



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

KOKULTIVACE KVASINEK A MIKROŘAS ZA ÚČELEM PRODUKCE OBOHACENÉ BIOMASY

COCULTIVATION OF YEASTS AND MICROALGAE TO PRODUCE ENRICHED BIOMASS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Lenka Bradáčová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1539/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Lenka Bradáčová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název diplomové práce:

Kokultivace kvasinek a mikrořas za účelem produkce obohacené biomasy

Zadání diplomové práce:

1. Přehled kmenů kvasinek a řas schopných kokultivace
2. Screening kmenů a optimalizace kultivačních podmínek pro produkci kombinované obohacené biomasy
3. Charakterizace produkované biomasy a obsahových složek
4. Vyhodnocení a diskuse výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

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

Bc. Lenka Bradáčová
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práce zkoumá vliv biologického stresu vyvolaného za podmínek kokultivace heterotrofních (kvasinky) a autotrofních (mikrořasy, sinice) organismů na produkci obohacené kombinované biomasy. Mezi sledované skupiny látek patří karotenoidy (β -karoten, lutein, lykopen, astaxanthin, torularhodin), chlorofyly A a B, ergosterol a ubichinon. Dále byla analyzována produkce lipidů, a to z hlediska obsahu v biomase a profilu mastných kyselin. V první části práce byla prozkoumána produkce biomasy kvasinek produkovaná v přítomnosti několika různých zdrojů dusíku. Jako zdroj uhlíku byl využíván glycerol. Následně proběhla kokultivace kvasinek s mikrořasami a sinicemi v mlutikultivátoru, kde byla postupně zvyšována koncentrace vybraných makroprvků (dusíku, hořčíku a fosforu). Poslední část práce byla zaměřena na kokultivaci kvasinek a mikrořas v laboratorním fermentoru. Na produkci celkové biomasy měl nejlepší efekt zvýšený obsah hořčíku a vysoký obsah dusíku v základním médiu. Vlivem dvojnásobného obsahu dusíku společně s fosforem bylo dosaženo nejlepších koncentrací karotenoidů. Produkce chlorofylů byla oproti karotenoidům výrazně nižší.

Klíčová slova: kokultivace, karotenogenní kvasinky, mikrořasy, sinice, obohacená biomasa

ABSTRACT

The diploma thesis is focused on the influence of biological stress formed by co-cultivation of heterotrophic (yeasts) and autotrophic (microalgae and cyanobacteria) organisms on the production of enriched biomass. The monitored groups of substances include carotenoids (β -carotene, lutein, lycopene, astaxanthin, torularhodin), chlorophylls A and B, ergosterol and ubiquinone. Further, production of lipids was analyzed in the terms of fatty acid profile and lipid content in biomass. In the first part of the work, the yeast biomass production was investigated using different nitrogen sources. Glycerol was used as a carbon source in all parts of the work. Subsequently, the co-cultivation of yeasts with microalgae and cyanobacteria took place in a multicultivator with gradual increase of selected macroelements – nitrogen, magnesium and phosphorus. The last part of the work was focused on the co-cultivation of yeasts and microalgae in a laboratory fermenter. The best effect on the production of total biomass was the increased magnesium content and high nitrogen content in the basic medium. The best concentrations of carotenoids were achieved due to the double nitrogen and phosphorus content together. Chlorophyll production was significantly lower compared to carotenoids.

Keywords: co-cultivation, carotenogenic yeasts, microalgae, cyanothecae, enriched biomass

BRADÁČOVÁ, Lenka. *Kokultivace kvasinek a mikrořas za účelem produkce obohacené biomasy*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131820>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování: Ráda bych poděkovala paní prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za cenné rady a připomínky během vypracovávání mé diplomové práce. Děkuji také Ing. Martinovi Szotkowskému, Ph.D, za pomoc během experimentální části této práce.

OBSAH

ABSTRAKT	3
ABSTRACT	4
ÚVOD	9
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1.1 Mikrořasy	10
1.1.1 Stélka řas	11
1.1.2 Rozmnožování řas	11
1.1.3 Zelené řasy	12
1.1.3.1 Rod <i>Scenedesmus</i>	12
1.1.3.2 Rod <i>Chlorella</i>	13
1.1.3.3 Rod <i>Coccomyxa</i>	14
1.2 Sinice	14
1.2.1 Rod <i>Anabaena</i>	15
1.3 Kvasinky	16
1.3.1 Morfologie kvasinek	16
1.3.2 Rozmnožování kvasinek	16
1.3.2.1 Vegetativní způsob	16
1.3.2.2 Pohlavní rozmnožování	17
1.3.3 Chemické složení buňky kvasinek	17
1.3.4 Metabolismus kvasinek	17
1.3.5 Karotenogenní kvasinky	18
1.3.5.1 Rod <i>Rhodospiridium</i>	18
1.3.5.2 Rod <i>Cystofilobasidium</i>	19
1.3.5.3 Rod <i>Sporidiobolus</i>	20
1.3.5.4 Rod <i>Phaffia</i>	20
1.4 Kokultivace	20
1.5 Metody analýzy a zpracování biomasy	21
1.5.1 Extrakce	22
1.5.1.1 Extrakce tuhé látky kapalinou	22

1.5.1.2	Extrakce z kapaliny do kapaliny	22
1.5.2	Chromatografie.....	23
1.5.2.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	23
1.5.2.2	Plynová chromatografie (GC).....	24
2	CÍLE PRÁCE.....	26
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
3.1	Chemikálie pro kultivace	27
3.2	Chemikálie pro extrakce a analýzu pomocí GC a HPLC.....	27
3.3	Seznam použitých kmenů mikroorganismů	28
3.3.1	Kvasinky.....	28
3.3.2	Mikrořasy	28
3.3.3	Sinice.....	28
3.4	Přístroje a pomůcky.....	28
3.4.1	Přístroje pro kultivace a kokultivace	28
3.4.2	Přístroje pro analýzu biomasy	29
3.5	Kultivační fáze	30
3.5.1	Kultivace kvasinek	30
3.5.2	Kultivace mikrořas a sinic.....	30
3.5.3	Příprava inokula I a II.....	30
3.5.4	Příprava produkčních médií	31
3.6	Stanovení biomasy	31
3.7	Kokultivační fáze v multikultivátoru	33
3.8	Kokultivace ve fermentoru.....	35
3.9	Analýza složek biomasy pomocí HPLC.....	36
3.9.1	Extrakce látek z biomasy.....	36
3.10	Analýza složek biomasy pomocí GC	37
3.10.1	Příprava vzorků pro analýzu	37
4	VÝSLEDKY.....	39
4.1	Stanovení koncentrace biomasy	39

4.2	Screening kvasinkových kmenů.....	40
4.2.1	Kultivační screening <i>Rhodosporidium toruloides</i> CCY 062-002-004.....	40
4.2.2	Kultivační screening <i>Cystofilobasidium macerans</i> CCY 17-9-3.....	43
4.2.3	Kultivační screening <i>Phaffia rhodozyma</i> CCY 77-1-1.....	45
4.2.4	Kultivační screening <i>Sporidiobolus pararoseus</i> CCY 19-9-6.....	46
4.2.5	Kultivační screening <i>Sporidiobolus metaroseus</i> CCY 19-6-20.....	47
4.3	Výsledky kokultivačních experimentů v mutikultivátoru.....	49
4.3.1	Kokultivace <i>Scenedesmus dimorphus</i> CCALA 443 a <i>Rhodosporidium toruloides</i> CCY 062-002-004.....	50
4.3.2	Kokultivace <i>Anabaena torulosa</i> CCALA 003 a <i>Rhodosporidium toruloides</i> CCY 062-002-004.....	52
4.3.3	Kokultivace <i>Scenedesmus acutus</i> CCALA 258 a <i>Rhodosporidium toruloides</i> CCY 062-002-004.....	55
4.3.4	Kokultivace <i>Sporidiobolus pararoseus</i> CCY 19-9-6 a <i>Coccomyxa</i> sp. CCALA 912.....	57
4.3.5	Kokultivace <i>Anabaena laxa</i> CCALA 805 a <i>Rhodosporidium toruloides</i> CCY 062-002-004.....	59
4.4	Výsledky kokultivace řas a kvasinek ve fermentoru.....	61
4.4.1	Kokultivace <i>Scenedesmus dimorphus</i> CCALA 443 a <i>Rhodosporidium toruloides</i> CCY 062-002-004 ve fermentoru.....	61
5	DISKUZE.....	64
6	ZÁVĚR.....	68
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	71
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	77

ÚVOD

V posledních letech se v řadě zemí světa postupně zlepšují životní podmínky a stoupá úroveň života. S sebou tento trend nese hlubší zájem a znalosti o svět kolem sebe a také péči o sebe samého. Se zvyšující se životní úrovní jsou spojeny i některé negativní jevy, jedním z nich je kontinuální a zvyšující se produkce odpadních produktů. Jako příklad lze uvést znečišťování povrchových vod, produkci odpadních vod, produkci špatně rozložitelných odpadních materiálů, spotřebovávání fosilních zdrojů, uvolňování více škodlivin do ovzduší, zvyšování uhlíkové stupy a řadu dalších.

Moderní obor biotechnologie zkoumá možnosti využití živých organismů, buněk a zejména mikroorganismů k řešení výše uvedených problémů. Pokrok byl dosažen například v oblasti produkce biopaliv několika generací. V poslední době se osvědčily mikrořasy a karotenogenní kvasinky jako alternativní producenti hojného množství lipidických látek, a tedy využití jejich biomasy je vhodné pro biopaliva. Důležitý fakt je ten, že mikroorganismy jsou schopny využívat jako zdroj živin různé odpadní substráty z mnoha průmyslových odvětví.

S rozvojem přírodních věd roste i aplikační potenciál mikroorganismů. Kromě paliv zaujímá významné místo i produkce obohacené biomasy, například u mikrořas nebo karotenogenních kvasinek. Vysoká produkce řady biologicky aktivních látek a antioxidantů umožňuje její aplikaci jako součást lidské potravy nebo doplňků stravy, dále také v krmivářském sektoru a akvaristice. Aplikace takové biomasy, nebo jejích metabolitů je také vhodná v kosmetickém průmyslu.

Tato diplomová práce se zabývá studiem možností produkce kombinované obohacené biomasy pocházející z kokultivace mikrořas a kvasinek. Cílem je testování a nastavení vhodných kultivačních podmínek tak, aby bylo možné docílit řízené produkce kvalitní biomasy s vysokým obsahem biologicky významných a vzácných metabolitů.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Mikrořasy

Mikrořasy jsou fotosyntetické jednobuněčné mikroorganismy, které lze nalézt v různých suchozemských a mořských ekosystémech, ve vodách slaných i sladkých. V průběhu posledních 3,5 miliardy let se postupně vyvinuly z prokaryotických cyanobakterií a v dnešní době rozeznáváme několik set tisíc druhů mikrořas. Fylogeneticky řadíme mikrořasy mezi eukaryotní i prokaryotní organismy. Rozmanitost těchto mikroorganismů je široká a souvisí s velkou škálou produkovaných metabolitů a probíhajícími reakcemi v jejich buňce. Tyto primitivní organismy mají schopnost autotrofního způsobu výživy, tedy fixují oxid uhličitý a sluneční energii. Mikrořasy jsou schopny takto zachycovat až 10krát účinněji uhlík než některé jiné suchozemské rostliny. Zajímavý je také obsah biologicky aktivních látek produkovaných jejich metabolismem, mezi něž patří polynenasycené mastné kyseliny s řetězcem delším než 20 uhlíků, karotenoidy, pigmenty a také enzymy produkované za stresových podmínek. Mikrořasy jsou významným producentem antioxidantních látek, jako jsou β -karoten, astaxanthin, lutein, aj. Antioxidanty z přírodních zdrojů vykazují vyšší stabilitu a jsou vhodnější pro lidskou spotřebu než některé běžně používané syntetické antioxidanty [1]. Kromě zmíněných látek v organismu mikrořas sledujeme také vhodný obsah minerálních a stopových prvků, které mají také pozitivní vliv na lidský organismus. Jejich obsah v biomase mikrořas je vyvážený a většinou v souladu s doporučeným denním příjmem těchto prvků. U některých kmenů mořských mikrořas může být např. několikrát vyšší obsah jodu na gram sušiny, než je výskyt tohoto prvku v běžné stravě. Pozitivní je také fakt, že mikroprvky jsou v biomase mikrořas vázány na organické molekuly (pigmenty, aminokyseliny, mastné kyseliny, aj.), což umožňuje jejich lepší využití organismem než ve formě anorganických solí [2]. V posledních letech dochází ke zvýšenému zájmu spotřebitelů o přírodní zdroje nutričních složek, což podporuje myšlenku biotechnologické produkce mikrobiální biomasy [1]. Vzhledem k biochemickému složení biomasy je žádoucí její obohacení pro zvýšení nutriční hodnoty potravin a krmiv pro zvířata, např. v akvakultuře. U některých látek produkovaných mikrořasami byly prokázány blahodárné účinky na živé organismy. Mnohé biologicky aktivní látky obsažené v biomase těchto mikroorganismů vykazují vlastnosti antibakteriální, antifungální, protivirové nebo protizánětlivé [3]. Postupné vyčerpávání fosilních zdrojů energie přivedlo vědce k myšlence využití biotechnologických postupů ke zmírnění dopadů tohoto trendu. V souvislosti s prací s fosilními zdroji energie je také vhodné zmínit využití mikrořas

jako zdroje pro tzv. biopaliva. Mikrořasy jsou schopny vyprodukovat mnohokrát větší množství olejů než některé suchozemské rostliny, např. slunečnice nebo palma olejná. Schopnost mikrořas akumulovat organické látky, nutrienty a zároveň odbourávat odpadní matrice z různých zdrojů může snížit obecně negativní vliv civilizace na životní prostředí [4]. Pěstování mikrořas nezatěžuje životní prostředí odlesňováním ploch a také nedochází k zabírání zemědělské půdy vhodné pro pěstování plodin. Jejich kultivace není sezonní, tudíž není potřeba aplikovat herbicidy ani pesticidy a v jejím průběhu nevznikají kontaminanty [3].

1.1.1 Stélka řas

Řasy se mohou vyskytovat ve formě jednobuněčné i mnohobuněčné. Mnohobuněčné řasy mají tělo tvořeno stélkou, tedy útvarem, u kterého neproběhla diferenciací pletiv, kromě pletivných stélek. Tyto stélky se objevují u řas nejvyvinutějších. Jejich členění na rhizoidy, fyloidy a kauloidy odpovídá tvarům těl vyšších rostlin – kořeny, stonek a list. Z hlediska složitosti stavby stélek se vyskytují v přírodě jejich různé organizační stupně. Jednobuněčné řasy vykazují charakter stélky monadoidní, která je tvořena bičíky a je schopna pohybu, také rhizopodiální, jedno i vícejadernou, dále kapsální typ, podobná monadoidnímu, avšak obsahuje buněčnou stěnu s obsahem slizu, možný je i výskyt bičíků, bez schopnosti pohyblivosti. V poslední řadě se vyskytuje u jednobuněčných řas typ kokální stélky, což je forma nepohyblivá s vytvořenou buněčnou stěnou. U mnohobuněčných zástupců převládá stélka trichální s jednojadernými buňkami. Tento typ vytváří jednoduchá nebo větvená vlákna. Dalším typem stélky vyskytující se u mnohobuněčných řas je heterotrichální nebo sifonkladální složená z mnohojaderných buněk, dále pseudoparenchymatická s možností dělení buněk ve dvou nebo třech vzájemně kolmých rovinách. Tato schopnost umožňuje vznik plochých listových stélek nebo těch s prostorově uspořádanými buňkami se schopností jejich diferenciací a rozlišení pletiv. Existuje také typ stélky sifonální s trubicovitým tvarem [5].

1.1.2 Rozmnožování řas

U řas pozorujeme rozmnožování pohlavní, nepohlavní i vegetativní. Nepohlavně se řasy rozmnožují pomocí výtrusů. Tyto útvary mohou být pohyblivé zoospory nebo nepohyblivé aplanospory. Nepohlavní rozmnožování u jednobuněčných řas zaznamenáváme většinou buněčným dělením, také zoosporami, aplanosporami nebo autosporami.

Vegetativní typ rozmnožování u řas znamená nejčastěji fragmentaci stélky a také tvorbu spor, akinet. Pomocí akinet řasy dokážou překonat období nepříznivých podmínek. Během pohlavního rozmnožování dochází ke splývání jader buněk, tedy karyogamii. Vznikají pohlavní

buňky, gamety. Během karyogamie probíhá kombinování genotypů, tedy gametogamie. Existuje gametogami trojího typu. Izogamie zajišťuje splnutí gamet stejného vzhledu a velikosti. Splnutí gamet stejného vzhledu, ale jiné velikosti se nazývá anizogamie. Posledním typem je oogamie, kdy samčí pohyblivá gameta oplodní samičí nepohyblivou oosféru. Jiným možným pohlavním způsobem rozmnožování řas je gametangiogamie (gametangie). Při tomto způsobu rozmnožování dochází ke splnutí celých gametangií, tvoří se tedy pohlavní buňky. Splnutím protoplastů somatických buněk se tvoří ani gamety ani gametangia. Příkladem může být konjugace spájivek.

Splnutím pohlavních buněk vzniká zygota. U zygoty většinou následuje ztlouštění buněčné stěny a k přeměně v zygosporu, jenž slouží k překonání nepříznivých podmínek. U haplodiplontních řas vyrůstá zygota sporofyt. Podle charakteru a průběhu životního cyklu dělíme řasy na tři typy – haplotní, haplodiplontní a diplontní. U řas haplotních převažuje haploidní generace. Z vegetativní haploidní stélky vznikají gamety a následnou kopulací diploidní zygota. Potom následuje meióza, jejímž důsledkem je vznik haploidních buněk vyrostle nová haploidní stélka. Jinak je to v případě řas haplodiplontních. Tito zástupci se vykazují tzv. rodozměnou. V jejich životním cyklu se střídá haploidní generace gametofyt s diploidní generací sporofytem. Posledním typem jsou řasy diplontní. U těchto jedinců zaznamenáváme převahu diploidní fáze. Haploidní fáze cyklu je přítomna pouze u gamet vznikajících po meióze ve specializovaných orgánech vegetativní stélky [5] [6].

1.1.3 Zelené řasy

Zelené řasy (*Chlorophyta*) jsou aerobní fotosyntetické organizmy mající eukaryotní buňku. Jsou charakteristické také přítomností dvoumembránových organel chloroplastů uvnitř buňky s obsahem zelených pigmentů chlorofylů. Stavba těla těchto organizmů se nečlení na kořen, stonek a listy, nazývá se thallus (stélka). Taxonomicky zelené řasy jsou řazeny do třídy *Chlorophyceae*, která je považována za nejvíce různorodou třídu ze všech řas [7].

1.1.3.1 Rod *Scenedesmus*

Rod *Scenedesmus* je rod zelených řas řadící se do oddělení *Chlorophyta* a třídy *Chlorophyceae*. Možná forma života u těchto mikrořas je jako jednobuněčný organizmus, ale velmi často vytváří koloniální formu, tzv. cenobia. Tento systém tvoří lineárně uspořádané buňky o počtu 2,4,8, nebo dokonce 16 jedinců v jedné řadě srostlé bočními stěnami. Zástupci se vyskytují hojně celosvětově v přírodě různých klimatických podmínek. Ve stojatých vodách tvoří velkou část fytoplanktonu a jsou vhodné jako potrava zooplanktonu pro jiné vodní organizmy, např.

perloočky. Koncem června a začátkem července můžeme pozorovat jejich zvýšený výskyt. Kultura *S. obliquus* (Obrázek 1) a *S. obtusus* se produkuje velkokapacitně jako potraviny z důvodu jejich vysokého obsahu bílkovin a minerálních prvků [7] [8].



Obrázek 1 *S. obliquus* [9]

1.1.3.2 Rod *Chlorella*

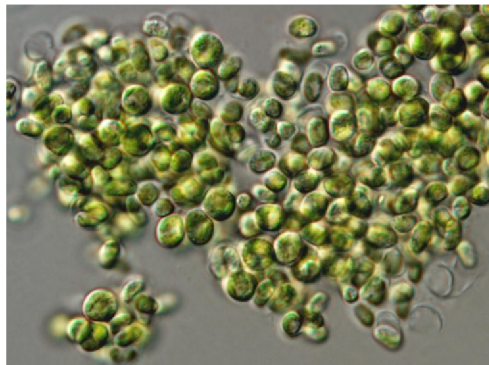
Tato jednobuněčná řasa je tvořena nepohyblivými buňkami sférického tvaru o velikosti v průměru 2-10 μm . Kultivace této řasy nevyžaduje náročné podmínky a poskytuje hojný nárůst biomasy. Zástupci mají zabudovaný fotosyntetický aparát, jenž zajišťuje tvorbu chemické energie z energie sluneční. Tento systém je schopen fungovat i při nízkých hodnotách světelného záření. Metabolismus řasy dokáže také odbourávat jako organický zdroj uhlíku glukózu v podmínkách tmy. V dnešní době se využívá její biomasa jako doplněk stravy z důvodu vyššího obsahu aminokyselin, minerálních prvků a vitamínů. Z hlediska vyšší produkce lipidických látek je také vhodná pro produkci biopaliv. *Chlorella* patří mezi nejvíce tolerantní mikrořasy pro alternativní způsob čištění odpadních vod za produkce obohacené biomasy [10]. Zástupci se mohou vyskytovat na vlhkých půdách, stěnách, kůře stromů, sladkovodních vodách a také odpadních vodách. Některé druhy řasy žijí v symbióze v těle bezobratlých jako tzv. *Zoochlorella* [7] [11].



Obrázek 2 *Chlorella* sp. [12]

1.1.3.3 Rod *Coccomyxa*

Rod *Coccomyxa* je tvořen volně žijícími zástupci zelených řas, které se vyskytují v řadě stanovišť a ekosystémů. Zástupci jsou zařazeni do několika desítek druhů [13]. Podle způsobu života v přírodě se označují jako lišejníkové a endofytické fotobionty. Někteří jedinci parazitují v mořských živočiších. Buňku těchto řas tvoří z velké části chloroplast a vysoký obsah lipidů. Jejich vysoká odolnost vůči nepříznivým podmínkám umožňuje jejich výskyt na extrémních místech, jako jsou např. prostředí s pH 2,6, polární oblasti při teplotách až -88 °C nebo jezírko na chlazení vyhořelého paliva jaderného reaktoru [14]. V podmínkách nedostatku některých živin (dusík, fosfor a síra) byl zjištěn vztah se zvýšenou antioxidační aktivitou u zástupce *C. omubensis*, jako obranou proti narůstající koncentraci kyslíkových radikálů v buňkách. Výsledky naznačují také možné využití antioxidačního systému mikrořasy jako senzoru oxidačního stresu v prostředí nedostatku živin [15].



Obrázek 3 *Coccomyxa* sp. [16]

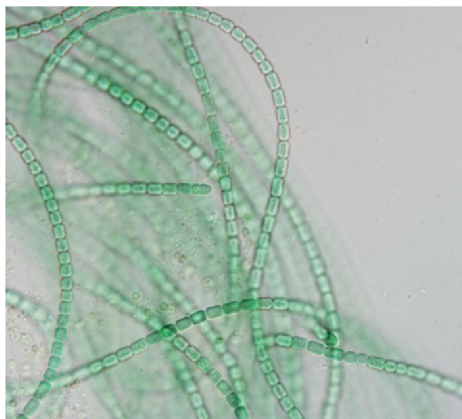
1.2 Sinice

Sinice patří mezi nejstarší oxygenní fotoautotrofní organizmy na světě. Fylogeneticky se jedná o prokaryotické gram-negativní bakterie mikrořas. Podle obsahu hlavního zastoupeného pigmentu c-fykocyaninu v jejich buňkách, mají převážně modro-zelnou barvu a nazýváme je také modro-zelené řasy. Tyto organizmy jsou schopny přežít téměř na všech možných stanovištích, díky jejich schopnosti syntetizovat si různé sloučeniny za pomoci využití radiační energie. Vyskytují se jako jednobuněčné i mnohobuněčné formy života, vláknité nebo agregované v koloniích. Existuje také výskyt volně žijících kmenů nebo v symbiotickém soužití s jinými organizmy. Od ostatních řas se liší nepravidelným organizováním buněčných organel a jejich pigmenty nejsou omezeny na jednotlivé chromatofory, ale vyskytují se volně v cytoplazmě. Buňka obsahuje primitivní jádro bez jaderné membrány a jadérka. Pohyb buněk

není zajištěn bičíky, avšak pomocí klouzavého pohybu. Využití sinicové biomasy přináší možnosti např. v enzymových technologiích, kde jsou běžně získávány některé restriční enzymy právě ze zástupců rodů *Anabaena*, *Microcoleus* a *Nostoc sp.* za nižší cenu než získané z jiných typů mikroorganismů. Význam těchto mikroorganismů v poslední době podporuje využití jejich biomasy v produkci tzv. biopaliv. Využití biomasy sinic má svůj význam také v případě produkce různých sekundárních metabolitů, vitamínů, toxinů, v kosmetickém a potravinářském průmyslu [17].

1.2.1 Rod *Anabaena*

Zástupci rodu *Anabaena* patří k dominantním složkám fytoplanktonu nacházejícího se v různých sladkovodních tocích, jezerech, vodních nádržích ale také v brakických vodních systémech po celém světě. Metabolismus této řasy umí produkovat některé toxiny nebezpečné pro jaterní nebo nervové buňky jiných organismů. Mezi příklady známých hepatotoxinů lze uvést mikrocystiny a jako neurotoxiny je možné zmínit anatoxin-a, nebo saxitoxiny. Některé hepatotoxické kmeny byly dříve izolovány v oblasti finského zálivu [18]. Významnou biotechnologickou aplikací této řasy je použití jako přírodní hnojivo. Stejně jako zástupci rodu *Nostoc*, mají zástupci rodu *Anabaena* schopnost fixovat dusík pomocí specializovaných buněk ve vlákních nazývaných heterocysty. Asimilaci dusíku zajišťují dráhy spjaté s centrálním metabolismem uhlíku. Ze schopnosti sinic fixovat dusík vychází jejich význam jako zdroje dusíku pro plodiny. Řasa je také vhodná v aplikaci čištění odpadních vod ze zemědělského průmyslu [19] [20].



Obrázek 4 *A. torulosa* [21]

1.3 Kvasinky

Kvasinky jsou eukaryotní heterotrofní jednobuněčné celosvětově rozšířené organizmy patřící do říše *Fungi*. V dnešní době věda zná přes 1000 druhů kvasinek, nicméně stále se jedná o zlomek všech jedinců patřících k této skupině. Jejich český název odkazuje na schopnost zkvašovat monosacharidy a některé disacharidy za tvorby ethanolu a oxidu uhličitého. Důležitým využitím kvasinek je odvětví biotechnologií a potravinářství, právě kvůli schopnosti fermentace různých substrátů v odlišných fyzikálně-chemických podmínkách. Některé kvasinky však sacharidy nefermentují vůbec. Kvasinky tvoří pravé mycelium, pouze pseudomycelium, což je útvar podobný kolonii jednobuněčných organizmů [22].

1.3.1 Morfologie kvasinek

Buňka kvasinek má většinou kulatý až elipsoidní tvar. V přírodě je možno také nalézt jedince s podlouhlým vláknitým tvarem. Prostorové rozměry buňky se liší druhově a pohybují se od 1 do 4 μm do šířky a 1 až 9 μm do délky. V cytoplazmě obsahují někteří zástupci barevné vakuoly a lomivé granule. Velikost buněk se může měnit v závislosti na přijímaných živinách a také dle náležitosti k určitému rodu [22].

1.3.2 Rozmnožování kvasinek

Kvasinky se rozmnožují vegetativním nebo pohlavním způsobem.

1.3.2.1 Vegetativní způsob

Tento způsob rozmnožování zahrnuje pučení a příčné dělení. U většiny kvasinkových druhů převládá pučení. Z mateřské buňky vzniká jedna identická dceřiná buňka.

Před začátkem pučení dochází v mateřské buňce ke změnám na organelách. Nejdříve probíhá splývání membrán na endoplazmatickém retikulu, následně i jeho dělení. Opakované dělení vakuol a protahování mitochondrií doprovází tyto změny také. Na mateřské buňce se vytvoří pupen, jako zárodek budoucího jedince. Menší vakuoly a mitochondrie přechází postupně do pupenu. Mateřské jádro začne prodělávat mitózu a společně s dalšími fragmenty organel přechází do pupenu. Cytoplazmatická membrána uzavře kanálek, kterým byly spojeny mateřská s dceřinou buňkou do pupenu. V pupenu dochází k intenzivnímu metabolismu a dorůstání organel. Po vytvoření buněčné stěny mezi oběma buňkami je pučení u konce. V optimálních podmínkách by měl tento děj trvat kolem dvou hodin [23].

1.3.2.2 Pohlavní rozmnožování

Výsledkem pohlavního rozmnožování je tvorba pohlavní spor. Kvasinky patřící do skupiny vřeckovýtrusných hub tvoří endospory (askospory), tedy uvnitř vřea (aska). Druhým typem pohlavního rozmnožování jsou útvary exospory (bazidiospory), která vytváří kvasinky uvnitř sporotvorných buněk. Tento způsob rozeznáváme u stopkovýtrusných hub (*Basidiomycotina*). Dvě haploidní buňky prochází procesem konjugace a také karyogamie. Výsledkem je vznik diploidního jádra, jež podstupuje redukční dělení meiózu. Po proběhlé meióze může navazovat jedno nepřímé dělení mitóza, nebo dochází přímo ke vzniku pohlavních spor. Tvorba endospor zahrnuje důležitý krok – vznik diploidní zygoty. Při spájení izogamním způsobem mají obě buňky přibližně stejnou velikost a jsou pohlavně rozlišené. Ke spájení velké mateřské buňky s dceřným pupenem dochází při heterogamním spájení. Přes exospory s rozmnožují pouze heterotalické kmeny. V případě tohoto rozmnožování se spájí buňky, ne však jejich jádra. Vzniká útvar dvoujaderná micelární fáze. Až v útvaru zvaném teliospora je možný průběh karyogamie. Po vyklíčení promycelia z teliospory dochází k meióse. Pučením tohoto útvaru vznikají sporidia, jejich následným pučením teprve vznikají vegetativní haploidní buňky [24].

1.3.3 Chemické složení buňky kvasinek

Obsah vody v cytoplazmě kvasinek se pohybuje v rozmezí 65-83 %. Složení sušiny kvasinkové buňky se liší v závislosti na druhu, stáří organismu a podmínkách kultivace. Hlavní složkou sušiny biomasy těchto organismů zabírají proteiny (až 50 %). Další složkou s vysokým zastoupením je glykogen (až 30 %). Lipidické látky jsou ve větší koncentraci u kvasinek využívajících jako zásobní látku tuky, nikoliv glykogen, jinak mohou značit degeneraci buňky. Dále jsou v sušině obsaženy z asi 10 % nukleové kyseliny, z 5 % strukturní polysacharidy a také až z 8 % popel. Látky sekundárního metabolismu, jako jsou vitamíny skupiny B, ergosterol, či provitamin A mají neméně významné zastoupení v biomase [24] [22].

1.3.4 Metabolismus kvasinek

Metabolismus kvasinek funguje na principu odbourávání organických molekul a zisku energie ukryté v jednotlivých vazbách mezi atomy. Veškerým zdrojem živin jsou jim organické látky. Tento způsob zisku energie patří mezi chemoorganoheterotrofní. Podle koncentrace rozpuštěného kyslíku v médiu, resp. v prostředí kvasinky, je možná aktivace anaerobního nebo aerobního metabolismu. Kvasinky mají dvě cesty, kterými mohou získat energii ve formě ATP pro další rozvoj buněk. Jedná se o respiraci a fermentaci. Tyto dráhy mají společný průběh až

po vytvoření dvou molekul pyruvátu a ATP z molekuly glukózy. Cestou fermentace následuje enzymatická přeměna pyruvátu na ethanol a oxid uhličitý. V tom kroku nedochází ke vzniku energie, avšak k recyklaci NAD^+ , které je spotřebováno v glykolýze. Respirační drahou prochází pyruvát kompletní oxidací na oxid uhličitý v Krebsově cyklu a následně řetězcem oxidativní fosforylace, jenž vyžaduje přítomnost kyslíku a ve spojení s reoxidací NADH na NAD^+ z katabolických drah produkuje ATP. Celkový výtěžek respirace je několikrát vyšší než u fermentace. Kvasinky pozitivní na Crabtreeho efekt v prostředí s dostatkem kyslíku a vhodné koncentraci glukózy mohou používat oba způsoby zisku energie současně. Při fermentaci vznikající ethanol se hromadí v médiu a může být přeměněn na acetyl-CoA a dále použit pro produkci ATP, když dojdou zásoby glukózy v prostředí kvasinky. Respirace je nicméně energeticky účinnější, protože při zmiňovaném kroku dochází ke spotřebě ATP [25].

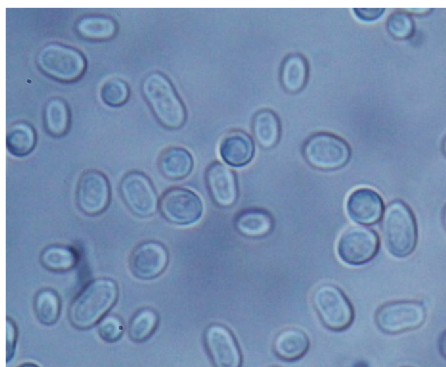
1.3.5 Karotenogenní kvasinky

Metabolismus některých rodů kvasinek má schopnost vytvářet a akumulovat v buňce barevné lipofilní pigmenty karotenoidy. V případě karotenogenních kvasinek se jedná o molekuly mající různé odstíny cihlově červené, žluté až oranžové barvy. Vyšší koncentrace těchto známých antioxidantních látek způsobuje příslušné zbarvení kolonií a těmto mikroorganismům říkáme také červené kvasinky. Významná je také produkce dalších lipidických látek těmito kvasinkami. Taxonomicky patří většina zástupců ke třídě *Basydiomycetes* [26] [23] [27].

1.3.5.1 Rod *Rhodospiridium*

Rod karotenogenních kvasinek *Rhodospiridium* patří ke známým a vědecky zkoumaným rodům, které mají potenciál produkovat lipidy a biopaliva, dále také karotenoidy a jiné hodnotné látky. Akumulace lipidů se pohybuje do 50 % a u některých zástupců dosahuje až 70 % sušiny. Pozitivním faktem je, že tyto kvasinky jsou přirozeně přizpůsobivé různým zdrojům substrátu, vykazují dobrou odolnost vůči různým inhibičním látkám u neznámých substrátů, což podporuje jejich potenciál průmyslového využití. Jako substrát mohou sloužit pro produkci lipidů glukóza, glycerol, mastné kyseliny, aj. Nejlepších výsledků z pohledu produkce biomasy dosahují tito zástupci na glukózovém médiu. Využití glycerolu jako substrátu pro produkci lipidů bylo také studováno. Jelikož během přípravy bionafty vzniká poměrně hodně glycerolu, nabízí se myšlenka využití tohoto glycerolu kvasinkami za účelem produkce lipidů a biomasy bohaté na karotenoidy a jiné látky. Podle způsobu přípravy bionafty může surový glycerol obsahovat také methanol, který má inhibiční efekt na *Rhodospiridium*, nicméně existují i záznamy o opačném efektu z pohledu produkce lipidů [28]. Bylo zjištěno, že zástupce

z pododdělení *Pucciniomycotina Rhodosporidium paludigenum* má schopnost degradovat mykotoxin patulin pomocí intracelulární enzymové aktivity. Transformačním produktem je pravděpodobně kyselina deoxypatulinová. Podle provedených experimentů vykazoval transformační produkt výrazně menší toxicitu než patulin vůči derivovaným lidským jaterním buňkám. Nabízí se tedy možnost využití této kvasinky k degradaci patulinu v místech jeho častého výskytu – ovoci, respektive produktech z něj [29]. *Rhodosporidium toruloides* je významný zástupce tohoto rodu. Výskyt kvasinky je možný v buničině borového dřeva, půdě, mořských vodách, kyselých odpadních vodách a také na listech rostlin. Metabolizmus tohoto zástupce je schopen efektivně využít široké profil zdrojů uhlíku a energie jako jsou monosacharidy, oligosacharidy (sacharóza, maltóza, celobióza, trehalóza), alkoholy (ethanol, glycerol, mannitol, sorbitol), organické kyseliny, mastné kyseliny s dlouhým řetězcem a také D-galakturonovou kyselinu [30]. Existují výzkumy studující produkci lipidů a karotenoidů pomocí *R. toruloides* za využití hydrolyzátů biomasy jako živného média. Tento způsob je průmyslově vhodný, protože tato kvasinka vykazuje rezistenci vůči inhibitorům pocházejícím z takové biomasy [31] [32] [33]. Průmyslová biotechnologická výroba karotenoidů a lipidů touto kvasinkou je ekonomicky náročná. Z tohoto důvodu vědci hledají možnosti snížení nákladů výroby. Jedním z možných postupů je využití třtinové melasy jako substrátu pro produkci karotenoidů a lipidů v podmínkách limitace dusíkového zdroje [34].



Obrázek 5 *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004

1.3.5.2 Rod *Cystofilobasidium*

Kvasinky tohoto rodu patří do řádu *Cysofilobasidiales*. Tento rod tvoří např. zástupci *C. bisporidii*, *C. capitatum*, nebo *C. macerans*. Tyto kvasinky produkují holobasidia, z nichž každé má úzkou centrální oblast a naběhlý vrchol. Zbarvení kolonií zástupců se pohybuje v odstínech růžové, ale také krémové barvy. V současnosti jsou klasifikovány čtyři druhy tohoto rodu [35]. Jejich hlavní fenotypově vlastnosti zahrnují tvorbu teliospory, tvorba

karotenoidů, tvorba škrobnatých sloučenin, využití D-glukuronátu a inositolu jako jediného zdroj uhlíku a využití dusičnanů jako jediného zdroje dusíku. Někteří zástupci provádí homotalický životní cyklus, např. *C. capitatum*, *C. informinatum*, jiní zase heterotalický – *C. ferigula* [36].

1.3.5.3 Rod *Sporidiobolus*

Tento rod zahrnuje několik biotechnologicky známých zástupců, jako jsou např. *S. pararoseus*, *S. metaroseus*, nebo *S. ruineniae*. Společným znakem tohoto rodu je rozmnožování klíčením teliospor do krátkých větvených hyf namísto basidií. Morfologie růstu kvasinky *S. metaroseus* zahrnuje vejčitý až elipsoidní tvar, přibližných rozměrů 2-5 x 8-12 μm s reniformními balistokonidii. Po měsíční kultivaci na MYP agaru je povrch kolonií růžový a hladký. Teliospory vykazují elipsoidní, terminální nebo interkalární charakter. Vhodné substráty pro metabolismus kvasinky mohou být např. D-glukóza, D-galaktóza, L-sorbóza, D-ribóza, D-arabinóza, sacharóza, maltóza nebo α,α -trehalóza. Stejně nebo i slabší využití látek kvasinkou je zaznamenáno u salicilátu, arbutinu, kyseliny jantarové a citronové [37]. Byl studován vliv dusíkového zdroje na produkci lipidů a karotenoidů u kvasinky *S. pararoseus*. S přidavkem síranu amonného došlo k nárůstu celkové biomasy, avšak k poklesu produkce lipidů. Dále bylo prokázáno, že lipidy produkované touto kvasinkou jsou bohaté na kyselinu olejovou ve srovnání s ostatními mikroorganismy. Lipidy pocházející z takové biomasy mají možné využití v potravinářském průmyslu k obohacení různých potravin o MUFA [38].

1.3.5.4 Rod *Phaffia*

Zástupci tohoto rodu jsou podobně jako zástupci rodu *Rhodotorula* biotechnologicky známé kvasinky vhodné pro velkoobjemovou produkci karotenoidů. *Phaffia* ochotně akumuluje ve svých buňkách astaxanthin, významný antioxidant využívaný běžně lidskou populací jako součást výživy [39]. Aplikace magnetického pole během kultivace zvyšuje produkci biomasy při několikadenní kultivaci u *P. rhodozyma*. Tento efekt podporuje také lepší produkci karotenoidů u zmíněné kvasinky. Existují záznamy, že takový nárůst je až o 59,6 % vyšší než bez aplikace magnetického pole [40].

1.4 Kokultivace

Možnost produkce obohacené biomasy v sobě skrývá způsob kultivace více mikroorganismů. Produkce dvou mikroorganismů v jednom médiu společně se nazývá kokultivace. Taková biomasa nabízí nové složení oproti samostatným mikroorganismům. Může dojít k vyšší

produkcí celkové biomasy, nižší produkci některé z biomolekul nebo také obohacení biomasy o látku, jež produkuje jenom jeden z mikroorganismů. Existují tři kombinace podle způsobu výživy jedinců – fotoautotrof s fotoautotrofem, heterotrof s fotoautotrofem a také heterotrof s heterotrofem. V této diplomové práci byla využita kombinace heterotrofního organismu kvasinky a fotoautotrofního organismu řasy a sinice. Kokultivace při takovém biologickém stresu funguje tak, že heterotrofní jedinec spotřebovává kyslík a zdroj organického uhlíku pomocí aerobního metabolismu za uvolňování oxidu uhličitého do média. Fotoautotrofní partner využívá vznikající i již přítomný oxid uhličitý a produkuje kyslík. Zvyšující se koncentrace rozpuštěného kyslíku také podporuje rychlejší růst heterotrofního jedince. Tato kombinace mikroorganismů se zdá být nejlepší volbou pro produkci obohacené biomasy. Volba mikroorganismů a široké spektrum produkovaných metabolitů patří mezi výhody. Dále také fakt, že nedochází k boji o uhlíkový zdroj. Mezi nevýhody je třeba zmínit nároky na ideální prostředí v médiu. Heterotrofní a fotoautotrofní zástupci mají mnohdy odlišné nároky na pH média, jeho složení, zdroj uhlíku, přítomnost kyslíku, aj. Důležitá je také volba kmenů vhodných pro kokultivaci [41] [42] [43].

Kokultivace kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae* a zástupců řas z rodů *Desmodesmus* a *Scenedesmus* vykazuje produkci lipidů vyšší než 30 % při různých stresových podmínkách [44]. Existuje studie zabývající se kokultivací heterotrofní kvasinky *Rhodotorula glutinis* a fotoautotrofní mikrořasy *Chlorella pyrenoidosa* na odpadním vodním substrátu z prostředí chovu prasat. Schopnost aplikace synergického působení metabolismů těchto mikroorganismů byla prokázána změnou sledovaných ukazatelů. Byla pozorována znatelná účinnost odbourávání substrátu z pohledu ukazatelů celkového dusíku, amoniakálního dusíku a chemické spotřeby kyslíku. Ideální poměr kvasinky a řasy byl zjištěn na 3:1. Při tomto poměru bylo dosaženo až o 59,8 % více bílkovin než u původního substrátu, což nabízí možnost využití biomasy z kokultivace pro krmné účely [45]. U kokultivace mikrořasy *Scenedesmus obliquus* a kvasinky *Rhodotorula glutinis* zaznamenáváme podstatný nárůst biomasy (1600 mg/l) a obsahu lipidů (467 mg/l) [46]. Kokultivace mikrořas a plísní poskytuje slibnou budoucnost pro zpracovávání odpadních vod za cílem snížení ceny produkce bionafty, díky snadné a efektivní práci s biomasou [47].

1.5 Metody analýzy a zpracování biomasy

V diplomové práci bylo využito několik mikrobiologických metod a postupů k produkci obohacené biomasy. Uplatněny byly dále také analytické techniky, pomocí kterých bylo

zjištěno složení vyprodukovaných buněk z pohledu jednotlivých sledovaných metabolitů a celkové koncentrace biomasy.

1.5.1 Extrakce

Principem této analytické separační metody je distribuce látky mezi dvěma vzájemně nemísitelnými rozpouštědly na základě odlišné rozpustnosti jednotlivých složek matrice v různých rozpouštědlech. Podle fyzikálního skupenství extrahovaných látek můžeme provádět extrakci tuhé látky kapalinou, extrakci kapalné látky jinou kapalinou, superkritickou fluidní extrakci a extrakci pevnou fází. Mezi možné využití této metody patří oddělení kationtů a aniontů anorganických sloučenin, přírodních látek jako např. barviv nebo tuků. Metoda se aplikuje také při zakoncentrování analytů [48].

1.5.1.1 Extrakce tuhé látky kapalinou

Tento proces extrakce je možné provádět kontinuálně nebo diskontinuálně. Během diskontinuálního procesu se provádí třepání pevné látky v rozpouštědle. Do rozpouštědla přechází analyzovaná látka, resp. nežádoucí obsah vzorku. U kontinuálního způsobu extrakce pevných látek kapalinou se využívá nejčastěji Soxhletův extraktor.

Základní tři části tohoto zařízení tvoří extrakční patrona ve střední části s výchozí náplní, destilační baňka a zpětný chladič. Extrakční patrona se naplní analyzovaným vzorkem, do baňky se nalije rozpouštědlo. Následuje zahřev baňky a kondenzace par rozpouštědla v chladiči. Po kondenzaci rozpouštědlo stéká do patrony na vzorek. Hromadění stékajícího rozpouštědla v patroně způsobí stoupaní hladiny a její přetečení do destilační baňky, kde se rozpouštědlo znovu destiluje. Výsledkem extrakce je v baňce izolovaná požadovaná složka ze vzorku, respektive složky. Jiným možným extraktorem pro kontinuální proces je Twisselmannův extraktor. U tohoto typu aparatury do varné baňky protéká zkondenzované rozpouštědlo přes patronu se vzorkem. Z varné baňky je možno ho oddělit destilací v horní části extraktoru [48].

1.5.1.2 Extrakce z kapaliny do kapaliny

V praxi je rozšířenější způsob extrakce z kapaliny do kapaliny. Na základě rozdílné rozpustnosti látek ve dvou nemísitelných kapalinách dochází k oddělení analytů ze vzorku do příslušných fází, mezi kterými se ustavuje fázová rovnováha. Vzorek většinou bývá ve vodné fázi a převádí se do druhé fáze, která bývá organická. K tomuto účelu jsou volena organická

rozpouštědla jako např. benzen, chloroform, butanol, aj. Nernstův rozdělovací zákon určuje rovnovážné rozdělení složky mezi vzorkem a rozpouštědlem. Podle něj je při konstantní teplotě a tlaku poměr aktivit složky v obou fázích konstantní. Pro větší výtěžek extrakce lze využít většího přídatku organického rozpouštědla nebo zopakování extrakce několikrát po sobě [48] [49].

1.5.2 Chromatografie

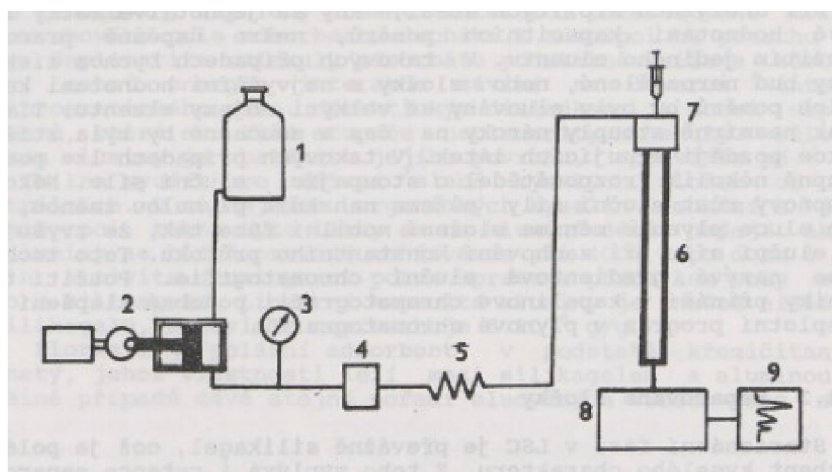
Chromatografické techniky patří mezi separační analytické metody. Jejich cílem je oddělení analytu z matrice vzorku. Řadíme je mezi metody kvalitativní i kvantitativní. Principem je vnesení vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze - nepohyblivou stacionární fázi a pohyblivou mobilní. Vzorek je od začátku stacionární fáze unášen pomocí mobilní fáze a dochází k zadržování složek vzorku do materiálu stacionární fáze na základě fyzikálně-chemických interakcí. Záchytem složek ve stacionární fázi dochází k jejich odseparování z matrice vzorku. Na konec stacionární fáze dorazí každá složka v jiném čase a dle toho jsou potom zachyceny na vhodném připojeném detektoru. Ve vzniklém chromatogramu je možno analyzovat jednotlivé složky. Chromatografické metody zahrnují četné množství metod. Můžeme je dělit podle skupenství mobilní fáze, podle uspořádání stacionární fáze nebo podle povahy děje, který převládá při separaci [50].

V této diplomové práci byly využity metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a plynové chromatografie (GC).

1.5.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC je pokročilá a instrumentálně náročná technika kapalinové chromatografie. Vyvinula se kolonové kapalinové chromatografie, která se používala až do poloviny šedesátých letch minulého století. Dodnes se stále používá pro oddělení směsí jednoduchých matric, např. oddělení složek směsí před spektrofotometrickým stanovením. Pro práci se složitějšími vzorky je nevhodné její využití a z těchto důvodů byla vyvinuta metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Tato technika vychází z plynové chromatografie. Separací látek se dosahuje pomocí adsorpce, rozdělování mezi dvě fáze podle různé rozpustnosti, iontovou výměnou, biospecifickými interakcemi a síťovým efektem. Technické vybavení tvoří čerpadlo, dávkovač vzorku, kolony, detektor a vyhodnocovací zařízení, viz. schéma (Obrázek 6). Hlavním úkolem čerpadla je zajištění stálého průtoku mobilní fáze s přesností lepší než 2 %. Průtok by se měl pohybovat v rozmezí rychlostí 0,1 – 10 ml/min. K dávkování vzorku se

využívá šesticečný kohout s dávkovací smyčkou. Takový kohout mlže dávkovat vzorek až do tlaku 40 MPa. Kolony pro HPLC se většinou používají jako rovné trubice, jejichž délka je obvykle v rozmezí 10 až 25 cm. Nejčastější průměry jsou od 2 do 6 mm. Vhodným materiálem pro tyto kolony je nerezová ocel nebo tvrzené sklo. Důležitým aspektem u vysokoúčinných systémů je, aby jejich průměr byl po celé délce shodný a povrch byl hladký. Kolony jsou naplněny sorbentem kulovitých částic o průměru 3, 5 nebo 10 μm . Důležitou součástí HPLC je také detektor. V praxi převládají detektory spektrofotometrický, fluorimetrický, refraktometrický nebo také elektrochemické detektory jako je např. vodivostní detektor [51].



Obrázek 6 Schéma kapalinového chromatografu [51]

Legenda: 1-zásobník, 2-čerpadlo, 3-tlakoměr, 4-filtr, 5-tlumič pulzů, 6-kolona, 7-dávkování vzorku, 8-detektor, 9-zapisovač

1.5.2.2 Plynová chromatografie (GC)

U této separační chromatografické techniky je principem rozdělení složek směsi ve vzorku mezi dvě fáze – mobilní plynnou a stacionární, pevnou nebo kapalnou, fází. Dle zvolené stacionární fáze můžeme využít plynovou adsorpční nebo plynovou rozdělovací chromatografii. U adsorpční verze je hlavním procesem adsorpce složky z plynné fáze na povrch pevného sorbentu. V případě rozdělovací GC probíhá distribuce mezi plynnou mobilní fází a kapalnou stacionární fází. Plynová chromatografie se využívá pro stanovení plynů, kapalin a látek s bodem varu okolo 400 °C. Látky jsou stanovovány v plynné fázi, tedy jsou vypařovány a nesmí se rozkládat. Teplota 400 °C je horní teplotní limit většiny dnešních plynových chromatografů.

Mobilní fázi v GC tvoří nosný plyn, obvykle argon, dusík, helium nebo vodík. Uvnitř kolon je stacionární fáze a dle charakteru dělíme kolony na náplňové a kapilární. Náplňové kolony mají

tvár trubice, kterou tvoří sklo nebo nerezová ocel. Náplní těchto trubic mohou být např. silikagel, oxid hlinitý, syntetické makromolekulární adsorbenty. Jako nosič u kapalné stacionární fáze můžeme nalézt např. křemelinu. Kapilární kolony obsahují stacionární fázi ve formě tenkého filmu na vnitřní straně kapiláry. Většinou se jedná o vrstvičku tavného křemene, který nese ještě tenkou vrstvu polyamidu. Separace složek vzorku začíná nástřikem vzorku do komory. Nosný plyn od tohoto okamžiku unáší vzorek kolonou naplněnou sorbentem. Následuje odpaření vzorku, aby bylo co nejrychlejší, nástřiková komora je vyhřívána. Po odpaření jsou páry vzorku dále unášeny do kolony. Kolona se nachází v termostatu, z důvodu kontroly teploty a správného průběhu separace. Průchodem kolonou se postupně separují složky vzorku a postupně dopadají na detektor, který vydá signál a ten je zpracováván vyhodnocovacím zařízením [48].

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce je kokultivace kvasinek a mikrořas za účelem produkce obohacené biomasy.

Dílčí cíle práce jsou:

Teoretická část:

- Charakterizace kvasinek a mikrořas
- Přehled kmenů těchto organismů
- Kokultivace
- Metody analýzy biomasy

Praktická část:

- Screening kmenů a optimalizace kultivačních podmínek pro produkci obohacené kombinované biomasy
- Charakterizace produkované biomasy a obsahových složek
- Vyhodnocení a diskuze výsledků

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie pro kultivace

Agar-Agar, Roth (SRN)

D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)

Dihydrogenfosforečnan draselný, Lach-Ner, S.r.o. (ČR)

Dusičnan kobaltnatý hexahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)

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

Glycerol Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Hydrogenfosforečnan draselný, 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)

Kvasničný autolyzát, Himedia (Indie)

Kyselina boritá p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)

Kyselina sírová 96% p.a., Penta (ČR)

Močovina Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Pepton z kaseinu, Roth (SRN)

Síran amonný Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Síran hořečnatý 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)

3.2 Chemikálie pro extrakce a analýzu pomocí GC a HPLC

Aceton p.a., Lach -ner, S.r.o. (ČR)

Hydroxid draselný p.a., Lach -ner, S.r.o. (ČR)

Diethylether p.a., Lach -ner, S.r.o. (ČR)

Ethanol pro UV -VIS, Lach -ner, S.r.o. (ČR)

Chloroform p.a., Lach -ner, S.r.o. (ČR) 3.1.4

Methanol pro HPLC, Sigma -Aldrich (SRN)

Acetonitril pro HPLC, Sigma -Aldrich (SRN)

Standardy Supleco FAME 37 mix (Sigma Aldrich, SRN).

3.3 Seznam použitých kmenů mikroorganismů

V experimentu byly využiti zástupci karotenogenních kvasinek a také zástupci mikrořas a sinic. Kvasinky byly získány ve sbírce „Culture Collection of Yeasts“ (CCY) při Chemickém ústavu SAV v Bratislavě. Řasy a sinice byly získány ve sbírce autotrofních organismů „Culture Collection of Autotrophic Organisms“ (CCALA) při Botanickém ústavu AV ČR v Třeboni.

3.3.1 Kvasinky

Sporidiobolus metaroseus CCY 19-6-20

Sporidiobolus pararoseus CCY 19-9-6

Cystofilobasidium macerans CCY 17-9-3

Phaffia rhodozyma CCY 77-1-1

Rhodospiridium toruloides CCY 062-002-004

3.3.2 Mikrořasy

Scenedesmus acutus CCALA 258

Scenedesmus dimorphus CCALA 443

Coccomyxa sp. CCALA 912

3.3.3 Sinice

Anabaena torulosa CCALA 003

Anabaena laxa CCALA 805

3.4 Přístroje a pomůcky

3.4.1 Přístroje pro kultivace a kokultivace

Analytické váhy Boeco (CRN)

Box Aura mini iBopTech (ČR)

Centrifuga Hermle Z36 HK, (ČR)

Detektor optické hustoty – detekce při 680 nm a 720 nm

Fermentor R.A.L.F Bioengineering, (Švýcarsko)

Kultivátor Multi-Cultivator MC 1000-OD PSI Drásov (ČR)
LED diodový zdroj pro zkumavky kokultivace
Termoblok VWR, (ČR)
Třepačka Yellow line, (SRN)
Třepaný inkubátor, ZWYR-D2401 – Labwit, BioTech (ČR)
Vortex/homogenizátor disruptor Genie, Scientific Industries, Inc. (USA)
Vzduchová pumpa

3.4.2 Přístroje pro analýzu biomasy

Spektrofotometr VIS, Helios δ , Unicam (GB)
Lyofilizátor Labconco FreeZone 4.5 Freeze Dryer (USA)
Vortex/homogenizátor disruptor Genie, Scientific Industries, Inc. (USA)
HPLC/DAD sestava (Thermo Fischer, USA)
• Detektor DAD Vanquish (Thermo Fischer, USA)
• Kolona C18 EVO 150 mm, 4,6 mm, 2.6 μm
• Vyhodnocovací systém Chromeleon
Thermo Scientific TRACE 1300 TM Gas Chromatograph, (Thermo Fischer, USA)
• Detektor FID (Thermo Fischer, USA)
• Kolona Zebron GC-FAME, 30 m \times 0,25 mm \times 0,20 μm , (Phenomenex, USA)
• Thermo Scientific AI 1310 Autosampler
• Vyhodnocovací systém Chromeleon

3.5 Kultivační fáze

3.5.1 Kultivace kvasinek

Všechny kvasinky využit v této diplomové práci byly uchovávány v hlubokomrazících boxech v kryovialkách při - 80 °C. Z těchto kryovialek bylo v prostředí očkovacího boxu odpipetováno 100 µl na Petriho misky se stejným médiem. Po 24 hod kultivaci bylo odebráno 10 stěrů kultury očkovací kličkou do jedné Erlenmeyerovy baňky, do kterých bylo připraveno inokulum I o objemu 60 ml tvořeného univerzálním médiem pro kultivaci kvasinek – YPD médiem. Po 24 h kultivace při teplotě 25 °C byla provedena mikrobiální kontrola s pomocí imerzního objektivu světelného mikroskopu. Následovalo přenesení namnožených kvasinek v poměru 1:5 do inokula II, které tvořilo opět YPD médium v objemu 125 ml. Následovala kultivace 24 hod při stejných podmínkách jako inokulum I. Poté byla provedena mikrobiální kontrola a přeočkování kvasinek do produkčního BBM média. Produkční médium bylo tvořeno 60 ml BBM média nebo „*Spirulina*“ médiem s různými zdroji dusíku a glycerolem jako zdrojem uhlíku. Do každé baňky bylo přeneseno 10 ml kultury z inokula II. Takto připravené produkční médium bylo kultivováno na třepačce po dobu 96 hod.

3.5.2 Kultivace mikrořas a sinic

Pro kultivaci mikrořas a sinic platí obdobné postupy jako u kvasinek, avšak některé kroky se liší. Jako prostředí byla využita destilovaná voda z důvodu náchylnosti těchto mikroorganizmů k iontům přítomným v kohoutkové vodě. Je nezbytné dodržování maximálně sterilní práce z důvodu zamezení případné kontaminace a narušení růstu kultury. Bylo zvoleno BBM médium o stejném složení jako v případě kvasinek. Z inokula II byla řasová kultura zaočkována do sterilního BBM média v 5 l probublávacích sterilizačních lahvích ke kultivaci po dobu několika týdnů. Během kultivace byla měřena spektrofotometricky absorbance při vlnové délce 680 nm pro kontrolu nárůstu biomasy. Její hodnota by se měla pohybovat v rozmezí 0,15 – 0,2.

3.5.3 Příprava inokula I a II

Inokula I a II byla tvořena univerzálním médiem pro kultivaci kvasinek, tzv. YPD médiem. Médium bylo připraveno navážením potřebných komponent dle tabulky 1 (Tabulka 1) a doplněním potřebným objemem vody. Pro inokulum I se jednalo o 60 ml, pro inokulum II byl objem 125 ml. Následovala sterilizace takto připravených médií v Erlenmeyerových baňkách v autoklávu při 120 °C po dobu 40 min. Po vychlazení média se zaočkovalo v BioHazard boxu kulturou. V případě mikrořas a sinic bylo využito u inokula I a II BBM médium.

Tabulka 1 *Složení YPD média*

Složka	Množství
D-glukóza / monohydrát D-glukózy	20 g / 22 g
Bakteriologický pepton	20 g
Kvasničný autolyzát	10 g
voda	1000 ml
agar	20 g

3.5.4 Příprava produkčních médií

Po kultivační fázi v univerzálním médiu byly kultury mikroorganismů kultivovány v produkčním BBM médiu, respektive „*Spirulina*“. Složení BBM média popisují údaje v tabulkách 2 a 3. Jednotlivé složky a koncentrace pro „*Spirulina*“ médium popisují data uvedená ve zdroji [52]. Produkční média obsahovala základní složení jako u BBM média, avšak u jednotlivých z nich došlo k nahrazení zdroje dusíku dle požadavků experimentu. Zdroj uhlíku byl vždy glycerol. U sledovaných kmenů sloužila jako zdroj dusíku vždy jedna z následujících sloučenin: dusičnan draselný, močovina, glycin nebo síran amonný. Přepočty pro jednotlivé zdroje uhlíku a dusíku určují data v tabulce 4.

3.6 Stanovení biomasy

Po kultivaci následovala mikrobiální kontrola buněk pomocí mikroskopu. Následovalo stočení 40 ml kultury v centrifugačních zkumavkách při 7500 ot/min po dobu 4 min. Supernatant byl slit a ponechán pro další analýzy. Kultura byla promyta 15 ml destilované vody a znovu zcentrifugována. Vzorek byl v centrifugační zkumavce zamrazen při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté lyofilizován po dobu 24 h. Po tomto kroku byl lyofilizovaný vzorek zvážen na analytických vahách a byla stanovena koncentrace biomasy v g/l vydělením hmotnosti biomasy odebraným objemem kultury. Vzorek byl po stanovení uschován v mrazícím boxu pro další analýzy.

Tabulka 2 *Složení BBM média*

Složka	Množství v zásobním [ml]	Množství na 1 l [ml]
NaNO ₃	25,00	10
MgSO ₄ ·2H ₂ O	7,50	10
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,50	10
KH ₂ PO ₄	17,50	10
K ₂ HPO ₄	7,50	10
NaCl	2,50	10
EDTA	-	1
Acidified iron	-	1
Trace metals	-	1
H ₃ BO ₃	11,42	1

Tabulka 3 *Složení některých složek BBM média*

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

Tabulka 4 *Obsah složek produkčního BBM média*

Složka	Množství
Zdroj uhlíku	g/l
glycerol	60 g/l
Zdroje dusíku	Zásobní roztoky [μl/100ml]
NaNO ₃	200
močovina	70
glycin	222
(NH ₄) ₂ SO ₄	144

3.7 Kokultivační fáze v multikultivátoru

Další část experimentu zahrnovala produkci a analýzu biomasy pocházející z kokultivace vybraných kmenů kvasinek a mikrořas nebo sinic v multikultivátoru. Tento úkol byl vypracován v multikultivátoru MC 1000-OD značky PSI zobrazeném na obr. 7 (Obrázek 7). V této diplomové práci byla kultivována jedna kombinace kvasinky a mikrořasy nebo sinice ve dvou multikultivátorech s upraveným složením solí BBM média. Jeden multikultivátor umožňoval využití osmi 100mililitrových zkumavek. Čisté kultivační zkumavky společně s gumovým těsněním a zapojenými gumovými hadičkami byly vysterilizovány v autoklávu při 120 °C po dobu 40 min. Stejným způsobem byly vždy nachystány všechny potřebné roztoky a média v Pyrexových lahvích. Živné prostředí ve všech zkumavkách tvořilo 70 ml BBM média. V prvních zkumavkách proběhla vždy kultivace pouze mikrořasy nebo sinice v BBM médiu. V další zkumavce byl zaočkován vybraný kmen kvasinky, taktéž v základním BBM médiu. V případě třetích zkumavek proběhla vždy kokultivace obou kmenů současně v nezměněném BBM médiu. U následujících kokultivací došlo k úpravě množství vybraných solí oproti základnímu složení BBM média za cílem nalezení optimálních podmínek pro produkci obohacené biomasy. Kokultivace v multikultivátoru A zahrnovala produkci kombinované obohacené biomasy v podmínkách postupného nárůstu obsahu dusíku v médiu. Ve druhém experimentu s multikultivátorem B bylo zacíleno na změnu koncentrace makroprvků hořčíku a fosforu v médiu. Kromě prvního experimentu byl u všech následujících kokultivací použit anti-foam roztok, aby bylo dostatečně regulované případné pění kultivační směsi. Mohlo by dojít k nechtěnému úniku obsahu ven skrze gumové hadičky. U všech zkumavek obsahujících kvasinku bylo přidáno 2,2 ml 50 % (v/v) roztoku glycerolu jako optimálního zdroje uhlíku pro podporu růstu kvasinky. Aby bylo docíleno stejné optické denzity řasové/sinicové kultury ve všech zkumavkách experimentu, bylo do litrové Pyrexové lahve se sterilním BBM médiem přidáno 40 ml kultury z Erlenmeyerovy baňky a homogenizováno. Nastavení multikultivátoru umožňovalo také úpravu fyzikálních parametrů. Průběh kokultivace byl upraven využitím osvětlení u obou experimentů na hodnotu 20 μE , která se postupně zvyšovala na finálních 100 μE . Teplota v obou přístrojích byla nastavena na optimálních 25 °C. Ve všech zkumavkách probíhalo intenzivní provzdušňování pro dostatečný růst biomasy. Experimenty probíhaly současně vždy 5 dní. Průběh nárůstu biomasy byl zaznamenán pomocí růstových křivek u každé zkumavky zvlášť. Kompletní obsah obou multikultivátorů je znázorněn v tabulce 5 a tabulce 6. V kulatých závorkách v tabulkách je uveden přidaný objem dané látky, který se přidává do zkumavky kokultivace oproti objemu v základním složení BBM média.

Tabulka 5 *Obsah zkumavek v multikultivátoru A*

Zkumavka č.	1	2	3	4
Mikroorganismus	řasa/sinice	kvasinka	oba	oba
NaNO ₃	100 %	100 %	100 %	200 % (0,7 ml)
KH ₂ PO ₄	100 %	100 %	100 %	200 % (0,7 ml)
K ₂ HPO ₄	100 %	100 %	100 %	200 % (0,7 ml)
MgSO ₄ .7H ₂ O	100 %	100 %	100 %	100 %
Glycerol 50 %	-	2,2 ml	2,2 ml	2,2 ml
Zkumavka č.	5	6	7	8
Mikroorganismus	oba	oba	oba	oba
NaNO ₃	100 %	100 %	100 %	100 %
KH ₂ PO ₄	300 % (1,4 ml)	350 % (1,75 ml)	100 %	100 %
K ₂ HPO ₄	300 %	350 %	100 %	100 %
MgSO ₄ .7H ₂ O	100 %	100 %	200 % (0,7 ml)	300 % (1,4 ml)
Glycerol 50 %	2,2 ml	2,2 ml	2,2 ml	2,2 ml



Obrázek 7 *Zapojený multikultivátor MC 1000-OD*

Tabulka 6 Složení kokultivačních směsí v multikultivátoru B

Zkumavka č.	1	2	3	4
Mikroorganismus	řasa/sinice	kvasinka	oba	oba
NaNO ₃	100 %	100 %	100 %	200 % (0,7 ml)
KH ₂ PO ₄	100 %	100 %	100 %	200 % (0,7 ml)
K ₂ HPO ₄	100 %	100 %	100 %	200 % (0,7 ml)
MgSO ₄ .7H ₂ O	100 %	100 %	100 %	100 %
Glycerol 50 %	-	2,2 ml	2,2 ml	2,2 ml
Zkumavka č.	5	6	7	8
Mikroorganismus	oba	oba	oba	oba
NaNO ₃	300 % (1,4 ml)	350 % (1,75 ml)	400 % (2,1 ml)	500 % (2,8 ml)
KH ₂ PO ₄	100 %	100 %	100 %	100 %
K ₂ HPO ₄	100 %	100 %	100 %	100 %
MgSO ₄ .7H ₂ O	100 %	100 %	100 %	100 %
Glycerol 50 %	2,2 ml	2,2 ml	2,2 ml	2,2 ml

3.8 Kokultivace ve fermentoru

Třetí část diplomové práce zahrnovala kokultivaci mikrořasy/snice a kvasinky v podmínkách fermentoru. Pro práci byl zvolen fermentor o objemu 3 litry v laboratorních podmínkách. Délka experimentu trvala 120 h a v průběhu byly odebírány vzorky biomasy. Analýza zahrnovala stejné postupy jako v případě kokultivace v multikultivátoru. Prostředí ve fermentoru tvořilo BBM médium v základním složení, zdrojem uhlíku byl jako v předchozích experimentech glycerol. Inokulum mikroorganismů bylo připraveno stejnými kroky jako u předchozích kokultivací. Očkovací poměr byl zachován, tedy 1:5. Fermentor obsahoval čidla pro kontrolu koncentrace rozpuštěného kyslíku (pO₂), pH média, redoxního potenciálu, teploty, průtoku vzduchu, intenzity osvětlení, počtu otáček míchadla nebo také turbidity. Dále byl umožněn dávkovaný ovládaný přítok kyseliny, báze a chladicí vody. Před zahájením prací byl fermentor

naplněn BBM médiem a vysterilizován při 120 °C po dobu 40 min. Po sterilizaci byla nádoba ponechána ke zchlazení a následně zapojena. Během kokultivace v této práci byly nastaveny podmínky pH 7, osvětlení zářivkou (11 W, 50 Hz), teplota 25 °C, pO₂ 30 %, průtok vzduchu 2 l/min. Po zapojení fermentoru bylo přečerpáno inokulum mikrořasy nebo sinice a ponecháno kultivovat samostatně několik hodin. Byly prováděny odběry biomasy a kontrolován nárůst spektrofotometricky při 680 nm. Po dostatečném nárůstu mikrořasy bylo přečerpáno do fermentoru inokulum kvasinky a započala kokultivace. Od tohoto kroku byl přidán také roztok glycerolu. Jednotlivá čidla dále měřila zmiňované ukazatele a v případě odchýlení od požadované hodnoty došlo k doplnění některé chemikálie nebo úpravě na příslušnou hodnotu ukazatele.

3.9 Analýza složek biomasy pomocí HPLC

3.9.1 Extrakce látek z biomasy

Zpracovaná biomasa byla dále podrobena extrakci dle Folche za účelem zjištění složení vyprodukovaných metabolitů. Na analytických vahách bylo odváženo 10-20 mg biomasy kvasinek nebo mikrořas do závitové zkumavky. Odvážená biomasa byla hydratována 1 ml destilované vody po dobu 30 minut. Následně byla biomasa zcentrifugována při 14000 ot/min po dobu 3 min. Supernatant byl slit do odpadu. Dále bylo k hydratované biomase přidáno 0,5 ml skleněných kuliček s 1 ml methanolu p.a. Utěsněné zkumavky byly umístěny na multipoziční vortex a ponechány dezintegrovat po dobu 10 minut. Celý obsah byl kvantitativně převeden do čisté 15 ml plastové centrifugační zkumavky s přidavkem 2 ml chloroformu p.a. Směs byla protřepána na multipozičním vortexu po dobu 10 min. Poté byl k obsahu přidán 1 ml destilované vody. Dalším krokem byla centrifugace těchto zkumavek při 2500 otáčkách/min po dobu 1 min. Bylo pokračováno odpipetováním spodní chloroformové fáze do skleněných 15ml závitových zkumavek, ve kterých bylo dále odpařeno rozpouštědlo pomocí termobloku při teplotě 45 °C a přítomnosti proudu N₂. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml směsi rozpouštědel ethylacetát:acetonitril v poměru 1:2 v čistotě HPLC kvality. Vzorek byl dále přefiltrován přes čisté injekční stříkačky s PTFE filtrem do šroubovací 2 ml skleněné vialky. Připravené vzorky byly uzavřeny a uschovány v mrazícím boxu, respektive přímo analyzovány na HPLC. Analýza vzorků byla prováděna na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu Dionex UltiMate 3000 s DAD detektorem řady Vanquish od firmy Thermo Fischer, USA. Separace probíhala při teplotě 25 °C a průtoku kolony 1,2 ml/min v gradientové eluci směsí dvou mobilních fází. Gradientová rampa je znázorněna v tabulce 7 (Tabulka 7). Mobilní fáze A byla směs

A:ACN:TrisHCl v poměru 84:14:2 při pH 8. Druhá mobilní fáze B obsahovala látky MeOH:EtAc v poměru 40:60.

Tabulka 7 *Gradientová rampa analýzy na HPLC/DAD*

	Retenční čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
1	0	100	0
2	13	0	100
3	19	0	100
4	20	100	0
5	25	100	0

3.10 Analýza složek biomasy pomocí GC

3.10.1 Příprava vzorků pro analýzu

Všechny vzorky analyzované v této diplomové práci byly před analýzou pomocí GC upraveny transesterifikací. Prvním krokem bylo navážení lyofilizované biomasy v množství 10-15 mg do kryptovracích vialek. Do vialky bylo přidáno 1,8 ml transesterifikační směsi (TES) o složení dle tabulky 8. Poté byly vialky umístěny do termobloku po dobu 2 h při teplotě 85 °C. Po ukončení vyhřívání v termobloku byly vialky ponechány ke zchlazení. Obsah byl přelit do čisté 5 ml plastové zkumavky. K obsahu bylo přidáno 0,5 ml 0,05 M NaOH za cílem neutralizovat kyselinu sírovou a dále 1 ml HPLC hexanu. Takto připravené vialky byly uzavřeny a vortexovány po dobu 10 min. V posledním kroku bylo do skleněných šroubovacích GC vialek odpipetováno 100 µl z horní fáze. Je nutno dbát na to, aby byla odebrána pouze čirá část kapaliny z důvodu vyšší kvality výsledného chromatogramu. Ke 100µl hexanové fáze bylo přidáno 900µl HPLC hexanu. Tímto byla provedena transesterifikace vzorků biomasy a je možné je analyzovat metodou plynové chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem (GC/FID), nebo je uschovat k pozdější analýze v mrazícím boxu při -36 °C.

Tabulka 8 *Složení transesterifikační směsi*

Složka	Specifikace
HPLC methanol	-
H ₂ SO ₄	15 obj.% (96 %)
heptadekanová kyselina	0,5 mg/ml

Analýza byla provedena na plynovém chromatografu Trace 1300 TM od firmy Thermo Fischer, USA. Byla použita kolona Zebron GC FAME (30 m, 0.25 mm, 0.20 µm) značky Phenomenex. Dávkování vzorku zajišťoval autosampler s děličem toku při poměru 10, objem vzorku činil 1 µl. Jako nosný plyn byl využit vodík při průtoku 0,5 ml/min. Teplotní program pro analýzu mastných kyselin a lipidů ve vyprodukované biomase je uveden v tab. 9 (Tabulka 9). Vyhodnocení probíhalo pomocí metody interního standartu a externí kalibrace pomocí standardů Supleco FAME 37 mix (Sigma Aldrich, SRN).

Tabulka 9 *Teplotní gradient pro analýzu na GC/FID*

	Retenční čas [min]	Gradient [°C·min⁻¹]	Teplota [°C]	Retence [min]
1	0,000	start	-	-
2	1,000	0,000	80,000	1,000
3	5,000	15,000	140,000	0,000
4	21,667	3,000	190,000	0,000
5	25,467	25,000	260,000	1,000
6	25,467	stop	-	-

4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovení koncentrace biomasy

V prvních fázích experimentu byly kultivovány kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Cystofilobasidium macerans* na BBM médiu s různým zdrojem dusíku a glycerolem. Tyto kmeny byly také kultivovány na minerálním médiu. Po kultivaci 96 hod bylo z produkčních médií odebráno po 40 ml kultury. Nárůst biomasy přepočítaný na hmotnostní koncentraci je shrnut v tabulce 10 (Tabulka 10).

Tabulka 10 Stanovení koncentrace biomasy na BBM médiu

Mikroorganismus	Obsah biomasy [g/l]				
	Zdroj dusíku a uhlíku				
	minerální (urea + glycerol)	dusičnan sodný glycerol	urea glycerol	síran amonný glycerol	glycin glycerol
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	8,34	4,07	3,21	4,05	3,31
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	6,65	1,53	4,35	3,21	3,50
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	8,07	1,96	7,21	2,85	7,42

Další experimenty pokračovaly kultivací zástupců kvasinek na „*Spirulina*“ médiu. Z produkčních médií bylo odebráno vždy 40 ml kultury. Výsledky stanovené koncentrace biomasy jsou uvedeny v tabulce 11 (Tabulka 11).

Tabulka 11 Stanovení koncentrace biomasy na „*Spirulina*“ médiu

Mikroorganismus	Obsah biomasy [g/l]				
	Zdroj dusíku a uhlíku				
	minerální (urea + glycerol)	dusičnan sodný glycerol	urea glycerol	síran amonný glycerol	glycin glycerol
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	8,11	5,01	8,53	5,13	6,31
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	2,64	3,28	0,56	2,01	2,23
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	4,81	3,71	3,25	2,04	3,63
<i>Phaffia rhodozyma</i>	0,23	0,13	0,08	0,08	0,11

4.2 Screening kvasinkových kmenů

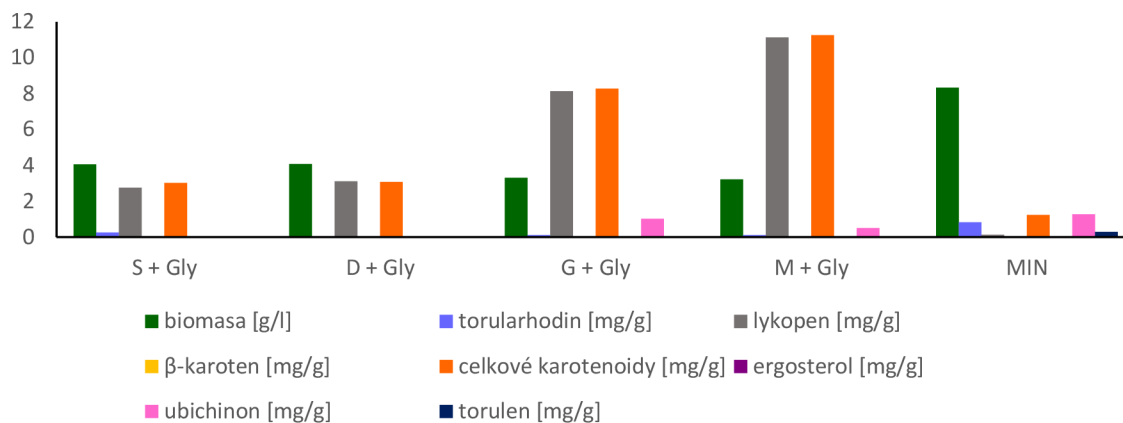
4.2.1 Kultivační screening *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004

Mezi první experimenty této diplomové práce patřily kultivační screeningové experimenty vybraných kmenů kvasinek uvedených výše (podkapitola 3.3.1). Kvasinka *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 byla kultivována na BBM a „*Spirulina*“ médiích po dobu 120 h. Podmínky stresu vytvářely odlišné zdroje dusíku a vždy stejný zdroj uhlíku glycerol. Síran amonný, dusičnan sodný, aminokyselina glycin a močovina sloužily kvasince jak zdroje dusíku pro fungování metabolismu a růst. Kontrolním médiem bylo minerální médium s obsahem glycerolu (30 g/l), močoviny (1,84 g/l), hořečnatých a fosforečných solí rozpuštěných v kohoutkové vodě. Pro grafická zobrazení těchto výsledků byly využity zkratky v popisku dat, jejichž soupis je uveden v tabulce 12 (Tabulka 12).

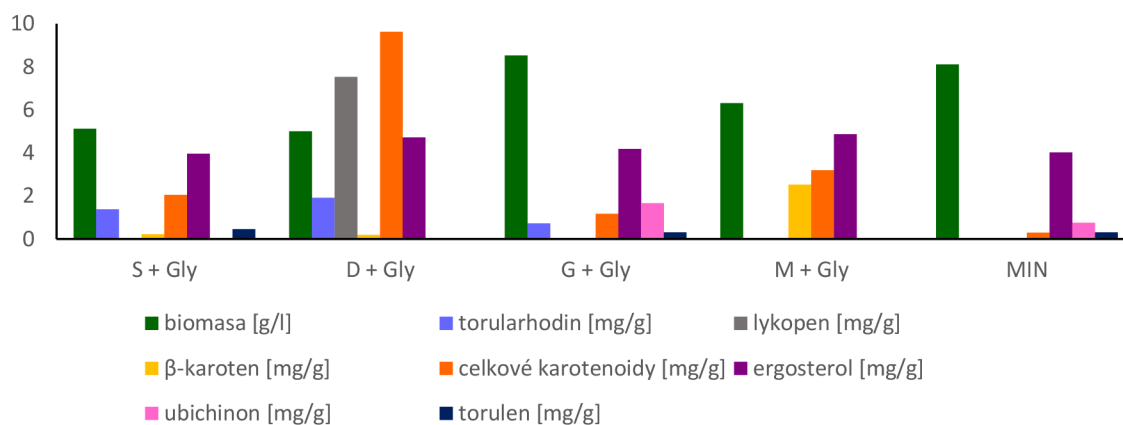
Tabulka 12 Význam zkratk pro popis grafů screeningové části práce

Zkratka	Význam
S	síran amonný
D	dusičnan sodný
G	glycin
M	močovina
MIN	minerální médium
Gly	glycerol
Spi	„ <i>Spirulina</i> “ médium
BBM	BBM médium

Z grafu na obr. 8 (Obrázek 8) můžeme vyčíst množství naprodukované biomasy v BBM médiu. Produkce biomasy se pohybovala v podobných výtěžnostech u prvních čtyřech typů stresů, avšak liší se množství biomasy získané z minerálního média. V tomto případě je až dvojnásobný nárůst oproti předešlým případům. Z pohledu celkové produkce karotenoidů uvedené v mg na g biomasy, můžeme konstatovat, že nejvhodnějším zdrojem makronutrientů na BBM médiu je kombinace močovina s glycerolem, kde došlo k nejvyšším výtěžkům ze všech kombinací. Produkce jednotlivých sledovaných metabolitů ukazuje nejvyšší produkci thorularhodinu v případě minerálního média, dále také u síranu amonného a močoviny. Zajímavý je obsah ubiquinonu, který je nejvyšší opět u minerálního média, nicméně vyskytuje se i u média s glycinem a močovinou.

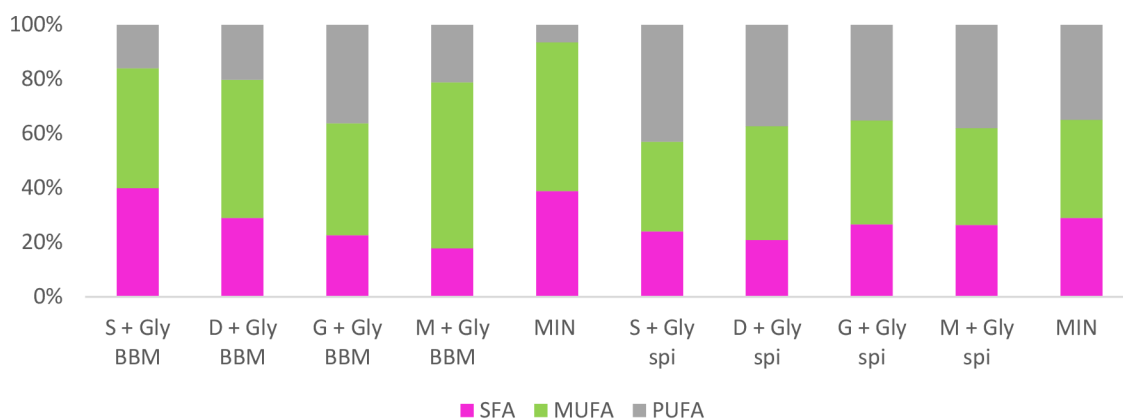


Obrázek 8 Grafické zobrazení analýzy kvasinkové biomasy *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 kultivované na BBM médiu

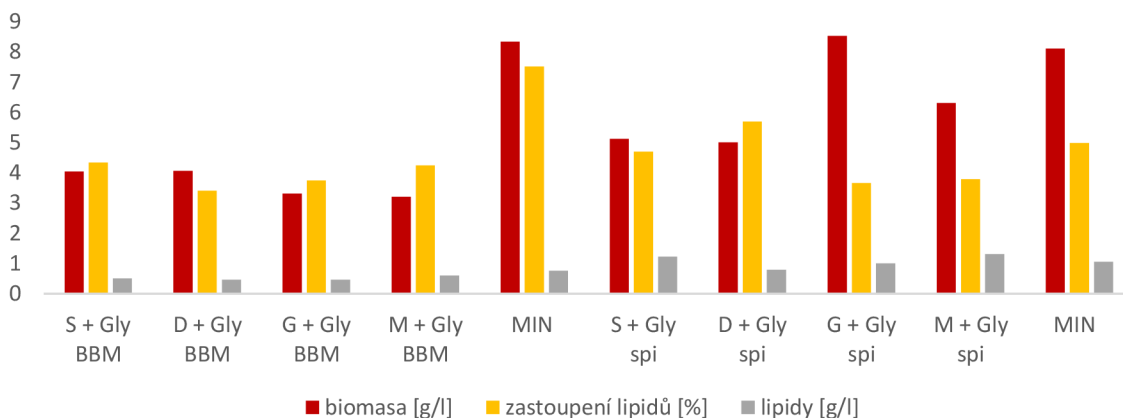


Obrázek 9 Grafické znázornění analýzy produkované biomasy *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 kultivované na „Spirulina“ médiu

Výsledek analýzy kultivace stejného kmene na „Spirulina“ médiu za jinak stejných fyzikálně-chemických podmínek můžeme vidět na grafu obr. 9 (Obrázek 9). Z tohoto grafu je patrná celkově vyšší produkce jednotlivých metabolitů než u předchozího grafu. Množství biomasy je vysoké v případě zdroje dusíku glycinu a také u minerálního média, stejně jako bylo u BBM média. Na rozdíl od kultivace na BBM médiu, kde se ergosterol téměř nevyskytoval, vidíme produkci ergosterolu u všech kombinací živin na „Spirulina“ médiu přibližně stejné, okolo 4-5 mg/g biomasy. Koncentrace lykopenu byla významná u BBM média v případě močovinného zdroje dusíku, až 11 mg/g biomasy, taktéž v případě glycinu (8,14 mg/g). Nižších výtěžků bylo dosaženo v případě síranu amonného a dusičnanu sodného a nejnižších u minerálního média, jak je patrné na grafu obr. 8 (Obrázek 8).



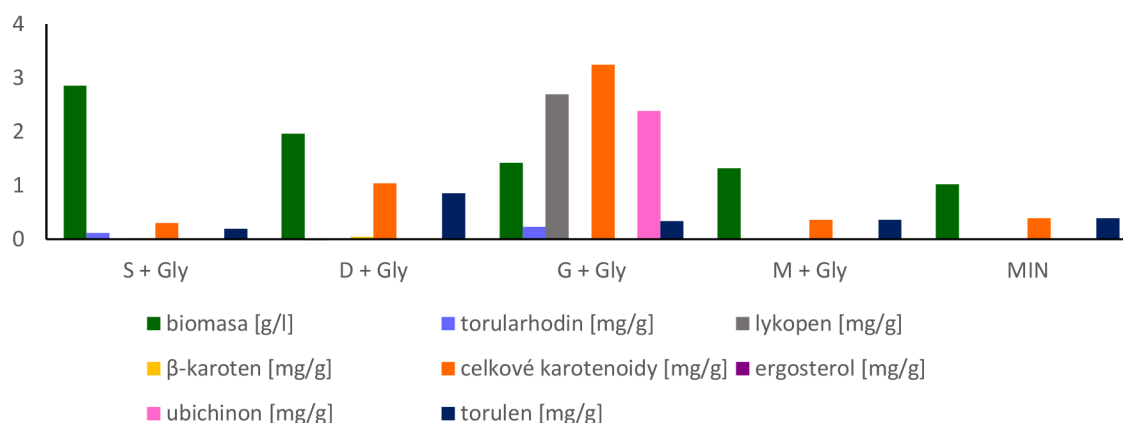
Obrázek 10 Grafické znázornění profilu mastných kyselin u kvasinky *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 kultivované na „*Spirulina*“ i BBM médiu



Obrázek 11 Grafické zobrazení procentuálního zastoupení lipidů v biomase kvasinky *Rhodotorula toruloides* CCY 062-002-004 kultivované na „*Spirulina*“ i BBM médiu

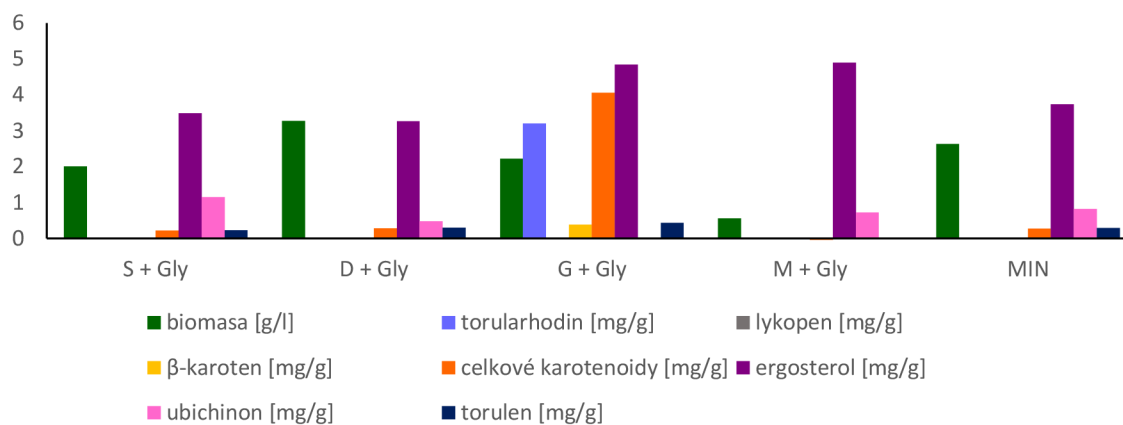
Z grafů na obrázcích 10 a 11 (Obrázek 10 a Obrázek 11) je možno zhodnotit a porovnat produkci lipidů a jednotlivých skupin mastných kyselin dle jejich saturace na obou typech médií. U všech případů na BBM médiu byla produkce podobná (okolo 0,5 g/l biomasy), u minerálního média lehce vyšší. Produkce lipidických látek v případě „*Spirulina*“ média byla celkově vyšší než u BBM média (Obrázek 11). Profil mastných kyselin nejvíce tvořily mononenasycené MK u BBM média, v případě „*Spirulina*“ média je vidět trend produkce pohybující se přibližně ve stejných hodnotách (Obrázek 10).

4.2.2 Kultivační screening *Cystofilobasidium macerans* CCY 17-9-3



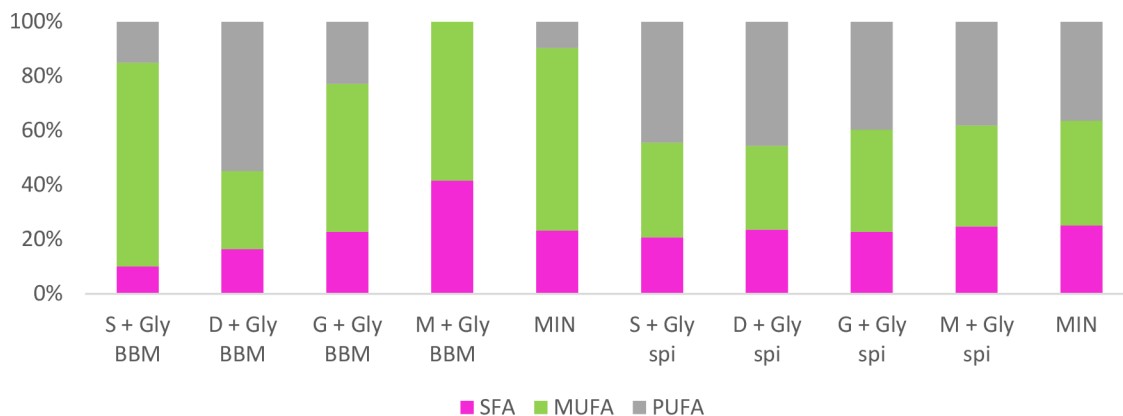
Obrázek 12 Grafické znázornění analýzy produkované biomasy *Cystofilobasidium macerans* CCY 17-9-3 kultivaném na BBM médiu

Za stejných podmínek jako u *R. toruloides* byl proveden také screening produkčních vlastností a růstu kmene kvasinky *Cystofilobasidium macerans* CCY 17-9-3.

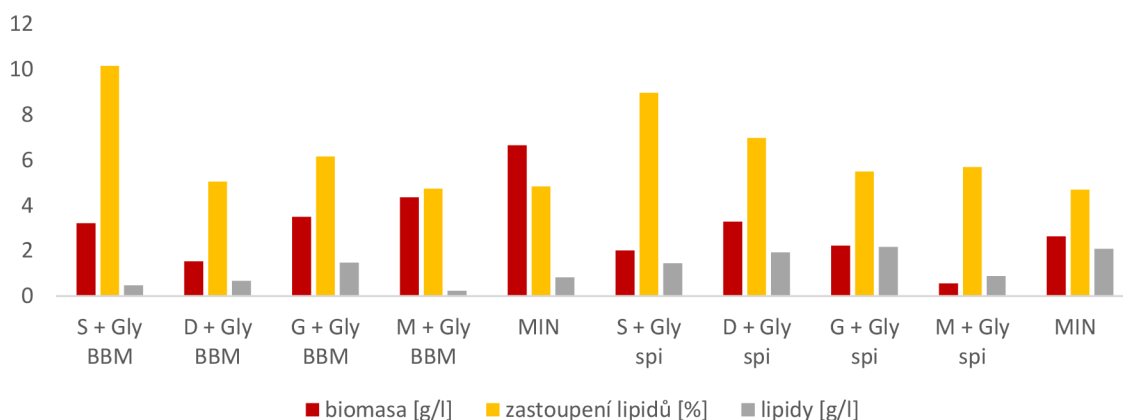


Obrázek 13 Grafické znázornění analýzy biomasy *Cystofilobasidium macerans* CCY 17-9-3 kultivaném na „Spirulina“ médiu

Produkce biomasy u dané kvasinky byla v případě BBM média nevyšší u síranu amonného jako zdroje dusíku, což můžeme najít v grafu na obr. 12 (Obrázek 12). V produkci v případě „Spirulina“ média dominuje jako zdroj dusíku dusičnan sodný, kde byla koncentrace biomasy nejvyšší (až 3,28 g/l), jak je patrné z grafu na obr. 13 (Obrázek 13). Z grafů dále můžeme vidět, že v obou případech kultivace byla velmi nízká produkce β-karotenu, avšak celkové karotenoidy byly shodně analyzovány ve vyšší koncentraci na glycinovém zdroji dusíku.

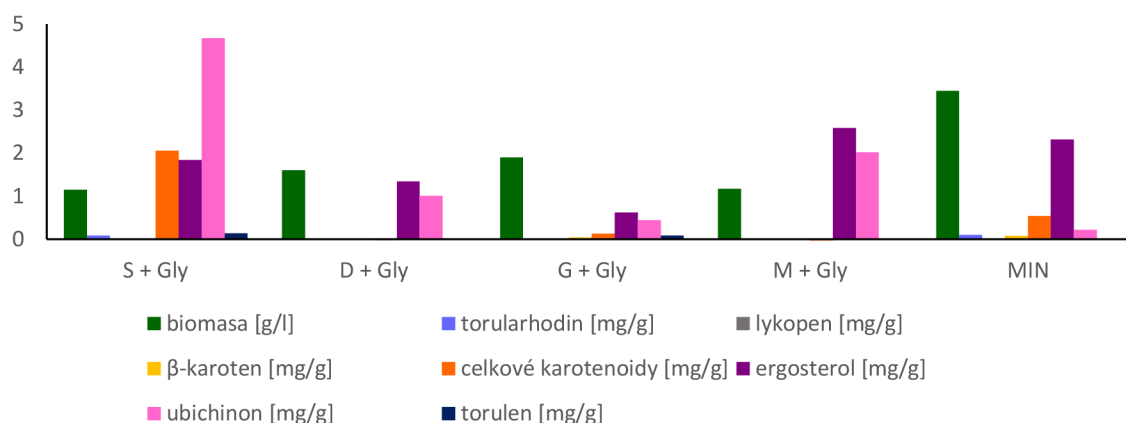


Obrázek 14 Grafické znázornění profilu mastných kyselin dle saturace v lipidech biomasy u kvasinky *Cystofilobasidium macerans* CCY 17-9-3 kultivované na „*Spirulina*“ a BBM médiu. Procentuální zastoupení lipidů v biomase ukazuje u obou typů médií, že dochází k výrazně vyšší koncentraci v případě síranového zdroje dusíku, jak popisuje graf na obr. 15 (Obrázek 15). Profil mastných kyselin je převážně tvořen MUFA v případě BBM média (Obrázek 14). Pouze v případě dusičnanového zdroje dusíku vybočuje koncentrace PUFA, a to na 54,92 %. Na „*Spirulina*“ médiu je možno pozorovat podobné výsledky u všech typů živin.



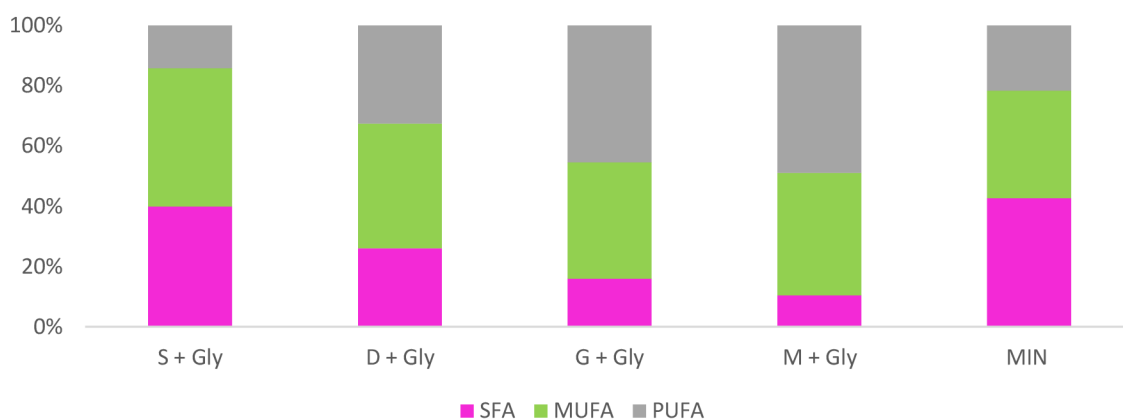
Obrázek 15 Grafické zobrazení procentuálního zastoupení lipidů v biomase u kvasinky *Cystofilobasidium macerans* CCY 17-9-3 kultivované na „*Spirulina*“ a BBM -

4.2.3 Kultivační screening *Phaffia rhodozyma* CCY 77-1-1

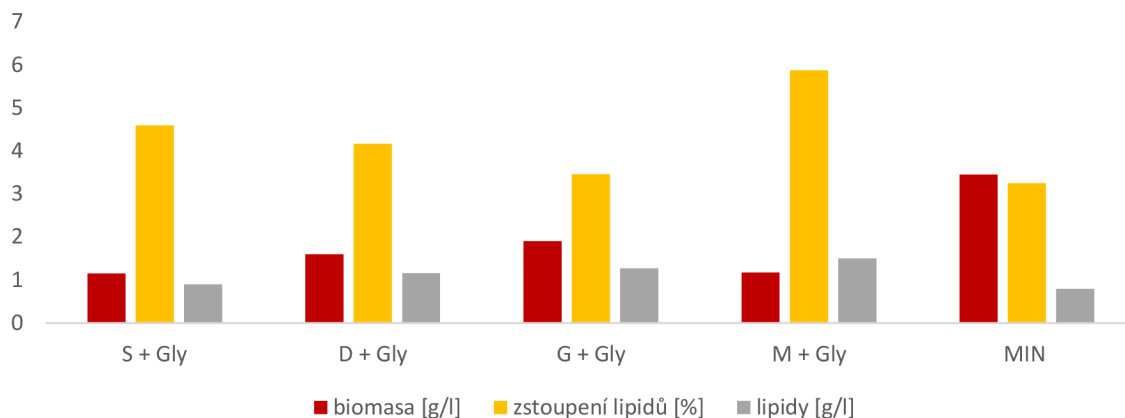


Obrázek 16 Grafické znázornění analýzy biomasy u kvasinky *Phaffia rhodozyma* CCY 77-1-1 kultivované na „*Spirulina*“ médiu -

Následující screeningové kultivace byly prováděny pouze na „*Spirulina*“ médiu v jinak stejných fyzikálně-chemických podmínkách. Zdroje dusíku a uhlíku byly shodné jako u předchozích experimentů. Kmen *Phaffia rhodozyma* CCY 77-1-1 dosahoval nižší produkce biomasy u všech čtyř typů zdrojů dusíku s glycerolem, kromě minerálního média (Obrázek 16). Produkce ubichinonu se ukazuje v případě síranového zdroje dusíku s glycerolem jako nejvýhodnější, jeho koncentrace byla v tomto případě nejvyšší (4,67 mg/g). Koncentrace ergosterolu byla nejvýhodnější v případě močovinnového zdroje dusíku s glycerolem (2,59 mg/g).



Obrázek 17 Grafické znázornění zastoupení skupin mastných kyselin dle saturace u kvasinky *Phaffia rhodozyma* CCY 77-1-1 kultivované na „*Spirulina*“ médiu

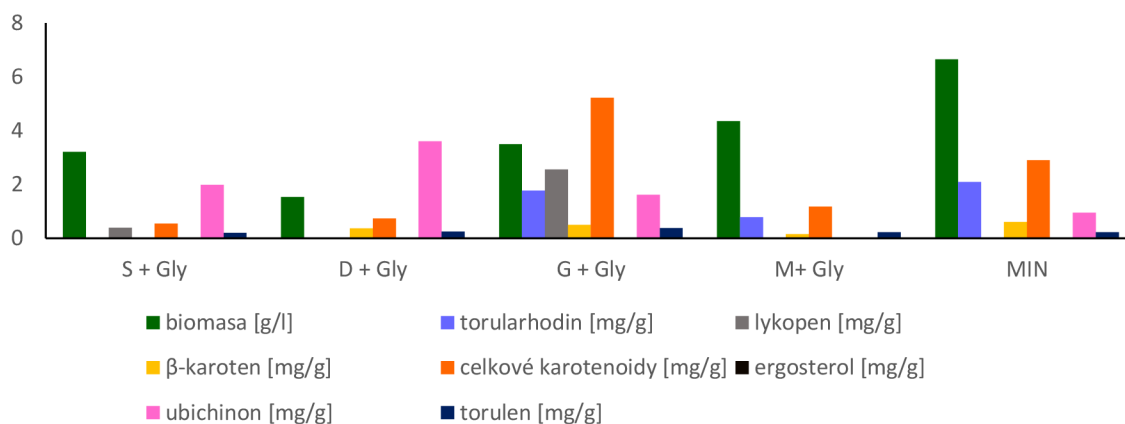


Obrázek 18 Grafické zobrazení procentuálního zastoupení lipidů v biomase u kvasinky *Phaffia rhodozyma* CCY 77-1-1 kultivané na „*Spirulina*“ médiu

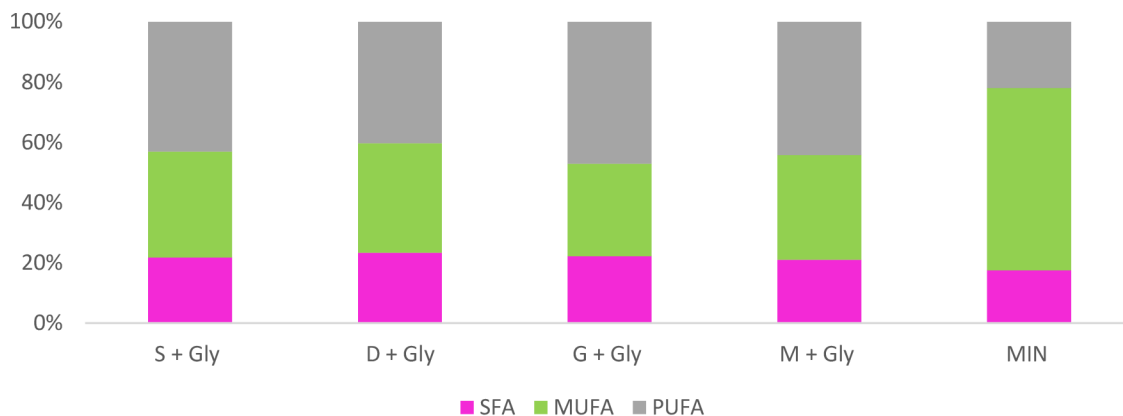
Podle grafu na obr. 17 (Obrázek 17) je patrný posun profilu mastných kyselin ve prospěch polynenasycených mastných kyselin (PUFA) s nejvyšší koncentrací PUFA v případě močoviny s glycerolem na „*Spirulina*“ médiu. Tento trend se opakuje také v případě celkového zastoupení lipidů v biomase, kde vykazuje kvasinka lepší využití živin v případě močovinného zdroje dusíku s glycerolem (Obrázek 18).

4.2.4 Kultivační screening *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6

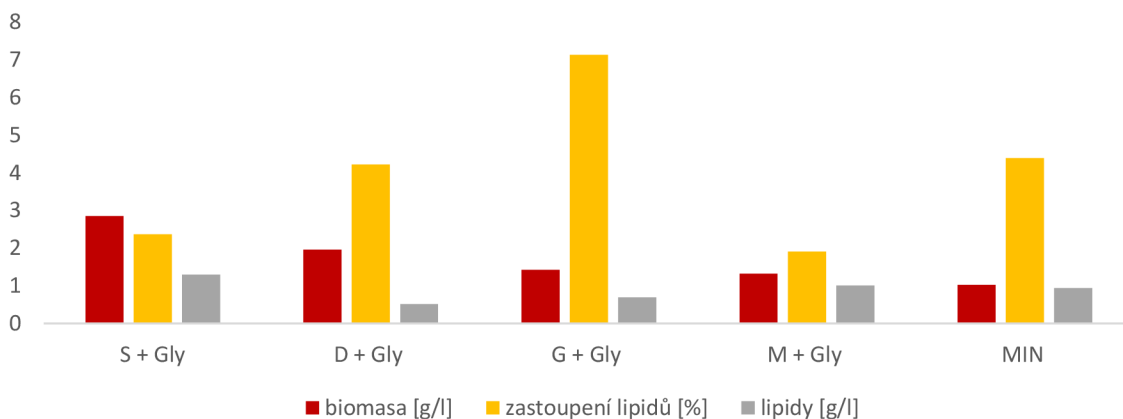
Kultivační screening kmene *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6 ukazuje v případě HPLC analýzy biomasy na obr. 19 (Obrázek 19), že profil produkovaných metabolitů patří společně s kmenem *R. toruloides* (Obrázek 9) k nejširším. V případě analýzy lipidů na obr. 20 a 21 (Obrázek 20 a Obrázek 21) vidíme lepší využití glycinového zdroje dusíku s glycerolem, kde dochází k nejvyššímu zastoupení lipidů v biomase se složením ve prospěch PUFA.



Obrázek 19 Grafické znázornění analýzy biomasy u kmene *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6 kultivaném na BMM médiu

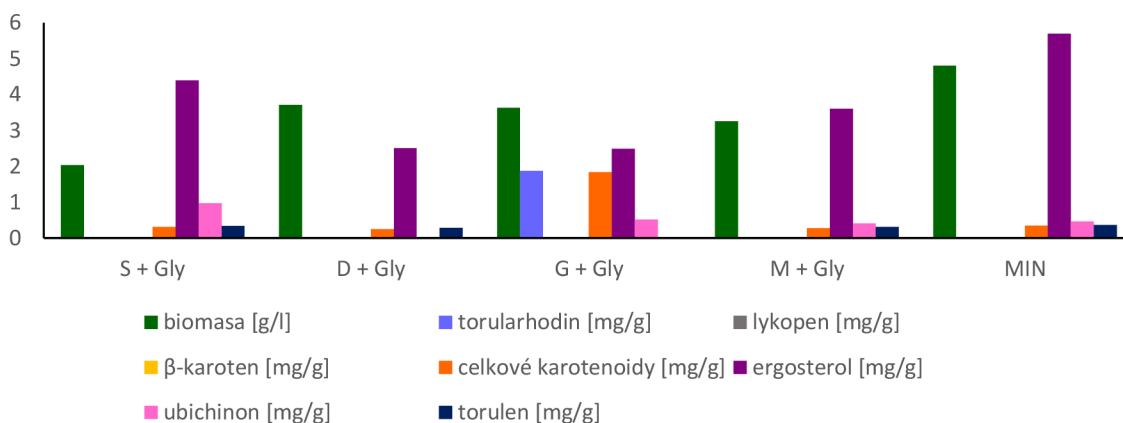


Obrázek 20 Grafické znázornění profilu mastných kyselin dle saturace u kmene *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6 kultivovaném na BBM médiu



Obrázek 21 Grafické zobrazení procentuálního zastoupení lipidů v biomase u kmene *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6 kultivovaném na BBM

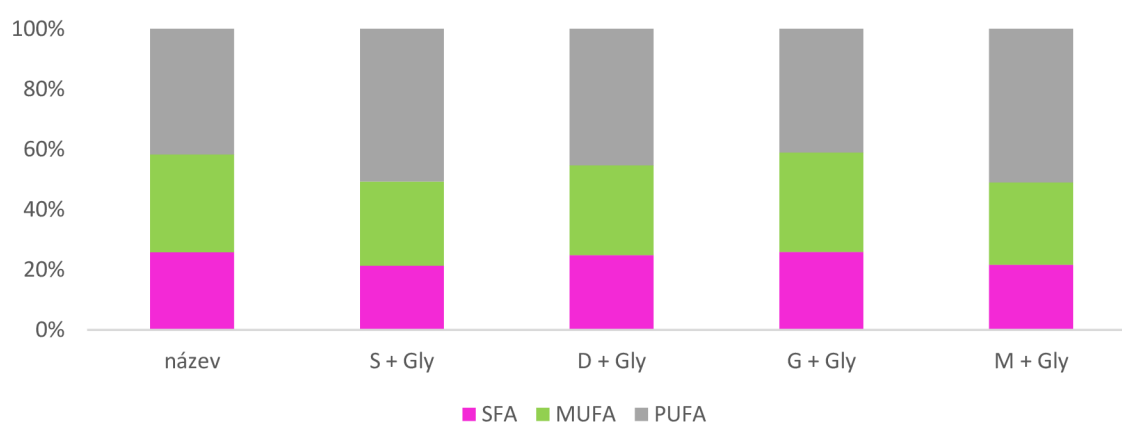
4.2.5 Kultivační screening *Sporidiobolus metaroseus* CCY 19-6-20



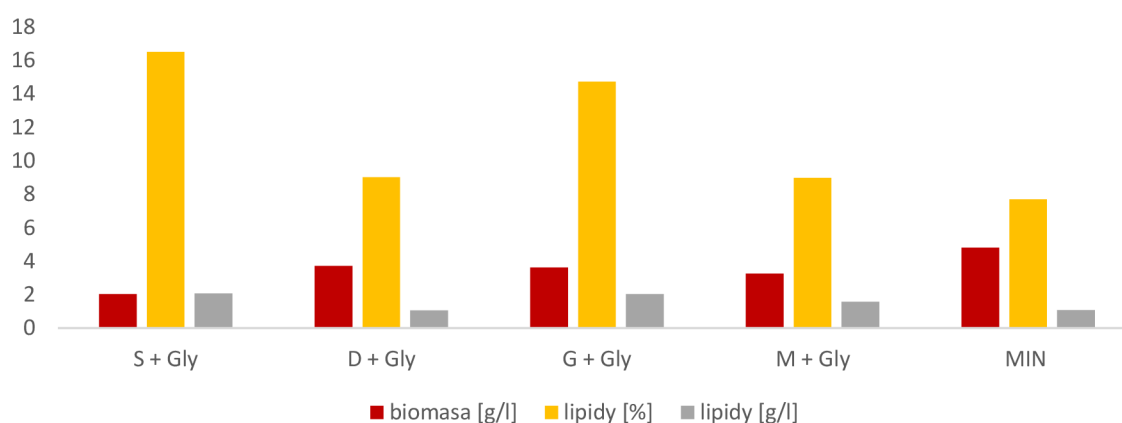
Obrázek 22 Grafické znázornění analýzy biomasy u kmene *Sporidiobolus metaroseus* CCY 19-6-20 kultivovaném na „Spirulina“ médiu

V případě posledního testovaného kmene *Sporidiobolus metaroseus* CCY 19-6-20 můžeme z grafu na obr. 22 (Obrázek 22) konstatovat vyšší koncentraci ergosterolu než u předchozích kmenů. Celková koncentrace biomasy byla nejvyšší v případě minerálního média s glycerolem a močovinou. Celkově kvasinka na médiích se všemi typy živin vykazuje podobný profil a produkci metabolitů.

Profil mastných kyselin dle jejich saturace se výrazně nemění u všech kombinací živin na „*Spirulina*“ médiu, jak je možno vidět na grafu obr. 23 (Obrázek 23). V rámci zastoupení MK shodně dominují PUFA a nejmenší procento představují satureované mastné kyseliny (okolo 30 %). Celková produkce lipidických látek je nejvyšší v případech síranového a glycinového zdroje dusíku v médiu (Obrázek 24).



Obrázek 23 Grafické zobrazení procentuálního zastoupení profilu mastných kyselin v lipidech biomasy u kmene *Sporidiobolus metaroseus* CCY 19-6-20 kultivaném na „*Spirulina*“ médiu



Obrázek 24 Grafické zobrazení procentuálního zastoupení lipidů v biomase u kmene *Sporidiobolus metaroseus* CCY 19-6-20 kultivaném na „*Spirulina*“ Médiu

4.3 Výsledky kokultivačních experimentů v mutikultivátoru

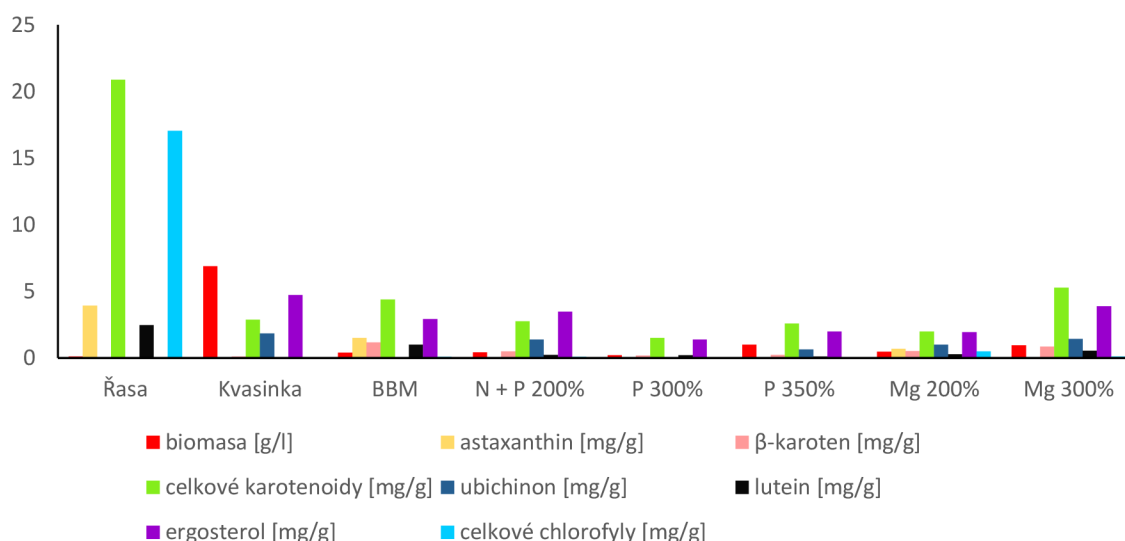
Po screeningové části diplomové práce následovaly samotné experimenty kokultivační produkce biomasy. Podmínky a detaily, za jakých byly kokultivace provedeny, jsou uvedeny v kapitole 3.8 (kapitola 3.7). V této diplomové práci bylo zanalyzováno a provedeno 5 typů kokultivací. Analýza a zpracování výsledků byly provedeny stejným způsobem jako v případě screeningové fáze. Výstupem jednotlivých kokultivací jsou tedy grafické znázornění výsledků analýz metabolitů z HPLC/DAD, dále analýza distribuce mastných kyselin pomocí GC/FID a procentuální zastoupení celkových lipidů v biomase. Pro popis grafů byly využity některé zkratky jejichž význam je uveden v tabulce 13.

Tabulka 13 Význam zkratk pro popis grafů kokultivací v multikultivátoru

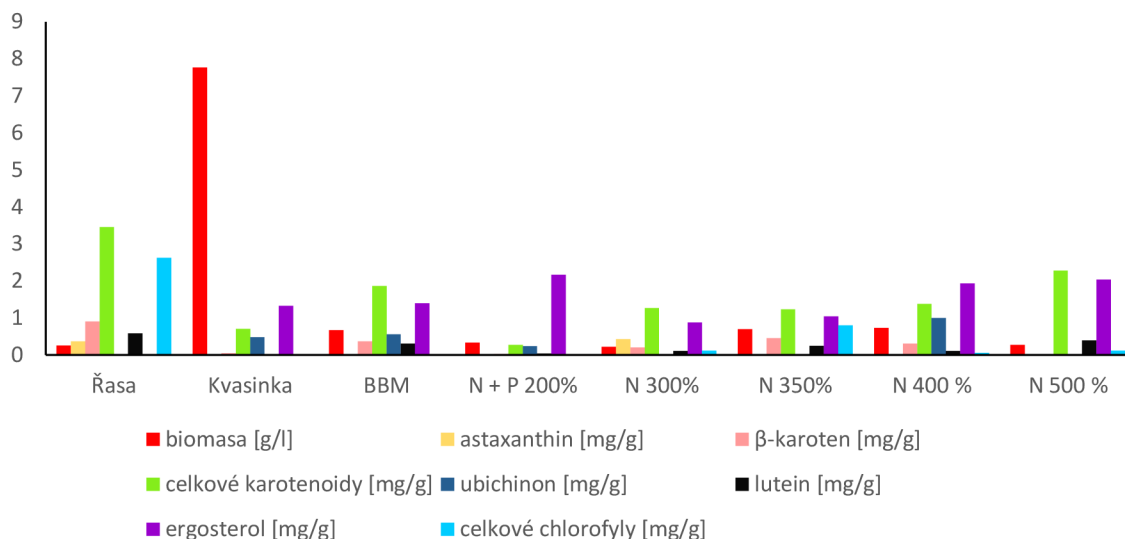
Zkratka	Význam
Ř/Řasa	Kultivace čisté řasy na BBM médiu
K/Kvasinka	Kultivace čisté kvasinky na BBM médiu
BBM	Kokultivace obou mikroorganismů na základním BBM médiu
N+P 200 %	Obsah dusičnanu sodného a fosforečných solí je 200 % oproti BBM médiu
P 300 %	Obsah fosforečných solí v BBM médiu je 300 % oproti základnímu médiu
P 350 %	Obsah fosforečných solí v BBM médiu je 350 % oproti základnímu médiu
N 300 %	Obsah dusičnanu sodného v BBM médiu je 300 % oproti základnímu médiu
N 350 %	Obsah dusičnanu sodného v BBM médiu je 350 % oproti základnímu médiu
N 400 %	Obsah dusičnanu sodného v BBM médiu je 400 % oproti základnímu médiu
N 500 %	Obsah dusičnanu sodného v BBM médiu je 500 % oproti základnímu médiu
Mg 200 %	Obsah hořečnaté soli v BBM médiu je 200 % oproti základnímu médiu
Mg 300 %	Obsah hořečnaté soli v BBM médiu je 200 % oproti základnímu médiu

4.3.1 Kokultivace *Scenedesmus dimorphus* CCALA 443 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004

Jako první dvojice mikrořasy a karotenogenní kvasinky byly vybrány kmeny *Scenedesmus dimorphus* CCALA 443 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004. Z grafů na obrázcích 25 a 26 (Obrázek 25 a Obrázek 26) můžeme vyčíst, že celková produkce biomasy byla vyšší v multikultivátoru B. V případě multikultivátoru A bylo nejvyšší produkce dosaženo u obsahu hořčičku v médiu 300 % oproti základnímu médiu. Vyšší koncentrace biomasy oproti samotné kvasinkové biomase obsahovala také kokultura na základním BBM médiu. U produkce ergosterolu bylo dosaženo lepších výsledků v případě multikultivátoru B. Nejvyšší koncentrace β -karotenu a luteinu můžeme pozorovat v případě multikultivátoru A u množství hořčičku na 300 %.

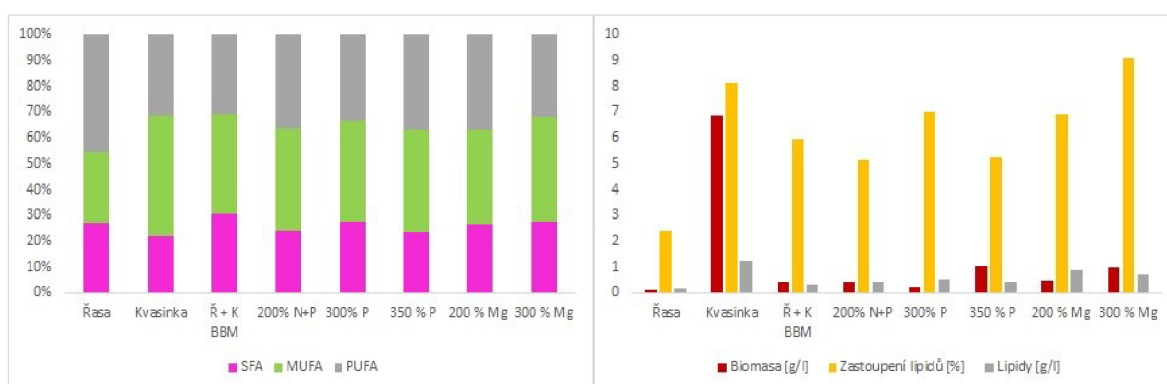


Obrázek 25 Grafické znázornění analýzy biomasy kokultivace kmenů *Scenedesmus dimorphus* CCALA 443 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 v multikultivátoru A

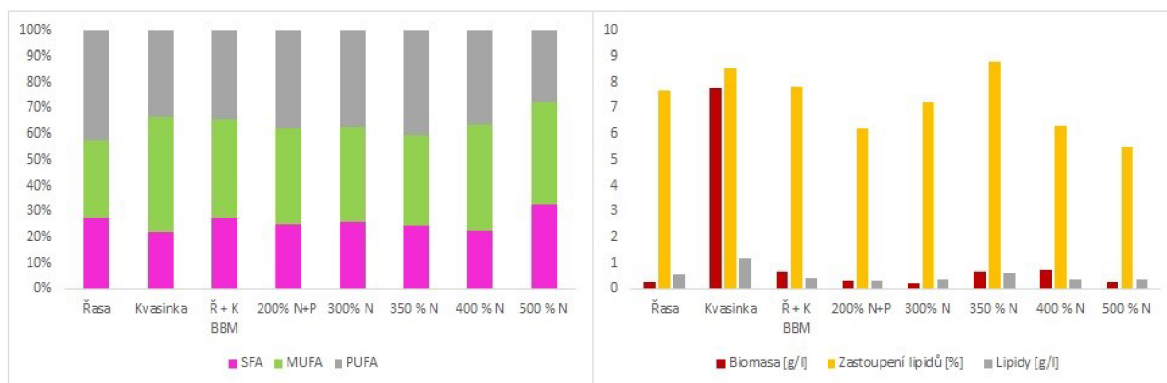


Obrázek 26 Grafické znázornění analýzy biomasy kokultivace kmenů *Scenedesmus dimorphus* CICALA 443 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 v multikultivátoru B

Zastoupení lipidů a distribuce mastných kyselin u této kokultivace je znázorněno na obrázcích 27 a 28 (Obrázek 27 a Obrázek 28) vždy v pravé části. U multikultivátoru A se zvyšuje produkce lipidů v případě obsahu hořčičku 200 %. U druhého multikultivátoru bylo dosaženo nevyššího obsahu v případě obsahu dusíku zvýšeného na 300 %, se zvyšujícím se obsahem dusíku se dále koncentrace lipidů už snižovala. U obou multikultivátorů byla koncentrace celkových lipidů v kokultuře nižší než u samotné kvasinky. Profil mastných kyselin je znázorněn na stejných obrázcích vždy v levé části. U obou multikultivátorů dochází postupně ke změně koncentrací u PUFA a SFA. V případě MUFA se koncentrace drží přibližně na stejné hodnotě. U multikultivátoru B můžeme na obr. 27 (Obrázek 27) vidět, že oproti samostatné kvasince došlo k nejvyšší koncentraci PUFA v případě zvýšení obsahu fosforu na 350 % a v případě hořčičku na 200 %.

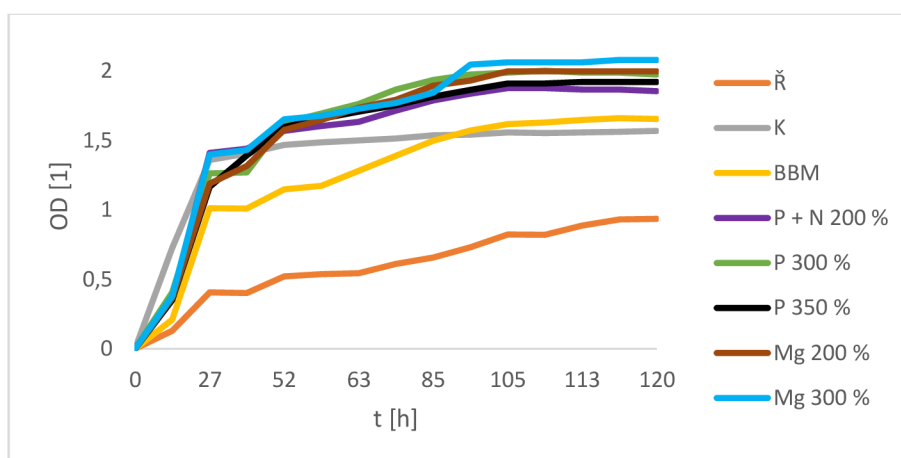


Obrázek 27 Grafické znázornění profilu mastných kyselin dle saturace (vlevo) a procentuální zastoupení lipidů v biomase (vpravo) kmenů *Scenedesmus dimorphus* CICALA 443 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 v multikultivátoru A



Obrázek 28 Grafické znázornění profilu mastných kyselin dle saturace (vlevo) a procentuální zastoupení lipidů v biomase (vpravo) kmenů *Scenedesmus dimorphus* CCALA 443 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 v multikultivátoru B

Změna složení mastných kyselin ve prospěch PUFA se projevila i v případě multikultivátoru B, a to až po obsah dusíku na 350 %, se zvyšujícím se obsahem se dále koncentrace PUFA snižovala ve prospěch MUFA i SFA.

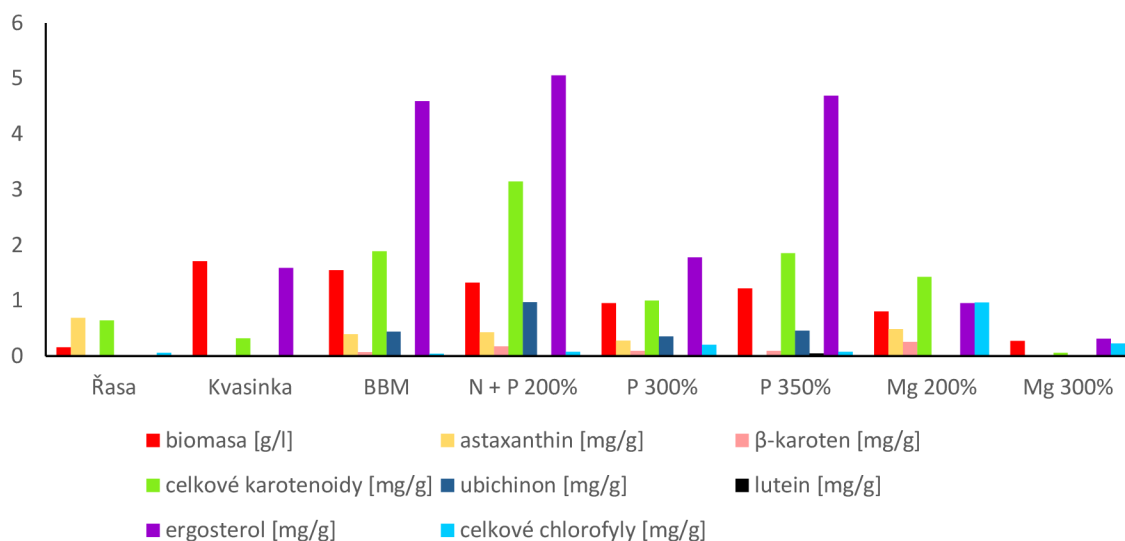


Obrázek 29 Záznam růstové křivky kokultivace kmenů *Scenedesmus dimorphus* CCALA 443 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 v multikultivátoru A

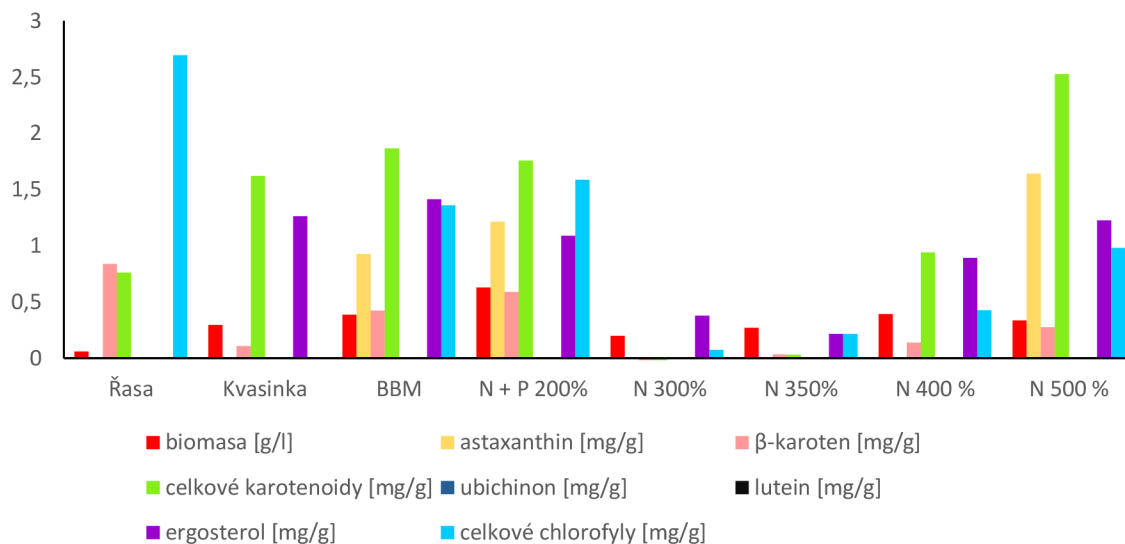
4.3.2 Kokultivace *Anabaena torulosa* CCALA 003 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004

Další analýza vyprodukované obohacené směsné biomasy pocházela z kokultivace kmenů *Anabaena torulosa* CCALA 003 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004. Celková produkce biomasy se ukázala výhodnější v případě multikultivátoru A, viz. obr. 30 a 31 (Obrázek 30 a Obrázek 31), kde došlo k vyšším výtěžkům v případě kokultivace na BBM médiu (1,54 g/l), u ostatních změn nutrientů produkce biomasy kolísala, ale nepřesáhla koncentraci v tomto případě. Produkce celkových karotenoidů vykazuje vyšší koncentrace v případě multikultivátoru A. Nejlepších výtěžků bylo dosaženo na médiu s obsahem dusíku a fosforu

zvýšeného na 200 % a v případě druhého multikultivátoru při obsahu dusíku až 500 % původní hodnoty. Naopak je tomu v případě produkce celkových chlorofylů. U těchto sloučenin bylo dosaženo výrazně lepších produkčních schopností u kokultivace v multikultivátoru B. Koncentrace astaxanthinu dosahovala rovněž zajímavých výsledků u multikultivátoru B. V případech obsahu dusíku a fosforu 200 % a zejména samotného dusíku při 500 % (až 1,64 mg/g biomasy) bylo dosaženo nejvyšších výtěžků astaxanthinu.



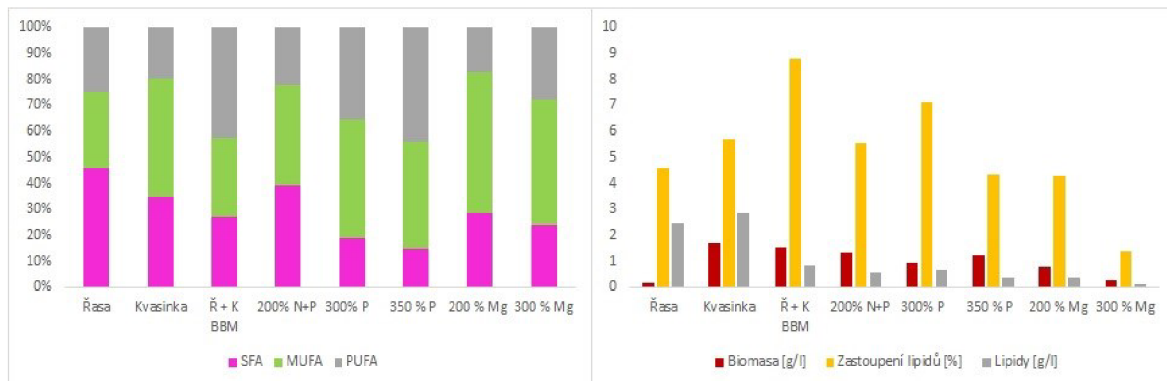
Obrázek 30 Grafické znázornění analýzy biomasy kokultivace kmenů *Anabaena torulosa* CICALA 003 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 v multikultivátoru A



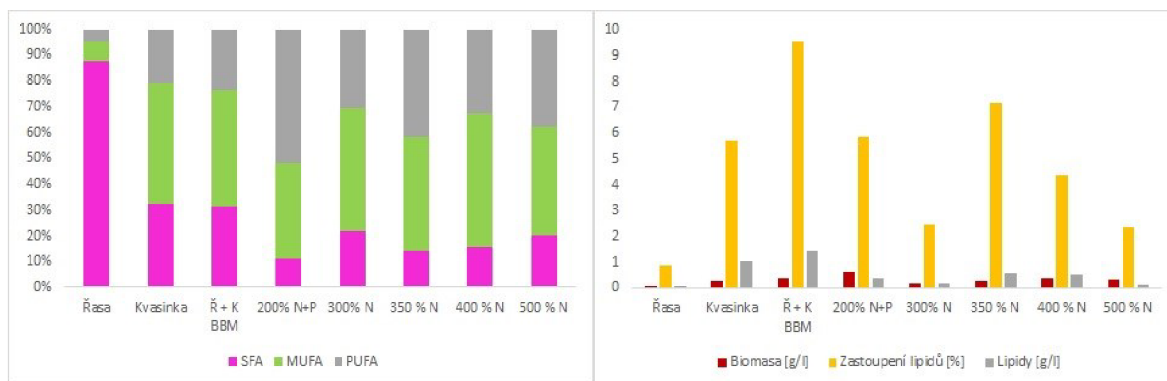
Obrázek 31 Grafické znázornění analýzy biomasy kokultivace kmenů *Anabaena torulosa* CICALA 003 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 v multikultivátoru B

Profil mastných kyselin u multikultivátoru A (Obrázek 32) se posouvá směrem k PUFA až po obsah fosforu 350 %, kde dosahuje nejvyšší hodnoty. Vyšší koncentrace hořčíku v médiu

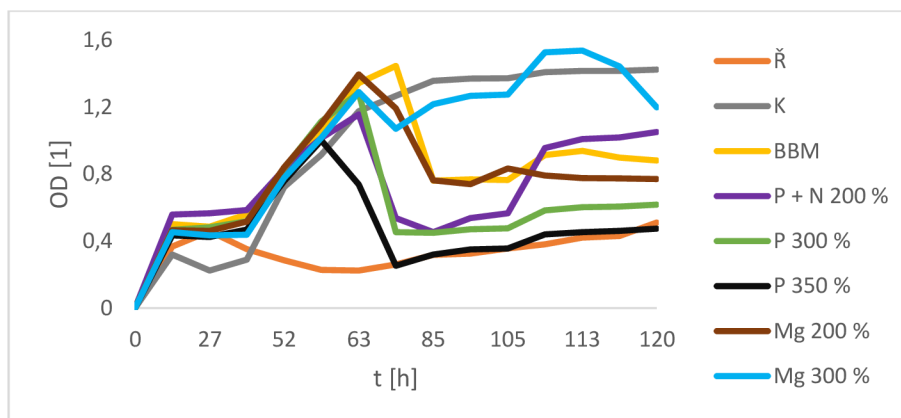
ovlivňují profil pozitivně směrem k MUFA. U druhého multikultivátoru B (Obrázek 33) je možné vidět podobný trend v procentuálním zastoupení lipidů dle grafu vpravo na stejném obrázku. Profil mastných kyselin se posouvá směrem k PUFA a následně kolísá v podobných hodnotách jako u samostatné kultury kvasinky.



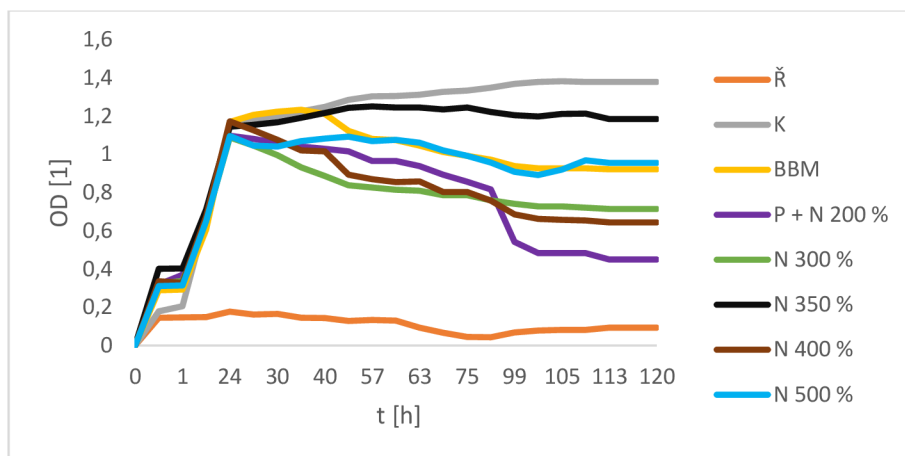
Obrázek 32 Grafické znázornění procentuálního složení mastných kyselin dle saturace (vlevo) a procentuální zastoupení lipidů v biomase (vpravo) kmenů *Anabaena torulosa* CCALA 003 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 v multikultivátoru A



Obrázek 33 Grafické znázornění procentuálního složení mastných kyselin dle saturace (vlevo) a procentuální zastoupení lipidů v biomase (vpravo) kmenů *Anabaena torulosa* CCALA 003 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 v multikultivátoru B



Obrázek 34 Záznam růstové křivky kokultivace kmenů *Anabaena torulosa* CCALA 003 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 v multikultivátoru A

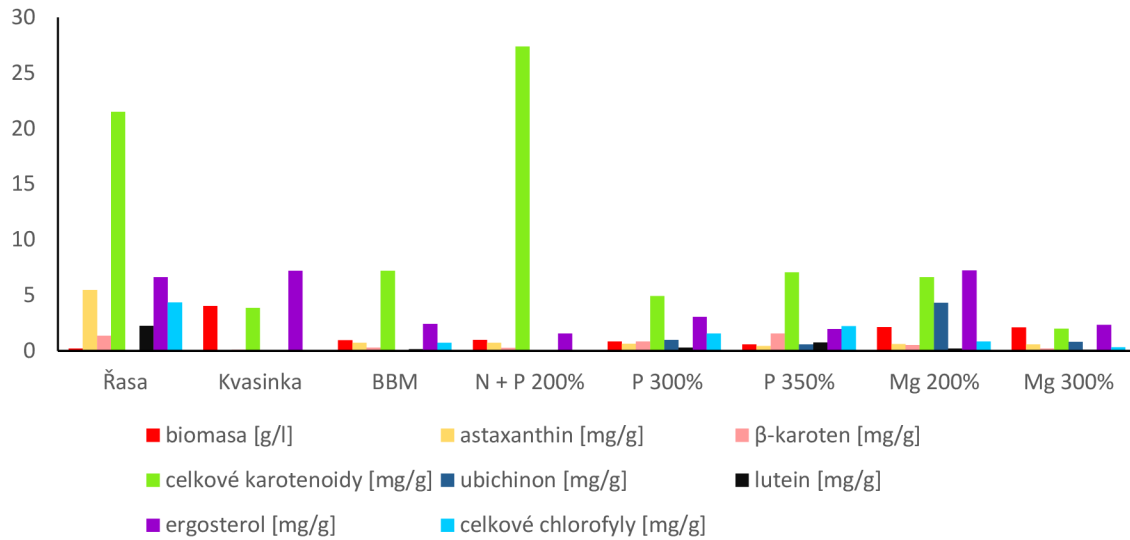


Obrázek 35 Záznam růstové křivky kokultivace kmenů *Anabaena torulosa* CCALA 003 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 v multikultivátoru B

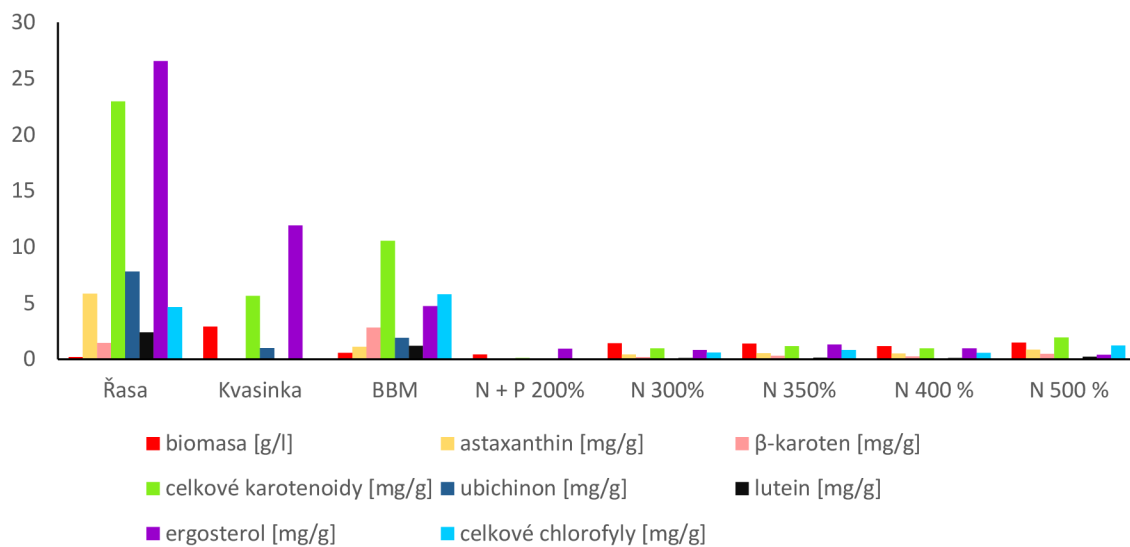
4.3.3 Kokultivace *Scenedesmus acutus* CCALA 258 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004

Celková koncentrace biomasy byla vždy nižší než u samotné kvasinky, jak je patrné z grafů na obr. 36 a 37 (Obrázek 36 a Obrázek 37); nejvyšší koncentrace byla stanovena u obsahu hořčíku 200 % (2,15 g/l) a dusíku 500 % (1,47 g/l). Dále můžeme pozorovat, že v případě multikultivátoru B byla produkce celkových karotenoidů výrazně nižší než u druhého multikultivátoru A. Dle grafu na obr. 36 (Obrázek 36) bylo zjištěno, že koncentrace karotenoidů je nejvyšší u obsahu dusíku a fosforu 200 %, naopak velmi nízká u hořčíku na 300 %. Produkce astaxanthinu je vyšší oproti samotné řase pouze v případě základního BBM média v multikultivátoru B. Celkové chlorofyly byly produkovány vesměs v množství nižším než u samotné řasy. Produkce ergosterolu vykazuje v případě multikultivátoru B vždy velmi nízkou hladinu oproti samotným mikroorganismům. U multikultivátoru A pozorujeme pokles koncentrace ergosterolu při nárůstu obsahu dusíku a fosforu k 200 %, následuje zvýšení koncentrace při obsahu 300 % fosforu. Nejvyšší koncentrace bylo dosaženo v případě obsahu hořčíku 200 %. Množství produkovaného luteinu je u obou multikultivátorů velmi nízké. V případě koncentrace fosforu při 350 % u multikultivátoru A došlo k nejvyšší produkci této látky oproti ostatním výživovým podmínkám. Vlevo na obr. 38 (Obrázek 38) je patrná převaha SFA u většiny měření, procentuální zastoupení lipidů je vyšší oproti samotné kvasince v případech obsahu fosforu 300 % a hořčíku 200 %. U multikultivátoru B (Obrázek 39) je patrný trend zvyšujícího se obsahu PUFA na úkor SFA se zvyšujícím se obsahem dusíku v médiu s vrcholem při obsahu 350 %. Další přidávky dusíku vedly k nárůstu obsahu SFA v médiu a snížení PUFA. Procentuální zastoupení lipidů bylo výrazně nižší než u předchozího

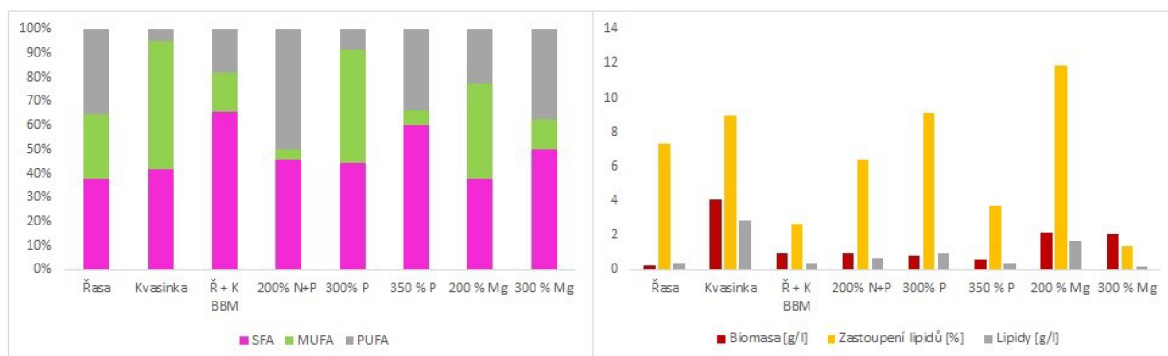
multikultivátoru A. Na obr. 39 (Obrázek 39) vpravo je patrný trend postupného snižování obsahu lipidů se zvyšujícím se obsahem dusíku v médiu.



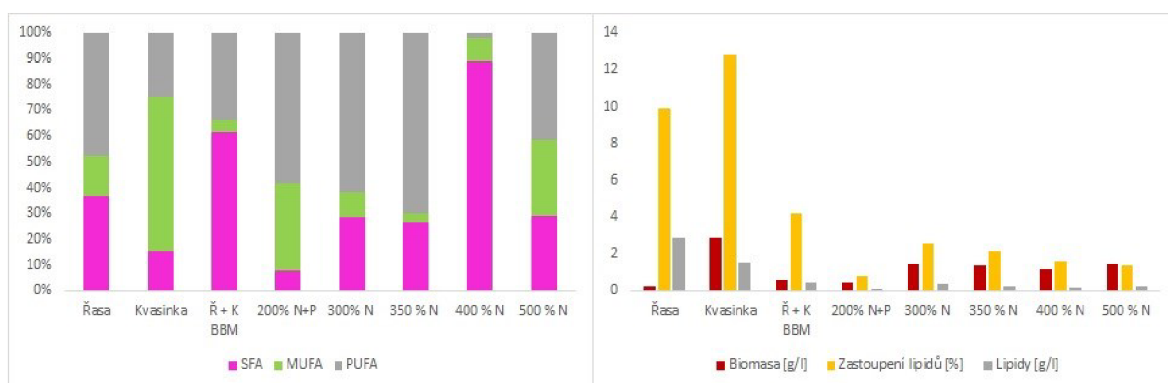
Obrázek 36 Grafické znázornění analýzy biomasy kokultivace kmenů *Scenedesmus acutus* CICALA 258 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 v multikultivátoru A



Obrázek 37 Grafické znázornění analýzy biomasy kokultivace kmenů *Scenedesmus acutus* CICALA 258 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 v multikultivátoru B



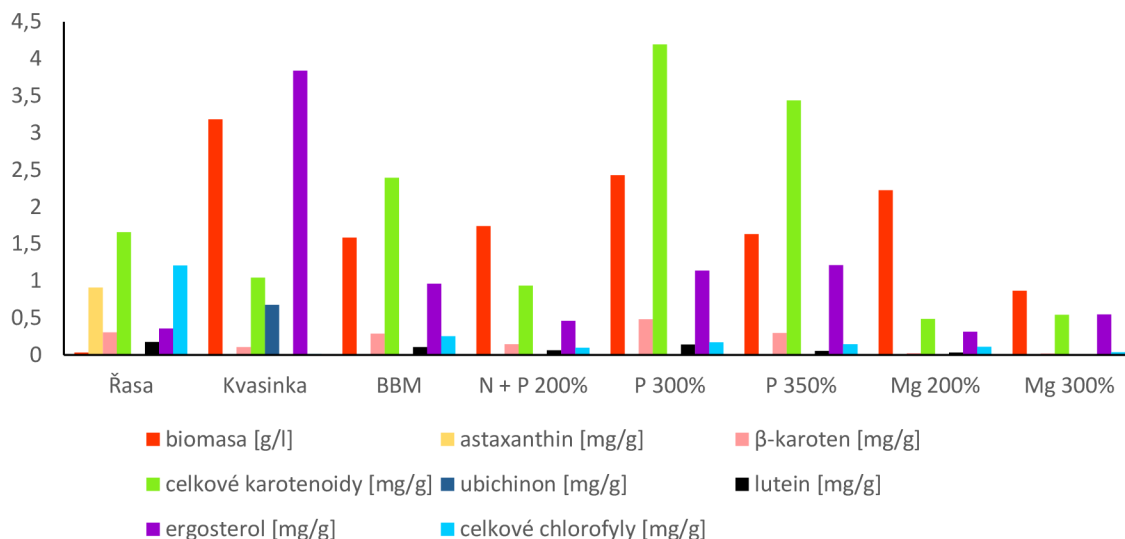
Obrázek 38 Grafické znázornění procentuálního složení mastných kyselin dle saturace (vlevo) a procentuální zastoupení lipidů v biomase (vpravo) kmenů *Scenedesmus acutus* CCALA 258 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 v multikultivátoru A



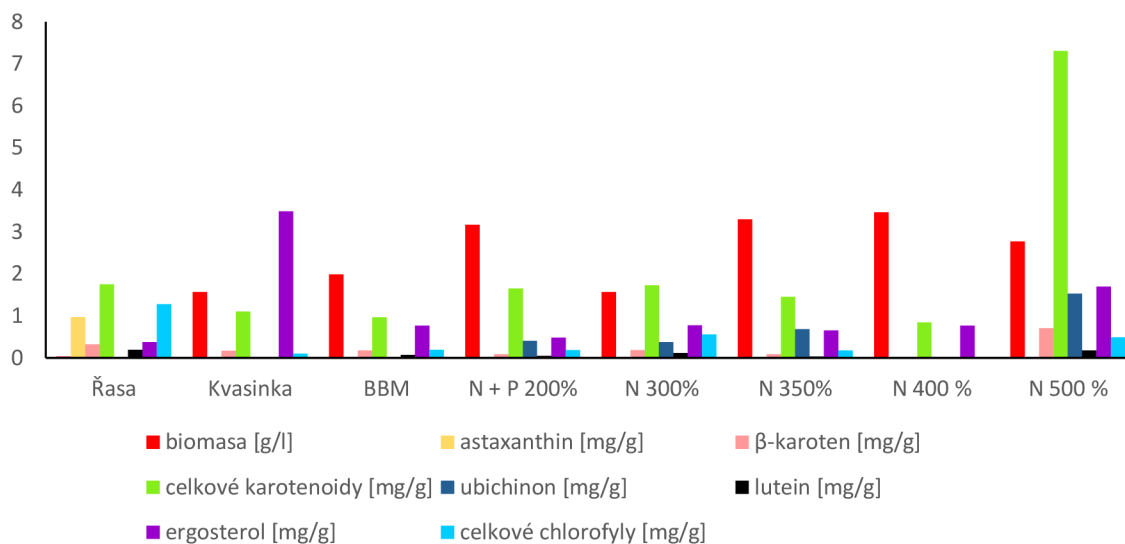
Obrázek 39 Grafické znázornění procentuálního složení mastných kyselin dle saturace (vlevo) a procentuální zastoupení lipidů v biomase (vpravo) kmenů *Scenedesmus acutus* CCALA 258 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 v multikultivátoru B

4.3.4 Kokultivace *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6 a *Coccomyxa* sp. CCALA 912

Celková produkce biomasy se ukázala výhodnější v případě multikultivátoru B, jak je patrné z grafů (Obrázek 40 a Obrázek 41). Obsah dusíku zvýšený na 400 % zajistil nejvyšší produkci biomasy u tohoto multikultivátoru. Nejvyšších výtěžků biomasy v případě multikultivátoru A bylo dosaženo u obsahu fosforu 300 %, se zvyšující se koncentrací nastal už pokles produkce. V případě změny obsahu hořčíku se ukázal nejvýhodnější 200 % obsah hořčíku v médiu. Obsah celkových karotenoidů dosahoval vyšších koncentrací v případě multikultivátoru A, s nejvyšším výtěžkem u obsahu fosforu 300 %. Nejnižší zisk byl zaznamenán v obou případech zvýšeného obsahu hořčíku. V případě obsahu dusíku 500 % byl zaznamenán nejvyšší zisk karotenoidů – až 7,3 mg/g. Produkce chlorofylů byla nižší než u samotné sinice, a to u obou multikultivátorů. Obsah ergosterolu se vyvíjel pozitivně s narůstajícím obsahem dusíku v médiu u multikultivátoru B. U multikultivátoru A koncentrace ergosterolu kolísala s vrcholem u obsahu fosforu při 300 % a 350 %. Obsah astaxanthinu dosáhl svého maxima v případě obsahu fosforu 300 % u multikultivátoru A, a ve druhém multikultivátoru u obsahu dusíku 500 %.

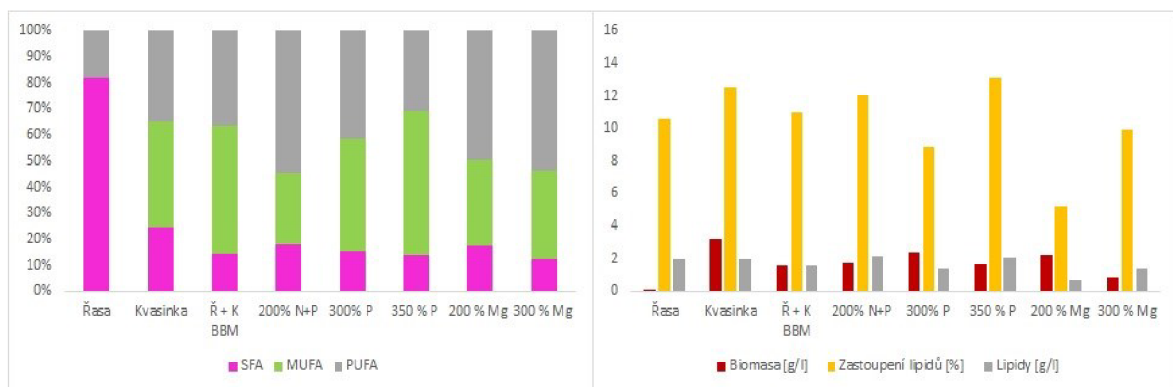


Obrázek 40 Grafické znázornění analýzy biomasy kokultivace *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6 a *Coccomyxa sp.* CCALA 912 v multikultivátoru A

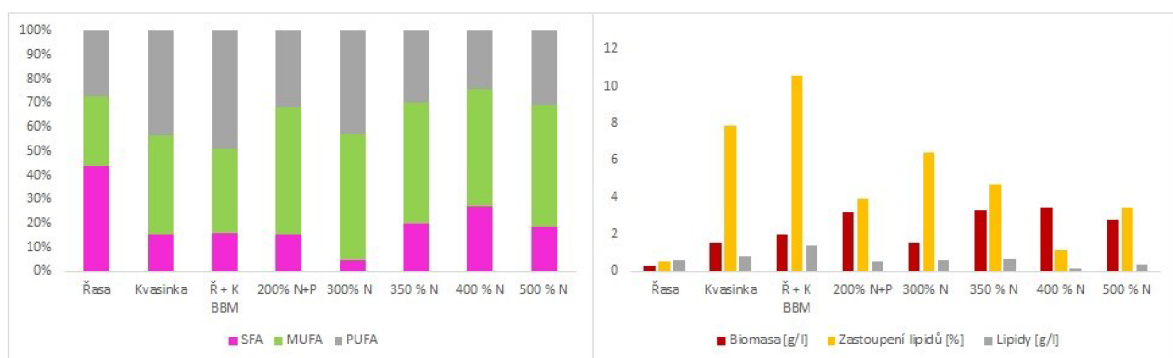


Obrázek 41 Grafické znázornění analýzy biomasy kokultivace *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6 a *Coccomyxa sp.* CCALA 912 v multikultivátoru B

Složení jednotlivých skupin MK dle saturace a procentuální zastoupení lipidů je uvedeno na obr. 42 a 43 vlevo (Obrázek 42 a Obrázek 43). Obsah PUFA v multikultivátoru A dosahuje maxima v případě obsahu dusíku a fosforu 200 % a s narůstající koncentrací fosforu klesá. Největší posunutí směrem k PUFA bylo docíleno s narůstajícím obsahem hořčičku v médiu. U multikultivátoru B docházelo přes menší kolísání k posunu složení MK ve prospěch MUFA s narůstajícím obsahem dusíku v médiu.



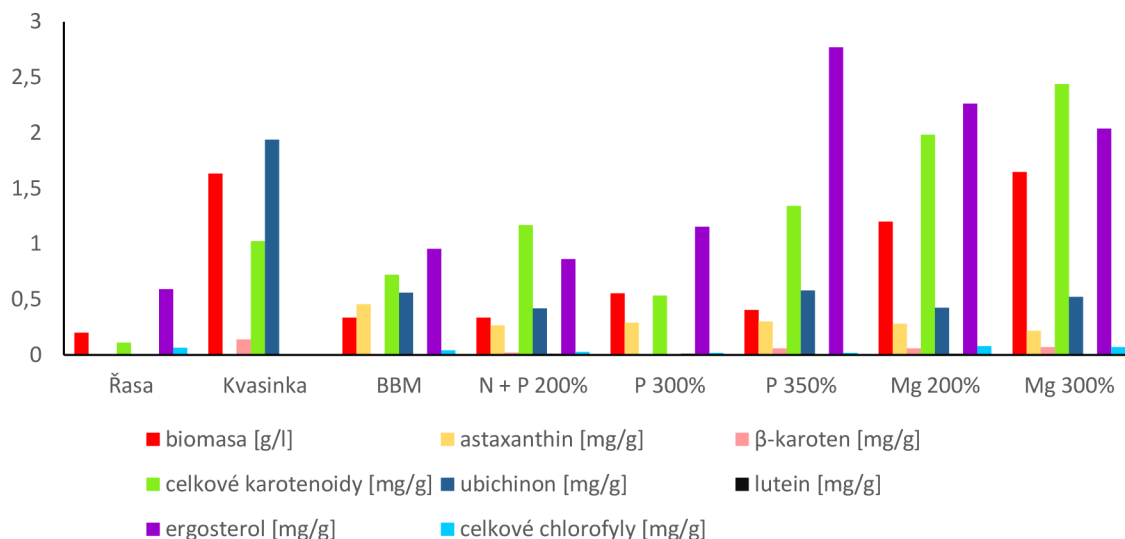
Obrázek 42 Grafické znázornění procentuálního složení mastných kyselin dle saturace (vlevo) a procentuální zastoupení lipidů v biomase (vpravo) kmenů *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6 a *Coccomyxa sp.* CCALA 912 v multikultivátoru A



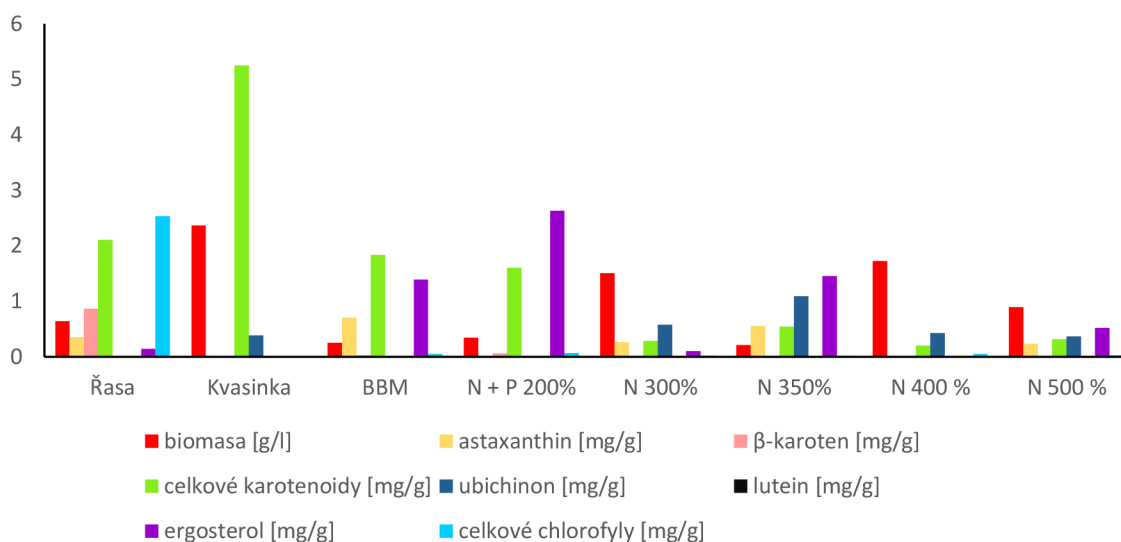
Obrázek 43 Grafické znázornění procentuálního složení mastných kyselin dle saturace (vlevo) a procentuální zastoupení lipidů v biomase (vpravo) kmenů *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6 a *Coccomyxa sp.* CCALA 912 v multikultivátoru B

4.3.5 Kokultivace *Anabaena laxa* CCALA 805 a *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004

Poslední experimenty v multikultivátoru byly provedeny s kmeny *Anabaena laxa* CCALA 805 a *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004. Celková produkce biomasy byla nejlépe podpořena při vyšším obsahu hořčíku (300 %, 1,65 g/l) a dusíku (400 %, 1,73 g/l) v médiu. Produkce karotenoidů byla lepší u multikultivátoru A (Obrázek 44 a Obrázek 45), kde převyšovala produkci u samotné kvasinky. Nejlepší podpora produkce karotenoidů byla sledována při obsahu hořčíku 300 % oproti BBM médiu. V případě vyššího obsahu dusíku byla patrná velmi nízká produkce oproti samotné kvasince. Koncentrace ubichinonu byla nejlépe podpořena vyšším obsahem dusíku (350 %, 1,09 mg/g). V případě astaxanthinu můžeme nalézt skoro dvakrát větší obsah v kokultuře než u samotné sinice, a to na základním BBM médiu u multikultivátoru B (Obrázek 45).

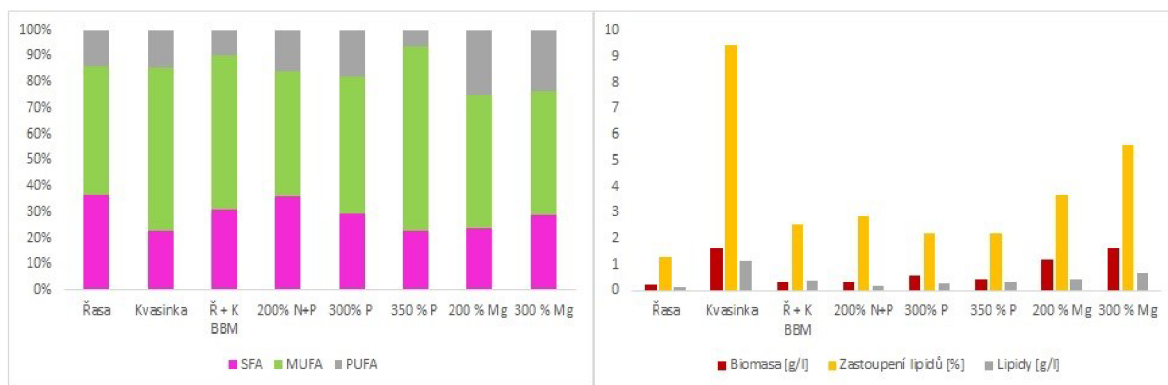


Obrázek 44 Grafické znázornění analýzy biomasy *Anabaena laxa* CCALA 805 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 v multikultivátoru A

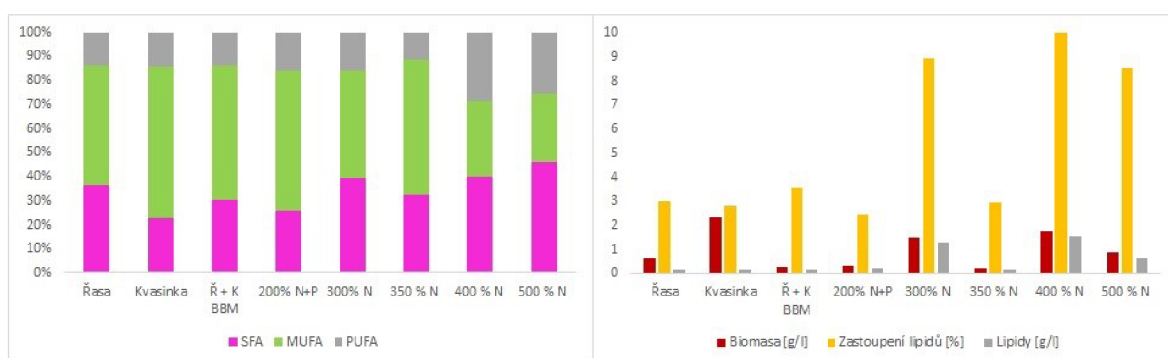


Obrázek 45 Grafické znázornění analýzy biomasy *Anabaena laxa* CCALA 805 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 v multikultivátoru B

V profilu MK dle saturace převládají MUFA u multikultivátoru A, dle grafu vlevo na obr. 46 (Obrázek 46). V procentuálním zastoupení lipidů je možné vidět trend nárůstu lipidů v biomase s rostoucí koncentrací Mg dle stejného obrázku vpravo. U multikultivátoru B je možné najít podobné výsledky ve spektru mastných kyselin jako v předchozím případě. S narůstajícím množstvím dusíku v médiu dochází pomalu k posunu profilu ve prospěch PUFA a neprospěch MUFA, jejichž množství ubývá, jak je možné najít na grafu vpravo obr. 47 (Obrázek 47). V procentuálním zastoupení lipidů dochází ke kolísání a je možné vidět, že při vyšším množství dusíku v médiu stoupla i produkce lipidů (Obrázek 47).



Obrázek 46 Grafické znázornění procentuálního složení mastných kyselin dle saturace (vlevo) a procentuální zastoupení lipidů v biomase (vpravo) kmenů *Anabaena laxa* CICALA 805 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 v multikultivátoru A



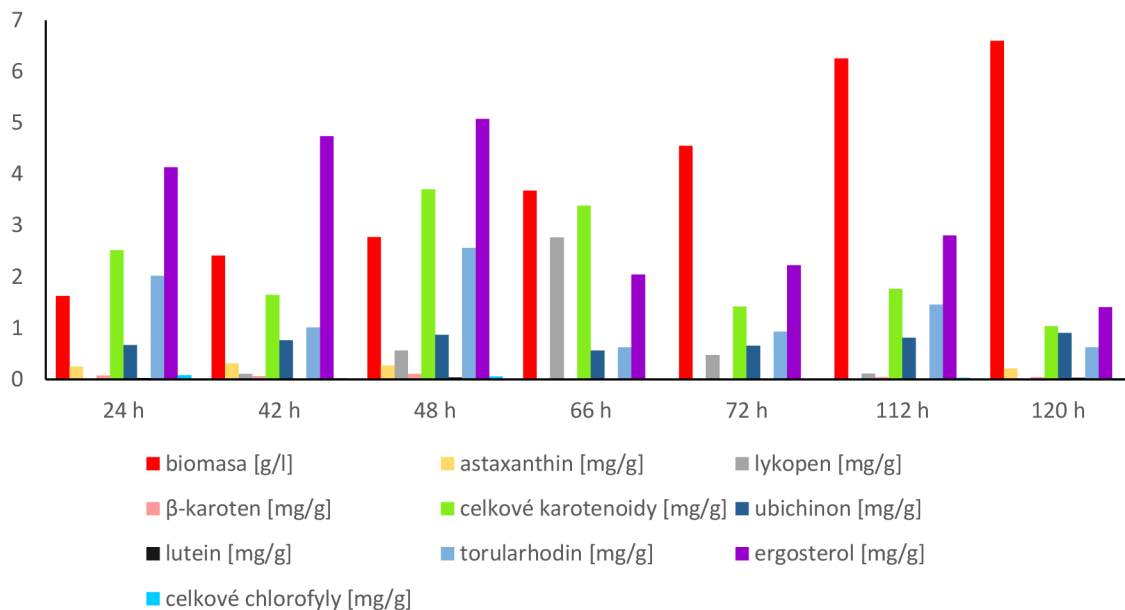
Obrázek 47 Grafické znázornění procentuálního složení mastných kyselin dle saturace (vlevo) a procentuální zastoupení lipidů v biomase (vpravo) kmenů *Anabaena laxa* CICALA 805 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 v multikultivátoru B

4.4 Výsledky kokultivace řas a kvasinek ve fermentoru

4.4.1 Kokultivace *Scenedesmus dimorphus* CICALA 443 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 ve fermentoru

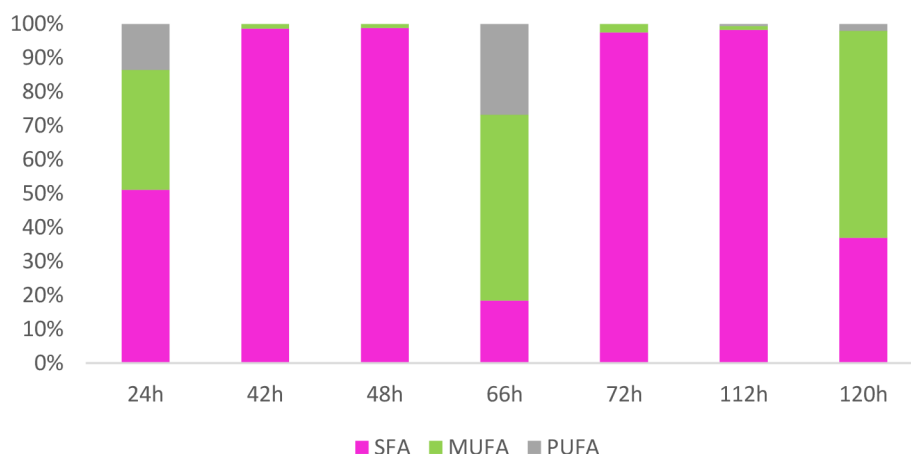
Po fázi v multikultivátoru následovala kokultivace ve fermentoru. Z časových důvodů byla provedena jedna kokultivace kmenů *Scenedesmus dimorphus* CICALA 443 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004. Výsledky analýzy produkované biomasy zahrnují stejné výstupy jako v případě předchozích experimentů. Kokultivace trvala 120 h a bylo provedeno celkem 7 odběrů vzorku biomasy. Graf na obr. 48 (Obrázek 48) obsahuje výsledky analýzy metabolitů pomocí HPLC/DAD. Obsah celkových karotenoidů dosáhl svého maxima při odběru ve 48. h (3,7 mg/g) a poté koncentrace klesala až ke konci pokusu. Největší část karotenoidů tvořil torularhodin, který dosáhl svého maxima ve 48. hodině odběru (2,56 mg/g). Produkce lykopenu byla velmi nízká až do 66. hodiny fermentace, kde byla analyzována koncentrace 2,77 mg/g

biomasy. Následně produkce klesla pod 0,5 mg/g a klesala až do konce sledovaného období. Koncentrace β -karotenu a luteinu byly nejnižší ze všech sledovaných karotenoidů.

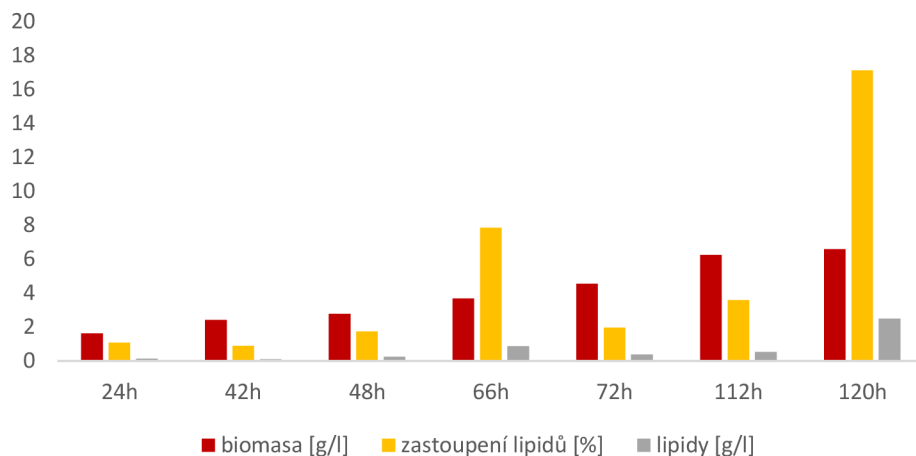


Obrázek 48 Grafické znázornění analýzy biomasy z kokultivace *Scenedesmus dimorphus* CCALA 443 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 ve fermentoru

Tvorba astaxanthinu patřila také k minoritním produktům, maximálně byla dosažena koncentrace 0,27 mg/g biomasy ve 48. h odběru. Produkce celkové biomasy dosáhla až na 6,60 g/l. Koncentrace ergosterolu zpočátku rostla (5,07 mg/g), po překročení 48. h začala klesat a následně už tuto hodnotu nepřekročila. Ubichinon se vyskytoval přibližně ve stejné hladině po celou dobu kokultivace. Maximum produkce bylo dosaženo ke konci fermentace (0,9 mg/g).



Obrázek 49 Grafické znázornění profilu mastných kyselin u kokultivace *Scenedesmus dimorphus* CCALA 443 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 ve fermentoru



Obrázek 50 Grafické znázornění procentuálního zastoupení lipidů v biomase u kokultivace *Scenedesmus dimorphus* CCALA 443 a *Rhodosporidium toruloides* CCY 062-002-004 ve fermentoru

Profil mastných kyselin (Obrázek 49) se začátkem kokultivace měnil ve prospěch SFA. V 66. h došlo ke změně a navýšení procentuálního zastoupení PUFA i MUFA, nicméně předchozí trend nadále pokračoval. Ke konci experimentu došlo k navýšení MUFA i k velmi nízké produkci PUFA. Procentuální zastoupení lipidů v biomase stoupalo pravidelně po celou délku experimentu (Obrázek 50).

5 DISKUZE

V této diplomové práci bylo cílem otestovat možnosti produkce obohacené biomasy pocházející z kokultivace kvasinek a mikrořas nebo sinic. Byli vybráni zástupci jednotlivých druhů karotenogenních kvasinek a mikrořas/sinic tak, jak je uvedeno v podkapitole 3.3 (podkapitola 3.3). Experiment započal screeningovou částí kvasinkových kmenů na BBM a „*Spirulina*“ médiích s různými zdroji dusíku a glycerolem jako jediným zdrojem uhlíku. Druhá část pokračovala kokultivačními pokusy v multikultivátoru. Po 120 h byla naprodukováná biomasa kvasinky a mikrořasy/ sinice stanovena gravimetricky a vybrané metabolity byly analyzovány pomocí HPLC/DAD a GC/FID. Produkce jednotlivých metabolitů doplňovala analýza profilu MK a celkové produkce lipidů. Poslední část tvořila produkce obohacené biomasy v BBM médiu ve fermentoru. Z časových důvodů a důvodů kontaminace plísněmi a bakteriemi byl uskutečněn pouze jeden fermentorový experiment. Pokračování této části diplomové práce bude realizováno v následujících odborných pracích a projektech.

Produkce celkové biomasy na BBM médiu byla u screeningových pokusů nejlepší shodně u všech tří kultivovaných kmenů *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6, *Cystofilobasidium macerans* CCY 17-9-3, *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004 na minerálním médiu. Koncentrace biomasy se pohybovala kolem 8 g/l u všech tří kmenů. Na „*Spirulina*“ médiu byly kultivovány kmeny *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6, *Cystofilobasidium macerans* CCY 17-9-3, *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004 společně s kmenem *Phaffia rhodozyma* CCY 77-1-1. Z výsledků je patrná nejvyšší koncentrace biomasy na glycinu jako zdroji N a glycerolu jako zdroji C u *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004 (8,53 g/l). Na minerálním médiu u *Sporidiobolus metaroseus* CCY 19-6-20 (7,81 g/l) a *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6 (6,65 g/l) byly produkovány nejvyšší koncentrace biomasy na „*Spirulina*“ médiu. U kvasinky *C. macerans* byla koncentrace vyšší také v případě močoviny s glycerolem a glycinu s glycerolem.

Celková nejvyšší produkce karotenoidů byla analyzována u kmenů *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004 (11,25 g/l) na močovinovém zdroji dusíku s glycerolem u BBM média, taktéž na „*Spirulina*“ médiu s dusičnanem sodným (9,63 g/l) a rovněž u kmene *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6 – 5,21 g/l na „*Spirulina*“ médiu s glycinovým zdrojem dusíku. U BBM média byla produkce jinak kolísavá u různých zdrojů dusíku.

Ve druhé části diplomové práce bylo provedeno 5 kokultivací v multikultivátoru s upraveným složením makroprvků u BBM média (kapitola 3.7). Jednalo se o fosfor, dusík a hořčík.

Porovnání produkce metabolitů bylo provedeno oproti metabolitům produkovaným samostatnou mikrořasou/sinicí a kvasinkou (podkapitoly 4.3.1 – 4.3.5).

Kmeny *Scenedesmus dimorphus* CCALA 443 a *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004 byly kokultivovány jako první. Produkce kombinované biomasy byla nejvyšší v případě obsahu fosforu na 350 % (1,01 g/l) a 300 % obsahu hořčíku v médiu (0,97 g/l). Stoupající koncentrace dusíku v médiu měla pozitivní vliv na produkci ergosterolu, jehož koncentrace se pohybovala maximálně mírně nad 2 mg/g. Nejvíce produkovanými karotenoidy byly β -karoten a lutein, a to v základním BBM médiu (1,18 mg/g a 1,01 mg/g). Profil MK se měnil v závislosti na množství fosforu (350 %), hořčíku (200 %) a také dusíku (350 %) ve prospěch zvýšeného podílu PUFA. Celková akumulace lipidů byla vyšší v případě zvýšené koncentrace dusíku v médiu.

Druhá kokultivace zahrnovala kmeny *Anabaena torulosa* CCALA 003 a *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004. Nejvhodnějším stresem pro tuto kombinaci mikroorganismů z pohledu produkce biomasy byla kombinace obsahu fosforu a dusíku na 200 % oproti základnímu médiu, takto bylo naprodukováno až 1,31 g/l. Taktéž v produkci β -karotenu se osvědčil stres stejný jako u produkce biomasy, u multikultivátoru B bylo v tomto případě naměřeno 0,59 mg/g. Zvyšující se obsah dusíku v médiu také podporoval vyšší produkci β -karotenu. Produkce astaxanthinu byla nejlépe podpořena navyšujícím se obsahem dusíku v médiu a dosáhla maxima při obsahu dusíku 500 % oproti BBM médiu (1,64 mg/g). Koncentrace luteinu byla v obou multikultivátorech velmi nízká, maximum bylo naměřeno při obsahu fosforu 350 % (0,05 mg/g). Chlorofyly byly významněji produkovány v případě vyšších koncentrací dusíku a fosforu, případně dusíku samotného. Výsledky ukazují koncentrace chlorofylů při 200 % obsahu dusíku a fosforu až 1,58 mg/g, v případě samotného navyšování dusíku je koncentrace nižší, až 0,98 mg/g. Z pohledu profilu MK došlo vlivem vyšší koncentrace fosforu k vyšší produkci PUFA (43,98 %) a k postupnému snižování výskytu SFA (minimum 14,79 %). Tento trend se objevil i v případě zvyšujícího se obsahu hořčíku a dusíku. Nejlepšího zastoupení PUFA bylo dosaženo při obsahu dusíku a fosforu 200 % (51,73 %). Celková produkce lipidů byla nejvyšší v případě kokultivace na čistém BBM médiu (maximum 1,46 g/l).

Celková produkce biomasy z kokultivace kmenů *Scenedesmus acutus* CCALA 258 a *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004 proběhla s podstatně nižšími výtěžky než u samotné kvasinky. Nejvyšší hodnota byla nalezena při úpravě obsahu hořčíku na 200 % (2,15 g/l). V případě úpravy obsahů dusíku s fosforem (až 27,37 mg/g), fosforu samotného (7,21 mg/g, 350 %) a hořčíku (6,61 mg/g, 200 %) došlo k vysoké produkci karotenoidů. Takových

hodnot nebylo dosaženo v žádné jiné kokultivaci v rámci této práce. Současně je to poměrně vysoká hodnota i z hlediska průmyslového využití a rovněž ve srovnání s literaturou [42] [43] [44] [45] [46]. Celková produkce chlorofylů byla nízká, ale v případě základního BBM média byla vyšší než u samotné mikrořasy (5,77 mg/g). Profil MK tvořily SFA, a to převážně u vyšších koncentrací fosforu a hořčíku. Vyšší obsah dusíku v médiu podporoval spíše tvorbu PUFA. Procentuální zastoupení lipidů bylo velmi nízké u vyšších koncentrací dusíku v médiu. Lepší akumulace byla zaznamenána s vyšším obsahem hořčíku (1,69 g/l, 200 %).

Jednoho z nejlepších výsledků bylo dosaženo u produkce biomasy v kokultuře kmenů *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6 a *Coccomyxa sp.* CCALA 912. Vysoká celková produkce biomasy (dusík 400 %, 3,46 g/l) byla doprovázená i širším spektrem produkovaných metabolitů. Nejlépe podporoval hojné zastoupení všech sledovaných látek nutriční stres způsobený obsahem dusíku na 500 % oproti základnímu médiu. Při těchto podmínkách bylo dosaženo produkce celkových karotenoidů až 7,30 mg/g biomasy, chlorofylů 0,49 mg/g, ergosterolu 1,70 mg/g, dále ubichinonu 1,53 mg/g, což je opět velmi dobrý výtěžek ve srovnání s literaturou [42] [43] [44] [45] [46]. Jediný astaxanthin byl přítomný v minimech případů a v některých byla produkce nulová. Akumulace lipidů byla zatím nejvyšší ze všech kokultur, při nejvyšším sledovaném obsahu fosforu přesáhla hranici 12 %. Změna obsahu dusíku měla slabší efekt na akumulaci lipidů, produkce byla výrazně nižší než u samotné kvasinky (maximum 10,59 g/l).

Kokultura *Anabaena laxa* CCALA 805 a *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004 produkovala lépe biomasu při vyšším obsahu hořčíku, při 300 % byla její koncentrace 1,65 g/l. Obsah karotenoidů převyšoval produkci samotné kvasinky v případě vyšších obsahů makroprvku fosforu a hořčíku. Nejvyšší koncentrace byla naměřena při obsahu hořčíku 300 % (2,44 mg/g). V porovnání s literaturou je tato hodnota nicméně nízká [53] [54]. Vyšší obsah sledovaných makroprvků měl slabší efekt na produkci β -karotenu, přičemž v případě stoupajícího obsahu dusíku byla produkce ještě nižší než u zvýšené koncentrace fosforu a hořčíku. Produkce ubichinonu vykazovala lepší odezvu při posílení obsahu dusíku, kde při 350 % obsahu oproti BBM médiu byla koncentrace

1,09 mg/g. Působení vyššího obsahu fosforu mělo pozitivní vliv na produkci ergosterolu, při 350 % obsahu fosforu byla koncentrace 2,77 mg/g biomasy. Vlivem zvyšování obsahu hořčíku došlo k až o 10 % vyšší produkci PUFA a zároveň snížení MUFA, současně bylo nalezeno vyšší procentuální zastoupení lipidů v biomase.

V poslední části diplomové práce byla provedena jedna kokultivace ve větším měřítku, a to v laboratorním 3 l fermentoru. Na základním BBM médiu byly mikroorganismy kultivovány po dobu 120 h. Do média byl přidán roztok glycerolu jako výživa pro kvasinku. Pro experiment byly na základě screeningových experimentů vybrány kmeny *Scenedesmus dimorphus* CCALA 443 a *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004. Z pohledu celkové produkce karotenoidů bylo dosaženo maximálního výtěžku 3,7 g/l. V porovnání s kokultivací v multikultivátoru lze u stejných kmenů při navýšení obsahu hořčičku na 300 % oproti BBM médiu dosáhnout vyšších výtěžků (až 5,29 g/l). Produkce astaxanthinu dosáhla až čtyřikrát nižší výtěžek u stejného média než v multikultivátoru (maximum 0,31 mg/g). Vyšších koncentrací bylo naprodukováno v případě torularhodinu, lykopenu a ergosterolu. Produkce ergosterolu převýšila všechny ostatní sledované metabolity, maxima dosáhla při 48. h odběru (5,07 mg/g biomasy). Akumulace lipidů se ukázala výhodnější v případě fermentoru než u multikultivátoru, při posledním odběru dosahovala koncentrace až 17,15 g/l. Z hlediska profilu MK v lipidech převažovaly SFA nad ostatními skupinami a po většinu experimentu nebyly naprodukovány PUFA.

Předložená práce představuje pilotní studii zaměřenou na optimalizaci podmínek kokultivace karotenogenních kvasinek a mikrořas za účelem produkce obohacené biomasy pro potravinářské a krmivářské účely. Kokultivace spojuje výhody obou typů mikroorganismů – heterotrofní růst kvasinek na odpadních substrátech s produkcí CO₂ a autotrofní růst mikrořas využívající CO₂ z metabolismu kvasinek a produkující kyslík pro jejich lepší růst. Navíc oba typy organismů produkují některé shodné metabolity, což je další potenciální výhoda.

Z dosažených výsledků je patrné, že uvedený koncept představuje slibnou a perspektivní možnost biotechnologického využití, avšak je třeba další optimalizace jak v oblasti výběru kmenů, tak při optimalizaci složení média a kultivačních podmínek. Práce bude základem pro navazující studie.

6 ZÁVĚR

V této diplomové práci byl zkoumán vliv biologického stresu kokultivace na složení produkované biomasy mezi heterotrofními a fotoautotrofními jedinci, jimiž byli kvasinky, mikrořasy a sinice. V analyzované kokultuře byl sledován obsah celkové biomasy, chlorofylů, karotenoidů, ergosterolu, ubiquinonu profil MK v lipidech a jejich procentuální zastoupení v biomase. V první části práce proběhly screeningové kultivace kmenů kvasinek na médiích vhodných pro mikrořasy, následně se pokračovalo kokultivační fází, kde došlo k postupnému navyšování obsahu makroprvků fosforu, hořčíku a dusíku v prostředí BBM média. Zdrojem uhlíku byl vždy glycerol. Finální fázi představovala kokultivace v laboratorním fermentoru.

Z výsledků vyplývají následující dílčí závěry:

- na celkovou produkci biomasy má nejlepší vliv stres způsobený zvýšeným obsahem hořčíku na 300 %, dusíku na 400 % a 500 % oproti BBM médiu. Menší, ale stále nezanedbatelný vliv má také obsah fosforu na 350 %. V případě kokultivace *Anabaena torulosa* CCALA 003 a *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004 byla nejvyšší koncentrace biomasy analyzována na základním médiu.

- obsah celkových karotenoidů pozitivně ovlivňoval zvýšený obsah dusíku společně s fosforem na 200 %, dále obsah dusíku na 500 % oproti základnímu médiu a v případě kokultury *Anabaena laxa* CCALA 805 a *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004 vyšší obsah fosforu i hořčíku.

- produkce β -karotenu je ovlivněna rozdílně podle typu mikroorganismu. U kokultivací mikrořas *Scenedesmus dimorphus* CCALA 443, *Scenedesmus acutus* CCALA 258 s kvasinkou *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004 je nejvíce vhodné základní BBM médium. V ostatních případech se uplatňuje vliv vyššího obsahu dusíku a hořčíku při 300 %.

- obsah luteinu v analyzované biomase podporuje vyšší obsah dusíku, zejména obsah 500 % oproti základnímu médiu.

- tvorbu ergosterolu nejlépe ovlivňuje obsah dusíku s fosforem na 200 %, jako je tomu u kokultury *Anabaena torulosa* CCALA 003 a *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004 a *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6 a *Coccomyxa sp.* CCALA 912.

- astaxanthin se tvoří nejvíce při vyšším obsahu dusíku v médiu. Při obsahu 500 % oproti BBM médiu je jeho obsah u kokultury *Anabaena torulosa* CCALA 003 a *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004 1,64 mg/g biomasy, což je nejvyšší hodnota z celé této práce. Kokultivací mikrořas *Scenedesmus dimorphus* CCALA 443, *Scenedesmus acutus* CCALA 258 s kvasinkou *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004 bylo nejvyšších hodnot naprodukováno na základním BBM médiu.

- celkový obsah chlorofylů je výrazně nižší než u karotenoidů. Jejich tvorbu podporuje nejlépe obsah dusíku v rozmezí 200 % - 350 % oproti BBM médiu. V případě kokultivace *Anabaena laxa* CCALA 805 a *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004 je nejlepším stresem 200 % obsah hořčíku v BBM médiu. Nejvyšší hodnota byla analyzována u kokultury kmenů *Scenedesmus acutus* CCALA 258 a *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004 na BBM médiu (5,77 mg/g).

- spektrum MK nejlépe ovlivňuje z pohledu vyššího obsahu PUFA navýšení dusíku na 350 %, hořčíku 200 % - 300 % a fosforu 200 % - 350 %. Dále má pozitivní vliv také vyšší obsah dusíku s fosforem při 200 %, což ukazují výsledky z kokultury *Anabaena torulosa* CCALA 003, *Scenedesmus acutus* CCALA 258 s kvasinkou *Rhodospiridium toruloides* CCY 062-002-004 a *Coccomyxa* sp. CCALA 912 s kvasinkou *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6. U poslední kokultivace se profil MK vyvíjel ve prospěch MUFA po celou délku kokultivace.

- u některých kokultur má lepší efekt na produkci lipidů vyšší obsah dusíku v BBM médiu, u jiných pak vyšší obsah fosforu nebo hořčíku v BBM médiu.

- kokultivace ve fermentoru na základním BBM médiu se zdrojem uhlíku glycerolem potvrdila rostoucí obsah torularhodinu, naopak je tomu u β -karotenu a luteinu. Podobně jako je tomu u některých jiných kokultivací došlo k velmi nízké produkci chlorofylů, jež byla výrazně převýšena karotenoidy a ergosterolem. Profil MK obsahuje z větší části SFA. Přítomnost MUFA tvoří asi jednu pětinu celkových MK a nejmenší zastoupení mají PUFA, méně než deset procent z celkového množství lipidů.

Kokultivace kvasinek a mikrořas/siníc s sebou přináší možnost produkce obohacené biomasy o karotenoidy, chlorofyly a lipidické látky. Na základě odlišného způsobu zajištění nutričních potřeb jednotlivých mikroorganismů je produkce takové biomasy s výhodou podpořena vzájemným dodáváním základních živin. Biotechnologická produkce v kokultuře má uplatnění

v průmyslu potravinářském, krmivářském, kosmetickém, produkci biopaliv a také zpracování odpadních vod. V navazujících studiích se nabízí možnost využití jiných stresových podmínek, např. jiné teploty během kokultivace, aplikace Fe^{2+} iontů, ale i jiných makro- i mikroprvků k cílenému ovlivnění metabolických drah mikroorganismů. Cílem je aplikovat zjištěné poznatky až do úrovně velkoobjemové kokultivace ve fermentoru za účelem co nejvyšší produkce obohacené biomasy a vzácných metabolitů.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] GAUTHIER, M.R., G.N.A. SENHORINHO a J.A. SCOTT. Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants. *Algal Research* [online]. 2020, **52**, 10 [cit. 2020-10-29]. ISSN 22119264. Dostupné z: doi:10.1016/j.algal.2020.102104
- [2] KOPECKÝ, J., R. LHOTSKÝ a J. PAICHLOVÁ. *Aktivní látky mikrořas ve výživě*. [Praha]: Středisko společných činností AV ČR, 2017. Věda kolem nás. ISBN ISBN978-80-270-2247-2.
- [3] JOHANSEN, M. N., ed. *Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy*. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2012, 475 s. Marine Biology. ISBN 978-1-62257-868-9.
- [4] COLLOTTA, M., P. CHAMPAGNE, W. MABEE a G. TOMASONI. Wastewater and waste CO₂ for sustainable biofuels from microalgae. *Algal Research* [online]. 2018, **29**(1), 12-21 [cit. 2020-10-29]. ISSN 22119264. Dostupné z: doi:10.1016/j.algal.2017.11.013
- [5] ŘEPKA, R. a J. KOBLÍŽEK. *Systematická botanika*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007, 216 s. ISBN ISBN978-80-7375-024-4.
- [6] GUSTINEAU, R., N. DAVIDOVICH, G. HALLEGRAEFF, I. PROBERT a J. MOUGET, K.G. RAMAWAT, J.M. MERILLON, K.R. SHIVANNA. *Reproduction in Microalgae: Reproductive Biology of Plants*. Boca Raton: CRC Press, 2014, 1-28 s. ISBN 9780429168611. 10.1201/B16535-3.
- [7] BARSANTI, L. a P. GUALTIERI. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Second edition. Boca Raton, Florida: CRC Press/Taylor, 2014. ISBN 9781439867327.
- [8] KUMAR RAI, S. Occurrence of genus *Scenedesmus* Mayenn (Chlorophyceae) from East Nepal. *Nepalese Journal of Biosciences*. 2013, **2013**(3).
- [9] *Scenedesmus acutus* Meyen: Nordic microalgae. In: *Nordic microalgae* [online]. [cit. 2021-07-17]. Dostupné z: <http://nordicmicroalgae.org/taxon/Scenedesmus%20acutus>
- [10] KATIYAR, R., B.R. GURJAR, A. KUMAR a R. BHARTI. An integrated approach for phycoremediation of municipal wastewater and production of sustainable transportation fuel using oleaginous *Chlorella* sp. *Journal of Water Process Engineering*. 2021, **42**, 1-2. ISSN 22147144. Dostupné z: doi:10.1016/j.jwpe.2021.102183

- [11] POSTEN, C. a S. FENG CHEN, ed. *Microalgae Biotechnology*. 1. Springer, 2016. ISBN 9401773211.
- [12] Microscope image of Chlorella sp.: Download Scientific Diagram. In: *ResearchGate | Find and share research* [online]. 2008 [cit. 2021-07-17]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Microscope-image-of-Chlorella-sp_fig8_299466154
- [13] BELZILE, C. a M. GOSSELIN. Free-living stage of the unicellular algae *Coccomyxa* sp. parasite of the blue mussel (*Mytilus edulis*): Low-light adaptation, capacity for growth at a very wide salinity range and tolerance to low pH. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2015, **132**, 201-207. ISSN 00222011. Dostupné z: doi:10.1016/j.jip.2015.10.006
- [14] CAO, S., F. ZHANG, H. ZHENG, F. PENG, Ch. LIU a Q. ZHOU. *Coccomyxa* greatwallensis sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a lichen epiphytic alga from Fildes Peninsula, Antarctica. *PhytoKeys*. 2018, **110**, 39-50. ISSN 1314-2003. Dostupné z: doi:10.3897/phytokeys.110.26961
- [15] RUIZ-DOMÍNGUEZ, M., I. VAQUERO, V. OBREGÓN, B. DE LA MORENA, C. VÍLCHEZ a J. VEGA. Lipid accumulation and antioxidant activity in the eukaryotic acidophilic microalga *Coccomyxa* sp. (strain onubensis) under nutrient starvation. *Journal of Applied Phycology*. 2015, **27**(3), 1099-1108. ISSN 0921-8971. Dostupné z: doi:10.1007/s10811-014-0403-6
- [16] *Coccomyxa* sp. | CCALA. In: *Welcome to CCALA | CCALA* [online]. 2020 [cit. 2021-07-17]. Dostupné z: <https://ccala.butbn.cas.cz/cs/node/14138>
- [17] SAHOO, D. a J. SECKBACH. *The Algae World*. 1. London: Springer, 2015. ISBN 9401773211.
- [18] HALINEN, K., D. FEWER, L. SIHVONEN, Ch. LYRA, E. ERONEN a K. SIVONEN. Genetic diversity in strains of the genus *Anabaena* isolated from planktonic and benthic habitats of the Gulf of Finland (Baltic Sea). *FEMS Microbiology Ecology*. 2008, **64**(2), 199-208. ISSN 01686496. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00461.x
- [19] NORENA-CARO, D., C. ZUNIGA, A. PETE et al. Analysis of the cyanobacterial amino acid metabolism with a precise genome-scale metabolic reconstruction of *Anabaena* sp. UTEX 2576. *Biochemical Engineering Journal*. 2021, **171**, 1-2. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2021.108008

- [20] ALVAREZ, A., S. WEYERS, H. GOEMANN, B. PEYTON a R. GARDNER. Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. *Algal Research*. 2021, **54**. ISSN 22119264. Dostupné z: doi:10.1016/j.algal.2021.102200
- [21] Anabaena torulosa Lagerheim ex Bornet et Flahault|CCALA. In: *Welcome to CCALA | CCALA* [online]. 2020 [cit. 2021-07-17]. Dostupné z: <https://ccala.butbn.cas.cz/cs/node/13231>
- [22] BUŇKOVÁ, L. a M. DOLEŽALOVÁ. *Obecná mikrobiologie*. Vyd. 2., nezměn. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010. ISBN 9788073189730.
- [23] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [24] BURSOVÁ, Š., L. NECIDOVÁ a M. DUŠKOVÁ. *Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody. Obecná mikrobiologie*. 1. Brno: FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE Ústav hygieny a technologie mléka, 2014. ISBN 978-80-7305-742-8.
- [25] PFEIFFER, T. a A. MORLEY. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2014, **1**. ISSN 2296-889X. Dostupné z: doi:10.3389/fmolb.2014.00017
- [26] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. Bratislava: Alfa, 1990. Edícia potravinárskej literatúry. ISBN 80-050-0644-6.
- [27] JANDEROVÁ, B. a O. BENDO VÁ. *Úvod do biologie kvasinek*. 1999. Praha: Karolinum. ISBN 80-718-4990-1.
- [28] XU, J. a D. LIU. Exploitation of genus Rhodosporidium for microbial lipid production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017, **33**(3), 1-4. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-017-2225-6
- [29] ZHU, R., K. FEUSSNER, T. WU, F. YAN, P. KARLOVSKY a X. ZHENG. Detoxification of mycotoxin patulin by the yeast Rhodosporidium paludigenum. *Food Chemistry*. 2015, **179**, 1-5. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.066

- [30] WEN, Z., S. ZHANG, Ch. ODOH, M. JIN a Z. ZHAO. Rhodosporidium toruloides - A potential red yeast chassis for lipids and beyond. *FEMS Yeast Research*. 2020, **20**(5), 12. ISSN 1567-1356. Dostupné z: doi:10.1093/femsyr/foaa038
- [31] LOPES, H., N. BONTURI a E. MIRANDA. Rhodotorula toruloides Single Cell Oil Production Using Eucalyptus urograndis Hemicellulose Hydrolysate as a Carbon Source. *Energies*. 2020, **13**(4), 11. ISSN 1996-1073. Dostupné z: doi:10.3390/en13040795
- [32] BERTACCHI, S., M. BETTIGA, D. PORRO a P. BRANDUARDI. Camelina sativa meal hydrolysate as sustainable biomass for the production of carotenoids by Rhodosporidium toruloides. *Biotechnology for Biofuels*. 2020, **13**(1), 10. ISSN 1754-6834. Dostupné z: doi:10.1186/s13068-020-01682-3
- [33] DAI, X., H. SHEN, Q. LI et al. Microbial Lipid Production from Corn Stover by the Oleaginous Yeast Rhodosporidium toruloides Using the PreSSLP Process. *Energies*. 2019, **12**(6), 10. ISSN 1996-1073. Dostupné z: doi:10.3390/en12061053
- [34] ZHENG, X., R. HU, D. CHEN et al. Lipid and carotenoid production by the Rhodosporidium toruloides mutant in cane molasses. *Bioresource Technology*. 2021, **326**, 6. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.124816
- [35] SAMPAIO, J, M. GADANHO a R. BAUER. Taxonomic studies on the genus Cystofilobasidium: description of Cystofilobasidium ferigula sp. nov. and clarification of the status of Cystofilobasidium lari-marini. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001, **51**(1), 221-229. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-51-1-221
- [36] LIBKIND, D., M. GADANHO, M. VAN BROOCK a J. SAMPAIO. Cystofilobasidium lacus-mascardii sp. nov., a basidiomycetous yeast species isolated from aquatic environments of the Patagonian Andes, and Cystofilobasidium macerans sp. nov., the sexual stage of Cryptococcus macerans. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 2009, **59**(3), 622-630. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijms.0.004390-0
- [37] VALERIO, E., M. GADANHO a J. SAMPAIO. Reappraisal of the Sporobolomyces roseus species complex and description of Sporidiobolus metaroseus sp. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 2008, **58**(3), 736-741. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijms.0.65580-0

- [38] HAN, M., Z. XU, Ch. DU, H. QIAN a W. ZHANG. Effects of nitrogen on the lipid and carotenoid accumulation of oleaginous yeast *Sporidiobolus pararoseus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2016, **39**(9), 1425-1433. ISSN 1615-7591. Dostupné z: doi:10.1007/s00449-016-1620-y
- [39] FRENGOVA, G. a D. BESHKOVA. *Carotenoids from Rhodotorula and Phaffia: yeasts of biotechnological importance*. 2009, **36**(2), 163-180. ISSN 1367-5435. Dostupné z: doi:10.1007/s10295-008-0492-9
- [40] SILVA, P., D. PRESCENDO JÚNIOR, L. SALA, J. BURKERT a L. SANTOS. Magnetic field as a trigger of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma*. *Process Biochemistry*. 2020, **98**, 131-138. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2020.08.001
- [41] CHU, R., S. LI, L. ZHU, Z. YIN, D. HU, Ch. LIU a F. MO. A review on co-cultivation of microalgae with filamentous fungi: Efficient harvesting, wastewater treatment and biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2021, **139**. ISSN 13640321. Dostupné z: doi:10.1016/j.rser.2020.110689
- [42] WANG, S., Y. WU a X. WANG. Heterotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* using sucrose as the sole carbon source by co-culture with *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology*. 2016, **220**, 615-620. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2016.09.010
- [43] ISHIKA, T., N. MOHEIMANI a P. BAHRI. Sustainable saline microalgae co-cultivation for biofuel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017, **78**, 356-368. ISSN 13640321. Dostupné z: doi:10.1016/j.rser.2017.04.110
- [44] SZOTKOWSKI, M., J. HOLUB, S. ŠIMANSKÝ, K. HUBAČOVÁ, P. SIKOROVÁ, V. MARINIČOVÁ, A. NĚMCOVÁ a I. MÁROVÁ. Bioreactor Co-Cultivation of High Lipid and Carotenoid Producing Yeast *Rhodotorula kratochvilovae* and Several Microalgae under Stress. *Microorganisms*. 2021, **9**(6), 23. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9061160
- [45] LI, H., Y. ZHONG, Q. LU et al. Co-cultivation of *Rhodotorula glutinis* and *Chlorella pyrenoidosa* to improve nutrient removal and protein content by their synergistic relationship. *RSC Advances*. 2019, **9**(25), 14331-14342. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C9RA01884K
- [46] XUE, F., J. MIAO, X. ZHANG a T. TAN. A New Strategy for Lipid Production by Mix Cultivation of *Spirulina platensis* and *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemistry and*

- Biotechnology*. 2010, **160**(2), 498-503. ISSN 0273-2289. Dostupné z: doi:10.1007/s12010-008-8376-z
- [47] ZHOU, W., Y. CHENG, Y. LI, Y. WAN, Y. LIU, X. LIN a R. RUAN. Novel Fungal Pelletization-Assisted Technology for Algae Harvesting and Wastewater Treatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012, **167**(2), 214-228. ISSN 0273-2289. Dostupné z: doi:10.1007/s12010-012-9667-y
- [48] JANČÁŘOVÁ, I. a L. JANČÁŘ. *Analytická chemie*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 80-715-7647-6.
- [49] NEDOMA, J., V. KOUTNÍK a P. HRDLIČKA. *Anorganická a analytická chemie*. Vyd. 2. nezm. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2001. ISBN 80-715-7549-6.
- [50] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [51] VOLKA, K. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-708-0227-8.
- [52] Spirulina medium | CCALA. *Welcome to CCALA | CCALA* [online]. Copyright © CCALA 2020 [cit. 05.08.2021]. Dostupné z: <https://ccala.butbn.cas.cz/en/spirulina-medium>
- [53] LEE, J., L. CHEN, J. SHI, A. TRZCINSKI a W. CHEN. Metabolomic Profiling of *Rhodospiridium toruloides* Grown on Glycerol for Carotenoid Production during Different Growth Phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, **62**(41), 10203-10209. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf502987q
- [54] PHAM, K., Y. SHIDA, A. MIYATA et al. Effect of light on carotenoid and lipid production in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2020, **84**(7), 1501-1512. ISSN 0916-8451. Dostupné z: doi:10.1080/09168451.2020.1740581

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	aceton
ACN	acetonitril
BBM	Bold Basal Medium
D	dusičnan sodný
EtAc	ethylacetát
G	glycin
Gly	glycerol
M	močovina
MeOH	methanol
MIN	minerální médium
MK	mastná kyselina
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
S	síran amonný
SFA	nasycené mastné kyseliny
Spi	„ <i>Spirulina</i> “ médium
TES	transesterifikační směs
TrisHCl	tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochlorid
YPD	kvasnicový extrakt pepton dextroza (univerzální kvasinkové médium)