunction with bevacizumab for the treatment of human lung adenocarcinoma in subcutaneous and orthotopic xenograft models, Zhong W, Hansen R, Li B
- [6] Effect of beta-glucans in the control of blood glucose levels of diabetic patients: a systematic review, Francelino Andrade E, Vieira Lobato R, Vasques Araújo T, Gilberto Zangerônimo M, Vicente
- [7] Effects of consuming foods containing oat beta-glucan on blood pressure, carbohydrate metabolism and biomarkers of oxidative stress in men and women with elevated blood pressure. Maki KC1, Galant R, Samuel P, Tesser J, Witchger MS, Ribaya-Mercado JD, Blumberg JB, Geohas J., Eur J Clin Nutr. 2007 Jun;61(6):786-95. Epub 2006 Dec 6.
- [8] Cholesterol-lowering effects of oat β -glucan, Othman RA, Moghadasian MH, Jones PJ, Nutr Rev. 2011 Jun;69(6):299-309. doi: 10.1111/j.1753-4887.2011.00401.x.

7 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. 1: Zařazení kvasinkového kmene *Rhodospiridium toruloides* v taxonomii (Zdroj: Bc. Monika Roubalová. Studium metabolismu karotenogenních kvasinek na molekulární úrovni. Brno, 2017. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.)

Obr. 2: Stavba buněk kvasinek (Zdroj: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Kvasinky>)

Obr. 3: *Saccharomyces Cerevisiae* (Zdroj: <https://biologydictionary.net/saccharomyces-cerevisiae/>)

Obr. 4: Strukturální vzorec Betakarotenu (Zdroj: vlastní vytvořeno v programu ChemSketch)

Obr. 5: Strukturální vzorec Astaxanthin (Zdroj: <https://www.watson-int.com/astaxanthin-cas-472-61-7/>)

Obr. 6: Kapalinový chromatograf Dionex UltiMate 3000 (Zdroj: vlastní foto)

Obr. 7: Plynový chromatograf Trace GC 1300TM (Zdroj: vlastní foto)

Tab. 1: Složení YPD médií

Tab. 2: Složení mobilních fází.

Tab. 3: Schéma gradientové eluce analýzy karotenoidů

Tab. 4: Tabulka ke screeningové kultivaci v první fázi.

Tab. 5: Tabulka ke screeningové kultivaci v druhé fázi.

Tab. 6: Tabulka k analýze plynové chromatografie a β -glukanů, slouží pro zjištění profilu mastných kyselin v dané látce.

Tab. 7: Tabulka k analýze plynové chromatografie a β -glukanů, slouží pro zjištění profilu mastných kyselin v dané látce. U druhého fermentoru.

Tab. 8: Tabulka s daty pro první měření.

Tab. 9: Tabulka s daty pro druhé měření