



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VLIV VYBRANÝCH MIKOBIOGENNÍCH PRVKŮ NA KAROTENOGENNÍ KVASINKY

INFLUENCE OF SOME MICROBIOGENIC ELEMENTS ON CAROTENOGENIC YEASTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Josef Pulkrábek

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jan Obračaj

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK2009/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Josef Pulkrábek**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Jan Obračaj**

Název bakalářské práce:

Vliv vybraných mikrobiogenních prvků na karotenogenní kvasinky

Zadání bakalářské práce:

Přehledná literární rešerše zaměřená na utilizaci mikrobiogenních prvků karotenogenními kvasinkami.

Kultivace a příprava obohacené biomasy kvasinek.

Analýza a charakterizace biomasy, stanovení antioxidační aktivity.

Vyhodnocení výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

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

Josef Pulkrábek
student

Ing. Jan Obračaj
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 20.9.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Karotenogenní kvasinky rodu *Rhodotorula* jsou dobře známy pro svou produkci řady ekonomicky cenných a jinak obtížně vyrobitelných produktů jako jsou mastné kyseliny, karotenoidy, ergosterol a ubichinon. Tato práce se zabývá vlivem příměsí vybraných mikrobiogenních prvků (Fe, Se, I) a jejich kombinací do minerálního kultivačního média kmenů *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula kratochvilovae* a *Rhodotorula toruloides* za účelem zkoumání produkce zmíněných cenných metabolických produktů a míry sorpce prvků do biomasy. Také byla měřena sorpce oxidu zinečnatého, fumarátu železnatého a selenomethioninu do již vykultivované biomasy po 2 a 24 hodinách. Obsah mastných kyselin byl měřen pomocí GC-FID, obsah karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu pomocí HPLC-DAD a prvků pomocí ICP-OES a IC. Až na výjimky byla míra produkce metabolických produktů příměsemi prvků snížena a inverzně korelována s koncentrací příměsí. Při sorpci vyšší koncentrace vykazovaly vyšší absolutní množství nasorbovaného prvku, ale menší relativní množství, což v kombinaci s menší produkcí cenných produktů ukazuje, že média nejsou pro kultivaci daných kmenů vhodná. Jejich obsah byl takový, že při podávání biomasy s jednotlivými nasorbovanými prvky by byl obsah v souladu s výživovými referenčními hodnotami EÚBP, ale při kultivaci v médiu se smíšenými příměsí by biomasa obsahovala buď příliš malé množství železa, nebo příliš velké množství selenu. Úrovně sorpce byly relativně nízké (5 až 22 % u železa a 0,5 až 2,5 % u selenu). Kultivace v médiích s nižší koncentrací příměsí je tedy slibnou oblastí pro budoucí práci.

KLÍČOVÁ SLOVA

Rhodotorula, sorpce, mikrobiogenní prvky, karotenogenní kvasinky, HPLC, GC, ICP, mastné kyseliny, karotenoidy, metabolismus kvasinek, výživové referenční hodnoty

ABSTRACT

Carotenogenic yeasts of the genus *Rhodotorula* are well known for their production of a variety of economically valuable and otherwise difficult to produce compounds such as fatty acids, carotenoids, ergosterol, and ubiquinone. This study investigates the effect of the addition of select microbiogenic elements (Fe, Se, I) and their combinations into mineral cultivation media on the production of the mentioned valuable metabolic products and the rate of element sorption into the biomass of the strains of *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula kratochvilovae*, and *Rhodotorula toruloides*. Additionally, the sorption of zinc oxide, ferrous fumarate, and selenomethionine into previously cultivated biomass was measured with sorption times of 2 and 24 hours. Fatty acid content was determined using GC-FID, while carotenoids, ergosterol, and ubiquinone were analyzed using HPLC-DAD, with element content being quantified using ICP-OES and IC. With a few exceptions, the production of metabolic products was decreased with the addition of elements into the media and inversely correlated with their concentration. Higher concentrations generally showed greater absolute amounts of sorbed elements but lower relative amounts, which, combined with reduced production of metabolic products shows that the media are not ideal for the cultivation of the given species. The elemental contents were such that biomass supplemented with individually sorbed elements would vaguely align with ESFA dietary reference values, but cultivation in media with a mixture of added elements could result in the biomass containing either insufficient iron or excessively high levels of selenium. Sorption levels were relatively low (5 to 22 % for iron and 0.5 to 2.5 % for selenium). Indicating that cultivation in media with lower concentrations of elemental additives is a promising area for future research.

KEYWORDS

Rhodotorula, sorption, microbiogenic elements, carotenogenic yeasts, HPLC, GC, ICP, fatty acids, carotenoids, yeast metabolism, dietary reference values

PULKRÁBEK, Josef. *Vliv vybraných mikrobiogenních prvků na karotenogenní kvasinky*. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/160759>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Jan Obračaj.

Prohlášení

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

.....

Podpis studenta

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat svému skvělému vedoucímu Ing. Janu Obračajovi a konzultantce Ing. Michaele Kubalové za nedocenitelnou pomoc, trpělivost a ochotu při řešení praktické i teoretické části práce. Také bych chtěl poděkovat fakultě, vedení ÚCHBPT a obzvláště prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za pohotovou reakci při nejistotě ohledně vedoucího umožnění realizace práce. V neposlední řadě bych také chtěl poděkovat rodině a přátelům za fyzickou i psychickou podporu při studiu.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Kvasinky	9
2.1.1	Morfologie a cytologie	9
2.1.2	Životní cyklus.....	10
2.1.3	Kultivace	10
2.1.4	Metabolity karotenogenních kvasinek	10
2.1.5	Rod <i>Rhodotorula</i>	11
2.1.6	Metabolismus Železa, Selenu a Jódu	12
2.2	Výživové referenční hodnoty	13
2.3	Biogenní prvky	14
2.4	Analýzy	15
2.4.1	Transesterifikace	15
2.4.2	HPLC-DAD.....	16
2.4.3	GC-FID.....	17
2.4.4	IC (IEX).....	17
2.4.5	ICP-OES.....	17
3	CÍLE PRÁCE	18
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
4.1	Pomůcky a přístroje	19
4.1.1	Pomůcky a přístroje pro kultivaci kvasinek	19
4.1.2	Pomůcky a přístroje pro extrakce a HPLC/GC analýzu.....	19
4.1.3	Pomůcky a přístroje pro ICP-OES analýzu.....	19
4.1.4	Pomůcky a přístroje pro IC analýzu.....	19
4.2	Použité chemikálie a kultivované kmeny kvasinek	20
4.2.1	Chemikálie použity pro kultivaci kvasinek	20
4.2.2	Chemikálie použité pro extrakce a GC analýzu	20
4.2.3	Chemikálie použité pro extrakce a HPLC analýzu	20
4.2.4	Chemikálie použité pro sorpční experiment.....	20
4.2.5	Chemikálie použité pro ICP-OES analýzu.....	20
4.2.6	Chemikálie použité pro IC analýzu	21
4.2.7	Kultivované kmeny karotenogenních kvasinek	21

4.3	Kultivace kvasinek	21
4.3.1	Převedení na petriho misku	21
4.3.2	Inokulum I a II.....	21
4.3.3	Produkční médium	22
4.3.4	Mikroskopická kontrola biomasy	23
4.4	Extrakce a analýza na HPLC	23
4.5	Extrakce a analýza na GC	24
4.6	Sorpční experiment	24
4.7	Prvková analýza (ICP).....	25
4.7.1	ICP-OES.....	25
4.7.2	IC (IEX).....	26
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	27
5.1	Výtěžek biomasy.....	27
5.2	Analýza obsahu mastných kyselin pomocí GC-FID.....	27
5.2.1	Kmen <i>Rhodotorula toruloides</i>	27
5.2.2	Kmen <i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	31
5.2.3	Kmen <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	35
5.3	Analýza obsahu karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu pomocí HPLC	35
5.3.1	Kmen <i>Rhodotorula toruloides</i>	36
5.3.2	Kmen <i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	38
5.3.3	Kmen <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	41
5.4	Analýza obsahu přimíšených prvků v biomase <i>R. toruloides</i> pomocí IC a ICP-OES	41
5.4.1	Kultivace	42
5.4.2	Sorpční experiment	43
6	ZÁVĚR	46
7	ZDROJE	48
8	POUŽITÉ ZKRATKY	56

1 ÚVOD

Karotenogenní kvasinky rodu *Rhodotorula* jsou známé svou schopností produkovat různorodou škálu metabolických produktů, mezi něž patří mastné kyseliny, karotenoidy, ergosterol a ubiquinon. Tyto látky jsou známé svými prospěšnými účinky na zdraví člověka. Mastné kyseliny například přispívají k optimálnímu fungování buněčných membrán a jsou důležité pro hormonální regulaci. Karotenoidy jsou známy pro své antioxidační vlastnosti, které chrání buňky před oxidačním stresem a mohou mít preventivní účinky proti některým chorobám.

Dalšími produkty, jako je ergosterol a ubiquinon, jsou esenciální pro buněčné funkce a energetický metabolismus. Kultivace těchto kvasinek je tedy nejen z hlediska biotechnologického významná pro výrobu těchto látek, ale má také potenciál přinášet zdravotní výhody při využití v potravinářském a farmaceutickém průmyslu.

Přidání mikrobiogenních prvků, jako jsou železo, selen a jód, do kultivačních médií může výrazně ovlivnit produkci těchto metabolických produktů. Železo je klíčové pro správnou funkci enzymů a transport kyslíku v těle, selen je známý svou účastí na tvorbě antioxidantů a ochraně buněk před poškozením a jód je důležitý pro správnou funkci štítné žlázy a metabolismus.

Práce zaměřené na optimalizaci podmínek pro růst a produkci u karotenogenních kvasinek tak nabízejí potenciál pro vylepšení biotechnologických procesů a získání vysoce kvalitních produktů pro zdravotní aplikace.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou jednobuněčné houby, které se vyznačují schopností fermentovat cukry na alkohol a oxid uhličitý, což je schopnost klíčová pro výrobu pečiva, piva, vína a dalších fermentovaných produktů [1]. Tato práce se zaměřuje konkrétně na kvasinky kmene *Rhodotorula*, které tvoří karotenoidové pigmenty, které hrají roli jako antioxidanty a pohlcovače UV záření [2; 3; 4]. Kvasinky, které tyto látky produkují se označují jako karotenogenní kvasinky.

2.1.1 Morfologie a cytologie

Kvasinky vykazují typicky kulaté až oválné tvarové formy, které se liší v závislosti na druhu, podmínkách a fázi růstu. Jejich buněčná stěna se skládá ze dvou částí. Vnitřní část tvoří přibližně 60 % suché váhy stěny a je složena převážně z β 1,3–glukanu a chitinu. Vnější část je utvořena z glykosylovaných mannoproteinů, hraje roli při komunikaci s ostatními buňkami [5; 6] a blokuje cizí degradační enzymy [7]. Složení buněčné stěny je shrnuto v *Tabulka 1* níže. Sacharidové řetězce navázané na mannoproteiny mají také velké množství postranních řetězců s fosfodiesterovými můstky, což způsobuje silný negativní náboj při fyziologickém pH, což dává stěně její hydrofilní charakter [8; 9]. Kvasinky se množí převážně nepohlavně pučením nebo dělením, ale jsou také schopny pohlavního rozmnožování [10]. Struktura buněčné stěny také umožňuje sorpci a vychytávání vybraných biogenních prvků. Tyto mechanismy jsou nejlépe prostudovány pro železo, ale studie pro mechanismy prostupu selenu i jódu buněčnou stěnou také existují, i když pro jód jsou dosti omezené. Jeden z hlavních mechanismů používaných pro přísun železa do buňky je využití sideroforů, což jsou nízkomolekulární látky, které s vysokou afinitou a specifitou chelatují Fe^{3+} ionty [11] a umožňují tím vychytávání membránovými proteiny FIT (Ferric ion transporter) [12]. Selen je vázán na vnějšek buňky chemisorpcí (tvoření komplexů či iontových vazeb s komponenty buněčné stěny) nebo je transportován dovnitř buněk transportéry cílící primárně na síru a možná jinými dosud neprozkoumanými cestami [13]. Vnitřní struktura je podobná jako u jiných eukaryotických buněk. Karotenogenní kvasinky, zejména ty z rodu *Rhodotorula*, jsou známé svou schopností produkovat vysoké koncentrace karotenoidů jako jsou beta-karoten, gamma-karoten, torulen a torularhodin.

Tabulka 1: Hmotnostní zlomky makromolekul v buněčné stěně kvasinek po vysušení [14]

Makromolekula:	Hmotnostní zlomek [%]:
Mannoproteiny	35-40
β 1,6 – Glukan	5-10
β 1,3 – Glukan	50-55
Chitin	1-2

2.1.2 Životní cyklus

Životní cyklus kvasinek je rozdělen do čtyř hlavních fází: vznik buňky, růst, replikace DNA, a replikace, která může nastat třemi způsoby: asexuálně, sexuálně nebo sexuálně s následnou meiózou a sporulací [15; 16]. Pučení je proces kde se dceřiná buňka vyvíjí jako přírůstek na mateřské, po čemž je odškrncena a začne svůj vlastní životní cyklus jako geneticky identický jedinec. Děje se tak převážně za dostatku živin a příznivých podmínek. Pokud dostatek živin v mediu není, tak se kvasinky schylují k sexuální formě reprodukce, kde se spárují buňky opačných párovacích typů a vytvoří diploidní zygotu. Za nepříznivých podmínek se ze zygoty poté vytvoří čtyři haploidní spory, které mají vyšší odolnost a zůstanou dormantní dokud se podmínky nezlepší [15; 16].

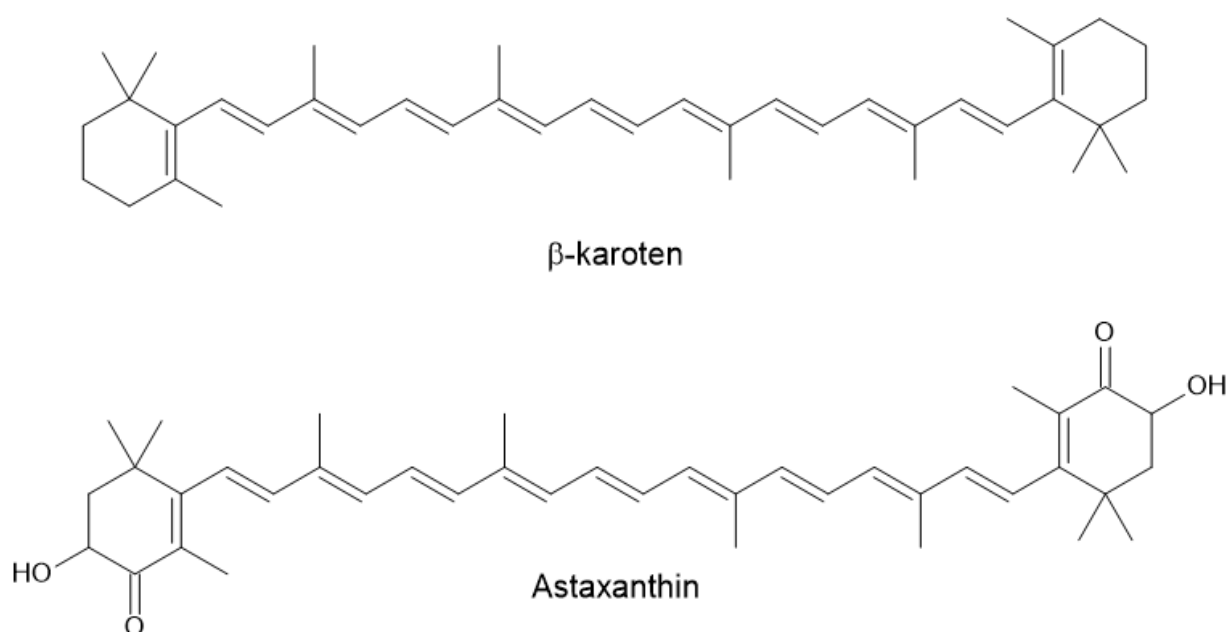
2.1.3 Kultivace

Pro zvolení přístupu ke kultivaci a volbě média je stěžejní cíl, se kterým jsou kvasinky kultivovány. I když kvasinky rostou dobře na základních médiích obsahujících pouze zdroj uhlíku a minerální soli, makro a mikroprvků, tak zdaleka rychleji rostou na médiích, které navíc obsahují formy proteinu a kvasinkové hydrolyzáty, jelikož nejsou nuceny syntetizovat komplexní biologické sloučeniny *de novo* [17]. Tyto média ale nemusí být vždy ekonomická ani vhodná, jelikož stres vytvořený sníženou koncentrací živin může potenciálně zvýšit produkci vybraných sekundárních metabolitů, za jejímž účelem byly kvasinky kultivovány. Lze tedy vyvodit že pro namnožení co největšího množství kvasinek je vhodnější použít medium obsahující bílkoviny a kvasinkové hydrolyzáty, zatímco pro produkci cenných metabolitů je vhodnější medium na bázi anorganických minerálních solí. Výhodné je tedy kvasinky namnožit v mediu komplexnějším a poté je převést do media minerálního. Kultivace mohou probíhat v širokém rozmezí měřítek, tedy od erlenmayerových či jiných baněk o relativně malém objemu (50 až 1000 ml) nebo menších bioreaktorů (malé jednotky až desítky litrů) až po průmyslové bioreaktory s objemy v desítkách až stovkách litrů. Důležitý faktor při kultivaci je také poměr C/N, neboli poměr dusíku k uhlíku, jelikož do jisté míry určuje povahu metabolických produktů kvasinek. Pro produkci karotenoidů je optimální C/N okolo 20 až 25:1, jelikož u vyšších poměrů než 30 a 50:1 byla pozorována diverze uhlíku do dráhy mastných kyselin [18; 19]. Další faktory ovlivňující růst karotenogenních kvasinek jsou teplota, světlo, pH, aerace a osmotický tlak vody [20; 21]. Konkrétní postup kultivace použitý při experimentech je sepsaný v experimentální části práce.

2.1.4 Metabolity karotenogenních kvasinek

Jak jméno naznačuje a je uvedeno výše, skupina karotenogenních kvasinek je soubor kmenů kvasinek (například kmeny *Rhodotorula*, *Phaffia*, *Xanthophyllomyces*, *Sporobolomyces* atd.), které dokáží přirozeně produkovat karotenoidy [22]. Karotenoidy jsou lipofilní, tetraterpenoidní sloučeniny složené zpravidla ze 40 uhlíků, kde je řetězec opatřen konjugovaným systémem Π vazeb a zakončen šestiuhlíkatým prstencem. Jsou také dále rozděleny do dvou podskupin: karotenů (čisté uhlovodíky) a xanthofylů (oxygenované deriváty) [23]. Pro přehlednost jsou tyto vlastnosti znázorněny na strukturách β -karotenu a Astaxanthinu v obrázku níže (*Obrázek 1*). Skrze schopnost zmíněnému konjugovanému systému Π vazeb absorbovat energetické em. záření (například pásmo UV) a pohlcovat reaktivní kyslíkové a jiné radikály nebo oxidanty které by reagovaly s biogenými buněčnými strukturami jako jsou nukleové nebo mastné kyseliny plní karotenoidy v buňce kvasinky významnou protekční roli jakožto quenchery radikálů a antioxidanty [24]. Vedlejší efekt Π konjugovaného systému a jeho absorpčních vlastností je charakteristické zbarvení které lze u kultur těchto kvasinek pozorovat. Karoteny nabývají barvy od červené přes oranžové až přes žlutou, zatímco u xanthofylů lze pozorovat zbarvení žluté až zelené. Živočišné buňky sice nejsou schopné karotenoidy syntetizovat, ale zmíněné protekční účinky z jejich přítomnosti

čerpají totožně. Tento fakt v kombinaci s tím že nejsou známy žádné toxické nebo jiné závažné negativní dopady na lidský organismus ani při vyšších dávkách [25] naznačuje že jsou karotenoidy vhodné komponenty potravinových doplňků, a tudíž ekonomicky zajímavé. Mimo své quencherové a antioxidační účinky jsou některé karotenoidy (primárně β -karoten) prekurzory esenciálního vitamínu A [26]. Kromě karotenoidů také tyto kvasinky produkují mastné kyseliny a látky jako ergosterol a ubichinon. Ergosterol plní v buněčných membránách nižších živočichů jako jsou studované kvasinky podobnou funkci jako plní cholesterol u živočichů, tedy funkci stabilizace membrány. Na rozdíl od cholesterolu je ergosterol ale mnohem odolnější vůči změnám ve vnějším prostředí, jako například změny vlhkosti nebo teploty [27]. Ubichinon, neboli koenzym Q₁₀, je důležitá látka která se podílí na transportu elektronů při buněčné respiraci v mitochondriích a je také velmi silným antioxidantem [28; 29]. Antioxidační účinky MK jsou facilitovány podobným mechanismem jako u karotenoidů, a tedy ještě zlepšují zdraví prospěšné vlastnosti biomasy.



Obrázek 1: Struktura β -karotenu a jeho oxygenovaného derivátu astaxanthinu

2.1.5 Rod *Rhodotorula*

Jak je již zmíněno výše, kvasinky rodu *Rhodotorula* jsou nejvýznamnější svojí schopností syntetizovat karotenoidy, což jsou lipofilní barviva, které způsobují jejich červené až žluté zbarvení [30; 31]. Díky své vysoké adaptabilitě na environmentální faktory jako pH a teplotu jsou rozšířeny v celé řadě prostředí jako jsou půdy, sladké a slané vody, vzduch nebo třeba povrchy rostlin [32; 33]. Tato adaptabilita také dělá ze zástupců rodu *Rhodotorula* vhodné mikroorganismy pro bioremediaci díky schopnosti organismů degradovat různé environmentální kontaminanty jako ropné sloučeniny nebo polycyklické aromatické uhlovodíky jako fenantren [34; 35]. V průmyslu jsou využívány hlavně právě pro jejich schopnost biosyntézy karotenoidů a mono/polynenasycených mastných kyselin které jsou využívány buď jako barviva (v případě karotenoidů) nebo antioxidační látky (v případě obou). Někteří zástupci tohoto rodu jako například *R. mucilaginosa* a *R. glutinis* mohou působit jako oportunní patogeny vůči člověku, tato schopnost je ale značně limitovaná, jelikož mezi lety 1985 a 2000 bylo zaznamenáno jen 43 nálezů, které navíc byly omezené na lidi s kompromitovanou imunitou nebo se zavedeným centrálním venózním katétre[m] [36; 37]. Některé další příklady zástupců jsou *Rhodotorula kratochvilovae*, *Rhodotorula toruloides* nebo *Rhodotorula taiwanensis*.

2.1.6 Metabolismus Železa, Selenu a Jódu

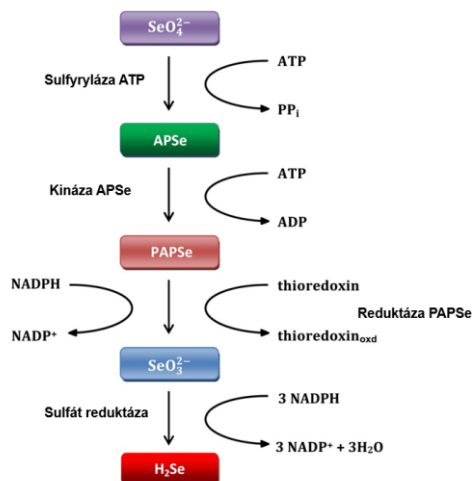
Studie zabývající se metabolismem těchto tří prvků konkrétně u karotenogenních kvasinek a kmene *Rhodotorula* jsou obtížně dohledatelné, existují ale zdroje, které se zabývají touto problematikou u modelové kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Bude se tedy předpokládat, že metabolismus vybraných prvků se mezi kvasinkami příliš výrazně neliší.

2.1.6.1 Železo

Metabolismus železa je ve kvasince *Saccharomyces cerevisiae* regulován třemi hlavními transkripčními faktory: Aft1/Aft2 při nízkých úrovních železa a Yap5 při vysokých úrovních železa. Kolekce zhruba 30 genů které u *S. cerevisiae* participují v železném metabolismu, známých jako „železný regulon“, obsahuje geny, které kódují proteiny zodpovědné za: akvizici železa na buněčné membráně (metaloreduktázy, železné transportéry), intracelulární transport železa, recyklaci železa (hem oxygenáza) a vazbu na mRNA [38]. Všechny tyto geny obsahují ve svém promotoru alespoň jeden železný regulační element, který jsou zmíněné transkripční faktory schopné rozeznat a posléze na něj reagovat [39]. Aft1 reguluje hlavně geny spojené s regulací přísunu a metabolismu železa, zatímco Aft2 ovládá expresi genů spojených primárně s transportem železa napříč buňkou [40; 41; 42]. Hlavní způsob, jak jsou transkripční faktory regulovány, je export dalších faktorů z jádra buňky díky exportnímu receptoru Msn5, který při dostatečných koncentracích železa export podporuje. Při nízkých koncentracích železa se tato dráha stane méně aktivní, což vede k akumulaci Aft1/Aft2 v jádru buňky a zvýšené transkripční aktivitě železného regulonu [43; 44]. Tohle ovšem není jediný mechanismus, kterým je aktivita Aft1/Aft2 regulována, jelikož bylo dokázáno že i v buňkách kde byl receptor Msn5 vyřazen, a Aft1 bylo v jádru buňky hojné, tak byla transkripční aktivita dostatkem železa omezena [45]. Naopak nadměrný přísun železa je regulovaný faktorem Yap5, který při excessu aktivuje čtyři geny, které odlišnými mechanismy snižují obsah volného železa v buňce: CCC1, GRX4, TYW1 a CUP1 [46; 47]. Je důležité zmínit, že všechny tři zmíněné transkripční faktory nejsou primárně aktivovány na základě koncentrací železa v cytosolu, ale na základě úrovně biogeneze železosirných klastrů v mitochondrii [48; 49]. Velká část, ne-li většina železa přijmutá buňkou je využita v mitochondriích k syntéze hemu nebo těchto železosirných klastrů [50]. Klastry se tedy jeví jako efektivnější ukazatel, jelikož samotné železné ionty nemají v buňce funkci. Gen CCC1 kóduje transportér, který převádí ionty železa do vakuoly, gen GRX4 kóduje Grx4 monothiol glutaredoxin, který hraje roli v sekvenci, která nakonec inhibuje faktory Aft1/Aft2, TYW1 kóduje protein, co izoluje železné ionty do železosirných klastrů a podle CUP1 je syntetizován protein vázající měď, což sníží její dostupnost pro Fet3, který jej potřebuje k příjmu železa do buňky [51; 52; 53; 54].

2.1.6.2 Selen

Kvasinky selen sorbují na své buněčné stěně hlavně díky interakcím s negativně nabitými skupinami, které se tam vyskytují, zejména fosfodiester, disulfidickými můstky a mannózovými fosfátovými residui. Při studování obsahu selenu v protoplastech bylo zjištěno, že protoplasty vychytávají zhruba 20 % méně selenu než klasické buňky, což implikuje výraznou roli stěny při sorpci [55]. Také bylo zjištěno, že ze sacharidů přítomných jako součást buněčné stěny má mannan výrazně větší potenciál vázat selen než glukany a chitin [56], čímž pádem selen sorbující na buněčnou stěnu nasorbuje primárně na vnější část buněčné stěny. Kvůli své chemické podobnosti k síře je selen transportován do nitra buňky Sul1 a Sul2 sulfátovými permeázami [57]. Uvnitř buňky je selen (přijatý ve formě selenanu) skrze kaskádu znázorněnou v obrázku níže (Obrázek 2) převeden na H₂Se, ze kterého jsou pak syntetizovány aminokyseliny s obsahem selenu (selenocystein a selenomethionin) [58]. Díky schopnosti H₂Se volně difundovat přes buněčné membrány není pozorována jeho akumulace [59; 60].



Obrázek 2: Metabolická kaskáda selenanu v buňkách kvasinek [61]

2.1.6.3 Jód

Kvasinky mají velmi omezenou schopnost akumulovat jód (<1 %), nedá se předpokládat žádná forma jódového metabolismu [62]. To množství, které je akumulováno je pravděpodobně sorbováno na buněčnou stěnu podobnými mechanismy jako u selenu.

2.2 Výživové referenční hodnoty

Skupina výživových referenčních hodnot je skupina hodnot stanovená Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EÚBP) a skládá se ze šesti hodnot uvedených v tabulce níže.

Tabulka 2: Jednotlivé výživové referenční hodnoty a jejich význam [63]

Výživová referenční hodnota	Anglický překlad a používaná zkratka	Význam hodnoty
Spodní mez příjmu	Lower Threshold Intakes (LTI)	Úroveň příjmu, pod kterou by měla velká většina členů populace nedostatek
Dostatečný příjem	Adequate Intake (AI)	Průměrná úroveň příjmu zdravé populace
Průměrné potřeby	Average Requirements (AR)	Úroveň příjmu dostačující pro polovinu dané populace
Referenční příjem pro populaci	Population Reference Intakes (PRI)	Úroveň příjmu dostatečná pro všechny členy populace
Nejvyšší povolená dávka	Tolerable Upper Intake Level (UL)	Maximální denní úroveň příjmu bez zdravotních rizik
Referenční rozmezí příjmu	Reference Intake (RI)	Rozmezí příjmu jako % denní energie získané z dané makroživiny, které je přiměřené pro udržení zdraví

2.3 Biogenní prvky

Prvky zkoumané v této práci (železo, selen a jód) a biogenní prvky obecně jsou velmi důležité pro každodenní fungování lidského organismu. Nejvíce železa je v organismu spotřebováno na výrobu hemoglobinu, který facilituje transport plynů (kyslík, oxid uhličitý) skrz krevní oběh [64], Hraje také ale významnou roli při transferu elektronů v cytochromech a oxidázových enzimech a jako součást železosírných klastrů v oxidoreduktázách [65]. Oproti železu role selenu není tak rozsáhlá, ale i přesto je nezbytná. Asi nejdůležitější funkcí selenu v organismu je jeho součást jakožto selenocystein v jodothyronin dejodinázách 1 až 3, které hrají významnou roli v ovlivňování metabolismu štítné žlázy. Mimo to také hraje roli v různých antioxidačních proteinech [66]. Jód v těle hraje roli jako součást hormonů štítné žlázy, které jsou obzvláště důležité pro zdravý vývin většiny orgánů při ranném vývoji [67]. EÚBP dosud nestanovil všechny výživové referenční hodnoty pro studované prvky. Pro železo stanovil hodnotu průměrné potřeby a referenčního příjmu pro populaci, pro selen dostatečný příjem a nejvyšší povolenou dávku, a pro jód pouze dostatečný příjem. Hodnoty jsou shrnuty v tabulkách níže (*Tabulka 3, Tabulka 4, Tabulka 5*).

Tabulka 3: Hodnoty průměrné potřeby a referenčního příjmu pro populaci železa stanovené EÚBP [68]

Věk	Průměrná potřeba (mg/den)	Referenční příjem pro populaci (mg/den)
7 až 11 měsíců	8	11
1 rok až 6 let	5	7
7 až 11 let	8	11
12 až 17 let (Muži)	8	11
12 až 17 let (Ženy)	7	13
≥ 18 let (Muži)	6	11
≥ 18 let (Ženy; před menopauzou)	7	16
≥ 18 let (Ženy; po menopauze)	6	11
Při těhotenství	7	16
Při kojení	7	16

Tabulka 4: Hodnoty dostatečného příjmu a nejvyšší povolené dávky selenu stanovené EÚBP [69; 70]

Věk	Dostatečný příjem (µg/den)	Nejvyšší povolená dávka (µg/den)
7 až 11 měsíců	15	55
1 až 3 roky	15	70
4 až 6 let	20	95
7 až 10 let	35	130
11 až 14 let	55	180
15 až 17 let	70	230
≥ 18 let	70	255
Při těhotenství	70	255
Při kojení	85	255

Tabulka 5: Hodnoty dostatečného příjmu jódu stanovené EÚBP [67]

Věk	Dostatečný příjem (µg/den)
7 až 11 měsíců	70
1 až 3 roky	90
4 až 6 let	90
7 až 10 let	90
11 až 14 let	120
15 až 17 let	130
≥ 18 let	150
Při těhotenství	200
Při kojení	200

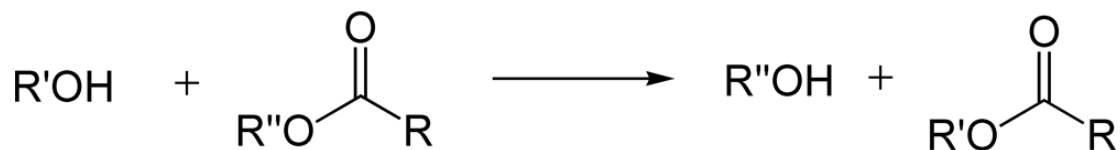
2.4 Analýzy

Hlavní látky obsažené v biomase, u kterých nás v kontextu této práce zajímá obsah jsou mastné kyseliny (SFA, MUFA, PUFA), karotenoidy a ionty přidaných prvků. Po ukončení kultivace byl tedy lyofilizát biomasy analyzován třemi metodami: metodou HPLC-DAD pro určení obsahu karotenoidů, metodou GC-FID pro analýzu obsahu mastných kyselin s rozdělením na SFA, MUFA a PUFA a metodou ICP-OES pro určení množství nasorbovaných nebo jinak navázaných prvků.

2.4.1 Transesterifikace

Využití transesterifikační reakce je stěžejní pro analýzu mastných kyselin pomocí GC-FID. Reakce za kyselé či zásadité katalýzy vymění na mastné kyselině esterově vázanou skupinu za skupinu alkoholu, který v reakci participoval. Typicky se využívá methanol, tedy esterově vázaný lipidový zbytek nahradí esterově vázaný methyl. Tyto estery se nazývají FAME (Fatty Acid Methyl Esters) a jejich snížená míra intermolekulárních interakcí a molekulová hmotnost

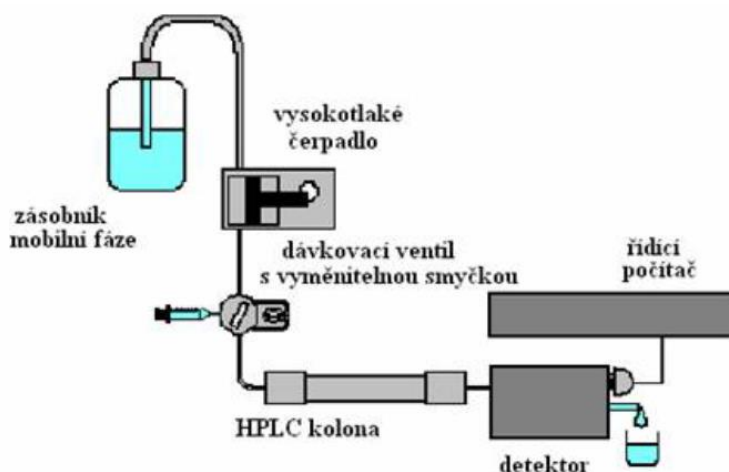
jim výrazně snižují bod varu čímž umožňují jejich analýzu pomocí metody GC–FID [71; 72]. Reakční schéma viz níže (Obrázek 3).



Obrázek 3: Schéma transesterifikace

2.4.2 HPLC-DAD

Chromatografie je metoda založená na rozdílné afinitě analytů ke stacionární fázi při průchodu mobilní fází skrze kolonu, která stacionární fázi obsahuje. Tento rozdíl afinit způsobí, že se v prostoru kolony látky rozdělí a posléze projdou přes detektor v pořadí od látky s nejmenší do látky s největší afinitou. Při HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector) je analytický přístroj, ve kterém je analyzovaný roztok vhnán do kolony pod zvýšeným tlakem, a jako detektor je vybrán detektor diodového pole, který díky většímu množství diod může snímat široké spektrum vlnových délek v jeden moment, a tudíž vytvořit závislost absorbance na čase pro všechny vybrané vlnové délky zároveň [73; 74]. Na základě plochy peaku, závislosti absorbance na čase se určí množství látky a na základě času kdy byl peak detekován se identifikuje charakter látky. Pro analýzu látek jako jsou karotenoidy je vhodnější použít reverzní fáze, tedy nepolární fázi stacionární a polární fázi mobilní [75]. Schéma lze vidět na Obrázek 4 níže.



Obrázek 4: Schéma HPLC [76]

2.4.3 GC-FID

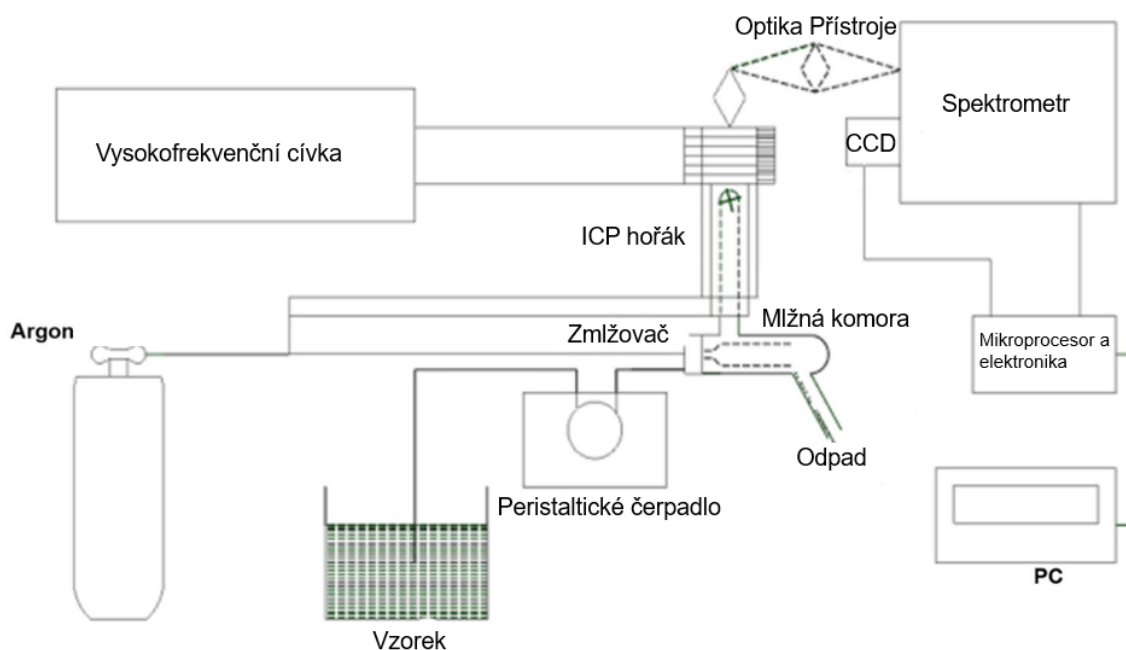
Metoda GC–FID funguje na podobných principech jako HPLC-DAD, ale s pár klíčovými rozdíly. Jelikož se jedná o plynovou chromatografii, tak jsou mobilní fáze i analyt plynné. To vznáší jisté limitace na charakter vzorku, zejména že musí být při používaných podmínkách ionizovatelný a dostatečně stabilní, aby nefragmentoval. Tyto limitace jsou důvodem pro transesterifikaci mastných kyselin na methylestery mastných kyselin, jak je zmíněno výše. Metodavyužívá detektor FID (Flame Ionization Detector), který detekuje rozdíl vodivosti mezi dvěma elektrodami způsoben přítomností iontů vytvořených spálením vzorku ve vodíkovém plameni [77]. Síla signálu se tedy odvíjí od vodivosti, ne absorbance jako u HPLC-DAD.

2.4.4 IC (IEX)

Iontová chromatografie také funguje na podobných principech jako HPLC-DAD a GC-FID, ale s tím rozdílem, že se ionty separují na základě své afinity k výměníku iontů [78]. Mobilní fáze je zpravidla polární vodný roztok. Lze použít pro skoro jakoukoliv molekulu s nábojem, od malých anorganických iontů, jako je měřený jód, až po aminokyseliny a proteiny [79; 80]. V této práci byl pro detekci použit konduktometrický detektor.

2.4.5 ICP-OES

Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) je jedna z nejspolehlivějších metod pro kvalitativní a kvantitativní určení obsahu prvků ve vzorku. Funguje na základě excitace elektronů prvků obsažených ve vzorku proudem plazmatu, po čemž následná deexcitace způsobí emisi elektromagnetického záření specifické pro jednotlivé prvky. Do proudu plazmatu, který má typicky teplotu 6000 až 10000 K, je vzorek vnášen peristaltickým čerpadlem [81]. Emitované elektromagnetické záření je poté rozděleno na jednotlivé vlnové délky pomocí difrakční mřížky a detekováno fotomultiplikátory nebo polovodičovými detektory. Z intenzity spektrálních linií se dají odvodit koncentrace zkoumaných prvků. Technikou lze velmi rychle analyzovat velké množství prvků najednou a detekční limity se pohybují v řádu jednotek až stovek ng/ml [82]. Schéma přístroje viz. níže (Obrázek 5).



Obrázek 5: Schéma ICP-OES [83]

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo studium vlivu příměsí vybraných mikrobiogenních prvků na růst kvasinek v médiu a míra jejich sorpce do biomasy. Tento vliv byl vyhodnocován skrze vyhodnocení efektu na koncentraci biomasy, produkci karotenoidů, ubichinonu, ergosterolu a mastných kyselin. Zadání práce bylo rozdělené na následující body:

- Přehledná literární rešerše zaměřená na utilizaci mikrobiogenních prvků karotenogenními kvasinkami.
- Kultivace a příprava obohacené biomasy kvasinek.
- Analýza a charakterizace biomasy, stanovení antioxidační aktivity.
- Vyhodnocení výsledků

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Pomůcky a přístroje

4.1.1 Pomůcky a přístroje pro kultivaci kvasinek

Předvážky Scout, Ohaus

Analytické váhy Pioneer, Ohaus ($\pm 0,0001$ g)

Mikroskop L II ooA, Intraco Micro

Třepačka WiseShake SHR-2D, Witeg

Zrcadlovka Nikon

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

Lyofilizátor Labconco FreeZone 4.5 Freeze Dryer (USA)

Centrifuga pro 15 ml vialky, Hermle (SRN)

Centrifuga pro 50 ml vialky, Hermle (SRN)

4.1.2 Pomůcky a přístroje pro extrakce a HPLC/GC analýzu

Termoblok VWR, (ČR)

Dusíková odpařovací souprava

PTFE filtry $\varnothing 0,45$ μm , Clarify

HPLC sestava (Thermo Fisher Scientific, USA)

- Dionex Ultimate Series 3000 Pump
- Dionex Ultimate Series 3000 Autosampler
- Kolona Kinetex EVO c18 150x4.6x2.6
- Thermo Fisher Vanquish detector

TRACE GC/FID (Thermo Fisher Scientific, USA)

- Kapilární kolona Zebron ZB-FAME, délka 30 m

Vyhodnocovací program Chromeleon

4.1.3 Pomůcky a přístroje pro ICP-OES analýzu

PTFE patrony

Mikrovlákná rozkladná jednotka Mega 1200 (Milestone, Itálie)

Horiba Jobin Yvonne Ultima 2 (HORIBA, Japonsko)

ICP-MS 7500CE s automatickým dávkovačem vzorků (Agilent, USA)

4.1.4 Pomůcky a přístroje pro IC analýzu

Metrohm Professional IC 850 (Metrohm, Švýcarsko)

Metrosep ASupp7 250/4 mm (Metrohm, Švýcarsko)

4.2 Použité chemikálie a kultivované kmeny kvasinek

4.2.1 Chemikálie použity pro kultivaci kvasinek

Kvasničný autolyzát, Himedia (Indie)

Pepton aus Casein, Carl Roth (SRN)

Glycerol bezvodý p.a., Penta (ČR)

Dusičnan sodný p.a., Penta (ČR)

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Penta (ČR)

Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Penta (ČR)

4.2.2 Chemikálie použité pro extrakce a GC analýzu

Hexan p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)

Hexan pro HPLC, Sigma - Aldrich (SRN)

Methanol pro HPLC, Sigma - Aldrich (SRN)

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

Hydroxid sodný, Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Dusík 5.0 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

Dusík 4.0 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

Vodík 5.50 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

Vzduch 5.0 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

4.2.3 Chemikálie použité pro extrakce a HPLC analýzu

Methanol pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)

Chloroform pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)

Acetonitril pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)

Ethyl acetát pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)

Tris base, Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Kyselina chlorovodíková (36 %), Lach-ner, S.r.o. (ČR)

4.2.4 Chemikálie použité pro sorpční experiment

Fumarát železnatý, Thermo Fisher Scientific (USA)

Oxid zinečnatý, Penta (ČR)

Selenomethionin, Thermo Fisher Scientific (USA)

4.2.5 Chemikálie použité pro ICP-OES analýzu

Peroxid vodíku 30%, Analytika Praha spol. s.r.o., (ČR)

Kyselina dusičná 67%, p.a., Analytika Praha spol. s.r.o., (ČR)

Argon

4.2.6 Chemikálie použité pro IC analýzu

Amoniak 20%, Carl Roth (SRN)

4.2.7 Kultivované kmeny karotenogenních kvasinek

Rhodotorula toruloides CCY 062-002-004 (Kmen 43)

Rhodotorula kratochvilovae CCY 20-2-33 (Kmen 39)

Rhodotorula mucilaginosa CCY-20-9-7 (Kmen 24)

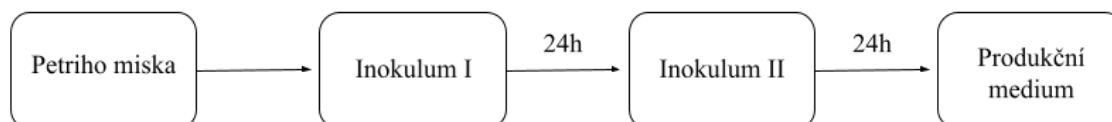
4.3 Kultivace kvasinek

4.3.1 Převedení na petriho misku

Karotenogenní kvasinky byly uloženy v kryovialkách při teplotě -82 °C s obsahem směsi YPD média a glycerolu v poměru 1:1. Za účelem následné kultivace byly kvasinky z kryovialky přeneseny na Petriho misku s YPD médiem a nechány růst po dobu 96 hodin.

4.3.2 Inokulum I a II

Inokula byla připravena následujícím způsobem: Media byla namíchána do standardních erlenmayerových baněk (složení medií viz. *Tabulka 6*), hrdla baněk byla uzavřena buničtinovou zátkou a po obalení zátky alobalem vysterilována v tlakovém hrnci při 120-140 °C po dobu 40 minut. Po ochlazení media na pokojovou teplotu bylo medium ve sterilním boxu očkováno přímo z Petriho misky v případě inokula I, nebo v případě inokula II z předem kultivovaného inokula I. Poměry očkovaného materiálu k objemu čistého média lze vidět rovněž v *Tabulka 6*. Po zaočkování bylo médium umístěno na reciprokou třepačku při 100 ot./min po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách kultivace inokula II bylo z tohoto inokula očkováno produkční medium. Pro stručnost se lze odkázat na schéma kultivace (*Obrázek 6*). Všechna media byla kultivována při pokojové teplotě.



Obrázek 6: Schéma kultivace inokul

Tabulka 6: Složení, objem, poměr očkovaného materiálu ku objemu inokul a jejich kultivační čas

Inokulum	Inokulum 1	Inokulum 2
Pepton [g/l H ₂ O]	20	20
Kvasničný Autolyzát [g/l H ₂ O]	10	10
Glycerol [g/l H ₂ O]	20	20
Objem erl. baňky [ml]	250	500
Objem inokula [ml]	50	100
Poměr očkovaného materiálu : objem media	1 klička/10 ml	2 ml/10ml
Kultivační čas [h]	24	24

4.3.3 Produkční médium

Po naočkování byla produkčního media obdobně jako u inokul I a II kultivovány na reciprokých třepačkách při 100 ot./min, avšak po dobu 120 hodin (složení medií viz. *Tabulka 7*). Mimo složení byl postup přípravy produkčních medií shodný s přípravou inokul I a II. Poměr očkovaného materiálu ku objemu čistého media byl 1:5. U kultivací kmenů *Rhodotorula mucilaginosa* a *Rhodotorula kratochvilovae* byly prováděny odběry po 72 a 96 hodinách a u kmenu *Rhodotorula toruloides* po 48, 72 a 96 hodinách. Odběry měly zpravidla objem 10 ml a byly ukládány do 15 ml uzavíratelných plastových zkumavek. Po 120 hodinách kultivace byly média sterilně slity do 50 ml uzavíratelných plastových zkumavek, zcentrifugovány při 8000 ot./min po dobu 3 minut, promyty destilovanou vodou, znovu zcentrifugovány při stejném nastavení a nakonec zamraženy pro pozdější lyofilizaci. U odběrů se postupovalo obdobně kromě nižších otáček při centrifugaci, zhruba 4500 ot./min. Do medií byly také přidány příměsi mikrobiogenních prvků dle tabulek (*Tabulka 8* a *Tabulka 9*) viz. níže. Pro kmen *Rhodotorula toruloides* byly kultivace prováděny v duplikátu.

Tabulka 7: Složení produkčních medií před přidáním mikrobiogenních prvků

Složka	MgSO ₄ ·7H ₂ O	NaNO ₃	KH ₂ PO ₄	Glycerol	Objem media [ml]
Množství [g/l H ₂ O]	0,696	5,1238	4	46,2565	50

*Tabulka 8: Přehled příměsí do produkčních medií kmene *Rhodotorula mucilaginosa**

Číslo vzorku	Prvek	Formy prvků (přidané sloučeniny)	Koncentrace [mmol/l]
1	Kontrola	-	-
2	Fe	FeCl ₃	5
3			10
4	Se	Na ₂ SeO ₄	5
5			10

Tabulka 9: Přehled příměsí do produkčních medií kmene *Rhodotorula toruloides* (kultivováno v duplikátu) a *Rhodotorula kratochvilovae*

Číslo vzorku	Prvek	Formy prvků (přidané sloučeniny)	Koncentrace [mmol/l]
1	Kontrola	-	-
2	Fe	FeCl ₃	5
3			10
4	Se	Na ₂ SeO ₄	5
5			10
6	I	NaI	1
7		KI	1
8	Fe + Se + I	FeCl ₃ + Na ₂ SeO ₄ + NaI	5:5:1
9		FeCl ₃ + Na ₂ SeO ₄ + KI	5:5:1
10	Fe + Se	FeCl ₃ + Na ₂ SeO ₄	5:5

4.3.4 Mikroskopická kontrola biomasy

Průběžná mikroskopická kontrola byla prováděna vždy při očkování kultury a dále v pravidelných intervalech během růstu produkčního média. Sterilní vzorek byl odebrán a aplikován na podložní sklíčko. Poté byl vzorek přikryt krycím sklíčkem a přebytečná tekutina absorbována buničitou vatou. Tento zpracovaný vzorek byl vložen do mikroskopu a sledován při 100násobném zvětšení za použití imerzního oleje.

4.4 Extrakce a analýza na HPLC

Extrakce a pozdější analýza probíhaly následovně: Nejprve bylo naváženo 15 až 20 mg lyofilizované biomasy do extrakčních Eppendorfových zkumavek. Poté byl k biomase přidán 1 ml destilované vody a v temném místě se nechala biomasa 30 minut rehydratovat. Následovně byla biomasa od nadbytečné vody centrifugací, při 12000 ot./min po dobu tří minut, oddělena. K takto zpracované biomase bylo přidáno 0,5 ml skleněných kuliček a 1 ml HPLC metanolu, po čemž byla biomasa 10 minut homogenizována pomocí vortexu. Zhomogenizovaná biomasa byla poté smíchána s 2 ml chloroformu p.a., 1 ml destilované H₂O a po mírném protřepání a ustálení obou fází byla chloroformová fáze oddělena a odpařena pod dusíkovou atmosférou. Zbýlý odparek byl rozpuštěn v 1 ml 1:2 směsi EtAc a ACN, přefiltrován přes PTFE filtr s velikostí pórů 0,45 μm a uchován při -20 °C pro HPLC analýzu. HPLC analýza byla provedena na přístroji Dionex UltiMate 3000 serie s PDA detektorem Vanquish. Vzorky byly separovány na koloně Kinetex C18 EVO 150 mm x 4,6 mm x 5 μm s využitím gradientové eluce uvedené v tabulce níže (Tabulka 10). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1,2 ml/min za laboratorní teploty s mobilními fázemi: Mobilní fáze A: ACN:MeOH:TrisHCl 84:2:14 a Mobilní fáze B: EtAc:MeOH 40:60.

Tabulka 10: Schéma gradientové eluce při HPLC analýze

Retenční čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0,0	100	0
13,0	0	100
19,0	0	100
20,0	100	0
25,0	100	0

4.5 Extrakce a analýza na GC

Pro analýzu pomocí přístroje GC-FID bylo naváženo 10 až 15 mg lyofilizované biomasy do kryptovialky o objemu 2 ml, po čemž byla vialka doplněna 1,8 ml transesterifikační směsí (15 % H₂SO₄, metanol, 500 mg/l interního standardu kyseliny heptadekanové). Vialka byla uzavřena hliníkovým víčkem a ponechána v termobloku nastaveném na teplotu 85 °C po dobu 120 minut. Po ochlazení byl obsah vialky přelit do šroubovací vialky o objemu 5 ml, smíchan s 0,5 ml 0,05 M NaOH a 1 ml GC hexanu a intenzivně protřepáván na vortexu po dobu 10 minut. Po ukončení protřepávání a rozdělení fází bylo přeneseno 100 µl hexanové fáze a 900 µl čistého GC hexanu do šroubovací vialky. Takto připravený vzorek byl analyzován na plynovém chromatografu s plamenově ionizačním detektorem na přístroji GC-FID Trace 1300 TM s autosamplerem na koloně Zebron GC FAME 30 m 0,25 mm a 0,2 µm za použití vodíku jako nosného plynu o průtoku 0,5 ml/min. Teplotní program lze vidět níže (Tabulka 11). Při vyhodnocení byla použita metoda interního standardu a jednotlivé MK byly identifikovány pomocí standardu Supelco FAME 37 mix. Výsledky byly poté vyhodnoceny za využití programu Chromeleon 7.2 a MS Excel.

Tabulka 11: Teplotní program pro GC-FID analýzu mastných kyselin

Retenční čas [min]	Gradient [°C/min]	Teplota [°C]	Zadržetí [min]
0,000	Start	-	-
1,000	0,0	80,0	1,0
5,000	15,0	140,0	0,0
21,667	3,0	190,0	0,0
25,667	25,0	260,0	1,0
25,467	Stop	-	-

4.6 Sorpční experiment

V sorpčním experimentu byla analyzována sorpce vybraných prvků dle schématu (Tabulka 12) na čerstvě vykultivovanou biomasu. Kultura *Rhodotorula toruloides* byla kultivována obdobným postupem jako ostatní kultury (Obrázek 6, objem produkčních medií dvakrát 50 ml), bez účelné příměsi prvků. Po 120 hodinách kultivace byla biomasa zcentrifugována při 8000 ot./min po dobu 3 minut, byl odlit supernatant a čerstvá biomasa byla smíšena s vodnými roztoky solí prvků. Tyto roztoky byly připraveny rozpuštěním hmotností solí prvků dle Tabulka 12 v 1 ml vody v eppendorfových plastových zkumavkách. Pro efektivnější rozpuštění a úpravu pH bylo k těmto roztokům přidáno 0,5 ml 0,05 M NaOH. Sorpce byly rozděleny do dvou stejných setů: u jednoho setu byla sorpce ukončena po 2 a u druhého po 24 hodinách.

Po uplynutí času sorpce bylo z každého vzorku odebráno 10 μ l suspenze biomasy pro prozkoumání pod mikroskopem. Pro ukončení sorpce byla biomasa vždy zcentrifugována při 8000 ot./min po dobu 3 minut, promyta destilovanou vodou, znovu zcentrifugována za stejného nastavení a poté lyofilizována.

Tabulka 12: Schéma kultivace jednoho setu sorpčního experimentu

Forma přidaného prvku	Hmotnost přídavku [mg]	Hmotnost biomasy v mokřém stavu [mg]	Hmotnost biomasy v suchém stavu [mg]
Kontrola (žádný přídavek)	0	325	50
Oxid zinečnatý	1	325	50
	2	325	50
Fumarát železnatý	1	325	50
	2	325	50
Selenomethionin	0,1	3250	500

4.7 Prvková analýza (ICP)

4.7.1 ICP-OES

Konečný obsah Fe, Se, a Zn v biomase byl analyzován metodou ICP-OES. Pro analýzu byly vzorky zpracovány následovně: Zhruba 50 mg (hmotnost s nejistotou $\pm 0,0001$ g byla zapsána) lyofilizované biomasy bylo naváženo do PTFE patron a smícháno s 5 ml 67% kyseliny dusičné a 2 ml 30% peroxidu vodíku. Tyto patrony byly pak vloženy do uzavíratelných nádob s bezpečnostním ventilem, vloženy do mikrovlnné rozkladné jednotky a rozloženy dle programu (Tabulka 13). Po vychladnutí byly vzorky naředěny na 25 ml v odměrných baňkách, důkladně promíchány a odlity do uzavíratelných plastových zkumavek. Do doby měření byly zkumavky uchovávány při -30 °C. Jako zdroj plazmy byl využíván Argon. Při měření byl zvolen výkon radiofrekvenčního generátoru 1300 W, průtok plazmového plynu 12 l/min a průtok stínícího plynu 0,28 l/min. Tlak na zmlžovači byl 3 bar (300000 Pa) a průtok zmlžovacího plynu byl 0,8 l/min. Vlnové délky od kterých byly odvozeny koncentrace prvků jsou znázorněny níže (Tabulka 14).

Tabulka 13: Program při rozkladu vzorků mikrovlnnou rozkladnou jednotkou

Uplynulý čas při rozkladu [min]	0	2	4	10	15	20	25
Výkon [W]	250	0	250	400	600	0 (ventilace)	Konec

Tabulka 14: Vlnové délky použité pro měření koncentrace daných prvků

Prvek	Vlnová délka (nm)
Fe	259,940
Se	203,985
Zn	206,191

4.7.2 IC (IEX)

1 ml vzorku supernatantu vzorků s příměsí jódu byl smíchán s 2,5 ml roztoku NH_3 o koncentraci 0,5 obj.% a poté byl vzorek měřen. Jako mobilní fáze byl použit 3,6 mM roztok Na_2CO_3 o průtoku 0,7 ml/min. Jako supresní roztok byla použita 0,1 M H_2SO_4 . Teplota měření vzorku byla 45 °C a objem nástřiku 20 μl .

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Výtěžek biomasy

Na první pohled lze na základě dat v *Tabulka 15* usoudit že za kultivace v daných mediích největší produkci biomasy vykazuje kvasinka *Rhodotorula toruloides*. Tato zvýšená výtěžnost do značné míry kompenzuje sníženou koncentraci některých cenných produktů, primárně nasycených mastných kyselin, kterou lze pozorovat u analýz níže.

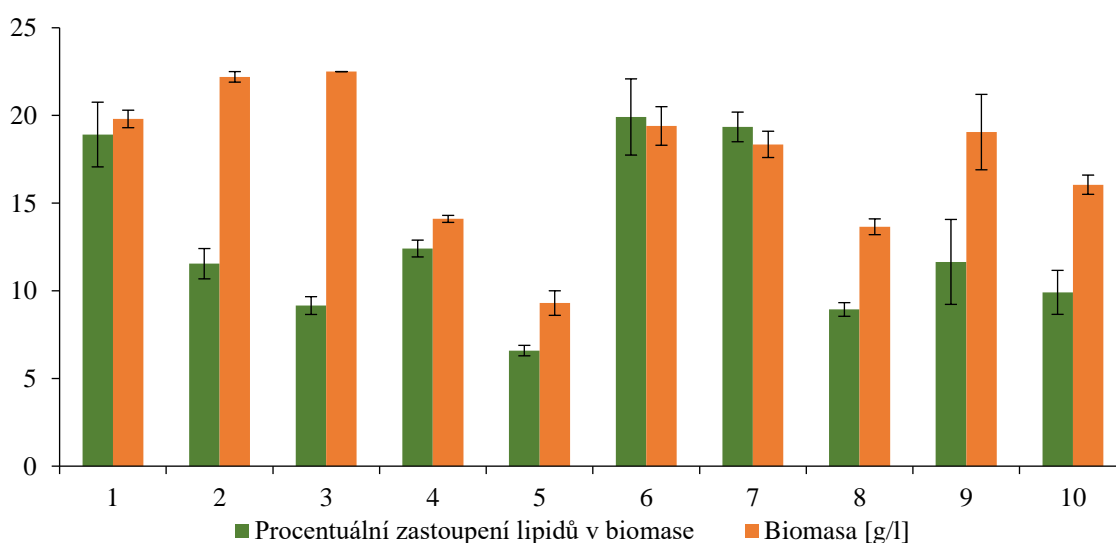
Tabulka 15: Výtěžek biomasy po 120 hodinách kultivace (číslování vzorků viz. Tabulka 9)

Číslo vzorku	<i>R. mucilaginosa</i> [g/l]	<i>R. kratochvilovae</i> [g/l]	<i>R. toruloides</i> [g/l]
1	12,0	15,0	19,8
2	10,1	14,3	22,2
3	10,2	14,0	22,5
4	9,2	10,0	14,1
5	8,8	7,0	9,3
6	-	13,7	19,4
7	-	13,9	18,4
8	-	10,1	13,7
9	-	10,3	19,0
10	-	8,6	16,0

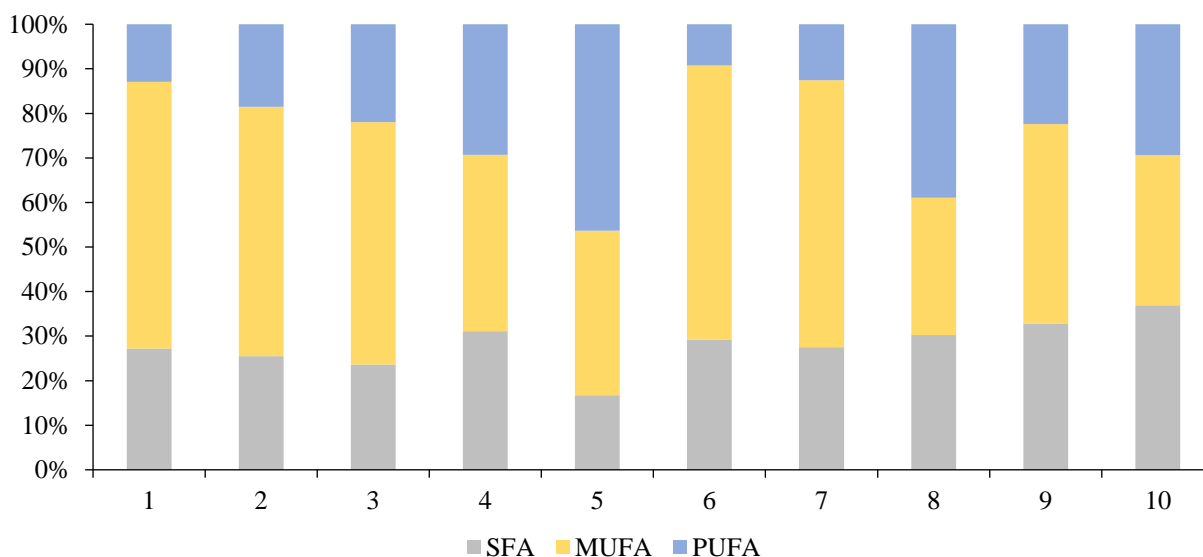
5.2 Analýza obsahu mastných kyselin pomocí GC-FID

5.2.1 Kmen *Rhodotorula toruloides*

5.2.1.1 Obsah mastných kyselin a rozdělení podle nasycenosti po ukončení kultivace (120 h)



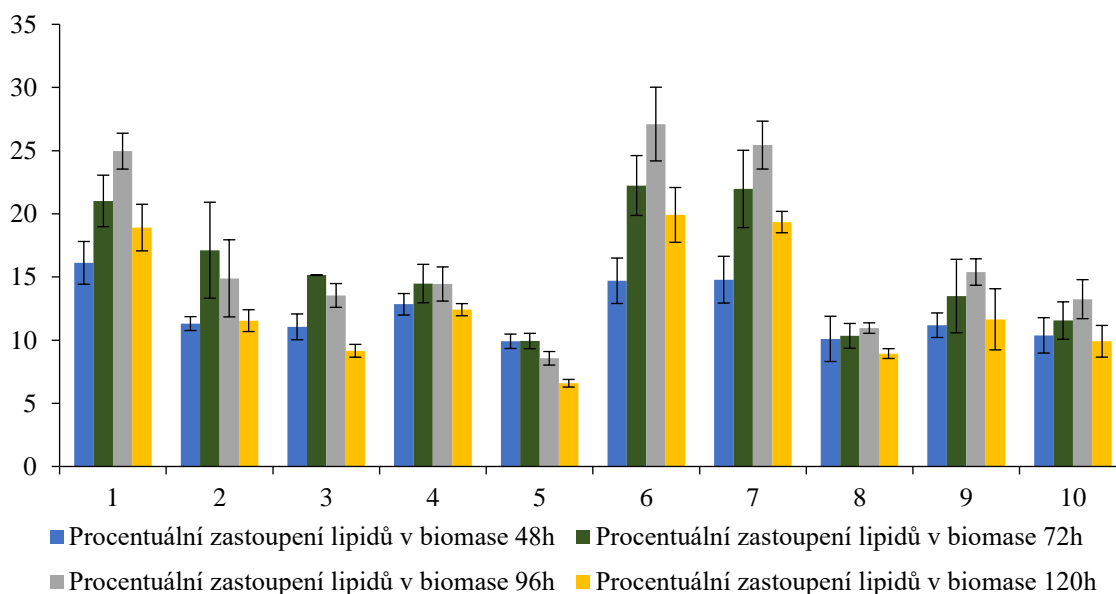
*Graf 1: Procentuální zastoupení lipidů v biomase a koncentrace biomasy pro *R. toruloides* po 120 hodinách kultivace (číslování vzorků viz. Tabulka 9)*



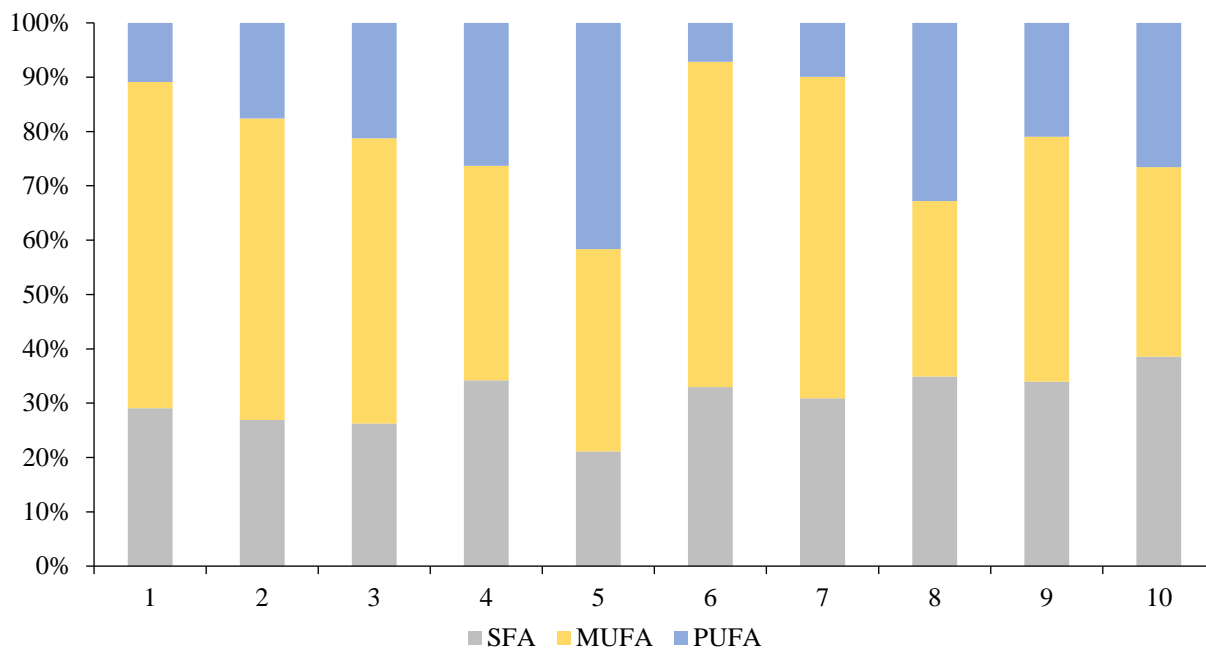
Graf 2: Obsah nasycených (SFA) mononenasycených (MUFA) a polynenasycených (PUFA) mastných kyselin ve vzorcích kultivací *R. toruloides* po 120 hodinách kultivace (číslování vzorků viz. Tabulka 9)

Z grafů (Graf 1, Graf 2) vyplývá, že mimo vzorky 6 a 7 příměsi prvků celkem výrazně zvyšují podíl polynenasycených mastných kyselin ve vzorku, zatímco koncentrace biomasy, mimo vzorky 4, 5 a 8, zůstává na srovnatelné hladině. Právě u těchto vzorků je efekt nejvýraznější, což naznačuje že koncentrace dané příměsi, kterou je v případě vzorků 4 a 5 selen, je příliš vysoká pro optimální výtěžnost a skrze silný oxidační stres jí způsobený, v důsledku kterého jsou buňky nuceny produkovat takto zvýšenou proporcí silněji antioxidačních mastných kyselin, inhibuje proliferaci kvasinek v mediu. U vzorku 8 je pravděpodobnější jiná příčina nárůstu proporce polynenasycených kyselin, jelikož nárůst není pozorován u vzorku 9, který má mimo záměny příměsi NaI za KI totožné složení. Není tedy nevhodné uvažovat nad tím, že zmíněný rozdíl je způsoben právě nějakou vlastností zaměněného jodidu.

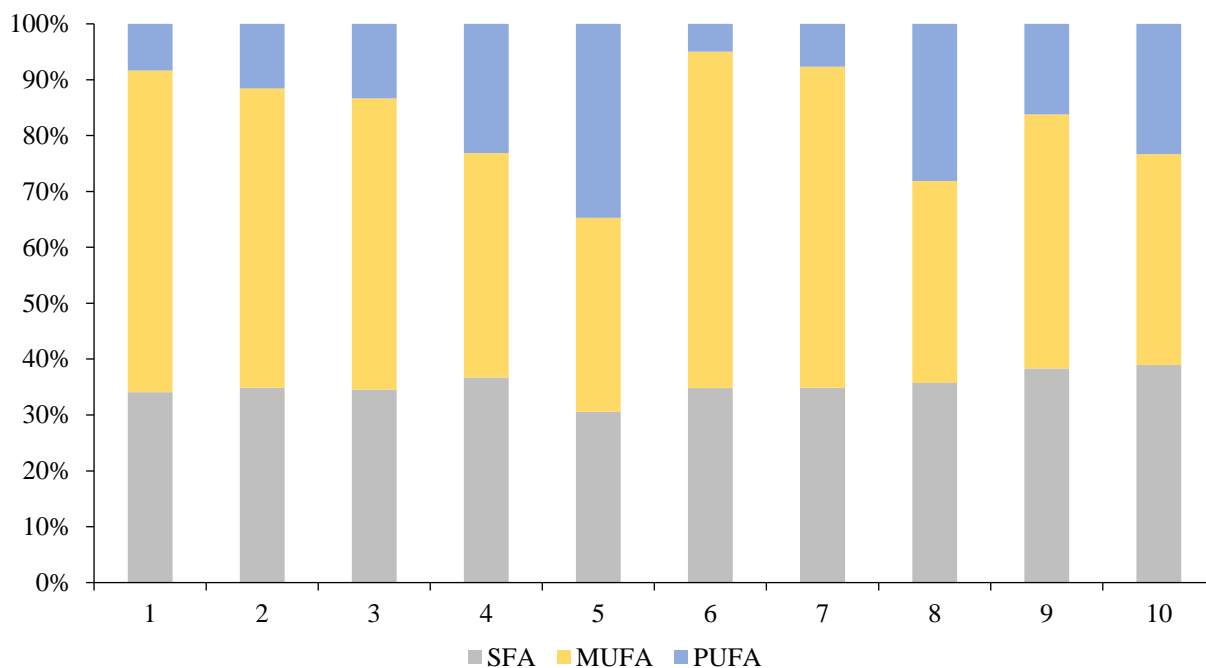
5.2.1.2 Obsah mastných kyselin a rozdělení podle nasycenosti v průběhu kultivace



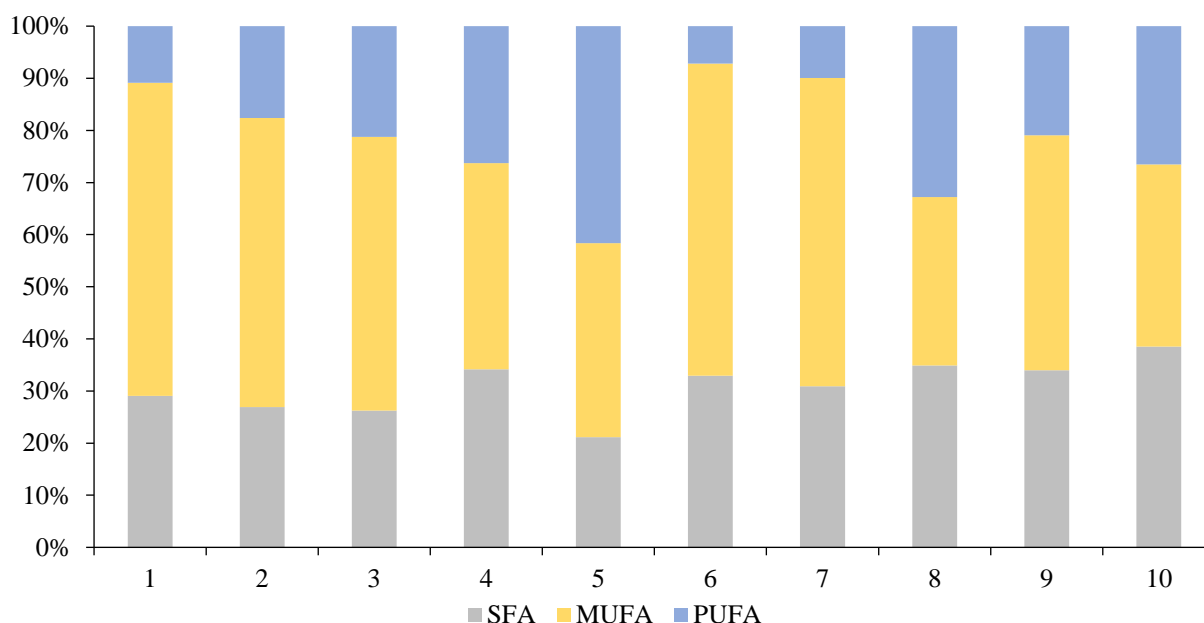
Graf 3: Procentuální zastoupení lipidů v biomase pro *R. toruloides* po 48, 72, 96 a 120 hodinách kultivace (číslování vzorků viz. Tabulka 9)



Graf 4: Obsah nasycených (SFA) mononenasycených (MUFA) a polynenasycených (PUFA) mastných kyselin ve vzorcích kultivací *R. toruloides* po 48 hodinách kultivace (číslování vzorků viz. Tabulka 9)

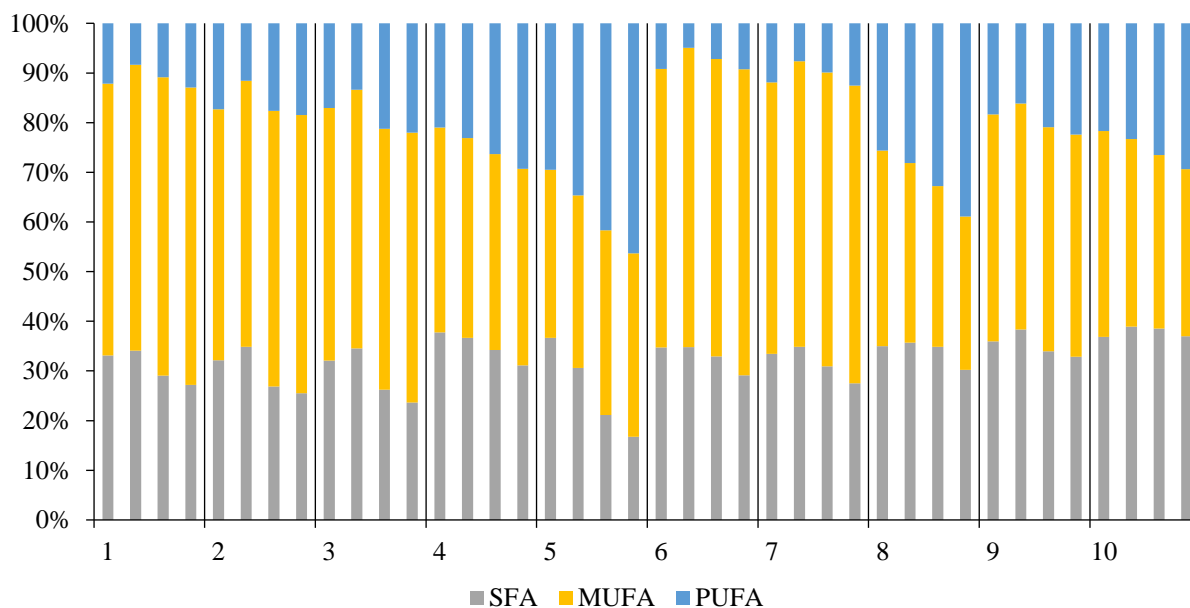


Graf 5: Obsah nasycených (SFA) mononenasycených (MUFA) a polynenasycených (PUFA) mastných kyselin ve vzorcích kultivací *R. toruloides* po 72 hodinách kultivace (číslování vzorků viz. Tabulka 9)



*Graf 6: Obsah nasycených (SFA) mononenasycených (MUFA) a polynenasycených (PUFA) mastných kyselin ve vzorcích kultivací *R. toruloides* po 96 hodinách kultivace (číslování vzorků viz. Tabulka 9)*

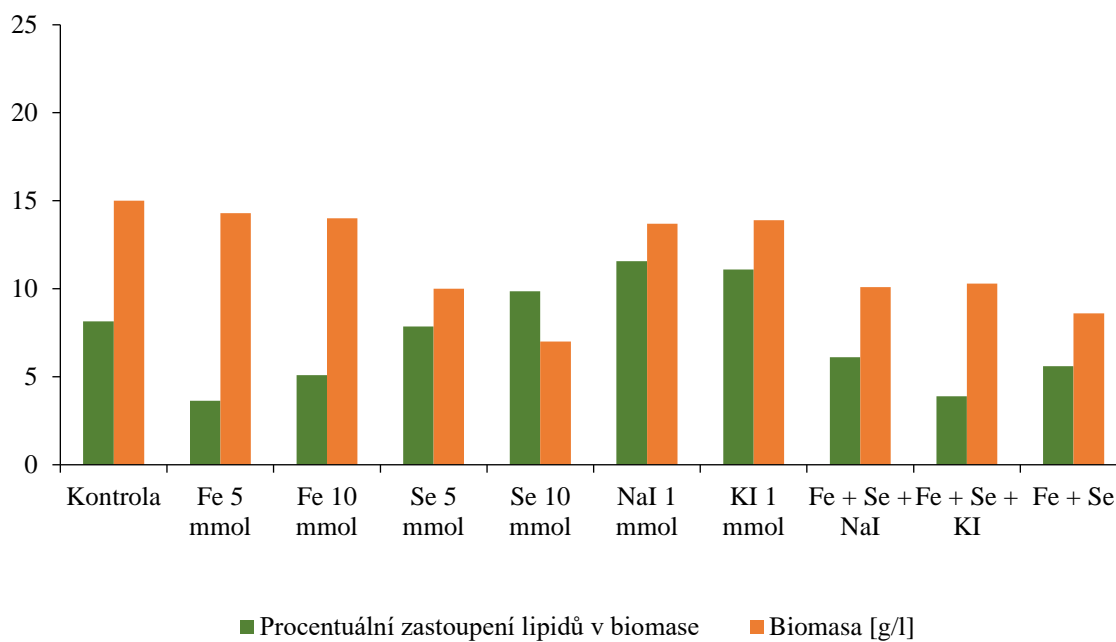
V 96. hodině kultivace lze pozorovat mírně zvýšené zastoupení nenasycených mastných kyselin napříč všemi vzorky kromě vzorku 3, což je pravděpodobně způsobeno dosud neuskutečněnou konverzí na více nasycené formy. Tento trend pokračuje u většiny vzorků do 72. hodiny kultivace, kde je většinou nejvyšší zlomek nenasycených mastných kyselin s mírným poklesem ve 48. hodině. Poměry mezi vzorky v daných časech odběru se příliš nemění. Při pozorování průběhu procentuálního zastoupení lipidů v čase v *Graf 3* je zřejmé, že zastoupení dosáhne maxima po 96. hodině, popř. u vzorků 3, 4 a 5 (byť nepatrně a v rámci nejistoty) po 72 hodinách od začátku kultivace. To ovšem stojí v kontrastu se zastoupením nenasycených mastných kyselin (*Graf 7*), které vrcholí až ve 120. hodině kultivace. Naneštěstí u jednotlivých odběrů v daném čase nebyla určována celková koncentrace biomasy a nelze tedy jednoznačně určit, zda by nejvyšší výtěžnost daných látek byla po 96 nebo 120 hodinách, ačkoliv kdyby byl primární cíl maximalizovat koncentraci nenasycených mastných kyselin a jejich celkový výtěžek by neměl takovou prioritu, tak mimo vzorky 3, 4 a 5, kde koncentrace peakuje po 72 hodinách je 96hodinová kultivace nejvhodnější pro výnosnost nenasycených mastných kyselin.



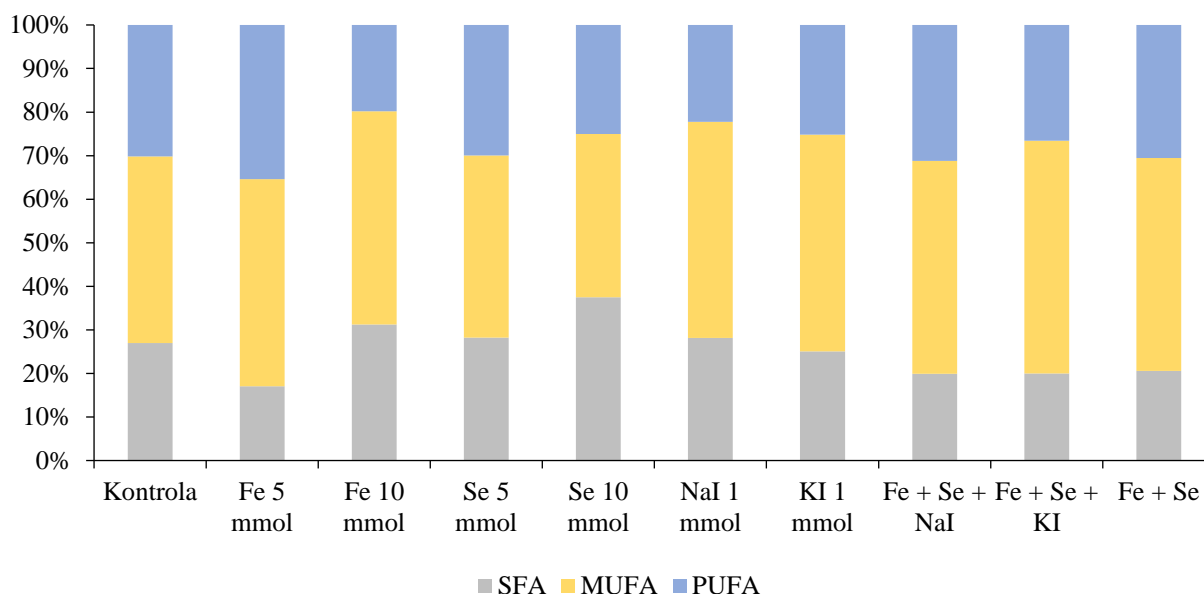
Graf 7: Obsah nasycených (SFA) mononenasycených (MUFA) a polynenasycených (PUFA) mastných kyselin ve vzorcích po 48, 72, 96 a 120 hodinách kultivace (číslování vzorků viz. Tabulka 9)

5.2.2 Kmen *Rhodotorula kratochvilovae*

5.2.2.1 Obsah mastných kyselin a rozdělení podle nasycenosti po ukončení kultivace (120 h)



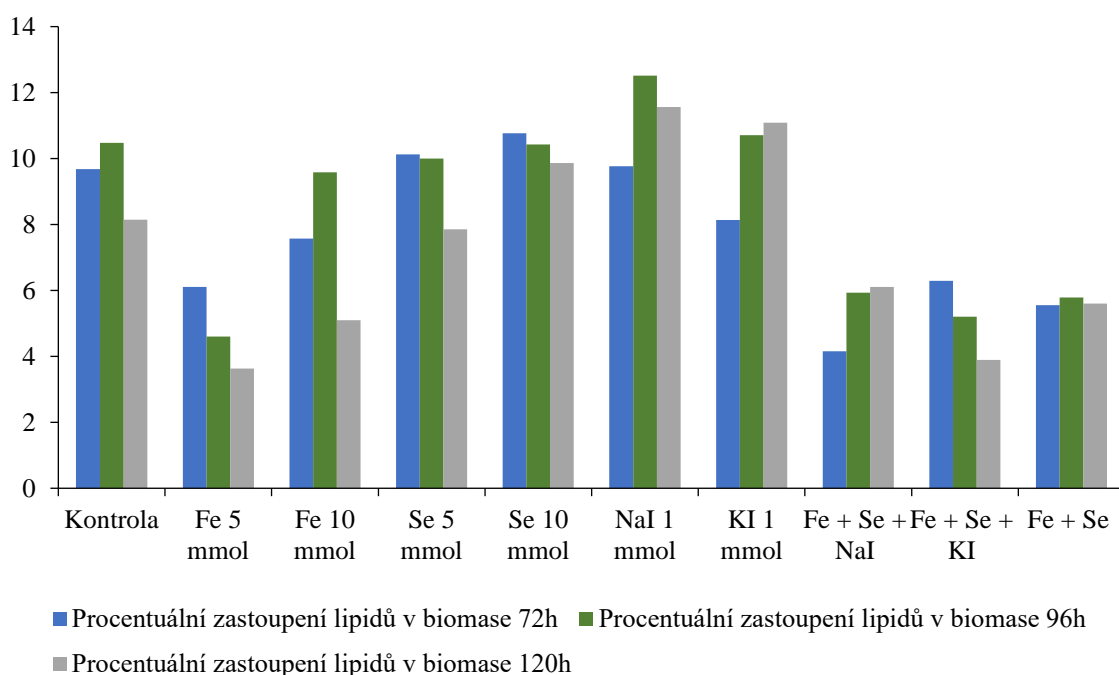
Graf 8: Procentuální zastoupení lipidů v biomase a koncentrace biomasy pro *R. kratochvilovae* po 120 hodinách kultivace



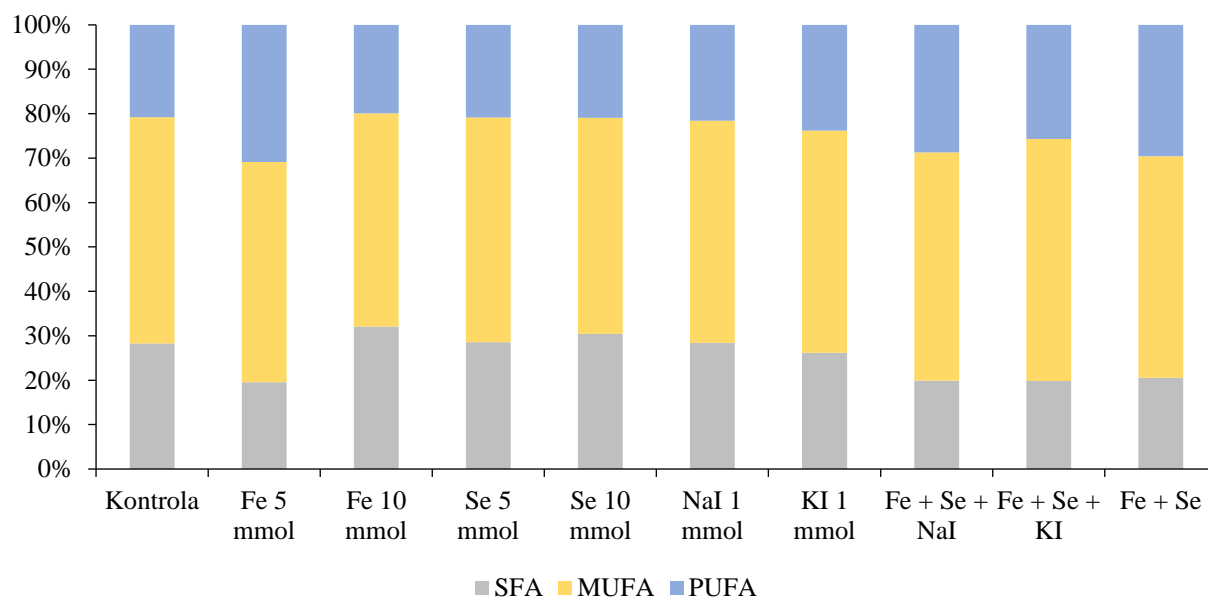
Graf 9: Obsah nasycených (SFA) mononenasycených (MUFA) a polynenasycených (PUFA) mastných kyselin ve vzorcích po 120 hodinách kultivace

Na první pohled je zřejmé že *R. kratochvilovae* má menší výnosnost z hlediska hmotnosti biomasy a obsahu lipidů v absolutních číslech, a i při pohledu na relativní pokles konkrétně koncentrace biomasy se jeví jako obecně méně rezistentní vůči působení stresujících příměsí v porovnání s *R. toruloides*. U vybraných vzorků, primárně vzorku s 10 mmol/l příměsí selenu (vzorek Se 10 mmol/l) sice *R. kratochvilovae* *R. toruloides* v obsahu lipidů předčí a v koncentraci biomasy vyrovnává, ale přesto se dané koncentrace biomasy liší o zhruba 25 %. Také je pozoruhodné že vyšší poměr nenasycených ku nasyceným MK se vyskytuje ve vzorcích se smíšeným obsahem přimíšených prvků a vzorek který měl nejhorší výsledky u *R. toruloides* je vzorkem, který měl u *R. kratochvilovae* mimo jodidy z hlediska procentuálního zastoupení lipidů výsledek nejlepší. To naznačuje společně se sníženým zlomkem lipidů a již zmíněným nižším zlomkem nasycených MK ve smíšených vzorcích že má *R. kratochvilovae* přirozenou rezistenci nebo adaptabilitu vůči prostředí kde se vyskytuje pouze jeden stresující prvek, ale jakmile se jedná o pestřejší složení tak už se dostatečně adaptovat schopná není, oxidační stres ochranné mechanismy buňky přehltní a inhibuje propagaci. Také je tato přirozená rezistence vůči jednoduchým stresorům založena na jiném principu než na zvýšené produkci nasycených MK, jelikož u vzorků s jednou příměsí se zlomek nasycených MK se zvyšující se koncentrací prvku snižuje. Je tedy alespoň z části založena na zvýšené produkci MK celkově nebo na mechanismu který nemá s metabolismem MK nic společného, např. odlišnou strukturou buněčné stěny která umožňuje lepší sorbci anebo menší koncentrací sulfátových permeáz Sul1 a Sul2 na membráně. Z hlediska produkce nenasycených MK se jeví jako nejvýhodnější media 1 mmol/l příměsí NaI a KI, jelikož mírně nižší proporce zmíněných nasycených MK oproti smíšeným vzorkům nejsou dostatečně nižší na to, aby offsetovaly výrazně vyšší koncentraci biomasy a vyšší zastoupení lipidů v ní.

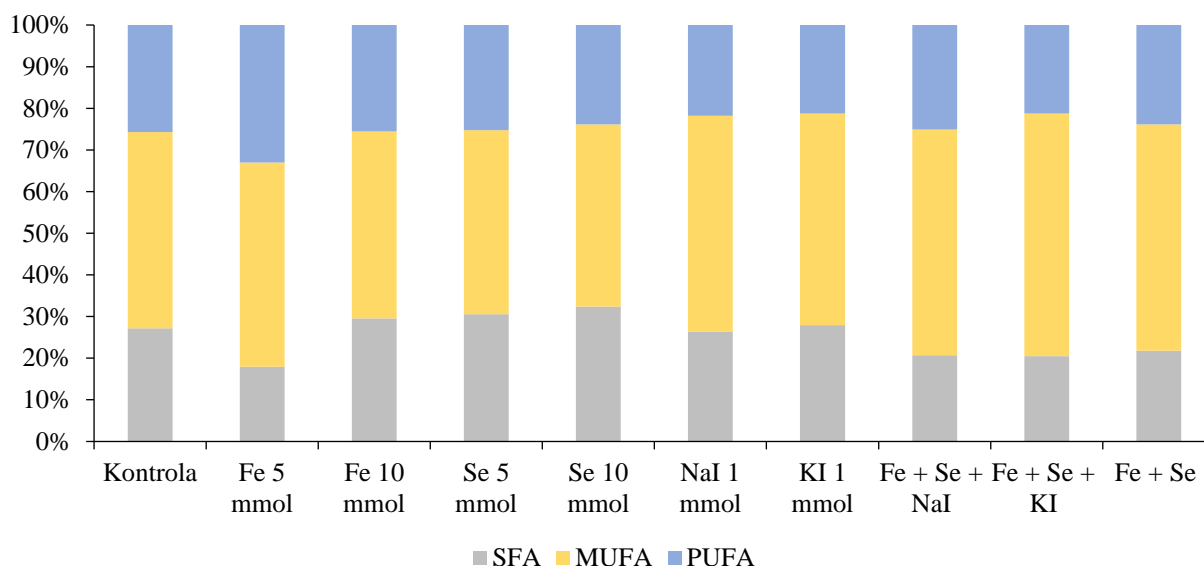
5.2.2.2 Obsah mastných kyselin a rozdělení podle nasycenosti v průběhu kultivace



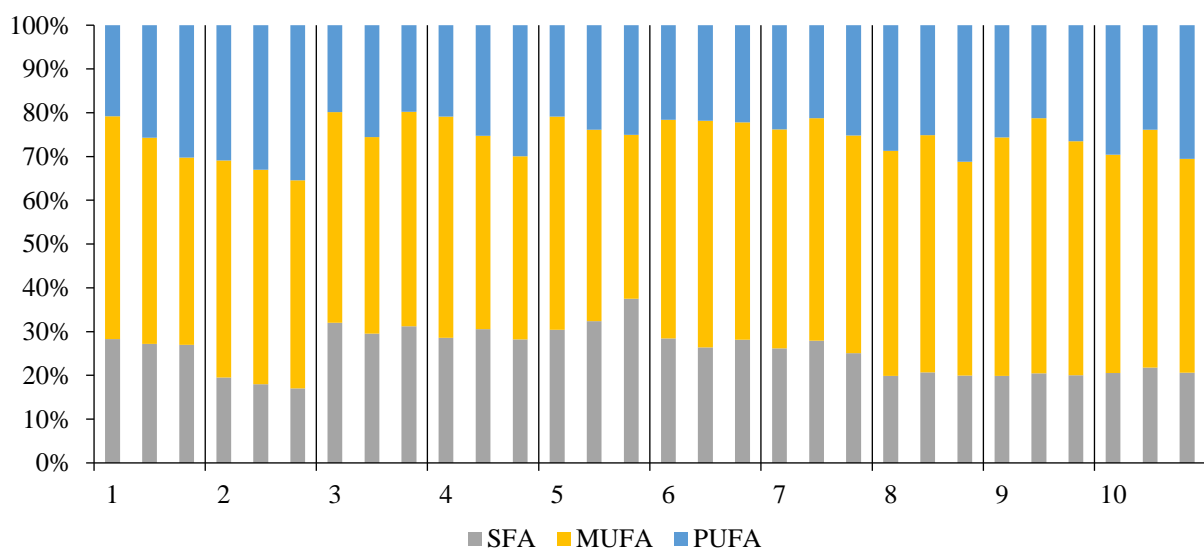
Graf 10: Procentuální zastoupení lipidů v biomase pro *R. kratochvilovae* po 72, 96 a 120 hodinách kultivace



Graf 11: Obsah nasycených (SFA) mononenasycených (MUFA) a polynenasycených (PUFA) mastných kyselin ve vzorcích kultivací *R. kratochvilovae* po 72 hodinách kultivace



Graf 12: Obsah nasycených (SFA) mononenasycených (MUFA) a polynenasycených (PUFA) mastných kyselin ve vzorcích kultivací *R. kratochvilovae* po 96 hodinách kultivace

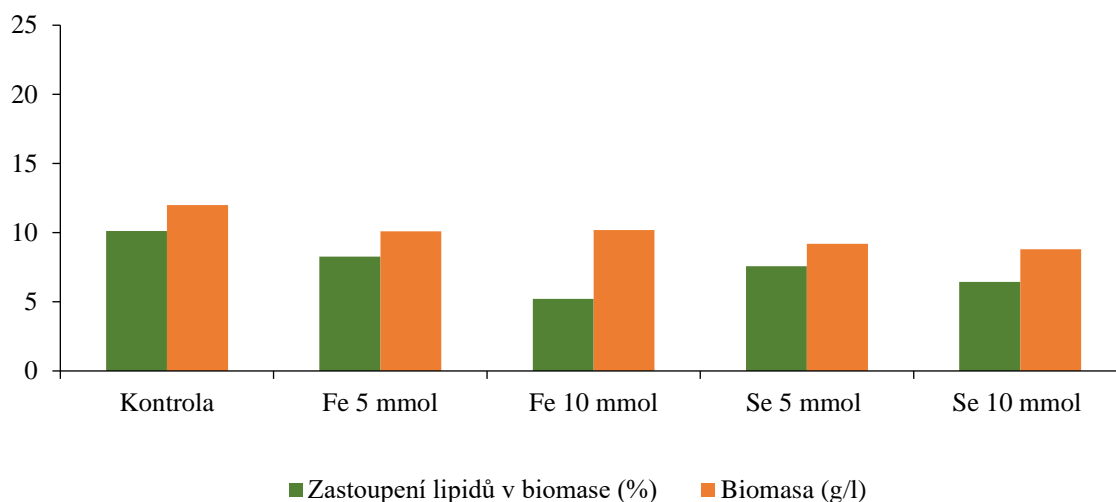


Graf 13: Obsah nasycených (SFA) mononenasycených (MUFA) a polynenasycených (PUFA) mastných kyselin ve vzorcích po 72, 96 a 120 hodinách kultivace (číslování vzorků viz. Tabulka 9)

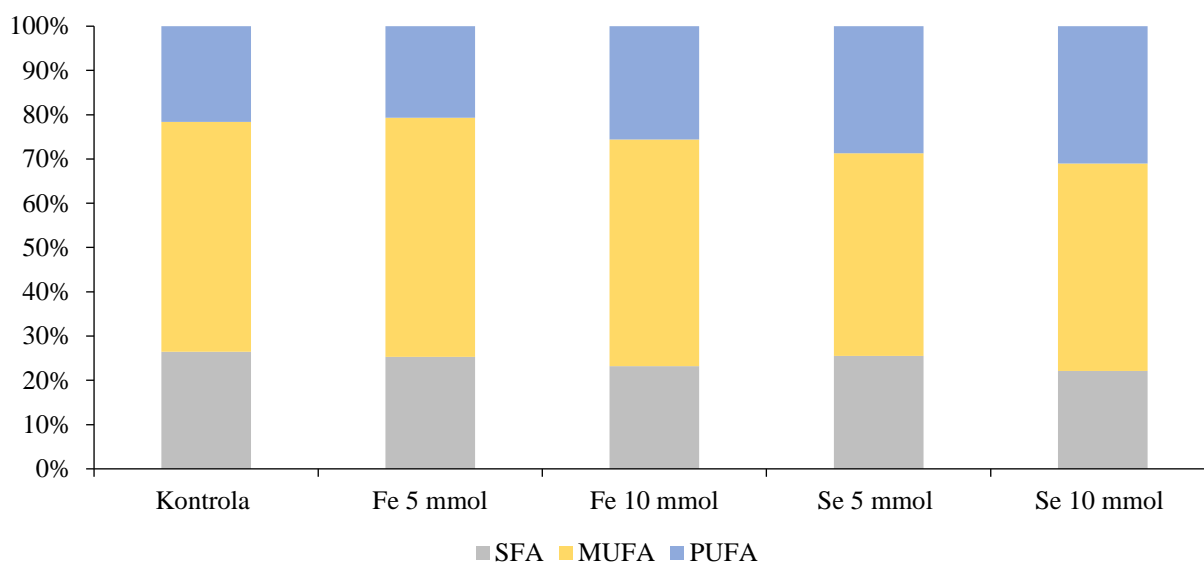
V časové progresi procentuálního zastoupení lipidů na rozdíl od *R. toruloides* čas peakového obsahu nemá tak jasný trend a mezi vzorky se liší, ačkoliv je kromě dvou vzorků vždy v 72. nebo 96. hodině. To opět naznačuje moc dlouhou kultivační dobu pro optimální výtěžnost, ale bez toho, aniž by byla známa koncentrace biomasy v dané časy tak se tato hypotéza nedá jednoznačně potvrdit. Data také podporují závěr o zvýšené rezistenci vůči selenu, jelikož v 96. a 72. hodinách je obsah lipidů srovnatelný s kontrolou, a u 10 mmol/l příměsi je ve 120 hodině procentuální zastoupení lipidů dokonce vyšší, a to bez výrazného nárůstu polynenasycených MK a dokonce s poklesem relativního zastoupení nasycených MK obecně. Je tedy možné, že důsledkem zvýšené rezistence *R. kratochvilovae* jsou koncentrace kdy je protekční antioxidační systém přehlcen u selenu a jednotlivých prvků vyšší, než byly použity v mediu a tím pádem má schopnost pojmout vyšší množství prvků při zachování svých produkčních vlastností z hlediska produkce nasycených MK.

5.2.3 Kmen *Rhodotorula mucilaginosa*

5.2.3.1 Obsah mastných kyselin a rozdělení podle nasycenosti po ukončení kultivace (120 h)



Graf 14: Procentuální zastoupení lipidů v biomase a koncentrace biomasy pro *R. mucilaginosa* po 120 hodinách kultivace



Graf 15: Obsah nasycených (SFA) mononenasycených (MUFA) a polynenasycených (PUFA) mastných kyselin ve vzorcích kultivací *R. mucilaginosa* po 120 hodinách kultivace

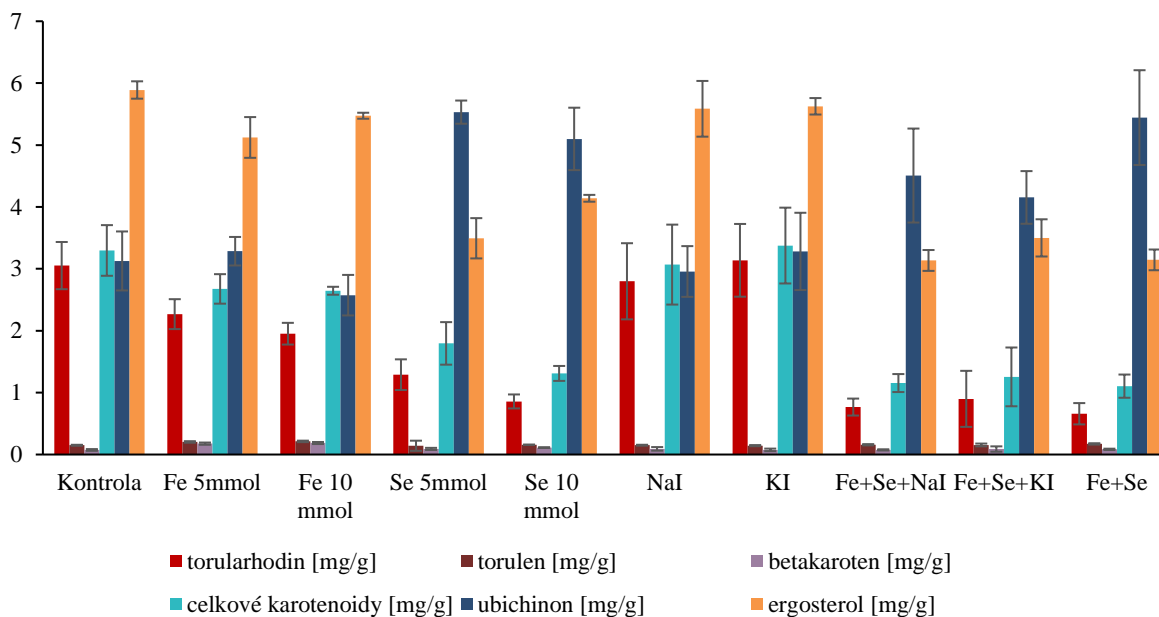
R. mucilaginosa je dle získaných výsledků ze tří zkoumaných kvasinek nejméně výtěžnou z hlediska koncentrace biomasy, jelikož hodnoty jsou zhruba o 25 % nižší než u *R. kratochvilovae* a o zhruba 50 % nižší než u *R. toruloides*. Z tohoto hlediska se ale také zdá být nejméně ovlivněna příměsími prvkových stresorů, protože ačkoliv je koncentrace biomasy nižší tak je napříč vzorky víceméně konstantní. Z hlediska procentuálního obsahu lipidů nevykazuje stejnou rezistenci jako *R. kratochvilovae* a se zvyšující koncentrací příměsí se hodnota tohoto parametru snižuje. Pozoruhodně obdobně jako *R. kratochvilovae* ale toleruje lépe 10 mmol/l koncentraci selenu než 10 mmol/l železa, přestože se sloučeniny selenu obecně považují za více toxické. Rozložení MK mezi polynasycenými a mononasycenými se oproti kontrole mění u vzorků kromě 5 mmol/l železa o 5 až 10 %. Nejde tedy o dramatické změny, jako u předchozích kmenů, ale proporce nasycených MK obecně zůstává v podstatě neměnná.

I když tedy výsledky kultivace *R. mucilaginosa* nejdou plně porovnat s ostatními kmeny díky zúženému kultivačnímu schématu tak se tento kmen oproti ostatním studovaným nejvíce jeví jako ideální pro produkci nasycených či nenasycených MK skrze svou relativně mírnou reakci vůči stresujícím příměsím.

5.3 Analýza obsahu karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu pomocí HPLC

5.3.1 Kmen *Rhodotorula toruloides*

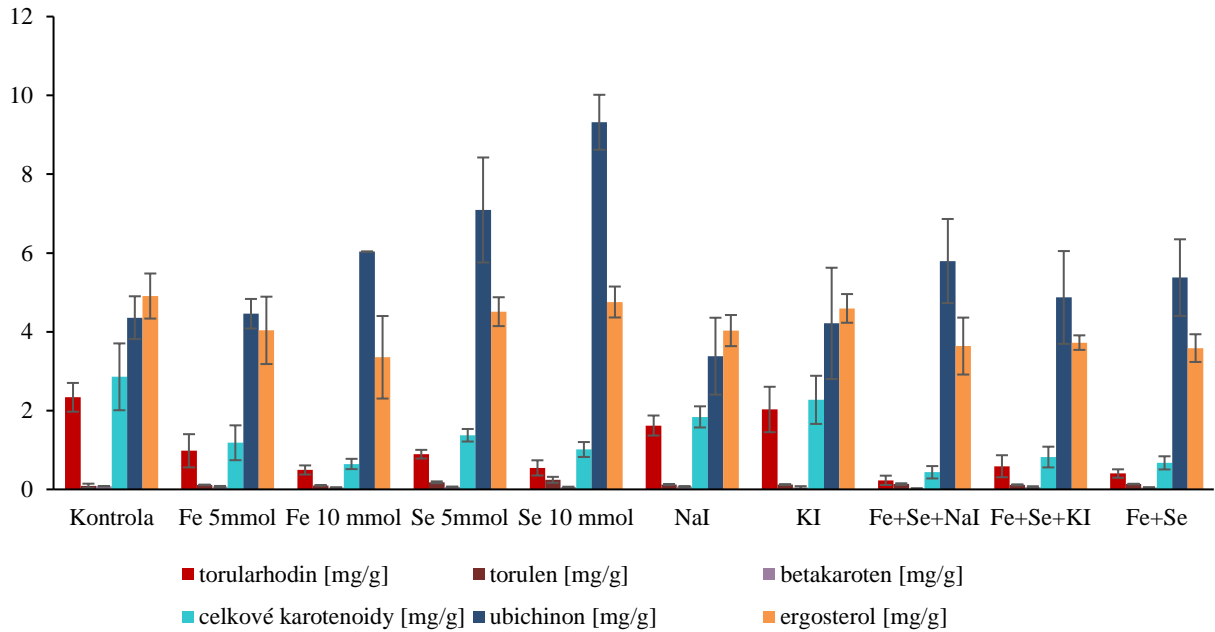
5.3.1.1 Obsah karotenoidů, ubichinonu a ergosterolu po ukončení kultivace (120 h)



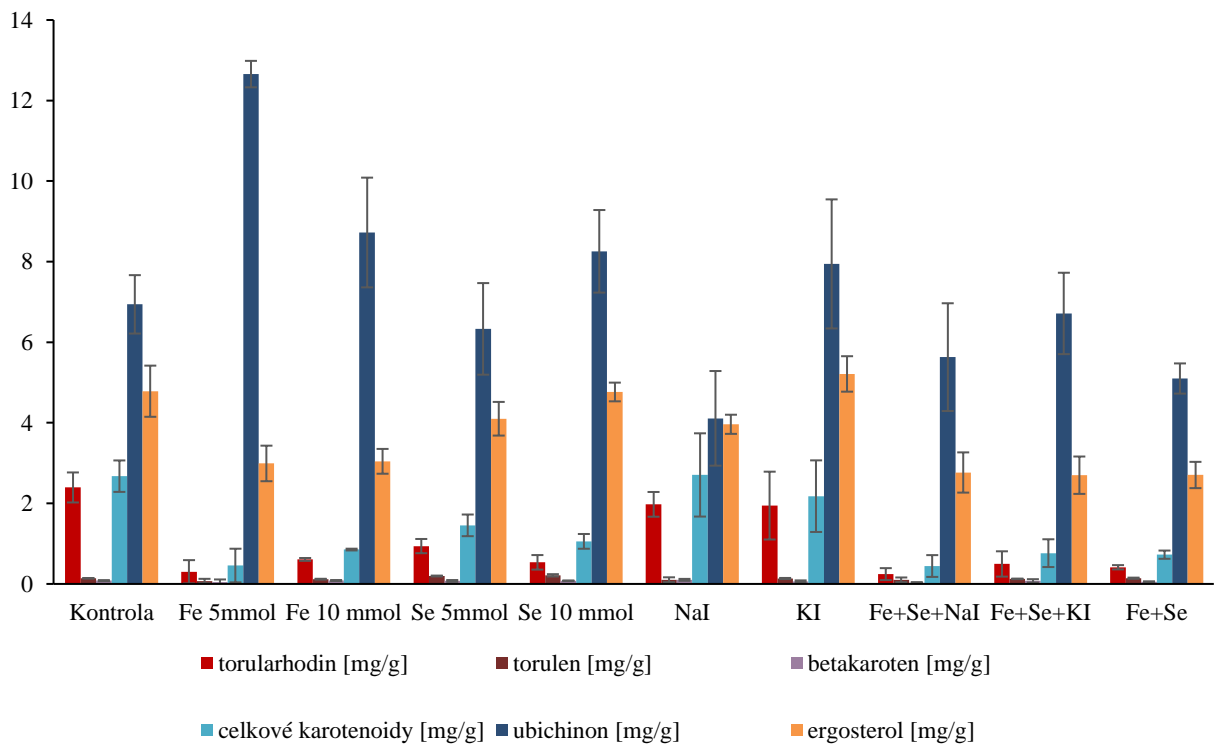
Graf 16: Obsah karotenoidů, ubichinonu a ergosterolu ve vzorcích kultivací *R. toruloides* po 120 hodinách kultivace

Z grafu výše (Graf 16) je zřejmé, že dominantní karotenoid produkovaný *R. toruloides* je torularhodin, jehož koncentrace se pohybují od zhruba 0,65 do 3,3 mg/g. Ostatní produkované karotenoidy (torulen a β -karoten), které byly dle dostupných standardů zanalyzovány, se vyskytují pouze ve velmi malých množstvích a skoro by se daly považovat, vzhledem k celkovým karotenoidům za zanedbatelné. Zdá se, že mnohem významněji zastoupenými produkty při studovaných kultivacích byly ubichinon a ergosterol. Společně s tím, že produkce ubichinonu se zdá být inverzně korelovaná s obsahem karotenoidů to naznačuje zvýšenou produkci ubichinonu jako ochrannou adaptaci proti oxidaci *R. toruloides* ve více stresujícím prostředí. Z dat vyplívá také druhá inverzní korelace, a to mezi produkcí ubichinonu a ergosterolu. Jelikož ergosterol se vyskytuje na vnějšku buňky jako součást buněčné membrány, zatímco ubichinon se vyskytuje v cytosolu, uvnitř buňky. Jeví se zde jako atraktivní vysvětlení to, že je zvýšená produkce ubichinonu způsobená až nadměrným pronikáním stresorů do buňky zapříčiněné narušenou stabilitou membrány v důsledku sníženého množství ergosterolu. V buňce by potom byl ubichinon produkován jako antioxidační činidlo. Jako u mastných kyselin se zdá, že příměsi jodidů mají pouze malý efekt na obsah produktů.

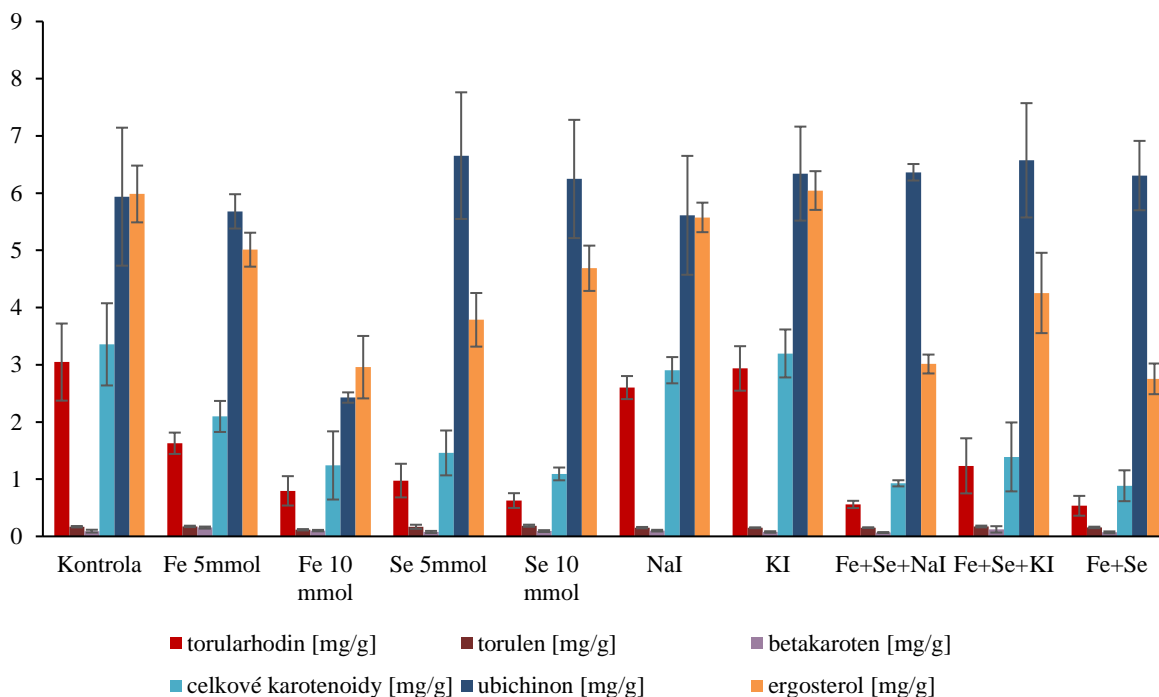
5.3.1.2 Obsah karotenoidů, ubichinonu a ergosterolu v průběhu kultivace



Graf 17: Obsah karotenoidů, ubichinonu a ergosterolu ve vzorcích kultivací *R. toruloides* po 48 hodinách kultivace



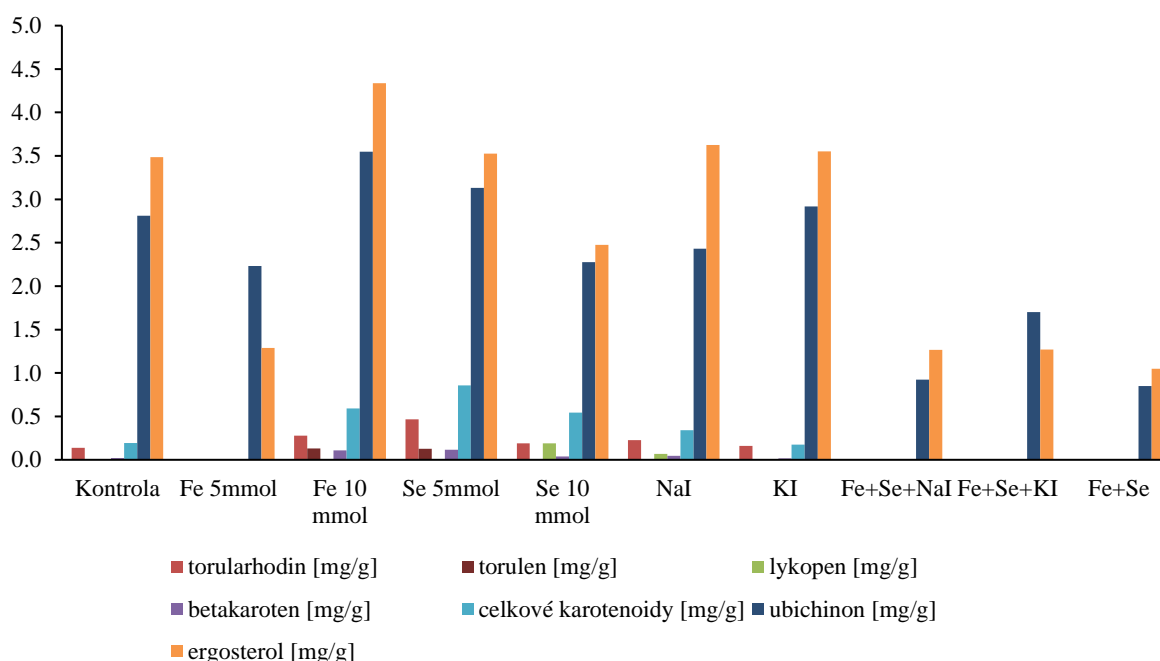
Graf 18: Obsah karotenoidů, ubichinonu a ergosterolu ve vzorcích kultivací *R. toruloides* po 72 hodinách kultivace



Graf 19: Obsah karotenoidů, ubichinonu a ergosterolu ve vzorcích kultivací *R. toruloides* po 96 hodinách kultivace

Narozdíl od mastných kyselin data naznačují, že obsah karotenoidů napříč vzorky se v průběhu kultivace až do ukončení ve 120. hodině zvětšuje, a tedy že kdyby byl cíl maximalizovat výtěžnost karotenoidů tak by teoreticky kultivace mohla pokračovat po delší dobu. Dále zvýšené zastoupení karotenoidů po 120. hodině za těchto stresových podmínek by se ale muselo experimentálně potvrdit. V porovnání s kontrolou je v mediích s příměsí prvků také výrazně snížena produkce karotenoidů ve všech časech odběru, což se opět odlišuje od produkce MK, kde méně toxické příměsi jako železo u *R. toruloides* produkci navyšovaly. Mnohem komplexnější je ale časový průběh koncentrací ergosterolu a ubichinonu. Například u vzorku obsahujícího příměs 10 mmol/l selenu koncentrace ubichinonu dosáhla maxima už ve 48. hodině kultivace, zatímco u ostatních vzorků v 72. nebo 96. hodině. U ergosterolu není fluktuační tak výrazná, ale také u řady vzorků dosáhne maximální koncentrace v jiném čase než ve 120. hodině. Pro maximální výtěžnost těchto produktů je tedy vhodnější kratší kultivace, pro ubichinon s 10 mmol/l příměsí Na_2SeO_4 a pro ergosterol s 1 mmol/l příměsí KI. Z dat není pro tento jev zřejmé pohotovité vysvětlení. Kmen *Rhodotorula kratochvilovae*

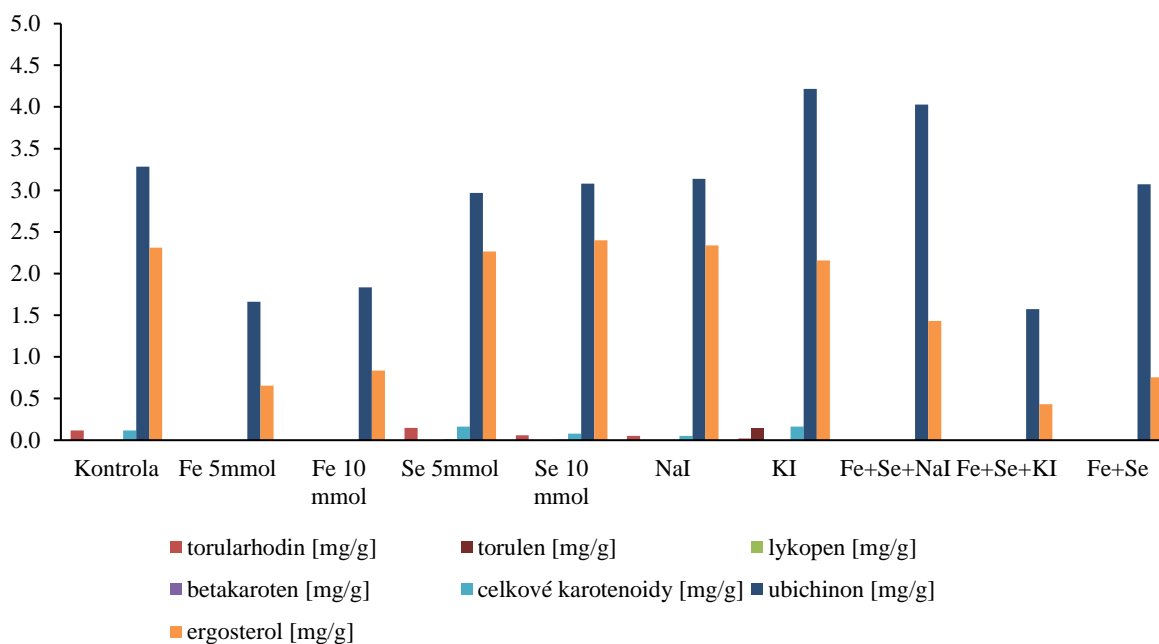
5.3.1.3 Obsah karotenoidů, ubichinonu a ergosterolu po ukončení kultivace (120 h)



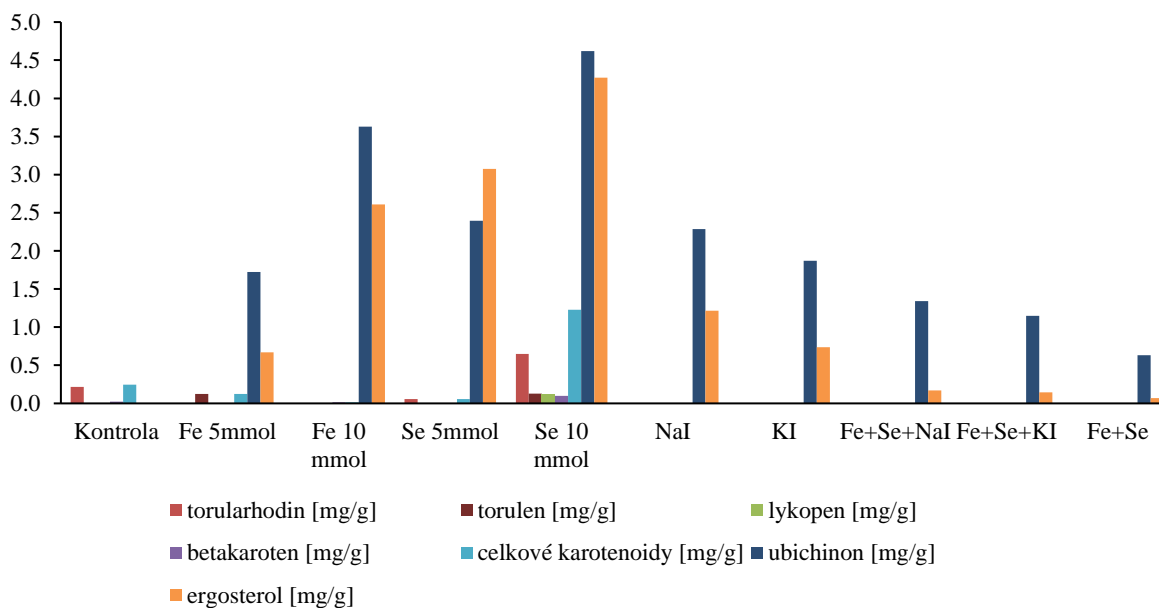
Graf 20: Obsah karotenoidů, ubichinonu a ergosterolu ve vzorcích kultivací *R. kratochvilovae* po 120 hodinách kultivace

Jelikož je vidět v Graf 20 značná odezva *R. kratochvilovae* na stresující prvky, tak se produkce karotenoidů zdá být u tohoto kmene mnohem více podmíněná oxidačním stresovým faktorům než u *R. toruloides*. U vzorků s příměsí pouze jednoho prvku, zejména u vzorku s přidavkem 5 mmol/l selenu je totiž oproti kontrole produkce těchto látek výrazně zvýšená. Z grafu také pozoruhodně vyplývá že všechny vzorky s přidavkem 5 mmol/l železa neprodukují množství karotenoidů detekovatelné metodou HPLC použitou v této práci, a také vykazují značně sníženou produkci ubichinonu a ergosterolu. Jelikož tato snížená zabarvenost byla pozorovaná u vzorků již při samotné kultivaci tak lze skoro jednoznačně vyloučit chybu při extrakci či měření. Srovnatelně pozoruhodné je, že při dvojnásobné koncentraci této příměsi efekt vymizí a koncentrace ubichinonu a ergosterolu jsou dokonce nejvyšší ze všech vzorků. Na základě poznatků ohledně metabolismu železa v *S. cerevisiae* je tedy možné že koncentrace železa v těchto mediích je dostatečně vysoká na to, aby byla výrazně ovlivňovala přirozený chod buňky, ale ne dostatečně vysoká na to, aby aktivovala transkripční faktor Yap5. Snížená koncentrace ergosterolu také naznačuje sníženou integritu buněčné membrány, což může dále podporovat nekontrolované propouštění iontů do buňky jeho neblahé ovlivňování buněčného metabolismu a struktury. Jodidy jsou opět srovnatelné s kontrolou, koncentrace karotenoidů u vzorku s příměsí NaI je o zhruba 50 % vyšší.

5.3.1.4 Obsah karotenoidů, ubichinonu a ergosterolu v průběhu kultivace



Graf 21: Obsah karotenoidů, ubichinonu a ergosterolu ve vzorcích kultivací *R. kratochvilovae* po 72 hodinách kultivace

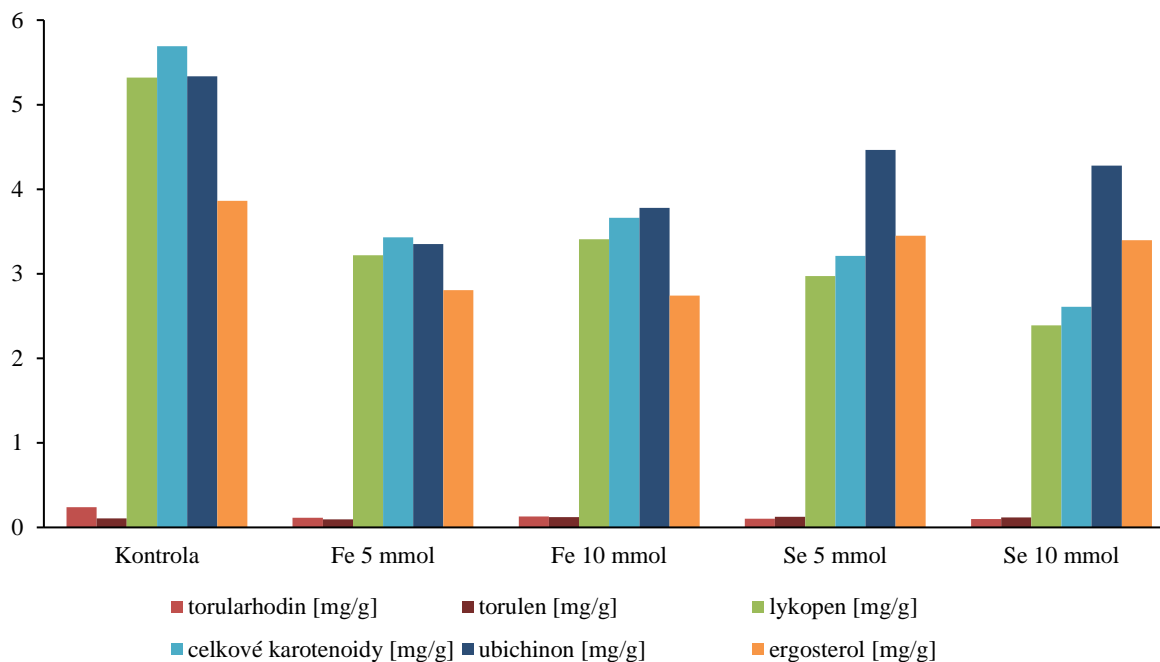


Graf 22: Obsah karotenoidů, ubichinonu a ergosterolu ve vzorcích kultivací *R. kratochvilovae* po 96 hodinách kultivace

Obdobně jako u *R. toruloides* vykazují vzorky peakovou koncentraci ubichinonu před koncem kultivace v 72. nebo 48. hodině. Nízké hodnoty karotenoidů ve vzorcích a ubichinonu/ergosterolu u kontroly v 96. hodině byly způsobeny nevhodným skladováním při laboratorní teplotě, atmosférickém tlaku a za přístupu kyslíku a občasného přístupu světla. Pro přesnější analýzu těchto látek bude nutné experiment v budoucnu opakovat.

5.3.2 Kmen *Rhodotorula mucilaginosa*

5.3.2.1 Obsah karotenoidů, ubichinonu a ergosterolu po ukončení kultivace (120 h)



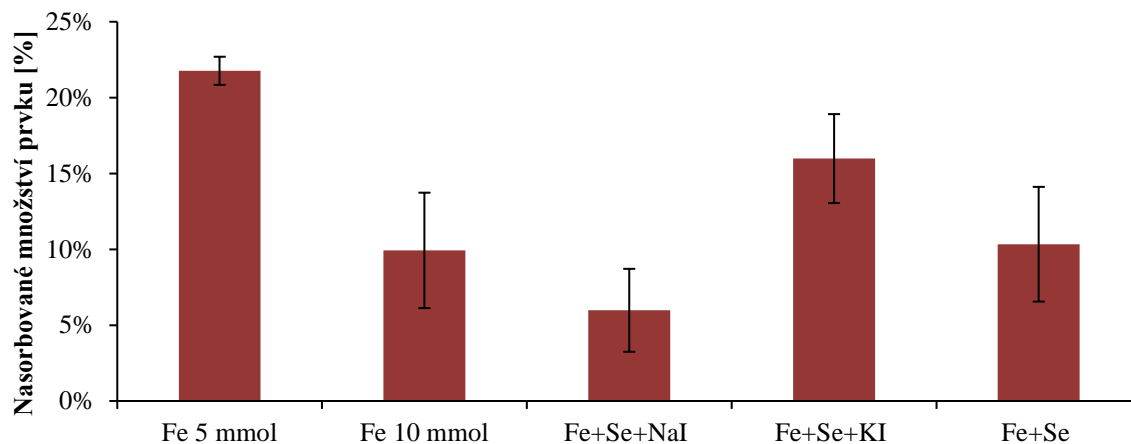
Graf 23: Obsah karotenoidů, ubichinonu a ergosterolu ve vzorcích kultivací *R. mucilaginosa* po 120 hodinách kultivace

R. mucilaginosa se skrze svou velmi vysokou produkci lykopenu zdá být z hlediska produkce karotenoidů ze všech tří zkoumaných kmenů nejvýkonnějším producentem těchto látek. Také je opět pozorována vyšší obecná rezistence vůči stresujícím příměsím, ačkoliv i tak příměsi vyprodukované množství karotenoidů snižují. Obdobný trend lze pozorovat u produkce ergosterolu, kde ačkoliv příměsi železa snižují produkci o až zhruba 29 %, tak poklesy nejsou tak výrazné, jako u ostatních kmenů. U ubichinonu také narozdíl od ostatních kmenů žádné příměsi produkci nezvyšují. Pro maximalizaci výtěžnosti těchto produktů se tedy studované příměsi v daných koncentracích pro daný kmen i daný kmen obecně díky nižší produkci oproti *R. toruloides* a *R. kratochvilovae* nezdají být vhodné.

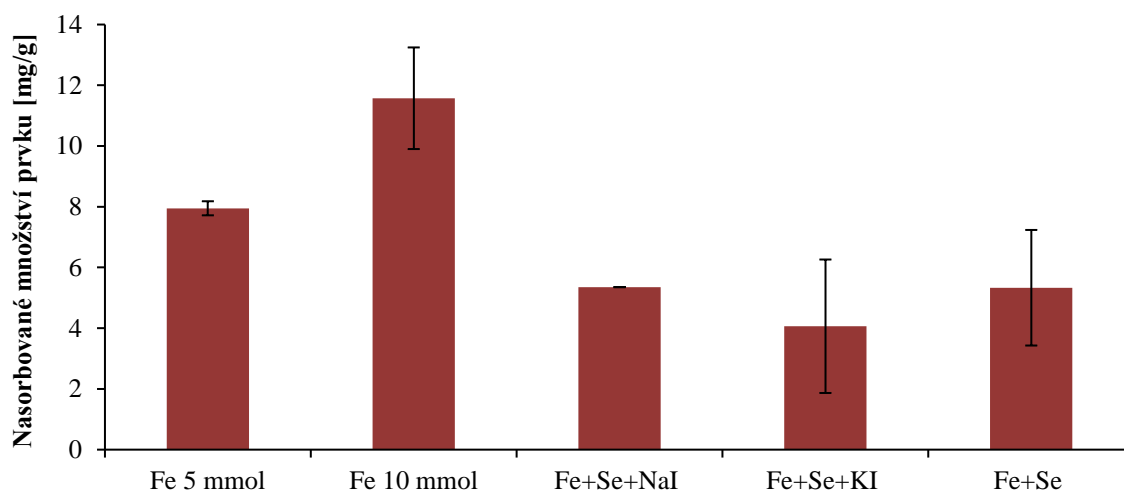
5.4 Analýza obsahu přimíšených prvků v biomase *R. toruloides* pomocí IC a ICP-OES

5.4.1 Kultivace

5.4.1.1 Železo



Graf 24: Nasorbované procento příměsi železa z kultivačního média

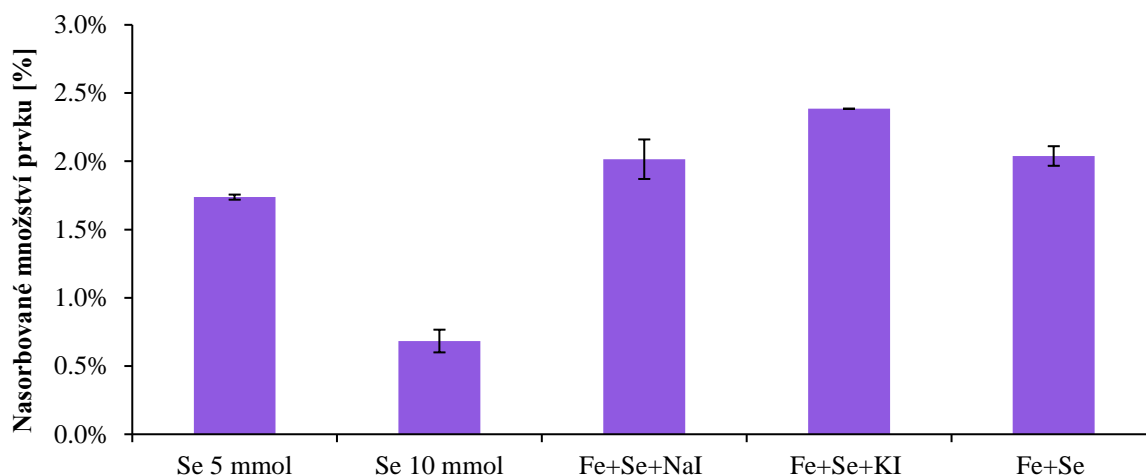


Graf 25: Nasorbované množství (mg/g) příměsi železa z kultivačního média

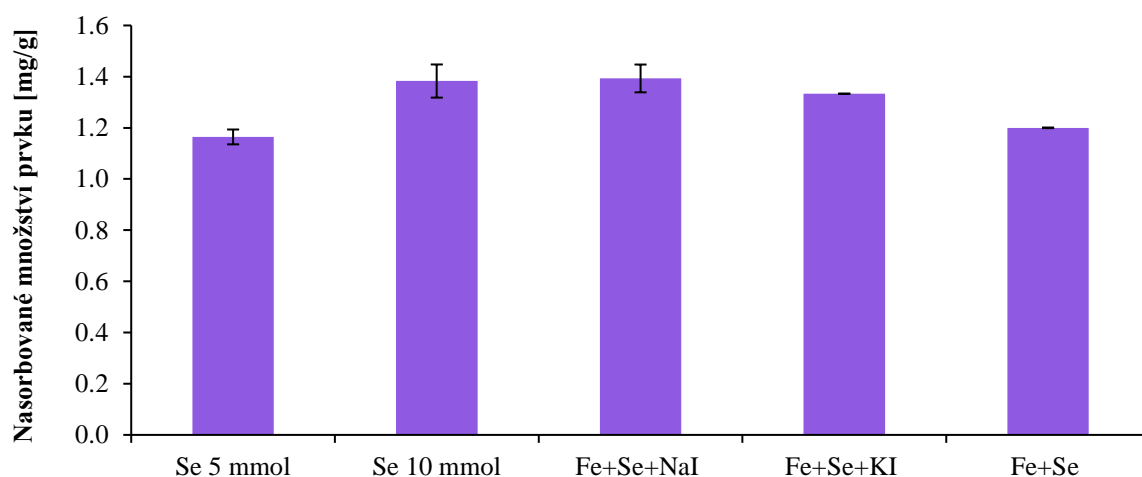
Ačkoliv bylo z hlediska obsahu v biomase nejvíce železa nasorbováno při kultivaci v mediu s 10 mmol/l příměsí FeCl_3 , tak v poměru ku množství přidaného prvku se jeví sorpce být výrazně méně účinná. To naznačuje vyrovnaní křivky rychlosti sorpce vůči koncentraci sorbované látky, a tedy že ve studovaném pásmu koncentrací již neroste nasorbované množství prvku v závislosti na jeho koncentraci lineárně. Přesné určení pozice přelomu mezi lineární a nelineární částí křivky by bylo vhodné dozkoumat v budoucím experimentu. Pozoruhodný je také výrazný rozdíl v relativním množství nasorbovaného železa mezi médii obsahujícími jodidy způsobený menším výtěžkem biomasy media s NaI, který lze pozorovat v grafech a tabulkách výše (Graf 1, Tabulka 15). Jak dále naznačuje i Graf 2 který znázorňuje relativní zastoupení MK, zdá se že NaI, ale ne KI, vytváří stresové podmínky, které díky svému omezení koncentrace biomasy snižují celkové množství nasorbovaného železa, i když schopnost

jednotlivých buněk sorbovat je přinejmenším srovnatelná a dokonce se jeví jako mírně slabší u buněk kultivovaných v médiu s příměsí KI. Výběr mezi těmito dvěma médii je tím pádem primárně založený na jejich ekonomické výtěžnosti. Při srovnání koncentrace železa v biomase s výživovými referenčními hodnotami EÚBP (*Tabulka 3*) obsahuje gram biomasy u vzorků s 5 a 10 mmol/l příměsí železa pro všechny věkové kategorie kromě kategorií 7 až 11 měsíců, 7 až 11 let a 12 až 17 let pro muže více než 100 % průměrné denní potřeby železa a u většiny kategorií výrazně nadpoloviční část referenčního příjmu pro populaci. Vzorky s příměsí jiných prvků mají obsah železa nižší, ale pořád dosahují na desítky procent obou stanovených referenčních hodnot. Zkoumaný způsob kultivace v médiu s příměsí se tedy zdá být efektivním způsobem obohacování biomasy o železo, ačkoliv ekonomická viabilita v porovnání s ostatními metodami obohacování není zřejmá.

5.4.1.2 Selen



Graf 26: Nasorbované procento příměši selenu z kultivačního média



Graf 27: Nasorbované množství (mg/g) příměši selenu z kultivačního média

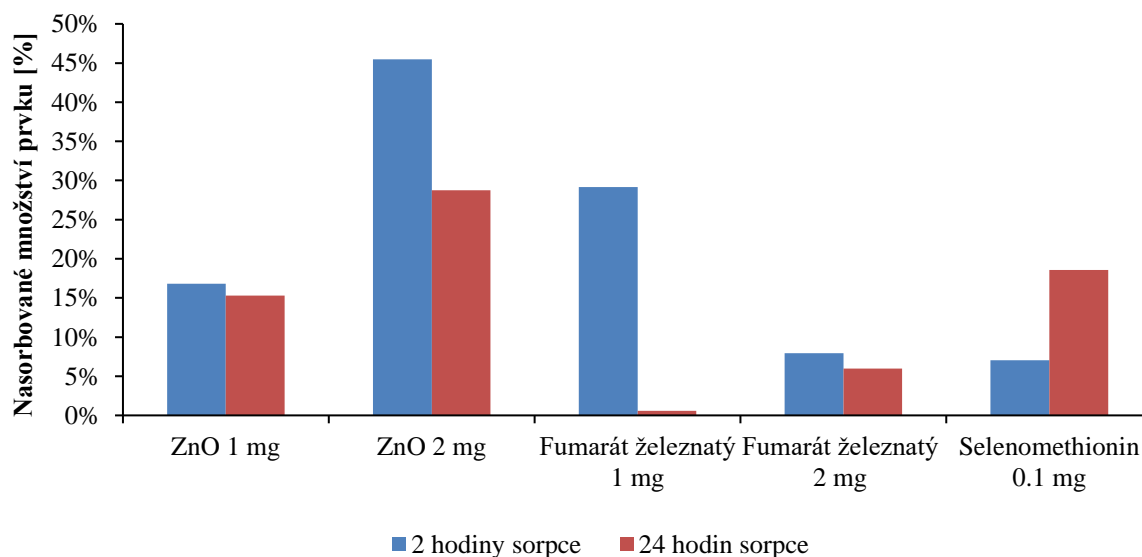
Oproti železu se z přidaného selenu sorbuje mnohem menší relativní, a tudíž i absolutní množství příměši, což by odpovídalo faktu, že selen má v buňce mnohem užší škálu využití. Trend parametru mezi vzorky pouze s přidáním selenu je podobný jako u železa, tedy že u vyšší koncentrace je nižší relativní množství nasorbovaného prvku, u vzorků s příměsí

dalších prvků je ale překvapivě vyšší než u kultivací pouze s přidavkem selenu. Jev je opět zapříčiněný vyšší koncentrací biomasy (*Tabulka 15*) ve zmíněných kultivacích, což naznačuje, že příměsí prvků do média již osahující příměs selenu zmenšují stres, kterým na ně selen působí a tím zlepšují proliferaci buněk. Absolutní obsah selenu sice oproti 5 mmol/l přidavku selenu napříč vzorky mírně roste, ale v porovnání ke fluktuacím obsahu nasorbovaného železa jsou rozdíly nepříliš významné. Kultivace v médiu s koncentrací selenu 10 mmol/l je tedy kvůli důvodům zmíněných výše, jako jsou nižší koncentrace biomasy, nižší relativní nasorbované množství a k tomu pouze marginálně zvýšený absolutní obsah selenu nevhodná. I když byla efektivita sorpce u selenu malá, tak v poměru na gram několikrát převyšuje nevyšší povolenou denní dávku selenu pro všechny uvedené skupiny (viz. *Tabulka 4*) a biomasa by se tedy musela podávat v menším množství. Kvůli tomuto vysokému rozdílu poměru dávek ku nasorbovanému množství se nejeví jako vhodné podávat biomasu s příměsí selenu a železa v poměrech studovaných touto prací, jelikož by množství podané biomasy vykazovalo buď relativně nízký obsah železa nebo příliš vysoký obsah selenu. V budoucnu by tedy bylo žádoucí opakovat experimenty s nižšími koncentracemi selenu v médiu.

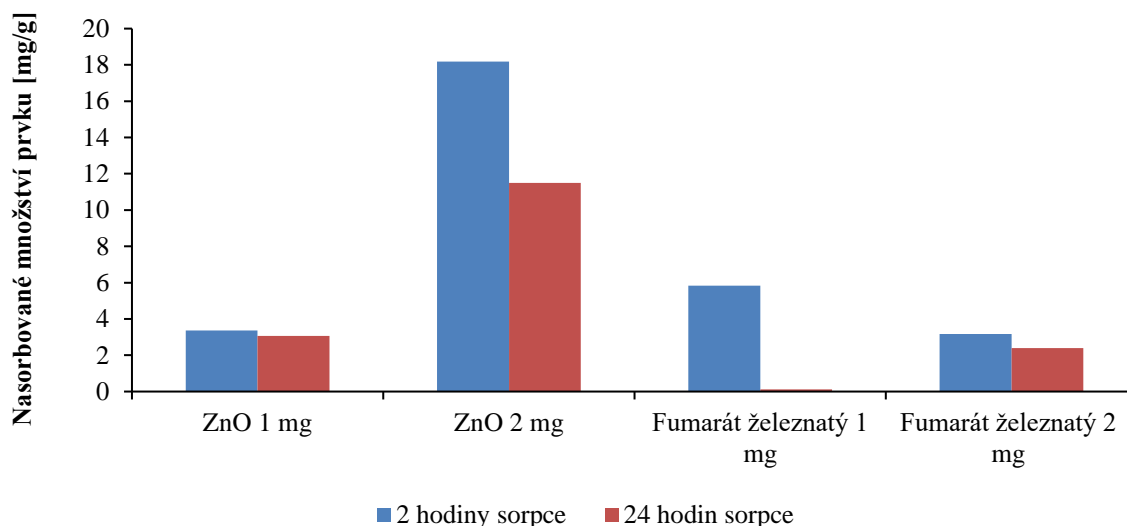
5.4.1.3 Jód

Při analýze koncentrace jódu v supernatantu po centrifugaci kultivací nebyl detekován žádný jód, což by naznačovalo úplnou sorpci. To se ale přičítá s výsledky studie provedené autory Ostercem aj., které naznačovaly minimální úroveň sorpce jódu napříč jeho různými anorganickými formami. Není tedy zřejmé, jestli tedy *R. toruloides* interaguje s jódem odlišně od *S. cerevisiae* anebo nastala jen chyba v měření, popř. byla koncentrace pod limitem detekce. Přímá analýza biomasy nebyla provedena z důvodu jejího příliš malého množství pro provedení použité metody. Pro analýzu obsahu jódu v biomase bude tedy nutné měření v budoucnu opakovat nebo zvolit jinou metodu, například ICP.

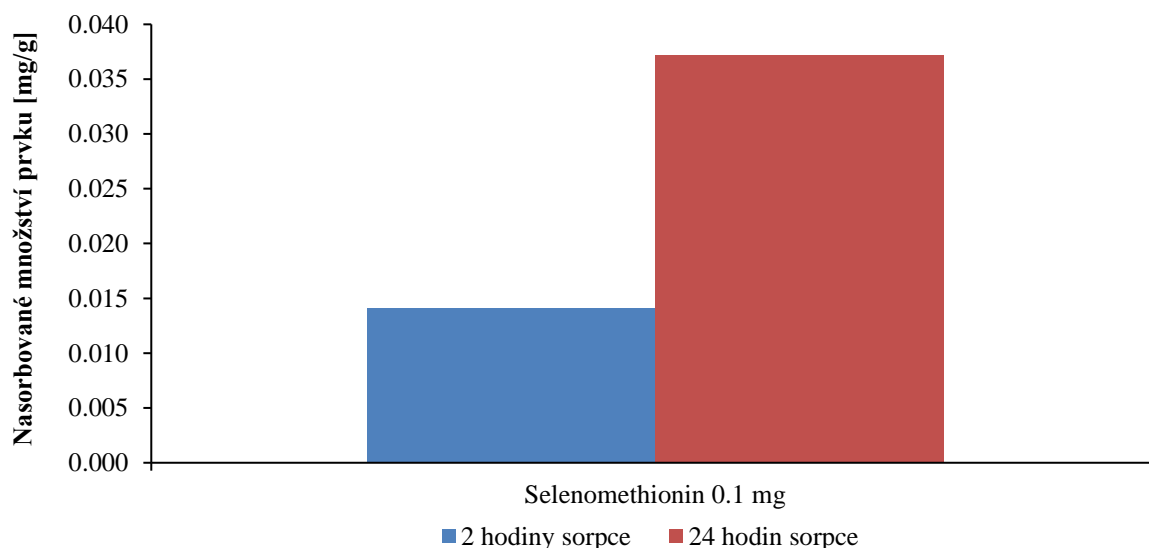
5.4.2 Sorpční experiment



Graf 28: Nasorbované procento vybraných sloučenin při sorpčním experimentu



Graf 29: Nasorbované množství (mg/g) vybraných sloučenin při sorpčním experimentu



Graf 30: Nasorbované množství (mg/g) selenomethioninu při sorpčním experimentu

Při pohledu na výsledky se zdá, že po 24 hodinách sorpce bylo u všech sloučenin nasorbované množství menší, než po 2 hodinách. Možné vysvětlení je větší míra rozpuštění sloučenin ve vodném prostředí sorpce a jejich následná retence v supernatantu. Také je možné že nastala chyba v experimentu, jelikož při iniciaci experimentu byl problém sloučeniny rozpustit ve vodném prostředí ve vialkách, což mohlo způsobit nerovnoměrnou možnost sorpce mezi vzorky. Je v plánu pro potvrzení nebo vyvrácení výsledků budoucím opakováním experimentu. Výjimkou je selenomethionin, který díky svému malému množství nebylo problém při experimentu rozpustit. U selenomethioninu se nasorbované množství po 24 hodinách oproti 2 hodinách sorpce zvedne na více než dvojnásobek čímž pádem se 24hodinová sorpce jeví jako výhodnější. V tomto čase je obsah selenomethioninu zhruba 37 $\mu\text{g/g}$ což se jeví jako bezpečná dávka, ačkoliv je menší než v mnoha dostupných doplncích. Obsah by se dal zvýšit přidáním většího množství selenomethioninu k biomase, ale přesná míra tohoto zvětšení by musela být odhalena navazujícím experimentem.

6 ZÁVĚR

Účelem provedení této práce bylo upřesnit efekt stresujících příměsí železa (FeCl_3), selenu (Na_2SeO_4), jódu (NaI , KI) a jejich kombinací uvedených v tabulkách výše (*Tabulka 8* a *Tabulka 9*) na produkci karotenoidů, ergosterolu, ubichinonu, lipidů a celkovou koncentraci biomasy. Dále poté byla analyzována míra sorpce prvků do biomasy v daných kultivacích a sorpce prvků na již vykultivovanou biomasu. Cílem práce bylo i stanovení antioxidační aktivity, ale z časových důvodů nebyla zkouška provedena a bude ji tedy nutné provést v budoucnu. Kultivace a extrakce pro HPLC a GC analýzu kmene *R. toruloides* byly provedeny v duplikátu, a výsledky jsou tedy ze statistického hlediska obzvláště věrohodné. Podle všech ukazatelů bylo pro všechny studované kmeny nejvíce stresující médium s 10 mmol/l koncentrací selenu, a to do míry že kromě kultivace kmenu *R. mucilaginosa* v něm bylo pozorováno snížení koncentrace biomasy oproti kontrole o zhruba 50 %. U *R. toruloides* sice tato příměs velmi výrazně zvýšila zastoupení polynenasycených mastných kyselin (na 46,30 % z celku), snížené zastoupení lipidů v biomase a snížený výtěžek biomasy celkově tento zvýšený relativní obsah z hlediska absolutní výtěžnosti ale z velké části negují. V průběhu času se obsah nenasycených mastných kyselin obecně zvyšoval, s nejvyšším zastoupením ve 120. hodině kultivace u většiny vzorků. Narozdíl od toho procentuální obsah lipidů v biomase dosahoval nejvyšších hodnot u většiny vzorků *R. toruloides* a *R. kratochvilovae* už v 96. hodině, a u některých vzorků s příměsí selenu i v 72 nebo dokonce už ve 48. hodině kultivace. Nejvíce rezistentí proti stresu vyvolanému příměsí se zdál být kmen *R. mucilaginosa*, jelikož i když měl v kontrolním prostředí oproti *R. toruloides* výtěžnost zhruba poloviční, tak příměsí snižovaly koncentraci biomasy a obsah lipidů jen o zhruba 20 (s výjimkou příměsí 10 mmol/l Fe) až 30 % oproti 50 a více procentním snížením které byly pozorovány u *R. toruloides*. Příměsí jódu se zdají mít mírně pozitivní vliv na celkovou produkci lipidů, a mírně snižují zastoupení polynenasycených MK ku prospěchu mononenasycených. Obdobně je to s koncentrací biomasy. Mimo příměsí jódu a u *R. toruloides* příměsí železa příměsí koncentraci biomasy snižují, zastoupení lipidů všechny příměsí snižují. Nejvíce lipidů vyprodukovala *R. toruloides*, poté *R. kratochvilovae* a nejméně *R. mucilaginosa*.

Z hlediska produkce karotenoidů v přepočtu na mg/g jednoznačně kraluje *R. mucilaginosa* skrze svou produkci lykopenu, který svou kontribucí k celkovému množství karotenoidů způsobuje vyšší hodnotu tohoto parametru než u ostatních kmenů. Nejmenší produkce lze pozorovat u *R. kratochvilovae*, která svou produkcí nedosahuje ani na 1 mg/g. Naneštěstí kvůli nevhodnému skladování vzorků pro 96. a 72. hodinu kultivace nelze pro tento kmen sledovat časová progrese. Obdobně jako u produkce MK kromě jodidů všechny příměsí produkci karotenoidů snížily, pro maximální výtěžnost těchto látek se tedy v daných koncentracích nejvíce jako vhodné. Jelikož se koncentrace karotenoidů u kultivací *R. toruloides* po celou dobu kultivace zvyšuje, je možné, že jejich peaková koncentrace nenastala ve 120. hodině kultivace a že pro maximální výtěžnost těchto produktů by byla vhodnější delší kultivace. Tato úvaha by se musela ověřit budoucím experimentem. Ohledně ubichinonu šly nejvyšší koncentrace pozorovat u *R. toruloides*, kde u všech vzorků koncentrace této látky dosahovaly nejvyšších hodnot před 120. hodinou kultivace. U vzorku s 5 mmol/l příměsí železa šla pozorovat nejvyšší koncentrace tohoto produktu ze všech kultivací v 72. hodině při hodnotě 12,66 mg/g. Ergosterolu také produkovala nejvíce *R. toruloides*, peakové koncentrace narozdíl od ubichinonu ale nastaly až v 120. hodině kultivace. Pro maximální výtěžnost ubichinonu by tedy byla vhodná zkrácená kultivace a pro ergosterol 120 nebo potenciálně vícehodinová.

Sorpce prvků k biomase byla studována pouze u *R. toruloides*, a výsledky se mezi selenem a železem liší. U železa byla pozorována mnohem vyšší míra sorpce (5 až 22 % oproti 0,5 až 2,5 % u selenu), pravděpodobně způsobena širší škálou využití železa v buňce. Absolutní obsah

varioval, ale plně nebo téměř plně dosahoval na výživové referenční hodnoty stanovené EÚBP pro všechny kategorie, a nebylo by tedy nevhodné biomasu podávat například jako doplněk stravy. U selenu byl obsah v mg/g napříč vzorky konstantní, a v kombinaci s tím, že 10 mmol/l přídavek selenu inhiboval produkci ostatních produktů lze dojít k závěru, že je pro kultivaci daných kmenů tato koncentrace nevhodná. I přes výše zmíněnou nízkou úroveň sorpce obsah selenu v gramu biomasy několikrát převyšuje výživové referenční hodnoty a biomasa by se tedy musela podávat v menším množství, což za předpokladu že je možné zbylý selen v médiu jinak zužítkovat může být výhodné. Z tohoto důvodu není kombinace železa a selenu v médiu při daných koncentracích vhodná, jelikož při nasorbovaných množstvích by biomasa obsahovala buď nevhodně vysokou dávku selenu, nebo příliš malou dávku železa. Koncentraci jódu nebylo možné vyhodnotit díky nedostatečnému množství biomasy pro použitou metodu, a experiment se bude tím pádem muset opakovat. Sorpční experiment se pro potvrzení výsledků látek kromě selenomethioninu také bude muset opakovat. Selenomethioninu se při zvoleném množství příměsi nasorbovalo po 24 hodinách do biomasy zhruba 37 µg/g, což je bezpečná dávka, ale vzhledem k tomu že nejde o čistý selen a mnoho doplňků obsahuje množství vyšší tak by v praxi bylo výhodnější sorbovat množství vyšší.

Z výsledků je zřejmé, že ačkoliv ve vybraných instancích příměsi produkci některých látek zvyšují (jako např. 5 mmol/l příměs železa produkci ubichinonu v 72. hodině u *R. toruloides*), tak je obecně stres jimi způsobený při daných koncentracích příliš intenzivní a inhibuje produkci produktů a růst vybraných kmenů. Výjimkou jsou jodidy, které měly na produkci nepodstatný vliv. V budoucnu bude tedy vhodné kromě experimentů zmíněných výše studovat efekty příměsí při nižších koncentracích a v jiných kombinačních poměrech.

7 ZDROJE

- [1] NEVOIGT, Elke. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2008, **72**(3), 379-412 [cit. 2024-05-18]. ISSN 1092-2172. doi:10.1128/MMBR.00025-07
- [2] WU, Zhen, Dao-dong PAN, Yuxing GUO a Xiaoqun ZENG. Structure and anti-inflammatory capacity of peptidoglycan from *Lactobacillus acidophilus* in RAW-264.7 cells. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2013, **96**(2), 466-473 [cit. 2023-06-22]. ISSN 01448617. doi:10.1016/j.carbpol.2013.04.028
- [3] STAHL, Wilhelm, Ulrike HEINRICH, Holger JUNGMANN, Helmut SIES a Hagen TRONNIER. Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2000, **71**(3), 795-798 [cit. 2024-05-18]. ISSN 00029165. doi:10.1093/ajcn/71.3.795
- [4] STAHL, Wilhelm a Helmut SIES. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2003, **24**(6), 345-351 [cit. 2024-05-18]. ISSN 00982997. doi:10.1016/S0098-2997(03)00030-X
- [5] CAPPELLARO, C., C. BALDERMANN, R. RACHEL a W. TANNER. Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of α - and α -agglutinin. *The EMBO Journal* [online]. 1994, **13**(20), 4737-4744 [cit. 2024-05-18]. ISSN 02614189. doi:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06799.x
- [6] BABA, Misuzu a Masako OSUMI. Transmission and scanning electron microscopic examination of intracellular organelles in freeze-substituted *Kloeckera* and *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Cells. *Journal of Electron Microscopy Technique* [online]. 1987, **5**(3), 249-261 [cit. 2024-05-18]. ISSN 0741-0581. doi:10.1002/jemt.1060050305
- [7] DE NOBEL, Johannes G., Frans M. KLIS, Jan PRIEM, Teun MUNNIK a Herman VAN DEN ENDE. The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* [online]. 1990, **6**(6), 491-499 [cit. 2024-05-18]. ISSN 0749-503X. doi:10.1002/yea.320060606
- [8] YU, D. S., H. JEONG, D.-H. LEE, et al. Complete Genome Sequence of the Probiotic Bacterium *Bifidobacterium bifidum* Strain BGN4. *Journal of Bacteriology* [online]. 2012, 2012-08-10, **194**(17), 4757-4758 [cit. 2023-06-22]. ISSN 0021-9193. doi:10.1128/JB.00988-12
- [9] JIGAMI, Yoshifumi a Tetsuji ODANI. Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 1999, **1426**(2), 335-345 [cit. 2024-05-18]. ISSN 03044165. doi:10.1016/S0304-4165(98)00134-2
- [10] *The Yeasts* [online]. Elsevier, 1998 [cit. 2024-05-18]. ISBN 9780444813121. doi:10.1016/B978-0-444-81312-1.X5000-X
- [11] NEILANDS, J.B. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1995, **270**(45), 26723-26726 [cit. 2024-05-18]. ISSN 00219258. doi:10.1074/jbc.270.45.26723

- [12] PROTCHENKO, Olga, Tracy FEREA, Jared RASHFORD, John TIEDEMAN, Patrick O. BROWN, David BOTSTEIN a Caroline C. PHILPOTT. Three Cell Wall Mannoproteins Facilitate the Uptake of Iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2001, **276**(52), 49244-49250 [cit. 2024-05-18]. ISSN 00219258. doi:10.1074/jbc.M109220200
- [13] KIELISZEK, Marek, Stanisław BŁAŻEJAK, Iwona GIENKA a Anna BZDUCHA-WRÓBEL. Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2015, **99**(13), 5373-5382 [cit. 2024-05-18]. ISSN 0175-7598. doi:10.1007/s00253-015-6650-x
- [14] KLIS, Frans M., Pieternella MOL, Klaas HELLINGWERF a Stanley BRUL. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2002, 2002-08-01, **26**(3), 239-256 [cit. 2024-05-18]. ISSN 1574-6976. doi:10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613.x
- [15] HERSKOWITZ, I. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews* [online]. 1988, **52**(4), 536-553 [cit. 2024-05-18]. ISSN 0146-0749. doi:10.1128/mr.52.4.536-553.1988
- [16] MORTIMER, Robert K., Patrizia ROMANO, Giovanna SUZZI a Mario POLSINELLI. Genome renewal *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts: A new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast* [online]. 1994, **10**(12), 1543-1552 [cit. 2024-05-18]. ISSN 0749-503X. doi:10.1002/yea.320101203
- [17] TRECO, Douglas A. a Victoria LUNDBLAD. Preparation of Yeast Media. *Current Protocols in Molecular Biology* [online]. 1993, **23**(1) [cit. 2024-05-18]. ISSN 1934-3639. doi:10.1002/0471142727.mb1301s23
- [18] AN, Gil-Hwan a Eric A. JOHNSON. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. 1990, **57**(4), 191-203 [cit. 2024-05-18]. ISSN 0003-6072. doi:10.1007/BF00400151
- [19] SINHA, Sweta, Gunjan SINGH, Anju ARORA a Debarati PAUL. Carotenoid Production by Red Yeast Isolates Grown in Agricultural and "Mandi" Waste. *Waste and Biomass Valorization* [online]. 2021, **12**(7), 3939-3949 [cit. 2024-05-18]. ISSN 1877-2641. doi:10.1007/s12649-020-01288-8
- [20] MATA-GÓMEZ, Luis Carlos, Julio César MONTAÑEZ, Alejandro MÉNDEZ-ZAVALA a Cristóbal Noé AGUILAR. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories* [online]. 2014, **13**(1) [cit. 2024-05-18]. ISSN 1475-2859. doi:10.1186/1475-2859-13-12
- [21] ANSCHAU, Andréia. Lipids from oleaginous yeasts: production and encapsulation. In: *Nutrient Delivery* [online]. Elsevier, 2017, s. 749-794 [cit. 2024-05-18]. ISBN 9780128043042. doi:10.1016/B978-0-12-804304-2.00020-2
- [22] FRENGOVA, Ginka I. a Dora M. BESHKOVA. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2009, **36**(2), 163-180 [cit. 2024-05-18]. ISSN 1367-5435. doi:10.1007/s10295-008-0492-9

- [23] BELL, J. Gordon, John MCEVOY, Douglas R. TOCHER a John R. SARGENT. Depletion of α -Tocopherol and Astaxanthin in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Affects Autoxidative Defense and Fatty Acid Metabolism. *The Journal of Nutrition* [online]. 2000, **130**(7), 1800-1808 [cit. 2024-05-18]. ISSN 00223166. doi:10.1093/jn/130.7.1800
- [24] DUTHIE, Susan J., Andrew R. COLLINS a Garry G. DUTHIE. The Role of Carotenoids in Modulating DNA Stability and Lipid Peroxidation. In: QUINN, Peter J. a Valerian E. KAGAN, ed. *Fat-Soluble Vitamins* [online]. Boston, MA: Springer US, 1998, s. 181-207 [cit. 2024-05-18]. Subcellular Biochemistry. ISBN 978-1-4899-1791-1. doi:10.1007/978-1-4899-1789-8_8
- [25] HAMMOND, Billy R. a Lisa M. RENZI. Carotenoids. *Advances in Nutrition* [online]. 2013, **4**(4), 474-476 [cit. 2024-05-18]. ISSN 21618313. doi:10.3945/an.113.004028
- [26] PAUL, Debarati, Panda Kusuma KUMARI a Nahid SIDDIQUI. Yeast Carotenoids: Cost-Effective Fermentation Strategies for Health Care Applications. *Fermentation* [online]. 2023, **9**(2) [cit. 2024-05-18]. ISSN 2311-5637. doi:10.3390/fermentation9020147
- [27] DUPONT, Sebastien, Guillaume LEMETAIS, Thierry FERREIRA, Philippe CAYOT, Patrick GERVAIS a Laurent BENEY. ERGOSTEROL BIOSYNTHESIS: A FUNGAL PATHWAY FOR LIFE ON LAND? *Evolution* [online]. 2012, **66**(9), 2961-2968 [cit. 2024-05-18]. ISSN 00143820. doi:10.1111/j.1558-5646.2012.01667.x
- [28] QUINN, Peter J., KAGAN, Valerian E., ed. *Coenzyme Q: Molecular Mechanisms in Health and Disease*. CRC Press, Taylor and Francis group, 2000. ISBN 9780849387326.
- [29] AUSSEL, Laurent, Fabien PIERREL, Laurent LOISEAU, Murielle LOMBARD, Marc FONTECAVE a Frédéric BARRAS. Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 2014, **1837**(7), 1004-1011 [cit. 2024-05-18]. ISSN 00052728. doi:10.1016/j.bbabi.2014.01.015
- [30] STAHL, Wilhelm, Ulrike HEINRICH, Holger JUNGMANN, Helmut SIES a Hagen TRONNIER. Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2000, **71**(3), 795-798 [cit. 2024-05-18]. ISSN 00029165. doi:10.1093/ajcn/71.3.795
- [31] STAHL, Wilhelm a Helmut SIES. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2003, **24**(6), 345-351 [cit. 2024-05-18]. ISSN 00982997. doi:10.1016/S0098-2997(03)00030-X
- [32] BUZZINI, P. a A. MARTINI. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2002, **93**(6), 1020-1025 [cit. 2024-05-18]. ISSN 1364-5072. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01783.x
- [33] SILÁ³NIZ, MarÁa-Isabel, Eva-MarÁa PAYO, Miguel-Angel CALLEJO, Domingo MARQUINA a JosÁ© M PEINADO. Environmental adaptation factors of two yeasts isolated from the leachate of a uranium mineral heap. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2002, **210**(2), 233-237 [cit. 2024-05-18]. ISSN 03781097. doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11186.x
- [34] BOGUSŁAWSKA-WĄS, Elżbieta a Waldemar DĄBROWSKI. The seasonal variability of yeasts and yeast-like organisms in water and bottom sediment of the Szczecin Lagoon.

- International Journal of Hygiene and Environmental Health* [online]. 2001, **203**(5-6), 451-458 [cit. 2024-05-18]. ISSN 14384639. doi:10.1078/1438-4639-00056
- [35] MACGILLIVRAY, A R a M P SHIARIS. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1993, **59**(5), 1613-1618 [cit. 2024-05-18]. ISSN 0099-2240. doi:10.1128/aem.59.5.1613-1618.1993
- [36] ZAAS, Aimee K., Molly BOYCE, Wiley SCHELL, Barbara Alexander LODGE, Jackie L. MILLER a John R. PERFECT. Risk of Fungemia Due to *Rhodotorula* and Antifungal Susceptibility Testing of *Rhodotorula* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2003, **41**(11), 5233-5235 [cit. 2024-05-18]. ISSN 0095-1137. doi:10.1128/JCM.41.11.5233-5235.2003
- [37] WIRTH, Fernanda a Luciano Z. GOLDANI. Epidemiology of *Rhodotorula*: An Emerging Pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* [online]. 2012, **2012**, 1-7 [cit. 2024-05-18]. ISSN 1687-708X. doi:10.1155/2012/465717
- [38] MARTÍNEZ-PASTOR, María Teresa, Ana PEREA-GARCÍA a Sergi PUIG. Mechanisms of iron sensing and regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2017, **33**(4) [cit. 2024-05-18]. ISSN 0959-3993. doi:10.1007/s11274-017-2215-8
- [39] POOR, Catherine B., Seraphine V. WEGNER, Haoran LI, et al. Molecular mechanism and structure of the *Saccharomyces cerevisiae* iron regulator Aft2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2014, 2014-03-18, **111**(11), 4043-4048 [cit. 2024-05-18]. ISSN 0027-8424. doi:10.1073/pnas.1318869111
- [40] BLAISEAU, Pierre-Louis, Emmanuel LESUISSE a Jean-Michel CAMADRO. Aft2p, a Novel Iron-regulated Transcription Activator That Modulates, with Aft1p, Intracellular Iron Use and Resistance to Oxidative Stress in Yeast. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2001, **276**(36), 34221-34226 [cit. 2024-05-18]. ISSN 00219258. doi:10.1074/jbc.M104987200
- [41] RUTHERFORD, Julian C., Shulamit JARON, Esha RAY, Patrick O. BROWN a Dennis R. WINGE. A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2001, 2001-12-04, **98**(25), 14322-14327 [cit. 2024-05-18]. ISSN 0027-8424. doi:10.1073/pnas.261381198
- [42] COUREL, Maité, Sylvie LALLET, Jean-Michel CAMADRO a Pierre-Louis BLAISEAU. Direct Activation of Genes Involved in Intracellular Iron Use by the Yeast Iron-Responsive Transcription Factor Aft2 without Its Paralog Aft1. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2005, 2005-08-01, **25**(15), 6760-6771 [cit. 2024-05-18]. ISSN 1098-5549. doi:10.1128/MCB.25.15.6760-6771.2005
- [43] UETA, Ryo, Naoko FUJIWARA, Kazuhiro IWAI, Yuko YAMAGUCHI-IWAI a Karsten WEIS. Mechanism Underlying the Iron-dependent Nuclear Export of the Iron-responsive Transcription Factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* [online]. 2007, **18**(8), 2980-2990 [cit. 2024-05-18]. ISSN 1059-1524. doi:10.1091/mbc.e06-11-1054
- [44] YAMAGUCHI-IWAI, Yuko, Ryo UETA, Ayako FUKUNAKA a Ryuzo SASAKI. Subcellular Localization of Aft1 Transcription Factor Responds to Iron Status in

- Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2002, **277**(21), 18914-18918 [cit. 2024-05-18]. ISSN 00219258. doi:10.1074/jbc.M200949200
- [45] UETA, Ryo, Naoko FUJIWARA, Kazuhiro IWAI a Yuko YAMAGUCHI-IWAI. Iron-Induced Dissociation of the Aft1p Transcriptional Regulator from Target Gene Promoters Is an Initial Event in Iron-Dependent Gene Suppression. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2012, 2012-12-01, **32**(24), 4998-5008 [cit. 2024-05-18]. ISSN 1098-5549. doi:10.1128/MCB.00726-12
- [46] LI, Liangtao, Xuan JIA, Diane M. WARD a Jerry KAPLAN. Yap5 Protein-regulated Transcription of the TYW1 Gene Protects Yeast from High Iron Toxicity. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2011, **286**(44), 38488-38497 [cit. 2024-05-18]. ISSN 00219258. doi:10.1074/jbc.M111.286666
- [47] PIMENTEL, Catarina, Cristina VICENTE, Regina Andrade MENEZES, Soraia CAETANO, Laura CARRETO, Claudina RODRIGUES-POUSADA a Yoshiaki TSUJI. The Role of the Yap5 Transcription Factor in Remodeling Gene Expression in Response to Fe Bioavailability. *PLoS ONE* [online]. 2012, 2012-5-16, **7**(5) [cit. 2024-05-18]. ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0037434
- [48] CHEN, Opal S., Robert J. CRISP, Martin VALACHOVIC, Martin BARD, Dennis R. WINGE a Jerry KAPLAN. Transcription of the Yeast Iron Regulon Does Not Respond Directly to Iron but Rather to Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2004, **279**(28), 29513-29518 [cit. 2024-05-18]. ISSN 00219258. doi:10.1074/jbc.M403209200
- [49] KUMÁNOVICS, Attila, Opal S. CHEN, Liangtao LI, et al. Identification of FRA1 and FRA2 as Genes Involved in Regulating the Yeast Iron Regulon in Response to Decreased Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2008, **283**(16), 10276-10286 [cit. 2024-05-18]. ISSN 00219258. doi:10.1074/jbc.M801160200
- [50] PHILPOTT, Caroline C. Yeast Iron Metabolism. In: ANDERSON, Gregory J. a Gordon D. MCLAREN, ed. *Iron Physiology and Pathophysiology in Humans* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2012, s. 653-667 [cit. 2024-05-18]. ISBN 978-1-60327-484-5. doi:10.1007/978-1-60327-485-2_30
- [51] LI, Liangtao, Dustin BAGLEY, Diane M. WARD a Jerry KAPLAN. Yap5 Is an Iron-Responsive Transcriptional Activator That Regulates Vacuolar Iron Storage in Yeast. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2008, 2008-02-01, **28**(4), 1326-1337 [cit. 2024-05-18]. ISSN 1098-5549. doi:10.1128/MCB.01219-07
- [52] PIMENTEL, Catarina, Cristina VICENTE, Regina Andrade MENEZES, Soraia CAETANO, Laura CARRETO, Claudina RODRIGUES-POUSADA a Yoshiaki TSUJI. The Role of the Yap5 Transcription Factor in Remodeling Gene Expression in Response to Fe Bioavailability. *PLoS ONE* [online]. 2012, 2012-5-16, **7**(5) [cit. 2024-05-18]. ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0037434
- [53] LI, Liangtao, Xuan JIA, Diane M. WARD a Jerry KAPLAN. Yap5 Protein-regulated Transcription of the TYW1 Gene Protects Yeast from High Iron Toxicity. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2011, **286**(44), 38488-38497 [cit. 2024-05-18]. ISSN 00219258. doi:10.1074/jbc.M111.286666

- [54] MARTÍNEZ-PASTOR, María Teresa, Ana PEREA-GARCÍA a Sergi PUIG. Mechanisms of iron sensing and regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2017, **33**(4) [cit. 2024-05-18]. ISSN 0959-3993. doi:10.1007/s11274-017-2215-8
- [55] KIELISZEK, Marek, Stanisław BŁAŻEJAK, Iwona GIENKA a Anna BZDUCHA-WRÓBEL. Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2015, **99**(13), 5373-5382 [cit. 2024-05-18]. ISSN 0175-7598. doi:10.1007/s00253-015-6650-x
- [56] BORKOWSKI, J. a B. DYKI. Selen - pierwiastek ważny dla zdrowia, fascynujący dla badacza. *Wiadomości Botaniczne*. 2008, **52**(52), 145-148.
- [57] MAPELLI, Valeria, Peter R. HILLESTRØM, Kalpesh PATIL, Erik H. LARSEN a Lisbeth OLSSON. The interplay between sulphur and selenium metabolism influences the intracellular redox balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* [online]. 2012, **12**(1), 20-32 [cit. 2024-05-18]. ISSN 15671356. doi:10.1111/j.1567-1364.2011.00757.x
- [58] KIELISZEK, Marek, Stanisław BŁAŻEJAK, Iwona GIENKA a Anna BZDUCHA-WRÓBEL. Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2015, **99**(13), 5373-5382 [cit. 2024-05-18]. ISSN 0175-7598. doi:10.1007/s00253-015-6650-x
- [59] LAZARD, Myriam, Nguyet-Thanh HA-DUONG, Stéphanie MOUNIÉ, Romary PERRIN, Pierre PLATEAU a Sylvain BLANQUET. Selenodiglutathione uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar ATP-binding cassette transporter Ycf1p. *The FEBS Journal* [online]. 2011, **278**(21), 4112-4121 [cit. 2024-05-18]. ISSN 1742-464X. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08318.x
- [60] MAPELLI, Valeria, Peter R. HILLESTRØM, Emese KÁPOLNA, Erik H. LARSEN a Lisbeth OLSSON. Metabolic and bioprocess engineering for production of selenized yeast with increased content of seleno-methylselenocysteine. *Metabolic Engineering* [online]. 2011, **13**(3), 282-293 [cit. 2024-05-18]. ISSN 10967176. doi:10.1016/j.ymben.2011.03.001
- [61] KIELISZEK, Marek, Stanisław BŁAŻEJAK, Iwona GIENKA a Anna BZDUCHA-WRÓBEL. Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2015, **99**(13), 5373-5382 [cit. 2024-05-18]. ISSN 0175-7598. doi:10.1007/s00253-015-6650-x
- [62] OSTERC, Andrej, Á tefan FUJS, Peter RASPOR a Vekoslava STIBILJ. *Saccharomyces cerevisiae*: the effect of different forms and concentrations of iodine on uptake and yeast growth. *FEMS Yeast Research* [online]. 2009, **9**(1), 45-51 [cit. 2024-05-18]. ISSN 15671356. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00449.x
- [63] EVROPSKÝ ÚŘAD PRO BEZPEČNOST POTRAVIN. Glossary. *Glossary / EFSA* [online]. 2023 [cit. 2024-05-18]. <https://www.efsa.europa.eu/en/glossary-taxonomy-terms>
- [64] ANDREWS, Nancy C. Disorders of Iron Metabolism. *New England Journal of Medicine* [online]. 1999, 1999-12-23, **341**(26), 1986-1995 [cit. 2024-05-18]. ISSN 0028-4793. doi:10.1056/NEJM199912233412607

- [65] Scientific Opinion on Dietary Reference Values for iron. *EFSA Journal* [online]. 2015, **13**(10) [cit. 2024-05-18]. ISSN 18314732. doi:10.2903/j.efsa.2015.4254
- [66] BEHNE, Dietrich, Horst HILMERT, Stefan SCHEID, Hildegard GESSNER a Walter ELGER. Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 1988, **966**(1), 12-21 [cit. 2024-05-18]. ISSN 03044165. doi:10.1016/0304-4165(88)90123-7
- [67] Scientific Opinion on Dietary Reference Values for iodine. *EFSA Journal* [online]. 2014, **12**(5) [cit. 2024-05-18]. ISSN 18314732. doi:10.2903/j.efsa.2014.3660
- [68] Scientific Opinion on Dietary Reference Values for iron. *EFSA Journal* [online]. 2015, **13**(10) [cit. 2024-05-18]. ISSN 18314732. doi:10.2903/j.efsa.2015.4254
- [69] Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium. *EFSA Journal* [online]. 2014, **12**(10) [cit. 2024-05-18]. ISSN 18314732. doi:10.2903/j.efsa.2014.3846
- [70] TURCK, Dominique, Torsten BOHN, Jacqueline CASTENMILLER, et al. Scientific opinion on the tolerable upper intake level for selenium. *EFSA Journal* [online]. 2023, **21**(1) [cit. 2024-05-18]. ISSN 18314732. doi:10.2903/j.efsa.2023.7704
- [71] CHRISTIE, William W. a Xianlin HAN. *Lipid analysis*. 4. Bridgewater:The Oil Press, 2010. ISBN 978-0-9552512-4-5.
- [72] AOCS. *AOCS Official Method Ce 2-66*. 7.
- [73] SNYDER, Lloyd R., Joseph J. KIRKLAND a John W. DOLAN. *Introduction to Modern Liquid Chromatography* [online]. Wiley, 2009 [cit. 2024-05-18]. ISBN 9780470167540. doi:10.1002/9780470508183
- [74] SWARTZ, Michael E. UPLC™: An Introduction and Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [online]. 2007, 2007-02-06, **28**(7-8), 1253-1263 [cit. 2024-05-18]. ISSN 1082-6076. doi:10.1081/JLC-200053046
- [75] RIVERA, S.M. a R. CANELA-GARAYOA. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, **1224**, 1-10 [cit. 2024-05-18]. ISSN 00219673. doi:10.1016/j.chroma.2011.12.025
- [76] LUKŠÍKOVÁ, Lada. *HPLC analýza léčiv*. Hradec Králové, 2009. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze.
- [77] MCNAIR, Harold M., James M. MILLER a Nicholas H. SNOW. *Basic Gas Chromatography*. 3. John Wiley, 2019. ISBN 978-1-119-45075-7.
- [78] IJABADENIYI, Oluwatosin Ademola, ed. *Food Science and Technology* [online]. De Gruyter, 2023 [cit. 2024-05-18]. ISBN 9783111013107. doi:10.1515/9783111013107
- [79] NGERE, Judith B., Kourosh H. EBRAHIMI, Rachel WILLIAMS, Elisabete PIRES, John WALSBY-TICKLE a James S. O. MCCULLAGH. Ion-Exchange Chromatography Coupled to Mass Spectrometry in Life Science, Environmental, and Medical Research. *Analytical Chemistry* [online]. 2023, 2023-01-10, **95**(1), 152-166 [cit. 2024-05-18]. ISSN 0003-2700. doi:10.1021/acs.analchem.2c04298

- [80] YAMAMOTO, Shuichi, Kazahiro NAKANISHI a Ryuichi MATSUNO. ION-EXCHANGE EQUILIBRIA. In: *Ion-Exchange Chromatography of Proteins* [online]. CRC Press, 1988, s. 121-158 [cit. 2024-05-18]. ISBN 9780429173790. doi:10.1201/b15751-8
- [81] THOMPSON, Michael a J. Nicholas WALSH. *Handbook of Inductively Coupled Plasma Spectrometry* [online]. Boston, MA: Springer US, 1989 [cit. 2024-05-18]. ISBN 978-1-4612-8037-8. doi:10.1007/978-1-4613-0697-9
- [82] MONTASER, Akbar, GOLIGHTLY, D.W., ed. *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry. 2.* VCH Publishers, 1992. ISBN 978-0-471-18811-7.
- [83] NYIKA, Joan, Ednah ONYARI, Megersa Olumana DINKA a Shivani Bhardwaj MISHRA. A Comparison of Reproducibility of Inductively Coupled Spectrometric Techniques in Soil Metal Analyses. *Air, Soil and Water Research* [online]. 2019, **12** [cit. 2024-05-18]. ISSN 1178-6221. doi:10.1177/1178622119869002

8 POUŽITÉ ZKRATKY

MK – Mastné kyseliny

SFA – Saturated fatty acids (nasycené mastné kyseliny)

MUFA – Monounsaturated fatty acids (mononenasycené mastné kyseliny)

PUFA – Polyunsaturated fatty acids (polynenasycené mastné kyseliny)

HPLC – High performance liquid chromatography (vysokoúčinná plynová chromatografie)

DAD – Diode array detector (detektor s diodovým polem)

GC – Gas chromatography (plynová chromatografie)

FID – Flame ionization detector (detektor fungující na bázi detekce ionizace plamene)

ICP – Induction coupled plasma (indukčně vázaná plazma)

OES – Optical emission spectrometry (emisní spektrometrie)

IC – Ion chromatography (iontová chromatografie)