



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

PRODUKCE PIGMENTŮ A LIPIDICKÝCH LÁTEK MIKROORGANISMY NA ODPADNÍCH SUBSTRÁTECH POTRAVINÁŘSKÉHO PRŮMYSLU

PRODUCTION OF PIGMENTS AND LIPID SUBSTANCES BY MICROORGANISMS ON WASTE
SUBSTRATES OF THE FOOD INDUSTRY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Dagmar Hladká

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Martin Szotkowski

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1510/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Dagmar Hladká**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Martin Szotkowski**

Název bakalářské práce:

Produkce pigmentů a lipidických látek mikroorganismy na odpadních substrátech potravinářského průmyslu

Zadání bakalářské práce:

V rámci této práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- Přehledná literární rešerše zaměřená na vybrané kmeny mikrořas a červených kvasinek
- Optimalizace kultivačních podmínek pro jednotlivé kmeny s cílem zisku obohacené biomasy
- Indukce produkce vybraných látek s využitím exogenních stresů
- Optimalizace extrakčních postupů pro jednotlivé kmeny mikroorganismů
- Vyhodnocení výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

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

Dagmar Hladká
student(ka)

Ing. Martin Szotkowski
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce se zabývá produkcí karotenoidů, lipidů a jiných látek vybranými kmeny karotenogenních kvasinek, autotrofních řas. Vybrané kmeny byly kultivovány v produkčním médiu o různém složení, obsahujícím odpadní substráty z potravinářského průmyslu. Vybrané kmeny byly vystaveny různé formě stresu, za účelem zvýšení produkce zmíněných metabolitů.

Teoretická část nám poskytuje informace o daných kmenech kvasinek a řas, dále informace o sledovaných metabolitech jako jsou lipidy, karotenoidy, ergosterol, ubichinon a chlorofyl. V neposlední řadě se studie zabývá možností stanovení těchto látek.

Experimentální část vysvětluje postupy kultivace jednotlivých kmenů kvasinek a mikrořas. Dále se zaměřuje na popis jednotlivých metod stanovení sledovaných metabolitů.

Výsledková část porovnává produkci biomasy, metabolitů a lipidů jednotlivými kmeny kvasinek a mikrořas. Jako vybrané kvasinek byly použity *Sporidiobolus pararoseus*, *Sporidiobolus metaroseus*, *Sporobolomyces roceus*, *Phaffia rhodozyma* a *Dioszegia hungarica*. Vybranými kmeny mikrořas byly *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus quadricauda*, *Scenedesmus dimorphus* a *Chlamydomonas reinhardtii*. U zmíněných kmenů byly testovány optimální podmínky média pro produkci metabolitů a lipidů. Z našich výsledků vyplývá, že optimální poměr uhlíku a dusíku pro produkci sledovaných metabolitů při aplikaci kávového hydrolyzátu byl C/N 13 a C/N 25. U mikrořas měla zvýšená koncentrace dusíkatého zdroje negativní vliv na produkci lipidů. Nejvhodnější kmen mikrořas pro využití dusíku v různých koncentracích byl *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sporidiobolus metaroseus* se poté prokázal jako nejvhodnější kmen pro produkci metabolitů s využitím kávového hydrolyzátu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikrořasy, karotenogenní kvasinky, lipidy, karotenoidy, HPLC/PDA, GC/FID, syrovátka, kávový hydrolyzát

ABSTRACT

The presented study is focused on production of carotenoids, lipids and other substances by carotenogenic yeasts and autotrophic algae. Studied strains were cultivated in media with different composition, including waste substrates from food industry. Studied strains were cultivated under stress conditions to enhance the production of desired metabolites.

The theoretical part deals with the information about yeasts and algae, with the information about monitored metabolites such as lipids, carotenoids, ergosterol, ubiquinone or chlorophyll. Furthermore, the theoretical part deals with possible methods of metabolite analysis.

The experimental part deals with the description of cultivation of yeasts and algae. Also experimental part is focused on the description of individual methods.

The result part deals with comparison of production of biomass, metabolites and lipids. The selected strains of yeast were *Sporidiobolus pararoseus*, *Sporidiobolus metaroseus*, *Sporobolomyces roseus*, *Phaffia rhodozyma* and *Dioszegia hungarica*. The selected strains of algae were *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus quadricauda*, *Scenedesmus dimorphus* and *Chlamydomonas reinhardtii*. We were optimized conditions for metabolites and lipids production. Optimal medium, which contained coffee hydrolyzate was with carbon to nitrogen ratio C/N 25. Nitrogen in higher concentration had negative effect on production of lipids. The most suitable strain for effective use of nitrogen in different concentrations was *Chlamydomonas reinhardtii*. The most suitable strain of yeast for effective use of coffee hydrolyzate was *Sporidiobolus metaroseus*.

KEYWORDS

Microalgae, carotenogenic yeasts, lipids, carotenoids, HPLC/PDA, GC/FID, whey, coffee hydrolyzate

HLADKÁ, Dagmar. *Produkce pigmentů a lipidických látek mikroorganismy na odpadních substrátech potravinářského průmyslu* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-07-25]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123938>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martin Szotkowski.

Prohlášení

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

.....

podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce panu Ing. Martinu Szotkowskiému za odborné vedení práce, cenné rady a nesmírnou ochotu při jejím řešení. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu po celou dobu mého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Kvasinky	9
2.1.1	Červené kvasinky	9
2.1.2	Rod <i>Phaffia</i>	9
2.1.3	Rody <i>Sporidiobolus</i> a <i>Sporobolomyces</i>	10
2.1.4	Rod <i>Dioszegia</i>	11
2.2	Řasy	11
2.2.1	Rod <i>Desmodesmus</i>	12
2.2.2	Rod <i>Chlamydomonas</i>	12
2.2.3	Rod <i>Scenedesmus</i>	13
2.3	Karotenoidy	13
2.3.1	Struktura karotenoidů	13
2.3.2	Funkce	14
2.3.3	Biosyntéza karotenoidů	14
2.3.4	Isoprenoidy, isopren a syntéza IPP a DMAPP	14
2.4	Ergosterol.....	16
2.5	Ubichinon	17
2.6	Chlorofyl.....	17
2.7	Lipidy.....	18
2.7.1	Složení lipidů.....	18
2.7.2	Biosyntéza mastných kyselin	18
2.7.3	Biosyntéza triacylglycerolů.....	19
2.8	Odpadní substráty potravinářského průmyslu	20
2.9	Metody buněčných analýz	20
2.9.1	Extrakce.....	20
2.9.2	Transesterifikace	21
2.9.3	Spektrofotometrie	21
2.9.4	Chromatografie.....	21
3	CÍL PRÁCE	23
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
4.1	Použité chemikálie.....	24
4.1.1	Chemikálie použité pro kultivaci kvasinek	24
4.1.2	Chemikálie použité pro kultivaci řas.....	24
4.1.3	Chemikálie použité pro extrakce	24
4.1.4	Chemikálie použité pro transesterifikaci a analýzu pro HPLC a GC	24
4.2	Přístroje a pomůcky	25

4.3	Použité kmeny mikroorganismů	26
4.3.1	Kmeny kvasinek	26
4.3.2	Kmeny mikrořas	26
4.4	Kultivace kvasinek	26
4.4.1	Inokulum 1/Inokulum 2	26
4.4.2	Produkční médium	27
4.5	Kultivace mikrořas	27
4.5.1	Aplikace dusíku a světelného stresu	28
4.6	Zpracování a analýza vzorků	29
4.6.1	Stanovení nárůstu biomasy a její zpracování	29
4.6.2	Extrakce pigmentů pro HPLC	29
4.6.3	Analýza pigmentů a lipidických látek	29
4.6.4	Transesterifikace vzorku biomasy	30
4.6.5	Analýza lipidů pomocí plynové chromatografie	30
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	31
5.1	Kvasinky	31
5.1.1	Kmen <i>Sporidiobolus pararoseus</i>	31
5.1.2	Kmen <i>Sporidiobolus metaroseus</i>	35
5.1.3	Kmen <i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	39
5.1.4	Kmen <i>Sporobolomyces roseus</i>	43
5.1.5	Kmen <i>Dioszegia hungarica</i>	46
5.1.6	Kmen <i>Phaffia rhodozyma</i>	47
5.2	Řasy	50
5.2.1	Kmen <i>Desmodesmus quadricauda</i>	51
5.2.2	Kmen <i>Desmodesmus acutus</i>	52
5.2.3	Kmen <i>Scenedesmus dimorphus</i>	55
5.2.4	Kmen <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	57
5.2.5	Porovnání produkce biomasy a ostatních metabolitů u vybraných řas	59
6	ZÁVĚR	61
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	63
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	66
9	PŘÍLOHY	67

1 ÚVOD

Biologické procesy jsou nezbytné v řadě průmyslových odvětví jako je potravinářství, farmaceutický průmysl, medicína, zemědělství a odpadové hospodářství. V současné době vzrůstá zájem o obnovitelné zdroje energie využitím biomasy, a to kvůli postupnému vyčerpávání zásob vlivem vzrůstající spotřeby, ke které přispěla populační exploze. Mikroorganismy dokáží syntetizovat chemické látky při využití odpadních substrátů z potravinářského průmyslu. Mezi tyto chemické látky patří například koenzym Q, provitamin A, provitamin D (ergosterol). Díky schopnosti syntetizovat tyto látky, se mikroorganismy dostaly do středu zájmu, neboť se vědci snaží nalézt nejvhodnější producenty a zároveň objevit optimální podmínky produkce požadovaných látek. Způsob syntézy pomocí mikroorganismů je prostředek pro efektivní a levnější produkci. Zlevnění spočívá v možnosti využití odpadních produktů jako jsou živočišné tuky, syrovátka nebo kávový hydrolyzát. Živočišné tuky vznikají jako odpadní produkt při živočišné výrobě. Surovátka je odpadní produkt při výrobě mléčných produktů. Kávový hydrolyzát se vyrábí z kávové sedliny, která vzniká majoritně jako odpad při výrobě instantních káv.

Karotenoidy jsou přírodní pigmenty, které skýtají širokou škálu významných vlastností. Jsou to prekursory vitamínů a hormonů. Slouží jako antioxidanty, neboť snižují vznik kyslíkových radikálů, čímž omezují proces oxidace. Mají pozitivní účinek proti řadě chorob jako je rakovina, také slouží jako ochrana před slunečním zářením. Využití nacházejí v řadě odvětví jako je potravinářský, zemědělský, kosmetický a farmaceutický průmysl. Ve farmaceutickém průmyslu se uplatňuje zejména provitamin A a provitamin D. Koenzym Q patří mezi účinné antioxidanty, také hraje roli při tvorbě energie. Uplatnění nalézá v kosmetickém průmyslu a jako doplněk stravy.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

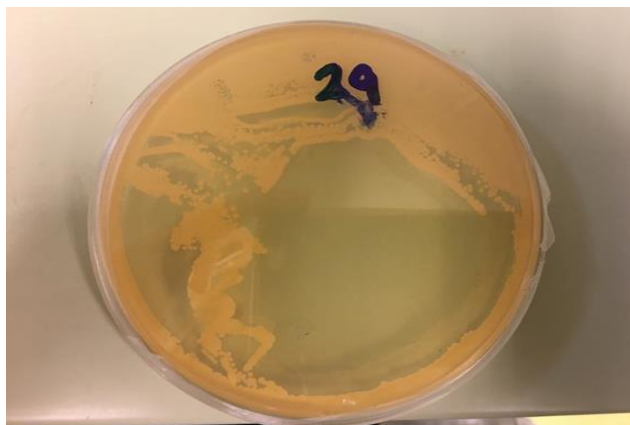
Kvasinky patří mezi eukaryotické organismy. Řadí se do říše hub, jedná se o jednobuněčné mikroorganismy. Kvasinky se rozmnožují převážně nepohlavně, tzn. pučením. Tento způsob rozmnožování se označuje jako vegetativní rozmnožování. Pohlavní způsob rozmnožování je rovněž možný. Název „kvasinky“ pochází od schopnosti zkvašovat sacharidy za následné tvorby ethanolu a oxidu uhličitého. Velikostně je buňka větší než bakteriální. Rozmezí velikostí je mezi 3 až 40 μm . Pro každý rod je typický určitý tvar buněk. Převládá především rotační elipsoid nebo kulatý, až protáhlý tvar. Kvasinky patří mezi chemoheterotrofní organismy, neboť využívají jako zdroj uhlíku a energie organické komponenty jako jsou monosacharidy (glukosa, fruktosa, xylosa, galaktosa), disacharidy (sacharosa, maltosa, laktosa) nebo oligosacharidy (maltotriosa, rafinosa), dále pak glycerol, laktát, ethanol, methanol nebo alkoholy. Kvasinky se vyskytují v půdě, vodě, na rostlinách, převážně pak na listech a květech. Díky svým sacharolytickým vlastnostem se vyskytují na ovoci a dalších cukernatých potravinách. Na základě sexuálního rozmnožování se kvasinky rozdělují na rody tvořící askospory, rody tvořící bazidiospory, sporidie a heterokaryotní mycelium a rody, jejichž tvorba spor není známá [1], [2], [6].

2.1.1 Červené kvasinky

Červené kvasinky řadíme do skupiny *Basidiomycetae*. Jejich název vychází z barvy pigmentů karotenoidů (červená, oranžová, žlutá), která je dána akumulací barviv v buňkách. Typickou vlastností těchto pigmentů je jejich nerozpustnost ve vodě a v tucích [1].

2.1.2 Rod *Phaffia*

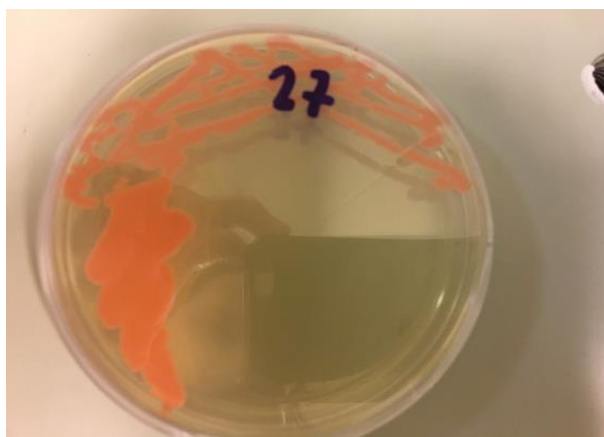
Kmen *Phaffia rhodozyma* byl izolován z exudátu na stromech v Japonsku a Severní Americe. Typickým znakem tohto kmenu je elipsovité tvar buňky. Buňky mohou být jednotlivé, v párech nebo krátkých řetízkách. Na agaru tento kmen vytváří hladký pomerančovo-červený nátěr. Tento kmen neobsahuje torulen, ani torularhodin, naopak obsahuje astaxanthin. Astaxanthin je ketoderivát karotenoidů. Jedná se o jediný druh červených kvasinek schopný zkvašovat sacharidy po delším čase a nižší teplotě. Kvasinka nachází využití jako zdroj látek pro kraby, raky, prvoky a perloočky [2].



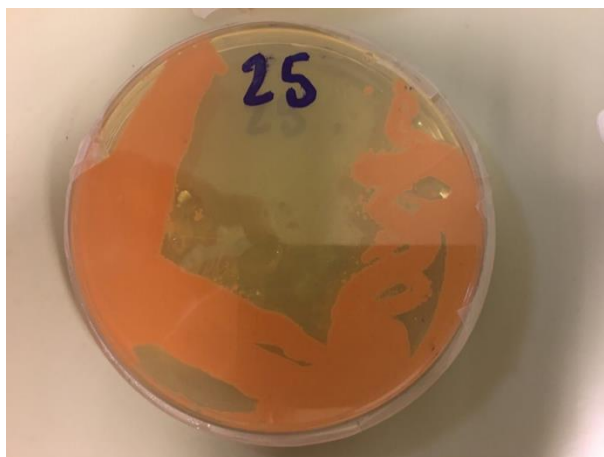
Obrázek 1: *Phaffia rhodozyma*

2.1.3 Rody *Sporidiobolus* a *Sporobolomyces*

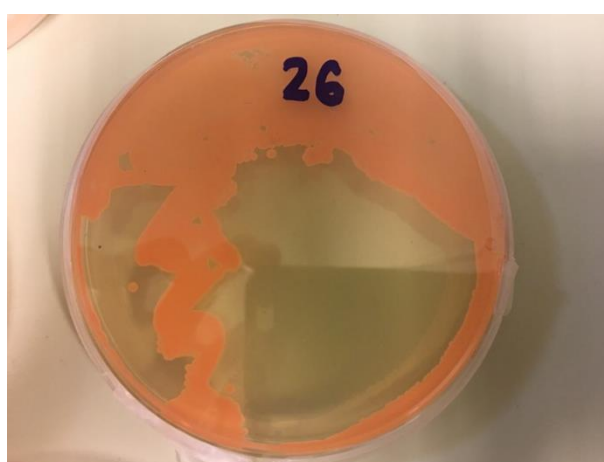
Tyto rody patří do skupiny rodů tvořící sporidie. *Sporidiobolus* je perfektní stadium rodu *Sporobolomyces*. Jejich metabolismus je přísně aerobní, nemají kvasné schopnosti. Typická je pro ně tvorba kolonií zvrásněného charakteru. Obsahují pigmenty, které zbarvují jak buňky, tak celé kolonie. Vytváří balistospory což jsou vegetativní exospory. Tyto exospory jsou odmršťovány ze svých stopek, dopadají na kolonie, čímž tvoří zvrásněný povrch. Tyto rody dále tvoří zhruba 50 % kvasinkové populace povrchových vod slaných i sladkých. Kmen *Sporidiobolus salmonicolor* byl izolován z mořské vody v okolí Azor. Typická je pro tento kmen tvorba sekundárních kolonií. Tvar buněk je elipsovité až protáhlý. Buňky mohou být jednotlivé, v párech nebo vytváří pravé i nepravé hyfy. Nátěr na agaru má lososovo-růžovou barvu. U kmene *Sporobolomyces roseus* je tvar buněk elipsovité, kulovité až protáhlý. Nátěr na agaru má pomerančovou barvu hladkého charakteru. Typickým výskytem je fyto sféra a atmosféra, kde jako zdroj dusíku využívají nitrát nebo redukované formy dusíkatých sloučenin. Kmen *Sporidiobolus pararoseus* má tvar buněk, který je kulovité až elipsovité. Nátěr na agaru vytváří lososovou barvu [2], [6].



Obrázek 2: *Sporidiobolus pararoseus*



Obrázek 3: *Sporidiobolus salmonicolor*



Obrázek 4: *Sporidiobolus metaroseus*

2.1.4 Rod *Dioszegia*

Kmen *Dioszegia hungarica* byl izolován z půdy v Maďarsku. Charakteristickým znakem jsou kulovité nebo krátké elipsovité buňky. Vyznačuje se pomalým růstem při optimální teplotě okolo 20 °C. Nátěr na agaru má oranžovo-červenou barvu [2].

2.2 Řasy

Řasy jsou nejjednodušší autotrofní organismy. V přírodě jsou hojně rozšířené, zejména pak ve vodách sladkých i slaných, na kmenech stromů, ledovcích nebo horských pramenech. Mají schopnost provádět fotosyntézu. Řasy jsou symbionti, neboť mohou vstupovat do symbiotického vztahu například s houbami. Řasy mají obrovskou variabilitu, co se týká velikosti. Velikost se pohybuje v desítkách mikrometrů až po desítky metrů. Na základě velikosti rozlišujeme, zda se jedná o mikrořasy nebo makrořasy. Pro správný růst řas je důležitý zdroj světla, zdroj uhlíku, dusíku, fosforu, hořčíku a silikátů. Řasy dělíme do různých skupin, například podle pigmentů na zelené druhy řas, červené druhy řas a hnědé druhy řas. Zelené druhy řas obsahují především chlorofyl A, chlorofyl B, lutein, zeaxanthin a β -karoten. Hnědé druhy řas obsahují chlorofyl C a β -karoten. Červené druhy řas produkují chlorofyl D, β -karoten, zeaxanthin, fykoerythrin a fykocyanin. Pro zelené řasy je charakteristická buněčná stěna

z celulosy, buňky jsou hruškovitého tvaru s přítomností bičíku. Typické je nepohlavní rozmnožování dělením buněk, fragmentací stélky nebo pohlavní rozmnožování kopulací gamet. 90 % zelených řas se nachází v planktonu a bentosu sladkých vod [9], [10], [11], [13].

2.2.1 Rod *Desmodesmus*

Tento rod patří do oddělení *Chlorophyta*, do třídy *Chlorophyceae*. Jedná se o zelené řasy, vyskytující se ve sladkovodních vodách. Nachází se, buď jako jednobuněčná řasa, častěji pak vytváří kolonie. Velikost buněk se pohybuje v desítkách mikrometrů. Typická je pro tento rod tvorba cenobií, jako ochrana před nepříznivými podmínkami. Tlustá buněčná stěna slouží jako ochrana před predátory. Tento rod se často využívá jako modelový organismus [13].



Obrázek 5: *Desmodesmus acutus* [27]

2.2.2 Rod *Chlamydomonas*

Tento rod patří také do oddělení *Chlorophyta*, do třídy *Chlorophyceae*. Častým výskytem je plankton stojatých vod. Buňky se nacházejí výhradně jednotlivě. Typický tvar buňky je kulovitý, válcovitý či hruškovitý. Buňka obsahuje dvě pulsující vakuoly v oblasti kořene bičíků. Dále buňka obsahuje 2 nebo 4 bičíky. Může mít pohlavní i nepohlavní rozmnožování. U nepohlavního rozmnožování se protoplast mateřské buňky rozděluje na dvě, čtyři nebo osm dceřiných protoplastů, které se opatří bičíky a skrze matečnou membránu se dostanou ven v podobě zoospor. Při pohlavním rozmnožování gamety vznikají podobně jako zoospory. Mezi zástupce patří například *Chlamydomonas Reinhardtii* [12], [13].



Obrázek 6: *Chlamydomonas reinhardtii* [28]

2.2.3 Rod *Scenedesmus*

Rod *Scenedesmus*, patřící do třídy *Chlorophyceae*, se řadí mezi sladkovodní zelené řasy. Pro tento rod je typický výskyt v jednobuněčné formě či ve formě kolonií. Velikosti buněk u jednotlivých kmenů se liší. Délka buněk se pohybuje mezi 3 až 78 μm . Šířka buněk se pohybuje od 2 do 10 μm . Tento rod se hojně vyskytuje ve sladkovodních jezerech a rybnících. Využití nachází při čištění odpadních vod jako donor kyslíku pro bakterie, které organický odpad odbourávají. Mezi zástupce patří například *Scenedesmus dimorphus* [12].

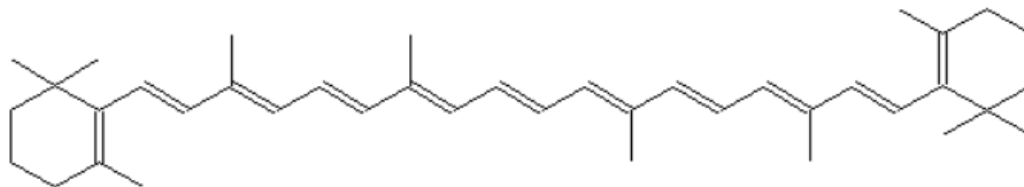
2.3 Karotenoidy

Karotenoidy patří mezi přírodní pigmenty, které vytváří řada organismů, a to například kvasinky, bakterie, vláknité houby a rostliny. Pigmenty poskytují významné biologické účinky, neboť jsou dobrými antioxidanty. Podle struktury, respektive podle počtu cyklických jader můžeme karotenoidy rozdělit na acyklické, monocyklické a dicyklické. Mezi acyklické patří fytoen, fytofluen, δ -karoten, neurosporen a lykopen. Mezi monocyklické patří torulen, torularhodin, γ -karoten, β -zeakaroten. Mezi dicyklické patří β -karoten. Mezi hlavní pigmenty obsažené v karotenogenních kvasinkách patří β -karoten, γ -karoten, torulen a torularhodin. Producenti karotenoidů jsou řasy, plísňe i bakterie. Nacházejí se na listech rostlin i živočišných organismech jako je humr a losos, v tukových tkáních se ukládají jako zásobní látky. Využití nacházejí v potravinářském, farmaceutickém, kosmetickém a zemědělském průmyslu [2], [3], [5].

2.3.1 Struktura karotenoidů

Patří mezi terpenoidy složené z osmi izoprenových jednotek. Molekuly karotenoidů obsahují 40 uhlíků. Řetězec může být alifatický, nebo na svých koncích obsahuje šestičlenné nebo pětičlenné cykly. Variabilita karotenoidů je poté dána různou formou zakončení na obou stranách řetězce. Karotenoidy dělíme do dvou skupin: karoteny a xanthofyly. Xanthofyly jsou odvozené od karotenů, jedná se o kyslíkaté sloučeniny. Mezi zástupce karotenů patří lykopen, β -karoten, α -karoten, γ -karoten, torulen a torularhodin. Lykopen je nejjednodušší karoten, jedná

se o acyklický polynasycený uhlovodík. β -karoten je provitaminem A. Nachází využití jako potravinové barvivo, často se pak nachází v másle, sýrech. Torulen se vyznačuje dobrými antioxidačními vlastnostmi. Mezi zástupce xanthofylů patří astaxanthin, jedná se o červené barvivo [3], [7].



Obrázek 7: Vzorec betakarotenu [15]

2.3.2 Funkce

Karotenoidy plní řadu funkcí, například mají antioxidační vlastnosti. Jinými slovy, slouží k odebírání reaktivní formy kyslíku, který může způsobovat narušení struktury buněk a tkání, vedoucí ke vzniku nádorových a jiných onemocnění. Jsou dobrou ochranou buněk před ultrafialovým zářením. V rostlinách plní karotenoidy nezastupitelnou roli jako anténní barviva ve fotosyntetickém aparátu [7].

2.3.3 Biosyntéza karotenoidů

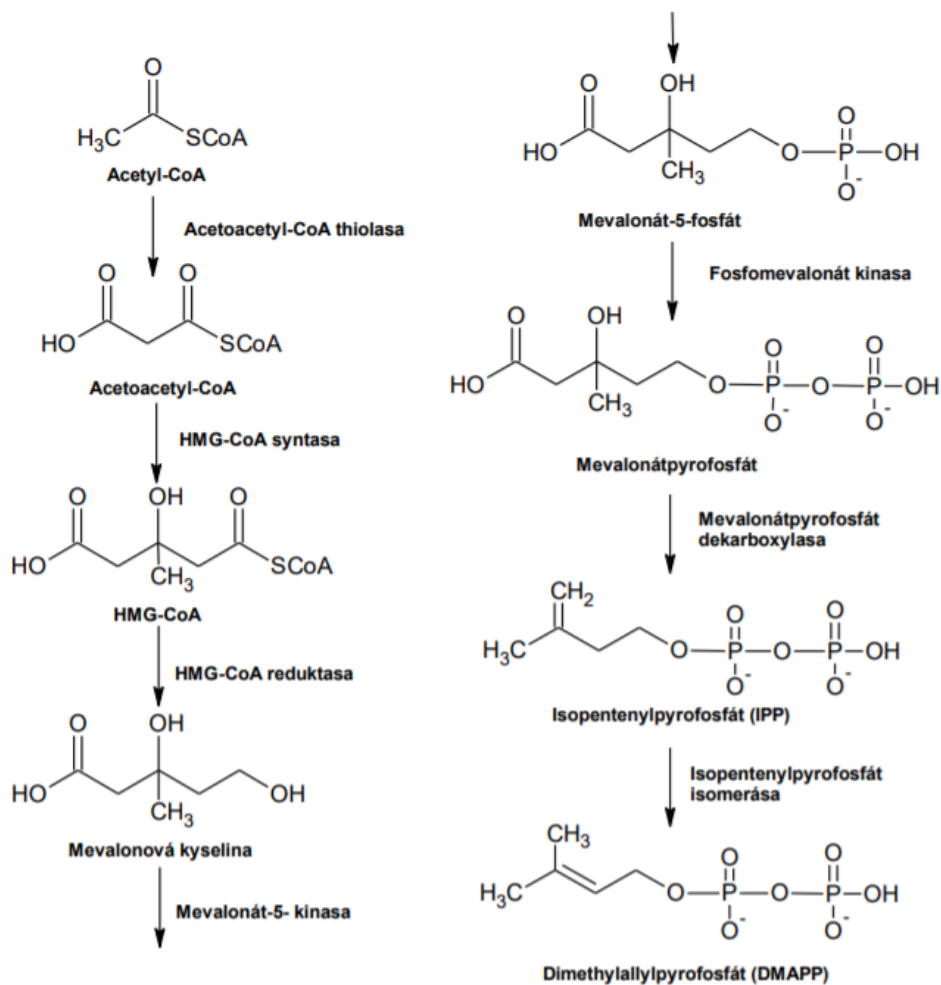
Izoprenoidní metabolická dráha produkuje karotenoidy, jejich syntéza probíhá ve dvou krocích. Do prvního kroku řadíme syntézu isopentenylpyrofosfátu (dále IPP). Do druhého kroku patří kondenzace IPP. Kondenzace může probíhat následujícími způsoby: „hlava-pata“, „pata-pata“ nebo „hlava-hlava“. IPP a dimethylallylpyrofosfát (dále DMAPP) jsou aktivované formy izoprenu [16], [17].

2.3.4 Isoprenoidy, isopren a syntéza IPP a DMAPP

Izoprenoidy jsou nezbytnou součástí živých organismů. Mezi izoprenoidy patří vonné látky, jedy, růstové faktory, silice a steroly. Isopren můžeme nalézt ve fosilních palivech a živých organismech. IPP můžeme syntetizovat pomocí mevalonátové cesty nebo pomocí deoxy-D-xylulosa-5-fosfátové dráhy [14], [16].

2.3.4.1 Biosyntéza mevalonátovou dráhou

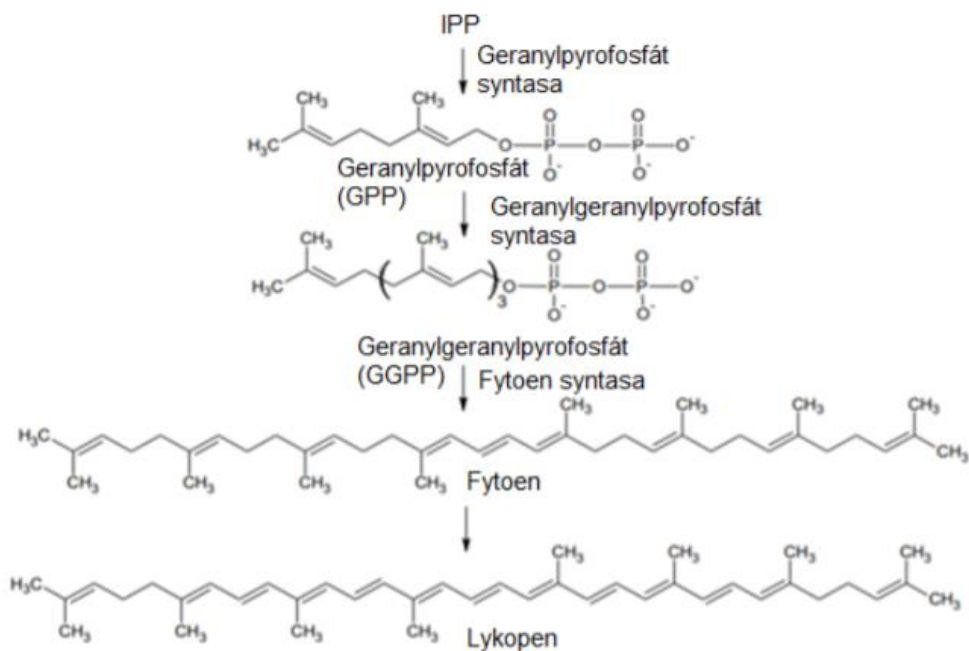
Touto dráhou disponují všechny vyšší eukaryota, jako jsou houby, rostliny, živočichové a archea. Výchozí látkou pro syntézu IPP je acetyl-CoA. Ten kondenzuje s acetoacetylem-CoA, jakožto meziproduktem u biosyntézy mastných kyselin. Kondenzací těchto dvou látek vzniká β -hydroxy-methylglutaryl-CoA, jehož redukcí vznikne mevalonová kyselina. Z této kyseliny vzniká IPP pomocí fosforylace a dekarboxylace. IPP pomocí enzymu isopentenylpyrofosfát isomerasa přechází na DMAPP [18].



Obrázek 8: Syntéza isopentenylpyrofosfátu a dimethylallylpyrofosfátu [14]

2.3.4.2 Syntéza karotenů

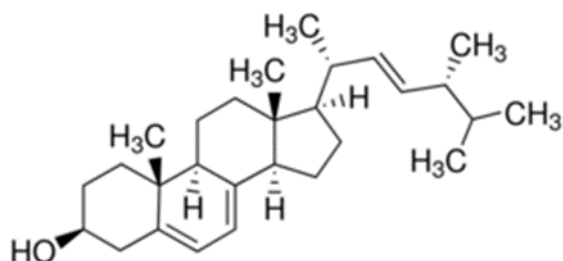
Biosyntéza karotenoidů probíhá kondenzací jednotlivých jednotek IPP a DMAPP. Syntetická cesta začíná kondenzací dvou jednotek „hlava k patě“ za vzniku geranyl-PP. Vzniklý geranyl-PP kondenzuje s druhou molekulou opět „hlava k patě“ za vzniku 20 uhlíkatého geranylgeranyl-PP. Finální kondenzací dvou těchto jednotek „hlava k hlavě“ vzniká 40 uhlíkatý bezbarvý skelet fytoen, který je prekursorem všech karotenoidů. Sérií desaturačních reakcí vzniká první karotenoid lykopen, ze kterého jsou dále syntetizovány jednotlivé karotenoidy v závislosti na enzymatické výbavě jednotlivých druhů mikroorganismů. Na množství produkovaných karotenoidů má vliv také složení kultivačního média, světlo, teplota a koncentrace kyslíku, přítomnost iontů jako je zinek a množství ethanolu [14].



Obrázek 9: Syntéza lykopenu [31]

2.4 Ergosterol

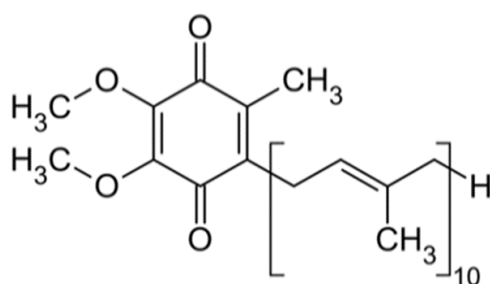
Ergosterol patří mezi steroidní látky, jehož funkce je obdobná jako u cholesterolu. Tedy ovlivňuje fluiditu biomembrán, proto ho můžeme nalézt v biomembránách hub a prvoků. Poprvé byl ergosterol získán z paličkovice nachové, což je parazitická houba. Po chemické stránce je ergosterol odvozen od steranu. Ve své struktuře obsahuje alespoň jednu hydroxylovou skupinu. Dále je provitamínem ergokalciferolu neboli vitamínu D₂. Tento vitamín se uplatňuje v metabolismu minerálů hořčíku, fosforu i vápníku. Působením ultrafialového záření dojde k fotochemické reakci, tím se ergosterol přemění na ergokalciferol. Ergosterol se u nižších eukaryot objevil vlivem evoluce, kdy se u nich postupně objevila metabolická dráha syntetizující ergosterol, který skvěle splňuje svou funkci i v nestabilním životním prostředí, ve kterém se nižší eukaryota přirozeně vyskytují. Pro svou esencialitu se dá využívat ve výzkumu antimykotik [14], [19], [20].



Obrázek 10: Ergosterol [34]

2.5 Ubichinon

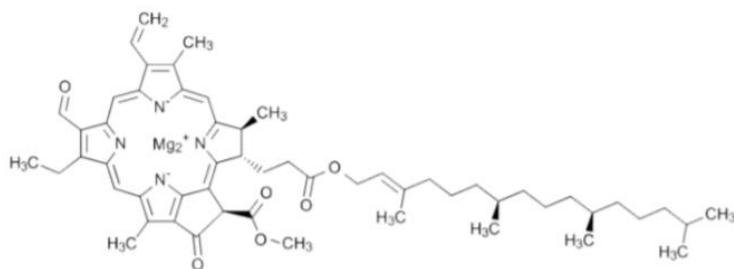
Ubichinon také znám jako koenzym Q se skládá z chinonového jádra a postranního řetězce různé délky. Podle počtu opakování isoprenoidních jednotek se koenzymu přiřazuje číslo. Délkou postranního řetězce se liší jednotliví zástupci. Mezi nejznámější patří koenzym Q₁₀. Můžeme ho nalézt například v mitochondriích, kde slouží jako přenašeč elektronů a protonů při buněčné respiraci. Nachází se tedy ve všech eukaryotických buňkách. Ubichinon se vyznačuje antioxidantními vlastnostmi. Časem dochází k úbytku ubichinonu a jeho absence v mitochondriích je spojována s projevy stárnutí. Nedostatek koenzymu Q může mít negativní vliv i na funkci srdce, kdy jeho nedostatek vede k poruchám vlivem uvolňování množství volných radikálů, následně mutaci mitochondriální DNA a tím narušení produkce energie v buňce. Svůj název ubichinon získal díky své předponě, která je odvozena od slova ubikvitární, neboli všudypřítomný. Zajímavostí je, že strukturně se ubichinonům podobá například vitamín K [8], [21], [22].



Obrázek 11: Ubichinon [32]

2.6 Chlorofyl

Chlorofyl je barvivo, neboli zelený pigment, který můžeme nalézt v chloroplastech, což je semiautonomní organela. Chloroplasty se běžně vyskytují pouze u některých eukaryotických organismů. Chlorofyl má významnou roli při fotosyntéze, konkrétně při absorpci světelného záření. Chlorofyl obstarává převod sluneční energie na energii chemickou. Chemická energie je uložena do molekul adenosin trifosfátu a následně využita na tvorbu sacharidů. Druhů chlorofylů je více. Mezi nejznámější patří chlorofyl typu A a chlorofyl typu B. Tyto dva typy se liší barvou, co se sktruktury týče, jedná se o deriváty dihydroporfyriu. Funkční změny obstarávají postranní řetězce, které vytváří změny v absorpčním spektru. Jinými slovy, díky postranním řetězcům chlorofyl A absorbuje červené světlo v rozmezí 670–480 nm, zatímco chlorofyl B absorbuje modré světlo v rozmezí 480–650 nm. Pro chlorofyl A je typická zelenomodrá barva, můžeme ho nalézt ve všech fotosyntetických rostlinách i ve fotosyntetických bakteriích. Pro chlorofyl B je typická žlutozelená barva a výskyt pouze ve vyšších rostlinách či zelených řasách. Dalším typem je chlorofyl C, který je v přírodě méně se vyskytující. Můžeme jej nalézt v hnědých mořských řasách. Chlorofyl D je v červených řasách. Dalším typem je chlorofyl E, který se vyskytuje pouze vzácně. Posledním typem je chlorofyl F, který je v sinicích spolu s chlorofylem A. Chlorofyl F v sinicích slouží pro rozšíření spektra absorbce světla nutného pro fotosyntézu [16], [23], [24].



Obrázek 12: Chlorofyl [33]

2.7 Lipidy

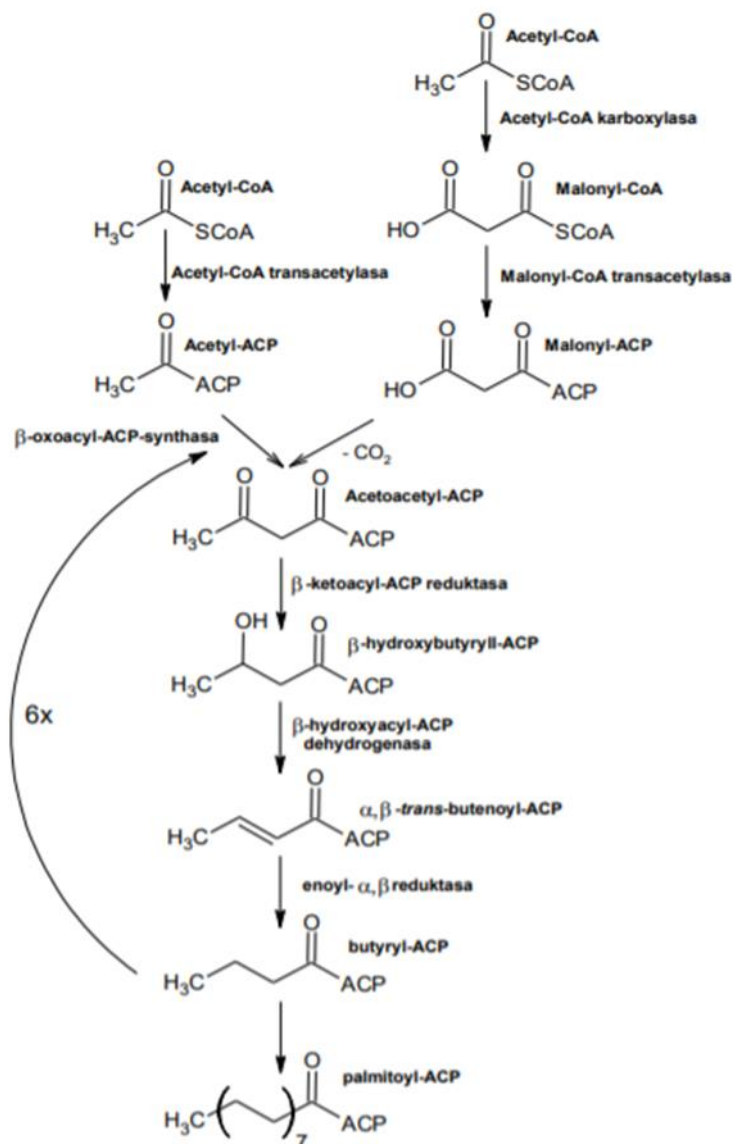
Lipidy neboli tuky se nacházejí v tělech živých organismů. Plní mnoho funkcí, například jsou zdrojem energie, hrají roli tepelné izolace, jsou to stavební kameny biomembrán. Lipidy jsou produkty primárního metabolismu, nebo je můžeme přijímat v potravě [14], [16].

2.7.1 Složení lipidů

Lipidy jsou estery alkoholů a vyšších mastných kyselin. Pro lipidy je typický jejich nepolární charakter, s čímž také souvisí jejich nerozpustnost ve vodném prostředí. Můžeme je rozdělit do dvou skupin, na jednoduché a složené lipidy. Jednoduché lipidy se dělí na tuky/oleje a vosky. Tuk se skládá z nasycených mastných kyselin, majících jednoduché vazby, zatímco oleje obsahují nenasycené mastné kyseliny s jednou nebo dvěma dvojnými vazbami. Rozdíly v chemickém složení mají vliv na vlastnosti, jako je tekutost a bod tání. Olej je tekutý, zatímco tuk je tuhý. Složené lipidy mají jako základ glycerol, na který je navázána kyselina přes esterovou vazbu. Mohou mít navázanou například kyselinu fosforečnou. Mohou obsahovat i navázané sacharidy, či alkoholy [14], [16].

2.7.2 Biosyntéza mastných kyselin

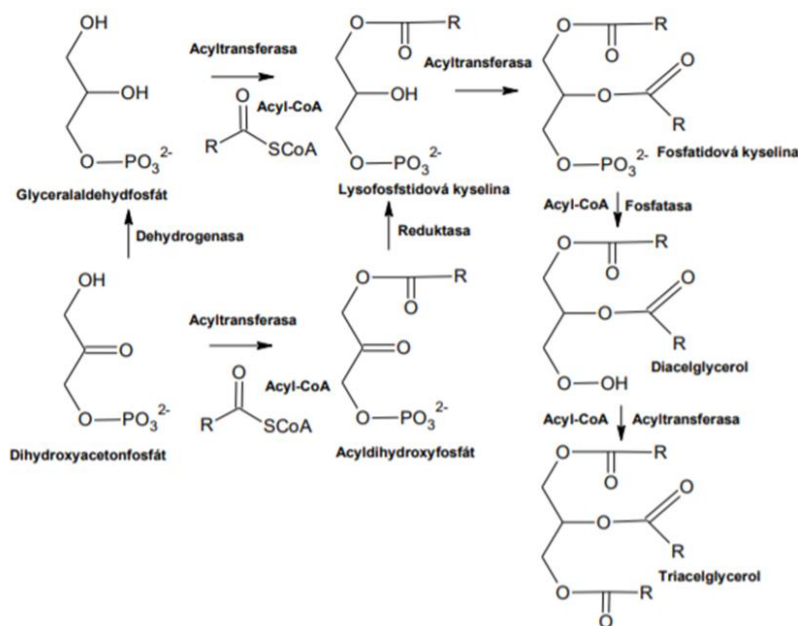
Metabolismus lipidů můžeme shrnout do dvou kroků. Do prvního kroku spadá biosyntéza mastných kyselin a glycerolu. Do druhého kroku řadíme vznik triacylglycerolů. Cytoplazma buněk je místem pro syntézu lipidů. Výchozí látkou pro syntézu lipidů je acetyl-CoA, který se za pomoci acetyl-CoA-transacetylasy převede na acetyl-ACP. Následně dojde k uvolnění ACP vlivem navázání na cysteinový zbytek enzymatického komplexu. Paralelně s tím je druhá molekula acetyl-CoA prodloužena, díky acetyl-CoA-karboxylasy o jeden uhlík, tímto vzniká malonyl-CoA, který je následně převeden na FAS komplex. Dalším krokem je vznik acetoacetyl-ACP kondenzací, spojenou s dekarboxylací, díky β -oxoacyl-ACP-syntasy. Takto vzniklý acetoacyl-ACP se dále redukuje na β -hydroxybutyryl-ACP, který se dehydratuje na α,β -trans-butenoyl-ACP. Tato látka podléhá redukcii za vzniku butyryl-ACP. V průběhu tedy došlo k prodloužení řetězce acetyl-CoA o dva uhlíky. Celý proces je opakován až do prodloužení o šestnáct uhlíků na kyselinu palmitovou. Kyselina palmitová může být přeměněna na další druhy mastných kyselin [14], [16].



Obrázek 13: Biosyntéza acylglycerolů [14]

2.7.3 Biosyntéza triacylglycerolů

Druhým krokem metabolismu lipidů je biosyntéza triacylglycerolů. Jedná se o esterifikaci glycerolu s mastnými kyselinami pomocí acyltransferas. Jde o několik esterifikačních reakcí, kdy dochází k esterifikaci glycerol-3-fosfátu a mastné kyseliny za vzniku lysofosfatidové kyseliny, esterifikací této kyseliny vznikne kyselina fosfatidová, z níž se vyrábí složené lipidy. Kyselina fosfatidová může být štěpěna na diacylglycerol. Esterifikací diacylglycerolu vznikne triacylglycerol [14], [16].



Obrázek 14: Biosyntéza triacylglycerolů [14]

2.8 Odpadní substráty potravinářského průmyslu

Odpadní substráty mohou sloužit jako zdroj uhlíku pro mikroorganismy, a tím přispět ke snížení výrobních nákladů. Snížení nákladů uskutečňuje myšlenka průmyslové výroby karotenoidů. Mezi odpadní substráty patří například syrovátka nebo kávová sedlina.. Surovátka vzniká jako odpadní produkt v mlékarenském průmyslu. Uhlík v syrovátce můžeme nalézt v podobě laktosy. Kvasinky využívají pouze glukosu a galaktosu, kterou získáme hydrolýzou laktasy. Kávové sedliny vznikají jako odpad při výrobě instantních káv. Zdrojem uhlíku v kávové sedlině jsou celuloza a hemiceluloza, které jsou schopny kvasinky využívat až po kyselé hydrolýze sedlin [29], [30].

2.9 Metody buněčných analýz

2.9.1 Extrakce

Extrakce je dělicí metoda založená na principu přestupu látek mezi dvě nemísitelné fáze. Může se jednat o dvě kapalně fáze, nebo o fázi kapalnou a pevnou. Jinými slovy dochází k přechodu látky z jedné kapaliny do druhé, nebo k přemístění látky z tuhé fáze do kapaliny. Tato dělicí metoda je založena na interakci rozpouštědla s molekulami analytu. Proto je pro výběr rozpouštědla nutno znát charakter analytu. Metabolity zkoumané v této práci mají převážně nepolární charakter. Tyto látky se vyskytují převážně v cytoplazmatické membráně. Mikroorganismy disponující silnou buněčnou stěnou je nutné rozrušit pomocí mechanických, chemických nebo enzymatických metod [25].

2.9.2 Transesterifikace

Tuto reakci řadíme mezi organické reakce. Principem reakce je výměna výše vroucího alkoholu (glycerol) za méně vroucí alkohol (methanol). Reakce běží za účasti katalyzátoru. Katalyzátorem může kyselina, popřípadě enzymy, jako je lipasa [26].

2.9.3 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je metoda zaměřená na měření absorbce procházejícího záření vzorkem v kyvetě. Studované pigmenty jsou schopné absorbce UV – VIS záření vysílaného zdrojem záření. Generované světelné záření prochází kyvetou se vzorkem, kde dochází k absorpci světelného záření molekulami vzorku. Neabsorbovaná část záření dopadá na detektor a na základě rozdílu intenzity vyslaného a detekovaného záření se vypočítá hodnota absorbance vzorku [25].

2.9.4 Chromatografie

Chromatografie je separační metoda, založená na separaci látek mezi dvě nemísitelné fáze, na základě interakce s danou fází. Jedna z fází je mobilní, druhá fáze je stacionární. Obě fáze mohou mít polární nebo nepolární charakter. Mobilní fáze může být jak plynná, tak kapalná, zatímco stacionární fáze může být buď kapalná, nebo pevná. Tato metoda poskytuje kvantitativní i kvalitativní informaci o daném analytu. Retenční čas dává kvalitativní informaci, tedy o jakou látku se jedná. Plocha píku dává kvantitativní informaci, tedy kolik dané látky v analytu je. Vzorek je injektorem vstříknut do toku mobilní fáze, která teče skrze stacionární fázi. Vzorek je v průběhu analýzy zadržován stacionární fází, dochází k separaci složek vzorku, na základě rozdílné interakce se stacionární fází [25].

2.9.4.1 HPLC/PDA

Zkratka HPLC označuje vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Sestava se skládá z mobilní fáze, čerpadla, autosampleru, předkolony, kolony, termostatu a detektoru. Čerpadlo slouží k tomu, že pohání mobilní fázi pod určitým tlakem. Mobilní fáze je poháněna až na kolonu. Na koloně dochází k separaci. Separace je založená na rozdílné afinitě analytu ke stacionární a mobilní fázi. Rozlišujeme kapalinovou chromatografii s normální fází a kapalinovou chromatografii s reverzní fází. Reverzní fáze se používá pro analýzu karotenoidů. Jedná se o nepolární stacionární fázi a polární mobilní fázi. PDA je typ detektoru označovaný jako detektor diodového pole. Jedná se o univerzální spektrofotometrický detektor. Tento detektor nám poskytuje celou řadu výhod. Pomáhá nám snadno identifikovat látku, neboť nám poskytuje celé absorpční spektrum. Tedy pro každý retenční čas nám poskytuje absorpční spektrum. Díky PDA detektoru můžeme pro každou vlnovou délku sestavit chromatogram [25].

2.9.4.2 GC/FID

GC neboli plynová chromatografie je separační metoda sloužící pro separaci látek s nízkým bodem varu. Od kapalinové chromatografie se liší skupenstvím mobilní fáze. Mobilní fáze je plyn. Vzorek s mobilní fází neinteraguje, pouze je mobilní fází unášen. Mobilní fáze se tedy označuje jako nosný plyn. Nosným plynem může být vodík, dusík nebo helium. Princip plynové chromatografie je založen na interakci analytu pouze se stacionární fází. Skládá se z náplňové nebo kapilární kolony. Kapilární kolona je dutá, křemenná kapilára s vrstvou polyamidu, který zajišťuje pružnost kapiláry. Na vnitřní vrstvě kapiláry se pak nachází ukotvená stacionární fáze. Kapilára může dosahovat délky desítek metrů. Nejčastěji používaným detektorem je plamenově ionizační detektor (FID). Používá se k analýze organických molekul. V principu dochází k tvorbě iontů, spalováním organické látky ve vodíkovém plameni [25].

3 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je produkce pigmentů a jiných metabolitů vybranými kmeny kvasinek a řas za využití odpadních substrátů z potravinářského průmyslu. V rámci bakalářské práce byly řešeny následující úkoly:

- Optimalizace kultivačních podmínek pro jednotlivé kmeny, s cílem zisku obohacené biomasy
- Indukce produkce vybraných látek s využitím exogenních stresů
- Optimalizace extrakčních postupů pro jednotlivé kmeny mikroorganismů
- Vyhodnocení výsledků

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité pro kultivaci kvasinek

D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner s r.o. (ČR)
Kvasničný autolyzát, Himedia (Indie)
Pepton z kaseinu, Roth (SRN)
Agar-agar, Roth (SRN)
Síran horečnatý heptahydrát p.a., Chemapol (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)
Glycerol, Lach-Ner (ČR)
Sывovátka (ČR)

4.1.2 Chemikálie použité pro kultivaci řas

Dusičnan sodný p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Na₂-EDTA.2H₂O p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Chlorid železitý hexahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Kyselina sírová 96% p.a., Penta (ČR)
Síran železnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Kyselina boritá p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Chlorid manganatý tetrahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Molybdenan sodný dihydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Dusičnan kobaltnatý hexahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Chlorid zinečnatý p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Síran měďnatý pentahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Chlorid kobaltnatý hexahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

4.1.3 Chemikálie použité pro extrakce

Aceton p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Acetonitril pro HPLC, Penta (ČR)
Ethylacetát pro HPLC, Penta (ČR)

4.1.4 Chemikálie použité pro transesterifikaci a analýzu pro HPLC a GC

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

4.2 Přístroje a pomůcky

Spektrofotometr VIS, Helios δ , Unicam (GB)

Box Aura mini iBioTech (ČR)

GKB Color Digital CCD kamera (Tchajwan)

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

Třepačka Yellow line, (SRN)

Třepaný inkubátor, ZWYR-D2401 – Labwit, BioTech (ČR)

Centrifuga BioTech, (ČR) Analytické váhy Boeco (SRN)

33 Kultivátor Multi-Cultivator MC 1000-OD PSI Drásov (ČR)

- Stojan pro 8 zkumavek o objemu 80 ml
- Termostat s vodní lázní,
- Vzduchová pumpa
- Zásobník na destilovanou vodu
- LED diodový zdroj pro každou zkumavku
- Detektor optické hustoty – detekce při 680 nm a 720 nm

Light meter, LX-1128SD (USA)

Lyofilizátor Labconco FreeZone 4.5 Freeze Dryer (USA)

Termoblok VWR, (ČR)

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

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

- Termostat - LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)
- Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR
- Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR
- Vyhodnocovací systém Xcalibur
- Kolona Kinetex Core Shell C18, 150 mm délka, 5,0 μm částice, Phenomenex
- Držák předkolony - KJ0 - 4282, ECOM (ČR)
- Předkolona - C18,AJ0 - 4287, Phenomenex
- Filtry pro HPLC, PRE-CUT, Alltech (GB)
- Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)
- Systém MicroTime 200, Picoquant GmbH, objektiv s vodní imerzí Olympus

UPLSAPO 60XW

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

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

4.3 Použité kmeny mikroorganismů

4.3.1 Kmeny kvasinek

Sporidiobolus pararoseus CCY 19-9-6
Sporidiobolus salmonicolor CCY 19-4-25
Sporidiobolus metoroseus CCY 19-6-20
Sporobolomyces roseus CCY 19-6-4
Phaffia rhodozyma CCY 77-1-1
Dioszegia hungarica CCY 18-1-3

Výše uvedené kmeny byly získány ze sbírky „Culture Collection of Yeasts“ Chemického ústavu SAV v Bratislavě.

4.3.2 Kmeny mikrořas

Desmodesmus acutus CCALA 437
Desmodesmus quadricauda CCALA 463
Scenedesmus dimorphus CCALA 443
Chlamydomonas reinhardtii CCALA 973

Výše uvedené kmeny byly získány ze sbírky „Culture Collection of Autotrophic Organisms“ Botanického institutu AV ČR v Třeboni.

4.4 Kultivace kvasinek

Výše uvedené kmeny kvasinek byly kultivovány v inokulu 1 a inokulu 2, následně pak v tekutém živném médiu s přidavkem odpadních substrátů. Před kultivací byla média sterilována v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem.

4.4.1 Inokulum 1/Inokulum 2

Prvním krokem před začátkem samotné kultivace je zaočkování zásobní kultury daného mikroorganismu na Petriho misku. Na Petriho misce se nachází YPD médium s agarem. Zásobní kultura je uložena v kryozkumavkách v hluboko mrazícím boxu. Složení YPD média, inokula 1 a inokula 2 tvoří bakteriologický pepton, glukosa a kvasničný autolyzát. Přídavek agaru pak vytváří médium pevné. V tabulce níže (Tabulka 1) je uvedena gramáž v závislosti na množství vody. Kultura nanesená na Petriho misku byla kultivována tři dny při pokojové teplotě. Po uplynutí tří dnů došlo k přeočkování do inokula 1. Přeočkováná kultura byla třepána na třepačce po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby byla do inokula 2 z jejího objemu dána 1/5 inokula 1. Inokulum 2 bylo třepáno na třepačce po dobu 24 hodin. Všechna očkování probíhala ve flow boxu, který nám dává aseptické prostředí.

Tabulka 1: Složení a gramáž YPD média

Látka	Koncentrace v g/l
glukosa	20
bakteriologický pepton	20
kvasničný autolyzát	10
agar	20

4.4.2 Produkční médium

Kontrolní médium obsahovalo anorganický základ a glukosu, glycerol nebo melasu jako zdroj uhlíku. Následně byla připravena stejná média jako kontrolní, navíc s přidavkem syrovátky. Tedy každý kmen byl kultivován na různých zdrojích uhlíku. Inokulum 2 bylo zaočkováno do produkčního média následujícím způsobem. Z inokula 2 byla přidána 1/5 jejího množství do produkčního média. Produkční médium spolu s kulturou bylo připojeno na vzduch, kterým bylo probubláváno po dobu 96 hodin. Následující tabulka (Tabulka 2) obsahuje složení a gramáže látek potřebných pro produkční médium.

Poté byla připravena média v 250ml Erlenmeyerových baňkách, která obsahovala 50 ml finálního média s kulturou. Médium obsahovalo anorganický základ a kávový hydrolyzát. Následně byla připravena i série médií s přidavkem močoviny viz tabulka 2. V níže přiložené tabulce (Tabulka 3) můžeme vidět množství uhlíkatého substrátu na 1 l vody.

Tabulka 2: Složení a gramáž produkčního média

Látka	Koncentrace v g/l
KH ₂ PO ₄	4
(NH ₄) ₂ SO ₄	4
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,7
glukosa/glycerol/melasa/syrovátka	30/30/51/30
močovina	1,81

Tabulka 3: Množství uhlíkatého substrátu v produkčních médiích

	glukosa [g/l]
C/N 13	30
C/N 25	58
C/N 50	116

4.5 Kultivace mikrořas

Multikultivátor nebo také fotobioreaktor je přístroj, sloužící pro kultivaci mikrořas. Jedná se o nízkoobjemovou kultivaci. V multikultivátoru je osm paralelních zkumavek. Každá z nich je vzdušněná. Zkumavky jsou ponořeny do vodní lázně. Za každou zkumavkou se nachází LED diody dosahující až 1000 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Multikultivátor nám umožňuje měnit míru osvětlení jednotlivých zkumavek a dále také teplotu všech zkumavek. Jako produkční médium bylo použito BBM médium bez dusíku ve všech zkumavkách viz Tabulka 4. Do každé zkumavky pak byla přidána, buď močovina, nebo dusičnan sodný v určité koncentraci 60 %, 80 %, 100 %, 27

150 % viz Tabulka 5. Kultivaci v multikultivátoru předchází kultivace samotné řasy. Po kultivaci samotné řasy došlo k přeočkování do produkčního média, tak, aby absorbance měla hodnotu 0,2. Následně bylo do každé zkumavky nalito 80 ml produkčního média. Poté byl přidán zdroj dusíku. Všechny výše uvedené řasy byly kultivovány v multikultivátoru.

4.5.1 Aplikace dusíku a světelného stresu

V multikultivátoru byl aplikován stres ve formě různého druhu dusíku o různé koncentraci. Experiment probíhal také se světelným stresem. Tento stres obnášel střídání dvou cyklů, a to světlo a tma. Světlo bylo zapnuté po dobu 16 hodin, zatímco tma po dobu 8 hodin. Po celou dobu experimentu bylo nastaveno osvětlení $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Experiment trval po dobu 10 dní. Po uplynutí této doby byla řasová biomasa zcentrifugována.



Obrázek 15: Multikultivátor MC 1000, Photon system instruments, Drásov

Tabulka 4: Složení BBM média s dusíkem

Látka	Objem v g/l
NaNO ₃	25
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	2,5
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	7,5
K ₂ HPO ₄	7,5
KH ₂ PO ₄	17,5
NaCl	2,5
EDTA	50
KOH	31
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	4,98
H ₂ SO ₄ (96%)	1
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	8,82
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	1,44
MoO ₃	0,71
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	1,57
Co(NO ₃) ₂ ·6 H ₂ O	0,49
H ₃ BO ₃	11,42

Tabulka 5: Koncentrace močoviny a dusičnanu sodného v produkčních médiích

Močovina (10 g/100 ml)	V [μ l]	NaNO ₃ (10 g/100 ml)	V [μ l]
60%	42	60%	120
80%	56	80%	160
100%	70	100%	200
150%	105	150%	300

4.6 Zpracování a analýza vzorků

4.6.1 Stanovení nárůstu biomasy a její zpracování

Několikadenní kultivace zajistí dostatečný nárůst biomasy. Po kultivaci následuje stočení v centrifuze po dobu 4 minut při 6000 rpm. Po centrifugaci byl supernatant odlit. Sediment byl dán na lyofilizátor po dobu 24 až 48 hodin, neboť lyofilizovaná forma se využívá pro stanovení biomasy a následnou analýzu pigmentů a lipofilních metabolitů. Zlyofilizované vzorky byly uchovávány v mrazícím boxu. Biomasa byla stanovena gravimetricky. Zlyofilizovaná biomasa byla zvážena na analytických vahách. Podobný postup platí i v případě řasové biomasy.

4.6.2 Extrakce pigmentů pro HPLC

Látky vyskytující se v mikroorganismech byly extrahovány za použití organických rozpouštědel. Nejprve byla eppendorf mikrozkuhavka zvážena na analytických vahách, následně do ní bylo odváženo a přidáno 20 až 30 mg lyofilizované biomasy a 1000 μ l demineralizované vody. Takto připravená mikrozkuhavka byla vložena do hluboko mrazícího boxu po dobu 1 hodiny. Přidáním vody a následným zamražením došlo k rozrušení buněčných struktur. Po stočení a odlití vody byl dalším krokem extrakce přídavek 1 ml acetonu a skleněných kuliček (cca 0,5 ml). Připravená mikrozkuhavka byla dána na vortex, kde byl obsah protřepáván po dobu 15 minut. Poté byl obsah odlit do plastové zkuhavky, spolu s dalšími 3 ml acetonu, z čehož byly odpipetovány 2 ml do skleněné zkuhavky, která byla dána do termobloku na teplotu 38 °C, za využití odpařování pomocí dusíku. Po vysušení byl vzorek rozpuštěn v 2 ml rozpouštědlové směsi ethylacetátu a acetonitrilu HPLC kvality. Na závěr byl extrakt přefiltrován do vialek o objemu 1,8 ml a uschován v mrazícím boxu. Podobný postup byl aplikován i u řasové biomasy s rozdílem navážení menšího množství biomasy do mikrozkuhavky. Konkrétně se jednalo o 5 až 15 mg.

4.6.3 Analýza pigmentů a lipidických látek

Samotná analýza probíhala na přístoji od firmy Thermo Fischer Scientific, na nepolární koloně C18 od firmy Kinetex. U kvasinkové biomasy byla stanovována koncentrace torularhodinu, torulenu, β -karotenu, celkových karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q. Celkové karotenoidy se skládají z identifikovatelných a neidentifikovatelných karotenoidů. Separace probíhá na nepolární koloně, jedná se tedy o obrácenou fázi. Termostat byl nastaven na teplotu 25 °C. Na detekci byl použit PDA detektor. Vyhodnocování probíhalo pomocí kalibračních křivek jednotlivých standardů.

Tabulka 6: Složení mobilní fáze A a B

Mobilní fáze A	Mobilní fáze B
acetonitril : methanol : trisHCl pufr (pH=8)	methanol : ethylacetát
80: 2: 14	60: 40

Tabulka 7: Schéma gradientové eluce

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

4.6.4 Transesterifikace vzorku biomasy

Transesterifikace je chemická reakce přeměny jednoho esteru v druhý. Transesterifikační směs se skládá z 15% kyseliny sírové v methanolu HPLC kvality a interního standardu C₁₇. Transesterifikace začíná navážením 5 až 10 mg lyofilizované biomasy do krimpovací vialky a následným přidáním 1,8 ml transesterifikační směsi. Poté se vialka zakrypluje pomocí krimpovacích kleští. Takto připravené vzorky se vloží do termobloku po dobu 2 hodin při teplotě 85 °C. Před dalším krokem musí být vzorky ochlazeny na laboratorní teplotu. Následně se do vialky o objemu 4 ml kvantitativně převede celý obsah vialky se vzorkem a 0,5 ml NaOH, 1 ml hexanu HPLC kvality. Uzavřená vialka se dá na vortex třepat po dobu 5 minut. Třepáním dojde k oddělení fází. Následně se z organické fáze odebere 0,1 ml do čisté vialky, do které se přidá 0,9 ml hexanu HPLC kvality. Takto připravené vzorky se uchovávají v mrazícím boxu.

4.6.5 Analýza lipidů pomocí plynové chromatografie

Analýza vzorků probíhá pomocí plynové chromatografie Scientific TRACETM 1300 Gas Chromatograph, s automatickým dávkováním vzorků s děličem toku s kolonou Zebron ZB-FAME. K detekci se využívá plamenově ionizační detektor.

Tabulka 8: Parametry plynové chromatografie

Kapilární kolona	Zebron ZB-FAME, o rozměrech 30 m × 0,25 mm × 0,20 μm
Dávkování	Autosampler Thermo Scientific AI 1310
Objem nástřiku vzorku	1 μl
Poměr nástřiku děliče toku	10
Konstantní průtok nosného plynu H ₂	1 ml/min
Detektor	Plamenově ionizační
Teplota	250 °C
Průtok	Vzduch 350 ml/min, make-up N ₂ 30 ml/min, H ₂ 35 ml/min

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

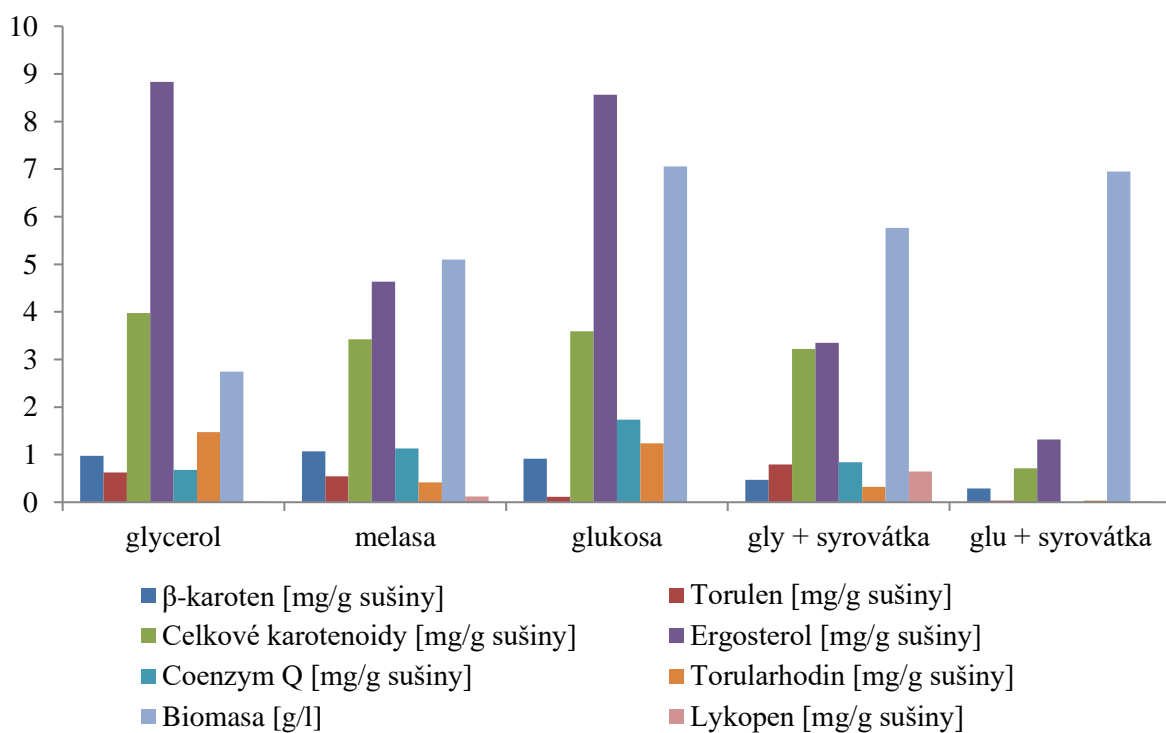
5.1 Kvasinky

Do experimentu byly vybrány následující kmeny kvasinek *Sporidiobolus pararoseus*, *Sporidiobolus metaroseus*, *Sporidiobolus salmonicolor*, *Dioszegia hungarica*, *Phaffia rhodozyma* a *Sporobolomyces roseus*. V prvním experimentu byla zdrojem uhlíku melasa, glycerol a glukóza. Jako použitý odpadní produkt sloužil syrovátkový protein. Experiment proběhl u všech výše uvedených kvasinek. V dalším experimentu byl použitý hydrolyzát kávy, jako odpadní produkt. Experiment proběhl u všech kvasinek, kromě kmene *Dioszegia hungarica*.

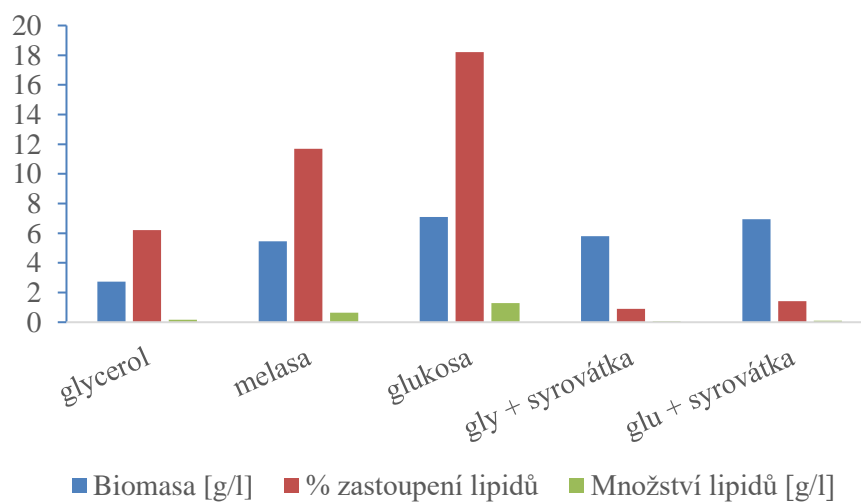
5.1.1 Kmen *Sporidiobolus pararoseus*

5.1.1.1 Aplikace, odpadního substrátu, syrovátky

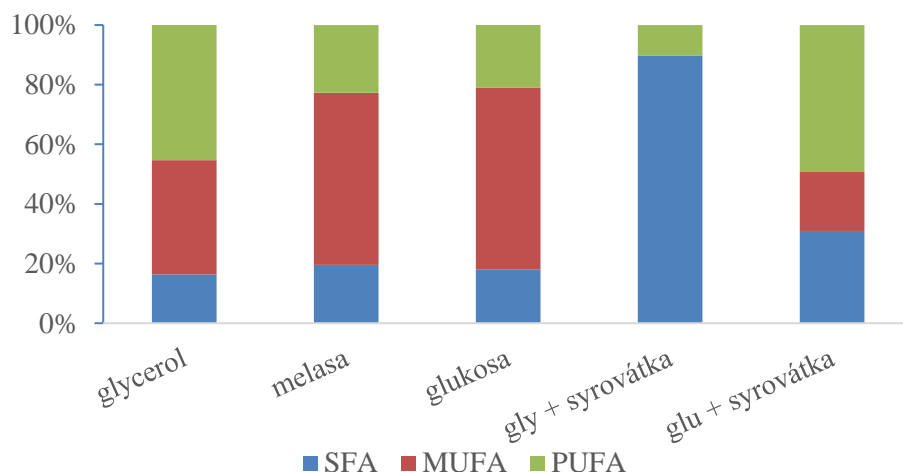
V tomto experimentu byl kultivován kmen *Sporidiobolus pararoseus*, u kterého byl sledován nárůst biomasy a dalších metabolitů, v závislosti na různých kombinacích syrovátky a zdroje glukózy. Celkové nárůsty biomasy a koncentrace metabolitů je možno pozorovat v níže přiloženém grafu (Obrázek 16). U kontrolních médií vidíme lepší produkci ergosterolu a dalších sledovaných metabolitů, než u médií se syrovátkou. U produkčního média, které obsahovalo melasu v kombinaci se syrovátkou, došlo k letálním účinkům. U médií se syrovátkou vidíme, že nejlepší produkci ostatních metabolitů má medium s glycerolem s výtěžkem 3,350 mg/g ergosterolu, 3,219 mg/g celkových karotenoidů, 0,323 mg/g torularhodinu, 0,468 mg/g β -karotenu. Z níže uvedeného grafického znázornění (Obrázek 17) vidíme u kontrolních médií rostoucí trend produkce lipidů zleva doprava. Nejvyšší produkci 1,285 g/l vidíme u kontrolního média s glukosou. Naopak u médií se syrovátkou nelze pozorovat žádný trend. Nejvyšší produkci lipidů u syrovátky vidíme v kombinaci s glukosou s výtěžkem 0,01 g/l. Z grafu (Obrázek 18) vidíme, že dochází ke zvýšené syntéze mononenasyčených mastných kyselin (dále MUFA) u kontrolních médií.



Obrázek 16: Grafické znázornění produkce biomasy a koncentrace vybraných metabolitů v závislosti na různém zdroji uhlíku u kmene *Sporidiobolus pararoseus*.



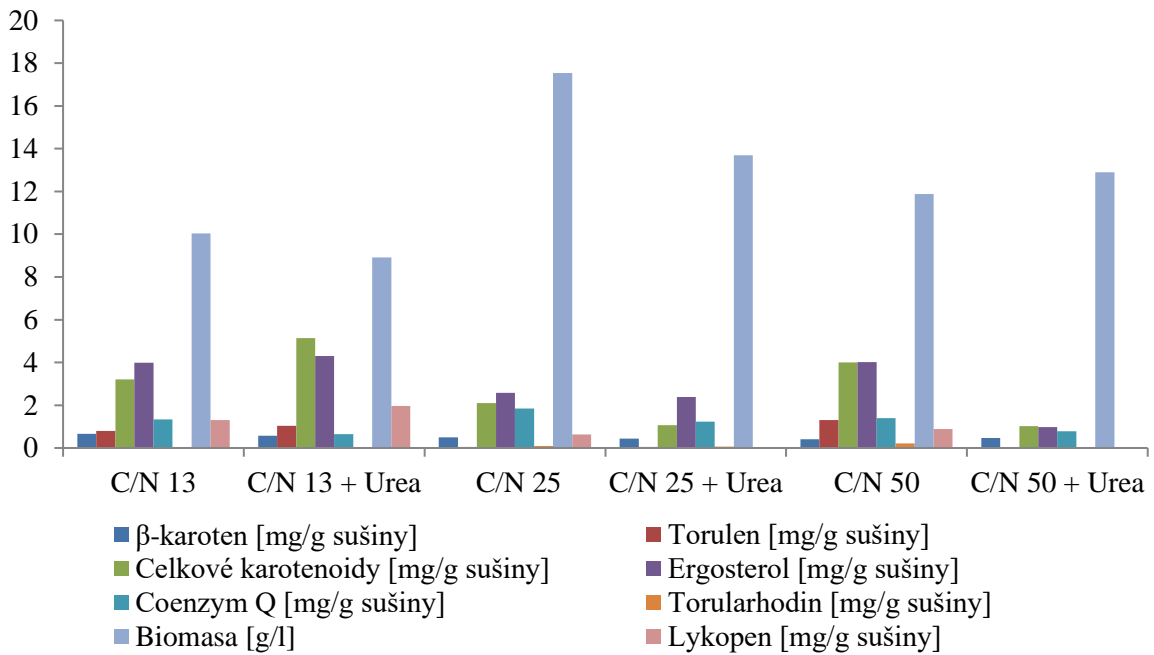
Obrázek 17: Grafické znázornění produkce biomasy a lipidů v závislosti na různém zdroji uhlíku u kmene *Sporidiobolus pararoseus*.



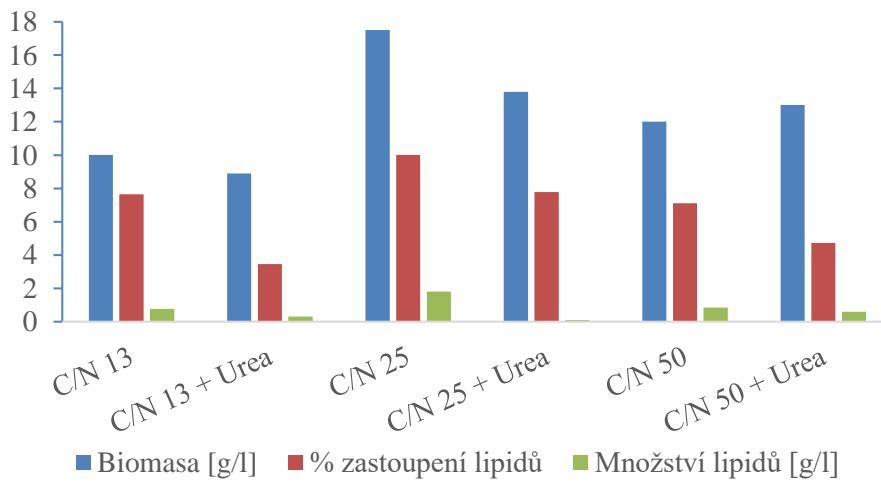
Obrázek 18: Grafické znázornění procentuálního zastoupení MK v lipidech v závislosti na různém zdroji uhlíku u kmene *Sporidiobolus pararoseus*.

5.1.1.2 Aplikace, odpadního substrátu, kávy

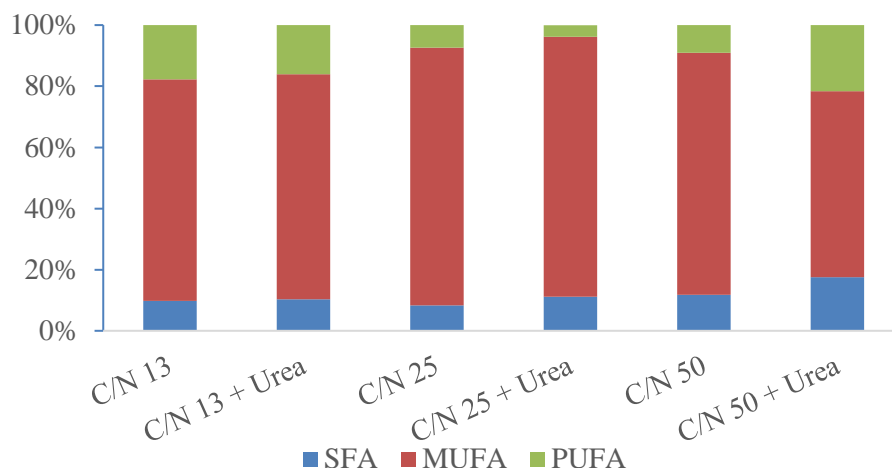
V tomto experimentu byl u kmene *Sporidiobolus pararoseus* použit hydrolyzát kávy. Kávové sedliny byly kyselé a enzymaticky hydrolyzovány a poté byly přidány do produkčního média v různém poměru dusíku a uhlíku. V grafickém znázornění (Obrázek 19) vidíme, že nárůst sledovaných metabolitů má klesající charakter s větším C/N poměrem. Dále z grafu vidíme, že produkce biomasy byla nejvyšší u poměru C/N 25, nicméně ostatní metabolity dosahovaly nejvyšší hodnoty u poměru C/N 13 s močovinou s výtěžkem celkových karotenoidů 5,144 mg/g, ergosterolu 4,308 mg/g a lykopenu 1,959 mg/g. Z níže uvedeného grafického znázornění (Obrázek 20) lze usuzovat, že média obsahující močovinu vykazují nižší produkci lipidů, a to z důvodu většího množství dusíků v médiu. Výtěžek lipidů 1,8 g/l můžeme pozorovat u média, které obsahovalo poměr C/N 25. Pokud se zaměříme na graf (Obrázek 21), vidíme, že u všech médií převažuje tvorba MUFA.



Obrázek 19: Grafické znázornění produkce biomasy a koncentrace vybraných metabolitů v závislosti na různém C/N poměru u kmene *Sporidiobolus parosaeus*.



Obrázek 20: Grafické znázornění produkce biomasy a lipidů v závislosti na různém C/N poměru u kmene *Sporidiobolus parosaeus*.

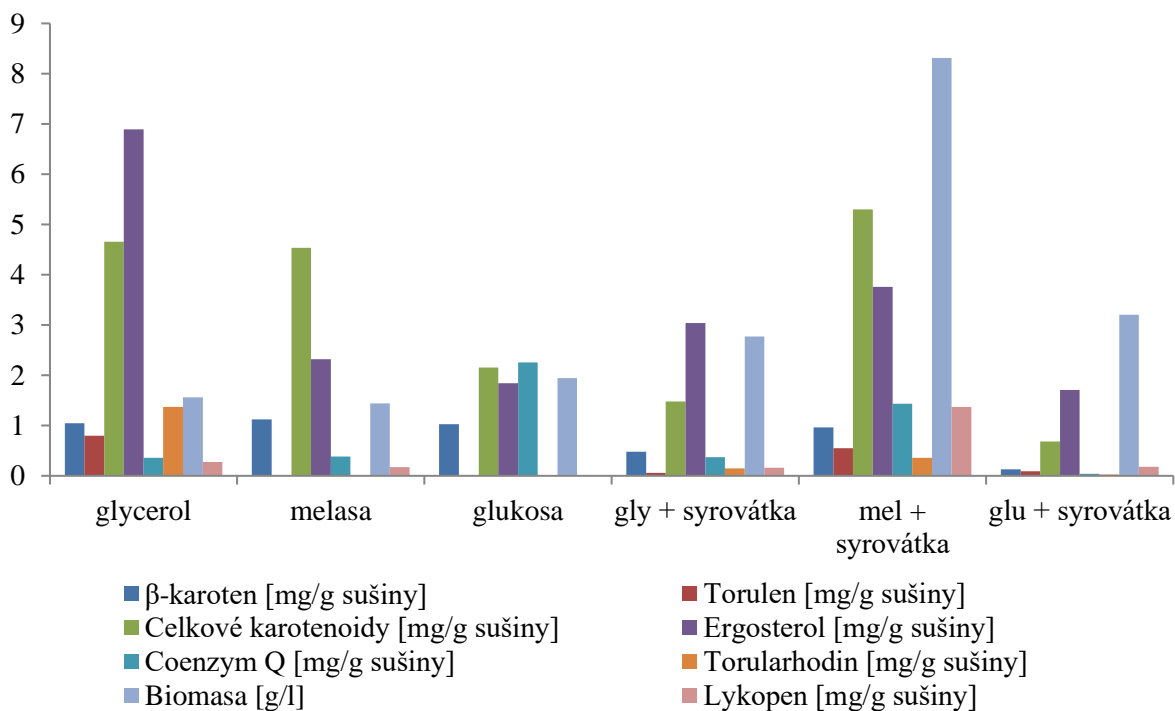


Obrázek 21: Grafické znázornění procentuálního zastoupení MK v lipidech v závislosti na různém C/N poměru u kmene *Sporidiobolus pararoseus*.

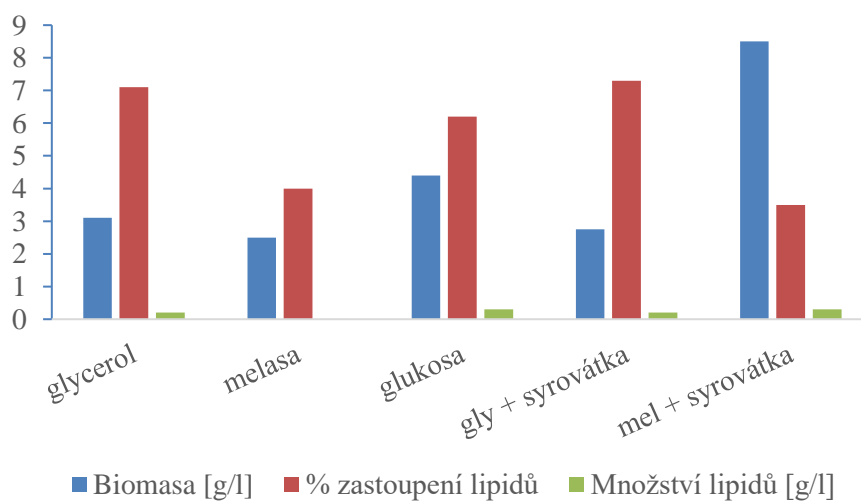
5.1.2 Kmen *Sporidiobolus metaroseus*

5.1.2.1 Aplikace, odpadního substrátu, syrovátky

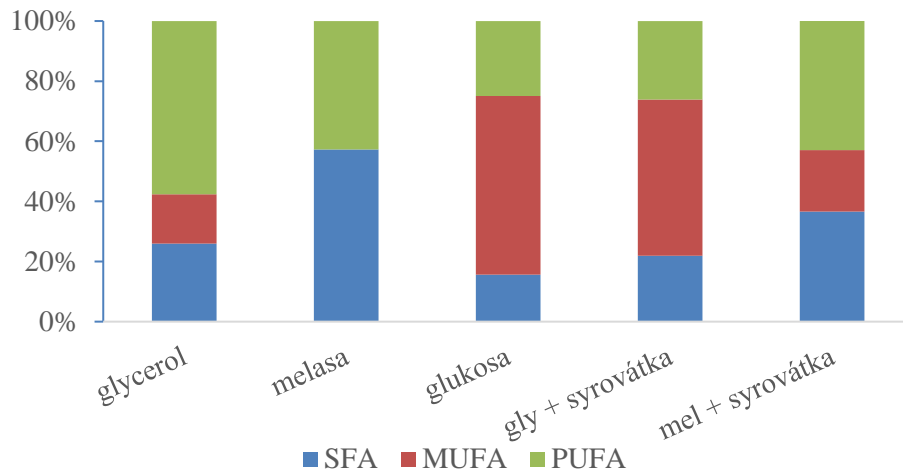
V dalším experimentu byl kultivován kmen *Sporidiobolus metaroseus*. V grafickém znázornění (Obrázek 22) lze pozorovat u ergosterolu klesající trend u kontrolních médií zleva doprava. Produkce biomasy byla největší u produkčního média, které obsahovalo syrovátku v kombinaci s melasou s výtěžkem 8,310 mg/g. Produkce ostatních metabolitů dosahuje nejvyšších hodnot u kontrolního média s glycerolem, s výtěžkem ergosterolu 6,895 mg/g, torularhodinu 1,370 mg/g, torulenu 0,799 mg/g. Nicméně u médií se syrovátkou vidíme nejvyšší hodnoty metabolitů u média melasa a syrovátka s výtěžkem 5,299 mg/g celkových karotenoidů. Z níže uvedeného grafu (Obrázek 23) lze vyvodit, že nejvyšší produkce lipidů je u kontrolního média s glukosou a stejně pak u média s melasou a syrovátkou. Výtěžek dosahoval 0,3 g/l. Pokud se zaměříme na graf (Obrázek 24), vidíme, že u profilu nasycenosti mastných kyselin dochází ke zvýšené syntéze MUFA u médií se syrovátkou oproti kontrolním médiím. Zároveň u kontrolních médií převažuje syntéza polynenasycených mastných kyselin (dále PUFA).



Obrázek 22: Grafické znázornění produkce biomasy a vybraných metabolitů v závislosti na různém zdroji uhlíku u kmene *Sporidiobolus metaroseus*.



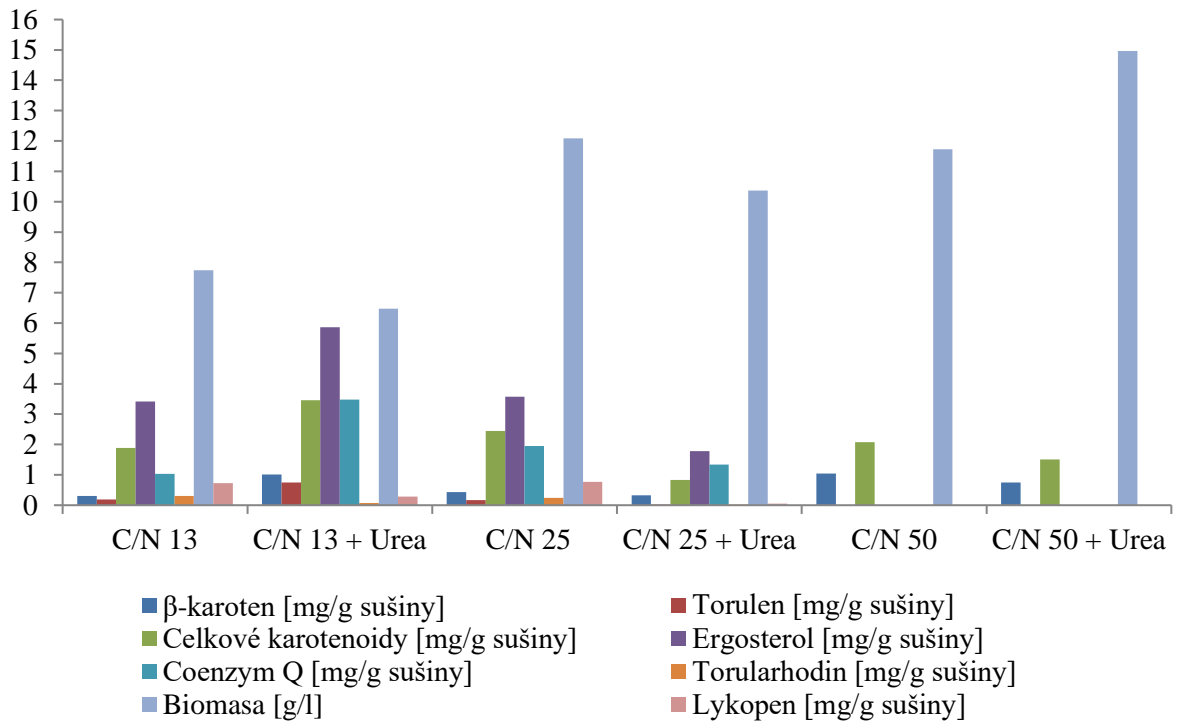
Obrázek 23: Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různém zdroji uhlíku u kmene *Sporidiobolus metaroseus*.



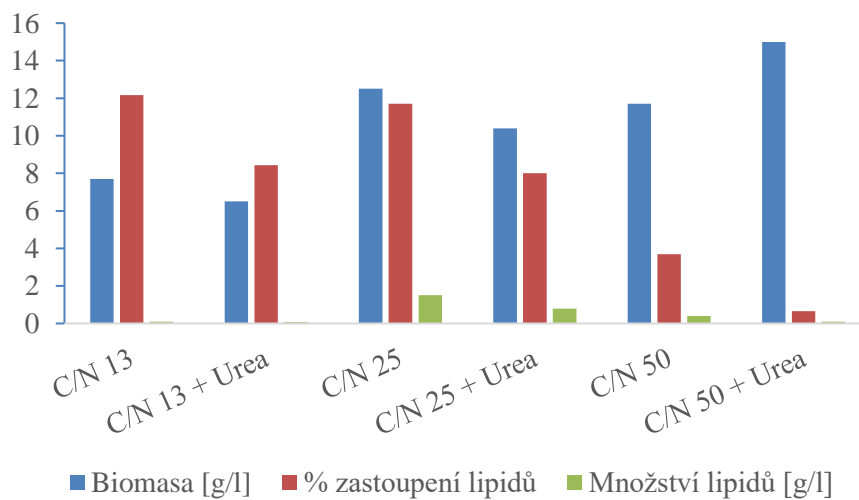
Obrázek 24: Grafické znázornění procentuálního zastoupení MK v lipidech v závislosti na různém zdroji uhlíku u kmene *Sporidiobolus metaroseus*.

5.1.2.2 Aplikace, odpadního substrátu, kávy

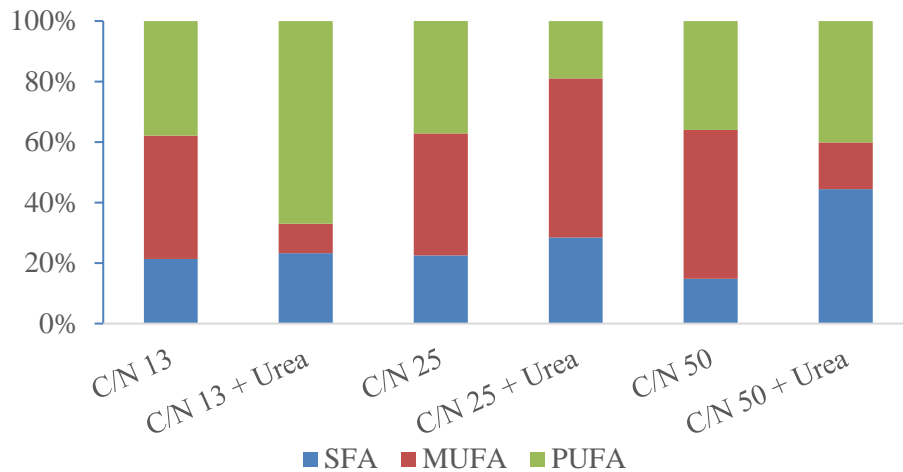
V dalším experimentu byl u kmene *Sporidiobolus metaroseus* použit kávový hydrolyzát jako odpadní substrát. Z grafického znázornění (Obrázek 25) vidíme, že produkce biomasy má rostoucí trend se zvyšujícím se C/N poměrem. Dále z grafu vidíme, že C/N 13 a C/N 25 má lepší produkci metabolitů, než C/N 50. Nejlepší produkce celkových karotenoidů a ergosterolu je u poměru C/N 13 Urea s výtěžkem celkových karotenoidů 3,457 mg/g, ergosterolu 5,867 mg/g. Z níže uvedeného grafu (Obrázek 26) vidíme, že produkce lipidů byla nejlepší u poměru C/N 25 s výtěžkem 1,5 g/l, poté u C/N 25 s močovinou s výtěžkem 0,8 g/l. Z dalšího grafického znázornění (Obrázek 27) můžeme pozorovat, že největší obsah mastných kyselin tvoří MUFA. Čím vyšší poměr, tím větší procento MUFA se akumuluje v buňkách. Větší syntéza MUFA se vyskytuje v médiích bez zdroje dusíku.



Obrázek 25: Grafické znázornění produkce biomasy a vybraných metabolitů v závislosti na různém C/N poměru u kmene *Sporidiobolus metaroseus*.



Obrázek 26: Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různém C/N poměru u kmene *Sporidiobolus metaroseus*.

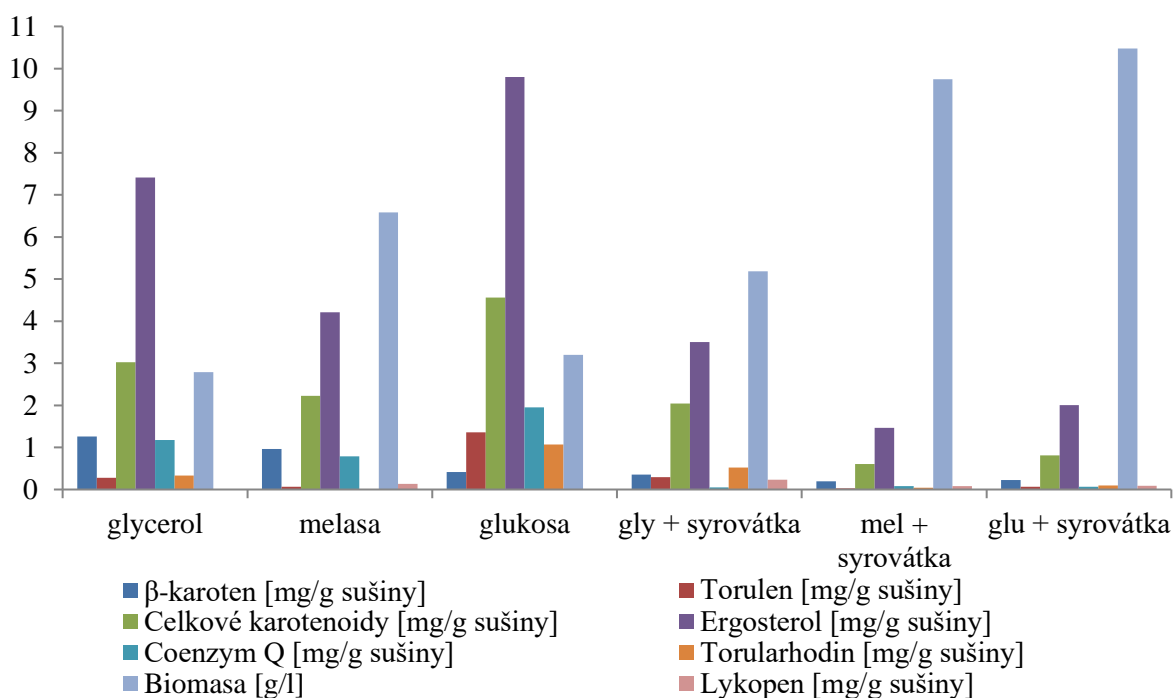


Obrázek 27: Grafické znázornění procentuálního zastoupení MK v lipidech v závislosti na různém C/N poměru u kmene *Sporidiobolus metaroseus*.

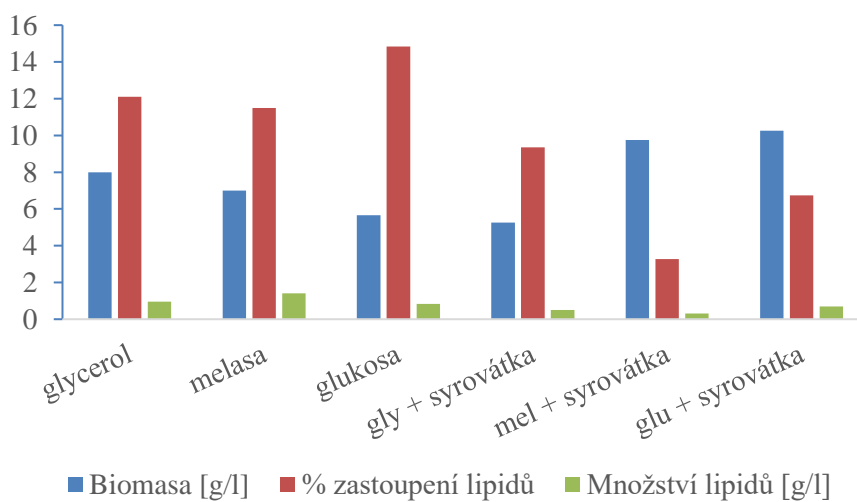
5.1.3 Kmen *Sporidiobolus salmonicolor*

5.1.3.1 Aplikace, odpadního substrátu, syrovátky

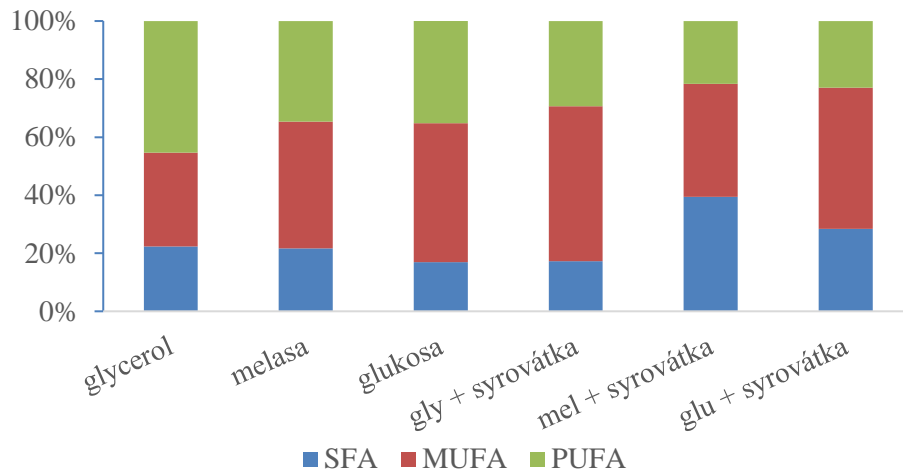
V dalším experimentu byl kultivován kmen *Sporidiobolus salmonicolor*. Z grafického znázornění (Obrázek 28) lze vyčíst klesající trend produkce ergosterolu a dalších metabolitů zleva doprava. Dále vidíme rostoucí trend produkce biomasy zleva doprava. Nejvyšší produkce biomasy je u média glukosa a syrovátka s výtěžkem 10,472 mg/g. U kontrolního média s glukosou je nejvyšší produkce ergosterolu s výtěžkem 9,802 mg/g. Produkce ostatních metabolitů je pak velmi nízká u všech médií, která obsahovaly syrovátku, z toho nejvyšší produkci celkových karotenoidů pozorujeme u média syrovátka a glycerol s výtěžkem 2,043 mg/g. Z níže uvedeného grafického znázornění (Obrázek 29) vidíme, že produkce lipidů je nejvyšší u média s melasou s výtěžkem 1,4 g/l. Dále můžeme pozorovat, že produkce lipidů u kontrolních médií je vyšší, než u médií obsahující syrovátku. Pokud srovnáme profil nasycenosti mastných kyselin (Obrázek 30), tak vidíme, že s obsahem syrovátky roste obsah MUFA. Jinými slovy u kontrolních médií převažuje obsah PUFA.



Obrázek 28: Grafické znázornění produkce biomasy a vybraných metabolitů v závislosti na různém zdroji uhlíku u kmene *Sporidiobolus salmonicolor*.



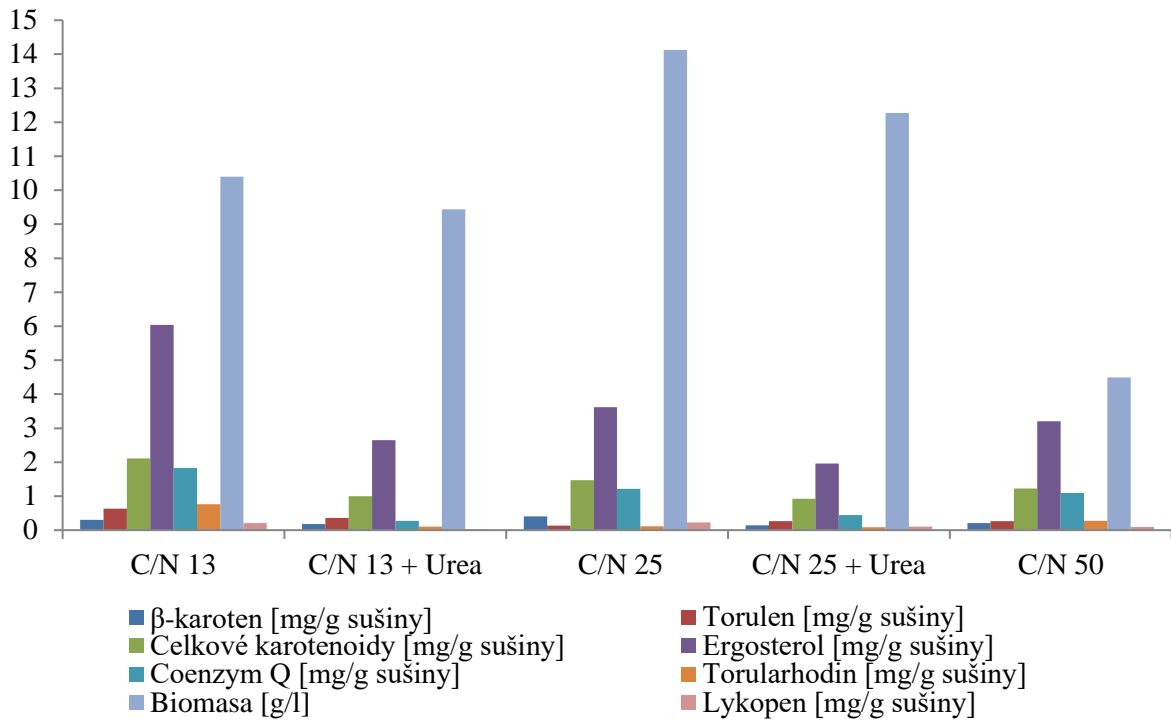
Obrázek 29: Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různém zdroji uhlíku u kmene *Sporidiobolus salmonicolor*.



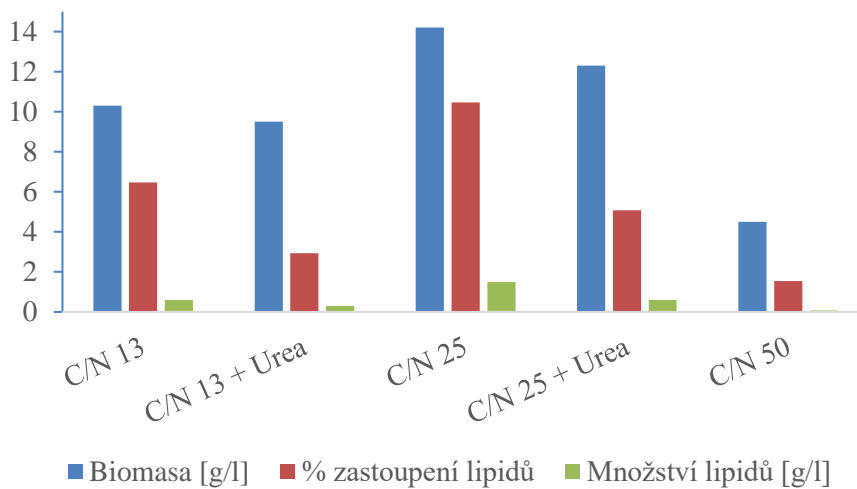
Obrázek 30: Grafické znázornění procentuálního zastoupení MK v lipidech v závislosti na různém zdroji uhlíku u kmene *Sporidiobolus salmonicolor*.

5.1.3.2 Aplikace, odpadního substrátu, kávy

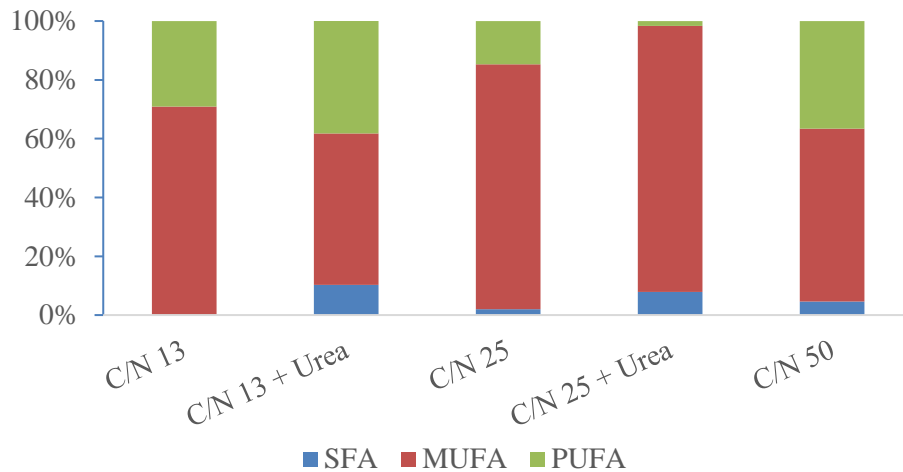
Z grafického znázornění (Obrázek 31) vidíme, že při použití kávového hydrolyzátu u kmene *Sporidiobolus salmonicolor* je nejvyšší produkce ergosterolu u poměru C/N 13 bez přídavku močoviny. Nejvyšší produkci biomasy s výtěžkem 14,125 mg/g pak vykazuje poměr C/N 25 bez přídavku močoviny. Ostatní metabolity vykazují nejlepší produkci u média C/N 13 s výtěžkem celkových karotenoidů 2,106 mg/g, ergosterolu 6,039 mg/g, koenzymu Q 1,827 mg/g a torulenu 0,633 mg/g. U média C/N 50 s močovinou došlo k letálním účinkům. Z níže uvedeného grafického znázornění (Obrázek 32) vyplývá, že nejlepší produkce lipidů je u poměru C/N 25 s výtěžkem 1,5 g/l. Z grafu (Obrázek 33) vidíme, že výrazně nejvyšší je produkce MUFA.



Obrázek 31: Grafické znázornění produkce biomasy a vybraných metabolitů v závislosti na různém C/N poměru u kmene *Sporidiobolus salmonicolor*.



Obrázek 32: Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různém C/N poměru u kmene *Sporidiobolus salmonicolor*.

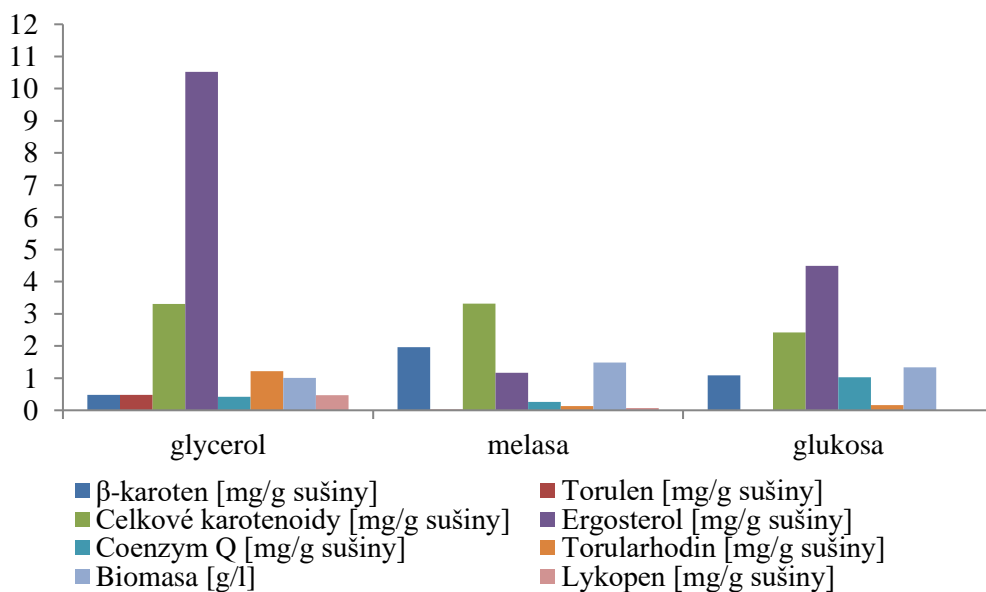


Obrázek 33: Grafické znázornění procentuálního zastoupení MK v lipidech v závislosti na různém C/N poměru u kmene *Sporidiobolus salmonicolor*

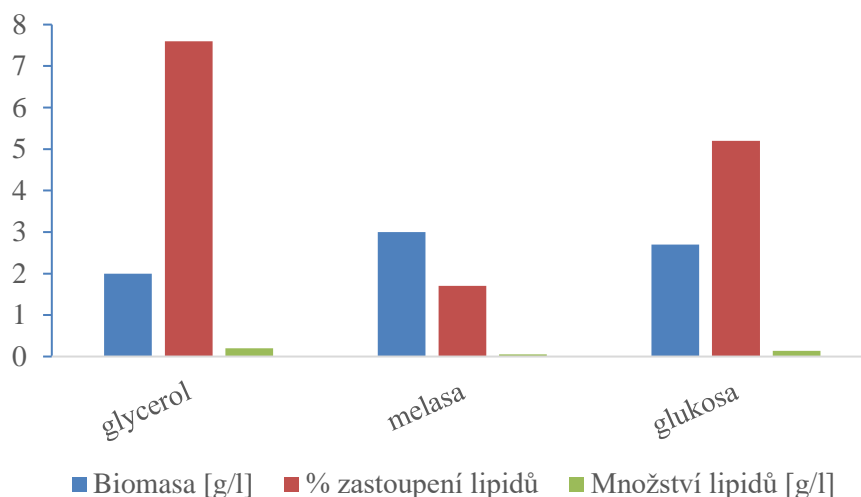
5.1.4 Kmen *Sporobolomyces roseus*

5.1.4.1 Aplikace, odpadního substrátu, syrovátky

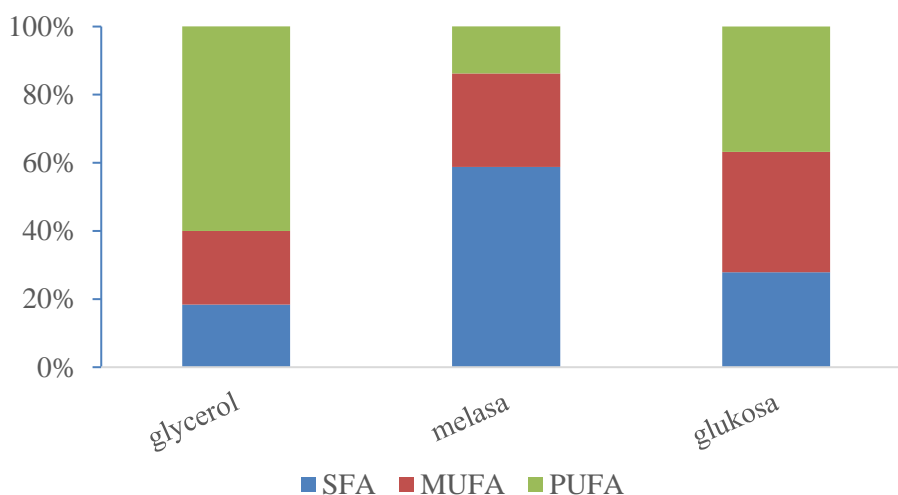
V tomto experimentu byla použita syrovátka jako odpadní substrát při kultivaci kmenu *Sporobolomyces roseus*. Z grafického znázornění (Obrázek 34) vidíme, že nejlepší produkce ergosterolu byla u kontrolního média s glycerolem s výtěžkem 10,523 mg/g. Produkce biomasy u všech kontrolních médií byla nízká. U médií, která obsahovaly syrovátku došlo k letálním účinkům, produkce sledovaných metabolitů byla nulová. Z níže uvedeného grafického znázornění (Obrázek 35) vidíme, že množství lipidů u kontrolních médií je minimální. Nejvyšší produkci lipidů vidíme u média s glycerolem s výtěžkem 0,2 g/l. U médií se syrovátkou je produkce lipidů nulová. Z grafu (Obrázek 36) vidíme, že profil nasycenosti mastných kyselin je různorodý.



Obrázek 34: Grafické znázornění produkce biomasy a vybraných metabolitů v závislosti na různém zdroji uhlíku u kmene *Sporobolomyces roseus*.



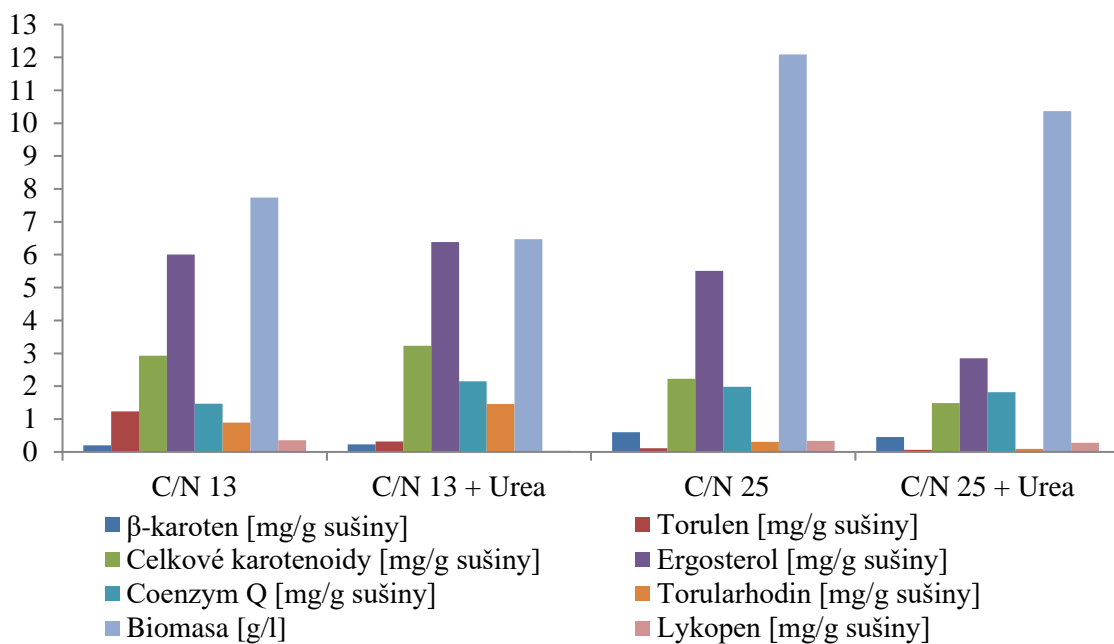
Obrázek 35: Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různém zdroji uhlíku u kmene *Sporobolomyces roseus*.



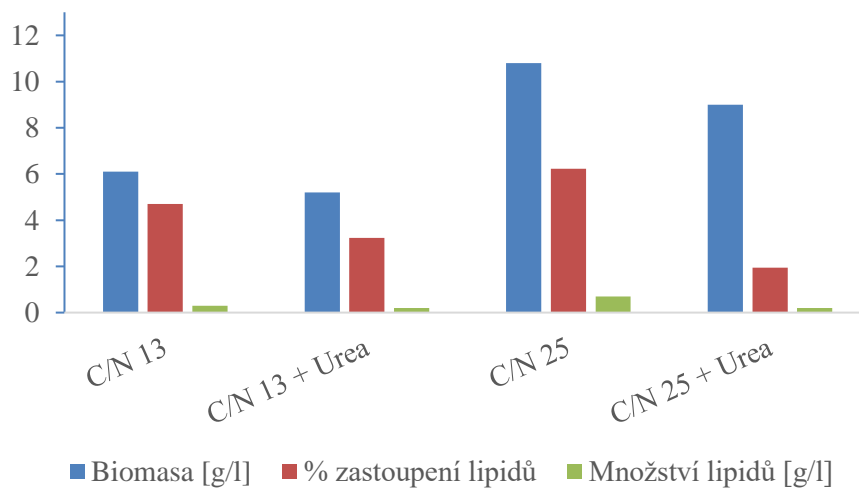
Obrázek 36: Grafické znázornění procentuálního zastoupení MK v lipidech v závislosti na různém zdroji uhlíku u kmene *Sporobolomyces roseus*.

5.1.4.2 Aplikace, odpadního substrátu, kávy

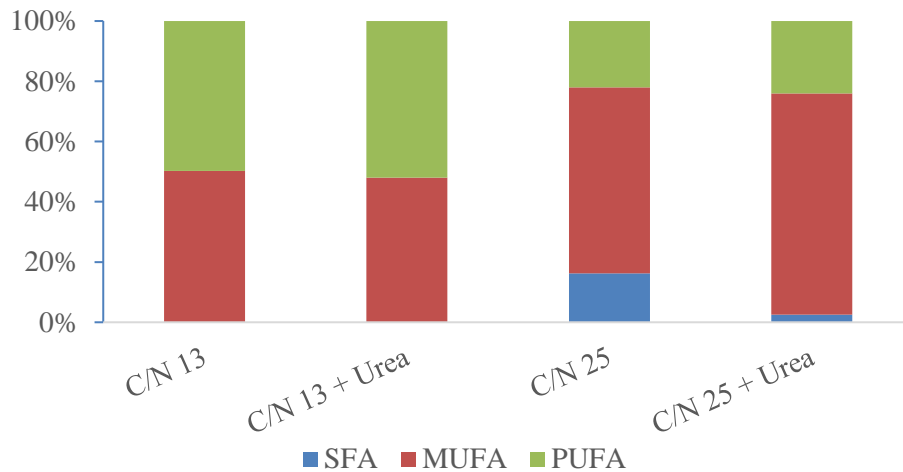
V tomto experimentu byl použit kávový hydrolyzát jako odpadní substrát. Pokud se zaměříme na produkci ergosterolu, z grafu (Obrázek 37) lze pozorovat klesající produkce se zvyšujícím se C/N poměrem. Nejlepší produkci biomasy má poměr C/N 25 s výtěžkem 12,090 mg/g. Maximální produkci celkových karotenoidů, koenzymu Q a ergosterolu vidíme u média C/N 13 Urea s výtěžkem celkových karotenoidů 3,232 mg/g, koenzymu Q 2,151 mg/g a ergosterolu 6,387 mg/g. U médií obsahujících poměr C/N 50 bez přídavku močoviny a C/N 50 s močovinou došlo k letálním účinkům. Z níže uvedeného grafického znázornění (Obrázek 38) vidíme, že produkce lipidů je nejlepší u poměru C/N 25 s výtěžkem 0,7 g/l. Z grafu (Obrázek 39) je zřejmý převažující obsah MUFA u poměrů C/N 13 a C/N 25.



Obrázek 37: Grafické znázornění produkce biomasy a vybraných metabolitů v závislosti na různém C/N poměru u kmene *Sporobolomyces roseus*.



Obrázek 38: Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různém C/N poměru u kmene *Sporobolomyces roseus*.

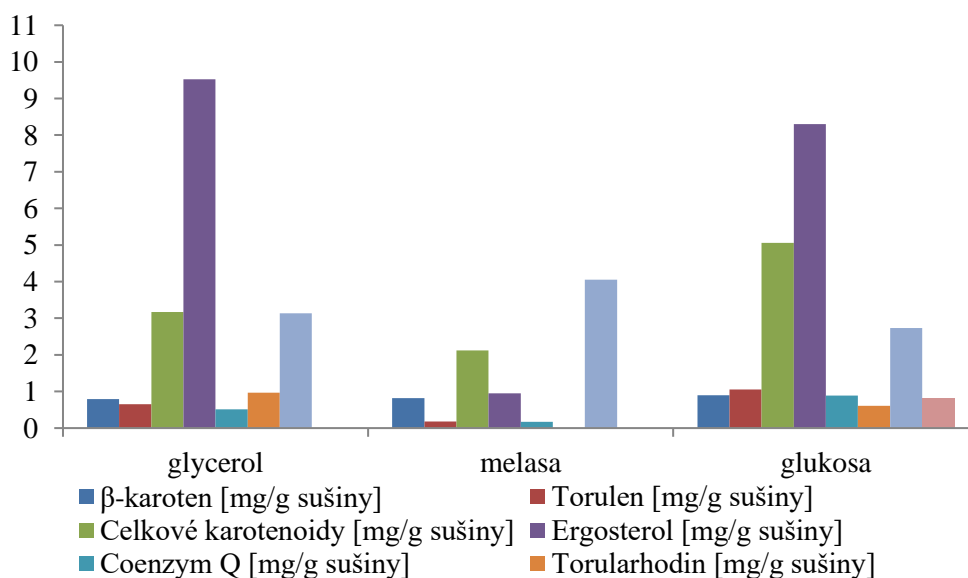


Obrázek 39: Grafické znázornění procentuálního zastoupení MK v lipidech v závislosti na různém C/N poměru u kmene *Sporobolomyces roseus*.

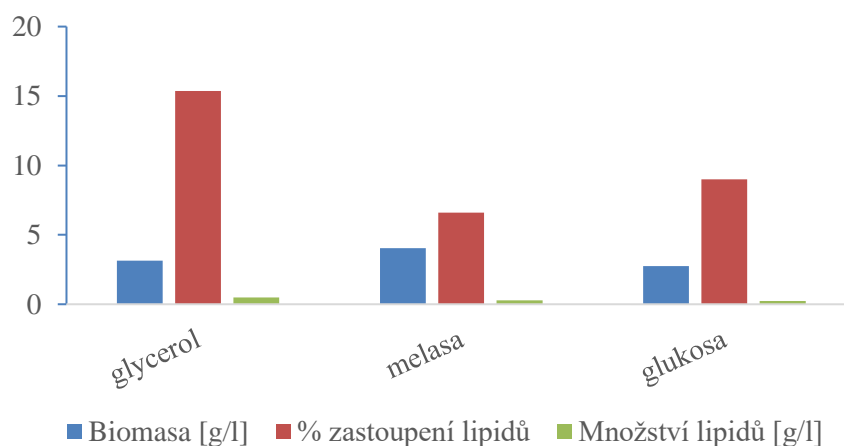
5.1.5 Kmen *Dioszegia hungarica*

5.1.5.1 Aplikace, odpadního substrátu, syrovátky

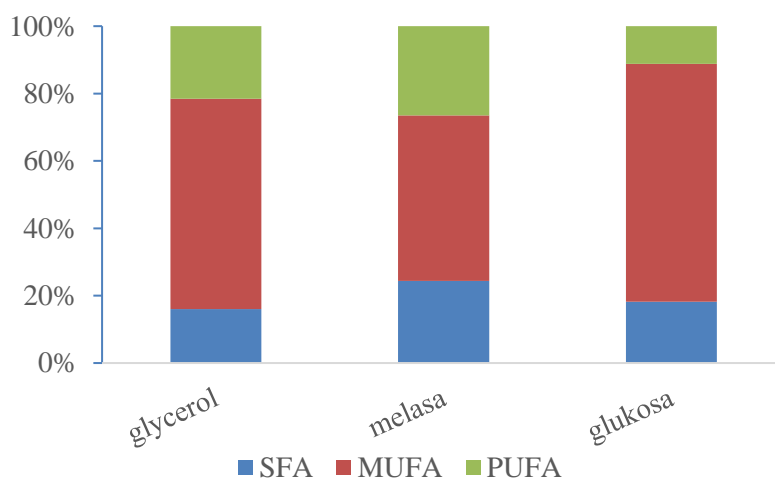
Kultivace, za využití odpadního substrátu syrovátky, kmene *Dioszegia hungarica* je graficky znázorněná na Obrázku 40. Nejlepší produkce biomasy je viditelná u kontrolního média s melasou s výtěžkem 4,051 mg/g. Nejlepší produkce sledovaných metabolitů je pak u kontrolního média s glukosou s výtěžkem celkových karotenoidů 5,062 mg/g, torulenu 1,054 mg/g a β -karotenu 0,896 mg/g. U médií obsahujících syrovátku došlo k letálním účinkům, produkce je tedy nulová. Z níže uvedeného grafického znázornění (Obrázek 41) vidíme, že nejvyšší produkce lipidů je u kontrolního média s glycerolem s výtěžkem 0,5 g/l. Profil mastných kyselin můžeme pozorovat na grafickém znázornění (Obrázek 42). Vidíme, že u kontrolních médií převažuje produkce MUFA.



Obrázek 40: Grafické znázornění produkce biomasy a vybraných metabolitů v závislosti na různém zdroji uhlíku u kmene *Dioszegia hungarica*.



Obrázek 41: Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různém zdroji uhlíku u kmene *Dioszegia hungarica*..

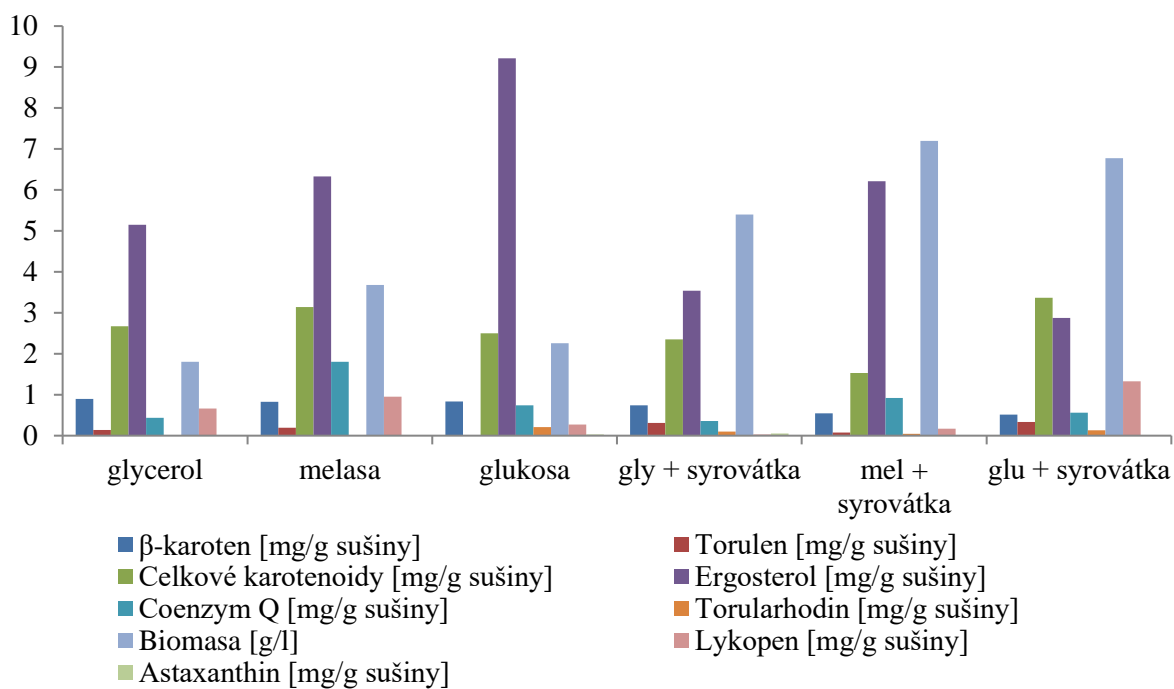


Obrázek 42: Grafické znázornění procentuálního zastoupení MK v lipidech v závislosti na různém zdroji uhlíku u kmene *Dioszegia hungarica*..

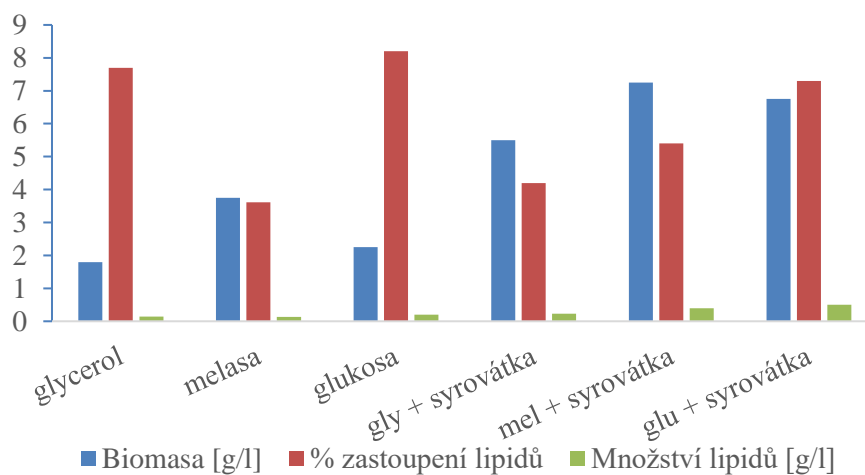
5.1.6 Kmen *Phaffia rhodozyma*

5.1.6.1 Aplikace, odpadního produktu, syrovátky

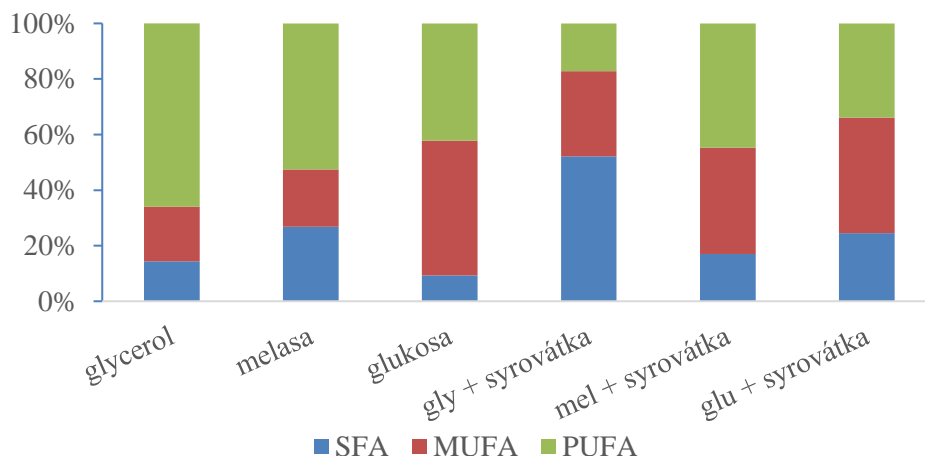
V dalším experimentu byl kultivován kmen *Phaffia rhodozyma*. V grafickém znázornění (Obrázek 43) vidíme rostoucí trend produkce ergosterolu u kontrolních médií, u médií se syrovátkou pozorujeme rostoucí trend biomasy. Maximální produkce ergosterolu je u kontrolního média s glukosou s výtěžkem 9,213 mg/g. Produkce biomasy je vyšší u médií se syrovátkou, než u kontrolních médií. Nejvyšší koncentrace biomasy je pozorována u média s melasou a syrovátkou s výtěžkem 7,198 mg/g. V níže uvedeném grafickém znázornění (Obrázek 44) vidíme maximální produkci lipidů u média glukosa a syrovátka s výtěžkem 0,5 g/l. Z grafu (Obrázek 45) vidíme zvýšenou syntézu PUFA u kontrolních médií. Z typů polynenasycených mastných kyselin pak převládá kyselina linolenová.



Obrázek 43: Grafické znázornění produkce biomasy a vybraných metabolitů v závislosti na různém zdroji uhlíku u kmene *Phaffia rhodozyma*.



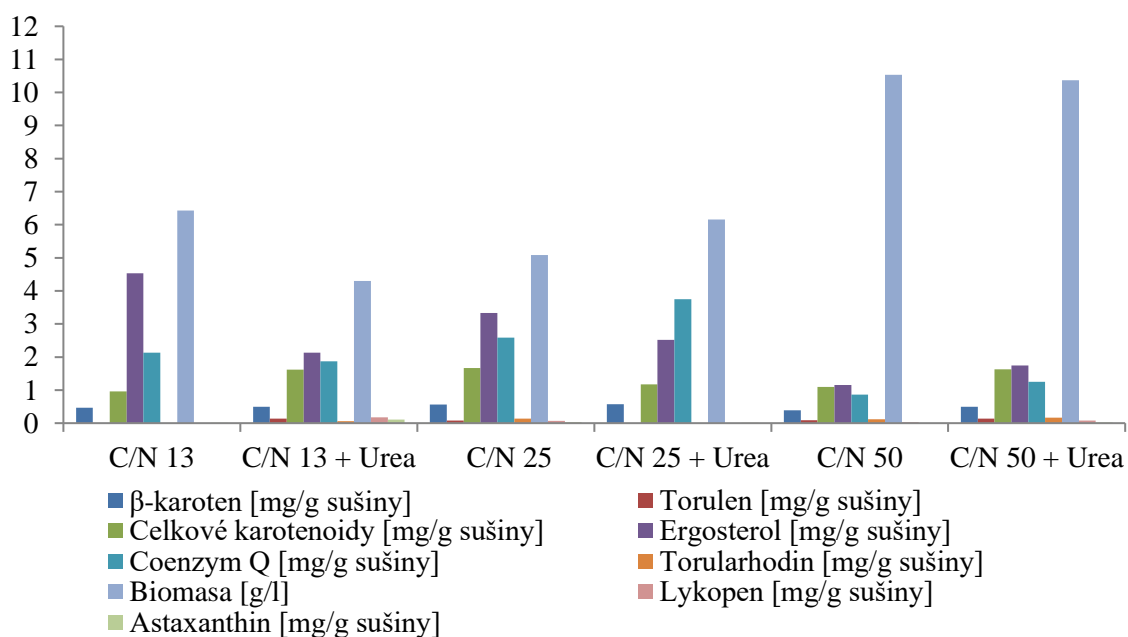
Obrázek 44: Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různém zdroji uhlíku u kmene *Phaffia rhodozyma*.



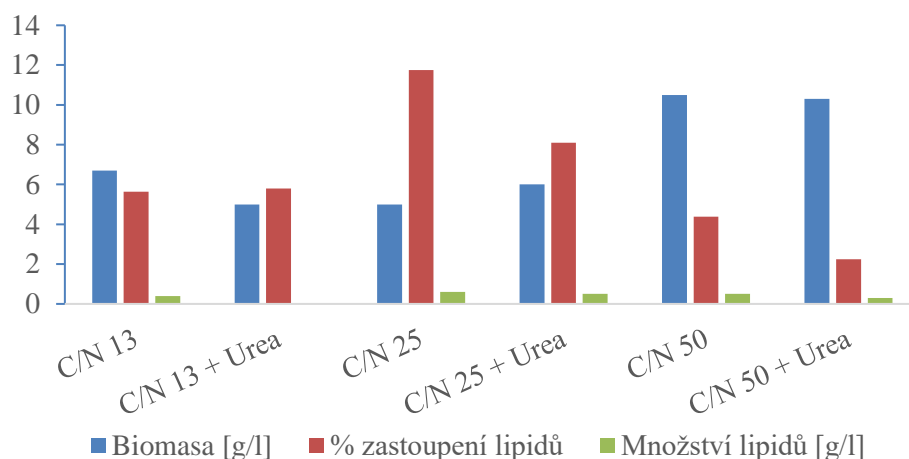
Obrázek 45: Grafické znázornění procentuálního zastoupení MK v lipidech v závislosti na různém zdroji uhlíku u kmene *Phaffia rhodozyma*.

5.1.6.2 Aplikace, odpadního substrátu, kávy

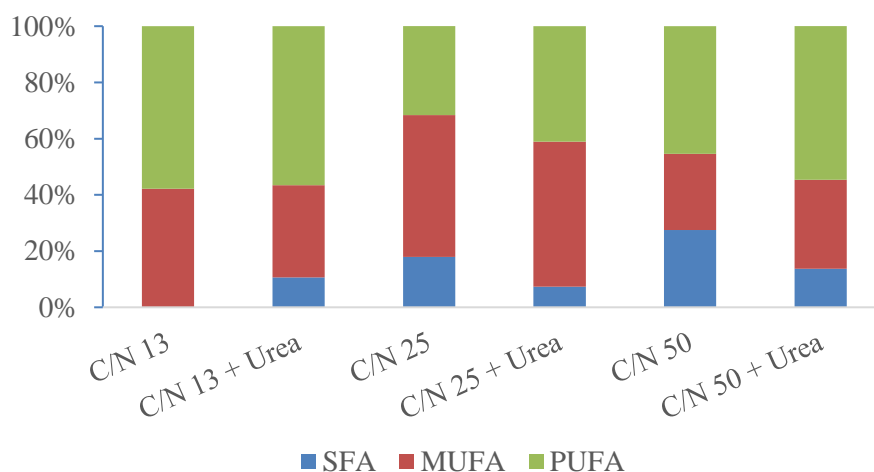
V grafickém znázornění (Obrázek 46) vidíme rostoucí trend produkce biomasy se zvětšujícím se C/N poměrem. Zároveň je zřejmé, že čím nižší je poměr, tím větší je produkce ergosterolu. Maximální produkce ergosterolu u poměru C/N 13 je 4,537 mg/g. Ostatní metabolity vykazují vyšší produkci u médií obsahujících močovinu. V grafu (Obrázek 47) můžeme pozorovat produkci lipidů. Nejvyšší produkci lipidů vidíme u poměru C/N 25 s výtěžkem 0,6 g/l. Produkce lipidů je vždy nižší u médií s obsahem močoviny. V grafickém znázornění (Obrázek 48) vidíme zvýšenou syntézu PUFA u nejnižšího C/N poměru. Z polynenasycených mastných kyselin převládá kyselina linolenová. Nejlepší syntézu MUFA vykazuje poměr C/N 25 a C/N 25 s močovinou.



Obrázek 46: Grafické znázornění produkce biomasy a vybraných metabolitů v závislosti na různém C/N poměru u kmene *Phaffia rhodozyma*.



Obrázek 47: Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různém C/N poměru u kmene *Phaffia rhodozyma*.



Obrázek 48: Grafické znázornění procentuálního zastoupení MK v závislosti na různém C/N poměru u kmene *Phaffia rhodozyma*.

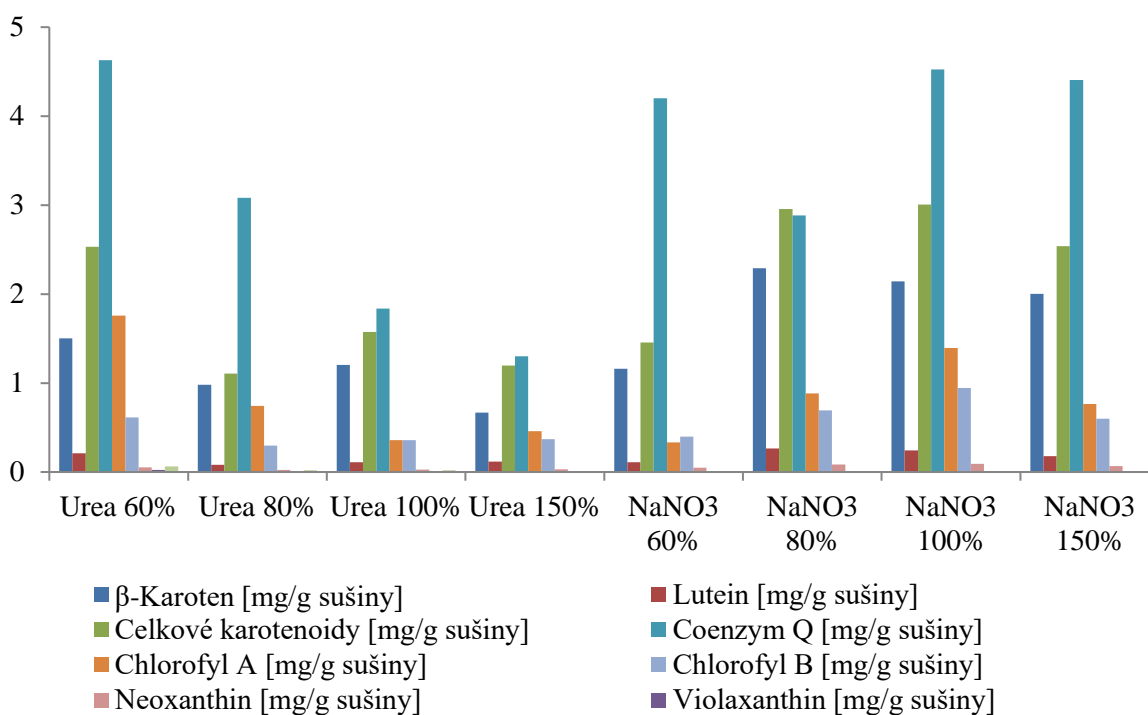
5.2 Řasy

Do experimentu byly vybrány následující druhy mikrořas: *Desmodesmus quadricauda*, *Desmodesmus acutus*, *Scenedesmus dimorphus*, *Chlamydomonas reinhardtii*. Všechny mikrořasy byly kultivovány v multikultivátoru, kde byl aplikován světelný stres ve formě střídání cyklů tmy a světla. Světlo trvalo 16 hodin, tma 8 hodin. Po celou dobu experimentu bylo nastaveno osvětlení na $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Dále byl aplikován stres ve formě různého zdroje a koncentrace dusíku. Byla použita močovina a NaNO_3 jako zdroj dusíku. Experiment trval 10 dní. V dalším experimentu byla sledována produkce biomasy a dalších metabolitů u kmenů *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus quadricauda* a *Chlamydomonas reinhardtii*. Tento experiment probíhal ve větším objemu se zdrojem dusíku a trval 14 dní.

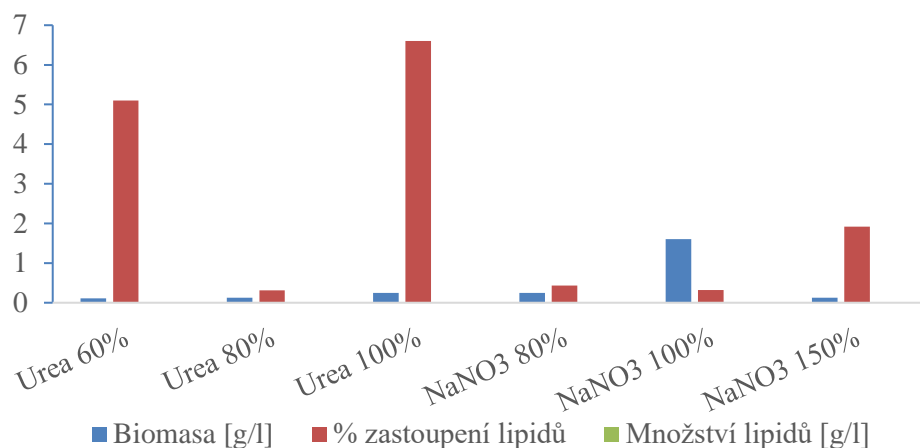
5.2.1 Kmen *Desmodesmus quadricauda*

5.2.1.1 Aplikace různého zdroje dusíku

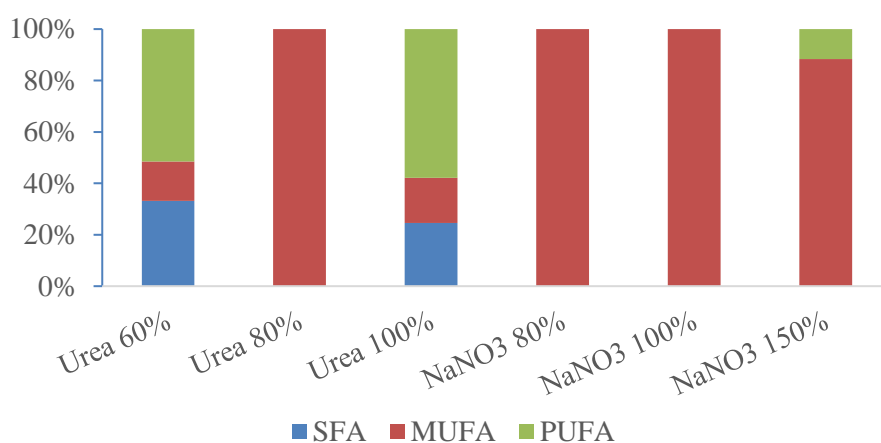
V tomto experimentu byl kultivován kmen *Desmodesmus quadricauda*. Z grafického znázornění (Obrázek 49) vidíme, že produkce biomasy a ostatních metabolitů u médií s vyšší koncentrací močoviny vykazuje klesající charakter. U médií s dusičnanem sodným můžeme pozorovat rostoucí trend zleva doprava. Při porovnání médií s močovinou a dusičnanem sodným, vidíme, že lepší produkce metabolitů je u médií s dusičnanem sodným. Nejvyšší stanovené výtěžky můžeme vidět u média s dusičnanem sodným 100%, kde celkové karotenoidy měly 3,008 mg/g sušiny, koenzym Q 4,526 mg/g sušiny, β -karoten 2,144 mg/g sušiny, chlorofyl A 1,393 mg/g sušiny, chlorofyl B 0,946 mg/g sušiny, lutein 0,244 mg/g sušiny. Z níže uvedeného grafického znázornění (Obrázek 50) vidíme, že produkce lipidů je nízká u všech médií. Nejvyšší produkce, která činí 0,02 g/l, je u média močovina 100%. Z grafu (Obrázek 51) vyplývá, že převládá syntéza MUFA, a to především u médií s dusičnanem sodným, nejvíce pak u média NaNO_3 80% a NaNO_3 100%.



Obrázek 49: Grafické znázornění produkce biomasy a vybraných metabolitů v závislosti na různém zdroji dusíku u kmene *Desmodesmus quadricauda*.



Obrázek 50: Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různém zdroji dusíku u kmene *Desmodesmus quadricauda*.



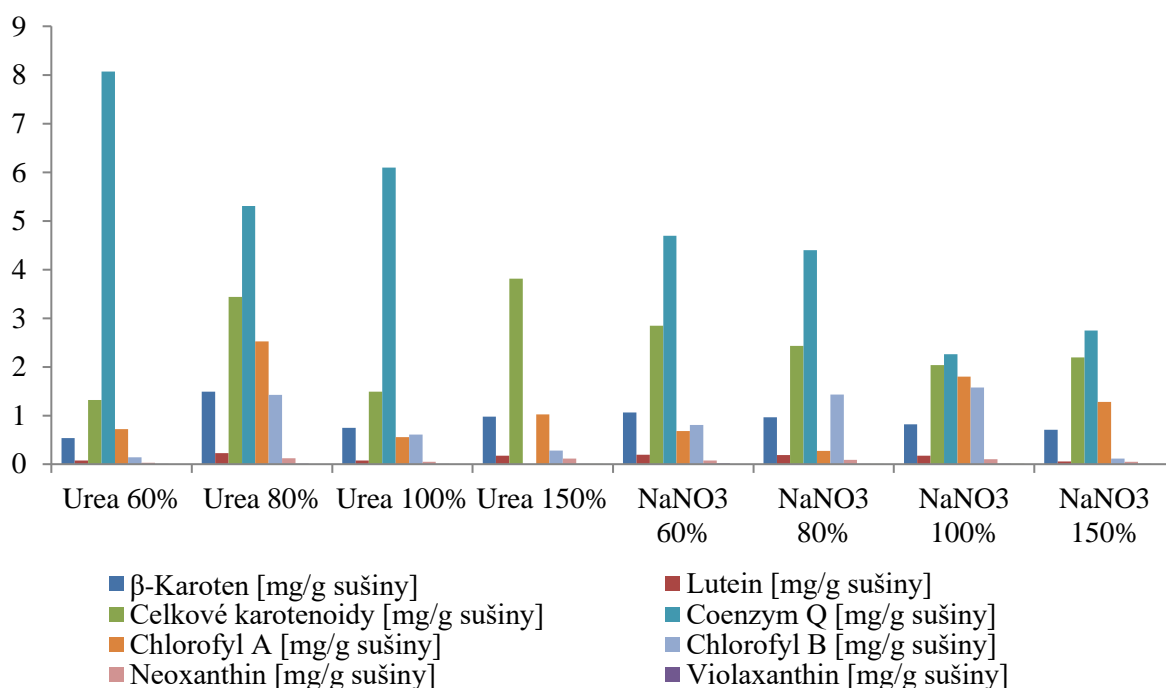
Obrázek 51: Grafické znázornění procentuálního zastoupení MK v závislosti na různém zdroji dusíku u kmene *Desmodesmus quadricauda*.

5.2.2 Kmen *Desmodesmus acutus*

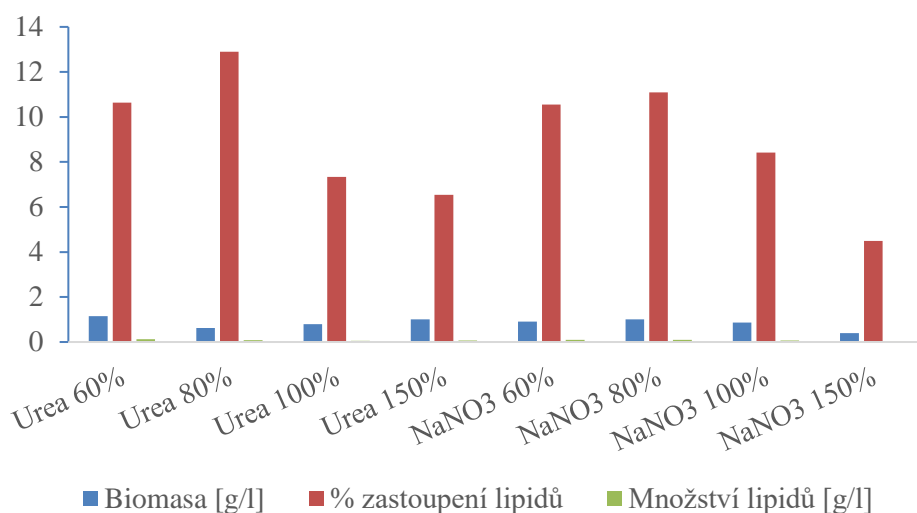
5.2.2.1 Aplikace různého zdroje dusíku

V tomto experimentu byl kultivován kmen *Desmodesmus acutus*. Z grafu (Obrázek 52) vidíme, že produkce sledovaných metabolitů vykazuje klesající tendenci s přibývajícím koncentrací dusíku. Pro vyšší produkci metabolitů vychází lépe použití močoviny s nižším obsahem dusíkatého zdroje. Nejlepší produkci koenzymu Q vykazuje médium Urea 60 % a to 8,072 mg/g sušiny. Nejvyšší produkci ostatních metabolitů vidíme u média Urea 80% s výtěžkem 2,522 mg/g chlorofylu A, 1,428 mg/g chlorofylu B, 1,490 mg/g β -karotenu, 0,227 mg/g luteinu. Z níže uvedeného grafického znázornění (Obrázek 53) vidíme nízkou produkci lipidů, u níž můžeme pozorovat snižující se trend produkce se zvyšující koncentrací dusíku. Nejvyšší produkci 0,12 g/l má médium Urea 60%. Při hodnocení profilu mastných kyselin (Obrázek 54) vidíme, že se zvyšující koncentrací dusíkatého zdroje se snižuje MUFA a zároveň narůstá PUFA. U dusičnanu sodného vidíme vyšší produkci MUFA, než u močoviny.

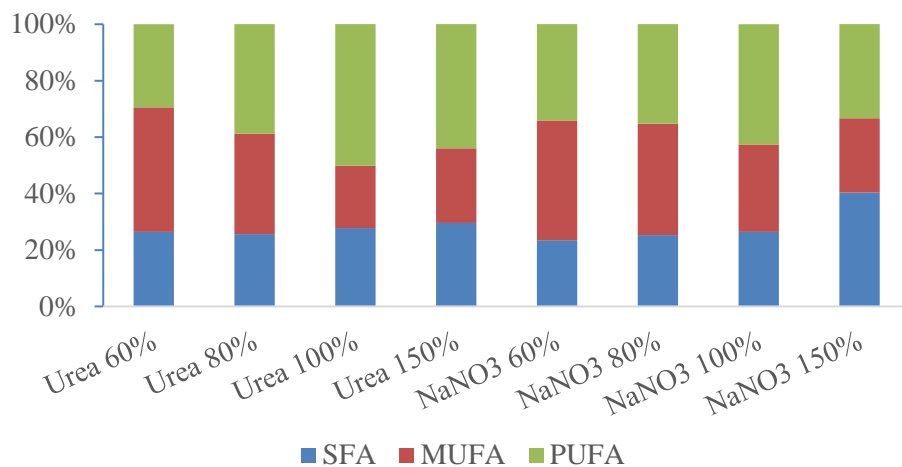
Na grafu (Obrázek 55) vidíme pro ukázkou zobrazení růstových křivek u kmene *Desmodesmus acutus* při různých zdrojích dusíku.



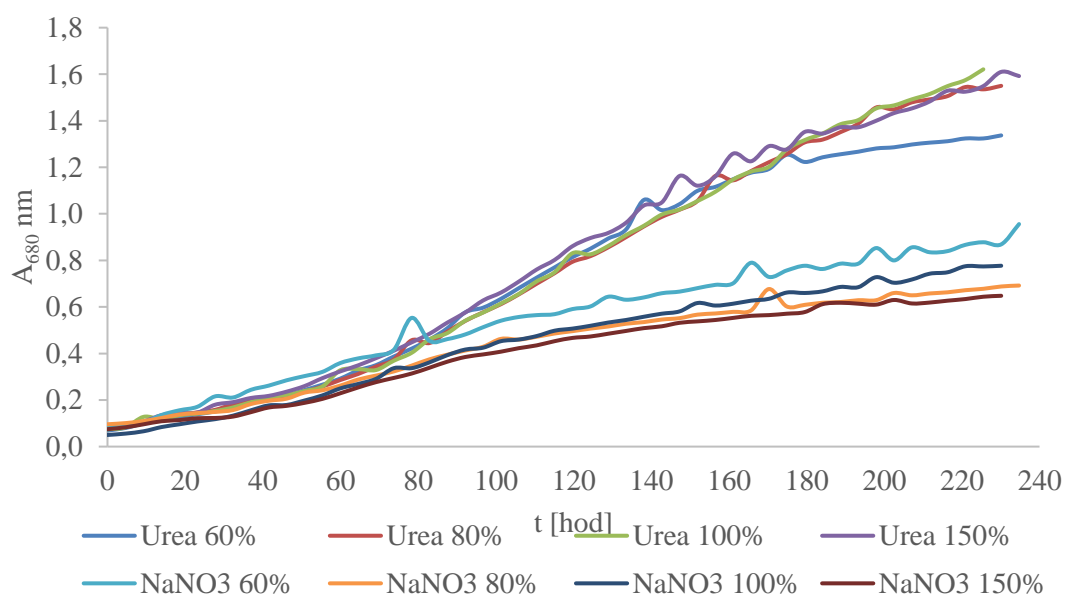
Obrázek 52: Grafické znázornění produkce biomasy a vybraných metabolitů v závislosti na různém zdroji dusíku u kmene *Desmodesmus acutus*.



Obrázek 53: Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různém zdroji dusíku u kmene *Desmodesmus acutus*.



Obrázek 54: Grafické znázornění procentuálního zastoupení MK v závislosti na různém zdroji dusíku u kmene *Desmodesmus acutus*.

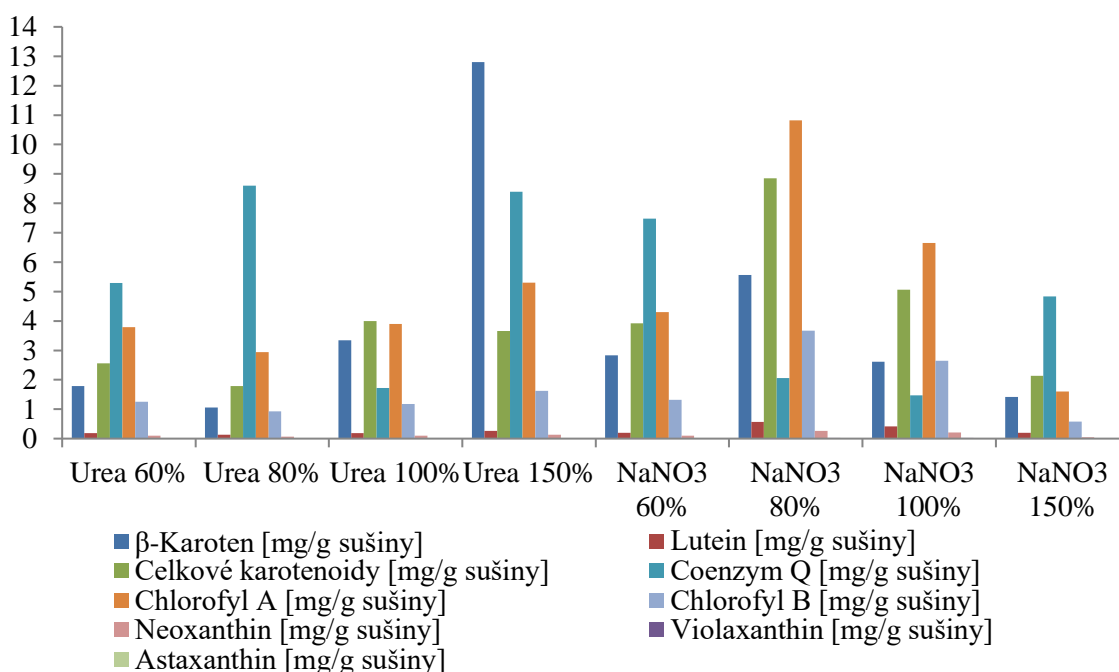


Obrázek 55: Grafické znázornění absorbance [680 nm] u kmene *Desmodesmus acutus* v závislosti na různém zdroji dusíku.

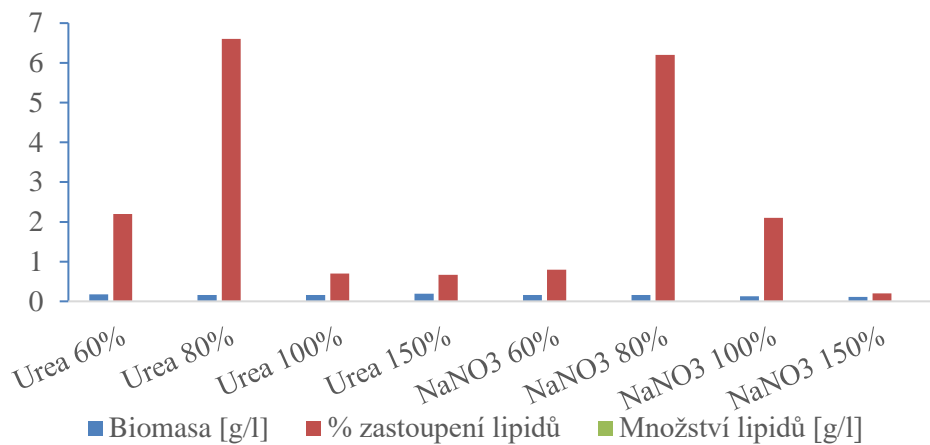
5.2.3 Kmen *Scenedesmus dimorphus*

5.2.3.1 Aplikace různého zdroje dusíku

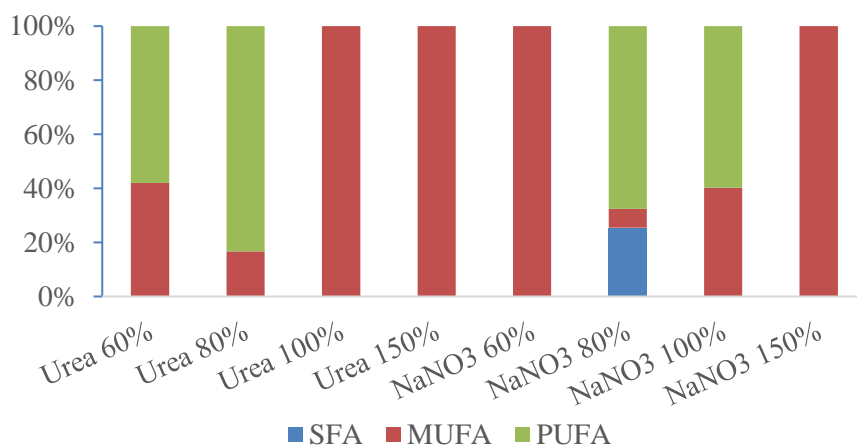
V experimentu byl kultivován kmen *Scenedesmus dimorphus*. Z grafického znázornění (Obrázek 56) vyplývá, že vyšší koncentrace močoviny indukují produkci metabolitů. U koncentrace dusičnanu sodného můžeme pozorovat opačný efekt. Nejvyšší výtěžek β -karotenu byl pozorován u média s močovinou 150%, a to 12,796 mg/g sušiny. Nejvyšší produkce dalších metabolitů byla u média NaNO_3 80% s výtěžkem 8,847 mg/g celkových karotenoidů, 10,825 mg/g chlorofylu A, 3,670 mg/g chlorofylu B. Produkce lipidů (Obrázek 57) se pohybuje v nízkých hodnotách u všech typů médií. Nejvyšší produkce lipidů je u močoviny 80% s výtěžkem 0,01 g/l. Profil nasycenosti mastných kyselin vykazuje větší zastoupení MUFA u médií s větší koncentrací dusíkatého zdroje. Při nižších koncentracích dusíku jsou buňky schopné akumulovat kolem 60 % PUFA.



Obrázek 56: Grafické znázornění produkce biomasy a vybraných metabolitů v závislosti na různém zdroji dusíku u kmene *Scenedesmus dimorphus*.



Obrázek 57: Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různém zdroji dusíku u kmene *Scenedesmus dimorphus*.

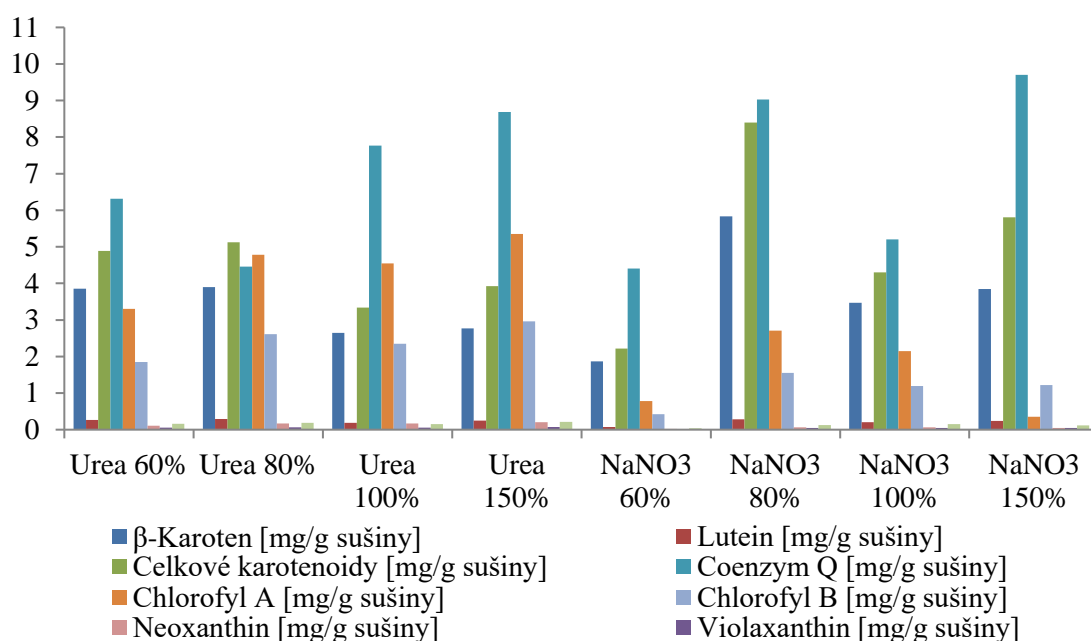


Obrázek 58: Grafické znázornění procentuálního zastoupení MK v závislosti na různém zdroji dusíku u kmene *Scenedesmus dimorphus*.

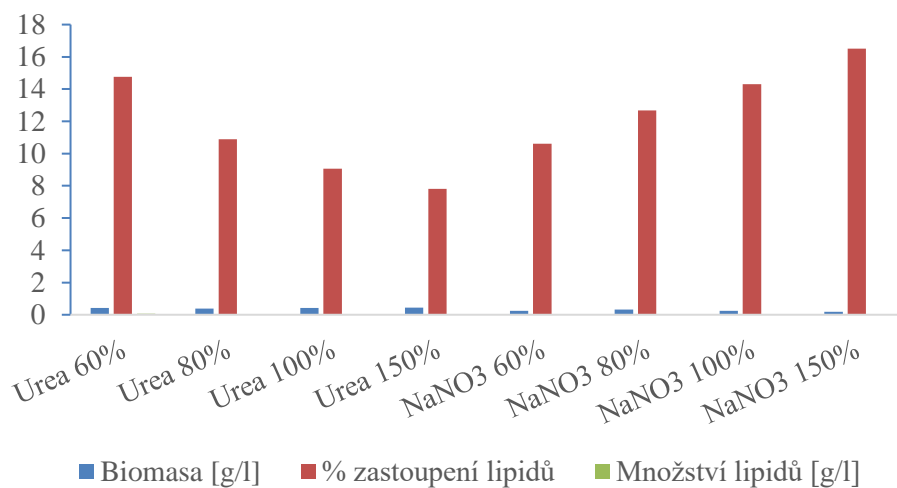
5.2.4 Kmen *Chlamydomonas reinhardtii*

5.2.4.1 Aplikace různého zdroje dusíku

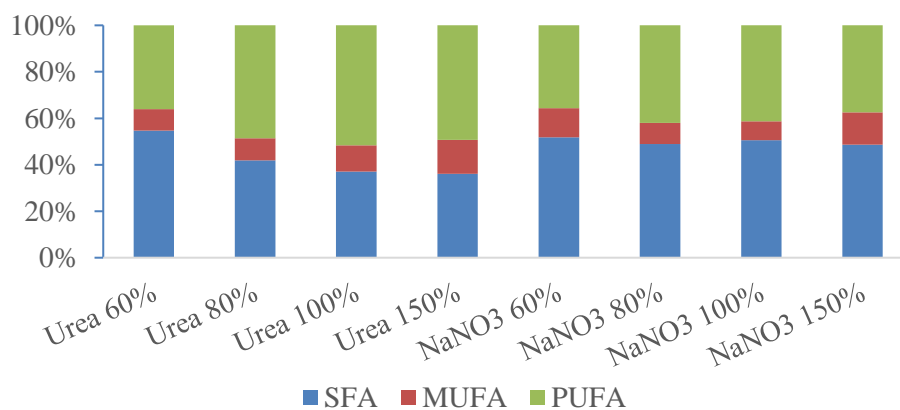
Při kultivaci kmene *Chlamydomonas reinhardtii* (Obrázek 59) je na první pohled u médií s rostoucí koncentrací močoviny znatelný rostoucí trend produkce sledovaných metabolitů. Produkce chlorofylu A a chlorofylu B je vyšší u médií s močovinou, než u médií s dusičnanem sodným. U média Urea 150% vidíme nejvyšší produkci koenzymu Q, chlorofylu A, chlorofylu B s výtěžkem 8,690 mg/g koenzymu Q, 5,352 mg/g chlorolu A, 2,964 mg/g chlorofylu B. Nejvyšší produkci β -karotenu vidíme u média NaNO_3 80%, kde výtěžek dosahuje 5,833 mg/g. Z níže uvedeného grafického znázornění (Obrázek 60) vidíme velmi nízkou produkci lipidů s klesajícím charakterem. Nejvyšší produkce lipidů je 0,06 g/l u média Urea 60%. Při porovnání profilu mastných kyselin (Obrázek 61) vidíme, že buňky akumulují především PUFA. Čím vyšší koncentrace močoviny, tím více buňky akumulují PUFA.



Obrázek 59: Grafické znázornění produkce biomasy a vybraných metabolitů v závislosti na různém zdroji dusíku u kmene *Chlamydomonas reinhardtii*.



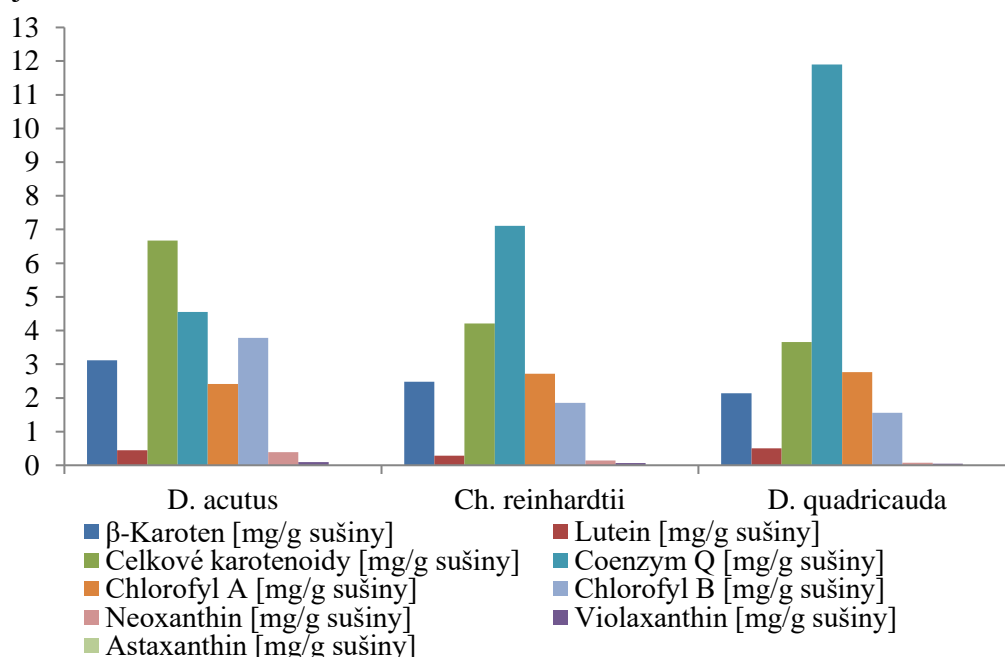
Obrázek 60: Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různém zdroji dusíku u kmene *Chlamydomonas reinhardtii*.



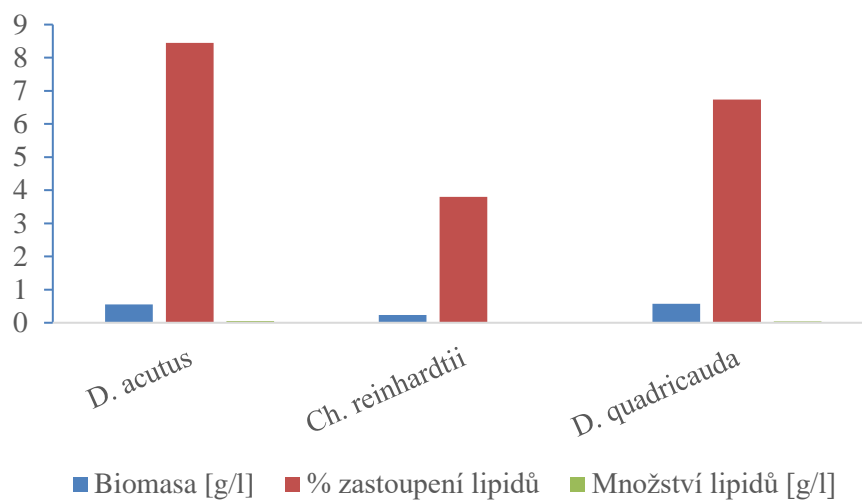
Obrázek 61: Grafické znázornění procentuálního zastoupení MK v závislosti na různém zdroji dusíku u kmene *Chlamydomonas reinhardtii*.

5.2.5 Porovnání produkce biomasy a ostatních metabolitů u vybraných řas

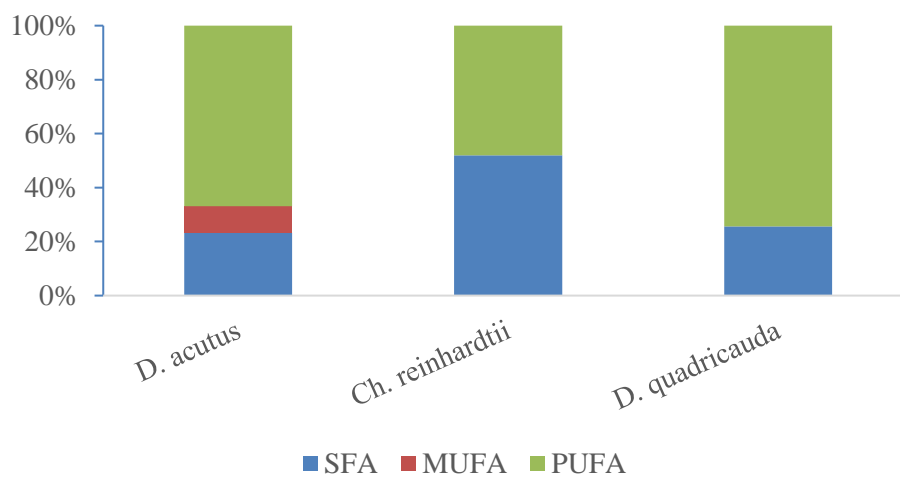
V tomto experimentu byla porovnána produkce biomasy, lipidů i ostatních metabolitů u kmenů *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus quadricauda* a *Chlamydomonas reinhardtii*. Experiment trval 10 dní, probíhal ve větším objemu za přítomnosti dusíkatého zdroje. Média byla probublávána vzduchem. Z grafického znázornění (Obrázek 62) vidíme, že produkce koenzymu Q má rostoucí trend. Nejvyšší je u kmene *Desmodesmus quadricauda* s výtěžkem 11,898 mg/g sušiny. Produkce dalších metabolitů má klesající trend zleva doprava. Nejlépe vychází produkce u kmene *Desmodesmus acutus*, kde produkce celkových karotenoidů je 6,669 mg/g, 3,116 mg/g β -karotenu, 3,784 mg/g chlorofylu B, 0,388 mg/g neoxanthinu. Produkce lipidů (Obrázek 63) je velmi nízká. Nejvyšší produkci lipidů má kmen *Desmodesmus acutus* s výtěžkem 0,05 g/l. Z profilu mastných kyselin (Obrázek 64) vidíme, že v buňkách převažuje PUFA.



Obrázek 62: Grafické znázornění produkce biomasy a vybraných metabolitů u kmene *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus quadricauda* a *Chlamydomonas reinhardtii*.



Obrázek 63: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus quadricauda* a *Chlamydomonas reinhardtii*



Obrázek 64: Grafické znázornění procentuálního zastoupení MK u kmene *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus quadricauda* a *Chlamydomonas reinhardtii*

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo porovnání produkce různých metabolitů, jak kvasinkami, tak mikrořasami kultivovanými v podmínkách, za přidání různých odpadních substátů, za účelem budoucího využití v biotechnologickém průmyslu. U kvasinek byly sledované následující kmeny: *Sporidiobolus metaroseus*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Sporobolomyces roseus*, *Sporidiobolus salmonicolor*, *Dioszegia hungarica*. Mezi sledované kmeny mikrořas patřily *Scenedesmus dimorphus*, *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus quadricauda*, *Chlamydomonas reinhardtii*. Mezi sledované metabolity u kvasinek patřila produkce karotenoidů, ergosterolu, koenzymu Q, lipidických látek, a to v závislosti na přidaném odpadním substrátu. U mikrořas byla sledována produkce stejných metabolitů v závislosti na různém zdroji dusíku s různou koncentrací.

V první sérii experimentu u kvasinek byla provedena kultivace s využitím syrovátky jako odpadního substrátu. V druhé sérii experimentů byl použit kávový hydrolyzát. Následně byly vyhodnoceny optimální podmínky pro kultivaci, v závislosti na použitém substrátu. Tyto stanovené optimální podmínky by mohly být využitelné pro biotechnologickou produkci.

Kmen *Sporidiobolus pararoseus* vykazoval lepší produkci biomasy na kávovém hydrolyzátu, než na syrovátce. Optimální médium se syrovátkou se jeví médium s glycerolem. Optimální médium pro výtěžnost lipidů se jeví médium s glukosou. Při použití kávového hydrolyzátu se jako optimální jeví poměr C/N 13 s močovinou. Z hlediska produkce lipidů se jako optimální jeví poměr C/N 25.

U kmene *Sporidiobolus metaroseus* je optimální médium pro produkci biomasy a dalších metabolitů médium s melasou a syrovátkou. Z hlediska produkce lipidů se rovněž jeví optimální médium s melasou a syrovátkou. V případě produkce metabolitů u kávového hydrolyzátu se nejlépe jeví poměr C/N 13 s močovinou. Nejlepší produkce lipidů je u poměru C/N 25.

Kmen *Sporidiobolus salmonicolor* vykazoval nejlepší produkci biomasy v médiu s glukosou a syrovátkou. Ostatní metabolity byly lépe produkovány v médiu s glycerolem a syrovátkou. Produkce lipidů nejlépe vychází v médiu, obsahující glukosu a syrovátku. Produkce metabolitů v závislosti na aplikaci kávového hydrolyzátu se jeví nejlépe u média C/N 13. Z hlediska výtěžnosti lipidů se jeví lépe médium C/N 25.

U kmene *Sporobolomyces roseus* nebyly stanoveny optimální podmínky pro kultivaci v závislosti na syrovátce. Při aplikaci syrovátky do médií došlo k letálním účinkům. Z hlediska aplikace kávového hydrolyzátu se nejlépe jeví médium C/N 13 s močovinou. Nejlepší produkce lipidů byla u média C/N 25. U dalšího kmene *Dioszegia hungarica* pozorujeme stejné letální účinky při aplikaci syrovátky, jako u výše zmíněného kmene. Experiment s kávovým hydrolyzátem u tohoto kmene neproběhl.

Kmen *Phaffia rhodozyma* byl poslední sledovaný kvasinkový kmen. Bylo zjištěno, že dochází k nejvyšším nárůstům biomasy a ergosterolu u média s melasou a syrovátkou. Produkce lipidů nejlépe vychází u média glukosa a syrovátka. Z hlediska kávového hydrolyzátu se jako optimální médium jeví poměr C/N 25. Nejlepší produkce lipidů je u poměru C/N 25.

Vybrané kvasinky poskytovaly lepší výtěžky při aplikaci kávového hydrolyzátu. Pro produkci lipidů se u všech kvasinek nejlépe osvědčilo médium C/N 25. Pro produkci metabolitů bylo optimální médium C/N 13 nebo C/N 25. Předpokladem bylo, že větší C/N poměr, tedy větší množství uhlíku, se projeví na ukládání do zásob. Nicméně, jako optimální se jeví C/N 25. Dá se předpokládat, že přebytek uhlíku není ukládán do zásob při nejvyšším poměru. V budoucích experimentech je možné aplikovat i jiné poměry.

V další sérii experimentů byly zapojeny řasy. Kultivace probíhala v multikultivátoru v závislosti na různém dusíkatém zdroji a různé koncentraci daného dusíkatého zdroje. Kmen *Desmodesmus quadricauda* vykazoval optimální podmínky produkce u média NaNO₃ 100%. Nejlepší produkce lipidů byla u média močovina 100%. Optimální médium pro produkci metabolitů u kmene *Desmodesmus acutus* je močovina 80%. Nejvyšší produkci lipidů vykazovalo médium močovina 60%.

Kmen *Scenedesmus dimorphus* vykazoval optimální podmínky pro produkci metabolitů u média NaNO₃ 80%. Optimum pro produkci lipidů bylo pozorováno u média močovina 80%.

Kmen *Chlamydomonas reinhardtii* upřednostňoval spíše média s močovinou. Nejlepší produkce metabolitů je u média močovina 150%. Nejlepší produkce β-karotenu je u média močovina 80%. Z hlediska akumulace lipidů se jako nejlepší jeví médium močovina 60%.

Ve většině případů vedla větší koncentrace dusíkatého zdroje k negativnímu efektu na produkci lipidů. V budoucích experimentech je možné se zaměřit na nižší koncentrace dusíku v médiu, popřípadě vyzkoušet jiné zdroje.

Dále byl proveden experiment, ve kterém se porovnávala produkce metabolitů u kmenů *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus quadricauda* a *Chlamydomonas reinhardtii*. Tento experiment již neprobíhal v multikultivátoru a nebyl doprovázen žádným stresovým faktorem. Nejvýznamnější produkce metabolitů byla u kmene *Desmodesmus acutus*. Rovněž akumulace lipidů v buňkách byla nejlepší u kmene *Desmodesmus acutus*.

Závěrem byly stanoveny nejvhodnější kmeny mikrořas a kvasinek. Nejvhodnějším kmenem mikrořas, v závislosti na využití různé koncentrace dusíku, je kmen *Chlamydomonas reinhardtii*. U kvasinek, v rámci využití kávového hydrolyzátu, byl jako nejvhodnější určen kmen *Sporidiobolus metaroseus*, a to zejména kvůli nejlepší produkci celkových karotenoidů. V rámci využití syrovátky byl jako nejvhodnější vybrán kmen *Sporidiobolus pararoseus*.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVIÁ. *Úvod do biologie kvasinek*. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-718-4990-1.
- [2] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. Bratislava: alfa, 1990. ISBN 80-05-00644-6.
- [3] DOUŠA, Michal. Vlastnosti karotenoidů, News from HPLC analysis [online]. c1996- 2004 [cit. 2018-05-29]. Dostupné z: http://hplc1.sweb.cz/Carotenoids/ch_karotenoids.htm
- [4] EVENS, Martha. Beta-carotene. In: University of Bristol: School of Chemistry [online]. Bristol: University of Bristol, c2002-2017 [cit. 2018-05-29]. Dostupné z: http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotene/beta-carotene_vita.html
- [5] KRULIKOVSKÁ, Tereza, Petra PATÁKOVÁ a Miroslav LUKČO. Vývoj metody izolace karotenoidních barviv z kvasinek rodu *Rhodotorula*. Chemické listy [online]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2008, 102(12), 1145-1149 [cit. 2018-05-29]. ISSN 1213- 7103. Dostupné z: <http://docplayer.cz/16299096-Vyvoj-metody-izolace-karotenoidnichbarviv-z-kvasinek-rodu-rhodotorula-tereza-krulikovska-petra-patakova-a-miroslavlukco.html>
- [6] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [7] MATA-GÓMEZ, Luis, Julio MONTAÑEZ, Alejandro MÉNDEZ-ZAVALA a Cristóbal AGUILAR. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories* [online]. 2014, 13(1), 12- [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1186/1475-2859-13-12. ISSN 1475-2859. Dostupné z: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-13-12>
- [8] ERNSTER, Lars a Gustav DALLNER. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1995, **1271**(1), 195-204. DOI: 10.1016/0925-4439(95)00028-3. ISSN 09254439. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0925443995000283>
- [9] GUALTIERI, Paolo a L. BARSANTI. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology* [online]. Boca Raton, 2006 [cit. 2019-12-04]. ISBN 08-493-1467-4.
- [10] GRAHAM, Linda E. a Lee Warren WILCOX. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology* [online]. Upper Saddle River, NJ, 2006 [cit. 2019-12-04]. ISBN 978-013- 6603-337.
- [11] ROGERS, Kara. *Fungi, algae, and protists*. New York, NY: Britannica Educational Pub. in association with Rosen Educational Services, 2011. Biochemistry, cells, and life. ISBN 16-153-0310-3.
- [12] FOTT, Bohuslav. *Sinice a řasy*. Praha: Československá akademie věd, 1956. ISBN 30.90.
- [13] FOTT, Jan. *Hlenky, houby, řasy*. Brno: Masarykova univerzita, 1956. ISBN 80-210-2157-8.
- [14] VOET, Donald a Judith G. VOET. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0544-9.

- [15] EVENS, Martha. *Beta-carotene* [online]. University of Bristol:School of chemistry [cit. 2020-01]. Dostupné z: http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotene/beta-carotene_vita.html
- [16] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 978-80-200-0600-4.
- [17] STEINB CHEL, A. a M. HOFRICHTER. *Biopolymers*. Chichester: Wiley-VCH, 2003
- [18] LANGE, B. M., T. RUJAN, W. MARTIN a R. CROTEAU. Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2000, **97**(24), 13172-13177 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1073/pnas.240454797. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.240454797>
- [19] KINGSLEY S., ROWAN. *Photosynthetic pigments of algae*. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. ISBN 978-052-1105-941
- [20] WEETE, John D., Maritza ABRIL, Meredith BLACKWELL a Geraldine BUTLER. Phylogenetic Distribution of Fungal Sterols. *PLoS ONE* [online]. 2010, **5**(5) [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1371/journal.pone.0010899. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0010899>
- [21] CASAGRANDE, Daniela, Paulo H. WAIB a Alceu Afonso JORDÃO JÚNIOR. *Mechanisms of action and effects of the administration of Coenzyme Q10 on metabolic syndrome* [online]. 2018, **13**, 26-32 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1016/j.jnim.2018.08.002. ISSN 23523859. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S235238591830032X>
- [22] BENTINGER, Magnus, Michael TEKLE a Gustav DALLNER. Coenzyme Q - Biosynthesis and functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2010, **396**(1), 74-79 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.147. ISSN 0006291X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X10003815>
- [23] YAHIA, E. M. *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry and human health*. 2nd edition. Hoboken, NJ, 2018. ISBN 978-111-9157-977.
- [24] MIZOGUCHI, Tadashi, Yuki KIMURA, Taichi YOSHITOMI a Hitoshi TAMIAKI. The stereochemistry of chlorophyll-c3 from the haptophyte *Emiliana huxleyi*: The (132R)-enantiomers of chlorophylls-c are exclusively selected as the photosynthetically active pigments in chromophyte algae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 2011, **1807**(11), 1467-1473 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.07.008. ISSN 00052728. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272811001745>
- [25] MMR, Lumír. *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [26] MCMURRY, John. *Organická chemie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2015. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-7080-930-3.
- [27] ŠKALOU, Pavel. Virtuální algologické praktikum. In: *Katedra botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze* [online]. Praha, 2019 [cit. 2020-03-09]. Dostupné z: <https://botany.natur.cuni.cz/algopraktika/17.html>

- [28] ALLEN, Michael. Algae ‘breaststroke’ is synchronized from within. In: *Physics world* [online]. Bristol, 2015 [cit. 2020-03-09]. Dostupné z: <https://physicsworld.com/a/algae-breaststroke-is-synchronized-from-within/>
- [29] ONWULATA, Charles I. a Peter J. HUNT. *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*. 1. Singapore: Fabulos printers, 2008. ISBN 978-0-8138-0903-8.
- [30] OBRUCA, Stanislav, Pavla BENESOVA, Dan KUCERA, Sinisa PETRIK a Ivana MAROVA. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. *New Biotechnology*. 2015, **32**(6), 569-574. DOI: 10.1016/j.nbt.2015.02.008. ISSN 18716784. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678415000333>
- [31] KOT, Anna M., Stanisław BŁAŻEJAK, Agnieszka KURCZ, Iwona GIENKA a Marek KIELISZEK. Rhodotorula glutinis—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, **100**(14), 6103-6117. DOI: 10.1007/s00253-016-7611-8. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7611-8>
- [32] Ubichinon. In: *Biochemie:metabolické dráhy* [online]. Praha, 2012 [cit. 2020-07-17]. Dostupné z: https://www.mojechemie.cz/Biochemie:Metabolick%C3%A9_dr%C3%A1hy
- [33] VON WETTSTEIN, D., S. GOUGH a C. G. KANNANGARA. Chlorophyll Biosynthesis. *The Plant Cell*. , 1039-1057. DOI: 10.1105/tpc.7.7.1039. ISSN 1040-4651. Dostupné také z: <http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.7.7.1039>
- [34] Ergosterol. In: *Merck* [online]. Germany, 2020 [cit. 2020-07-17]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e6510?lang=en@ion=CZ>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

PUFA – polynenasycené mastné kyseliny

MUFA – mononenasycené mastné kyseliny

SFA – nasycené mastné kyseliny

UREA – močovina

GLY – glycerol

GLU – glukosa

MEL – melasa

C/N – poměr uhlíku a dusíku

IPP – isopentenylpyrofosfát

DMAPP – dimethylallylpyrofosfát

UV – ultrafialové záření

VIS – viditelné záření

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

PDA – detektor diodového pole

GC – plynová chromatografie

FID – plamenově ionizační detektor

MK – mastná kyselina

YPD – yeast extract-pepton-dextrose

ČR – Česká Republika

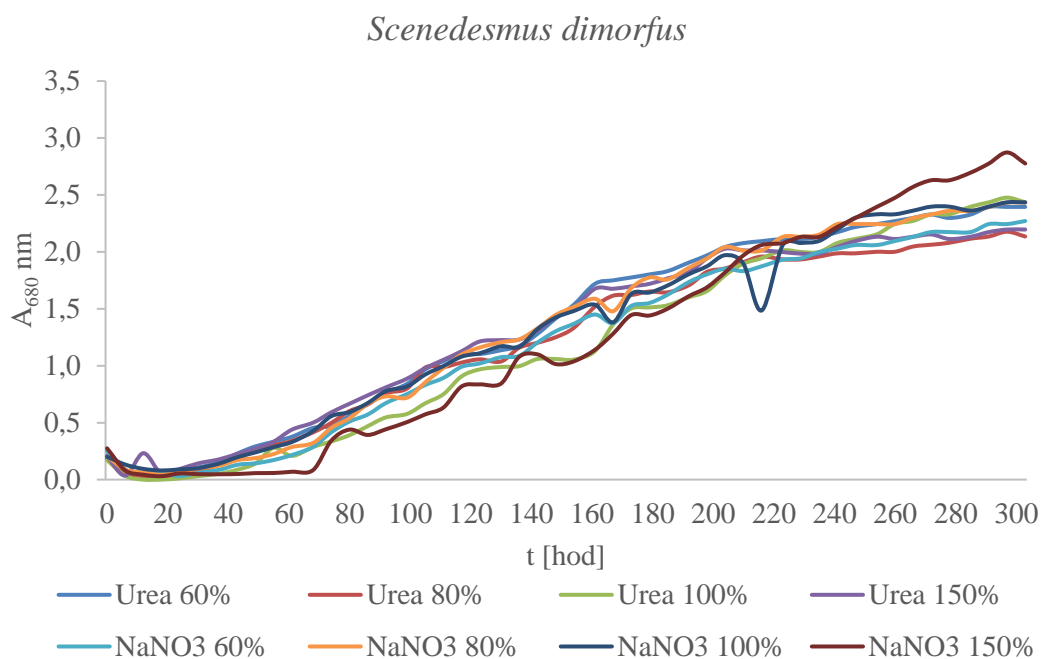
SRN – Spolková republika Německo

GB – Velká Británie

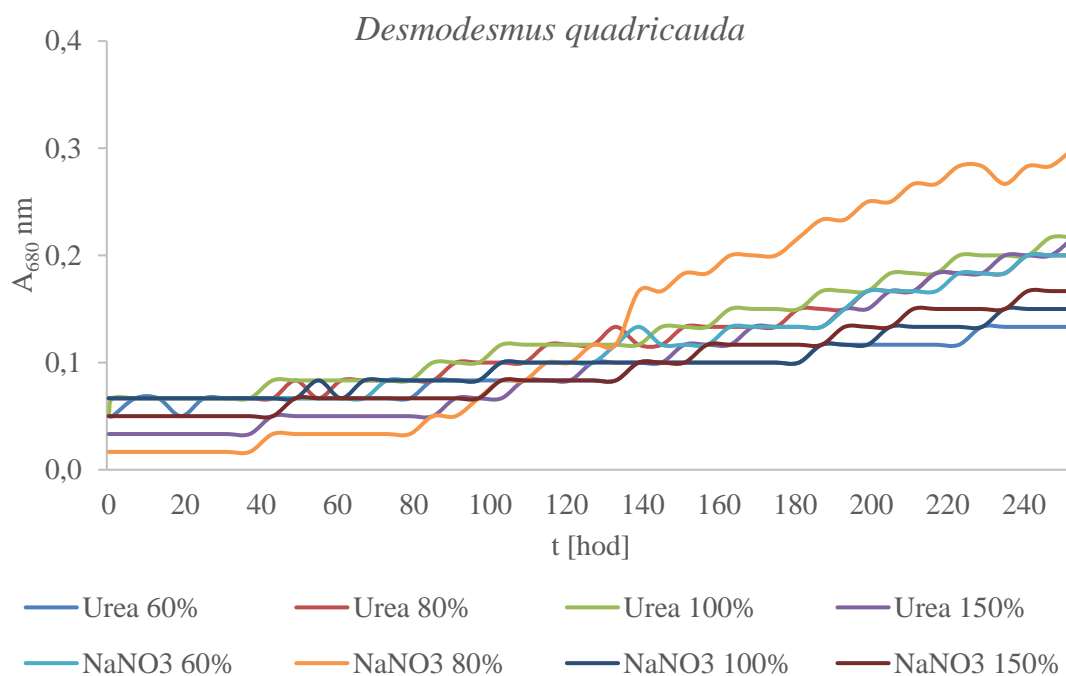
USA – Spojené státy americké

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Grafické znázornění absorbance [680 nm] u kmene *Scenedesmus dimorphus* v závislosti na různém zdroji dusíku.



Příloha 2: Grafické znázornění absorbance [680 nm] u kmene *Desmodesmus quadricauda* v závislosti na různém zdroji dusíku.



Příloha 3: Grafické znázornění absorpance [680 nm] u kmene *Chlamydomonas reinhardtii* v závislosti na různém zdroji dusíku.

