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

APLIKACE CHEMICKÝCH A FYZIKÁLNÍCH STRESŮ V POZDNÍ FÁZI RŮSTU NA VYBRANÉ KMENY MIKROORGANISMŮ

APPLICATION OF CHEMICAL AND PHYSICAL STRESSES IN THE LATE PHASE OF GROWTH TO SELECTED STRAINS OF MICROORGANISMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Marek Langer

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.

BRNO 2021

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání bakalářské práce

Číslo práce:	FCH-BAK1713/2020	Akademický rok:	2020/21
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií		
Student:	**Marek Langer**		
Studijní program:	Chemie a technologie potravin		
Studijní obor:	Biotechnologie		
Vedoucí práce:	**Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.**		

Název bakalářské práce:

Aplikace chemických a fyzikálních stresů v pozdní fázi růstu na vybrané kmeny mikroorganismů

Zadání bakalářské práce:

V rámci této práce budou řešeny následující dílčí cíle:

– Přehledná literární rešerše zaměřená na vybrané kmeny mikroorganismů.
– Screeningová kultivace vybraných kmenů mikroorganismů za stresových podmínek.
– Optimalizace složení produkčních médií.
– Optimalizace kultivace a aplikace stresových faktorů.
– Příprava a izolace různých extraktů z buněčné biomasy a jejich charakterizace.
– Srovnání produkčních vlastností vybraných kmenů.
– Vyhodnocení výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Marek Langer student(ka)	Ing. Martin Szotkowski, Ph.D. vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

V biotechnologickém průmyslu je využíváno široké spektrum mikroorganismů, které slouží k produkci významných metabolitů. Mezi ně patří karotenoidy a chlorofyly s antioxidačními účinky, mastné kyseliny, ubichinon a ergosterol. Pro zefektivnění a ekonomickou udržitelnost v průmyslu jsou hledány způsoby, jakými by bylo možno zvýšit výtěžek metabolitů na maximum. Jednou z cest, která je využita i v této práci, je aplikace chemických stresových faktorů na mikroorganismy. V teoretické části byly popsány vybrané mikroorganismy, jejich důležité intracelulární metabolity, ale také jejich metabolismus. Poslední podkapitolou je využití stresových faktorů v průmyslu. V experimentální části byly podrobeny jednotlivé mikroorganismy různým koncentracím chloridu sodného, síranu kobaltnatého a chloridu železitého. Významné zvýšení produkce lipidů bylo zjištěno při aplikaci chloridu sodného na kvasinkový kmen *Rhodosporidium toruloides.* Zvýšení produkce karotenoidu torularhodinu nastalo po aplikaci železité soli u *Sporidiobolus pararoseus,* po aplikaci chloridu sodného byl vzrůst torularhodinu značný u kmenů *Cystofilobasidium macerans* a *Rhodosporidium toruloides.* Chlorid sodný byl taktéž vhodným stresovým faktorem pro tvorbu karotenoidu lykopenu u *Rhodotorula mucilaginosa.* Nejvýznamnějším stresovým faktorem u řas byl síran kobaltnatý, který zvýšil produkci metabolitů u *Scenedesmus obliquus.* Značné produkce dosáhla také sinice *Anabaena torulosa* v přítomnosti chloridu sodného.

ABSTRACT

A wide spectrum of microorganisms is used in the biotechnological industry for production of meaningful metabolites; including carotenoids and chlorofyles with antioxidant effects, fatty acids, ubiquinone and ergosterol. Ways to increase yield of metabolites to maximum capacity are being researched to increase efficiency and economical sustainability in industry. One of the ways is the application of chemical stress factors on microorganisms as is described in this thesis. In the theoritical part certain microorganisms, their important intracellular metabolites and their metabolism are established. The last subchapter covers the usage of stress factors in industry. In the experimental part each microorganism was subjected to various concentrations of sodium chloride, cobalt(II) sulfate and iron(III) chloride. Significant increase of lipid production was registered after an application of sodium chloride on yeast strain *Rhodosporium toruloides.* An increase in production of torularhodin in *Sporidiobolus pararoseus* occured after application of iron salt. After an application of sodium chloride the growth of torularhodin in strains *Cystofilobasidium macerans* a *Rhodosporidium toruloides* was significant. Sodium chloride was also a suitable stress factor for lycopene formation in *Rhodotorula mucilaginosa*. The most meaningful stress factor of algae was cobalt(II) sulfate which increased metabolite production in *Scenedesmus obliquus*. Cyanobacteria *Anabaena torulosa* also attained a significant production in the presence of sodium chloride.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kvasinky, mikrořasy, sinice, karotenoidy, chlorofyly, lipidy, stresové faktory

KEY WORDS

Yeasts, microalgae, cyanobacteria, carotenoids, chlorophyles, lipids, stress factors

LANGER, Marek. *Aplikace chemických a fyzikálních stresů v pozdní fázi růstu na vybrané kmeny mikroorganismů* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-30]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131978. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Martin Szotkowski.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval vedoucímu své bakalářské práce panu Ing. Martinu Szotkowskému, Ph.D. za profesionální přístup, cenné rady a nesmírnou ochotu při jejím vypracovávání. Dále patří poděkování Fakultě chemické za vytvoření pracovních podmínek a umožnění práci uskutečnit. Na závěr bych rád poděkoval své rodině a přátelům, kteří mě při studiu a při vzniku práce plně podporovali.

OBSAH

1 Úvod 7
2 Teoretická část 8
2.1 Řasy 8
2.1.1 Rod *Scenedesmus* 9
2.1.2 Rod *Chlorella* 10
2.2 Kvasinky 10
2.2.1 *Rod Rhodotorula* 11
2.2.2 Rod *Sporidiobolus* 12
2.2.3 Rod *Cystofilobasidium* 12
2.3 Karotenoidy 12
2.3.1 Dělení karotenoidů 13
2.3.2 Struktura karotenoidů 13
2.3.3 Biosyntéza karotenoidů 14
2.3.3.1 Mevalonátová dráha 14
2.3.3.2 Dráha 2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfátu (MEP) 15
2.3.3.3 Syntéza lykopenu z isopentenylpyrofosfátu a dimethylallylpyrofosfátu 18
2.3.3.4 Syntéza karotenoidů z lykopenu 18
2.4 Lipidy 21
2.4.1 Metabolismus lipidů 22
2.4.1.1 Biosyntéza mastných kyselin 22
2.4.1.2 Biosyntéza triacylglycerolů 24
2.5 Ergosterol 25
2.6 Ubichinon 25
2.7 Stresové faktory 26
3 Cíle práce 28
4 Experimentální část 29
4.1 Použité chemikálie 29
4.1.1 Chemikálie pro kultivaci mikrořas a sinic 29
4.1.2 Chemikálie pro kultivaci kvasinek 29
4.1.3 Chemikálie pro extrakce 30
4.2 Použité přístroje a pomůcky 30
4.3 Použité kmeny mikroorganismů 30

4.3.1 Mikrořasy 30
4.3.2 Sinice 30
4.3.3 Kvasinky 30
4.4 Kultivace mikroorganismů 31
4.4.1 Kultivace mikrořas a sinic 31
4.4.1.1 Aplikace stresových faktorů 32
4.4.2 Kultivace kvasinek 33
4.4.2.1 Aplikace stresových faktorů 33
4.5 Stanovení intracelulárních metabolitů 34
4.5.1 Stanovení koncentrace biomasy 34
4.5.2 Extrakční postupy pro HPLC analýzu 34
4.5.3 Extrakční postupy pro GC analýzu 34
5 Výsledky a diskuze 36
5.1 Aplikace terminálních stresů na zástupce karotenogenních kvasinek 36
5.1.1 Produkční vlastnosti kmene *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6 36
5.1.2 Produkční vlastnosti kmene *Cystofilobasidium macerans* CCY 17-9-3 39
5.1.3 Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula kratochvilovae* CCY 20-2-26 42
5.1.4 Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula mucilaginosa* CCY 19-4-6 45
5.1.5 Produkční vlastnosti kmene *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 48
5.2 Aplikace terminálních stresů na zástupce mikrořas 51
5.2.1 Produkční vlastnosti kmene *Arthrospira maxima* CCALA 030 51
5.2.2 Produkční vlastnosti kmene *Scenedesmus obliquus* CCALA 455 54
5.3 Aplikace terminálních stresů na zástupce sinic 57
5.3.1 Produkční vlastnosti kmene *Anabaena torulosa* CCALA 003 57
5.3.2 Produkční vlastnosti kmene *Synechococcus nidulans* CCALA 188 57
6 Závěr 61
7 Seznam použitých zdrojů 63
8 Seznam zkratek 68

1 Úvod

S rostoucím zájmem okolního světa o zdravé potraviny obsahující mnoho nutrientů je spjat výzkum významných látek pro lidskou výživu. Pěstování rostlin se zdá být pro farmaceutické, kosmetické i potravinářské účely nevýhodné. Důvodem je mnohdy nízký obsah potřebné látky, potíže se škůdci, ale i klimatické náhlé změny, které zemědělství zatěžují a omezují. Poměrně moderním způsobem získávání mnoha přírodních látek se stala biotechnologická produkce za využití mikroorganismů širokého spektra. Do popředí se dostávají karotenogenní kvasinky, mikrořasy a sinice. Kvasinky produkují mastné kyseliny, ergosterol, ubichinon a karotenoidy, zatímco mikrořasy a sinice navíc ještě chlorofyly.

Získávání karotenoidů s sebou nese mnoho výhod, jedná se totiž o látky se silnou antioxidační aktivitou, které brání volným kyslíkovým radikálům poškozovat buňky či tkáně. Některé z karotenoidních pigmentů jsou užívány i pro správnou funkci zraku, neboť jsou prekurzory vitaminu A. Chlorofyly jsou taktéž významnými antioxidanty, podporují funkci imunitního systému a čistí krev. Ergosterol je provitaminem D_2 a slouží mnohdy jako doplněk stravy. Pro vznik ATP v organismu je důležitý ubichinon, jehož je žádoucí doplňovat zejména ve starším věku, kdy ho již tělo nedokáže rychle a účinně syntetizovat. Neméně důležitými jsou mastné kyseliny, zvláště pak esenciální, které si lidské tělo nedokáže vytvářet, ale musí je přijímat v potravě.

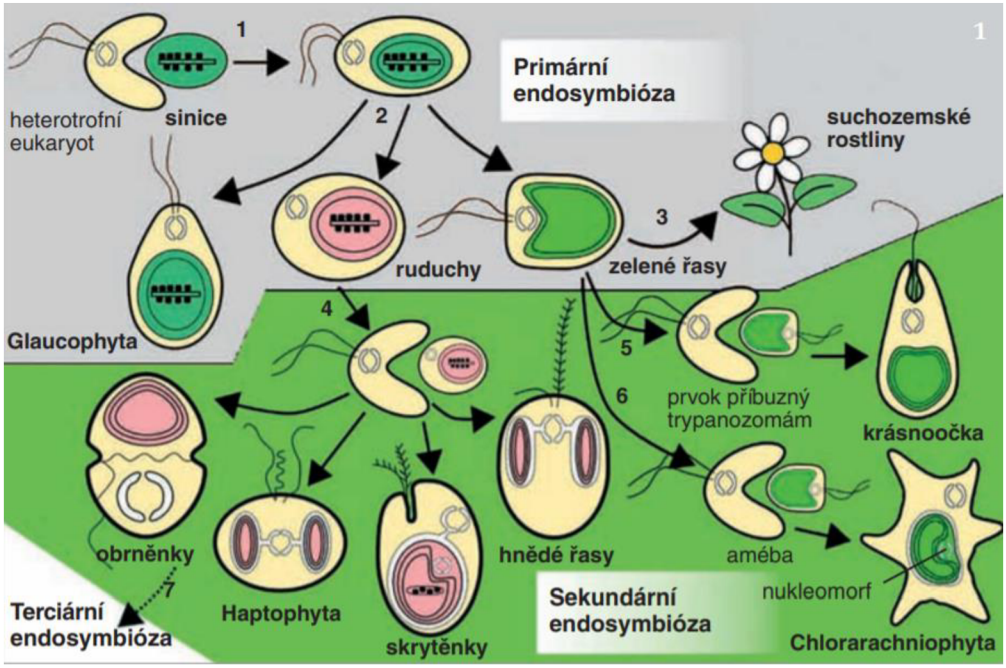
Aby bylo možno rozšířit produkci těchto výše zmíněných látek v průmyslu, je nezbytné, aby byla co nejšetrnější k životnímu prostředí, ale zároveň měla co nejvyšší výtěžky metabolitů. Poslední roky je na vzestupu zužitkování všech částí rozložitelných surovin beze zbytku, což se nazývá jako biorafinérie. Z tohoto důvodu se do popředí dostávají odpadní substráty z průmyslu (syrovátka, odpadní tuk), které mohou sloužit jako vhodný substrát pro některé mikroorganismy, zejména pro kvasinky. Kromě toho je i zkoumáno, jak přimět mikroorganismy, aby vytvářely co největší množství významných metabolitů. Nemusí jít však vždy pouze o zvýšení celkového výtěžku, někdy je žádoucí změna profilu látek, kdy nastává zvýšení obsahu jednoho produktu na úkor jiného. Tyto snahy mohou být uskutečňovány využitím tzv. stresových faktorů, které mohou být fyzikální nebo chemické.

V této práci je využíváno právě chemických stresových faktorů, a to pomocí třech anorganických solí, které jsou přidávány do médií v různých koncentracích. Chemické stresy jsou zde využívány pro sledování a srovnání produkce vnitrobuněčných metabolitů u daných zástupců kvasinek, mikrořas a sinic.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Řasy

Obecně se jedná o eukaryotní organismy, které jsou schopny fotosyntézy a nejsou vyššími rostlinami. Zařazení této skupiny organismů je složité, protože jednotliví zástupci nemají společného předka, tzv. „prařasu“, ze které by se všichni vyvinuli. Přestože řasy vznikly na základě endosymbiózy, kdy jedna buňka pohltila druhou, výzkumy ukázaly, že tato endosymbióza proběhla při evoluci vícekrát. Primární endosymbióza zapříčinila vznik prvního eukaryotického organismu schopného fotosyntézy, a to tak, že již eukaryotická buňka (obsahující mitochondrie) pohltila sinici (prokaryotickou buňku). Pohlcená sinice však nebyla rozložena a strávena, nýbrž koevolvovala s eukaryotickou buňkou. Z této koevoluce byly vyvinuty 3 skupiny, a to zelené řasy, ruduchy a *Glaucophyta*. Sekundární endosymbióza znamená, že takto vzniklá eukaryotická buňka řasy byla opět pohlcena, např. prvokem anebo měňavkou. Tímto procesem vznikly ostatní skupiny řas. Vznik jednotlivých skupin endosymbiózou je znázorněn na následujícím obrázku [1].



Obrázek č. 1 Proces endosymbiózy během evoluce [1]

Na základě výše zmíněných okolností lze konstatovat, že řasy nejsou seskupením taxonomickým. Toto seskupení lze nazvat spíše jako biologické nebo ekologické. Biologické znamená, že jednotlivá oddělení řas mají společné znaky jako např.: tělo řas je nazýváno jako stélka a není diferenciováno jako u vyšších rostlin; základní metabolismus řas byla fotosyntéza (přestože u mnoha druhů tato schopnost během evoluce vymizela). Podobností biotopů, ve kterých řasy žijí, je lze považovat i za seskupení ekologické [1].

Řasy jsou různorodou skupinou i v rámci jejich velikosti. Z tohoto hlediska rozlišujeme 2 skupiny: makrořasy a mikrořasy. Makrořasy (nazývané chaluhy) jsou mnohobuněčné organismy, většinou obývají slané vody (moře, oceány) a mohou dorůstat i délky 60 metrů. Mikrořasy jsou oproti tomu jednobuněčné organismy, někdy tvoří i kolonie a jsou součástí

vodního fytoplanktonu. Jejich rozměry se pohybují v řádech mikrometrů. Přestože jsou řasy vázány především na vodní prostředí jako jsou moře, jezera, vodní toky, rybníky atd., vyskytují se na mnoha dalších stanovištích jako jsou kmeny stromů, bahna, kameny, srst živočichů, ale žijí i na sněhu, v okolí horkých pramenů a na pouštích. Řasy tak obývají téměř celou planetu a adaptovaly se na nejrůznější prostředí, mnohdy s extrémními podmínkami (vysoká salinita v Mrtvém moři, nízká nebo vysoká teplota, nízké pH atd.) [2].

Jak již bylo zmíněno, mikrořasy jsou jednobuněčné organismy, někdy tvořící kolonie, ale mohou se vyskytovat i v symbióze s odlišnými organismy (s mořskými houbami, korály, se suchozemskými houbami pak tvoří lišejníky). Tento vztah je prospěšný pro oba organismy, řasa poskytuje symbiontu produkty fotosyntézy, ten ji za to poskytuje tvar a ochranu před vnějšími vlivy anebo dalšími organismy [2], [3].

Řasy disponují třemi způsoby rozmnožování: nepohlavním, pohlavním a vegetativním. Vegetativní rozmnožování nastává rozpadem stélky na shodné jedince, u nepohlavního rozmnožování se vytváří spory mitózou a u pohlavního tzv. gamety procesem meióza [2], [3].

Přestože mohou řasy člověku škodit např. ve formě vodního květu, což je přemnožená a toxiny produkující populace řas na vodní hladině, jsou důležitými organismy jak pro člověka, tak pro život na Zemi. Mnoho druhů řas je schopno fotosyntetizovat, čímž vytváří nezbytný kyslík pro aerobní organismy (řasy vytváří zhruba polovinu kyslíku atmosféry). Jsou však člověkem využívány i přímo jako zdroj potravy, hnojivo a topivo. Významný gel vyráběný z ruduch se nazývá agar a je používán jako živné medium pro kultivace mikroorganismů anebo jako želatina pro potravinářský průmysl. V rámci této bakalářské práce je nezbytné zmínit pigmenty nacházející se v řasách, jimiž jsou karotenoidy a chlorofyly. Pro tyto látky, které řasy metabolismem vytvářejí, jsou kultivovány v biotechnologických provozech [2], [3], [4].

Řasy jsou děleny do šesti následujících pododdělení [5]

1. *Rhodophyta* – červené řasy
2. *Chlorophyta* – zelené řasy
3. *Chromophyta* – hnědé řasy
4. *Euglenophyta* – krásnoočka
5. *Dinophyta* – obrněnky
6. *Cryptophyta* – skrytěnky

2.1.1 Rod *Scenedesmus*

Jde o rod spadající pod zelené řasy, který čítá momentálně 74 druhů. *Scenedesmus* se běžně nacházejí ve sladkých vodách. Nejčastěji tvoří cenobia o 4 nebo 8 buňkách, které jsou uspořádány za sebou ve formě řetízku. V rozích kolonií jsou často přítomny trny. Buňky rodu *Scenedesmus* mohou existovat i samostatně, zejména v případech, kdy jsou vystaveny příhodným podmínkám. Buňka většinou obsahuje tzv. pyrenoid, což je bílkovinné tělísko, ve kterém je přítomen enzym RUBISCO důležitý pro fotosyntézu. *Scenedesmus* jsou často využívány k výrobě bionafty nebo bioethanolu [6], [7], [8].

Obrázek č. 2 Scenedesmus opoliensis [6]

2.1.2 Rod *Chlorella*

Tento rod je taktéž řazen do zelených řas. Jejich buňky jsou jednojaderné a kokálního až elipsoidního tvaru. Uvnitř nich se nachází bílkovinné tělísko pyrenoid, na němž jsou 2 škrobová zrna. Zástupci rodu *Chlorella* osídlují slané i sladké vody, disponují rychlým růstem a odolností proti nepříznivým podmínkám. Taktéž jsou cenné v rámci zdravé výživy, protože obsahují bílkoviny, karotenoidy, látky lipidické povahy, chlorofyly (a i b) a minerály. Skrz tyto vlastnosti a obsahové látky jsou to jedny z nejvyužívanějších mikrořas pro biotechnologické kultivace. Poslední dobou je *Chlorella* pěstována po celém světě a tvoří výživové doplňky stravy. Pro lepší vstřebávání výše zmíněných látek v trávicím traktu jsou získané buňky podrobeny procesu rozbití buněčné stěny [9], [10], [11].

Obrázek č. 3 Chlorella pyrenoidosa [10]

2.2 Kvasinky

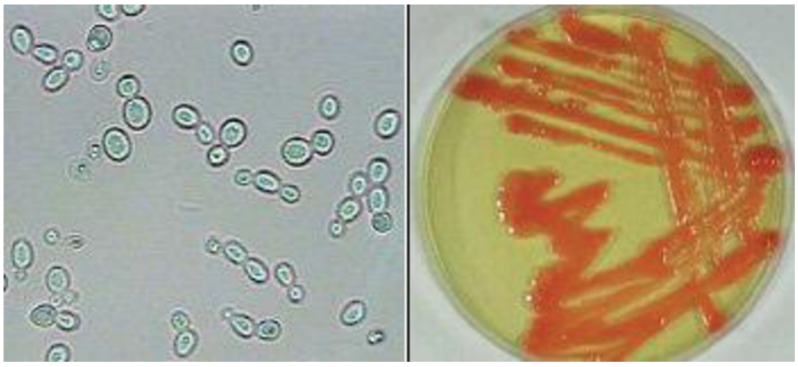
Jedná se o mikroorganismy s eukaryotním typem buňky, které spadají do říše houby. Živí se heterotrofně, nejsou tedy schopny fotosyntézy. Jejich název vyplývá ze schopnosti kvašení, které nastává při anaerobním rozkladu sacharidů (mono-, di- a trisacharidů), přičemž vzniká ethanol a oxid uhličitý. Jestliže je však v okolí přítomen kyslík, kvasinky přecházejí na aerobní

způsob metabolismu. Řadí se obecně mezi psychrofilní mikroorganismy, protože rostou při nižších teplotách, kde se taky nachází optimum jejich růstu (5–20 °C). Přesto však závisí na konkrétním rodu a druhu dané kvasinky, některé snesou vyšší teploty, dokonce i vysoké či nízké pH [12], [13].

Tvar kvasinek je nejčastěji oválného tvaru, vejčitý nebo kulovitý, někdy však tvoří protáhlé buňky. Velikost je proměnlivá, pohybuje se v řádech jednotek až desítek μm. Kvasinky mohou žít samostatně, ale mohou tvořit i tzv. mycelia. Ta rozlišujeme na pravá a nepravá. Pravé mycelium znamená, že se buňky po příčném rozdělení neodloučí, ale zůstávají spojeny, čímž vznikají vlákna. Nepravé mycelium, zvané též pseudomycelium, je odlišné v tom, že buňky, které se spojují do vláken, se dělí pučením. Pučení je způsob nepohlavního rozmnožování, který je pro kvasinky typický. Při něm vzniká na mateřské buňce pupen, který roste, později se do něj přesouvá část příslušných organel a jádro. Poté se dceřiná buňka odškrcuje od buňky mateřské. Toto odškrcení zanechává na kvasinkách tzv. jizvu. U dceřiné buňky se vzniklá jizva nazývá jako jizva zrodu. Některé rody kvasinek pučí pokaždé na jiném místě, podle počtu jizev tak lze odhadnout přibližné stáří kvasinky. Většina kvasinek je schopna i pohlavního rozmnožování, při kterém splývají 2 haploidní spory [13], [14].

2.2.1 Rod Rhodotorula

Jde o velmi rozšířený rod, nachází se jak ve vodě, půdě, tak i ve vzduchu, kde je častým kontaminantem. Tvar buněk je od kulovitého po protáhlý, může být i vejčitý či elipsoidní. Jeho zástupci postrádají schopnost kvašení, jejich metabolismus je aerobní. Rod *Rhodotorula* je biotechnologicky využíván pro produkci pigmentů karotenoidů. Ty jsou využívány buňkami jako ochrana před UV zářením. Kvůli karotenoidům mají kvasinky daného rodu oranžové až načervenalé zbarvení. V daném rodu se nachází celkem 47 druhů kvasinek, z nichž 3 jsou schopné vyvolat infekci u člověka, těmi jsou *Rhodotorula mucilaginosa, R. minuta a R. glutinis*. Infekce však vznikají nejčastěji u jedinců s oslabenou imunitou, tudíž patogenita daných rodů nebyla přímo studována. *Rhodotorula* je významná rychlým růstem, kultivace je možná na většině médií, která nemusí obsahovat dokonce ani vysoké koncentrace nutrientů. Při teplotě 37 °C nastává snížená schopnost růstu, už jen z toho důvodu jsou infekce u člověka tímto kmenem vzácné [12], [14], [45], [46].



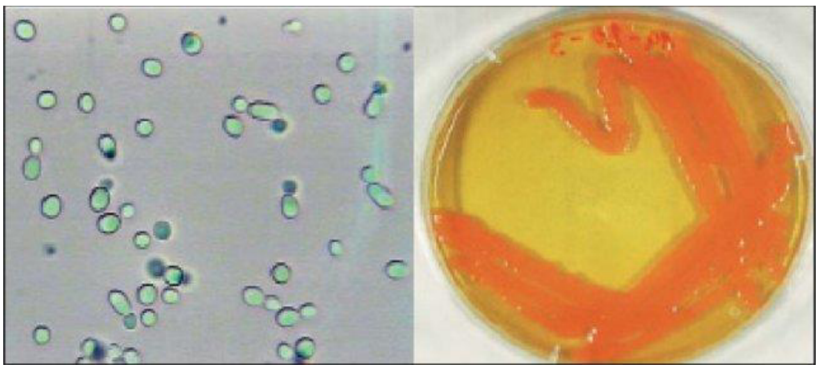
Obrázek č. 4 Rhodotorula glutinis [15]

2.2.2 Rod *Sporidiobolus*

Tyto kvasinky mají podobné vlastnosti jako předchozí rod, jsou karotenogenní a těmito pigmenty jsou taktéž zbarveny. Mezi nejvýznamnější jimi produkované karotenoidy patří β-karoten, torularhodin a torulen. Jejich metabolismus je striktně aerobní, tudíž nejsou schopny kvašení cukrů. Z hlediska ekologie a finančních nákladů je podstatná skutečnost, že kvasinky daného rodu mohou metabolizovat řadu odpadních substrátů a vedlejších produktů průmyslu. Vedle syntézy karotenoidů je využívána i produkce mastných kyselin, které jsou v buňkách obsaženy ve vhodném složení. Optimální teplota růstu je 20–25 °C. Tvar buněk je zejména vejčitý, elipsoidní, nebo podlouhlý. Se *Sporidiobolus* je spojen rod *Sporobolomyces*, který je jeho anamorfním stádiem. To znamená, že buňky se nemohou rozmnožovat pohlavním způsobem. *Sporidiobolus* je schopen nepohlavního rozmnožování buď pučením, nebo pomocí spor balistokonidií. Pohlavní rozmnožování nastává poté prostřednictvím teliospor. Některé druhy rodu byly přeřazeny do nového rodu *Rhodosporidiobolus*. V současnosti tak obsahuje rod *Sporidiobolus* pouze 3 zástupce, jimiž jsou *Sporidiobolus metaroseus, S. pararoseus* a *S. salmonicolor*. *Sporidiobolus* je taxonomicky velmi příbuzný *Rhodotorula*, pouze na základě struktury nelze tyto 2 rody rozpoznat [12], [47].

2.2.3 Rod *Cystofilobasidium*

Zahrnuje karotenogenní kvasinky, proto jsou zbarveny oranžově, červeně až růžově. Ne všechny druhy z rodu jsou však zbarveny a syntetizují karotenoidy. Tvar buňky je vejčitý až elipsoidní. Rod je schopen rozmnožování jak nepohlavního, zejména pučením, tak pohlavního, a to pomocí teliospor. Jako u předchozích dvou rodů chybí schopnost kvašení za anaerobních podmínek. Důležitým metabolickým produktem je kromě karotenoidů i koenzym Q obsahující 8 jednotek. Rod čítá celkem 6 druhů, mezi nejznámější zástupce patří *Cystofilobasidium capitatum*, *Cystofilobasidium ferigula* a *Cystofilobasidium infirmominiatum* [17], [48].



Obrázek č. 5 Cystofilobasidium capitatum [16]

2.3 Karotenoidy

Je to skupina organických lipofilních látek čítající přes 750 sloučenin. Obsahují v sobě molekuly izoprenu, řadí se proto do rozsáhlé skupiny izoprenoidů, konkrétněji mezi terpeny. Všechny karotenoidy jsou pak specificky nazývány jako tetraterpeny a skládají se z 8 izoprenoidních pětiuhlíkatých jednotek (monoterpeny jsou totiž tvořeny dvěma jednotkami izoprenu). Karotenoidy jsou pigmenty s barvou od žluté až po červenou. Jsou tudíž využívány jako přírodní barviva. Jejich významnější vlastností je však antioxidační účinek.

Díky tomuto účinku jsou karotenoidy schopny neutralizovat volné radikály, které mohou být pro živé organismy doslova zničující (způsobují např. rakovinové bujení). Karotenoidy též savcům slouží k syntéze vitaminu A, jsou proto takzvanými prekurzory vitamínu A (nebo také provitaminy A) [18], [19], [20].

Karotenoidy se nachází ve všech fotosyntetizujících organismech. Bylo totiž zjištěno, že karotenoidy hrají důležitou roli i v rámci fotosyntézy. Absorbují vlnové délky v jiné části viditelného světla než chlorofyly, čímž je zvýšen záchyt energie při světelné části fotosyntézy. Další významnou vlastností je ochrana organismu před velkým množstvím dopadajícího záření. Způsobují zbarvení různých druhů ovoce, květin, trav atd., v jejichž buňkách jsou uloženy v organelách zvaných chromoplasty [21], [22].

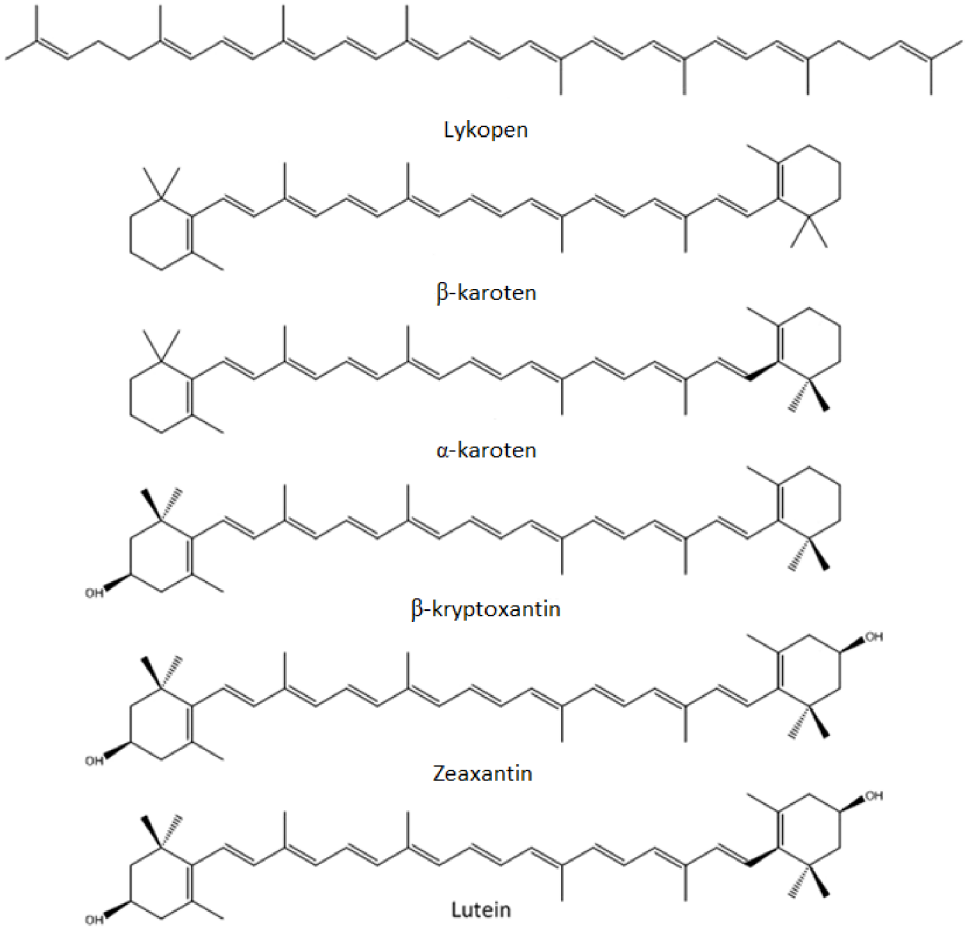
2.3.1 Dělení karotenoidů

Karotenoidy můžeme dělit na karoteny a xanthofyly. Karoteny jsou tvořeny uhlovodíkovým řetězcem, zatímco xanthofyly obsahují navíc ve své struktuře kyslíkové atomy. Tyto atomy mohou být součástí hydroxylových, karbonylových, karboxylových a epoxidových skupin. Díky přítomnosti atomů kyslíku jsou xanthofyly polárnější než karoteny [23], [24].

2.3.2 Struktura karotenoidů

Karotenoidy jsou oligomery tvořeny osmi jednotkami isoprenu, celkem tedy obsahují 40 atomů uhlíku. Izoprenoidní konce se označují jako „hlava“ a „pata“. Hlavou je nazýván konec, na jehož straně se nachází atom uhlíku, který je při vytváření názvosloví označen číslem 1, tedy ten, jenž má blíže methylovou skupinu. Pata je tím pádem druhý konec, jehož uhlík je označován číslem čtyři. V karotenoidech se za sebou jednotky řadí způsobem „hlava-pata“, nicméně uprostřed dochází ke změně, kde se na patu napojuje taktéž pata. Na tuto část molekuly ukončenou hlavou se následně pojí pata další izoprenoidní jednotky. Díky zmíněnému pojení monomerů lze označit molekulu karotenoidu jako symetrickou [17], [20].

Jako důležitý strukturní rys můžeme označit dvojné vazby, jež jsou v molekulách karotenoidů konjugované. To způsobuje i výše zmíněnou barevnost těchto látek (světelná absorpce je v rozmezí 400 a 550 nm). Konjugované vazby jsou příčinou dvou možných uspořádání atomů nebo atomových skupin. Tato uspořádání jsou nazývána buď cis-, anebo trans-. V karotenoidech se nachází především vazby trans, často je konfigurace celé molekuly označena jako all-trans. Konce uhlíkového skeletu karotenoidů jsou buď oba alifatické, jeden alifatický a jeden cyklický, nebo oba cyklické. Na základě těchto zakončení jsou karotenoidy nazývány jako acyklické, monocyklické nebo alicyklické. Cykly mohou být jak pětičlenné, tak šestičlenné [22], [24].



Obrázek č. 6 Vybraní zástupci karotenoidů: převzato a upraveno dle [25]

2.3.3 Biosyntéza karotenoidů

Karotenoidy vznikají kondenzací dvou typů izoprenoidních látek, a to isopentenyldifosfátu (IPP) a dimethylallyldifosfátu (DMAPP). Tyto 2 izoprenoidní látky však nejsou základními substráty, ale musí se nejprve vytvořit. Pro jejich vznik slouží 2 známé metabolické dráhy, první je mevalonátová dráha (MVA) a druhá je nazývána jako dráha 2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfátu (MEP) nebo 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátu (DXP) [20], [26].

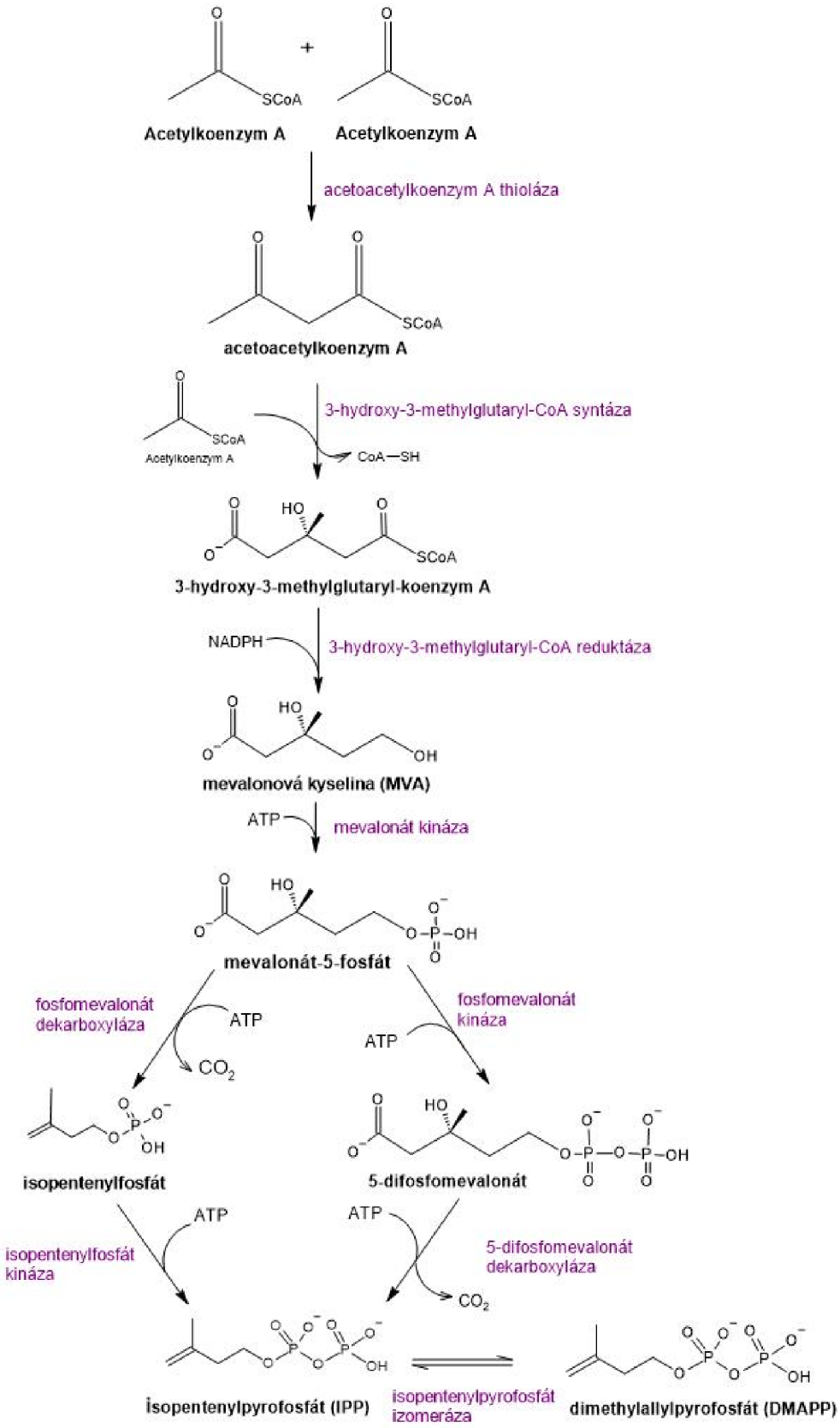
2.3.3.1 Mevalonátová dráha

Touto dráhou jsou izoprenoidy syntetizovány u zvířat a kvasinek, v jejichž buňkách se tak děje v cytosolu. Dráha začíná kondenzací dvou molekul acetyl-CoA enzymem acetoacetyl-CoA thiolázou, čímž vznikne molekula acetoacetyl-CoA. Přidáním dalšího acetyl-CoA vznikne 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMGS-CoA), a to za přítomnosti enzymu HMGS-CoA syntázy. Molekula je následně redukována HMGS-CoA reduktázou na mevalonovou kyselinu (MVA). Ta je postupně dvakrát fosforylována kinázami na produkt mevalonát-5-difosfát. Ten je za využití ATP dekarboxylován 5-difosfomevalonát dekarboxylázou na produkt mevalonátové dráhy, tedy izopentenylpyrofosfát. Bylo zjištěno, že u archeí je MVA fosforylována kinázou, následně je však rovnou využito ATP na dekarboxylaci pro vznik izopentenylfosfátu, který je až poté fosforylován kinázou na IPP. Grafický popis mevalonátové dráhy je znázorněn na obrázku na následující straně [20], [26].

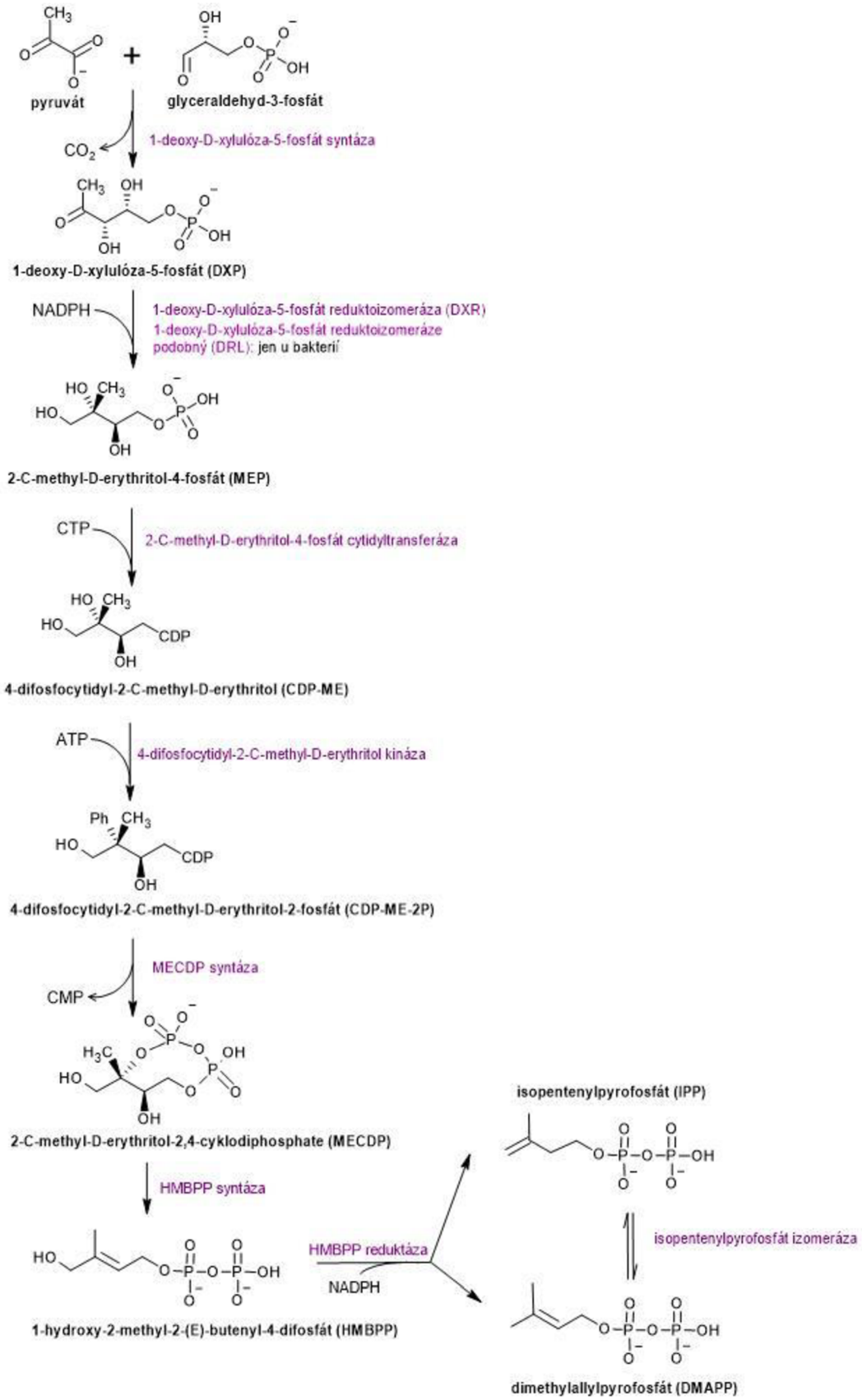
2.3.3.2 Dráha 2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfátu (MEP)

Jelikož je tato bakalářská práce zaměřena nejen na kvasinky, ale i na zelené řasy, u kterých jsou prekurzory karotenoidů (IPP a DMAPP) syntetizovány právě touto drahou, je nezbytné ji taktéž detailněji popsat. MEP dráha se dále vyskytuje i u eubakterií a vyšších rostlin. Na rozdíl od mevalonátové dráhy se odehrává v buněčných organelách, konkrétně v plastidech. Bylo zjištěno, že některé organismy využívají současně obě dráhy. Avšak pokud je jedna dráha u těchto organismů potlačena, druhá nedokáže její nepřítomnost plně nahradit [26].

Graficky je schéma dráhy popsáno níže (viz Obrázek 8), nicméně je nutno zmínit některé její okolnosti. Hned první reakce, při které reaguje pyruvát s glyceraldehyd-3-fosfátem za účasti enzymu 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátu (DXS), ovlivňuje rychlost celé dráhy největší měrou (tzv. rychlost-limitující krok). To bylo prokázáno změnami hladin produkovaných izoprenoidů v organismech, kde byla ovlivněna translace enzymu DXS. Přeměny 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátu (DXP) na 2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfát (MEP) se účastní enzym DXP reduktoizomeráza (DXR). Byl však nalezen i další enzym zprostředkující tento krok dráhy, avšak pouze u bakterií. Ten je nazýván jako DXR-podobný, zkratkou DRL. Třetí produkt metabolické dráhy MEP, tedy 4-difosfocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol (CDP-ME), může v organismech vznikat i přímo z meziproduktů pentózofosfátové dráhy, nejen pouze z výchozích substrátů MEP. Co se týče enzymů dané metabolické dráhy, ty se shlukují do multienzymových komplexů, čímž usnadňují a také zrychlují celý proces přeměny [26].



Obrázek č. 7 Mevalonátová metabolická dráha pro syntézu IPP – schéma bylo vytvořeno v programu Chemsketch podle [26]



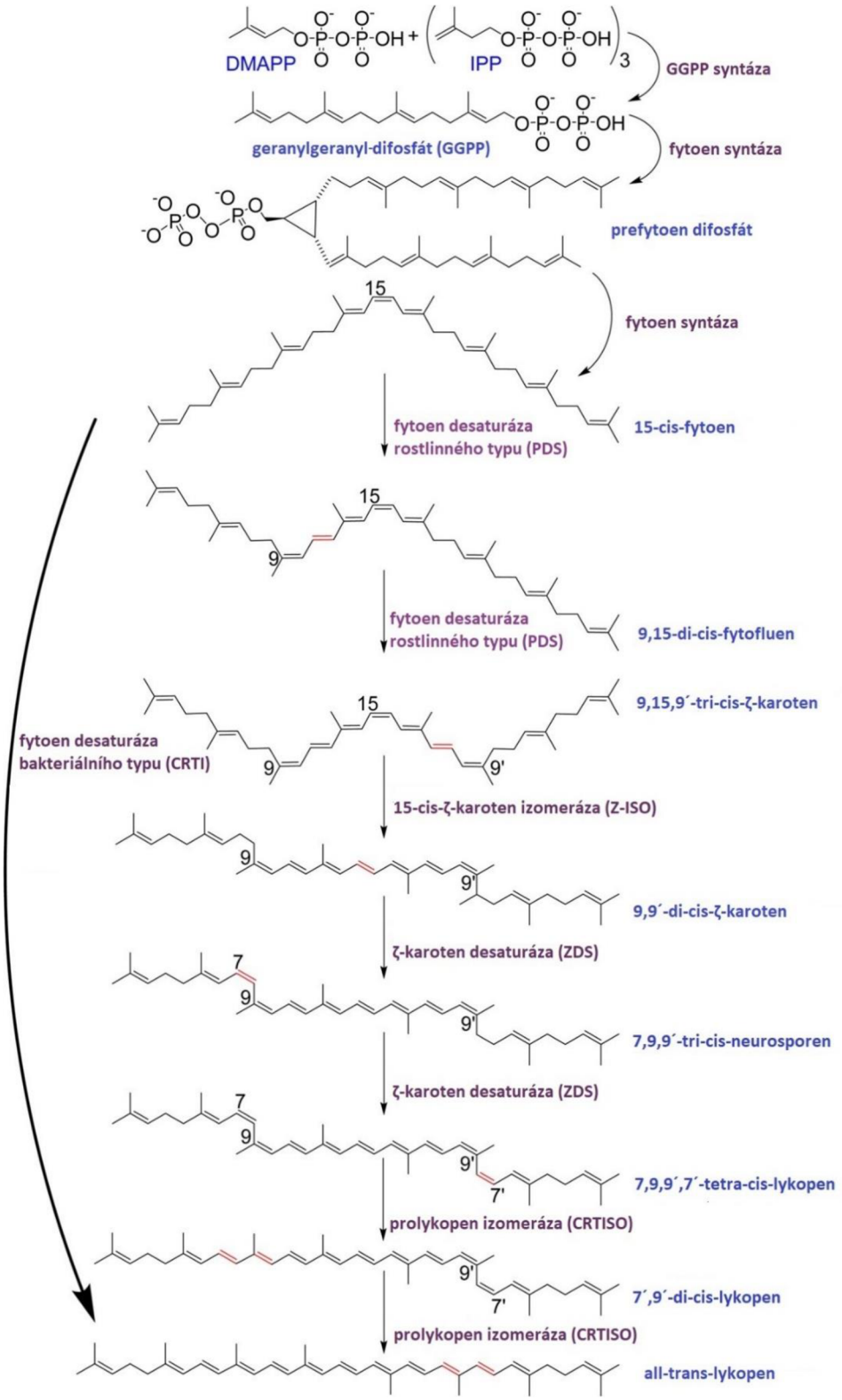
Obrázek č. 8 Dráha 2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfátu (MEP) pro syntézu IPP – schéma bylo vytvořeno v programu Chemsketch podle [26]

2.3.3.3 Syntéza lykopenu z isopentenylpyrofosfátu a dimethylallylpyrofosfátu

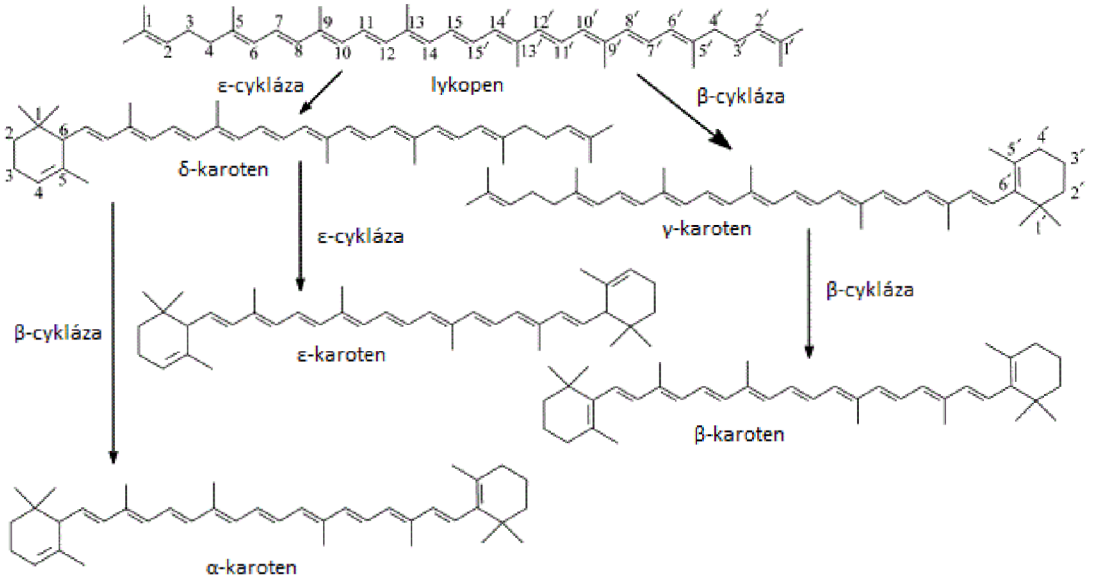
Jakmile jsou vytvořeny základní prekurzory pro biosyntézu karotenoidů (IPP a DMAPP) jednou ze dvou výše zmíněných metabolických drah, dochází k jejich kondenzaci. K té dochází ze 3 molekul IPP a 1 molekuly DMAPP, a to za účinku enzymu geranylgeranyl-difosfát syntázy. Vzniklý geranylgeranyl-difosfát (GGPP) kondenzuje s další molekulou díky fytoen syntáze, kterou je přeměněn ve dvou krocích až na 15-cis-fytoen. Z 15-cis-fytoenu vedou k all-trans-lykopenu 2 metabolické cesty. První se nachází u kvasinek a bakterií a zahrnuje působení pouze jednoho enzymu, a to fytoen desaturázy bakteriálního typu (CRTI). Druhá je složitější a nachází se u rostlin a sinic. Je nazývána jako poly-cis metabolická dráha a zahrnuje více kroků za účasti celkem 4 enzymů. Není ještě zcela jasné, proč ji dané organismy využívají, když je více komplexní a vede ke stejnému produktu. Pouze se předpokládá, že cis-intermediáty jednotlivých kroků dráhy mohou hrát roli jako signální molekuly v regulačních procesech. Celý proces je znázorněn na další straně na obrázku [26].

2.3.3.4 Syntéza karotenoidů z lykopenu

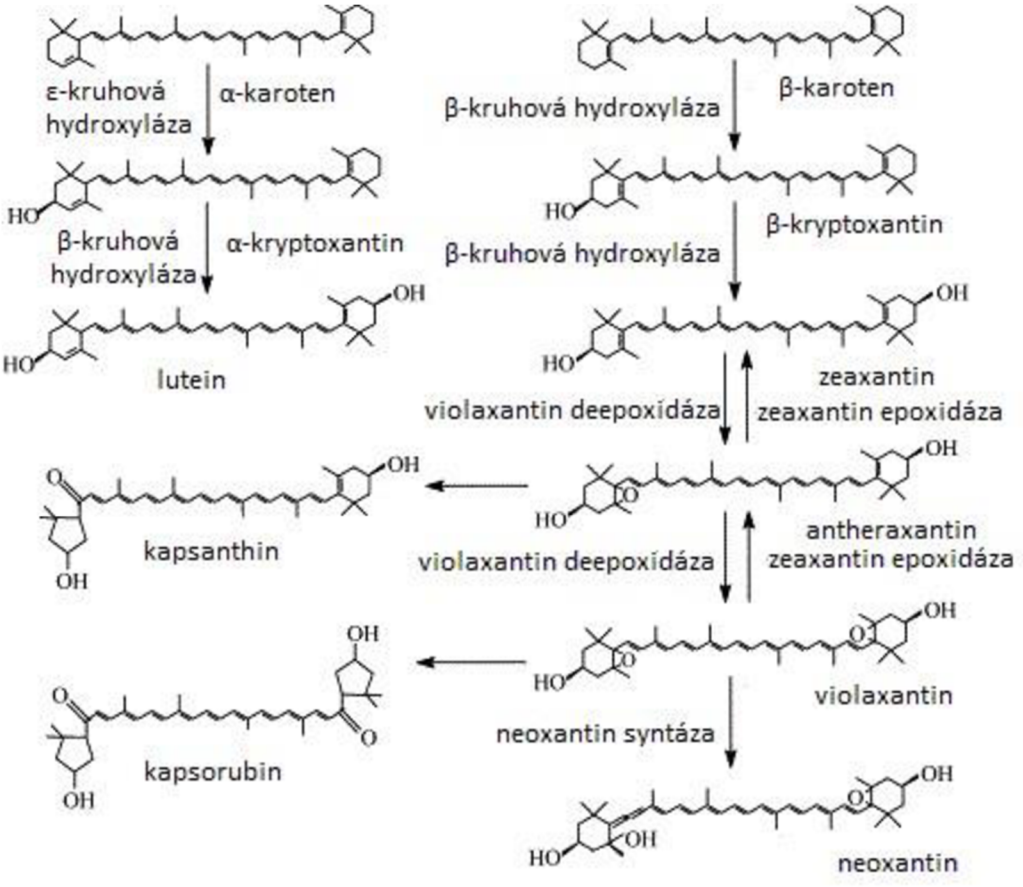
Vzniklý lykopen je podroben cyklizaci, při které je stočen jeden konec nebo oba konce molekuly do šestiuhlíkatého cyklu. Cyklus pak může být alfa nebo beta podle umístění dvojné vazby v kruhu, což závisí na typu enzymu, který reakci iniciuje. Enzymy způsobující cyklizaci jsou nazývány jako cyklázy (ε- a β-). Po dvojstupňové cyklizaci může vzniknout více typů karotenu, přičemž alfa a beta karoten slouží jako prekurzory pro další typy karotenoidů (viz Obrázek 10 a Obrázek 11) [27].



Obrázek č. 9 Schéma syntézy all-trans-lykopenu z isoprenoidových intermediátů jak u kvasinek, tak u řas – převzato a upraveno dle [26]



Obrázek č. 10 Syntéza α-karotenu a β-karotenu z lykopenu: převzato a upraveno dle [27]



Obrázek č. 11 Schéma syntézy různých karotenoidů z α-karotenu a β-karotenu: převzato a upraveno dle [27]

2.4 Lipidy

Lipidy jsou velmi rozmanitou skupinou přírodních látek, ať už z hlediska struktury, anebo funkce. Jejich společnou vlastností je tzv. hydrofobie, což znamená, že jsou odpuzovány vodou, tudíž se v ní ani nerozpouštějí. Naopak se dobře rozpouštějí v nepolárních organických rozpouštědlech, jimiž jsou např. diethylether, chloroform, hexan a toluen. Tato vlastnost však nemusí platit u tzv. složených lipidů, které disponují amfifilním charakterem. To znamená, že molekula obsahuje 2 části, z nichž je jedna polární a druhá nepolární [28], [29], [30].
Lipidy se dělí na 2 hlavní skupiny:

- Jednoduché: estery mastných kyselin s alkoholem
- Složené: estery mastných kyselin s alkoholem a nějakou další skupinou

Podle typu alkoholu dělíme jednoduché lipidy dále na tuky a vosky, přičemž tuky obsahují glycerol, vosky pak nějaký vyšší jednosytný alkohol. Nejvýznamnějšími tuky jsou acylglyceroly, konkrétněji pak triacylglyceroly, ve kterých jsou všechny 3 hydroxylové skupiny glycerolu nahrazeny zbytky mastných kyselin. Do skupiny složených lipidů pak mohou patřit např. fosfolipidy (v nich je „další skupinou“ zbytek kyseliny fosforečné), glykolipidy (obsahující navíc aminoalkohol sfingosin a sacharidovou složku), lipoproteiny a aminolipidy [28], [29].

Lipidy mají v organismech mnoho funkcí. Slouží jako bohatý zdroj energie, zvláště pak jako její rezervní zdroj. Stavební funkcí lipidů se rozumí fosfolipidy tvořící biomembrány (buněk, ale i organel), kde jsou tyto složené lipidy uspořádány do dvojvrstev. Pro živočichy je důležitá též ochranná funkce, ať už se jedná o vrstvy lipidů obalující vnitřní orgány živočichů proti mechanickému poškození, anebo podkožní tuk zabraňující ztrátám tepla. Lipidy jsou nepostradatelné taktéž pro vstřebávání některých vitaminů, které se v nich rozpouštějí (vitamín A, D, E a K) [31].

Jak již bylo zmíněno, lipidy obsahují mastné kyseliny. Jedná se o nerozvětvené karboxylové kyseliny, především se sudým počtem atomů uhlíku. Podle násobnosti vazeb mezi atomy uhlíku v řetězci je dělíme na nasycené a nenasycené. Nasycené mastné kyseliny neobsahují mezi atomy uhlíku násobné vazby, zatímco nenasycené tyto vazby obsahují. Nenasycené mastné kyseliny mohou mít buď jednu dvojnou vazbu, čímž jsou nazývány jako mononenasycené, pokud obsahují dvě a více dvojných vazeb, označují se jako polynenasycené (PUFA). Pokud jsou mastné kyseliny nenasycené, jednotlivé skupiny atomů nemohou rotovat kolem dvojných vazeb, ale jsou fixně vázány okolo osy dvojné vazby. Na základě této skutečnosti rozlišujeme dvě geometrické izomerie, a to cis a trans. U cis izomerie se nachází acylové skupiny na stejné straně, u trans je tomu opačně. Přírodně se vyskytující nenasycené mastné kyseliny mají převážně konfiguraci cis, která způsobuje značný ohyb molekuly (ten se zvětšuje se vzrůstajícím počtem dvojných vazeb s konfigurací cis) [28], [30].

Lipidy jsou důležitou součástí lidské stravy, zejména je nutno přijímat esenciální lipidy, anebo přímo ty mastné kyseliny, které si lidský organismus nedokáže sám syntetizovat. Jedněmi z takových lipidických látek jsou PUFA, zvláště pak kyselina dokosahexaenová (DHA) a arachidonová (ARA). Tyto 2 kyseliny nejsou obsaženy v rostlinných zdrojích, pouze v živočišných, navíc v malém množství. Bylo však zjištěno, že mastné kyseliny a lipidy mohou být produkovány mikroorganismy, čehož se začalo hojně využívat. Dané mikroorganismy se nazývají jako oleogenní, jedná se o zelené řasy a kvasinky, ale i houby nebo bakterie.

Oleogenní mikroorganismy uchovávají značné množství lipidů intracelulárně, jejichž hmotnostní podíl ze sušiny je vyšší než 20 %. Intracelulární úschova je nevýhodná v tom, že pro zisk lipidů je nutné buňky rozbít nebo rozložit, zároveň však ekonomicky co nejúsporněji. K akumulaci lipidů dochází především při vystavení buňky stresovému faktoru, jakým je například nedostatek klíčových živin pro růst a množení (touto živinou je např. dusík). Mikrobiálně produkované lipidy se však nevyužívají pouze v potravinářství, ale slouží i jako surovina pro výrobu bionafty, která je biodegradabilní, netoxická a obnovitelná [32], [33], [34], [35].

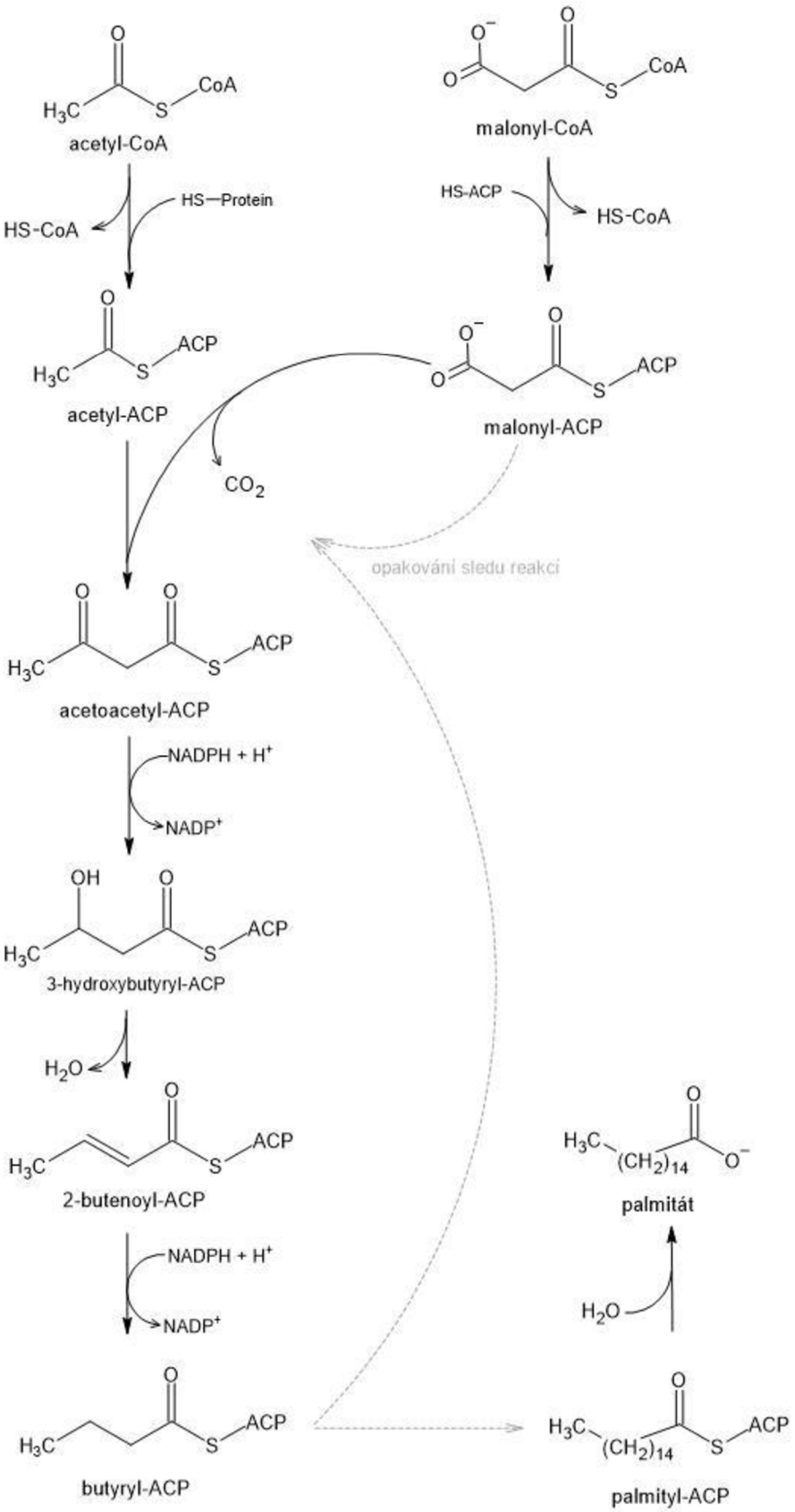
2.4.1 Metabolismus lipidů

Biosyntéza lipidů nastává v buňkách převážně z mastných kyselin a alkoholů (nejčastěji glycerolu). Sestává ze dvou částí, a to z biosyntézy mastných kyselin a biosyntézy triacylglycerolů [36].

2.4.1.1 Biosyntéza mastných kyselin

Na rozdíl od rozkladu mastných kyselin zvaného jako β-oxidace, která probíhá v mitochondriích, jejich syntéza probíhá v cytosolu buňky. Výchozí látkou je však acetyl-CoA, který se nachází v mitochondriích. Jeho prostup membránou mitochondrie je možný až po úpravě. Tou se rozumí dvě možnosti, a to navázání na karnitin, nebo přeměna na citrát, až potom je možný přesun vně mitochondrii. Katalyzátorem biosyntézy není samostatný enzym, nýbrž multienzymový komplex (syntetáza mastných kyselin). V něm se nachází důležitý přenašeč acylových skupin, nazývaný jako ACP (acyl carrier protein) [29], [36].

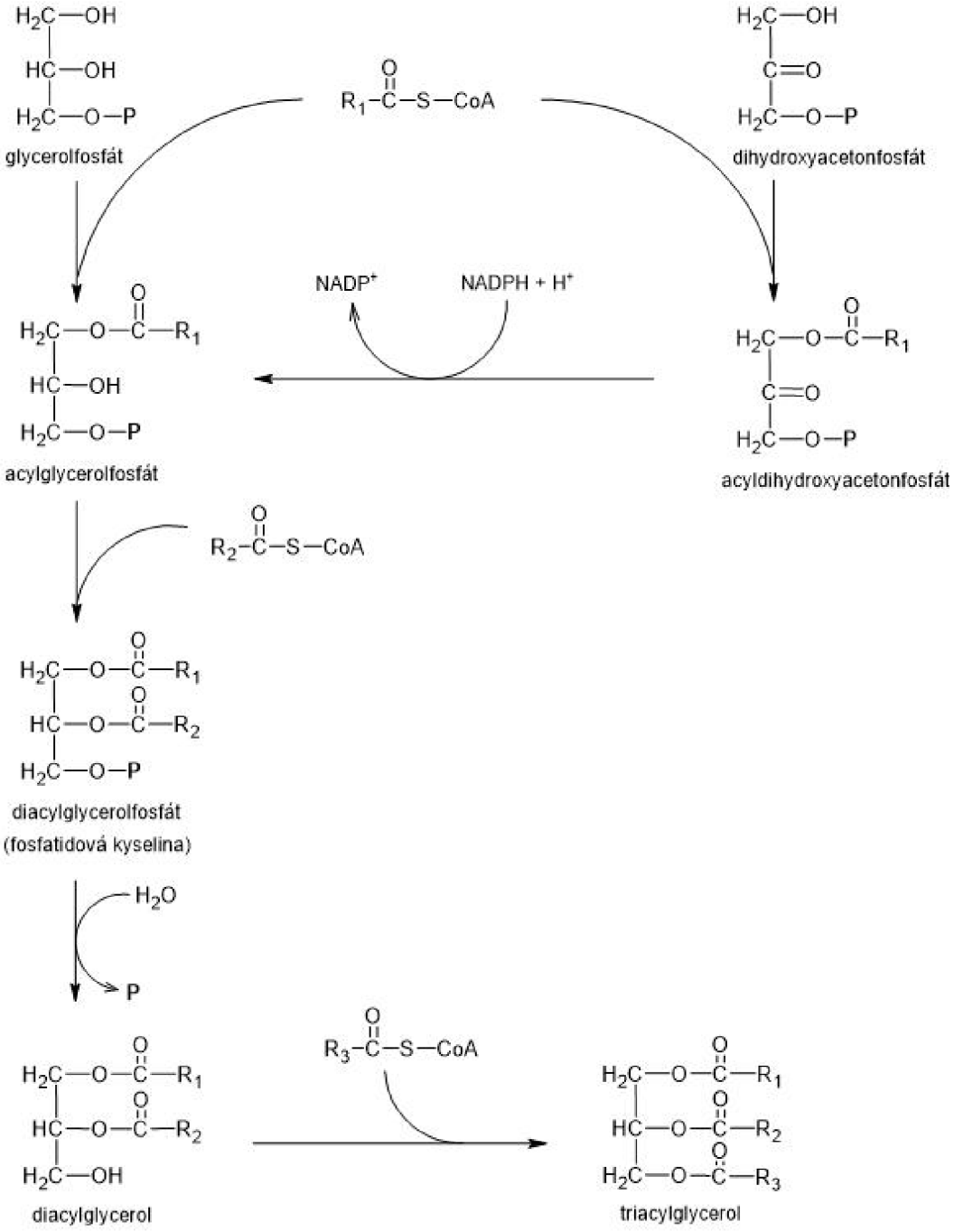
První krok celé metabolické dráhy je aktivace acetyl-CoA oxidem uhličitým, čímž vznikne malonyl-CoA. Na něj se dále váže výše zmíněný ACP, který nahradí odstupující koenzym A. Vzniklý malonyl-ACP reaguje s acetyl-ACP (který vznikl z acetyl-CoA) při současné dekarboxylaci na meziprodukt acetoacetyl-ACP. Ten je dále redukován, dehydratován a znovu redukován, čímž vznikne butyryl-ACP. Zde nastává návrat sloučeniny k začátku dráhy, kde reaguje znovu s malonyl-ACP za současné dekarboxylace, čímž se zvýší počet uhlíků o 2. Sled reakcí se opakuje, tedy nastává znovu redukce, dehydratace a další redukce. Produkt se znovu vrací a cyklus se tímto způsobem opakuje až do požadované délky řetězce podle toho, jaká mastná kyselina má vzniknout. Například u šestnáctiuhlíkaté kyseliny palmitové je cyklus opakován do dosažení palmityl-ACP. Ten se však již do cyklu nevrací a nekondenzuje s malonyl-ACP, ale hydratuje se, čímž je vytvořen palmitát za současného odstoupení ACP. Redukce v této biosyntéze zastává $NADPH+H^+$, který vzniká v organismu v tzv. pentózovém cyklu, u řas (jakožto fototrofů) ale také ve světelné fázi fotosyntézy. Schéma procesu vzniku mastných kyselin je uvedeno na další straně. Uvedený palmitát jako konečný produkt slouží mnohdy jako prekurzor při vzniku jiných mastných kyselin, a to i nenasycených. Při těchto syntézách se uplatňují skupiny enzymů zvané elongázy a desaturázy [29], [36].



Obrázek č. 12 Schéma biosyntézy mastných kyselin – vytvořeno v programu Chemsketch podle [36]

2.4.1.2 Biosyntéza triacylglycerolů

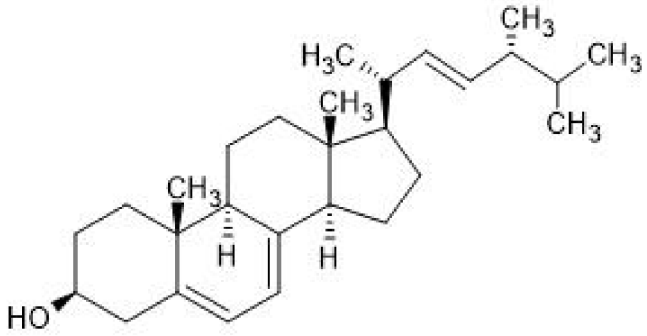
Do dráhy vstupují glycerolfosfát a mastná kyselina vytvořená v předchozí metabolické dráze, na kterou je však navázán CoA. Tyto acyly mastných kyselin se přenášejí dva, čímž vznikne fosfatidová kyselina. Dané dvě po sobě následující reakce zprostředkovávají enzymy acyltransferázy. Následně není hned přidán třetí acyl, ale nejdříve se za pomocí hydratace odštěpí fosfát. Až v dalším a zároveň posledním kroku je acyl vnesen na diacylglycerol, čímž vznikne produkt celé dráhy, a to triacylglycerol [29], [36].



Obrázek č. 13 Schéma syntézy triacylglycerolu [36]

2.5 Ergosterol

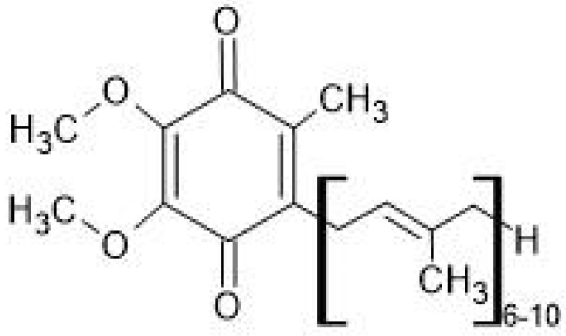
Jedná se o steroid nacházející se v kvasinkách a houbách. V kvasinkách se podílí na regulaci enzymu proteinkinázy, jež je nezbytná pro růst buněk. Ergosterolu se využívalo i k indikaci plísní v potravinách, které ho syntetizují. Bylo dokonce zjištěno, že při definovaných podmínkách množství ergosterolu závisí na počtu plísňových kolonií velmi přesně. Proto je jeho stanovení teoreticky možné využít i pro kvantifikaci plísní. Ergosterol je nepolární, tudíž se rozpouští v lipidech, nikoliv ve vodě. Strukturně je podobný cholesterolu, důležité steroidní látce. Význam ergosterolu pro nás spočívá v jeho přeměně na vitamín D_2 při jeho vystavení ultrafialovému záření. Z toho důvodu je nazýván jako provitamin D. Je potřeba však rozlišovat vitamín D_2 a D_3, tedy ergokalciferol a cholekarciferol. Ergosterol se využívá komerčně, zejména produkcí kvasinek, kdy je následně přeměněn na vitamín užívaný jako doplněk stravy [37], [38].



Obrázek č. 14 struktura molekuly ergosterolu [39]

2.6 Ubichinon

Jedná se o látku s chinoidní strukturou, jinak nazývanou jako koenzym Q_{10}. Název koenzym Q je zavádějící, protože může označovat i např. koenzym Q_7, Q_8 nebo Q_9. Číslo v dolním indexu udává, kolik izoprenoidních jednotek molekula obsahuje. Díky tomuto izoprenoidnímu řetězci je ubichinon lipofilní, tedy rozpustný v tucích a nerozpustný ve vodě. Ubichinon je nezbytným kofaktorem v mitochondriální membráně při oxidativní fosforylaci, která slouží k vytváření ATP. Nejvyšší koncentrace ubichinonu lze nalézt ve tkáních s vysokou metabolickou aktivitou, kde se musí přeměňovat energie ze živin na ATP velmi rychle (např. v srdci, kosterních svalech a játrech). Chinoidní jádro molekuly je pak důležité pro antioxidační vlastnosti, protože zachycuje škodlivé volné radikály. Ačkoliv je koenzym Q_{10} látkou, kterou náš organismus sám syntetizuje, při stárnutí jsou jeho koncentrace mnohem nižší. Z tohoto důvodu se využívá i jako suplement volně dostupný v lékárnách, doporučovaný především ve vyšším věku. Dříve se vyráběl synteticky, nicméně díky narůstajícímu ekologickému smýšlení společnosti, snažícímu se omezit vedlejší odpadní produkty a snížit energetické nároky, je dnes produkován mikroorganismy fermentací v bioreaktorech. V kvasinkách vzniká ubichinon v mitochondriích (u člověka i na Golgiho aparátu). Je nutno podotknout, že izopentenylfosfát pro syntézu izoprenoidního řetězce vzniká mevalonátovou metabolickou drahou nebo MEP drahou, které již byly popsány výše (viz 2.3.3 Biosyntéza karotenoidů). Mutace v genech pro syntézu ubichinonu mohou vést u člověka k fatálním důsledkům, z čehož lze vidět, jak je v organismu důležitý [40], [41], [42], [43].



Obrázek č. 15 Struktura Koenzymu Q (ubichinon obsahuje 10 izoprenových jednotek) [44]

2.7 Stresové faktory

Při mikrobiální produkci karotenoidů, chlorofylů a lipidických látek je nutno sledovat zejména jejich výtěžek. Aby byl co největší, bylo zkoumáno působení různých faktorů při kultivacích. Došlo k uplatnění tzv. stresových faktorů, které se dělí na chemické a fyzikální. Stresové faktory mikroorganismy negativně ovlivňují a mají tendenci zvyšovat produkci a akumulaci některých metabolitů, zejména těch ochranných. Např. karotenoidní látky působí jako antioxidační činidla, díky čemuž vychytávají volné radikály, které jsou pro mikroorganismy nebezpečné. S rostoucí akumulací těchto intracelulárních metabolitů se tím pádem zvyšuje šance mikroorganismů na přežití při působení negativních vlivů. Mezi fyzikální stresové faktory patří světelný a tepelný stres, chemickým stresem se označuje přidání chemických látek do média. Takovými látkami mohou být např. anorganické soli, oxidační činidla (peroxid vodíku), fenol a methylenová modř. Stresovým faktorem pro mikroorganismy však nemusí být pouze jejich vystavení chemickým látkám nebo fyzikálním vlivům, ale také snížení koncentrace živiny v médiu, např. dusíku [49], 0.

Některé stresové faktory mění u kvasinek karotenoidní profil, tedy mohou inhibovat určitý karotenoid, zatímco produkci jiného zvýšit. Daná situace byla sledována u *Rhodotorula mucilaginosa* a *Rhodotorula glutinis* pro nikotin, který potlačuje zacyklení při syntéze β-karotenu. Jeho prekurzorem je však lykopen, tudíž roste výtěžnost tohoto metabolitu. Oproti tomu působí difenylamin, jež akumulaci β-karotenu naopak zvyšuje [51].

Regulace karotenogeneze je poměrně dobře prozkoumána u kvasinky *Xanthophyllomyces dendrorhous*, jejímž hlavním karotenoidem je astaxanthin. Daný druh kvasinky je pro jeho produkci již využíván v průmyslu, a to zejména díky schopnosti zvýšení produkce vhodnými podněty. Těmi jsou právě stresové faktory, z nichž se nejvíce uplatňuje peroxid vodíku. Přestože produkce astaxanthinu při jeho působení vzrůstá, děje se tak na úkor obsahu β-karotenu [51], [52].

Zvýšení produkce karotenoidů a lipidických látek byla a je zkoumána hojně i u mikrořas. V jejich kultivaci spočívá velký potenciál, protože na rozdíl od vyšších rostlin nevyžadují tolik prostoru, rychleji rostou a koncentrace významných látek je v biomase vyšší. Ačkoliv průmyslová produkce mikrořas pro komerční účely není ve světě ještě tolik rozšířena, zejména poslední 4 desetiletí se rozvíjí tzv. scale-up proces. Ten je charakterizován přechodem produkce biomasy z laboratorního prostředí do většího měřítka ve velkých průmyslových zařízeních. Přesun do průmyslového zařízení však již nastal u řasy *Haematococcus pluvialis*, jež se využívá k produkci astaxanthinu. Zde je ke zvýšení produkce využito právě stresu, konkrétně

světelného. Kultivace je zpravidla dvoukroková. V prvním kroku je dbáno na co nejvyšší nárůst biomasy, tudíž je řasa vystavena vhodným podmínkám s dostatkem živin. Ve druhém kroku je biomasa vystavena světelnému stresu, často navíc i nedostatku nutrientů v médiu. To má za následek omezení množení buněk, ale zvýšení syntézy a akumulace astaxanthinu. Přestože se ve světě již nachází více než 10 průmyslových zařízení sloužících k produkci astaxanthinu řasou *Haematococcus pluvialis*, výzkum pro zvýšení efektivity stále probíhá z důvodu vysokých nákladů kultivací [53], [54].

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je studium produkčních vlastností vybraných mikroorganismů ve stresových podmínkách. V této práci budou řešeny následující dílčí cíle:

- Přehledná literární rešerše zaměřená na vybrané kmeny mikroorganismů
- Screeningová kultivace vybraných kmenů mikroorganismů za stresových podmínek
- Optimalizace složení produkčních médií
- Optimalizace kultivace a aplikace stresových faktorů
- Příprava a izolace různých extraktů z buněčné biomasy a jejich charakterizace
- Srovnání produkčních vlastností vybraných kmenů mikroorganismů
- Vyhodnocení výsledků

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie pro kultivaci mikrořas a sinic

Agar-Agar, Roth (SRN)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Dusičnan kobaltnatý hexahydrát p.a., Sigma-Aldrixh (SRN)
Dusičnan sodný p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Ethylendiamintetraacetát sodný dihydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Hydrogenfosforečnan draselný, Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Hydrogenuhličitan sodný p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Hydroxid draselný p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Chlorid manganatý tetrahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Chlorid sodný p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Chlorid železitý hexahydrát p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Kyanokobalamin p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Kyselina boritá p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Kyselina ethylendiamintetraoctová p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Kyselina sírová 96% p.a., Penta (ČR)
Molybdenan sodný dihydrát p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Oxid molybdenový p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Síran draselný p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Síran kobaltnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Síran manganatý heptahydrát p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Síran měďnatý pentahydrát p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Síran železnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Uhličitan sodný p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)

4.1.2 Chemikálie pro kultivaci kvasinek

Agar-Agar, Roth (SRN)
D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Glycerol p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Chlorid sodný p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Chlorid železitý p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Kvasničný autolyzát, Himedia (Indie)
Močovina p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Pepton, Roth (SRN)
Síran kobaltnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)

4.1.3 Chemikálie pro extrakce

Aceton p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
Acetonitril pro HPLC, Penta (ČR)
Ethylacetát pro HPLC, Penta (ČR)
Chloroform p.a., Penta (ČR)
Kyselina sírová 96% p.a., Penta (ČR)
Methanol pro HPLC, Penta (ČR)

4.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy Boeco (SRN)
Box Aura Mini BioTech (ČR)
Centrifuga Sigma Laborzentrifugen (SRN)
GKB Color Digital CCD kamera (Tchaiwan)
Lyofilizátor Labconco FreeZone 4.5 Freeze Dryer (USA)
Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)
Spektrofotometr VIS, Helios δ, Unicam (GB)
Termoblok SBH 130, Stuart (GB)
Třepačka Yellow line (SRN)
HPLC/MS sestava (Thermo Fisher Scientific, USA):

- Dionex ultimate series 3000 pump
- Dionec ultimate series 3000 autosampler
- Kolona kinetex EVO c18 150×4.6×2.6
- Thermo Fisher Vanquish detector
- Vyhodnocovací systém Chromeleon

GC sestava Thermo Scientific TRACE^{TM} 1300 (Thermo Fisher Scientific, USA):

- Kolona Zebron ZB-FAME, 30 m×0,25 mm×0,20 μm, Phenomenex
- Thermo Scientific AI 1310 Autosampler
- Detektor FID (Thermo Fisher Scientific, USA)

4.3 Použité kmeny mikroorganismů

4.3.1 Mikrořasy

Arthrospira maxima CCALA 030
Scenedesmus obliquus CCALA 455

4.3.2 Sinice

Synechococcus nidulans CCALA 188
Anabaena torulosa CCALA 003

4.3.3 Kvasinky

Cystofilobasidium macerans CCY 17-9-3
Rhodotorula kratochvilovae CCY 20-2-26
Rhodotorula mucilaginosa CCY 19-4-6
Rhodosporidium toruloides CCY 062-002-004
Sporidiobolus pararoseus CCY 19-9-6

4.4 Kultivace mikroorganismů

4.4.1 Kultivace mikrořas a sinic

Mikřořasy a sinice byly zaočkovány ze zásobních kultur, a to do BBM média, jehož složení je uvedeno v následujících tabulkách (viz Tabulka č. 1 a Tabulka č. 2), řasa *Arthrospira maxima* byla zaočkována do *Spirulina* médium (složení viz Tabulka č. 3 a Tabulka č. 4). Po dostatečném nárůstu biomasy byla část přeočkována do provzdušňovací Pyrex láhve s produkčním médiem (BBM nebo *Spirulina* médium).

Tabulka č. 1 Složení BBM média

Složka	Zásobní roztok [g/l dH2O]	Množství na 1 l [ml]
$NaNO_3$	25,00	10
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,50	10
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,50	10
K_2HPO_4	7,50	10
KH_2PO_4	17,50	10
NaCl	2,50	10
EDTA	-	1
Acidified iron	-	1
H_3BO_3	11,42	1
Trace metals	-	1

Tabulka č. 2 Složení částí BBM média

Roztok	Složka	Množství [g/l]
EDTA	EDTA	50,00
	KOH	31,00
Acidified iron	$FeSO_4 \cdot 7H2O$	4,98
	H_2SO_4 (96 %)	1 ml
Trace metals	$ZnSO_4 \cdot 7H2O$	8,82
	$MnCl_2 \cdot 4H2O$	1,44
	MoO_3	0,71
	$CuSO_4 \cdot 5H2O$	1,57
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H2O$	0,49

Tabulka č. 3 Složení Spirulina média

složka	Množství [g/l]
$NaHCO_3$	13,61
Na_2CO_3	4,03
K_2HPO_4	0,50
$NaNO_3$	2,5
K_2SO_4	1,0
NaCl	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,04
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01

složka	Množství [g/l]
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,08
Trace metals	5 ml (složení viz Tabulka č. 4)
Vitamin solution	1 ml (složení viz Tabulka č. 4)

Tabulka č. 4 Složení částí Spirulina média

	Složka	Zásobní roztok [g/l dH2O]	Množství na 1 l
Trace metals	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	-	0,5 g
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	-	0,7 g
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1,0	1 ml
	$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	2,0	1 ml
	H_3BO_3	10,0	1 ml
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	1,0	1 ml
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	1,0	1 ml
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,005	1 ml
Vitamin sol.	kyanokobalamin	-	0,005 g

4.4.1.1 Aplikace stresových faktorů

Z produkčního média bylo do 250ml Erlenmeyerovy baňky odměrným válcem nalito 100 ml média obsahujícího biomasu. Do sady baněk byly pipetovány roztoky chloridu železitého a síranu kobaltnatého (složení a pipetované objemy viz Tabulka č. 5). Při aplikaci chloridu sodného byly jednotlivé navážky připraveny do baněk již před přidáním 100 ml média s biomasou (navážky viz Tabulka č. 6). Kontrolní vzorek neobsahoval přídavek žádné soli, zde byla přítomnost solí pouze z produkčního média. Řasové i sinicové kultury byly ponechány na třepačkách pod vlivem stresů celkem 72 hodin.

Tabulka č. 5 Koncentrace iontů kovů zásobních roztoků a pipetované objemy roztoků

Zásobní roztok a koncentrace iontu kovu	Koncentrace iontu kovu při kultivaci [mmol/l]	Pipetovaný objem zásobního roztoku [µml]
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,189 mol/l Fe^{3+}	0,1	53,0
	0,2	106,0
	0,3	159,0
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,183 mol/l Co^{2+}	0,1	54,5
	0,2	109,5
	0,3	164,5

Tabulka č. 6 Navážky chloridu sodného v roztocích o dané koncentraci

Koncentrace NaCl při kultivaci [mol/l]	Navážka NaCl [g]
0,5	2,92
1,0	5,85
1,5	8,75
2,0	11,70

4.4.2 Kultivace kvasinek

Kvasinkové kultury byly zaočkovány z kryozkumavky na Petriho misku s YPD agarem. Po 72 hodinách proběhlo přeočkování do YPD média (inokulum I). Z inokula I bylo vykonáno přeočkování do inokula II po 24 hodinách, taktéž do YPD média (složení je uvedeno v Tabulce č. 7). Z inokula II bylo přeočkováno 70 ml do provzdušňovací pyrex láhve do produkčního média (složení viz Tabulka č. 8).

Tabulka č. 7 *Složení agarového média v Petriho miskách a YPD média pro inokula I a II*

	YPD agar	YPD médium
Složka	Koncentrace (g/l)	Koncentrace (g/l)
Agar-agar	20	-
Kvasničný autolyzát	10	10
Pepton	20	20
Glukóza	20	20

Tabulka č. 8 *Složení produkčního média pro kultivaci kvasinek*

Složka	Koncentrace (g/l)
KH_2PO_4	4,00
$MgSO_4 \cdot 7H2O$	0,70
močovina	1,91
glycerol	46,46

4.4.2.1 Aplikace stresových faktorů

Z produkčního média bylo po 72 hodinách přelito 20 ml kultury do 100ml Erlenmeyerovy baňky. Poté byla do jednotlivých baněk pipetována daná množství roztoků chloridu železitého a síranu kobaltnatého (viz Tabulka č. 9). Chlorid sodný byl do baněk navážen předem (navážky soli jsou uvedeny v Tabulce č. 10). Kontrolní vzorek opět neobsahoval přídavek žádné ze solí, pouze těch obsažených v médiu. Na rozdíl od řasových a sinicových kultur byly kvasinkové kultury na třepačkách ponechány vlivu stresů pouze 24 hodin.

Tabulka č. 9 *Koncentrace iontů kovů zásobních roztoků a pipetované objemy roztoků*

Zásobní roztok a koncentrace iontu kovu	Koncentrace iontu kovu při kultivaci [mmol/l]	Pipetovaný objem zásobního roztoku [μml]
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,189 mol/l Fe^{3+}	0,1	10,6
	0,2	21,2
	0,3	31,8
	0,4	42,4
	0,5	53,1
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,183 mol/l Co^{2+}	0,1	10,9
	0,2	21,9
	0,3	32,9
	0,4	43,8
	0,5	54,8

Tabulka č. 10 Navážky chloridu sodného v roztocích o dané koncentraci

Koncentrace NaCl při kultivaci [mol/l]	Navážka NaCl [g]
0,5	0,58
1	1,17
1,5	1,75
2	2,34

4.5 Stanovení intracelulárních metabolitů

4.5.1 Stanovení koncentrace biomasy

Po uplynutí konečné fáze kultivace, jíž bylo působení stresových faktorů, byla část média s biomasou slita do centrifugačních zkumavek. Kvasinkové kultury bylo slito 15 ml, řasové a sinicové kultury bylo slito vždy 70 ml. Ve zkumavkách byly kultury podrobeny centrifugaci, řasy a sinice při 8500 rpm po dobu 4 minut, kvasinky při 4500 rpm po stejnou dobu. Supernatant byl odlit, biomasa byla promyta destilovanou vodou a následně zcentrifugována za stejných podmínek. V konečné fázi byl supernatant odlit a kultura byla zmrazena. Po vyjmutí byla centrifugační zkumavka se zmraženou biomasou vložena do lyofilizátoru po dobu 24 hodin. Po lyofilizaci byla biomasa zvážena na analytických vahách a uchována v mrazničce pro následovné extrakce.

4.5.2 Extrakční postupy pro HPLC analýzu

Nejprve bylo naváženo 15–20 mg zlyofilizované biomasy s přesností na 1 desetinné místo miligramu do plastové Eppendorf zkumavky. Poté byl přidán 1 ml destilované vody pro hydrataci buněk po dobu 30 minut. Následně byla biomasa zcentrifugována při 2000 rpm po dobu 1 minuty. Supernatant byl odlit a do zkumavky k biomase byly přidány skleněné kuličky a 1 ml methanolu. Směs byla umístěna do vortexu po dobu 10 minut, díky čemuž došlo k dezintegraci buněk. Zvortexovaná směs byla přelita do 15ml centrifugační zkumavky s 2 ml chloroformu (stabilizovaného ethanolem o obsahu 1 %). Znovu byla směs 10 minut vortexována, poté byl do zkumavky přidán 1 ml destilované vody a po dobu 1 minuty byla i tato směs ponechána ve vortexu. Zkumavky byl vyjmuty z vortexu a umístěny do centrifugy na 1 minutu při 2000 rpm. Ze vzniklých 2 oddělených fází byla spodní chloroformová odpipetována kvantitativně do skleněné zkumavky. Pod proudem dusíku při zvýšené teplotě na 40 °C byl chloroform odpařen. Po odpaření zde byl napipetován 1 ml směsi 1:2 ethylacetátu:acetonitrilu, ve které byla vysušená pevná část rozpuštěna. Konečným krokem bylo přefiltrování směsi přes PTFE filtry do vialky.

4.5.3 Extrakční postupy pro GC analýzu

Nejprve bylo naváženo 10–15 mg zlyofilizované biomasy s přesností na 1 desetinné místo miligramu do krymplovací skleněné vialky. Pipetou bylo přidáno 1,8 ml transesterifikační směsi, která je tvořena 15 % hmotnostními H_2SO_4 v HPLC methanolu, ve kterém je ještě rozpuštěno 0,5 mg/ml interního standardu C_{17}. Po napipetování směsi byla vialka zakrymplována a ponechána v termobloku při 85 °C po dobu 120 minut. Po uvedené době a vychladnutí byl obsah vialky převeden do 5ml vialky společně s 0,5 ml NaOH koncentrace

0,05 mol/l a 1 ml HPLC hexanu. Zašroubovaná vialka byla vložena do vortexu po dobu 10 minut. Ze vzniklých dvou fází bylo odpipetováno 100 µl horní čiré hexanové fáze do vialky, do které bylo následně přidáno ještě 900 µl HPLC hexanu.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

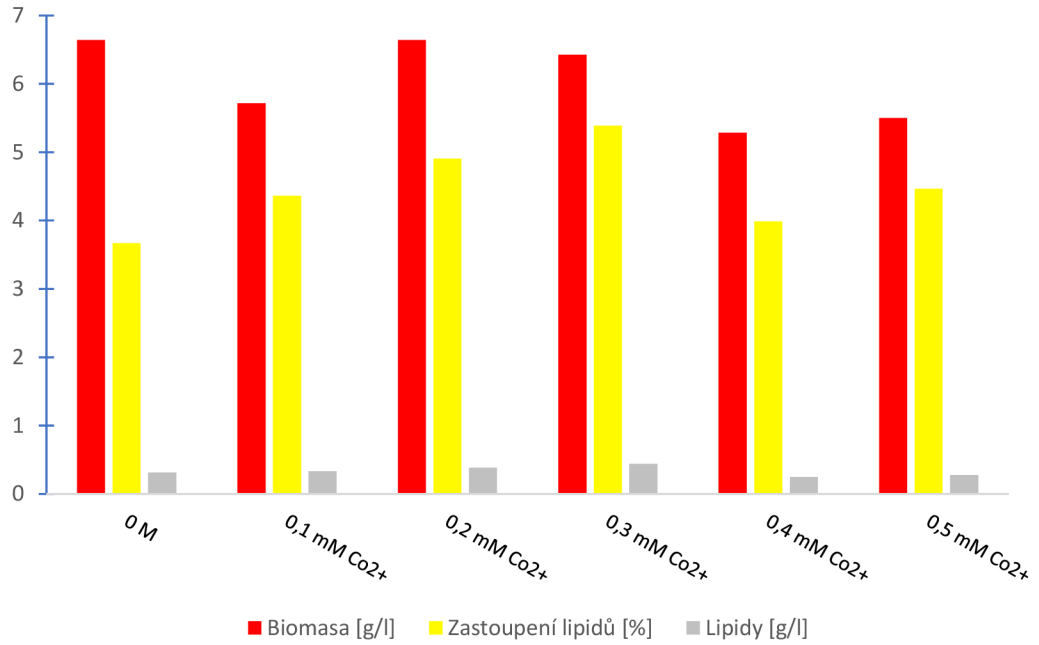
5.1 Aplikace terminálních stresů na zástupce karotenogenních kvasinek

V rámci tohoto experimentu byly jednotlivé kmeny kvasinek kultivovány v aerovaných lahvích Pyrex, a to na médiích uvedených v kapitole 4.4.2. Po 72 hodinách v produkčních médiích byla kvasinková kultura rozdělena do Erlenmeyerových baněk s různými koncentracemi vybraných stresových faktorů. Po 24 hodinách působení terminálních stresů byly kultury zpracovány, zlyofilizovaná biomasa byla podrobena extrakčním postupům (viz kapitola 4.5) a následně byly vzorky analyzovány chromatograficky. Pomocí GC-FID byl stanoven obsah lipidů a profil mastných kyselin. Analýza HPLC-PDA byla využita ke stanovení karotenoidních barviv (torularhodin, torulen, betakaroten, lykopen a celkové karotenoidy), ergosterolu a ubichinonu. Výsledky chromatografických analýz jsou uvedeny v následujících grafech. HPLC výsledky produkce stanovovaných metabolitů jsou uvedeny v miligramech, které jsou vztaženy na gram suché biomasy.

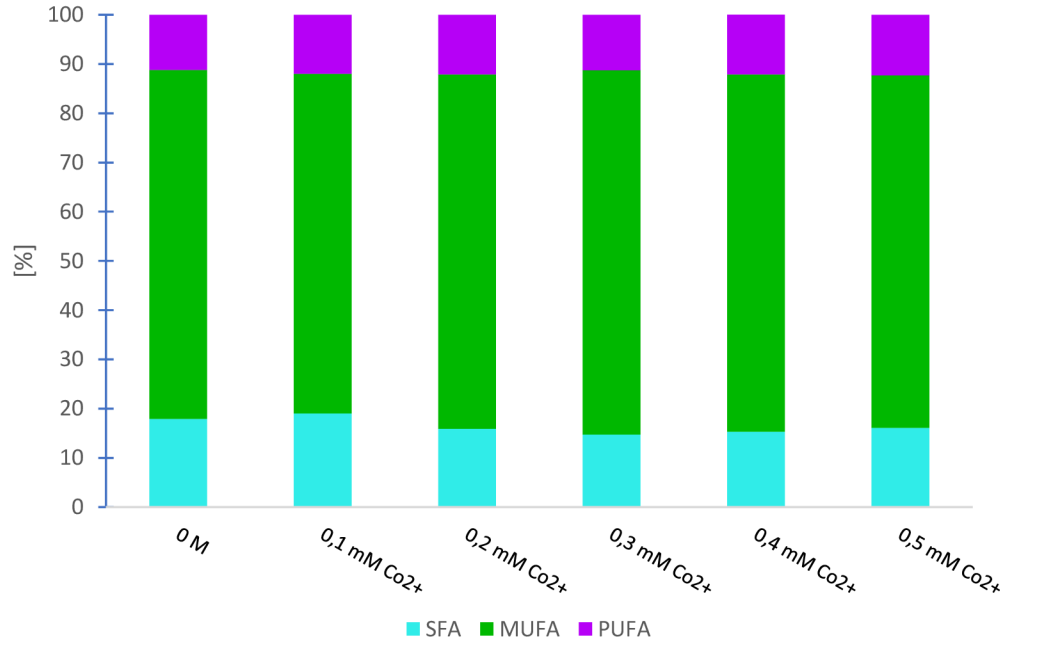
5.1.1 Produkční vlastnosti kmene *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6

Výsledky chromatografické analýzy lipidických látek kmene *S. pararoseus* kultivovaného na médiích s 5 různými koncentracemi Co^{2+} jsou zobrazeny na následujících grafech (Obrázek č. 16 a Obrázek č. 17). Z grafu (Obrázek č. 17) je patrné, že koncentrace biomasy byla při působení kobaltnatých iontů spíše nižší, v médiu s koncentrací Co^{2+} 0,2 mmol/l dosahovala stejné koncentrace jako u kontrolního vzorku. Zřetelný je však nárůst zastoupení lipidů v biomase, jehož maximum nastává při koncentraci 0,3 mmol/l Co^{2+}, kde činí 5,4 %. Oproti kontrolnímu vzorku, jehož zastoupení lipidů v biomase dosahuje 3,7 % a ve kterém chemický stresový faktor nebyl aplikován, je hodnota podstatně vyšší. Profil mastných kyselin na základě jejich nasycenosti se příliš neměnil, mírný nárůst byl zaznamenán u PUFA. Zde bylo dosaženo jejich nejvyššího zastoupení u média s koncentrací 0,5 mmol/l Co^{2+}, a to 12,26 %. Kontrolní vzorek jich poté obsahoval pouze 11,18 %.

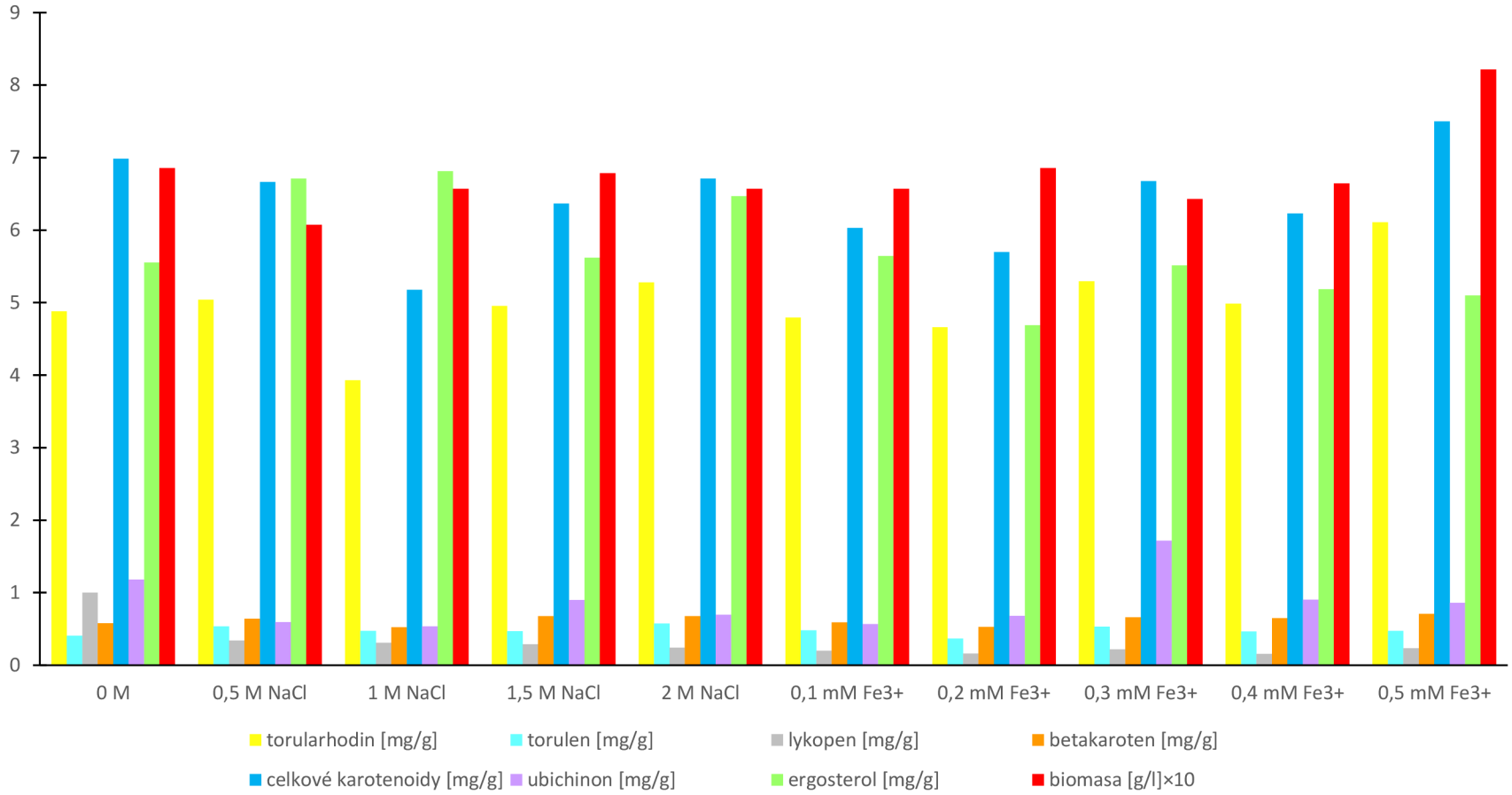
Výsledky analýzy karotenoidních látek, ergosterolu a ubichinonu kmene *S. pararoseus* kultivovaného na médiích se 3 různými stresy jsou uvedeny v následujících grafech (Obrázek č. 18 a Obrázek č. 19). Z nich je patrno, že obsah celkových karotenoidů se při stresování pomocí všech 3 solí snižuje, výjimka nastává u nejvyšší koncentrace Fe^{3+} v médiu, kde je obsah celkových karotenoidů 7,500 mg/g. Zde byla jejich produkce zvýšena oproti kontrolnímu vzorku (0 M), kde činí pouze 6,984 mg/g. Mírné zvýšení produkce nastalo i u média s koncentrací 0,4 mmol/l Co^{2+}, a to na 6,055 mg/g oproti kontrolnímu vzorku s obsahem 5,649 mg/g celkových karotenoidů. Významnější je pak stresové ovlivnění pigmentu torularhodinu pomocí NaCl i Fe^{3+}. Zde je patrný trend nárůstu obsahu torularhodinu při zvyšující se koncentraci soli. Zatímco výtěžnost torularhodinu u kontrolního vzorku dosahuje 4,881 mg/g, u média s koncentrací 2 mol/l NaCl činí 5,279 mg/g, při nejvyšší koncentraci Fe^{3+} dokonce 6,109 mg/g. Ač obsah ubichinonu při kultivacích s NaCl spíše klesal, u Fe^{3+} nastal markantní nárůst v médiu o koncentraci 0,3 mmol/l. Co se týče ubichinonu, je nutno zmínit jeho nadprodukci v médiích obsahujících Co^{2+}, ve kterém lze sledovat postupný nárůst až do maxima při 0,3 mmol/l Co^{2+}. Ergosterol v médiích s Co^{2+} kopíruje trend růstu stejně jako při ubichinonu, opět s maximem při 0,3 mmol/l Co^{2+}.



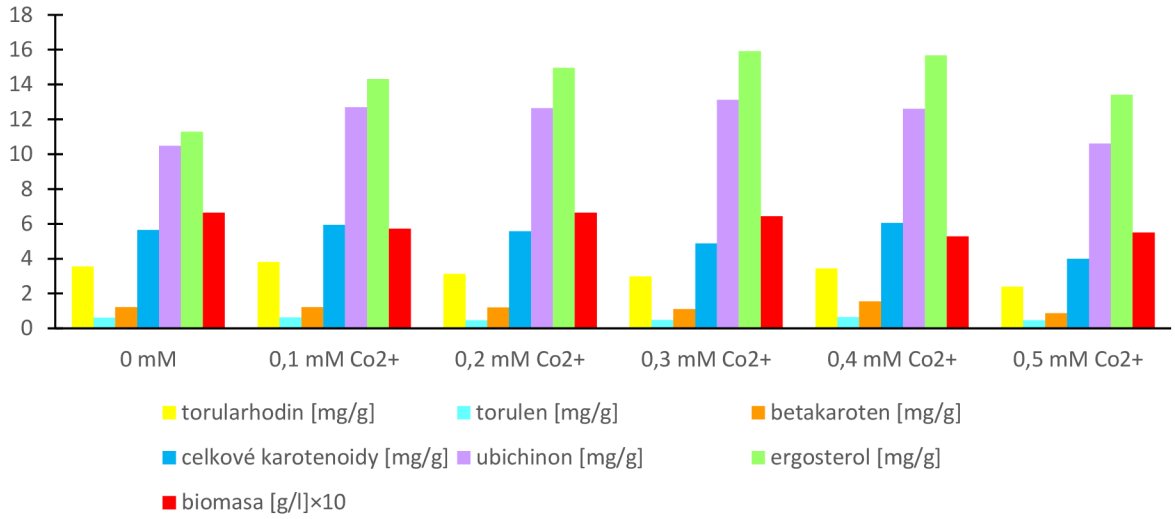
Obrázek č. 16 GC analýza kmene Sporidiobolus pararoseus kultivovaného na médiích se solným stresem Co^{2+}



Obrázek č. 17 GC analýza zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene Sporidiobolus pararoseus při kultivaci za aplikace solného stresového faktoru Co^{2+}



Obrázek č. 18 HPLC analýza zastoupení karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu u kmene Sporidiobolus pararoseus kultivovaného na médiích se solným stresem indukovaným NaCl a Fe^{3+}

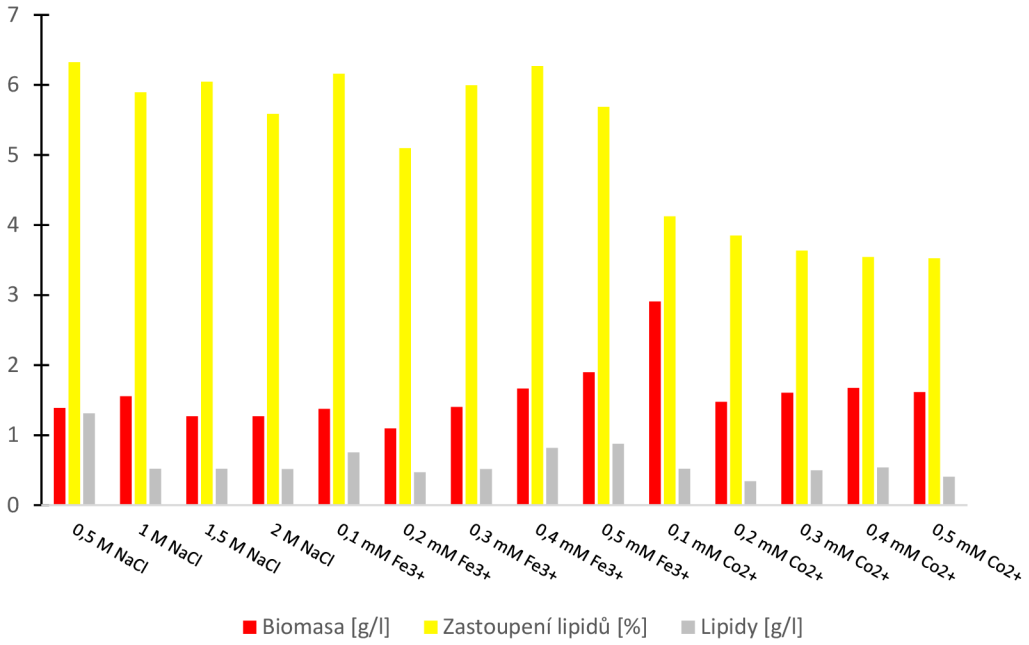


Obrázek č. 19 HPLC analýza zastoupení karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu u kmene Sporidiobolus pararoseus kultivovaného na médiích se solným stresem indukovaným Co^{2+}

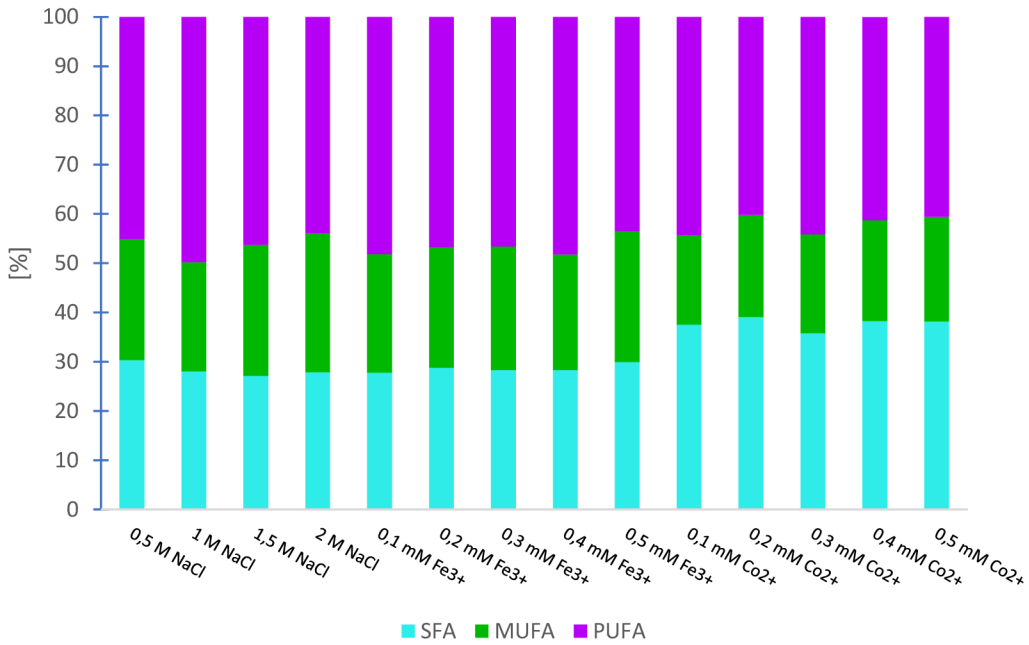
5.1.2 Produkční vlastnosti kmene *Cystofilobasidium macerans* CCY 17-9-3

Výsledky chromatografické analýzy lipidických látek kmene *C. macerans* kultivovaného na médiích se 3 různými solnými stresy jsou zobrazeny na následujících grafech (Obrázek č. 20 a Obrázek č. 21). Z grafů lze vypozorovat zejména nárůst biomasy se zvyšující se koncentrací iontů Fe^{3+} až do maxima při nejvyšší koncentraci iontů (0,5 mmol/l). Zbylé 2 stresové faktory nevykazují určitý trend v nárůstu nebo poklesu množství biomasy. Zastoupení lipidů v biomase u stresů NaCl a Co^{2+} značí mírný pokles, zatímco u iontů Fe^{3+} nastává opačná situace, kdy obsah lipidů vzrůstá do maxima při 0,4 mmol/l Fe^{3+}. Profil nasycenosti mastných kyselin pak nevykazuje trend nárůstu nebo poklesu se zvyšující se koncentrací solných stresů.

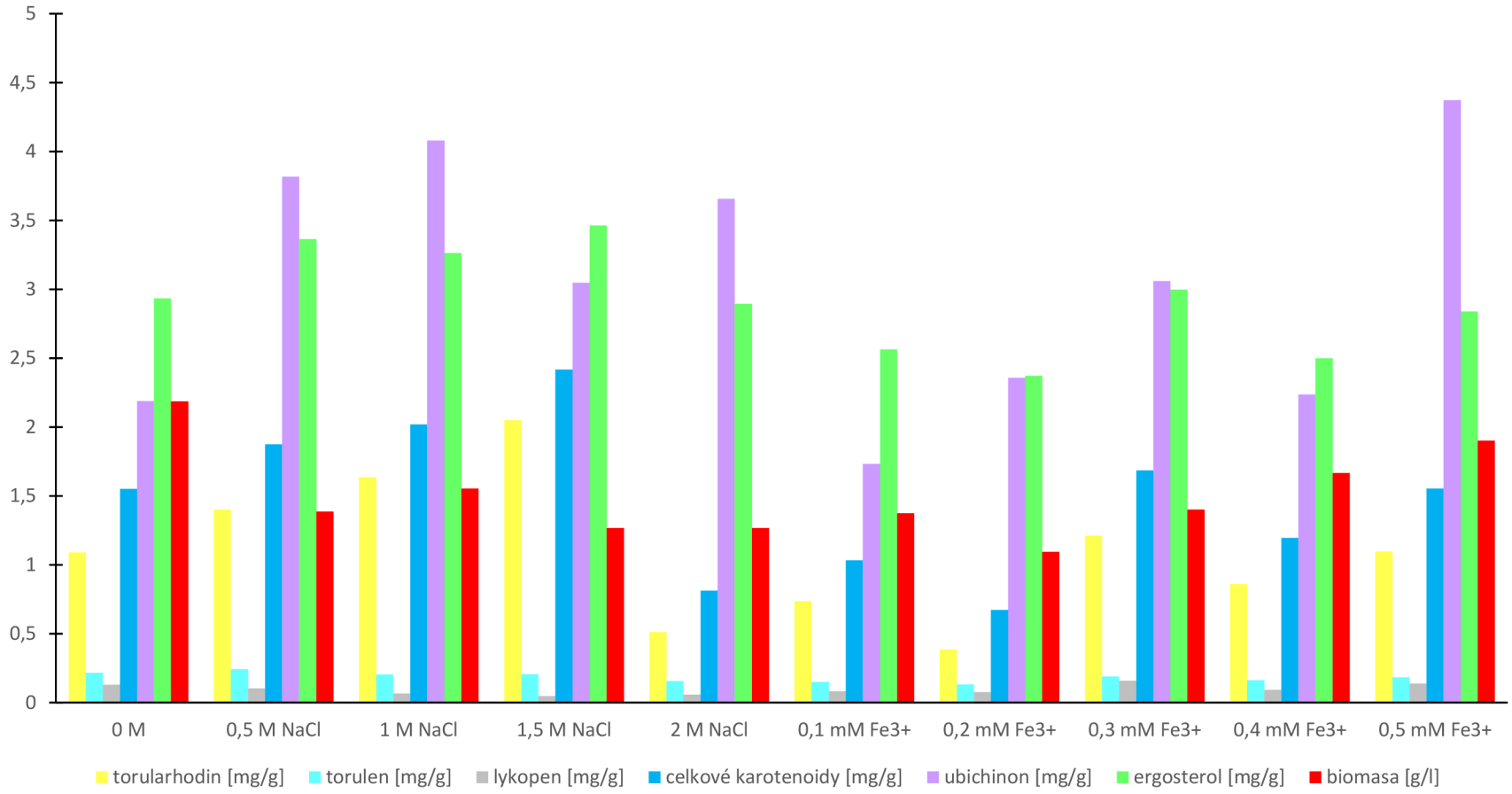
Výsledky analýzy karotenoidních látek, ergosterolu a ubichinonu kmene *C. macerans* kultivovaného na médiích se 3 různými stresy jsou uvedeny v následujících grafech (Obrázek č. 22 a Obrázek č. 23). S ohledem na celkové množství karotenoidů se největší měrou vyznačuje stresový faktor NaCl, jehož zvyšující se koncentrace v médiu způsobuje nárůst karotenoidů. Maxima je zde dosaženo v médiu při 1,5 mol/l NaCl, naopak při 2 mol/l NaCl je již produkce mnohem nižší. Více než 70 % karotenoidů je tvořeno torularhodinem, který kopíruje jejich růst, opět s maximem v 1,5 mol/l NaCl. Ergosterol i ubichinon taktéž významně narůstá při zvětšování koncentrace NaCl. Maximum produkce ergosterolu nastává při 1,5 mol/l NaCl, kde dosahuje 3,463 mg/g, zatímco kontrolní vzorek (0 M) pouze 2,934 mg/g. Největší produkce ubichinonu byla zjištěna u koncentrace 1 mol/l NaCl, kdy činila 4,080 mg/g, ačkoliv výtěžek u kontrolního vzorku dosahoval pouze 2,188 mg/g. Při stresech ionty Fe^{3+} nastalo u kvasinky taktéž zvýšení produkce ubichinonu, nejvíce při koncentraci 0,5 mmol/l. Hodnota činila 4,372 mg/g, což je vyšší než při aplikaci NaCl. Kultivace v přítomnosti iontů Co^{2+} nejvíce ovlivnila tvorbu ubichinonu, jehož obsah markantně vzrostl při koncentraci 0,2 mmol/l Co^{2+}. Při dalším zvyšování koncentrace Co^{2+} obsah ubichinonu mírně klesal, ne však pod hodnotu kontrolního vzorku.



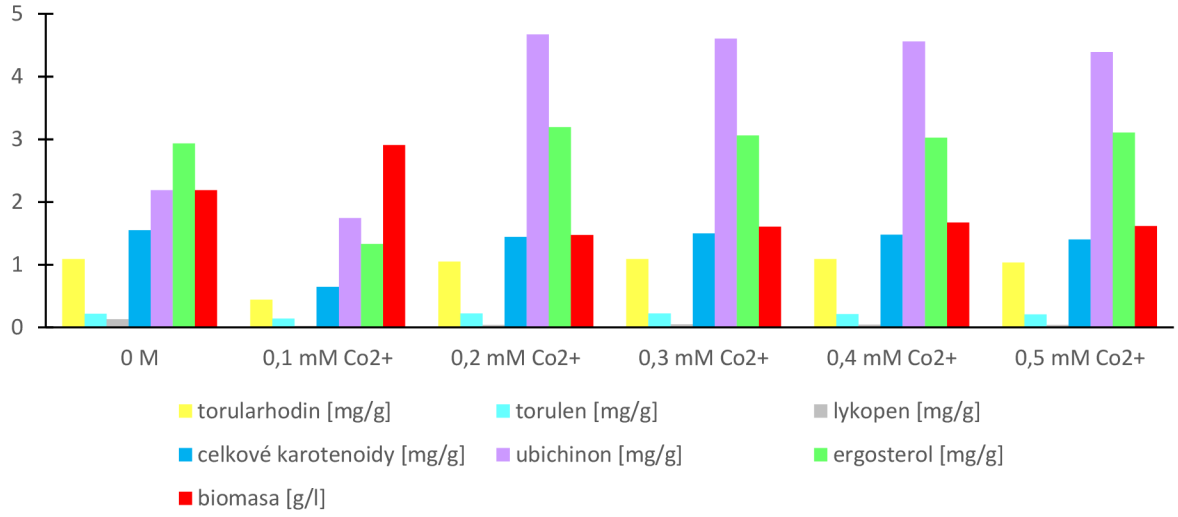
Obrázek č. 20 Grafické znázornění množství biomasy a zastoupení lipidů při kultivaci kmene Cystofilobasidium macerans za využití 3 různých stresových faktorů



Obrázek č. 21 Grafické znázornění profilu mastných kyselin v lipidech u kmene Cystofilobasidium macerans při kultivaci za využití 3 různých stresových faktorů



Obrázek č. 22 HPLC analýza zastoupení karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu u kmene Cystofilobasidium macerans kultivovaného na médiích za využití solných stresů NaCl a Fe^{3+}



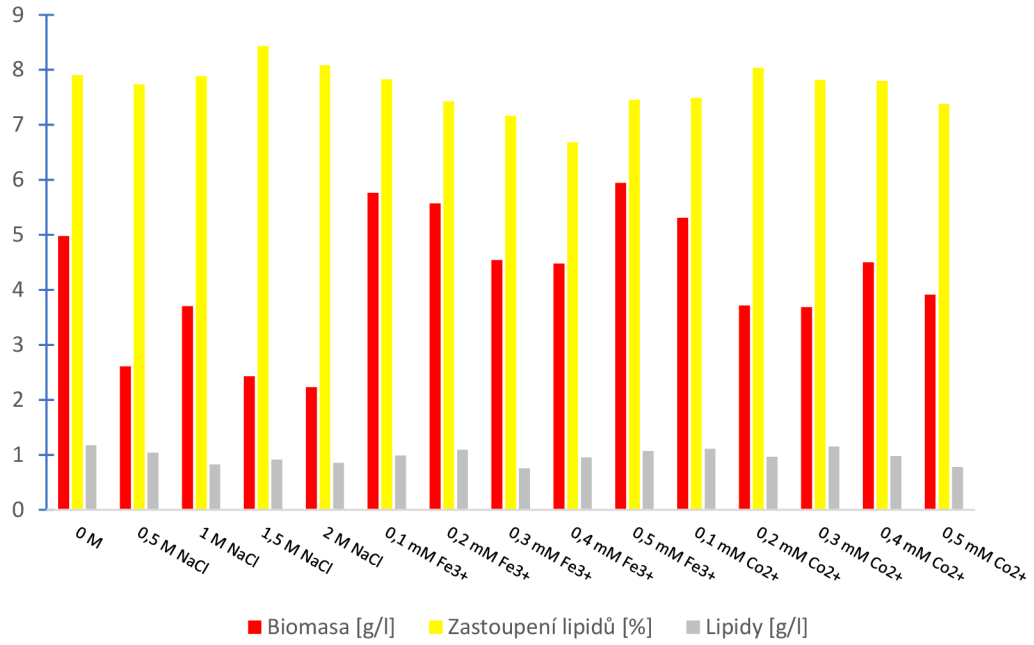
Obrázek č. 23 HPLC analýza zastoupení karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu u kmene Cystofilobasidium macerans kultivovaného na médiích za využití solného stresu Co^{2+}

5.1.3 Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula kratochvilovae* CCY 20-2-26

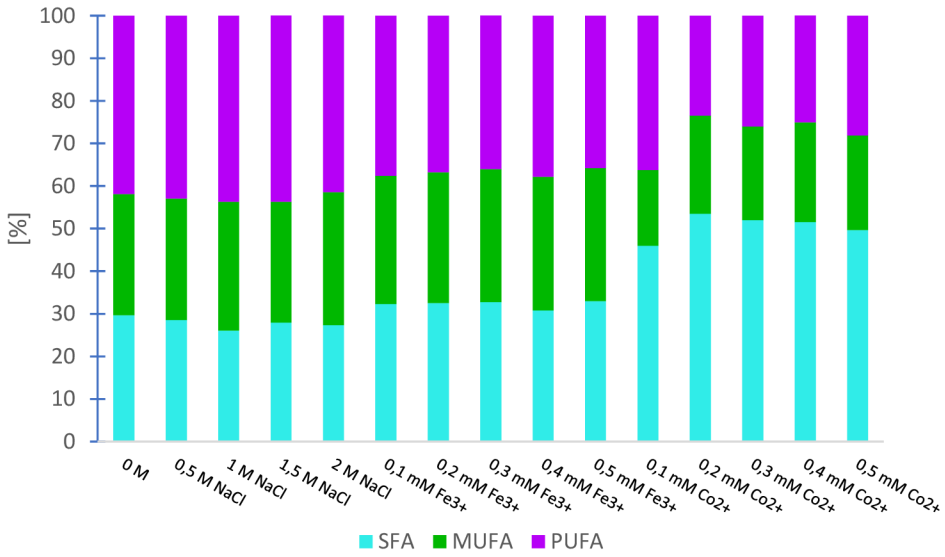
Výsledky chromatografické analýzy lipidických látek kmene *R. kratochvilovae* kultivovaného na médiích se 3 různými stresovými faktory jsou zobrazeny na následujících grafech (Obrázek č. 24 a Obrázek č. 25). Z grafů je patrné, že NaCl i Co^{2+} působily na růst kultury spíše inhibičně. Vzorky obsahující nízké koncentrace Fe^{3+} (0,1 mmol/l a 0,2 mmol/l) měly poměrně vysoký nárůst biomasy, největší však byl zaznamenán u nejvyšší koncentrace Fe^{3+}. Pozitivní vliv na zastoupení lipidů nastal zejména u nejvyšších koncentrací NaCl (1,5 mol/l a 2 mol/l). Při koncentraci 1,5 mol/l NaCl činily lipidy 8,435 % biomasy oproti kontrolnímu vzorku se 7,903 % lipidů. Z toho vyplývá, že podíl lipidů v biomase byl zvýšen o 6,7 % z původního zastoupení.

Z grafu (Obrázek č. 25) je zřejmé, že stresové faktory výrazně ovlivnily zastoupení mastných kyselin kvasinky. Při kultivaci v přítomnosti Co^{2+} vysoce vzrostlo zastoupení SFA, a to jak na úkor MUFA, tak PUFA. Tento pokles produkce PUFA je nežádoucím zjištěním, jelikož polynenasycené mastné kyseliny jsou žádaným typem mastných kyselin s mnoha pozitivními účinky na lidské zdraví (viz kapitola 2.4). Zatímco i u iontů Fe^{3+} kleslo zastoupení PUFA, u stresového faktoru NaCl byl projeven mírný nárůst z hodnoty 41,9 % u kontrolního vzorku na hodnotu 43,7 % u 1,5 mol/l NaCl. Z výše zmíněných skutečností vyplývá, že využití NaCl při vhodné koncentraci může najít uplatnění jak ve zvýšení celkového zastoupení lipidů v biomase, tak ve výhodné změně profilu mastných kyselin.

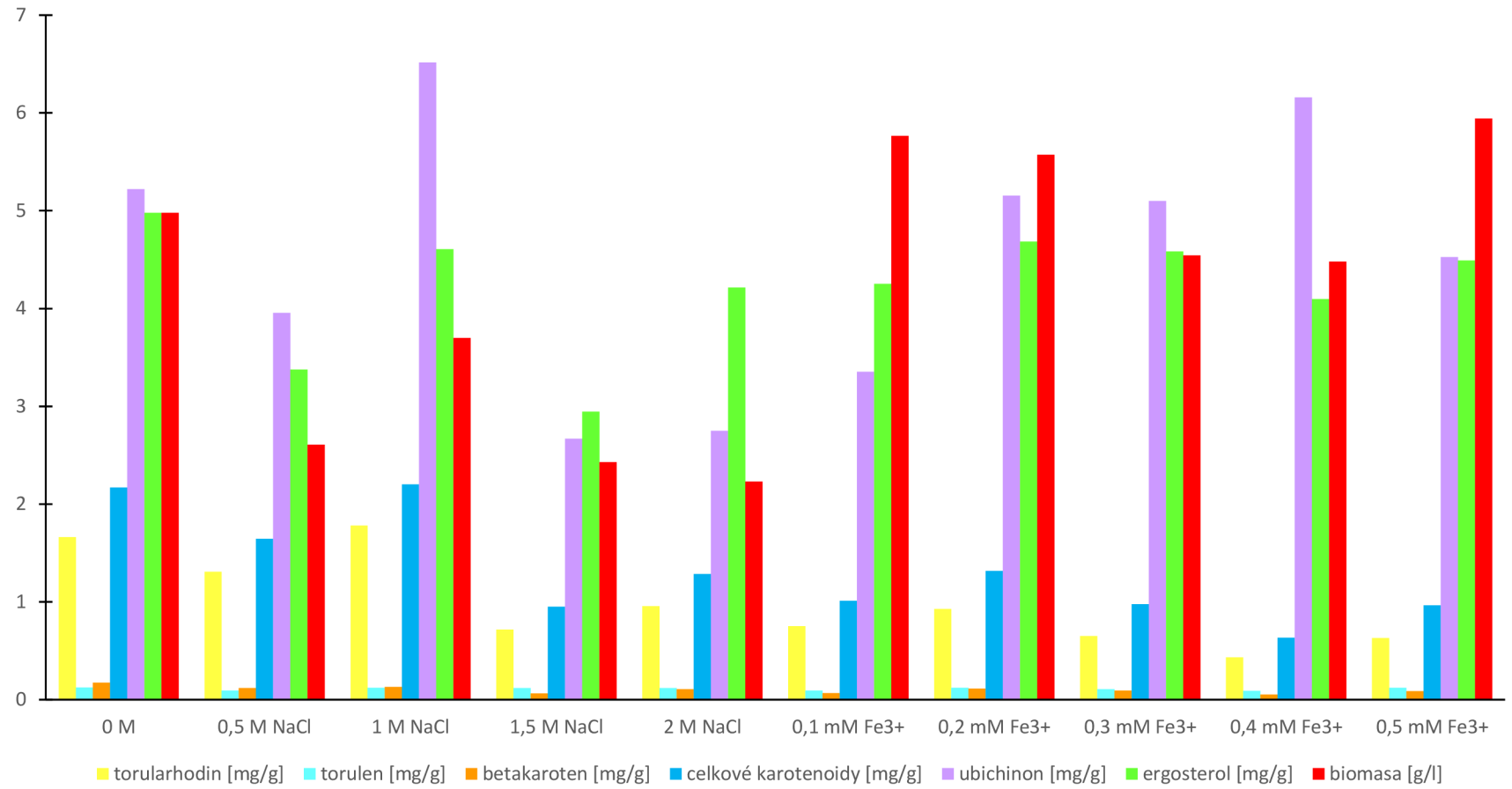
Výsledky analýzy karotenoidních látek, ergosterolu a ubichinonu kmene *R. kratochvilovae* kultivovaného na médiích se 3 různými stresy jsou uvedeny v následujících grafech (Obrázek č. 26 a Obrázek č. 27). Produkce karotenoidních látek za použití stresových faktorů byla nižší nebo podobná s kontrolním vzorkem. Nejvýznamnějším zjištěním byl nárůst obsahu ubichinonu při 0,3 mmol/l Co^{2+}, který činil 6,509 mg/g, zatímco kontrolní vzorek ho obsahoval pouze 5,220 mg/g. Další zvýšení koncentrace Co^{2+} poté způsobuje opět pokles obsahu ubichinonu.



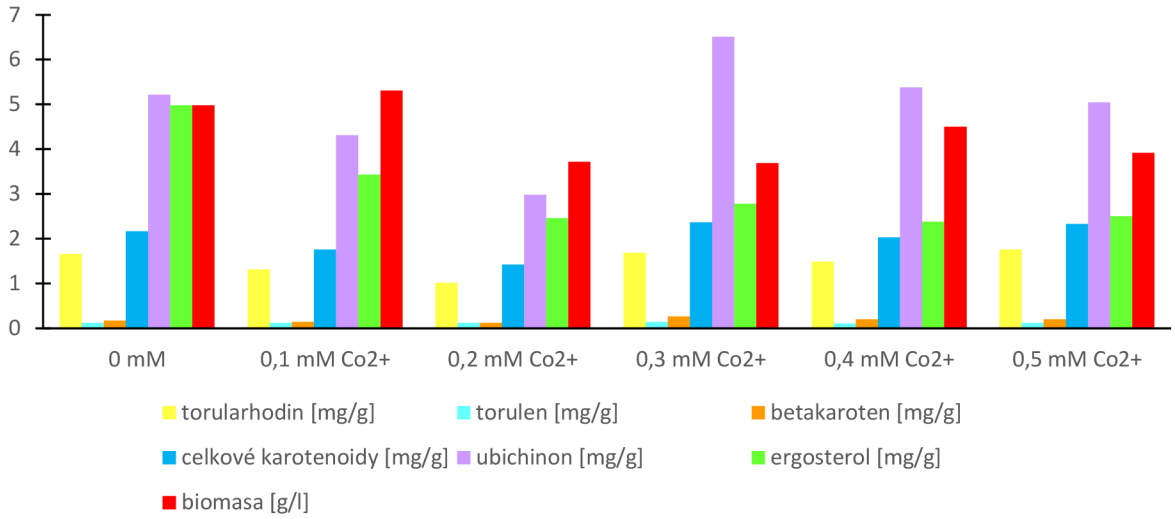
Obrázek č. 24 Grafické znázornění množství biomasy a zastoupení lipidů při kultivaci kmene Rhodotorula kratochvilovae za aplikace 3 různých stresových faktorů



Obrázek č. 25 Grafické znázornění profilu mastných kyselin v lipidech u kmene Rhodotorula kratochvilovae při kultivaci za využití 3 různých stresových faktorů



Obrázek č. 26 HPLC analýza zastoupení karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu u kmene Rhodotorula kratochvilovae kultivovaného na médiích za využití solných stresů NaCl a Fe^{3+}

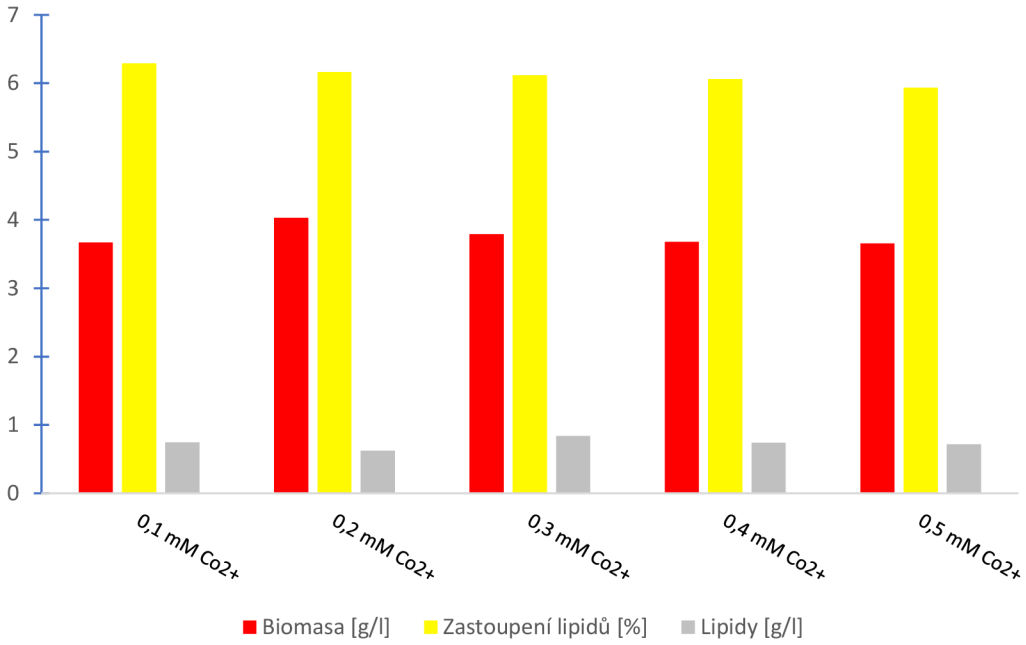


Obrázek č. 27 HPLC analýza zastoupení karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu u kmene Rhodotorula kratochvilovae kultivovaného na médiích za využití solného stresu Co^{2+}

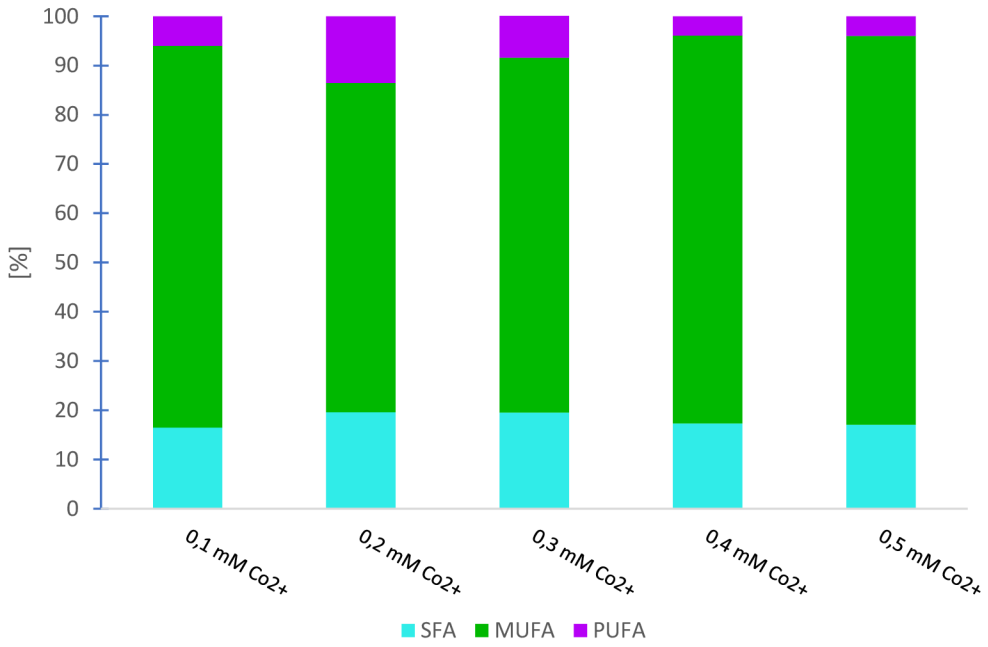
5.1.4 Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula mucilaginosa* CCY 19-4-6

Výsledky chromatografické analýzy lipidických látek kmene *R. mucilaginosa* kultivovaného na médiích s 5 různými koncentracemi Co^{2+} jsou zobrazeny na následujících grafech (Obrázek č. 28 a Obrázek č. 29). Se zvyšující se koncentrací Co^{2+} nastává mírné snižování zastoupení lipidů v biomase. Oproti tomu je však výrazně změněn profil mastných kyselin. Maximální zastoupení PUFA bylo dosaženo při koncentraci 0,3 mmol/l Co^{2+}, které činilo 35,88 %.

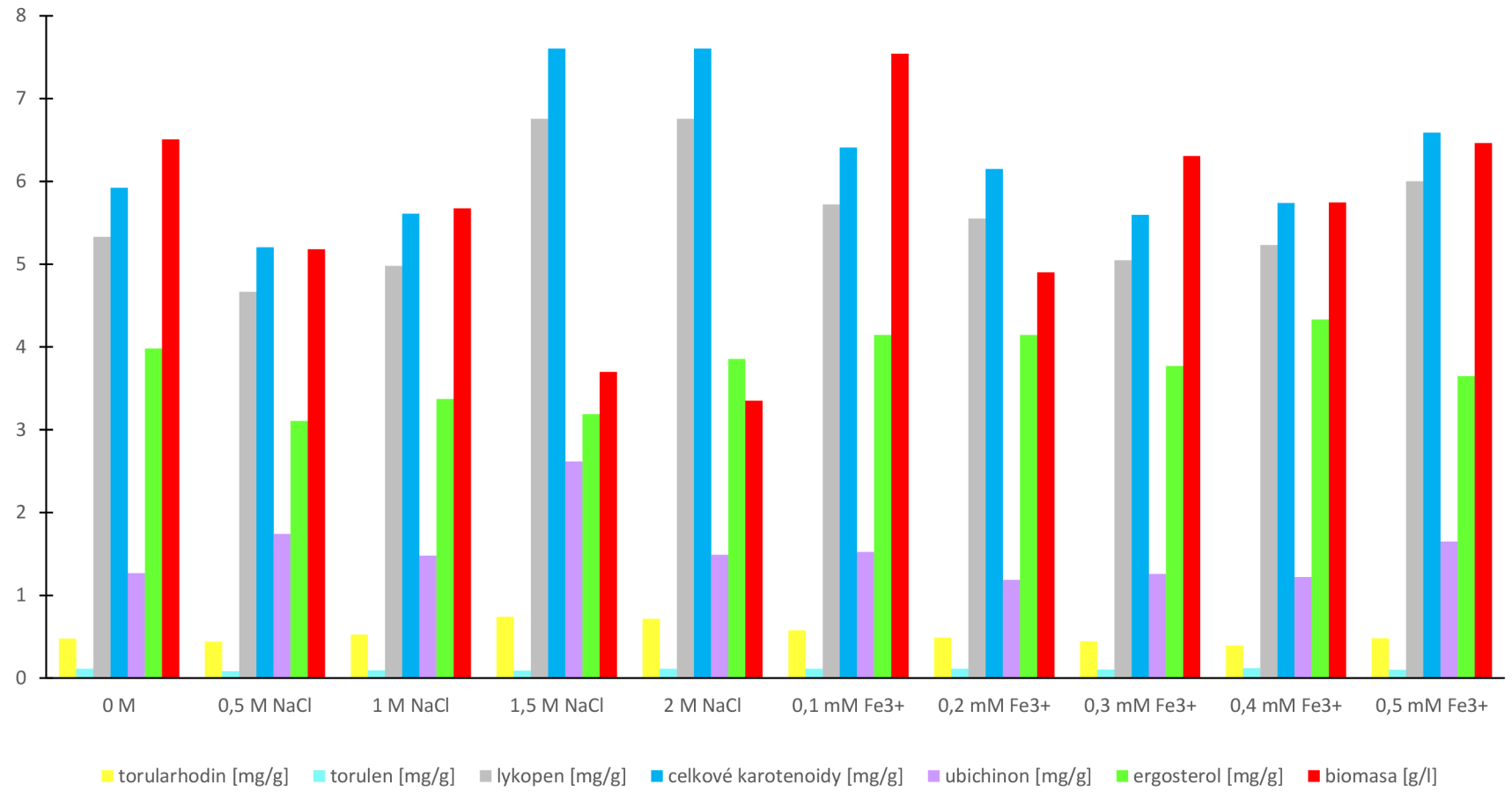
Výsledky analýzy karotenoidních látek, ergosterolu a ubichinonu kmene *R. mucilaginosa* kultivovaného na médiích se 3 různými stresy jsou uvedeny v následujících grafech (Obrázek č. 30 a Obrázek č. 31). Zde je vidět podstatný nárůst celkových karotenoidů, zejména pak lykopenu, při působení stresu NaCl při koncentracích 1,5 mol/l a 2 mol/l. Produkce lykopenu dosahovala maxima 6,757 mg/g při 1,5 mol/l NaCl, zatímco kontrolní vzorek pouze 5,328 mg/g. Zvýšení obsahu lykopenu je tudíž o 26,8 %. Daná koncentrace NaCl se projevila i na produkci ubichinonu, jež činila více než dvojnásobek produkce u kontrolního vzorku. Na médiích s obsahem Co^{2+} byla taktéž pozitivně ovlivněna produkce celkových karotenoidů, zejména pak lykopenu. Nejvhodnější koncentrací bylo 0,2 mmol/l Co^{2+}, při kterém nastalo zvýšení produkce lykopenu dokonce o 45,8 %. Na růst biomasy však působí zvyšující se koncentrace NaCl a Co^{2+} inhibičně.



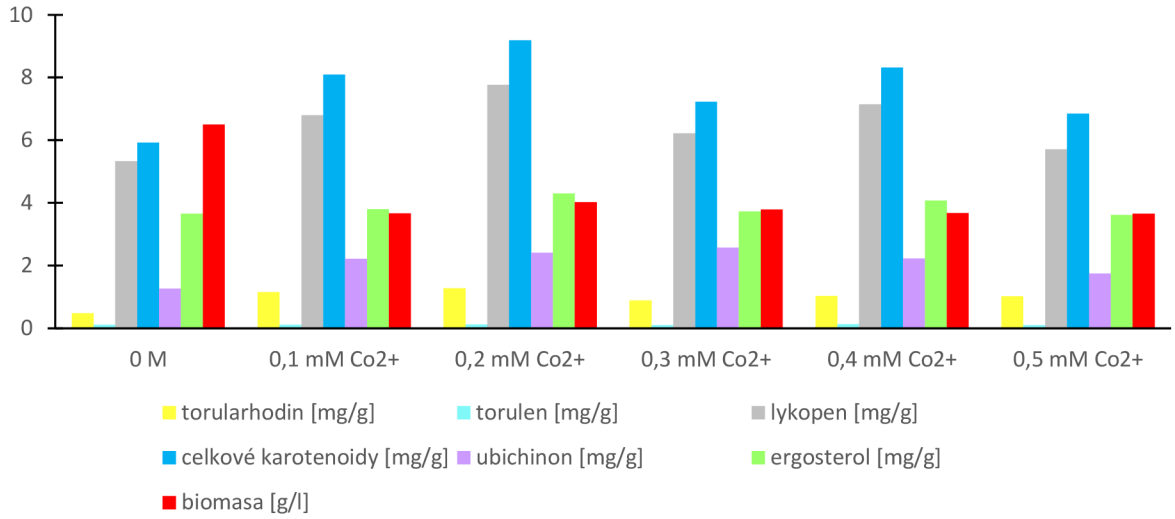
Obrázek č. 28 Grafické znázornění množství biomasy a zastoupení lipidů při kultivaci kmene Rhodotorula mucilaginosa za aplikace solného stresu Co^{2+}



Obrázek č. 29 GC analýza zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene Rhodotorula mucilaginosa při kultivaci za aplikace solného stresového faktoru Co^{2+}



Obrázek č. 30 HPLC analýza zastoupení karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu u kmene Rhodotorula mucilaginosa kultivovaného na médiích za využití solných stresů NaCl a Fe^{3+}



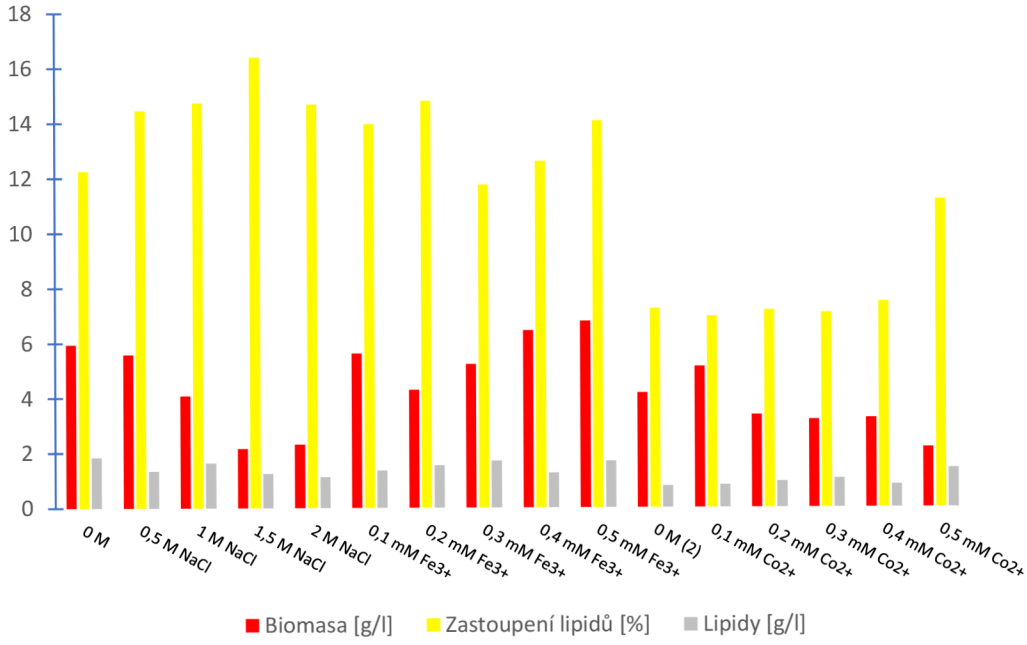
Obrázek č. 31 HPLC analýza zastoupení karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu u kmene Rhodotorula mucilaginosa kultivovaného na médiích za využití solného stresu Co^{2+}

5.1.5 Produkční vlastnosti kmene *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004

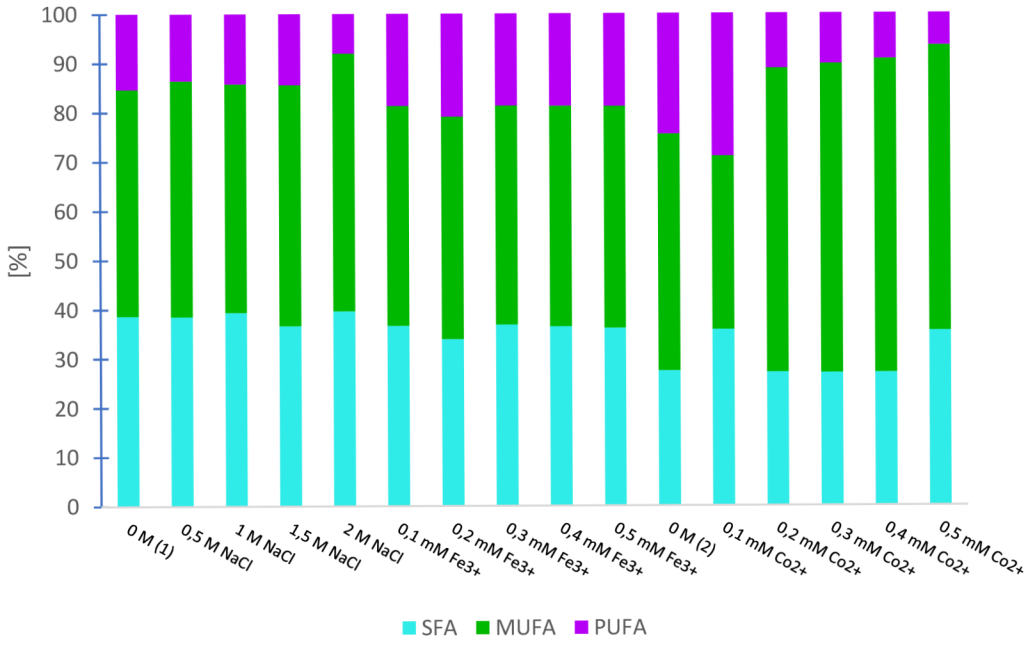
Výsledky chromatografické analýzy lipidických látek kmene *R. toruloides* kultivovaného na médiích se 3 různými stresovými faktory jsou zobrazeny na následujících grafech (Obrázek č. 32 a Obrázek č. 33). Jako v předchozích případech se zde objevuje schopnost NaCl inhibovat růst kvasinkové biomasy, která postupně klesá s rostoucí koncentrací soli v médiu. Podobný trend se objevuje také u Co^{2+}, naopak ionty Fe^{3+} růst biomasy podporují. Zastoupení lipidů je nejvyšší opět při koncentraci 1,5 mol/l NaCl (viz kapitola 5.1.3), činí tak 16,4 %. Kontrolní vzorek však obsahuje pouze 12,3 % lipidů, z toho vyplývá zvýšení produkce lipidů o 33,3 % při vhodné koncentraci NaCl. Přestože zvyšování koncentrace NaCl zapříčiňuje růst lipidického zastoupení v biomase, mírně snižuje procentuální zastoupení PUFA. Na druhou stranu se zvyšuje koncentrace MUFA, jež mají taktéž benefity pro lidské zdraví. Pro co nejvyšší obsah MUFA je vhodné využít iontů Co^{2+}, zvláště o koncentraci 0,1 mmol/l, při kterém bylo zastoupení MUFA nejvyšší, a to 63,7 %. Nutno zmínit skutečnost, že se tento nárůst MUFA děje na úkor PUFA.

Výsledky analýzy karotenoidních látek, ergosterolu a ubichinonu kmene *R. toruloides* kultivovaného na médiích se 3 různými stresy jsou uvedeny v následujících grafech (Obrázek č. 30 a Obrázek č. 31). Je patrné, že se zvyšující se koncentrací NaCl roste i obsah celkových karotenoidů, zejména pak torularhodinu, který z nich tvoří více než 90 %. Jeho obsah je nejvyšší při koncentraci 2 mol/l NaCl, kde činí 5,609 mg/g, zatímco kontrolní vzorek 4,355 mg/g. Produkce torularhodinu při dvoumolární koncentraci NaCl byla tedy zvýšena o 28,8 %. Ionty Fe^{3+} v médiu zvýšily produkci ubichinonu, jež je nejvyšší při koncentraci 0,1 mmol/l, mírně nižší je poté u 0,4 mmol/l Fe^{3+}. Z grafu (Obrázek) je patrno, že ionty Co^{2+} mírně zvyšují produkci karotenoidů, zejména pak torularhodinu, jehož maxima bylo dosáhnuto v médiu s koncentrací 0,3 mmol/l Co^{2+}.

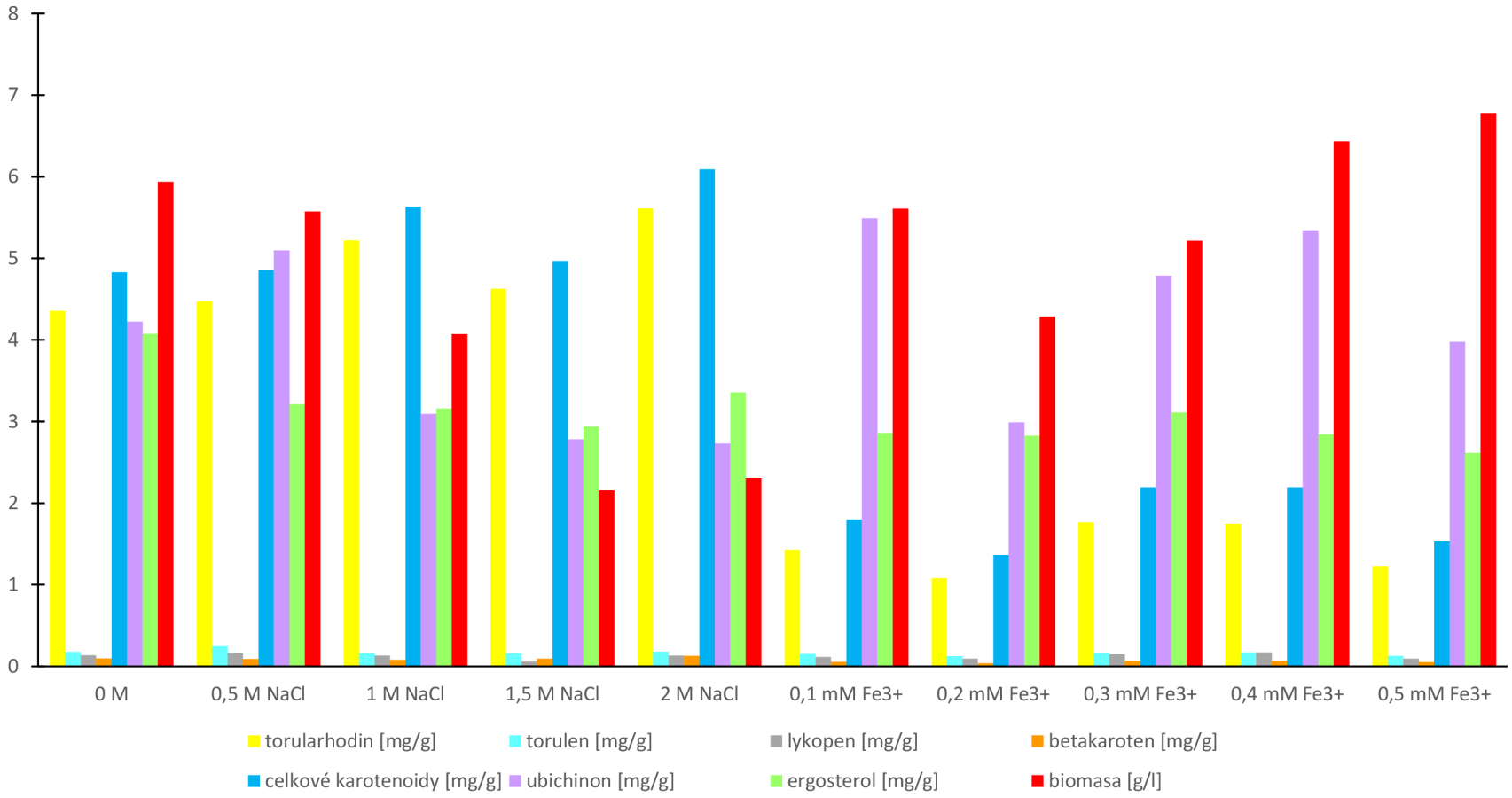
Jeho přesný obsah činí 4,883 mg/g, který u kontrolního vzorku dosahuje pouze 3,923 mg/g. Jeho výtěžek byl tedy vyšší o 24,5 %. Nezanedbatelný je též nárůst koncentrace β-karotenu při shodné koncentraci Co^{2+} oproti kontrolnímu vzorku, který je 1,7× vyšší. Koncentrace ergosterolu nebyla žádným z použitých stresových faktorů pozitivně ovlivněna, oproti kontrolnímu vzorku byla vždy nižší.



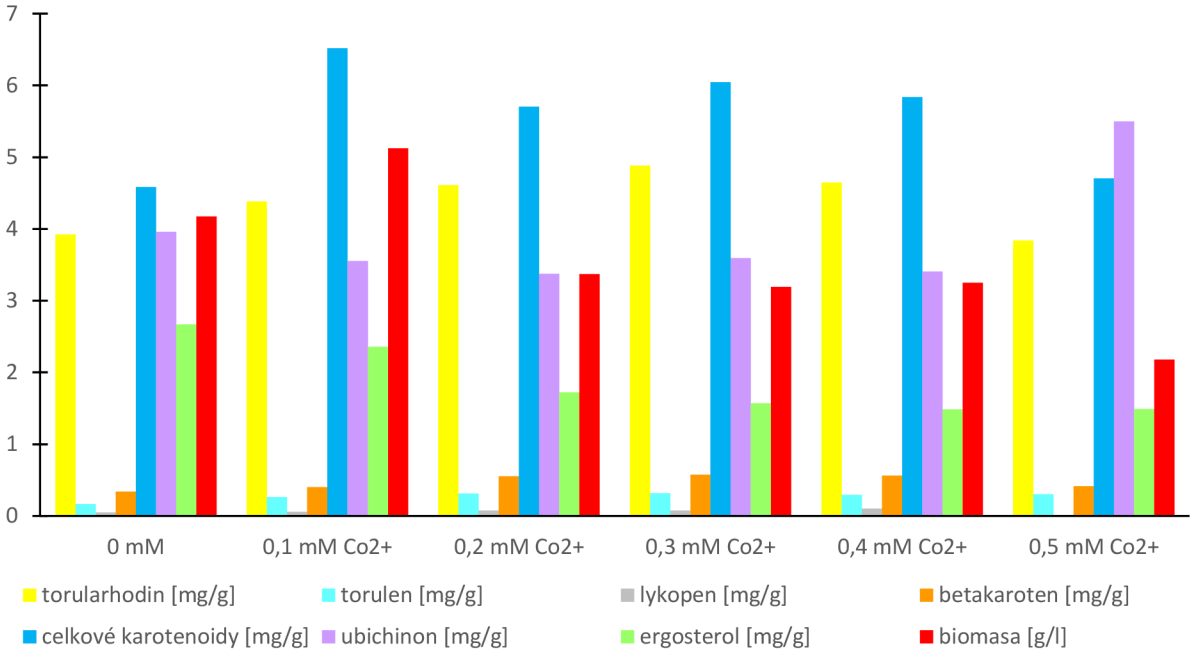
Obrázek č. 32 *Grafické znázornění množství biomasy a zastoupení lipidů při kultivaci kmene*



Obrázek č. 33 *Grafické znázornění profilu mastných kyselin v lipidech u kmene Rhodosporidium toruloides za aplikace 3 různých stresových faktorů*



Obrázek č. 34 HPLC analýza zastoupení karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu u kmene Rhodosporidium toruloides kultivovaného na médiích za využití solných stresů NaCl a Fe^{3+}



Obrázek č. 35 HPLC analýza zastoupení karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu u kmene Rhodosporidium toruloides kultivovaného na médiích za využití solného stresu Co^{2+}

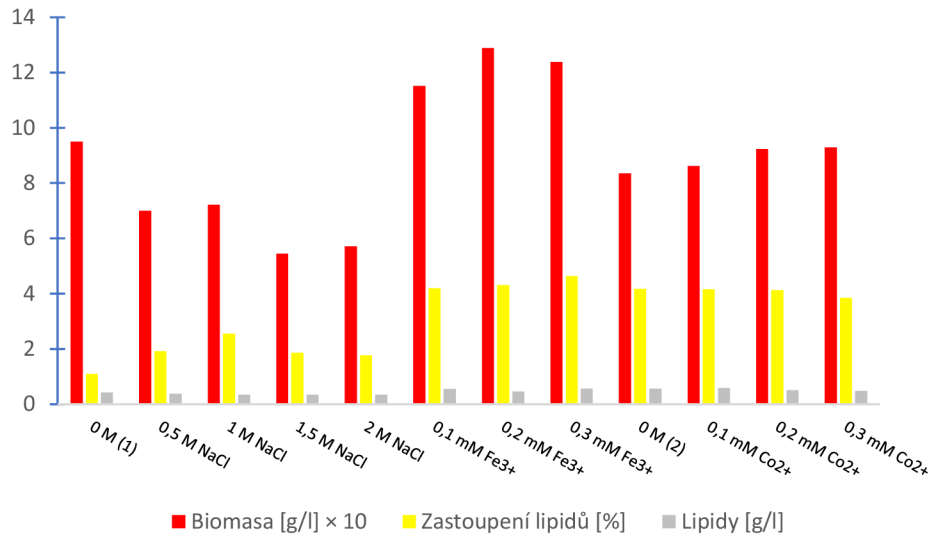
5.2 Aplikace terminálních stresů na zástupce mikrořas

V rámci tohoto experimentu byly kmeny mikrořas kultivovány v aerovaných Pyrex lahvích, a to na médiích uvedených v kapitole 4.4.1. Po dostatečném nárůstu v produkčních médiích byla kultura rozdělena do Erlenmeyerových baněk s různými koncentracemi vybraných stresových faktorů. Po 72 hodinách působení terminálních stresů byly kultury zpracovány, zlyofilizovaná biomasa byla podrobena extrakčním postupům (viz kapitola 4.5) a následně byly vzorky analyzovány chromatograficky. Pomocí GC-FID byl stanoven obsah lipidů a profil mastných kyselin. Analýza HPLC-PDA byla využita ke stanovení karotenoidních barviv (violaxanthin, lutein, betakaroten a celkové karotenoidy), chlorofylů (chlorofyl a, chlorofyl b) a ubichinonu. Karotenoidní barviva obsažená ve velmi nízké koncentraci nebyla pro větší přehlednost brána v potaz.

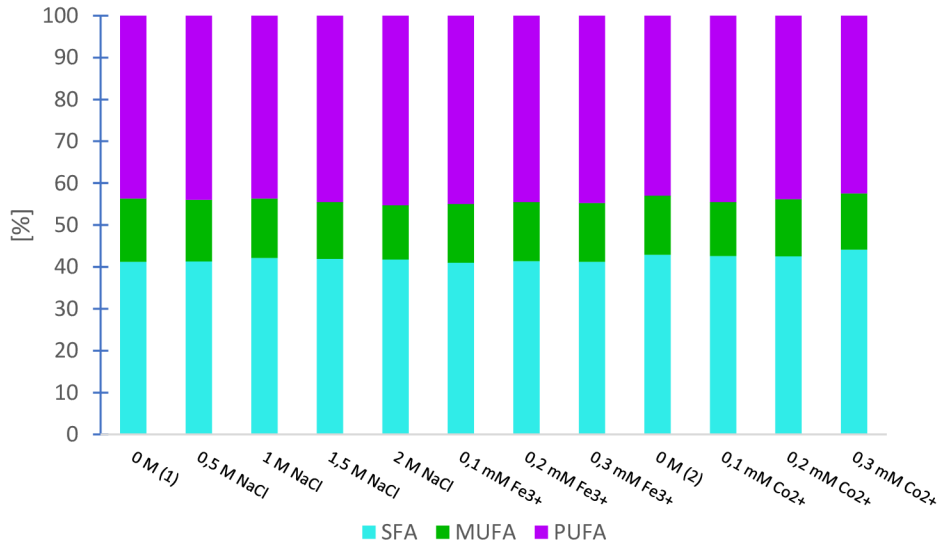
5.2.1 Produkční vlastnosti kmene *Arthrospira maxima* CCALA 030

Výsledky chromatografické analýzy lipidických látek kmene *Arthrospira maxima* kultivovaného na médiích s různými terminálními stresy jsou zobrazeny na následujících grafech (Obrázek č. 36 a Obrázek č. 37). Z grafu (Obrázek č. 36) lze zřetelně vidět, že růst biomasy je inhibován zvyšující se koncentrací NaCl v médiu. Opačná situace nastává u Fe^{3+}, kde se vyskytuje značný nárůst biomasy oproti kontrolnímu vzorku. Při zvyšující se koncentraci Co^{2+} produkce biomasy mírně narůstá. Zastoupení lipidů je výrazně zvýšeno v přítomnosti Fe^{3+} v médiu, zatímco u kontrolního vzorku činí lipidy 1,1 % biomasy, při nejvyšší koncentraci Fe^{3+} dosahují hodnoty 4,6 %. Zvýšení produkce lipidů na jednotku biomasy tedy dosáhlo až 318,2 %. Z dalšího grafu (viz Obrázek č. 37) však vyplývá, že profil mastných kyselin není stresovými faktory příliš ovlivněn.

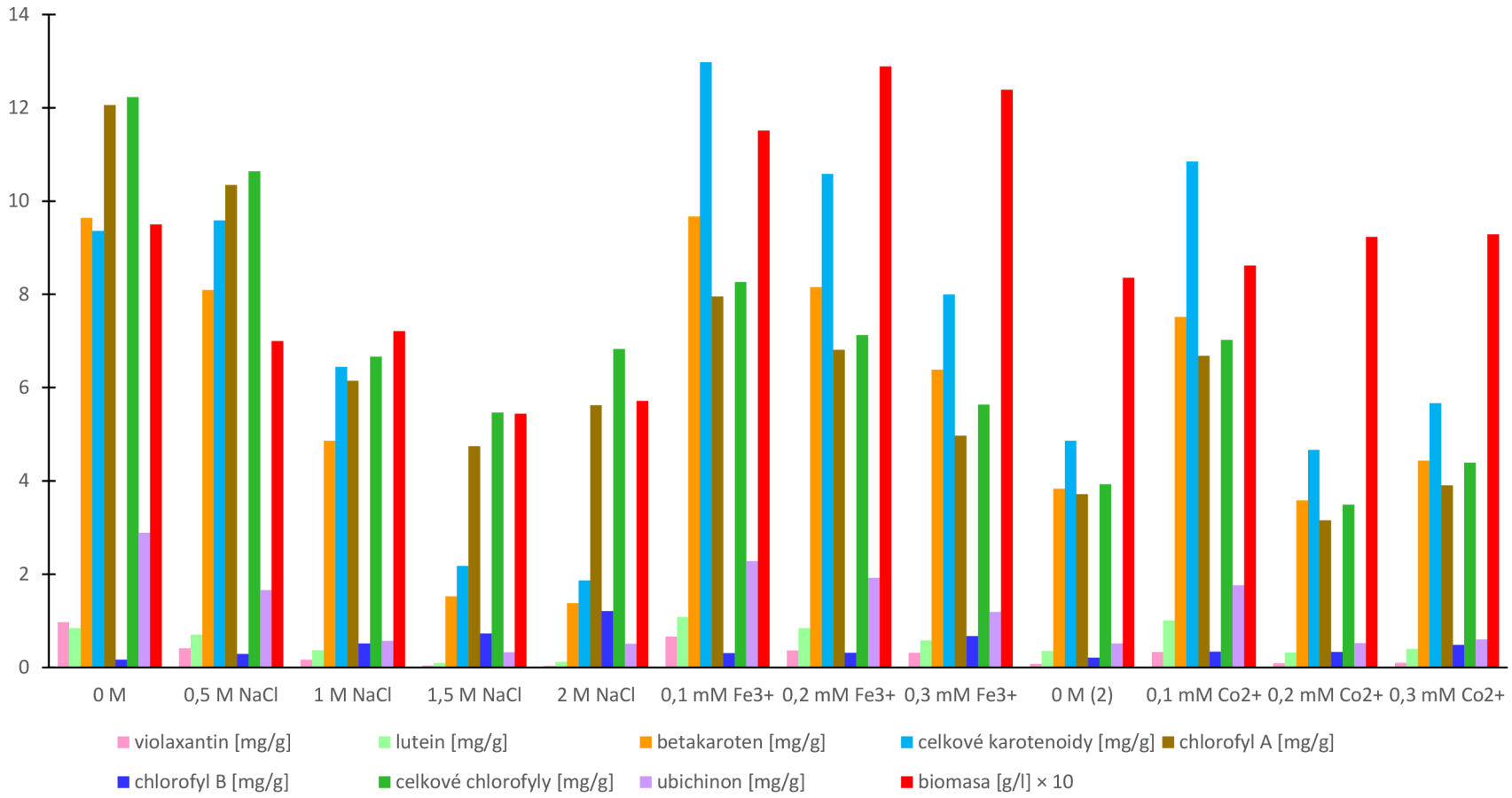
Výsledky analýzy karotenoidních látek, chlorofylů a ubichinonu kmene *Arthrospira maxima* kultivovaného na médiích se 3 různými stresy jsou uvedeny v následujícím grafu (Obrázek č. 38). S rostoucí koncentrací NaCl v médiu klesá také produkce jak karotenoidních pigmentů, tak chlorofylů. Nárůst se projevil u nejnižší koncentrace Fe^{3+}, a to zejména celkových karotenoidů, z nichž obsahově nejvýznamnější byl β-karoten, jenž tvoří více než 70 % z celkového počtu. U koncentrace Co^{2+} 0,1 mmol/l se projevil vysoký nárůst celkových karotenoidů, zejména β-karotenu, ale i chlorofylu *a*. V případě ostatních koncentrací Co^{2+} však byla změna minimální oproti kontrolnímu vzorku.



Obrázek č. 36 Grafické znázornění množství biomasy a zastoupení lipidů při kultivaci kmene Arthrospira maxima za aplikace 3 různých stresových faktorů



Obrázek č. 37 Grafické znázornění profilu mastných kyselin v lipidech u kmene Rhodosporidium toruloides při kultivaci za využití 3 různých stresových faktorů

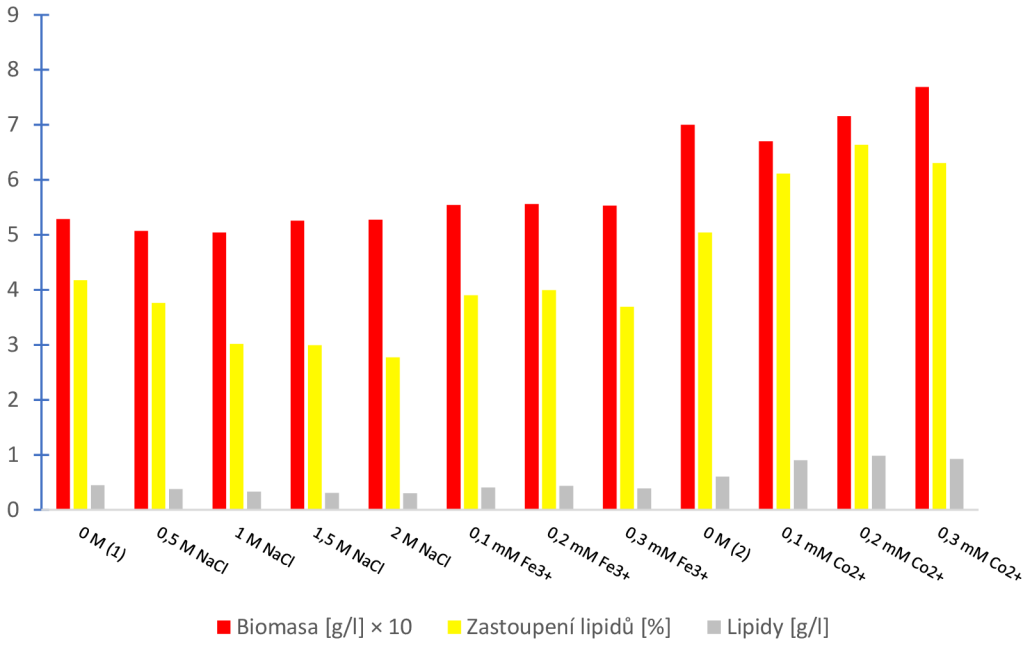


Obrázek č. 38 HPLC analýza zastoupení karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu u kmene Arthrospira maxima kultivovaného na médiích za využití solných stresů NaCl, Fe^{3+} a Co^{2+}

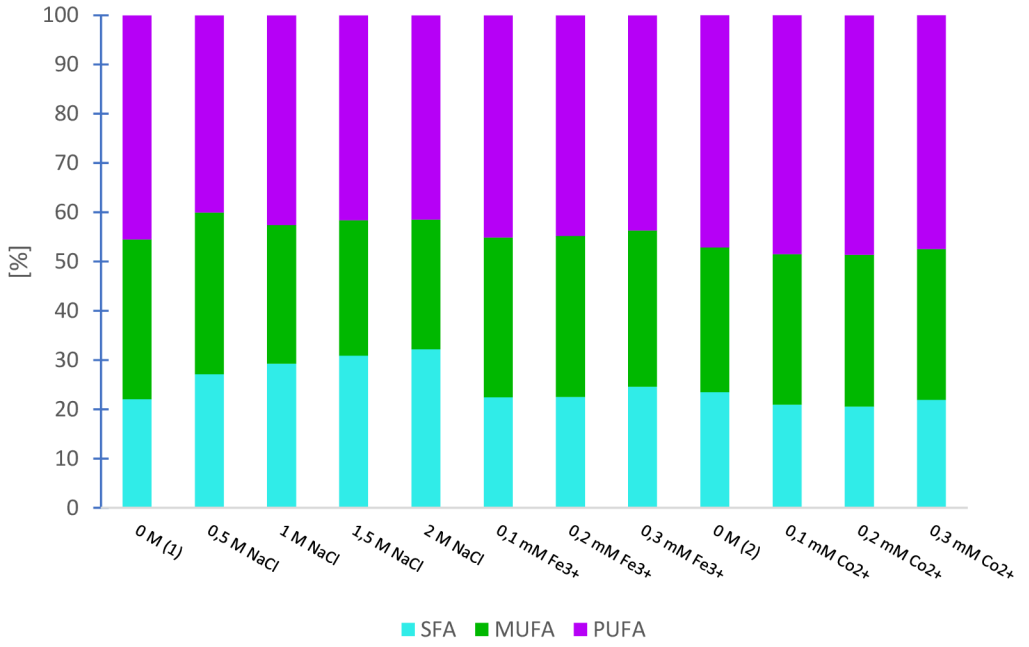
5.2.2 Produkční vlastnosti kmene *Scenedesmus obliquus* CCALA 455

Výsledky chromatografické analýzy lipidických látek kmene *Scenedesmus obliquus* kultivovaného na médiích s různými terminálními stresy jsou zobrazeny na následujících grafech (Obrázek č. 39 a Obrázek č. 40). Biomasa v přítomnosti NaCl a Fe^{3+} víceméně stagnuje, patrný je však její nárůst při koncentraci 0,2 mmol/l a 0,3 mmol/l Co^{2+}. Zastoupení lipidů při stresovém faktoru NaCl a Fe^{3+} zaznamenává pokles. Naopak v médiích s obsahy Co^{2+} nastává zřetelný nárůst, jehož maximum se nachází při 0,2 mmol/l Co^{2+}. Zde je zastoupení lipidů 6,6 %, u kontrolního vzorku pak 5,0 %. To znamená zvýšení produkce lipidů na jednotku biomasy o 32 %. Při kultivacích na médiích s ionty Co^{2+} lze kromě zastoupení lipidů v biomase zdůraznit i mírný vzrůst zastoupení PUFA. U dalších 2 stresových faktorů se při vzrůstající koncentraci soli naopak podíl PUFA v lipidech snižuje.

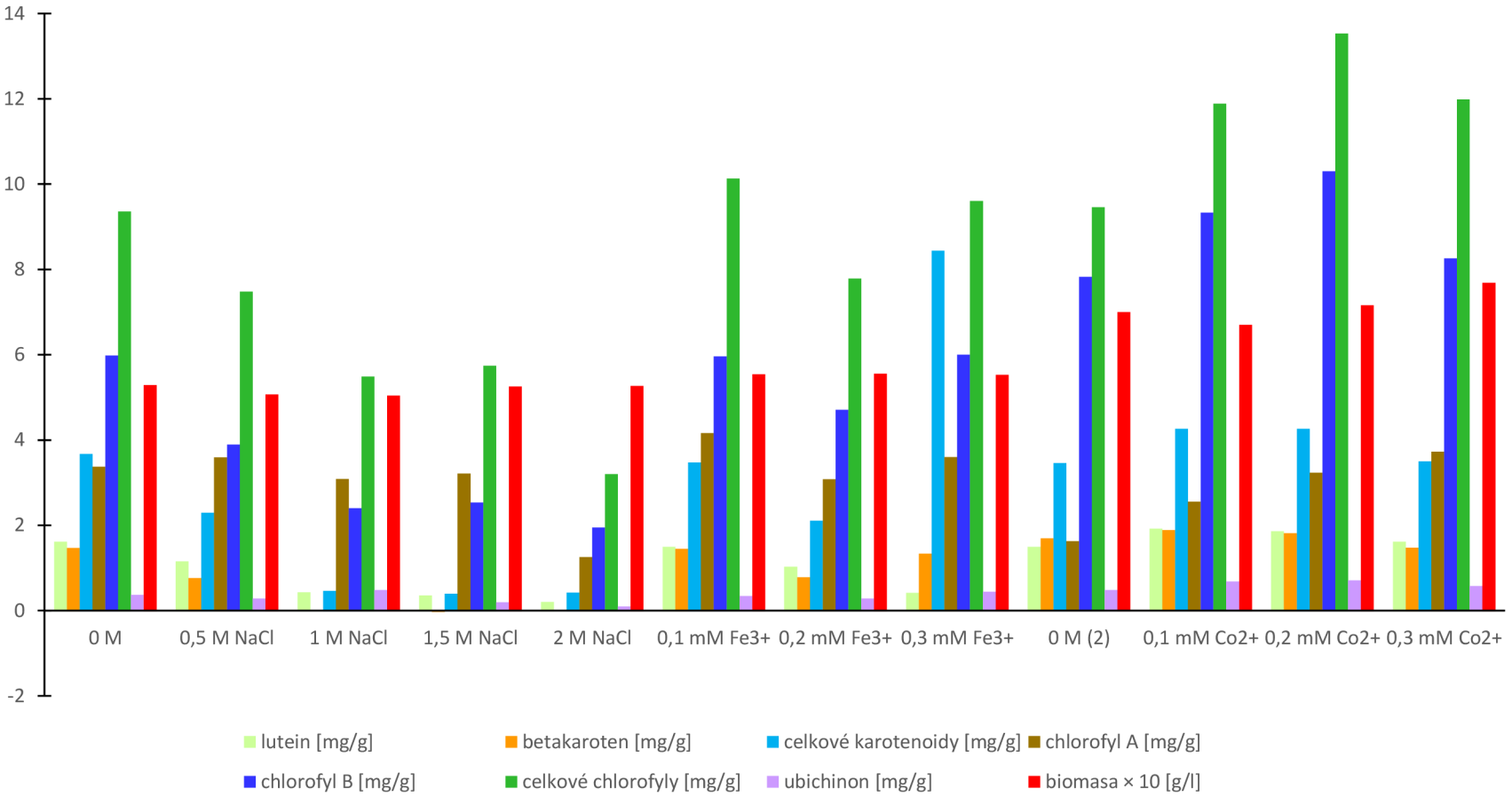
Výsledky analýzy karotenoidních látek, chlorofylů a ubichinonu kmene *Scenedesmus obliquus* kultivovaného na médiích se 3 různými stresy jsou uvedeny v následujícím grafu (Obrázek č. 41). Se zvyšující se koncentrací NaCl nastalo snižování produkcí intracelulárních metabolitů. Média obsahující Fe^{3+} se vyznačovala mírně zvýšenou produkcí, konkrétně u koncentrace 0,1 mmol/l došlo k nárůstu celkových chlorofylů, zejména pak chlorofylu *b*. U koncentrace 0,3 mmol/l bylo vyprodukováno výrazné množství celkových karotenoidů oproti ostatním koncentracím a kontrolnímu vzorku. Pro zvýšení obsahu celkových chlorofylů, zejména pak chlorofylu *b,* bylo vhodné řasu kultivovat při zvýšené koncentraci iontů Co^{2+}. Nejvyšší produkce chlorofylů pak bylo dosaženo při koncentraci 0,2 mmol/l Co^{2+}, a to 13,532 mg/g. Jelikož byl výtěžek chlorofylů u kontrolního vzorku 9,457 mg/g, znamená to, že stresový faktor zvýšil jeho produkci o 43,1 %.



Obrázek č. 39 Grafické znázornění množství biomasy a zastoupení lipidů při kultivaci kmene Scenedesmus obliquus za aplikace 3 různých stresových faktorů



Obrázek č. 40 Grafické znázornění profilu mastných kyselin v lipidech u kmene Scenedesmus obliquus při kultivaci za využití 3 různých stresových faktorů



Obrázek č. 41 HPLC analýza zastoupení karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu u kmene Scenedesmus obliquus kultivovaného na médiích za využití solných stresů NaCl, Fe^{3+} a Co^{2+}

5.3 Aplikace terminálních stresů na zástupce sinic

V rámci tohoto experimentu byly kmeny sinic kultivovány v aerovaných Pyrex lahvích, a to na médiích uvedených v kapitole 4.4.1. Po dostatečném nárůstu v produkčních médiích byla kultura rozdělena do Erlenmeyerových baněk s různými koncentracemi vybraných stresových faktorů. Po 72 hodinách působení terminálních stresů byly kultury zpracovány, zlyofilizovaná biomasa byla podrobena extrakčním postupům (viz kapitola 4.5) a následně byly vzorky analyzovány chromatograficky. Pomocí GC-FID byl stanoven obsah lipidů a profil mastných kyselin. Analýza HPLC-PDA byla využita ke stanovení karotenoidních barviv (astaxanthin, lutein, betakaroten a celkové karotenoidy), chlorofylů (chlorofyl a, chlorofyl b) a ubichinonu. Karotenoidní barviva obsažená ve velmi nízké koncentraci nebyla pro větší přehlednost brána v potaz.

5.3.1 Produkční vlastnosti kmene *Anabaena torulosa* CCALA 003

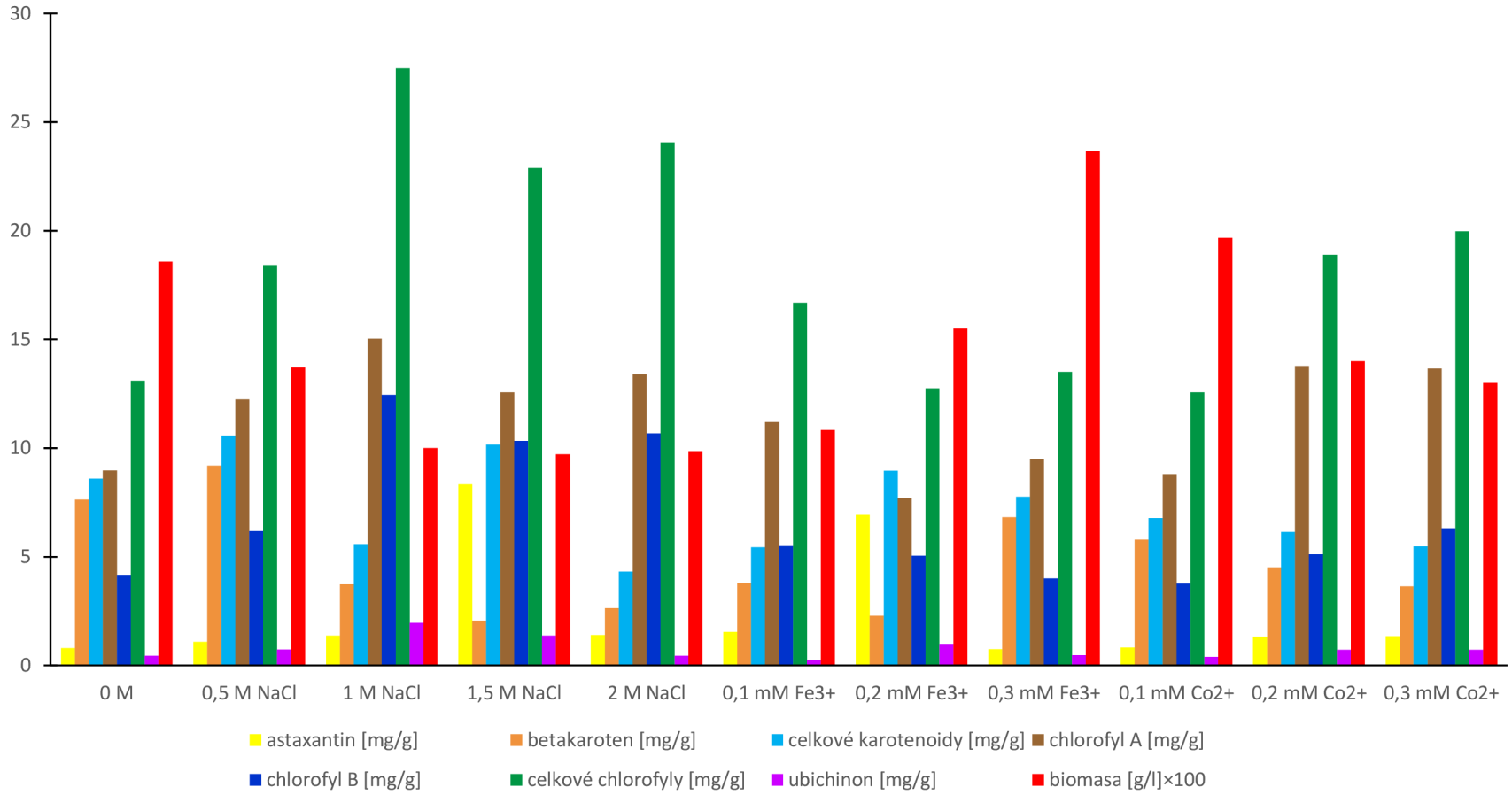
Výsledky analýzy karotenoidních látek, chlorofylů a ubichinonu kmene *Anabaena torulosa* kultivovaného na médiích se 3 různými stresy jsou uvedeny v následujícím grafu (Obrázek č. 42). Z něj je patrné, že média s obsahem NaCl výrazně inhibují růst biomasy. Naopak je daný stres doprovázen velkou produkcí chlorofylů, nejvyšší při koncentraci 1 mol/l NaCl, a to 27,480 mg/g. U kontrolního vzorku došlo k produkci pouze 13,104 mg/g chlorofylů, z čehož vyplývá, že pomocí vhodné koncentrace soli byl jejich výtěžek zvýšen o 109,4 %. Při dané koncentraci NaCl je zaznamenán i nejvyšší přírůstek ubichinonu, jenž je 3× vyšší než u kontrolního vzorku. Růst obsahu chlorofylů byl zaznamenán i u Co^{2+}, nejvýše pak při koncentraci 0,3 mmol/l.

Zastoupení lipidů společně s podíly mastných kyselin nemohlo být stanoveno z důvodu nedostatečného množství vyprodukované biomasy potřebné pro analýzu GC.

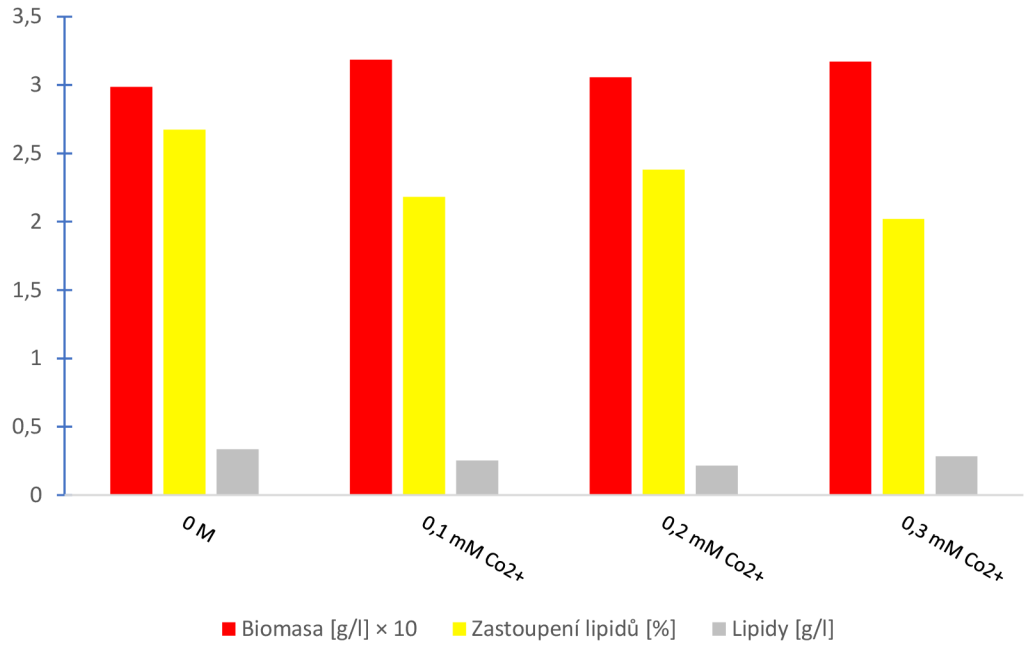
5.3.2 Produkční vlastnosti kmene *Synechococcus nidulans* CCALA 188

Výsledky chromatografické analýzy lipidických látek kmene *Synechococcus nidulans* kultivovaného na médiu s různými koncentracemi stresového faktoru Co^{2+} jsou zobrazeny na následujících grafech (Obrázek č. 39 a Obrázek č. 40). Množství biomasy neodpovídá přímo žádnému trendu, osciluje přibližně kolem stejné hodnoty. Výraznější je však snižování zastoupení lipidů v biomase se vzrůstající koncentrací Co^{2+}. Změna profilu mastných kyselin se příliš neprojevila.

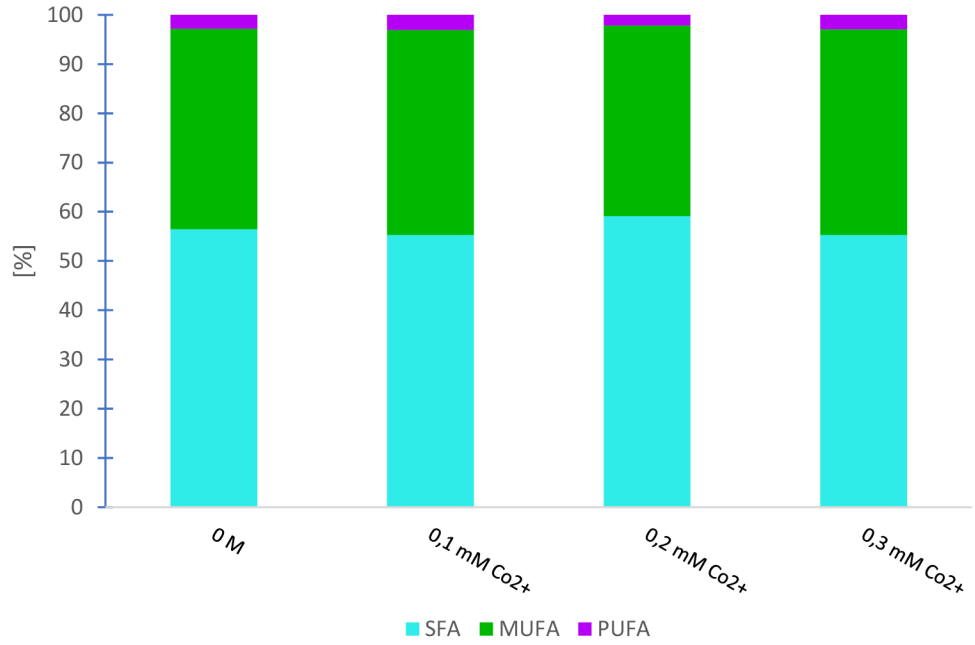
Výsledky analýzy karotenoidních látek, chlorofylů a ubichinonu kmene *Synechococcus nidulans* kultivovaného na médiu s různými koncentracemi stresového faktoru Co^{2+} jsou uvedeny v následujícím grafu (obr). Z něj je patrná skutečnost zvýšené produkce chlorofylu *a* v přítomnosti stresového faktoru Co^{2+}. Při koncentraci 0,1 mmol/l Co^{2+} dochází k nejvyšším výtěžkům jak chlorofylů, tak celkových karotenoidů, ale i ubichinonu. Pro produkci pigmentu luteinu je přítomnost Co^{2+} ryze nežádoucí v daném intervalu koncentrací, jelikož jeho produkce je vždy menší než u kontrolního vzorku.



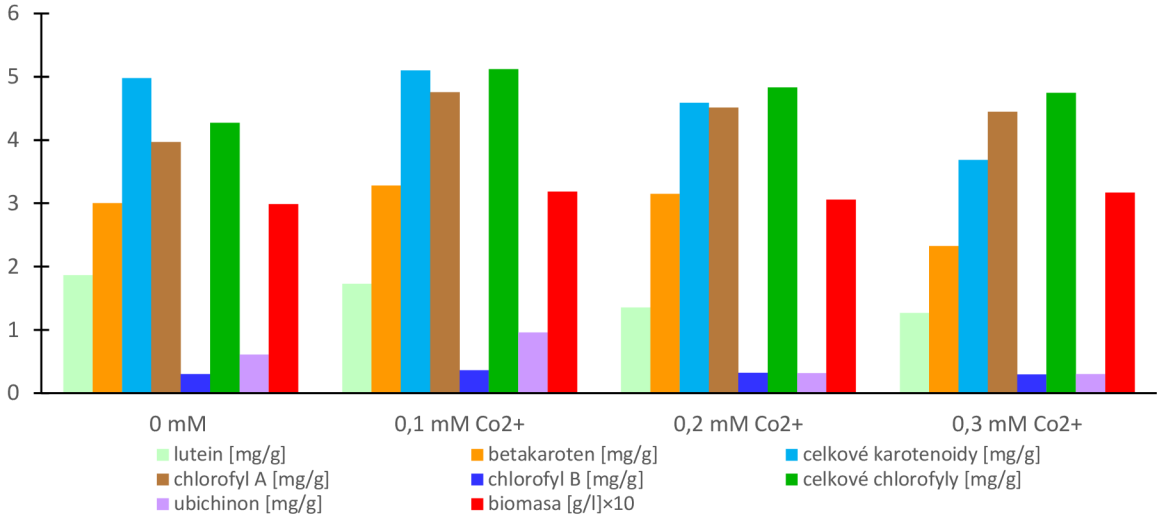
Obrázek č. 42 HPLC analýza zastoupení karotenoidů, chlorofylů a ubichinonu u kmene Anabaena torulosa kultivovaného na médiích obsahujících solné stresy NaCl, Fe^{3+} a Co^{2+}



Obrázek č. 43 Grafické znázornění množství biomasy a zastoupení lipidů při kultivaci kmene Synechococcus nidulans za aplikace různých koncentrací stresového faktoru Co^{2+}



Obrázek č. 44 Grafické znázornění profilu mastných kyselin v lipidech u kmene Synechococcus nidulans při kultivaci za využití různých koncentrací stresového faktoru Co^{2+}



Obrázek č. 45 HPLC analýza zastoupení karotenoidů, chlorofylů a ubichinonu u kmene Synechococcus nidulans kultivovaného na médiích za využití solného stresu Co^{2+}

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo srovnání produkčních vlastností vybraných mikroorganismů za aplikace stresových faktorů, které byly tvořeny různými koncentracemi soli NaCl, iontů Fe^{3+} a Co^{2+} v médiu. Dalším úkolem bylo optimalizovat složení médií pro dané potřeby zvýšení produkce nebo ovlivnění profilu získaných metabolitů.

Kultivace za použití stresových faktorů proběhla u těchto kmenů kvasinek: *Cystofilobasidium macerans* CCY 17-9-3, *Rhodotorula kratochvilovae* CCY 20-2-26, *Rhodotorula mucilaginosa* CCY 19-4-6, *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 a *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6. Sledovanými metabolity byly zejména mastné kyseliny, s čímž byl spojen obsah lipidů, karotenoidní pigmenty (torularhodin, lykopen, torulen a betakaroten), ergosterol a ubichinon. Zvážením celkové hmotnosti zlyofilizované biomasy u jednotlivých vzorků byla monitorována též produkce biomasy. Přítomnost iontů Fe^{3+} v médiu mnohdy způsobila vyšší nárůst biomasy v porovnání s kontrolními vzorky, což bylo zřetelné zejména u kmenů *Cystofilobasidium macerans, Rhodotorula kratochvilovae* a *Rhodosporidium toruloides.* Zvyšování koncentrace NaCl v médiu naopak často způsobila inhibici růstu biomasy, což lze pozorovat u všech zkoumaných kvasinkových kmenů kromě *Sporidiobolus pararoseus.* Inhibice růstu je mnohdy spojena s tvorbou a akumulací lipidických látek, což nastalo právě při stresování kultury solí NaCl u kmene *Rhodotorula kratochvilovae*. Zde činil obsah lipidů u kontrolního vzorku 7,9 %, při koncentraci 1,5 mol/l NaCl v médiu dokonce 8,4 %. Produkce lipidů tedy byla zvýšena o 6,7 % z původního zastoupení. Mnohem vyšší nárůst zastoupení lipidů byl zaznamenán u kmene *Rhodosporidium toruloides,* u kterého nastalo maximum jejich produkce taktéž při koncentraci 1,5 mol/l NaCl. U daných vzorků obsahovala kontrola pouze 12,3 % lipidů v biomase oproti maximální produkci s 16,4 %. Z toho vyplývá, že produkce lipidů byla zvednuta o 33,3 %. U *Rhodotorula kratochvilovae* nastalo při aplikaci NaCl také mírné ovlivnění zastoupení mastných kyselin. U něj došlo k mírnému vzrůstu podílu PUFA, jež jsou žádoucí kvůli účinkům na lidské zdraví. Při aplikaci iontů Co^{2+} byl značně ovlivněn profil mastných kyselin, kdy oproti ostatním vzorkům vzrostlo zastoupení SFA na úkor PUFA a MUFA. Tento jev je zejména nežádoucí, zvlášť při využití metabolitů v potravinářství, protože PUFA a MUFA jsou z nutričního hlediska významnější.

U karotenoidů byla zaznamenána zvýšená produkce torularhodinu při aplikaci Fe^{3+} u kmene *Sporidiobolus pararoseus,* nejvíce při koncentraci 0,5 mmol/l. Výtěžek torularhodinu činil 6,109 mg/g, u kontrolního vzorku pouze 4,881 mg/g. Torularhodin je majoritní karotenoid i u kmene *Cystofilobasidium macerans*, jehož zvýšená produkce nastala při aplikaci NaCl, nejvyšší výtěžek byl při koncentraci 1,5 mol/l. Totéž nastalo i u *Rhodosporidium toruloides*, u něhož torularhodin tvoří přes 90 % celkových karotenoidů, avšak s maximem produkce při koncentraci 2 mol/l NaCl. Kvasinky kmene *Rhodotorula mucilaginosa* disponovaly při aplikaci NaCl značným nárůstem obsahu lykopenu, jenž je jejich majoritní karotenoid, který tvoří více než 90 % z celkových karotenoidů. Jeho obsah se zvyšoval s rostoucí koncentrací stresu do maxima při 1,5 mol/l NaCl, při koncentraci 2 mol/l se nepatrně snížil. Pouze u kmene *Rhodotorula kratochvilovae* nebyl zaznamenán pozitivní vliv stresových faktorů na produkci karotenoidů.

Kvasinky kmene *Rhodotorula kratochvilovae* však projevily zvýšenou produkci ubichinonu, která vzrostla při koncentraci 0,3 mmol/l Co^{2+} v médiu a při zvyšující se koncentraci mírně

klesala. Zřetelná změna v obsahu ubichinonu se projevila u *Sporidiobolus pararoseus*, a to při aplikaci Fe^{3+} i Co^{2+}, nejvyšší produkce nastaly při koncentraci 0,3 mmol/l obou stresů. U Co^{2+} se objevila podobná produkce ergosterolu, která kopírovala nárůst ubichinonu. U kmene *Cystofilobasidium macerans* je zřetelné zvýšení obsahu ubichinonu při aplikaci všech stresových faktorů, a to s maximy při 1 mol/l NaCl, 0,5 mmol/l Fe^{3+} a 0,2 mmol/l Co^{2+}. Obsah ergosterolu se zvyšoval znatelně zejména při aplikaci NaCl. U kmene *Rhodotorula mucilaginosa* bylo pozorováno zvýšení obsahu ubichinonu při aplikaci NaCl, s maximem při koncentraci 1,5 mol/l.

Vystavení stresovým faktorům byly pouze 2 kmeny mikrořas, a to *Arthrospira maxima* CCALA 030 a *Scenedesmus obliquus* CCALA 455. Zde byly kromě karotenoidních barviv, mastných kyselin a ubichinonu stanovovány i chlorofyly, a to jak chlorofyl *a*, tak chlorofyl *b*. Pro nárůst biomasy je u *Arthrospira maxima* vhodné aplikovat do média Fe^{3+}, které dokonce znatelně zvýšily zastoupení lipidů v biomase. Přestože využití iontů Co^{2+} příliš nezvyšuje koncentraci biomasy, i zde nastává velká produkce i akumulace lipidů. Růst biomasy negativně ovlivňuje zvyšující se koncentrace NaCl, na druhou stranu pozitivně ovlivňuje zastoupení lipidů, nicméně zdaleka ne v takové míře jako další 2 zmíněné stresy. Výhodou využití NaCl v průmyslu pro produkci mastných kyselin by byla skutečnost, že na rozdíl od dalších 2 solí jde o netoxickou a běžně dostupnou sloučeninu, tudíž by nebyl problém řasu následně využít jak v potravinářství, tak v kosmetickém průmyslu.

U kmene *Scenedesmus obliquus* je vhodným stresovým faktorem Co^{2+}, a to jak z pohledu růstu biomasy, tak z pohledu obsahu lipidů v ní. Přestože u NaCl nedocházelo k inhibici růstu, výrazně kleslo zastoupení lipidů. Výhoda Co^{2+} spočívá i v mírné změně profilu mastných kyselin, ve kterém narůstají PUFA na úkor SFA. Z hlediska analýzy HPLC jsou opět nejvýraznější ionty Co^{2+}, které vysoce podmiňují produkci chlorofylů, zejména pak chlorofylu *b*. Při nižších koncentracích Co^{2+} lze vidět i mírný nárůst obsahu karotenoidů a ubichinonu.

Ze zástupců sinic byly taktéž pro experiment zvoleny pouze 2 kmeny, a to *Anabaena torulosa* CCALA 003 a *Synechococcus nidulans* CCALA 188. U kmene *Anabaena torulosa* proběhlo pouze stanovení HPLC, ze kterého lze vidět schopnost inhibice NaCl i Co^{2+} růstu biomasy, ionty Fe^{3+} naopak produkci biomasy podporují. Nejvýznamnější vliv na produkci chlorofylů měla aplikace NaCl v médiu. Kromě chlorofylů se zvyšoval také obsah ubichinonu a astaxanthinu.

Posledním zkoumaným zástupcem mikroorganismů byl *Synechococcus nidulans*, na který byl aplikován pouze stres Co^{2+}, který snižoval produkci lipidů v biomase. Zajímavější je výsledek HPLC, který ukazuje při aplikaci nízké koncentrace Co^{2+} zvýšenou produkci chlorofylu *a*, betakarotenu a ubichinonu. Nárůst jmenovaných metabolitů není však příliš patrný, a navíc dochází ryze k inhibici produkce luteinu, což je také nežádoucí.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

[1] JURÁŇ, Josef a Jan KAŠTOVSKÝ. Nový pohled na systém řas a jak ho učit? *Živa* [online]. 15. prosince 2016, (6), 299-301 [cit. 2020-11-04]. ISSN 0044-4812. Dostupné z: https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/novy-pohled-na-system-ras-a-jak-ho-ucit.pdf

[2] VIDYASAGAR, Aparna. *What are Algae?* [online]. 4. června 2016 [cit. 2020-11-04]. Dostupné z: https://www.livescience.com/54979-what-are-algae.html

[3] Algae, 2001-. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2020-11-04]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Algae#Symbiotic_algae

[4] KALINA, Tomáš a Jiří VÁŇA, 2005. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1036-8.

[5] SZOTKOWSKI, M. Srovnání metabolické aktivity a potenciálního využití mikrořas a pigmentotvorných kvasinek. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 97 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

[6] MORGAN, Mike. *Images of desmids from the genus Scenedesmus: Scenedesmus* [online]. říjen 2005 [cit. 2020-11-04]. Dostupné z: http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artoct05/mmdesmid.html

[7] *Oddělení Chlorophyta: Stavba buňky* [online]. [cit. 2020-11-04]. Dostupné z: http://www.sinicearasy.cz/134/Chlorophyta

[8] Scenedesmus, 2001-. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2020-11-04]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Scenedesmus

[9] KALINA, Tomáš a Jiří VÁŇA, 2005. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii: Řád: Chlorely - Chlorellales*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1036-8.

[10] CALDECOTT, Todd. Chlorella. In: Todd Caldecott, Dip. Cl.H., RH(AHG): ayurveda, herbal medicine, nutrition [online]. [cit. 2020-11-05]. Dostupné z: https://toddcaldecott.com/herbs/chlorella/

[11] International Journal of Biological Macromolecules: Isolation, structures and biological activities of polysaccharides from Chlorella: A review [online], 15. listopadu 2020n. l.. 163. [cit. 2020-11-05]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181302034441X?via%3Dihub

[12] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila, 2002. Mikrobiologie pro potraviná̊ře a biotechnology: Kvasinky. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia. ISBN 80-200-1024-6.

[13] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH, 2012. Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin. Ostrava: Key Publishing. Monografie (Key Publishing). ISBN isbn978-80-7418-145-0.

[14] KALHOTKA, Libor, 2014. Mikromycety v prostředí člověka: vláknité mikromycety (plísně) a kvasinky. V Brně: Mendelova univerzita. ISBN 978-80-7375-943-8.

[15] MAROVA, Ivana, Milan CERTIK a Emilia BREIEROV, 2011. Production of Enriched Biomass by Carotenogenic Yeasts - Application of Whole-Cell Yeast Biomass to Production of Pigments and Other Lipid Compounds. MATOVIC, Miodrag Darko, ed. Biomass - Detection, Production and Usage [online]. InTech, 2011-09-09 [cit. 2020-11-06]. ISBN 978-953-307-492-4. Dostupné z: doi:10.5772/19235

[16] International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology: Taxonomic studies on the genus Cystofilobasidium: description of Cystofilobasidium ferigula sp. nov. and clarification of the status of Cystofilobasidium lari-marini [online], 2001. 51 [cit. 2020-11-06]. Dostupné z: https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/51/1/0510221a.pdf?expires=1604623928&id=id&accname=guest&checksum=A1891043CD7847E0903B09C1F0BD6D1A

[17] VODRÁŽKA, Zdeněk. Biochemie. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.

[18] KOPECKÝ, Jiří, Richard LHOTSKÝ a Jindřiška PAICHLOVÁ. Aktivní látky mikrořas ve výživě. [Praha]: Středisko společných činností AV ČR, 2017. Věda kolem nás. ISBN 978-80-270-2247-2.

[19] SLIWKA, Hans - Richard. Carotenoids. MDPI - Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2019. ISBN 9783039218646.

[20] VELÍŠEK, Jan a Karel CEJPEK. Biosynthesis of food components. Tábor: OSSIS, 2008. ISBN 978-80-86659-12-1.

[21] Hashimoto H, Uragami C, Cogdell RJ. Carotenoids and Photosynthesis. Subcell Biochem. 2016;79:111-39. doi: 10.1007/978-3-319-39126-7_4. PMID: 27485220.

[22] DOUŠA, Michal, 2007. Stanovení vitaminů, doplňkových látek a vybraných léčiv v krmivech. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. ISBN 978-80-86548-94-4.

[23] KUCZYNSKA, Paulina, Malgorzata JEMIOLA-RZEMINSKA a Kazimierz STRZALKA, 2017. Characterisation of Carotenoids Involved in the Xanthophyll Cycle. CVETKOVIC, Dragan J. a Goran S. NIKOLIC, ed. *Carotenoids* [online]. InTech, 2017-06-14 [cit. 2020-11-25]. ISBN 978-953-51-3211-0. Dostupné z: doi:10.5772/67786

[24] NICOL, Marc a M. MAUDET, 2000. Caroténoïdes et vitamine A. Actualités. *Oléagineux, Corps gras, Lipides* [online]. **7**(3), 266-270 [cit. 2020-11-28]. ISSN 1258-8210. Dostupné z: doi:10.1051/ocl.2000.0266

[25] MARHUENDA-MUÑOZ, María, Sara HURTADO-BARROSO, Anna TRESSERRA-RIMBAU a Rosa Maria LAMUELA-RAVENTÓS, 2019. A review of factors that affect carotenoid concentrations in human plasma: differences between Mediterranean and Northern diets. *European Journal of Clinical Nutrition* [online]. **72**(S1), 18-25 [cit. 2021-02-04]. ISSN 0954-3007. Dostupné z: doi:10.1038/s41430-018-0305-9

[26] MOISE, Alexander R., Salim AL-BABILI a Eleanore T. WURTZEL, 2013. Mechanistic Aspects of Carotenoid Biosynthesis. *Chemical Reviews* [online]. **114**(1), 164-193 [cit. 2021-02-03]. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr400106y

[27] FRASER, Paul D a Peter M BRAMLEY. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* [online]. Elsevier, 2004, **43**(3), 228-265 [cit. 2021-02-16]. ISSN 0163-7827. Dostupné z: doi:10.1016/j.plipres.2003.10.002

[28] MURRAY, Robert K., c2012. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Přeložil Bohuslav MATOUŠ. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-907-7.

[29] ZEHNÁLEK, Josef, 2005. *Biochemie*. Vyd. 2. nezměn. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-7157-840-1.

[30] COULTATE, Tom P., 2009. *Food - The Chemistry of its Components: Fatty Acids: Structure and Distribution* [online]. 5. Royal Society of Chemistry [cit. 2021-02-23]. ISBN 978-1-62198-201-2. Dostupné z: https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00A7TLU1/food-chemistry-its-components/fatty-acids-structure

[31] ŠÍCHO, Vladislav, Zdeněk VODRÁŽKA a Blanka KRÁLOVÁ, 1981. *Potravinářská biochemie: Lipidy*. 2. Praha: Státní nakladatelství technické literatury.

[32] GUNSTONE, Frank D., 2006. *Modifying Lipids for Use in Food: Lipids from microbial source* [online]. Woodhead Publishing [cit. 2021-02-24]. ISBN 978-1-84-569168-4. Dostupné z: https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMLUF0001/modifying-lipids-use/modifying-lipids-use

[33] SANTEK, Mirela Ivancic, Suncica BELUHAN a Bozidar SANTEK, 2018. Production of Microbial Lipids from Lignocellulosic Biomass. NAGESWARA-RAO, Madhugiri a Jaya R. SONEJI, ed. *Advances in Biofuels and Bioenergy* [online]. InTech, 2018-07-04 [cit. 2021-02-25]. ISBN 978-1-78923-286-8. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.74013

[34] GARAY, Luis A., Kyria L. BOUNDY-MILLS a J. Bruce GERMAN, 2014. Accumulation of High-Value Lipids in Single-Cell Microorganisms: A Mechanistic Approach and Future Perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **62**(13), 2709-2727 [cit. 2021-02-25]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf4042134

[35] KRUGER, Jacob S., Nicholas S. CLEVELAND, Rou Yi YEAP, et al., 2018. Recovery of Fuel-Precursor Lipids from Oleaginous Yeast. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* [online]. **6**(3), 2921-2931 [cit. 2021-02-25]. ISSN 2168-0485. Dostupné z: doi:10.1021/acssuschemeng.7b01874

[36] ŠPIČKA, Jiří, 2004. *Biochemie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta. ISBN 80-7040-683-6.

[37] DOHNAL, Vlastimil, Alena JEŽKOVÁ a Jiří SKLÁDANKA, 2009. Ergosterol: Klíčový steroid hub. *Kontakt* [online]. **10**(2), 449-454 [cit. 2021-02-27]. ISSN 12124117. Dostupné z: doi:10.32725/kont.2008.066

[38] ROGERS, Kara. Ergosterol: chemical compound. In: *Britannica* [online]. 2018 [cit. 2021-02-27]. Dostupné z: https://www.britannica.com/science/ergosterol.

[39] YUAN, Jian-Ping, Jiang-Hai WANG, Xin LIU, Hui-Cong KUANG a Xiao-Ni HUANG, 2006. Determination of Ergosterol in Ganoderma Spore Lipid from the Germinating Spores of Ganoderma lucidum by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **54**(17), 6172-6176 [cit. 2021-02-27]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf0617059

[40] *Methodist Debakey Cardiovasc Journal* [online], 2019. 15(3). [cit. 2021-03-01]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6822644/

[41] LEE, Sean Qiu En, Tsu Soo TAN, Makoto KAWAMUKAI a Ee Sin CHEN, 2017. Cellular factories for coenzyme Q10 production. *Microbial Cell Factories* [online]. **16**(1) [cit. 2021-03-01]. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-017-0646-4

[42] BENTINGER, Magnus, Michael TEKLE a Gustav DALLNER, 2010. Coenzyme Q – Biosynthesis and functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **396**(1), 74-79 [cit. 2021-03-01]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.147

[43] ACOSTA, Manuel Jesús, Luis VAZQUEZ FONSECA, Maria Andrea DESBATS, Cristina CERQUA, Roberta ZORDAN, Eva TREVISSON a Leonardo SALVIATI, 2016. Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. **1857**(8), 1079-1085 [cit. 2021-03-01]. ISSN 00052728. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbabio.2016.03.036

[44] KHOSHJOU, Farhad a Farahnaz DADRAS, 2014. Mitochondrion and Its Role in Diabetic Nephropathy. *Iranian Journal of Kidney Diseases* [online]. Hamadan, Iran, **8**(5) [cit. 2021-03-01]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/265393178_Mitochondrion_and_Its_Role_in_Diabetic_Nephropathy

[45] RAMOS, Antonio. Rhodotorula species. *Antimicrobe: Infectious Disease & ANTIMICROBIAL AGENTS* [online]. [cit. 2021-7-6]. Dostupné z: http://www.antimicrobe.org/index.asp

[46] SAMPAIO, José Paulo, 2011. Rhodotorula. *The Yeasts* [online]. Elsevier, 2011, s. 1873-1927 [cit. 2021-7-6]. ISBN 9780444521491. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-52149-1.00155-5

[47] KOT, Anna M., Marek KIELISZEK, Kamil PIWOWAREK, Stanisław BŁAŻEJAK a Cassamo Ussemane MUSSAGY, 2021. Sporobolomyces and Sporidiobolus – non-conventional yeasts for use in industries. *Fungal Biology Reviews* [online]. **37**, 41-58 [cit. 2021-7-16]. ISSN 17494613. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbr.2021.06.001

[48] SAMPAIO, José Paulo, 2011. Cystofilobasidium Oberwinkler & Bandoni (1983). *The Yeasts* [online]. Elsevier, 2011, s. 1423-1432 [cit. 2021-7-18]. ISBN 9780444521491. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-52149-1.00111-7

[49] KOT, Anna M., Stanisław BŁAŻEJAK, Marek KIELISZEK, Iwona GIENTKA, Joanna BRYŚ, Lidia RECZEK a Katarzyna POBIEGA, 2019. Effect of exogenous stress factors on the biosynthesis of carotenoids and lipids by Rhodotorula yeast strains in media containing agro-industrial waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. **35**(10) [cit. 2021-7-19]. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-019-2732-8

[50] MÁROVÁ, Ivana, Emilia BREIEROVÁ a Radka KOČÍ, 2004. Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of carotenogenic yeasts. *Annals of Microbiology* [online]. **54**(1), 73-85 [cit. 2021-7-19]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/228779464_Influence_of_exogenous_stress_factors_on_production_of_carotenoids_by_some_strains_of_cartenogenic_yeasts

[51] MANNAZZU, Ilaria, Sara LANDOLFO, Teresa Lopes DA SILVA a Pietro BUZZINI, 2015. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. **31**(11), 1665-1673 [cit. 2021-7-20]. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-015-1927-x

[52] LIU, Yuan Shuai a Jian Yong WU, 2006. Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in Xanthophyllomyces dendrorhous. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **73**(3), 663-668 [cit. 2021-7-20]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-006-0501-8

[53] CEZARE-GOMES, Eleane A., Lauris del Carmen MEJIA-DA-SILVA, Lina S. PÉREZ-MORA, Marcelo C. MATSUDO, Lívia S. FERREIRA-CAMARGO, Anil Kumar SINGH a João Carlos Monteiro DE CARVALHO, 2019. Potential of Microalgae Carotenoids for Industrial Application. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. **188**(3), 602-634 [cit. 2021-7-20]. ISSN 0273-2289. Dostupné z: doi:10.1007/s12010-018-02945-4

[54] LI, Xin, Xiaoqian WANG, Chuanlan DUAN, et al., 2020. Biotechnological production of astaxanthin from the microalga Haematococcus pluvialis. *Biotechnology Advances* [online]. **43** [cit. 2021-7-20]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107602

8 SEZNAM ZKRATEK

FID – plamenově ionizační detektor
GC – plynová chromatografie
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MUFA – mononenasycené mastné kyseliny
PDA – detektor diodového pole
PTFE – polytetrafluorethylen
PUFA – polynenasycené mastné kyseliny
SFA – nasycené mastné kyseliny
YPD – yeast extract-pepton-dextrose