



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**OPTIMALIZACE KULTIVAČNÍCH PODMÍNEK A
PRODUKCE METABOLITŮ MIKROŘASAMI RODU
DESMODESMUS A SCENEDESMUS VE
FOTOBIOREAKTORECH.**

OPTIMIZATION OF CULTIVATION CONDITIONS AND PRODUCTION OF METABOLITES BY MICROALGAE
OF THE GENUS DESMODESMUS AND SCENEDESMUS IN PHOTOBIOREACTORS.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Michaela Kubalová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1891/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Michaela Kubalová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Optimalizace kultivačních podmínek a produkce metabolitů mikrořasami rodu *Desmodesmus* a *Scenedesmus* ve fotobioreaktorech.

Zadání diplomové práce:

Přehledná literární rešerše zaměřená na popis studovaných kmenů a opis zvolených kultivačních systémů.

Popis problematiky heterotrofních kultur mikrořas.

Kultivace vybraných kmenů mikrořas v laboratorních fotobioreaktorech

Optimalizace kultivačních podmínek s využitím různých fyzikálních a chemických stresů

Testování organických zdrojů uhlíku a mixotrofního způsobu růstu mikrořas

Analýza produkované biomasy

Vyhodnocení výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Michaela Kubalová
studentka

Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

V súčasnej dobe sa veľká pozornosť zameriava na biotechnologický priemysel. V rámci biotechnologického priemyslu sa pomocou mikroorganizmov produkujú rôzne užitočné látky, akými sú napríklad chlorofyl a karotenoidy, ktoré sú významnými antioxidantnými látkami, ale aj masné kyseliny, steroly a ubichinón. Táto diplomová práca je zameraná na kultiváciu vybraných kmeňov mikrorias rodu *Scenedesmus* a *Desmodesmus*. V prvej časti práce sú opísané kmeňe rias a študované metabolity. V druhej, experimentálnej časti, boli na vybrané kmene aplikované rôzne druhy alkoholov, ako stresové podmienky, s cieľom zvýšenia produkcie intracelulárnych metabolitov. Ďalej bola prevedená fermentorová kultivácia, pri ktorej bola aplikovaná kombinácia dvoch rôznych alkoholov. Prevedená bola tiež kultivácia pomocou flat – panel fotobioreaktoru, pri ktorej bolo použité svetlo s rôznymi vlnovými dĺžkami. Pre analýzu boli použité viaceré chromatografické techniky, výsledky analýz sú uvedené v experimentálnej časti.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Mikroriasy, bioreaktor, stresové faktory, chlorofyl, lipidy, karotenoidy, optická hustota, kvantový výtlačok

ABSTRACT

Nowadays, a lot of attention is being paid to the biotechnology industry. Within this industry, are with the help of microorganisms produced various useful substances, such as chlorophyll and carotenoids, which are important antioxidant substances, but also fatty acids, sterols and ubiquinone. This thesis is focused on the cultivation of selected strains of microalgae of the genus *Scenedesmus* and *Desmodesmus*. In the first part of the thesis, the algae strains and studied metabolites are described. In the second, experimental part, different types of alcohol were applied to the selected strains as stress conditions, with the aim of increasing the production of intracellular metabolites. Further, fermentor cultivation was carried out, in which a combination of two different alcohols was applied. Subsequently, cultivation using a flat-panel photobioreactor was also carried out, in which light with different wavelengths was used. Several chromatographic techniques were used for the analysis and the results of the analyzes are presented in the experimental part.

KEY WORDS

Microalgae, bioreactor, stress factors, chlorophyll, lipids, carotenoids, optical density, quantum yield

KUBALOVÁ, Michaela. *Optimalizace kultivačních podmínek a produkce metabolitů mikrořasami rodu Desmodesmus a Scenedesmus ve fotobioreaktorech.* Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149077>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. 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 jež 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

Pod'akovanie

Týmto by som rada poďakovala môjmu vedúcemu Ing. Martinovi Szotkowskému, Ph.D. za veľkú pomoc, ľudský a veľmi inšpiratívny prístup, a taktiež za množstvo cenných rád a pripomienok pri meraní a následnom spracovávaní diplomovej práce. Ďalej by som chcela poďakovať svojej konzultantke Ing. Pavlíne Sniegoňovej za pomoc pri riešení praktických úloh. V neposlednom rade patrí veľké poďakovanie mojej rodine a priateľom za ich podporu a trpezlivosť po celú dobu štúdia.

Obsah

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Úvod | 7 |
| 2 | Teoretická časť | 8 |
| 2.1 | Riasy | 8 |
| 2.1.1 | Rody <i>Scenedesmus</i> a <i>Desmodesmus</i> | 9 |
| 2.1.2 | Morfológia a cytológia rias | 9 |
| 2.1.3 | Kultivácia a kultivačné techniky | 9 |
| 2.2 | Študované metabolity | 13 |
| 2.2.1 | Lipidy | 13 |
| 2.2.2 | Karotenoidy | 14 |
| 2.2.3 | Steroly | 16 |
| 2.2.4 | Chlorofyl | 16 |
| 2.2.5 | Koenzým Q10 | 19 |
| 2.3 | Biomasa | 19 |
| 2.4 | Analytické techniky stanovenia biomasy | 19 |
| 2.4.1 | Optická hustota – OD | 19 |
| 2.4.2 | Kvantový výťažok – QY | 20 |
| 2.4.3 | Vysokoučinná kvapalinová chromatografia – HPLC | 20 |
| 2.4.4 | Plynová chromatografia – GC | 20 |
| 3 | Ciele práce | 22 |
| 4 | Experimentálna časť | 23 |
| 4.1 | Použité chemikálie | 23 |
| 4.1.1 | Chemikálie pre kultiváciu mikrorias | 23 |
| 4.1.2 | Chemikálie pre extrakciu (HPLC,GC) | 23 |
| 4.2 | Použité prístroje a pomôcky | 23 |
| 4.3 | Použité kmene mikrorias | 24 |
| 4.4 | Použité kmene siníc | 24 |
| 4.5 | Kultivácia mikrorias | 24 |
| 4.5.1 | Flat – panel fotobioreaktor | 25 |
| 4.6 | Aplikácia stresových faktorov | 26 |
| 4.7 | Stanovenie metabolitov | 26 |
| 4.7.1 | Stanovenie koncentrácie biomasy | 26 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.7.2 | Analýza vzoriek pomocou HPLC – DAD | 26 |
| 4.7.3 | Analýza vzoriek pomocou HPLC – RI | 27 |
| 4.7.4 | Analýza vzoriek pomocou GC | 28 |
| 5 | Výsledky a diskusia..... | 29 |
| 5.1 | Aplikácia stresových faktorov..... | 29 |
| 5.1.1 | <i>Desmodesmus communis</i> CCALA 464 | 29 |
| 5.1.2 | <i>Scenedesmus cf. acutus</i> CCALA 437 | 35 |
| 5.1.3 | <i>Scenedesmus cf. ecornis</i> CCALA 444..... | 39 |
| 5.1.4 | <i>Desmodesmus armatus</i> CCALA 43 | 43 |
| 5.1.5 | <i>Scenedesmus obliquus</i> CCALA | 47 |
| 5.1.6 | <i>Desmodesmus velitaris</i> CCALA 468 | 51 |
| 5.1.7 | <i>Scenedesmus pseudoarmatus</i> CCALA 462..... | 55 |
| 5.1.8 | <i>Synechococcus bigranulatus</i> CCALA 187..... | 59 |
| 5.2 | Fermentorova kultivácia <i>Scenedesmus obliquus</i> | 63 |
| 5.3 | Kultivácia kultúra <i>Scenedesmus cf. acutus</i> vo flat – panel fotobioreaktore..... | 66 |
| 6 | Záver..... | 68 |
| 7 | Zdroje | 69 |
| 8 | Zoznam použitých skratiek a symbolov | 73 |

1 ÚVOD

Mikroriasy si v posledných rokoch získali pozornosť najmä vďaka svojim výnimočným biologickým vlastnostiam, pomocou ktorých dokážu premieňať slnečné svetlo, oxid uhličitý a iné anorganické zdroje uhlíka na organickú hmotu prostredníctvom fotosyntézy. Tieto schopnosti sú využívané vo viacerých priemyselných odvetviach, najmä v oblasti vedeckého a biotechnologického výskumu. Ich účinnosť fotosyntézy vysoko preyšuje účinnosť fotosyntézy suchozemských rastlín. Vďaka tomu a vďaka ich schopnosti produkovať zlúčeniny, ako napríklad lipidy, sacharidy a pigmenty, sú využívané v rôznych odvetviach, napríklad v potravinárstve, pri čistení odpadových vôd, výrobe biopalív, ale aj vo farmaceutickom a kozmetologickom priemysle. Pre oblasť výživy a spomínaný farmaceutický a kozmetologický priemysel sú riasy zaujímavé predovšetkým pre ich bohatý obsah vitamínov, minerálov, mastných kyselín, ale tiež pigmentov, ako napríklad chlorofyly a karotenoidy, ktoré sa vyznačujú svojimi vysokými antioxidačnými vlastnosťami. Prieskum týchto zlúčenín môže viesť k objavu nových liečiv a terapeutických aplikácií.

V predloženej diplomovej práci boli použité rôzne druhy stresových faktorov, za účelom zvýšenia produkcie vybraných intracelulárnych metabolitov. Chemickými stresovými faktormi boli rôzne druhy alkoholov, konkrétne methanol, ethanol, glycerol a isopropylalkoho. Pri týchto látkach bola okrem stresovej reakcie mikroorganizmu pozorovaná aj možnosť využitia pridaného alkoholu ako zdroj uhlíka pri mixotrofnom spôsobe výživy. Prítomnosť a koncentrácia alkoholu v použitom kultivačnom médiu bola zisťovaná metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s refraktometrickým detektorom (HPLC–RI). Z fyzikálnych stresov bola vybraná zmena farby svetelného žiarenia. Klasické teplé biele svetlo bolo menené na svetlo červené s vlnovou dĺžkou v rozmedzí 620–780 nm, zelené svetlo s vlnovou dĺžkou 495–570 nm a fialové svetlo s vlnovou dĺžkou 380–450 nm. Vplyv zmeny svetelných podmienok bol pozorovaný pri kultivácii riasových kultúr pomocou flat – panel fotobioreaktora, ktorého súčasťou je samostatný svetelný panel, ktorý tieto zmeny vlnových dĺžok umožňoval.

Obsah intracelulárnych metabolitov je možné určiť chromatografickými metódami, kedy na určenie pigmentov sa používa vysokoúčinnná kvapalinová chromatografia (HPLC) a pre určenie zastúpenia lipidov a ich profilu mastných kyselín sa využíva plynová chromatografia (GC).

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Riasy

Riasy (algae) sú skupina organizmov patriaca do skupiny rastlín (plantae). Sú súborom fotoautotrofných eukaryotických organizmov, jednobunkových alebo mnohobunkových, ktorých spoločným znakom je okrem fotosyntézy aj ich závislosť na prítomnosti vody. Produkujú rovnaké zásobné látky (rôzne cukorné substráty, lipidy, proteíny atď.) ako vyššie rastliny a taktiež používajú rovnaké obranné mechanizmy pred predátormi a parazitmi. Rozlíšenie od vyšších rastlín je veľmi jednoduché, rastliny majú vysokú schopnosť diferenciacie, čo u rias nie je pozorované.

Pojem riasy zastupuje ako makroriasy, tak aj súbor mikroorganizmov nazývaný mikroriasy. Všetky obsahujú primárne chloroplasty pokryté dvoma membránami. Chloroplasty sú uložené priamo v cytoplazme. Najviac zastúpenou skupinou sú mikroriasy, ktoré sú zodpovedné za produkciu až 50 % fotosynteticky vytvoreného kyslíku [1, 2].

Riasy sú najčastejšie delené podľa pigmentov, ktoré produkujú, z čoho najznámejšie sú:

- *Chlorophyta* (zelené riasy)
- *Rhodophyta* (červené riasy)
- *Chromophyta* (hnedé riasy)

Vyskytujú sa celosvetovo, bez ohľadu na podnebné pásmo a v takmer všetkých podmienkach. Kombináciu fotosyntetických pigmentov podriše viridiplantae tvoria chlorofyl a, chlorofyl b, karotén a xantofyly. Chloroplasty zelených rias obsahujú pyrrenoid-proteínové teliesko s vysokým obsahom enzýmu ribulóza- 1,5- bisfosfát (RUBISCO), ktorý sa uplatňuje pri väzbe atmosférického oxidu uhličitého na cukor (pentózu) pri fotosyntéze. Enzým RUBISCO je prítomný vo všetkých fotoautotrofných organizmoch [2, 3, 4, 5].

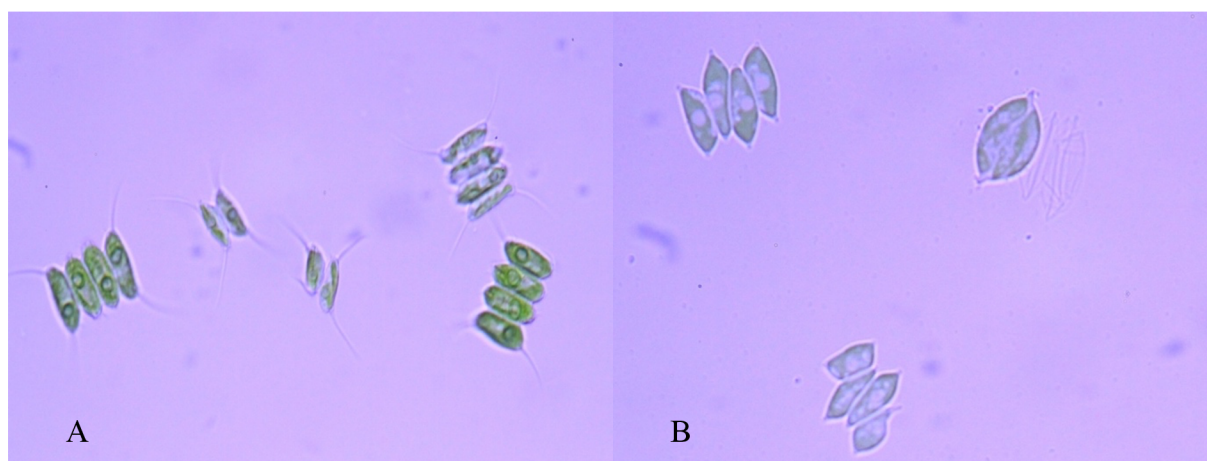
Mikroriasami sú nazývaní tiež jednobunkoví jedinci, ktorých vývojové štádium je nižšie ako u rias. Mikroriasy produkujú komerčne dôležité biomolekuly akými sú napríklad proteíny, lipidy, vitamíny, pigmenty a iné biologicky aktívne látky, ktoré je možné priamo aplikovať v odvetviach akými sú potravinárstvo, zdravotníctvo, farmaceutický a kozmetický priemysel. Väčšina skupín rias sú fotoautotrofné – výživou úplne závislé na ich fotosyntetickom aparáte, kde hlavným zdrojom energie je práve slnčné žiarenie a CO₂ je hlavným zdrojom uhlíka. Veľakrát však riasy pre získanie energie používajú kombináciu fotoautotrofnosti a heterotrofnosti, nazývanú mixotrofia. Heterotrofná kultivácia nahrádza svetelné potreby mikrorias prijímaním živín z organického zdroja uhlíka. Aj pri mixotrofných riasach sa využívanie fototrofnosti a heterotrofnosti môže líšiť od druhu k druhu. Väčšina využíva primárne fototrofnosť a heterotrofnosť využívajú zriedka. Avšak iné využívajú primárne heterotrofnosť, ale môžu využívať niektoré z produktov fotosyntézy, najšastejšie fotosyntetickú fixáciu uhlíka a tvorbu hlavných živín – dusík, fosfor, železo, rastové faktory (napríklad vitamíny, esenciálne aminokyseliny a podobne). Heterotrofia je predovšetkým dôležitá pri nedostatočnom prístupe slnečného žiarenia.

Na základe toho, z akého zdroja prijímajú energiu, môžeme riasy rozdeliť do 4 skupín:

- Obligátne heterotrofné riasy – primárne heterotrofné, ale sú schopné prežiť autotrofne
- Obligátne fototrofné riasy – primárne fototrofné, ale za zhoršeného prístupu slnečného žiarenia môžu energiu získavať heterotrofne
- Fakultatívne mixotrofné riasy – rastú rovnocenne ako fotoautotrofy aj heterotrofy
- Obligátne mixotrofné riasy – primárne fototrofné, ale heterotrofne získavajú niektoré esenciálne faktory rastu [3, 4, 5, 6].

2.1.1 Rody *Scenedesmus* a *Desmodesmus*

Rod *Scenedesmus* aj *Desmodesmus* sú sladkovodné druhy mikrorias, líšiac sa od seba veľmi minimálne a aj v rámci kmeňa sa od seba líšia tvarom a veľkosťou. Mikroriasy môžu mať viacero druhov bunkového usporiadania, môžu byť jednobunkové, koloniálne alebo vláknité. Oba rody patria medzi nepohyblivé jednobunkové organizmy, predovšetkým sa vyskytujú vo forme kolónii, najčastejšie ako zoskupenia 4 buniek, ktoré sa nazývajú cenobia. Môžu sa však vyskytovať aj ako 8-, 16- alebo 32- bunkové cenobiá. Pri oboch rodoch je pozorovaná široká diverzita, do oboch rodov patrí veľké množstvo kmeňov, ktoré je ťažké odlíšiť, zástupcu každého druhu zobrazuje obrázok 1. Fenotyp každého kmeňa je ovplyvňovaný napríklad aj koncentráciou nutričov, teplotou, intenzitou svetla a podobne [3, 4, 7, 8, 9].



Obrázok 1: A – *Desmodesmus velitaris* CCALA 468, B – *Scenedesmus cf. acutus* CCALA 437

2.1.2 Kultivácia a kultivačné techniky

V posledných desaťročiach sa kultivácia mikrorias zameriava najmä na rozvoj techník otvorených masových kultúr pod holým nebom. Tieto techniky sú síce lacné, avšak majú rôzne nevýhody, z ktorých najväčšou je kontaminácia jednoriasovej kultúry. Podmienky kultivácie sú nedostatočne kontrolované a je možné takto kultivovať iba niekoľko rezistentých kmeňov rias za extrémnych podmienok, ktoré sa v takýchto otvorených systémoch vyskytujú. Extrémnymi podmienkami sa myslí vysoké pH, slanosť alebo teplota kultivačného média. Zvyšok kmeňov mikrorias je možné kultivovať iba v uzavretých fotobioreaktoroch za kontrolovaných podmienok. Kultiváciu je možné v uzavretých bioreaktoroch zvýšiť

optimalizáciou kultivačných podmienok. Medzi dve najvýraznejšie podmienky pri kultivácii patria svetlo a teplota [3, 4, 12, 13, 14].

2.1.2.1 Kultivačné systémy

Pre kultiváciu rias je možné použiť viacero duhov kultivačných systémov, najčastejšie sa delia na 2 skupiny – otvorené systémy a uzavreté systémy. Medzi otvorené systémy sa radia napríklad otvorené jazerá alebo nádrže, napustené vodou, premiešavané najčastejšie mechanicky. Zdrojom uhlíka je v takýchto prípadoch vzdušný oxid uhličitý, zdrojom svetla slnečné žiarenie. Výhodou takýchto nádrží je ľahké zostrojenie a možnosť masovej kultivácie. Ako bolo spomenuté vyššie (viď. kapitola 2.1.3), táto technika má však značnú nevýhodu kontaminácie, a preto je takto možné najmä kultivácia extremofilných rias. Medzi ďalšie nevýhody otvorených systémov patrí aj vysoká miera vyparovania média, nedobrá prístup svetla celou kultúrou a neefektívne rozpúšťanie vzdušného CO₂ do média. Všetky spomenuté nevýhody nepriaznivo ovplyvňujú výťažok biomasy. Medzi uzavreté systémy patria rôzne druhy fotobioreaktorov. Vo fotobioreaktoroch je kultivačné médium uzavreté v priehľadných nádobách rôznych objemov, osvetľované umelo alebo slnečným žiarením, premiešavané buď mechanicky alebo aeráciou. Najväčšou výhodou uzavretých systémov je obmedzenie kontaminácie kultúry. Uzavretý systém poskytuje okrem iného lepšie možnosti regulácie kultivačných podmienok, čím je možné maximalizovať výťažok riasovej biomasy [12, 15, 16].

2.1.2.2 Fermentor

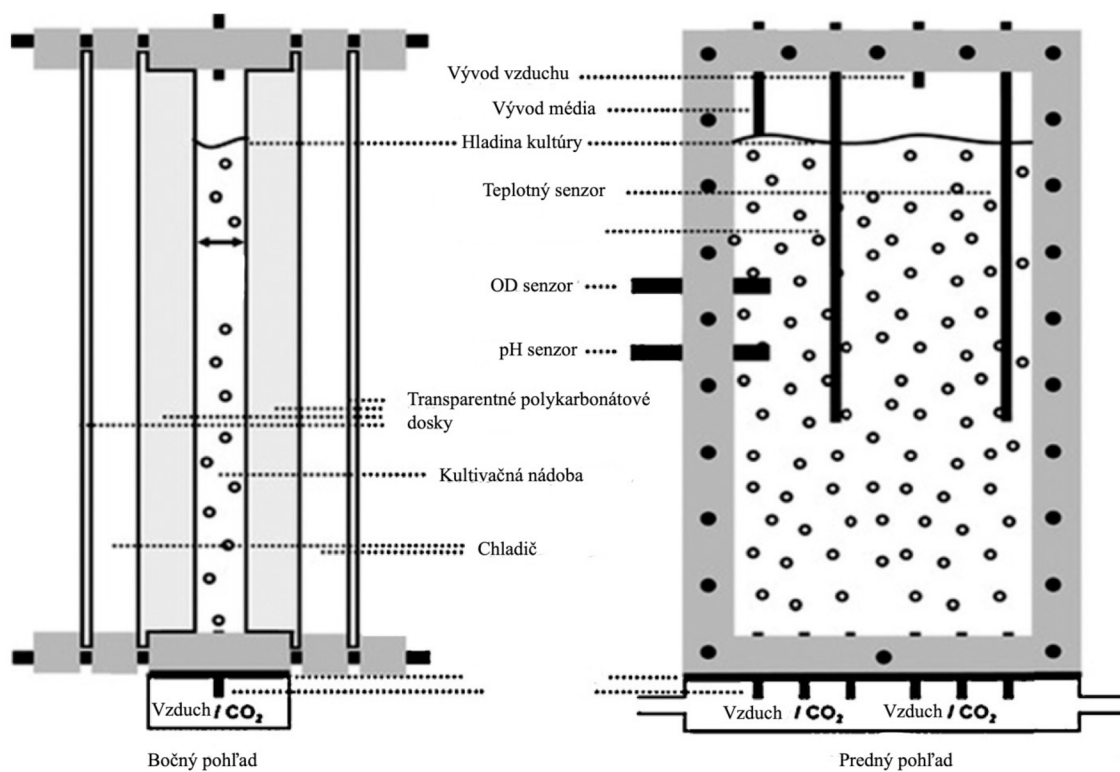
Fermentor, tiež známy ako bioreaktor, je zariadenie využívané v biotechnologickom priemysle napríklad pre fermentáciu, kultiváciu bunkových kultúr a tiež produkciu enzýmov vo väčšom merítke. Je vyrobený z inertných materiálov, ako sklo a nerez. Tieto komponenty musia byť zároveň odolné voči vysokej teplote, aby nedochádzalo k poškodeniu pri procese sterilizácie. Fermentor umožňuje pomocou čidiel kontrolovať viacerých parametrov, akými sú napríklad teplota, pH, hladina kyslíka, iónová sila a mnoho ďalších. Často používané sú vo farmaceutickom, biotechnologickom a potravinárskom priemysle. Najčastejšie sa fermentory delia podľa spôsobu prevádzky na vsádkové (batch), prítokové (fed–batch) a kontinuálne. Najčastejšie sú používané vsádkové fermentory, nakoľko ide o uzavretý systém a je pri nich zabezpečená najvyššia sterilita. Pri prítokových fermentoroch sú počas doby kultivácie do média dodávané výživy. Pri kontinuálnych bioreaktoroch je konštantne dodávané médium a odoberaný výsledný produkt. V kontinuitnej kultivácii je však najväčšia miera kontaminácie. Na obrázku 2 je znázornená vsádková (batch) kultivácia riasovej kultúry [16, 17, 18].



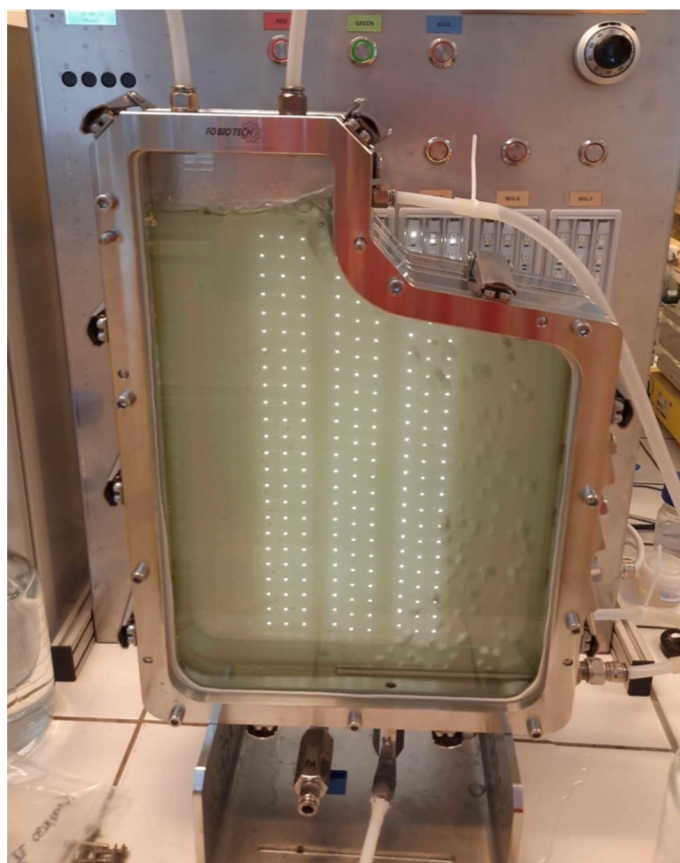
Obrázok 2: Fermentorová kultivácia riasovej kultúry

2.1.2.3 Flat-panel fotobioreaktor

Flat – panel fotobioreaktory, alebo tiež nazývané ploché horizontálne bioreaktory, majú veľké výhody pri produkcii fotoautotrofných organizmov. Konštrukcia takéhoto fotobioreaktoru (schéma flat – panel fotobioreaktora zobrazená na obrázku 3) sa skladá z dvoch vertikálnych priehľadných (sklenených) platní, umiestnených do železného rámu, dostatočne blízko k sebe, čím sa zväčší osvetľovaná plocha. Medzi tieto priehľadné panely je vložené kultivačné médium s mikroriasou a celý systém je osvetľovaný po celej ploche fotobioreaktoru (viď. Obrázok 4). V klasických bioreaktoroch väčší jedinci často tienia jedincami menším alebo vzdialenejším od povrchu, čo vedie k zníženiu prechodu svetla a teda k spomaleniu rastu a nízkej produkcii. V porovnaní s fotobioreaktormi, ktorých kultivačná nádoba má väčšiu hrúbku, nedochádza vo flat-panel fotobioreaktore k vzájomnému tieneniu medzi jedincami a svetlo prechádza kultúrou rovnomerne [12, 13, 19].



Obrázok 3: Flat – panel fotobioreaktor, bočný a predný pohľad (dostupné z [21])



Obrázok 4: Flat – panel fotobioreaktor, FO BIO TECH

2.2 Študované metabolity

Mikroriasy sú udržateľným zdrojom lipidov a karotenoidov, pričom mechanizmus akumulácie týchto látok je zapríčinený najmä stresovými podmienkami. Stresovými podmienkami sa myslí napríklad nedostatok živín alebo nepriaznivé fyzikálne podmienky. Obsah lipidov v mikroriasach je obvykle v rozmedzí 20-50 % suchej hmotnosti bunky. Mikroriasy ďalej produkujú karotenoidy, ktoré sú potrebné pre fotosyntetický metabolizmus, kde spôsobujú rozšírenie spektra absorbujúceho svetlo (napríklad primárny karotenoid luteín). Karotenoidy sa okrem iného vyznačujú antioxidačnými vlastnosťami a používajú sa napríklad pri zmierňovaní rakoviny, predčasného starnutia, kardiovaskulárnych ochorení a podobne [11, 22].

2.2.1 Lipidy

Lipidy sú jednou hlavných tried biologických molekúl a majú kľúčové úlohy v rôznych biologických procesoch. Patria k elementárnym stavebným prvkom bunky, podieľajú sa najmä na štruktúre bunkových membrán, kde tvoria lipidickú dvojvrstvu. Môžu tiež slúžiť ako zásoba energie pre bunku, ale aj vo forme hormónov ako signalizačné molekuly, ochranné či izolačné molekuly. Sú tiež dôležité pri rozpúšťaní vitamínov A, D, E a K [23, 24].

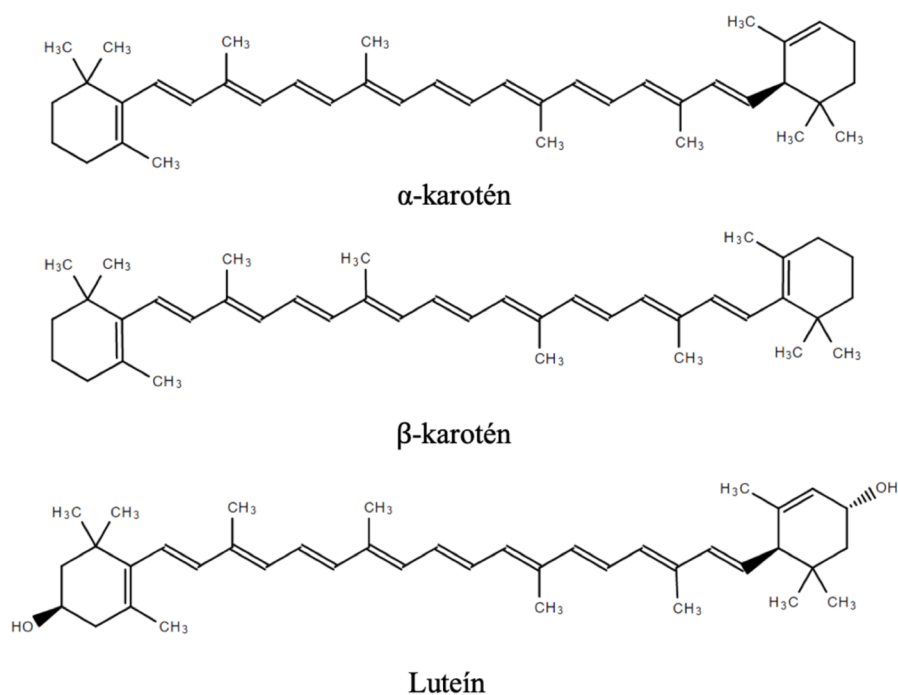
U mnohých mikrorias bolo dokázané, že môžu produkovať a akumulovať lipidy, pri mixotrofných podmienkach kultivácie je táto schopnosť zvýšená v porovnaní s čisto heterotrofnými a fototrofnými podmienkami. Mikroriasy sú udržateľným zdrojom lipidov bohatých na omega-3 polynenasýtené mastné kyseliny (PUFA), z ktorých najznámejším zástupcom je napríklad kyselina alfa-linolénová (ALA). Práve kyselina alfa-linolénová je dôležitou mastnou kyselinou s protizápalovými, kardio a neuroprotektívnymi účinkami a dôležitá je pre správny prenatálny aj postnatálny vývoj mozgu. Zvýšená akumulácia kyseliny alfa-linolénovej bola preukázaná aj pri aplikácii stresových podmienok na riasy rodu *Desmodesmus*. Avšak, zvýšená produkcia lipidov za stresových podmienok spôsobuje zníženie rastu [19, 20, 34].

2.2.1.1 Mastné kyseliny a triacylglyceroly

Mastné kyseliny sú karboxylové kyseliny s dlhými postrannými reťazcami. Zvyčajne sa vyskytujú v esterifikovanej forme. Vo vyšších rastlinách a u živočíchov sú prevládajúcimi mastnými kyselinami tie, ktorých dĺžka postranného reťazca obsahuje 16 alebo 18 uhlíkov. Takými sú napríklad kyselina palmitová, olejová, linolová a stearová. Mastné kyseliny s nepárnym počtom uhlíkov sa vyskytujú menej často, čo vychádza zo syntézy mastných kyselín, ktorá je založená na spájaní dvojuhlíkatých reťazcov. Ďalším delením mastných kyselín môže byť delenie na nasýtené a nenasýtené, čo určuje výskyt, prípadne absencia dvojitej väzby. Nasýtené mastné kyseliny dvojité väzbu neobsahujú, nenasýtené áno. Niektoré mastné kyseliny sú pre človeka esenciálne a je potrebné prijímať ich potravou. V olejoch a tukoch z rastlinných a živočíšnych zdrojov je možné nájsť prevažne triacylglyceroly – látky na báze glycerolu, na ktorý sú viazané rôzne mastné kyseliny esterovou väzbou. Podľa naviazaných mastných kyselín sa výsledné vlastnosti triacylglycerolov líšia. Hlavnou úlohou TAG je zásoba energie v organizme človeka, a to najmä v podobe viscerálneho a podkožného tuku, ktoré slúžia ako tepelná izolácia organizmu [24, 25].

2.2.2 Karotenoidy

Karotenoidy sú skupinou biologických chromofórov s absorbným rozsahom 400-550 nm. Vyskytujú sa v rastlinách, riasach, hubách a ďalších mikroorganizmoch. Vyskytujú sa najmä v lipidických membránach, napríklad v membránach chloroplastov. Karotenoidy z hľadiska štruktúry predstavujú izoprénové zlúčeniny, ktoré vznikli syntézou dvoch molekúl geranylgeranyl difosfátu. Je možné ich rozdeliť na 2 skupiny – neoxidovaná, kde patria α -karotén, β -karotén alebo oxidovaná forma, kde patria xantofyly, luteín, violaxantín, fukoxantín a ďalšie. Vo fotosyntetickom aparáte fungujú karotenoidy ako doplnkové svetlozberné pigmenty a taktiež ako ochrana pred nadmerným žiarením. Sú zodpovedné za žlté, oranžové a červené sfarbenie. Nakoľko nie sú syntetizované v ľudskom organizme, je nutné ich dopĺňať z potravy. Medzi najznámejšie patria napríklad β -karotén a luteín (oba zobrazené na obrázku 5) [4, 26, 27].



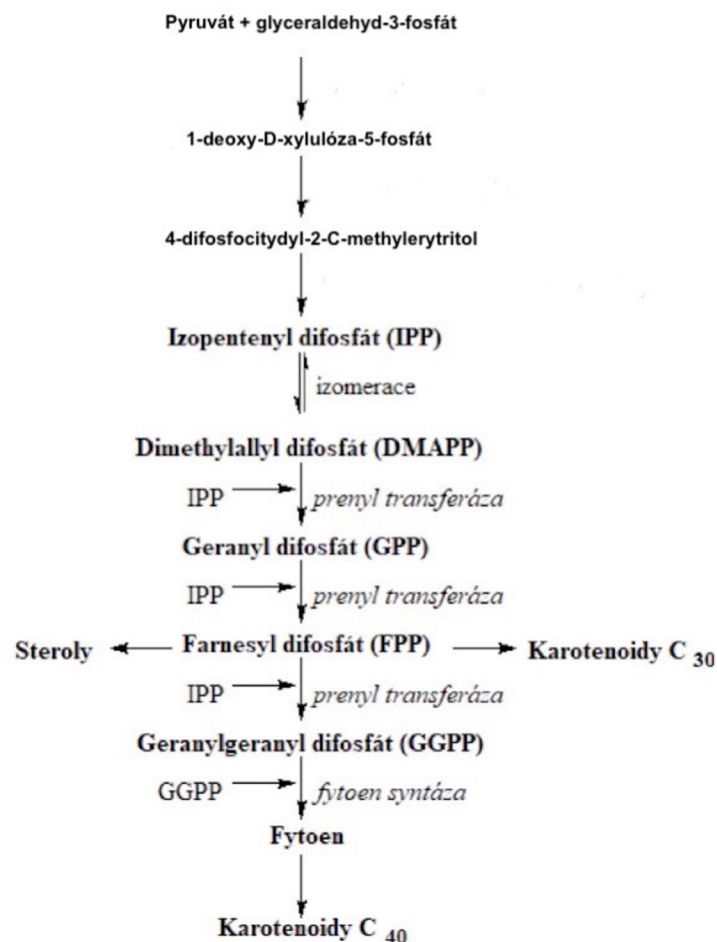
Obrázok 5: Karotenoidy (Upravené, dostupné z [28])

2.2.2.1 Biosyntéza

Karotenoidy sú produktami sekundárneho metabolizmu, ich biosyntéza je prevádzaná izoprenoidnou dráhou. V prípade fototrofných organizmov je syntéza umiestnená v chloroplastoch. Schéma biosyntézy karotenoidov je znázornená na obrázku 6. Možno ju rozdeliť na dve časti, v prvej dochádza k syntéze prekursorov karotenoidov, a to k syntéze izopentenyl pyrofosfátu (IPP), prípadne jeho izoméru dimethylallyldifosfátu (DMAPP). Tieto prekursory sú syntetizované mevalonátovou syntézou. Radou kondenzačných reakcií ďalej vzniká geranylgeranylpyrofosfát (GGPP), ktorý slúži ako univerzálny prekursor pre všetky karotenoidy. GGPP sa premieňa na fytoén pomocou viacerých enzymatických reakcií. Fytoén sa ďalej modifikuje sériou reakcií, počas ktorých dochádza k vzniku napríklad β -karotén, luteín, astaxantín a ďalšie. α -karotén je tvorený aj z lycopénu, ktorý je syntetizovaný okrem

iného zelenými riasami. Následne z α - a β -karoténu dochádza pomocou oxidácie k syntéze xantofylov.

Medzi rôznymi druhmi mikrorias sa líšia špecifické enzýmy a regulačné mechanizmy, zapojené do biosyntézy, a vďaka tomu dochádza k syntéze rôznych profilov karotenoidov. Biosyntéza karotenoidov môže byť ovplyvnená aj rôznymi faktormi, napríklad intenzitou svetla, dostupnosťou živín, či podmienkami prostredia [29, 30, 31].



Obrázok 6: Biosyntéza karotenoidov (upravené z [32])

2.2.2.2 Funkcie a využitie

Karotenoidy majú v prírode veľkú škálu funkcií. Medzi hlavné patrí antioxidačná funkcia, odchyt voľných radikálov a ich vplyv na znižovanie oxidačného stresu. Ich antioxidačné vlastnosti zabraňujú zmene bunkových štruktúr a nádorovému bujneniu. Medzi nemenej dôležitú funkciu patrí aj to, že sú prekursorom vitamínu A. Okrem spomínaných funkcií, ovplyvňujú tiež veľa metabolických procesov. V chloroplastoch pôsobia ako ochrana fotosyntetického aparátu, ale podieľajú sa aj na samotnej fotosyntéze, pôsobia ako farbivá [33, 34].

2.2.3 Steroly

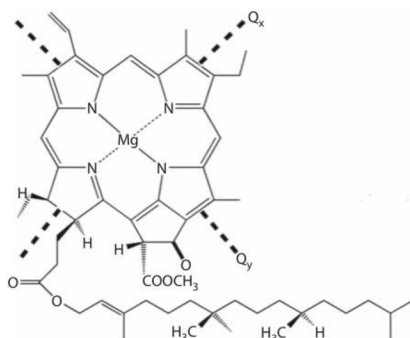
Steroly sú látky, ktoré svojou štruktúrou pripomínajú cholesterol. Sú produktmi sekundárneho metabolizmu mikrorias, podobne ako karotenoidy a polysacharidy. Majú dôležitú rolu v štruktúre a funkcii bunkových membrán a fyziologických procesoch. V biomembránach zodpovedajú za regulácie fluidity a permeability, taktiež sú prekursori rôznych hormónov. V rastlinách je najviac zastúpeným sterolom fytosterol. V poslednej dobe sa čím ďalej tým viac hovorí o ich benefitoch na ľudský organizmus. Steroly napríklad pomáhajú v prevencii voči kardiovaskulárnym ochoreniam, znižujú riziko obezity, cukrovky a mnoho ďalších [35, 36, 29].

2.2.4 Chlorofyl

Všetky fotosyntetické organizmy obsahujú organické pigmenty na zachytávanie energie. Tieto pigmenty je možné rozdeliť do 3 skupín:

- Chlorofyly – zelené farbivá.
- Karotenoidy – žlté a oranžové farbivá.
- Fykobilíny

Chlorofyly a karotenoidy sú lipofylné, zatiaľ čo fikobilíny sú hydrofylné. Molekuly chlorofylu sa skladajú z tetrapyrolového kruhu, ktorého centrálnym atómom je horčík (viď. Obrázok 7). Na základe toho, aké postranné reťazce sa na tetrapyrolovom kruhu nachádzajú, je možné rozlíšiť 4 druhy chlorofylu – *a*, *b*, *c* a *d*. Všetky chlorofyly majú hlavné absorpčné pásy: modrý alebo modro-zelený (450-475 nm) a červený (630-675 nm). Chlorofyl *a* je prítomný vo všetkých fotoautotrofných organizmoch ako súčasť jadra a pigment v reakčnom centre, zatiaľ čo chlorofyl *b* a *c* je prítomný vo svetlozberných anténach a v špecifických typoch organizmov ako sú hnedé a červené riasy. Chlorofyl *b*, *c* a *d*, tiež nazývané doplnkové pigmenty, slúžia na rozšírenie rozsahu absorpcie svetla. Pomer jednotlivých chlorofylov v jednotlivých fotoautotrofných organizmoch sa líši a je daný evolúciou, miestom výskytu a zložením kultivačného média. Pomer sa môže meniť aj výskytom stresových podmienok, vyvolaných zmenou fyzikálnych alebo chemických podmienok [4, 37].



Obrázok 7: Štruktúra chlorofylu *a* (upravené, prevzaté z [1])

2.2.4.1 Fotosyntéza

Fotosyntéza je základným procesom pre udržanie života na Zemi a to tým, že je základným zdrojom kyslíka potrebného pre dýchanie. Tento proces je viazaný na chloroplasty buniek.

Proces zahŕňa fyzikálne procesy súvisiace s absorpciou žiarenia a prenosom energie k reakčným centráam, prenos elektrónov redoxnými systémami k redukcii NADP a k podpore vzniku ATP z ADP a fixáciu CO₂ spojenú s redukciou vodíka pri tvorbe cukrov a organických zlúčenín. Fotosyntéza môže byť teda vyjadrená ako redoxná reakcia poháňaná svetelnou energiou (ktorú zachytávajú chlorofyly), v ktorej sa oxid uhličitý a voda menia na uhľovodíky a kyslík. Je možné rozdeliť ju na dve časti – svetelnú a temnostnú. Vo svetelnej časti dochádza k transformácii energie zo solárnej na chemickú, pričom dochádza k syntéze NADPH a ATP. V temnostnej fáze dochádza k inkorporácii CO₂ a syntéze glukózy. Množstvo fixovaného CO₂ a teda aj účinnosť fotosyntézy ovplyvňujú množstvo a kvalitu biomasy pri kultivácii mikrorias [2, 4, 24].

2.2.4.1.1 Svetelná fáza

Svetelná fáza fotosyntézy zahŕňa proces zachytenia svetelnej energie a jej premenu na NADPH a ATP. Reakcie, pre ktoré je potrebná prítomnosť svetla prebiehajú v tylakoidných membránach. Tie obsahujú lipidickú dvojvrstvu obsahujúcu dve zložky – mono- a digalaktozylglycerol. V tejto membráne, prípadne na tejto membráne, sa nachádzajú proteíny, ktoré tvoria komplexy (buď komplex proteín–proteín, alebo komplex pigment–proteín). Tylakoidná membrána obsahuje 5 hlavných komplexov:

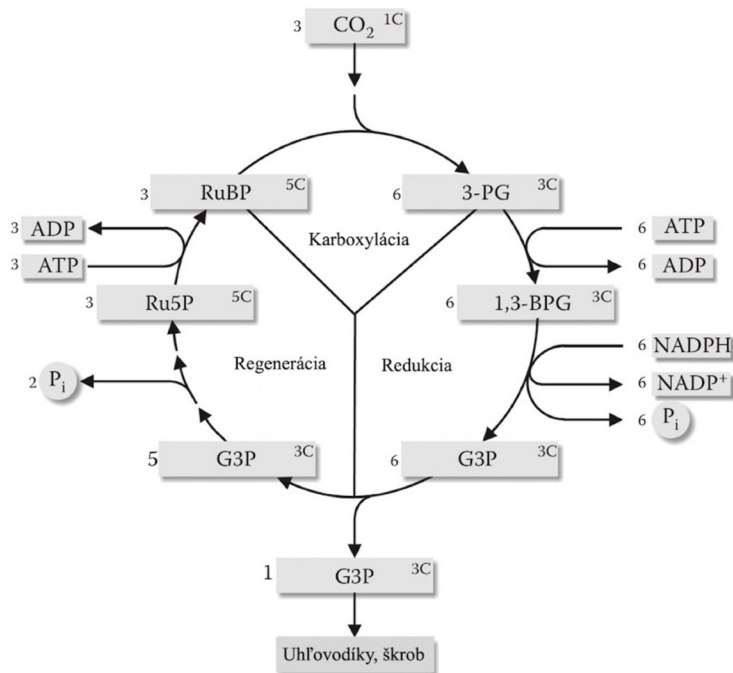
1. Antény na zber svetla
2. Fotosystém II (PS II)
3. Fotosystém I (PS I)
4. Elektrónové prenášače
5. ATP syntázu.

Všetky spomenuté komplexy sa podieľajú na udržaní fotosyntetického transportu elektrónov a fotofosforylácie. V prvom kroku je svetelná energia absorbovaná pigmentami v tylakoidných membránach, odkiaľ sa excitované elektróny prenášajú do elektrón – transportného reťazca, skladajúceho sa zo série proteínových komplexov. Z elektrón – transportného reťazca je uvoľňovaná energia, ktorá je potrebná na pumpovanie protónov H⁺ zo strómy do luménu tylakoidu, čím sa vytvára koncentračný gradient. Protóny následne prúdia späť cez tylakoidnú membránu cez enzým nazývaný ATP syntáza, pričom sa energia uvoľnená tokom protónov spotrebuje na produkciu ATP z ADP a fosfátu. Elektróny ako posledný prijíma NADP⁺, ktorý sa redukuje a vzniká NADPH. Oba produkty tejto fázy, ATP aj NADPH, sú využité vo fáze temnostnej, v Calvinovom cykle [1, 4, 37].

2.2.4.1.2 Temnostná fáza – Calvinov cyklus

Po svetelnej fáze nasleduje fáza na svetle nezávislá – temnostná fáza. V temnostnej fáze sú zahrnuté reakcie, pri ktorých je chemický potenciál využitý na fixáciu a redukciiu anorganického uhlíka z CO₂ na uhľovodíkový reťazec. Fixácia prebieha s využitím NADPH a ATP v stróme chloroplastu (pre eukaryotické riasy) alebo v cytoplazme (pri prokaryotických riasách). Podmienkou týchto reakcií nie je tma, svetlo však v nich nie je priamo zahrnuté. Sled týchto reakcií sa bežne označuje ako Calvin – Benson – Basshamov cyklus alebo tiež C3 fotosyntéza, keďže prvým metabolitom bol 3- fosfoglycerát. Calvinov cyklus je možné rozdeliť na 3 fázy: karboxylácia, redukcia a regenerácia. Tieto fázy sú schematicky znázornené

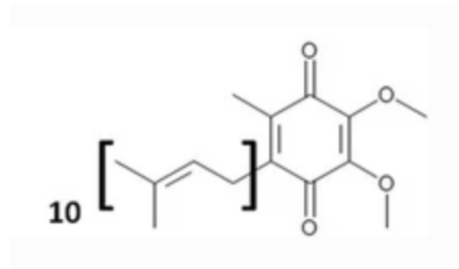
na obrázku 8. Fixácia uhlíka závisí od viacerých faktorov, pričom jeden z najdôležitejších faktorov a jediným z enzýmov, ktorý je schopný viazať oxid uhličitý, je enzým RuBisCo – ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxygenáza – a jeho selektivita a účinnosť. Hneď v prvej fáze cyklu tento enzým karboxyluje ribulózu-1,6-bisfosfát, pričom vzniká 3-fosfoglycerát. V ďalšej, redukčnej fáze, za spotreby ATP vzniká 3-bisfosfoglycerát, ktorý sa postupne redukuje až na glycerinaldehyd-3-fosfát. V poslednej, regeneračnej fáze, dochádza k vzniku ribulóza-5-fosfátu a ten pokračuje do ďalšieho biochemického cyklu. 3-fosfoglycerát sa potom pomocou dráhy glukoneogenéza premení na glukózu [1, 38, 39, 40].



Obrázok 8: Schéma troch fáz Calvinovho cyklu

2.2.5 Koenzým Q10

Koenzým Q, známy aj pod názvom ubiquinón, je molekula, ktorá sa nachádza takmer vo všetkých bunkách a ktorej rola je kľúčová v produkcii energie v bunkách. Je známa celá skupina chinónov, patria tu napríklad vitamín E, koenzým Qs, naftochinón a mnoho ďalších. Najznámejšou je forma koenzým Q10 (viď. Obrázok 9), ktorý sa nachádza v mitochondriách, kde je dôležitou súčasťou elektrón-transportného reťazca, tiež známeho ako oxidatívna fosforylácia. Tento proces je zodpovedný za väčšinu produkcie ATP v aeróbných organizmoch. Okrem toho ubiquinón ako antioxidant chráni bunky pred oxidatívnym stresom a je tiež jediným v tukoch rozpustný antioxidant, ktorý je syntetizovaný endogénne [41, 42, 43, 44].



Obrázok 9: Štruktúra koenzýmu Q10 (upravené z [44])

2.3 Biomasa

Bunková hustota a biomasa sú dôležitými faktormi pre študovanie účinnosti kultivačných metód a taktiež pre produkciu a kultiváciu vo väčšom merítku. Biomasu je možné charakterizovať viacerými spôsobmi. Je možné merať priamo hmotnosť vodných rias - sušinu, čo je v jednoriasových kultivačných systémoch primárnym parametrom pre stanovenie biomasy. Ďalšou skupinou metód sú metódy založené na absolútnych jednotkách, ale uvažujú iba časť biomasy, čo spôsobuje variácie v závislosti na použítom kmeni a na použitých kultivačných technikách. Takouto metódou môže byť napríklad metóda stanovenia počtu buniek. Najbežnejšou metódou pre rutinné merania je však tretia skupina udávajúca relatívne hodnoty. Do tejto skupiny patria okrem iného parametre ako meranie optickej hustoty OD (*optical density*) alebo in vivo autofluorescencia chlorofylu a (IVF).

Produkcia biomasy a jej zloženie sú závislé na použítom kmeni a podmienkach kultivácie, pri väčšine kmeňov platí, že najviac biomasy je vyprodukovaná pri mixotrofných podmienkach. Biomasa je zdrojom viacerých vitamínov a minerálov, ktoré sú prospešné pre organizmus [14, 19].

2.4 Analytické techniky stanovenia biomasy

2.4.1 Optická hustota – OD

Optická hustota, alebo tiež absorbanca, vyjadruje množstvo svetla, pri určitej vlnovej dĺžke, ktoré je materiál alebo látka schopné absorbovať. Je to tiež parameter, ktorý sa často využíva pri analýze riasových kultúr, pri pozorovaní ich rastu v čase. Platí, že ako riasa s časom narastá, kultúra sa stáva viac hustou, čo znamená, že kultúra absorbuje viac svetla. Bežne používaná vlnová dĺžka pre meranie optickej hustoty rias je 680 nm. Táto vlnová dĺžka je v spektre viditeľného svetla a je tiež blízko absorpčného maxima chlorofylu a, čo je primárny fotosyntetický pigment rias. Vlnová dĺžka 720 nm je blízko absorpčného maxima fykocyanínu, čo je modrý pigment, ktorý sa taktiež podieľa na procese fotosyntézy. Meranie pri vlnovej dĺžke 720 nm sa využíva najmä pri cyanobaktériách, pre určenie množstva fykocyanínu [4, 46].

2.4.2 Kvantový výťažok – QY

Keď sú organizmy schopné fotosyntézy vystavené svetlu, všetky emitujú fluorescenčné žiarenie, ktoré pochádza predovšetkým z chlorofylu a. V mikroriasových kultúrach je kvantový výťažok (QY) používaný pre vyjadrenie miery účinnosti fotosyntetických procesov. Vyjadruje podiel absorbovanej svetelnej energie, ktorá sa premení na fluorescenčnú emisiu. QY možno

použiť pre posúdenie faktorov, ako je svetelný stres, dostupnosť živín a tiež vplyv prostredia na fotosyntézu riasových kultúr. [47, 48].

2.4.3 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia – HPLC

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia je separačná analytická metóda, ktorá poskytuje ako kvalitatívne, tak aj kvantitatívne informácie o analyzovanej vzorke. Je to metóda založená na delení dvoch látok na základe ich rozdielnej afinity k mobilnej a stacionárnej fáze.

Pevná, stacionárna fáza je umiestnená v kolóne, ktorú predstavuje tvar trubice s priemerom približne 3-5 mm. Ako jej náplň sa najčastejšie využíva silikagel, alumina alebo aktívne uhlie. Ako tekutá, mobilná fáza sa najčastejšie používajú organické rozpúšťadlá (hexán benzén, acetón, acetonitril, ethanol a ďalšie), alebo zmes organického rozpúšťadla s vodou (napr. acetonitril-voda, methanol-voda). Pri separácii zložiek pomocou HPLC je možné meniť gradient mobilnej fázy a tým aj čas eluovania jednotlivých zložiek. Zmena gradientu tiež zapríčiňuje aj uvoľňovanie zložiek silne naviazaných na stacionárnu fázu. Gradient je možné meniť zmenou zloženia mobilnej fázy. Zložky eluátu prechádzajú detektorom, ktorý zachytáva sledované vlastnosti ako elektrický signál, ktorý je spracovávaný pomocou počítača. Voľba detektoru závisí od analyzovanej vzorky, bežne používanými detektormi sú napríklad UV-VIS, PDA, fluorescenčný alebo refraktometrický detektor a mnoho iných. Výsledkom merania je graf nazývaný chromatogram [49, 50, 51, 52].

2.4.4 Plynová chromatografia – GC

Plynová chromatografia (GC – z ang. *Gas Chromatography*) je analytická metóda, používaná k separácii prevažne plyných a prchavých látok. Podobne ako kvapalinová chromatografia, používa proces delenia zložiek na základe delenia medzi mobilnou a stacionárnou fázou, delenie prebieha na základe rozdielnych bodoch varu. Mobilnou fázou je v tomto prípade nosný plyn, najčastejšie používaný vodík, hélium alebo dusík. Mobilná fáza pri plynovej chromatografii nijako nereaguje s analyzovanou vzorkou. Analyzovaná vzorka je mobilnou fázou prenášaná cez kolónu so stacionárnou fázou, s ktorou jednotlivé analyty interagujú. Použité sú náplňové alebo kapilárne kolóny. Kapilárne kolóny sú potiahnuté vrstvou polyamidu a ich dĺžka sa pohybuje od 10–100 metrov. Na detekciu sa najbežnejšie využíva plameňovo ionizačný detektor (FID), ktorý je možné použiť na analýzu takmer všetkých organických zlúčenín. Jeho princípom je spaľovanie analytu vo vodíkovom plameni. Tým vzniká zmena vodivosti iónov, ktorá je následne meraná a odpovedá koncentrácii meranej vzorky [53].

3 CIELE PRÁCE

- Prehľadná literárna rešerš zameraná na popis študovaných kmeňov a opis zvolených kultivačných systémov.
- Popis problematiky heterotrofných kultivácii mikrorias.
- Kultivácia vybraných kmeňov mikrorias v laboratórnych podmienkach.
- Optimalizácia kultivačných podmienok s využitím rôznych fyzikálnych a chemických stresov.
- Testovanie organických zdrojov uhlíka a mixotrofného spôsobu rastu mikrorias.
- Analýza produkovanej biomasy a vyhodnotenie výsledkov.

4 EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie pre kultiváciu mikrorias

- Dusičnan sodný p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Sírčitan horečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Hdyrogenfosforečnan draselný, Sigma-Aldrich (SRN)
- Dihydrogenfosforečnan draselný, Sigma-Aldrich (SRN)
- Chlorid sodný p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- EDTA, Sigma-Aldrich (SRN)
- Hydroxid draselný p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Sírčitan železnatý (heptahydrát), Penta (ČR)
- Kyselina sírová 96% p.a., Penta (ČR)
- Chlorid manganatý tetrahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
- Oxid molibdenový, Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Sírčitan meďnatý (pentahydrát), Penta (ČR)
- Dusičnan kobaltnatý hexahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
- Hydrogenuhlíčan sodný, Sigma-Aldrich (SRN)
- Uhlíčan sodný, Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Sírčitan draselný, Penta (ČR)
- Sírčitan zinočnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Kyselina boritá p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
- Molybdenan sodný, Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Sírčitan kobaltnatý (heptahydrát), Lach-Ner, s.r.o. (ČR)

4.1.2 Chemikálie pre extrakciu (HPLC,GC)

- Methanol p.a., Penta (ČR)
- Chloroform p.a., Penta (ČR)
- Acetonitril pre HPLC, Penta (ČR)
- Ethylacetát pre HPLC, Penta (ČR)
- Hydroxid sodný p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Hexan pre GC, Penta (ČR)
- Kyselina heptadekanová pre GC, Sigma-Aldrich (SRN)
- Kyselina sírová 96%, Lach-ner (ČR)

4.2 Použité prístroje a pomôcky

- Box Aura ini iBopTech, (ČR)
- Trepačka Yellow line, (SRN)
- Trepaný inkubátor, ZWYR-D2401 – Labwit, BioTech, (ČR)
- Centrifuga BioTech, (ČR)
- AquaPen-C AP 110-C, PSI (Photon System Instruments), (ČR)
- Lyofilizátor Labconco FreeZone 4.5 Freeze Dryer, (USA)
- Analytické váhy Boeco, (CRN)
- Termoblok VWR, (ČR)
- Vortex/homogenizátor disruptor Genie, Scientific Industries, Inc. (USA)

- HPLC/MS sestava: Sestava HPLC/MS Dionex UltiMate 3000, (USA)
 - Pump module Dionex UltiMate 3000
 - Autosampler Dionex UltiMate 3000
 - DAD detector Vanquish series
 - Vyhodnocovací systém Chromeleon 7.2
 - Kolona Kinetex C18-EVO, 150 mm x 4,6 mm x 5,0 μm c, Phenomenex (USA)
 - Držiak predkolóny – KJ0 - 4282, Phenomenex (USA)
 - Predkolóny – C18-EVO, AJ0 – 8368, Phenomenex (USA)
 - Filtre pre HPLC, Chromservis (ČR)
- HPLC zostava Dionex Ultimate 3000, (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Systém MicroTime 200, Picoquant GmbH, objektív s vodnou imerziou Olympus UPLSAPO 60XW
- Thermo Scientific TRACE™ 1300 Gas Chromatograph, (Thermo Fischer Scientific, USA)
 - Detektor FID, (Thermo Fischer Scientific, USA)
 - Thermo Scientific AI 1310 Autosampler
 - Kolona Lion GC-FAME, 30 m x 0,25 mm x 0,20 μm, Chromservis (ČR)

4.3 Použité kmene mikrorias

- *Desmodesmus communis* CCALA 464
- *Scenedesmus cf. acutus* CCALA 437
- *Scenedesmus cf. ecornis* CCALA 444
- *Desmodesmus armatus* CCALA 439
- *Scenedesmus obliquus* CCALA 999
- *Desmodesmus velitaris* CCALA 468
- *Scenedesmus pseudoarmatus* CCALA 462

4.4 Použité kmene siníc

- *Synechococcus bigranulatus* CCALA 187

4.5 Kultivácia mikrorias

Mikroriasy rodu *Desmodesmus* a *Scenedesmus* a sinica rodu *Synechococcus* boli kultivované v BBM médiu, ktorého zloženie je uvedené v tabuľke 1. Mikroriasy a sinice boli zaočkované do Erlenmayerových baniek pri dostatočnej absorbancii 0,15 na celkový objem 100 ml. Absorbancia bola meraná v pravidelných intervaloch pomocou prístroja Aquapen pri 680 nm a 720 nm. V týchto intervaloch bolo tiež merané QY. Kultúry boli konštantne miešané pomocou trepacích zariadení. Kultivácia prebiehala vždy 14 dní od pridania alkoholu, ako chemického stresu.

Tabuľka 1 Zloženie BBM média

| Zložka | Zásobný roztok [g/l] | Množstvo na 1 l [ml] |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------|
| NaNO ₃ | 25 | 10 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 2,5 | 10 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 47,5 | 10 |
| K ₂ HPO ₄ | 7,5 | 10 |
| KH ₂ PO ₄ | 17,5 | 10 |
| NaCl | 2,5 | 10 |
| EDTA | Tabuľka 2 | 1 |
| Acidified iron | Tabuľka 2 | 1 |
| H ₃ BO ₃ | 11,42 | 1 |
| Trace metals | Tabuľka 2 | 1 |

Tabuľka 2 Zloženie roztkov BBM média

| Roztok | Látka | Množstvo na 1 l |
|----------------|--|-----------------|
| EDTA | EDTA | 50 g |
| | KOH | 31 g |
| Acidified iron | FeSO ₄ ·7H ₂ O | 4,98 |
| | H ₂ SO ₄ (96 %) | 1 ml |
| Trace metals | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 8,82 g |
| | MnCl ₂ ·4H ₂ O | 1,44 g |
| | MoO ₃ | 0,71 g |
| | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 1,57 g |
| | Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O | 0,49 g |

4.5.1 Kultivácia riasovej kultúry vo flat – panel fotobioreaktore

Bola prevedená kultivácia riasy *Scenedesmus acutus* vo flat – panel fotobioreaktore s objemom 2 litre. Pre kultiváciu bolo použité BBM médiu. Celková kultivácia trvala 60 dní, z čoho prvých 30 dní bola kultúra ponechaná v čistom BBM médiu a osvetľovaná iba teplým bielym svetlom až do doby dosiahnutia dostatočnej oprickej hustoty. Po dosiahnutí dostatočného OD bola kultúra, pomocou led panelu, ktorý je súčasťou zostavy flat – panel fotobioreaktoru, osvetľovaná červeným svetlom, ktorého vlnová dĺžka je 620–780 nm. Odber v prvom dni bol prevedený pred zapnutím červeného svetla. Červené svetlo bolo zapnuté do 8. dňa kultivácie, kedy bolo zmenené na zelené svetlo s vlnovou dĺžkou v rozmedí 495–570 nm. Zelené svetlo bolo ponechané do 16. dňa kultivácie, kedy bolo vymenené za fialové svetlo s vlnovou dĺžkou 380–450 nm. Takto bola kultúra ponechaná do 19. dňa kultivácie, kedy bolo k fyzikálnemu stresu zároveň aplikovaných 10 ml 50% roztoku ethanolu. Kultúra bola takto ponechaná po dobu 4 dní a následne stočená pomocou centrifúgy pri 4500 rpm a lyofilizovaná, aby mohla prebiehať následná analýza.

4.5.2 Fermentorová kultivácia riasovej kultúry

Kmeň *Scenedesmus obliquus* bol použitý pre kultiváciu vo fermentore. Kultúra bola miešaná mechanickým miešadlom a konštantne prevzdušňovaná zmesou vzduchu a CO₂. Po celú dobu kultivácie bola kultúra osvetľovaná teplým bielym svetlom. Celková doba kultivácie vo fermentore bola 15 dní. Kultúra bola pripravená up-stream procesom, a síce zo zásobnej kultúry na agárovom géle bola kultúra zaočkovaná do 100 ml BBM média v 250 ml Erlenmayerovej banky. Po dosiahnutí dostatočného OD bola kultúra prevedená do 800 ml BBM média do fľašky Pyrex s objemom 1 l, kde bola prevzdušňovaná sterilným vzduchom. Do fermentoru bola kultúra zaočkovaná opäť po dosiahnutí dostatočného OD, čo značne urýchlilo samotnú fermentorovú kultiváciu. Celkový objem kultivačného média s riasovou kultúrou bol 2 litre. Na piaty deň od začatia kultivácie bolo do kultúry pridaných 10 ml 50% roztoku glycerolu, na dvanásť deň bolo do roztoku kultúry pridaných ešte 5 ml 50% roztoku isopropylalkoholu a na 15. deň bola kultivácia ukončená. Kultúra bola stočená pomocou centrifúgy pri 8000 rpm, zlyofylizovaná a ďalej analyzovaná pomocou chromatografických metód.

4.6 Aplikácia stresových faktorov

V tejto diplomovej práci boli na kultúry aplikované stresové faktory. Kultivácia prebiehala v Erlenmayerových bankách s objemom 250 ml. Všetky riasy boli kultivované na BBM médiu, do ktorého bol pred začatím kultivácie pridaný ampicilín, aby sa zabránilo kontaminácii kultúry a mohla byť sledovaná iba odozva riasy na pridaný stres. Kultivácia prebiehala v skriňových trepačkách za stáleho miešania pri teplote 25 °C a konštantného osvetľovania bielym svetlom. Kultúra bola tiež v pravidelných intervaloch kontrolovaná pomocou mikroskopu, aby sa overilo, že sa v médiu nevyskytuje kontaminácia. Pri kultivácii v Erlenmayerových bankách bolo do 100 ml kultivačného média s kultúrou pridaných 0,5 ml rôznych typov alkoholu. Použité boli 50% roztoky methanolu, ethanolu, isopropylalkoholu a glycerolu. Kultúry boli sledované po dobu 14 dní od aplikácie alkoholu. Pribeh kultivácie so stresovými faktormi bol sledovaný v pravidelných intervaloch.

Na tento experiment naväzovali experimenty, pri ktorých bol použitý flat – panel fotobioreaktor a fermentor. Oba bioreaktory mali celkový objem 2 litre. Pri kultivácii vo fermentore bola použitá riasa *Scenedesmus obliquus*, do ktorej boli po dosiahnutí dostatočného OD aplikované alkoholy. Ako prvý bol aplikovaný 50% roztok glycerolu v množstve 10 ml. Po 7 dňoch od pridaní glycerolu bolo do kultúry pridaných 5 ml 50% roztoku isopropylalkoholu. Kultúra bola takto ponechaná po dobu 3 dni a následne bola kultivácia ukončená. Pri kultivácii vo flat – panel fotobioreaktore boli okrem chemických stresových faktorov použité aj stresy fyzikálne, a síce zmena farby a teda aj zmena vlnovej dĺžky svetla. Pre experiment vo fotobioreaktore boli vybrané riasy *Scenedesmus acutus* a *Desmodesmus pseudoarmatus*. Ako prvá bola prevedená kultivácia riasy *Scenedesmus acutus*, kde bolo po dosiahnutí vhodnej optickej hustoty (OD) aplikované červené svetlo, to bolo po 10 dňoch zmenené na svetlo zelené a to bolo po ďalších 10 dňoch zmenené na svetlo fialové. Počas aplikácie fialového svetla bolo pridaných aj 10 ml 50% roztok ethanolu. Ako druhá bola vo flat – panel fotobioreaktore kultivovaná riasa *Desmodesmus pseudoarmatus*, táto kultivácia prebehla zrýchlene a bolo použité iba červené svetlo a následne 10 ml 50% roztoku glycerolu.

Cieľom týchto experimentov bolo zistiť, či a do akej miery sú zvolené kmene mikrorias schopné heterotrofnej prípadne mixotrofnej výživy a ako aplikované stesy ovplyvňujú výťažok a zloženie biomasy.

4.7 Stanovenie metabolitov

4.7.1 Stanovenie koncentrácie biomasy

Po ukončení kultivácie bolo kultivačné médium s narastanou kultúrou centrifugované po dobu 3-5 minút pri 4500-8000 rpm. Po centrifugácii boli supernatanty odliate, kultúra premytá destilovanou vodou. Takto stočená biomasa bola lyofilizovaná po dobu 24 hodín a následne zvážená. Hmotnosť bola prepočítaná na jeden liter kultúry.

4.7.2 Analýza vzoriek pomocou HPLC–DAD

Pre analýzu farbív bola použitá metóda HPLC–DAD. Zlyofilizovaná biomasa bola pomocou analytických váh navážená do Eppendorf skúmaviek. Navážených bolo vždy 5-10 mg z každej vzorky. Vzorka bola 30 min hydratovaná pridaním 1 ml destilovanej vody. Následne boli vzorky stočené a voda odstránená. K rehydratovanej vzorke boli pridané sklenené guľičky a 1 ml p.a. methanolu. Následne boli skúmavky umiestnené na dezintegrátor, aby pomocou pohybu a sklenených guľičiek došlo k rozbitiu bunkových štruktúr a uvoľneniu a rozpusteniu farbív v methanole. Vzorka bola ďalej kvantitatívne prevedená do 15 ml skúmaviek, do ktorých bolo tiež pridaných 2 ml p.a. chloroformu. Vzorky boli vložené na vortex na 10 minút. Následne bol pridaný 1 ml destilovanej vody a všetky vzorky zľahka pretrepané, čím došlo k oddeleniu jednotlivých fáz. Po tomto procese bola do sklenených skúmaviek odobratá chloroformová časť a vzorky boli uložené na termoblok za súčasného prevzdušňovania dusíkom. Po odparení chloroformu boli vzorky rozpustené v 1 ml zmesi rozpúšťadiel acetonitril:ethylacetát 2:1. Rozpustené vzorky boli prefiltrované cez PTFE filter do sklenených vialiek a analyzované pomocou kvapalinového chromatografu. Parametre merania sú uvedené v tabuľke 3.

Tabuľka 3 Parametre merania pre analýzu pomocou HPLC–DAD

| | | |
|------------------------|---------------------------------------|------------------------|
| Kolóna | Kinetex EvoC18 150 mm x 4,6 mm x 5 µm | |
| Detektor | DAD Vanquish series | |
| Zloženie mobilnej fázy | MF A: ACN:TrisHCl:MeOH | MF A: ACN:TrisHCl:MeOH |
| | 84:14:02 | 60:40:00 |
| Čas [min] | MF A [%] | MF B [%] |
| 0 | 100 | 0 |
| 13 | 0 | 100 |
| 19 | 0 | 100 |
| 20 | 100 | 0 |
| 24 | 100 | 0 |

4.7.3 Analýza vzoriek pomocou HPLC–RI

Vzorky z kultivácií s prídavkom alkoholu boli odoberané vždy po pridaní alkoholu po 1, 2, 7 a 14 dňoch. Vzorky so zbytkovým alkoholom boli centrifugované po dobu 3 minúty pri 8000 rpm. Supernatant bol odobratý striekačkou a nastreknutý do dávkovača. Pre zistenie prítomnosti a množstva použitého alkoholu v médiu bola prevedená analýza metódou HPLC s RI detektorom. Parametre merania sú uvedené v tabuľke 4.

Tabuľka 4 Parametre merania pre analýzu pomocou HPLC–RI

| | |
|------------------------|--|
| Kapilárna kolóna | Rezex ROA Organic acids |
| Rozmery kolóny | 300x7,8 mm |
| Objem nástreku vzorky | 20 µl |
| Prietok mobilnej fázy | 1 ml/min |
| Zloženie mobilnej fázy | 0,005 M H ₂ SO ₄ |
| Doba analýzy | 15 minút |
| Teplota | 50 °C |
| Detektor | RI |

4.7.4 Analýza vzoriek pomocou GC

Ďalšou analytickou metódou pre stanovenie biomasy bola plynová chromatografia (GC). Do krimpovacích vialiek bolo navážených 5-10 mg zlyofylizovanej biomasy, do ktorej bolo pridaných 1,8 ml transesterifikačnej zmesi. Vialky boli uzavreté a vložené na termoblok, ktorý bol vyhriaty na teplotu 85 °C, nakoľko pri tejto teplote prebieha transesterifikačná reakcia. Vzorky boli takto ponechané po dobu 2 hodín. Po vychladnutí boli vzorky z krimpovacích vialiek kvantitatívne prevedené do 5 ml šrobovacích vialiek, kde bolo k vzorkám pridaných 0,5 ml 0,5 M NaOH a 1 ml hexanu HPLC kvality. Takto pripravené vzorky boli premiešavané pomocou vortexu po dobu 5–10 minút. Ďalej bolo z hornej – hexanovej fázy odpipetovaných 0,1 ml vzorky do sklenených vialiek, kde bola vzorka doplnená pomocou hexanu na objem 1 ml. Takto pripravené vzorky boli analyzované pomocou GC, parametre merania sú uvedené v Tabuľka 5. Pre vyhodnotenie analýzy bol použitý program Chromeleon.

Tabuľka 5 Parametre merania pre GC analýzu

| | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Kapilárna kolóna | LION LN-FAME 30 m x 0,25 mm x 0,20 µm |
| Dávkovanie | Autosampler Thermo Scientific AI 1310 |
| Objem nástreku vzorky | 1 µl |
| Pomer nástreku deliča toku | 10 |
| Prietok nosného plynu H ₂ | 1 ml/min |
| Teplota | 240 °C |
| Detektor | FID |
| Prietok | Vzduch 350 ml/min |
| | Make-up N ₂ 30 ml/min |
| | H ₂ 35 ml/min |

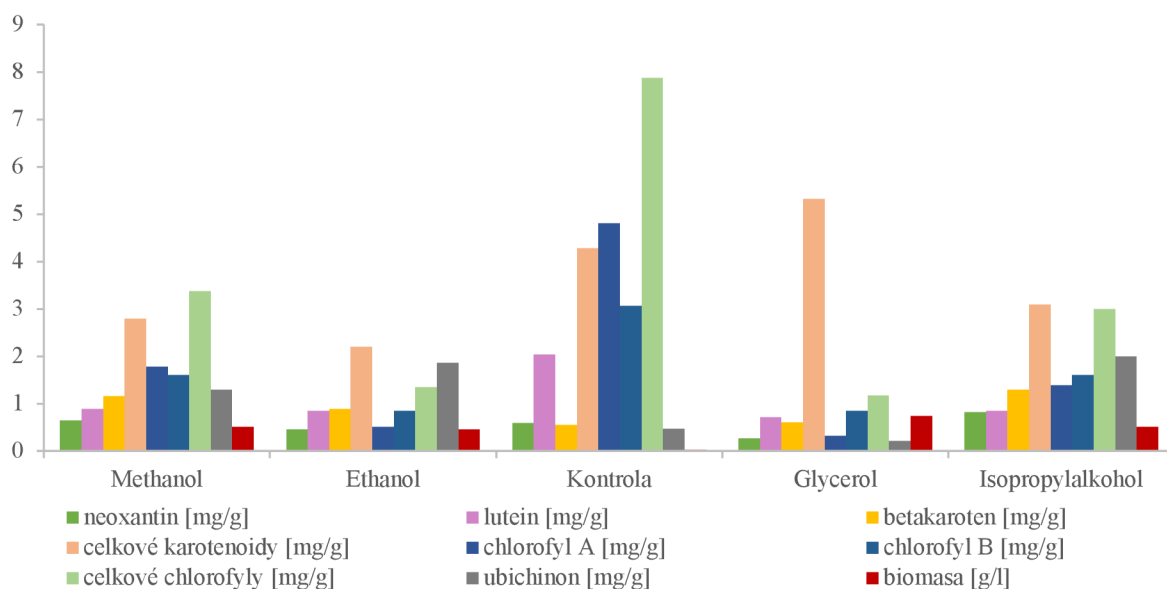
5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pre experimenty boli zvolené kmene rias *Desmodesmus communis*, *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus ecornis*, *Desmodesmus armatus*, *Scenedesmus obliquus*, *Desmodesmus velitaris*, *Scenedesmus pseudoarmatus* a sinice *Synechococcus bigramulatus*, ktoré boli kultivované v BBM médiu. Ako stresové faktory boli zvolené roztoky rôznych alkoholov. Ako posledné boli pomocou svetelného panelu flat – panel fotobioreaktoru skúmané stresové podmienky vyvolané zmenou vlnových dĺžok svetla. Postup týchto experimentov je opísaný v kapitole 4.6.

5.1 Aplikácia stresových faktorov

5.1.1 *Desmodesmus communis* CICALA 464

Pri kultivácii kmeňa *Desmodesmus communis* bola kultúra kultivovaná súčasne v piatich Erlenmayerových bankách na BBM médiu, do každej bol pridaný rôzny alkohol, ako stresový faktor, jedna bola ponechaná ako kontrola bez prídavku alkoholu. Vzorky boli po lyofilizácii analyzované pomocou analytických metód, výsledky analýzy pomocou HPLC-DAD je možné vidieť v grafe na obrázku 10. Z grafu je zrejmé, že sa riasovej kultúre vo všetkých vzorkách darilo, ani pri jednej alkohol nepôsobil nepriaznivo. Aj keď bola produkcia biomasy najnižšia pri kontrolnej vzorke, obsahuje táto vzorka najvyšší obsah celkových chlorofylov, a síce 7,87 mg/g suchej biomasy, z čoho chlorofyl *a* tvoril 4,8 mg/g a chlorofyl *b* tvoril 3,07 mg/g biomasy. V tejto vzorke je výrazná aj hodnota celkových karotenoidov (4,28 mg/g biomasy), z čoho luteín tvorí až tvorí až 2,03 mg/g biomasy, čo je až 47 %. Vo vzorke s pridaním glycerolu, na úkor ostatných metabolitov, veľmi výrazne prevyšuje produkcia karotenoidov. Celkový obsah karotenoidov tvorí až 5,32 mg/g sušiny, čo je nie len vyššie oproti ostatným metabolitom v tejto vzorke, ale aj o 20 % viac ako v kontrolnej vzorke.

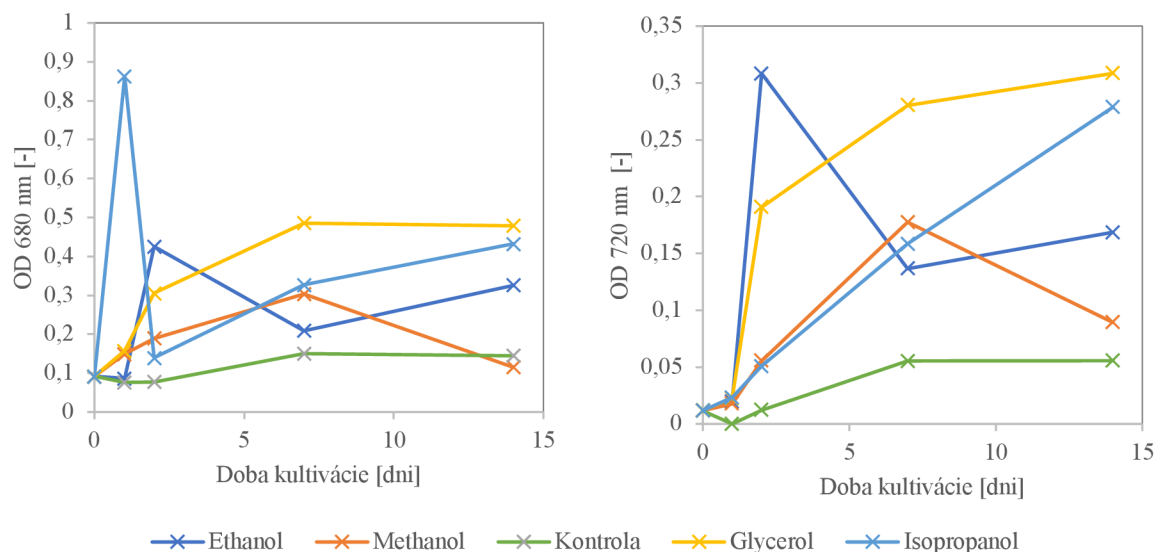


Obrázok 10: Graf závislosti produkcie lipidických metabolitov v závislosti na použítom alkohole pre *Desmodesmus communis*

Vo vzorkách s metanolom a isopropylalkoholom z karotenoidov prevláda betakarotén, ktorého hodnoty sú 1,15 mg/g biomasy pre metanol (o 48 % viac ako kontrolná vzorka) a 1,29 mg/g biomasy pre isopropylalkohol (o 54 % viac ako kontrolná vzorka). V porovnaní s kontrolnou vzorkou dosahoval vysoké výsledky aj obsah ubichinónu vo vzorkách s prídavkom metanolu, ethanolu a isopropylalkoholu. Vo vzorke s metanolom je vyšší o 63 %, vo vzorke s ethanolom o 75 %, a vo vzorke s isopropylalkoholom vyšší o 76,5 %.

OD (viď. Obrázok 11) bolo merané pri 680 nm aj pri 720 nm, klesalo iba pri vzorke s prídavkom 0,5 ml metanolu, avšak kvantový výtťažok fluorescence (QY - Tabuľka 6) je lineárny, takže nemožno hovoriť o úhyne kultúry. Pri vzorke s prídavkom ethanolu je vidieť skokový nárast OD v prvom dni po pridaní alkoholu, na druhý deň ale OD pokleslo a v ďalších dňoch stúpalo lineárne.

Najvyššiu hodnotu OD aj pri 680 nm, aj pri 720 nm dosahuje vzorka s prídavkom glycerolu, čo značí o výbornom náraste kultúry, ktorá obsahovala predovšetkým karotenoidy. Hodnoty OD pri vzorke s glycerolom sú nielen najvyššie, ale ako pri jedinej vzorke OD ani raz nekleslo a nárast je konštantný. Kontrolná vzorka aj napriek najvyššiemu obsahu intracelulárnych metabolitov dosahovala najnižšie hodnoty OD pri 720 nm, čo značí o nízkom obsahu modrých farbív. Taktiež dosahovala vzorka druhé najnižšie hodnoty aj pri OD 680 nm a nárast OD bol najpomalší zo všetkých vzoriek.



Obrázok 11: Graf závislosti optickej hustoty na čase, meranie pri 680 nm (vľavo) a 720 nm (vpravo) pre kmeň *Desmodesmus communis*

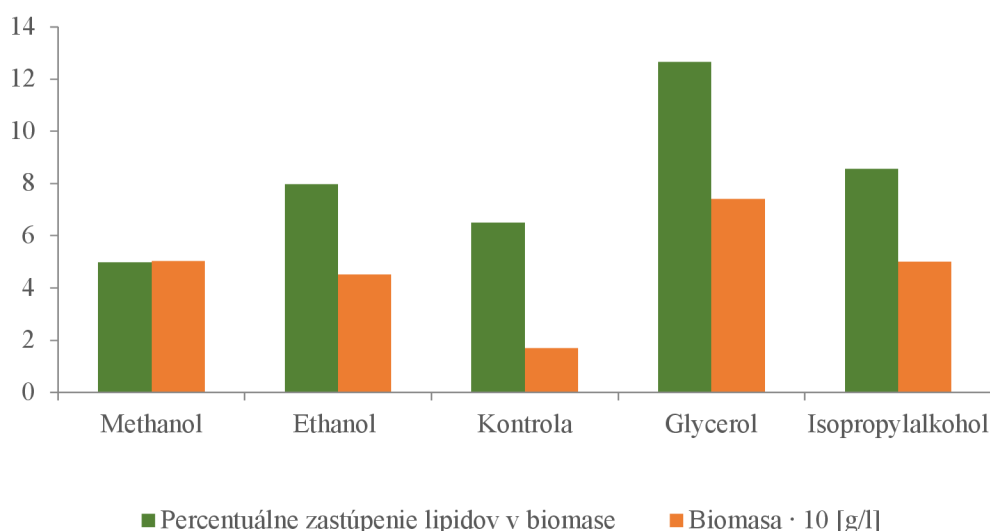
Pri kvantovom výtťažku fluorescence (viď. Tabuľka 6) sú takmer všetky hodnoty lineárne, vyčnievajú hodnoty vzorky s ethanolom, kedy QY na druhý deň kultivácie prudko pokleslo, čo odzrkadľuje aj skokový pokles OD, v ďalších dňoch QY aj OD opäť narastalo. Tento jav mohol byť spôsobený vyvolaným stresom, ktorému sa kultúra musela v prvých dňoch kultivácie prispôbiť. Taktiež QY pri kontrolnej vzorke začalo mierne klesať a tento jav mohol

byť spôsobený postupným úbytkom živín v dôsledku postupného nárastu kultúry. Všetky hodnoty ale spadajú do intervalu 0,5–1, čo značí o dobrej vitalite kultúry pri všetkých vzorkách.

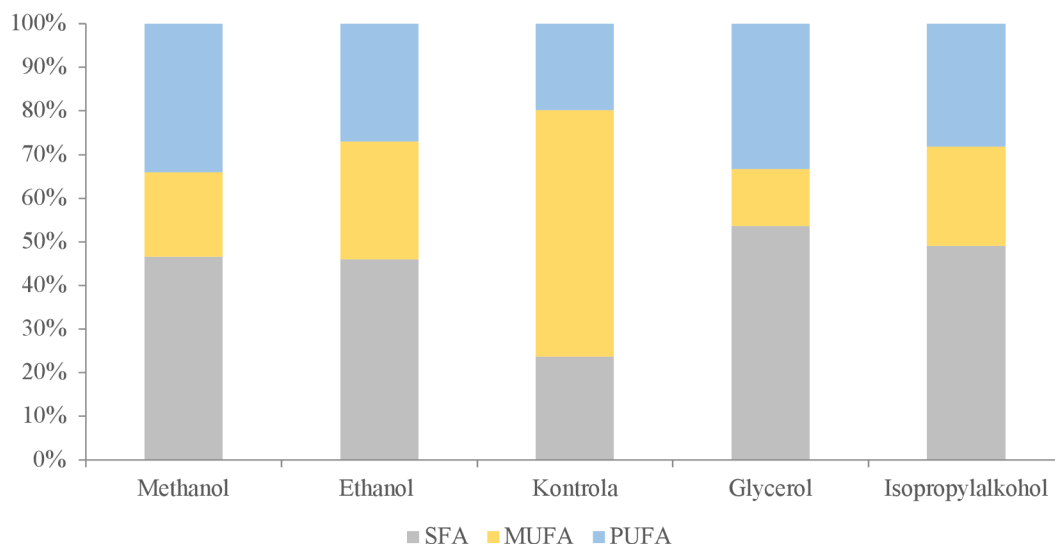
Tabuľka 6: Hodnoty kvantového výťažku fluorescence pri použití stresových faktorov pre kmeň *Desmodesmus communis*

| Doba kultivácie [dni] | QY [-] | | | | |
|-----------------------|----------|---------|----------|------------------|----------|
| | Methanol | Ethanol | Glycerol | Isopropylalkohol | Kontrola |
| 0 | 0,73 | 0,73 | 0,73 | 0,73 | 0,73 |
| 1 | 0,72 | 0,71 | 0,74 | 0,71 | 0,72 |
| 2 | 0,72 | 0,56 | 0,73 | 0,72 | 0,68 |
| 7 | 0,73 | 0,71 | 0,66 | 0,72 | 0,68 |
| 14 | 0,73 | 0,72 | 0,66 | 0,74 | 0,66 |

Na grafoch na obrázku 12 a obrázku 13 je zobrazené množstvo nakultivovanej biomasy, percentuálne zastúpenie lipidov a tiež lipidický profil vzoriek. Nárast biomasy je najmenší pri kontrolnom vzorku, takže je možné povedať, že prídavok alkoholu podporil nárast biomasy. Naopak, prídavok glycerolu a isopropylalkoholu bol nárast biomasy, ako aj percentuálne zastúpenie lipidov najväčší. Keďže bolo predošlými analýzami dokázané, že k užití alkoholu nedošlo, je možné predpokladať, že riasa posilnila nárast biomasy pôsobením stresových podmienok ako obranný mechanizmus. Lipidický profil (viď. Obrázok 13) ukazuje, že v kontrolnej vzorke sú najviac zastúpené mononenasytené mastné kyseliny (MUFA), kedy sa v tejto vzorke nachádza aj 56 % MUFA. Vo zvyšných vzorkách sa ukazuje opačný trend, a síce zastúpenie MUFA vo vzorkách je najnižšie a ako najviac zastúpené figurujú nasýtené mastné kyseliny (SFA).



Obrázok 12: Produkcia biomasy a percentuálne zastúpenie lipidov v závislosti na pridaný alkohol ako chemický stres pri kultivácii kmeňa *Desmodesmus communis*



Obrázok 13: Zloženie lipidov v biomase pri kultivácii kmeňa *Desmodesmus communis* v BBM médiu pri prídavku alkoholu ako stresového faktora

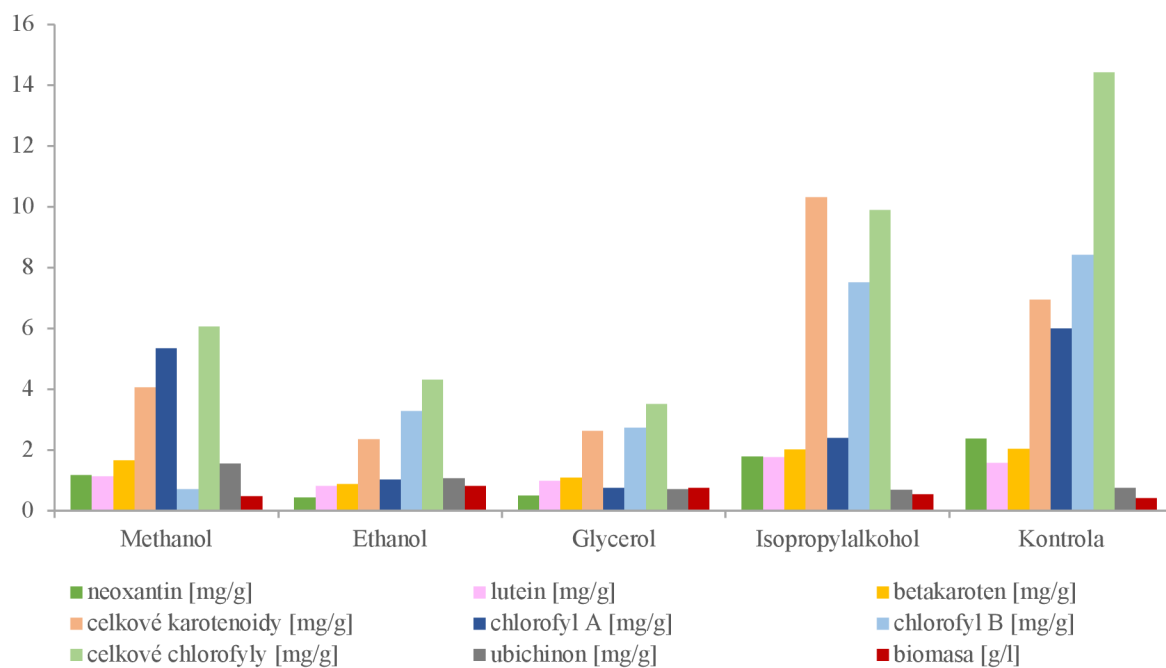
Taktiež analýza pomocou HPLC–RI (viď. Tabuľka 7) ukázala, že v prípade vzorky s prídavkom methanolu nastal pokles methanolu v médiu, takže bol methanol pravdepodobne využitý pre heterotrofný spôsob výživy. Úbytok alkoholu v médiu je možné pozorovať aj pri prídavku ethanolu, pri ktorom je vidieť aj skokový nárast OD v prvých 2 dňoch po pridaní alkoholu, taktiež OD v prvých dňoch po pridaní pokleslo, ale v ďalších dňoch došlo k nárastu. Pri vzorkách s glycerolom a isopropylalkoholom nie je pozorovaný úbytok alkoholu v kultivačnom médiu, avšak v niektorých dňoch sa v médiu vyskytuje ethanol (zvýraznené červene). Výskyt ethanolu nemohol byť spôsobený metabolizovaním glycerolu ani isopropylalkoholu, keďže k ich ubýtkom nedošlo.

Tabuľka 7: Výsledky HPLC–RI analýzy pre určenie koncentrácie alkoholu v kultivačnom médiu pre kmeň *Desmodesmus communis*

| Pridaný alkohol | Doba kultivácie [dni] | Methanol [g/l] | Ethanol [g/l] | Isopropanol [g/l] | Glycerol [g/l] |
|-------------------------|-----------------------|----------------|---------------|-------------------|----------------|
| Methanol | 0 | 1,8998 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 5,63 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 1,8834 | 0 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ethanol | 0 | 0 | 1,5561 | 0 | 0 |
| | 1 | 0 | 1,363 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 6,352 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Glycerol | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,5914 |
| | 1 | 0 | 6,347 | 0 | 4,212 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 4,232 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 4,223 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 4,222 |
| Isopropylalkohol | 0 | 0 | 0 | 0,9052 | 0 |
| | 1 | 0 | 6,352 | 6,92 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 6,92 | 0 |
| | 7 | 0 | 6,665 | 6,925 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 6,92 | 0 |
| Kontrola | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |

5.1.2 *Scenedesmus cf. acutus* CCALA 437

Výsledky HPLC analýzy karotogenných látok, chlorofylu a ubichinónu sú uvedené v grafe (viď. Obrázok 14). Pri riase *Scenedesmus acutus* je možné pozorovať zmenu zloženia intracelulárnych metabolitov v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Najvýraznejší je nárast celkových karotenoidov (20,65 mg/g biomasy) pri vzorke s prídavkom isopropylalkoholu. V tomto prípade je produkcia karotenoidov nie len vyššia v porovnaní s kontrolou, ale množstvo karotenoidov prevažuje počet celkových chlorofylov v danej vzorke. Najvyššia produkcia zvyšných metabolitov bola pozorovaná pri kontrolnej vzorke. Riasová kultúra s prídavkom metanolu ukazuje zmeny pomeru chlorofylu *a* a *b*, kedy pri kontrolnej vzorke a vzorkách s prídavkom zvyšných alkoholov prevažuje chlorofyl *a*, vo vzorke s metanolom je viditeľný jeho značný ubýtok (1,41 mg/g biomasy) a produkcia chlorofylu *b* je len nevýrazne znížená (10,69 mg/g biomasy) v porovnaní s kontrolnou vzorkou (11,99 mg/g biomasy). Pri tejto vzorke je možné pozorovať aj nárast ubichinónu (3,12 mg/g biomasy). Pre ostatné prídavky alkoholu bola produkcia metabolitov v porovnaní s kontrolou znížená, avšak namerané hodnoty QY (viď. Tabuľka 8) sú konštanté a vypovedajú, že vitalita riasy pri produkcii s alkoholmi v danom časovom období výrazne znížená nebola.



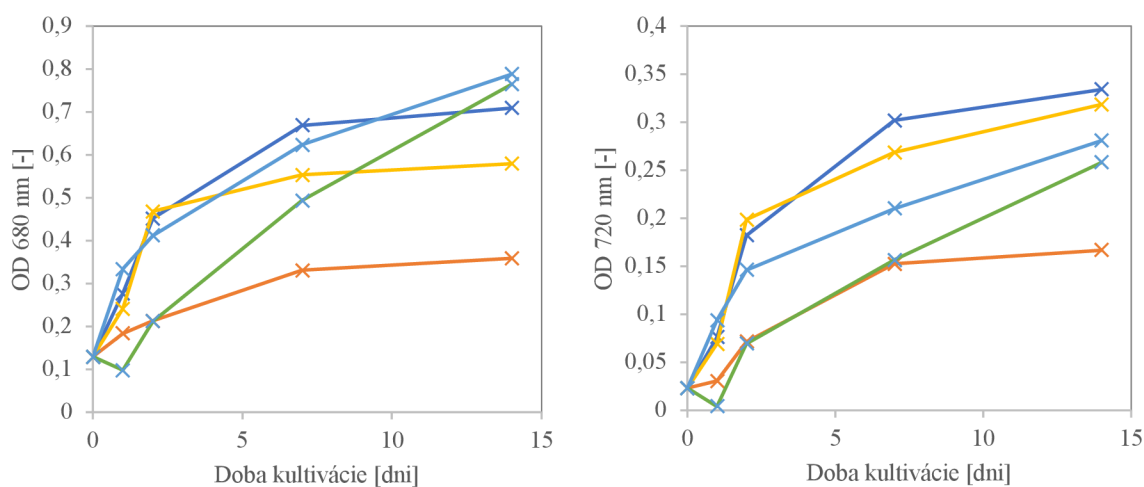
Obrázok 14: Graf závislosti produkcie lipidických metabolitov v závislosti na použítom alkohole pre *Scenedesmus acutus*

Tabuľka 8: Hodnoty kvantového výťažku fluorescence pri použití stresových faktorov pre kmeň *Scenedesmus acutus*

| Doba kultivácie [dni] | QY [-] | | | | |
|-----------------------|----------|---------|----------|------------------|----------|
| | Methanol | Ethanol | Glycerol | Isopropylalkohol | Kontrola |
| 0 | 0,73 | 0,73 | 0,73 | 0,73 | 0,73 |
| 1 | 0,72 | 0,71 | 0,74 | 0,72 | 0,73 |
| 2 | 0,72 | 0,71 | 0,74 | 0,72 | 0,74 |
| 7 | 0,74 | 0,71 | 0,68 | 0,72 | 0,75 |
| 14 | 0,74 | 0,71 | 0,68 | 0,72 | 0,74 |

Po celú dobu kultivácie bolo v pravidelných intervaloch merané OD pri 680 a 720 nm, rastové krivky vytvorené týmto meraním sú znázornené v grafe nižšie (viď. Obrázok 15). Pri kontrolnej vzorke je možné pozorovať prvotný pokles optickej hustoty kultúry 24 hodín po zaočkovaní, ďalej však kultúra rástla konštantne. Pri vlnovej dĺžke 680 nm bol pre kultúry s ethanolom, glycerolom, aj isopropanolom pozorovaný prudký nárast OD v prvom a druhom dni kultivácie, v ďalších dňoch sa nárast zmiernil. Pre vzorku s glycerolom bol nárast OD v 7. a 14. deň experimentu takmer minimálny, taktiež QY (Tabuľka 8) tejto kultúry začalo po prudkom náraste klesať, takže je možné predpokladať, že z dlhodobého hľadiska by bolo pridanie glycerolu pre kultúru neprospešné. Najvýraznejšie zvýšenie OD pri 680 nm je pozorované pri kultúre s prídavkom isopropanolu, čo odpovedá aj zvýšenej produkcii niektorých metabolitov, spomenutej vyššie.

Pre merania OD pri 720 nm je pri všetkých vzorkách pozorovaná rastúca tendencia. Hodnoty pre vzorky s ethanolom, glycerolom a isopropylalkoholom sú vyššie ako hodnoty kontrolnej vzorky. Najvýraznejší je prudký nárast hodnôt pri vzorke s prídavkom ethanolu. Hodnota OD meraná pri 720 nm detekuje veľkosť buniek alebo výskyt modrého farbiva – fykocyanínu.



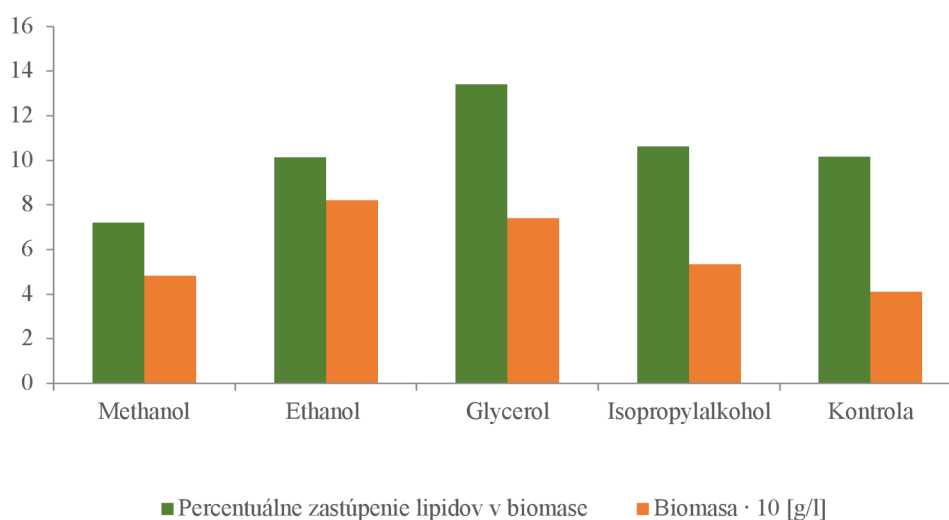
Obrázok 15: Graf závislosti optickej hustoty na čase, meranie pri 680 nm (vľavo) a 720 nm (vpravo) pre kmeň *Scenedesmus acutus*

Analýza vzoriek média počas kultivácie ukazuje, že riasová kultúra pri pridaní isopropylalkoholu a glycerolu tento alkohol nevyužívala pre mixotrofný spôsob výživy, nakoľko koncentrácia týchto alkoholov v médiu ostala nezmenená. Pre prídavok ethanolu koncentrácia v prvom týždni kultivácie zľahka stúpla, avšak po 14 dňoch od začatia kultivácie bola koncentrácia tohto alkoholu v médiu nulová. Nulová koncentrácia alkoholu sa objavuje aj pri prídavku methanolu, kde alkohol v médiu nebol detekovaný už po 7 dňoch od začiatku kultivácie. Možno teda predpokladať, že v prípade methanolu aj ethanolu bol alkohol utilizovaný riasovou kultúrou.

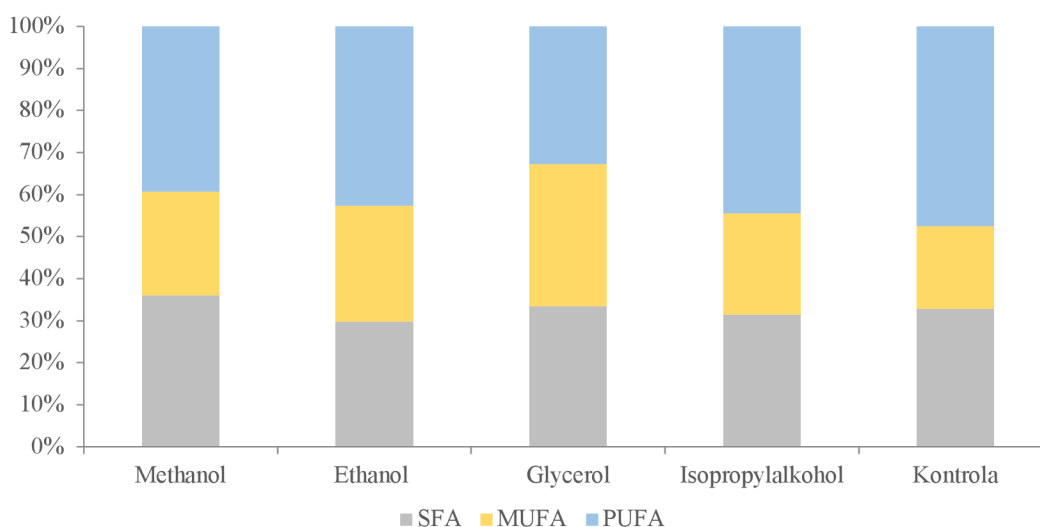
Tabuľka 9: Výsledky HPLC–RI analýzy pre určenie koncentrácie alkoholu v kultivačnom médiu pre kmeň *Scenedemus acutus*

| Pridaný alkohol | Doba kultivácie | Methanol [g/l] | Ethanol [g/l] | Isopropanol [g/l] | Glycerol [g/l] |
|------------------|-----------------|----------------|---------------|-------------------|----------------|
| Methanol | 0 | 1,8998 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 5,527 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 5,525 | 0 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ethanol | 0 | 0 | 1,5561 | 0 | 0 |
| | 1 | 0 | 6,192 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 6,197 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 6,203 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Glycerol | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,5914 |
| | 1 | 0 | 0 | 0 | 4,145 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 4,137 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 4,17 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 4,117 |
| Isopropylalkohol | 0 | 0 | 0 | 0,9052 | 0 |
| | 1 | 0 | 0 | 6,733 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 6,732 | 0 |
| | 7 | 0 | 0 | 6,733 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 6,735 | 0 |
| Kontrola | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Aj napriek tomu, že HPLC-DAD analýza ukázala najmenšiu produkciu metabolitov pri kultivácii riasovej kultúry s glycerolom, percentuálne zastúpenie lipidov v biomase (Obrázok 16) bolo v tejto vzorke najvyššie (13,41 %), čiže kultúra produkovala viac lipidov na úkor zvyšných metabolitov. Percentuálne zastúpenie lipidov pre vzorky s prídavkom isopropylalkoholu a ethanolu je približne zhodné s kontrolnou vzorkou (± 10 %), vzorky s metanolom majú tento parameter znížený (4,83 %). Produkcia biomasy v porovnaní s kontrolnou vzorkou vzrástla pre všetky vzorky, najvýraznejšie pre vzorku s prídavkom ethanolu (10,13 g/l). Čo sa týka zastúpenia mastných kyselín v lipidickom podiele (Obrázok 17), vo všetkých vzorkách bola v porovnaní s kontrolnou vzorkou zvýšená produkcia MUFA, najvýraznejšie pre vzorku s prídavkom glycerolu (33,82 %). Vo všetkých vzorkách, s výnimkou spomenutej, dominuje produkcia PUFA, obsah MUFA je naopak pri všetkých vzorkách najnižší.



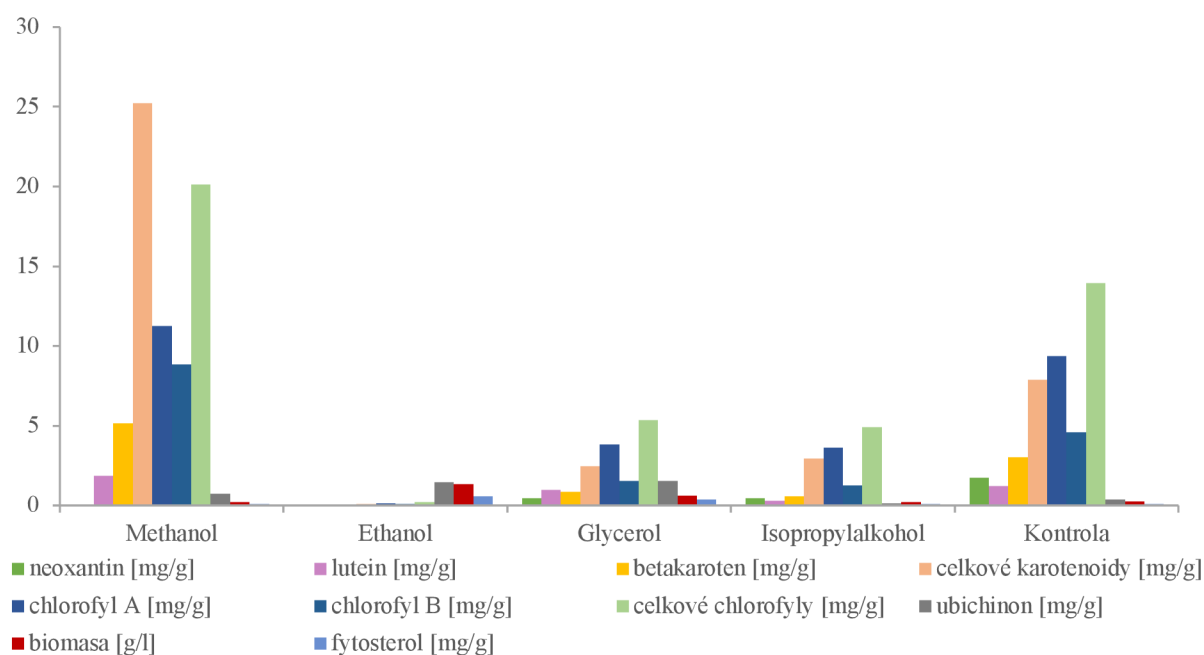
Obrázok 16: Produkcia biomasy a percentuálne zastúpenie lipidov v závislosti na pridaný alkohol ako chemický stres pri kultivácii kmeňa *Scenedesmus acutus*



Obrázok 17: Zloženie lipidov v biomase pri kultivácii kmeňa *Scenedesmus acutus* v BBM médiu pri prídavku alkoholu ako stresového faktora

5.1.3 *Scenedesmus cf. ecornis* CCALA 444

Výsledky analýzy HPLC pre stanovenie karotenoidov, chlorofylov a ubichinónu pri kultivácii riasy *Scenedesmus ecornis*, s prídavkom piatich rôznych alkoholov, sú uvedené v grafe (viď. Obrázok 18). Pri kultivácii s ethanolom je produkcia veľmi nízka až žiadna, aj keď produkcia biomasy bola najvyššia zo všetkých vzoriek. Nízka produkcia intracelulárnych metabolitov odpovedá aj nulovému QY (viď. Tabuľka 10) pri ukončení kultivácie po 14 dňoch. Pri tejto vzorke zároveň počas kultivácie dochádzalo k tvorbe riasových zhlukov.



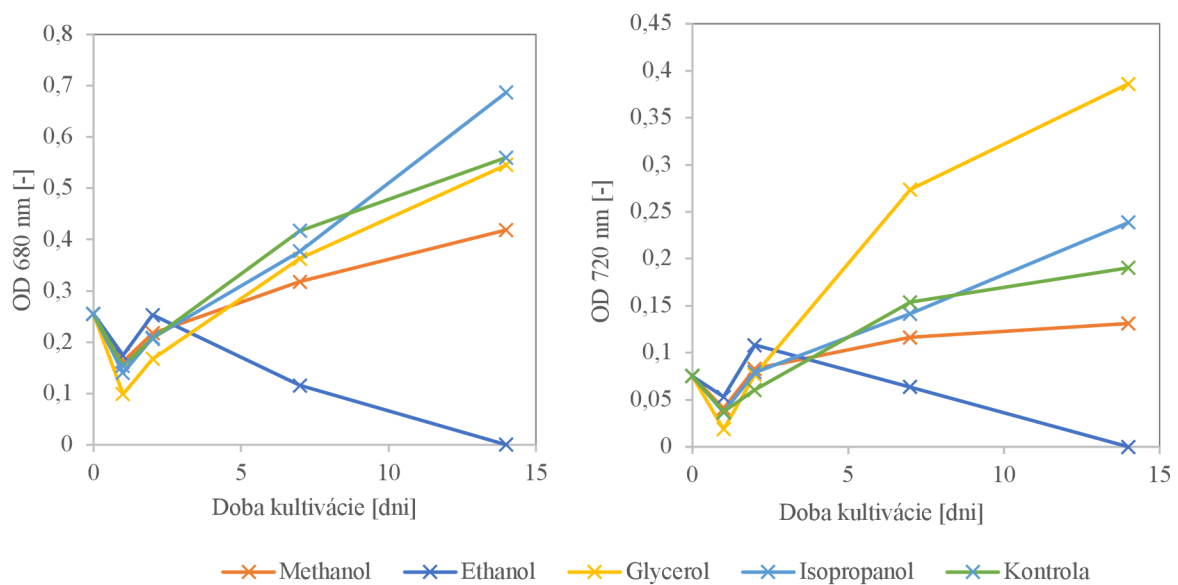
Obrázok 18: Graf závislosti produkcie lipidických metabolitov v závislosti na použitom alkohole pre *Scenedesmus ecornis*

Najvyššie výsledky dosahuje vzorka s prídavkom methaolu. Táto vzorka obsahuje najvyšší obsah celkových karotenoidov a to až 50,46 mg/g biomasy, čo je v porovnaní s obsahom celkových karotenoidov v kontrolnej vzorke trojnásobok. Obsah karotenoidov je zároveň vyšší ako obsah celkových chlorofylov (40,23 mg/g) vo vzorke. Pri kultivácii s glycerolom a isopropylalkoholom sú hodnoty nižšie ako pri kontrolnej vzorke, avšak QY (Tabuľka 10) je, s výnimkou vzorky s ethanolom, konštantné, čo vypovedá o dobrej vitalite riasových kultúr.

Tabuľka 10: Hodnoty kvantového výťažku fluorescencie pri použití stresových faktorov pre kmeň *Scenedesmus ecornis*

| Doba kultivácie [dni] | QY [-] | | | | |
|-----------------------|----------|---------|----------|------------------|----------|
| | Methanol | Ethanol | Glycerol | Isopropylalkohol | Kontrola |
| 0 | 0,71 | 0,71 | 0,71 | 0,71 | 0,71 |
| 1 | 0,72 | 0,72 | 0,71 | 0,71 | 0,71 |
| 2 | 0,72 | 0,72 | 0,73 | 0,71 | 0,71 |
| 7 | 0,72 | 0,14 | 0,69 | 0,71 | 0,71 |
| 14 | 0,72 | 0 | 0,7 | 0,71 | 0,71 |

Optická hustota vzoriek bola meraná pri 680 a 720 nm, výsledky sú zobrazené v grafe (viď. Obrázok 19). U všetkých vzoriek došlo v prvom dni kultivácie k poklesu OD, či už pri 680 nm alebo 720 nm, v ďalších dňoch začali hodnoty narastať. Pre meranie pri 680 nm dosahuje najvyššie hodnoty kultúra s prídavkom isopropanolu, avšak neodpovedá to celkovej produkcii biomasy zistenej pomocou GC analýzy (Obrázok 20). Kultúra s glycerolom, isopropylalkoholom, metanolom, ako aj kontrolná kultúra, vykazujú v ďalších dňoch lineárny nárast optickej hustoty. Hodnoty OD pre kultúru s ethanolom po druhom dni lineárne klesajú, v deň ukončenia kultivácie boli hodnoty nulové. Avšak, meranie pre túto vzorku mohlo byť ovplyvnené vznikom zhlukov kultúry v médiu. Pri 720 nm dosahuje najlepšie hodnoty kultúra s glycerolom, takže je možné predpokladať zvýšený výskyt modrých farbív v bunkách riasy.



Obrázok 19: Graf závislosti optickej hustoty na čase, meranie pri 680 nm (vľavo) a 720 nm (vpravo) pre kmeň *Scenedesmus ecornis*

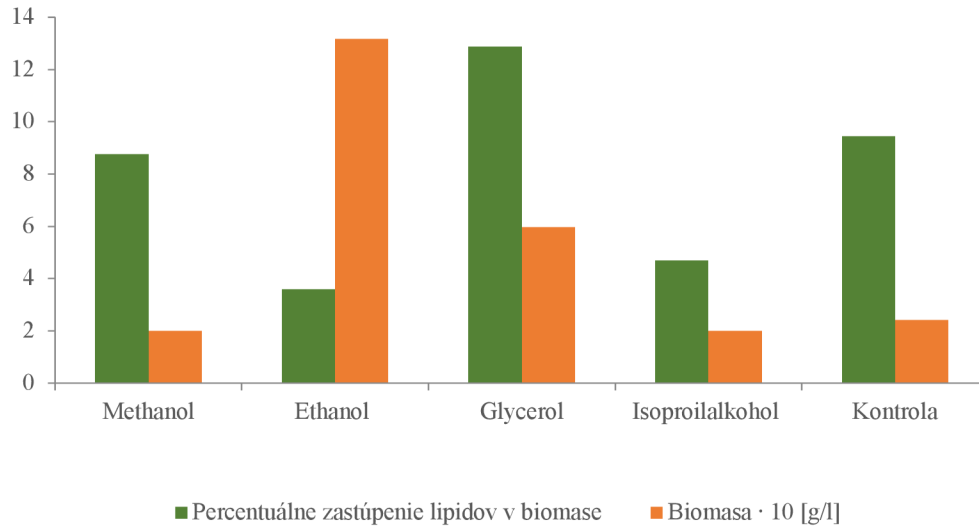
Analýza vzoriek média pomocou HPLC–RI je vyjadrená v Tabuľka 11. V rámci kmeňa *Scenedesmus ecornis* je možné vidieť, že ani jeden z alkoholov nebol utilizovaný riasovou kultúrou, nakoľko koncentrácia alkoholov v médiu ostala počas celej doby experimentu nezmenená. Alkohol ale pôsobil ako stresový faktor, čo je vidieť na rôznych hodnotách intracelulárnych metabolitov pre rôzne alkoholy. Pri vzorke s prídavkom ethanolu došlo k postupnému úhynu kultúry, taktiež sa na siedmy a štrnásty deň kultivácie objavuje v médiu prítomnosť glycerolu (hodnoty zvýraznené červene).

Tabuľka 11: Výsledky HPLC–RI analýzy pre určenie koncentrácie alkoholu v kultivačnom médiu pre kmeň *Scenedemus acutus*

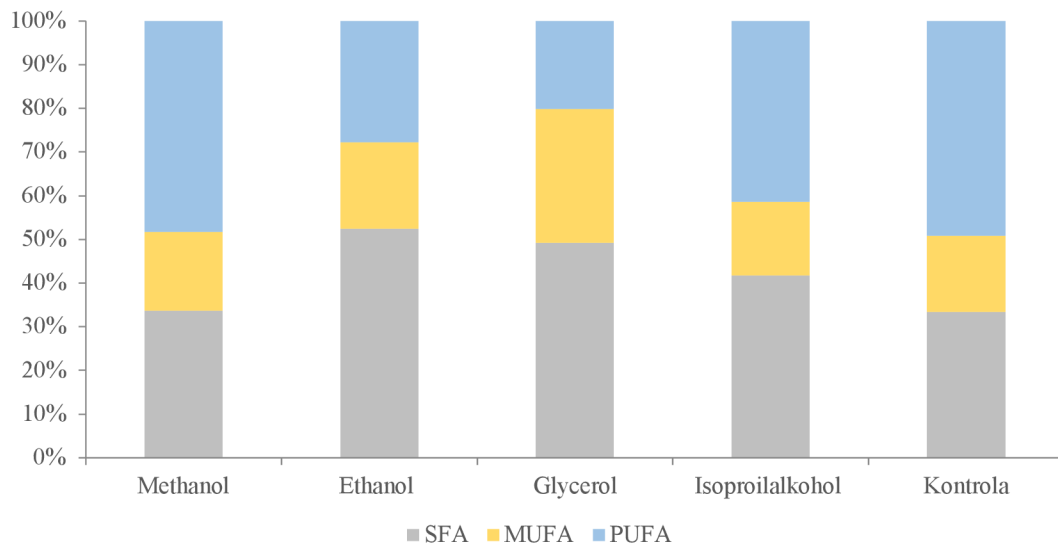
| Pridaný alkohol | Doba kultivácie [dni] | Methanol [g/l] | Ethanol [g/l] | Isopropanol [g/l] | Glycerol [g/l] |
|------------------|-----------------------|----------------|---------------|-------------------|----------------|
| Methanol | 0 | 5,427 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 5,427 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 5,428 | 0 | 0 | 0 |
| | 7 | 5,428 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 5,428 | 0 | 0 | 0 |
| Ethanol | 0 | 0 | 6,097 | 0 | 0 |
| | 1 | 0 | 6,097 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 6,095 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 6,1 | 0 | 4,512 |
| | 14 | 0 | 6,135 | 0 | 4,518 |
| Glycerol | 0 | 0 | 0 | 0 | 4,085 |
| | 1 | 0 | 0 | 0 | 4,085 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 4,085 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 4,082 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 4,078 |
| Isopropylalkohol | 0 | 0 | 0 | 6,716 | 0 |
| | 1 | 0 | 0 | 6,718 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 6,712 | 0 |
| | 7 | 0 | 0 | 6,717 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 6,72 | 0 |
| Kontrola | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Analýzou pomocou plynovej chromatografie (Obrázok 20 a Obrázok 21) bolo zistené, najvyššiu produkciu biomasy ukazuje vzorka s prídavkom ethanolu, avšak pri zohľadnení úhynu kultúry a minimálnej produkcií intracelulárnych metabolitov, táto hodnota nie je pre ďalšie analýzy významná. Druhú najvyššiu produkciu biomasy, podobne ako že najvyššie percentuálne zastúpenie lipidov dosahovala kultúra s prídavkom glycerolu. Percentuálne zastúpenie lipidov vo vzorke činí 12,88 %, produkcia biomasy bola 0,58 g/l.

Pre zastúpenie mastných kyselín vo vzorkách platí, že najmenší podiel zaujímajú vo všetkých vzorkách MUFA. Najvyššiu hodnotu MUFA je možné vidieť pri vzorke s glycerolom a to 20,2 %. Pre vzorku s metanolom a kontrolnú vzorku je zastúpenie PUFA väčšie ako zastúpenie SFA. Pre vzorky s ethanolom, glycerolom a isopropanolom platí opačný trend, a teda zastúpenie SFA je vyššie ako zastúpenie PUFA.



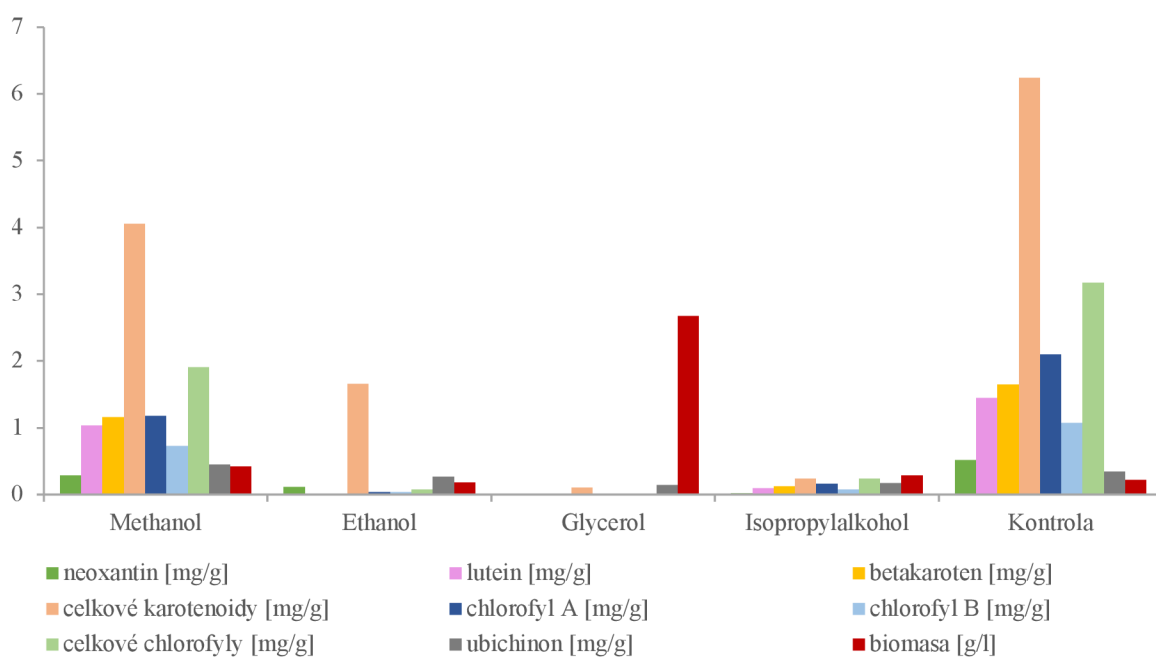
Obrázok 20: Produkcia biomasy a percentuálne zastúpenie lipidov v závislosti na pridaný alkohol ako chemický stres pri kultivácii kmeňa *Scenedesmus ecornis*



Obrázok 21: Zloženie lipidov v biomase pri kultivácii kmeňa *Scenedesmus ecornis* v BBM médiu pri prídavku alkoholu ako stresového faktora

5.1.4 *Desmodesmus armatus* CCALA 43

Výsledky chromatografickej analýzy karotenoidov, chlorofylov a ubichinónu sú uvedené v grafe na obrázku 22. Najvyššie hodnoty dosahuje kontrolná vzorka, všetky ostatné vzorky majú hodnoty výrazne nižšie. Už v samotnej kontrolnej vzorke je možné pozotovať vyššiu hodnotu pre celkové karotenoidy (12,48 mg/g biomasy) ako pre celkové chlorofyly (6,34 mg/g biomasy). Tento trend je pozorovaný aj pri vzorkách s prídavkom methaolu, kde celkový obsah karotenoidov činil 8,10 mg/g biomasy. Karotenoidy sú detekované aj vo vzorke riasovej kultúry s prídavkom ethanolu, kde je obsah celkových karotenoidov 3,32 mg/g biomasy. V tejto vzorke zvyšné metabolity neboli detekované, alebo bola ich koncentrácia príliš malá. Nízka koncentrácia metabolitov v tejto vzorke zároveň odpovedá aj hodnotám QY uvedeným v tabuľke 12, kde QY vo vzorke z ethanolom bola v 14. deň kultivácia nulová. Nulová hodnota QY vypovedá o tom, že kultúra je nevitálna, pôsoboneím stresových podmienok. QY taktiež výrazne kleslo pri vzorke s glycerolom, pri ktorej je možné pozorovať výrazný nárast celkovej biomasy. Hodnota QY pri tejto vzorke však stále spadá do intervalu 0,5 – 1, čo vypovedá o dobrej vitalite riasovej kultúry. QY zvyšných vzoriek taktiež spadá do tohto intervalu a po celú dobu kultivácie ostalo výrazne nezmenené.

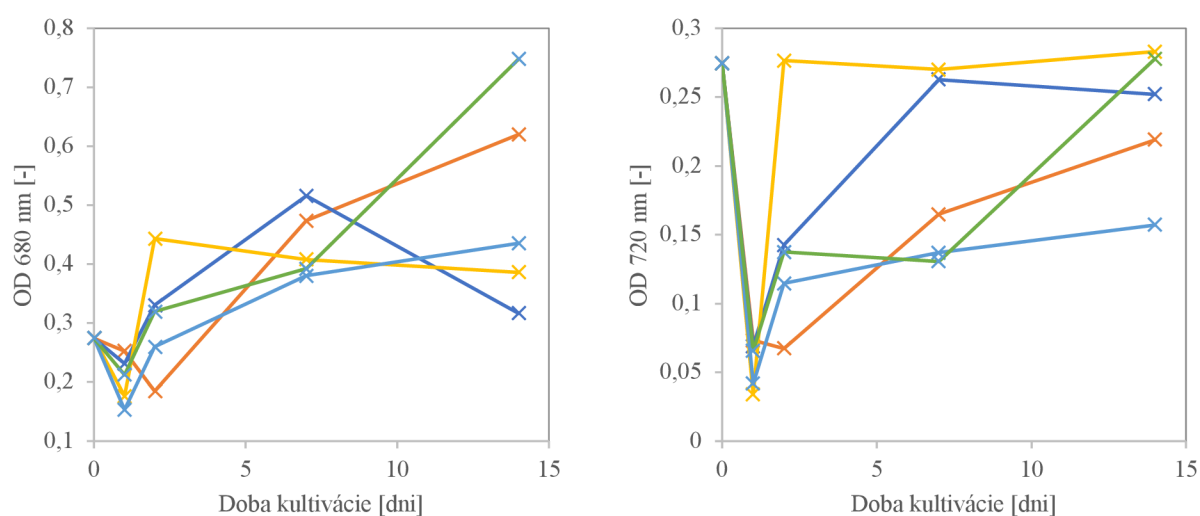


Obrázok 22: Graf závislosti produkcie lipidických metabolitov v závislosti na použítom alkohole pre *Desmodesmus armatus*

Tabuľka 12: Hodnoty kvantového výťažku fluorescence pri použití stresových faktorov pre kmeň *Desmodesmus armatus*

| Doba kultivácie [dni] | QY [-] | | | | |
|-----------------------|----------|---------|----------|------------------|----------|
| | Methanol | Ethanol | Glycerol | Isopropylalkohol | Kontrola |
| 0 | 0,77 | 0,77 | 0,77 | 0,77 | 0,77 |
| 1 | 0,74 | 0,72 | 0,72 | 0,75 | 0,74 |
| 2 | 0,75 | 0,72 | 0,71 | 0,75 | 0,71 |
| 7 | 0,71 | 0,21 | 0,63 | 0,71 | 0,72 |
| 14 | 0,7 | 0 | 0,63 | 0,71 | 0,71 |

Grafy na obrázku 23 zobrazujú hodnoty OD meraného pri 680 a 720 nm. Všetky vzorky vykazujú počiatkový pokles a následný nárast hodnôt. Najvyššie hodnoty OD meraného pri 680 nm, je možné pozorovať pri kontrolnej vzorke. V tomto prípade hodnoty nestúpajú lineárne, ale nárazovo. Hodnoty OD (680 nm) pre vzorky s prídavkom ethanolu a glycerolu vykazujú počiatkové stúpanie, avšak v prípade glycerolu po 2. dni kultivácie hodnoty prestali stúpať a v prípade ethanolu hodnoty po 7 dni kultivácie výrazne klesali. Nepriaznivé hodnoty OD kopírujú nízke hodnoty výsledkov z chromatografickej analýzy vyššie (viď. Obrázok 22). Hodnoty OD merané pri 720 nm taktiež ukazujú prudký pokles v prvom dni kultivácie, v ďalších dňoch hodnoty opäť narastali. Možno predpokladať, že klesanie OD mohlo byť spôsobené tým, že si riasová kultúra musela najskôr privyknuť na pridaný stres. Ako ukázala analýza pomocou HPLC-RI (viď. Tabuľka 13), ani v jednom prípade alkohol z média nebol odbúraný, jeho koncentrácia v kultivačnom médiu ostala takmer nezmenená, takže alkohol pôsobil len ako stresový faktor a nie ako zdroj uhlíka pre heterotrofnú výživu. V prípade vzorky s prídavkom ethanolu sa navyše v médiu pri 7. dni vyskytoval glycerol, ktorý mohol byť riasou produkovaný ako odpoveď na pridaný stres.



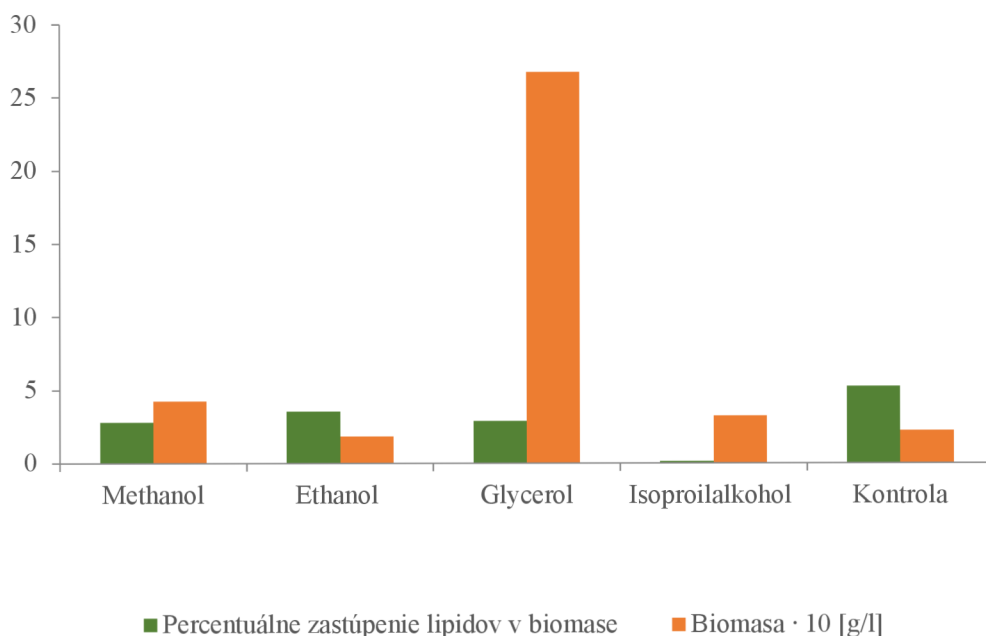
Obrázok 23: Graf závislosti optickej hustoty na čase, meranie pri 680 nm (vľavo) a 720 nm (vpravo) pre kmeň *Desmodesmus armatus*

Tabuľka 13: Výsledky HPLC–RI analýzy pre určenie koncentrácie alkoholu v kultivačnom médiu pre kmeň *Desmodesmus armatus*

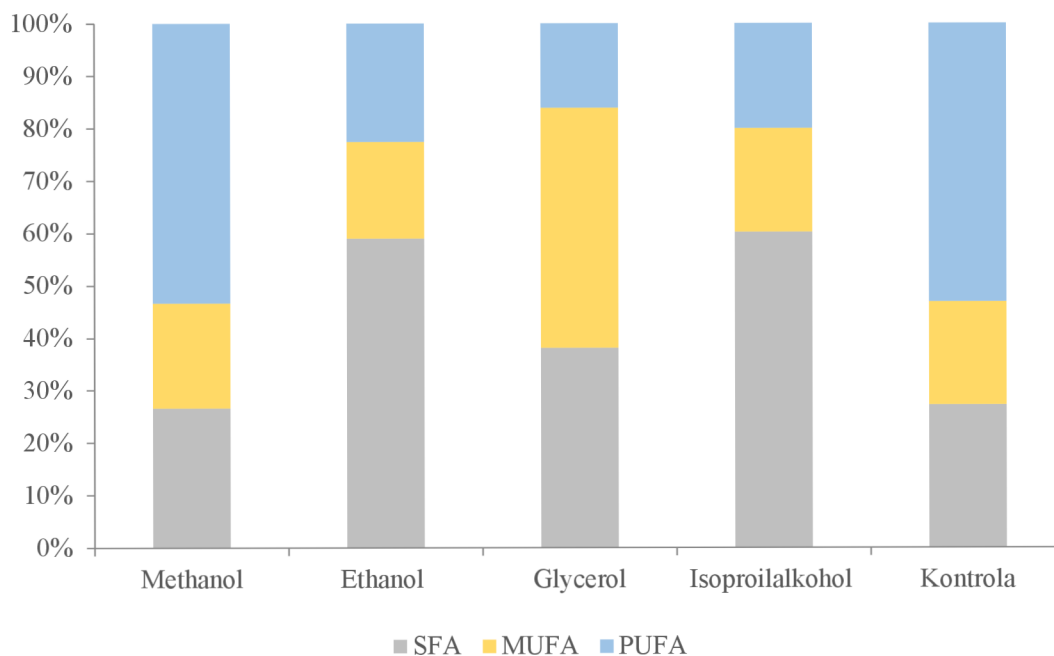
| Pridaný alkohol | Doba kultivácie [dni] | Methanol [g/l] | Ethanol [g/l] | Isopropanol [g/l] | Glycerol [g/l] |
|------------------|-----------------------|----------------|---------------|-------------------|----------------|
| Methanol | 0 | 1,8998 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 5,482 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 5,482 | 0 | 0 | 0 |
| | 7 | 5,485 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 5,483 | 0 | 0 | 0 |
| Ethanol | 0 | 0 | 1,5561 | 0 | 0 |
| | 1 | 0 | 6,148 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 6,147 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 6,158 | 0 | 4,252 |
| | 14 | 0 | 6,155 | 0 | 4,248 |
| Glycerol | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,5914 |
| | 1 | 0 | 0 | 0 | 4,125 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 4,115 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 4,11 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 3,352 |
| Isopropylalkohol | 0 | 0 | 0 | 0,9052 | 0 |
| | 1 | 0 | 0 | 6,718 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 6,72 | 0 |
| | 7 | 0 | 0 | 6,723 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 6,73 | 0 |
| Kontrola | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Analýza metódou GC (Obrázok 24) ukázala, že najviac biomasy bolo produkovanej pri vzorke s prídavkom glycerolu a to až 2,67 g/l, čo je výrazne viac ako pri zvyšných vzorkách pri kmeni *Desmodesmus armatus*. Najnižšie hodnoty biomasy vykazuje vzorka s ethanolom, čo odpovedá aj analýzám spomenutým vyššie, kultúra nemala pozitívnu odpoveď na prídanie alkoholu. Percentuálne zastúpenie lipidov v biomase pri vzorke s glycerolom bolo 2,87 %. Najmenšie, takmer nulové, zastúpenie lipidov je možné vidieť pri vzorke s prídavkom isopropylalkoholu. Najvyššie percentuálne zastúpenie lipidov vykazuje kontrolná vzorka, a to

až 5,23 %. Zloženie lipidov je zobrazené na grafe na obrázku 25. Pri kontrolnej vzorke a vzorke s prídavkom methanolu dominuje zastúpenie PUFA (53,39 % pre vzorku s methanolom, 53,13 % pre kontrolnú vzorku). Pre vzorky s prídavkom ethanolu a isopropylalkoholu dominuje zastúpenie SFA a pri vzorke s prídavkom glycerolu ako pri jedinej možno vidieť veľký nárast MUFA až na 45,8 %.



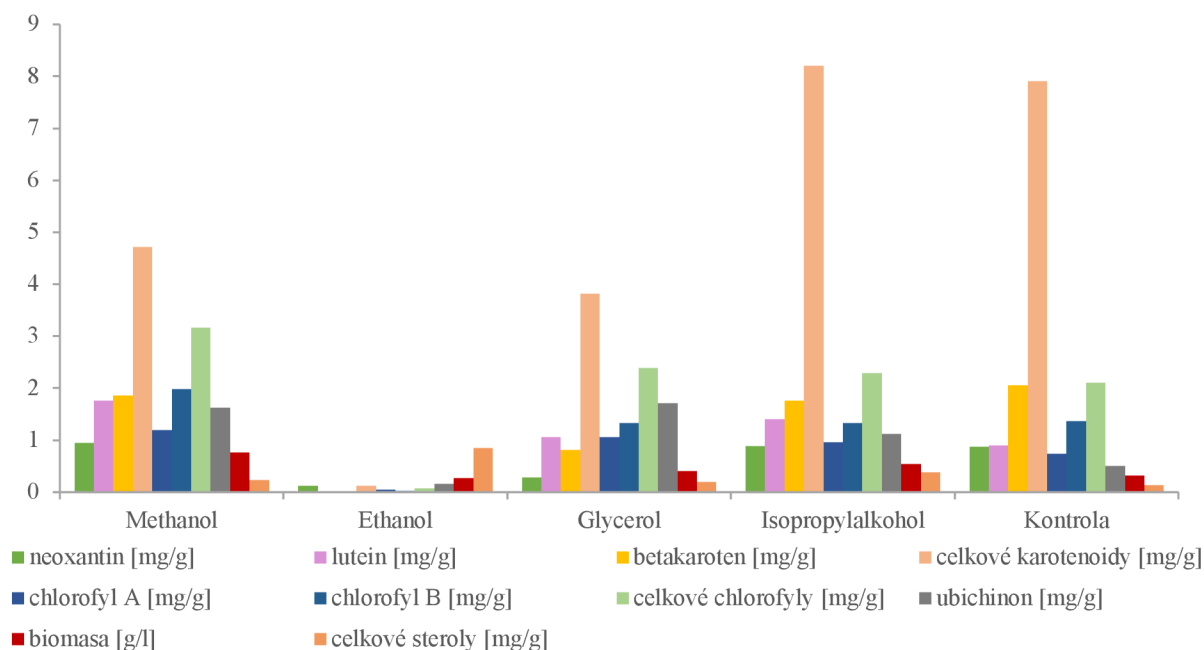
Obrázok 24: Produkcia biomasy a percentuálne zastúpenie lipidov v závislosti na pridaný alkohol ako chemický stres pri kultivácii kmeňa *Desmodesmus armatus*



Obrázok 25: Zloženie lipidov v biomase pri kultivácii kmeňa *Desmodesmus armatus* v BBM médiu pri prídavku alkoholu ako stresového faktora

5.1.5 *Scenedesmus obliquus* CCALA

Obrázok 26 zobrazuje výsledky chromatografickej analýzy pre kmeň *Scenedesmus obliquus*. Kontrolná vzorka a vzorka s izopropylalkoholom dosahujú najvyššie výsledky. Najnižšie hodnoty dosahuje vzorka riasovej kultúry s prídavkom ethanolu, kde je však možné pozorovať najvyššiu koncentráciu celkových sterolov a to až 1,69 mg/g biomasy. Pre porovnanie koncentrácia celkových sterolov v kontrolnej vzorke bola iba 0,26 mg/g biomasy. Najvyššia hodnota celkových karotenoidov je vo vzorke s prídavkom isopropylalkoholu a to 16,41 mg/g suchej biomasy. Vo vzorkách s glycerolom a s metanolom je vidieť nárast ubichinónu, ktorý pri je vyšší od kontrolnej vzorky vyšší o 69 % pre metanol a o 70 % pre glycerol.



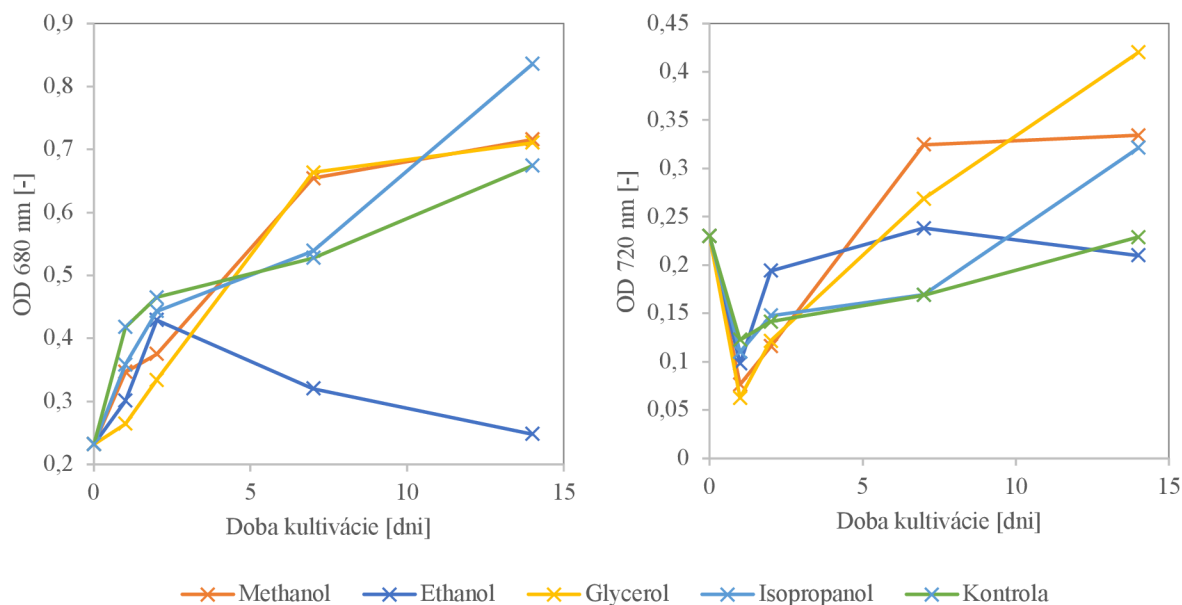
Obrázok 26: Graf závislosti produkcie lipidických metabolitov v závislosti na použítom alkohole pre *Scenedesmus obliquus*

Hodnoty kvantového výťažku fluorescencie, zobrazené v tabuľke 14, ukazujú, že takmer pri všetkých vzorkách, s výnimkou vzorky s ethanolom, bolo QY konštantné, čiže vitalita riasovej kultúry bola vyhovujúca. Pri vzorke s ethanolom je možné vidieť nulové hodnoty QY už na siedmy deň kultivácie, čo značí úhyn kultúry. Nízkym hodnotám QY odpovedajú aj nízke hodnoty koncentrácie metabolitov, zobrazené na grafe vyššie (Obrázok 26).

Tabuľka 14: Hodnoty kvantového výťažku fluorescence pri použití stresových faktorov pre kmeň *Scenedesmus obliquus*

| Doba kultivácie [dni] | QY [-] | | | | |
|-----------------------|----------|---------|----------|------------------|----------|
| | Methanol | Ethanol | Glycerol | Isopropylalkohol | Kontrola |
| 0 | 0,76 | 0,76 | 0,76 | 0,76 | 0,76 |
| 1 | 0,72 | 0,73 | 0,71 | 0,71 | 0,72 |
| 2 | 0,72 | 0,73 | 0,73 | 0,72 | 0,73 |
| 7 | 0,72 | 0 | 0,73 | 0,73 | 0,72 |
| 14 | 0,68 | 0 | 0,56 | 0,7 | 0,7 |

Grafy na obrázku 27 zobrazujú hodnoty optickej hustoty meranej pri 680 a 720 nm. Vzorka s prídavkom ethanolu vykazuje rapidne zníženie OD pri 680 nm, čo odpovedá aj nízkej koncentrácii metabolitov (viď. Obrázok 26), hodnoty merané pri 720 nm ukazujú taktiež pokles, avšak nie taký signifikantny, ako pri 680 nm. Táto hodnota sa zároveň významne nelíši od hodnoty OD (720 nm) nameranej pri kontrolnej vzorke. Možno predpokladať, že úbytok modrého farbiva nebol taký rýchly, ako úbytok zeleného farbiva. Najvyššie hodnoty OD (680 nm) vykazuje vzorka s isopropanolom, pri ktorej bol nárast mierny do 7 dňa a následne od 7. do 14. dňa hodnoty stúpali ešte ostrejšie. Vzhľadom na hodnoty uvedené na grafe vyššie (viď. Obrázok 26) sa prídavok isopropylalkoholu javí ako najvhodnejší pre použitie. Hodnoty pre vzorky s prídavkom methanolu a glycerolu sú takmer identické pre OD (680 nm), pri 720 nm dosahovala vyššie hodnoty vzorka s glycerolom. Taktiež obsah intracelulárnych metabolitov nie je zhodný (viď. Obrázok 26).



Obrázok 27: Graf závislosti optickej hustoty na čase, meranie pri 680 nm (vľavo) a 720 nm (vpravo) pre kmeň *Scenedesmus obliquus*

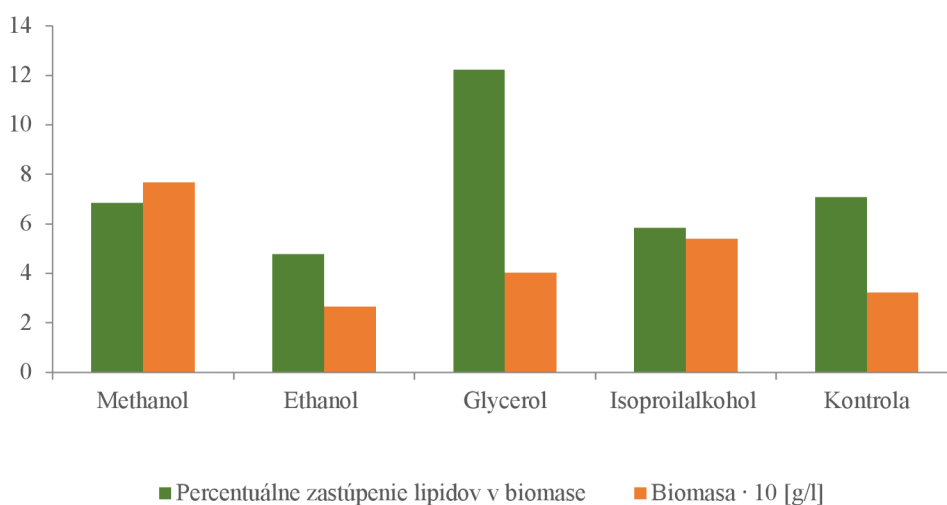
Výsledky HPLC–RI analýzy, použitej pre zistenie koncentrácie alkoholu v kultivačnom médiu, sú uvedené v tabuľke 15. Z výsledkov je zrejmé, že koncentrácia methanolu v médiu ostala nezmenená. Koncentrácia glycerolu a isopropylalkoholu sa po siedmom dni kultivácie v oboch prípadoch mierne znížila, v prípade isopropylalkoholu bol touto skutočnosťou pravdepodobne navýšený aj obsah niektorých intracelulárnych metabolitov (viď. Obrázok 26). V prípade ethanolu ostala jeho koncentrácia v médiu konštantná, avšak došlo k produkcii glycerolu od siedmeho dňa kultivácie. Nakoľko bol obsah intracelulárnych metabolitov veľmi nízky (viď. Obrázok 26) a OD pri 680 nm ukazuje takmer nulové hodnoty (viď. Obrázok 27), mohla byť produkcia glycerolu spôsobená pravdepodobne ochranným mechanizmom riasy.

Tabuľka 15: Výsledky HPLC–RI analýzy pre určenie koncentrácie alkoholu v kultivačnom médiu pre kmeň *Scenedesmus obliquus*

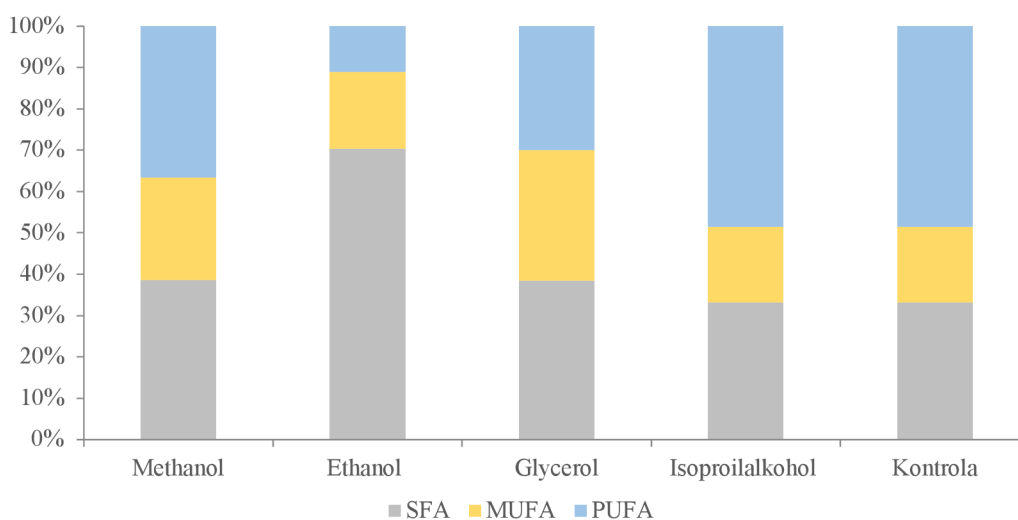
| Pridaný alkohol | Doba kultivácie [dni] | Methanol [g/l] | Ethanol [g/l] | Isopropanol [g/l] | Glycerol [g/l] |
|------------------|-----------------------|----------------|---------------|-------------------|----------------|
| Methanol | 0 | 1,8998 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 5,485 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 5,49 | 0 | 0 | 0 |
| | 7 | 5,478 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ethanol | 0 | 0 | 1,5561 | 0 | 0 |
| | 1 | 0 | 6,157 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 6,167 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 6,173 | 0 | 4,595 |
| | 14 | 0 | 6,175 | 0 | 4,598 |
| Glycerol | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,5914 |
| | 1 | 0 | 0 | 0 | 4,127 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 4,12 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 4,095 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Isopropylalkohol | 0 | 0 | 0 | 0,9052 | 0 |
| | 1 | 0 | 0 | 6,68 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 6,688 | 0 |
| | 7 | 0 | 0 | 6,692 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 6,517 | 0 |
| Kontrola | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Ako z grafu na obrázku 28 vyplýva, najviac biomasy bolo produkovanej vo vzorke, do ktorej bol pridaný methanol, a síce 0,767 g/l. Najmenej biomasy bolo produkovanej pri vzorke s prídavkom ethanolu, čo koreluje s predchádzajúcimi zisteniami, a teda s postupným úhynom kultúry. V porovnaní so vzorkami s methanolom, glycerolom a isopropanolom bolo v kontrolnej vzorke produkované menšie množstvo biomasy a to 0,323 g/l. Najvyššie zastúpenie lipidov obsahovala vzorka s prídavkom glycerolu a to až 12,2 %.

Profil zastúpenia mastných kyselín (viď. Obrázok 29) ukazuje, že vo vzorke s ethanolom boli najviac zastúpené SFA a to až 70,41 %. Pre vzorky s isopropylalkoholom a kontrolnú vzorku vidíme totožné zastúpenie PUFA a to 48,5 %, MUFA 17,8 % a aj SFA a to 33,1 %. Pre vzorku s glycerolom je možné vidieť navýšenie MUFA na 31,5 % na úkor PUFA. Rovnaký trend je pozorovaný pre vzorku s methanolom, kde zastúpenie MUFA tvorí 24,8 %.



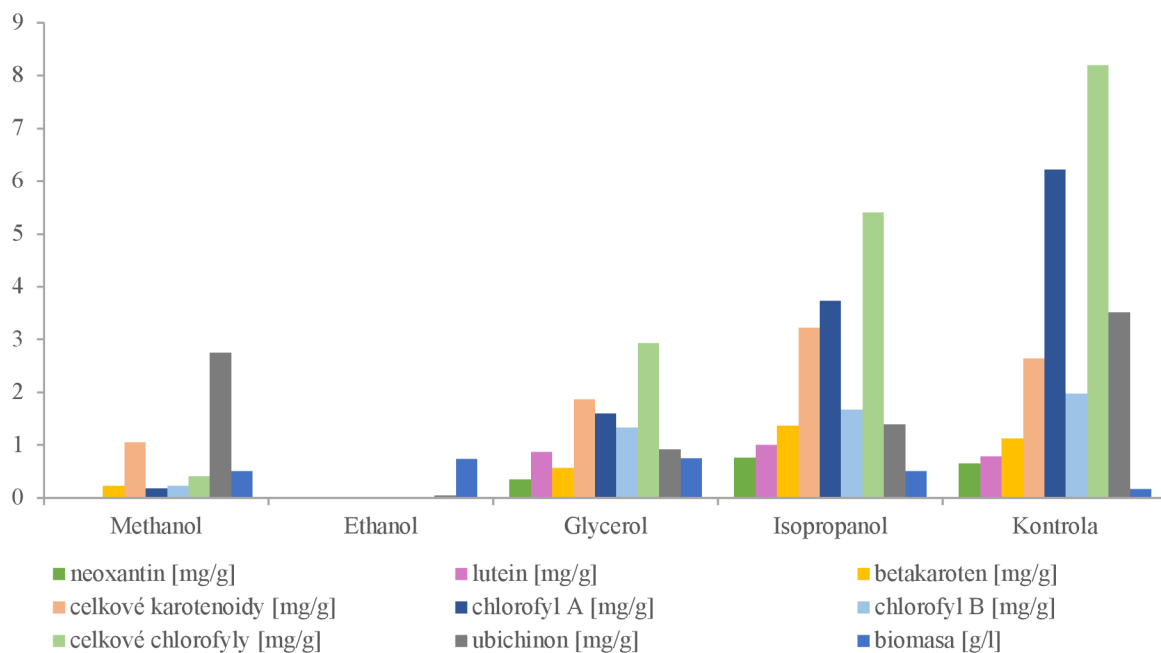
Obrázok 28: Produkcia biomasy a percentuálne zastúpenie lipidov v závislosti na pridaný alkohol ako chemický stres pri kultivácii kmeňa *Scenedesmus obliquus*



Obrázok 29: Zloženie lipidov v biomase pri kultivácii kmeňa *Scenedesmus obliquus* v BBM médiu pri prídavku alkoholu ako stresového faktora

5.1.6 *Desmodesmus velitaris* CCALA 468

Graf na obrázku 30 zobrazuje závislosť produkcie metabolitov v závislosti na použitom alkohole ako stresovom faktore. Z grafu je zrejmé, že produkcia bola najvyššia pri kontrolnej vzorke bez prídania alkoholu. Naopak najmenšia, takmer žiadna, produkcia, bola pri vzorke s prídavkom ethanolu. Túto skutočnosť kopíruje aj postupné znižovanie hodnoty QY (Tabuľka 16), ktoré znázorňuje nie úplne ideálne podmienky pre riasovú kultúru a ubýtok jej vitality. Druhé najmenšie hodnoty dosahuje vzorka s prídavkom methanolu. Aj keď je väčšina hodnôt veľmi nízka, hodnota ubichinónu je výrazne vyššia, a to až 2,75 mg/g suchej biomasy. V porovnaní s kontrolnou vzorkou je táto hodnota ale nižšia, nakoľko hodnoty ubychinónu pri kontrolnej vzorke dosahovali až 3,52 mg/g biomasy. Navýšenie oproti kontrolnej vzorke je vidieť v jedinom prípade a to v prípade karotenoidov pri vzorke s prídavkom isopropylalkoholu, kedy celkové karotenoidy tvorili 3,22 mg/g biomasy, z toho betakarotén 1,37 mg/g biomasy. Pre porovnanie hodnoty karotenoidov v kontrolnej vzorke tvorili 2,64 mg/g biomasy, z toho betakarotén 1,29 mg/gbiomasy. Hodnoty QY ostali pre všetky vzorky, s výnimkou ethanolu takmer nezmenené.

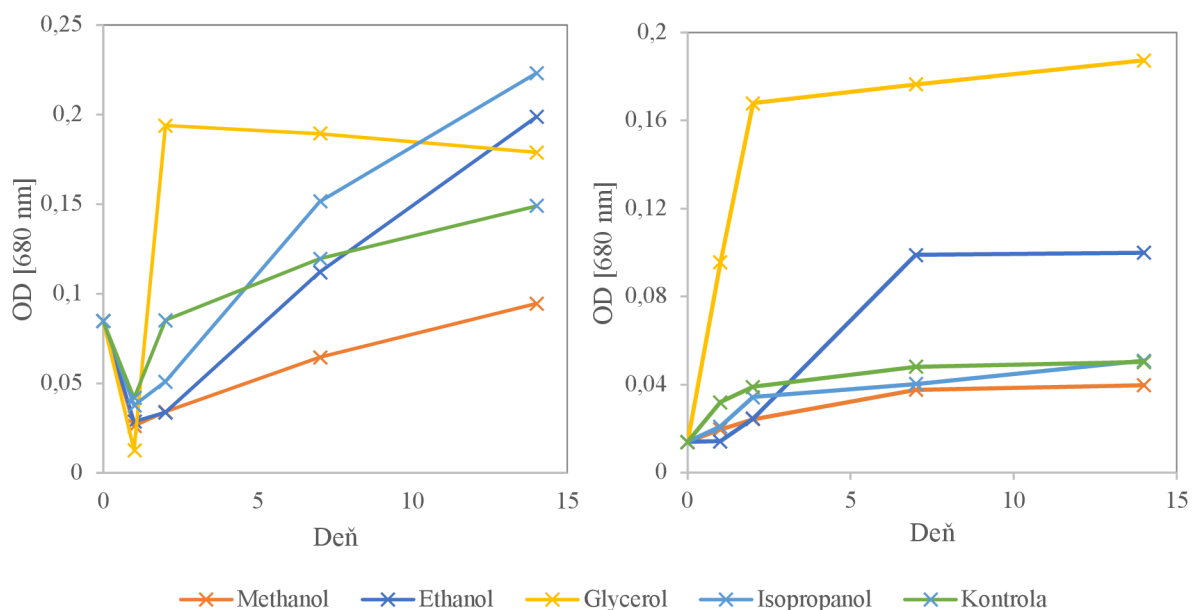


Obrázok 30: Graf závislosti produkcie lipidických metabolitov v závislosti na použitom alkohole pre *Desmodesmus velitaris*

Tabuľka 16: Hodnoty kvantového výťažku fluorescence pri použití stresových faktorov pre kmeň *Desmodesmus velitaris*

| Doba kuldivácie [dni] | QY [-] | | | | |
|-----------------------------|----------|---------|----------|------------------|----------|
| | Methanol | Ethanol | Glycerol | Isopropylalkohol | Kontrola |
| 0 | 0,67 | 0,67 | 0,67 | 0,67 | 0,67 |
| 1 | 0,68 | 0,7 | 0,71 | 0,67 | 0,67 |
| 2 | 0,68 | 0,69 | 0,69 | 0,67 | 0,67 |
| 7 | 0,68 | 0,62 | 0,62 | 0,67 | 0,67 |
| 14 | 0,67 | 0,51 | 0,61 | 0,67 | 0,66 |

Hodnoty OD namerané pri 680 a 720 nm sú zobrazené v grafoch na obrázku 31. Najvyšší počiatkový nárast OD pri 680 nm vykazuje vzorka s prídavkom glycerolu, avšak po druhom dni od pridania alkoholu začala táto hodnota klesať. Rovnaká vzorka dosahovala pri OD meranom pri 720 nm najvyššie hodnoty, oveľa vyššie ako zvyšné analyzované vzorky. Táto vysoká hodnota značí buď prítomnosť fykocyanínu alebo veľký nárast buniek. Najnižšie hodnoty namerané pri oboch vlnových dĺžkach dosahuje vzorka s prídavkom methanolu. Vzorka s prídavkom ethanolu aj napriek znižujúcemu sa QY a nízkemu obsahu metabolitov dosahovala vysoké hodnoty OD.



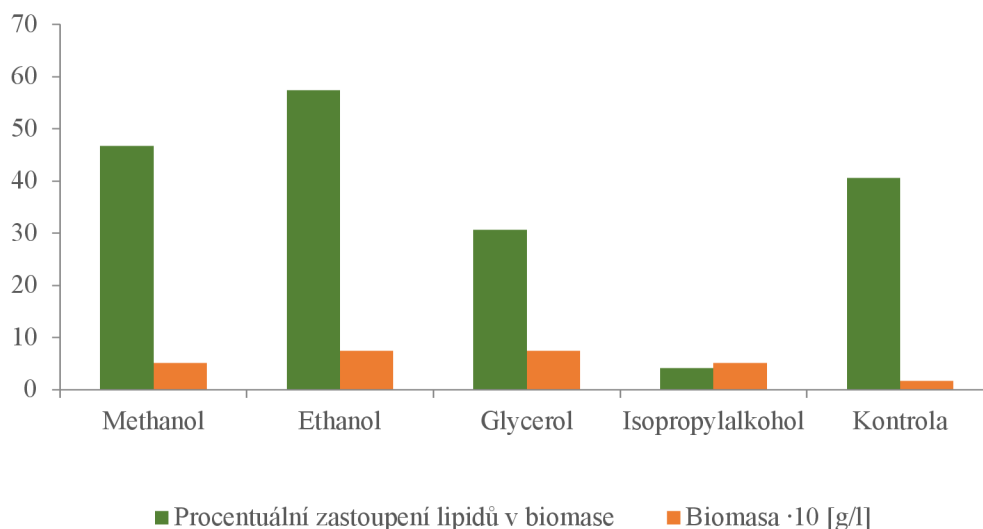
Obrázok 31: Graf závislosti optickej hustoty na čase, meranie pri 680 nm (vľavo) a 720 nm (vpravo) pre kmeň *Scenedesmus pseudoarmatus*

Tabuľka 17 znázorňuje výsledky HPLC–RI analýzy. Z výsledkov vyplýva, že vo všetkých prípadoch bol alkohol z média odbúravaný až na nulovú koncentráciu. Pre methanol a isopropanol sa pridaný alkohol v médiu nenachádzal už na siedmy deň kultivácie. Pre ethanol a glycerol nastala nulová koncentrácia na 14. deň. Avšak, aj keď bol alkohol utilizovaný, v médiu sa pri všetkých vzorkách vyskytuje prítomnosť ethanolu. Nakoľko sa ethanol vyskytuje aj pri kontrolnej vzorke, je možné predpokladať, že je riasov produkovaný v niektorom z jej metabolických cyklov ako vedľajší produkt.

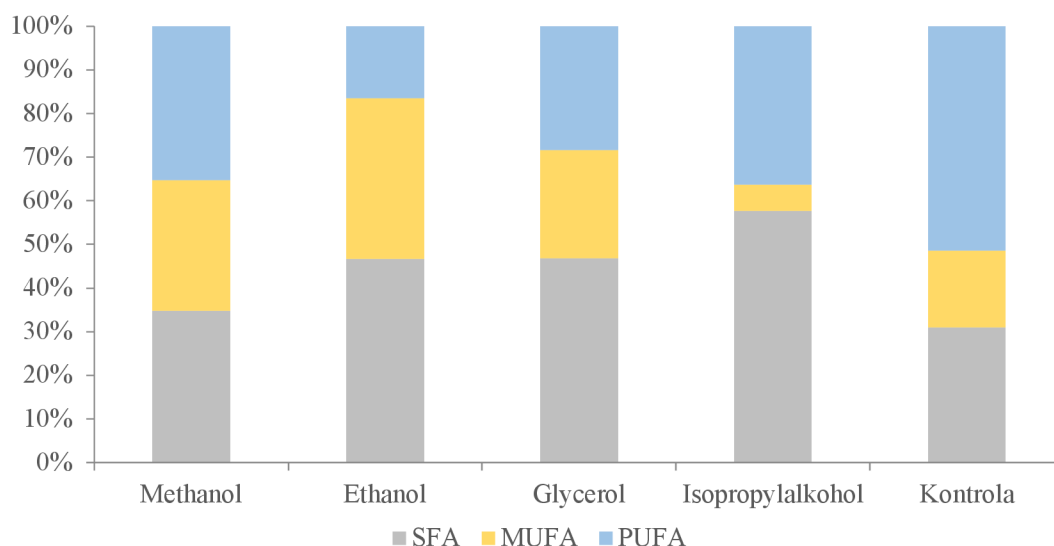
Tabuľka 17: Výsledky HPLC–RI analýzy pre určenie koncentrácie alkoholu v kultivačnom médiu pre kmeň *Desmodesmus velitaris*

| Pridaný alkohol | Doba kultivácie [dni] | Methanol [g/l] | Ethanol [g/l] | Isopropanol [g/l] | Glycerol [g/l] |
|------------------|-----------------------|----------------|---------------|-------------------|----------------|
| Methanol | 0 | 1,8998 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 5,462 | 6,132 | 0 | 0 |
| | 2 | 5,462 | 6,133 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ethanol | 0 | 0 | 1,5561 | 0 | 0 |
| | 1 | 0 | 6,133 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 6,137 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 6,138 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Glycerol | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,5914 |
| | 1 | 0 | 6,15 | 0 | 4,083 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 4,082 |
| | 7 | 0 | 6,128 | 0 | 4,07 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Isopropy/alkohol | 0 | 0 | 0 | 0,9052 | 0 |
| | 1 | 0 | 6,205 | 6,807 | 0 |
| | 2 | 0 | 6,167 | 6,758 | 0 |
| | 7 | 0 | 6,16 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kontrola | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 0 | 6,158 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 6,167 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 6,16 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Graf na obrázku 32 ukazuje, že najnižšia produkcia biomasy bola pri kontrolnej vzorke, naopak najvyššia bola pri vzorke s prídavkom glycerolu. Takmer totožne vysoká bola pri vzorke s prídavkom ethanolu, avšak koncentrácia intracelulárnych metabolitov (viď. Obrázok 30) že tento alkohol mal negatívny vplyv na kultúru a produkcia sledovaných metabolitov bola prakticky mizivá. Profil mastných kyselín je pri každej vzorke veľmi rozdielny, pri vzorke s isopropylalkoholom dominuje zastúpenie SFA (58 %) a zaostáva produkcia MUFA (6 %), naopak pri kontrolnej vzorke dominuje zastúpenie PUFA 52 %. Najvyššie zastúpenie MUFA sa nachádza pri vzorke s ethanolom (37 %), kde je naopak zo všetkých vzoriek najmenšie zastúpenie PUFA (16,5 %).



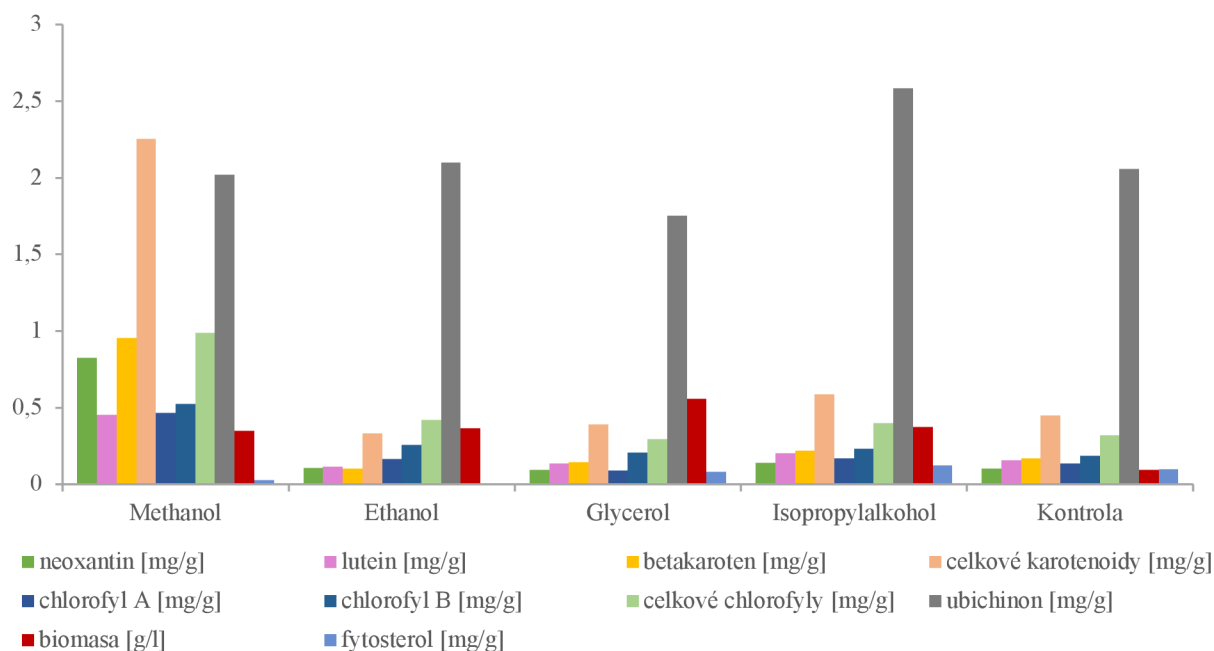
Obrázok 32: Produkcia biomasy a percentuálne zastúpenie lipidov v závislosti na pridaný alkohol ako chemický stres pri kultivácii kmeňa *Desmodesmus velitaris*



Obrázok 33: Zloženie lipidov v biomase pri kultivácii kmeňa *Desmodesmus velitaris* v BBM médiu pri prídavku alkoholu ako stresového faktora

5.1.7 *Scenedesmus pseudoarmatus* CCALA 462

Z grafu na obrázku 34 je zrejme, že najvyššie hodnoty dosahuje vzorka kultivovaná s prídavkom methanolu. Všetky hodnoty, s výnimkou fytosterolu, sú vyššie ako pri kontrolnej vzorke. Výraznou hodnotou je obsah celkových karotenoidov, ktorý tvorí až 4,51 mg/g biomasy. Táto hodnota je o 80 % vyššia ako hodnota celkových karotenoidov v kontrolnej vzorke. 1,9 mg/g biomasy z celkových karotenoidov tvorí betakarotén. Výborné výsledky v tejto vzorke dosahujú aj iné metabolity, napríklad neoxantín (1,65 mg/g biomasy), luteín (0,91 mg/g biomasy) a chlorofyly, ktorých celkový obsah je až 1,98 mg/g biomasy. V tejto vzorke má klesajúcu tendenciu iba fytosterol. Pri kmeni *Scenedesmus pseudoarmatus* je tiež možné pozorovať vysoké hodnoty ubichinónu, ktoré významne prevyšujú hodnoty všetkých ostatných metabolitov. Najvyššiu hodnotu ubichinónu (5,16 mg/g biomasy) dosahuje vzorka s prídavkom isorpopylalkoholu, zároveň je v tejto vzorke navýšenie celkových karotenoidov o 23 % oproti kontrolnej vzorke. Priaznivé výsledky pre všetky vzorky sú v súlade s výsledkami meranie QY (Tabuľka 18), ktoré ukazujú, že všetky vzorky naberali hodnoty od 0,5 do 1, čo vypovedá o tom, že vitalita kultúry bola vo všetkých prípadoch dobrá.

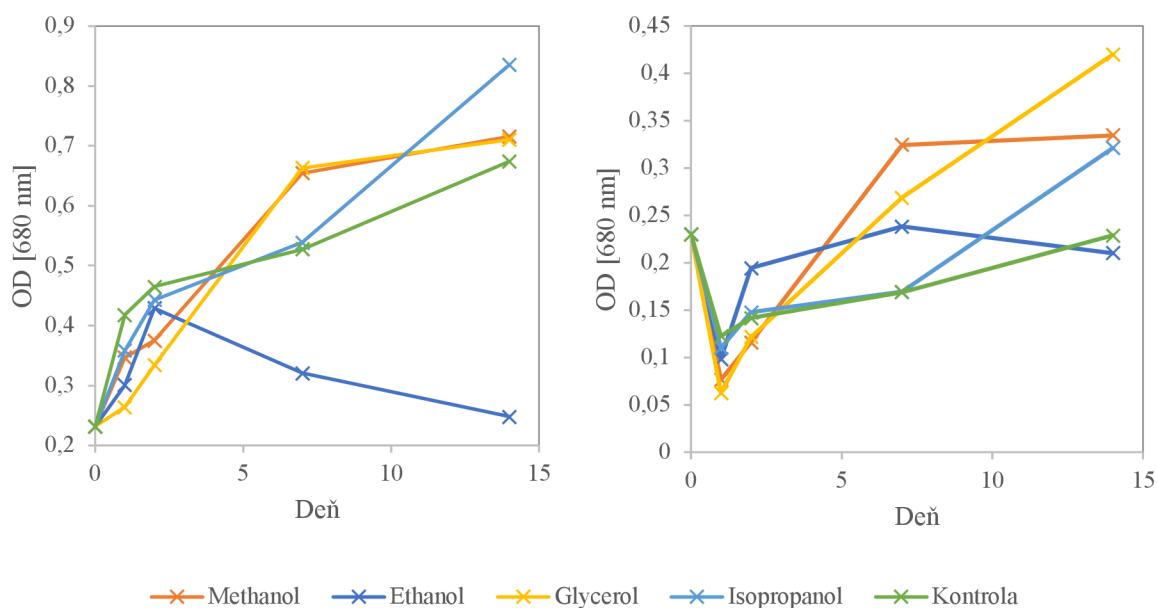


Obrázok 34: Graf závislosti produkcie lipidických metabolitov v závislosti na použítom alkohole pre *Scenedesmus pseudoarmatus*

Tabuľka 18: Hodnoty kvantového výťažku fluorescence pri použití stresových faktorov pre kmeň *Scenedesmus pseudoarmatus*

| Doba kuldivácie [dni] | QY [-] | | | | |
|-----------------------------|----------|---------|----------|------------------|----------|
| | Methanol | Ethanol | Glycerol | Isopropylalkohol | Kontrola |
| 0 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 |
| 1 | 0,7 | 0,69 | 0,6 | 0,69 | 0,71 |
| 2 | 0,69 | 0,67 | 0,53 | 0,68 | 0,71 |
| 7 | 0,66 | 0,66 | 0,59 | 0,67 | 0,72 |
| 14 | 0,67 | 0,67 | 0,56 | 0,67 | 0,71 |

Z grafov na Obrázok 35 je zrejme, že vzorka s prídavkom ethanolu dosahovala najnižšie hodnoty pri oboch meraniach, ako pri 680 nm, tak aj pri 720 nm. Pri meraní pri 720 nm je možné pozorovať prvotné zníženie OD pre všetky vzorky, v ďalších dňoch po zaočkovaní však OD začalo narastať. S výnimkou vzorky s ethanolom dosahovali všetky vzorky vyššie hodnoty ako kontrolná vzorka a to pri meraniach pre obe vlnové dĺžky. Alkohol teda podporil rast riasovej kultúry, čo sa prejavilo zvýšením optickej hustoty. Tento fakt je potvrdený aj v grafe nižšie (viď. Obrázok 36).



Obrázok 35: Graf závislosti optickej hustoty na čase, meranie pri 680 nm (vľavo) a 720 nm (vpravo) pre kmeň *Scenedesmus pseudoarmatus*

Pre zistenie koncentrácie alkoholu v kultivačnom médiu bola použitá HPLC–RI analýza, ktorej výsledky sú uvedené v Tabuľka 19. Z tabuľky je zrejme, že vo všetkých vzorkách, aj v kontrolnej vzorke, sa nachádza v médiu prítomnosť ethanolu (hodnoty zvýraznené červene). Nakoľko ethanol v prípade vzorky s methanolom, glycerolom, isopropylalkoholom a do kontrolnej vzorky do média pridávaný nebol, bol tento alkohol pravdepodobne produktom

niektorého z metabolických cyklov použitého kmeňa riasy. Pri všetkých vzorkách je zároveň možné pozorovať úbytok alkoholu z kultivačného média v priebehu kultivácie, takže tento kmeň všetky z použitých alkoholov utilizoval a použil ako heterotrofný spôsob výživy.

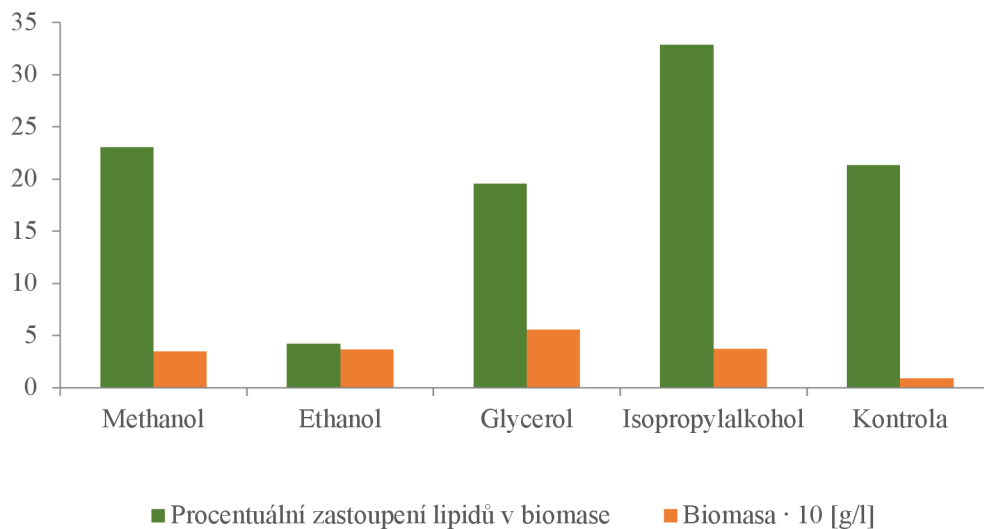
Tabuľka 19: Výsledky HPLC–RI analýzy pre určenie koncentrácie alkoholu v kultivačnom médiu pre kmeň *Scenedesmus pseudoarmatus*

| Pridaný alkohol | Doba kultivácie [dni] | Methanol [g/l] | Ethanol [g/l] | Isopropanol [g/l] | Glycerol [g/l] |
|------------------|-----------------------|----------------|---------------|-------------------|----------------|
| Methanol | 0 | 1,8998 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 5,4 | 6,028 | 0 | 0 |
| | 2 | 5,397 | 6,035 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 6,04 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ethanol | 0 | 0 | 1,5561 | 0 | 0 |
| | 1 | 0 | 6,033 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 6,043 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 6,033 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Glycerol | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,5914 |
| | 1 | 0 | 6,068 | 0 | 4,092 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 4,085 |
| | 7 | 0 | 6,033 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Isopropylalkohol | 0 | 0 | 0 | 0,9052 | 0 |
| | 1 | 0 | 6,045 | 6,593 | 0 |
| | 2 | 0 | 6,048 | 6,595 | 0 |
| | 7 | 0 | 6,037 | 6,56 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kontrola | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 0 | 6,063 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 6,053 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 6,045 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |

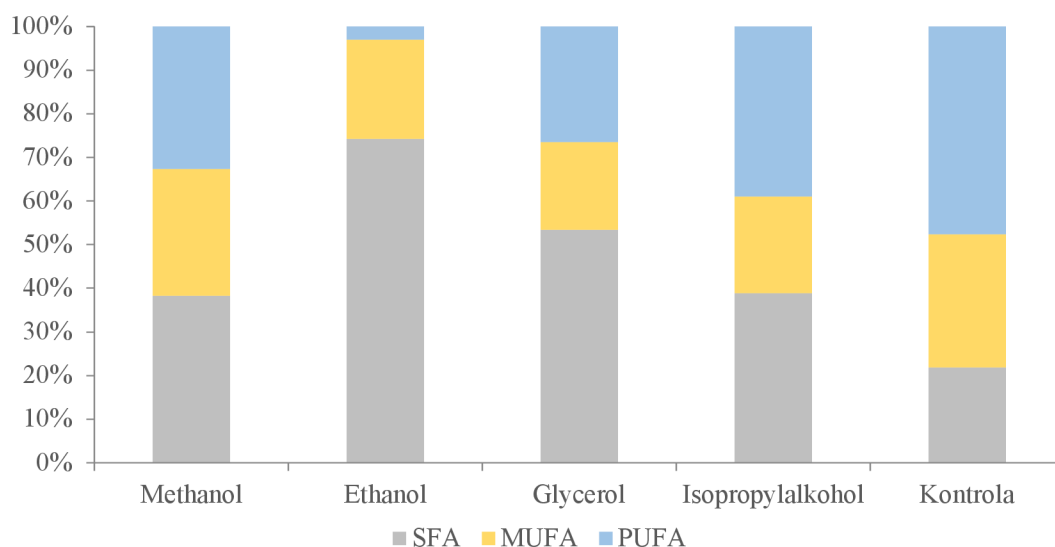
Z grafu na obrázku 36 vyplýva, že najviac biomasy bolo produkovanej pri vzorke s prídavkom glycerolu, a to až 0,56 g/l. Naopak najmenej biomasy bolo produkovanej pri kontrolnej vzorke (0,091 g/l), z čoho vyplýva, že prídanie alkoholu, ako stresového faktora, bolo pre riasu priaznivé. Z toho istého grafu vyplýva, že najvyššie percentuálne zastúpenie lipidov obsahovala vzorka s prídavkom isopropylalkoholu a to 32,9 %. Najmenšie zastúpenie

lipidov a tiež veľmi nízku produkciu biomasy mala vzorka s prídavkom ethanolu, čo odpovedá aj predošlým zisteniam o postupnom úhyne kultúry.

Čo sa profilu mastných kyselín týka, všetky vzorky sa výrazne líšili od kontrolnej vzorky (viď. Obrázok 37). Platí, že všetky vzorky mali oproti kontrole vyššiu hodnotu SFA a nižšiu hodnotu PUFA. V kontrolnej vzorke teda dominuje PUFA s 48 %, obsah MUFA je 30,7 % a obsah SFA 22%. Pri vzorke s metanolom boli v predchádzajúcich výsledkoch zobrazené priaznivé výsledky, kedy je produkcia intracelulárnych metabolitov vyššia ako pri kontrolnej vzorke. Pri jej profile mastných kyselín sa líši len nevýrazne s hodnotami PUFA 32 %, MUFA 35 % a SFA 46 %.



Obrázok 36: Produkcia biomasy a percentuálne zastúpenie lipidov v závislosti na pridaný alkohol ako chemický stres pri kultivácii kmeňa *Scenedesmus pseudoarmatus*

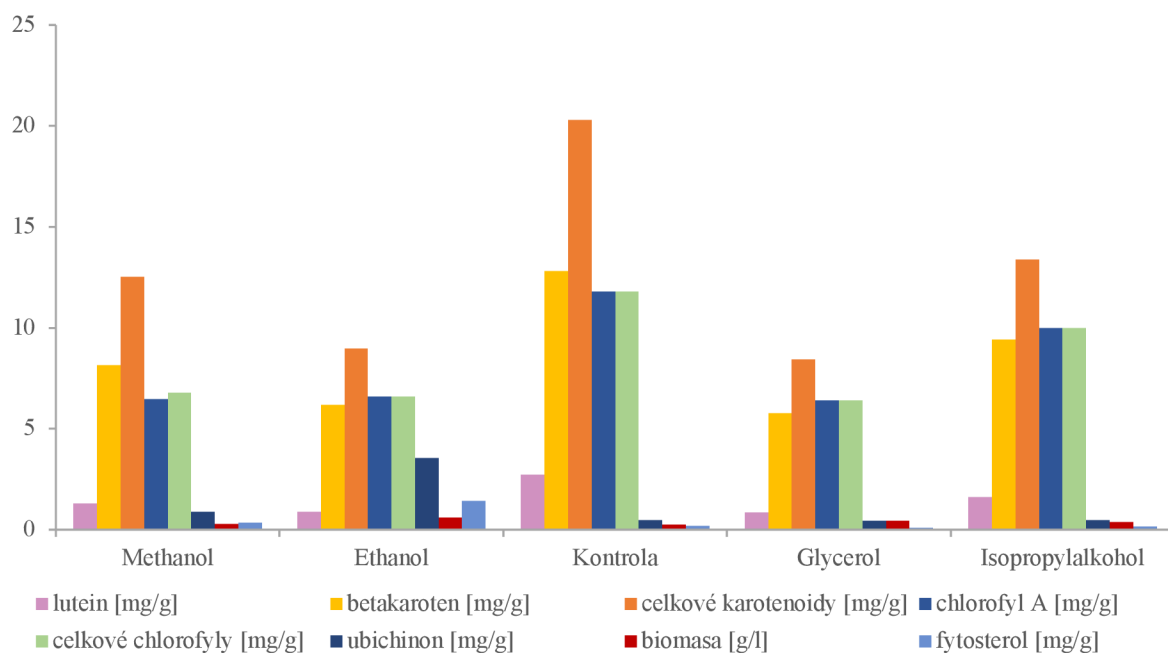


Obrázok 37: Zloženie lipidov v biomase pri kultivácii kmeňa *Scenedesmus pseudoarmatus* v BBM médiu pri prídavku alkoholu ako stresového faktora

5.1.8 *Synechococcus bigranulatus* CCALA 187

Pre porovnanie bol s vybranými mikroriasami rodu *Scenedesmus* a *Desmodesmus* kultivovaný aj jeden kmeň siníc, a síce sinica *Synechococcus bigraulatus*. Sinica, podobne ako riasy, bola kultivovaná na BBM médiu, do ktorého bol pridaný 50% roztok alkoholu v množstve 0,5 ml. Výsledky analýzy prevedenej pomocou HPLC–DAD sú uvedené v grafe na obrázku 38. Z grafu vyplýva, že sa síce v stresových podmienkach všetkým vzorkám darilo, avšak produkcia intracelulárnych metabolitov bola najvyššia pri kontrolnej vzorke. Vo všetkých vzorkách absentoval chlorofyl *b*, produkcia karoténov bola u všetkých vyššia ako produkcia chlorofylu. Najvyššie hodnoty celkových betakaroténov dosahuje kontrolná vzorka, kde karotenoidy činili 20,28 mg/g suchej biomasy, z čoho betakarotén tvoril 12,82 mg/g biomasy. Pre porovnanie chlorofyl *a* tvoril v kontrolnej vzorke 11,79 mg/g biomasy. Stále vysoké hodnoty vykazujú aj vzorky s prídavkom methanolu a isopropylalkoholu, kde celkové karotenoidy tvorili 13,38 mg/g biomasy (isopropylalkohol) a 12,53 mg/g biomasy (methanol). Určite zaujímavé je spomenúť vzorku s prídavkom ethanolu, kde je produkcia metabolitov síce nižšia, avšak v porovnaní so zvyšnými vzorkami pri kmeni *Synechococcus bigramulatusi* dosahuje táto vzorka výrazne navýšené hodnoty ubichinónu a fytosterolu. Ubichinón tvorí 3,64 mg/g biomasy, čo predstavuje rozdiel s kontrolnou vzorkou až 87 %, Hodnota fytosterolu je 1,41 mg/g biomasy, zatiaľ čo v kontrolnej vzorke len 0,17 mg/g biomasy, čo je rozdiel 88 %.

Vo vzorkách bolo po celú dobu kultivácie merané QY, výsledky sú uvedené v tabuľke 20. Oproti riasovým kultúram sú hodnoty nižšie, táto skutočnosť je opísaná v kapitole 2.4.2. Hodnoty QY pre vitálnu kultúru sú v intervale od 0,2 do 0,5, čo platí pre všetky vzorky. Možno dokonca pozorovať nárast hodnôt QY pri vzorkách s prídavkom glycerolu, pre zvyšné vzorky nie sú pozorované výraznejšie zmeny.

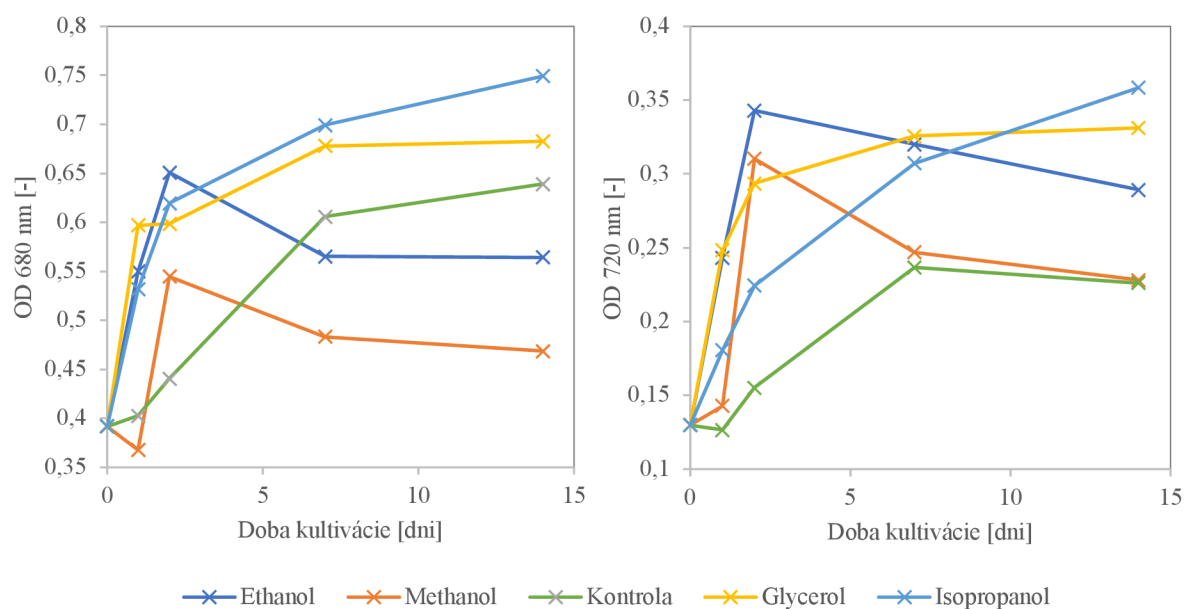


Obrázok 38: Graf závislosti produkcie lipidických metabolitov v závislosti na použítom alkohole pre *Synechococcus bigraulatus*

Tabuľka 20: Hodnoty kvantového výťažku fluorescence pri použití stresových faktorov pre kmeň *Synechococcus bigranulatus*

| Doba kultivácie [dni] | QY [-] | | | | |
|-----------------------|----------|---------|----------|------------------|----------|
| | Methanol | Ethanol | Glycerol | Isopropylalkohol | Kontrola |
| 0 | 0,28 | 0,28 | 0,28 | 0,28 | 0,28 |
| 1 | 0,3 | 0,29 | 0,4 | 0,31 | 0,29 |
| 2 | 0,31 | 0,25 | 0,4 | 0,39 | 0,29 |
| 7 | 0,3 | 0,28 | 0,41 | 0,33 | 0,31 |
| 14 | 0,31 | 0,26 | 0,41 | 0,36 | 0,28 |

Bolo prevedené meranie OD pri 680 nm a 720 nm, výsledky merania sú uvedené v grafoch na obrázku 39. Oproti riasovým kultúram bol predpokladaný výskyt modrého farbiva - fykocynínu, a teda meranie pri 720 nm malo mať rastúcu tendenciu. Rastúca tendencia sa potvrdila pri kontrolnej vzorke a vzorkách s glycerolom a isopropylalkoholom. Pre vzorky s ethanolom a metanolom nastal v prvých dňoch kultivácie prudký nárast OD, avšak v ďalších dňoch začalo OD klesať, takže možno predpokladať, že farbív začalo ubývať. Pri týchto vzorkách došlo aj k poklesu OD meraného pri 680 nm. Pri oboch vzorkách je viditeľný aj pokles chlorofylu v porovnaní s kontrolnou vzorkou (viď. Obrázok 38) a pri vzorke s ethanolom aj pokles QY (Tabuľka 20). Pre zvyšné vzorky pokračuje nárast OD aj pri 680 nm, najvyššie hodnoty pri oboch meraniach dosahuje kultúra s prídavkom isopropylalkoholu.



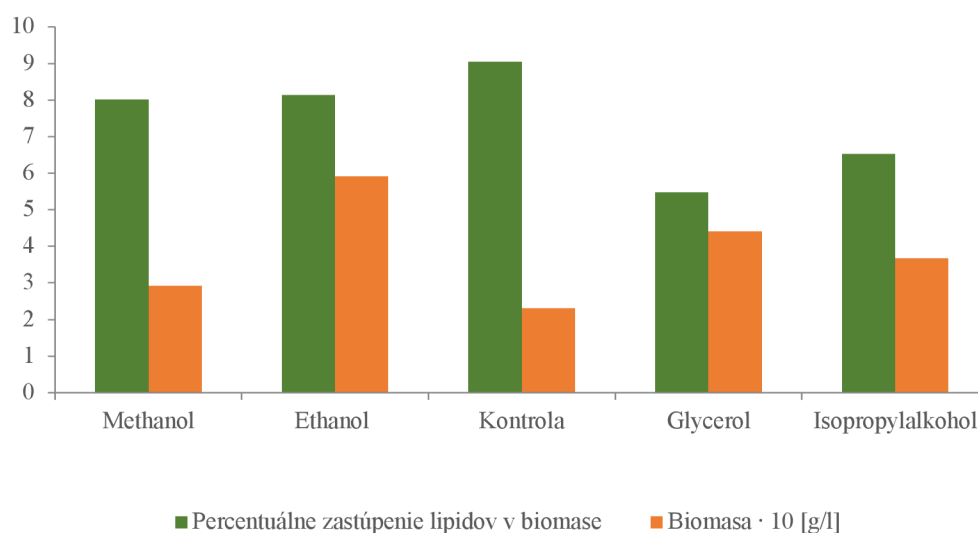
Obrázok 39: Graf závislosti optickej hustoty na čase, meranie pri 680 nm (vľavo) a 720 nm (vpravo) pre kmeň *Synechococcus bigranulatus*

Aj keď OD pri 680 nm aj 720 nm dosahovalo najvyššie hodnoty pri vzorke s isopropylalkoholom, analýza pomocou HPLC–RI (Tabuľka 21) ukázala, že alkohol nebol utilizovaný, jeho koncentrácia v médiu ostala takmer nezmenená, a teda pôsobil len ako stresový faktor. To isté platí pre vzorku s glycerolom. Avšak, analýza preukázala, že ethanol bol kultúrou utilizovaný po 2. dni kultivácie. Zaujímavé su pri vzorke s prídavkom methanolu výsledky obsahu glycerolu v médiu, kedy na počiatku bol pridaný iba methanol, ktorý sa na v médiu nenachádzal už na druhý deň od jeho pridania ku kultúre, ale namiesto ethanolu sa začal vyskytovať glycerol. Možno predpokladať, že methanol bol riasou spotrebovaný a metabolickým procesom vznikol glycerol. Ako je vidieť aj na grafe s hodnotami OD (Obrázok 39), glycerol pre kultúru nebol nepriaznivý.

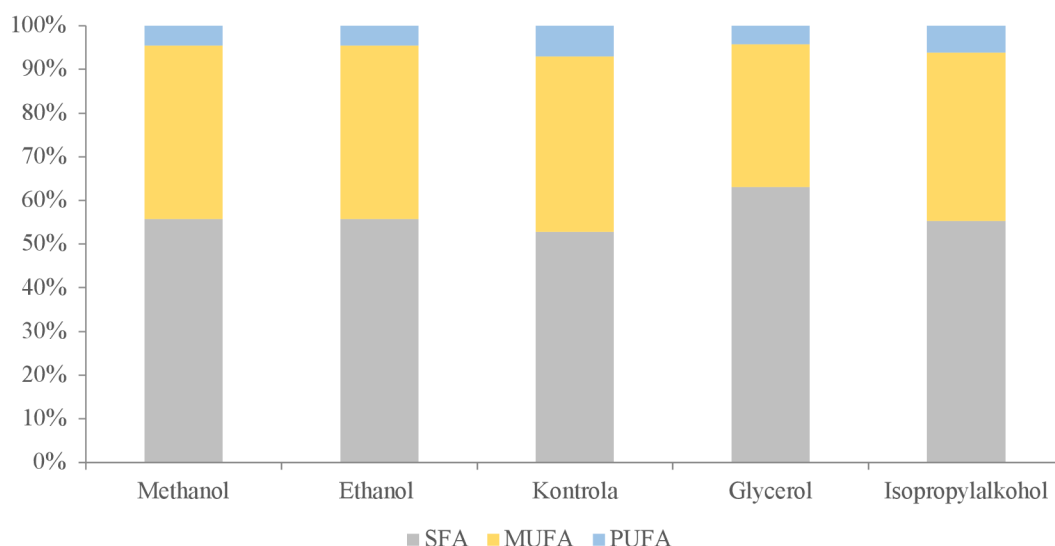
Tabuľka 21: Výsledky HPLC – RI analýzy pre určenie koncentrácie alkoholu v kultivačnom médiu pre kmeň *Synechococcus bigramulatus*

| Pridaný alkohol | Doba kultivácie [dni] | Methanol [g/l] | Ethanol [g/l] | Isopropanol [g/l] | Glycerol [g/l] |
|------------------|-----------------------|----------------|---------------|-------------------|----------------|
| Methanol | 0 | 1,8998 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 5,625 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 4,34 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 4,345 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 4,345 |
| Ethanol | 0 | 0 | 6,308 | 0 | 0 |
| | 1 | 0 | 6,315 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 6,318 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Glycerol | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,5914 |
| | 1 | 0 | 6,24 | 0 | 4,16 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 4,172 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 4,167 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 4,162 |
| Isopropylalkohol | 0 | 0 | 0 | 0,9052 | 0 |
| | 1 | 0 | 6,25 | 6,828 | 0 |
| | 2 | 0 | | 6,765 | 0 |
| | 7 | 0 | 0 | 6,585 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 6,588 | 0 |
| Kontrola | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Analýza pomocou GC ukázala údaje o produkcii biomasy a zastúpení lipidov v nej (Obrázok 40) a tiež zloženie lipidov (Obrázok 41). Z grafu je vidieť, že produkcia biomasy bola najvyššia (0,592 g/l) vo vzorke ethanolom, čo logicky vyplýva aj zo zistenia vyššie, a teda že ethanol bol riasou utilizovaný a použitý ako heterotrofný spôsob výživy. Druhá najvyššia hodnota sa vyskytuje pri vzorke s glycerolom (0,44 g/l), pri glycerole bolo taktiež preukázané, že je riasou tolerovaný. Najnižšiu produkciu biomasy vykazuje kontrolná vzorka, pri ktorej je zároveň najvyššie percentuálne zastúpenie lipidov a to 9 %. Najnižšie zastúpenie lipidov ukazuje vzorka s prídavkom glycerolu, kde lipidy tvoria iba 5,5 %. Pri pohľade na graf prezentujúci zloženie lipidov (viď. Obrázok 41) je zrejmé, že najnižšie zastúpenie majú PUFA, naopak najvyššie zastúpenie má SFA. Tento trend sa opakuje pri všetkých vzorkách. Najviac zastúpené sú SFA pri vzorke s glycerolovým prídavkom, kde tvoria až 63 %, najmenej zastúpené pri kontrolnej vzorke (52,9 %). Pri kontrolnej vzorke je zároveň najvyššie zastúpenie PUFA a o 7 %. Zastúpenie MUFA je najnižšie pri vzorke s glycerolom, a síce 23,6 %, pri ostatných vzorkách je zastúpenie MUFA takmer zhodné.



Obrázok 40: Produkcia biomasy a percentuálne zastúpenie lipidov v závislosti na pridaný alkohol ako chemický stres pri kultivácii kmeňa *Synechococcus bigranulatus*



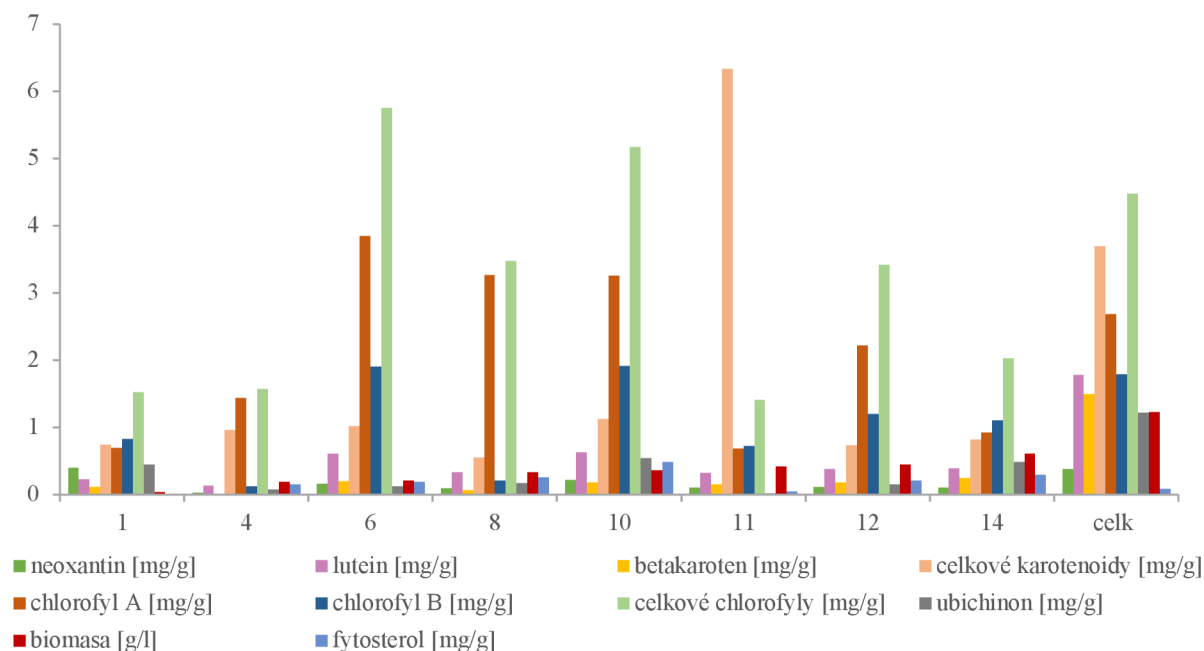
Obrázok 41: Zloženie lipidov v biomase pri kultivácii kmeňa *Synechococcus bigranulatus* v BBM médiu pri prídavku alkoholu ako stresového faktora

5.2 Fermentorova kultivácia *Scenedesmus obliquus*

Výsledky chromatografickej metódy pre stanovenie intracelulárnych metabolitov – karotenoidov, chlorofylov, sterolov – je možné vidieť na grafe zobrazenom na Obrázok 42. V grafe je možné pozorovať priaznivý vplyv glycerolu na produkciu intracelulárnych metabolitov, nakoľko sa po piatom dni, a teda po pridaní glycerolu, zvýšil obsah metabolitov vo vzorke.

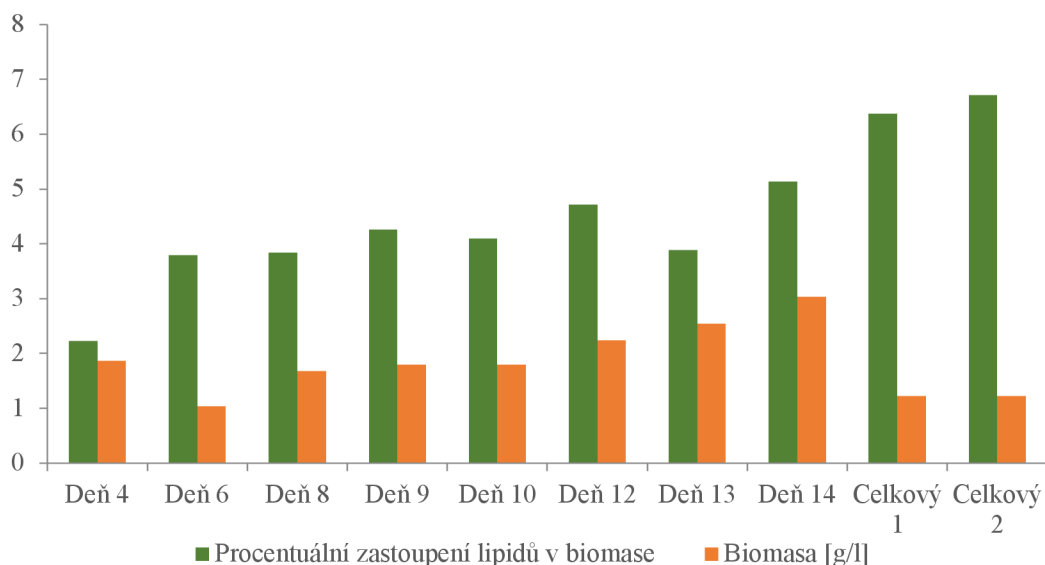
Na grafe na obrázku 42 je možné pozorovať zvýšenie obsahu intracelulárnych metabolitov po pridaní 10 ml glycerolu na piaty deň kultivácie. Obzvlášť výrazné je zvýšenie obsahu chlorofylov, ktoré na šiesty deň kultivácie tvorili až 5,75 mg/g suchej biomasy, z toho chlorofyl *a* 3,85 mg/g biomasy a chlorofyl *b* 1,9 mg/g biomasy. Pre porovnanie obsah celkových chlorofylov v štvrtý deň kultivácie (deň pred pridaním glycerolu) tvoril iba 1,57 mg/g biomasy, čiže nárast bol 72,7%. Taktiež výrazný je nárast luteínu, ktorý bol na 4. deň kultivácie iba 0,13 mg/g biomasy a na 6. deň kultivácie až 0,6 mg/g biomasy. Na 11. deň možno pozorovať výrazný nárast β -karoténu, ktorý tvoril 6,34 mg/g suchej biomasy, avšak na 12. deň, po pridaní isopropylalkoholu bol jeho obsah nižší. Pri pridaní isopropylalkoholu bolo pozorované prvotné zníženie produkcie intracelulárnych metabolitov, avšak v ďalších dňoch bol pozorovaný postupný nárast.

Výsledné hodnoty intracelulárnych metabolitov pri fermentorovej kultivácii s použitím dvoch rôznych alkoholov sú priaznivé, možno pozorovať vysoký obsah celkových karotenoidov, až 3,69 mg/g biomasy, z čoho β -karotén tvoril 1,5 mg/g biomasy a luteín až 1,78 mg/g biomasy. Taktiež vysoká je aj produkcia celkových chlorofylov, až 4,48 mg/g biomasy, z čoho chlorofyl *a* tvoril 2,69 mg/g biomasy a chlorofyl *b* tvoril 1,79 mg/g biomasy. Taktiež vysoký je aj obsah ubichinónu, a to 1,22 mg/g biomasy. Priaznivý vývoj fermentorovej kultivácie s pridaním týchto dvoch alkoholov súhlasí so zisteniami uvedenými v kapitole 5.1.5 pri experimentoch v Erlenmayerových bankách.



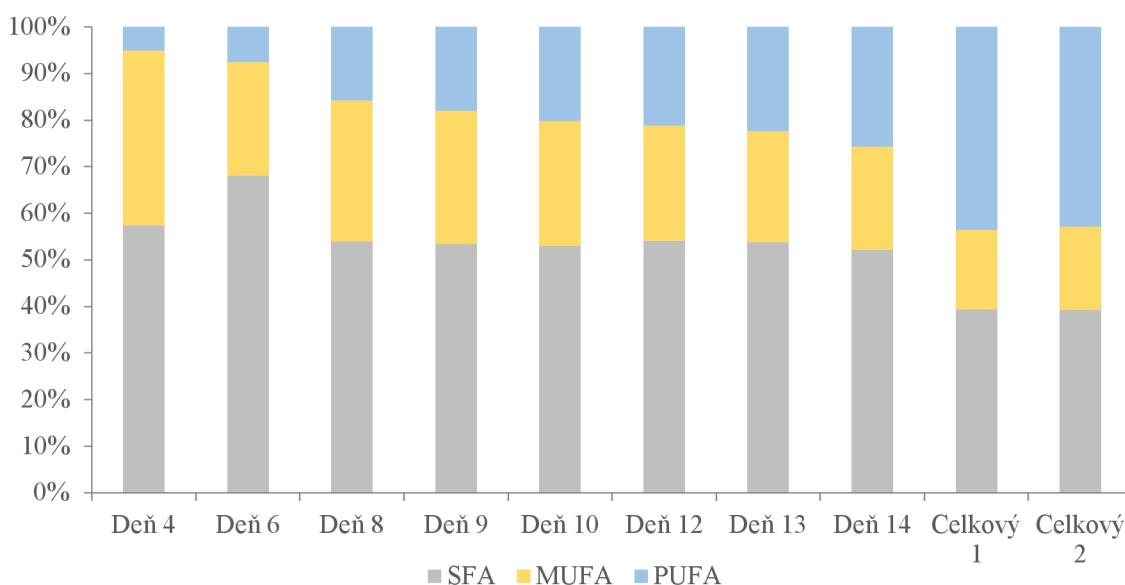
Obrázok 42: Graf závislosti produkcie lipidických metabolitov v závislosti na použítom alkohole pri fermentorovej kultivácii riasy *Scenedesmus obliquus*. Pridaných 10 ml glycerolu na 5. deň kultivácie a 5 ml isopropylalkoholu na 12. deň kultivácie. (celk. – analýza celkovej biomasy po skončení kultivácie).

Na grafe zobrazenom na obrázku 43 je možné pozorovať vývoj produkcie biomasy pri fermentorovej kultivácii riasy rodu *Scenedesmus obliquus*. Šiesty deň vykazuje čiastočný úbytok produkovanej biomasy, čo mohlo byť spôsobené práve pridaním glycerolu do kultivačného média. V ďalších dňoch už riasová kultúra vykazuje konštantný nárast biomasy. Pri hodnotách analýzy celkovej biomasy je možné vidieť, že množstvo biomasy je menšie ako množstvo biomasy v predchádzajúci deň. Táto skutočnosť mohla byť spôsobená tým, že koncentrácia buniek riasovej kultúry nemusela byť, aj napriek konštantnému miešaniu, v každom mieste zhodná a teda v odobratých 20 ml sa mohlo nachádzať viac buniek ako vo zvyšku kultivačného média. Percentuálne zastúpenie lipidov taktiež konštantne narastalo, s výnimkou 13. dňa, čo je deň po pridaní isopropylalkoholu. Tento jav mohol byť spôsobený adaptáciou kultúry na pridaný alkohol, keďže v ďalších dňoch zastúpenie lipidov opäť rástlo.



Obrázok 43: Produkcia biomasy a percentuálne zastúpenie lipidov v závislosti na pridaný alkohol ako chemický stres pri fermentorovej kultivácii riasy *Scenedesmus obliquus*. Pridaných 10 ml glycerolu na 5. deň kultivácie a 5 ml isopropylalkoholu na 12. deň kultivácie. (celkový 1 a celkový 2 – analýza celej biomasy po skončení kultivácie)

Graf na obrázku 44 zobrazuje zastúpenie mastných kyselín vo vzorke. Ako je možné vidieť, v prvých dňoch dominujú SFA (57,3 % na 4. deň kultivácie) a PUFA sú len málo zastúpené (5,13 % na 4. deň kultivácie). Pridaním alkoholu je možné pozorovať zmenu lipidického profilu, kedy začína stúpať zastúpenie PUFA na úkor SFA. Pri konci fermentorovej kultivácie (vzorka: Celkový 1 a vzorka: Celkový 2) už je možné vidieť, že PUFA prevažujú SFA. Zastúpenie PUFA tvorilo 43,57 % a zastúpenie SFA kleslo na 39,35 %.



Obrázok 44: Zloženie lipidov v biomase pri fermentorovej kultivácii kmeňa *Scenedesmus obliquus* v BBM médiu pri prídavku alkoholu ako stresového faktora. Pridaných 10 ml glycerolu na 5. deň kultivácie a 5 ml isopropylalkoholu na 12. deň kultivácie.

5.3 Kultivácia kultúra *Scenedesmus cf. acutus* vo flat – panel fotobioreaktore

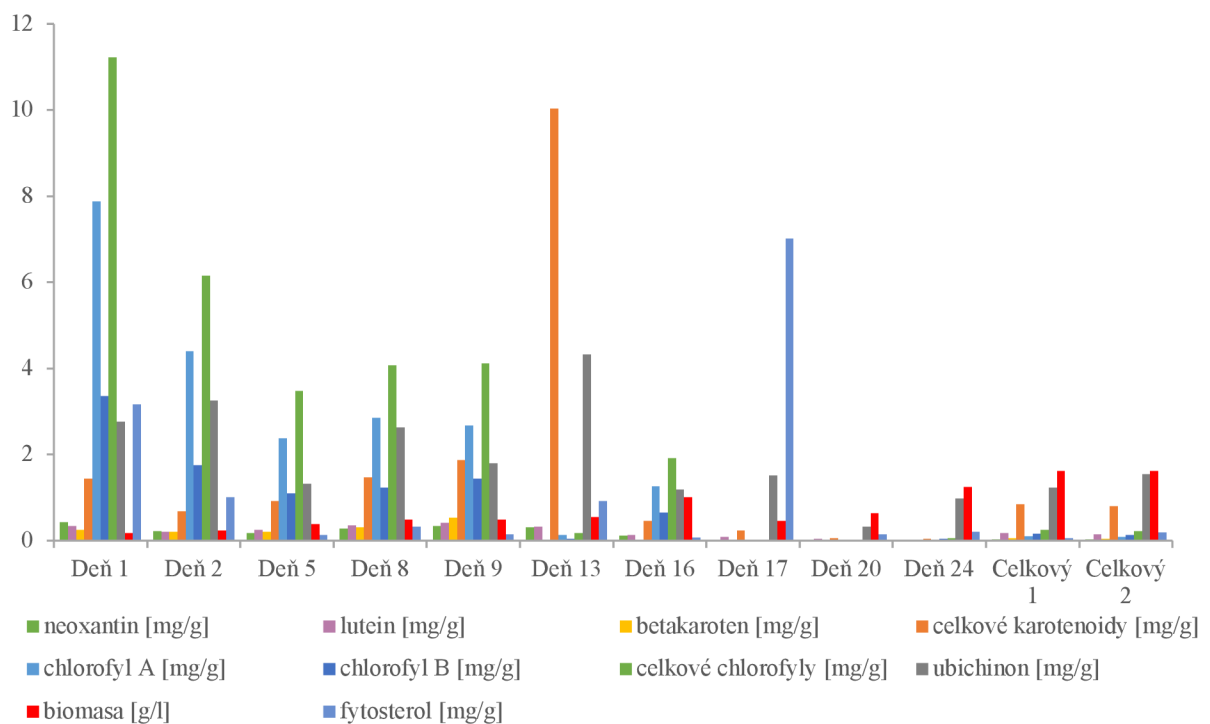
Ako je spomenuté v kapitole 2.1.1, rody *Scenedesmus* sa vyskytujú v kolóniách po 4-, 8-, 16- alebo 32-buniek. Na obrázku 45 je zobrazená kultúra zväčšená pomocou mikroskopu. Obrázok A zobrazuje kultúru na začiatku kultivácie, pred pridaním stresových faktorov. Na obrázku je možné pozorovať kolóniu štyroch buniek, typickú pre kultúru *Scenedesmus acutus*. Na obrázku B je kultúra odobratá na konci kultivácie, kde je možné pozorovať aj štvorčlenné kolónie, ale aj osemčlenné kolónie. Stresové faktory teda vyvolali väčšie zoskupovanie buniek, ako obranný mechanizmus použitej riasovej kultúry. Taktiež je možné na obrázku B pozorovať zväčšenie jednotlivých buniek, v porovnaní s obrázkom A, čo mohlo byť, okrem iného spôsobené aj pridaním ethanolu do kultivačného média, nakoľko bolo pomocou HPLC–RI analýzy v kapitole 5.1.2 dokázané, že ethanol je v prípade riasy *Scenedesmus acutus* využitý pre mixotrofný spôsob výživy.



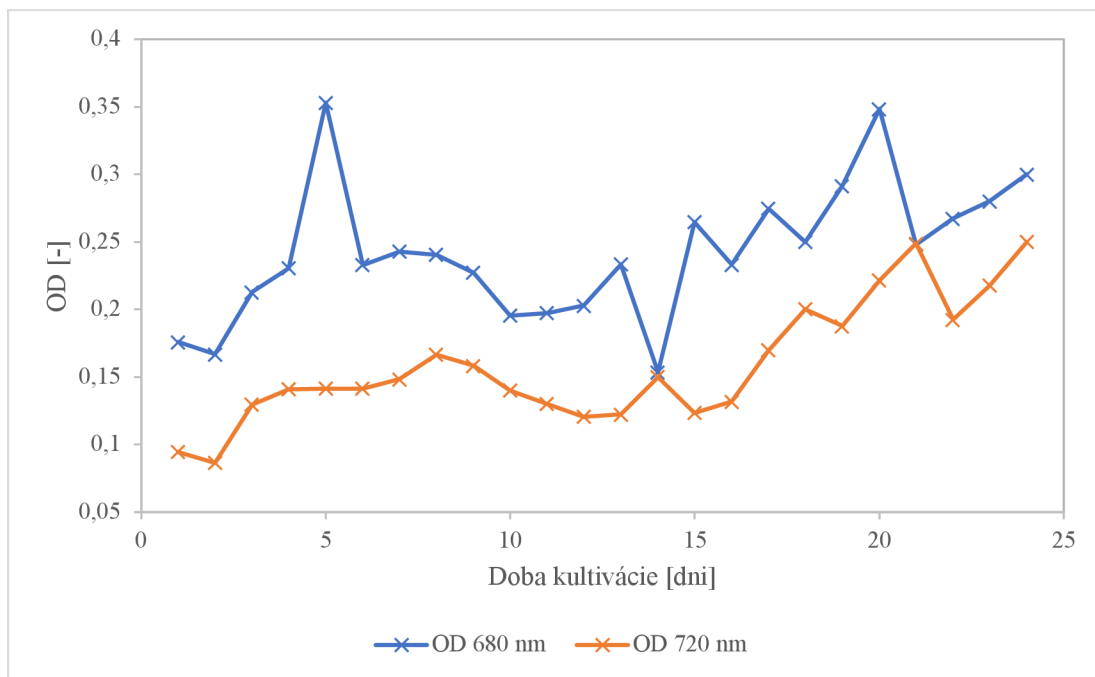
Obrázok 45: A – kultúra *Scenedesmus cf. acutus* CCALA 437 vo flat – panel fotobioreaktore na začiatku kultivácie (27.9.2022), B – kultúra *Scenedesmus cf. acutus* CCALA 437 vo flat – panel fotobioreaktore na konci kultivácie (7.12.2022)

Na grafe na obrázku 46 je zobrazená produkcia intracelulárnych metabolitov v čase. Z grafu je zrejmé, že na každý pridaný stres bol odozvou riasovej kultúry prvotné zníženie produkcie metabolitov, v ďalších dňoch sa však kultúra stabilizovala. Produkcia biomasy konštantne narastala, menilo sa však zastúpenie jednotlivých metabolitov. Ako je vidieť, po pridaní červeného svetla v prvom dni kultivácie klesá obsah celkových chlorofylov z 11,23 mg/g biomasy na 6,15 mg/g suchej biomasy. Taktiež možno pozorovať zníženú produkciu karotenoidov, ktorých pokles bol z 1,44 mg/g biomasy na 0,67 mg/g biomasy. Zvýšená bola iba produkcia ubichinónu, a to z 2,77 mg/g biomasy na 3,25 mg/g biomasy. V ďalších dňoch kultivácie pokračoval klesajúci trend až do 5. dňa kultivácie, od kedy začala produkcia intracelulárnych metabolitov opäť stúpať a na ôsmy deň kultivácie, pred zmenou svetla na zelenú farbu, boli hodnoty už 4,08 mg/g biomasy pre celkové chlorofyly, 1,86 mg/g biomasy pre celkové karotenoidy, z čoho β -karotén tvoril 0,3 mg/g biomasy (nárast o 17 % oproti hodnotám z prvého dňa kultivácie) a luteín 0,42 mg/g biomasy (nárast o 19 % oproti hodnotám z prvého dňa kultivácie). Po zapnutí zeleného svetla nie je pozorovaný výrazný

prvotný pokles produkcie metabolitov, naopak produkcia celkových karotenoidov bola zeleným svetlom zvýšená na 1,86 mg/g suchej biomasy. Analýza vzorky odobratej v 13. deň kultivácie ukazuje, že došlo vplyvom zeleného svetla k výraznému zvýšeniu karotenoidov (10,02 mg/g biomasy) a ubichinónu (4,32 mg/g biomasy) na úkor ostatných metabolitov. Klesol napríklad aj obsah betakaroténu, detekované karotenoidy ale neboli presne určené, nakoľko metóda bola štandardizovaná iba na vybrané druhy karotenoidov. Na 16. deň bolo svetlo zmenené na fialovú farbu, čo viedlo k poklesu takmer všetkých metabolitov, okrem fytosterolu. Obsah fytosterolu tvoril až 7,01 mg/g biomasy. Vo vzorke boli ďalej detekované už len celkové karotenoidy s obsahom 0,24 mg/g biomasy a ďalej ubichinón s obsahom 1,51 mg/g biomasy. Produkcia intracelulárnych metabolitov v ďalších dňoch, do pridania ethanolu, vykazovala klesajúcu tendenciu, aj napriek správnej vitalite kultúry (zistené pomocou QY) a narastajúcemu OD (Obrázok 47). Roztok ethanolu bol pridaný v 24. deň kultivácie. Ako je z grafu zrejmé, prídavok ethanolu opäť podporil produkciu metabolitov, nakoľko u všetkých je pozorovaná stúpajúca tendencia produkcie. Výsledné hodnoty pri ukončení kultivácie sú priaznivé najmä pri produkcii celkových karotenoidov (0,8 mg/g biomasy) a pri produkcii ubichinónu (1,54 mg/g biomasy). Produkcia chlorofylov vo vzorke bola k ukončeniu kultivácie veľmi malá až nulová.



Obrázok 46: Graf závislosti produkcie lipidických metabolitov v závislosti na použitom farebnom svetle a alkohole pri kultivácii riasy *Scenedesmus acutus* vo flat – panel fotobioreaktore. V prvý deň zapnuté červené svetlo (620–780 nm), v ôsmy deň zapnuté zelené svetlo (495–570 nm), v 16. deň zapnuté fialové svetlo (380–450 nm) a na 19. deň pridaných 10 ml 50% roztoku ethanolu.



Obrázok 47: OD merané pri 680 a 720 nm pri kultivácii riasy *Scenedesmus acutus* vo flat-panel fotobioreaktore

6 ZÁVER

V rámci tejto diplomovej práce bol sledovaný vplyv stresových faktorov na produkciu metabolitov pri kultivácii vybraných kmeňov mikrorias a siníc. Vybrané boli riasy *Desmodesmus communis*, *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus ecornis*, *Desmodesmus armatus*, *Scenedesmus obliquus*, *Desmodesmus velitaris*, *Scenedesmus pseudoarmatus*. Zo siníc bol vybraný kmeň *Synechococcus bigramulatus*, pre porovnanie produkovaných metabolitov pod totožnými stresovými podmienkami. Ako stresový faktor boli použité 50% roztoky rôznych druhov alkoholov, konkrétne metanolu, ethanolu, glycerolu a isopropylalkoholu. Ďalším stresovým faktorom, použitým pri kultivácii pomocou flat – panel fotobioreaktoru, bola zmena farby, a teda aj vlnovej dĺžky, použitého svetla. Použité bolo červené svetlo s vlnovou dĺžkou 620–780 nm, zelené svetlo s vlnovou dĺžkou v rozmedí 495–570 nm a fialové svetlo s vlnovou dĺžkou 380–450 nm.. Medzi sledované metabolity sa radia predovšetkým chlorofyly, karotenoidy (napr. β -karotén, xantíny a luteín), fytosterol, ubichinón a tiež lipidy a ich zloženie mastných kyselín. Pri všetkých experimentoch bol do kultivačného média pridaný ampicilín, aby sa zabránilo rastu nevyžiadaných bakteriálnych kultúr, a teda bol sledovaný len vplyv stresového faktora na riasovú kultúru.

Ako prvé boli prevedené experimenty v Erlenmayerových bankách s prídavkom zvolených alkoholov. Pri kultivácii boli prevádzané pravidelné merania OD pre zistenie nárastu kultúr a tiež QY, pre zistenie vitality kultúr. Po ukončení kultivácie boli prevedené analýzy pomocou HPLC a GC. Ako najhoršie sa javí použitie ethanolu, nakoľko došlo k zníženiu produkcie intracelulárnych metabolitov, prípadne k usmrteniu kultúry, pri najväčšom počte kultúr. Najnepriaznivejšie pôsobil ethanol na kultúry *Scenedesmus ecornis*, *Scenedesmus obliquus*, *Desmodesmus velitaris* a tiež *Desmodesmus armatus*, pri ktorom je ale pozorovaný nárast obsahu karotenoidov na úkor ostatných metabolitov. Analýza pomocou HPLC–RI ukázala, že ethanol bol použitý ako mixotrofný spôsob výživy pri riasach rodu *Desmodesmus communis*, *Scenedesmus acutus*, *Desmodesmus velitaris*, *Scenedesmus pseudoarmatus* a *Synechococcus bigramulatus*. Táto analýza tiež ukázala, že ethanol sa vyskytoval v médiu aj pri vzorkách s prídavkom iných alkoholov, dokonca aj v kontrolnej vzorke, napr. pri riaske *Desmodesmus velitaris*.

Prídavok glycerolu na riasové kultúry výrazne nepôsobil, produkcia intracelulárnych metabolitov bola takmer vždy podobná alebo zľahka nižšia ako produkcia intracelulárnych metabolitov pri kontrolných vzorkách. Výsledky sú výrazné pri riaske *Desmodesmus communis*, pri ktorej bola, v porovnaní s kontrolnou vzorkou, vysoko zvýšená produkcia karotenoidov o 20 %.. Karotenoidy boli zvýšené na úkor zvyšných sledovaných metabolitov, ktorých obsah v tejto vzorke klesol (pokles celkových chlorofylov o 85 %). Analýza pomocou HPLC–RI ukázala, že glycerol bol utilizovaný riasami *Desmodesmus armatus*, *Scenedesmus obliquus*, *Desmodesmus velitaris* a *Scenedesmus pseudoarmatus*. Aj napriek tomu, že bol do média pridaný iba glycerol, sa v médiu okrem glycerolu nachádzal aj ethano, a to pri riasach *Desmodesmus velitaris*, *Scenedesmus pseudoarmatus* (6,068 g/l na prvý a 6,033 g/l nasiedmy deň kultivácie) a pri sinici *Synechococcus bigramulatus* (6,24 g/l v prvom dni po pridaní glycerolu).

Najpozitívnejší vplyv na riasové kultúry mali methanol a isopropylalkohol. Produkcia intracelulárnych metabolitov bola zhodná alebo vyššia ako kontrolná vzorka v najväčšom počte prípadov. Pre methanol bolo pozorovaná najmä produkcia ubiquinónu a karotenoidov pri riaske *Desmodesmus velitaris* a pri riaske *Desmodesmus communis* (zvýšenie produkcie ubiquinónu o 64 % a β -karoténu o 53 % oproti kontrolnej vzorke). Výrazné zvýšenie produkcie metabolitov bolo pozorované pri riasach *Scenedesmus ecornis* (napr. zvýšenie karotenoidov až o 62,5 % a zvýšenie chlorofylov o 31 %) a *Scenedesmus pseudoarmatus* (zvýšenie produkcie karotenoidov o 80 %), pri ktorých výrazne prevyšovala aj produkcia karotenoidov. Znížená koncentrácia methanolu, značiaca jeho využítie, bola pozorovaná pri *Desmodesmus communis*, *Scenedesmus acutus* a *Scenedesmus obliquus*. Úbytok methanolu z média bol pozorovaný aj pri *Desmodesmus velitaris* a *Scenedesmus pseudoarmatus*, pri ktorých bola v médiu detekovaná aj prítomnosť ethanolu, a tiež pri sinici *Synechococcus bigranulatus*, pri ktorej bol v médiu detekovaný okrem methanolu aj glycerol. Pre vzorky s prídavkom glycerolu bolo pozorovaná najmä zvýšená produkcia karotenoidov pri riasach *Scenedesmus acutus* (o 33 %), *Scenedesmus obliquus*, ďalej pri riasach *Desmodesmus communis* a *Scenedesmus pseudoarmatus*, pri ktorých je pozorované aj zvýšenie ubiquinónu, a ďalej pri riaske *Desmodesmus velitaris*, u ktorej je možné pozorovať aj zvýšenú produkciu luteínu (o 22 %). Využitie isopropylalkoholu bolo zároveň dokázané pri riasach *Desmodesmus velitaris*, *Scenedesmus pseudoarmatus* a pri sinici *Synechococcus bigranulatus*, pri ktorých bol v médiu pri kultivácii zároveň detekovaný ethanol. Prítomnosť iného alkoholu, ako bol pridaný, mohla byť spôsobená napríklad ako obranný mechanizmus riasovej kultúry, prípadne ako metabolický produkt alebo odpadný produkt pri použití pridaného alkoholu ako mixotrofného spôsobu výživy.

Pre fermentorovú kultiváciu bola vybraná riasa *Scenedesmus obliquus*. Na základe experimentov v Erlenmayerových bankách bolo zvolené prídanie glycerolu a isopropylalkoholu, nakoľko v menšom merítku dosahovala riasová kultúra s týmito alkoholmi najlepšie výsledky. Aj napriek tomu, že v pilotných experimentoch dosahoval lepšie výsledky isopropylalkohol, vo fermentorovej kultivácii dochádzalo k väčšiemu nárastu obsahu metabolitov pri prídavku glycerolu. Obzvlášť vysoká bola produkcia chlorofylov, ktorých obsah dosahoval až 5,75 mg/g biomasy. Kombinácia alkoholov mala priaznivý vplyv najmä na produkciu karotenoidov. Pri skončení kultivácie bol obsah celkových karotenoidov až 3,69 mg/g biomasy. Vysoká bola aj tvorba luteínu (1,78 mg/g biomasy), ktorého obsah dokonca prevýšil obsah β -karoténu (1,5 mg/g biomasy).

Ako posledná bola prevedená kultivácia riasy *Scenedesmus acutus* vo flat-panel fotobioreaktore. Pri tejto kultivácii bolo skúmané najmä ovplyvňovanie produkcie metabolitov rôznou vlnovou dĺžkou svetla. Červené svetlo spôsobilo postupné znižovanie produkcie metabolitov, zelené svetlo naopak ich produkciu zvyšovalo a javí sa ako najlepšie pre budúce experimenty. Zelené svetlo taktiež zvýšilo produkciu celkových karotenoidov na 10,02 mg/g biomasy a ubiquinónu na 4,32 mg/g biomasy. Fialové svetlo nepôsobilo priaznivo na kultúru. Do kultúry bol ku koncu kultivácie pridaný ešte 50% roztok ethanolu. Tento alkohol bol vybraný najmä na základe meraného OD pri experimentoch v erlenmayerových bankách, avšak neskoršia HPLC analýza ukázala, že pre kultúru priaznivejšie by bolo použitie isopropylalkoholu. Do budúcich experimentov by pri použitom kmeni bolo teda vhodné

použitie zeleného svetla a isopropylalkoholu. Pri skončení kultivácie vo flat-panel fotobioreaktore možno vidieť najvyššie hodnoty pri karotenoidoch (0,94 mg/g biomasy) a ubichinóne 1,54 mg/g biomasy.

7 ZDROJE

- [1] GUALTIERI, Paolo a L. BARSANTI. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. ISBN 978-0849314674.
- [2] ROSYPAL, Stanislav. *Nový přehled biologie*. Praha: Scientia, 2003. ISBN 978-80-86960-23-4.
- [3] BARSANTI, L. a Paolo. GUALTIERI. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Second edition. Boca Raton, [Florida]: CRC Press/Taylor & Francis Group, [2014]. ISBN 978-1-4398-6732-7.
- [4] RICHMOND, Amos. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Ames, Iowa, USA: Blackwell Science, 2004. ISBN 06-320-5953-2
- [5] VOET, Donald a Judith G. VOET. *Biochemistry*. 4th ed. Hoboken: Wiley, c2011. ISBN 978-0470570951
- [6] ROHIT, M. V. a S. VENKATA MOHAN. Quantum Yield and Fatty Acid Profile Variations With Nutritional Mode During Microalgae Cultivation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2018, **6**. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2018.00111
- [7] JOHNSON, Joni L., Marvin W. FAWLEY a Karen P. FAWLEY. The diversity of Scenedesmus and Desmodesmus (Chlorophyceae) in Itasca State Park, Minnesota, USA. *Phycologia*. 2007, **46**(2), 214-229. ISSN 0031-8884. Dostupné z: doi:10.2216/05-69.1
- [8] HEGEWALD, Eberhard a Anke BRABAND. A taxonomic revision of Desmodesmus serie Desmodesmus (Sphaeropleales, Scenedesmaceae). *Fottea*. 2017, **17**(2), 191-208. ISSN 18025439. Dostupné z: doi:10.5507/fot.2017.001
- [9] BOROWITZKA, Michael A., John BEARDALL a John RAVEN. *The Physiology of Microalgae*. Imprint: Springer, 2016. ISBN 978-3-319-24945-2.
- [10] KHATTAR, J., D. SINGH a Gurpreet KAUR. *Algal biology and biotechnology*. New Delhi: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., 2009. ISBN 9789380026190
- [11] KALINA, Tomáš a Jiří VÁŇA, 2005. *Sinice, řasy, houby, mechorostry a podobné organismy v současné biologii*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1036-8.
- [12] SIERRA, E., F.G. ACIÉN, J.M. FERNÁNDEZ, J.L. GARCÍA, C. GONZÁLEZ a E. MOLINA. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal*. 2008, **138**(1-3), 136-147. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2007.06.004
- [13] *Journal of Biotechnology*. 85. 2001. ISSN 01681656. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165600003539>
- [14] SCHAGERL, Michael, Rainer SIEDLER, Eliška KONOPÁČOVÁ a Sameh Samir ALI. Estimating Biomass and Vitality of Microalgae for Monitoring Cultures: A Roadmap for Reliable Measurements. *Cells*. 2022, **11**(15). ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells11152455
- [15] YOUSUF, Abu. Fundamentals of Microalgae Cultivation. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*. Elsevier, 2023, , 1-9. DOI: 10.1016/B978-0-12-817536-1.00001-1. ISBN 9780128175361. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012817536100001>
- [16] UGWU, C.U., H. AOYAGI a H. UCHIYAMA. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*. 2008, **99**(10), 4021-4028. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2007.01.046
- [17] KAŠTÁNEK, František. *Bioinženýrství*. 1. Praha: Academia, 2001. ISBN 80-200-0768-7

- [18] CHANDRA, Rashmi, Garima VISHAL, Carlos Eduardo Gámez SÁNCHEZ a Janet Alejandra Gutiérrez URIBE. Bioreactor for algae cultivation and biodiesel production. *Bioreactors*. Elsevier, 2020, 2020, 289-307. ISBN 9780128212646. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-821264-6.00015-2
- [19] ZHAN, Jiao, Junfeng RONG a Qiang WANG. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2017, **42**(12), 8505-8517. ISSN 03603199. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijhydene.2016.12.021
- [20] SIJIL, P.V., Vinaya R. ADKI, R. SARADA a V.S. CHAUHAN. Strategies for enhancement of alpha-linolenic acid rich lipids in *Desmodesmus* sp. without compromising the biomass production. *Bioresource Technology*. 2019, **294**. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.122215
- [21] SINGH, R.N. a Shaishav SHARMA. Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2012, **16**(4), 2347-2353. ISSN 13640321. Dostupné z: doi:10.1016/j.rser.2012.01.026
- [22] SUN, Xiao-Man, Lu-Jing REN, Quan-Yu ZHAO, Xiao-Jun JI a He HUANG. Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnology for Biofuels*. 2018, **11**(1). ISSN 1754-6834. Dostupné z: doi:10.1186/s13068-018-1275-9
- [23] MURO, Eleonora, G. Ekin ATILLA-GOKCUMEN, Ulrike S. EGGERT a William BEMENT. Lipids in cell biology: how can we understand them better?. *Molecular Biology of the Cell*. 2014, **25**(12), 1819-1823. ISSN 1059-1524. Dostupné z: doi:10.1091/mbc.e13-09-0516
- [24] VOET, Donald, Judith VOET a Charlotte PRATT. *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*. 3rd ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2008. ISBN 978-0470129302.
- [25] DE CARVALHO, Carla a Maria CARAMUJO. The Various Roles of Fatty Acids. *Molecules*. 2018, **23**(10). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23102583
- [26] STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRICHTER. *Biopolymers*. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. ISBN 9783527302208.
- [27] NOVOVESKÁ, Lucie, Michael E. ROSS, Michele S. STANLEY, Rémi PRADELLES, Virginie WASIOLEK a Jean-François SASSI. Microalgal Carotenoids: A Review of Production, Current Markets, Regulations, and Future Direction. *Marine Drugs*. 2019, **17**(11). ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md17110640
- [28] HOPKINS, William G. a Norman P. A. HÜNER. *Introduction to Plant Physiology*. 4. USA: Wiley, 2008. ISBN 9780470247662.
- [29] CHRISTEN, P. a E. HOFMANN. *EJB Reviews 1994*. 1995. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-79502-2
- [30] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [31] LIAO, Pan, Andréa HEMMERLIN, Thomas J. BACH a Mee-Len CHYE. The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production. *Biotechnology Advances*. 2016, **34**(5), 697-713. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2016.03.005
- [32] SZOTKOWSKI, Martin. Řízená produkce lipidů a dalších lipidických látek pomocí vybraných druhů kvasinek a mikrořas. . Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zavprace/detail/134986>. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

- [33] PACKER, L. *Carotenoids and Retinoids: Molecular Aspects and Health Issues*. AOCS Publishing, 2005. ISBN 978-1893997837.
- [34] SIJIL, P.V., Vinaya R. ADKI, R. SARADA a V.S. CHAUHAN. Strategies for enhancement of alpha-linolenic acid rich lipids in *Desmodesmus* sp. without compromising the biomass production. *Bioresource Technology*. 2019, **294**. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.122215
- [35] HANNAN, Md. Abdul, Abdullah Al Mamun SOHAG, Raju DASH, et al. Phytosterols of marine algae: Insights into the potential health benefits and molecular pharmacology. *Phytomedicine*. 2020, **69**. ISSN 09447113. Dostupné z: doi:10.1016/j.phymed.2020.153201
- [36] VOLKMAN, J. Sterols in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003, **60**(5), 495-506. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-002-1172-8
- [37] DOUGLAS, Susan E. a John A. RAVEN, LARKUM, Anthony W. D., ed. *Photosynthesis in Algae*. 1. Illinois, U.S.A.: Springer Science + Business Media, 2003. ISBN 978-94-007-1038-2.
- [38] KUMAR, Gulshan, Ajam SHEKH, Sunaina JAKHU, Yogesh SHARMA, Ritu KAPOOR a Tilak Raj SHARMA. Bioengineering of Microalgae: Recent Advances, Perspectives, and Regulatory Challenges for Industrial Application. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020, **8**. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2020.00914
- [39] BLANKENSHIP, Robert E. 2nd ed. Chichester: Wiley Blackwell, 2014. ISBN 9781405189767.
- [40] MICHAL, Gerhard a Dietmar SCHOMBURG, ed. *Biochemical pathways: an atlas of biochemistry and molecular biology*. 2nd ed. Hoboken: Wiley, c2012. ISBN 978-0-470-14684-2
- [41] BENTINGER, Magnus, Michael TEKLE a Gustav DALLNER. Coenzyme Q – Biosynthesis and functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010, **396**(1), 74-79. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.147
- [42] KAGAN, Valerian E. a Peter J. QUINN. *Coenzyme Q: Molecular mechanisms in health and disease*. USA: CRC Press, 2001. ISBN 9780849387326.
- [43] CRANE, F.L., I.L. SUN a E.E. SUN. The essential functions of coenzyme Q. *The Clinical Investigator*. 1993, **71**(S8). ISSN 0941-0198. Dostupné z: doi:10.1007/BF00226841
- [44] GULABOSKI, Rubin, Velo MARKOVSKI a Zhu JIHE. Redox chemistry of coenzyme Q—a short overview of the voltammetric features. *Journal of Solid State Electrochemistry*. 2016, **20**(12), 3229-3238. ISSN 1432-8488. Dostupné z: doi:10.1007/s10008-016-3230-7
- [45] ZHAO, Dongzhi, Xiaogang XING, Yuguang LIU, Jianhong YANG a Lin WANG. The relation of chlorophyll- a concentration with the reflectance peak near 700 nm in algae-dominated waters and sensitivity of fluorescence algorithms for detecting algal bloom. *International Journal of Remote Sensing*. 2010, **31**(1), 39-48. ISSN 0143-1161. Dostupné z: doi:10.1080/01431160902882512
- [46] POSTEN, Clemens a Christian WALTER. *Microalgal Biotechnology: Potential and Production: Marine and Freshwater Botany*. Walter de Gruyter, 2012. ISBN 9783110225020.
- [47] DU, Niu, Pardis GHOLAMI, David I. KLINE, et al. Simultaneous quantum yield measurements of carbon uptake and oxygen evolution in microalgal cultures. *PLOS ONE*. 2018, **13**(6). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0199125
- [48] MALLICK, Nirupama a F.H MOHN. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003, **55**(1), 64-69. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/S0147-6513(02)00122-7

- [49] SMITH, Clare. Disadvantages & Advantages of an HPLC. Sciencing [online]. Santa Monica: Leaf Group Media, 2020 [cit. 2021-05-14]. Dostupné z: <https://sciencing.com/disadvantages-advantages-hplc-5911530.html>
- [50] JANDERA, Pavel a Jaroslav CHURÁČEK. *Gradient elution in column liquid chromatography: theory and practice*. Amsterdam: Elsevier, 1985. Journal of chromatography library. ISBN 04-444-2124-6.
- [51] PARRIS, N. A. *Instrumental liquid chromatography: a practical manual on high-performance liquid chromatographic methods*. 2nd completely rev. ed. Amsterdam: Elsevier, 1984. ISBN 04-444-2061-4.
- [52] SNYDER, Lloyd, Joseph GLAJCH a J. KIRKLAND. *Practical HPLC method development*. 2ND ED. New York: WILEY, 1997. ISBN 9781118592014.
- [53] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

GC – plynová chromatografia

HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

MK – masné kyseliny

MUFA – mononenasýtené masné kyseliny

PUFA – polynenasýtené masné kyseliny

SFA – nasýtené masné kyseliny

TAG – triacylglycerol

UV-VIS – ultrafialovo-viditeľná spektroskopia

RI – refraktometrický detektor

DAD – detektor s diódovým poľom

FID – plameňovo-ionizačný detektor