



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

SIMULTÁNNÍ KOKULTIVACE VYBRANÝCH KMENŮ KAROTENOGENNÍCH KVASINEK A AUTOTROFNÍCH BAKTERIÍ

SIMULTANEOUS CO-CULTIVATION OF SELECTED STRAINS OF CAROTENOGENIC YEASTS AND AUTOTROPHIC BACTERIA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Jana Blažková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1692/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Jana Blažková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Simultánní kokultivace vybraných kmenů karotenogenních kvasinek a autotrofních bakterií

Zadání diplomové práce:

V rámci této práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- Přehledná literární rešerše zaměřená na vybrané kmeny karotenogenních kvasinek, sinic a principy kokultivace
- Otestování produkčních vlastností vybraných kmenů karotenogenních kvasinek na minerálních médiích
- Kokultivace vybraných kmenů kvasinek se zástupci sinic
- Selektce vhodných kokultivačních dvojic kvasinka:sinice
- Optimalizace složení kokultivačního média a podmínek kultivace
- Charakterizace získané biomasy pomocí chromatografických technik
- Vyhodnocení výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 20.5.2022:

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

Bc. Jana Blažková
studentka

Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

Předložená diplomová práce byla zaměřena na studium kokultivací vybraných mikroorganismů, kterými byly karotenogenní kvasinky a sinice. V těchto kokultivacích byla srovnávána produkce vybraných metabolitů. Mezi hlavní sledované metabolity byly řazeny karotenoidy, steroly, koenzym Q10, chlorofyly a lipidy. Dále se tato práce zaměřila na studium a možnosti optimalizace produkce lipidů a lipidových látek u vybraných kmenů karotenogenních kvasinek a druhů sinic.

Teoretická část se zabývá popisem karotenogenních kvasinek, sinic a chemickým složením produkovaných metabolitů. Kvasinky a sinice obsahují karotenoidy, přírodní pigmenty, řazené mezi antioxidanty. Jako antioxidanty mají výrazné biologické účinky v lidském organismu, mezi kterými jsou například protinádorové a protizánětlivé účinky, či účinky proti neurodegenerativním nemocem. Dalšími metabolity mikroorganismů s pozitivním vlivy na lidské tělo jsou ergosterol a koenzym Q. Chlorofyl produkovaný sinicemi nachází uplatnění v potravinářském průmyslu jako zelené barvivo. Lipidy vytvářené těmito mikroorganismy obsahují velké množství nenasycených mastných kyselin nacházejících uplatnění v kosmetice nebo farmacii. V teoretické části byly také popsány jednotlivé analytické metody, kterými byla zjišťována produkce sledovaných metabolitů.

Experimentální část je zaměřená na produkci karotenoidů, sterolů, koenzymu Q10 a chlorofylu, které jsou stanovovány pomocí HPLC, lipidy a profil mastných kyselin jsou stanovovány pomocí GC. Stanovované metabolity jsou sledovány v různých druzích kokultivačních partnerů (karotenogenní kvasinka a sinice) v médiích s různými přísadami makroprvků (P, N a Mg). Poté následoval experiment kokultivací s použitím odpadních olejů (fritovací a kávový olej) a studium vlivu odpadních olejů přidávaných do kokultivací.

Kokultivační experimenty potvrdily schopnost společného růstu karotenogenních kvasinek a sinic. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u dvojic *Rhodospiridium toruloides* a *Anabena torulosa*, *Rhodospiridium toruloides* a *Arthrospira maxima*.

Klíčová slova

Kvasinky, sinice, kokultivace, lipidy, mastné kyseliny, karotenoidy, chlorofyly, ergosterol, ubichinon, stresové faktory

Abstract

The submitted diploma thesis was focused on the study of co-cultivation of selected microorganisms, which were carotenogenic yeasts and cyanobacteria. The production of selected metabolites was compared in these co-cultivations. The main metabolites monitored were carotenoids, sterols, coenzyme Q10, chlorophylls and lipids. Furthermore, this work focused on the study and possibilities of optimizing the production of lipids and lipid substances in selected strains of carotenogenic yeasts and cyanobacterial species.

The theoretical part is focused on the description of yeasts, especially carotenogenic yeasts, cyanobacteria and the chemical composition of the produced metabolites. Microorganisms such as yeast and cyanobacteria contain carotenoids, which are natural pigments and are classified as antioxidants. As antioxidants, they have significant biological effects, such as effects on human health. Coenzyme Q has a positive effect on the functioning of organs in the human body. Chlorophyll is widely used in the food industry as a green dye. Lipids produced by microorganisms contain a large amount of unsaturated fatty acids, which is currently used in cosmetics or pharmacy. The theoretical part also described the individual analytical methods by which the production of the monitored metabolites could be determined.

The experimental part is focused on the production of carotenoids, sterols, coenzyme Q10 and chlorophyll, which were determined by HPLC, lipids and fatty acid profile were determined by GC. The determined metabolites are monitored in different types of co-culture partners (carotenogenic yeast and cyanobacteria) in media with different additions of macroelements (P, N and Mg). This was followed by a co-cultivation experiment using waste oils (frying and coffee oil) and a study of the effect of waste oils added to co-cultivations.

Co-cultivation experiments confirmed the ability of carotenogenic yeasts and cyanobacteria to grow together. The best results were obtained with *Rhodospiridium toruloides* and *Anabena torulosa*, *Rhodospiridium toruloides* and *Arthrospira maxima*.

Key words

Yeasts, cyanobacteria, waste substrates, co-cultivation, lipids, fatty acids, carotenoids, chlorophylls, ergosterol, ubiquinone, stress factors

BLAŽKOVÁ, Jana. *Simultánní kokultivace vybraných kmenů karotenogenních kvasinek a autotrofních bakterií* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139178>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Martin Szotkowski.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že předložená diplomová práce je původní a zpracovala jsem ji samostatně. Prohlašuji, že citace použitých pramenů je úplná, že jsem ve své práci neporušila autorská práva (ve smyslu Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském a o právech souvisejících s právem autorským).

V Brně dne 15. května 2022

.....

podpis autora

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce panu Ing. Martinu Szotkowski, Ph.D. za odborné vedení práce, cenné a odborné rady, také čas, který mi věnoval a velkou ochotu, trpělivost při zpracování mojí experimentální části. Také bych chtěla poděkovat za odborné rady a pomoc při zpracování výsledků Ing. Samueli Šimanskému a Ing. Jiřímu Holubovi. Dále poděkování patří mé rodině a přátelům za podporu během mého studia.

Obsah

1	Úvod	8
2	Teoretická část	10
2.1	Studované metabolity	10
2.1.1	Lipidy.....	10
2.1.2	Biosyntéza lipidů.....	11
2.1.3	Mastné kyseliny: struktura a nomenklatura	12
2.1.4	Karotenoidy.....	14
2.1.5	Chlorofyly.....	18
2.1.6	Steroly.....	24
2.1.7	Ubichinon.....	25
2.2	Mikroorganismy	27
2.2.1	Kvasinky	27
2.2.2	Karotenogenní kvasinky.....	31
2.2.3	Sinice.....	35
2.2.4	Zemědělská a průmyslová aplikace sinic.....	38
2.3	Kokultivace	42
2.3.1	Možnosti kokultivace	43
2.3.2	Biologický stres	43
2.3.3	Kokultivace autotrofní organismus – heterotrofní organismus.....	45
2.4	Odpadní substráty	46
2.4.1	Syrovátka	46
2.5	Metody pro analýzu buněk mikroorganismů a biomasy	47
2.5.1	Gravimetrická stanovení a mikroskopické pozorování mikroorganismů	47
2.5.2	Extrakce	48
2.5.3	Transesterifikace.....	49
2.5.4	Chromatografie.....	49
2.5.5	HPLC-PDA.....	50
2.5.6	GC-FID	51
3	Cíle práce	52
4	Experimentální část	53
4.1	Kmeny mikroorganismů	53
4.1.1	Kvasinkové kmeny.....	53
4.1.2	Kmeny sinic.....	53

4.2	Chemikálie	54
4.2.1	Chemikálie používané pro kultivaci karotenogenních kvasinek mikrořas a sinic.....	54
4.2.2	Chemikálie pro extrakce, transesterifikaci a analýzu pro GC a HPLC.....	55
4.3	Přístroje a pomůcky	55
4.3.1	Přístroje a pomůcky pro kultivaci.....	55
4.3.2	Přístroje pro izolaci a analýzu vybraných analytů	56
4.4	Kultivační techniky a složení médií.....	57
4.4.1	Kultivace karotenogenních kvasinek.....	57
4.4.2	Kokultivace sinic a kvasinek na odpadních olejích	62
4.4.3	Zpracování vzorků.....	62
5	Výsledky a diskuse	65
5.1	Multikultivátorové kokultivační experimenty.....	65
5.1.1	Kokultivace <i>Rhodosporidium toruloides</i> a <i>Anabaena torulosa</i>	66
5.1.2	Kokultivace <i>Rhodosporidium toruloides</i> a <i>Arthrospira maxima</i>	68
5.1.3	Kokultivace <i>Rhodosporidium toruloides</i> a <i>Anabaena laxa</i>	70
5.1.4	Kokultivace <i>Sporidiobolus pararoseus</i> a <i>Anabaena laxa</i>	72
5.1.5	Kokultivace <i>Sporidiobolus pararoseus</i> a <i>Arthrospira maxima</i>	75
5.1.6	Kokultivace <i>Sporidiobolus metaroseus</i> a <i>Arthrospira maxima</i>	77
5.1.7	Kokultivace <i>Rhodosporidium toruloides</i> a <i>Anabaena torulosa</i>	79
5.1.8	Kokultivace <i>Sporidiobolus pararoseus</i> a <i>Anabaena torulosa</i>	81
5.1.9	Kokultivace <i>Rhodotorula kratochvilovae</i> a <i>Anabaena torulosa</i>	84
5.1.10	Kokultivace <i>Rhodosporidium toruloides</i> a <i>Anabaena torulosa</i>	86
5.2	Experimenty kokultivací s odpadními oleji	88
5.2.1	<i>Rhodotorula kratochvilovae</i> a <i>Anabaena torulosa</i>	89
5.2.2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CCY 19-4-6 a <i>Anabaena torulosa</i>	91
5.2.3	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CCY 20-9-7 a <i>Anabaena torulosa</i>	93
5.2.4	<i>Sporidiobolus metaroseus</i> a <i>Anabaena torulosa</i>	95
5.2.5	<i>Rhodosporidium toruloides</i> a <i>Anabaena torulosa</i>	97
6	Závěr	100
7	Seznam použité literatury	103
8	Seznam použitých zkratek a symbolů.....	115

1 Úvod

Snaha o urychlení přechodu k cirkulární ekonomice se díky rozvoji biotechnologických metod a aplikací v posledních desetiletí výrazně zvyšuje. Principem cirkulární ekonomiky je myšleno vyrábění mnoha široce používaných chemikálií a materiálů pomocí surovin, které jsou obnovitelné. Využitím odpadů z jiných odvětví dochází ke snížení emisí skleníkových plynů. Při snaze využívat stále více obnovitelných zdrojů je také nutné zachovat a kontrolovat u vyprodukovaného materiálu jeho kvalitu, která musí odpovídat parametrům a pravidlům nastaveným v daném odvětví. Příklady obnovitelných zdrojů, které lze biotechnologicky výhodně využít jsou biomasa, sacharidy, odpadní oleje, celulósové odpady a oxid uhličitý v případě fototrofních mikroorganismů [1].

Oleogenní mikroorganismy jsou skupina mikroorganismů zahrnující bakterie, kvasinky, plísňe a řasy, produkují mikrobiální oleje, které jsou pokládány za alternativní surovinu pro výrobu bionafty a dalších produktů. Mikroorganismy jsou považovány za tzv. buněčné továrny, schopné produkce široké palety metabolitů. Největší rozmanitosti dosahují fototrofní řasy a sinice poháněné slunečním zářením, transformující oxid uhličitý na různé metabolity. Za vhodných podmínek (intenzivní osvětlení, dostatek oxidu uhličitého) lipidy nahromaděné procesem fotosyntézy dosahují více než 50% suché hmotnosti buněk. Kultivaci mikrořas tedy můžeme označit jako proces, který redukuje uhlík [2].

Také různé druhy kvasinek jsou schopné produkovat velké množství lipidů díky různým zdrojům uhlíku (melasa, glycerol atd.). Zaměříme-li se pouze na kvasinkové buňky, jejich hlavní výhodou je rychlejší růst ve srovnání s buňkami sinic a řas. To znamená, že kultivace kvasinek může vést k vyšší produktivitě tvorby lipidů než ve srovnání s kultivací řas, nebo kultivací sinic [2].

Kultivace řas a kvasinek, nebo sinic a kvasinek má tedy určitou podobnost, která spočívá v akumulaci vysokého obsahu lipidů a dalších metabolitů. Produkce společných metabolitů se silným biologickým účinkem, které nacházejí uplatnění v různých odvětvích průmyslu vede k jednoznačné otázce. A to otestovat možnosti kultivovat páry sinice a kvasinka, nebo řasa a kvasinka společně v jedné kultivační nádobě. V kokultivaci mohou tedy mikrořasy, nebo sinice pracovat jako tzv. generátor kyslíku pro kvasinky,

zatímco kvasinky slouží jako zdroj oxidu uhličitého pro mikrořasy a sinice. Zároveň si v ideální kombinaci jako pár heterotrof/autotrof nekonkurují o zdroje uhlíku. Srovnáme-li dosavadní výsledky v této oblasti kokultivací s klasickou kultivací jednoho mikroorganismu vidíme, že v řadě produkčních parametrů dochází k navýšení, a tedy pozitivnímu účinku kokultivace [2].

Kokultivaci lze provést s různými kombinacemi mikroorganismů. Dle způsobu výživy se tak mohou páry mikroorganismů skládat z: a) dvou různých heterotrofních, b) dvou různých autotrofních, c) heterotrofního a autotrofního mikroorganismu. Z těchto tří variant je za nejlépe produkující považováno, když společně kultivujeme heterotrofní a autotrofní organismy. Bohužel je nutné vyřešit i určité překážky, za nejčastější jsou považovány rozdíly v pH, teplotě kultivace, nároky na živiny v médiu, požadavcích na kyslík a obecně vzájemná slučitelnost. Pokud je autotrofní mikroorganismus pomalu rostoucí, může být v některých případech spotřebován heterotrofním mikroorganismem. Přestože v kokultivaci může být problematické vymezit vhodné podmínky, intenzivním výzkumem mikroorganismů právě v kokultivacích může směřovat k nálezům takřka „ideálních kombinací“, které umožní řešení pro snížení uhlíkové stopy, zajistí výměnu kyslíku/oxidu uhličitého a řízení pH. Pokud bereme v potaz symbiózu, můžeme doufat, že výměna molekul povede k široké řadě známých vysoce významných produktů a také k novým molekulám. Z toho vyplývá, že v biotechnologiích by společné pěstování heterotrofních kvasinek a autotrofních mikrořas, nebo sinic mohlo být zkoumáno jako velmi slibná strategie [3].

2 Teoretická část

2.1 Studované metabolity

2.1.1 Lipidy

Lipidy jsou základními stavebními kameny všech buněk [4]. Jedná se o látky biologického původu a spadají do heterogenní skupiny molekul. Mají společnou vlastnost, kterou je hydrofobicita a rozpustnost v organických rozpouštědlech. Struktura lipidů může být odvozena od jednoduchých krátkých uhlovodíkových řetězců (monoterpeny, diterpeny) až po složitější molekuly, zahrnující triacylglyceroly, fosfolipidy, steroly a jejich estery. Lipidy obsaženy v jednotlivých třídách se mohou výrazně strukturálně lišit. Nejznámějšími zástupci jsou mastné kyseliny, které jsou nedílnou součástí komplexních lipidů, liší se délkou uhlovodíkového řetězce, a také přítomností, množstvím a polohou dvojných vazeb v uhlovodíkovém řetězci. Mastné kyseliny a komplexní lipidy obsahují různé strukturální varianty, které vedou k funkčním rozdílům a ty ovlivňují jejich metabolismus a jejich účinky [5]. Lipidy dělíme do tří základních skupin:

a) Jednoduché lipidy, které se dále dělí na acylglyceroly a vosky

b) Komplexní lipidy, které jsou po strukturální stránce odvozeny zejména od struktury acylglycerolů, kde je jedna z esterových esterifikována kyselinou fosforečnou. Na volné hydroxylové skupině fosfátu obsahují i další navázané komponenty (alkoholy, sacharidy aj.). Díky těmto komponentám komplexní sacharidy mají amfifilní charakter. Mezi fosfolipidy, dle navázaného substituentu řadíme např. glykolipidy, fosfolipidy a sfingolipidy.

c) Odvozené lipidy, které jsou odvozeny od lipidů a jejich prekurzorů. Jsou zde řazeny steroly, steroidní hormony, terpeny, karotenoidy, ubichinon, vitamíny rozpustné v tucích atd.[6][7].

2.1.1.1 Struktura, vlastnosti a funkce lipidů

Živý svět je plný různých biomolekul (např. sacharidy, lipidy, nukleové kyseliny) ty jsou evolučně organizovány tak, aby plnily funkce nezbytné pro život. Lipidy jsou jedinou třídou základních molekul, které netvoří polymery, ale zato disponují širokými

strukturní varianty a motivy. Tvoří membránové bariéry, také ukládají energii a usnadňují buněčnou signalizaci [8]. Lipidy mají nepolární charakter a jsou nerozpustné ve vodě a dalších polárních rozpouštědlech. Lipidy amfipatické povahy (v molekule obsahují hydrofilní i hydrofobní část) vytváří micely a jejich struktura je závislá na polaritě prostředí [4][7]. Lipidy v buňce plní základní funkce, strukturní, ochranné, funkce ukládání energie, metabolické a rozpouštěcí funkce. Strukturní funkcí rozumíme, že fosfolipidy tvoří základní stavební kameny membrán všech buněk a organel. Ochrannou funkcí jsou lipidy využívány vyššími organismy jako tepelný izolant a ochranou před vnějšími vlivy. Energie je ukládána v dlouhých řetězcích mastných kyselin a je uvolňována pomocí β -oxidace [7]. Oleogenní mikroorganismy jsou stále více považovány za mikroorganismy známé vysokou produkcí lipidů [9].

2.1.2 Biosyntéza lipidů

Syntéza lipidů a její metabolická dráha je v principu ustálená a jednotlivé chemické reakce odehrávané a kroky jsou u všech druhů buněk a mikroorganismů stejné [7]. Biosyntéza lipidů se neobejde bez nepřetržitého přísunu mastných kyselin, které jsou esterifikovány v různých lipidových strukturách, kterými mohou například být fosfolipidy, triacylglyceroly (TAG). Aby tento děj mohl nepřetržitě probíhat je potřeba stálý přísun acetylkoenzymu A (Acetyl-CoA) v cytosolu, kde probíhá biosyntéza mastných kyselin [10]. Kvasinky nemají ATP: citrát lyázu, ale mají tvelmi efektivní dráhu vedoucí k cytosolovému Acetyl-CoA. Prvně se dekarboxyluje pyruvát a acetaldehyd, ten se dále přeměňuje na acetát a acetyl-CoA. Acetaldehyd je hlavně za fermentačních podmínek přeměňován na ethanol, ale stále dostatečné množství acetaldehydu je přeměňováno na acetyl-CoA, právě aby byla zajištěná dostatečná biosyntéza lipidů. I přesto, že tato dráha je centrální pro fermentační metabolismus u kvasinek, je také účinná při respiračních podmínkách. Biosyntéza lipidů obsahuje dvě větve z acetyl-CoA, jedna z nich vede k mastným kyselinám a druhá vede ke sterolům. Mastné kyseliny slouží jako stavební kameny pro biosyntézu TAG, fosfolipidů [11].

Výroba nového triacylglycerolu a fosfolipidu, představuje pro mikrobiální buňku náročný energetický proces. Prekurzory této biosyntézy jsou mastné kyseliny a aktivovaný glycerol (glycerol-3-fosfát a dihydroxyacetonfosfát), jehož významným zdrojem je například glykolýza sacharidů [12].

Dalším krokem jsou dva řetězce mastných kyselin postupně připojeny k aktivnímu glycerolu a vznikají fosfolipidy. Pokud má buňka dostatek energie a také jsou splněny potřeby pro tvorbu fosfolipidů, je fosfátová skupina na třetím atomu uhlíku glycerolu nahrazena třetí molekulou mastné kyseliny. Vznikne triacylglycerolová sloučenina sloužící pro ukládání energie. K dalším funkčním skupinám (monosacharidy, proteiny), může být připojena hotová lipidová struktura. Tento proces vede k zisku nových vlastností, umístění a funkci v buňce [10][13][14].

Biotechnologicky je významná právě nadprodukce lipidů. Nadprodukce lipidů je nastartována změnou metabolismu, která je regulovaná několika klíčovými enzymy. Adenosinmonofosfátdeamináza je klíčový enzym, který je zapojen jako první. Když je jeho regulace zvýšena, aby byla zesílena odpověď na určitý stimulus odštěpí se aminoskupina připojená k 6. uhlíku adenosinmonofosfátu (AMP), kdy vznikne inosinmonofosfát (IMP) a amonný iont. Následuje potlačení koncentrace AMP v buněčné cytoplazmě vedoucí ke snížení aktivity isocitrátdehydrogenázy (ICDH), tím je zvýšena koncentrace isocitrátu v mitochondriích a ten je dopraven do cytoplazmy buňky díky citrát/malát translokáze. Isocitrát je stěpen pomocí citrátlyázy a vzniká oxalacetát a acetyl-CoA. Osud oxalacetátu je takový, že se vrací do mitochondrií ve formě malátu. Acetyl-CoA je využit v procesu syntézy mastných kyselin. Aby došlo k syntéze kyseliny palmitové je potřeba 8 molekul acetyl-CoA a 16 molekul NADPH [15][16][17].

2.1.3 Mastné kyseliny: struktura a nomenklatura

Mastné kyseliny jsou tvořeny uhlovodíkovými řetězci o různých délkách a stupni nenasyčenosti (přítomnost dvojných vazeb), s připojenou karboxylovou skupinou na jednom konci a na druhém konci s methylovou skupinou. Nejpočetnější skupinou mastných kyselin jsou ty, které mají sudý počet uhlíků s přímým řetězcem. Uhlovodíkový řetězec může mít různou délku od 2 až po 30 uhlíků. Mastné kyseliny dělíme na:

- a) SFA – Nasycené mastná kyseliny, tvořené pouze uhlovodíkovým řetězcem bez násobných vazeb
- b) MUFA – Mononenasyčené mastné kyseliny obsahující v řetězci 1 dvojnou vazbu
- c) PUFA – Polynenasycené mastné kyseliny jsou definovány přítomností minimálně dvou nenasyčených vazeb.

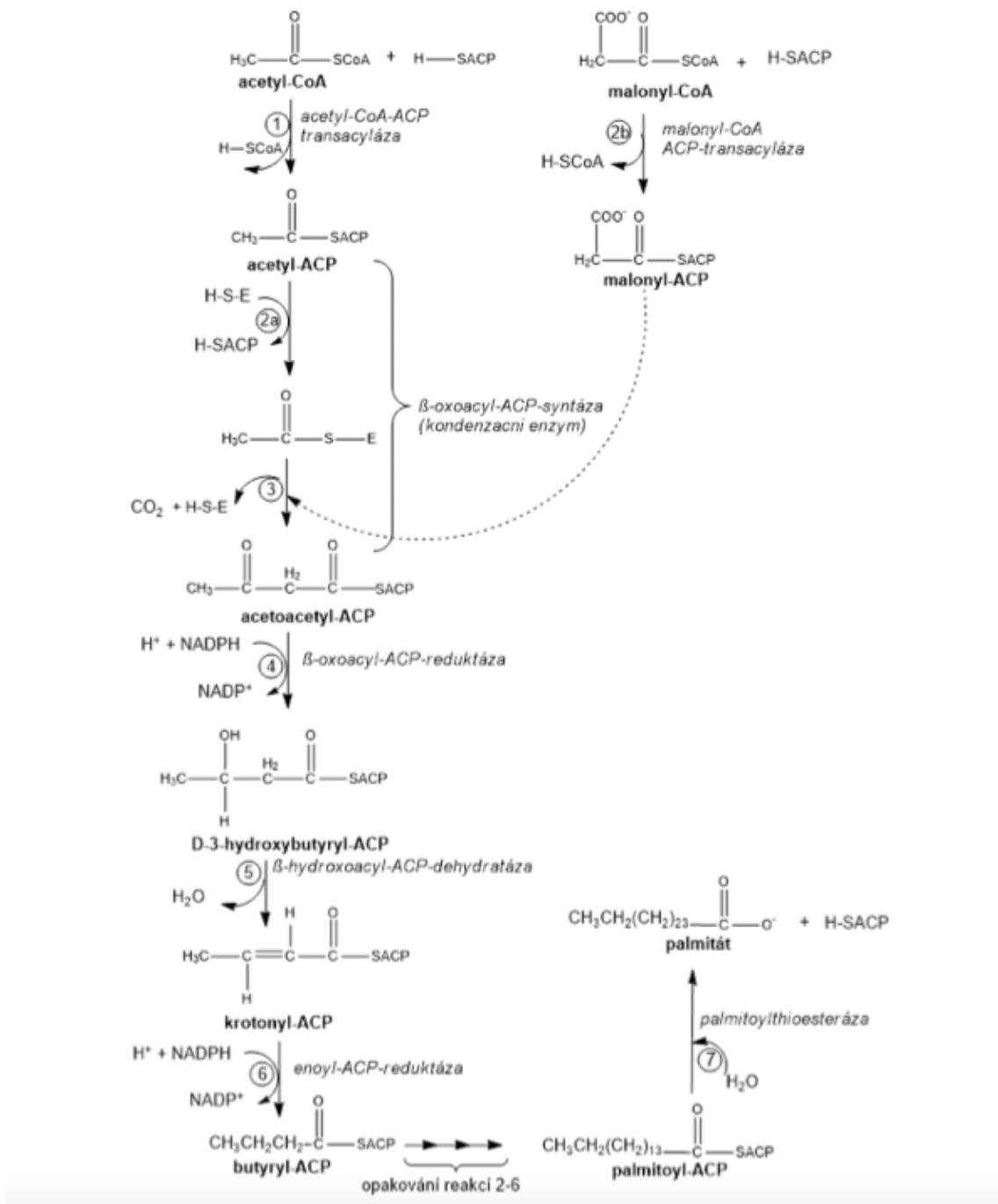
Vlastnosti, funkci a chování mastných kyselin ovlivňuje délka řetězce, poloha dvojně vazby a její orientace cis/trans., Řetězec mastných kyselin může být i zakřiven (počet, poloha a orientace dvojných vazeb) a tím může být změněno zabalení v lipidových membránách a mohou mít také změněny biofyzikální vlastnosti (teplota tání) [5].

2.1.3.1 Mastné kyseliny: syntéza

Nasycené mastné kyseliny jsou syntetizovány postupnou kondenzací C₂ jednotek ve formě acetyl-CoA k acylovému řetězci. Proces je katalyzován pomocí cytosolového multienzymového komplexu, známým pod názvem syntáza mastných kyselin. Počátkem kondenzační reakce je adice C₂ z acetylové skupiny, která je vázaná na kondenzační enzym do komplexu malonyl-acyl carrier protein (ACP) a vzniká acetoacetyl-ACP a CO₂ z malonylové skupiny. Acetoacetyl-ACP je redukován na butyryl-ACP a 4uhlíková butyrylová skupina je přemístěna z ACP na kondenzační enzym. Tímto je řetězec prodloužen o 2 uhlíky a enzymový komplex následně dehydratuje a redukuje hydroxy skupinu za vzniku nasyceného řetězce. Hlavním produktem syntézy mastných kyselin je kyselina palmitová. Mastné kyseliny s delším řetězcem u eukaryot vznikají z kyseliny palmitové, kdy jsou za potřebí elongázy, působící jako elongační enzym, kterými jsou katalyzovány prodlužovací reakce. Poté následují redukční a dehydratační reakce a vzniká nasycený uhlovodíkový řetězec. Syntéza mastných kyselin je znázorněna (Obr. č. 1) [5].

Mononenasycené mastné kyseliny vznikají desaturací mastných kyselin, enzymy zvanými desaturázy. Primárními substráty, které vstupují do reakce, jsou palmitoleoyl-CoA a oleoylkyseliny. Tato reakce je katalyzována stearoyl-CoA desaturázou [5].

PUFA mohou produkovat veškerá eukaryota a některé bakterie. Existují důležité rozdíly ve specifitě desaturáz, které jsou exprimované v rostlinných a živočišných tkáních, ty mají důsledky na požadavky mastných kyselin. Savci nemohou syntetizovat kyselinu linolenovou a α -linolenovou, obě kyseliny jsou esenciální mastné kyseliny a musí být přijímány ve stravě [5].



Obr. č. 1 Schéma syntézy mastných kyselin [18]

2.1.4 Karotenoidy

Karotenoidy jsou červené, oranžové a žluté pigmenty. Syntetizují je rostliny a některé mikroorganismy a plní mnoho důležitých fyziologických funkcí. Karotenoidy mají různé průmyslové využití jako například barviva a antioxidanty. Mají také velmi příznivý vliv na zdraví, a proto jsou využívány v potravinářském, nutraceutickém průmyslu a také farmakologickým průmyslem [19].

Karotenoidy tvoří velkou skupinu pigmentů a bylo z nich určeno více než 750 chemických struktur. Skládají se z uhlovodíkové kostry 40 atomů uhlíku, skládající se z 8 izoprenových jednotek. Díky acyklické struktuře mají pigmenty velkou rozmanitost a acyklická struktura má dlouhou centrální sloučeninu polyenu, která absorbuje světlo [19].

Karotenoidy mají silný účinek jako antioxidanty a pohlcovače radikálů, které zastavují smrtící účinky singletového kyslíku a superoxidu, ten vzniká při oxidačním stresu nebo za přítomnosti těžkých kovů. Pokud kvasinky rostly za nepříznivých podmínek, bylo popsáno, že mnoho z nich prokázalo zvýšenou schopnost produkovat karotenoidy [20]. Mnoho druhů kvasinek má schopnost akumulovat karotenoidy [21]. Nejen karotenoidy, ale i TAG z kvasinek jsou důležitými bioprodukty, které lze využít pro nutriční průmysl a výrobu bionafty [22].

2.1.4.1 Komerční aplikace karotenoidů

Karotenoidy jsou díky svým barevným vlastnostem využívány v potravinách a krmivech. Přírodní karotenoidy jsou používány k posílení barvy ryb, to má za účinek zvýšení spotřebitelské kvality. Karotenoidy byly navrženy jako sloučeniny s přidanou hodnotou, které by mohly přispět k tomu, aby výroba biopaliv z mikrořas byla ekonomicky rentabilní. Na trhu dominují chemicky syntetizované karotenoidy, které ale nedosahují biologických účinků přírodních karotenoidů. Přirozené karotenoidy jsou však stále populárnější, díky spotřebitelům, kteří chtějí přírodní produkty. Přírodní karotenoidy je možné extrahovat z rostlinného materiálu (rajčata, řasy a houby). Poté jsou individuální karotenoidy dostupné v různých formách (prášek rozpustný ve studené vodě, olejová emulze a kuličky). Nejobvyklejší koncentrace se pohybuje okolo 10 % hmotnosti produktu [22].

V biotechnologii mikrořas se výroba karotenoidů v posledních letech stala jednou z neúspěšnějších aktivit. Odhadovaný nárůst na trhu v roce 2028 je odhadován na 1,9 miliardy dolarů. Mikrořasy jsou slibné suroviny pro biopaliva. V přirozených potravinách (vaječný žloutek, kuřecí maso, ryby) jsou karotenoidy využívány jako zvýrazňovače barvy [22].

Hlavní typy karotenoidů, které jsou komerčně využívány na globálním trhu, jsou astaxanthin, β -karoten, lutein, kanthaxantin, lykopen a zeaxanthin. β -karoten je pigment,

který dodává červené zbarvení, žlutou nebo oranžovou barvu rostlinám, řasám a zvířatům [23].

2.1.4.2 Kosmetický průmysl

V kosmetickém průmyslu jsou karotenoidy využívány jako konzervanty. Kombinace s dalšími antioxidanty nebo bioaktivními látkami z řas, také v krémech na ochranu před sluncem při opalování. U pacientů s lupénkou, což je kožní zánětlivé onemocnění, byl prokázán příznivý účinek karotenoidů. Karotenoidy také poskytují fotoprotekci proti UV záření [22].

2.1.4.3 Nutraceutický a zdravotní trh

Jednou z velmi důležitých funkcí karotenoidů v lidském těle je jeho biotransformace na retinol (funkce provitaminu A). Tuhle schopnost má asi jen 10 % karotenoidů, které jsou identifikované v přírodě. Pro zdraví dítěte a přežití je vitamín A velmi důležitým faktorem, jeho nedostatek může způsobit poruchy vidění a různé další související patologie plic, průdušnice a dutiny ústní. Jediný zdroj prekursoru retinolu u lidí je strava, ovoce, zelenina a mikrořasy jsou hlavními dodavateli aktivních karotenoidů provitaminu A [22].

Karotenoidy mají dále pozitivní účinek na zastavení rozvoje chronických a degradativních onemocnění. Rakovina a kardiovaskulární onemocnění jsou hlavní příčinou úmrtí ve světě a právě 50 % nádorů je připisováno špatné stravě. Karotenoidy jsou nezbytné pro zdraví buněk. Je to díky jejich ochrannému působení na buněčné složky proti oxidativnímu poškození. Buňky imunitního systému provádí mezibuněčnou komunikaci působením karotenoidů. Příjem karotenoidů může pomoci při zabránění vzniku rakoviny [22].

Diety bohaté na karotenoidy by mohly chránit lidský organismus před kardiovaskulárními onemocněními. To v důsledku zapojení oxidačních látek a oxidačního stresu do rozvoje a klinického projevu ischemické choroby srdeční.

Karotenoidy mají také pozitivní účinky na zdraví očí. Také karotenoidy mohou vycitávat reaktivní formu kyslíku (ROS) a mají protizánětlivé účinky [22].

2.1.4.4 Produkce karotenoidů

V současnosti je majorita světové produkce karotenoidů realizována především syntetizována chemickou cestou, pouze malá část karotenoidů se získává přirozeně extrakcí z rostlin nebo řas. Veřejnost se spíše soustředí na přirozenou cestu získávání karotenoidů, které jsou pak využívány jako alternativy ke konvenčním lékům. Sinice a karotenogenní kvasinky právě představují alternativní zdroj přírodních karotenoidů. Proto extrakce karotenoidů extrahovaných z produkujících mikroorganismů může vyřešit problémy s vyvážením nabídky a poptávky po těchto produktech [23].

Karotenoidy se dělí do dvou kategorií, a to na primární a sekundární. Primární karotenoidy jsou složkou fotosyntetického aparátu (strukturního i funkčního), jsou tedy nezbytné pro přežití. Karotenogenezi jsou produkovány sekundární karotenoidy pouze v případě specifických podmínek prostředí (vysoké světlo, osmotický šok), kterým je buňka vystavena. Primární karotenoidy jsou spojeny s membránami, sekundární karotenoidy jsou umístěny v lipidových vezikulách ve stromatu plastidu nebo cytosolu. Karotenoidy, které jsou syntetizovány v chloroplastech, mohou být exportovány do cytoplazmy a poté se mohou nacházet kdekoli umístěné po buňce [24].

2.1.4.5 Struktura a vlastnosti karotenoidů

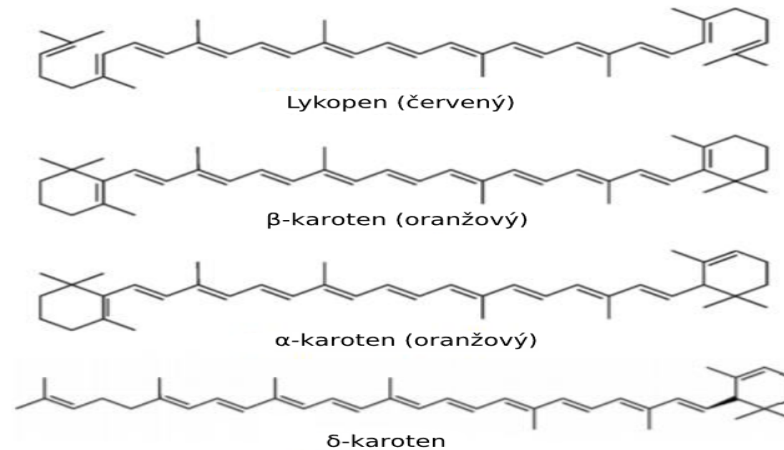
Spojením dvou molekul C₂₀ geranylgeranyldifosfátu jsou syntetizovány karotenoidy, metabolická dráha syntézy karotenoidů u rodu *Rhodotorula* je znázorněna níže (viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Mezi hlavní karotenoidy jsou řazeny lykopen, β-karoten, lutein a zeaxanthin, níže jsou uvedeny struktury základních karotenoidů (Obr. č. 2 **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Veškeré karotenoidy mají polyizoprenoidní strukturu, dlouhý konjugovaný řetězec dvojných vazeb a téměř bilaterální symetrii kolem centrální dvojných vazeb. Karotenoidy mohou být rozděleny, jako provitamin A a sloučeniny neprovitaminu A. Dalším hlediskem, kterým jsou karotenoidy děleny, je dle jejich funkčních skupin:

- a) xantofyly obsahující kyslík, jako funkční skupinu
- b) karoteny složené jen z mateřského uhlovodíkového řetězce

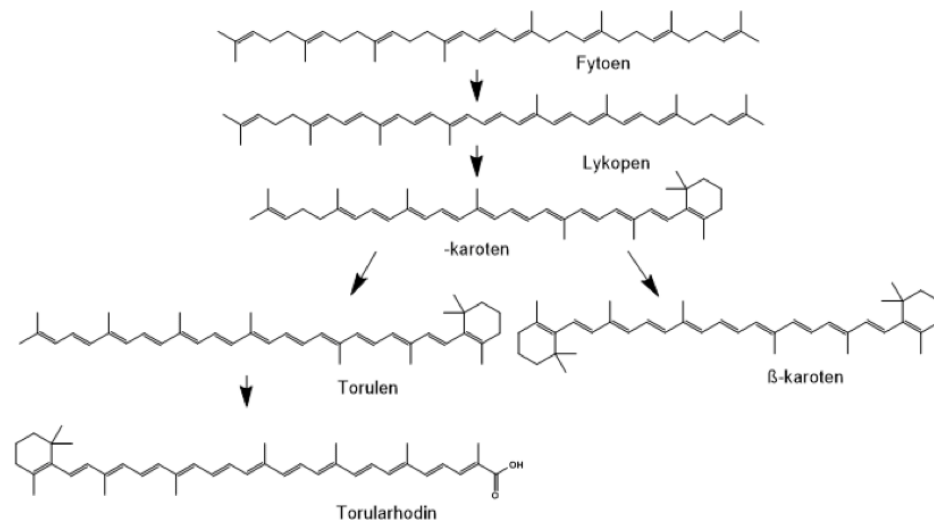
Karotenoidy jsou hydrofobní molekuly, které mají velmi nízkou rozpustnost ve vodě. Polární funkční skupiny, které jsou připojené k polyenovému řetězci, mohou měnit

polaritu karotenoidů. To může ovlivnit lokalizaci karotenoidů v biologických membránách a jejich interakce s různými molekulami [25].

Karotenoidy jsou přítomné v rostlinách, houbách, bakteriích a řasách, dále jsou také přítomné v mnoha potravinách (ovoce, zeliny, ryby). Obecně byla prokázána řada biologických účinků karotenoidů [25].



Obr. č. 2 Struktura vybraných karotenoidů [26]



Obr. č. 3 Metabolická dráha syntézy karotenoidů u rodu Rhodotorula [27]

2.1.5 Chlorofyly

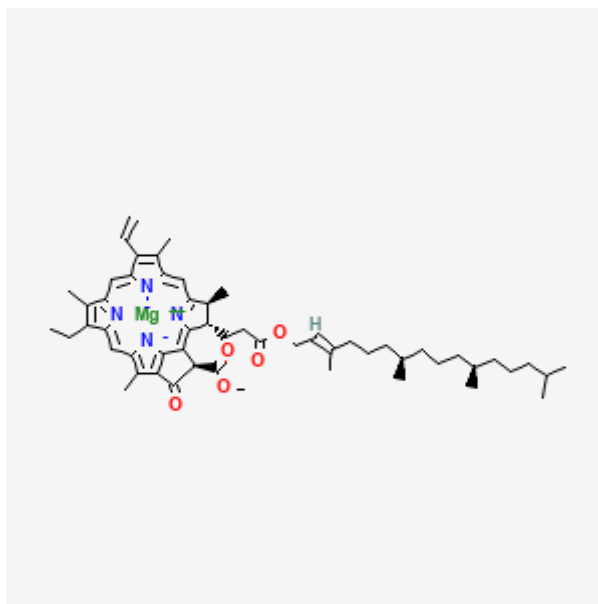
Chlorofyly jsou lipofilní pigmenty, které jsou zodpovědné za zelené zbarvení u fotosyntetických organismů (rostliny, mořské řasy, mikrořasy). Jsou tedy nejvíce zastoupenými pigmenty na zemi. Primární funkcí chlorofylů je fotosyntéza, ale mají i

další řadu jiných funkcí, kterými jsou široká škála biologických aktivit, včetně anti mutagenního účinku, anti genotoxických vlastností.

Mají také silnou antioxidační schopnost spojenou s vychytáváním volných radikálů, tím je zabráněno oxidaci lipidů. Naše každodenní strava obsahuje chlorofyly, a to nejen ze zeleniny, ovoce a ryb, ale také z povolených zelených potravinářských barviv, které jsou používána při zpracování potravin [28].

Název chlorofyl je brán jako obecný název, který ale seskupuje více než 100 různých struktur chlorofylu. Mají různé strukturální přeskupení, chemické chování, polaritu a mnoho dalších. Chlorofyly, které jsou přítomné v potravinách, jsou vystavovány různým chemickým, biochemickým úpravám v důsledku přirozeného zrání, stárnutí, zpracování a skladování, díky tomu je složitost ve struktuře zvyšována. Potravinářské barvivo, které mají povolené přídavky zelených potravinářských barviv, mohou obsahovat nové struktury chlorofylu [28].

Obecná struktura chlorofylů se skládá z porfyrinového kruhu s navázaným chelátovým Mg^{2+} kationtem umístěného ve středu molekuly (viz Obr. č. 4). V konkrétním makrocyclickém ligandu je použitý kov v závislosti na účelu, pro který biologický proces byl ligand vytvořen. Hořčík byl evolučně vybrán pro molekulu chlorofylu, aby sbíral světlo, kde neredoxní hořčík je nápomocen v procesu absorpce světla. Existují. Především čtyři druhy chlorofylu, chlorofyl a, chlorofyl b, chlorofyl c a chlorofyl d. Barva chlorofylu je zelená, daná díky jeho absorpčnímu spektru v červené a modré oblasti (viditelné části) elektromagnetického spektra. Barva květů a plodů je nažloutlá, a to díky obsahu karotenoidů, jiných barviv a absenci chlorofylu. Komplexy chlorofylu A a karotenoidů jsou známy tím, že chrání fotosyntetický systém před silným světlem [29].

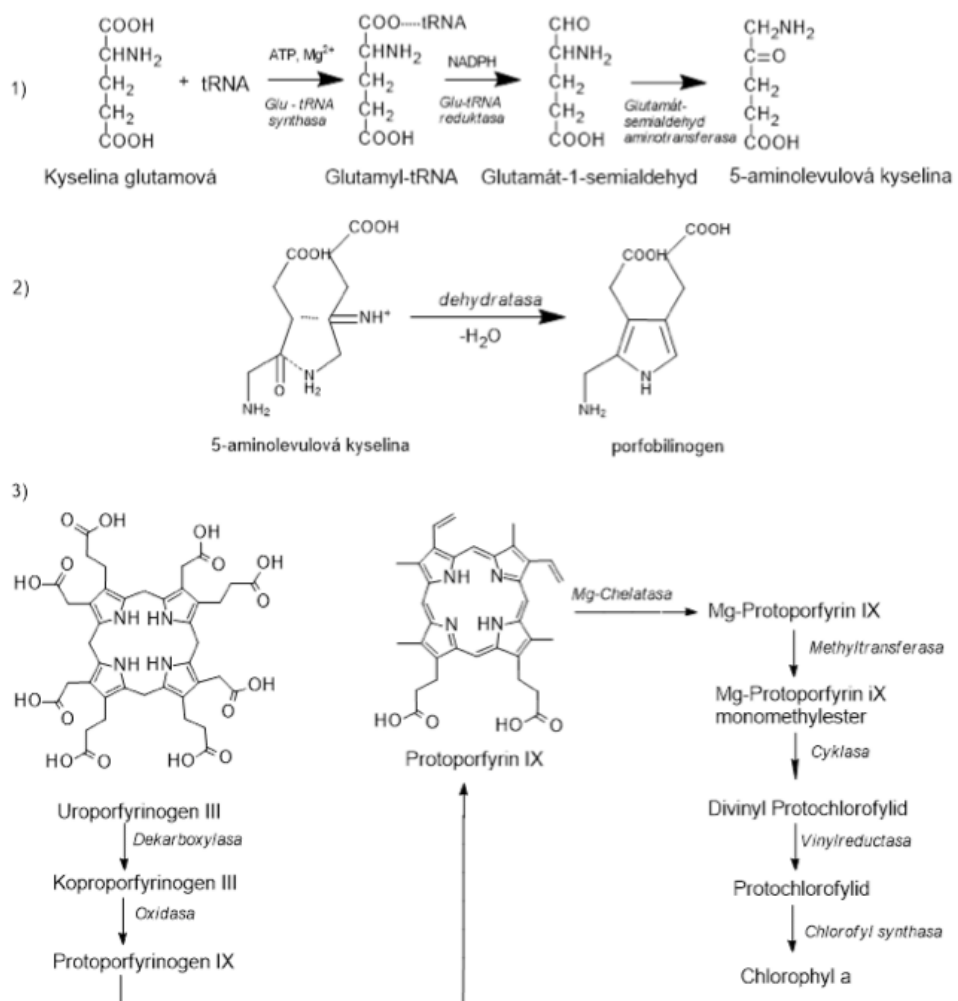


Obr. č. 4 Struktura Chlorofylu [30]

2.1.5.1 Biosyntéza chlorofylu

Biosyntéza chlorofylu se odehrává uvnitř chloroplastů eukaryotických buněk a v cytoplasmě prokaryotických buněk. Chlorofyly a tetrapyrrolové sloučeniny jsou syntetizovány souhrnnou biosyntetickou cestou, jeden z prvních meziproduktů této dráhy je kyselina d-aminolevulová (ALA) [31]. Kondenzace molekuly glutamátu s tRNA dává vzniku glutamyl-tRNA působením enzymu glutamyl-tRNA syntázy. Glutamyl-tRNA reduktáza přeměňuje nově vytvořenou molekulu na glutamát-1-semialdehyd. Poté následuje transaminace, kdy vzniká kyselina 5-aminolevulová, která je nezbytným prekurzorem pro syntézu porfyrinů. ALA dehydratáza (ALAD) kondenzuje dvě molekuly ALA a vzniká pyrrol, porfobilinogen (PBG) a čtyři molekuly PBG jsou polymerizovány PBG deaminázou za vzniku lineárního tetrapyrrolu, 1-hydroxymethylbilanu (HMB). Uroporfyrinogen III syntáza přeměňuje HMB na uroporfyrinogen III (URO), jedná se o první uzavřený makrocyklus v dráze. Poté je URO přeměněn na koproporfyrinogen III (COPRO) v dekarboxylačních reakcích katalyzovaných dekarboxylázou uroporfyrinogenu III. Následně jsou dvě propionátové skupiny COPRO dekarboxylovány a vzniká protoporfyrinogen IX pomocí koproporfyrinogen III oxidázy. Protoporfyrin IX vzniká oxidační reakcí extrahující šest elektronů z protoporfyrinogenu IX katalyzovanou protoporfyrinogen IX oxidázou. Mg-chelatáza je dále potřebná ke katalýze začlenění Mg^{2+} za vzniku Mg-protoporfyrinu IX. Následně je produkován divinyl protochlorofylid cyklizační reakcí. Poté následuje redukční reakce produkující chlorofylid.

Postranní řetězce kyseliny propionové jsou esterifikovány fytyl difosfátem, za vzniku molekuly chlorofylu. Esterifikace je katalyzována chlorofylsyntázou [32]. Cesta biosyntézy chlorofylu až do určitých bodů je sdílena mezi různými tetrapyrroly (chlorofyl, hem, sirohem, fytochrombilin), na které má buňka v různých časových intervalech různé požadavky. Kombinace s fototoxickými vlastnostmi tetrapyrrolů, které pokud nejsou správně chráněny, mohou vést k tvorbě ROS. Musí být přísně řízena regulace biosyntetické dráhy chlorofylu. Schéma biosyntézy chlorofylu je znázorněno (viz Obr. č. 5) [32].



Obr. č. 5 Biosyntéza chlorofylu [33]

2.1.5.2 Fotosyntéza

Fotosyntéza je dvoustupňový proces, který propojuje transdukcí světelné energie na energii chemickou s čistým hromaděním organických metabolitů primárně prostřednictvím biochemického zachycování atmosférického CO₂. Tuto světelnou energii (sluneční) zachycují fototrofní organismy a přeměňují ji na chemickou. Asimilace CO₂ je závislá na produktech světelných reakcí, přímo na redukční síle ve formě NADPH a vazebné energii, která je ve formě ATP. Pokud je asimilace CO₂ omezena právě dostupností CO₂ nebo kapacitou, tak světelné reakce mohou být modulovány zpětnovazebnou reakcí. Během evoluce se podařilo vyvinout několik typů fotosyntézy, které mají společný prvek a tím je zachycování slunečního světla. Rozdíl je ve zdroji redukčního činidla. Dříve fotosyntetické mikroorganismy využívaly s největší pravděpodobností vodík, sulfan, nebo jiné obdobné sloučeniny. Později se mikroorganismy přizpůsobily prostředí vody, vodu využívaly jako redukční činidlo a byla vytvořena kyslíková fotosyntéza. Sinice jsou prvotními mikroorganismy, které využívaly kyslíkovou fotosyntézu. Poté ze sinic byl přenesen tento biochemický proces na rostliny a řasy. Biochemický proces kyslíkové fotosyntézy je rozdělen do dvou částí [34][35][36]:

- a) Světelná fáze – přeměna energie, syntéza NADPH a ATP
- b) Temná fáze – včlenění CO₂, syntéza glukózy

2.1.5.2.1 Světelná fáze fotosyntézy

Fotosyntetické mikroorganismy absorbují sluneční záření v pásmu viditelného světla (rozsah 400 – 700 nm) v prvotní světelné fázi fotosyntézy. U sinic je proces fotosyntézy soustředěn ve specializované oblasti vnitřního prostoru buňky, který je nazván cytosol. U eukaryot je světlo absorbováno v chloroplastech, ty jsou vybaveny potřebnými složkami pro fotosyntézu. Chloroplasty obsahují specializované organely a ty mají vnitřní membránový systém, který je nazýván tylakoidy a na povrchu tylakoidní membrány jsou dva fotosystémy (PS I a PS II) [35][36].

Molekuly chlorofylu a anténní pigmenty tvoří fotochemická reakční centra, která jsou centrem fotosystému. Hrají důležitou roli ve fotosystému, anténní pigmenty jsou nosiči energie a zahrnují karotenoidy, chlorofyly a další. Anténní pigmenty Fotosystému II absorbují světelné záření, to je začátek fotosyntézy. Nejdříve je elektron excitován a následně je přenesen do reakčního centra fotosystému II, to obsahuje chlorofylový pigment.

Následně pomocí modifikace molekuly chlorofylu se elektron převádí na molekulu feofytinu. Feofytin dále přenáší elektron k plastochinonu a následně je v systému transportu elektronů přenesen do fotosystému I a zaplňuje chybějící elektrony v tomto systému [35][36].

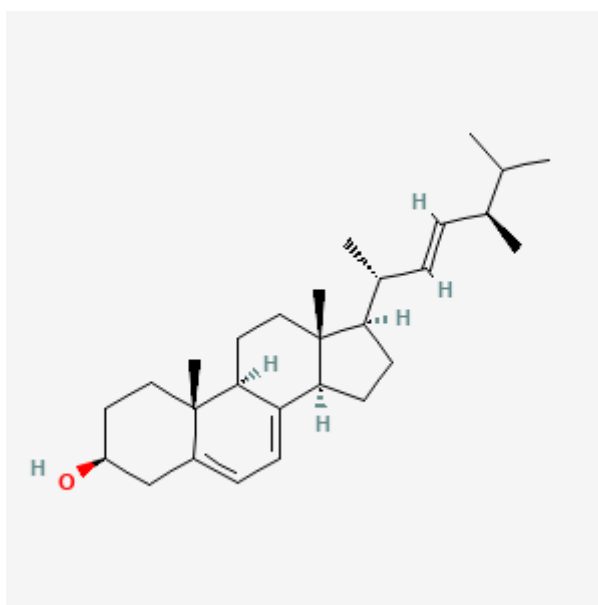
Pomocí feroproteinového systému jsou excitované elektrony z fotosystému I přeměněny na NADP-reduktázu. NADP⁺ je redukováno na NADPH pomocí komplexu reduktáza-cytochrom b6F. Při transportu elektronů vzniká gradient elektrochemického potenciálu. Ten se využívá k vytvoření gradientu vodíkových protonů v mezimembránovém prostoru chloroplastu. Tento protonový gradient je využit následně kanálem transmembránového proteinového komplexu ATP syntázy a je využitý pro syntézu ATP. Fotolytický rozklad vody je nazývá Hillova reakce a díky tomuto ději jsou doplňovány elektrony, které jsou poskytovány PS II. Konečné protony vodíku jsou využity k tvorbě protonového gradientu a kyslík je uvolňován jako odpad. Po shrnutí tedy konečnými produkty této fáze jsou molekuly ATP a redukovaný kofaktor NADPH, ty jsou dále využity v temnostní fázi [35][36].

2.1.5.2.2 Calvinův cyklus

Temnostní fáze neboli cyklus Calvina Bensona, v tomto cyklu jsou ATP a NADPH využívány k fixaci oxidu uhličitého a jeho následné redukci, která dá vzniku uhlovodíkové kostře. Finálním produktem dráhy je molekula glukózy, ke které vede řada reakcí. Enzym ribulóza-1,5-bifosfátcarboxyláza/oxygenáza (enzym Rubisco), který je jako jediný schopen vázat oxid uhličitý a je tedy nejdůležitějším enzymem cyklu. Calvinův cyklus je dělen do tří fází, které jsou karboxylace, redukce a regenerace. První fází je karboxylace molekuly ribulóza-1,5-bifosfát enzymem Rubisco za vzniku 6-uhlíkatého prekurzoru, který je ihned štěpen na dvě 3-fosfoglycerátové jednotky. Poté je 3-fosfoglycerát fosforylován pomocí ATP na 1,3-bifosfoglycerát. Redukční fáze je ukončena redukcí 1,3-bifosfoglycerátu na glycerát-3-fosfát. V regenerační fázi se uhlíkové jednotky spojí, a je vytvořena ribulóza-5-fosfát. Ribulóza-5-fosfát je fosforylován pomocí ATP a vstupuje do dalšího cyklu. K tomu, aby byla vyrobena jedna molekula 3-fosfoglycerátu jsou potřeba 3 otáčky cyklu. Působením dráhy glukoneogeneze je 3-fosfoglycerát přeměněn na glukózu. Celkem v Calvinově cyklu probíhá 13 reakcí, kterých se účastní 11 enzymů. Regenerace enzymu Rubisco a ribulóza-1,5-bifosfátu jsou specifickými pouze pro tento cyklus [35][36].

2.1.6 Steroly

Steroly jsou esenciální lipidy, které obsahuje většina eukaryotických buněk. Zajišťují důležité strukturální a signalizační funkce (Dupont, a další, 2012). Mezi funkce sterolů řadíme kontrolu fluidity a permeability membrány a v některých rostlinách mají steroly specifickou funkci při proliferaci buněk, transdukcii signálu a jako modulátory aktivity enzymů vázaných na membránu. Mikrobiální steroly jsou řazeny do skupiny bioaktivních molekul, které jsou odvozeny od steranové struktury s obsahem minimálně jedné hydroxylové skupiny. Mezi tuhle obsáhlou skupinu molekul se řadí kvasinkový ergosterol (viz Obr. č. 6), mikrořasový clionasterol, fuconasterol a steroidní hormony (testosteron, aldosteron a další). Prvním popsáním a izolovaným byl ergosterol, ten byl izolován z námelových sklerocií, které rostly na žitu [7][37][38][39].



Obr. č. 6 Ergosterol [40]

2.1.6.1 Biosyntéza sterolů

Izoprenoidní dráha je základem pro biosyntézu sterolů, protože biosyntéza je na ní postavena a je tedy pro všechny organismy většinou ustálená. U eukaryotických buněk probíhá syntéza na rozhraní cytoplazmy a endoplazmatického retikula a v semiautonomních organelách, kterými jsou chloroplasty a mitochondrie. Vstupní molekula je aktivována forma isoprenu. Začátek biosyntézy spočívá v postupné kondenzaci dvou IPP jednotek a jedné jednotky DMAPP, kdy vzniká C₁₅ řetězec farnesylpyrofosfátu.

Následuje spojení dvou molekul farnesylpyrofosfátu enzymem skvalensyntázou a vzniká C₃₀ řetězec skvalenu. V biosyntéze sterolů je syntéza prekurzoru skvalenu velmi důležitá, protože vytvořená molekula skvalenu může být použita pouze pro následné reakce sterolů. Oproti tomu, když vezmeme v potaz dřívější meziprodukty, kterými jsou farnesyl-PP, geranyl-PP, tak ty mohou být použity pro syntézu karotenoidů a dalších látek. Molekula skvalenu se poté ve dvou fázích cyklizuje a vzniká lanosterol. Lanosterol je přeměněn na příhodný mikrobiální sterol [37][41].

2.1.7 Ubichinon

Ubichinon, také známý jako koenzym Q (CoQ), je redox aktivní, lipofilní molekula přítomná ve všech eukaryotech a dost pravděpodobně se vyskytuje v každé buňce. Obsahuje redoxně aktivní benzochinonovou hlavní skupinu a ta je konjugována s polyisoprenoidním postranním řetězcem druhově specifické délky, který omezuje molekulu ubichinonu na struktury, které jsou bohaté na lipidy [42]. U bakterií a eukaryot funguje ubichinon jako nosič elektronů v aerobním dýchacím řetězci [43].

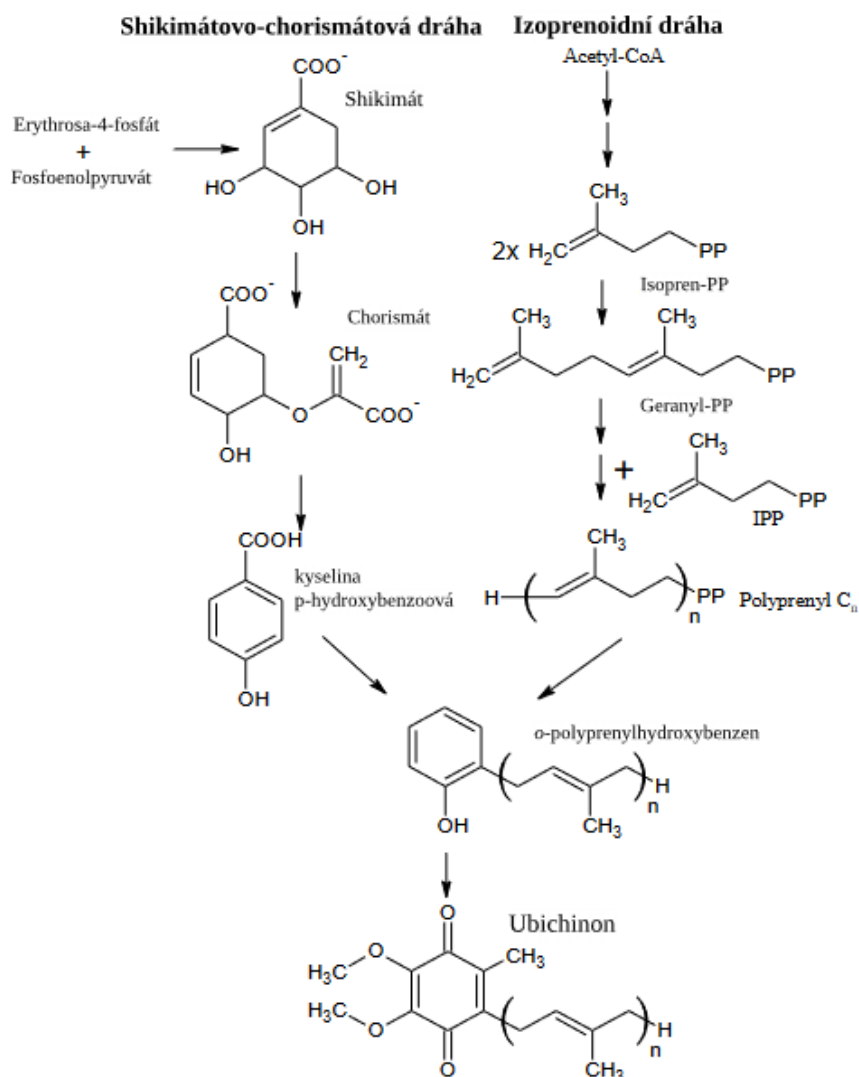
2.1.7.1 Funkce a využití ubichinonu

Ubichinon je lipid, který podléhá oxidoredukčním cyklům. Jeho funkce je např. v respiračním řetězci, kde transportuje elektrony a jeho klíčová role je v generování energie. Ubichinon je rozšířený redoxně aktivní lipid [44]. V elektronovém transportním řetězci jsou elektrony shromážděny při reoxidaci kofaktorů FADH₂ a NADH+H⁺ přesunuty vnitřním membránovým prostorem, kde je využit různý elektronový potenciál. Ubichinon spadá do zmíněného transportního řetězce. Funkci přenašeče využívající rozdílný elektronový potenciál má ubichinon umožněn, díky jeho struktuře, která se skládá ze dvou částí – chinonové jádro a polyprenový řetězec. Chinonové jádro je obsaženo v první části a umožňuje ubichinonu přijímat elektrony a následně se v procesu redukovat. Polyprenový řetězec je částí druhou. Vnitřní část biomembrány je nepolární tudíž polyprenový řetězec zajišťuje vyšší nepolární povahu ubichinonu a ten může existovat ve vnitřní části biomembrány. Ubichinon chrání lipidové membrány před peroxidací a oxidativní destrukcí díky jeho vysoce antioxidačním vlastnostem [44][45][46][47].

Ubichinon je nejvíce spojován s kosmetickým a farmaceutickým průmyslem, kde se využívá hlavně pro jeho schopnost zpomalit stárnutí pokožky. Díky přirozenému stárnutí kůže a organismu hladina ubichinonu v buňkách ubývá, jeho nedostatek však uvolňuje větší množství volných radikálů, a tím je způsobena mutace mitochondriální DNA a je narušena tvorba energie v buňce. Tento proces může vést až k rakovinnému bujení. Koenzym Q je nepostradatelný pro udržení fyziologické srdeční činnosti, kde i malý pokles jeho koncentrace má negativní důsledky na srdeční činnost. Studie potvrdily předpoklad prospěšnosti dlouhodobého užívání ubichinonu, který napomáhá celkovému zlepšení stavu organismu a také snížená rizika kardiovaskulárních, zánětlivých a nádorových onemocnění [44][45][46][47].

2.1.7.2 Biosyntéza ubichinonu

Základ biosyntézy ubichinonu je v kombinaci dvou metabolických drah, a to shikimát-chorismátové a izoprenoidní dráhy. Dráha shikimát-chorismátová, která je v cytoplazmě buňky, má zajistit syntézu chinonového jádra, což je prekurzor kyseliny p-hydroxybenzoové. Vstupními molekulami této dráhy jsou erythroza 4-fosfát a fosfoenolpyruvát, následnou společnou kondenzací a cyklizací vzniká šikimát, který se kondenzuje s jinou molekulou fosfoenolpyruvátu a přemění se na chorismát a z chorismátu vzniká kyselina p-hydroxybenzoová, po odštěpení pyruvátu od molekuly. Polyprenylpyrofosfát je vytvořen izoprenoidní dráhou, ten se kondenzuje s kyselinou p-hydroxybenzoovou a vzniká o-polyprenylhydroxybenzen. Ubichinon poté vzniká z o-polyprenylhydroxybenzenu, který prochází řadou oxidačních reakcí, biosyntéza znázorněna (viz Obr. č. 7) [7][44][45][46].



Obr. č. 7 Schéma syntézy ubichinonu [7][44]

2.2 Mikroorganismy

2.2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganismy spadající do říše hub. Kvasinky jsou heterotrofní mikroorganismy. Většina kvasinek spadá do třídy vřekovýtrusných hub, ale některé i do třídy stopkovýtrusných, a proto společně tvoří taxonomickou skupinu. Kvasinky jsou přítomné po celé planetě, odhaduje se, že doposud bylo popsáno asi 1500 druhů kvasinek. Odhadem se jedná asi o 1 % veškeré populace kvasinek na Zemi.

Velikost a tvar buněk u kvasinek je velmi varibilní a závislý na určitých faktorech, kterými mohou být: způsob vegetativního množení, prostředí, nutriční podmínky prostředí, ve kterém žijí a také na druhu kvasinky. Obecně je uváděna velikost u kvasinek v rozmezí 3-4 μm . Kvasinky netvoří žádné pravé miceliální buňky, tvoří pouze pseudomycelium, pokud žijí v koloniích. Dále také mohou žít i jednotlivě. Tvar buňky může být od elipsoidního přes vejčitý až kulovitý. U jednotlivých rodů mohou být i jiné tvary buněk, například u rodu *Schizosaccharomyces* je tvar válcovitý nebo u rodu *Trigonopsis* je trojúhelníkovitý [48][49][50][51].

2.2.1.1 Struktura a tvar kvasinkové buňky

Buňka kvasinek je složena z buněčné stěny, cytoplazmatické membrány a cytoplazmy. Jádro se nachází v cytoplazmě a je odděleno dvojitou membránou. V buňce se nachází ještě další organely, které jsou typické pro eukaryotické buňky (endoplazmatické retikulum, Golgiho komplex, mitochondrie, plastidy, vakuoly a také ribozomy) [48][49][50][51].

Buněčná stěna má v první řadě chránit buňku před vnějšími vlivy, kterými mohou být osmotický nebo mechanický šok a oddělit ji od okolí. Ale také musí zabezpečit a zprostředkovat transport živin do vnitřních částí buňky. Je díky ní umožněná komunikace mezi jednotlivými buňkami v kolonii. Buněčná stěna u kvasinek je silná a odolná, která je tvořena chitinovou vrstvou a na ní je usazená vrstva β -glukanů. Buněčná stěna je tvořena monosacharidovými jednotkami, které jsou spojeny v řetězec, ten je spojen 1,3glykosidickými vazbami a větven pomocí sacharidů, které jsou vázány 1,6-glykosidickými vazbami. Konečnou vrstvu tvoří fosfáty a proteiny [48][49][50][51].

Cytoplazmatická membrána je tvořená především z fosfolipidů a bílkovin. Struktura je nejlépe popsána jako lipidová dvojvrstva (fosfolipidová), v ní jsou rozpuštěné a ukotvené proteiny, steroly, antioxidanty, signální molekuly a další důležité části. Protoplast buňky je uzavřen cytoplazmatickou membránou. Dalším pozitivem u cytoplazmatické membrány je její semipermeabilita, která tvoří rozhraní mezi prostředím a buňkou. Malým plynům a molekulám je umožněn samostatný průchod přes membránu, ale větší molekuly už neprojdou, ty musí procházet do buňky transportními kanály, které se nacházejí na obou stranách [48][49][50][51].

Všechny buněčné organely, enzymy a další zásobní látky se nacházejí v cytoplazmě. Mezi důležitější organely jsou řazeny endoplazmatické retikulum (ER) a mitochondrie. ER je hladké a drsné. V oblasti drsného ER dochází k syntéze a modifikaci proteinů, které je způsobeno systémem membrán ER. Hladné ER, respektivě na jeho povrchu probíhá mnoho dalších transformací a modifikací lipidů, polysacharidů, syntézy karotenoidů a dalších enzymatických reakcí. Jako buněčné elektrárny jsou označovány mitochondrie. Enzymy dýchacího řetězce a enzymy oxidativní fosforylace se nacházejí v mitochondriích. Mitochondrie jsou semiautonomní organely, jsou to tedy organely s vlastní genetickou informací, samotné mají schopnost replikovat, přepisovat a překládat nukleové kyseliny [48][49][50][51][52].

Kvasinková buňka obsahuje zpravidla jednu velkou kulatou vakuolu. Vakuola slouží jako skladiště všech potřebných látek a enzymů. V počáteční fázi pučení je v buňce větší množství malých vakuol, ty však jak buňka stárne, se postupně zvětšují a počet se snižuje. Molekuly, které mají kratší poločas rozpadu, jsou hydrolyzovány pomocí vakuoly. Golgiho aparát je důležitý v posttranslačních modifikacích proteinů, následný transport na učená místa a syntézu polysacharidů [44][48][50][51][52].

Jádro kvasinkové buňky je od cytoplazmy odděleno jadernou membránou s póry. Je tedy nositelem genetické informace. Na jaderné membráně se diferencuje polární tělísko, jádro a polární tělísko tvoří mikrotubuly, a jsou díky tomuto spojení zajištěny potřebné procesy při dělení buněk [44][48][50][51][52].

2.2.1.2 Rozmnožování kvasinek

Kvasinky se mohou rozmnožovat vegetativně (nepohlavně) a pohlavně, oba druhy rozmnožování se u většiny zástupců kvasinek pravidelně střídají. Nepohlavní rozmnožování kvasinek probíhá většinou pučením. Během pučení je na mateřské buňce vytvořen pupen, který se postupně zvětšuje, když je dostatečná velikost, dochází k oddělení od mateřské buňky. Pohlavní rozmnožování je jiné v tom, že jsou vytvořeny dva typy spor: askospory a bazidiospory. Díky těmto druhům spor vzniklo dělení kvasinek na *Basidiomycota* a *Ascomycota*. Nepohlavní rozmnožování upřednostňují karotenogenní kvasinky. V případě optimálních podmínek dvě buňky splynou v jednu a posléze se spojí jejich jádra, dochází ke karyogamii u bazidiomycet [48][49][50][52].

2.2.1.3 Nepohlavní (vegetativní) rozmnožování

U většiny zástupců kvasinek je preferované vegetativní rozmnožování pučením. Na povrchu mateřské buňky je vytvořena malá dceřiná buňka, která je spojena kanálem s mateřskou buňkou. Na začátku pučení hrají roly membrány ER, ty se spojí a poté rozdělí. Tento děj se opakuje, aby bylo vytvořené dostatečné množství membrán. Mitochondrie mění svůj tvar na dlouhé a protáhlé. Po dokončení procesu, následuje proces mitotického dělení jádra. Následně poté migrace jádra spolu s připravenými organelami (mitochondrie, vakuoly, a další) k nově vznikajícímu pupenu. Do prostoru nově vzniklého pupenu migrují jádro s organelami spolu s dalšími složkami v cytoplazmě. Kanál, který byl vytvořený mezi dceřinou a mateřskou buňkou, se poté uzavře. ER zvyšuje svou metabolickou aktivitu a vzniká nová buněčná stěna. Spojují se malé vakuoly v jednu a tím je proces pučení ukončen. Na povrchu mateřské buňky je viditelná charakteristická jizva [48][49][50][52].

2.2.1.4 Růstová křivka mikroorganismů

Růst buněčné kultury v čase po zaočkování do kultivačního média popisuje růstová křivka. Kultura po zaočkování do média prochází řadou fází během svého růstu v médiu a adaptace. Růstovou křivku může být rozdělena do 4 základních fází: Klidová fáze (Lag fáze), Exponenciální fáze (logaritmická fáze), Stacionární fáze, Fáze odumírání. V klidové fázi nastává adaptace na nové prostředí, počet buněk se nezvyšuje. Dochází k odumírání buněk, které se nepřizpůsobily na nové prostředí. Zvyšuje se objem a hmotnost buňky, také roste citlivost buňky na fyzikální a chemické vlivy. Množství enzymů se zvyšuje a syntetizují se složky nutné pro dělení. Délka této fáze se odvíjí od fyziologického stavu buněk mikroorganismů, také na složení média a velikosti. Před exponenciální fází buňky prochází zrychleným růstem, kdy se buňky intenzivně dělí a poté nastává exponenciální fáze, která je nejdůležitější. Buňky se geometricky množí a produkují velké množství primárních metabolitů, rychlost růstu je největší a generační doba nejkratší, populace exponenciálně roste. Fáze trvá až do vyčerpání živin, s postupným vyčerpáním živin v médiu klesá rychlost buněčného dělení, což je označováno jako fáze pomalého růstu. Jako další fází je stacionární fáze, nedochází ke zvyšování počtu buněk, protože nastává stav rovnováhy, kdy rychlost buněčné proliferace je v rovnováze s rychlostí buněčné smrti.

Dochází k akumulaci sekundárních metabolitů v důsledku vyčerpání živného média, jedná se o reakci na stres způsobený omezením živin, kyslíkem, světlem a dalšími faktory. Posledním krokem je fáze odumírání, kdy nedostatek živin zastaví buněčné dělení a kultura pomalu odumírá [48][49][50][52].

2.2.2 Karotenogenní kvasinky

Název karotenogenní kvasinky je odvozen od toho, že skupina těchto kvasinek má společný určitý znak, tím je obsah enzymatického aparátu schopného produkovat karotenoidní pigmenty. Tyto druhy jsou charakteristicky zbarvené od světle žluté barvy až po červenou, produkci karotenoidů a akumulaci karotenoidních pigmentů v buňce. Jsou označovány také jako „červené kvasinky“. Tyto kvasinky produkují hlavně tyto druhy karotenoidů: β -karoten, torulen, tolurarahodin a lykopen. Dle typu kvasinek, živného média a podmínek prostředí (světelné spektrum, intenzita a přítomnost oxidantů) je složení karotenoidů v jednotlivých buňkách rozdílné a liší se. Karotenogenní kvasinky spadají do třídy *Basidiomycota*, do této třídy spadají kvasinkové rody: *Cystofilobasidium*, *Rhodotorula* a *Sporobolomyces*. Všechny tyto rody se vyznačují nadprodukcí karotenoidů. Pokud mají tyto rody ideální podmínky, produkují také vysoké množství lipidů. Navíc tyto lipidy se skládají z mastných kyselin, které se vyznačují vysokým obsahem polynenasycených a mononenasycených mastných kyselin, které nalézají široké spektrum využití v potravinářském, farmaceutickém a zemědělském průmyslu [48][49][50][52].

2.2.2.1.1 Rod *Cystofilobasidium*

Rozmnožování kvasinek tohoto rodu probíhá jak vegetativně, tak pohlavně. Vegetativní rozmnožování probíhá prostřednictvím pučení haploidních nebo diploidních buněk. Jsou tvořeny kolonie, které jsou charakteristické oranžovým, lososovým nebo skořicovým zbarvením a mají lesklý povrch. Tvar buněk vypadá jako protáhlý ovál. Některé druhy kvasinek jsou schopné tvořit pseudohyfy. Kvasinky rodu *Cystofilobasidium* jsou schopné fermentovat monosacharidy. Pohlavní rozmnožování je umožněno díky tvorbě holobazidií. Uvnitř těchto holobazidií dochází ke karyogamii a vznikají spory. Rod spadá pod čeleď *Rhodotorulaceae* a je tedy příbuzný rodu *Rhodotorula*. Odlišnost mezi nimi je tvorba jednobuněčných bazidií kulatého až protáhlého tvaru.

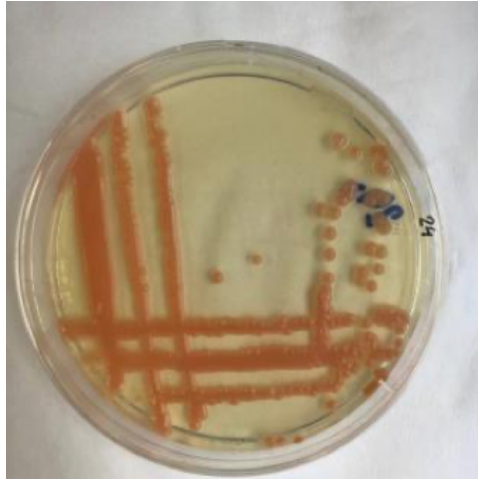
Jako hlavní karotenoidní pigment je považován torulen, a to díky tomu, že za stresových podmínek vznikají jeho oxidované analogy. Mezi nejznámější zástupce řadíme: *Cystofilobasidium bisporidii*, *Cystofilobasidium macerans*, *Cystofilobasidium capitatum* a *Cystofilobasidium infimominiatum* [51][53][54][55].

2.2.2.1.2 Rod *Rhodotorula*

Buňky rodu *Rhodotorula* mají tvar elipsoidní až oválný a velikost je okolo 5 µm. Kvasinky spadající do tohoto rodu mají velmi dobře vyvinutý pentózový cyklus, ale neumějí fermentovat cukry. Jedná se o mezofilní mikroorganismy, které můžeme najít úplně všude ať už ve vzduchu, půdě a ve fylosféře kolem planety. Rod *Rhodotorula* je nejméně náročný na kultivaci a zdroje živin v médiu, především na obsah dusíku. Často jsou kvasinky tohoto rodu izolovány v půdách s nižším obsahem dusíku. Během stacionární fáze *Rhodotorula* akumuluje lipidy a směs karotenoidů. Kolonie jsou zabarveny krémově růžově, červeně až do žluté barvy, a to pomocí vyššího obsahu karotenoidních pigmentů. Rozmnožovat se mohou pučením, produkují pseudomycelium a také se mohou rozmnožovat pohlavně díky tvorbě telospor. Zástupci tohoto rodu jsou *Rhodotorula kratochvilovae* (viz 0), *Rhodotorula mucilaginosa* (viz Obr. č. 9) [51][56][57][58][59][60][61].



Obr. č. 8 Nátěr kmene *Rhodotorula kratochvilovae* na agaru



Obr. č. 9 Nátěr kmene *Rhodotorula mucilaginosa* na agaru

2.2.2.1.3 Rod *Rhodosporidium*

Kolonie buněk *Rhodosporidium* jsou zabarveny do červena až oranžova, díky vyšší koncentraci karotenoidů. Buňky mají vejčitý tvar. Rozmnožování probíhá pučením a mohou tvořit pseudomycela. Pohlavní rozmnožování je u tohoto rodu také a může být homotalické i heterotalické. Mezi nejznámější kmen je řazen *Rhodosporidium toruloides*, který byl izolován z dřevní kaše jehličnanů. Další zástupci tohoto rodu se podařilo izolovat ze vzduchu, odpadních vod a půdy. Tento rod může zpracovávat různé zdroje uhlíku. Hexózy, pentózy a oligosacharidy, alkoholy a organické kyseliny. Rod *Rhodosporidium* je řazen mezi přísné anaeroby, není schopen zkvasit cukry ani zpracovat laktózu. V buňkách je pozorována zvýšená produkce koenzymů Q9 a Q10. Zástupci tohoto rodu jsou například *Rhodosporidium toruloides* (viz Obr. č. 10) a *Rhodosporidium babjevae* [51][62][63][64].



Obr. č. 10 Rhodosporidium toruloides zásobní kultura v submerzní kultivaci v YPD médiu

2.2.2.1.4 Rod *Sporidiobolus*

U tohoto rodu mají buňky tvar oválný, elipsoidní až válcovitý a kolonie jsou hladké a ploché a jsou zbarvené do odstínu růžovo-červené barvy. Zabarvení je způsobeno tím, že rod *Sporidibolus* vykazuje vyšší produkci β -karotenu, torulenu a torularhodinu při biosyntéze karotenoidů. Tento rod tvoří teliospory. U některých druhů je pozorována schopnost tvořit pravé mycelium. U tohoto rodu nejsou zástupci schopni fermentovat cukry. Mezi ně můžeme zařadit *Sporidiobolus pararoseus* (viz Obr. č. 11) nebo *Sporidiobolus salmonicolor* [51][65][66][67][68].



Obr. č. 11 Nátěr kmene *Sporidiobolus pararoseus* na agaru

2.2.3 Sinice

Sinice sehrály velmi důležitou roli ve vývoji rané Země a biosféry. Jejich důležitá role byla v okysličení atmosféry a oceánů [69]. Sinice také označovány jako modrozelené řasy, jsou starobylou skupinou prokaryotických mikroorganismů. Jsou prvními fotosynteticky aktivními mikroorganismy, které využívají vodu jako zdroj elektronů a následně produkují kyslík jako odpadní produkt. Sinice jsou prokaryotické kyslíkové fototrofy. Existují v různých morfologiích včetně jednobuněčných a vláknitých forem. Sinice výrazně ovlivnily globální ekosystém, protože jejich fotosyntetická aktivita poskytla velkou část kyslíku nezbytného pro proliferaci aerobních forem života. Sinice jsou běžné také jejich symbiotickým vztahem s rostlinami, houbami (lišejníky) a eukaryotickými řasami. Staré organismy endosymbiózou pohltily sinici, což vedlo ke vzniku chloroplastu řas. Všechny sinice provádějí kyslíkovou fotosyntézu, ale některé druhy sinic mohou přejít na typickou bakteriální anoxygenní fotosyntézu, kdy jako donor elektronů slouží sulfid. Fermentaci sinice provádějí v anoxických podmínkách a za tmy [70][71].

Sinice se nacházejí v jednobuněčných kulovitých buňkách, vláknitých buňkách nebo koloniích, které mají různé tvary a velikosti. Jsou závislé na jednotlivých typech sinic. Rozmnožování je primárně dáno nepohlavním dělením buněk nebo fragmentací. U vláknitých sinic během jejich vývoje byly vytvořeny unikátní struktury: heterocysty a akinety. Primární funkcí heterocyst je fixace dusíku. Proto jsou heterocysty mimo jiné prospěšné pro růst sinic, které rostou v podmínkách chudých na dusík.

Uvnitř heterocysty je dusík fixován pomocí enzymu na amonné ionty, ty jsou dále transformovány na organické formy dusíku. Díky tomuto procesu se dostane buňkám dostatečné množství zpracovatelného dusíku, aby mohly překonat stresové stavy a pokračovat v potřebné biosyntéze. Akinety jsou obvykle větší než vegetativní buňky a mají velké množství uložených živin. Akinety jsou ochrannou formou buněk, které si sinice vytvořily za nepříznivých podmínek a mohou přežívat v životu schopnému stavu i několik desítek let. Akinety snesou vysychání i chlad, ale jsou citlivé na teplo [70][71][72].

Sinice produkují také řadu sekundárních metabolitů (bioaktivní sloučeniny), kterými jsou například alkaloidy, oligopeptidy, souhrnně jsou označovány jako cyanotoxiny. Cyanotoxiny jsou toxické pro životní prostředí i pro člověka. Řada těchto sloučenin byla izolována a díky své biologické aktivitě se jeví slibně jako léčiva pro léčbu rakoviny a dalších onemocnění. Sinice jsou považovány za alternativní zdroj energie, mohou být využity v čistírnách odpadních vod, pro degradaci ropy, pro hnojení v zemědělství a jako potrava pro lidi a zvířata [71].

Jak již bylo zmíněno, sinice jsou schopné kyslíkové fotosyntézy, jejich hlavním fotosyntetickým pigmentem je chlorofyl-a. Chlorofyl-a mohou doprovázet karotenoidy, xantofyly a fykobilizomy, ty převážně obsahují fykoerythrin a fykocyanin [71].

2.2.3.1 Struktura buněk sinic a jejich výskyt

Sinice se řadí mezi prokaryota, ale ve srovnání s jinými prokaryoty vykazují sinice vysoký rozdíl v morfologických znacích. Sinice se řadí mezi gramnegativní bakterie. Buněčná stěna, která má za úkol tvořit horní ochrannou vrstvu buňky, je složená z lipopolysacharidů a ty jsou na povrchu potaženy vrstvou z fosfolipidů. Buněčná stěna může být přeměněna a zabudována do ochranných schránek, pokud je buňka vystavena nepříznivým podmínkám, tento jev je velmi častý a ochranou schránkou může být například glykokalyx. Další částí je cytoplazmatická membrána, která se nachází pod buněčnou stěnou a skládá se z fosfolipidů, které jsou doplněné o steroly, regulační a signální proteiny nebo jejich komplexy. Steroly mají zajistit transport a fluiditu [12][70][71].

Cytoplazma u sinic má bakteriální typ ribozomu a kruhovou molekulu DNA. V cytoplazmě u prokaryot nejsou obsaženy žádné organely a membránová tělíska, ale obsahuje primitivní membránové struktury označovány jako tylakoidy. Jejich funkce u sinic je, že slouží jako centrum fotosyntetického aparátu. Je vidět názorný rozdíl oproti bakteriím rodu *Chlorobium*, které využívají jako centrum fotosyntetického aparátu bakteriochlorofyl. Thylakoidy sinic jsou vybaveny chlorofylem A, který je hlavním fotosyntetickým pigmentem. Povrch thylakoidů je vybavený fykobilizomy, které jsou na povrchu ukotveny. Fykobilizomy jsou tvořené fykobiliproteiny, mezi které spadají fykoerytrin, fykocyanin a alofykocyanin a slouží jako složka sběru světla. Jádro u sinic je tvořeno z allofykocyaninu. Z jádra vystupují tyčinky, které jsou naskládáné z fykocyaninových nebo fykoerytrinových částí. Pro sinice je charakteristický znak tzv. chromatická adaptace. Chromatickou adaptací se rozumí změna v zastoupení jednotlivých fotosyntetických pigmentů u sinic. Je to evoluční mechanismus a umožňuje optimální využití červeného a zeleného části spektra slunečního záření pro fotosyntézu, protože se mění složení fykobiliproteinů [12][70][71].

Některé sinice jsou schopné fixovat vzdušný dusík a významně tak ovlivňují koloběh dusíku v přírodě. Uvnitř heterocystů se pomocí enzymu nitrogenázy ze vzdušného dusíku vytváří za spotřeby ATP amonné sloučeniny. Protože anaerobní prostředí je rozhodující faktor při určování aktivity dusíkatých látek, v důsledku toho reakce probíhá ve specifických buňkách bez fotosyntetické funkce, které jsou nazývány heterocysty. Vegetativní zelené buňky jsou také schopny fixovat vzdušný dusík, ale pouze v temné části dne, protože je funkce silně fotosyntetického aparátu potlačena [12][65][71].

Sinice se nachází v mořských i sladkovodních vodách po celé planetě, tam se volně pohybují ve vodě, ale i na dnu se pohybují. V půdním prostředí hrají sinice také důležitou roli, jsou nenahraditelným faktorem, který ovlivňuje oběh živin v ekosystému. Jako jedny z mála mikroorganismů zvládají nehostinné podmínky, kterými jsou horké prameny, prostředí sopečného prachu a mnoha dalších. Sinice jsou, známe tím, že produkují značné množství biologicky aktivních látek, ty je možné využít jako léčiva, biologické pesticidy a další průmyslově významné látky.

Sinice jsou děleny do čtyř pododdílů [12][65][71].

- a) *Chroococcales*
- b) *Pleurocapsales*
- c) *Oscillatoriales*
- d) *Nostocales*

2.2.4 Zemědělská a průmyslová aplikace sinic

Sinice lze využít v zemědělství, současné postupy hospodaření s půdou (anorganická hnojiva a chemikálie na ochranu rostlin) sice zlepšily množství produkce potravin, ale dlouhodobé využívání těchto syntetických metod vzbuzuje obavy (životní prostředí, produktivita půdy atd.). Sinice patří mezi vysoce užitečné mikroorganismy, které mají několik použití v zemědělství. Sinice jsou také využívány pro zlepšení produktivity kvality půdy. V 50. letech 20. století byla aplikována sušená biomasa sinic do půdy tzv. „algalizace“. Tento proces pomohl změnit úrodnost půdy a zvýšená byla produkce plodin o 15 až 20 %. Velkou výhodou je i přirozenost této metody a není potřeba využití dodatečných ekonomických vstupů. Dusík je klíčovou živinou potřebnou pro růst rostlin a je hlavním požadavkem pro zemědělské systémy v nížinách. Sinice jsou důležitou součástí povrchových krust různých půd, protože mají schopnost fixovat atmosférický dusík (N₂), jako zdroj dusíku [73].

Sinice jsou důležitým biologickým zdrojem sekundárních metabolitů obsahujících peptidy a dipeptidy. Sinice jsou mikroorganismy, o kterých panuje předpoklad, že jsou ideálním podkladem pro vývoj různých produktů průmyslového potenciálu. Sinice jsou producenti důležitých a nových metabolitů, ty mají biotechnologický, farmaceutický a průmyslový potenciál. Sekundární metabolity získané extrakcí ze sinic jsou toxické nebo netoxické a siderofory, fytohormony, aminokyseliny podobné mykosporinu a scytonemin, jsou řazeny mezi netoxické sekundární metabolity. Jsou schopné produkovat protiplísňové, antibiotické a protirakovinné látky [73].

Sinice jsou využitelné i v bioenergii, jsou ideální platformou pro vývoj různých paliv a produktů. Biopaliva z mikrořas, sinic a mořských řas jsou považována za surovinu třetí generace. V této linii jsou sinice uváděny jako dominantní, protože dokáží produkovat slušnou míru biopaliva a vykazují jednoduché náklady na sluneční světlo, CO₂, vodu a minimum živin.

Využití sinic při výrobě biopaliv začalo teprve nedávno a vývoj v genetickém inženýrství také znásobil produkci progresivních paliv, jako je etanol, vyšší alkoholy, paliva na bázi terpenů, mastné kyseliny a alkeny a vodík v podstatném měřítku. U sinic je sluneční světlo zachycováno pomocí thylakoidních pigmentů a následně je přeměněno na chlorofyly s jádrem fotosystému I a II známých jako produkční motory pro biologickou hmotu v sinicích. Sinice jsou také široce uznávány pro svou slibnou povahu při přeměně sloučenin C na cenné zdroje energie, využívají se většinou k výrobě etanolu a H₂. Sinice ve srovnání s mikrořasami akumulují menší množství lipidů, později se však ukázalo, že sinice mají vysokou rychlost růstu během exponenciální fáze svého růstového cyklu. Vodík je považován za ideální nosič energie pro budoucí generace, protože spalováním je výhřevný a neprodukuje žádný CO₂. U sinic je molekulární vodík katalyzován enzymem hydrogenázou, která je podporována elektrony z redukováného ferredoxinu [73].

Mezi sekundární metabolity sinic jsou řazeny exopolysacharidy, jedná se o slizovité látky polysacharidové povahy. Tyto polysacharidy jsou někdy také přítomny jako obal, pouzdro a sliz. Studie na polysacharidech sinic odhalila dominanci hexóz (glukóza, galaktóza a manóza), pentóz (ribóza, xylóza a arabinóza), deoxyhexóz (fruktóza a ramnóza) a kyselých hexóz (kyselina glukuronová a galakturonová). Přítomnost hydrofobních skupin byla také popsána a esterově vázané acetylové skupiny byly také přítomny s peptidy a deoxycukry. Dalšími sekundárními metabolity sinic jsou pigmenty. Sinice nabízejí širokou škálu barevných pigmentů díky vysoce fluorescenčním a kovalentně vázaným fykobiliproteinům. Jsou to ve vodě rozpustné proteiny spojené dohromady peptidy a pomáhají usměrňovat přenos energie pro fotosyntetické dráhy. Fykocyanin (modrý), allofykocyanin (modrá šedá) a fykoerytrin (červený) jsou fykobiliproteiny, které mají absorpční spektra kolem 620 nm, 650 nm a 565 nm. Tyto proteiny jsou odvozeny z hemu a enzymatickou reakcí se redukují na biliverdin. Jedná se o nejčastěji detekované pigmenty a jsou široce používány v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu [73].

2.2.4.1.1 Rod *Arthrospira*

Arthrospira je známá tím, že upřednostňuje alkalické vody, kde je vysoký podíl koncentrace uhličitanu a hydrogenuhličitanu. Jedná se o vláknité sinice, kdy tvoří dlouhé vláknité buňky, které jsou stočeny do tvaru levé šroubovice. Vlákna jsou vždy po jedné, netvoří shluky a rozmnožují se nepohlavně (binární dělení). Zajímavostí je, že v médiích s různými podmínkami, mohou být pozorovatelná rovná vlákna nebo těsné svinutí. Velikost buněk může být v rozmezí 2 až 12 μm [74][75][76].

Arthrospira se vyznačuje svým velkým obsahem bílkovin, včetně esenciálních aminokyselin, dále polynenasycených mastných kyselin (kyselina γ -linolenová), fotosyntetické pigmenty včetně antioxidační aktivity, vitamíny a minerály. Tudíž získaná biomasa z rodu *Arthrospira* je používána i jako potravinový doplněk stravy pod názvem „*Spirulina*“. Většinová část biomasy se produkuje v jezírkách, kde se pěstuje. Nejnovější výzkumy odhalily možné využití biomasy a její slibné výsledky při léčbě některých typů rakovin, alergií, hepatitidy a cévních onemocnění. *Arthrospira* (viz Obr. č. 12) je využitelná i v technickém odvětví (biosyntéza nanočástic stříbra) i jako krmivo pro zvířata [74][75][76].

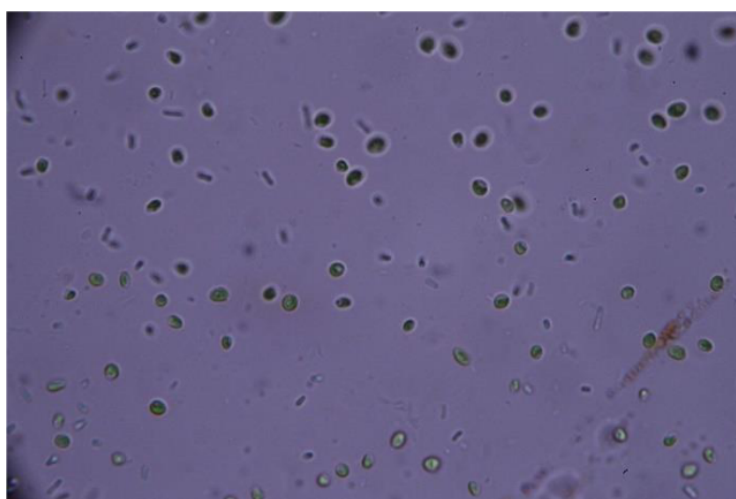


Obr. č. 12 *Arthrospira maxima* CCALA 030

2.2.4.1.2 Rod *Synechococcus*

Synechococcus jsou sinice rozšířené v mořských vodách. Jejich velikost je v rozmezí 0,8 – 1,5 μm . Buňky se vyznačují právě svým cylindrickým až vejčitým tvarem. Rozmnožování je pomocí příčného dělení. Upřednostňují mělké vody s dobrým osvětlením, kde dosahují vysokých rychlostí růstu a jejich výskyt je tam tedy hojnější. Tento rod je řazen jako jeden z nezbytných v tropických a subtropických oceánech, protože tam tvoří důležitou část autotrofního planktonu. Uvnitř jejich buněk se nachází fosfátové inkluze, glykogen anebo také granule PHA, také mají strukturovanou buněčnou stěnu a jsou gramnegativní. Buňky rodu *Synechococcus* jsou pohyblivé, i když nemají bičíky, hýbou se klouzavým pohybem [77][78][79].

Synechococcus (viz Obr. č. 13) obsahuje karboxyzom, což je bakteriální vnitrobuněčná struktura a za úkol má fixaci uhlíku a jsou schopné v sobě zakoncentrovávat enzym Rubisco. Tento enzym umožňuje fixaci uhlíku, je zodpovědný za schopnost buněk vázat CO_2 . Pokud je inhibována asimilace CO_2 v Calvinově cyklu, což může být způsobenou vysokou koncentrací kyslíku, pak dochází k ději, který je energetický náročný a nazývá se fotorespirace. Ribulosa 1,5-bifosfát je oxidován, namísto žádoucí karboxylace, při fotorespiraci a je spotřebována energie, která byla získaná ve světelné fázi fotosyntézy. Tato oxidační reakce tedy snižuje celkovou účinnost fotosyntézy. Karboxyzomy jsou užitečné, protože jsou schopné tento negativní efekt potlačit, díky tomu, že obsahují určitou koncentraci oxidu uhličitého, který postupně difunduje dovnitř, a to v podobě iontů HCO_3^- [77][78][79].



Obr. č. 13 *Synechococcus nidulans* CCALA 188

2.3 Kokultivace

V biotechnologii heterotrofních a fotoautotrofních mikroorganismů, jejich kokultivace je jako jedna z možností řešení velkých výzev právě v oblasti produkce biopaliv, karotenoidů atd. Jako ideální produkční kmeny byly studovány různé druhy olejnatých mikrobů, protože jsou schopny akumulovat více než 20 lipidů v sušině buněk. Využívají se dvě skupiny mikroorganismů, heterotrofní, kde zástupci jsou kvasinky, bakterie a fototrofních, kde jsou řazeny sinice a řasy. Mají různou produkční schopnost. Laboratorní experimenty přinesly zajímavé a slibné výsledky i maloobjemové experimenty. Bohužel komerční velkoobjemová výroba už je těžce dosažitelná. Každá skupina mikroorganismů má své pro i proti [80][81][82][83][84].

Heterotrofní organismy jsou známé tím, že rostou velice rychle a také v produkci značného množství biomasy. Takle biomasa může být použita jako celek, nebo může být extrahována a díky extrakci tak dojde k získání požadované skupině biomolekul (lipidy, karotenoidy a polysacharidy). Tyto organismy mají tendence poměrně rychle sedimentovat v pozdějších fázích růstu, ale sedimentace je možné využít při sklizních. Tento přístup má nevýhodu v podobě vysokých nákladů na vstupy, kterými je zdroj uhlíku (glukóza, glycerol), soli a zdroj dusíku. Dále je nutné neustálé provzdušňování v celém objemu kultivační nádoby, protože množství vzniklé biomasy je závislé na růstu těchto mikroorganismů a ty jsou přímo úměrné rozpuštěnému kyslíku v médiu. Kultivační nádoba také musí mít vhodně orientované vstupní trysky a intenzivní míchaní. Všechny tyto vstupy ovlivňují náklady celého biotechnologického procesu. Jde o náhradu umělých zdrojů uhlíku a dusíku pomocí odpadních materiálů z potravinářského a zemědělského průmyslu, tyto materiály snižují počáteční náklady. Ale většina mikroorganismů lépe rostou na umělých zdrojích než na zdrojích použitých z odpadních materiálů [48][49][50][51].

Autotrofní mikroorganismy v biotechnologickém využití se vyznačují relativně nízkými vstupními náklady, oproti heterotrofním mikroorganismům. Kultivační médium je složeno pouze ze solí a jako zdroj uhlíku je využíván atmosférický vzduch nebo odpadní oxid uhličitý. Autotrofní mikroorganismy také mají určitá negativa, řadí se mezi ně prodloužená doba růstu v porovnání s heterotrofy, také vysoká náchylnost ke kontaminaci, nízká produkce biomasy a je nutnost stálého přísunu světla, tedy stálé osvětlení.

Při sklizení velkého objemu kultur je další komplikace v tom, že kultura má nízkou hustotu. Také je potřeba procesu extrakce a čištění, což přidá na nákladech. Shrnutí těchto informací a nyní stálé nízké ceně ropných paliv, není výroba biopaliv pomocí mikroorganismů ekonomicky výhodná a proveditelná ve srovnatelném měřítku [80][81][82][83][84][85].

2.3.1 Možnosti kokultivace

U monokulturní kultivace může být jeden kultivační mikroorganismus vystresován pouze nedostatkem živin, solného stresu a tepelného stresu. Tím, že je mikroorganismus vystaven fyzikálním a chemickým stresovým podmínkám, iniciuje to vyšší produkci žádoucích produktů, kterými jsou lipidy, polysacharidy a karotenoidy. Jsou tady jistá omezení, především snížený růst biomasy a není tedy nějak zvýšená produktivita. A překonat tyto problémy nabízí společné pěstování různých mikroorganismů. Posledním typem stresu, který nebyl ještě zmíněn, je právě stres biologický. Existuje rozsáhlá sbírka jednotlivých typů mikroorganismů v podobě axenických kultur a vědci se už řadu let zabývají jejich izolací, čištěním a identifikací. A následná snaha byla vedena a založena na identifikaci produkovaných metabolitů, výběru vhodného média a kultivačních podmínek, aby bylo dosaženo nejvyšší možné produktivity. Mnoho mikroorganismů bylo vybráno a přeneseno do průmyslu a využívají se dodnes. Až byl vyčerpán maximální přírodní potenciál, byla zvýšená produktivita umožněna pomocí genetické modifikace těchto mikroorganismů nebo vhodnými náhražkami. Pro mnoho heterotrofních organismů je právě tento postup vhodný a účinný [80][81][82][83][84].

2.3.2 Biologický stres

Od počátku kdy se mikroorganismy vyvíjely, vzájemně soutěžily i se ovlivňovaly. Což pomocí evoluce vedlo k několika základním a zásadním přístupům. Blíže se zaměříme na jednotlivé cesty. Predace znamená, že u mikroorganismů specializujících se na predaci se vyvinuly různé zbraně (antibiotika) a výhody. Tímto získávají výhody oproti ostatním konzumentům stejných zdrojů. Dalším směrem, kterým se mohou mikroorganismy specializovat je adaptace na jiný zdroj uhlíku, dusíku a podobně. Symbióza neboli spolupráce znamená, že dva nebo více různých druhů mikroorganismů vytvoří odolnější symbiotické uspořádání, které využívá výhod původních organismů.

Eukaryotické řasy jsou typickým příkladem symbiozy. Sdružení různých mikroorganismů žijících odděleně, ale vzájemně se podporujících je dalším příkladem symbiozy [80][81][82][83][84].

Biologickým stresem se rozumí, že je přítomen cizí organismus, který na určité úrovni ovlivňuje námi kultivovaný kmen. Biologický stres může být negativní a pozitivní. Negativním efektem se rozumí predace neboli kontaminace kultury. Cizí kmen přeroste námi studovaný kmen. Pozitivní efekt je symbióza. Pro ujasnění kokultivace je tedy kombinovaná kultivace dvou nebo více mikroorganismů v jednom kultivačním mediu, aby bylo docíleno symbiotického růstu. Typy kokultivace:

- a) Autotrof – autotrof
- b) Heterotrof – heterotrof
- c) Autotrof – Heterotrof

Probíhá-li kultivace dvou podobných typů mikroorganismů, je možné zvýšit produkci požadovaných metabolitů celým systémem, zvýšit jejich rozmanitost, rozložení a zajistit, aby vložené zdroje byly maximálně využity. Také se může stát, že mikroorganismy sdílejí zdroj živin, poté může docházet ke zbytečné konkurenci. Tím je snížena produkce biomasy a nedojde k žádnému výraznému zlepšení. Dále existuje možnost využití kombinovaných zdrojů živin, příkladem mohou být odpadní substráty, jeden mikroorganismus spotřebuje pouze část živin a nekonkuruje poté druhému mikroorganismu. Nalezení vhodných podmínek není vždy úplně jednoduché, záleží také, jací jsou vybrání zástupci ze stejného druhu příklad kvasinky – kvasinky. U tohoto případu je velmi složité najít kompromis, protože jejich enzymatická výbava je velmi podobná tedy preferují i velmi obdobný zdroj živin [80][81][82][83][84].

Určité výhody by mohla poskytnout společná kultivace dvou fototrofních organismů. Sinice a řasy produkují současně karotenoidy, lipidy a chlorofyly, ale nastává problém v okamžiku, kdy obě kultury soutěží o zdroj uhlíku, kterým je oxid uhličitý. Oxid uhličitý lze snadno vyřešit tím, že se zvýší jeho koncentrace. Sinice a řasy produkují i specifické produkty pro svůj druh, jako příkladem jsou fykobiliproteiny ze sinic. Ne všechny kmene sinic a řas by však mohly společně být kultivovány, a to kvůli různým požadavkům ohledně složení média, intenzitě světla, pH média a mnoha dalším faktorům.

Dále se může stát, že jeden mikroorganismus vyprodukuje molekuly, které by byly toxické pro druhý mikroorganismus a inhibovaly by jeho růst [80][81][82][83][84].

2.3.3 Kokultivace autotrofní organismus – heterotrofní organismus

Tento typ kultivace, kdy jsou smíchány autotrofní a heterotrofní mikroorganismus, navrhuje téměř ideální kombinace pro kultivaci. Jednotlivé mikroorganismy nabízí širokou škálu produkovaných a extrahovaných látek, a navíc navzájem nesoutěží o zdroj uhlíku. Jde o výměnu plynů zjednodušeně. Heterotrofní mikroorganismus (karotenogenní kvasinky) spotřebovává zdroj organického uhlíku a rozpuštěného kyslíku pomocí aerobního metabolismu a do média následně vyrábí oxid uhličitý. Autotrofní mikroorganismus (sinice) zpracovávají oxid uhličitý, výhodou je, že je tam větší koncentrace oxidu uhličitého a sinice tedy roste rychleji. Autotrofní mikroorganismus uvolňuje kyslík a ten indukuje rychlejší růst heterotrofního partnera [80][81][82][83][84].

Výše popsaný ideální stav je jen těžce dosažitelný, je třeba řešit mnoho překážek a také hledat případné kompromisy. Při kultivaci je vhodné se zaměřit na složení média, zvážit různé rozdíly ve složení média, pH optimum pro pěstované kmeny, také je důležitá jejich vzájemná slučitelnost a mnoho dalších faktorů. Každý druh mikroorganismu si klade své nároky na podmínky kultivačního procesu, jako jsou například zdroj uhlíku nebo kyslíku. Je tedy velmi zdlouhavé a náročné přijít na optimální podmínky pro složení médií a výběr vhodných párů kmenů [80][81][82][83][84].

Tento proces na druhou stranu má své výhody. Díky kultivaci právě dvou rozdílných mikroorganismů, mohou být nalezeny výhody v porozumění symbiotických vztahů mikroorganismů, také mohou být nalezeny různé inovace v procesech. U tohoto druhu kultivace se kombinují výhody kvasinek a sinic. Právě díky porozumění a nalezení vhodných podmínek a inovací je možné zjednodušit a také zefektivnit oba typy kultivačních procesů mikroorganismů. V literatuře je možné se dočíst o různých druzích kokultivace, nejčastěji se setkáváme s kokultivací oleogenních kvasinek nebo bakterií s mikrořasami v akvakultuře, chemické výrobě a nakládání s odpady. Tato kokultivace je zaměřena na karotenogenní kvasinky a sinice, kdy je žádoucí účelová indukce produkce lipidů, karotenoidů, polysacharidů nebo dalších jiných cenných sloučenin [80][81][82][83][84].

2.4 Odpadní substráty

Ročně je celosvětově spotřebováno enormní množství potravin, okolo 1,3 miliardy tun. Ty jsou vyrobeny za spotřeby velkého množství energie a živin. Proto využití potravinového odpadu jako suroviny v biotechnologických procesech poskytuje inovativní způsob, jak získat část energie a živin, které jsou vynaloženy na výrobu potravin. Pomocí chemických a biologických metod, dochází k hydrolýze potravinového odpadu na volný aminodusík, glukózu, fosfát a další jednoduché zdroje živin. Takto vzniklé produkty nacházejí uplatnění jako živiny, které mohou využít mikroorganismy, jejichž metabolická všestrannost umožňuje výrobu široké škály produktů. V tomto ohledu jsou mikrořasy velmi zajímavé, protože chemikálie, materiály a energii lze získat právě z biomasy mikrořas, a to po chemických nebo biologických modifikacích [86].

2.4.1 Syrovátka

V mlékárenském průmyslu vzniká obrovské množství odpadu, ten je možné rozdělit na kapalný a pevný odpad. Odpadní produkty, které jsou vypouštěny na konci procesu, mohou mít různý charakter a různé vlastnosti v závislosti na typu produktu, který byl vyroben, také v závislosti na klimatu, provozních podmínkách a čistících postupech. Vedlejší produkt, který je nazván syrovátka vzniká při zpracování mléka a mléčných výrobků a z těchto procesů je 80 až 90 % z celkového objemu mléka vyhozeno v podobě syrovátky [86][87][88]. Syrovátku lze charakterizovat jako mléčné sérum bez tuků a kaseinu, ve kterém jsou dále homogenně rozpuštěny laktóza kratší peptidové řetězce.

Množství vyrobené syrovátky je rovno množství vyrobenému mléku, což je problém. Syrovátka je toxická pro životní prostředí, proto není možná její jednoduchá likvidace. Syrovátka může způsobit značné škody na životním prostředí, a to díky tomu, že syrovátka má enormní biochemickou spotřebu kyslíku a zároveň vysokou chemickou spotřebu kyslíku. Syrovátka obsahuje vysokou koncentraci laktózy, a právě laktóza je hlavní složkou způsobující tento problém. Tudíž rozlití syrovátky do životního prostředí má prakticky okamžitý důsledek v tom, že je okamžitě spotřebován veškerý kyslík a organismy přítomné v tomto prostředí umírají [87][88][89][90].

Syrovátka obsahuje široké množství zdrojů makroživin a mikroživin. Díky metodám srážení mléčné bílkoviny minerálními kyselinami, po vysrážení vzniká tzv. kyselá syrovátka. Takto vzniklá syrovátka má nižší pH, nižší obsah sacharidů a vyšší obsah minerálních látek. Pro výrobu tvarohu je tento proces charakteristický. Také může vznikat i tzv. sladká syrovátka, která vzniká enzymatickým vysrážením mléka například s chymozinem. Například je tento postup uplatněn při výrobě sýru Cheddar [87][88][90].

Existují tři možnosti zpracování odpadní syrovátky. První je založena na tom, že je požadováno maximální využití jednotlivých složek syrovátky. Tyto jednotlivé složky mohou být izolovány pomocí různých filtračních technik, nebo fyzikálně-chemických procesů, kterými mohou být například srážení nebo flokulace. Druhou možností je biologické odbourání živin ze syrovátky jako zdroje živin pro rostliny. Takto odbourané živiny mohou sloužit jako růstové faktory, protože mají vysoký obsah dusíku, minerálů a organických sloučenin. Na druhou stranu jsou zde i negativa v podobě vysokého obsahu solí v syrovátce, které vznikají během tohoto procesu. Většina zemědělsky využívaných rostlin vysoký obsah solí nesnese. Takto vzniklá syrovátka tedy musí projít procesem srážení vápníkem. Třetí možností je biotechnologické zpracování syrovátky pomocí mikroorganismů. Mléčná syrovátka, která obsahuje laktózu jako zdroj uhlíku. Několik zdrojů uvádí, že laktóza může být zdrojem uhlíku pro biosyntézu karotenoidů kvasinkami [87][88][89][90].

2.5 Metody pro analýzu buněk mikroorganismů a biomasy

2.5.1 Gravimetrická stanovení a mikroskopické pozorování mikroorganismů

Při zjištění informací o velikosti a anatomii buněk slouží mikroskopické a cytologické techniky. Mohou nám dát tzv. morfologický popis jednotlivých buněčných kultur. Může se nahlídnout na rozdíly mezi jednotlivými druhy mikroorganismů, také rozdíly mezi jednotlivými zástupci téhož druhu, reakce na stresové prostředí. Lze využít také izotopů, pomocí kterých je možné sledovat dráhy jednotlivých molekul a atomů buňkou a také možné mutace buněk. Dále je možné studovat mezibuněčná komunikace, vnitrobuněčná komunikace, propojení metabolických drah a mnoho dalších jevů, které jsou důležité pro efektivní využití mikroorganismu v laboratorní i průmyslové biotechnologii [91][92].

2.5.1.1 Optická a fluorescenční mikroskopie

Optická mikroskopie poskytuje informace o tvaru, velikosti a morfologii buněk, množení buněk, lokalizaci specifických organel v buňce a dalších parametrech. Při použití konfokálních a optických mikroskopů je možné zjistit poměrně omezené množství informací. Díky kontrastním pigmentům, tak mohou být pozorovány jednotlivé organely, metabolické dráhy. Tisícinásobné zvětšení umožňuje pozorovat vakuoly a velké buněčné organely. Molekuly, které jsou schopné fluorescence, je možné pozorovat fluorescenční mikroskopii. Po přidání fluorescenčních pigmentů je možné pozorovat a studovat látky a organely, které nejsou schopné fluorescence, to z důvodu, aby bylo možné vizuálně lokalizovat většinu metabolitů a organel v buňce [91][92].

2.5.1.2 Stanovení buněčné biomasy

V mikrobiologických a biotechnologických experimentech je nesmírně důležité stanovení počtu buněk nebo jejich koncentrace v médiu. Je využíváno mnoho přímých i nepřímých metod pro stanovení množství biomasy. Tyto metody jsou založené na výpočtu nebo stanovení absolutní hmotnosti. Mezi tradiční metody se řadí mikroskopické počítání nebo počítání pomocí Bürkerovy počítací komůrky. Nyní jsou využívanější na počítání průtoková cytometrie a automatická počítadla buněk, je to efektivnější a zaznamenává se také více parametrů. Jako nepřímá metoda se dá uvést turbidimetrie, kterou lze stanovit počet buněk [91][92].

Gravimetrické stanovení biomasy je další tradiční metodou stanovení biomasy. Vzorek s kulturou se odstředí nebo zfiltruje, poté je několikrát promyt a sušen do konstatní hmotnosti. Druhou možností a rychlejší a také efektivnější je lyofilizace, také je mnohem šetrnější, zejména s ohledem na termolabilní látky.

2.5.2 Extrakce

Extrakce je prováděna za účelem izolace analytu od matrice nebo látek, které způsobují rušivé účinky při stanovení. Extrakce je separační metoda, která je specifická v tom, že využívá selektivní přenos konkrétní složky mezi dvěma nemísitelnými kapalinami nebo mezi kapalnou a pevnou fází. Spočívá v přenosu jedné (nebo více) rozpuštěné látky, obsažených ve vstupním roztoku, do jiné nemísitelné kapaliny (rozpuštědla), nebo se přenášejí z pevné fáze do roztoku.

Jsou zde uplatňovány vzájemné interakce mezi molekulami rozpouštědla a mezi molekulami analytu. Také musí být vhodně zvolené rozpouštědlo, které závisí na typu interakcí, které se na systém vztahují. Pokud je využita kapalinová extrakce, musí být splněna základní podmínka, a to ustanovení rovnováhy mezi analytem a rozpouštědlem. V takovém případě jsou stanovované metabolity převážně nepolární povahy a jejich výskyt je v cytoplazmatické membráně a dalších buněčných organelách. Jak už bylo zmíněno, karotenogenní kvasinky mají obzvlášť silnou buněčnou stěnu, je tedy nutné buď před extrakcí, nebo během extrakce narušit buněčnou stěnu, aby byl obsah cytosolu přístupný pro rozpouštědlo. Řasy a sinice mají tenčí buněčnou stěnu, následná extrakce je tak jednodušší a účinnější. K rozrušení buněčné stěny je možné použít mechanické, chemické a enzymatické metody [93][94].

2.5.3 Transesterifikace

Pod pojmem transesterifikace se rozumí proces, kdy jsou karboxylové kyseliny (mastné kyseliny) esterifikovány alkoholy, kdy je přítomen vhodný kyselý katalyzátor. Pokud je potřeba analyzovat profil lipidů a mastných kyselin produkovaných mikroorganismy je tato metoda v biotechnologii využívána. Pomocí transesterifikace vznikají estery karboxylových kyselin, které mají nižší bod varu ve srovnání s karboxylovými kyselinami. Toho je pak využito, při stanovení plynovou chromatografií. Jistou nevýhodou této reakce je její reverzibilita. Reakce tedy probíhá tak dlouho, dokud se neustaví rovnováha mezi produkty a výchozími materiály reakce. Bývá použit velký přebytek alkoholu za účelem zvýšení účinnosti a výtěžku transesterifikace, rovnováha se pak posouvá směrem k esterovým produktům [95].

2.5.4 Chromatografie

Chromatografické metody jsou řazeny mezi separační metody, které jsou hojně využívány v analytické chemii. Analyty vzorku mohou být separovány na základě různé rozpustnosti, adsorpce nebo distribučního koeficientu mezi dvěma fyzikálně a chemicky nemísitelnými fázemi. Fáze jsou nazývány jako stacionární (pevná, nepohyblivá) a mobilní (pohyblivá). Separační proces je tvořen díky opakovaným vytvářením rovnovážných stavů analytů na základě fyzikálně-chemických interakcí mezi analytem a mobilní fází, analytem a stacionární fází a v neposledním případě také mobilní a stacionární fází.

Pro názorný příklad separačních mechanismů používaných při chromatografických separacích se můžou uvést následující: rozpouštění, srážení, chemisorpce, adsorpce, síťový efekt, tvorba komplexů, iontová výměna atd. Chromatografická separace má určité výhody a je vyznačována tím, že využívá několik separačních mechanismů najednou. U chromatografie je důležitý celkový čas, který je daný analyt zadržován v chromatografické koloně, ten je dán výslednou afinitou pro dvě fáze jednotlivě. Látky, které mají vyšší afinitu jsou déle zadržovány v koloně než látky s nižší afinitou. Na tomto principu jsou odděleny jednotlivé složky a méně zadržované látky se dostávají jako první z kolony pryč [95][96][97].

2.5.5 HPLC-PDA

Z technik kolonové chromatografie byla posléze vyvinuta vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Kolonová chromatografie měla kolonu s průměrnou délkou asi 50 cm a průměrem 2-3 cm a ta byla naplněna částicemi sorbentu o relativně velkém průměru. Na horní část kolony byl nanesen vzorek a pak byla nalita mobilní fáze. Přes mobilní fázi byly postupně eluovány jednotlivé složky směsi. Jenomže separace byla zdlouhavá a neefektivní z důvodu, že eluce byla poháněna pouze gravitací. Kapalinová chromatografie následně tento nedostatek vyřešila systémem čerpadel, která pohání mobilní fázi na koloně konstantním regulovaným průtokem. Částice stacionární fáze prošly výraznou redukcí, kdy byl zvýšen aktivní povrch stacionární fáze a tím byla zvýšena účinnost separace. Tím, že se velikost částic stacionární fáze zmenšovala, úměrně se zvyšoval i odpor stacionární fáze vůči toku mobilní fáze. Na tento popud byly vyvinuty nové sestavy s čerpadly, která byla schopná pracovat za extrémně vysokých tlaků. Díky kapalinové chromatografii, která pracovala za nízkých tlaků, byla vyvinutá dnes velmi využívaná vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [95][96][97].

HPLC je v dnešní době všudypřítomná technika pro separaci komplexních směsí analytů. Mobilní fáze je čerpána pod vysokým tlakem pomocí čerpadel do kolony. V koloně pak dochází k samotné separaci. Pro analýzu lipidových metabolitů, kterými jsou zmiňované karotenoidy, steroly, ubiquinon a chlorofyly, je upřednostněno uspořádání s nepolární stacionární fází a polární mobilní fází. Jako detektor je preferován detektor diodového pole (PDA).

Hlavní část tohoto detektoru je tvořena řadou fotodiod, které snímají jednotlivé vlnové délky. Je tedy možné snímat celé absorpční spektrum dané látky v reálném čase. A díky tomuto aspektu je možné danou látku identifikovat [95][96][97].

2.5.6 GC-FID

Separace látek s poměrně nízkým bodem varu je specifická právě pro plynovou chromatografii. Mobilní fázi u plynové chromatografie je nosný plyn, ten ale nijak neinteraguje se vzorkem. Mohou být využity různé druhy nosných plynů: vodík, dusík a helium. Separace je založena pouze na interakci analytů se stacionární fází. Jsou zde využívány kapilární nebo náplňové kolony. Náplňové kolony jsou totožné s HPLC kolonami. Kapilární kolony jsou tvořeny dutou křemennou kapilárou, která je potažená vrstvou polyamidu. Tenkou vrstvou stacionární fáze jsou potaženy vnitřní stěny kapiláry. Kapilární kolony jsou opravdu velmi dlouhé, délka kolony je v rozmezí od 10 do 100 metrů a vnitřní průměr je uváděn ve stovkách mikrometrů. Tyto kolony mají obrovskou separační plochu, proto kapilární kolony dosahují nejvyšší separační účinnosti. Velkou nevýhodou těchto analýz je, že analyty musí mít bod varu do cca 400 °C. Ale molekuly, které nelze oddělit plynovou chromatografií kvůli jejich vysoké teplotě tání, lze převést na analýzu derivátů s nižší teplotou varu. Jako příklad lze uvést konverzi mastných kyselin na jejich odpovídající methylestery. Univerzálním detektorem pro téměř všechny organické molekuly je plamenově ionizační detektor (FID). Jeho odezva je lineární v širokém rozsahu koncentrací [95][96][97].

3 Cíle práce

- Přehledná literární rešerše zaměřená na vybrané kmeny karotenogenních kvasinek, sinic a principy kokultivace
- Otestování produkčních vlastností vybraných kmenů karotenogenních kvasinek na minerálních médiích
- Kokultivace vybraných kmenů kvasinek se zástupci sinic
- Selektce vhodných kokultivačních dvojic sinice: kvasinka
- Optimalizace složení kokultivačního média a podmínek kultivace
- Charakterizace získané biomasy pomocí chromatografických technik
- Vyhodnocení výsledků

4 Experimentální část

4.1 Kmeny mikroorganismů

4.1.1 Kvasinkové kmeny

Všechny studované karotenogenní kvasinkové kmeny byly získány z Culture Collection of Yeasts (CCY), Slovenská akademie věd, Bratislava, Slovensko. Kmeny karotenogenních kvasinek byly uchovávány při -80 °C v chladicím boxu. Skladovací médium sestávalo ze směsi 1:1 kvasinkové kultury v médiu YPD a 50 % glycerolu jako kryoprotektiva.

<i>Rhodosporidium toruloides</i>	CCY 062-002-004
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	CCY 19-9-6
<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	CCY 19-6-20
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	CCY 20-2-26
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CCY 19-4-6
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CCY 20-9-7

4.1.2 Kmeny sinic

Všechny studované kmeny sinic byly zakoupeny ze sbírky kultur autotrofních organismů (CCALA), Akademie věd ČR, Třeboň. Sinice byly skladovány ve zkumavkách se šikmým agarovým médiem s vhodným médiem.

<i>Arthrospira maxima</i>	CCALA 030
<i>Anabaena torulosa</i>	CCALA 003
<i>Anabaena laxa</i>	CCALA 805



Obr. č. 14 Zásobní kultura *Anabaena torulosa* CCALA 003 na pevném médiu

4.2 Chemikálie

4.2.1 Chemikálie používané pro kultivaci karotenogenních kvasinek mikrořas a sinic

Kvasničný autolyzát, Himedia (Indie)

Pepton z kaseinu, Roth (SRN)

Agar-Agar, Roth (SRN)

Síran amonný Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Glycerol Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Močovina Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Dusičnan sodný p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)

Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)

Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)

Dihydrogenfosforečnan draselný

Hydrogenfosforečnan draselný
Chlorid sodný p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Hydroxid draselný p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Síran železnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Kyselina sírová 96 % p.a., Penta (ČR)
Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Chlorid manganatý tetrahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Síran měďnatý pentahydrát p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Dusičnan kobaltnatý hexahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Kyselina boritá p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)

4.2.2 Chemikálie pro extrakce, transesterifikaci a analýzu pro GC a HPLC

Acetonitril pro HPLC, Penta (ČR)
Kyselina heptadekanová pro GC, Sigma-Aldrich (SRN)
Ethylacetát pro HPLC, Penta (ČR)
Hexan pro GC, Penta (ČR)
tris(hydroxymethyl)aminomethane p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Methanol pro HPLC, Penta (ČR)

4.3 Přístroje a pomůcky

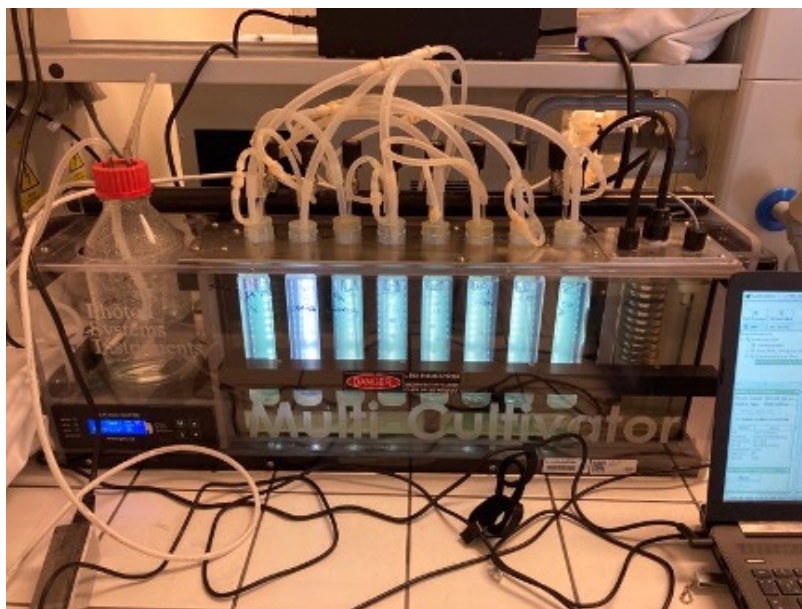
4.3.1 Přístroje a pomůcky pro kultivaci

Analytické váhy Boeco (CRN)
Centrifuga Hermle Z36 HK, (ČR)
Třepačka Yellow line, (SRN)
Třepaný inkubátor, ZWYR-D2401 – Labwit, BioTech (ČR)
Box Aura mini iBopTech (ČR)

Kultivátor Multicultivator MC 1000 -OD PSI Drásov (ČR) (viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**)

- Stojan pro 8 zkumavek o objemu 80 ml

- Vzduchová pumpa
- Termostat s vodní lázní
- Zásobník s destilovanou vodou
- Detektor optické hustoty – detekce při 680 nm a 720 nm
- LED diodový zdroj pro každou zkumavku



Obr. č. 15 Kultivátor Multicultivator MC 1000 -OD PSI Drásov (ČR)

4.3.2 Přístroje pro izolaci a analýzu vybraných analytů

Spektrofotometr VIS, Helios δ , Unicam (GB)

Lyofilizátor Labconco FreeZone 4.5 Freeze Dryer (USA)

Termoblok VWR, (ČR)

Vortex/homogenizátor disruptor Genie, Scientific Industries, Inc. (USA)

Thermo Scientific TRACETM 1300 Gas Chromatograph, (Thermo Fischer Scientific, USA)

- Detektor FID (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Thermo Scientific AI 1310 Autosampler
- Kolona LION LN-FAME, 30 m \times 0,32 mm \times 0,20 μ m, Chromservis

HPLC/PDA sestava: Sestava HPLC/MS (Thermo Fischer Scientific, USA)

- Termostat – LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)
- Detektor PDA – PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR

- Pumpa – MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR
- Vyhodnocovací systém Xcalibur
- Kolona Kinetex Core Shell C18-EVO, 150 mm délka, 4,6 mm šířka, 5,0 μm částice, Phenomenex
- Držák předkolony – KJ0 – 4282, ECOM (ČR)
- Předkolona – C18-EVO, Phenomenex
- Filtry pro HPLC, PTFE, Chromservis
- Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)
- Systém MicroTime 200, Picoquant GmbH, objektiv s vodní imerzí Olympus UPLSAPO 60XW

4.4 Kultivační techniky a složení médií

4.4.1 Kultivace karotenogenních kvasinek

Karotenogenní kvasinky společně se sinicemi byly ve formě kokultivací v prostředí BBM média s různými poměry dusičných, fosforečných a hořečnatých iontů. Kultivace probíhala v multikultivátoru MC 1000.

4.4.1.1 Inokulum I a II

Základem každé kultivace je příprava univerzálního živného média, v tomto případě YPD kvasinkové médium (složení viz. Tabulka č. 1). Pro přípravu čerstvé zásobní kultury bylo médium YPD s 2 % agarem sterilizováno ve vysokotlakých nádobách a nalito do sterilních Petriho misek. Po ochlazení za sterilních podmínek ve flow-boxu pod UV světlem byly Petriho misky uzavřeny parafilmem a uchovány v lednici pro pozdější použití. Pro inokulaci bylo několik smyček ze zásobních kultur v kryozkumavkách naočkováno na Petriho misku s YPD agarem. Petriho misky byly udržovány v laboratorní teplotě a za stálého osvětlení. Po optimální buněčné proliferaci (3 až 4 dny) byly kultury na agarových plotnách připraveny pro inokulaci do tekutého média. YPD médium bylo připraveno a sterilizováno po dobu 30 minut při 121 °C v Erlenmeyerových baňkách ve vysokotlakých nádobách s otevřeným ventilem, aby bylo zabráněno Maillardově reakci. Kultura z agarové plotny byla přenesena do Erlenmeyerových baněk sterilní smyčkou. Inokulace byla provedena s poměrem 1 smyčka kultury na 10 ml inokulačního média.

Inokulum I bylo kultivováno při laboratorní teplotě za konstantního osvětlení na reciproční třepačce, kdy inkolum I mělo objem 50 ml. Po 24 hodinách bylo inokulum I přeočkováno do inokula II s poměrem 1:5, kdy inokulum II mělo objem 125 ml.

Tabulka č. 1: Složení YPD média

Složení inokulačního média	
Složka	Množství
Destilovaná voda	1000 ml
Kvasničný autolyzát	10 g
Bakteriologický pepton	20 g
Glycerol	20 g

4.4.1.2 Produkční média multikultivátorových experimentů

Následovala fáze kultivace, kdy byla potřeba přenést YPD médium kvasinek z inokula II do připravených produkčních médií. Média obsahovala místo běžně používané destilované vody BBM medium (složení viz. Tabulka č. 2, Tabulka č. 3), případně spirulina médium (složení viz. Tabulka č. 4, Tabulka č. 5, Tabulka č. 6) podle dané sinice, jaké médium vyžadovala. V případě kokultivačních experimentů byly navíc baňky obohaceny o glycerol v koncentraci 30 g/l a dusičné, fosforečné a hořečnaté ionty viz Tabulka č. 7. Kontrolní baňka čistě kvasinkového média byla kultivována také v BBM médiu obohaceném glycerolem v koncentraci 30 g/l. Pro kultivaci kvasinek a sinic byl využit přístroj multikultivátor. Ten se skládá z osmi oddělených komor pro kultivační zkumavky.

Každá zkumavka má svůj vlastní přívod vzdušnění, kterým je pak skleněná zkumavka obsahující médium a vhodné mikroorganismy probublávána. Byla potřeba dodržet stejná intenzita probublávání v každé jednotlivé zkumavce. Multikultivátory obsahují LED osvětlení, které je možné nastavit s rozdílnou intenzitou pro každou zkumavku zvlášť.

Díky této skutečnosti lze paralelně provádět osm experimentů s rozdílnými stresovými parametry. V případě těchto prováděných experimentů byla teplota i osvětlení udržovány v konstantních hodnotách.

Bylo použito osm kultivačních zkumavek, kdy první obsahovala pouze 2ml kvasinky o absorbanci 0,15 v BBM médiu s glycerolem v koncentraci 30 g/l. Druhá baňka obsahovala pouze sinici v BBM médiu, nebo spirulina médiu v množství 5 ml o absorbanci 0,25, zbylých 6 zkumavek bylo naplněno vhodným médiem a obsahovalo kokultivaci sinic (5ml, A = 0,25) a kvasinek (2 ml, A=0,15) s přidanými esenciálními prvky viz Tabulka č. 7. Kultivace vždy trvaly 4 dny, poté byla kultivace ukončena a vzniklá biomasa byla dále zpracována.

Tabulka č. 2: Složení BBM média

Složka	Zásobní roztok (g/l dH ₂ O)	Množství na 1 l
NaNO ₃	25,00	10
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,50	10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,50	10
K ₂ HPO ₄	7,50	10
KH ₂ PO ₄	17,50	10
NaCl	2,50	10
EDTA	-	1
Acidified iron solution	-	1
H ₃ BO ₃	11,42	1
Trace metal solution	-	1

Tabulka č. 3: Složení jednotlivých složek BBM média

Roztok	Složka	Množství (g/l)
EDTA	EDTA	50,00
	KOH	31,00
Acidified iron	FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,98
	H ₂ SO ₄ (96 %)	1 ml
Trace metal	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,82
	MnCl ₂ ·4 H ₂ O	1,44
	MoO ₃	0,71
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57
	Co(NO ₃) ₂ ·6 H ₂ O	0,49

Tabulka č. 4: Složení Spirulina média

	Spirulina solution 1	Spirulina solution 2
Složka	Koncentrace (g/l)	Koncentrace (g/l)
NaHCO ₃	13,61	-
Na ₂ CO ₃	4,03	-
K ₂ HPO ₄	0,50	-
NaNO ₃	-	2,5
K ₂ SO ₄	-	1,0
NaCl	-	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	0,2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	0,04
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	0,01
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	-	0,08
Roztoky	Koncentrace (ml/l)	Koncentrace (ml/l)
Trace metal solution	-	5
Vitamin solution	-	1

Tabulka č. 5: Trace metal solution do spirulina media

Trace metal solution	
Složka	Množství na 1 l
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,7 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1 ml
MnSO ₄ ·7H ₂ O	1 ml
H ₃ BO ₃	1 ml
Co (NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	1 ml
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1 ml
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1 ml

Tabulka č. 6: Vitamin solution do spirulina média

Vitamin solution	
Složka	Množství do 1 l
Cyanokobalamin (vit. B ₁₂)	5 mg

Tabulka č. 7: Rozložení kultivačního experimentu v multikultivátoru.

Mikroorganismy	Přidané prvky	Množství prvků oproti samotnému BBM médiu (%)
Kvasinka kontrola	-	100
Sinice kontrola	-	100
Kokultivace	P+N	200 + 200
Kokultivace	P+N	300 + 300
Kokultivace	P+N	400 + 400
Kokultivace	Mg ²⁺	200
Kokultivace	Mg ²⁺	300
Kokultivace	P+N+ Mg ²⁺	300+300+300

4.4.2 Kokultivace sinic a kvasinek na odpadních olejích

V těchto experimentech byly použity různé kombinace sinic a kvasinek, které byly kultivovány na BBM médiu (Tabulka č. 2, Tabulka č. 3) obohaceném o glycerol (30 % C složky) a kávový nebo fritovací olej (70 % C složky). Kontrolní Erlenmeyerova baňka se sinicemi byla kultivována na čistém BBM médiu bez přidané C složky. Cílem těchto experimentů bylo zjistit, zda jsou kokultivační experimenty výhodnější ke zpracování těchto odpadních olejů v porovnání se samotnými kvasinkami. Dalším takovým cílem bylo také, jak se změní produkované metabolity mikroorganismů v souvislosti na kokultivacích a také na prostředí. V tabulce č. 8 je znázorněno, jak byly erlenmeyerovy kultivační baňky připraveny. Kultivace probíhala opět 4 dny, tak jak probíhala kokultivace v multikultivátoru.

Tabulka č. 8: Obsah baněk olejových experimentů

Baňka	Mikroorganismus	Olej
1	Kontrolní kvasinka	Kávový
2	Kontrolní kvasinka	Fritovací
3	Kontrolní sinice	-
4	Kokultivace	Kávový
5	Kokultivace	Fritovací

4.4.3 Zpracování vzorků

4.4.3.1 Zpracování biomasy

Po skončení kultivací byla následně biomasa přelita do centrifugačních zkumavek a stáčena pomocí centrifugy, a to za přesně nastavených podmínek, které jsou 8000ot/min po dobu 8 minut. Supernatant je odlit do odpadů, zcentrifugovaná biomasa je promyta destilovanou vodou, před následnou centrifugací je ještě protřepána centrifugační zkumavka s biomasou a destilovanou vodou, poté je znovu dána do centrifugy za dodržení stejných podmínek. Biomasa, která je zbavená supernatantu je vložena do -80 °C mrazáku. Po zmrznutí biomasy v centrifugační zkumavce, je vložena do lyofilizátoru, kdy je potřeba, aby tam zůstala až do úplného vysušení. Centrifugační zkumavka s biomasou je vyjmuta z lyofilizátoru, biomasa se zváží na analytických vahách a jsou odebrány vhodné objemy, které jsou následně extrahovány a použity HPLC a GC.

4.4.3.2 Příprava vzorků pro HLC analýzu lipidických látek

Prvním krokem bylo odvážení 8-15 mg lyofilizované biomasy do mikrozkušavky typu Eppendorf se závitkem a těsněním. Do vzorku byl přidán 1 ml destilované vody a byl hydratován (minimálně 2 h), nebo byl vložen do -80 °C mrazáku, kde se ponechal po dobu 20-30 min. Po uplynutí doby, kdy byly vzorky v mrazáku, byly vytaženy a rozmrazeny. Poté byly vloženy do centrifugy a centrifugovány, supernatant byl odlit. Byl přidán 1 ml methanolu p.a. a také skleněné kuličky (cca 0,5 ml, glass pearls). Vzorky byly vloženy do vortexu a třepány na minimálně 15 minut. Po protřepání byl vzorek převeden do 15 ml plastové centrifugační zkumavky. Ke vzorku bylo přidáno 2 ml chloroformu laboratorní kvality. Zkumavky byly opět převedeny na vortex a třepány 10 minut. Po protřepání bylo do vzorku napipetováno 1 ml destilované vody. Vzorky byly stáčeny na centrifuze při 2000 rpm po dobu 1 minuty. Po stočení vzorků byla odpipetována spodní chloroformová fáze. Následovalo její odpaření v termobloku, kde inertní atmosféru zajišťoval N₂. Po odpaření chloroformu byl k vysušenému vzorku přidán 1 ml směsi ethylacetátu a acetonitrilu HPLC kvality v poměru 1:2. Posledním krokem bylo přefiltrování vzorku přes 0,4 μm filtr PTFE do vialky se závitkem o objemu 1,8 ml. Parametry HPLC sestavy jsou uvedeny v tabulce (Tabulka č. 9).

Tabulka č. 9: Gradientový program a složení mobilních fází pro HPLC analýzu karotenoidů

Kolona		Nepolární C18
Detektor		DAD
Složení MF	MF A: ACN:TrisHCl:MeOH	MF B: MeOH:EtAc
	84:14:2	60:40
Čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0	100	0
13	0	100
19	0	100
20	100	0
24	100	0

4.4.3.3 Transesterifikace vzorku mikrobiální biomasy

Na odvážení zlyofilizované biomasy byly využity krymplovací vialky, do nich bylo odváženo cca 5-10 mg biomasy. K odvážené biomase bylo napipetováno 1,8 ml transesterifikační směsi, která obsahovala 15 % H₂SO₄ v methanolu HPLC kvality a interní standard kyseliny heptadekanové o koncentraci 0,5 mg/ml. Vzorky připravené touto cestou ve vialkách byly zakrymplovány, poté inkubovány v termobloku po dobu 2 hodin při teplotě 85 °C. Po skončení inkubace byly transesterifikované vzorky volně ponechány, aby došlo k vychlazení na pokojovou teplotu.

Poté do připravené 5 ml vialky byl kvantitativně převeden obsah vialky se vzorkem, které se musela odkrimplovat. Do 5 ml vialky se vzorkem bylo napipetováno 0,5 ml 0,05 mol/l NaOH, také byl přidán 1 ml hexanu HPLC kvality. Vialka byla uzavřena a třepána na vortexu po dobu 5-10 minut. Poté co došlo k oddělení fází, bylo z hexanové fáze pipetou odebráno 0,1 ml a převedeno do čisté vialky o objemu 1,8 ml spolu s 0,9 ml hexanem HPLC kvality. Takto připravený vzorek byl analyzován pomocí GC. Parametry GC sestavy jsou uvedeny v tabulce (Tabulka č. 10)

Tabulka č. 10: Parametry GC/FID

	LION LN-FAME
Kapilární kolona	Rozměry 30 m × 0,32 mm × 0,20 μm,
Dávkování	Autosampler Thermo Scientific AI 1310
Objem nástřiku vzorku	1 μl
Poměr nástřiku děliče toku	10
Konstantní průtok nosného plynu H ₂	1 ml/min
Detektor	Plamenově ionizační
Teplota	250 °C
Průtok	Vzduch 350 ml/min, make-up N ₂ 30 ml/min, H ₂ 35 ml/min

5 Výsledky a diskuse

5.1 Multikultivátorové kokultivační experimenty

V rámci multikultivátorových experimentů byly kombinovány různé druhy sinic a karotenogenních kvasinek. V každém experimentu bylo zachováno stejné prvkové a obsahové složení médií, viz Tabulka č. 7. Hlavním cílem těchto experimentů bylo otestovat, zda zvolený kokultivační pár sinice a kvasinka jsou schopny koexistovat v jednom médiu. Zároveň druhým cílem bylo vystavit mikroorganismy stresové situaci tím, že jim bude přidán nadbytek minerálních prvků v různých poměrech a zjistit, jak na dané stresové situace reagují.

Tabulka č. 11: Rozložení experimentu, označení vzorku

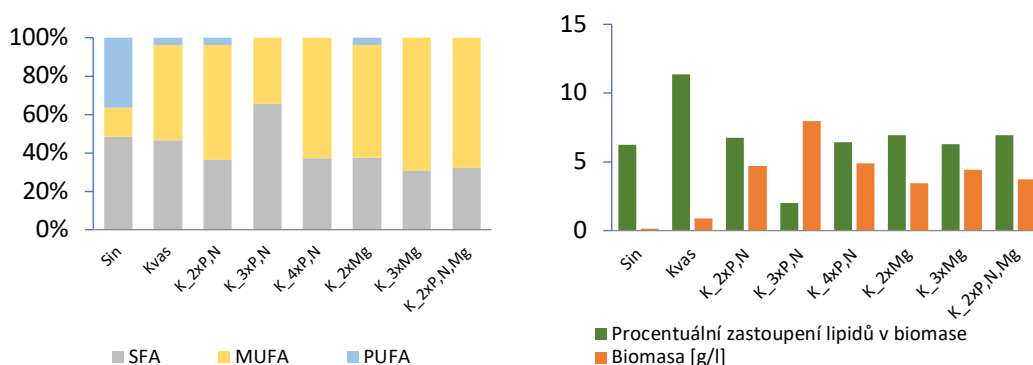
Sinice kontrola	Sin
Kvasinka kontrola	Kvas
Kokultivace 200 % P a N	K_2xP, N
Kokultivace 300 % P a N	K_3xP, N
Kokultivace 400 % P a N	K_4xP, N
Kokultivace 200 % Mg	K_2xMg
Kokultivace 300 % Mg	K_3xMg
Kokultivace 200 % P, N a Mg	K_2xP, N, Mg

5.1.1 Kokultivace *Rhodosporidium toruloides* a *Anabaena torulosa*

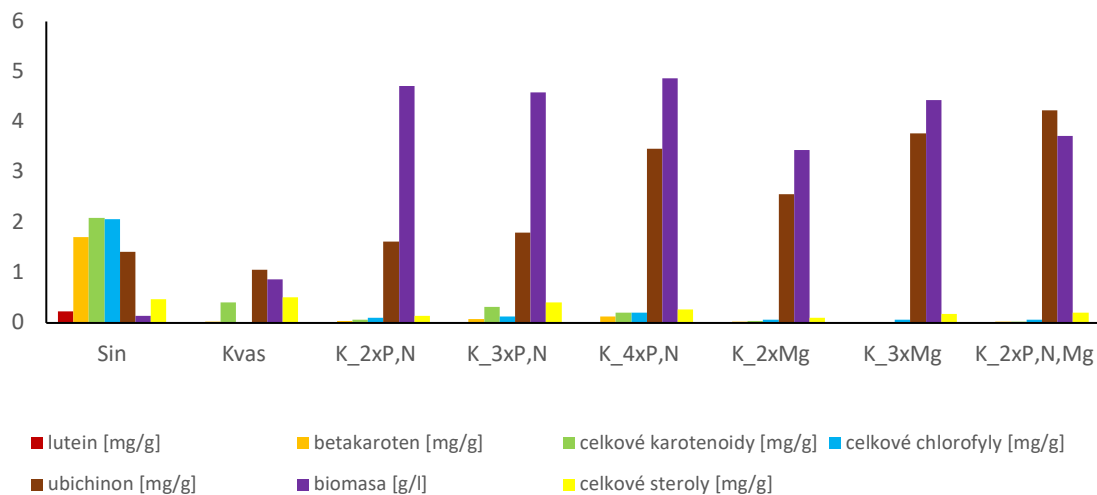
Tabulka č. 12: Výsledky produkce biomasy kokultivace *A. torulosa* a *R. toruloides* v multikultivátorové kultivaci s aplikací zvýšeného obsahu makroživin.

Mikroorganismus	Přidané prvky (%)	Množství biomasy (g/l)
Sinice kontrola	-	0,135
Kvasinka kontrola	-	0,864
Kokultivace	200% P + N	4,711
Kokultivace	300% P + N	4,590
Kokultivace	400% P + N	4,871
Kokultivace	200% Mg ²⁺	0,313
Kokultivace	300% Mg ²⁺	4,440
Kokultivace	200% P+N+ Mg ²⁺	3,716

Z výsledků produkce biomasy v kokultivačním experimentu *R. toruloides* a *A. torulosa* vidíme jasný trend, kdy ve všech kokultivačních experimentech s výjimkou kokultivace s 200 % Mg bylo naprodukováno několikanásobně více biomasy ve srovnání s kontrolními kultivacemi. Z hlediska produkce biomasy v kokultivacích vidíme poměrně stabilní trend v produkci s malými odchylkami. Největší produkce biomasy (4,871 g/l) bylo dosaženo v 5. zkumavce s čtyřnásobným množstvím P a N. Druhá nejvyšší naměřená produkce (4,711 g/l) byla dosažena ve 3. zkumavce s dvojnásobným množstvím P a N. Obecně lze konstatovat, že v této kokultivaci zvýšený podíl makroprvků P a N má velmi pozitivní vliv na produkci biomasy. V případě zvýšeného obsahu hořecnatých iontů byla výrazná indukce pozorována při trojnásobném množství oproti kontrolnímu médiu.



Obr. č. 16 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vyprodukované biomase *R. toruloides* a *Anabaena torulosa* (vlevo) a znázornění množství procentuálního zastoupení lipidů v biomase a celková vyprodukovaná biomasa při kultivaci a kokultivaci *R. toruloides* a *Anabaena torulosa* (vpravo)



Obr. č. 17 Kokultivace *R. toruloides* a *Anabaena torulosa* výsledky HPLC

Z grafů výsledků analýzy složení mastných kyselin a obsahu lipidů (Obr. č. 16) vidíme poměrně stabilní produkci lipidů v kokultivačních experimentech, která se pohybuje v rozmezí (6-7,5 % lipidů). Celková produkce je nižší v porovnání s kontrolní kvasinkovou kultivací, která dosáhla nejvyšších produkcí 11,35 % lipidů v biomase. Tento výsledek koresponduje s produkcí biomasy, kdy kontrolní kvasinková kultura naprodukovala málo biomasy a zaměřila se na akumulaci lipidů. Na druhou stranu v kokultivačních experimentech byla preferována produkce biomasy. Z hlediska složení mastných kyselin vidíme, že v porovnání s kontrolní kultivací sinice *Anabaena torulosa*, která produkovala stabilní kompletní profil mastných kyselin, jsou v kokultivacích zastoupeny primárně nasycené mastné kyseliny (SFA) a mononenasycené mastné kyseliny (MUFA). Ve většině kokultivací bylo naprodukováno větší množství MUFA ve srovnání s kontrolními kultivacemi. Na produkci MUFA měl pozitivní vliv primárně navýšený obsah hořčnatých iontů s maximem 69,14 % v médiu s 300 % Mg iontů. Jak již bylo zmíněno produkce polynenasycených mastných kyselin byla v kokultivacích prakticky upozaděna ve všech kokultivacích s výjimkou médií s dvojnásobkem P, N a Mg (zkumavky 3 a 6), kdy bylo naprodukováno necelé 4% obsahu.

Z výsledků HPLC analýzy produkce lipidických látek (Obr. č. 17) vidíme, že v porovnání s kontrolními kultivacemi, dochází u všech kokultivací ke snížené produkci pigmentů, která byla obecně velmi nízká. Na druhou stranu došlo k výrazně zvýšené produkci ubichinonu, což koreluje s vysokou produkcí biomasy, a tedy vysokou aktivitou elektrontransportních drah. Zvýšený obsah živin v médiu vede ke zvýšené akumulaci ubichinonu.

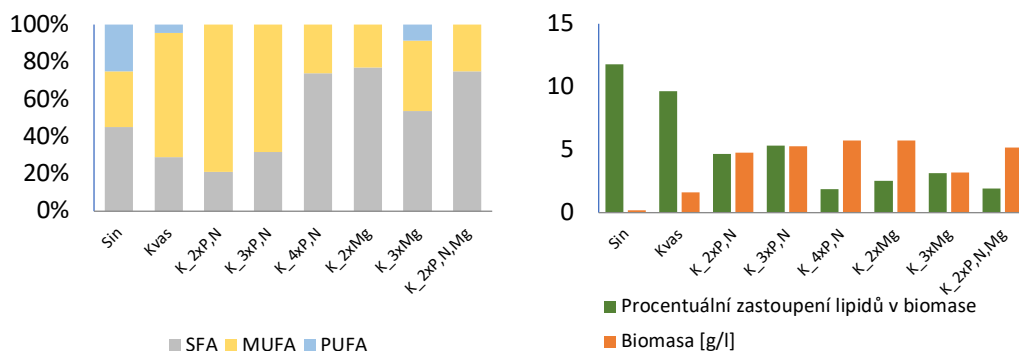
Nejvyšší produkce ubiquinonu v sušině bylo dosaženo na médiích s dvojnásobkem Mg, P a N (4.226 mg/g) a na médiu s nejvyšším obsahu P a N. Produkce karotenoidů byla v kokultivacích nízká a nepřekročila 0,5 mg/g suché biomasy. Nejvyšší hodnoty bylo naměřeno u kontrolní kultivace *Anabaeny torulosa*, a to 2,088 mg/g. Závěrem lze shrnout, že tato kokultivace byla produktivní primárně z hlediska produkce biomasy. Produkce sledovaných metabolitů byla nízká a z tohoto hlediska je nutná další optimalizace. Dále můžeme konstatovat, že tato kokultivační dvojice byla schopná společně koexistovat.

5.1.2 Kokultivace *Rhodospiridium toruloides* a *Arthrospira maxima*

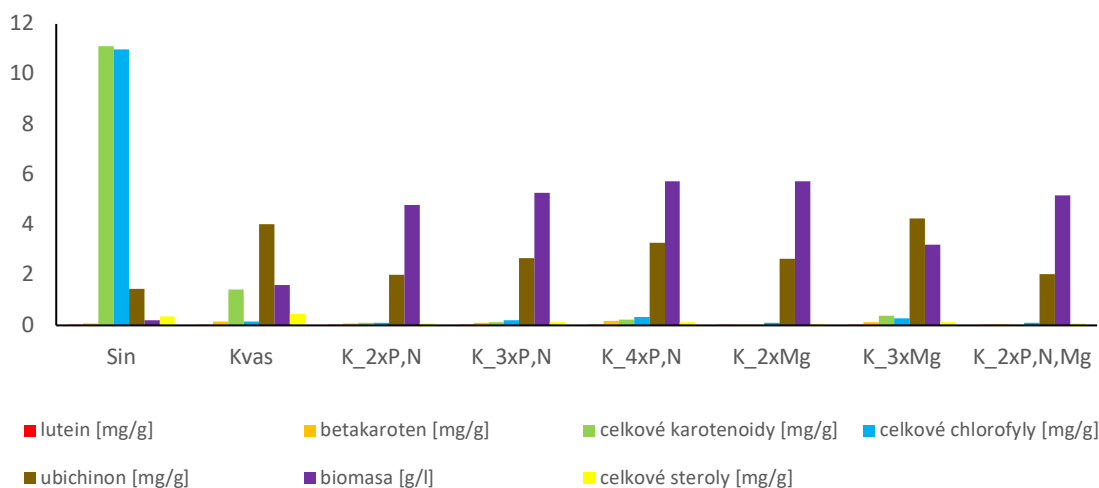
Tabulka č. 13: Výsledky produkce biomasy kokultivace *R. toruloides* a *Arthrospira maxima* v multikultivátorové kultivaci s aplikací zvýšeného obsahu makroživin.

Mikroorganismus	Přidané prvky (%)	Množství biomasy (g/l)
Sinice kontrola	-	0,209
Kvasinka kontrola	-	1,596
Kokultivace	200% P + N	4,783
Kokultivace	300% P + N	5,279
Kokultivace	400% P + N	5,726
Kokultivace	200% Mg ²⁺	5,745
Kokultivace	300% Mg ²⁺	3,203
Kokultivace	200% P+N+ Mg ²⁺	5,180

Z výsledků produkce biomasy v kokultivačním experimentu *R. toruloides* a *A. maxima* vidíme jasný trend, kdy ve všech kokultivačních experimentech bylo naprodukováno několikanásobně více biomasy ve srovnání s kontrolními kultivacemi. Z hlediska produkce biomasy v kokultivacích vidíme poměrně stabilní produkci s malými odchylkami. Největší produkce biomasy (5,745 g/l) bylo dosaženo v 6. zkumavce s dvojnásobným množstvím Mg²⁺. Druhá nejvyšší naměřená produkce (5,526 g/l) byla dosažena v 5. zkumavce s čtyřnásobným množstvím P a N. Obecně lze konstatovat, že v této kokultivaci zvýšený podíl makroprvků P, N a Mg²⁺ má velmi pozitivní vliv na produkci biomasy. V případě 7. zkumavky, kde byl obsah hořečnatých iontů trojnásobný byla pozorována nejnižší produkce biomasy oproti ostatním kokultivačním zkumavkám.



Obr. č. 18 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vyprodukované biomase *R. totuloides* a *Arthrospira maxima* (vlevo) a znázornění množství procentuálního zastoupení lipidů v biomase a celková vyprodukovaná biomasa při kultivaci a kokultivaci *RT* a *AM* (vpravo)



Obr. č. 19 Kokultivace *R. toruloides* a *Arthrospira maxima* výsledky HPLC

Z grafů výsledků analýzy složení mastných kyselin a obsahu lipidů (Obr. č. 18) vidíme, že produkce lipidů v kokultivačních experimentech se rozdělila na dvě skupiny, které mají poměrně stejné množství lipidů. Kokultivace s dvojnásobným a trojnásobným přidavkem N a P má produkci kolem 5 % lipidů a ostatní kokultivační experimenty se pohybují v rozmezí (2-3 % lipidů). Celková produkce je nižší v porovnání s kontrolní sinicovou kultivací, která dosáhla nejvyšších produkcí 11,8 % lipidů v biomase. Tento výsledek koresponduje s produkcí biomasy, kdy kontrolní kvasinková kultura i kontrolní sinicová kultura naprodukovaly málo biomasy a zaměřili se na akumulaci lipidů. Na druhou stranu v kokultivačních experimentech byla preferována produkce biomasy.

Z hlediska složení mastných kyselin vidíme, že v porovnání s kontrolní kultivací sinice *A. maximo*, která produkovala celkem stabilní kompletní profil mastných kyselin, jsou v kokultivacích zastoupeny primárně nasycené mastné kyseliny (SFA) a mononenasycené mastné kyseliny (MUFA), v případě kokultivace s trojnásobným množstvím Mg^{2+} , byla pozorována i produkce polynenasycených mastných kyselin (PUFA). U kokultivací s dvojnásobným a trojnásobným množstvím N a P je vidět, že bylo nadprodukováno větší množství MUFA ve srovnání s kontrolními kultivacemi. Zbylé kokultivační experimenty vyprodukovaly větší množství SFA oproti kontrolním kultivacím. Největší produkce MUFA byla pozorována u kokultivacev médiu s 200 % P a N s maximem 78,81 % MUFA. Produkce polynenasycených mastných kyselin byla v kokultivacích prakticky upozaděna, výjimku tvoří pouze kokultivace s 300 % Mg, kdy bylo nadprodukováno 8,76 %.

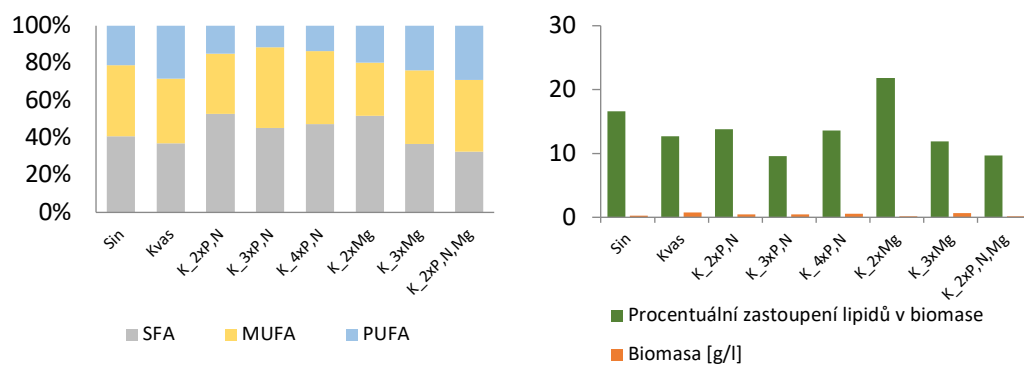
Z výsledků HPLC analýzy produkce lipidických látek (Obr. č. 19) vidíme, že v porovnání s kontrolními kultivacemi, dochází u všech kokultivací ke snížené produkci pigmentů, která byla obecně velmi nízká. Zvýšený obsah živin v médiu vede ke zvýšené akumulaci ubichinonu. Nejvyšší produkce ubichinonu v sušině bylo dosaženo na médiu s trojnásobným množstvím hořčnatých iontů (4,262 mg/g). Produkce karotenoidů byla v kokultivacích nízká a nepřekročila 0,5 mg/g suché biomasy. Nejvyšší hodnoty celkových karotenoidů bylo naměřeno u kontrolní kultivace *Arthrospira maximo*, kdy hodnota dosáhla 11,104 mg/g. U kontrolní sinice *Arthrospira maximo* byl pozorován vysoký obsah celkových karotenoidů a chlorofylů. Závěrem lze shrnout, že tato kokultivace byla produktivní z hlediska produkce biomasy a kokultivační dvojice spolu vzájemně koexistovaly.

5.1.3 Kokultivace *Rhodospiridium toruloides* a *Anabaena laxa*

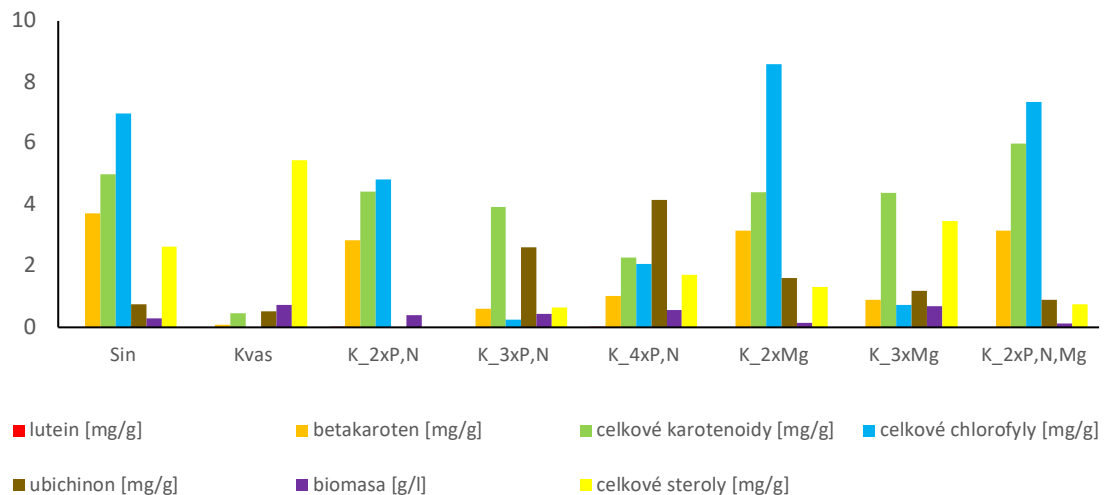
Tabulka č. 14: Výsledky produkce biomasy kokultivace *R. toruloides* a *Anabaena laxa* v multikultivátorové kultivaci s aplikací zvýšeného obsahu makroživin.

Mikroorganismus	Přidané prvky (%)	Množství biomasy (g/l)
Sinice kontrola	-	0,285
Kvasinka kontrola	-	0,723
Kokultivace	200% P + N	0,408
Kokultivace	300% P + N	0,441
Kokultivace	400% P + N	0,571
Kokultivace	200% Mg^{2+}	0,151
Kokultivace	300% Mg^{2+}	0,689
Kokultivace	200% P+N+ Mg^{2+}	0,133

Z výsledků produkce biomasy v kokultivačním experimentu *R. toruloides* a *A. laxa* je vidět, že největší množství vyprodukované biomasy bylo dosaženo u kontrolní kvasinky (0,723 g/l). Ve všech kokultivačních experimentech je množství biomasy poměrně rozdílné a ve všech případech bylo nižší než u kontrolní kvasinky ale vyšší než u kontrolní sinice. Nejvyšší produkce biomasy (0,689 g/l) z kokultivačních experimentů dosáhla 7. zkumavka s 300 % Mg. Druhá nejvyšší naměřená produkce (0,571 g/l) byla dosažena v 5. zkumavce se čtyřnásobným množstvím P a N. Obecně lze konstatovat, že v této kokultivaci zvýšený podíl makroprvků P a N má pozitivní vliv na produkci biomasy. V případě zvýšeného obsahu hořčnatých iontů byla pozorována zvýšená produkce biomasy při trojnásobném množství oproti kontrolnímu médiu.



Obr. č. 20 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vyprodukované biomase *R. toruloides* a *Anabaena laxa* (vlevo) a záznam množství procentuálního zastoupení lipidů v biomase a celková vyprodukovaná biomasa při kultivaci a kokultivaci *RT* a *AL* (vpravo)



Obr. č. 21 Kokultivace *R. toruloides* a *Anabaena laxa* výsledky HPLC

Z grafů výsledků analýzy složení mastných kyselin a obsahu lipidů (Obr. č. 20) je pozorována poměrně stabilní produkce lipidů v kokultivačních experimentech, která se pohybuje v rozmezí (9-13 % lipidů), výjimka je u kokultivace s dvojnásobným množstvím hořčnatých iontů, kde obsah dosahuje skoro 22 % lipidů v biomase. Ve většině případů je celková produkce nižší v porovnání s kontrolními kultivacemi, ale jak již bylo zmíněno nejvyšší množství lipidů v biomase je v kokultivaci s dvojnásobným množstvím hořčnatých iontů. Produkce biomasy je ve všech zkumavkách poměrně nízká. Z hlediska složení mastných kyselin je vidět, že všechny zkumavky produkovaly poměrně stabilní kompletní profil mastných kyselin. Ve všech zkumavkách je vidět, že zastoupení SFA, MUFA a PUFA poměrně stejné. Největší vyprodukované množství SFA 52,66 % bylo dosaženo v médiu s 200 % P a N, nejvyšší vyprodukované množství MUFA 43,26 % bylo dosaženo v médiu s trojnásobným množstvím P a N. Na produkci PUFA měl pozitivní vliv média s obsahem 200 % P, N a Mg iontů s maximem 29,04 %.

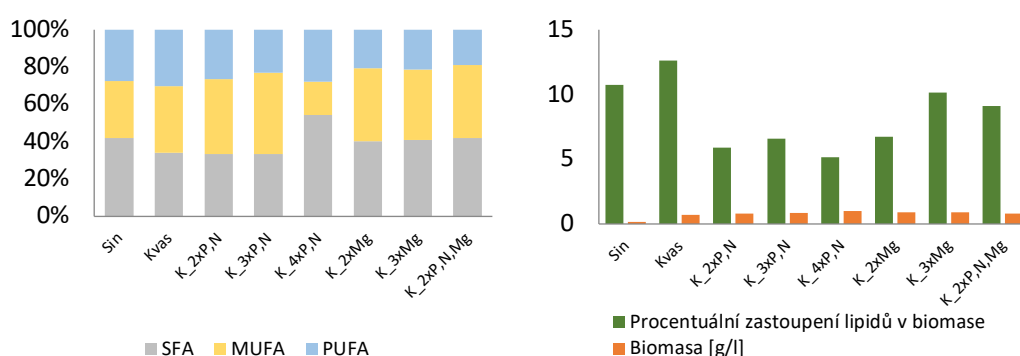
Z výsledků HPLC analýzy produkce lipidických látek (Obr. č. 21) je vidět, že ve všech zkumavkách je přibližně stejné množství pigmentů. Produkce ubichinonu je výrazně vyšší v kokultivačních experimentech ve zkumavkách 4 (300 % P a N) a 5 (300 % P a N). Produkce karotenoidů byla ve většině zkumavek zvýšena. Závěrem lze shrnout, že tato kokultivace nebyla produktivní z hlediska produkce biomasy. Produkce sledovaných metabolitů byla vyšší, ale produkce biomasy byla velmi nízká ve všech experimentech. Je nutná další optimalizace. Dále můžeme konstatovat, že tato kokultivační dvojice byla schopná společně koexistovat. Ale také je zřejmé, že tato dvojice není vhodným kokultivačními partnery z hlediska produkce biomasy.

5.1.4 Kokultivace *Sporidiobolus pararoseus* a *Anabaena laxa*

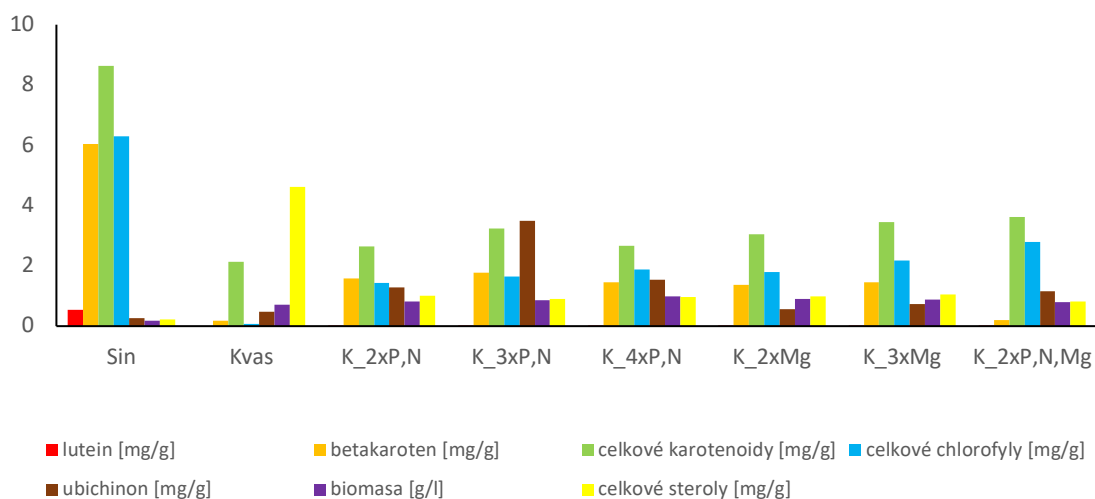
Tabulka č. 15: Výsledky produkce biomasy kokultivace *S. pararoseus* a *Anabaena laxa* v multikultivátorové kultivaci s aplikací zvýšeného obsahu makroživin.

Mikroorganismus	Přidané prvky (%)	Množství biomasy (g/l)
Sinice kontrola	-	0,179
Kvasinka kontrola	-	0,701
Kokultivace	200% P + N	0,813
Kokultivace	300% P + N	0,861
Kokultivace	400% P + N	0,978
Kokultivace	200% Mg ²⁺	0,893
Kokultivace	300% Mg ²⁺	0,884
Kokultivace	200% P+N+ Mg ²⁺	0,791

Z výsledků produkce biomasy v kokultivačním experimentu *S. pararoseus* a *A. laxa* vidíme, že ve všech kokultivačních experimentech bylo naprodukováno více biomasy ve srovnání s kontrolními kultivacemi. Z hlediska produkce biomasy v kokultivacích vidíme poměrně stabilní trend v produkci s malými odchylkami. Největší produkce biomasy (0,978 g/l) bylo dosaženo v 5. zkumavce s čtyřnásobným množstvím P a N. Druhá nejvyšší naměřená produkce (0,893 g/l) byla dosažena v 6. zkumavce s dvojnásobným množstvím hořečnatých iontů. Obecně lze konstatovat, že v této kokultivaci zvýšený podíl makroprvků P a N má velmi pozitivní vliv na produkci biomasy, a to i v případě zvýšeného obsahu hořečnatých iontů.



Obr. č. 22 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vyprodukované biomase *S. pararoseus* a *Anabaena laxa* (vlevo) a znázornění množství procentuálního zastoupení lipidů v biomase a celková vyprodukovaná biomasa při kultivaci a kokultivaci *SP* a *AL* (vpravo)



Obr. č. 23 Kokultivace *S. pararoseus* a *Anabaena laxa* výsledky HPLC

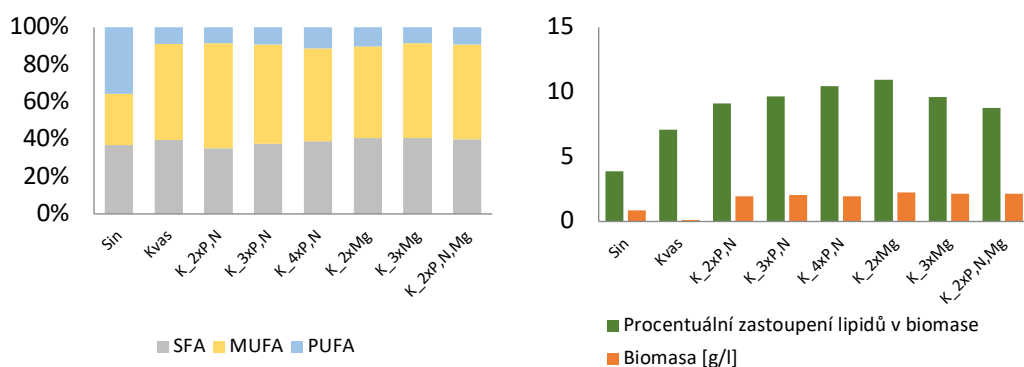
Z grafů výsledků analýzy složení mastných kyselin a obsahu lipidů (Obr. č. 22) vidíme, že produkce lipidů v kokultivačních experimentech je celkem stabilní a pobybuje se v rozmezí (6-10 % lipidů). Celková produkce je nižší v porovnání s kontrolními kultivacemi kvasinky a sinice. Nejvyšší produkce lipidů v biomase dosáhla kontrolní kvasinková kultivace, kdy hodnota byla 12,64 % lipidů v biomase. Tento výsledek koresponduje s produkcí biomasy, kdy kontrolní kvasinková kultura naprodukovala málo biomasy a zaměřila se na akumulaci lipidů. V kokultivačních experimentech bylo naprodukováno vyšší množství biomasy, i když celkové množství vyprodukované biomasy nebylo tak vysoké. Z hlediska složení mastných kyselin je vidět, že všechny kultivace produkovaly poměrně stabilní profil mastných kyselin. Ve všech zkumavkách je vidět, že je zastoupení SFA, MUFA a PUFA poměrně stejné. Největší vyprodukované množství SFA 54,39 % bylo dosaženo v médiu s 400 % P a N, nejvyšší vyprodukované množství MUFA 43,63 % bylo dosaženo v médiu s trojnásobným množstvím P a N. Na produkci PUFA měl pozitivní vliv média s kontrolní kvasinkou s maximem 30,27 %.

Z výsledků HPLC analýzy produkce lipidických látek (Obr. č. 23) vidíme, že v porovnání s kontrolními kultivacemi, dochází u všech kokultivací ke snížené produkci pigmentů, která byla obecně velmi nízká. I v případě kultivace pozorujeme zvýšenou produkci ubichinonu, ve srovnání s ostatními kokultivacemi. Z dat dále vidíme, že zvýšený obsah živin v médiu vede ke zvýšené akumulaci ubichinonu. Nejvyšší produkce ubichinonu v sušině bylo dosaženo na médiích s trojnásobkem P a N (3,492 mg/g). Produkce karotenoidů byla v kokultivacích v rozmezí 2,652-3,628 mg/g suché biomasy. Nejvyšší hodnoty bylo naměřeno u kontrolní kultivace *Anabaena laxa*, a to 8,628 mg/g. Závěrem lze shrnout, že tato kokultivace byla relativně produktivní z hlediska produkce biomasy, která byla vyšší než kontrolní kvasinka a sinice, ale nebyla závratně vysoká. Dále můžeme konstatovat, že tato kokultivační dvojice byla schopná společně koexistovat.

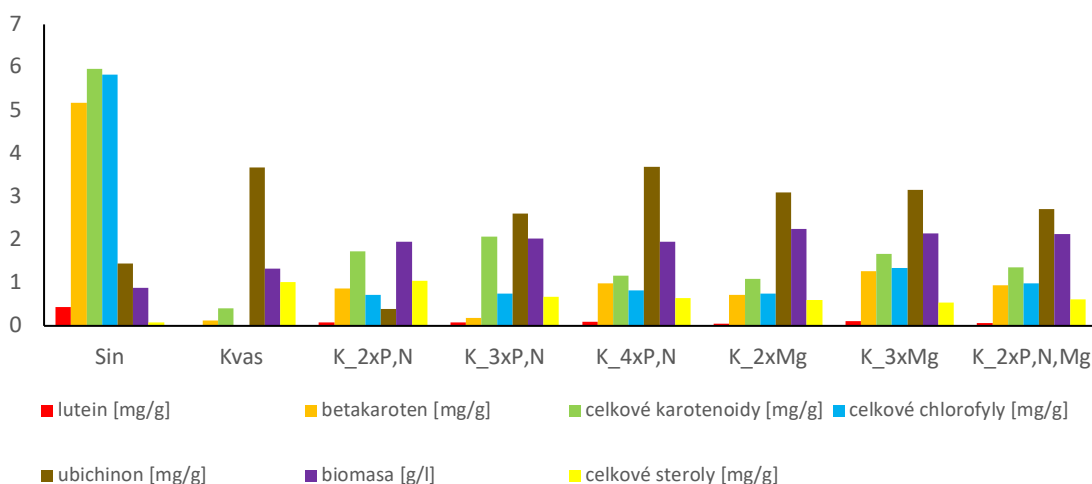
5.1.5 Kokultivace *Sporidiobolus pararoseus* a *Arthrospira maxima*

Tabulka č. 16: Výsledky produkce biomasy kokultivace *S. pararoseus* a *Arthrospira maxima* v multikultivátorové kultivaci s aplikací zvýšeného obsahu makroživin.

Mikroorganismus	Přidané prvky (%)	Množství biomasy (g/l)
Sinice kontrola	-	0,878
Kvasinka kontrola	-	1,328
Kokultivace	200% P + N	1,956
Kokultivace	300% P + N	2,024
Kokultivace	400% P + N	1,950
Kokultivace	200% Mg ²⁺	2,250
Kokultivace	300% Mg ²⁺	2,154
Kokultivace	200% P+N+Mg ²⁺	2,126



Obr. č. 24 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vyprodukované biomase *S. pararoseus* a *Arthrospira maxima* (vlevo) a znázornění množství procentuálního zastoupení lipidů v biomase a celková vyprodukovaná biomasa při kultivaci a kokultivaci *SP* a *AM* (vpravo)



Obr. č. 25 Kokultivace *S. pararoseus* a *Arthrospira maxima* výsledky HPLC

Z výsledků produkce biomasy v kokultivačním experimentu *S. pararoseus* a *A. maxima* vidíme opět pozitiva kokultivace, kdy ve všech kokultivačních experimentech bylo naprodukováno větší množství biomasy ve srovnání s kontrolními kultivacemi. Mezi jednotlivými kultivačními podmínkami nebyly pozorovány výrazné rozdíly v produkci biomasy. Největší produkce biomasy (2,250 g/l) bylo dosaženo v 6. zkumavce s dvojnásobným množstvím Mg^{2+} . Obecně lze konstatovat, že v této kokultivaci zvýšený podíl makroprvků má velmi pozitivní vliv na produkci biomasy.

Z grafů výsledků analýzy složení mastných kyselin a obsahu lipidů (Obr. č. 24) vidíme nízkou produkci lipidů v kokultivačních experimentech, která se pohybuje v rozmezí (9-11 % lipidů). Celková produkce je vyšší v porovnání s kontrolní kvasinkovou kultivací, která dosáhla produkce 7,09 % lipidů v biomase. Produkce biomasy byla i v tomto experimentu mírně vyšší v porovnání s kontrolními kultivacemi. Z hlediska složení mastných kyselin je vidět, že jsou v kokultivacích zastoupeny primárně mononenasyčené mastné kyseliny (MUFA) a nasycené mastné kyseliny (SFA). Ve většině kokultivací bylo naprodukováno větší množství MUFA ve srovnání s kontrolními kultivacemi. Na produkci MUFA měl pozitivní vliv primárně navýšený obsah P a N iontů s maximem 56,06 % v médiu s 200 % P a N iontů. Produkce polynenasycených mastných kyselin byla v kokultivacích snížena v porovnání s MUFA a SFA, ale ve všech kokultivacích bylo naprodukováno průměrně okolo 9% obsahu PUFA.

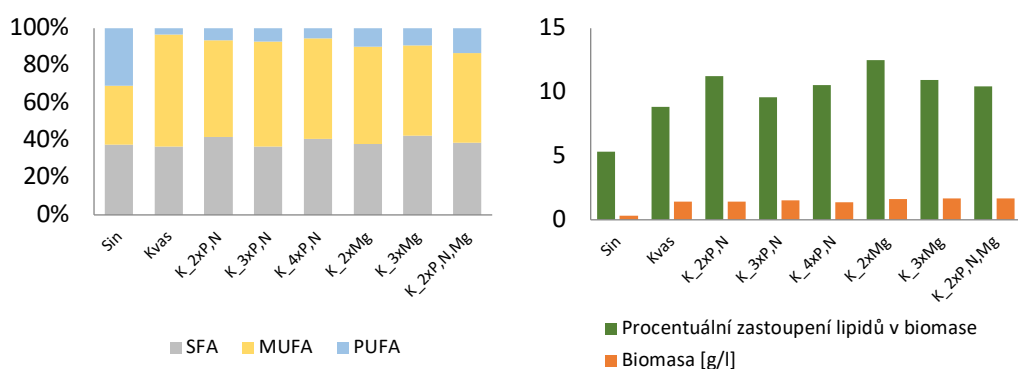
Z výsledků HPLC analýzy produkce lipidických látek (Obr. č. 25) vidíme, že v porovnání s kontrolními kultivacemi, dochází u všech kokultivací ke snížené produkci pigmentů. Zvýšený obsah živin v médiu vede ke zvýšené akumulaci ubichinonu. Nejvyšší produkce ubichinonu v sušině bylo dosaženo na médiích s čtyřnásobkem P a N (3,696 mg/g) a na médiu s nejvyšším obsahem Mg^{2+} (3,160 mg/g). Produkce karotenoidů v kokultivacích nepřekročila hodnotu 2,5 mg/g suché biomasy. Nejvyšší hodnoty bylo naměřeno u kontrolní kultivace *Arthrospira maximo*, a to 5,971 mg/g. Závěrem lze shrnout, že tato kokultivace byla produktivní z hlediska produkce biomasy a zvýšeného zastoupení lipidů v biomase. Dále můžeme konstatovat, že tato kokultivační dvojice byla schopná společně koexistovat a v rámci tohoto experimentu je nutné dále optimalizovat tyto podmínky.

5.1.6 Kokultivace *Sporidiobolus metaroseus* a *Arthrospira maxima*

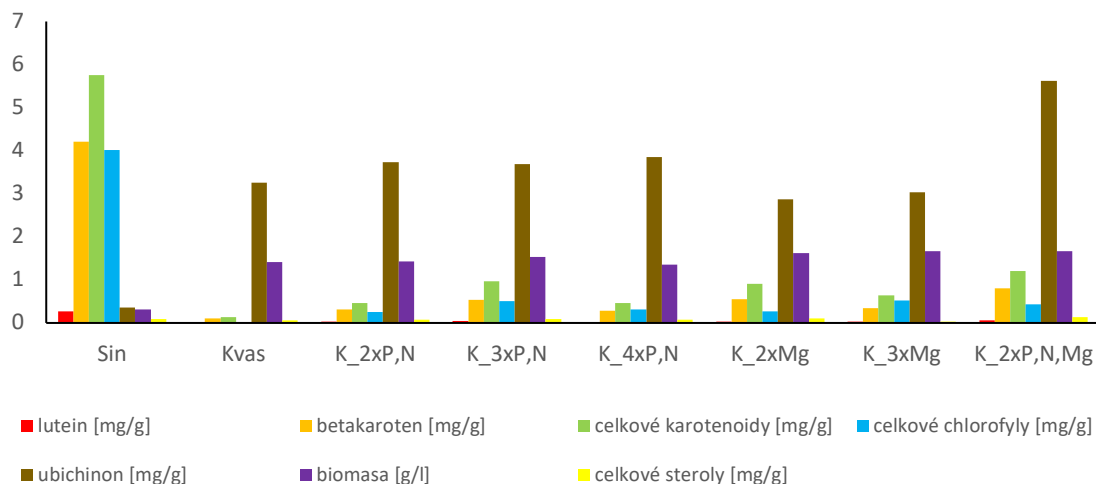
Tabulka č. 17: Výsledky produkce biomasy kokultivace *S. metaroseus* a *Arthrospira maxima* v multikultivátorové kultivaci s aplikací zvýšeného obsahu makroživin.

Mikroorganismus	Přidané prvky (%)	Množství biomasy (g/l)
Sinice kontrola	-	0,311
Kvasinka kontrola	-	1,415
Kokultivace	200% P + N	1,429
Kokultivace	300% P + N	1,534
Kokultivace	400% P + N	1,349
Kokultivace	200% Mg ²⁺	1,625
Kokultivace	300% Mg ²⁺	1,666
Kokultivace	200% P+N+ Mg ²⁺	1,669

Z výsledků produkce biomasy v kokultivačním experimentu *S. metaroseus* a *A. maxima* pozorujeme trend, kdy ve všech kokultivačních experimentech bylo naprodukováno větší množství biomasy ve srovnání s kontrolními kultivacemi. Z hlediska produkce biomasy v kokultivacích vidíme poměrně stabilní trend v produkci s malými odchylkami. Největší produkce biomasy (1,669 g/l) bylo dosaženo v 8. zkumavce s dvojnásobným množstvím P, N a Mg²⁺. Druhá nejvyšší naměřená produkce (1,666 g/l) byla dosažena v 7. zkumavce s trojnásobným množstvím Mg²⁺. U kontrolní kvasinky a kokultivačních experimentů se množství vyprodukované biomasy výrazně neliší, změna je u kontrolní sinice.



Obr. č. 26 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vyprodukované biomase *S. metaroseus* a *Arthrospira maxima* (vlevo) a znázornění množství procentuálního zastoupení lipidů v biomase a celková vyprodukovaná biomasa při kultivaci a kokultivaci SM a AM (vpravo)



Obr. č. 27 Kokultivace *S. metaroseus* a *Arthrospira maxima* výsledky HPLC

Z grafů výsledků analýzy složení mastných kyselin a obsahu lipidů (Obr. č. 26) vidíme poměrně stabilní produkci lipidů v kokultivačních experimentech, která se pohybuje v rozmezí (9,5-12,5 % lipidů). Celková produkce je mírně zvýšená v porovnání s kontrolní kvasinkovou kultivací, která dosáhla produkce 8,9 % lipidů v biomase. Z hlediska složení mastných kyselin jsou v kokultivacích zastoupeny primárně mononenasyčené mastné kyseliny (MUFA) a nasycené mastné kyseliny (SFA). Ve většině kokultivací bylo naprodukováno větší množství MUFA ve srovnání s kontrolní kultivací sinice. Nejvyšší hodnota MUFA s maximem 59,86 % byla dosažena u kontrolní kvasinky, v kokultivačních experimentech na produkci MUFA měl pozitivní vliv primárně navýšený obsah P a N iontů s maximem 56,06 % v médiu s 300 % P a N iontů. Produkce polynenasycených mastných kyselin byla v kokultivacích snížena v porovnání s MUFA a SFA, ale ve všech kokultivacích bylo naprodukováno průměrně okolo 10 % obsahu. Pozitivnější vliv na produkci PUFA je pozorován v kokultivačních experimentech obohacených o hořčičnaté ioty.

Z výsledků HPLC analýzy produkce lipidických látek (Obr. č. 25) vidíme, že kontrolní kvasinka a kokultivační experimenty mají dost podobné složení produkovaných pigmentů. Kromě kontrolní sinice došlo opět k výrazné zvýšené produkci ubichinonu. Nejvyšší produkce ubichinonu v sušině bylo dosaženo na médiích s dvojnásobkem P, N a Mg (5,625 mg/g). Produkce karotenoidů v kokultivacích nepřekročila hodnotu 1,3 mg/g suché biomasy. Nejvyšší hodnoty karotenoidů bylo naměřeno u kontrolní kultivace *Arthrospira maxima*, a to 5,758 mg/g. Závěrem lze shrnout, že tato kultivace nebyla produktivní z hlediska vyprodukované biomasy.

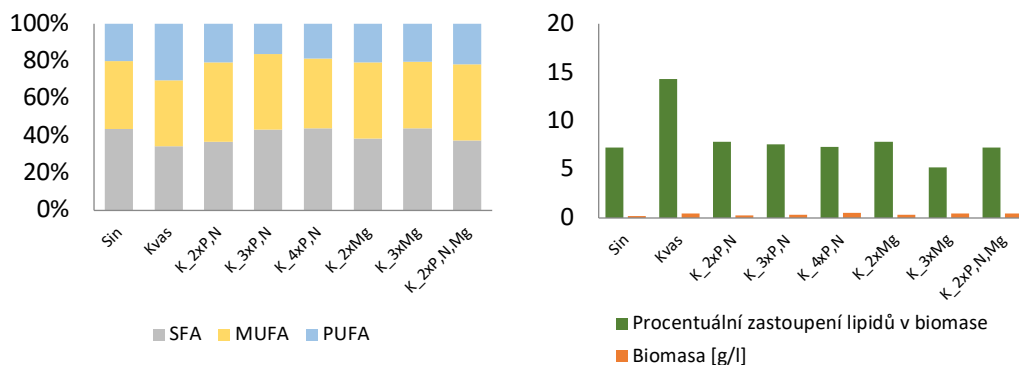
Zajímavé bylo procentuální zastoupení lipidů v biomase. Lze obecně říci, že kvasince se dařilo mnohem lépe a přežila na úkor sinice, jejíž růst byl inhibován, a je nutné provést další opakování a optimalizace. Nelze jednoznačně vyloučit, že tato kokultivační dvojice by nebyla schopná společně koexistovat, jelikož mohlo dojít během experimentu ke kontaminaci, nebo kultura sinice byla oslabená. Z výsledků HPLC analýzy je zřejmé, že v kokultivačních zkumavkách je pozorováno určité množství celkových chlorofylů, které pocházely od sinice, tudíž nějaké minimální množství sinice se udrželo i v těchto zkumavkách.

5.1.7 Kokultivace *Rhodosporidium toruloides* a *Anabaena torulosa*

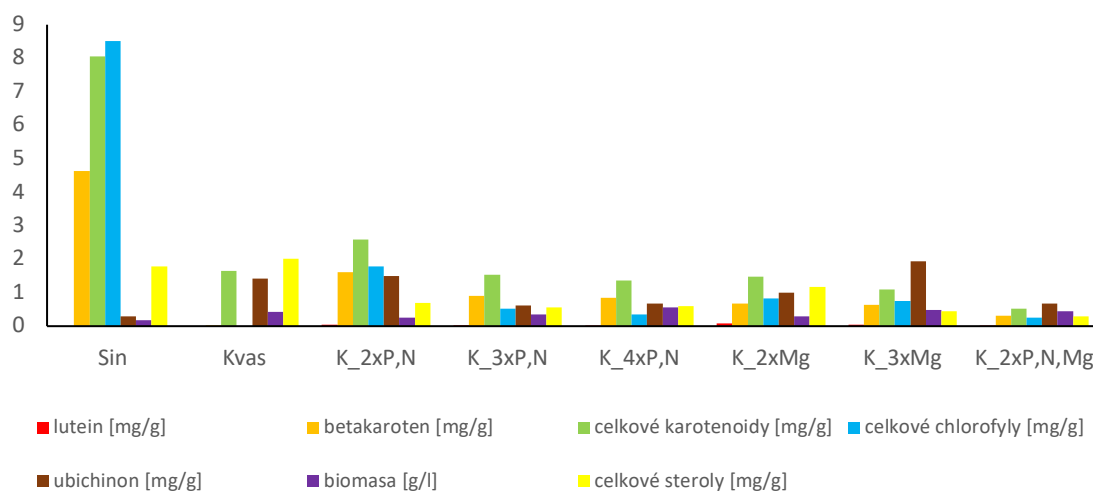
Tabulka č. 18: Výsledky produkce biomasy kokultivace *R. toruloides* a *Anabaena torulosa* v multikultivátorové kultivaci s aplikací zvýšeného obsahu makroživin.

Mikroorganismus	Přidané prvky (%)	Množství biomasy (g/l)
Sinice kontrola	-	0,170
Kvasinka kontrola	-	0,183
Kokultivace	200% P + N	0,263
Kokultivace	300% P + N	0,350
Kokultivace	400% P + N	0,553
Kokultivace	200% Mg ²⁺	0,300
Kokultivace	300% Mg ²⁺	0,481
Kokultivace	200% P+N+ Mg ²⁺	0,453

Výsledky produkce biomasy v kokultivačním experimentu *S. toruloides* a *A. torulosa* ukazují, že ve všech kokultivačních experimentech bylo naprodukováno větší množství biomasy ve srovnání s kontrolními kultivacemi. Z hlediska produkce biomasy bylo v celém experimentu naprodukováno obecně velmi malé množství biomasy. Největší produkce biomasy (0,553 g/l) bylo dosaženo v 5. zkumavce s čtyřnásobným množstvím P a N. Druhá nejvyšší naměřená produkce (0,481 g/l) byla dosažena v 7. zkumavce s trojnásobným množstvím Mg²⁺. Obecně lze konstatovat, že v této kokultivaci zvýšený podíl makroprvků P, N a Mg²⁺ má pozitivní vliv na produkci biomasy.



Obr. č. 28 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vyprodukované biomase *R. toruloides* a *Anabaena torulosa* (vlevo) a znázornění množství procentuálního zastoupení lipidů v biomase a celková vyprodukovaná biomasa při kultivaci a kokultivaci *RT* a *AT* (vpravo)



Obr. č. 29 Kokultivace *R. toruloides* a *Anabaena torulosa* výsledky HPLC

Z grafů výsledků analýzy složení mastných kyselin a obsahu lipidů (Obr. č. 28) vidíme poměrně stabilní produkci lipidů v kokultivačních experimentech, která se pohybuje okolo hodnoty 7 % lipidů. Celková produkce je nižší v porovnání s kontrolní kvasinkovou kultivací, která dosáhla produkce 14,33 % lipidů v biomase. Kultura kontrolní sinice v tomto kokultivačním experimentu byla spíše inhibovaná, a její produkce je velmi nízká. Kontrolní kultivace sinice *Anabaena torulosa* produkovala úlný profil mastných kyselin. V kokultivacích jsou zastoupeny přibližně shodné profily mastných kyselin, včetně kontrolní kvasinky. Tedy z grafu, kde je znázorněno složení mastných kyselin je zřejmé, že všechny kultury se chovaly obdobně. Nejvyšší hodota MUFA s maximem 42,51 % byla dosažena v médiu s dvojnásobným množstvím P a N, tedy zkumavka 3.

Produkce polynenasycených mastných kyselin byla v kokultivacích snížena v porovnání s MUFA a SFA, ale ve všech kokultivacích bylo naprodukováno průměrně okolo 20 % obsahu PUFA. Pozitivnější vliv na produkci PUFA je pozorován v kokultivačních experimentech, které jsou obohacené o hořčičnaté ioty.

Z výsledků HPLC analýzy produkce lipidických látek (Obr. č. 29) vidíme, že kontrolní kvasinka a kokultivační experimenty mají velmi podobné složení pigmentů. Kromě kontrolní sinice došlo k výrazné zvýšené produkci ubichinonu. Nejvyšší produkce ubichinonu v sušině bylo dosaženo na médiích s trojnásobkem Mg (1,934 mg/g). Produkce karotenoidů v kokultivacích nepřekročila hodnotu 2,5 mg/g suché biomasy. Nejvyšší hodnoty karotenoidů bylo naměřeno u kontrolní kultivace *Anabaeny torulosa*, a to 8,059 mg/g. Závěrem lze shrnout, že tato kultivace nebyla produktivní z hlediska vyprodukované biomasy. Zajímavé bylo procentuální zastoupení lipidů v biomase. Lze obecně říci, že kvasince se dařilo mnohem lépe a přežila na úkor sinice, které se tolik nedařilo. Tudíž je potřeba provést další optimalizace podmínek. Nelze jednoznačně vyloučit, že tato kokultivační dvojice by nebyla schopná společně koexistovat. Z výsledků HPLC analýzy je zřejmé, že v kokultivačních zkumavkách je pozorováno určité množství celkových chlorofylů, které produkovala sinice, tudíž nějaké minimální množství sinice se udrželo i v těchto zkumavkách.

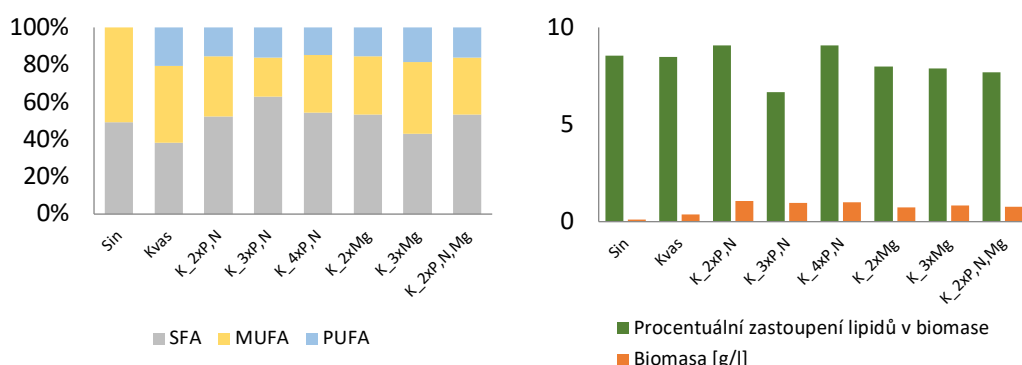
5.1.8 Kokultivace *Sporidiobolus pararoseus* a *Anabaena torulosa*

Tabulka č. 19: Výsledky produkce biomasy kokultivace *S. pararoseus* a *Anabaena torulosa* v multikultivátorové kultivaci s aplikací zvýšeného obsahu makroživin.

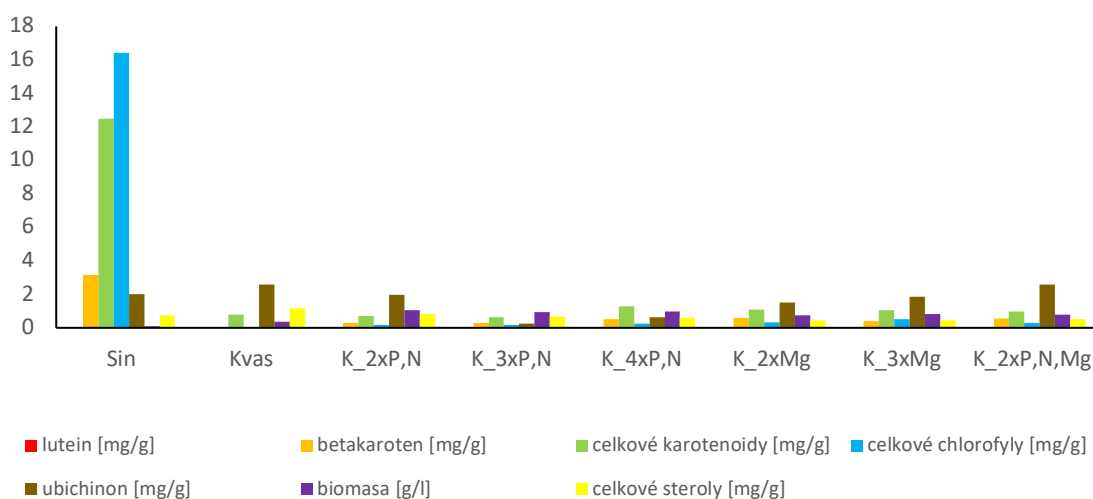
Mikroorganismus	Přidané prvky (%)	Množství biomasy (g/l)
Sinice kontrola	-	0,094
Kvasinka kontrola	-	0,376
Kokultivace	200% P + N	1,054
Kokultivace	300% P + N	0,950
Kokultivace	400% P + N	0,985
Kokultivace	200% Mg ²⁺	0,740
Kokultivace	300% Mg ²⁺	0,819
Kokultivace	200% P+N+ Mg ²⁺	0,770

Z výsledků produkce biomasy v kokultivačním experimentu *S. pararoseus* a *A. torulosa* pozorujeme vyšší nárůst množství biomasy oproti kontrolním kultivacím. I když rozdíly nejsou výrazné. Největší produkce biomasy (1,054 g/l) bylo dosaženo ve 3. zkumavce s dvojnásobným

množstvím P a N. Druhá nejvyšší naměřená produkce (0,985 g/l) byla dosažena v 5. zkumavce s čtyřnásobným množstvím P a N. Obecně lze konstatovat, že v této kokultivaci zvýšený podíl makroprvků P, N má pozitivní vliv na produkci biomasy.



Obr. č. 30 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vyprodukované biomase *S. pararoseus* a *Anabaena torulosa* (vlevo) a znázornění množství procentuálního zastoupení lipidů v biomase a celková vyprodukovaná biomasa při kultivaci a kokultivaci *SP* a *AT* (vpravo)



Obr. č. 31 Kokultivace *S. pararoseus* a *Anabaena torulosa* výsledky HPLC

Z grafů výsledků analýzy složení mastných kyselin a obsahu lipidů (Obr. č. 28) vidíme poměrně stabilní produkci lipidů ve všech experimentech, jak kokultivačních také i v kontrolních. Je vidět menší skok u kokultivace, kde bylo přidáno trojnásobné množství P a N iontů, kde byla i nejvyšší vyprodukovaná biomasa. Ve zbylých zkumavkách je vidět vyšší procentuální zastoupení lipidů v biomase. Nejvyššího zastoupení lipidů v biomase bylo dosaženo ve zkumavkách 3 a 5, kde bylo 9,07 % lipidů, v těchto zkumavkách bylo dvojnásobné a čtyřnásobné množství P a N.

Samotné kultuře sinice se v tomto kokultivačním experimentu z hlediska produkce biomasy nedařilo, ale v zastoupení lipidů v biomase pozorujeme srovnatelný výsledek s ostatními zkumavkami. Opět je z grafů zřejmé, že kokultivační experimenty se chovaly podobně jako kontrolní kvasinková kultura. Což naznačuje že majoritu produkované biomasy tvořily hlavně kvasinkové buňky. Kvasinková kontrola a kokultivační experimenty produkovaly stabilní profil mastných kyselin. Tedy z grafu, kde je znázorněno složení mastných kyselin je zřejmé, že všechny zkumavky se chovaly obdobně, až na výjimku kontrolní sinice, kde nebyly naměřeny žádné PUFA. Nejvyšší hodota MUFA s maximem 53,37 % byla dosažena v médiu s kontrolní sinicí. Produkce polynenasycených mastných kyselin byla v kokultivacích a kontrolní kvasince snížena v porovnání s MUFA a SFA, ale ve všech kokultivacích a kontrolní kvasince bylo naprodukováno průměrně okolo 18 % PUFA.

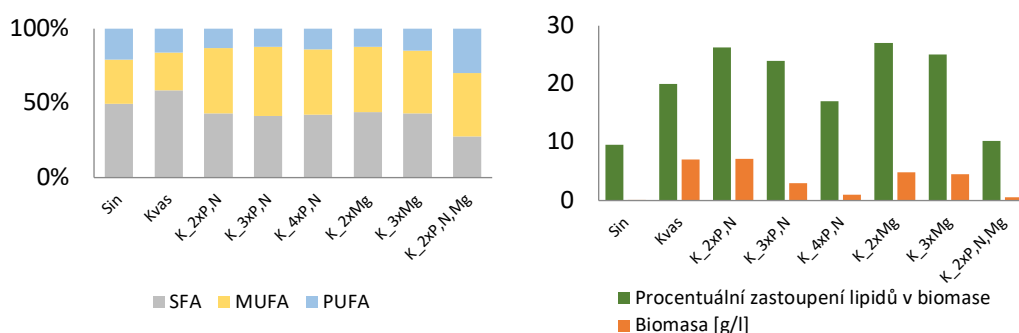
Z výsledků HPLC analýzy produkce lipidických látek (Obr. č. 29) vidíme, že kontrolní kvasinka a kokultivační experimenty mají opět podobný profil pigmentů. Produkce ubichinonu je ve všech zkumavkách přibližně stejná až na výjimku kokultivačního experimentu s trojnásobným množstvím P a N. Nejvyšší produkce ubichinonu v sušině bylo dosaženo na médiu s kontrolní kvasinkou (2,590 mg/g). Produkce karotenoidů v kokultivacích nepřekročila hodnotu 1,5 mg/g suché biomasy. Nejvyšší hodnoty karotenoidů bylo naměřeno u kontrolní kultivace *Anabaena torulosa*, a to 12,502 mg/g. Závěrem lze shrnout, že tato kultivace nebyla produktivní z hlediska vyprodukované biomasy. Zajímavé bylo procentuální zastoupení lipidů v biomase. Lze obecně říci, že kvasince se dařilo mnohem lépe a dost možná přežila na úkor sinice, které se tolik nedařilo. Tudiž je potřeba provést další optimalizace podmínek. Nelze jednoznačně vyloučit, že tato kokultivační dvojice by nebyla schopná společně koexistovat, jelikož mohlo dojít během experimentu ke kontaminaci, nebo sinice nemusela být dostatečně namnožená, a tedy mohla být zastíněna kvasinkou. Z výsledků HPLC analýzy je zřejmé, že v kokultivačních zkumavkách je pozorováno určité množství celkových chlorofylů, které pocházely od sinice, tudíž nějaké minimální množství sinice se udrželo i v těchto zkumavkách.

5.1.9 Kokultivace *Rhodotorula kratochvilovae* a *Anabaena torulosa*

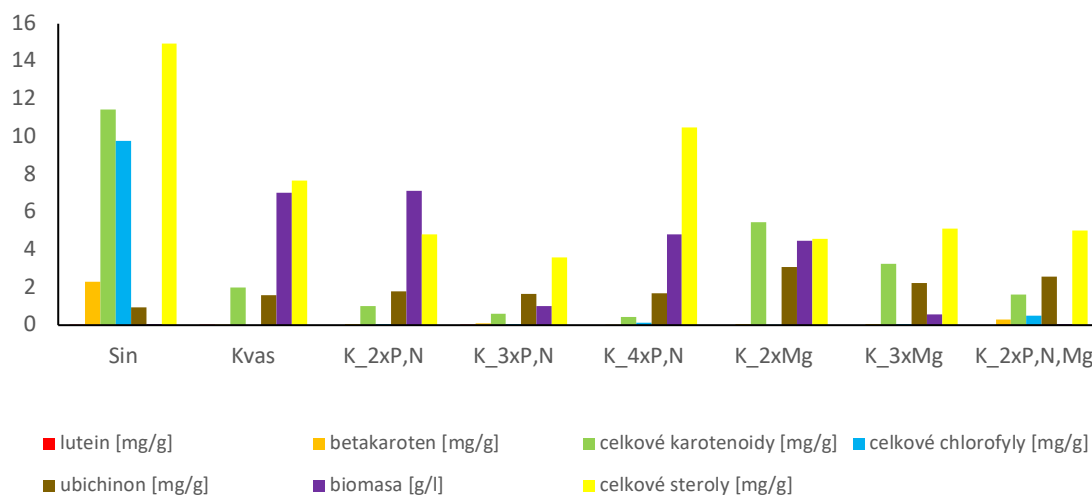
Tabulka č. 20: Výsledky produkce biomasy kokultivace *R. kratochvilovae* a *Anabaena torulosa* v multikultivátorové kultivaci s aplikací zvýšeného obsahu makroživin.

Mikroorganismus	Přidané prvky (%)	Množství biomasy (g/l)
Sinice kontrola	-	0,055
Kvasinka kontrola	-	7,013
Kokultivace	200% P + N	7,125
Kokultivace	300% P + N	3,013
Kokultivace	400% P + N	1,000
Kokultivace	200% Mg ²⁺	4,825
Kokultivace	300% Mg ²⁺	4,465
Kokultivace	200% P+N+ Mg ²⁺	0,566

Z výsledků produkce biomasy v kokultivačním experimentu *R. kratochvilovae* a *A. torulosa* je vidět, že kontrolní kultivace kvasinky vyprodukovala o dost větší množství (7,013 g/l) biomasy. Kokultivačním experimentům se nejvíce dařilo při 200 % P a N, kdy biomasa byla největší (7,125 g/l). Zajímavostí je, že přidáním dalších živin v médiu s 300 % a 400 % P a N je vidět značný pokles v množství biomasy. V kokultivačním experimentu, kde bylo přidáno dvojnásobné množství hořečnatých iontů je pozorován nárůst biomasy (4,825 g/l), ale v případě trojnásobného množství hořečnatých iontů je znát mírný pokles v množství biomasy. V případě kokultivační zkumavky 8, kde bylo přidáno 200 % P, N a Mg²⁺, je vidět značný pokles množství biomasy (0,566 g/l). Lze tedy říci, že pozitivní vliv na produkci biomasy měl především přidavem 200 % P a N a 200 % Mg.



Obr. č. 32 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vyprodukované biomase *R. kratochvilovae* a *Anabaena torulosa* (vlevo) a znázornění množství procentuálního zastoupení lipidů v biomase a celková vyprodukovaná biomasa při kultivaci a kokultivaci RK a AT (vpravo)



Obr. č. 33 Kokultivace *R. kratochvilovae* a *Anabaena torulosa* výsledky HPLC

Z grafů výsledků analýzy složení mastných kyselin a obsahu lipidů (Obr. č. 32) vidíme, že produkce lipidů v kokultivačních experimentech není vůbec stabilní, jsou pozorovány skoky v procentuálním zastoupení lipidů v biomase mezi jednotlivými zkumavkami. Není pozorována žádná podobnost. Celková produkce je vyšší v porovnání s kontrolní sinicovou kultivací, která dosáhla nejnižších produkci 9,54 % lipidů v biomase. V kokultivačních experimentech bylo také více preferována akumulace lipidů, i když množství biomasy u většiny kokultivačních experimentů byla větší. Z hlediska složení mastných kyselin je vidět, že všechny zkumavky produkovaly kompletní profil mastných kyselin. V kokultivacích byly zastoupeny primárně nasycené mastné kyseliny (SFA) a mononenasycené mastné kyseliny (MUFA). Vě většině kokultivací bylo naprodukováno větší množství MUFA ve srovnání s kontrolními kultivacemi. Na produkci MUFA měl pozitivní vliv primárně navýšený obsah hořečnatých iontů s maximem 46,40 % v médiu s 300 % P a N iontů. Na produkci PUFA měl pozitivní vliv primárně navýšený obsah P, N a Mg iontů s maximem 29,71 % v médiu s 200 % P, N a Mg.

Z výsledků HPLC analýzy produkce lipidických látek (Obr. č. 33) vidíme, že v porovnání s kontrolními kultivacemi, dochází u všech kokultivací ke snížené produkci pigmentů, která byla obecně velmi nízká. Produkce karotenoidů byla v kokultivacích, kde bylo přidáno 200, 300 a 400 % P a N nízká a nepřekročila 0,5 mg/g suché biomasy, ale v kokultivacích s přidavkem hořečnatých iontů byla vyšší. Nejvyšší hodnoty bylo naměřeno u kontrolní kultivace *Anabaeny torulosa*, a to 11,446 mg/g.

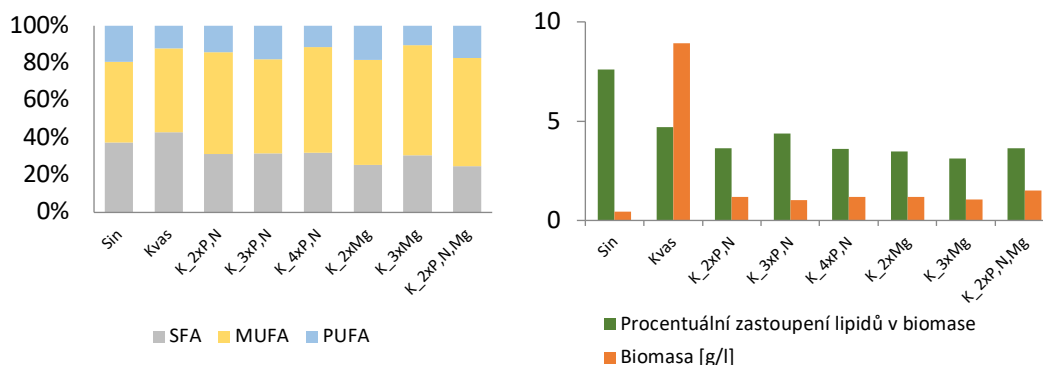
Zvýšený obsah živin v médiu vede ke zvýšené akumulaci ubichinonu. Nejvyšší produkce ubichinonu v sušině bylo dosaženo na médiích s dvojnásobkem Mg (3,103 mg/g) a na médiu s dvojnásobným obsahem P, N a Mg. Závěrem lze shrnout, že tato kokultivace byla produktivní z hlediska biomasy v případě přidaného dvojnásobného množství P a N, a poté také z hlediska přidaných hořčnatých iontů, ve zbylých případech kokultivační podmínky nebyly vhodné. Produkce sledovaných metabolitů byla nízká a z tohoto hlediska je nutná další optimalizace. Dále můžeme konstatovat, že tato kokultivační dvojice byla schopná společně koexistovat.

5.1.10 Kokultivace *Rhodospiridium toruloides* a *Anabaena torulosa*

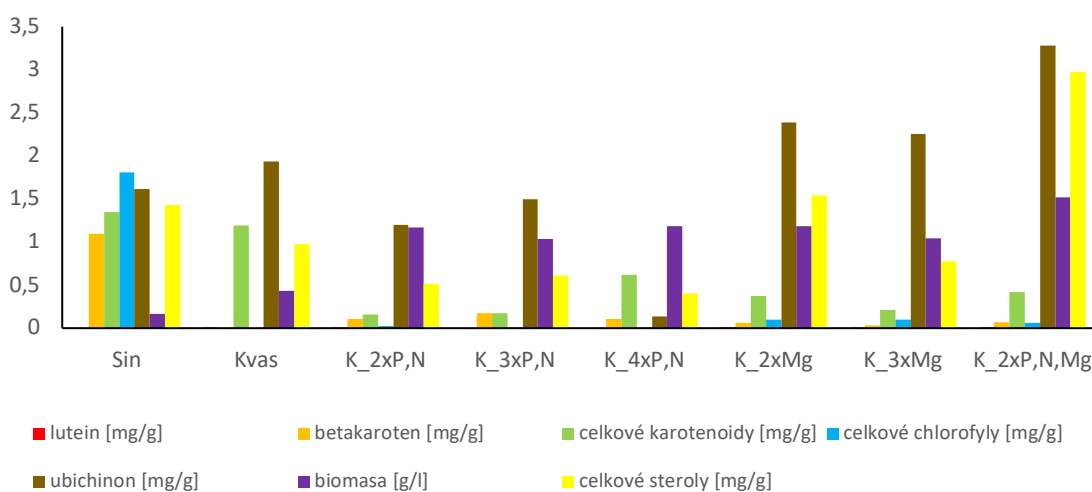
Tabulka č. 21: Výsledky produkce biomasy kokultivace *R. toruloides* a *Anabaena torulosa* v multikultivátorové kultivaci s aplikací zvýšeného obsahu makroživin.

Mikroorganismus	Přidané prvky (%)	Množství biomasy (g/l)
Sinice kontrola	-	0,168
Kvasinka kontrola	-	0,431
Kokultivace	200% P + N	1,170
Kokultivace	300% P + N	1,039
Kokultivace	400% P + N	1,184
Kokultivace	200% Mg ²⁺	1,183
Kokultivace	300% Mg ²⁺	1,043
Kokultivace	200% P+N+ Mg ²⁺	1,520

Z výsledků produkce biomasy v kokultivačním experimentu *R. toruloides* a *A. torulosa* vidíme, že ve všech kokultivačních experimentech bylo naprodukováno více biomasy ve srovnání s kontrolními kultivacemi. Z hlediska produkce biomasy v kokultivacích vidíme poměrně stabilní trend v produkci s malými odchylkami. Největší produkce biomasy (1,520 g/l) bylo dosaženo v 8. zkumavce s dvojnásobným množstvím P, N a Mg. Druhá nejvyšší naměřená produkce (1,184 g/l) byla dosažena v 5. zkumavce se čtyřnásobným množstvím P a N. Ve zkumavce 5 a 6 je rozdíl v řádech tisíce vyprodukované biomasy, lze tedy říci, že čtyřnásobný přírůstek P a N měl stejný vliv, jako přírůstek dvojnásobného množství hořčnatých iontů. Obecně lze konstatovat, že v této kokultivaci zvýšený podíl makroprvků P, N a Mg má velmi pozitivní vliv na produkci biomasy.



Obr. č. 34 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vyprodukované biomase *R. toruloides* a *Anabaena torulosa* (vlevo) a znázornění množství procentuálního zastoupení lipidů v biomase a celková vyprodukovaná biomasa při kultivaci a kokultivaci RT a AT (vpravo)



Obr. č. 35 Kokultivace *R. toruloides* a *Anabaena torulosa* výsledky HPLC

Z grafů výsledků analýzy složení mastných kyselin a obsahu lipidů (Obr. č. 34) vidíme poměrně stabilní produkci lipidů v kokultivačních experimentech, která se pohybuje v rozmezí (3,5-4,4 % lipidů). Celková produkce je nižší v porovnání s kontrolními kultivacemi, kdy sinice dosáhla nejvyšších produkcí 7,60 % lipidů v biomase. Tento výsledek koresponduje s produkcí biomasy, kdy kontrolní sinicová kultura naprodukovala málo biomasy a zaměřila se na akumulaci lipidů. Na druhou stranu v kokultivačních experimentech byla preferována i produkce biomasy, která byla ztelně vyšší než u kontrolní sinice. Z hlediska složení mastných kyselin vidíme, že v kokultivacích jsou zastoupeny primárně nasycené mastné kyseliny (SFA) a mononenasycené mastné kyseliny (MUFA). Vě většině kokultivací bylo naprodukováno větší množství MUFA ve srovnání s kontrolními kultivacemi.

Na produkci MUFA měl pozitivní vliv primárně navýšený obsah hořčnatých iontů s maximem 58,72 % v médiu s 300 % Mg iontů. Produkce polynenasycených mastných kyselin byla v kokultivacích prakticky nižší ve všech kokultivacích, kdy bylo nejvíce naprodukováno 18,40 % obsahu, a to v kokultivačním médiu obohaceném o 200 % hořčnatých iontů.

Z výsledků HPLC analýzy produkce lipidických látek (Obr. č. 35) vidíme, že v porovnání s kontrolními kultivacemi, dochází u všech kokultivací ke snížené produkci pigmentů. Na druhou stranu došlo k výrazně zvýšené produkci ubichinonu, Zvýšený obsah živin v médiu vede ke zvýšené akumulaci ubichinonu. Nejvyšší produkce ubichinonu v sušině bylo dosaženo na médiích s dvojnásobkem Mg, P a N (3,28 mg/g) a na médiu s dvojnásobným obsahem Mg. Produkce karotenoidů byla v kokultivacích nízká a nepřekročila 0,7 mg/g suché biomasy. Nejvyšší hodnoty bylo naměřeno u kontrolní kultivace *Anabaena torulosa*, a to 1,35 mg/g. Závěrem lze shrnout, že tato kokultivace byla produktivní z hlediska produkce biomasy. Produkce sledovaných metabolitů byla nízká a z tohoto hlediska je nutná další optimalizace. Dále můžeme konstatovat, že tato kokultivační dvojice byla schopná společně koexistovat.

5.2 Experimenty kokultivací s odpadními oleji

V rámci experimentů kokultivací na odpadních olejích (fritovací olej a kávový olej) byly kombinovány různé druhy karotenogenních kvasinek se sinicí *Anabaena torulosa* (viz Obr. č. 36). V každém experimentu bylo zachováno složení média. A jako zdroj uhlíku bylo místo glycerolu využito odpadní fritovací a kávový olej (Tabulka č. 8). Hlavním cílem těchto experimentů bylo zjistit, zda kokultivační experimenty jsou výhodnější pro zpracování těchto odpadních olejů v porovnání se samotnými karotenogenními kvasinkami. Dalším cílem bylo prostudovat dále, zda jsou kultury v kokultivaci, zejména sinice, schopny na olejovém substrátu přežít.

Tabulka č. 22: Rozložení experimentu, označení vzorku

Kontrolní kvasinka – kávový olej	Kvas_káv
Kontrolní kvasinka – fritovací olej	Kvas_frit
Kontrolní sinice	Sin
Kokultivace – kávový olej	K_káv
Kokultivace – fritovací olej	K_frit



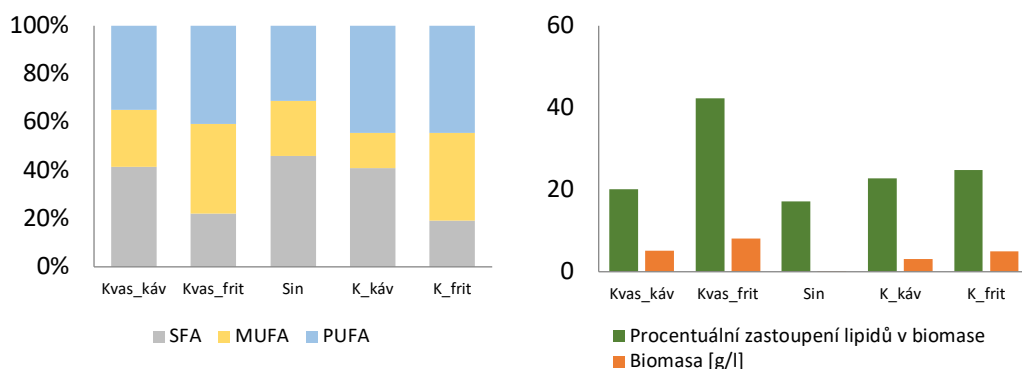
Obr. č. 36 *Anabaena torulosa* v BBM minerálním médiu, kontrolní kultura

5.2.1 *Rhodotorula kratochvilovae* a *Anabaena torulosa*

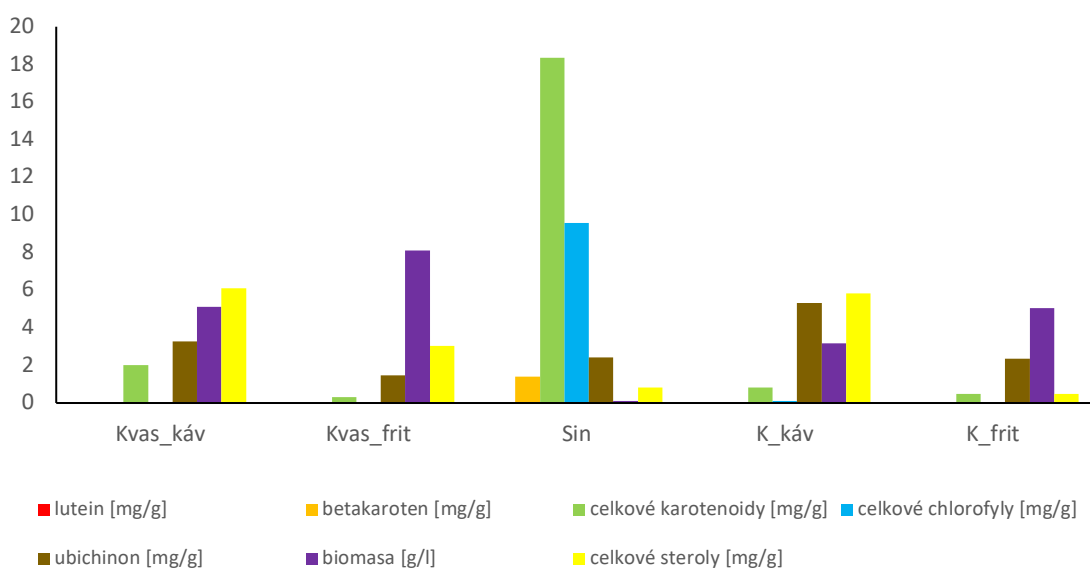
Tabulka č. 23: Experimenty na odpadních olejích získaná biomasa

Mikroorganismus	Olej	Množství biomasy (g·l ⁻¹)
<i>R. kratochvilovae</i>	Kávový	5,118
<i>R. kratochvilovae</i>	Fritovací	8,106
<i>A. torulosa</i>	Kontrola	0,102
Koku	Kávový	3,156
Koku	Fritovací	5,042

Z výsledků získané biomasy můžeme pozorovat vyšší vyprodukovanou biomasu u samotné kvasinky *R. kratochvilovae* na odpadních olejích. Z tabulky je jasné, že nejlépe se dařilo kvasince na fritovacím oleji, kde dosáhla 8, 106 g/l suché biomasy. V porovnání s kokultivací na fritovacím oleji, kde byla hmnotnost 5,042 g/l, je větší množství u zmíněné samotné kvasinky v médiu s fritovacím olejem. Kávový olej se v tomto experimentu prokázala jako horší uhlíkatý substrát. Obecně lze konstatovat, že použití fritovacího oleje má velmi pozitivní vliv na produkci biomasy, jak v kultivaci, také i v kokultivaci.



Obr. č. 37 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vyprodukované biomase *R. kratochvilovae* a *Anabaena torulosa* (vlevo) a znázornění množství procentuálního zastoupení lipidů v biomase a celková vyprodukovaná biomasa při kultivaci a kokultivaci RK a AT (vpravo) na odpadních olejích



Obr. č. 38 Kokultivace a kultivace na odpadních olejích *R. kratochvilovae* a *Anabaena torulosa* výsledky HPLC

Z grafů výsledků analýzy složení mastných kyselin a obsahu lipidů (Obr. č. 37) vidíme, že kultivace na kávovém oleji a kokultivace na fritovacím oleji se v množství zastoupení lipidů v biomase nijak výrazně nelišila. V kokultivaci bylo naprodukováno menší množství biomasy, i celkový obsah lipidů. Kultivace na fritovacím oleji byla významná z hlediska biomasy a také velice zajímavá i v procentuálním zastoupení lipidů v biomase. Bylo dosaženo maxima 42,36 % lipidů v biomase u kvasinky na fritovacím oleji. U kontrolní sinice bylo dosaženo velmi nízkého nárůstu biomasy, který byl částečně kompenzován produkcí lipidů, která dosáhla 17,18 %.

Profil mastných kyselin u všech vzorků obsahuje všechny skupiny mastných. Mononenasyčené mastné kyseliny dosáhly svého maxima 36,16 % v kokultivačním experimentu v médiu s fritovacím olejem, zde bylo dosaženo i maxima u polynenasycených mastných kyselin 44,56 %. SFA dosáhla svého maxima 46,13 % u kontrolní sinice.

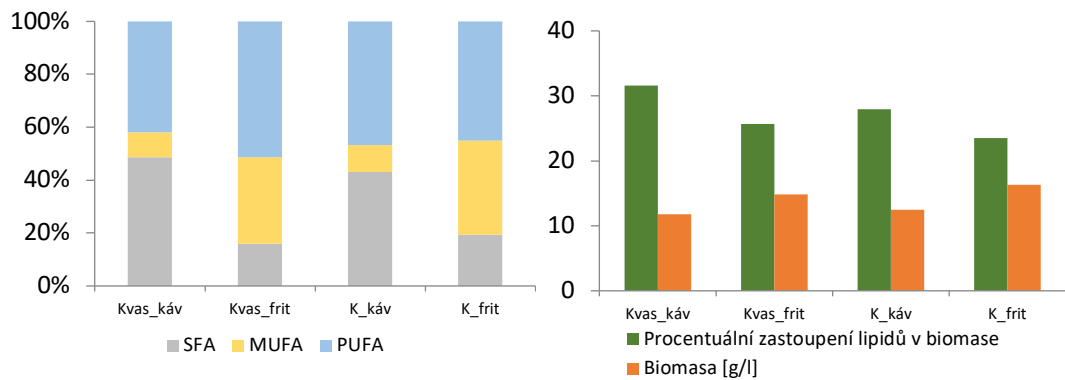
Z výsledků HPLC analýzy produkce lipidických látek (Obr. č. 38) vidíme jistou podobnost mezi kvasinkovouu kultivací na kávovém oleji a kokultivací na kávovém oleji. V produkci těhcot látek dominuje kontrolní kultivace sinice. V obou případech je přítomno malé množství betakarotenu, celkové karotenoidy jsou o něco vyšší u kvasinkové kultivace, ubichinon je vyšší u kokultivace. Celkové steroly se také nějak výrazně neliší. U kokultivace je malé množství celkových chlorofylů, tudíž i sinice částečně přežila v této kokultivaci na kávovém oleji. Srovnání výsledků kultivace a kokultivace na fritovacím oleji je v podstatě obdobné jako v případě kávového oleje. Na závěr lze říci, že kokultivace nebyla primárně výhodná pro produkci biomasy. Z hlediska produkce sledovaných metabolitů je určitě potřebná optimalizace. Dále můžeme konstatovat, že tato kokultivační dvojice byla schopná společně koexistovat i na odpadních olejích.

5.2.2 *Rhodotorula mucilaginosa* CCY 19-4-6 a *Anabaena torulosa*

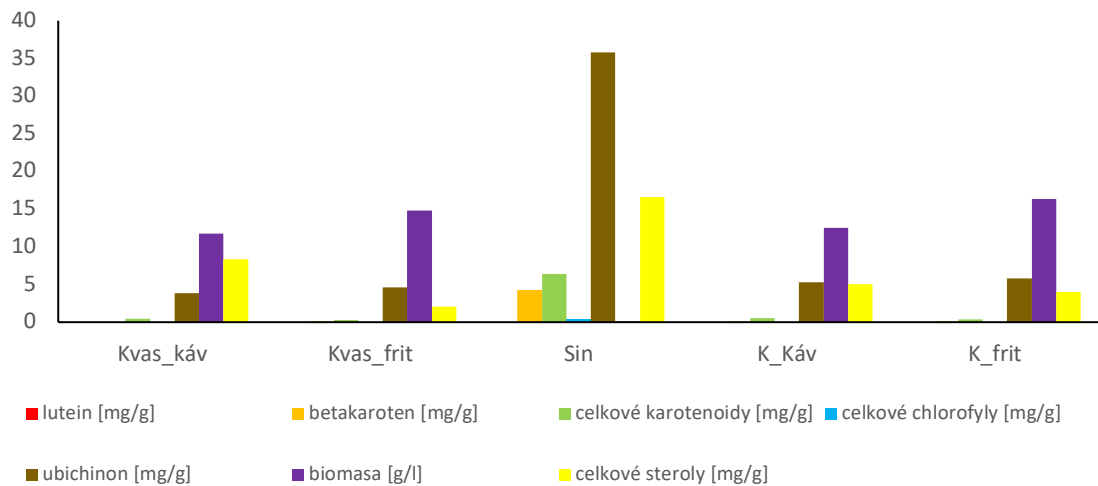
Tabulka č. 24: Experimenty na odpadních olejích získaná biomasa

Mikroorganismus	Olej	Množství biomasy (g·l ⁻¹)
<i>R. mucilaginosa</i>	Kávový	11,760
<i>R. mucilaginosa</i>	Fritovací	14,800
<i>A. torulosa</i>	Kontrola	0,0080
Koku	Kávový	12,516
Koku	Fritovací	16,328

Z výsledků získané biomasy můžeme pozorovat vyšší vyprodukovanou biomasu u kokultivací *A. torulosa* a kvasinky *R. kratochvilovae* na odpadních olejích. Z tabulky je jasné, že nejlépe se dařilo kokultivaci na fritovacím oleji, kde dosáhla 16,328 g/l biomasy. Samotná kvasinka na fritavím oleji poté naprodukovala pouze 14,800 g/l biomasy. Obecně lze konstatovat, že použití fritovací a kávového oleje má velmi pozitivní vliv na produkci biomasy, jak v kultivaci, také i v kokultivaci.



Obr. č. 39 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vyprodukované biomase *R. mucilaginosa* a *Anabaena torulosa* (vlevo) a znázornění množství procentuálního zastoupení lipidů v biomase a celková vyprodukovaná biomasa při kultivaci a kokultivaci *RM* a *AT* (vpravo) na odpadních olejích



Obr. č. 40 Kokultivace a kultivace na odpadních olejích *R. mucilaginosa* a *Anabaena torulosa* výsledky HPLC

Z grafů výsledků analýzy složení mastných kyselin a obsahu lipidů (Obr. č. 39) vidíme, že kultivace na kávovém oleji a kokultivace na kávovém oleji se v množství zastoupení lipidů v biomase nějak výrazně nelišila. V kokultivaci bylo naprodukováno sice větší množství biomasy, ale bylo na druhou stranu akumulováno méně lipidů. Kokultivace na fritovacím oleji, byla významná z hlediska biomasy a také velice zajímavá v procentuálním zastoupení lipidů v suché biomase. Kultivace na fritovacím oleji dosáhla 25,65 % zastoupení lipidů v biomase, což je o něco vyšší než u kokultivace. Maxima 31,54 % zastoupení lipidů v biomase bylo dosaženo u kvasinkové kultivace na kávovém oleji. Z hlediska složení mastných kyselin je vidět, že u všech vzorků byly produkovány všechny skupiny mastných kyselin.

Mononenasyčené mastné kyseliny dosáhly svého maxima 35,66 % v kokultivaci v médiu s fritovacím olejem. Maxima u polynenasycených mastných kyselin 51,35 % bylo dosaženo u kvasinkové kultivace na fritovacím oleji. SFA dosáhla svého maxima 48,61 % u kvasinkové kultivace na kávovém oleji. Z výsledků je viditelný přímý vliv fritovacího oleje, která ve všech kultivacích navyšoval obsah MUFA.

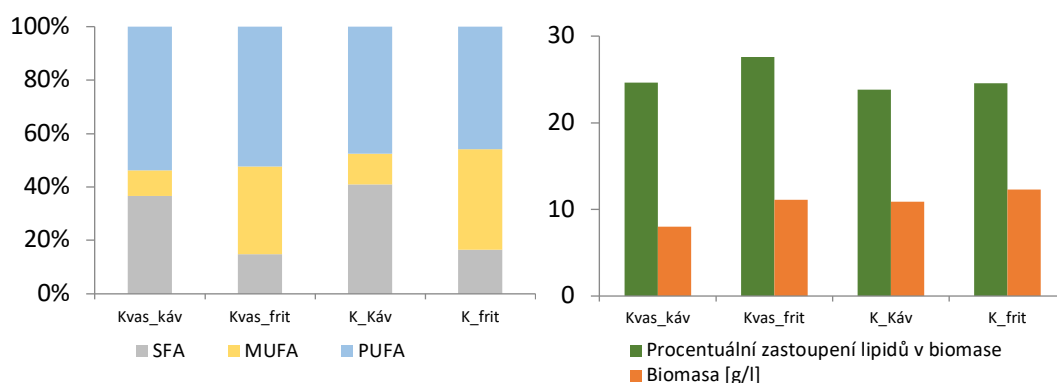
Z výsledků HPLC analýzy produkce lipidických látek (Obr. č. 40) pozorujeme jistou podobnost mezi kvasinkovou kultivací na kávovém oleji a kokultivací na kávovém oleji. V případě kokultivace na kávovém oleji je přítmno malé množství betakarotenu. U kultivace i kokultivace na kávovém oleji produkováno malé množství. Produkce ubichinonu byla výraznější u kokultivace na kávovém oleji. Celkové steroly jsou více zastupeny u kultivace na kávovém oleji než u kokultivace. Ve vzorcích kokultivací nebyly naměřeny žádné chlorofyly, a lze tka předpokládat, že sinice v této kultivaci pravděpodobně uhynula. Výsledky kultivací s využitím fritovacího oleje poté poskytují prakticky shodné výsledky. V těchto médiích bylo dosaženo nejvyšších produkcí lipidických metabolitů (ubichinon 5,804 mg/g). Na závěr lze říci, že kokultivace byla výhodná zejména na produkci biomasy a lipidů. Produkce pigmentů a dalších lipidických látek byla velmi nízká. Z hlediska produkce sledovaných metabolitů je nutná další optimalizace. Dále můžeme konstatovat, že tato kokultivační dvojice byla schopná společně koexistovat i na odpadních olejích.

5.2.3 *Rhodotorula mucilaginosa* CCY 20-9-7 a *Anabaena torulosa*

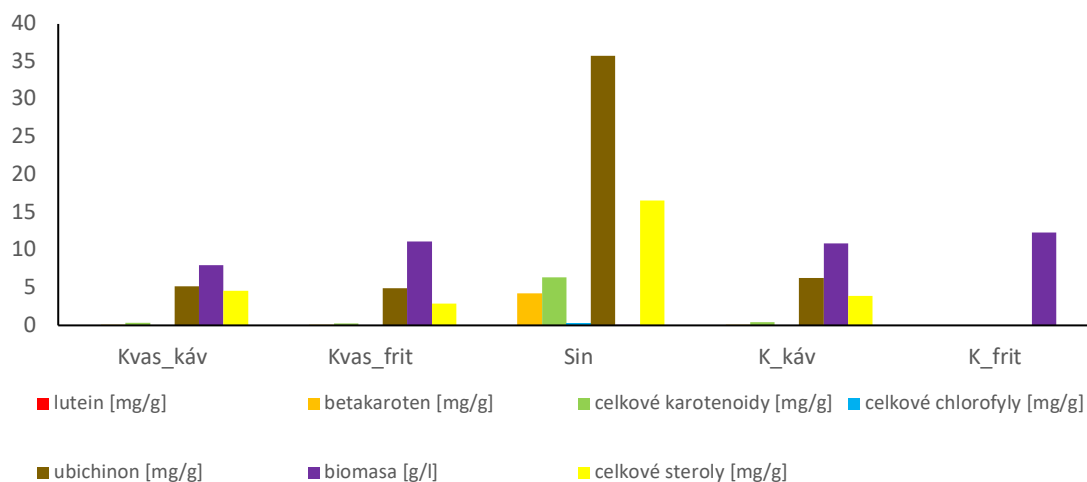
Tabulka č. 25: Experimenty na odpadních olejích získaná biomasa

Mikroorganismus	Olej	Množství biomasy (g·l ⁻¹)
<i>R. mucilaginosa</i>	Kávový	8,0000
<i>R. mucilaginosa</i>	Fritovací	11,132
<i>A. torulosa</i>	Kontrolní	0,0080
Koku	Kávový	10,916
Koku	Fritovací	12,310

Z výsledků získané biomasy můžeme pozorovat vyšší vyprodukovanou biomasu u kokultivací *A. torulosa* a kvasinky *R. kratochvilovae* na odpadních olejích. Z tabulky je jasné, že nejlépe se dařilo mikroorganismům v kokultivaci na fritovacím oleji, kde dosáhla 12,310 g/l biomasy. V porovnání s kultivací na fritovacím oleji, kde kvasinka sama naprodukovala pouze 11,132 g/l, V případě kávového oleje byl pozorován stejný trend, ale s nižšími produkcemi.



Obr. č. 41 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vyprodukované biomase *R. mucilaginoso* a *Anabaena torulosa* (vlevo) a znázornění množství procentuálního zastoupení lipidů v biomase a celková vyprodukovaná biomasa při kultivaci a kokultivaci *RM* a *AT* (vpravo) na odpadních olejích



Obr. č. 42 Kokultivace a kultivace na odpadních olejích *R. mucilaginoso* a *Anabaena torulosa* výsledky HPLC

Z grafů výsledků analýzy složení mastných kyselin a obsahu lipidů (Obr. č. 41) vidíme, že kultivace na kávovém oleji a kokultivace na kávovém oleji se v množství zastoupení lipidů v biomase nějak výrazně nelišila. Stejně pravidlo platilo i pro obsah lipidů v médiích s fritovacím olejem. V kokultivacích bylo naprodukováno více biomasy, na druhou stranu však v produkci lipidů zaostávaly kokultivace za kontrolní kvasinkovou kultivací. Kvasinková kultivace na fritovacím oleji dosáhla 27,58 % zastoupení lipidů v biomase, což je o něco vyšší než u kokultivace a tato hodnota 27,58 % je maximální hodnota zastoupení lipidů v biomase v tomto experimentu.

V profilu mastných kyselin vidíme dva základní trendy, přidavek fritovacího oleje vede ke zvýšené akumulaci MUFA, naopak kávový olej indukuje vyšší produkci PUFA. Tento trend je nezávislý na typu kultivace. Mononenasyčené mastné kyseliny dosáhly svého maxima 37,68 % v kokultivačním médiu s fritovacím olejem. Maxima u polynenasycených mastných kyselin 53,89 % bylo dosaženo u kvasinkové kultivace na kávovém oleji. SFA dosáhla svého maxima 40,95 % u kokultivace na kávovém oleji.

Z výsledků HPLC analýzy produkce lipidických látek (Obr. č. 42) vidíme jistou podobnost mezi kvasinkou kultivací na kávovém oleji a kokultivací na kávovém oleji. U obou případů je pozorovatelné malé množství celkových karotenoidů, ubichinonu je mírně větší množství u kokultivace na kávovém oleji (6,323 mg/g). Steroly jsou více zastoupeny u kvasinkové kultivace na kávovém oleji než u kokultivace. U kontrolní sinice je malé množství celkových chlorofylů, kokultivace naobshovaly žádné chlorofyly. Lze tedy předpokládat, že i v této kokultivaci došlo k úhynu kultury sinice. Ve srovnání kultivace a kokultivace na fritovacím oleji je vidět značný rozdíl, kdy kultivace na fritovacím oleji obsahovala ubichinon i celkové steroly, bohužel u kokultivace nebyl pozorován žádný sledovaný metabolit. Pravděpodobně došlo k chybě v extrakčním procesu a bylo by vhodné celý experiment zopakovat. Na závěr lze říci, že kokultivace byla opět výhodnější pro produkci biomasy. Dále můžeme konstatovat, že tato kokultivační dvojice nebyla schopná společně koexistovat na odpadních olejích. Sinice v této kokultivaci nepřežila.

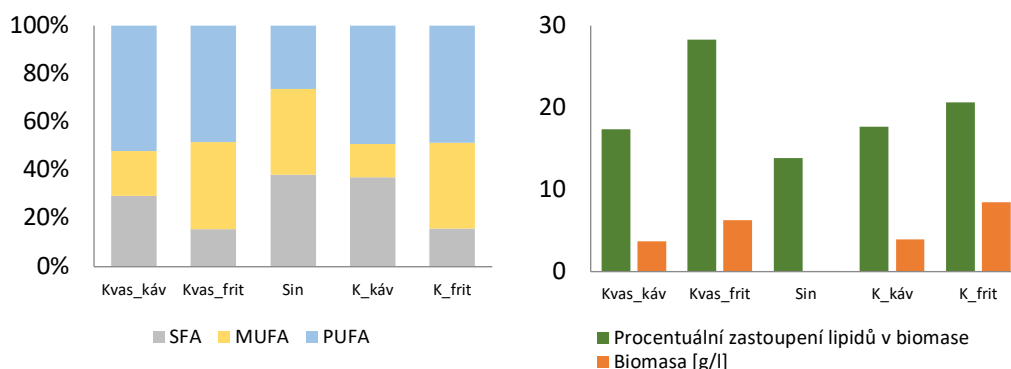
5.2.4 *Sporidiobolus metaroseus* a *Anabaena torulosa*

Tabulka č. 26: Experimenty na odpadních olejích získaná biomasa

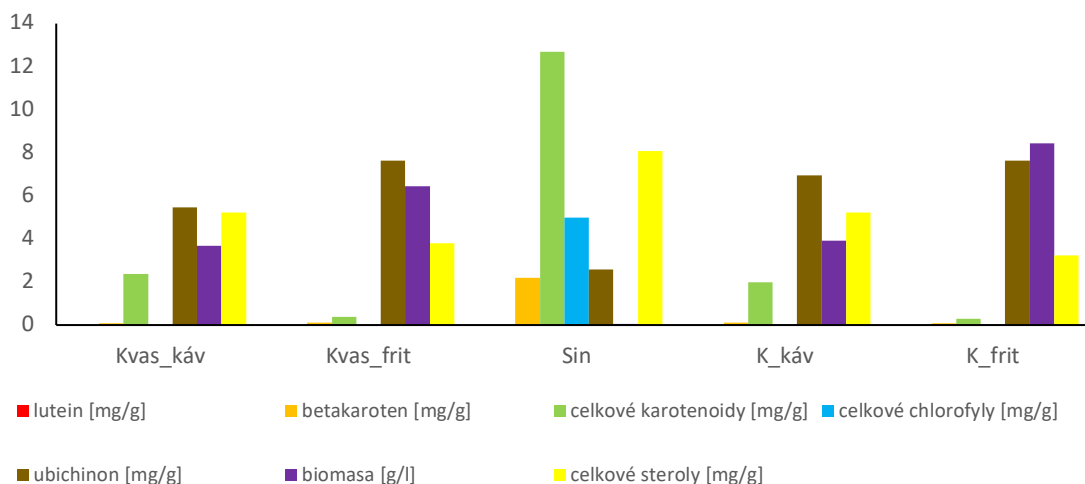
Mikroorganismus	Olej	Množství biomasy (g·l ⁻¹)
<i>S. metaroseus</i>	Kávový	3,690
<i>S. metaroseus</i>	Fritovací	6,245
<i>A. torulosa</i>	Kontrolní	0,040
Koku	Kávový	3,904
Koku	Fritovací	8,448

Z výsledků získané biomasy můžeme pozorovat vyšší vyprodukovanou biomasu u kokultivací *A. torulosa* a kvasinky *S. metaroseus* na odpadních olejích. Z tabulky je jasné, že nejlépe se dařilo kokultivaci na fritovacím oleji, kde dosáhla 8,488 g/l biomasy.

V porovnání kultivací na fritovacím oleji, kde kokultivace vyprodukovala 6,245 g/l biomasy, je produkce v kontrolní kultivaci kvasinky o 20 % menší. V případě kávového oleje byly kopírovaly výsledky produkci na fritovacím oleji. Obecně lze konstatovat, že použití fritovací oleje má velmi pozitivní vliv na produkci biomasy, jak v kultivaci, také i v kokultivaci.



Obr. č. 43 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vyprodukované biomase *S. metaroseus* a *Anabaena torulosa* (vlevo) a znázornění množství procentuálního zastoupení lipidů v biomase a celková vyprodukovaná biomasa při kultivaci a kokultivaci SM a AT (vpravo) na odpadních olejích



Obr. č. 44 Kokultivace a kultivace na odpadních olejích *S. metaroseus* a *Anabaena torulosa* výsledky HPLC

Z grafů výsledků analýzy složení mastných kyselin a obsahu lipidů (Obr. č. 43) vidíme, že kultivace na kávovém oleji a kokultivace na kávovém oleji se v množství zastoupení lipidů v biomase nějak výrazně nelišila. V kokultivaci bylo naprodukováno větší množství biomasy a také větší množství lipidů v porovnání s kultivací na kávovém oleji. Kokultivace na fritovacím oleji, byla významná z hlediska biomasy a také velice zajímavá v procentuálním zastoupení lipidů v biomase. Kokultivace na fritovacím oleji dosáhla 20,68 % zastoupení lipidů v biomase,

což je nižší hodnota než u kvasinkové kultivace na fritovacím oleji, kde hodnota 28,28 % je zároveň maximální hodnota v tomto experimentu. U všech kultivací byl produkován kompletní profil mastných kyselin. Jak již bylo zmíněno v předchozích experimentech, i zde platí vliv fritovacího a kávového oleje na produkci nenasycených mastných kyselin. Mononenasyčené mastné kyseliny dosáhly svého maxima 36,28 % ve kvasinkové kultivaci v médiu s fritovacím olejem. Maxima u polynenasycených mastných kyselin 51,89 % bylo dosaženo u kvasinkové kultivace na kávovém oleji. SFA dosáhla svého maxima 38,27 % u sinicové kontrolní kultivace.

Z výsledků HPLC analýzy produkce lipidických látek (Obr. č. 44) vidíme jistou podobnost mezi kvasinkou kultivací na kávovém oleji a kokultivací na kávovém oleji. U obou případů je naměřeno větší množství celkových karotenoidů. Maxima produkce karotenoidů ale dosáhla kontrolní kultura sinice, a to 12,686 mg/g sušiny. V produkci ubichinonu dominovaly experimenty s fritovacím olejem, kde bylo vyprodukováno více než 7,5 mg/g sušiny. Celkové steroly jsou zastoupeny u kvasinkové kultivace i kokultivace na kávovém oleji a nepřekročily hodnotu 5,2 mg/g celkové sušiny. V případě kokultivačních experimentů bylo identifikováno velmi malé množství chlorofylů, které dokazuje, že kultura sinice byla schopna za daných podmínek částečně přežít. Na závěr lze říci, že kokultivace byla výhodnější na produkci biomasy. Z hlediska produkce sledovaných metabolitů je určitě potřebná optimalizace. Dále můžeme konstatovat, že tato kokultivační dvojice by byla schopná společně koexistovat i na odpadních olejích. Sinice v tomto kokultivačním experimentu přežila.

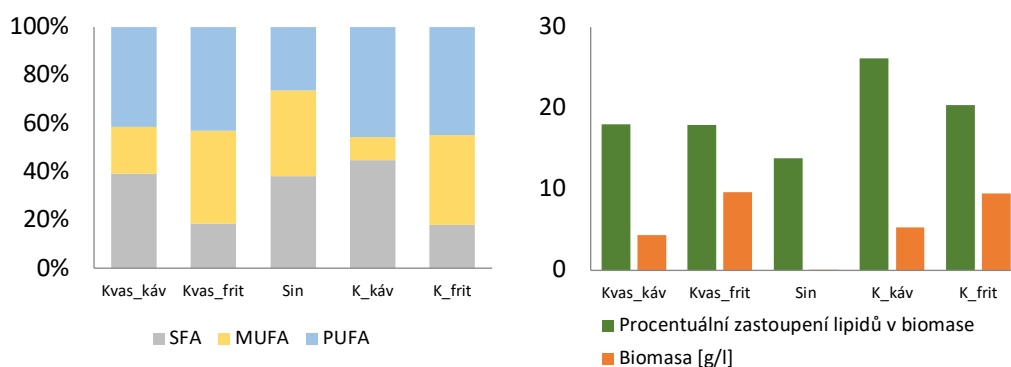
5.2.5 *Rhodosporidium toruloides* a *Anabaena torulosa*

Tabulka č. 27: Experimenty na odpadních olejích získaná biomasa

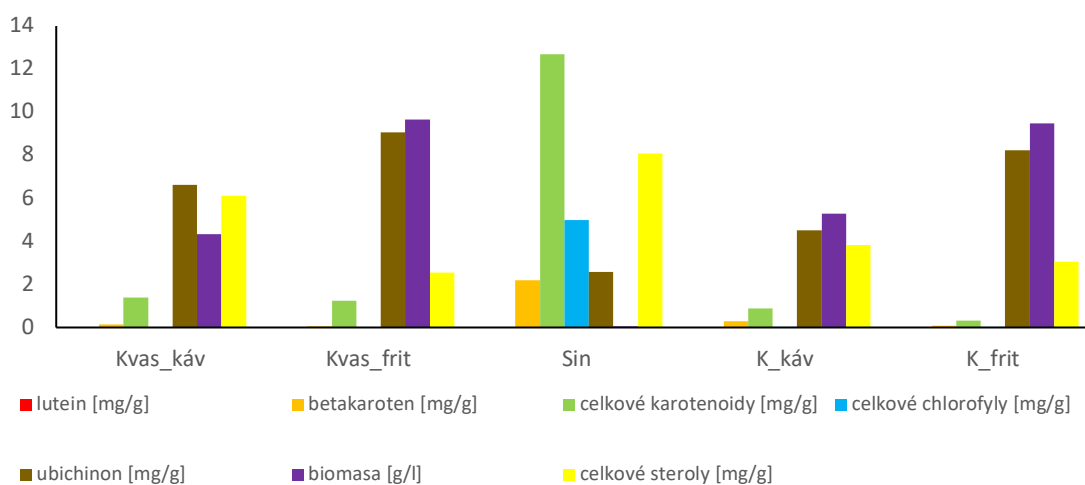
Mikroorganismus	Olej	Množství biomasy (g·l ⁻¹)
<i>R. toruloides</i>	Kávový	4,342
<i>R. toruloides</i>	Fritovací	9,650
<i>A. torulosa</i>	Kontrolní	0,040
Koku	Kávový	5,268
Koku	Fritovací	9,474

Z výsledků získané biomasy můžeme pozorovat nejvyšší vyprodukovanou biomasu u kvasinkové kultivace *R. toruloides* na fritovacím oleji. Z tabulky je zřejmé, že nejlépe se dařilo kvasinkové kultivaci a kokultivaci na fritovacím oleji, kde bylo dosaženo přes 9 g/l suché biomasy.

V porovnání s kvasinkovou kultivací a kokultivací na kávovém oleji, byla hmotnost poloviční ve srovnání s kultivacemi na fritovacím oleji. Na kávovém oleji se lépe dařilo kokultivačnímu experimentu z hlediska výtěžnosti biomasy. Obecně lze konstatovat, že použití fritovací oleje má velmi pozitivní vliv na produkci biomasy těchto dvou mikroorganismů, jak v kultivaci, také i v kokultivaci.



Obr. č. 45 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vyprodukované biomase *R. toruloides* a *Anabaena torulosa* (vlevo) a znázornění množství procentuálního zastoupení lipidů v biomase a celková vyprodukovaná biomasa při kultivaci a kokultivaci RT a AT (vpravo) na odpadních olejích



Obr. č. 46 Kokultivace a kultivace na odpadních olejích *R. toruloides* a *Anabaena torulosa* výsledky HPLC

Z grafů výsledků analýzy složení mastných kyselin a obsahu lipidů (Obr. č. 45) vidíme, že u kokultivace na kávovém oleji bylo dosaženo maxima 26,13 % zastoupení lipidů v biomase, tato hodnota je znatelně vyšší než u samotné kvasinkové kultivace na kávovém oleji.

Kokultivace na fritovacím oleji, byla významná z hlediska biomasy a také velice zajímavá v procentuálním zastoupení lipidů v biomase. Kokultivace na fritovacím oleji dosáhla 20,37 % zastoupení lipidů v biomase, což je srovnatelná hodnota s hodnotou kvasinkové kultivace. Z hlediska složení mastných kyselin je vidět, že u všech vzorků je kompletní profil mastných kyselin. Mononenasyčené mastné kyseliny dosáhly svého maxima 38,65 % v kultivaci kvasinky v médiu s fritovacím olejem. Maxima u polynenasycených mastných kyselin 45,60 % bylo dosaženo u kokultivačního experimentu na kávovém oleji. SFA dosáhla svého maxima 44,72 % u kokultivačního experimentu na kávovém oleji.

Z výsledků HPLC analýzy produkce lipidických látek (Obr. č. 46) vidíme jistou podobnost mezi kvasinkou kultivací na kávovém oleji a kokultivací na kávovém oleji. V obou experimentech dosahuje produkce karotenoidů více než 1,0 mg/g. Primárním lipidickým metabolitem dle analýzy je ubichinon, který dosáhl maxima 9,054 mg/g v kvasinkové kultuře v médiu s fritovacím olejem. Celkové steroly jsou zastoupeny u kultivace i kokultivaci na kávovém oleji, kdy znatelně vyšší množství (6,131 mg/g) je u kvasinkového experimentu. U kontrolní sinice bylo detekováno nejvyšší množství celkových chlorofylů, a to 4,99 mg/g sušiny. V kokultivačních experimentech bylo také detekováno malé množství celkových chlorofylů, a lze tedy předpokládat, že sinice přežila i v kokultivacích. Na závěr lze říci, že kvasinková kultivace na fritovacím oleji byla nejvýhodnější z hlediska produkce biomasy. Následující optimalizací média a kultivačních podmínek by bylo možné dále navýšit produkce. Dále můžeme konstatovat, že tato kokultivační dvojice by byla schopná společně koexistovat i na odpadních olejích. Sinice v tomto kokultivačním experimentu přežila.

6 Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřená na vybrané kmeny karotenogenních kvasinek, sinic a principy jejich vzájemné kokultivace. Provedené testy potvrdily, že vybrané sinice a zástupci karotenogenní kvasinek jsou schopné symbiotického růstu. Některé výsledky poukázaly na významné rozdíly v úrovni symbiotického růstu a celkové produktivitě celého procesu. Mikroorganismy byly vystaveny různým stresovým faktorům. Které spočívaly v biologickém stresu kokultivace, různé úrovně koncentrací makroprvku N, P a Mg. Posledním stresovým faktorem byl přídavek odpadních olejů do kokultivačních médií. Experimentální část byla rozdělena do dvou částí, a to na multikultivátorové kokultivační experimenty a experimenty prováděné na odpadních olejích (kávovém a fritovacím).

V první části experimentu byly karotenogenní kvasinky s vybranými sinicemi kokultivovány na BBM minerálním médiu, nebo na spirulina médiu. Volba kokultivačního média byla založena na tom, jaké minerální médium bylo pro sinici vhodné. Následně byly přidány různé kombinace stresových faktorů, v podobě obohacení o minerální ionty (P, N a Mg^{2+}) v různých množstvích. Toto rozvžení experimentu bylo poté dodrženo u všech kokultivačních experimentů, které byly provedeny v multikultivátoru ve zkumavkách o objemu 80 ml. V rámci této práce s karotenogenními kvasinkami byli využiti zástupci rodů *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* a *Sporidiobolus* a sinicové rody byly využity *Anabaena* a *Arthrospira*. Bylo prokázáno, že studované kmeny karotenogenních kvasinek byly schopné růst, jak na BBM minerálním médiu, tak také na spirulina médiu. Také bylo prokázáno, že veškeré kokultivační experimenty, které byly prováděny, byly schopny kokultivační dvojice přežít a produkovat kombinovanou biomasu a sledované metabolity. Experimenty také ukázaly, že vhodnou volbou mikroorganismů a poměrem dusíku, fosforu a hořčnatých iontů lze dosáhnout zvýšení produkce metabolitů v řádu jednotek procent. Bylo zjištěno, že v kokultivačních experimentech různé koncentrace makroprvků nemají výrazný vliv na produkci a profil mastných kyselin. Dále bylo zjištěno, že při vyčerpání živin se kvasinky začnou chovat jako velmi silý agresor a sinici přítomnou v médiu začnou asimilovat.

V těchto experimentech dosáhly nejlepších výsledků dvojice *Rhodosporidium toruloides* a *Anabaena torulosa*, kdy maximum naprodukované biomasy bylo v případě přidání 200 % P a N, kde výtěžek byl 4,711 g/l. V porovnání s kontrolními kultivacemi (0,135 g/l sinice a 0,846 g/l kvasinka) je tedy nárůst množství biomasy zřetelný. Dalším vhodným kokultivačním partnerem byla dvojice *Rhodosporidium toruloides* a *Arthrospira maxima*, kdy maximum naprodukované biomasy bylo v případě přidání dvojnásobného množství hořčnatých iontů a bylo dosaženo 5,745 g/l. Opět v porovnání s kontrolními kultivacemi (0,209 g/l sinice a 1,596 g/l) je také nárůst biomasy zřetelný. Nárůst, i když ne tak velký byl pozorován ještě u kokultivační dvojice *Sporidiobolus pararoseus* a *Anabaena torulosa*, kdy maximum naprodukované biomasy bylo dosaženo v médiu s 200 % P a N, výtěžek byl 1,054 g/l. Když je to porovnáno s kontrolními kultivacemi (0,094 g/l sinice a 0,376 g/l kvasinky) je zde také pozorován nárůst. Produkce lipidických metabolitů byla v těchto experimentech poměrně nízká a pro její navýšení je nutná další optimalizace kultivačních podmínek.

V druhé části experimentu byly karotenogenní kvasinky a sinice kultivovány na odpadních olejích. V rámci tohoto experimentu byly využity tyto rody karotenogenních kvasinek *Rhodosporidium*, *Sporidiobolus* a *Rhodotorula*, v těchto kokultivacích byla využita jediná sinice, a to *Anabaena torulosa*. Tyto dvojice byly kultivovány na BBM médiu s přidavkem glycerolu jako zdrojem uhlíku a s využitím odpadů z potravinářského průmyslu (fritovací a kávový olej). Tyto materiály sloužily jako levné zdroje uhlíku v médiu. Byla provedena série laboratorních kvasinkových kultivací na olejích a kokultivací na olejích. Kvasinky dosáhly velmi dobrých výsledků v produkci biomasy i produkci metabolitů na této kombinaci substrátů. Pozitivnější vliv měl fritovací olej, kdy výtěžky biomasy byly vždy vyšší. Nejvýhodnější z těchto kvasinkových experimentů bylo dosaženo u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa*, kdy bylo naprodukováno 14,800 g/l biomasy v médiu s přidáním fritovacím olejem. Byly prováděny i kokultivace na odpadních olejích. V části experimentů, na základě dat analýzy přítomných chlorofylů, lze konstatovat, že sinice v těchto experimentech někdy přežila, ale ne vždy se jí úplně dařilo. Svého maxima v naprodukovaném množství biomasy dosáhla v médiu na fritovacím oleji společně s kvasinkou *Rhodotorula mucilaginosa*. Obecně platilo pravidlo, že v případě kokultivací bylo vyprodukováno více biomasy v porovnání s kvasinkovou kultivací na odpadních olejích.

Výsledky experimentů s karotenogenními kvasinkami a sinicemi potvrdily velký potenciál jejich biotechnologického využití. Také bylo potvrzeno, že vhodnou volbou a optimalizací kultivačních podmínek je možné modelovat produkci metabolitů a zvýšit tedy zisky celého procesu. Kokultivace je potenciálně velmi efektivní metoda kultivace kvasinek a sinic, které umožňují produkci kombinované biomas, která může být obohacena o řadu cenných látek, ve srovnání s produktem klasické jednodruhové kultivace.

7 Seznam použité literatury

- [1] SCHILLING, Christophe a Steve WEISS. A Roadmap for Industry to Harness Biotechnology for a More Circular Economy. *New Biotechnology* [online]. 2021, 60, 9-11 [cit. 2022-04-28]. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2020.08.005
- [2] YEN, Hong-Wei, Pin-Wen CHEN a Li-Juan CHEN. The synergistic effects for the co-cultivation of oleaginous yeast- *Rhodotorula glutinis* and microalgae- *Scenedesmus obliquus* on the biomass and total lipids accumulation. *Bioresource Technology* [online]. 2015, 184, 148-152 [cit. 2022-04-28]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2014.09.113
- [3] SZOTKOWSKI, Martin, Jiří HOLUB, Samuel ŠIMANSKÝ, Klára HUBAČOVÁ, Pavlína SIKOROVÁ, Veronika MARINIČOVÁ, Andrea NĚMCOVÁ a Ivana MÁROVÁ. Bioreactor Co-Cultivation of High Lipid and Carotenoid Producing Yeast *Rhodotorula kratochvilovae* and Several Microalgae under Stress. *Microorganisms* [online]. 2021, 9(6) [cit. 2022-04-28]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms906116
- [4] SANTOS, Ana a Giulio PRETA. Lipids in the cell: organisation regulates function. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2018, 75(11), 1909-1927 [cit. 2022-04-28]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-018-2765-4
- [5] BURDGE, Graham a Philip CALDER. Introduction to Fatty Acids and Lipids. *Intravenous Lipid Emulsions* [online]. Basel: S. KARGER, 2014, 1-16 [cit. 2022-04-28]. World Review of Nutrition and Dietetics. ISBN 978-3-318-02752-5. Dostupné z: doi:10.1159/000365423
- [6] MURRAY, Robert K. Harperova Biochemie. Jinočany, 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- [7] VOET, Donald a Judith VOET. Biochemistry. 4th ed. Hoboken: Wiley, 2011. ISBN 978-0470570951.
- [8] SCHNORR, Stephanie a David BERRY. Lipid synthesis at the trophic base as the source for energy management to build complex structures. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2022, 73, 364-373 [cit. 2022-04-28]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2021.09.014

- [9] PARSONS, Sophie, Michael ALLEN a Christopher CHUCK. Coproducts of algae and yeast-derived single cell oils: A critical review of their role in improving biorefinery sustainability. *Bioresource Technology* [online]. 2020, 303 [cit. 2022-04-28]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.122862
- [10] FAKAS, Stylianos. Lipid biosynthesis in yeasts: A comparison of the lipid biosynthetic pathway between the model nonoleaginous yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the model oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Engineering in Life Sciences* [online]. 2017, 17(3), 292-302 [cit. 2022-04-28]. ISSN 1618-0240. Dostupné z: doi:10.1002/elsc.201600040
- [11] NIELSEN, Jens. Systems biology of lipid metabolism: From yeast to human. *FEBS Letters* [online]. 2009, 583(24), 3905-3913 [cit. 2022-04-28]. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2009.10.054
- [12] BERG, Jeremy, John TYMOCZKO, Lubert STRYER a Gregory GATTO. *Biochemistry*. 7th international ed. New York: W. H. Freeman, 2012. ISBN 14-292-7635-5.
- [13] TRAN, N.H., J.R. BARTLETT, G.S.K. KANNANGARA, A.S. MILEV, H. VOLK a M.A. WILSON. Catalytic upgrading of biorefinery oil from micro-algae. *Fuel* [online]. 2010, 89(2), 265-274 [cit. 2022-04-28]. ISSN 00162361. Dostupné z: doi:10.1016/j.fuel.2009.08.015
- [14] KLUG, Lisa a Günther DAUM. Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS Yeast Research* [online]. 2014, 14(3), 369-388 [cit. 2022-04-28]. ISSN 15671356. Dostupné z: doi:10.1111/1567-1364.12141
- [15] ATHENAKI, M., C. GARDELI, P. DIAMANTOPOULOU, S.S. TCHAKOUTEU, D. SARRIS, A. PHILIPPOUSSIS a S. PAPANIKOLAOU. Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2018, 124(2), 336-367 [cit. 2022-04-28]. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/jam.13633
- [16] WANG, Yanan, Sufang ZHANG, Zhiwei ZHU, Hongwei SHEN, Xinping LIN, Xiang JIN, Xiang JIAO a Zongbao ZHAO. Systems analysis of phosphate-limitation-induced lipid accumulation by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnology for Biofuels* [online]. 2018, 11(1) [cit. 2022-04-28]. ISSN 1754-6834. Dostupné z: doi:10.1186/s13068-018-1134-8

- [17] BABA, Masato a Yoshihiro SHIRAIW. Biosynthesis of Lipids and Hydrocarbons in Algae. Photosynthesis [online]. InTech, 2013 [cit. 2022-04-28]. ISBN 978-953-51-1161-0. Dostupné z: doi:10.5772/56413
- [18] VOET, Donald a Judith G. VOET. Biochemie. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0544-9.
- [19] ALCAÍNO, Jennifer, Marcelo BAEZA a Víctor CIFUENTES. Carotenoid Distribution in Nature. Carotenoids in Nature [online]. Cham: Springer International Publishing, 2016, 3-33 [cit. 2022-04-28]. Subcellular Biochemistry. ISBN 978-3-319-39124-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-39126-7_1
- [20] RAPTA, Peter, Martin POLOVKA, Michal ZALIBERA, Emilia BREIEROVA, Ingrid ZITNANOVA, Ivana MAROVA a Milan CERTIK. Scavenging and antioxidant properties of compounds synthesized by carotenogenic yeasts stressed by heavy metals—EPR spin trapping study. Biophysical Chemistry [online]. 2005, 116(1), 1-9 [cit. 2022-04-28]. ISSN 03014622. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpc.2005.01.006
- [21] LIBKIND, Diego, Ruben SOMMARUGA, Horacio ZAGARESE a Maria VAN BROOCK. Mycosporines in carotenogenic yeasts. Systematic and Applied Microbiology [online]. 2005, 28(8), 749-754 [cit. 2022-04-28]. ISSN 07232020. Dostupné z: doi:10.1016/j.syapm.2005.05.005
- [22] VÍLCHEZ, Carlos, Eduardo FORJÁN, María CUARESMA, Francisco BÉDMAR, Inés GARBAYO a José VEGA. Marine Carotenoids: Biological Functions and Commercial Applications. Marine Drugs [online]. 2011, 9(3), 319-333 [cit. 2022-04-28]. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md9030319
- [23] SATHASIVAM, Ramaraj a Jang-Seu KI. A Review of the Biological Activities of Microalgal Carotenoids and Their Potential Use in Healthcare and Cosmetic Industries. Marine Drugs [online]. 2018, 16(1) [cit. 2022-04-28]. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md16010026
- [24] NOVOVESKÁ, Lucie, Michael ROSS, Michele STANLEY, Rémi PRADELLES, Virginie WASIOLEK a Jean-François SASSI. Microalgal Carotenoids: A Review of Production, Current Markets, Regulations, and Future Direction. Marine Drugs [online]. 2019, 17(11) [cit. 2022-04-28]. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md17110640

- [25] MILANI, Alireza, Marzieh BASIRNEJAD, Sepideh SHAHBAZI a Azam BOLHASSANI. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2017, 174(11), 1290-1324 [cit. 2022-04-28]. ISSN 00071188. Dostupné z: doi:10.1111/bph.13625
- [26] YAHIA, Elhadi M., José DE JESÚS ORNELAS-PAZ, Tatiana EMANUELLI, Eduardo JACOB-LOPES, Leila Queiroz ZEPKA a Braulio CERVANTES-PAZ. Chemistry, Stability, and Biological Actions of Carotenoids. *Fruit and Vegetable Phytochemicals* [online]. Chichester, UK, 2017, 2017-10-16, 285-346 [cit. 2022-05-08]. ISBN 9781119158042. Dostupné z: doi:10.1002/9781119158042.ch15
- [27] LE QUESNE, P.W. *Phytochemistry of fruit and vegetables*: Edited by F.A. Tomás-Barbeán and R.J. Robins [online]. New York: Oxford University Press, 1997 [cit. 2022-04-29]. ISBN 0-19-857790-7. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja975568v>
- [28] VIERA, Isabel, Marta HERRERA a María ROCA. In Vitro Bioaccessibility Protocol for Chlorophylls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2021, 69(31), 8777-8786 [cit. 2022-04-28]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.1c02815
- [29] BORAH, Karishma a Jagannath BHUYAN. Magnesium porphyrins with relevance to chlorophylls. *Dalton Transactions* [online]. 2017, 46(20), 6497-6509 [cit. 2022-04-28]. ISSN 1477-9226. Dostupné z: doi:10.1039/C7DT00823F
- [30] Chlorophyll: PubChem Compound Summary for cid 1208502. In: Pubchem: Bethesda (MD) [online]. National library of medicine (US): National center for Biotechnology Information, 2004 [cit. 2022-04-29].
- [31] REINBOTHE, Christiane, Majida BAKKOURI, Frank BUHR, Norifumi MURAKI, Jiro NOMATA, Genji KURISU, Yuichi FUJITA a Steffen REINBOTHE. Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction. *Trends in Plant Science* [online]. 2010, 15(11), 614-624 [cit. 2022-04-28]. ISSN 13601385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2010.07.002
- [32] STENBAEK, Anne a Poul JENSEN. Redox regulation of chlorophyll biosynthesis. *Phytochemistry* [online]. 2010, 71(8-9), 853-859 [cit. 2022-04-28]. ISSN 00319422. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytochem.2010.03.022

- [33] VON WETTSTEIN, D., S. GOUGH a C. G. KANNANGARA. Chlorophyll Biosynthesis. *The Plant Cell* [online]. 1039-1057 [cit. 2022-04-29]. ISSN 1040-4651. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.7.7.1039
- [34] CRUZ, Jeffrey a Thomas AVENSON. Photosynthesis: a multiscopic view. *Journal of Plant Research* [online]. 2021, 134(4), 665-682 [cit. 2022-04-28]. ISSN 0918-9440. Dostupné z: doi:10.1007/s10265-021-01321-4
- [35] GERHARD, Michal a Dietmar SCHOMBURG. *Biochemical pathways: an atlas of biochemistry and molecular biology*. 2. Hoboken: Wiley, 2012. ISBN 978-0-470-14684-2.
- [36] BLANKENSHIP, Robert E. *Molecular mechanisms of photosynthesis*. 2nd ed. Chichester: Wiley Blackwell, 2014. ISBN 978-1-4051-8976-7.
- [37] DUPONT, Sebastien, Guillaume LEMETAIS, Thierry FERREIRA, Philippe CAYOT, Patrick GERVAIS a Laurent BENEY. ERGOSTEROL BIOSYNTHESIS: A FUNGAL PATHWAY FOR LIFE ON LAND?. *Evolution* [online]. 2012, 66(9), 2961-2968 [cit. 2022-04-28]. ISSN 00143820. Dostupné z: doi:10.1111/j.1558-5646.2012.01667.x
- [38] BELT, Simon, Thomas BROWN, Lukas SMIK, Philipp ASSMY a C.J. MUNDY. Sterol identification in floating Arctic sea ice algal aggregates and the Antarctic sea ice diatom *Berkeleya adeliensis*. *Organic Geochemistry* [online]. 2018, 118, 1-3 [cit. 2022-04-28]. ISSN 01466380. Dostupné z: doi:10.1016/j.orggeochem.2018.01.008
- [39] VOLKMAN, J. Sterols in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2003, 60(5), 495-506 [cit. 2022-04-28]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-002-1172-8
- [40] Ergosterol: PubChem Compound Summary for cid 444679. In: Pubchem [online]. National library of medicine (US): National center for Biotechnology Information, 2004 [cit. 2022-04-29].
- [41] ROBERTS, C.W., R. MCLEOD, D.W. RICE, M. GINGER, M.L. CHANCE a L.J. GOAD. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology* [online]. 2003, 126(2), 129-142 [cit. 2022-04-28]. ISSN 01666851. Dostupné z: doi:10.1016/S0166-6851(02)00280-3

- [42] WANG, Ying a Siegfried HEKIMI. Understanding Ubiquinone. *Trends in Cell Biology* [online]. 2016, 26(5), 367-378 [cit. 2022-04-28]. ISSN 09628924. Dostupné z: doi:10.1016/j.tcb.2015.12.007
- [43] MEGANATHAN, R. Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2001, 203(2), 131-139 [cit. 2022-04-28]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10831.x
- [44] AUSSEL, Laurent, Fabien PIERREL, Laurent LOISEAU, Murielle LOMBARD, Marc FONTECAVE a Frédéric BARRAS. Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 2014, 1837(7), 1004-1011 [cit. 2022-04-28]. ISSN 00052728. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbabi.2014.01.015
- [45] BENTINGER, Magnus, Michael TEKLE a Gustav DALLNER. Coenzyme Q – Biosynthesis and functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2010, 396(1), 74-79 [cit. 2022-04-28]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.147
- [46] MEGANATHAN, R., Ohsuk KWON a Thomas BEGLEY. Biosynthesis of Menaquinone (Vitamin K₂) and Ubiquinone (Coenzyme Q). *EcoSal Plus* [online]. 2009, 3(2) [cit. 2022-04-28]. ISSN 2324-6200. Dostupné z: doi:10.1128/ecosalplus.3.6.3.3
- [47] KAGAN, Valerian a Peter QUINN. *Coenzyme Q: molecular Mechanisms in Health and Disease*. Boca Raton: CRC Press, 2001. ISBN 9780849387326.
- [48] WALKER, Graeme M. *Yeast physiology and biotechnology*. Chichester: Wiley, 1998. ISBN 04-719-6446-8.
- [49] SATYANARAYANA, T. a G. KUNZE. *Yeast biotechnology: diversity and applications*. New York: Springer, 2009. ISBN 978-1-4020-8292-4.
- [50] *Molecular mechanisms in yeast carbon metabolism*. New York: Springer, 2014. ISBN 978-3-642-55012-6.
- [51] SAMPAIO, José Paulo. *The Yeasts* [online]. Elsevier, 2011, 1423-1432 [cit. 2022-04-28]. ISBN 9780444521491. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-52149-1.00111-7
- [52] KURTZMAN, C., W. FELL a T. BOEKHOUT. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 5. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 2011. ISBN 9780080931272.

- [53] OBERWINKLER, Franz, Robert BANDONI, Paul BLANZ a Ljuba KISIMOVA-HOROVITZ. *Cystofilobasidium*: a New Genus in the Filobasidiaceae. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 1983, 4(1), 114-122 [cit. 2022-04-28]. ISSN 07232020. Dostupné z: doi:10.1016/S0723-2020(83)80039-3
- [54] HERZ, Stephanie, Roland WEBER, Heidrun ANKE, Adele MUCCI a Paolo DAVOLI. Intermediates in the oxidative pathway from torulene to torularhodin in the red yeasts *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *C. capitatum* (Heterobasidiomycetes, Fungi). *Phytochemistry* [online]. 2007, 68(20), 2503-2511 [cit. 2022-04-28]. ISSN 00319422. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytochem.2007.05.019
- [55] SAMPAIO, J, M GADANHO a R BAUER. Taxonomic studies on the genus *Cystofilobasidium*: description of *Cystofilobasidium ferigula* sp. nov. and clarification of the status of *Cystofilobasidium lari-marini*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2001, 51(1), 221-229 [cit. 2022-04-28]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-51-1-221
- [56] MUSSAGY, Cassamo, Ana GUIMARÃES, Lara ROCHA, James WINTERBURN, Valéria SANTOS-EBINUMA a Jorge PEREIRA. Improvement of carotenoids production from *Rhodotorula glutinis* CCT-2186. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2021, 165 [cit. 2022-04-28]. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2020.107827
- [57] CHENG, Yu-Ting a Chu-Fang YANG. Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* [online]. 2016, 61, 270-275 [cit. 2022-04-28]. ISSN 18761070. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtice.2015.12.027
- [58] KOT, Anna, Stanisław BŁAŻEJAK, Agnieszka KURCZ, Iwona GIENKA a Marek KIELISZEK. *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2016, 100(14), 6103-6117 [cit. 2022-04-28]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-016-7611-8
- [59] MAZA, D., Silvana VIÑARTA, Ying SU, José GUILLAMÓN a Manuel AYBAR. Growth and lipid production of *Rhodotorula glutinis* R4, in comparison to other oleaginous yeasts. *Journal of Biotechnology* [online]. 2020, 310, 21-31 [cit. 2022-04-28]. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2020.01.012

- [60] DA COSTA, Willyan, Carlos DE ARAÚJO PADILHA, Júlia DE MEDEIROS DANTAS, Maylla SILVA, Hugo DE OLIVEIRA ROCHA, Flávio DA SILVA, Márcio FERRARI a Everaldo DOS SANTOS. Fractional recovery of oleaginous bioactive produced by *Rhodotorula mucilaginosa* CCT3892 using deep eutectic solvents. *Bioresource Technology Reports* [online]. 2020, 12 [cit. 2022-04-28]. ISSN 2589014X. Dostupné z: doi:10.1016/j.biteb.2020.100561
- [61] AKSU, Z. a A. EREN. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry* [online]. 2005, 40(9), 2985-2991 [cit. 2022-04-28]. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2005.01.011
- [62] TRAN, Tuyet, Dai-Hung NGO, Ngoc NGUYEN a Dai-Nghiep NGO. Draft genome sequence data of *Rhodospiridium toruloides* VN1, a strain capable of producing natural astaxanthin. *Data in Brief* [online]. 2019, 26 [cit. 2022-04-28]. ISSN 23523409. Dostupné z: doi:10.1016/j.dib.2019.104443
- [63] OSORIO-GONZÁLEZ, Carlos, Krishnamoorthy HEGDE, Pedro FERREIRA, Satinder BRAR, Azadeh KERMANSHAHIPOUR, Carlos SOCCOL a Antonio AVALOS-RAMÍREZ. Lipid production in *Rhodospiridium toruloides* using C-6 and C-5 wood hydrolysate: A comparative study. *Biomass and Bioenergy* [online]. 2019, 130 [cit. 2022-04-28]. ISSN 09619534. Dostupné z: doi:10.1016/j.biombioe.2019.105355
- [64] SARAN, Saurabh, Arushi MATHUR, Jyotsana DALAL a R.K. SAXENA. Process optimization for cultivation and oil accumulation in an oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* A29. *Fuel* [online]. 2017, 188, 324-331 [cit. 2022-04-28]. ISSN 00162361. Dostupné z: doi:10.1016/j.fuel.2016.09.051
- [65] ZENG, Jiaying, Shaoan LIAO, Ming QIU, Mingfeng CHEN, Jianmin YE, Jiayi ZENG a Anli WANG. Effects of carbon sources on the removal of ammonium, nitrite and nitrate nitrogen by the red yeast *Sporidiobolus pararoseus* Y1. *Bioresource Technology* [online]. 2020, 312 [cit. 2022-04-28]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.123593
- [66] LI, Chunji, Ning ZHANG, Bingxue LI, Qiong XU, Jia SONG, Na WEI, Wenjing WANG a Hongtao ZOU. Increased torulene accumulation in red yeast *Sporidiobolus pararoseus* NGR as stress response to high salt conditions. *Food Chemistry* [online].

- 2017, 237, 1041-1047 [cit. 2022-04-28]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2017.06.033
- [67] COLET, Rosicler, Leticia URNAU, Jaine BAMPI et al. Use of low-cost agro products as substrate in semi-continuous process to obtain carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* [online]. 2017, 11, 268-274 [cit. 2022-04-28]. ISSN 18788181. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcab.2017.07.015
- [68] MANOWATTANA, Atchara, Charin TECHAPUN, Masanori WATANABE a Thanongsak CHAIYASO. Bioconversion of biodiesel-derived crude glycerol into lipids and carotenoids by an oleaginous red yeast *Sporidiobolus pararoseus* KM281507 in an airlift bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2018, 125(1), 59-66 [cit. 2022-04-28]. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiosc.2017.07.014
- [69] DEMOULIN, Catherine, Yannick LARA, Luc CORNET, Camille FRANÇOIS, Denis BAURAIN, Annick WILMOTTE a Emmanuelle JAVAUX. Cyanobacteria evolution: Insight from the fossil record. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2019, 140, 206-223 [cit. 2022-04-28]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.007
- [70] ABED, R.M.M., S. DOBRETSOV a K. SUDESH. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2009, 106(1), 1-12 [cit. 2022-04-28]. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x
- [71] DVOŘÁK, Petr, Dale CASAMATTA, Petr HAŠLER, Eva JAHODÁŘOVÁ, Alyson NORWICH a Aloisie POULÍČKOVÁ. Diversity of the Cyanobacteria. *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, 3-46 [cit. 2022-04-28]. ISBN 978-3-319-46259-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-46261-5_1
- [72] HARISH, a Kunal SETH. Molecular circuit of heterocyst differentiation in cyanobacteria. *Journal of Basic Microbiology* [online]. [cit. 2022-04-28]. ISSN 0233111X. Dostupné z: doi:10.1002/jobm.202000266
- [73] GARLAPATI, Deviram, Muthukumar CHANDRASEKARAN, ArulAnanth DEVANESAN, Thangavel MATHIMANI a Arivalagan PUGAZHENDHI. Role of

- cyanobacteria in agricultural and industrial sectors: an outlook on economically important byproducts. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2019, 103(12), 4709-4721 [cit. 2022-04-28]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-019-09811-1
- [74] KIM, Yihwan, Jehyun JEON, Min KWAK, Gwang KIM, InSong KOH, Mina RHO a Qunfeng DONG. Photosynthetic functions of *Synechococcus* in the ocean microbiomes of diverse salinity and seasons. *PLOS ONE* [online]. 2018, 13(1) [cit. 2022-04-28]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0190266
- [75] STUNDA-ZUJEVA, Agnese. Review of *Spirulina/Arthrospira* Growth Medium Modifications. *Key Engineering Materials* [online]. 2020, 850, 153-158 [cit. 2022-04-28]. ISSN 1662-9795. Dostupné z: doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.850.153
- [76] DE LA JARA, A., C. RUANO-RODRIGUEZ, M. POLIFRONE, P. ASSUNÇAO, Y. BRITO-CASILLAS, A. WÄGNER a L. SERRA-MAJEM. Impact of dietary *Arthrospira* (*Spirulina*) biomass consumption on human health: main health targets and systematic review. *Journal of Applied Phycology* [online]. 2018, 30(4), 2403-2423 [cit. 2022-04-28]. ISSN 0921-8971. Dostupné z: doi:10.1007/s10811-018-1468-4
- [77] PALINSKA, Katarzyna a Waldemar SUROSZ. Taxonomy of cyanobacteria: a contribution to consensus approach. *Hydrobiologia* [online]. 2014, 740(1), 1-11 [cit. 2022-04-28]. ISSN 0018-8158. Dostupné z: doi:10.1007/s10750-014-1971-9
- [78] STUART, Rhona, Chris DUPONT, D. JOHNSON, Ian PAULSEN a Brian PALENIK. Coastal Strains of Marine *Synechococcus* Species Exhibit Increased Tolerance to Copper Shock and a Distinctive Transcriptional Response Relative to Those of Open-Ocean Strains. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2009, 75(15), 5047-5057 [cit. 2022-04-28]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00271-09
- [79] CABELLO-YEVES, Pedro, Jose HARO-MORENO, Ana-Belen MARTIN-CUADRADO, Rohit GHAI, Antonio PICAZO, Antonio CAMACHO a Francisco RODRIGUEZ-VALERA. Novel *Synechococcus* Genomes Reconstructed from Freshwater Reservoirs. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, 8 [cit. 2022-04-28]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2017.01151

- [80] CHU, Ruoyu, Shuangxi LI, Liandong ZHU, Zhihong YIN, Dan HU, Chenchen LIU a Fan MO. A review on co-cultivation of microalgae with filamentous fungi: Efficient harvesting, wastewater treatment and biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2021, 139 [cit. 2022-04-28]. ISSN 13640321. Dostupné z: doi:10.1016/j.rser.2020.110689
- [81] ISHIKA, Tasneema, Navid MOHEIMANI a Parisa BAHRI. Sustainable saline microalgae co-cultivation for biofuel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2017, 78, 356-368 [cit. 2022-04-28]. ISSN 13640321. Dostupné z: doi:10.1016/j.rser.2017.04.110
- [82] LIU, Lu, Junhui CHEN, Phaik-Eem LIM a Dong WEI. Dual-species cultivation of microalgae and yeast for enhanced biomass and microbial lipid production. *Journal of Applied Phycology* [online]. 2018, 30(6), 2997-3007 [cit. 2022-04-28]. ISSN 0921-8971. Dostupné z: doi:10.1007/s10811-018-1526-y
- [83] CHEIRSILP, Benjamas, Suleeporn KITCHA a Salwa TORPEE. Co-culture of an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and a microalga *Chlorella vulgaris* for biomass and lipid production using pure and crude glycerol as a sole carbon source. *Annals of Microbiology* [online]. 2012, 62(3), 987-993 [cit. 2022-04-28]. ISSN 1590-4261. Dostupné z: doi:10.1007/s13213-011-0338-y
- [84] WANG, Shikai, Yong WU a Xu WANG. Heterotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* using sucrose as the sole carbon source by co-culture with *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology* [online]. 2016, 220, 615-620 [cit. 2022-04-28]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2016.09.010
- [85] BARSANTI, Laura a Paolo GUALTIERI. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Second edition. Boca Raton, 2014. ISBN 978-1-4398-6732-7.
- [86] PLEISSNER, Daniel a Carol LIN. Valorisation of food waste in biotechnological processes. *Sustainable Chemical Processes* [online]. 2013, 1(1) [cit. 2022-04-28]. ISSN 2043-7129. Dostupné z: doi:10.1186/2043-7129-1-21
- [87] O'BRIEN, R.D. *Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications*. 3. USA: Taylor & Francis Group, 2009. ISBN 9780429148064.
- [88] PROŠKOVÁ, Alexandra, Jiří KUČERA a Zdeňka KOPICOVÁ. POROVNÁNÍ KYSELE A BAZICKY KATALYZOVANÉ TRANSESTERIFIKACE

KAFILERNÍHO TUKU METHANOLEM: Chemické listy [online]. 103121034-1036.

- [89] FRENGOVA, Ginka, Emilina SIMOVA a Dora BESHKOVA. Use of Whey Ultrafiltrate as a Substrate for Production of Carotenoids by the Yeast *Rhodotorula Rubra*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2004, 112(3), 133-142. ISSN 0273-2289. Dostupné z: doi:10.1385/ABAB:112:3:133
- [90] ONWULATA, Charles a Peter HURT. Whey processing: functionality and health benefits. 1. Singapore: Fabulos Printers, 2008. ISBN 978-0-8138-0903-7.
- [91] HOPPERT, Michael. Microscopic Techniques in Biotechnology. 1. Wiley Blackwell, 2006. ISBN 978-3-527-60261-2.
- [92] WAITES, Michael, Neil ROCKEY, Neil MORGAN a Gary HIGTON. Industrial Microbiology: An Introduction. Qxford: Wiley Blackwell, 2001. ISBN 978-0-632-05307-0.
- [93] LEE, Soo, Jun CHO, Yong CHANG a You-Kwan OH. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. Bioresource Technology [online]. 2017, 244, 1317-1328 [cit. 2022-04-28]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2017.06.038
- [94] POOJARY, Mahesha, Francisco BARBA, Bahar ALIAKBARIAN, Francesco DONSi, Gianpiero PATARO, Daniel DIAS a Pablo JULIANO. Innovative Alternative Technologies to Extract Carotenoids from Microalgae and Seaweeds. Marine Drugs [online]. 2016, 14(11) [cit. 2022-04-28]. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md14110214
- [95] RIVERA, S.M. a R. CANELA-GARAYOA. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. Journal of Chromatography A [online]. 2012, 1224, 1-10 [cit. 2022-04-28]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2011.12.025
- [96] VAN BREEMEN, R. Electrospray liquid chromatography-mass spectrometry of carotenoids. Analytical chemistry. 1995, 67132004-2009. ISSN 00003-2700.
- [97] VAN BREEMEN, R. Liquid chromatography-mass spectrometry of carotenoids. Pure and Applied Chemistry. 1997, 69102061-2066. ISSN 0033-4545 (print) 1365-3075 (electronic).

8 Seznam použitých zkratek a symbolů

ACP – acylový nosný protein

AL – *Anabaena laxa*

ALA – kyselina aminolevulová

AM – *Arthrospira maxima*

AMP – adenosinmonofosfát

AT – *Anabaena torulosa*

ATP – adenosintrifosfát

CoA – acetylkoenzym A

COPRO – koproporfyrinogen III

ER – endoplazmatické retikulum

FID – plamenově ionizační detektor

GC – plynová chromatografie

HMB – hydroxymethylbilan

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ICDH – isocytrátdehydrogenáza

IMP – inosinmonofosfát

Kvas – Kvasinka

K_2x P, N – Kokultivace 200 % P, N

K_3x P, N – Kokultivace 300 % P, N

K_4x P, N – Kokultivace 400 % P, N

K_2x Mg – Kokultivace 200 % Mg

K_3x Mg – Kokultivace 300 % Mg

K_2x P, N, Mg – Kokultivace 200 % P, N a Mg

K_káv – Kokultivace na kávovém oleji

K_frit – Kokultivace na fritovacím oleji

Kvas_káv – Kvasinka na kávovém oleji

Kvas_frit – Kvasinka na fritovacím oleji

MeOH – methanol
MF A – mobilní fáze A
MF B – mobilní fáze B
MUFA – mononenasyčené mastné kyseliny
NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADP – nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PBG – porfobilinogen
PDA – detektor diodového pole
PUFA – polynenasycené mastné kyseliny
RK – Rhodotroula kratochvilovae
RM – Rhodotorula musilaginosa
ROS – reaktivní forma kyslíku
RT – Rhodosporidium toruloides
Sin – Sinice
SM – Sporidiobolus metaroseus
SP – Sporidiobolus pararoseus
TAG – triacylglycerol
TrisHCL – pufr kyseliny chlorovodíkové
URO – uroporfyrinogen
YPD – yeast extract-pepton-dextrose