

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

PRODUKCE BETA-GLUKANŮ VYBRANÝMI DRUHY
KVASINEK, ŘAS A SINIC

PRODUCTION OF BETA-GLUCANS BY SOME YEASTS AND ALGAE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Markéta Veselá

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1249/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Markéta Veselá**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Produkce beta–glukanů vybranými druhy kvasinek, řas a sinic

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) rešerše zaměřená na beta–glukany, jejich přírodní zdroje, biologické účinky a produkci u kvasinek, řas a sinic
- 2) optimalizace metody stanovení beta–glukanů
- 3) analýza obsahu beta–glukanů ve vybraných druzích kvasinek, řas a sinic
- 4) stanovení dalších metabolitů a růstových charakteristik produkčních kmenů
- 5) vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

Bc. Markéta Veselá

student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

vedoucí ústavu

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.

Děkan

V Brně dne 31.1.2018

ABSTRAKT

Pro předloženou diplomovou práci bylo vytipováno několik druhů kvasinek a mikrořas a ve vybraných producentech byly analyzovány β -glukany, lipidy, karotenoidy, ergosterol a koenzym Q. Podmínky kultivace kvasinek byly voleny s ohledem na co nejvyšší produkci β -glukanů. Kultivace řas byla prováděna dle postupů Sbírký autotrofních mikroorganismů (CCALA). Ze zástupců mikrořas byly vybrány *Desmodesmus acutus*, *Dunaliella salina*, *Arthrospira maxima* a *Cyanothece* sp. Pro kultivace kvasinek byly vybrány druhy: *Rhodotorula glutinis*, *Cystofilobasidium macerans* a *Sporidiobolus metaroseus*. Kultivována byla také *Saccharomyces cerevisiae*, která je dnes již ověřeným zdrojem β -glukanů a je považována za zdravotně bezpečný GRAS organismus. Z uvedených důvodů byla *S. cerevisiae* použita jako standard pro porovnání produkce β -glukanů ve vybraných druzích kvasinek. β -glukany byly stanoveny pomocí enzymatického kitu K-YBGL Megazyme, karotenoidy, ergosterol a koenzym Q byly stanoveny pomocí HPLC/PDA a lipidy, respektive obsah mastných kyselin byl stanoven pomocí GC/FID. Nejlepším producentem kvasinkových β -glukanů byla *R. glutinis* a *S. metaroseus* a nejlepší podmínky pro produkci β -glukanů i ostatních metabolitů byl C/N poměr 70. U mikrořas byla prokázána pouze produkce α -glukanů, jejichž největším producentem byl *D. acutus*.

KLÍČOVÁ SLOVA

Optimalizace produkce beta-glukanů, lipidy, karotenoidy, kvasinky, mikrořasy

ABSTRACT

Several yeast strains and microalgae were selected for this diploma thesis. β -glucans, lipids, carotenoids, ergosterol and coenzyme Q were determined in selected producers, and the cultivation conditions for yeast strains were optimized to gain enhanced production of β -glucans. Microalgae cultivations were carried out according to the instructions of the Collection of Autotrophic organisms (CCALA). Selected microalga strains include *Desmodesmus acutus*, *Dunaliella salina*, *Arthrospira maxima* and *Cyanothece* sp. Selected yeast species include *Rhodotorula glutinis*, *Cystofilobasidium macerans* and *Sporidiobolus metaroseus*. Edible yeast *Saccharomyces cerevisiae* was cultivated to compare with other yeast strains because of its verified production of β -glucans. β -glucans were then determined by the enzymatic kit K-YBGL Megazyme, carotenoids, ergosterol and coenzyme Q were analyzed by HPLC/PDA and fatty acids were analyzed by GC/FID. The best producer of yeast β -glucans was *R. glutinis* and *S. metaroseus*, and the best conditions for the production of β -glucans and other metabolites was the C/N ratio of 70. Within the microalgae species, only α -glucan production was observed, the best producer was *D. acutus*.

KEYWORDS

Optimalization of the production of beta-glucans, lipids, carotenoids, yeast, microalgae

VESELÁ, M. *Produkce beta-glukanů vybranými druhy kvasinek, řas a sinic*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 92 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

Poděkování: Ráda bych tímto poděkovala vedoucí své diplomové práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za odborné vedení a rady poskytnuté při vypracování diplomové práce. Velké díky patří také Ing. Daně Byrtusové, Ing. Marku Raptovi a Ing. Martinovi Szotkowskému, kteří se snažili zajistit co nejlepší podmínky pro realizaci práce. Obrovské díky patří mé rodině, která mi byla největší oporou, a také mým přátelům za všestrannou podporu.

OBSAH

1. ÚVOD	10
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	12
2.1 β -D-glukany.....	12
2.1.1 Struktura a chemické vlastnosti β -D-glukanů	12
2.1.2 Izolace β -D-glukanů	13
2.2 Biologické účinky β -D-glukanů	14
2.3 Aplikace β -D-glukanů	15
2.3.1 Potravinářský a krmivářský průmysl.....	15
2.3.2 Farmaceutický průmysl	16
2.3.3 Kosmetický průmysl	17
2.4 Kvasinky.....	17
2.4.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2.4.2 <i>Rhodotorula glutinis</i>	18
2.4.3 <i>Cystofilobasidium macerans</i>	19
2.4.4 <i>Sporidiobolus metaroseus</i>	19
2.5 Kvasinky jako zdroj β -D-glukanů	19
2.6 Mikrořasy.....	20
2.6.1 <i>Dunaliella salina</i>	21
2.6.2 <i>Desmodesmus acutus</i>	22
2.6.3 <i>Arthrospira maxima</i>	22
2.6.4 <i>Cyanothece</i> sp.	22
2.7 Mikrořasy jako zdroj β -D-glukanů	23
2.8 Metody stanovení β -D-glukanů	23
2.8.1 Enzymatické stanovení.....	23
2.8.2 IR.....	24
2.8.3 NMR.....	24
2.8.4 HPLC.....	24
2.9 Kvasinky a mikrořasy jako zdroj karotenoidů.....	25

2.10	Metody stanovení karotenoidů.....	26
2.11	Kvasinky a mikrořasy jako zdroj lipidů.....	26
2.12	Metody stanovení lipidů	27
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3.1	Použité chemikálie.....	28
3.1.1	Izolace a analýza karotenoidů	28
3.1.2	Izolace a analýza mastných kyselin.....	28
3.1.3	Kultivace mikroorganismů	28
3.2	Přístroje a pomůcky	29
3.2.1	Kit K-YBGL – Megazym.....	29
3.2.2	Izolace a analýza karotenoidů	29
3.2.3	Izolace a analýza mastných kyselin.....	29
3.2.4	Přístroje použité pro kultivace.....	29
3.3	Použité kmeny mikroorganismů	30
3.3.1	Kvasinky.....	30
3.3.2	Mikrořasy	30
3.3.3	Sinice.....	30
3.4	Kultivace mikroorganismů	30
3.4.1	YPD agar	30
3.4.2	YPD médium.....	30
3.4.3	Produkční média s různými C/N poměry	31
3.4.4	Produkční média pro mikrořasy	31
3.4.4.1	Příprava média pro sinici <i>Arthrospira maxima</i>	31
3.4.4.2	Příprava média pro sinici <i>Cyanothece sp.</i>	31
3.4.4.3	Příprava média pro řasu <i>Desmodesmus acutus</i>	32
3.4.4.4	Příprava média pro řasu <i>Dunaliella salina</i>	32
3.5	Izolace a analýza β -D-glukanů	33
3.5.1	Příprava pomocných roztoků	33
3.5.1.1	Hydroxid sodný (4 M)	33
3.5.1.2	Acetátový pufr (200 mM, pH 5,0)	33
3.5.1.3	Acetátový pufr (1,2 M, pH 3,8)	33
3.5.1.4	Hydroxid draselný (10 M).....	33
3.5.1.5	Hydroxid draselný (2 M)	33

3.5.1.6	Kyselina sírová (72%).....	33
3.5.2	Příprava reakčních roztoků z jednotlivých částí kitu	34
3.5.2.1	Část 1	34
3.5.2.2	Část 2	34
3.5.2.3	Část 3	34
3.5.2.4	Část 4	34
3.5.2.5	Část 5	34
3.5.2.6	Část 6	34
3.5.3	Stanovení celkových glukánů.....	34
3.5.4	Stanovení α -glukánů.....	35
3.6	Extrakce a analýza karotenoidů	35
3.7	Transesterifikace a analýza lipidů	36
3.7.1	Podmínky stanovení mastných kyselin:	36
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	37
4.1	Produkce biomasy a β -glukánů kvasinkami v médiích s různým C/N poměrem.....	37
4.1.1	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	39
4.1.2	<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	41
4.1.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
4.1.4	<i>Rhodotorula glutinis</i>	44
4.1.5	Porovnání produkce biomasy kvasinek	46
4.1.6	Porovnání produkce β -glukánů kvasinek	48
4.1.7	Produkce β -glukánů vybranými druhy mikrořas.....	49
4.2	Produkce mastných kyselin kvasinkami v médiích s různým C/N poměrem	51
4.2.1	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	51
4.2.2	<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	53
4.2.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
4.2.4	<i>Rhodotorula glutinis</i>	57
4.2.5	Porovnání produkce mastných kyselin kvasinkami	59
4.3	Produkce karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q kvasinkami v médiích s různým C/N poměrem	61
4.3.1	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	61
4.3.2	<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	63
4.3.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64

4.3.4	<i>Rhodotorula glutinis</i>	66
4.3.5	Porovnání produkce karotenoidů kvasinkami	67
4.3.6	Porovnání produkce ergosterolu kvasinkami	69
4.3.7	Porovnání produkce koenzymu Q kvasinkami.....	70
5.	ZÁVĚR.....	72
6.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	73
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	88
8.	PŘÍLOHY	89
8.1	Růstové křivky kvasinek	89

1. ÚVOD

Imunitní systém teplokrevných obratlovců, mezi něž je řazen i člověk, je závislý na podnětech, které jsou schopny aktivovat buňky imunitního systému. Tyto podněty obecně nazýváme antigeny, a mohou jimi být jak bakterie, tak malé částice prachu, nebo pylová zrna a nespočet dalších. Je dokázáno, že jedinci vychovávaní v nadměrné čistotě trpí různými deficity právě ve zrání imunitního systému. Přehnaná hygiena se stává velkým problémem dnešní doby. Věda ani medicína již nestačí držet krok se stále měnícími se mikroorganismy a v nemocnicích se objevují extrémně rezistentní kmeny bakterií. Na nové kmeny chřipky nejsme schopni reagovat dostatečně účinnými vakcínami. AIDS a rakovina zůstávají i po mnoha letech výzkumu závažnými chorobami, potýkáme se také čím dál častěji s alergiemi a autoimunitními chorobami. To vše přímo souvisí se stavem našeho imunitního systému, jak rychle a jak efektivně je schopen reagovat, a proto se do popředí zájmu dostaly přírodní doplňky, které prakticky nevykazují vedlejší účinky, nicméně jsou schopny stimulovat naši přirozenou nespecifickou imunitu.

Mezi takové látky patří polysacharidové imunomodulátory, obzvláště β -D-glukany (dále jen glukany). V období šedesátých až osmdesátých let, bychom našli jednotky až desítky prací zabývající se tímto tématem. V následujícím desetiletí bylo prací týkajících se glukanu již stovky. Největší pozornosti se glukanu dostalo poté, co byly objeveny i protinádorové účinky. Není tedy překvapivé, že po přelomu 20. století se ve výzkumu glukanu pokračuje ještě intenzivněji. V západních zemích se ke studiu glukanu používá snadno dostupného zdroje kvasinek, konkrétně notoricky známé kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. V Japonsku a Číně se β -glukany izolují z jedlých hub, které jsou pro tuto oblast typické. Nejčastěji využívané zdroje jsou zde shiitake (*Lentinus edodes*), maitake (*Grifola frondosa*), Klanolístka obecná (*Schizophyllum commune*) nebo reishi (*Ganoderma lucidum*). Ve Francii je využíváno velkého přebytku řas (*Laminaria digitata*) u pobřeží v Bretani a v Kanadě a Brazílii je využíváno obilí.

Ačkoliv se s β -glukany již běžně setkáváme v komerčních produktech, stále není podrobně objasněn jejich účinek. Biologické účinky glukanu jsou totiž velice rozmanité, a úzce souvisí se zdrojem, ze kterého jsou izolovány. Díky těmto komplikacím není zatím reálné využívat β -glukany v evropských zemích jako léčivo. Například v Japonsku jsou překvapivě již od 80. let povoleny lentinan a schizofylan. Tyto glukany jsou zde používány především v kombinaci s cytostatickými chemoterapeutiky při léčbě rakoviny žaludku a střev [1], [2]. Schválení takového farmaceutického přípravku v EU ovšem vyžaduje přesný popis účinků i struktury, tedy kompletní charakterizaci léčivé látky.

Pro samotné studium účinků glukanu je zcela zásadní izolace v co nejčistší formě, a nejvyšší čistoty a spolehlivé charakterizace může být dosaženo právě u kvasinek. Pokud bychom našli efektivního producenta glukanu mezi rody produkujícími i karotenoidy, lipidy, nebo mnoho využitelných proteinů, jednalo by se o levný zdroj dobře stravitelných a zdraví prospěšných látek. Takto bohatými zdroji živin jsou také mikrořasy a technologie pro jejich kultivaci jsou již od šedesátých let intenzivně studovány z důvodu obav z potravinové krize. Předpokládá se tedy, že další generace potravinových doplňků, budou založeny na produktech mikrobiálních kultur. Pro přípravu potravinových doplňků a krmiv jsou již zavedené velkoobjemové kultivace mikrořas, například *Spirulina* (nyní označována jako *Arthrospira*) je díky vysokému obsahu proteinů a polynenasycených mastných kyselin kultivována v Mexiku, USA, nebo Číně, a *Dunaliella* je pro vysoký obsah β -karotenu kultivována v Austrálii.

2. TEORETICKÁ ČÁST

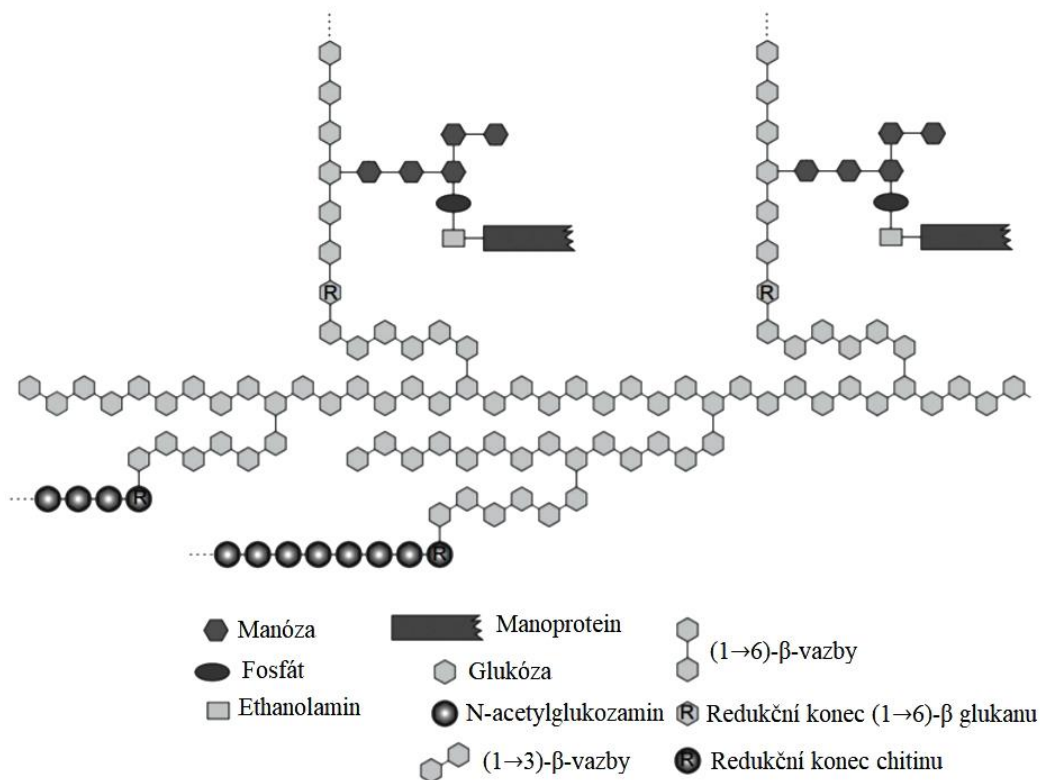
2.1 β -D-glukany

Přírodní β -glukany jsou heterogenní skupinou polysacharidů obsahující β -D-glukopyranózu jako opakující se monomerní jednotku v řetězci, spojeném β -glykosidickými vazbami. Jejich zdroji jsou kvasinky, houby, bakterie, řasy, ale i vyšší rostliny jako ječmen a oves. Jsou ukotveny v buněčné stěně a jedná se o vysoce konzervované strukturní komponenty [3], [4]. V současné době jsou středem pozornosti hlavně díky svým rozmanitým biologickým účinkům. V popředí zájmu je především stimulace imunitního systému a boj proti rakovinným buňkám. Takové účinky glukánů můžeme pozorovat díky jejich interakci s několika receptory buněk imunitního systému, přesný mechanismus ovšem stále není znám, jelikož se jedná o velice komplexní aktivaci nespecifické imunitní odpovědi, do které je zapojeno mnoho typů leukocytů [5], [6]. Různé biologické účinky pak vykazují β -glukany z různých zdrojů, záleží především na jejich čistotě, a na vlastnostech jako je molekulová hmotnost, stupeň větvení, nebo rozpustnost [1].

2.1.1 Struktura a chemické vlastnosti β -D-glukanů

β -glukany z kvasinek, řas a hub obsahují mezi monomery glukózy (1 \rightarrow 3)- a (1 \rightarrow 6)- β vazby, naopak cereální zdroje poskytují polymery s vazbami (1 \rightarrow 3)- a (1 \rightarrow 4)- β [5]. Převážně (1 \rightarrow 3)- β řetězce jsou pak zodpovědné za integritu buněčné stěny kvasinek a z hlediska jejich mechanického chování mají vlastnosti pružiny [7]. Pevnost a odolnost buněčné stěny je také podpořena kovalentními vazbami mezi jednotlivými složkami. Prokázány byly vazby mezi chitinem a (1 \rightarrow 3)- β -glukany, a také vazby mezi manoproteiny, (1 \rightarrow 3)- a (1 \rightarrow 6)- β -glukany. Chitin se ovšem u kvasinek nachází z 90 % jen v jizvách po pučení (narozdíl od hub, kde tvoří značnou část buněčné stěny), takže manoproteiny jsou hlavní složkou této amorfní vrstvy, která vyplňuje prostor mezi glukany. Jedná se tedy o kompaktní pevný obal buňky, který lze poměrně těžce rozdělit na jednotlivé frakce, za současného zachování nativní struktury [8], [9], [10], [8]. Jednoduchý model struktury buněčné stěny *S. cerevisiae* je znázorněn na obrázku 1.

Izolace glukánů (nerozpustných v alkalických roztocích) tak většinou zahrnuje rozrušení buněčné stěny a odstranění materiálu rozpustného v alkalických roztocích (rozpustné glukany, manany a proteiny) působením zředěného NaOH a zvýšené teploty [11]. Odolné nerozpustné glukany pak mohou podléhat digesci v silně kyselém prostředí, například působením kyseliny chlorovodíkové, nebo kyseliny sírové. Spolu s kyselou hydrolyzou jsou často aplikovány i enzymy (glukanázy), které zajistí totální hydrolyzu nerozpustných glukánů tak, že dochází k uvolnění monomerů glukózy. Pokud je při výše popsáném procesu použit málo koncentrovaný roztok NaOH, nebo na buňky nepůsobila dostatečně vysoká teplota, glukany mohou být chráněny proti působení glukanáz reziduálními proteiny a pro lýzi buňky je pak nutné nejprve použít proteázy, popřípadě jiné prostředky pro narušení buněčné stěny [4], [7], [12].



Obrázek 1: Model struktury polysacharidových řetězců buněčné stěny *S. cerevisiae* [13]

Obecně tedy nejsou strukturální polysacharidy buněčných stěn rozpustné v alkalických roztocích, naopak polysacharidy tvořící amorfní vrstvu okolo strukturálních polymerů (manoproteiny) v těchto roztocích rozpustné jsou. EPS nacházející se ve slizu na povrchu buněk jsou dokonce rozpustné ve vodě. Tyto EPS sice také obsahují (1→3,1→6)-β-D-glukany, ovšem s nižší molekulovou hmotností [14]. O rozpustnosti glukánů ve vodě rozhoduje právě molekulová hmotnost a stupeň větvení. Udává se, že glukany jsou ve vodě nerozpustné, pokud je stupeň pomylerace vyšší než 100 [15].

Základním předpokladem pro biologickou aktivitu glukanu je kostra tvořená řetězcem (1→3)-β-D-glukanu, a pro imunomodulační aktivitu je pravděpodobně také zásadní stočení hlavního řetězce do trojšroubovice [2]. V buněčné stěně *S. cerevisiae* byla již pomocí ¹³C-NMR tato konformace (1→3)-β-D-glukanu prokázána [16]. Tříhelixová konformace základního řetězce se obecně vyskytuje u delších jednořetězcových β-glukanů a přítomnost postranních (1→6)-β glykosidových řetězců působí při stimulaci imunitního systému synergicky [1]. Udává se, že nejúčinnější jsou β-glukany s molekulovou hmotností kolem 5000 až 10000 kD [17], záleží ovšem také na způsobu podání, například při intravenózní aplikaci glukánů musí být jejich molekulová hmotnost snížena tak, aby byl zcela rozpustný ve vodě [18], [19].

2.1.2 Izolace β-D-glukanů

Pro izolaci nejčistších β-glukanů jsou nejvhodnější kvasinky. Například *S. cerevisiae* používaná pro výrobu alkoholu je vystavována stresovým podmínkám, a tak v buněčné stěně obsahuje mnoho β-glukanů (v průměru je to 16,5 % sušiny) [18], [20], [21]. Nicméně ve formě pekařského droždí má mnohem vyšší poměr β-glukanů ku α-mananům, proto je mnohem výhodnější používat pekařské droždí pro získání čistších (1→3,1→6)-β-D-glukanů, obzvláště pro

použití v potravinářském průmyslu [18], [22]. Proces izolace β -glukanů je většinou patentovaný, ale ve výsledku se patenty liší pouze v detailech. Nejprve je vhodné oddělit buněčné stěny od zbytku buněčného materiálu. Většinou se provádí autolýza buněčných stěn při asi 45-65 °C a při mírně kyselém pH, je ale možné použít i enzymatický rozklad (například pomocí přečištěné lytikázy). Následně jsou buněčné stěny získány centrifugací, a to díky jejich větší hustotě a nerozpustnosti oproti jiným složkám buněk. Buněčné stěny mohou být dále inkubovány s alkalickou proteázou pro odstranění mananové frakce. V alkalickém prostředí lze tedy separovat proteiny i manany od glukanů, které v roztoku zůstávají jako suspendované částice. Další centrifugací již lze získat nerozpustné β -glukany, které lze přímo sprejově vysušit s výslednou čistotou zhruba 65 % [7], [12], [23], [24]. Pro další přečištění mohou být ještě před sušením použity enzymy jako glukoamyláza nebo lipázy pro odstranění reziduálních lipidů. Výsledným produktem je práškový glukan o čistotě vyšší než 90 %, bez zápachu a použitelný v potravinářském průmyslu. Může být také zahrnuta částečná hydrolyza v alkalickém nebo kyselém prostředí pro snížení molekulové hmotnosti [18].

Frakce α -manoproteinů může být také zakoncentrována, a to membránovou ultrafiltrací, obsahuje totiž ještě zhruba 54,5 % celkových glukanů v sušině, z čehož asi 29,2 % jsou α -manany. Po vysušení mají manoproteiny podobu světle hnědého prášku o koncentraci asi 40 %. Frakce bohatá na α -manany je hojně využívána v krmivářském průmyslu [18], [23].

2.2 Biologické účinky β -D-glukanů

Hlavním působištěm β -glukanů je imunitní systém, kde díky imunomodulaci mohou vykazovat protirakovinné, antioxidační nebo antibakteriální účinky. V osmdesátých letech byla také jako další účinek objevena stimulace krvetvorby a mnoho pozornosti je v posledních letech věnováno účinkům na snižování cholesterolu v krvi [1], [14].

Jelikož jsou β -glukany vysoce evolučně konzervované struktury, naše tělo je rozpozná jako složky potenciálně patogenních organismů (bakterií, kvasinek nebo plísní). Takové struktury se označují jako PAMPs, z anglického Pathogen Associated Molecular Patterns [17]. Lze tedy říci, že schopnost rozpoznávat β -glukany jako cizorodé látky je fylogeneticky zakódována u všech mnohobuněčných živočichů od bezobratlých až po člověka [6]. PAMPs jsou u obratlovců rozpoznávány díky receptorům buněk přirozené imunity, které nazýváme PRR (Pattern Recognition Receptors). Jejich největší exprese je dosažena u makrofágů, dendritických buněk, leukocytů a tzv. NK buněk (Natural killer cells) [17]. V souvislosti s β -glukany byly prokázány jako nejaktivnější receptory CR3, dectin-1, laktosylceramid a TLR2.

CR3 je nejdůležitější receptor, který zprostředkovává odstraňování opsonizovaných komplexů fagocytárním systémem, hlavně pomocí makrofágů, neutrofilů a NK buněk. Receptor dectin-1 po navázání β -glukanu spouští fagocytózu, mimo jiné i nevstřebatelných β -glukanových řetězců a tím dojde k jejich přenosu k dalším složkám imunitního systému. Toll-Like receptory velmi úzce spolupracují s receptorem dectin-1 a dochází k syntéze cytokinů (konkrétně interleukinů IL-2, IL-10 a IL-12, nebo TNF- α), a tedy i k aktivaci T-lymfocytů [1], [4].

Největší aktivace je dosažena u makrofágů, které mají na povrchu svých buněk jak CR3 receptor, tak dectin-1 [25]. Makrofágy jsou evolučně nejstarší buňky plnící obrannou roli a nacházejí se prakticky v každém orgánu. Neustále analyzují své okolí tak, aby organismus co nejrychleji zbavili cizorodých látek fagocytózou. Při vývoji makrofágů v kostní dřeni může

glukan též zasáhnout, a to ve stádiu monocytu, kdy jsou tyto buňky ovlivněny svým okolním prostředím a poté dozrávají a osídlují orgány a tkáně, kde dosáhnou svého finálního stádia [2], [1], [17], [14]. Aktivované makrofágy úzce spolupracují s T-lymfocyty, a společně dokážou ničit i nádorové buňky [1]. Účinky β -glukanů na makrofágy lze sledovat i při hojení ran, kdy je díky β -glukanům zlepšen transport makrofágů do místa rány, je také stimulován vznik granulační tkáně a je podpořena reepitelizace [26], [27].

Bylo také prokázáno, že ve spojení s huminovými kyselinami, nebo třeba s vitamínem C a resveratrolem vykazují glukany ještě mnohem silnější biologické účinky, a to díky synergickému působení [28], [29], [30], [31]. β -glukan má také prokazatelné účinky na snižování hladiny cholesterolu v krvi, nicméně přesný mechanismus zatím také není objasněn. Jedná se o velmi žádoucí efekt, vzhledem k tomu, že kardiovaskulární onemocnění jsou stále běžnou příčinou smrti obyvatel západních států [32].

2.3 Aplikace β -D-glukanů

Vzhledem k tomu, že většina starších studií zabývajících se účinky β -glukanů používala k testování materiál o nedefinované čistotě, bylo poměrně obtížné prokazovat jeho účinky na lidské zdraví a proces schválení β -glukanů v potravinářském průmyslu byl velice zdoluhavý. V současné době probíhají studie na lidech i na zvířatech s vysoce přečištěnými glukany, jedná se nejčastěji o nerozpustný WGP (whole glucan particles) v případě orálního podání, nebo rozpustný kvasničný PGG (poly-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopyranozyl-(1 \rightarrow 3)- β -Dglukopyranoza) v případě intravenózního podání [19], [33]. Aplikace ve farmaceutickém průmyslu prozatím nejsou v EU schváleny, nicméně v potravinářském i kosmetickém průmyslu, nebo v potravinových doplňcích se s jejich použitím již běžně setkáváme [18], [34]. Například kvasinka *S. cerevisiae*, její buněčná stěna a produkty její frakcionace (tedy i β -glukany) mají status GRAS (udělený FDA roku 1997) a mohou tak být použity jako ingredience při výrobě potravin. EFSA schválila β -glukany jako bezpečnou ingredienci až roku 2011, a povolila jejich použití jako potravinového doplňku [18].

2.3.1 Potravinářský a krmivářský průmysl

Pro potravinářské účely je prodáván velmi čistý glukan například WGP® nebo BetaRight®. Využití má v pekařských výrobcích, cereáliích, jogurtech, ovocných džusech, majonézách, omáčkách nebo sýrech. Většina potravinářských aplikací je patentována výrobcem. Velkou výhodou glukanů je, že jsou bez zápachu a nemění chuť výrobku [35], [36], [37]. β -glukany lze uplatnit při zahušťování, stabilizaci emulzí, nebo při tvorbě gelů, je tedy možné jimi nahradit tradiční zahušťovadla jako jsou arabská guma, algináty, pektin, karboxymethylcelulóza, nebo xanthanová guma. Mimo jiné takto do potravin inkorporujeme rozpustnou vlákninu, která je ve stravě při dnešních stravovacích návycích u většiny lidí deficientní. Glukany pro potravinářství mohou být extrahovány z různých zdrojů, například ovesný β -glukan (“Oattrim”), dále extrakt z ječmene (“NutrimXe”), nebo rýžový extrakt (“Ricetrim”). Do bezlepkových pekařských výrobků byl s velkým úspěchem přidáván i kvasničný glukan [5], [36], [38], [39]. Po přidání β -glukanu do mouky lze sledovat zvětšení objemu pečiva, ale i větší pevnost kůrky chleba. Ve fázi zpracování těsta lze zase sledovat lepší rheologické vlastnosti, přídavek β -glukanů tedy nalezneme i v mnoha sušenkách. Při obohacení těstovin o větší množství β -glukanů byla zase sledována nižší glykemická odezva [40], [41], [42], [43], [44]. Využití glukanů ale nalezneme

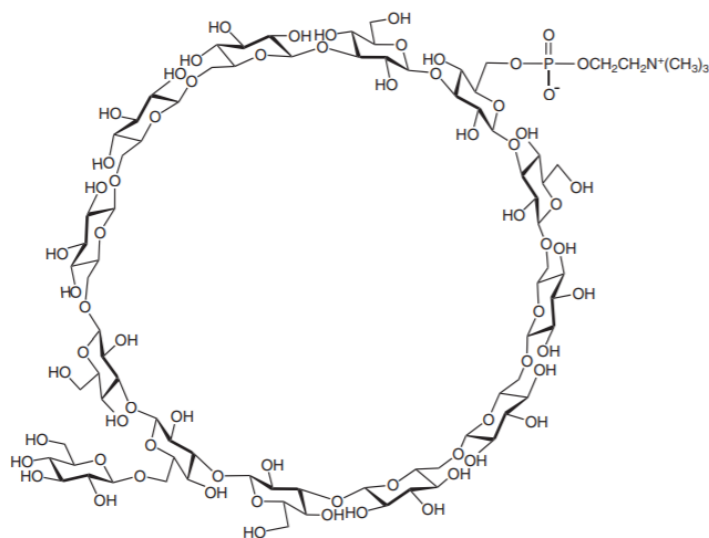
i v nápojích, při úpravě viskozity například v pomerančových džusech, nebo v mléčných výrobcích, konkrétně při výrobě nízkotučných sýrů, ale i v jogurtech, zmrzlinách a ve spoustě dalších výrobcích, kde je třeba nahradit tuk za současného zachování textury [35], [45], [46]. Roku 1997 dokonce FDA povolila označovat potraviny s obsahem β -glukanů, jako potraviny, které pomáhají snižovat riziko srdečních onemocnění, a to hlavně díky snižování obsahu cholesterolu v krvi [15], [34], [47].

Zajímavý doplněk stravy je vyráběn díky kultivaci *S. cerevisiae* v mediu se Selenem [48], [49]. Jelikož kvasinky nemají k dispozici geny regulující metabolismus selenu, zpracují jej stejně jako síru (z důvodu velmi podobných chemických vlastností těchto prvků) a náhodně jej inkorporují například do Se-glutathionu, Se-adenosylhomocysteinu, nebo Se-methioninu [50]. Výsledný produkt je komerčně dostupný jako Sel-Plex® a měl by udržovat zdravý metabolismus, vzhledem k naší potřebě Selenu pro inkorporaci do více než 25 enzymů [51].

Využití mají β -glukany i v krmivech, dostupný je například vyvazovač mykotoxinů a těžkých kovů Mycosorb®, který z krmiv odstraňuje nejvíce problematické mykotoxiny jako jsou aflatoxin, citrinin, ochratoxin A, patulin, nebo ergotové alkaloidy [52], [53], [54], [55], [56]. Po separaci β -glukanů o čistotě více než 90 %, zůstávají nevyužity α -manany. Tato frakce buněčné stěny kvainek je využitelná jako krmivo hospodářských zvířat, příkladem mohou být komerční produkty Bio-Mos® nebo Actigen™, který zlepšuje imunitní systém krmených zvířat [57], [58].

2.3.2 Farmaceutický průmysl

Velké využití má cyklický (1 \rightarrow 2)- β -glukan v obvazových materiálech i v materiálech používaných na hojení popálenin, nebo jako nový materiál pro enkapsulaci léčiv. Je produkován zástupci čeledi *Rhizobiaceae* a je oproti cyklodextrinu a chitozanu (doposud používané) výrazně rozpustnější ve vodě [59]. Z houby *Schizophyllum commune* byl dokonce izolován komplex chitozanu, chitinu a glukanu (ChCsGC) se skvělými antibakteriálními účinky, konkrétně proti *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, nebo *S. aureus* [60]. Pro enkapsulaci léčiv je také zkoumán kurdlan ve spojení s již používaným PEG [61]. Struktura ve vodě rozpustného bakteriálního (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)- β -glukanu je zobrazena na obrázku 2.



Obrázek 2: Struktura cyklického (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)- β -glukanu [13]

Lentinan a schyzofylan jsou již schváleny jako léčivo v Japonsku, kde pomáhají při léčbě rakoviny. Již mnoho studií dnes dokazuje vliv β -glukanů na inhibici růstu nádorů, ale i na rychlejší zotavení po chemoterapii. Mezi velmi účinné β -glukany se v této oblasti dále řadí pachymaran, skleroglukan, kurdlan, nebo grifolan. Použití glukanů je také testováno současně s monoklonálními protilátkami, kdy byl prokázán synergický účinek, a jsou také testovány deriváty glukanů jako karboxymethylpachymaran, hydroxypropylpachymaran, karboxymethylkurdlan, sulfoethylkurdlan, nebo sulfopropylkurdlan. Problémem ale zůstává nedostatečné popsání mechanismu účinku [32], [61], [19].

Glukan má teěž slibnou budoucnost v oblasti poživ a plnidel léků. Například při použití spolu s tradičními plnidly jako jsou hydroxypropylcelulóza nebo polyvinylpyrrolidon, vznikne pilulka mnohem tvrdší, ovšem s mnohem kratší dobou rozpuštění [18].

2.3.3 Kosmetický průmysl

Jelikož jsou glukany velmi dobrými stabilizátory emulzí, mají příjemnou texturu a antioxidační účinky, jsou využívány i v kosmetických přípravcích. Bylo zjištěno, že kvasničný glukan podporuje růst keratinocytů, a celkově zvyšuje míru obnovení rohové vrstvy (*stratum corneum*). Ovesný glukan má zase zklidňující a hydratační účinky a celkově zlepšuje fyzikálně-chemické vlastnosti pokožky. Schyzofylan a pleuran dokonce zmírňuje projevy atopické pokožky a zabraňuje bakteriálním infekcím postižených míst. Výroba takových kosmetických produktů je stejně jako výroba potravinových doplňků z glukanů patentována [15], [18], [62]. Příkladem mohou být produkty slovenské biotechnologické firmy Pleuran s.r.o. Imunoglukan P4H[®], které zahrnují tělová mléka i krémy. Dostupné jsou také opalovací krémy a oleje. Ovesné β -glukany taktéž našly praktické využití v kosmetice, dostupná je například kosmetika Avenacare [15].

2.4 Kvasinky

Kvasinky jsou jednobuněčné chemoorganotrofní organismy, které zdroj uhlíku zpracovávají převážně kvašením a jsou řazeny do říše *Fungi*. Rozmnožují se vegetativně dělením, nebo pučením, a některé mají schopnost i pohlavního dělení, a to pomocí endospor (askospory) nebo exospor (bazidiospory). Kvasinky patřící do oddělení *Ascomycetes* (houby vřeckovýtrusé), nebo *Basidiomycetes* (houby stopkovýtrusé) jsou tzv. telemorfnní formy (perfektní) a kvasinky patřící do oddělení *Deuteromycetes*, jsou tzv. anamorfnní formy (imperfektní), u nichž není znám pohlavní způsob rozmnožování [63].

Stejně jako i jiné eukaryotické buňky, i kvasinky se brání stresovým podmínkám produkcí specifických metabolitů. V přítomnosti intenzivního UV záření mohou produkovat karotenoidy, specificky akumulují trehalózu, při vyšším osmotickém tlaku využívají pevné buněčné stěny. Některé kvasinky mají také schopnost syntetizovat EPS tvořící ochranné pouzdro buňky [64], [65].

Největší výhodou kultivace kvasinek je nenáročnost na substrát a schopnost využít i levné zdroje uhlíku, či dokonce odpadní materiály. Příjem hexóz je uskutečňován membránovými proteiny. Kvasinky obsahují dva typy těchto hexózových transportérů. První z nich zprostředkovávají usnadněnou difúzi a ke svému fungování nepotřebují energii. Druhé přenáší současně protony a hexózy, k fungování vyžadují energii a fungují pouze při nízké koncentraci sacharidů v médiu. Obecně platí, že každý kmen může mít transportéry s různou afinitou

k různým cukerným zdrojům. Celkově nejvíce přenašečů bylo prokázáno u rodu *Rhodotorula*, méně jsou zastoupeny například u rodu *Saccharomyces* [66], [67]. Nejvíce preferovaným substrátem heterotrofních kultivací kvasinek je glukóza. Glukózová represe zastává hlavní regulační mechanismus metabolismu sacharidů a je zodpovědná za represí mnoha enzymů glukoneogeneze, nebo Krebsova cyklu. Citlivost ke katabolické represí ale není u všech kmenů kvasinek stejná [63], [68].

Další velkou výhodou kultivace kvasinek je poměrně krátká generační doba, jakmile se tedy kvasinky dostanou do logaritmické fáze růstu, riziko bakteriální kontaminace je velmi malé. Down-stream procesy jsou taktéž snadno proveditelné, biomasu lze snadno zcentrifugovat a zbavit nečistot filtrací. Pro krmivářské účely se v poslední době využívá biomasy zbavené buněčných stěn, pro zvýšení obsahu aminokyselin a vitamínů [69], [70], [71].

2.4.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Zástupci rodu *Saccharomyces* velmi intenzivně zkvašují sacharidy a jejich využití ve fermentačních procesech napříč potravinářským průmyslem je již notoricky známo. *Saccharomyces cerevisiae* je díky tomu považována za GRAS organismus a je nejintenzivněji studovaným eukaryotickým organismem [63].

S. cerevisiae má poměrně úzký výběr sacharidů, které může využívat jako efektivní zdroj uhlíku pro růst a fermentaci. Obsahuje pouze jeden typ hexózových transportérů, konkrétně ty, které usnadňují difúzi a nevyžadují energii. Dobrým substrátem jsou glukóza, fruktóza, manóza, galaktóza, nebo disacharidy maltóza a sacharóza. *S. cerevisiae* patří mezi kvasinky, které jsou schopné odbourat glukózu oxidativním způsobem, ale i redukcí, v závislosti na růstových podmínkách. Batch kultivace *S. cerevisiae* tak bývají doprovázeny tvorbou ethanolu, jehož uvolnění do média nastává ve chvíli kdy již kvasinka není schopna využít cukernatý substrát [68], [67], [72]. Velmi zajímavým jevem je diauxie, která se projevuje při kultivaci *S. cerevisiae* v přítomnosti glukózy jako jediného uhlíkatého zdroje. V první fázi narůstá biomasa a pomalu se hromadí ethanol. Jakmile je glukóza z média vyčerpána, vyprodukovaný ethanol slouží jako substrát pro další růst. Tento jev se zdá být typický i pro ostatní kvasinky, které při kultivaci za aerobních podmínek vždy produkují ethanol [73], [74].

2.4.2 *Rhodotorula glutinis*

Kvasinky rodu *Rhodotorula* nezakvašují žádné cukry, pro využití glukózy jim slouží pentózový cyklus. Vyskytují se běžně v ovzduší a jako ochranu proti UV záření syntetizují karotenoidní barviva, díky kterým jsou jejich kolonie zbarveny oranžově až do červena [64]. *Rhodotorula glutinis* syntetizuje zejména torulen (je považován za bezpečné potravinářské aditivum) [75], a jeho syntézy je schopna i z velmi levných zdrojů uhlíku [76]. Dále syntetizuje ve velkém množství torularhodin a β -karoten, ten je dokonce napříč všemi druhy vždy nejzastoupenějším pigmentem. Stejně jako ostatní zástupci rodu, i *R. glutinis* produkuje velké množství lipidů, které by mohly být zdrojem cenných mastných kyselin, konkrétně asi 80 % sumy mastných kyselin tvoří kyseliny olejová, linoleová a palmitová. Zástupci rodu *Rhodotorula* produkují také značné množství EPS [65], [77].

2.4.3 *Cystofilobasidium macerans*

Stejně jako *Rhodotorula*, rod *Cystofilobasidium* cukry nezkrvašuje, ale má široké spektrum substrátů, které využívá. V rámci rodu vyniká *C. macerans* schopností růstu v médiu s obsahem erytritolu. Nálezy rodu *Cystofilobasidium* nalezneme v přírodě nejčastěji ve vodním prostředí, a to převážně v chladnějších oblastech (Norsko, Dánsko). V tekutém médiu má korálově-červenou barvu, kolonie mají hladký, lesklý povrch [78], [79]. V rámci biotechnologického využití byla u *C. macerans* zkoumána produkce enzymů polygalakturonázy, pektin lyázy, nebo pektin esterázy. Nahradit by pak mohla hojně využívaný druh *Aspergillus niger*, který je již schválený jako GRAS organismus, nicméně enzymy *C. macerans* mohou zachovat specifitu za nižší teploty, a tak je z hlediska zabránění mikrobiální kontaminace mnohem výhodnější jejich použití v potravinářském průmyslu. Žádné klinické potíže nejsou v souvislosti s *C. macerans* brány v úvahu, jelikož při 37 °C již buňky tohoto druhu nerostou [80].

Spektrum produkovaných karotenoidů je velmi podobné spektru *R. glutinis*, až na jisté výjimky. Například torularhodin, běžný produkt oxidace karotenoidů, se ve spektru karotenoidů *C. macerans* neobjevuje, nicméně meziprodukty jeho biosyntézy ve spektru prokázány byly. Jedná se o 16'-hydroxytorulen a torularhodinaldehyd, které nebyly u jiných rodů kvasinek prokázány [81], [82].

2.4.4 *Sporidiobolus metaroseus*

Rod *Sporidiobolus* své substráty nezkrvašuje, stejně jako oba dva výše uvedené druhy červených kvasinek. V rámci koenzymů v jeho buňkách dominuje koenzym Q10. Barva v tekutém médiu je převážně růžová, produkuje tedy mnoho karotenoidů. Kolonie mají máslovitou konzistenci a jsou na povrchu hladké. *S. metaroseus* je pohlavním stádiem *Sporobolomyces roseus* [83]. Většinou je *S. metaroseus* izolován z Evropských rostlin a zkoumáno je využití tohoto druhu při zpracování lignocelulózy, nebo biotransformace ligninových materiálů, ale také se zdá být slibným producentem karotenoidů [76], [84], [85]. Jelikož při 37 °C již buňky tohoto druhu nerostou, a jeho nálezy jsou přírodního původu, není pravděpodobný lidský patogen [83].

2.5 Kvasinky jako zdroj β -D-glukanů

Vzhledem ke složení buněčné stěny kvasinek, kde má glukan hlavní strukturní funkci, je možné jej izolovat téměř z každého druhu [14]. Například buněčná stěna *S. cerevisiae* tvoří asi 15–30 % hmotnosti sušiny buněk [86]. Z toho asi 80–90 % zaujímají polysacharidy [63]. Nejvyšší podíl z těchto polysacharidů pak zaujímají vlákna (1→3)- β -glukanů (50 %) a manoproteiny (40 %). V menším množství je zastoupen větvený (1→6)- β -glukan (10 %) a minoritní složkou buněčné stěny je také chitin (1–3 %) [86]. O složení buněčných stěn jiných rodů kvasinek zatím není mnoho dostupných informací, dostupné informace jsou ale například o EPS. Mezi producenty EPS patří například rod *Rhodotorula* [63]. V médiích s vysokým C/N poměrem lze tyto EPS izolovat ve větším množství, tyto experimenty byly ovšem prováděny převážně s houbami [87], [88].

Glukany buněčné stěny kvasinek mají tedy hlavní řetězec spojený (1→3)- β -vazbami, a větvení tohoto řetězce se vyskytuje v poloze 6. Manany jsou v buněčné stěně často vázány s proteiny a jejich koncentrace je nejvyšší ve vnější vrstvě. Jejich hlavní řetězce obsahují (1→6)- α -vazby, postranní řetězce jsou připojeny v poloze 2 a 3 a jsou také vázány

s molekulami glukanu. S glukany je propojen i chitin, polymer N-acetylglukozaminu, a vyskytuje se spíše ve vnitřní vrstvě buněčné stěny. Další složky buněčné stěny zahrnují například lipidy, nebo anorganický fosfát [63], [8], [12].

Řada studií prokázala, že i když fyzikálně-chemické vlastnosti glukanu ovlivňují jejich biologickou aktivitu, mnohem důležitější je jejich čistota. Z tohoto důvodu jsou pro izolaci vhodnější kvasinky, jejich glukany jsou totiž lépe definovatelné, mají větší biologickou aktivitu, a také jsou levným zdrojem [1]. Rozdíly, mezi β -glukany z různých kmenů kvasinek jsou ve stupni větvení (1 \rightarrow 3)- β lineárního řetězce [10]. To se také zdá být jako zásadní parametr určující imunomodulační aktivitu glukanu, a za ten nejaktivnější je považován glukon *Saccharomyces cerevisiae*. Faktem ovšem je, že právě *S. cerevisiae* je mikroorganismem zdaleka nejprostudovanějším a její glukany byly mnohokrát analyzovány jak z hlediska struktury, tak z hlediska jejich biologických účinků. Studie zaměřené na podrobnou analýzu glukanu z jiných rodů kvasinek jsou velice ojedinělé [1], [65].

2.6 Mikrořasy

Mezi mikrořasy se řadí fotosyntetizující mikroorganismy, patřící do říše eukaryotické (řasy) i prokaryotické (sinice). Jedná se o fylogeneticky velmi staré organismy, které se dokázaly přizpůsobit mnoha extrémním stanovištím, a proto ve svých buňkách produkují různé sekundární metabolity, ochranné nebo zásobní látky viz Tabulka 1.

Tabulka 1: Nutričně důležité látky obsažené v biomase mikrořas, kromě polysacharidů [70]

Barviva a antioxidanty	Chlorofyl, fykocyanin, fukoxantin, β -karoten, astaxantin, lutein, zeaxantin, kantaxantin
Polynenasycené mastné kyseliny (ω -3, ω -6)	Linolenová, arachidonová, eikosapentaenová a dokosaheptaenová
Vitamíny	A, B1, B2, B3, B6, B12, C, E, H, kyselina listová, kyselina pantotenová
Esenciální aminokyseliny (> 5 g/100 g proteinů)	Leucin, valin, arginin, lysin, izoleucin, fenylalanin, thyrosin
Ostatní	Antibakteriální, antivirové a fungicidní látky, toxiny, steroly, minerály, vláknina a další

S rostlinami má většina řas mnoho společných metabolických drah. Pro člověka jsou prospěšné nejen přeměnou velkého množství vzdušného CO₂ na O₂, jsou také velmi hodnotným zdrojem živin. Obsahují mnoho antioxidantů, kromě známých karotenoidů a fenolických látek, obsahují některé kmeny i sulfo-deriváty polysacharidů [89], [90].

Sinice se mohou rozmnožovat pouze nepohlavně, a to dělením, u vláknitých druhů probíhá i fragmentace (hormogoniemi – dílčími pohyblivými vlákny), nebo tvorba klidových spor (akinety). Jednobuněčné řasy jsou schopny jak nepohlavního rozmnožování dělením a tvorbou spor, tak i pohlavního rozmnožování tvorbou gamet [69].

Buněčná stěna sinic, na rozdíl od jednobuněčných řas, neobsahuje celulózu a sinice jsou tak pro člověka lépe stravitelné. Je složena z lipoproteinů a pevného peptidoglykanu (mureinu). Murein zde tvoří síťovou strukturu, stejně jako v buněčných stěnách bakterií. Tato síťová struktura je tvořena N-acetylglukosaminem a kyselinou acetylmuramovou, které jsou spojeny

přes (1→4)- β glykosidické vazby. Další velmi zásadní rozdíl mezi jednobuněčnými řasami a sinicemi je v morfologii buňky, kdy u sinic chybí buněčné jádro a organely. Povrch buněk bývá také často pokryt glykokalyxem (slizovitý obal tvořený lipopolysacharidy) [69].

Pro kultivaci fotoautotrofních organismů, jako jsou mikrořasy, je zcela zásadní světelný režim. Fotosyntéza je pro tyto organismy zdrojem biomasy, kyslíku i energie pro metabolismus a růst. Prostup světla buněčnou suspenzí ovšem závisí nejen na intenzitě světla, ale i na intenzitě míchání, hustotě buněk a tloušťce kultury. Účinnost fotosyntézy bývá nejvyšší při nižším ozáření, a je tak možné získat co nejvíce biomasy. Pokud jsou ovšem husté kultury mikrořas dostatečně míchány, je zajištěna optimální výměna plynů a výživa, je dosaženo vysoké účinnosti přeměny sluneční energie. Velkým rizikem kultivací řas je bakteriální kontaminace, u velkokapacitních kultivací je tedy nutné provádět mikroskopickou kontrolu stavu kultury. Dále je nutno sledovat fyziologický stav buněk. Pro takové sledování je využíváno fluorescence chlorofylu [70], [90].

Je také prokázáno, že mikrořasy lze kultivovat i za heterotrofních podmínek, kdy dokonce produkují mnohonásobně více biomasy a akumulují více sacharidů (při fototrofních kultivacích akumulují více lipidů) [69], [91]. Pasivní difúze plasmatickou membránou je ovšem pro hexózy stericky nemožná. Hexózy tak do buňky pronikají díky inducibilnímu aktivnímu transportu pomocí membránového proteinu. Tyto membránové transportéry přenáší spolu s hexózou i protony (symport) a byly již mnohokrát prokázány například u *Chlorella vulgaris* [92], [93].

V současné době jsou kultivační systémy využívány jen pro několik málo kmenů mikrořas. Jsou to kmeny, které se vyznačují vysokou rychlostí růstu, jsou adaptabilní vůči podmínkám kultivace, a hlavně produkují vysoké množství požadovaných látek. Jedná se například o rody *Chlorella*, *Arthrospira*, *Dunaliella*, *Haematococcus* a *Nannochloropsis*. Zahuštění kultury je pak prováděno podle parametrů daného kmenu (zejména podle velikosti buněk). Zdaleka nejpoužívanější je ovšem centrifugace. Dále je součástí down-streamingu flokulace, kdy vznikají agregáty řas pomocí hlinitých nebo železitých solí, chitosanu, nebo pomocí změny pH. Pro použití v potravinářském průmyslu pak následuje lyofilizace (popřípadě jiný šetrný způsob sušení) a případně i extrakce. S ohledem na to, že mnoho druhů sinic produkuje cyanotoxiny, které jsou nebezpečné i pro člověka (neurotoxiny, hepatotoxiny, genotoxiny), musí doplňky výživy z mikrořas splňovat všechny příslušné požadavky na kvalitu a zdravotní standardy potravin a provozy pro produkci mikrořas a jejich zpracování musí mít zavedený a schválený systém HACCP [70], [71].

2.6.1 *Dunaliella salina*

Kmen salinní mikrořasy *Dunaliella salina* je kultivován ve velkých mělkých nádržích v západní Austrálii pro získání β -karotenu. Bičíkaté buňky *Dunalielly* mohou ve svých olejových kapénkách obsahovat až 10 % β -karotenu (vztaženo na sušinu), a ten je navíc doprovázen dalšími karotenoidy jako je lutein, neoxantin, zeaxantin a violaxantin. Otevřené systémy kultivace jsou používány mimo jiné pro kmeny se specifickými podmínkami růstu. U *Dunalielly* se jedná o vysokou koncentraci soli v médiu. Právě salinita kultivačních médií předurčuje *Dunaliellu* k velkému využití v biotechnologiích. Navíc byla u *Dunalielly* prokázána i možnost heterotrofní kultivace, kdy jako zdroj uhlíku může sloužit acetát, laktát, glukóza, nebo i glutamát [70].

2.6.2 *Desmodesmus acutus*

Technologie pro kultivace rodu *Desmodesmus* ve foto-bioreaktorech jsou v současné době ve vývoji, jejich rozmachu brání vysoká cena. Jedná se o druh s možností heterotrofní kultivace, kde jako organický zdroj uhlíku slouží glukóza [69]. Kultivace jsou zaměřeny na produkci xantofylů (lutein, violaxantin, zeaxantin), z nichž na trhu nejžádanější je lutein. Jedná se o rostlinný pigment, který je v současnosti získáván z aksamitníku vzpřímeného, jehož květy mohou obsahovat 0,10–0,16 % karotenoidů. Lutein je účinným antioxidantem (v těle člověka nedochází k přeměně na vitamín A) a jeho nadprodukce rodem *Desmodesmus* je tedy intenzivně zkoumána, a současně jsou prováděny kultivace za účelem nadprodukce aminokyselin [70], [71], [94], [95].

2.6.3 *Arthrospira maxima*

Jedná se o druh planktonní sinice obsahující mnoho proteinů se zastoupením esenciálních aminokyselin. Obsahuje také polynenasycené mastné kyseliny (α - a γ -linolenová kyselina a další). Sinice je velmi dobře stravitelná nejen díky absenci celulózy v buněčné stěně, ale i díky vysoké využitelnosti proteinů. Obsahuje také vitamíny B (thiamin, riboflavin, nikotinamid, pyridoxin, kyanokobalamin, kyselinu listovou), D a E, proto je její využití zaměřeno hlavně na potravinářský průmysl. Při kultivaci vyžaduje vysoké pH okolo 9 (pochází z alkalických jezer Mexika), kterého je dosaženo vysokým obsahem hydrogenuhličitanu. Pro velkoobjemové kultivace *Spiruliny* je využíváno otevřených nádrží, a to z toho důvodu, že oproti jiným sinicím roste velmi rychle. Vyznačuje se také vláknitým tvarem, což jí dává další výhodu v downstream procesech, jelikož k zahuštění kultury *Spiruliny* stačí pouze konvenční filtrace [69], [70], [89], [71].

2.6.4 *Cyanothece* sp.

Kmen morfologicky velmi různorodé sinice *Cyanothece* má důležitou roli v mořském ekosystému a značnou měrou přispívá ke správnému koloběhu dusíku a uhlíku. Jedná se o druh diazotrofní, což znamená, že dokáže fixovat atmosférický dusík. Klíčový je v tomto procesu enzym nitrogenáza, pro který je ovšem silně toxický kyslík vznikající při fotosyntéze, a tak tyto procesy musí být v buňkách časově či prostorově separovány [96].

Cyanothece je v poslední době je studována zejména kvůli produkci EPS do produkčního média. Produkce EPS se zdá být přímo úměrná růstové rychlosti sinice. Produkované EPS jsou tvořeny (1→6)- α -D-polysacharidem, kde převažují monomery glukózy a často obsahují různé aniontové skupiny. U sinic jsou tyto skupiny tvořeny velmi často kyselinou uronovou, pyruvylem nebo sulfoskupiny. U cyanothecky byla také mnohokrát prokázána přítomnost kyselin glukuronové a galakturonové [97], [98]. Na produkci EPS této sinice má hlavní vliv koncentrace NaCl v médiu, jeho pH a typ zdroje dusíku (jako nejvhodnější se zdají být 4,5% (w/v) NaCl, pH 7,0 a NaNO₃). EPS kmenu *Cyanothece* jsou produkovány ve formě slizu a očekávané jsou jejich velmi dobré chelatační účinky. Uplatnění mohou tyto EPS najít například v odstraňování barviv z odpadních vod, jelikož často jsou tato barviva odolná i k biooxidaci, a tak je vhodnější uplatnit jejich adsorpci [99], [100], [101].

2.7 Mikrořasy jako zdroj β -D-glukanů

Obsah polysacharidů v řasách se může pohybovat od 38 % do 74 % sušiny, většinou se ovšem jedná o stavební polysacharidy, jako jsou agary, karagenany a algináty. Ve hnědých mořských řasách lze nalézt i zásobní polysacharidy jako laminarin ((1 \rightarrow 3)- β -glukan), a ten je ve Francii z přebytku hnědých řas také získáván. V rámci třídy *Chrysophyta* lze najít také zástupce, kteří si jako zásobní polysacharid syntetizují chrysolaminarin ((1 \rightarrow 3)- β -glukan s občasným (1 \rightarrow 6)- β větvením). Chrysolaminarin bychom mohli nalézt například i v jednobuněčných mořských řasách patřících do třídy *Haptophyta*, *Xanthophyta*, nebo *Bacillariophyta* [1], [69], [102].

O β -glukanech mikrořas je ale jen velmi málo dostupných informací. Organismus, který je v této oblasti velmi dobře prozkoumán, a zároveň se nejvíce podobá mikrořasám, je *Euglena gracilis* [90]. Vzhledem k přítomnosti chloroplastů v jejích buňkách, je často řazena mezi řasy, nicméně za správné je dnes považováno zařazení mezi prvoky [103]. Polysacharidy obsažené v mikrořasách představují významné bioaktivní látky a často se jedná i o různé deriváty (například sulfo-deriváty). Příkladem komerčního produktu je *Chlorella* růstový faktor CGF (Chlorella Growth Factor), který se izoluje jako vodný extrakt biomasy a obsahuje mimo jiné (1 \rightarrow 3)- β -glukan. Účinky CGF zahrnují regeneraci tkání a ochranu buněk proti některým toxickým látkám [70], [71].

2.8 Metody stanovení β -D-glukanů

Stanovení glukanů je ovlivněno zdrojem, ze kterého je izolován, ale i metodou extrakce. Před analýzou je také nutno zvážit, s jakou přesností chceme glukany stanovit, zda je dostačující informace o jejich konfiguraci a množství, nebo je nutno zjistit i konformaci řetězce a do detailu popsat jeho strukturu. Pro velmi rychlou a jednoduchou orientaci stačí metoda, kdy se barvivo, jako například cellufluor, nespecificky váže na polysacharidy obsahující β -vazby a po promytí destilovanou vodou je měřena fluorescence vzorku. Pro spektrometrické metody lze dále použít anilinovou modř nebo calcofluor. Pro rychlé zjištění konformace (například trojitá šroubovice), kterou polysacharid v roztoku zaujímá, lze použít Kongo červeň, která s polysacharidy tvoří v roztocích NaOH komplex. Měřená jsou absorpční spektra v UV oblasti, kdy se mění absorpční maximum po přidavku polysacharidů do roztoku. Například po přidavku dextransu (obsahuje náhodné struktury cívky) je absorpční maximum komplexu 450 nm, zatímco po přidavku laminarinu (obsahuje tříhelikální struktury) je maximum 550 nm. Lze se také rychle zorientovat v distribuci molekulových hmotností. Pro taková měření lze použít gelovou permeační chromatografii s využitím kolon se stacionární fází na bázi agarózy (Sephacrose) nebo na bázi kopolymeru styrenu a divinylbenzenu (Styragel) [8], [12], [104], [105], [13].

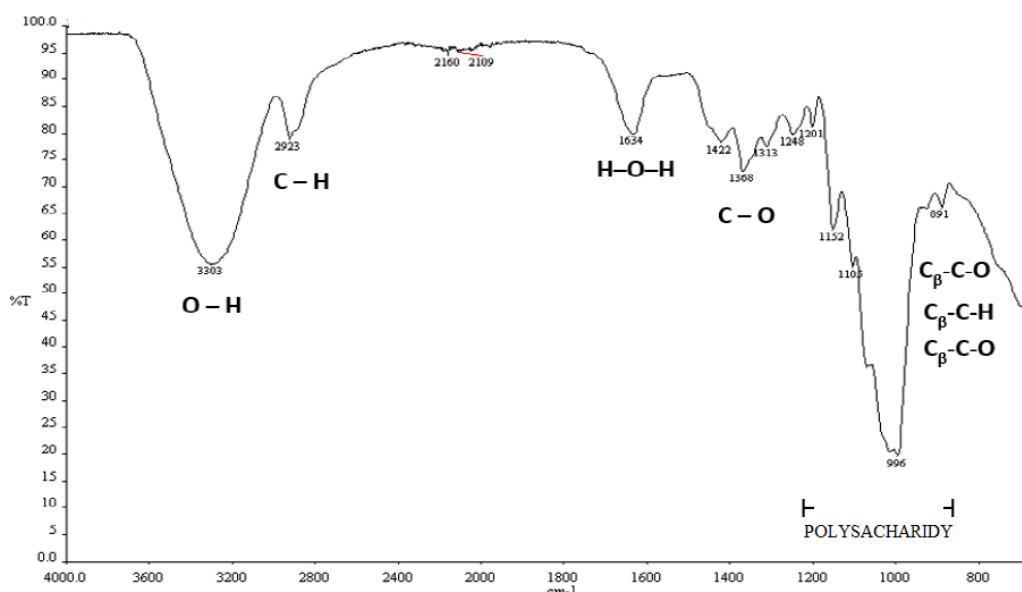
2.8.1 Enzymatické stanovení

Díky chemické hydrolyze komponent buněčné stěny a finálnímu štěpení glukanů pomocí enzymů je možné β -glukany stanovit z rozdílu obsahu celkových glukanů a α -glukanů. Lyofilizovaná biomasa buněk je podrobena působení H_2SO_4 a vysoké teploty. Působením KOH jsou solubilizovány téměř všechny složky buněčné stěny a pro kompletní rozštěpení (1 \rightarrow 3)- a (1 \rightarrow 6)- β -D-glukanů je dále nutno použít exo-(1 \rightarrow 3)- β -glukanázu a β -glukozidázu. Detekce monomerů glukózy je pak provedena pomocí roztoku GOPOD (obsahující glukóza-oxidázu a peroxidázu). Takto jsou stanoveny celkové glukany kvasinek. Pro stanovení pouze α -glukanů

je lyofilizát buněk inkubován pouze s roztokem KOH (který není schopen solubilizovat β -glukany). Dále jsou α -glukany podrobeny působení amyloglukozidázy a invertázy. Monomerní jednotky glukózy jsou opět stanoveny pomocí roztoku GOPOD. Z rozdílu obsahu glukózy příslušející celkovým glukánům a glukózy příslušející α -glukanům lze vypočítat obsah β -glukanů.

2.8.2 IR

Purifikované polysacharidy mohou být ve směsi s KBr stlačeny do formy tablety, která je pak proměřena pomocí FT-IR. Transmittance je pak měřena v rozmezí vlnové délky $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, v tomto intervalu se totiž projeví stretching vazeb O-H i C-H, a také vibrace vazby C-H [97], [100], [106]. Pro polysacharidy je pak nejtypičtější série píků v oblasti $1200\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ viz Obrázek 3.



Obrázek 3: FT-IR spektrum β -D-glukanu [106]

2.8.3 NMR

Vzhledem k tomu, že mikroorganismy bývají kultivovány za kontrolovaných podmínek, mohou inkorporovat některé stabilní izotopy z anorganických i organických sloučenin (např. ^{13}C , ^1H) do svých produktů, třeba do polysacharidů. Polysacharidy označené stabilními izotopy jsou pak použitelné pro analýzu struktury molekul [70]. Pomocí spekter ^{13}C -NMR lze zjistit konformaci molekul β -glukanů a ze spekter ^1H -NMR lze zjistit míru substituce postranními řetězci [8], [105].

2.8.4 HPLC

Pro kapalinovou chromatografii musí být vzorek nejprve upraven tak, abychom získali přечиštěné neutrální sacharidy. K takovému účelu může posloužit DEAE-C nebo ConA chromatografie [4], [23]. Po hydrolýze polysacharidového řetězce (například trifluoroctovou kyselinou a působením vysoké teploty), vysušení a převedení do vodného roztoku, lze pomocí kolony obsahující anexovou náplň (například Dionex CarboPac PA10) analyzovat zastoupení

jednotlivých monosacharidů či disacharidů. Mobilní fáze pak může tvořit deionizovaná voda, NaOH, nebo fosfátový pufr [23], [104].

Dalším způsobem HPLC analýzy glukánů může být analýza methylovaných derivátů glukózy. Methylace hydroxylových skupin probíhá v přebytku methylačního činidla (dimethylsodný a methyljodid) a je následována kyselou hydrolýzou. Uvolněné methylované deriváty glukózy (2,3,4,6-O-tetramethyl-D-glukóza; 2,3,4-O-trimethyl-D-glukóza; 2,4-O-dimethyl-D-glukóza) jsou analyzovány pomocí HPLC/MS, a podle poměru methylovaných derivátů lze zjistit větvení a konfiguraci [18].

2.9 Kvasinky a mikrořasy jako zdroj karotenoidů

Karotenoidy jsou jedním z nejběžnějších lipofilních pigmentů v přírodě a díky svým biologickým účinkům jsou široce využívány v potravinářském, farmaceutickém i kosmetickém průmyslu. Mohou být využity jako prekurzory vitamínu A, který si živočichové nejsou schopni syntetizovat sami, nebo může být využito jejich antioxidační aktivity, a to například v boji proti rakovině a kardiovaskulárním onemocněním [76]. Jejich účinek spočívá v ochraně membrány buňky proti kyslíkovým a peroxylovým radikálům. V nefotosyntetizujících organizmech hrají tedy karotenoidy zásadní roli v ochraně proti foto-oxidativnímu stresu. Míra těchto ochranných schopností je dána délkou polyenového řetězce chromoforu molekuly, ale i typem substituentů na jononovém cyklu [76].

Základní strukturu většiny karotenoidů tvoří tetraterpen. Úplným počátkem biosyntézy (izoprenoidní dráhy) je acetyl-CoA. Důležitým meziproduktem syntézy je isopentenyl-difosfát, který již kondenzuje s jeho dalšími molekulami až vznikne geranylgeranyl-difosfát s dvaceti atomy uhlíku, a kondenzací dvou molekul geranylgeranyl-difosfátu již vzniká nejjednodušší karotenoid, fytoen, který jako prekurzor tetraterpenů podléhá postupně dehydrogenaci za vzniku „all-trans“ konfiguraci [107], [95].

Karotenoidy tvoří dvě hlavní skupiny, první jsou karoteny (například β -karoten, torulen) a druhou skupinou jsou xantofyly, jejichž molekuly obsahují navíc atomy kyslíku (například astaxantin, kantaxantin). Také mohou být rozděleny na karotenoidy s acyklickou monocyklickou nebo bicyklickou strukturou. Jejich syntéza může být snadno provedena i chemickou cestou, nicméně mnohem atraktivnější formou je dnes výroba biotechnologická, a tak se stále hledají nejproduktivnější kmeny v řadách mikroorganismů. Například „červené kvasinky“, kam patří rody jako *Rhodotorula* nebo *Sporidiobolus*, jsou schopny syntetizovat směs mnoha karotenoidů, při růstu na médiích obsahujících levné zdroje uhlíku [76], [108]. Přídavkem látek, které jsou prekurzory reaktivních forem kyslíku (durochinon, H_2O_2 , ethanol), nebo například intenzivní aerací média pak lze u kvasinek docílit menší produkce β -karotenu, a upřednostněny jsou produkty jeho oxidace, tedy xantofyly (například plektaniaxanthin, kantaxanthin a astaxanthin nebo torularhodin) [81], [109].

Například rod *Rhodotorula* může produkovat specifické poměry karotenoidů (β -karotenu, torulenu, torularhodinu) v různém poměru, v závislosti na podmínkách kultivace [108], [77]. Ze zástupců mikrořas, je studovaným rodem *Dunaliella*, která je schopna produkce luteinu, β -karotenu a astaxantinu. Obecně je nespočet mikroorganismů, produkujících karotenoidy, nicméně chybí dostatek informací o optimálních podmínkách, při kterých by tyto organismy syntetizovaly karotenoidy v co největším množství [108].

2.10 Metody stanovení karotenoidů

Analýze karotenoidů z mikrobiální biomasy předchází náročný proces extrakce. Karotenoidy se totiž mohou vyskytovat ve volné formě, ale i ve formě esterů s mastnými kyselinami, jsou náchylné k oxidaci, izomeračním reakcím, hydrogenaci, nebo k cyklizaci, často jsou také asociované s buněčnými membránami. Prvním krokem jejich izolace je kompletní rozrušení buněk, tento krok je nejčastěji realizován za použití mechanických sil (intenzivní třepání suspenze buněk v přítomnosti skleněných kuliček), jejichž účinek je umocněn přidavkem rozpouštědla. Pro současné provedení rozrušení buněk a extrakce karotenoidů je vhodné přidat k suspenzi aceton, chloroform, petrolether, nebo jejich směs. Čistě chemické rozrušení buněk může být provedeno v přítomnosti dimethylsulfoxidu. Po odpaření rozpouštědla je již přidáno čisté rozpouštědlo HPLC kvality, a takto připravený vzorek může být ještě na kratší dobu uskladněn při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, kdy se na povrch vyplaví reziduální lipidy (ty by potom ucpávaly kolonu HPLC a zvyšovaly tlak při analýze) [76], [110].

Velmi jednoduchou metodou stanovení karotenoidů je spektrofotometrie, nicméně je použitelná pouze pro vzorky, které obsahují jen jeden typ karotenoidů. Pokud by se ve vzorku vyskytovala jejich směs, absorpční spektra by se mohla částečně překrývat, a tak by docházelo k velkým nepřesnostem [111]. Mnohem přesnější metodou je RP-HPLC, z chromatogramu pak lze kvantitativně vyhodnotit jednotlivé karotenoidy. Pro přesnou identifikaci struktury je možné použít analýzu pomocí LC-MS a porovnání hmotnostních spekter s jejich knihovny [112]. Pro velmi rychlou detekci karotenoidů byla také použita průtoková cytometrie, například u *R. glutinis* byla potvrzena dobrá korelace mezi měřenou autofluorescencí a obsahem β -karotenu. U ostatních mikroorganismů, kde β -karoten není nejvíce zastoupený karotenoid, by průtoková cytometrie poskytla velmi rychlý přehled o celkovém obsahu karotenoidů [113].

2.11 Kvasinky a mikrořasy jako zdroj lipidů

Lipidy jsou estery alkoholů a vyšších mastných kyselin a můžeme je klasifikovat na fosfolipidy, glykolipidy (mají strukturální funkci v buněčných membránách) a triacylglyceroly (zásobní lipidy, zdroje energie). V současné době je snaha dosáhnout kultivací mikroorganismů co nejvyššího zisku triacylglycerolů, které se jinak běžně vyskytují jako hlavní složky rostlinných olejů. U kvasinek je glycerol esterifikován převážně mastnými kyselinami se šestnácti a osmnácti atomy uhlíku. Také mnoho druhů mikrořas má schopnost produkovat značné množství (20 až 50 % sušiny) triacylglycerolů jako zásobní lipidy, a vzhledem k vysokému obsahu PUFA jsou tyto organismy preferovaným zdrojem. Do budoucna se ovšem u kvasinek předpokládají genetické modifikace, které i z nich udělají preferovaný zdroj. Nejžádanější jsou kyseliny linolová (LA), α -linolenová (ALA), arachidonová (AA), eikosapentaenová (EPA) a dokosahexaenová (DHA) [70], [71]. Aktuálně využívanými organismy jsou například kvasinka *Yarrowia lipolytica* (vysoký obsah EPA), nebo mikrořasa *Spirulina* (bohatý zdroj GLA) [114]. Poměr různých mastných kyselin, respektive lipidů, je pro mikroorganismy parametr určující správnou fluiditu a propustnost membrán. Z pohledu mikroorganismů tedy jisté vlastnosti membrány musí být zachovány, aby i funkce membránových proteinů zůstaly zachovány [115].

Na syntézu lipidů má vliv například teplota kultivace (ovlivňuje aktivitu desaturáz), vliv má také pH kultivačního média, ale zdaleka nejdůležitějším faktorem je dostupnost živin.

Například po vyčerpání dusíku z média, kdy buňky přestávají růst, jsou uhlíkaté zdroje postupně využívány jednak jako zdroj energie, ale i jako vstupní jednotky syntézy lipidů. Po vyčerpání dusíku je totiž citrát uvolňován do cytosolu, a u oleogenních kvasinek (a pravděpodobně i u mikrořas se schopností heterotrofního růstu) je právě citrát prekurzorem acetyl-CoA. Ten je pak převeden na malonyl-CoA a veškeré reakce již probíhají na enzymatickém komplexu syntézy mastných kyselin, dokud nevznikne kyselina palmitová, která je jako prekurzor mastných kyselin uvolněna z komplexu, a je dále přeměněna dle enzymatických možností daného organismu [114], [116], [117]. Proto vysoké C/N poměry indukují syntézu lipidů. Zdroj uhlíku pak ale musí být vybírán tak, aby byl pro daný druh nejvhodnější a jeho koncentrace musí být také v ideálním rozmezí. Aby byla biotechnologická výroba lipidů také ekonomicky výhodná, měla by být při kultivaci využita média obsahující průmyslové odpady, nebo lignocelulóзовou biomasu apod. Jako dobře využitelný odpad pro produkci lipidů se zdá být i odpadní tuk (například z masného průmyslu) [71], [77], [118].

2.12 Metody stanovení lipidů

Při stanovení lipidů se již standardně využívá plynové chromatografie, které předchází transesterifikace, díky které jsou uvolněné mastné kyseliny převedeny na methylestery. Před přidáním transesterifikační směsi je možné promýt suspenzi buněk ethanolem, nebo hexanem, pokud se u nich vyskytuje extracelulární tuk, například z kultivačního média. Často je také nejprve prováděna extrakce dle Folche. Transesterifikačním činidlem bývá směs silné kyseliny a methanolu a vzorek je v této směsi ponechán vždy za zvýšené teploty. Jako standard je napříč mnoha studiemi používaná heptanová nebo heptadekanová kyselina. Po transesterifikaci je přidáván vodný roztok NaCl, nebo NaOH a následně dochází k oddělení vodné a lipidové fáze. Oddělení fází může být urychleno centrifugací směsi. Odběr lipidové frakce je pak rozpuštěn například v chloroformu chromatografické kvality, a pomocí GC jsou estery mastných kyselin analyzovány při daném teplotním gradientu [115].

Velmi jednoduchou a rychlou metodou pro stanovení celkových lipidů je TLC na silikagelu, kde jako vyvíjecí směs může být použit roztok hexanu, diethyletheru a kyseliny octové [118].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

3.1.1 Izolace a analýza karotenoidů

Chloroform pro HPLC, Roth (DE)

Methanol pro HPLC, VWR Chemicals, Sigma-Aldrich (DE)

Acetonitril pro HPLC, VWR Chemicals, Sigma-Aldrich (DE)

3.1.2 Izolace a analýza mastných kyselin

Heptadekanová kyselina, Sigma-Aldrich (DE)

3.1.3 Kultivace mikroorganismů

Pepton, Roth (DE)

Agar, Himedia (IN)

Kvasničný autolyzát, Himedia (Indie)

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

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Penta (ČR)

Síran horečnatý heptahydrát p.a., Chemapol (ČR)

Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (CZ)

Citran železito-amonný, Fluka (DE)

Dusičnan kobaltnatý hexahydrát p.a., Penta (CZ)

Chlorid kobaltnatý hexahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (CZ)

Chlorid měďnatý dihydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (CZ)

Síran měďnatý pentahydrát, Penta (CZ)

Vitamin B12, Sigma-Aldrich (DE)

Chlorid železitý hexahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (CZ)

Síran železnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (CZ)

Kyselina boritá p.a., Lachema (CZ)

Hydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema (CZ)

Síran draselný p.a., Lach-ner, S.r.o. (CZ)

Chlorid draselný p.a., Lach-ner, S.r.o. (CZ)

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-ner, S.r.o. (CZ)

Dusičnan draselný p.a., Lach-ner, S.r.o. (CZ)

Kyselina citronová p.a., Lach-ner, S.r.o. (CZ)

Chlorid hořečnatý hexahydrát, Lachema (CZ)

Síran horečnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (CZ)

Chlorid manganatý tetrahydrát p.a., Lachema (CZ)

Síran hořečnatý monohydrát, Lach-ner, S.r.o. (CZ)

Chlorid sodný p.a., Penta (CZ)

Uhličitan sodný p.a., Lach-ner, S.r.o. (CZ)

Na₂-EDTA · 2H₂O p.a., Lach-Ner s r.o. (CZ)

Hydrogenuhlíčan sodný, Lachema (CZ)

Molybdenan amonný tetrahydrát p.a., Penta (CZ)

Molybdenan sodný dihydrát p.a., Penta (CZ)
Dusičnan sodný p.a., Lach-ner, S.r.o. (CZ)
TAPS, Sigma-Aldrich (DE)
Chlorid zinečnatý p.a., Lach-ner, S.r.o. (CZ)
Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (CZ)
Ostatní použité chemikálie byly vesměs čistoty p.a. a byly získány od běžných distributorů.

3.2 Přístroje a pomůcky

3.2.1 Kit K-YBGL – Megazym

Centrifuga vysokorychlostní chlazená Z 36 HK, HERMLE Labortechnik (DE)
Centrifuga U-32 R, Boeco (DE)
Vodní lázeň W 620E, LaboPLAY (PL)
Míchačka Vortex, Labnet International, Inc. (US)
pHmetr 211, HANNA instruments (US)

3.2.2 Izolace a analýza karotenoidů

HPLC/PDA: Sestava HPLC/MS (Thermo Fischer Scientific, US)
Termostat - LCO 101, Column Oven (ECOM, CZ)
Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR
Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR
Vyhodnocovací systém Xcalibur
Kolona Kinetex C18, 5 mm, 4,6 x 150 mm,
Phenomenex Držák předkolony - KJ0 - 4282, ECOM (CZ)
Předkolona - C18,AJ0 - 4287, Phenomenex
Filtry pro HPLC, PRE-CUT, Alltech (GB)

Vakuová rotační odparka RV06-ML, IKA (DE)

Ultrazvuk PS 02000 POWERSONIC s.r.o. (SK)

3.2.3 Izolace a analýza mastných kyselin

Termoblok SBH2000, Stuart (GB)

GC/FID:

Plynový chromatograf TRACE GC (ThermoQuest S.p.A., Itálie) Autosampler AI/AS 3000

Kapilární kolona: DB-WAX o rozměrech 30 mx 0,32 mm x 0,5 μm

3.2.4 Přístroje použité pro kultivace

Třepačka Yellow line RS10, (DE)

Analytické váhy Boeco (DE)

Spektrofotometr VIS, Helios δ, Unicam (GB)

Biologický termostat BT 120M, LABO – MS, spol. s r.o. (CZ)

Sterilační LIFE BOX, Esco Technologies, Inc. (US)

Lyofilizátor, Labconco (US)

3.3 Použité kmeny mikroorganismů

3.3.1 Kvasinky

Sporidiobolus metaroseus CCY 19-6-20

Rhodotorula glutinis CCY 20-2-26

Cystofilobasidium macerans CCY 10-1-2

Saccharomyces cerevisiae CCY 6646

3.3.2 Mikrořasy

Desmodesmus acutus CCALA 437

Dunaliella salina

3.3.3 Sinice

Cyanothece sp. ATCC 51142

Arthrospira maxima

3.4 Kultivace mikroorganismů

Všechny druhy kvasinek byly očkovány z kryozkumavek, které byly uchovávány v glycerolu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byly kultivovány ve stresových podmínkách v přítomnosti zdroje záření. Prvním mediem byly agarové plotny, následně byly kvasinky očkovány do inokula, a poté přímo do produkčního média. Každé médium bylo před zaočkováním sterilováno po dobu 60 minut při $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně ochlazeno na laboratorní teplotu. Poté bylo každé médium podrobeno ještě 20 minutám UV záření.

3.4.1 YPD agar

Každé kultivaci v produkčním mediu předcházela růst na YPD agaru po dobu 3 dnů. Agarové plotny byly zaočkovány kulturou z kryozkumavek a byly následně kultivovány v blízkosti zdroje osvětlení. Po 3 dnech růstu byly kvasinky zaočkovány do tekutého YPD inokula. Složení YPD agaru je uvedeno v tabulce 2.

Tabulka 2: Složení YPD agaru

Složka	Koncentrace [g/l]
Glukóza	20
Kvasničný autolyzát	10
Pepton	20
Agar	15

3.4.2 YPD médium

V YPD inokulu byly kvasinky kultivovány 2 dny. Kultivace v inokulu byla prováděna také v blízkosti zdroje osvětlení a médium bylo po celou dobu intenzivně mícháno. Z inokula byly kvasinky očkovány přímo do produkčního média v poměru 1:5. Složení YPD média uvádí Tabulka 3.

Tabulka 3: Složení YPD média

Složka	Koncentrace [g/l]
Glukóza	20
Kvasničný autolyzát	10
Pepton	20

3.4.3 Produkční média s různými C/N poměry

V produkčním médiu byly kvasinky kultivovány po dobu 6 dní, v blízkosti zdroje záření a v podmínkách intenzivního míchání. Produkčním médiem bylo buď YPD medium (pro screening růstových křivek), nebo produkční média s různými C/N poměry. Složení těchto produkčních médií uvádí Tabulka 4. Objem odebrané suspenze buněk byl vždy 50 ml.

Tabulka 4: Složení produkčních médií pro různé C/N poměry

Složka	C/N = 70	C/N = 90	C/N = 110
	Koncentrace [g/l]		
Glukóza	40	47	57
Kvasničný autolyzát	2		
KH ₂ PO ₄	4		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,7		

3.4.4 Produkční média pro mikrořasy

Mikrořasy a sinice byly kultivovány při laboratorní teplotě za neustálého osvětlení a vzdušnění. Pro kultivaci řas a sinic byla použita média, která slouží jako inokulační i produkční. Tato média byla sterilována 60 minut při 140 °C. Složení i příprava médií byla prováděna podle sbírky CCALA. Tabulka 5 obsahuje celkový obsah všech chemikálií v jednotlivých produkčních médiích jednotlivých druhů mikrořas.

3.4.4.1 Příprava média pro sinici *Arthrospira maxima*

Arthrospira maxima vyžaduje přípravu Spirulina média. Toto médium musí být připraveno ze dvou zásobních roztoků, které se zvlášť sterilují, a až v posledním kroku jsou tato média smíchána dohromady v poměru 1:1. Jeden zásobní roztok obsahuje NaHCO₃, Na₂CO₃ a K₂HPO₄. Druhý zásobní roztok obsahuje všechny zbylé chemikálie viz Tabulka 5.

3.4.4.2 Příprava média pro sinici *Cyanothece sp.*

Pro kultivaci *Cyanothece sp.* musí být vytvořeno médium ASP2. Těsně před jeho přípravou je nutno vždy nachystat čerstvý zásobní roztok CoCl₂ · 6H₂O, Na₂MoO₄ · 2H₂O a CuSO₄ · 5H₂O. Z tohoto zásobního roztoku je pak pipetováno potřebné množství do kultivačního média. Samostatně je také třeba připravit zásobní roztok Na₂EDTA · 2H₂O a FeCl₃ · 6H₂O. Jako první musí být rozpuštěna EDTA, až poté je pomalu přisypáván chlorid železitý a po jeho úplném rozpuštění se roztok nechá stát přes noc.

3.4.4.3 Příprava média pro řasu *Desmodesmus acutus*

Kultivace druhu *Desmodesmus acutus* vyžaduje BG11 médium. Při přípravě tohoto média je do destilované vody nejprve rozpuštěn zásobní roztok citrátu železito-amonného a kyseliny citronové. Až poté jsou rozpuštěny zbývající chemikálie a médium může být sterilováno.

Tabulka 5: Složení kultivačních médií mikrořas

Chemikálie	BG11	Spirulina	Dunaliella	ASP2
	Koncentrace v konečných kultivačních médiích c [g·l ⁻¹]			
CaCl ₂ · 2H ₂ O	3,5·10 ⁻²	4,0·10 ⁻²	0,3	0,4
Citrát železito-amonný	6,0·10 ⁻⁶	–	–	–
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	4,9·10 ⁻⁵	5,0·10 ⁻⁶	–	–
CoCl ₂ · 6H ₂ O	–	–	5,1·10 ⁻⁵	1,2·10 ⁻⁵
CuCl ₂ · 2H ₂ O	–	–	4,1·10 ⁻⁵	–
CuSO ₄ · 5H ₂ O	7,9·10 ⁻⁵	2,5·10 ⁻⁸	–	3,0·10 ⁻⁶
Cyanobalamin (B12)	–	5,0·10 ⁻⁶	–	–
FeCl ₃ · 6H ₂ O	–	–	2,4·10 ⁻²	3,9·10 ⁻³
FeSO ₄ · 7H ₂ O	–	1,4·10 ⁻²	–	–
H ₃ BO ₃	2,9·10 ⁻³	5,0·10 ⁻⁵	6,1·10 ⁻⁴	3,4·10 ⁻²
K ₂ HPO ₄	3,1·10 ⁻²	0,5	–	5,0·10 ⁻²
K ₂ SO ₄	–	1,0	–	–
KCl	–	–	0,2	0,6
KH ₂ PO ₄	–	–	3,5·10 ⁻²	–
KNO ₃	–	–	1,0	–
Kyselina citronová	6,0·10 ⁻⁶	–	–	–
MgCl ₂ · 6H ₂ O	–	–	1,5	–
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7,5·10 ⁻²	0,2	0,5	0,8
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1,8·10 ⁻³	–	4,1·10 ⁻⁵	4,3·10 ⁻³
MnSO ₄ · H ₂ O	–	6,1·10 ⁻⁶	–	–
NaCl	–	1,0	29,2	18,0
Na ₂ CO ₃	2,0·10 ⁻²	4,0	–	–
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	1,0·10 ⁻³	8,3·10 ⁻²	1,9·10 ⁻²	3,6·10 ⁻²
NaHCO ₃	–	13,6	4,3·10 ⁻²	–
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	–	–	3,8·10 ⁻⁴	–
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	3,9·10 ⁻⁴	5,0·10 ⁻⁶	–	4,4·10 ⁻⁵
NaNO ₃	1,5	2,5	–	1,5
TAPS	–	–	–	3,7
ZnCl ₂	–	–	4,1·10 ⁻⁵	3,2·10 ⁻⁴
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2,2·10 ⁻⁴	5,0·10 ⁻⁶	–	–

3.4.4.4 Příprava média pro řasu *Dunaliella salina*

Média *Dunaliella* jsou často připravována s různými koncentracemi NaCl v produkčním médiu. Pro kultivaci byla zvolena standardní koncentrace 0,5M, což odpovídá 29,2 g NaCl v jednom litru média. Před přípravou kultivačního média je potřeba opět samostatně připravit zásobní

roztok $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Vzhledem ke stopovému množství některých chemikálií v médiu, je vhodné také připravit zásobní roztok ZnCl_2 , H_3BO_3 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

3.5 Izolace a analýza β -D-glukanů

Nejprve byly připraveny pomocné roztoky, které nejsou součástí kitu K-YBGL Megazyme. Poté byly rozředěny jednotlivé části kitu (dle příloženého návodu výrobce) a pomocí těchto roztoků byly analyzovány β -glukany v biomase kvasinek a mikrořas. Pro měření kitu byla navažována lyofilizovaná biomasa ve formě jemného prášku. Vzhledem k omezenému množství lyofilizátu, byl postup měření kitu pozměněn tak, aby bylo možno navážit jen přibližně 30 mg a pro ověření správnosti měření byl použit kontrolní vzorek β -glukanu, který je součástí samotného kitu a má deklarovaný obsah β -glukanů.

3.5.1 Příprava pomocných roztoků

3.5.1.1 Hydroxid sodný (4 M)

Do 70 ml Milli-Q vody bylo za neustálého míchání po částech rozpuštěno 16 g NaOH. Po rozpuštění veškerého NaOH byl roztok zchlazen na laboratorní teplotu a doplněn na 100 ml. Roztok byl skladován při laboratorní teplotě.

3.5.1.2 Acetátový pufr (200 mM, pH 5,0)

Do 900 ml Milli-Q vody bylo za neustálého míchání přidáno 11,6 ml ledové kyseliny octové a pH roztoku bylo pomocí 4M NaOH upraveno na hodnotu 5,0. Objem roztoku byl při laboratorní teplotě doplněn na 1000 ml a byl uchován při 4 °C.

3.5.1.3 Acetátový pufr (1,2 M, pH 3,8)

Do 800 ml Milli-Q vody bylo za neustálého míchání přidáno 69,6 ml ledové kyseliny octové a pH roztoku bylo pomocí 4M NaOH upraveno na hodnotu 3,8. Objem roztoku byl doplněn na 1000 ml a byl uchován při laboratorní teplotě.

3.5.1.4 Hydroxid draselný (10 M)

Do 350 ml Milli-Q vody bylo za stálého míchání po částech rozpuštěno 280,5 g KOH. Vše bylo prováděno v digestoři a roztok byl po zchlazení na laboratorní teplotu doplněn na objem 500 ml. Připravený roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

3.5.1.5 Hydroxid draselný (2 M)

Do 400 ml Milli-Q vody bylo za stálého míchání po částech rozpuštěno 56 g KOH. Vše bylo prováděno v digestoři a roztok byl po zchlazení na laboratorní teplotu doplněn na objem 500 ml. Připravený roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

3.5.1.6 Kyselina sírová (72%)

Do 150 ml Milli-Q vody bylo za stálého míchání po částech přilito 320 ml koncentrované kyseliny sírové a po zchlazení na laboratorní teplotu byl roztok doplněn na objem 500 ml.

3.5.2 Příprava reakčních roztoků z jednotlivých částí kitu

3.5.2.1 Část 1

K části 1 kitu (suspenze $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ obsahující $\text{exo-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta$ -glukanázu (100 U/ml) a β -glukozidázu (20 U/ml)) bylo přidáno 9 ml 200 mM acetátového pufru (pH 5,0). Finální objem roztoku (asi 11 ml) byl rozdělen na 4 části a uchován v plastových zkumavkách při -20°C . Při používání alikvótů byl roztok uchováván v chladu a co nejrychleji opět uložen do mrazu.

3.5.2.2 Část 2

Obsah části 2 kitu (roztok 50% glycerolu obsahující amyloglukozidázu (1,63 U/ml) a invertázu (500 U/ml)) nebyl nijak upravován, celý roztok byl uchováván při 4°C .

3.5.2.3 Část 3

Celý obsah části 3 kitu (pufr pro reakční roztok GOPOD obsahující p-hydroxybenzoovou kyselinu a azid sodný) byl rozpuštěn v Milli-Q vodě a doplněn na objem 1 litr. Po naředění byl tento roztok ihned použit k rozředění části 4 kitu.

3.5.2.4 Část 4

Část 4 kitu (enzymy pro reakční roztok GOPOD – glukóza-oxidáza a peroxidáza) byla nejprve rozpustěna ve 20 ml čerstvě naředěné části 3, a poté bylo celých 20ml převedeno do zbylých 980 ml naředěné části 3 kitu. Takto vznikl reakční roztok GOPOD, který je nutno rozdělit na alikvotní podíly, a každý alikvót musí být ukryt v hliníkové fólii.

Jeden alikvót roztoku byl uchováván při 4°C (použitelnost roztoku maximálně 3 měsíce). Zbylé alikvóty byly uchovávány před svým použitím při -20°C (použitelnost roztoku asi 1 rok), a poté pro aktuální používání byly uchovávány maximálně měsíc při 4°C .

3.5.2.5 Část 5

Obsah části 2 kitu (standardní roztok D-glukózy (1 mg/ml) v 0,2% kyselině benzoové) nebyl nijak upravován, celý roztok byl uchováván při 4°C . Část 5 kitu je stabilní i při pokojové teplotě (použitelnost 5 let).

3.5.2.6 Část 6

Obsah části 6 kitu (kontrolní vzorek 49% β -glukanu) nebyl nijak upravován, obsah této části je stabilní při pokojové teplotě (použitelnost 5 let).

3.5.3 Stanovení celkových glukanů

Na dno 10ml zkumavky se šroubovacím závitem bylo naváženo 30 mg lyofilizátu. K lyofilizátu byl přidán 1 ml ledové 72% kyseliny sírové, zkumavky byly uzavřeny a 2 hodiny byly temperovány v ledové lázni, za občasného intenzivního promíchání na vortexu.

Po 2 hodinách v ledové lázni bylo do zkumavek pipetováno nejprve 2, poté 3 ml vody a po každém přidavku byl obsah zkumavky intenzivně promíchán. Zkumavky byly poté umístěny do vroucí lázně, po 5 minutách byly pevně uzavřeny a v lázni byly ponechány 2 hodiny. Po zchlazení na laboratorní teplotu byly převedeny 3 ml vzorku do plastové 50ml zkumavky. Dále bylo přidáno 1,5 ml 10 M KOH a objem byl doplněn na 25 ml pomocí 200 mM acetátového pufru (pH 5,0). Obsah plastové zkumavky byl promíchán a centrifugován 10 minut při 1500

rpm. Po centrifugaci bylo pipetováno 50 μ l extraktu na dno skleněné zkumavky v duplikátu. Ke vzorku bylo pipetováno 50 μ l upravené části 1 kitu a obsah zkumavky byl promíchán. Směs byla inkubována 60 minut při 40 °C. Do zkumavek bylo pipetováno 1,5 ml reakčního roztoku GOPOD a byl připraven blank a standard. Pro přípravu blanku bylo na dno zkumavky pipetováno 0,1 ml 200 mM acetátového pufru (pH 5,0) a 1,5 ml roztoku GOPOD. Pro přípravu standardu bylo pipetováno 50 μ l části 5 kitu, 50 μ l 200 mM acetátového pufru (pH 5,0) a 1,5 ml roztoku GOPOD. Všechny zkumavky byly inkubovány 20 minut při 40 °C a nakonec byla změřena absorbance při 510 nm proti blanku.

3.5.4 Stanovení α -glukanů

Na dno 10ml zkumavky se šroubovacím závitkem bylo přesně naváženo 30 mg lyofilizátu. K lyofilizátu byl přidán 1 ml 2M KOH a obsah zkumavek byl za stálého míchání inkubován 20 minut v ledové lázni. Poté byly do zkumavek pipetovány 4 ml 1,2 M acetátového pufru (pH 3,8) a ihned po pufru bylo pipetováno 0,1 ml části 2 kitu. Zkumavky byly inkubovány 30 minut při 40 °C za občasného promíchání. Obsah zkumavek byl kvantitativně převeden do plastových centrifugačních zkumavek a vzorky byly centrifugovány 10 min při 1500 rpm. Po odstředění bylo pipetováno 50 μ l supernatantu na dno skleněné zkumavky v duplikátu. K supernatantu bylo dále pipetováno 50 μ l 200 mM acetátového pufru (pH 5,0) a 1,5 ml roztoku GOPOD. Opět byl připraven blank a standard a všechny zkumavky byly inkubovány 20 minut při 40 °C. Absorbance byla proměřena při 510 nm.

3.6 Extrakce a analýza karotenoidů

Přibližně 50 mg lyofilizované biomasy bylo naváženo do plastových 15ml zkumavek a biomasa byla rehydratována 10 minut pomocí 0,3 ml destilované vody. Do zkumavky bylo přidáno 5 ml Folchova činidla (chloroform:methanol 2:1) a skleněné kuličky ve dvojnásobném množství vztaženém na množství biomasy. Suspenze byla 30 minut intenzivně protřepávána na vortexu a pomocí hliníkové fólie bylo zabráněno přístupu světla. Poté byla suspenze bez kuliček převedena do čisté plastové 15ml zkumavky a po přidání 3 ml destilované vody byly zkumavky centrifugovány jednu minutu při 7000 rpm. Spodní lipidová frakce byla kvantitativně odebrána do slzičkové baňky a umístěna do vakuové odparky. Po odpaření rozpouštědla byly do baňky pipetovány 2 ml chloroformu HPLC kvality a odparek s karotenoidy byl rozpuštěn a kvantitativně převeden do vialky přes filtr 20 μ m. Vialka byla ihned pevně uzavřena pomocí krimpovacích kleští. Vzorek byl poté ihned proměřen, popřípadě uchován při -80 °C v temnu. K chromatografické analýze byla použita HPLC sestava od firmy Thermo Fischer Scientific. Ke zpracování získaných chromatogramů byl využit software Xcalibur. Samotná analýza probíhala na nepolární koloně C18 od firmy Kinetex. Při metodě byla nastavena gradientová eluce, kdy první mobilní fáze tvořila směs acetonitrilu (84 %), 0,1M Tris-HCl pufr pH 8 (14 %) a methanol (2 %). Tato mobilní fáze je během prvních 8 minut analýzy vyměněna za druhou mobilní fázi, která je tvořena methanolem (60 %) a ethylacetátem (40 %). Druhá mobilní fáze vymývá analyty z kolony po dobu 4 minut, a následně je během 1,5 minuty vyměněna zpět za první mobilní fázi, kterou je kolona ještě několik minut promývána. Celková délka analýzy je pak 16 minut. Průtok mobilní fáze byl 1,0 ml/min a termostat obsahující kolonu byl nastaven na teplotu 25°C. Detekce byla prováděna spektrofotometricky s využitím detektoru diodového pole pro zvolené vlnové délky, které odpovídaly absorpčním maximům studovaných látek (285

nm pro ubichinon a ergosterol, 450 nm pro karotenoidy). Výsledná data byla zpracována a vyhodnocena na základě porovnání se standardy (vyhodnocena byla suma karotenoidů, obsah ergosterolu a koenzymu Q). Vzorek byl dávkován dávkovací smyčkou o objemu 20 µl. Kromě výše zmíněných molekul, byla stanovována i celková koncentrace karotenoidů.

3.7 Transesterifikace a analýza lipidů

Do skleněné vialky bylo odváženo přibližně 10 mg lyofilizované biomasy. K lyofilizátu bylo pipetováno 0,8 ml transesterifikační směsi (15% H₂SO₄ v methanolu s přidavkem 0,5 mg/ml interního standardu, kterým je heptadekanová kyselina) a 1 ml chloroformu. Směs byla po zakrimpování vialky inkubována v termobloku po dobu 3 hodin při 90 °C. Po transesterifikaci se vialky nechají volně zchladnout na laboratorní teplotu a jejich obsah je kvantitativně převeden do 5ml vialek s 0,5 ml 0,05M roztoku NaOH. Směs je intenzivně protřepána a po dokonalém oddělení fází je pipetováno 0,5 ml spodní chloroformové fáze do čisté skleněné vialky se závitkem pro GC. Do vialky je dále pipetováno 0,5 ml chloroformu a vzorek je ihned analyzován, nebo uchován při -80 °C.

3.7.1 Podmínky stanovení mastných kyselin:

Plynový chromatograf TRACE GC (ThermoQuest S.p.A., Itálie) Autosampler AI/AS 3000

Kapilární kolona: DB-WAX o rozměrech 30 mx 0,32 mm x 0,5 µm

Oven – teplotní program

Počáteční teplota: 50 °C na 1 minutu

Vzestupný gradient: 25 °C/min do 200 °C s výdrží 0 minut

Vzestupný gradient: 3 °C/min do 230 °C s výdrží 30 minut

Celková doba analýzy: 47 minut

Teplota injektoru: 250 °C

Splitless time 1 minuta, 1:20 průtok/min

Dávkování: autosampler bez děliče toku (splitless), 1 µl

Nosné plyny:

Průtok dusíku: 1 ml/min

Detektor FID (plamenovo-ionizační) Teplota detektoru: 250 °C

Průtoky plynů v detektoru:

Průtok vzduchu: 350 ml/min

Průtok vodíku: 35 ml/min

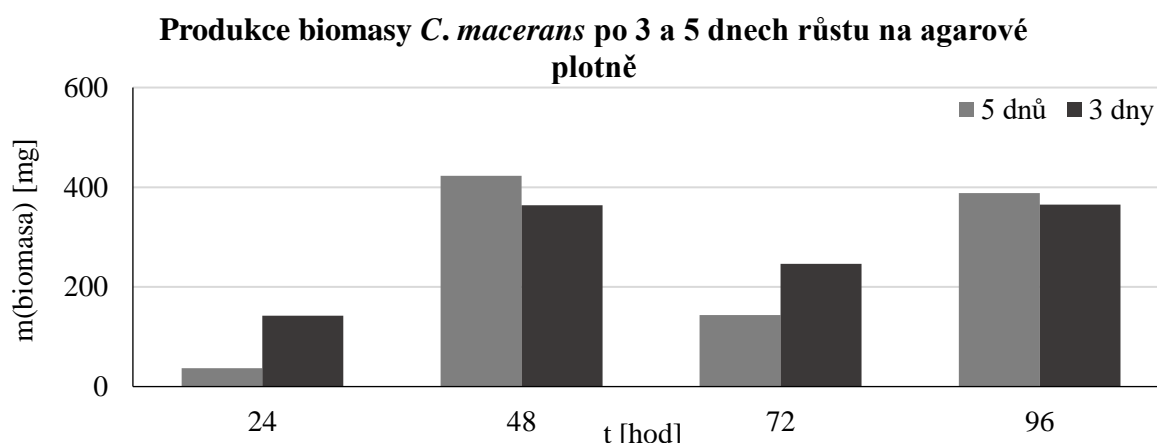
Make-up dusíku: 30 ml/min

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

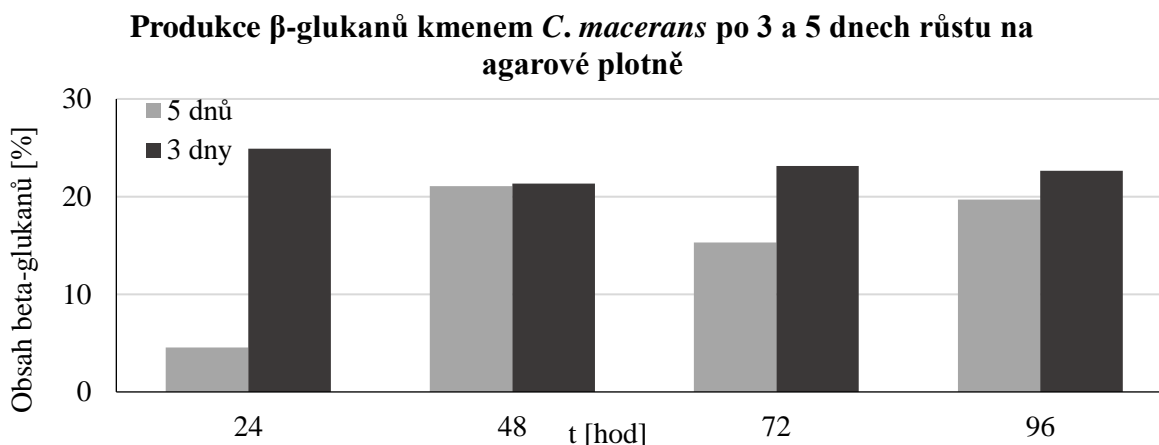
Byli vybráni zástupci tří rodů červených kvasinek (*Cystofilobasidium macerans*, *Sporidiobolus metaroseus* a *Rhodotorula glutinis*), pro které byla stanovena růstová křivka. Jako kontrolní kmen všech provedených kultivací byla použita *S. cerevisiae*, jakožto jediný zástupce kvasinek, komerčně využívaný pro produkci β -glukanů. Všechny čtyři růstové křivky byly stanoveny na základě kultivace v YPD médiu a jsou uvedeny v příloze v kapitole 8.1 (Graf 66–69). Pro odběr biomasy a její komplexní analýzu byly stanoveny 24-hodinové intervaly a kultivace byly prováděny do 144. hodiny, kdy dle růstových křivek každý z kultivovaných kmenů kvasinek poskytoval ještě značné množství biomasy. Biomasa byla vždy lyofilizována a lyofilizát byl analyzován z hlediska obsahu β -glukanů, mastných kyselin, karotenoidů, ergosterolu a koenzymů Q.

4.1 Produkce biomasy a β -glukanů kvasinkami v médiích s různým C/N poměrem

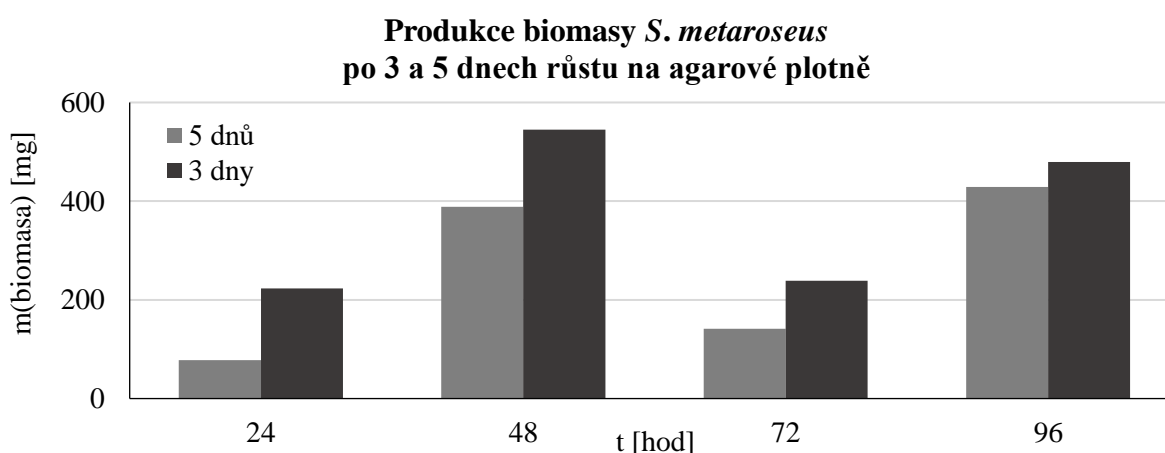
Každý ze čtyř vybraných kvasinkových kmenů byl kultivován celkem ve třech produkčních médiích při C/N poměru 70, 90 a 110. Při kultivaci bylo na suspenze buněk všech kmenů působeno přímým zářením. Analýza β -glukanů byla provedena pomocí enzymatického kitu Megazyme viz kapitola 3.5. Vzhledem k nedostatku informací o růstové fázi červených kvasinek, ve které by mohlo být dosaženo nejvyšší produkce β -glukanů, byla provedena optimalizace doby růstu kolonií na agarových plotnách. Jako optimální byly zvoleny 3 dny. Po této době byl na pevném médiu dostatek biomasy převeditelný do tekutého média, a zároveň prodloužení doby růstu již produkci β -glukanů nezvýšilo. Porovnání produkce biomasy a produkce β -glukanů červených kvasinek v tekutém médiu, do kterého byly zaočkovány po třech a pěti dnech růstu na pevném médiu znázorňují grafy 1–6. Pro následující analýzy tedy byly všechny kmeny červených kvasinek i *S. cerevisiae* kultivovány nejprve 3 dny na agarových plotnách, poté byly převedeny do tekutého média. Prvním krokem byl růst v inokulu po dobu 48 hodin, poté již následovala kultivace v produkčním médiu.



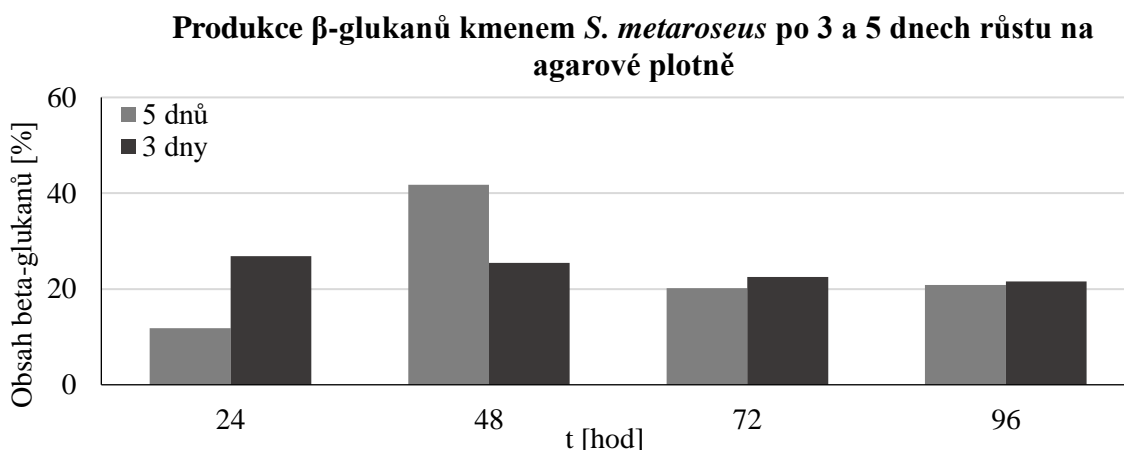
Graf 1: Produkce biomasy při kultivaci *C. macerans* v tekutém médiu po 3 a 5 dnech růstu na pevném médiu



Graf 2: Produkce β -glukanů při kultivaci *C. macerans* v tekutém médiu po 3 a 5 dnech růstu na pevném médiu

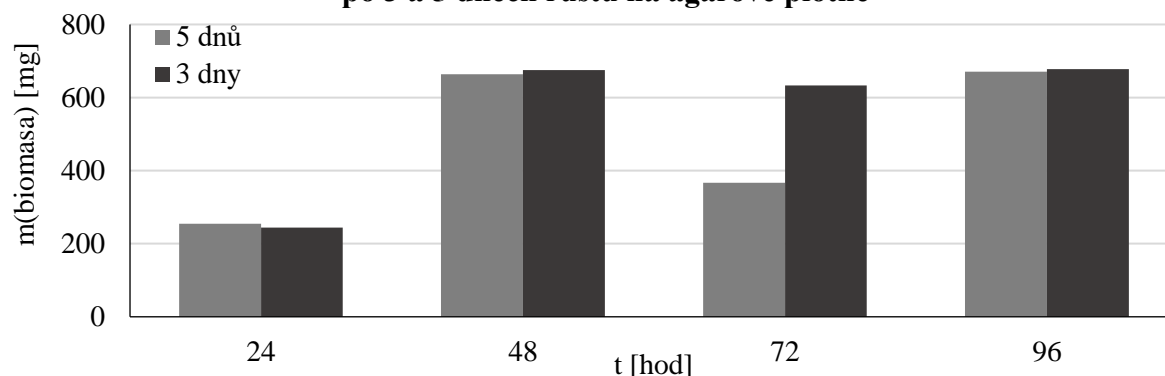


Graf 3: Produkce biomasy při kultivaci *S. metaroseus* v tekutém médiu po 3 a 5 dnech růstu na pevném médiu



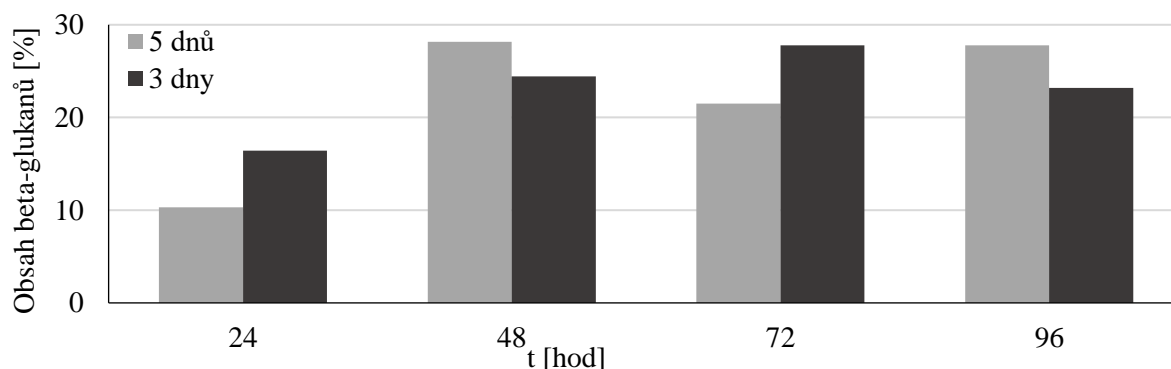
Graf 4: Produkce β -glukanů při kultivaci *S. metaroseus* v tekutém médiu po 3 a 5 dnech růstu na pevném médiu

Produkce biomasy *R. glutinis* po 3 a 5 dnech růstu na agarové plotně



Graf 5: Produkce biomasy při kultivaci *R. glutinis* v tekutém médiu po 3 a 5 dnech růstu na pevném médiu

Produkce β -glukanů kmenem *R. glutinis* po 3 a 5 dnech růstu na agarové plotně

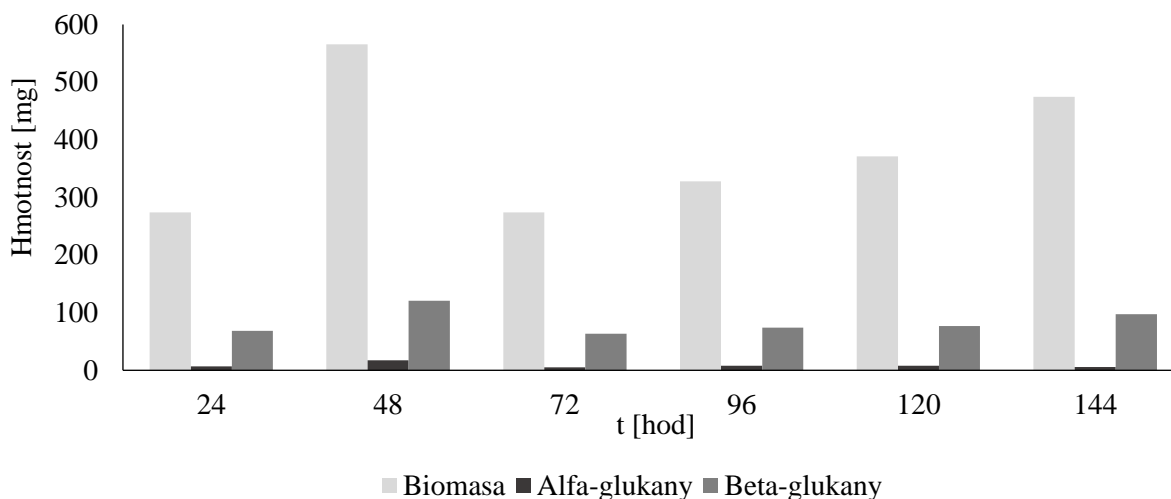


Graf 6: Produkce β -glukanů při kultivaci *R. glutinis* v tekutém médiu po 3 a 5 dnech růstu na pevném médiu

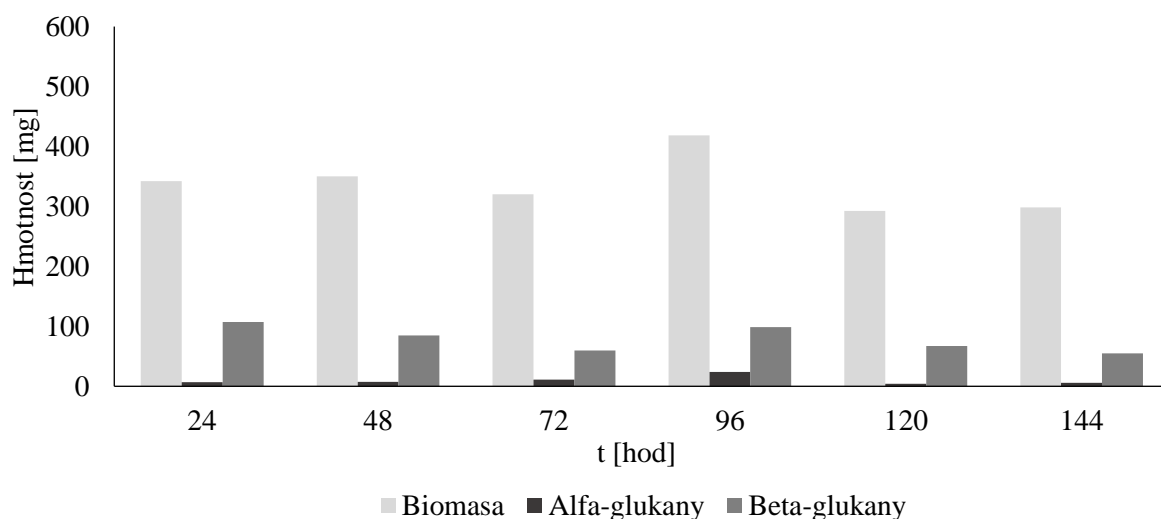
4.1.1 *Cystofilobasidium macerans*

V této diplomové práci byl prokázán výskyt obou polysacharidů, tedy α - i β -glukanů, nicméně ve velmi malém množství, v porovnání s ostatními kultivovanými kmeny. Obsah α -glukanů je v podstatě zanedbatelný. V porovnání se dvěma níže uvedenými studii se tato práce zásadně liší v podstatě analyzovaného materiálu, kdy pro účely diplomové práce byla použita biomasa celých buněk, nebyly tedy separovány buněčné stěny, ani exopolymery.

Po porovnání kultivací *C. macerans* v různých C/N poměrech (viz graf 7–9) nelze udělat jednoznačný závěr, produkce biomasy i β -glukanů je doprovázena výkyvy v různých časových odběrech, ze zjištěných výsledků lze pouze konstatovat, že vysoký C/N poměr nijak zásadně růst *C. macerans* neovlivňuje.

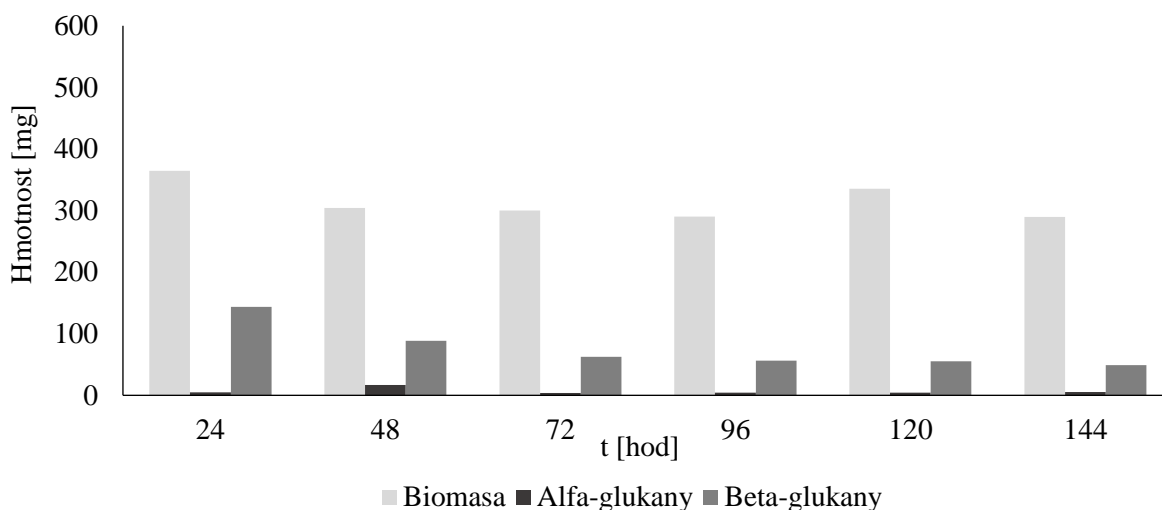


Graf 7: Závislost množství lyofilizované biomasy a množství polysacharidů *C. macerans* na čase odběru buněčné suspenze kultivované při $C/N = 70$



Graf 8: Závislost množství lyofilizované biomasy a množství polysacharidů *C. macerans* na čase odběru buněčné suspenze, kultivované při $C/N = 90$

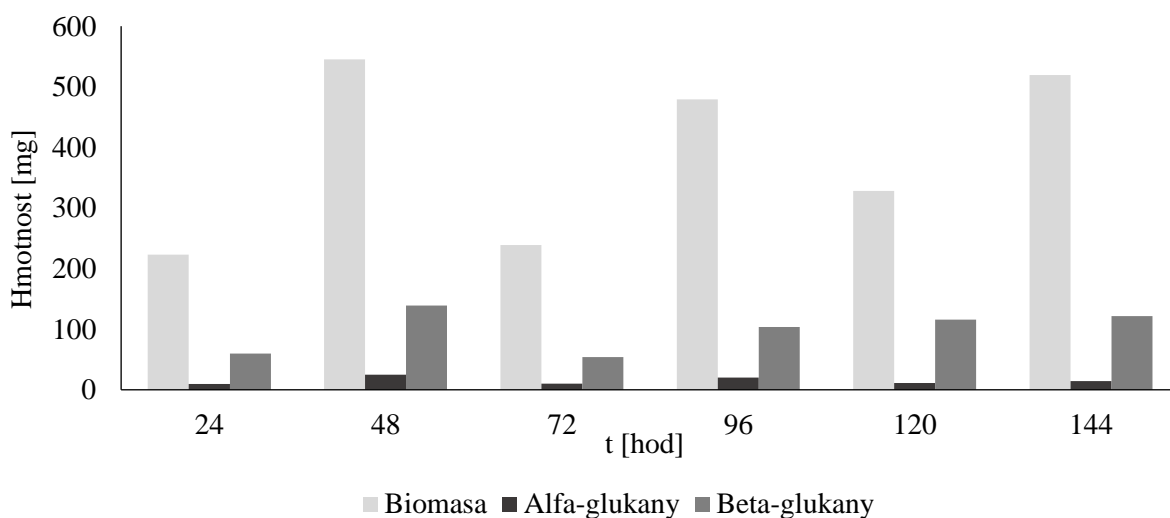
O složení polysacharidů buněčné stěny *C. macerans* zatím není mnoho dostupných informací, výjimkou je studie H. Prillinger a kol. [119], kteří studovali zastoupení monosacharidů buněčných stěn několika zástupců kvasinek z oddělení Ascomycetes a Basidiomycetes. U cystofilobasidia bylo v buněčné stěně prokázáno 94 % mol. glukózy, což by mohlo poukazovat na výskyt β -glukanů. Tento druh byl také zkoumán z hlediska produkce exopolymerů, kde se tým E. Breierové [120] zaměřuje na biosorpci nikelnatých iontů pomocí exopolymerů *C. macerans* a uvádí, že se jedná převážně o glykoproteiny, ve kterých je obsah polysacharidů indukovan právě stresovými podmínkami, konkrétně přítomností těžkých kovů. Tyto polysacharidy by se s největší pravděpodobností mohly skládat z α -mananů, které jsou pro sorpci těžkých kovů používány [55].



Graf 9: Závislost množství lyofilizované biomasy a množství polysacharidů *C. macerans* na čase odběru buněčné suspenze, kultivované při C/N = 110

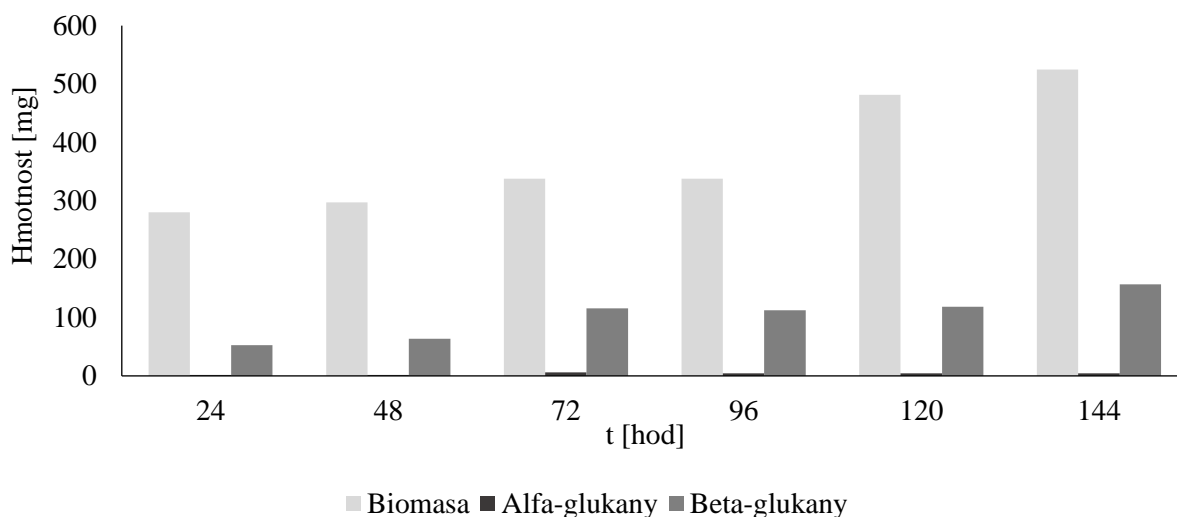
4.1.2 *Sporidiobolus metaroseus*

Na grafu 10–12 je zobrazena produkce glukánů *C. macerans* v různých C/N poměrech, a lze říci, že produkce α -glukánů ani β -glukánů nekoreluje přímo s nárůstem biomasy. Zatímco při vyšších C/N poměrech dochází k růstu buněk 5. i 6. den kultivace, obsah β -glukánů zůstává beze změny.



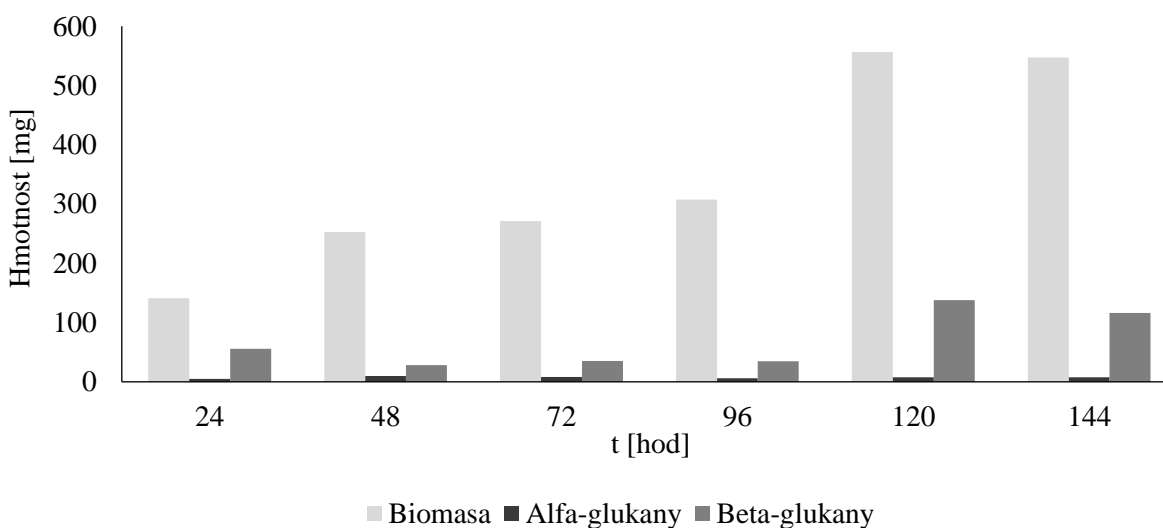
Graf 10: Závislost množství lyofilizované biomasy a množství polysacharidů *S. metaroseus* na čase odběru buněčné suspenze, kultivované při C/N = 70

Z grafu 10 jsou patrná tři maxima produkce biomasy, při poměru C/N = 70 je tedy *S. metaroseus* schopný využívat glukózu poměrně rychle a již druhý den kultivace nastává první maximum produkce biomasy. Při kultivaci v médiích s vyšším C/N poměrem se tento kmen postupně adaptuje na dané podmínky a až pátý a šestý den kultivace produkuje nejvíce biomasy. Tato tendence pomalého růstu je patrná i růstové křivky (viz Graf 66).



Graf 11: Závislost množství lyofilizované biomasy a množství polysacharidů *S. metaroseus* na čase odběru buněčné suspenze, kultivované při C/N = 90

V rámci oddělení *Basidiomycetes*, kam *S. metaroseus* patří, je známo, že v buněčné stěně obsahují mnohem více chitinu než ostatní kvasinky. V rámci čeledi *Sporobolomycetaceae* je typický výskyt fukózy, naopak v buněčných stěnách chybí xylóza [121]. Podrobnější informace o složení buněčných stěn, a obsahu polysacharidů v nich, nejsou dostupné. Ze studie R. Vadkertiové [122], která zkoumala odolnost kvasinek vůči přítomnosti těžkých kovů, je zřejmé, že *Sporidiobolus* nepatří mezi odolné rody, a pravděpodobně v buněčné stěně neobsahuje vysoké množství polymerů, které by mohly těžké kovy adsorbovat, ani jejich produkci na těžké kovy nereaguje.



Graf 12: Závislost množství lyofilizované biomasy a množství polysacharidů *S. metaroseus* na čase odběru buněčné suspenze, kultivované při C/N = 110

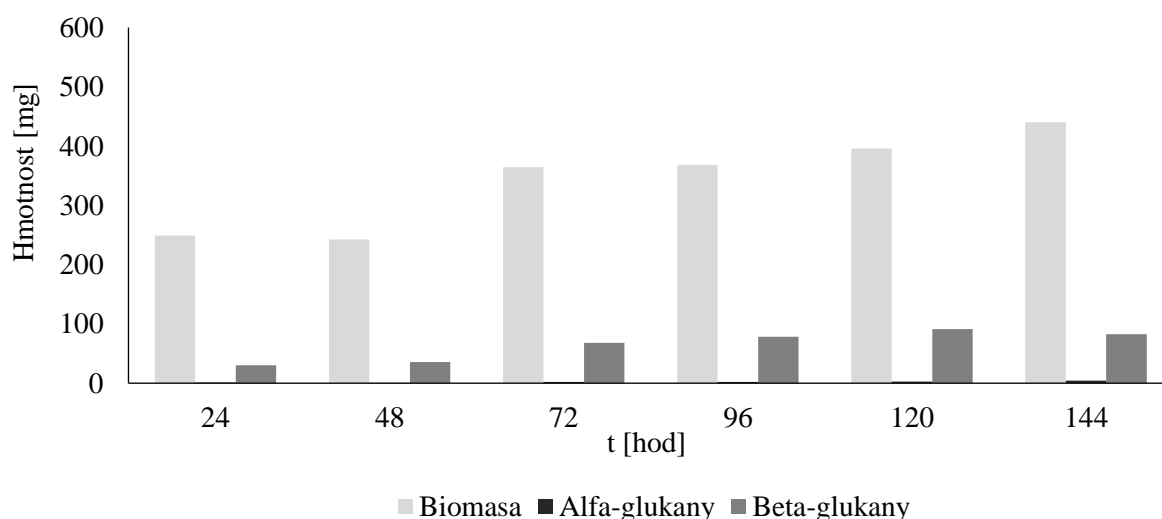
4.1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Obsah glukánů v buněčné stěně *S. cerevisiae* byl prokázán již nespočtem studií, jejich izolace i charakterizace byla mnohokrát podrobně provedena [24], [86], [123], [124]. I v této diplomové práci byl obsah β -glukanů prokázán, což ukazují Graf 13–15, nicméně obsah

glukanů je poměrně nízký, a *S. cerevisiae* není v rámci použitých médií nejefektivnějším producentem. Jelikož jsou postupy výroby a izolace β -glukanů z buněk *S. cerevisiae* silně patentovány, nelze říci, v jakých podmínkách lze očekávat nárůst β -glukanů.

Podmínky kultivace uvádí například B. Aguilar-Uscanga a kol. [124], kde je hodnocen vliv složení média a kultivačních podmínek na množství celkových glukanů v biomase. Pozorovány byly například změny v poměru obsahu β -glukanů a mananů, kdy v YPD médiu byl tento poměr téměř dvakrát vyšší než v YNB médiu. Zásadním vlivem na tento poměr má tedy typ zdroje uhlíku v médiu, a vliv limitace dusíkem nebyl na tento poměr prokázán. Celkový obsah glukanů byl pak nejvyšší po přidání galaktózy do média. Významné rozdíly byly také sledovány u kultivací s různými teplotami, kdy při 22 °C bylo dosaženo asi 10 % celkových glukanů v biomase (což jsou podmínky použité i v této diplomové práci), zatímco při 37 °C dosáhli 20 % celkových glukanů v biomase.

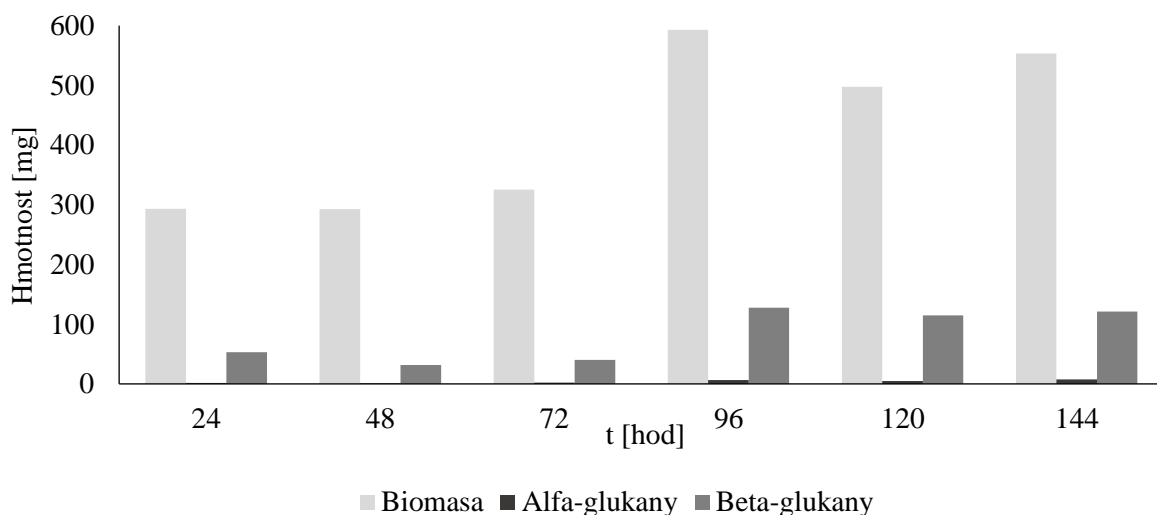
Z níže uvedených grafů je patrné, že při vyšším C/N poměru v médiu, je obsah glukanů mírně vyšší. Zvyšuje se zde i produkce biomasy, a lze tedy říci, že zvýšením C/N poměru bylo dosaženo intenzivnějšího využívání glukózy z média, která ale nebyla využita ve prospěch biosyntézy β -glukanů. Tyto výsledky nejsou v souladu s výsledky studie B. Aguilar-Uscanga a kol. [124], nicméně ve zmíněné studii použit jiný zdroj dusíku (síran amonný).



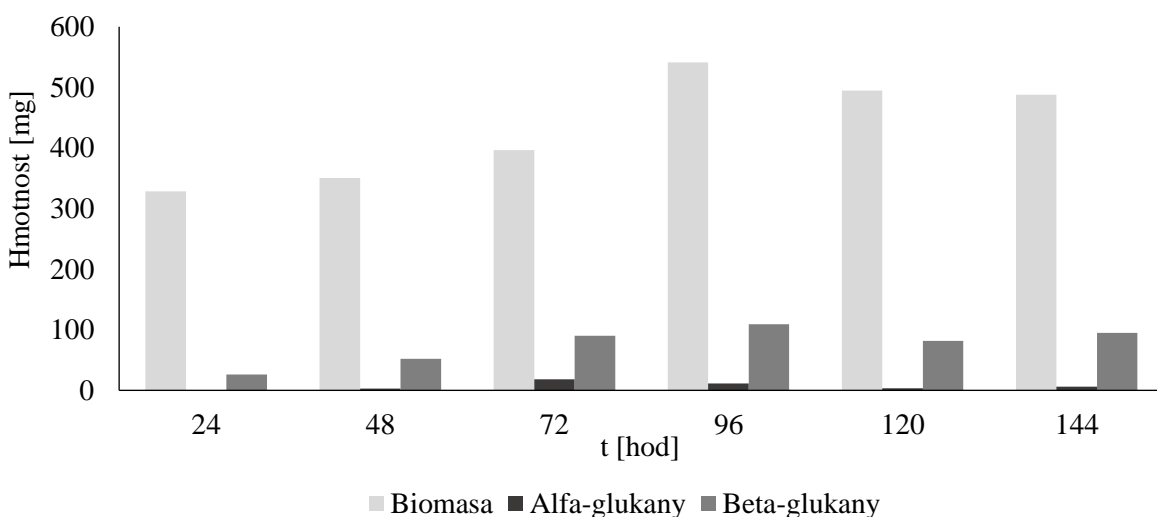
Graf 13: Závislost množství lyofilizované biomasy a množství polysacharidů *S. cerevisiae* na čase odběru buněčné suspenze, kultivované při C/N = 70

M. Kieliszek a kol. [125] studovali také vliv pH YPD média na složení buněčné stěny, kdy nejvíce β -glukanů bylo produkováno při pH 4. Jako zdroj uhlíku zde byl také testován glycerol. Při kultivaci *S. cerevisiae* v médiu o pH 4, obsahujícím 3 % glycerolu, byl dokonce obsah β -glukanů značně vyšší než při kultivaci v YPD médiu.

K. Kwang Suk a kol. [126] uvádí další specifikace produkčního média *S. cerevisiae* s cílem nejvyšší produkce β -glukanů a prokazuje, že nejvyšší produkce je dosaženo na začátku stacionární fáze (při batch kultivaci).



Graf 14: Závislost množství lyofilizované biomasy a množství polysacharidů *S. cerevisiae* na čase odběru buněčné suspenze, kultivované při C/N = 90

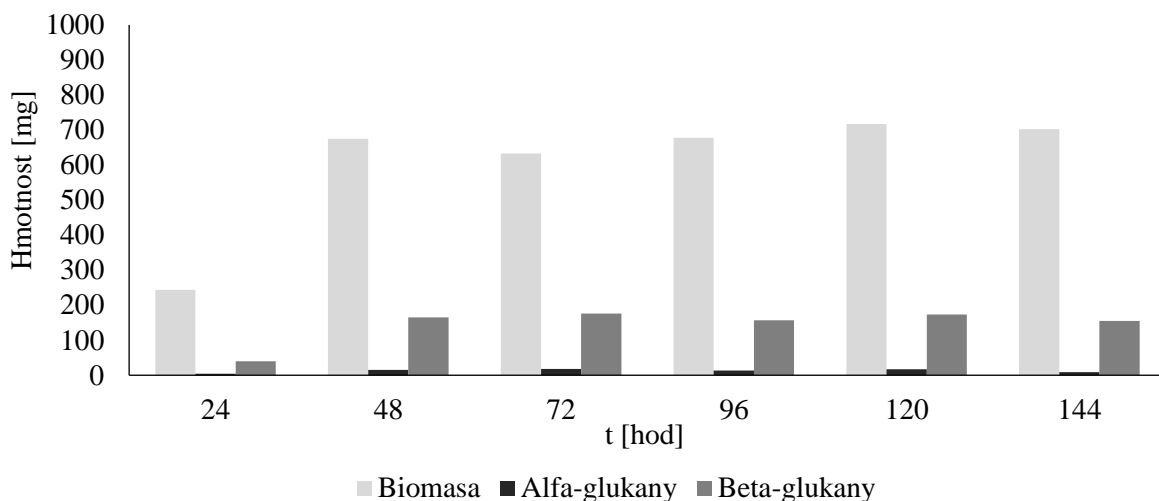


Graf 15: Závislost množství lyofilizované biomasy a množství polysacharidů *S. cerevisiae* na čase odběru buněčné suspenze, kultivované při C/N = 110

4.1.4 *Rhodotorula glutinis*

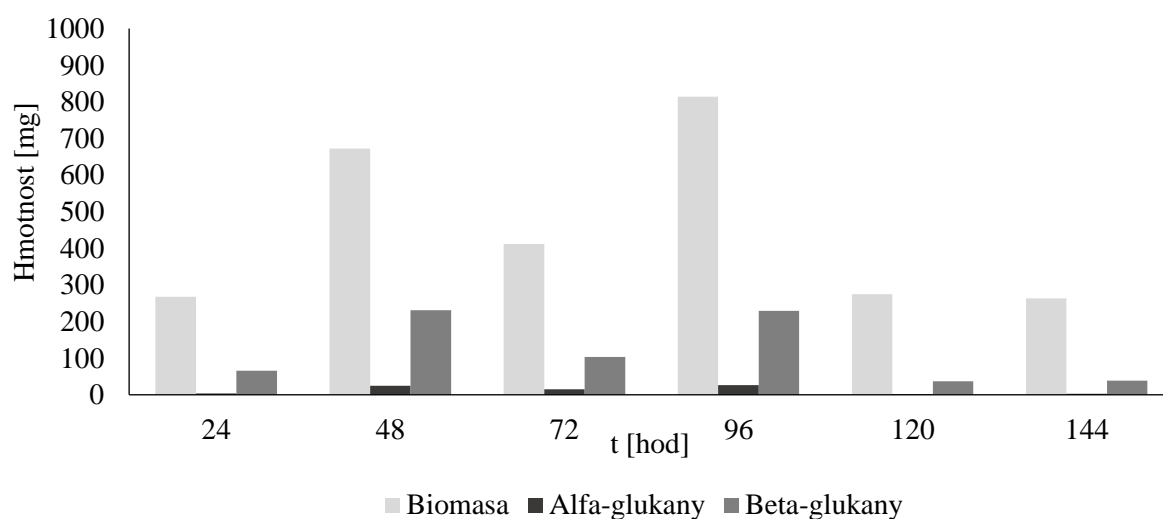
Stejně jako *S. metaroseus*, patří *R. glutinis* do oddělení *Basidiomycetes*, a tak se předpokládá vyšší obsah chitinu v buněčné stěně [121], naopak zastoupení β -glukanů, konkrétně (1 \rightarrow 3)- β řetězců se nepředpokládá. Dalším společným znakem s *S. metaroseus* je typický výskyt fukózy a absence xylózy v buněčné stěně. U rodu *Rhodotorula* jsou zkoumány hlavně α -glukany a také obsah (1 \rightarrow 3)- α -glukanáz [127]. Prokázány byly u *R. glutinis* kapsulární polysacharidy, a to ve formě lineárních řetězců mananů, s občasným větvením (1 \rightarrow 3)- a (1 \rightarrow 4)- β [63], [121].

Na grafu 16–18 lze sledovat vliv zvyšujícího se C/N poměru na růst i produkci glukanů. Při kultivaci *R. glutinis* v médiu s C/N = 70 dochází pravděpodobně již od druhého dne kultivace k udržování stacionární fáze růstu, a množství biomasy ani β -glukanů nijak nekolísá, stejně tak α -glukany produkované v malém množství zůstávají takřka beze změny.

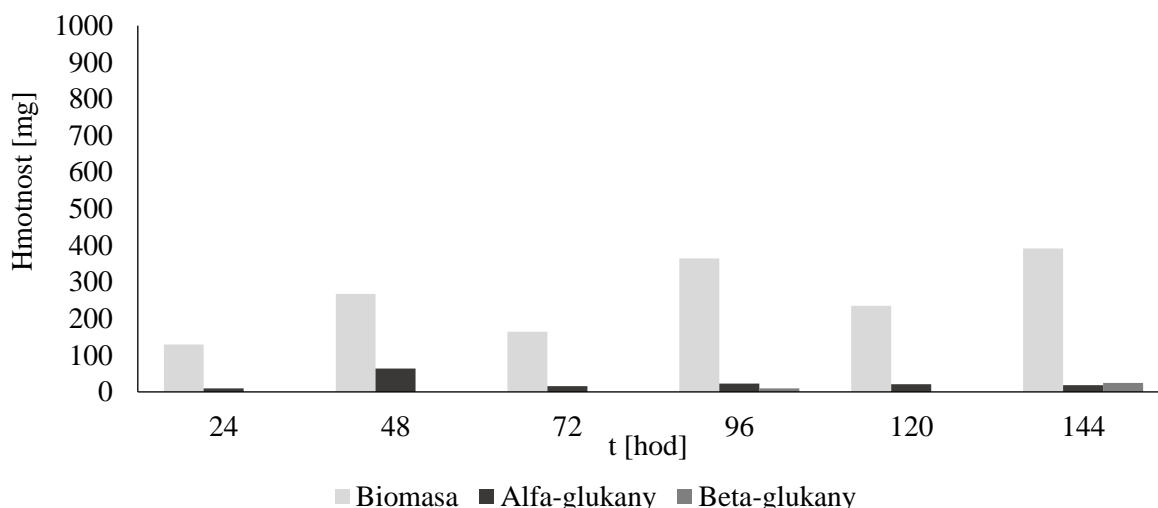


Graf 16: Závislost množství lyofilizované biomasy a množství polysacharidů *R. glutinis* na čase odběru buněčné suspenze, kultivované při C/N = 70

Při kultivaci v médiu s C/N = 90 jsou patrná dvě maxima, a to ve druhém a čtvrtém dni kultivace a následně dochází k dramatickému poklesu množství biomasy i glukánů, obsah β -glukanů je pátý a šestý den kultivace minimální. Při kultivaci v médiu s C/N = 110 je zajímavým jevem zvýšení obsahu α -glukanů, v podstatě úplná absence β -glukanů a pomalý růst biomasy, který dosahuje maxima šestý den kultivace, kdy je biomasy v porovnání s C/N = 70 zhruba polovina.



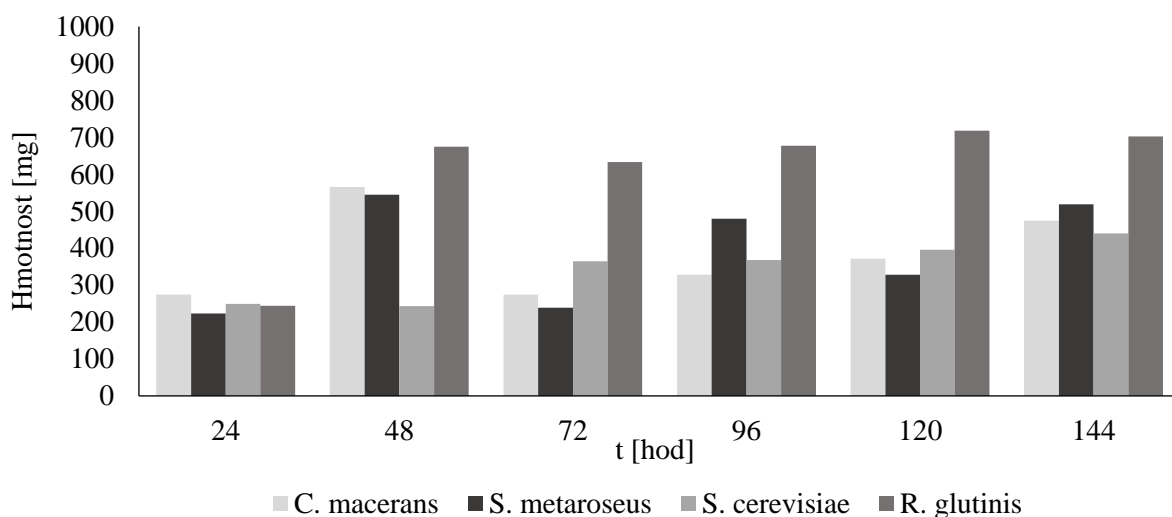
Graf 17: Závislost množství lyofilizované biomasy a množství polysacharidů *R. glutinis* na čase odběru buněčné suspenze, kultivované při C/N = 90



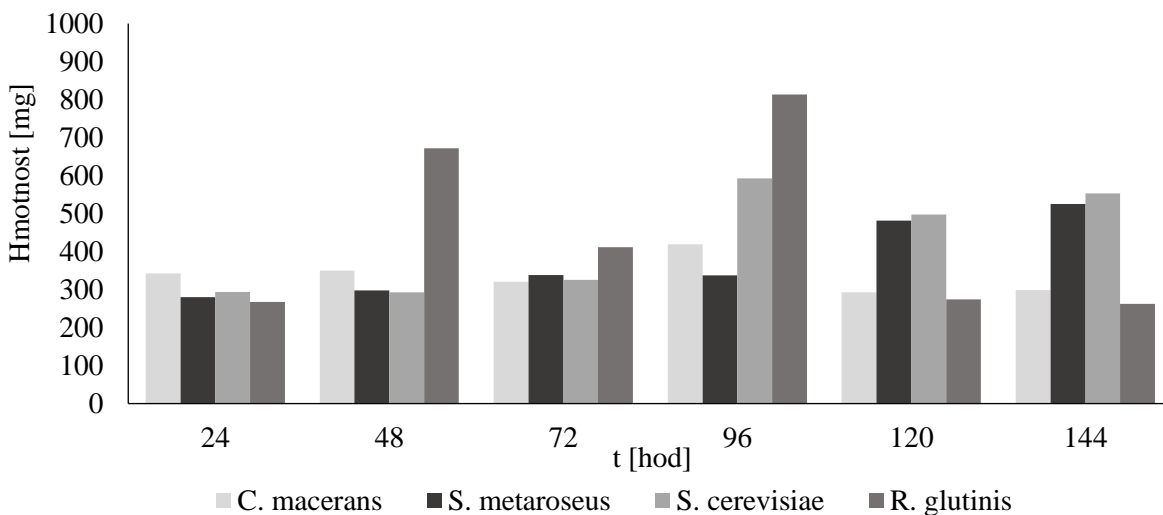
Graf 18: Závislost množství lyofilizované biomasy a množství polysacharidů *R. glutinis* na čase odběru buněčné suspenze, kultivované při $C/N = 110$

4.1.5 Porovnání produkce biomasy kvasinek

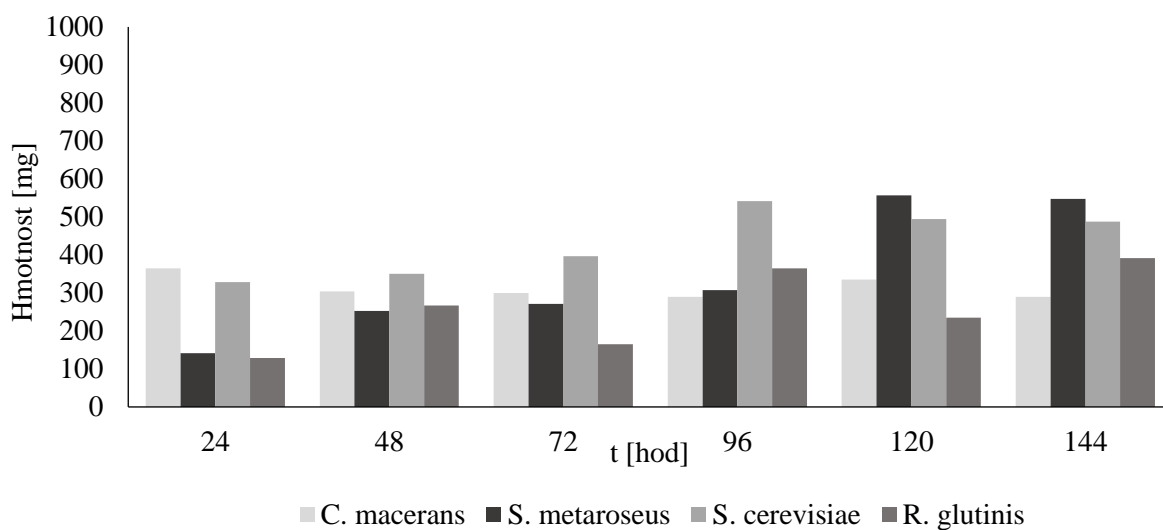
Produkce biomasy všech kmenů byla porovnána v rámci kultivací v různých C/N poměrech. Při poměru $C/N = 70$ (viz Graf 19) rostla jednoznačně nejvíce *R. glutinis*, poměrně málo biomasy bylo získáno kultivací *S. cerevisiae*, u které lze zaznamenat nejmenší rozdíly v množství produkované biomasy napříč všemi šesti odběrovými časy. Při poměru $C/N = 90$ (viz Graf 20) je již růst *R. glutinis* po 96. hodině inhibován, dosahuje zde nejmenších hodnot množství biomasy. Naopak *S. cerevisiae* i *S. metaroseus* jsou v těchto časových odběrech stále velmi produktivní. U poměru $C/N = 110$ lze z Graf 21 jednoznačně odvodit, že množství biomasy je u všech kultivovaných kmenů nejnižší, pátý a šestý den zůstávají nejvíce produktivní *S. cerevisiae* i *S. metaroseus*. Z níže uvedených grafů vyplývá, že *S. metaroseus* i *S. cerevisiae* jsou schopné využívat glukózu z média i při vysokém C/N poměru, a jejich růst není inhibován v pozdních fázích kultivace. Naopak růst *R. glutinis* je vysokým C/N poměrem značně inhibován, a pravděpodobně zde prochází stacionární fází, což lze pozorovat i na její růstové křivce (viz Graf 69). *C. macerans* produkuje jednoznačně nejméně biomasy a vysokým C/N poměrem je jeho růst mírně inhibován.



Graf 19: Závislost množství biomasy v médiu s CN = 70 na čase odběru buněčné suspenze



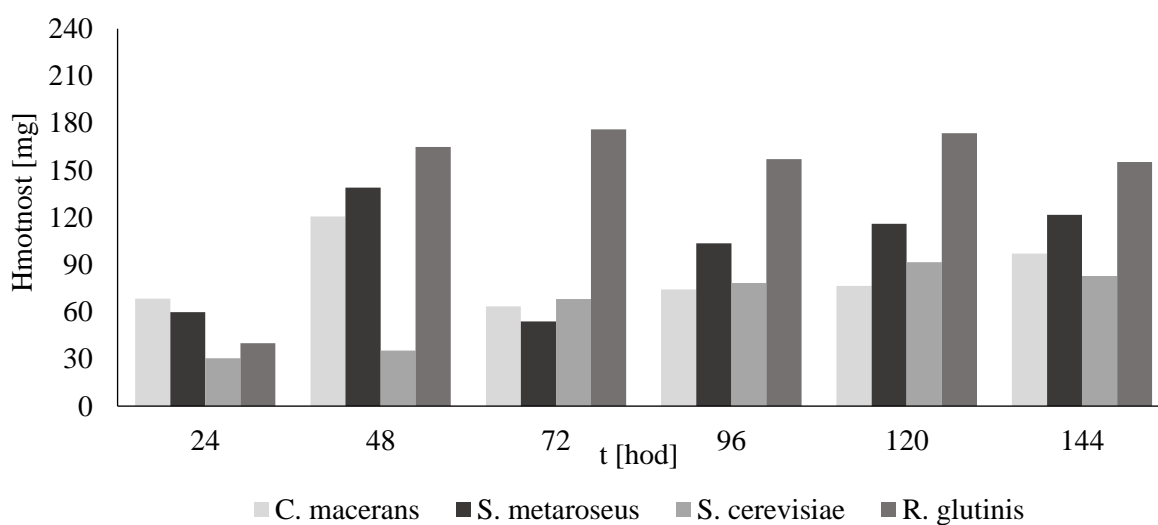
Graf 20: Závislost množství biomasy v médiu s CN = 90 na čase odběru buněčné suspenze



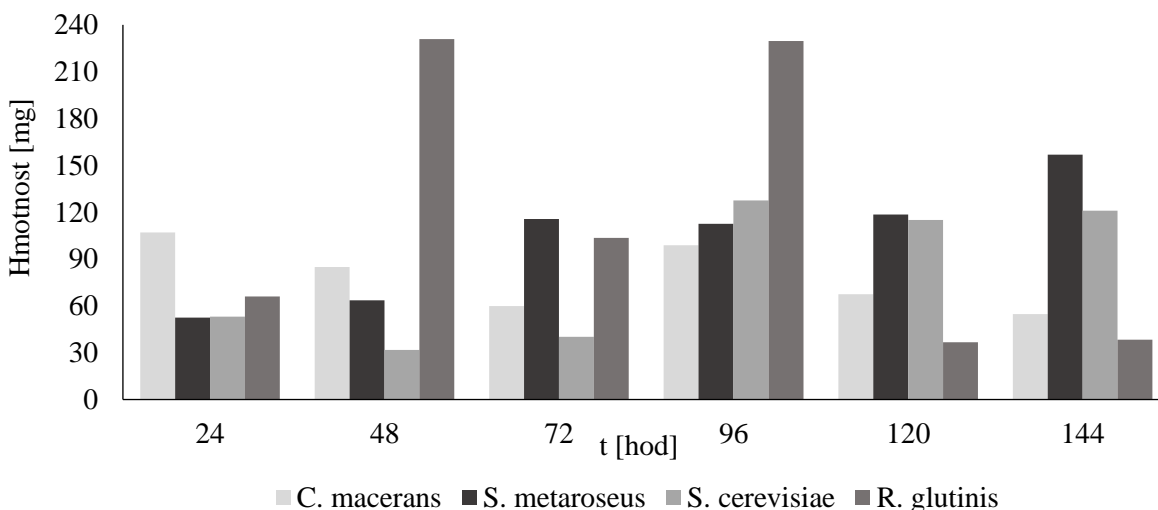
Graf 21: Závislost množství biomasy v médiu s CN = 110 na čase odběru buněčné suspenze

4.1.6 Porovnání produkce β -glukanů kvasinek

Produkce β -glukanů všech kmenů byla porovnána v rámci kultivací v různých C/N poměrech, a je zde očekávána jistá homologie s produkcí biomasy, tedy s růstem buněk a s růstem jejich buněčné stěny. Při poměru C/N = 70 (viz Graf 22) je jasně vidět homologie s produkcí biomasy při tomto poměru. Nejvyšší obsah β -glukanů tedy produkuje *R. glutinis*. Druhým slibným producentem je *S. metaroseus*. Na Graf 23, který znázorňuje produkci β -glukanů při poměru C/N = 90, jsou na první pohled viditelná dvě maxima patřící *R. glutinis*. Druhý a čtvrtý den kultivace v tomto médiu je tedy kmenem *R. glutinis* produkováno zdaleka nejvíce β -glukanů napříč všemi C/N poměry. Hned po čtvrtém dni klesá obsah β -glukanů *R. glutinis* na minimum (stejně tak tomu bylo u biomasy) a její prvenství v produkci přebírá *S. metaroseus*, následovaný *S. cerevisiae*.



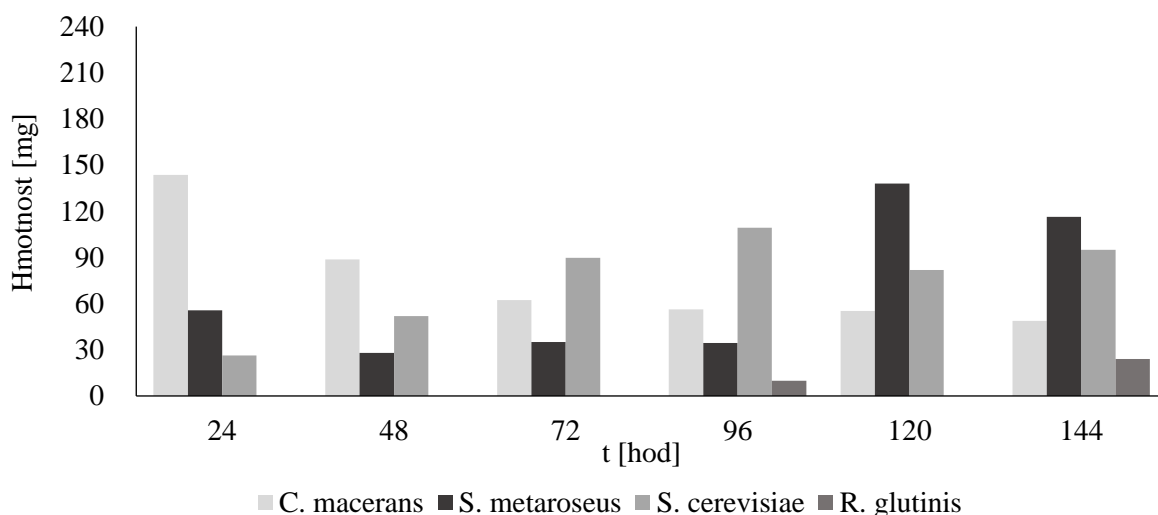
Graf 22: Závislost množství β -glukanů v biomase kvasinek na čase odběru buněčné suspenze odebrané z média s C/N = 70



Graf 23: Závislost množství β -glukanů v biomase kvasinek na čase odběru buněčné suspenze odebrané z média s C/N = 90

Graf 24 zobrazuje očekávaný dramatický pokles v produkci β -glukanů, kde jedinou výjimkou je *S. metaroseus*, který opět pátý a šestý den kultivace udržuje vysoké koncentrace

glukanu. Velmi překvapivý je zde obrovský nárůst obsahu β -glukanů u *C. macerans*, a to hned po prvním dni kultivace, kdy množství biomasy zůstává oproti předchozím C/N poměrům v podstatě nezměněno. Tento jev by tedy bylo dobré prokázat několika dalšími experimenty.



Graf 24: Závislost množství β -glukanů v biomase kvasinek na čase odběru buněčné suspenze odebrané z média s C/N = 110

4.1.7 Produkce β -glukanů vybranými druhy mikrořas

Zástupci mikrořas byli kultivováni ve specifických médiích, jejichž složení standardně uvádějí sbírky mikroorganismů. Kultivovány byly sinice *Cyanothece* sp. a *Arthrospira maxima* a jednobuněčné řasy *Desmodesmus acutus* a *Dunaliella salina*. Vzhledem k delší růstové fázi mikrořas oproti kvasinkám byly kultivace provedeny až do jedenáctého dne. První dva odběry byly provedeny po čtvrtém a šestém dni pro možnost porovnání produkce glukanů s produkcí kvasinek. Ve grafu 25 jsou zobrazena množství biomasy, β -glukanů i α -glukanů všech kmenů mikrořas ve všech třech odběrech.

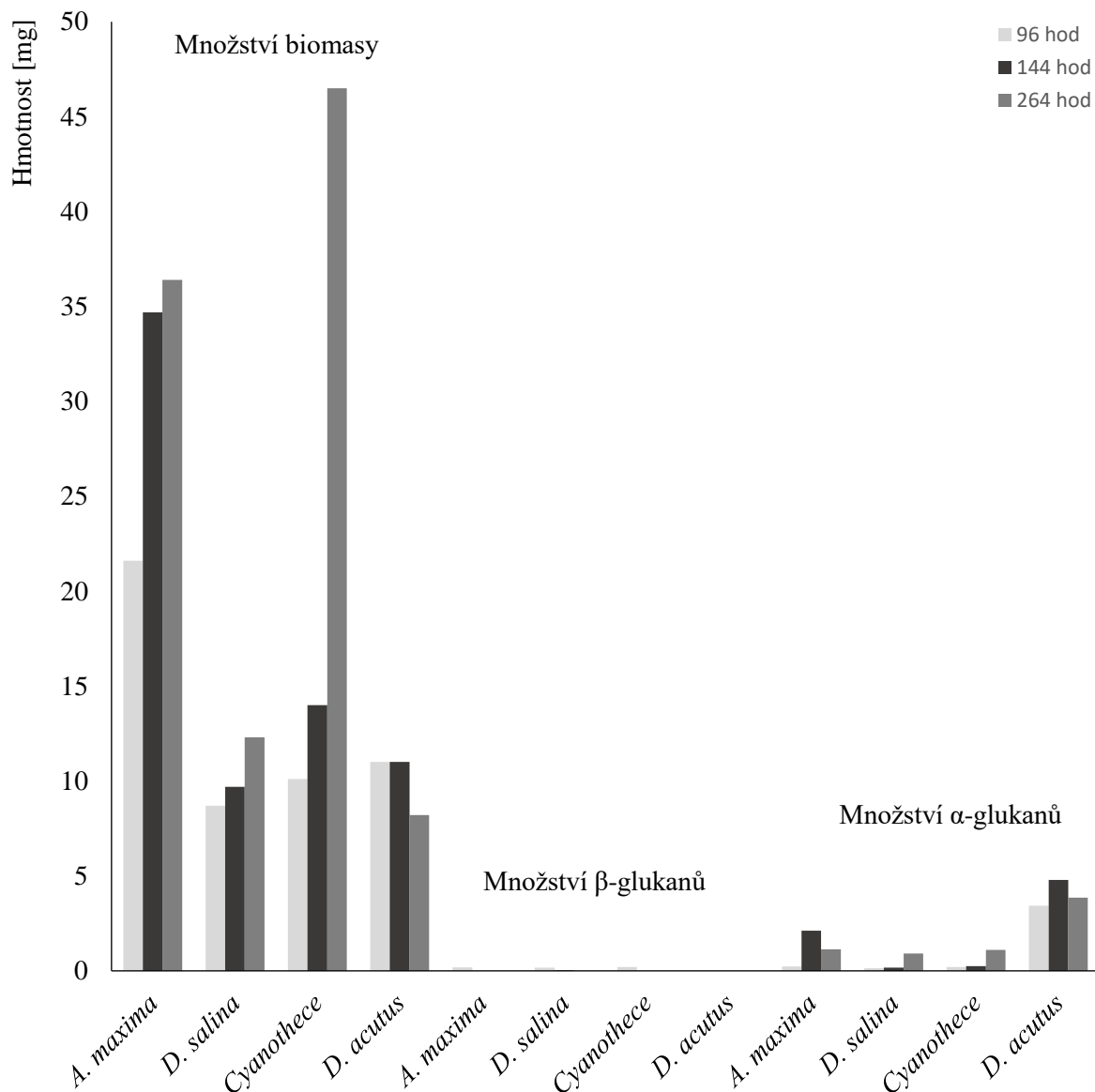
Mikrořasy nejsou dle výsledků této diplomové práce vhodnými producenty β -glukanů, z grafu 24 je zřejmé, že v biomase mikrořas se vyskytují jen ve stopovém množství. Naopak α -glukany jsou produkovány, největší množství obsahuje biomasa *D. actus*. Celkově ovšem mikrořasy v čase jedenácti dnů nenarostly v takové míře, aby bylo možné zvažovat další optimalizace a analýzy dalších metabolitů. Pro další experimenty bude zásadní prodloužení doby kultivace a poté optimalizace růstových podmínek.

Sinice *Arthrospira* by po optimalizaci kultivačních podmínek mohla být slibným producentem EPS. I. Chentir a kol. [128] uvádějí, že produkce EPS je ovlivněna převážně koncentrací NaCl v médiu a také intenzitou záření. M. Giorgos [129] zkoumal produkci polysacharidů v médiu s limitním obsahem fosforu, kdy *Spirulina* dosahovala vyšší produkce, na úkor nižšího zisku proteinů. V současné době jsou ovšem kultivace *Arthrospiry* zaměřeny zejména na produkci proteinů a lipidů a produkce polysacharidů je tak brána spíše jako možný zisk vedlejších produktů.

Produkce exopolysacharidů *Dunalielly* byla již v několika studiích zkoumána, struktura těchto EPS byla stanovena pomocí FT-IR i NMR, a jedná se o (1 \rightarrow 4)- α -D-glukany podobné amylóze, a jejich deriváty [130]. A. Mishra a kol. [131] podrobili *Dunaliellu* solnému stresu a prokázali vliv těchto podmínek na zvýšení produkce EPS. Další specifické experimenty

prováděny prozatím nebyly a produkce EPS Dunalielly zatím není optimalizována a v blízké budoucnosti pravděpodobně nenajde uplatnění [132].

Množství biomasy a glukánů produkované kmeny mikrořas ve třech časových intervalech



Graf 25: Množství biomasy a glukánů produkované vybranými zástupci mikrořas

Kmen *Cyanothece* je z hlediska polysacharidů zkoumán intenzivněji, a jejich produkce i využití je již diskutováno v mnoha studiích [97], [99]. Ideální teplota kultivace se uvádí okolo 30 °C a do média může být produkováno jedenáctý den kultivace až 22 g/l exopolysacharidů. Tyto EPS jsou tvořeny převážně α -glukany, ale jako i jiné salinní sinice, obsahují i sulfoderiváty, které mají slibnou budoucnost jako nové bioaktivní polymery [98].

Desmodesmus může být kultivován i heterotrofně, a tak se této mikrořase v poslední době dostává velké pozornosti [128]. Růst této mikrořasy je zkoumán za podmínek limitního obsahu dusíku, fosforu, nebo železa za účelem produkce lipidů a hodnotných polysacharidů [129]. Ch. Schulze a kol. [90] dokonce při čtrnáctidenní kultivaci v BG11 médiu prokázali poměrně

vysoký obsah β -glukanů v biomase mnoha druhů *Desmodesma*, a analýzu prováděli stejným způsobem jako je popsáno v této diplomové práci, nicméně po jedenáctidenní kultivaci se obsah β -glukanů nepodařilo prokázat.

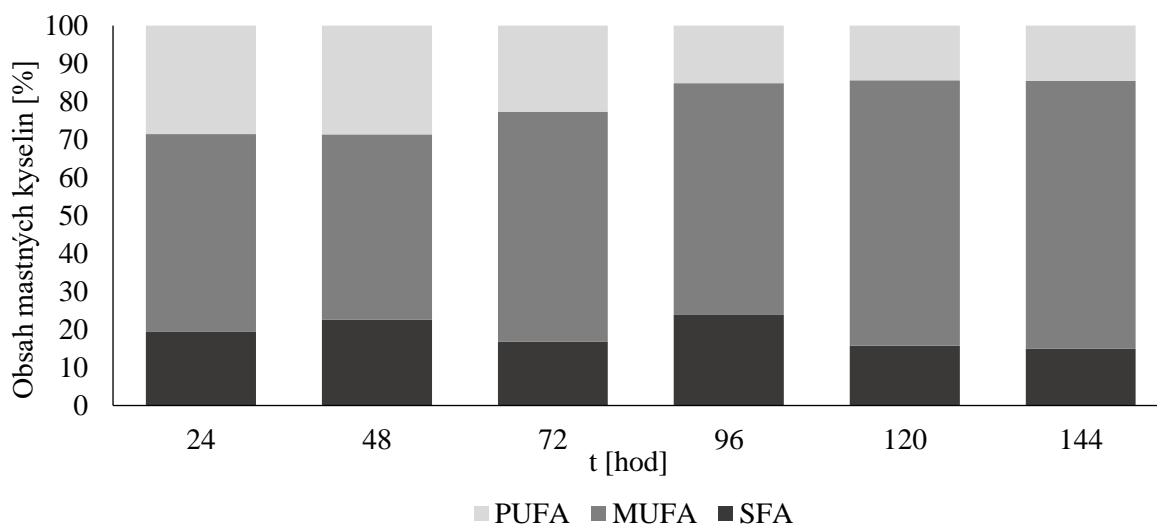
4.2 Produkce mastných kyselin kvasinkami v médiích s různým C/N poměrem

Lyofilizovaná biomasa kvasinek byla podrobena transesterifikaci a pomocí plynové chromatografie byl stanoven profil mastných kyselin. Stanovené mastné kyseliny byly zařazeny do tří skupin: PUFA (polynenasycené mastné kyseliny), MUFA (mononenasycené mastné kyseliny) a SFA (nasycené mastné kyseliny). PUFA zahrnují kyseliny linolovou, eikosapentaenovou, α -linolenovou a dokosahexaenovou. MUFA je součtem kyselin myristolejové, palmitolejové heptadecenové, olejové, eikosenové, erukové a nervonové. SFA jsou součtem zbývajících kyselin: myristové, pentadekanové, palmitové, stearové, eikosanové, lignocerové. Výsledkem je procentuální zastoupení PUFA, MUFA a SFA v celkovém množství mastných kyselin v biomase.

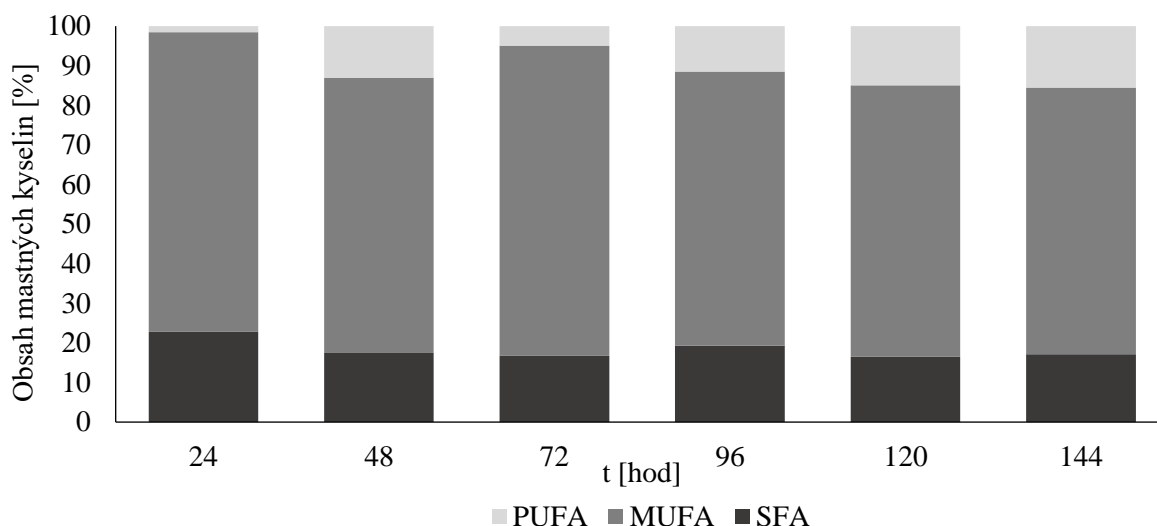
Polynenasycené mastné kyseliny, jako je kyselina arachidonová (AA, 20:4n6), eikosapentaenová (EPA, 20:5n3) a dokosahexaenová (DHA, 22:6n3) jsou desaturačními a elongačními reakcemi odvozovány převážně z esenciálních mastných kyselin linolové (18:2n6) a α -linolenové (18:3n3). Tyto esenciální mastné kyseliny jsou jakožto prekurzory eikosanoidů v lidské stravě nezastupitelné. Právě kyselina linolová a kyselina α -linolenové v kvasinkových PUFA obsaženy v největším množství a o jejich produkci v biomase kvasinek je velký zájem.

4.2.1 *Cystofilobasidium macerans*

Produkce mastných kyselin *C. macerans* byla viditelně inhibována zvyšováním C/N poměru v médiu, viz Graf 29. Také je naprosto zřejmé snižování obsahu PUFA v rámci produkce celkových mastných kyselin, viz Graf 26–28.



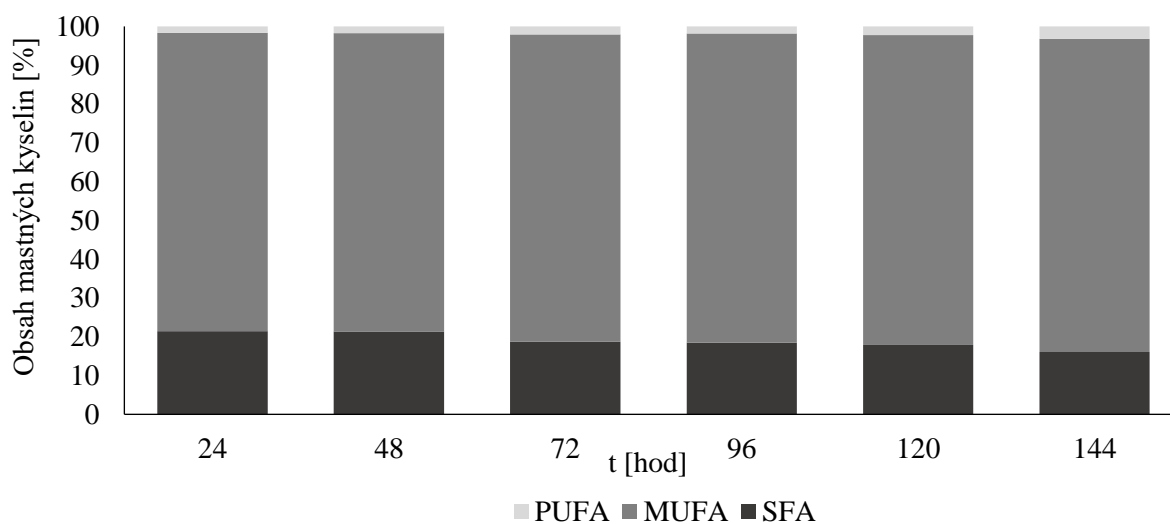
Graf 26: Zastoupení SFA, MUFA a PUFA v celkovém obsahu mastných kyselin v biomase *C. macerans* odebírané ve 24-hodinových intervalech z média s C/N = 70



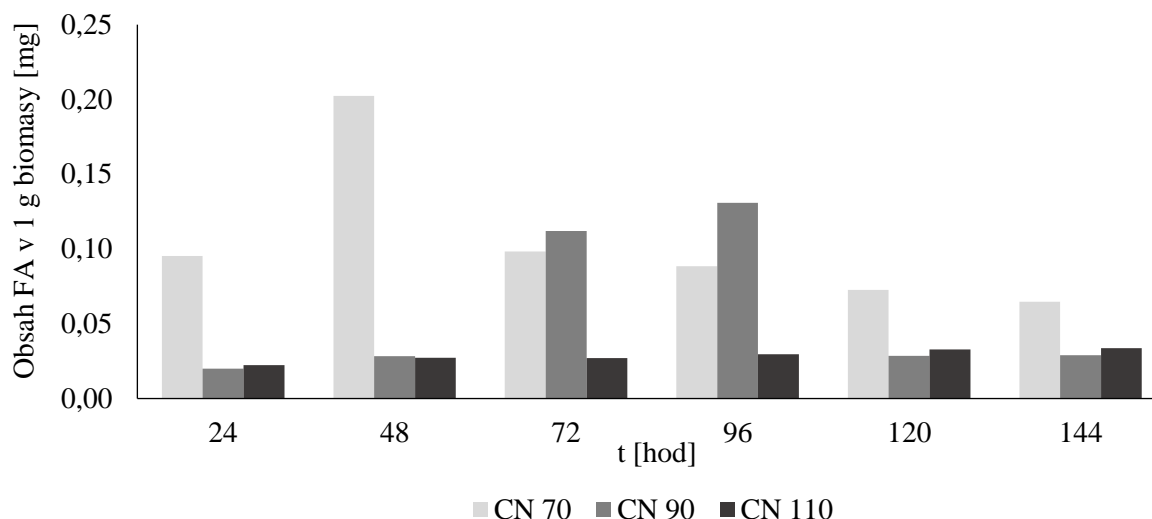
Graf 27: Zastoupení SFA, MUFA a PUFA v celkovém obsahu mastných kyselin v biomase *C. macerans* odebírané ve 24-hodinových intervalech z média s C/N = 90

Při kultivaci v médiu s C/N = 70 bylo hned v prvních dvou dnech dosaženo maxima produkce mastných kyselin. V rámci kultivace při C/N = 90 je produkováno nejvíce PUFA pátý a šestý den kultivace, a při C/N = 110 již PUFA nejsou téměř zastoupeny. SFA zůstávají celkově bez větších změn.

Obsah PUFA by se při dalších experimentech mohl regulovat nižší teplotou, například T. Řezanka a kol. [130]. kultivovali zástupce rodu *Cystofilobasidium* při 4 °C, kdy docházelo ke snížení obsahu MUFA, a naopak se zvýšil obsah žádanějších PUFA a obecně byl nárůst biomasy nejvyšší při kultivacích v rozmezí 4–10 °C.



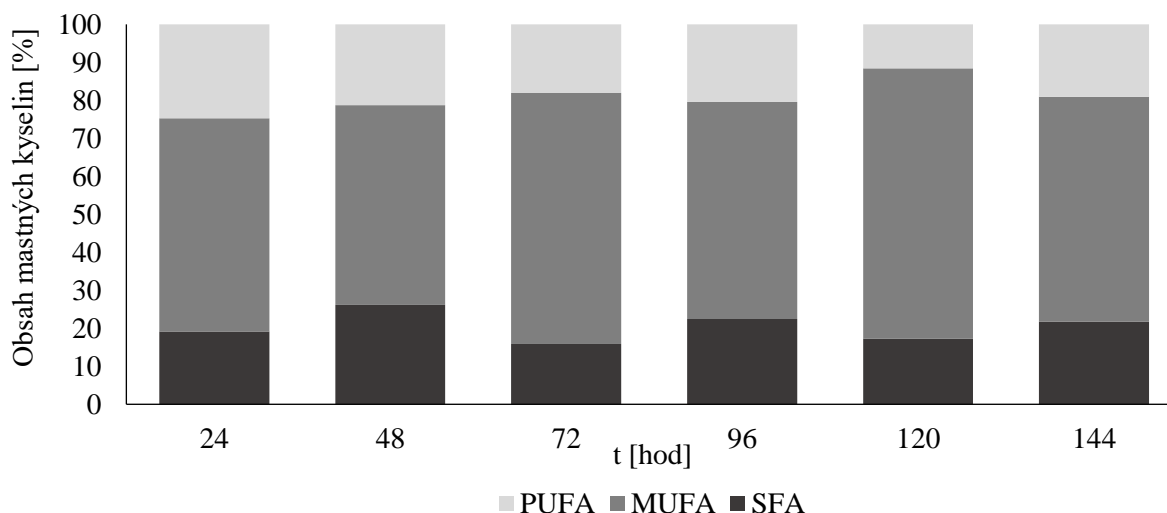
Graf 28: Zastoupení SFA, MUFA a PUFA v celkovém obsahu mastných kyselin v biomase *C. macerans* odebírané ve 24-hodinových intervalech z média s C/N = 110



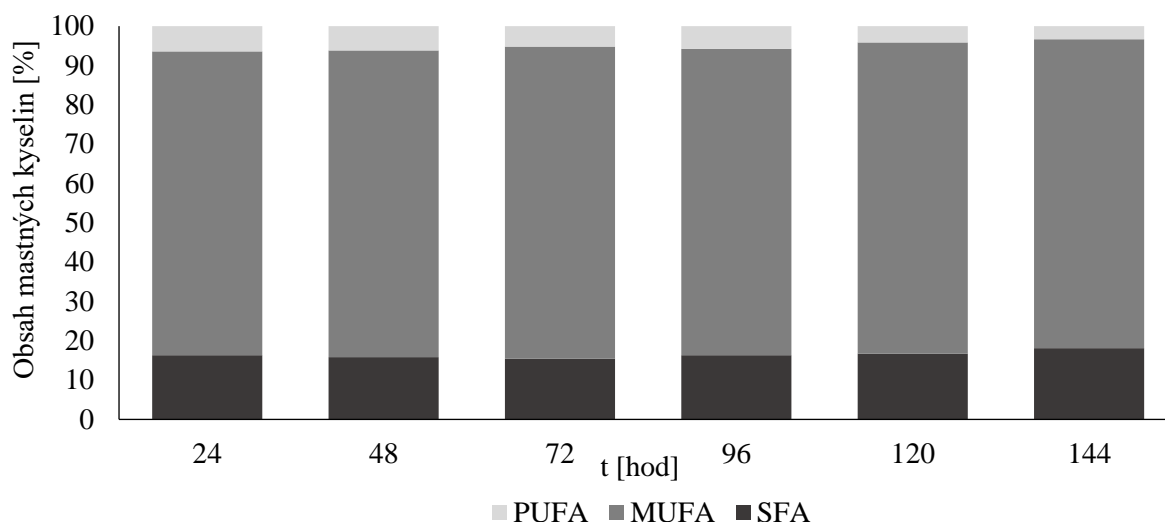
Graf 29: Závislost celkového množství mastných kyselin v 1 g odebrané biomasy *C. macerans* na různých časech odběru

4.2.2 *Sporidiobolus metaroseus*

Kultivací *S. metaroseus* bylo zjištěno, že při poměru C/N = 70, produkuje tento druh zdaleka nejvyšší množství mastných kyselin, zatímco při C/N = 90 a C/N = 110 je produkce zhruba třetinová. Vše zobrazuje Graf 33, a dále lze z grafů 30–32 jasně odvodit tendenci ke snižování produkce PUFA při vyšším C/N poměru v médiu. Produkce SFA zůstává téměř beze změn až na jedinou výjimku, kdy po prvním dni kultivace v médiu s C/N = 110 bylo zjištěno velmi nápadné zvýšení obsahu. Zvýšení obsahu SFA je zde je natolik nápadné, že nejvíce pravděpodobným vysvětlením je chyba měření.

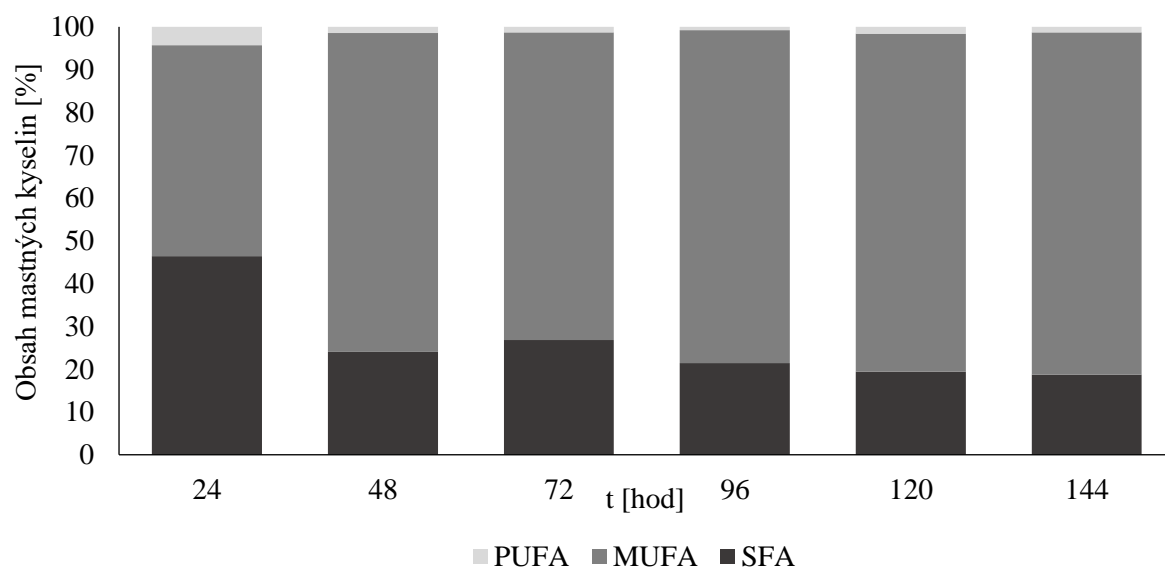


Graf 30: Zastoupení SFA, MUFA a PUFA v celkovém obsahu mastných kyselin v biomase *S. metaroseus* odebírané ve 24-hodinových intervalech z média s C/N = 70

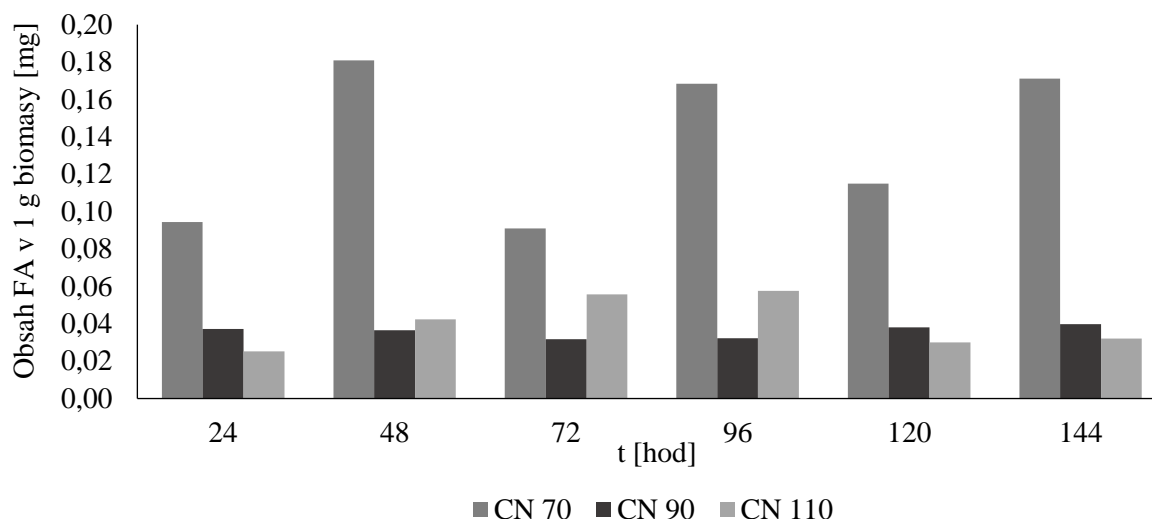


Graf 31: Zastoupení SFA, MUFA a PUFA v celkovém obsahu mastných kyselin v biomase *S. metaroseus* odebírané ve 24-hodinových intervalech z média s C/N = 90

M. Han a kol. [131] kultivovali jeden z druhů rodu *Sporidiobola* v médiu nejen s glukózou, ale i s kukuřičným výluhem a kvasničným extraktem. Již po třetím dni kultivace dosáhli v rámci lipidických látek necelých 80 % nenasycených mastných kyselin. Dokonce byl tímto druhem produkován EPS, u kterého byl stanoven poměr galaktózy, glukózy a manózy jako 16:8:1, což nasvědčuje produkci nového typu polysacharidu.



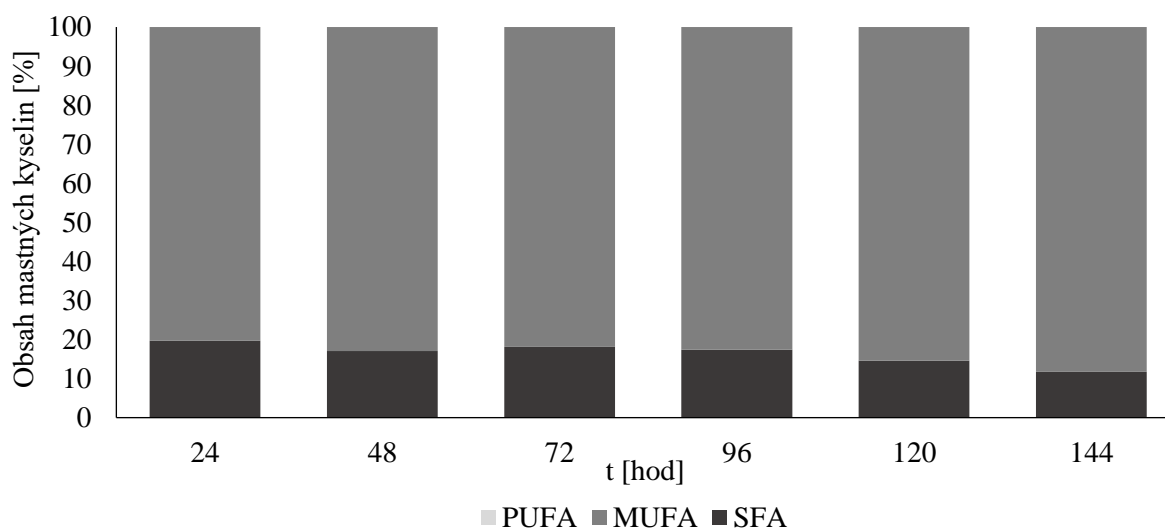
Graf 32: Zastoupení SFA, MUFA a PUFA v celkovém obsahu mastných kyselin v biomase *S. metaroseus* odebírané ve 24-hodinových intervalech z média s C/N = 110



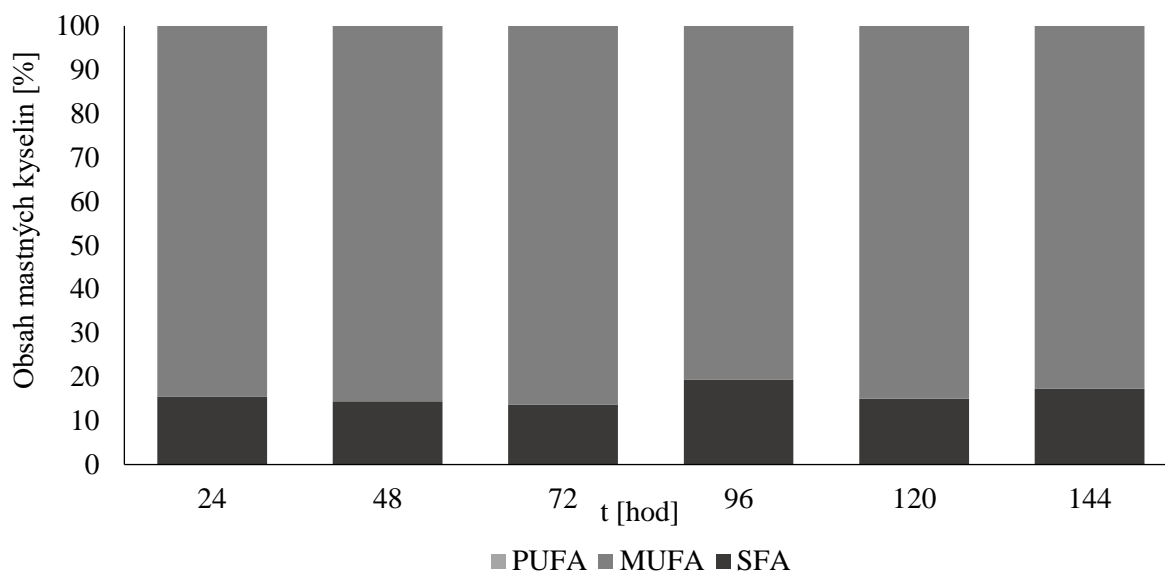
Graf 33: Závislost celkového množství mastných kyselin v 1 g odebrané biomasy *S. metaroseus* na různých časech odběru

4.2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

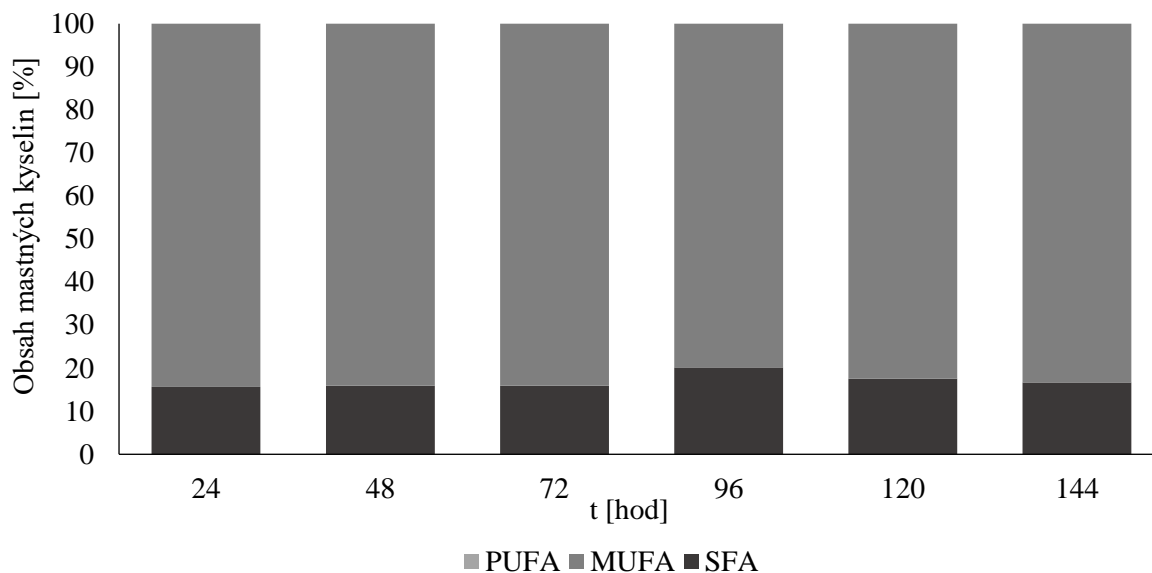
Bylo potvrzeno, že *S. cerevisiae* není přirozeným producentem PUFA a jejich syntéza nemůže být indukována ani vysokým C/N poměrem. Pouze po jistých genetických modifikacích (zavedení odpovídajících desaturáz a elongáz) dosáhl Parker-Barnes a kol. [132], [133] produkce PUFA i v *S. cerevisiae*. Tento druh je pro podobné experimenty preferován mimo jiné i z důvodu spolehlivé, stabilní produkce mastných kyselin bez velkých výkyvů, což je naprosto zřejmé i z grafů 13–15. Zastoupení MUFA a SFA se téměř nemění, a zcela dominantní je při všech C/N poměrech obsah MUFA. Více než 70 % všech mastných kyselin *S. cerevisiae* by podle A. M. Romero a kol. [115] měly tvořit kyseliny palmitolejová a olejová.



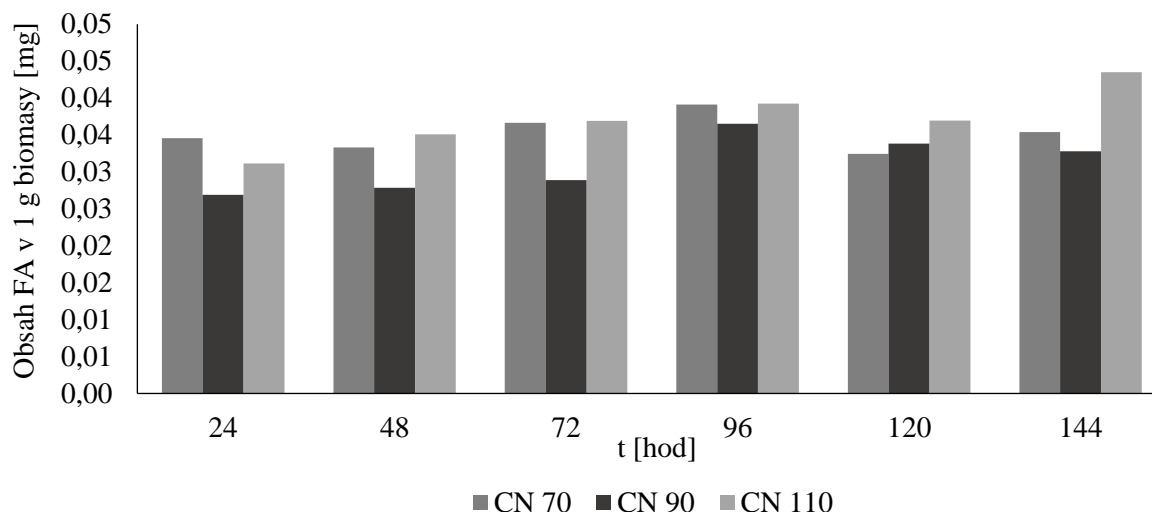
Graf 34: Zastoupení SFA, MUFA a PUFA v celkovém obsahu mastných kyselin v biomase *S. cerevisiae* odebírané ve 24-hodinových intervalech z média s C/N = 70



Graf 35: Zastoupení SFA, MUFA a PUFA v celkovém obsahu mastných kyselin v biomase *S. cerevisiae* odebírané ve 24-hodinových intervalech z média s C/N = 90



Graf 36: Zastoupení SFA, MUFA a PUFA v celkovém obsahu mastných kyselin v biomase *S. cerevisiae* odebírané ve 24-hodinových intervalech z média s C/N = 110

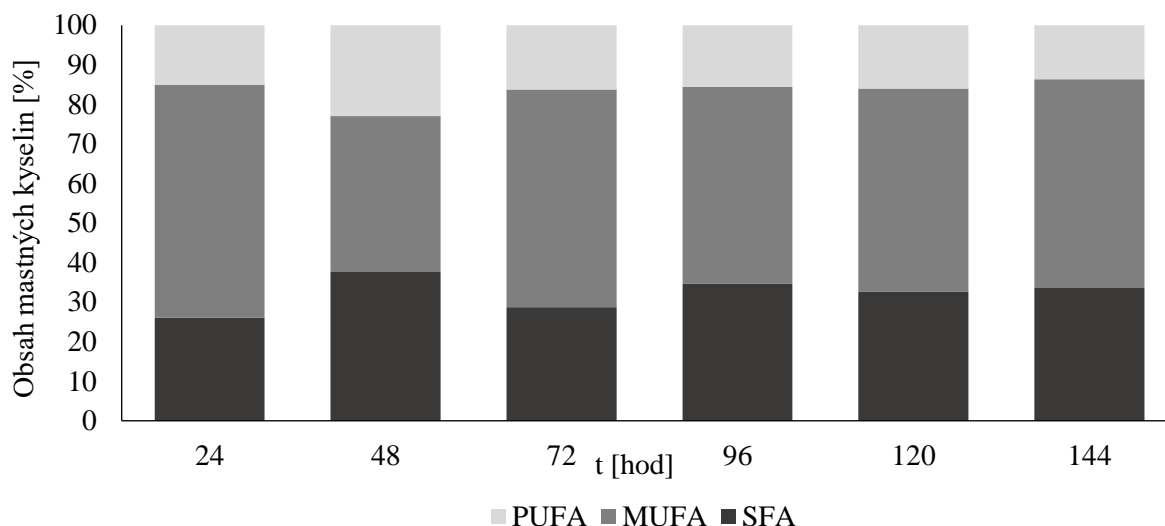


Graf 37: Závislost celkového množství mastných kyselin v 1 g odebrané biomasy *S. cerevisiae* na různých časech odběru

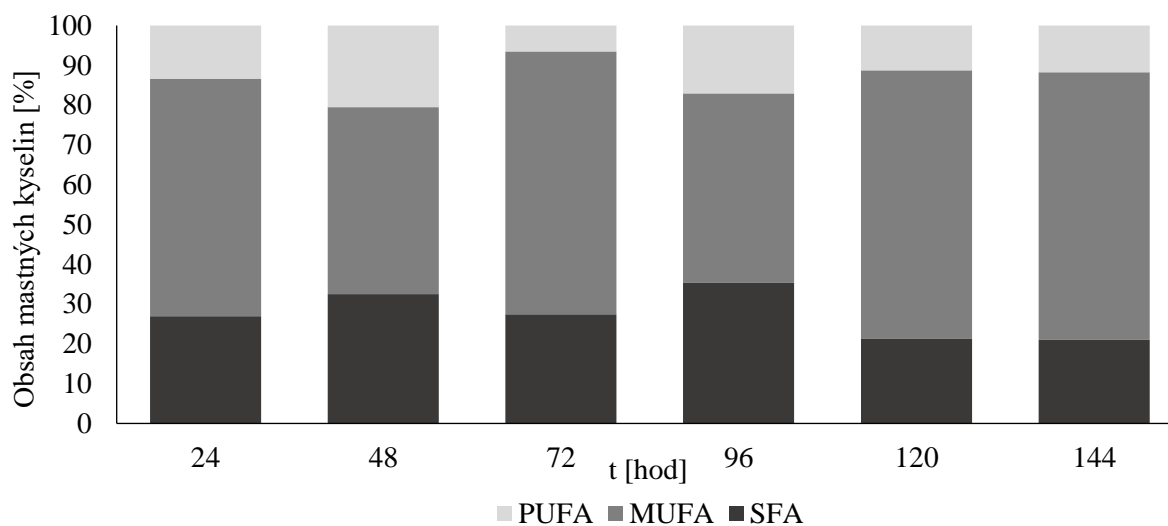
4.2.4 *Rhodotorula glutinis*

R. glutinis je již velmi dobře známa produkcí zásobních lipidů i produkcí velkého množství karotenoidů [77]. Například J. Tkáčová a kol. [134] uvádějí, že při poměru C/N = 70 dosahovala *R. glutinis* nejvyšší produkce mastných kyselin. To potvrzují i výsledky této diplomové práce, viz Graf 41. Dále podle J. Tkáčové a kol. [134] měla *R. glutinis* po vyčerpání glukózy z média začne ukládat zásobní lipidy a inhibovat svůj růst. Takovou tendenci je jasně vidět z Graf 41, kdy od čtvrtého dne roste obsah mastných kyselin v biomase. Zároveň je inhibován růst, kultury a množství biomasy zůstává beze změny (viz Graf 16).

Po zvýšení C/N poměru na 90 ovšem čtvrtý den nastává zlom a obsah mastných kyselin prudce klesá. Dle Graf 17 zde ale prudce klesá i množství biomasy, je tedy možné, že poměr C/N = 90 je absolutně nevhodný pro dlouhodobější kultivace *R. glutinis*. Zajímavé je, že při C/N = 110 vykazuje *R. glutinis* podobné chování, jako při C/N = 70, jen produkuje méně mastných kyselin. Dle Graf 18 produkuje také celkově méně biomasy.

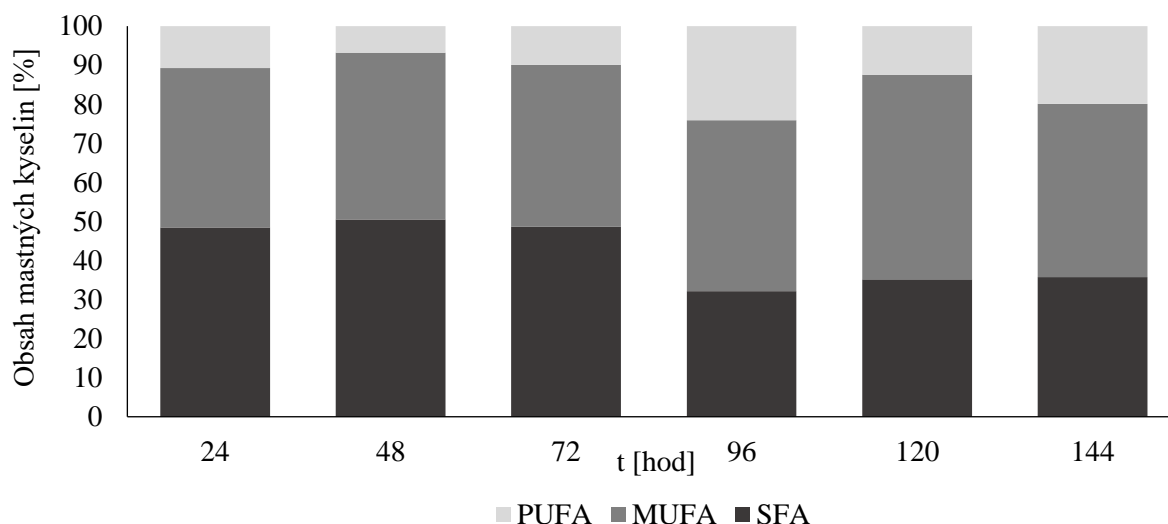


Graf 38: Zastoupení SFA, MUFA a PUFA v celkovém obsahu mastných kyselin v biomase *R. glutinis* odebírané ve 24-hodinových intervalech z média s C/N = 70

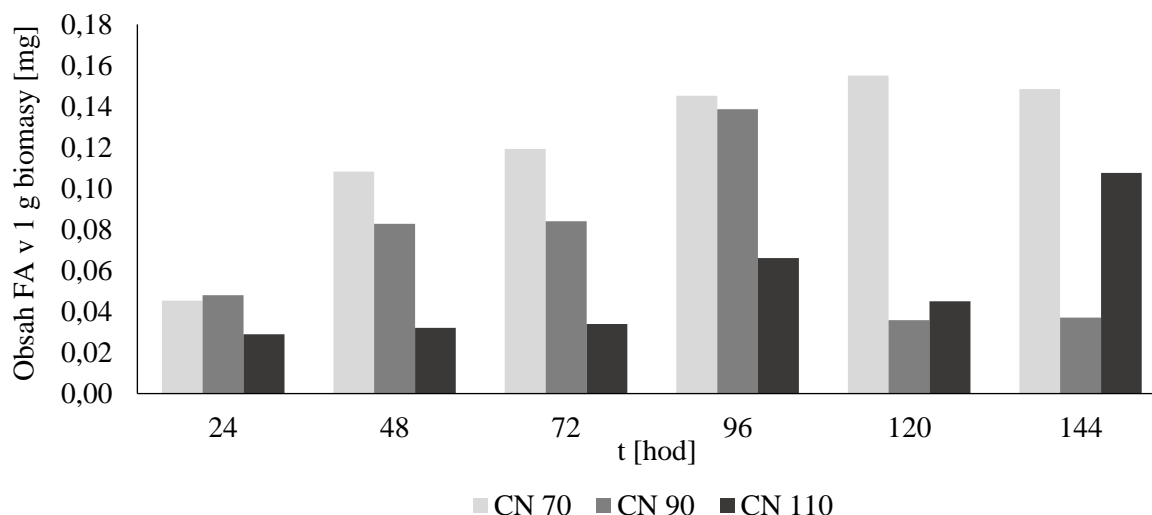


Graf 39: Zastoupení SFA, MUFA a PUFA v celkovém obsahu mastných kyselin v biomase *R. glutinis* odebírané ve 24-hodinových intervalech z média s C/N = 90

Co se týče profilu mastných kyselin, zdá se být poměrně stabilní, při C/N = 70 se takřka nemění viz Graf 38, jen po čtvrtém dni růstu v médiu s C/N = 90 a C/N = 110 je viditelné mírné zvýšení obsahu PUFA, viz grafy 39–40.



Graf 40: Zastoupení SFA, MUFA a PUFA v celkovém obsahu mastných kyselin v biomase *R. glutinis* odebírané ve 24-hodinových intervalech z média s C/N = 110

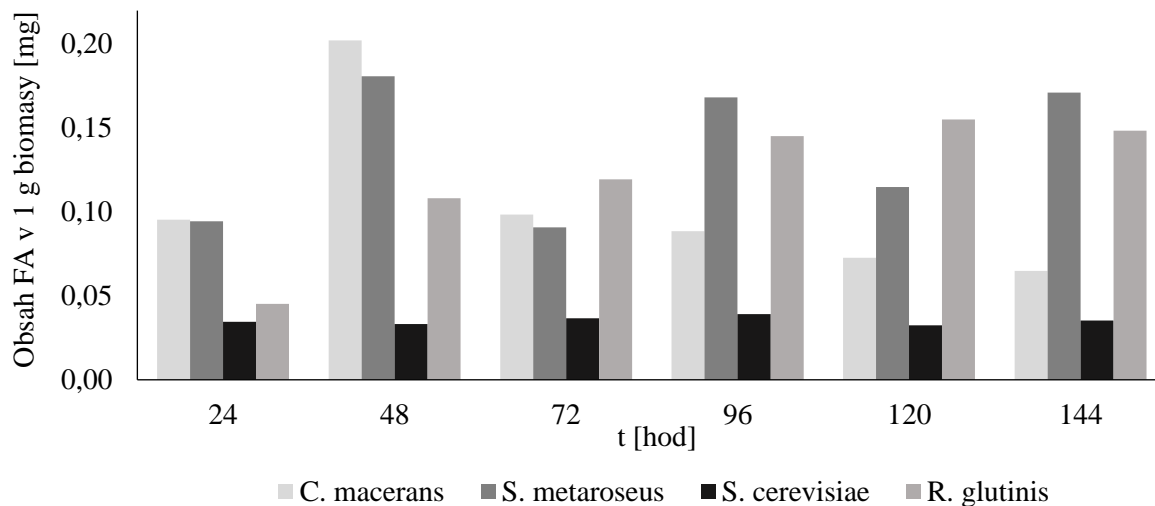


Graf 41: Závislost celkového množství mastných kyselin v 1 g odebrané biomasy *R. glutinis* na různých časech odběru

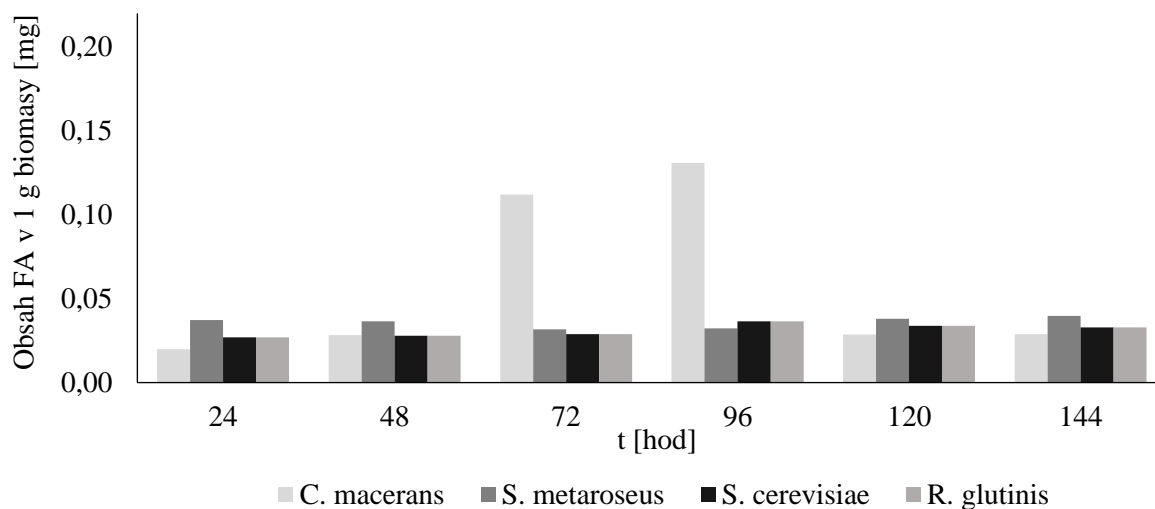
4.2.5 Porovnání produkce mastných kyselin kvasinkami

Produkce mastných kyselin v médiu s poměrem C/N = 70 uvádí Graf 42. Nejméně FA produkuje jednoznačně *S. cerevisiae*, na druhou stranu je také nejspolehlivějším producentem, jelikož obsah FA se v její biomase takřka nemění. Nejlepším producentem je při nejnižším C/N poměru *R. glutinis*, v jejíž biomase obsah FA pozvolna roste, od čtvrtého dne se drží maxima a nevykazuje velké výkyvy v produkci. Naopak *S. metaroseus* produkuje FA s velkými výkyvy, maxima obsahu FA se opakují ve 48., 72. a 144. hodině růstu. *C. macerans* produkuje nejvíce FA druhý den kultivace (jedná se také o globální maximum obsahu FA v rámci poměru C/N = 70), a poté již obsah lipidů pozvolna klesá.

Při kultivaci kvasinek v médiích s C/N = 90 (viz Graf 43) došlo ke snížení obsahu FA v rámci všech časových odběrů u všech kultivovaných kmenů. Obsahem FA se při této kultivaci kvasinky liší jen minimálně, jedinou výjimkou je zde *C. macerans*, který třetí a čtvrtý den produkoval značně vyšší množství FA.

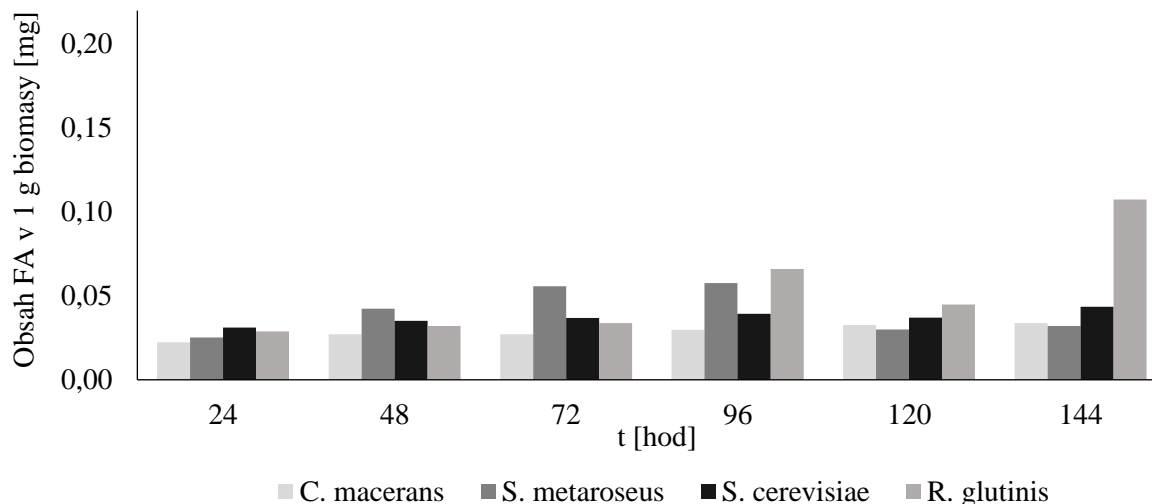


Graf 42: Porovnání produkce celkového množství mastných kyselin kvasinek při kultivaci v médiu s $C/N = 70$



Graf 43: Porovnání produkce celkového množství mastných kyselin kvasinek při kultivaci v médiu s $C/N = 90$

Po dalším zvýšení poměru C/N na 110 se obsah FA kvasinek překvapivě mírně zvýšil a v rámci jednotlivých kmenů jsou již patrné rozdíly (viz Graf 43). *R. glutinis* je zde opět nejlepším producentem, maximum FA produkuje opět spíše v pozdější fázi kultivace, a globální maximum nastává šestý den kultivace.



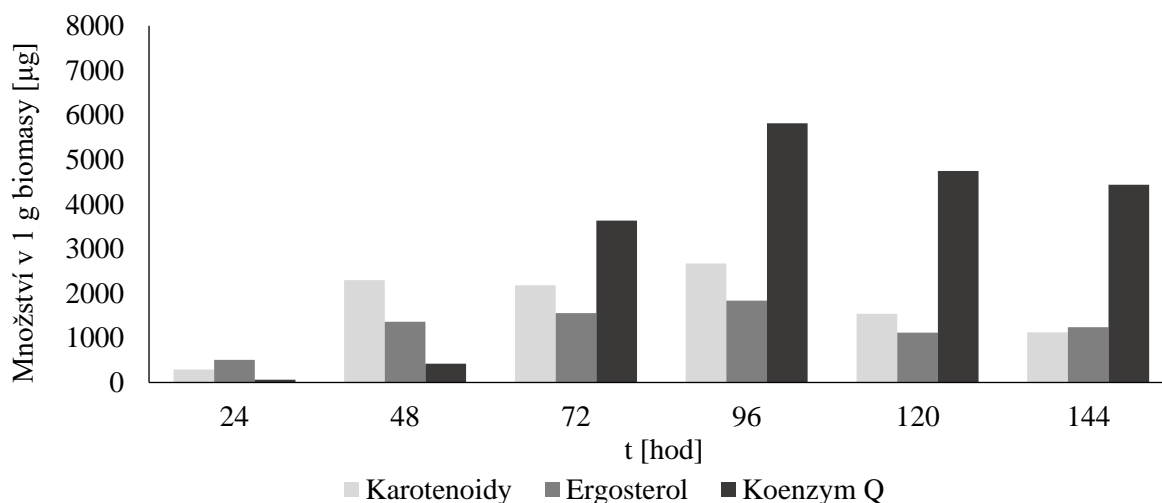
Graf 44: Porovnání produkce celkového množství mastných kyselin kvasinek při kultivaci v médiu s C/N = 110

4.3 Produkce karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q kvasinkami v médiích s různým C/N poměrem

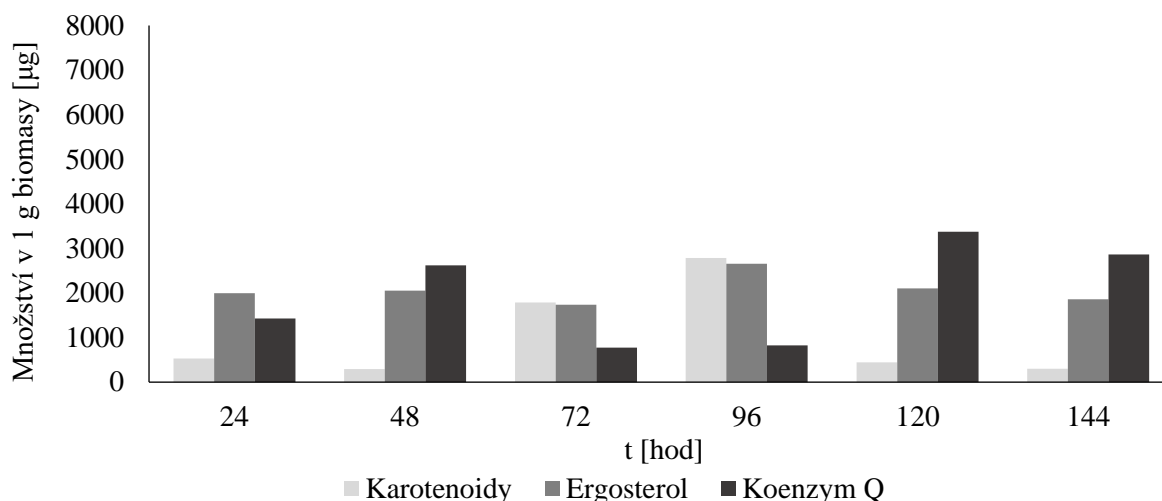
Karotenoidy, ergosterol i koenzym Q byly stanoveny pomocí kapalinové chromatografie, viz kapitola 3.2.2. Jelikož na buněčnou kulturu během kultivace působilo přímé záření, předpokládá se zvýšená produkce karotenoidů (u červených kvasinek). Produkce ergosterolu je též předpokládána, ergosterol zajišťuje správnou funkci lipidických membrán (ovlivňuje jejich permeabilitu), a nalezneme ho i v cytosolu buněk, kde se účastní regulace proteinkinázy, která je potřebná pro iniciaci růstu [135]. Vysoký podíl Koenzymu Q v biomase je očekáván spíše v pozdních fázích kultivace, jelikož se jedná o přenašeč elektronů dýchacího řetězce, a tedy o látku nezbytnou pro produkci ATP

4.3.1 *Cystofilobasidium macerans*

V této diplomové práci byla u *C. macerans* sledována velmi nízká produkce karotenoidů.

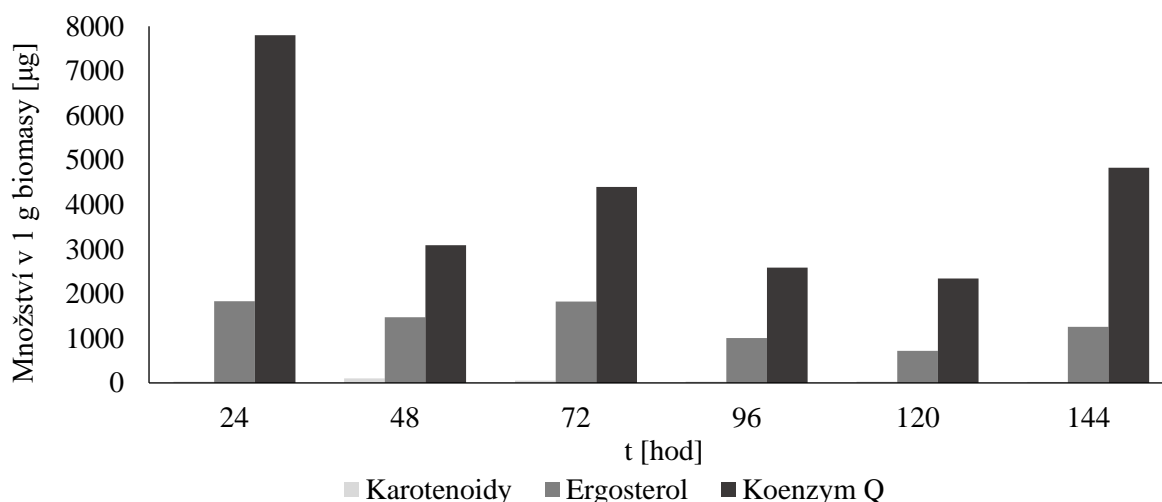


Graf 45: Závislost obsahu karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q v 1 g biomasy *C. macerans* na čase odběru buněčné suspenze z média s C/N = 70



Graf 46: Závislost obsahu karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q v 1 g biomasy *C. macerans* na čase odběru buněčné suspenze z média s C/N = 90

Pouze při poměru C/N = 70 a 90 v médiu je *C. macerans* schopen biosyntézy karotenoidů, kdy větší produkce je dosaženo jen čtvrtý den kultivace, viz grafy 45–46. Po zvýšení C/N poměru na 110 pak produkce karotenoidů nebyla vůbec prokázána, viz Graf 47.



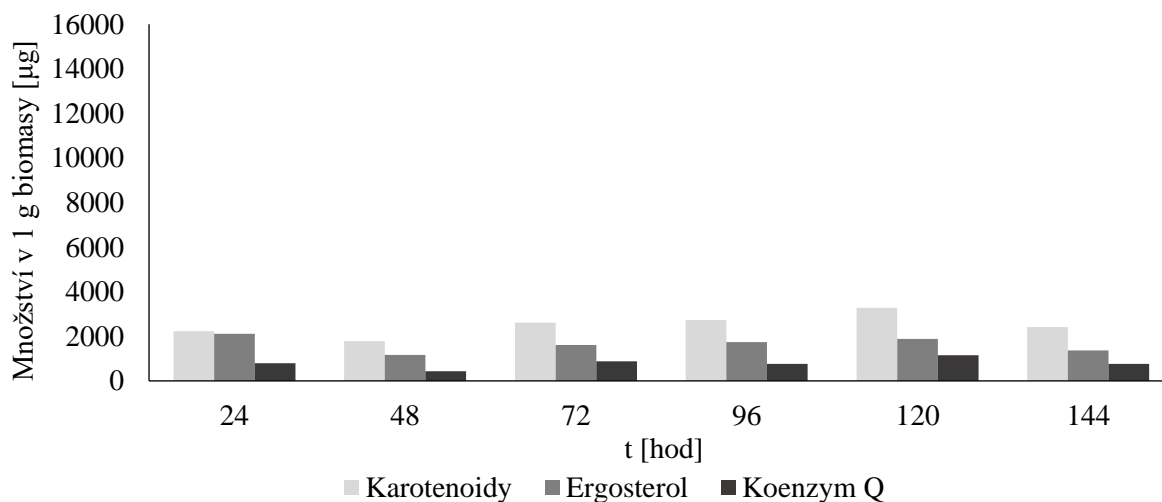
Graf 47: Závislost obsahu karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q v 1 g biomasy *C. macerans* na čase odběru buněčné suspenze z média s C/N = 110

V produkci ergosterolu nelze sledovat jasnou tendenci, poměr C/N v médiu pravděpodobně žádný vliv na jeho produkci nemá, a vykazuje podobnou závislost jako množství biomasy, viz grafy 7–9. Produkce ergosterolu by mohla být spíše ovlivněna typem zdroje uhlíku. Například S. Petrik a kol. [136] uvádí nejvyšší obsah karotenoidů a ergosterolu zástupce rodu *Cystofilobasidium* při kultivaci v médiu obsahující glukózu i glycerol (při C/N = 57), s preferencí glycerolu jako substrátu.

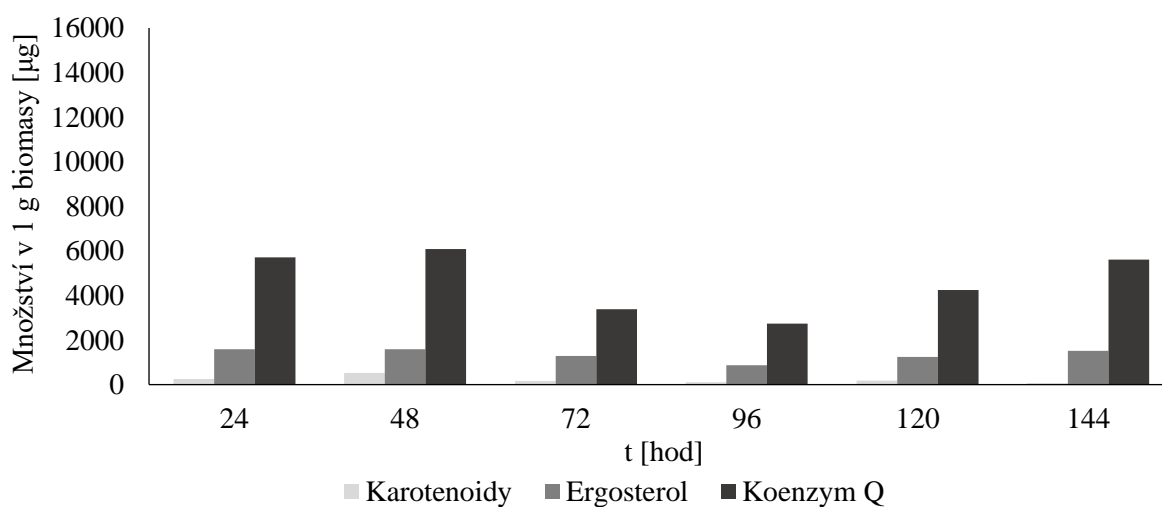
Produkce koenzymu Q se v posledních dnech kultivace v médiu s C/N = 70 zřetelně zvyšovala, zatímco v médiu s C/N = 90 byla minimální. Celkově nejvyšší produkce koenzymu Q bylo dosaženo první den kultivace při nejvyšším C/N poměru,

4.3.2 *Sporidiobolus metaroseus*

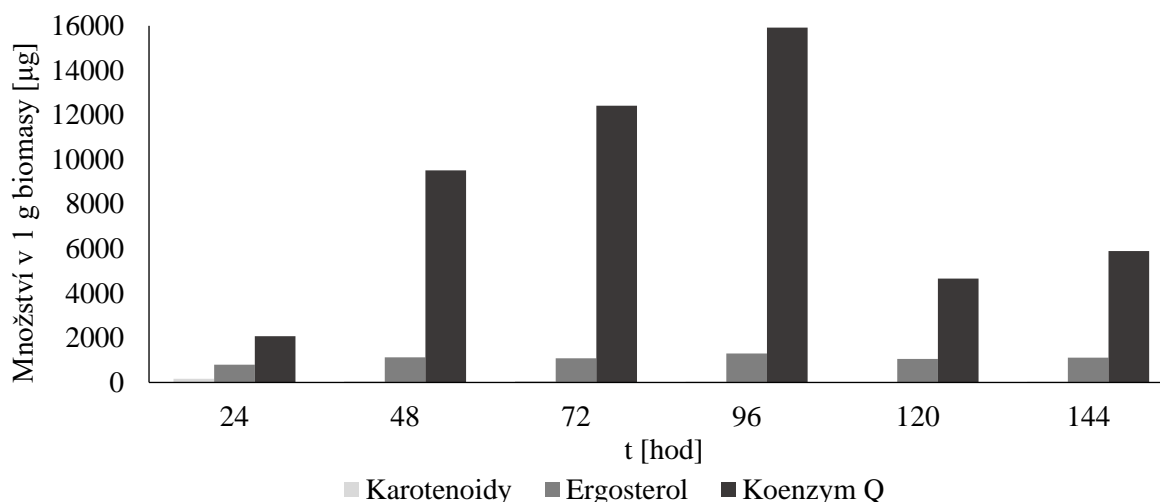
Kultivací *S. metaroseus* bylo dosaženo velmi nízké produkce karotenoidů, která byla navíc pozorována pouze při kultivaci v médiu s C/N = 70, viz Graf 48. Situace je tedy podobná jako u *C. macerans*, kdy vyšší C/N poměr inhibuje biosyntézu karotenoidů. U *S. metaroseus* dokonce již při C/N = 90 nebyla prokázána přítomnost karotenoidů.



Graf 48: Závislost obsahu karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q v 1 g biomasy *S. metaroseus* na čase odběru buněčné suspenze z média s C/N = 70



Graf 49: Závislost obsahu karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q v 1 g biomasy *S. metaroseus* na čase odběru buněčné suspenze z média s C/N = 90



Graf 50: Závislost obsahu karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q v 1 g biomasy *S. metaroseus* na čase odběru buněčné suspenze z média s C/N = 110

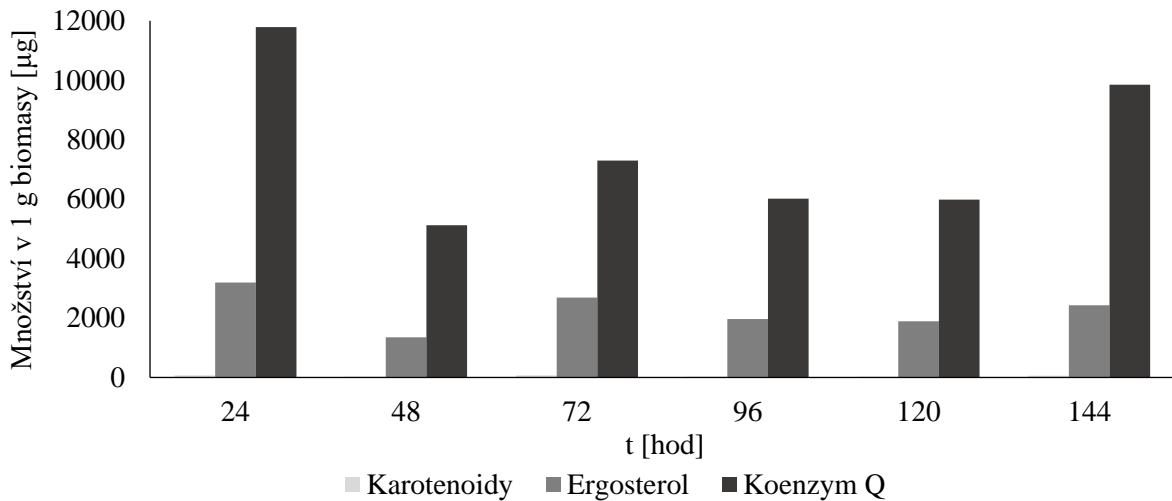
Produkce karotenoidů *S. metaroseus* je výsledkem mnoha studií, často je tento druh kultivován v médiu s glycerolem, kde je mezi karotenoidy naprosto dominující β -karoten [137]. R. Colet a kol. [138] uvádí nejvyšší produkci karotenoidů při kultivaci s komplexním substrátem, konkrétně s glycerolem, sladovým extraktem a peptonem, kdy po jedenáctém dnu kultivace bylo dosaženo nejvyšší produkce.

Produkce ergosterolu je u *S. metaroseus* naprosto minimální téměř neměnná, beze změn v médiích s různými C/N poměry. Produkce koenzymu Q s C/N poměrem roste, a nejvyšší produkce je dosaženo při C/N = 110, konkrétně třetí a čtvrtý den kultivace, po kterých hned následuje prudký pokles. Tato tendence nelze nijak propojit s obsahem mastných kyselin, ani glukanů, jednotlivé závislosti nevykazují společné znaky.

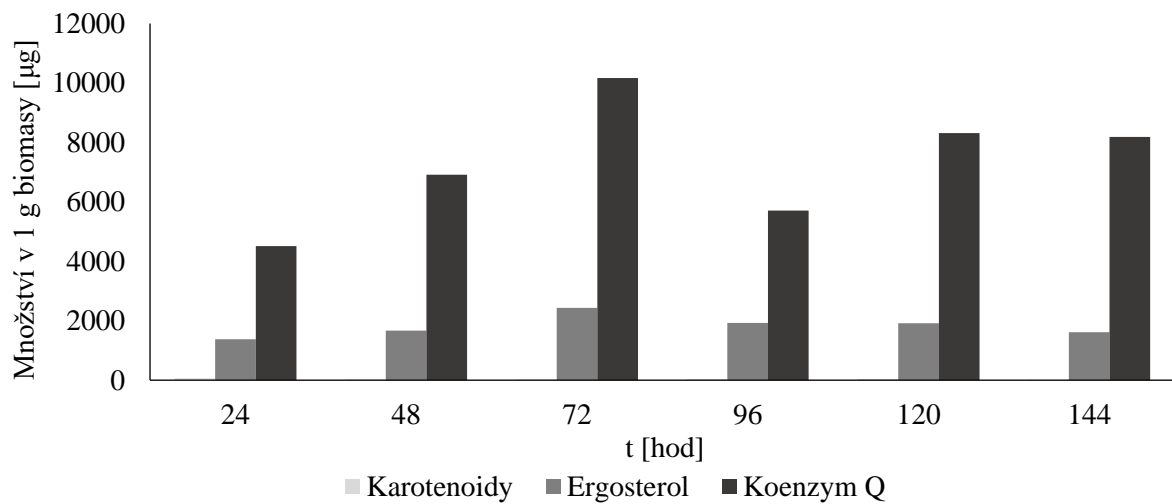
4.3.3 *Saccharomyces cerevisiae*

U většiny kmenů kvasinek je ergosterol syntetizován v řádu desetin procenta sušiny, nicméně *S. cerevisiae* může produkovat i jednotky procent ergosterolu [135]. V této diplomové práci bylo zjištěno, že je *S. cerevisiae* velmi spolehlivým producentem. Vyšší C/N poměr měl na produkci ergosterolu mírný negativní vliv, naopak obsah koenzymu Q zůstal v podstatě beze změny (viz grafy 51–53). Vyšší akumulace ergosterolu by mohlo být dosaženo například kontrolovaným přístupem kyslíku a přidavkem n-dodekanu. A. C. Blaga [139] uvádí trojnásobné zvýšení produkce ergosterolu po přidavku n-dodekanu do produkčního média.

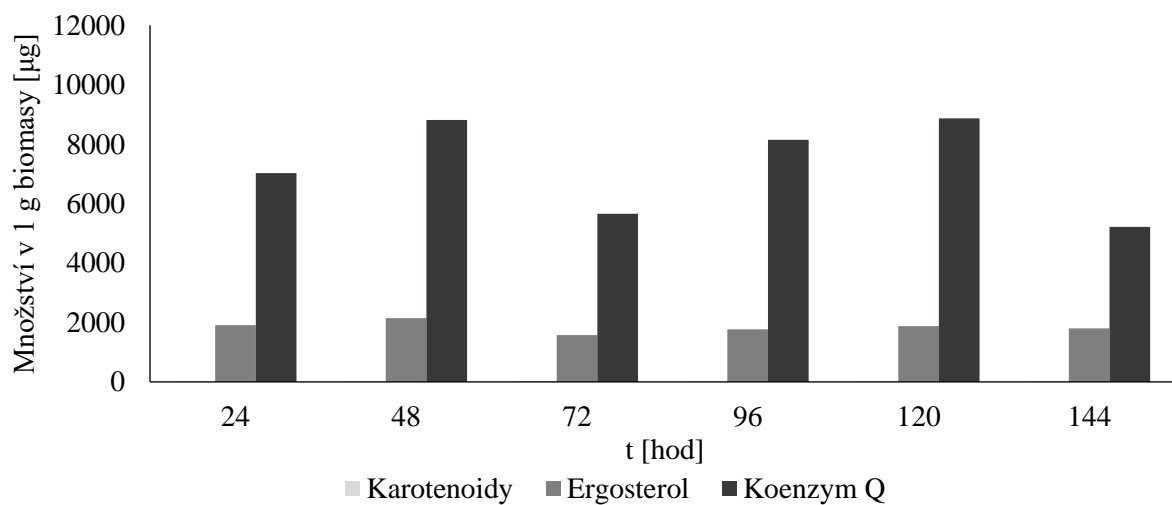
Obsah koenzymu Q zůstal při kultivacích v různých C/N poměrech v podstatě beze změny, měnila se spíše doba, kdy dosahoval jeho obsah maxima. Z výsledků této diplomové práce nelze jednoznačně určit vliv C/N poměru na jeho biosyntézu. jednoznačně nejvíce koenzymu Q je produkováno při C/N = 70, a to hned po prvním dnu kultivace v produkčním médiu. Poté jeho množství klesá, zatímco biomasa buněk pozvolna narůstá (viz Graf 13). Z grafu 52 je patrné maximum obsahu koenzymu Q třetí den kultivace v produkčním médiu s C/N = 90. Po tomto maximum opět docházelo k nárůstu biomasy a rostl i obsah β -glukanů, viz Graf 14. Při kultivaci v médiu v C/N = 110 je udržována poměrně stálá koncentrace koenzymu Q.



Graf 51: Závislost obsahu karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q v 1 g biomasy *S. cerevisiae* na čase odběru buněčné suspenze z média s C/N = 70



Graf 52: Závislost obsahu karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q v 1 g biomasy *S. cerevisiae* na čase odběru buněčné suspenze z média s C/N = 90

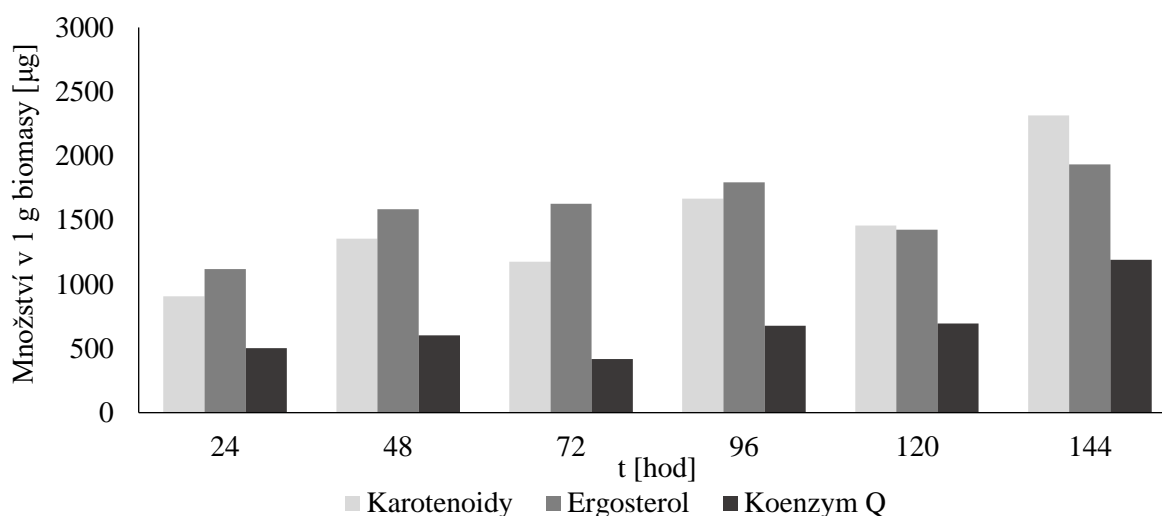


Graf 53: Závislost obsahu karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q v 1 g biomasy *S. cerevisiae* na čase odběru buněčné suspenze z média s C/N = 110

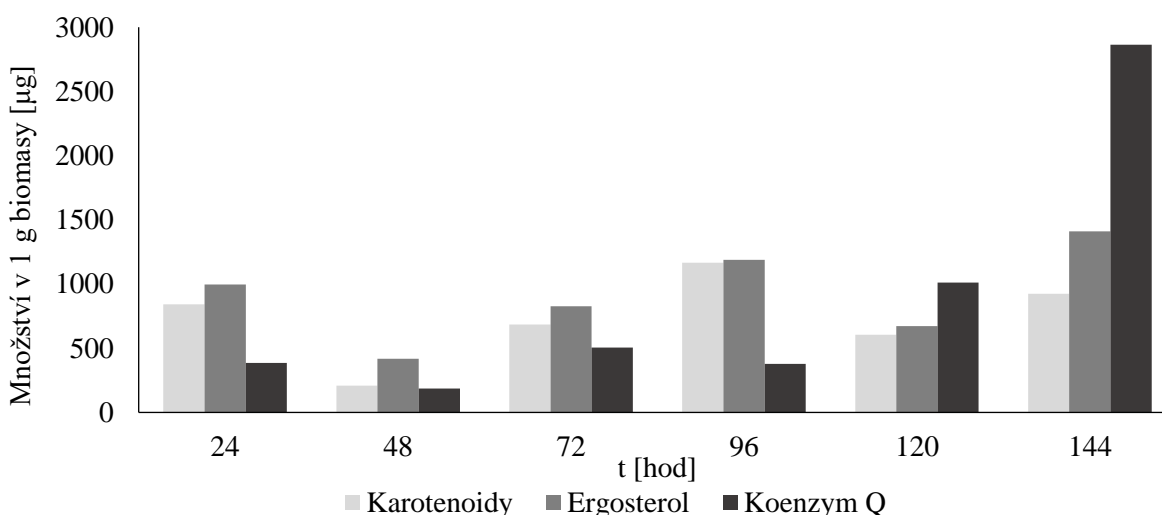
4.3.4 *Rhodotorula glutinis*

Produkce karotenoidů *R. glutinis* je jednoznačně nejvyšší při poměru C/N = 70, viz Graf 54. Jak je dále vidět na grafech 55–56, zvyšování C/N poměru na obsah karotenoidů nemá zdaleka tak markantní vliv, jako u *C. macerans* nebo *S. metaroseus*.

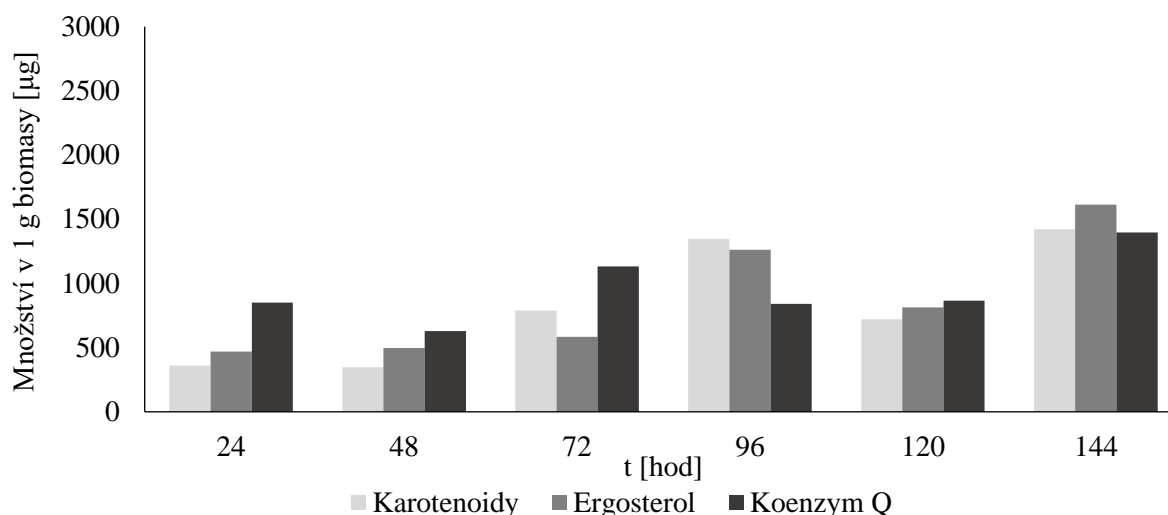
J. Tkáčová a kol. [134] sledovali nejvyšší produkci karotenoidů *R. glutinis* při C/N = 50. Také uvádějí, že teprve jistou dobu po akumulaci zásobních lipidů jsou tyto lipidy rozštěpeny β -oxidací na acetyl-CoA, a ten je následně využíván pro biosyntézu β -karotenu. Výsledky této diplomové práce nicméně toto chování nenaznačují, například při C/N = 70 je nejvyšší produkce karotenoidů dosaženo po šestém dni kultivace, kdy je stále v biomase udržováno velké množství lipidů, viz Graf 41.



Graf 54: Závislost obsahu karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q v 1 g biomasy *R. glutinis* na čase odběru buněčné suspenze z média s C/N = 70



Graf 55: Závislost obsahu karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q v 1 g biomasy *R. glutinis* na čase odběru buněčné suspenze z média s C/N = 90

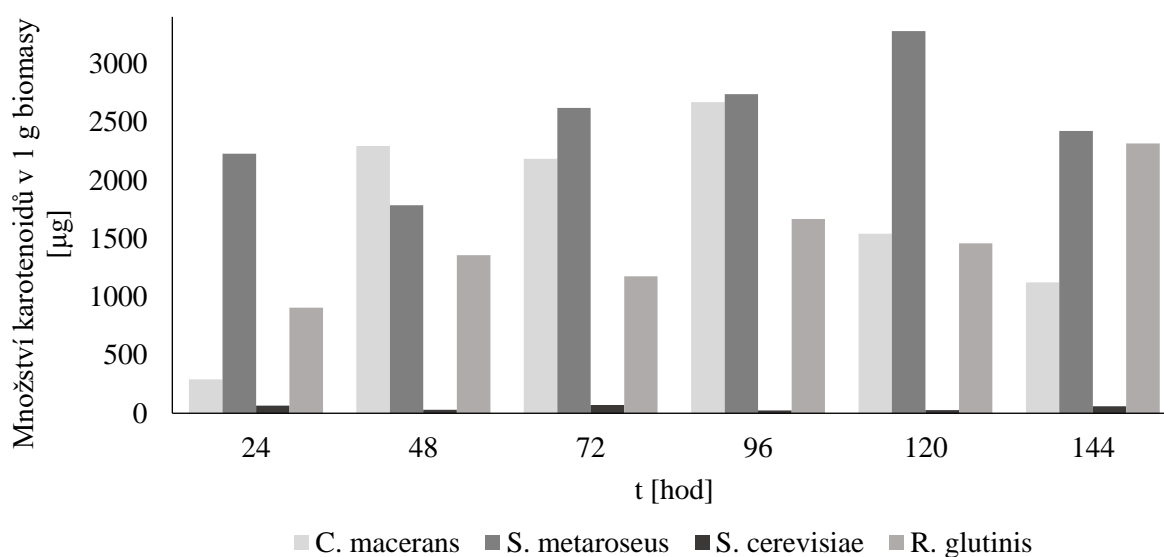


Graf 56: Závislost obsahu karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q v 1 g biomasy *R. glutinis* na čase odběru buněčné suspenze z média s C/N = 110

Produkce ergosterolu je jednoznačně nejvyšší při C/N = 70, a při vyšších C/N poměrech je zdatně nižší. Produkce koenzymu Q je poměrně stabilní, v rámci poměru C/N = 70 je jeho obsah nejvyšší v posledním dnu kultivace, dalo by se tedy očekávat, že v následujících dnech by *R. glutinis* již lipidy využívala jako zdroj energie. Obsah koenzymu Q prochází po šestém dni kultivace při C/N = 90 velkým maximem, a současně buňky *R. glutinis* v této době obsahovaly velmi málo lipidů (viz Graf 41), což by mohlo indikovat využívání lipidů jako zdroj energie. Ani růst buněk již totiž nebyl v této době zaznamenán (viz Graf 17), a glukóza již byla jistě z média vyčerpána.

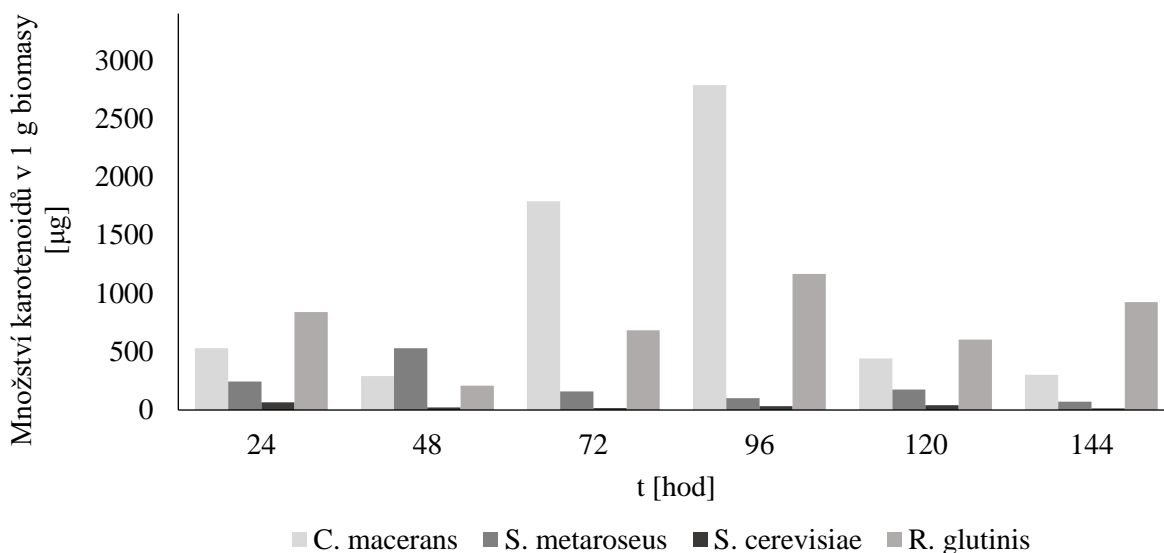
4.3.5 Porovnání produkce karotenoidů kvasinkami

Produkce karotenoidů je u všech kmenů, respektive u červených kvasinek (*S. cerevisiae* zde slouží pouze jako negativní kontrola) nejvyšší při poměru C/N = 70 (viz Graf 57). U vyšších C/N poměrů (viz graf 58–59) je biosyntéza karotenoidů značně inhibována, a v dalších experimentech by bylo žádoucí použít ještě nižší C/N poměry.

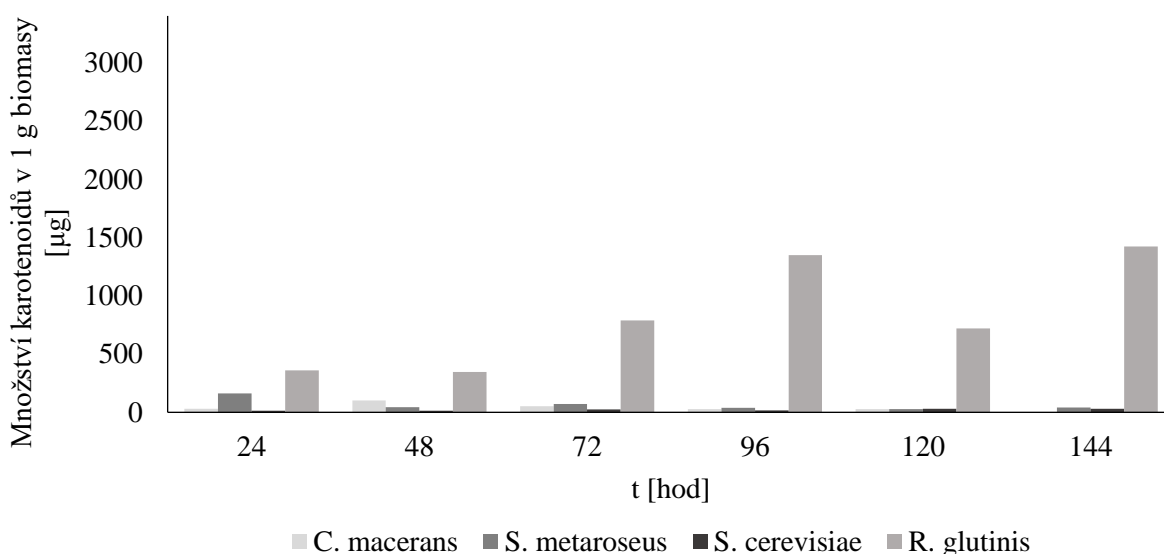


Graf 57: Porovnání produkce karotenoidů kvasinkami při kultivaci v médiu s C/N = 70

V rámci kultivace při poměru C/N = 70 je nejlepším producentem karotenoidů jednoznačně *S. metaroseus*, který celou dobu kultivace udržuje jejich vysoké množství a maximum nastává pátý den kultivace. Vysoké množství karotenoidů produkuje i *C. macerans*, po čtvrtém dnu kultivace ovšem toto množství značně klesá. Množství karotenoidů *R. glutinis* mírně kolísá a maxima dosahuje šestý den kultivace, kde je obsah karotenoidů shodný s *S. macerans*.



Graf 58: Porovnání produkce karotenoidů kvasinkami při kultivaci v médiu s C/N = 90

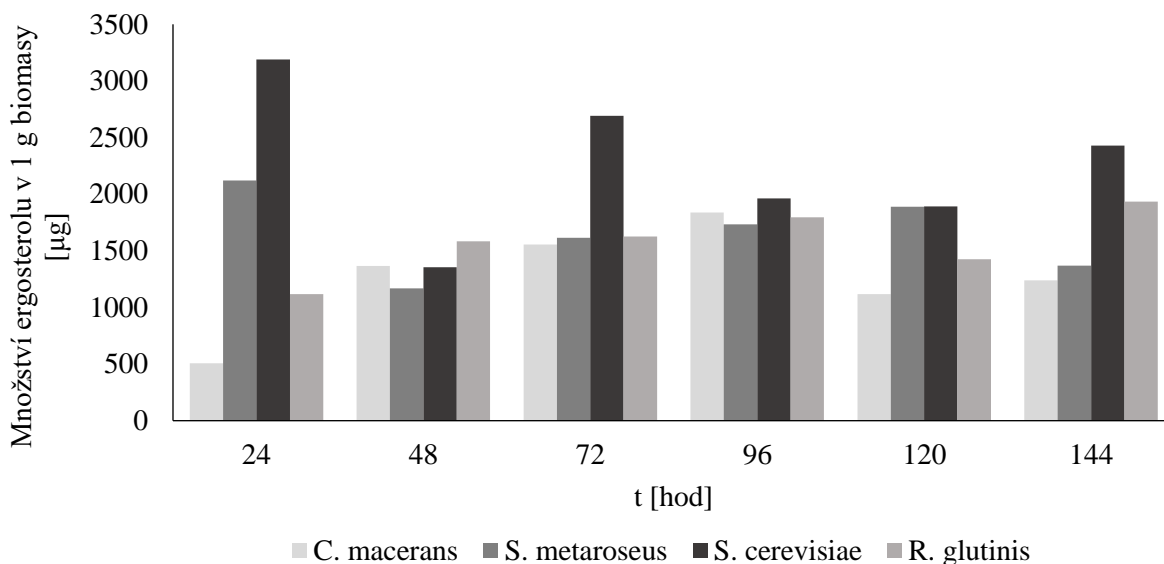


Graf 59: Porovnání produkce karotenoidů kvasinkami při kultivaci v médiu s C/N = 110

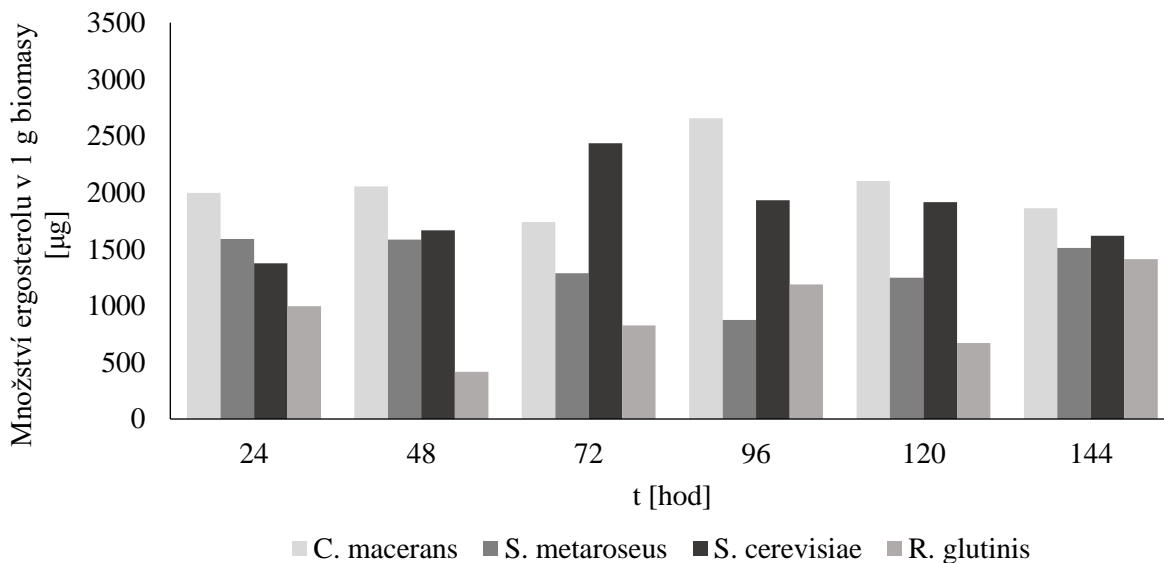
Zvýšení poměru C/N nejvíce negativně ovlivnilo kmen *S. metaroseus*, produkce karotenoidů při C/N = 90 dramaticky klesla, a při C/N = 110 je již biosyntéza karotenoidů téměř úplně inhibována. *C. macerans* nebyl při C/N = 90 tak markantně ovlivněn, třetí a čtvrtý den dosahuje produkce karotenoidů srovnatelné s produkcí při C/N = 70. V ostatních dnech kultivace už ale obsah karotenoidů rapidně klesá, a při C/N = 110 je ovlivněn stejně jako *S. metaroseus* a prakticky žádné karotenoidy nesyntetizuje. *R. glutinis* jako jediná odolává vysokým C/N poměrům, a produkce karotenoidů při C/N = 90 je v podstatě shodná s produkcí při C/N = 110.

4.3.6 Porovnání produkce ergosterolu kvasinkami

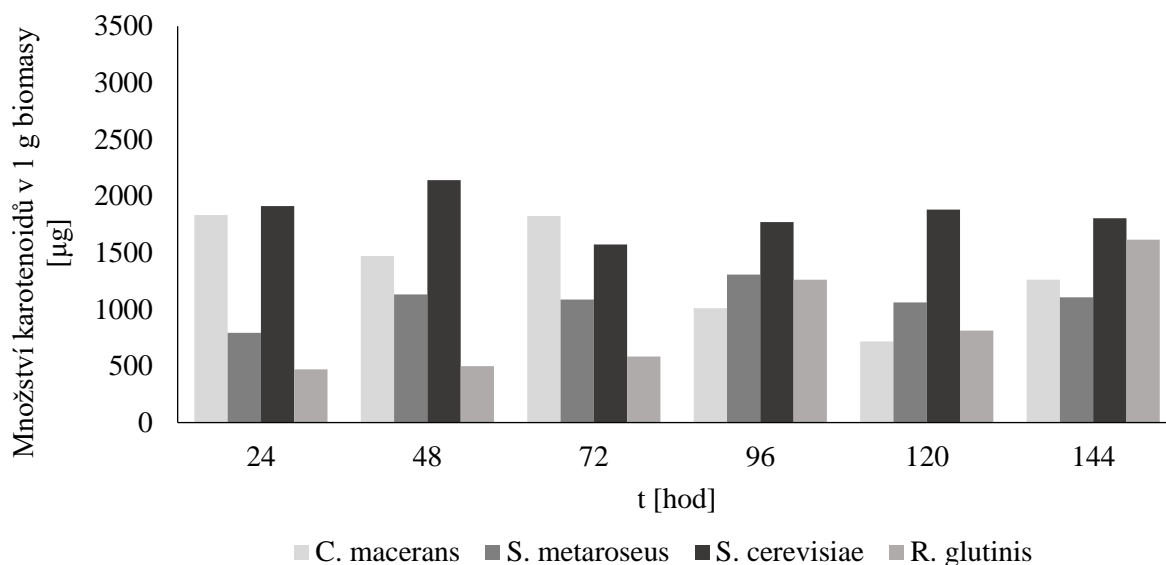
Se zvyšujícím se C/N poměrem klesá u *S. metaroseus* a *R. glutinis* povolna obsah ergosterolu, což je vidět z grafů 60–62. Pouze *C. macerans* dosahuje při kultivaci v médiu s C/N = 70 a 110 srovnatelného množství ergosterolu, a při C/N = 90 dosahuje znatelně vyšší produkce. Nejméně je C/N poměrem ovlivněna *S. cerevisiae*, která při C/N = 70 produkuje nejvíce ergosterolu, poté se jeho obsah mírně sníží, ale v rámci poměrů C/N = 90 a 110 již není v produkci velký rozdíl.



Graf 60: Porovnání produkce ergosterolu kvasinkami při kultivaci v médiu s C/N = 70



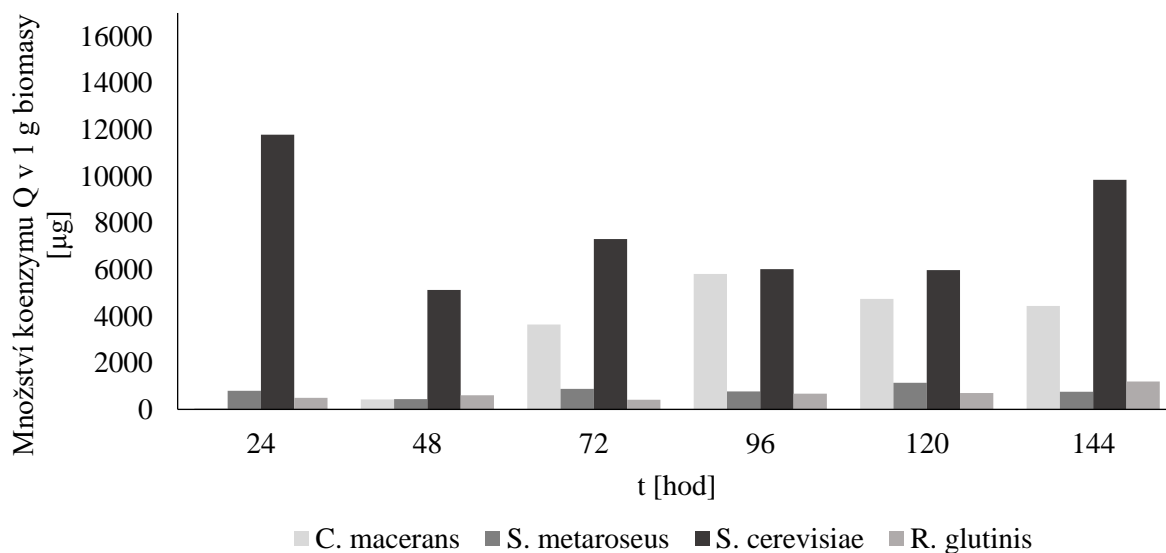
Graf 61: Porovnání produkce ergosterolu kvasinkami při kultivaci v médiu s C/N = 90



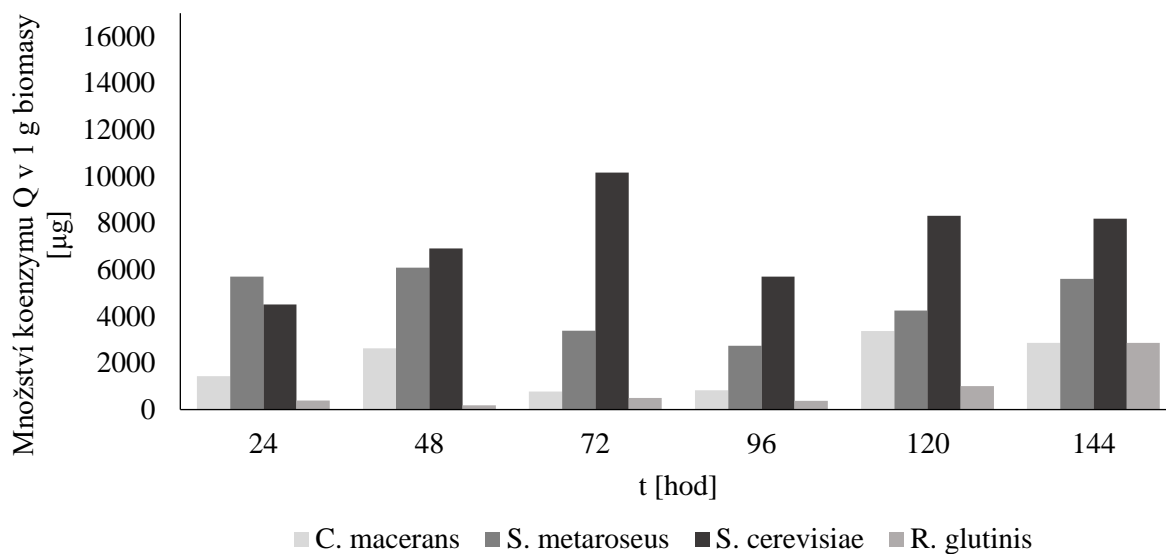
Graf 62: Porovnání produkce ergosterolu kvasinkami při kultivaci v médiu s C/N = 110

4.3.7 Porovnání produkce koenzymu Q kvasinkami

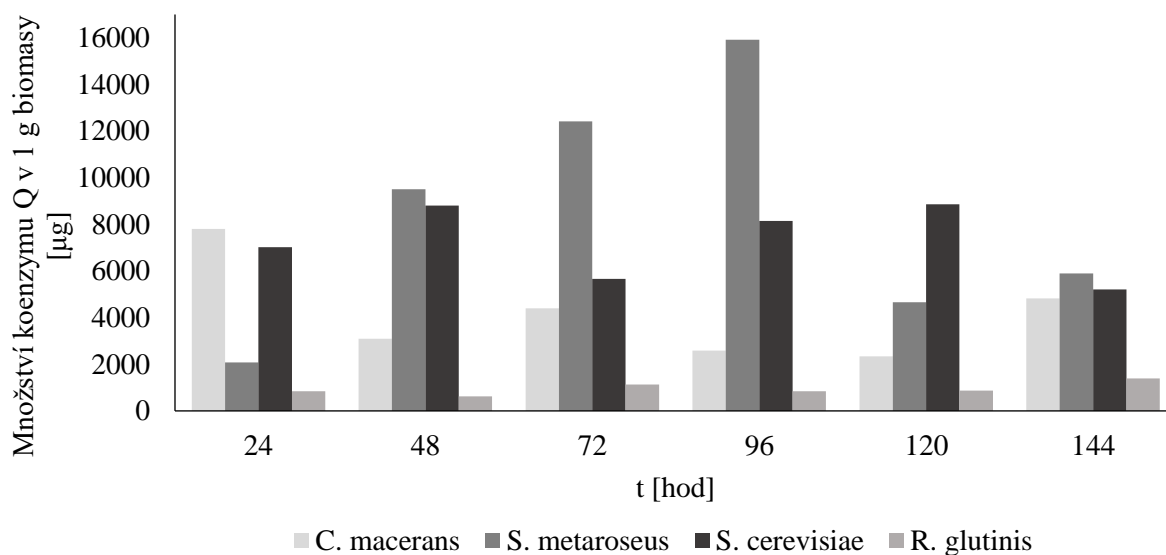
Produkce koenzymu Q roste u všech kvasinek s rostoucím C/N poměrem. Tato tendence je vidět na grafech 63–65. *R. glutinis* produkuje celkově nejméně koenzymu Q ze všech kmenů. *S. metaroseus* produkuje minimální množství koenzymu Q pouze při C/N = 70. Po zvýšení poměru C/N na 90 je druhým nejproduktivnějším kmenem, a při C/N = 110 již produkuje největší množství koenzymu Q ze všech kmenů. *C. macerans* je při všech třech C/N poměrech nevýrazným producentem. *S. cerevisiae* je nejlepším producentem koenzymu Q při C/N poměrech 70 a 90.



Graf 63: Porovnání produkce koenzymu Q kvasinkami při kultivaci v médiu s C/N = 70



Graf 64: Porovnání produkce koenzymu Q kvasinkami při kultivaci v médiu s C/N = 90



Graf 65: Porovnání produkce koenzymu Q kvasinkami při kultivaci v médiu s C/N = 110

5. ZÁVĚR

V předložené diplomové práci byl zkoumán obsah β -glukanů vybraných druhů kvasinek, řas a sinic. Kvasinky byly kultivovány při třech různých C/N poměrech v přítomnosti přímého záření jako stresového faktoru, a kromě β -glukanů, byl pro každý C/N poměr stanoven obsah α -glukanů, mastných kyselin, karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q. Pro řasy a sinice byla použita speciální média typická pro daný kmen a byla provedena analýza α - i β -glukanů. Vybrané druhy kvasinek zahrnovaly *Cystofilobasidium macerans*, *Sporidiobolus metaroseus*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Rhodotorula glutinis*, a pro každý kmen kvasinek byla stanovena růstová charakteristika. Jako zástupci řas byli vybráni *Dunaliella salina* a *Desmodesmus acutus* a jako zástupci sinic byly kultivovány *Arthrospira maxima* a *Cyanothece* sp.

Porovnáním produkce biomasy při různých C/N poměrech bylo zjištěno, že *S. metaroseus* i *S. cerevisiae* jsou schopné využívat glukózu z média i při vysokém C/N poměru, a jejich růst není inhibován v pozdních fázích kultivace. Naopak růst *R. glutinis* je vysokým C/N poměrem značně inhibován i přes to, že při nejnižším C/N poměru vykazuje zdaleka nejvyšší produkci biomasy. Produkce β -glukanů koreluje s produkcí biomasy, nejlepším producentem je *R. glutinis* a *S. metaroseus*, a nejmenší výkyvy při produkci β -glukanů vykazuje *S. cerevisiae*. Produkce α -glukanů byla pozorována pouze u *R. glutinis*, jejich největší množství bylo produkováno při nejvyšším C/N poměru.

Produkce mastných kyselin byla zvýšeným C/N poměrem značně inhibována u všech druhů kvasinek. Nejlepším producentem mastných kyselin je jednoznačně *R. glutinis*, největší množství je produkováno opět při nejnižším C/N poměru, tedy při C/N = 70.

Produkce karotenoidů je opět u všech druhů kvasinek inhibována vysokým poměrem C/N. Druhy *C. macerans* a *S. metaroseus* při poměru C/N = 110 již prakticky neprodukují žádné karotenoidy. Nejméně je ovlivněna *R. glutinis*, která jako jediná produkuje karotenoidy i při C/N = 110. Největší množství karotenoidů bylo produkováno při C/N = 70, kde nejlepším producentem byl *S. metaroseus*.

Obsah ergosterolu v kvasinkových buňkách při zvyšování C/N poměru pozvolna klesal. Nejméně byla ovlivněna *S. cerevisiae*, která při všech třech C/N poměrech produkovala vysoká množství ergosterolu. Ze stanovených metabolitů pouze produkce koenzymu Q není vysokým C/N poměrem inhibována. *R. glutinis* produkuje nejméně koenzymu Q ze všech kmenů. *S. metaroseus* je C/N poměrem v produkci koenzymu Q nejvíce ovlivněn a při C/N = 110 je jeho nejlepším producentem. Při nižších C/N poměrech je nejlepším producentem koenzymu Q *S. cerevisiae*.

Nárůst biomasy řas a sinic byl oproti nárůstu kvasinek zanedbatelný. Mikrořasy vykazovaly značně pomalejší růst, a produkce β -glukanů v podstatě nebyla zaznamenána. Na rozdíl od kvasinek byl ovšem u řas stanoven vysoký obsah α -glukanů. Nejlepším producentem byl *Desmodesmus acutus*, a značné množství α -glukanů bylo stanoveno také v biomase druhu *Arthrospira maxima*.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VĚTVIČKA, Václav. *Beta Glukan: tajemství přírody*. Brno: Gynpharma, 2011. ISBN 978-80-254-9143-0.
- [2] BOHN, John a James BEMILLER. (1-3)-Beta-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*. West Lafayette, USA, 1995, (28), 3-14.
- [3] HARADA, Toshie a Naohito OHNO. Contribution of dectin-1 and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) to immunomodulating actions of β -glucan. *International Immunopharmacology*. 2008, **8**(4), 556-566. DOI: 10.1016/j.intimp.2007.12.011. ISSN 15675769. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576907004043>
- [4] DALONSO, Nicole, Gustavo GOLDMAN a Regina GERN. β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015, **99**(19), 7893-7906. DOI: 10.1007/s00253-015-6849-x. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-015-6849-x>
- [5] ZHU, Fengmei, Bin DU a Baojun XU. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocolloids*. 2016, **52**, 275-288. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.07.003. ISSN 0268005x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X15300126>
- [6] SOLTANIAN, S., E. STUYVEN, E. COX, P. SORGELOOS a P. BOSSIER. Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. *Critical Reviews in Microbiology*. 2009, **35**(2), 109-138. DOI: 10.1080/10408410902753746. ISSN 1040-841X. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408410902753746>
- [7] ZLOTNIK, HINDA, M. FERNANDEZ, BLAIR BOWERS a ENRICO CABIB. Saccharomyces cerevisiae mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 1984, **159**(3), 1018-1026. PMC215762.
- [8] KOLLÁR, R., B.B. REINHOLD a E. PETRÁKOVÁ. Architecture of the Yeast Cell Wall: beta(1-6)-GLUCAN INTERCONNECTS MANNOPROTEIN, beta(1-3)-GLUCAN, AND CHITIN. *The Journal Of Biological Chemistry*. 1997, **272**(28), 17762-17775.
- [9] KAPTEYN, Johan, Roy MONTIJIN, Edwin VINK et al. Retention of Saccharomyces cerevisiae cell wall proteins through a phosphodiester-linked β -1,3-/ β -1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology*. 1996, **6**(3), 337-345. DOI: 10.1093/glycob/6.3.337. ISSN 0959-6658. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/glycob/article-lookup/doi/10.1093/glycob/6.3.337>
- [10] ZLATKOVIC, Dragan, Dragica JAKOVLJEVIC, Djordje ZEKOVIC a Miroslav VRVIC. A glucan from active dry baker's yeast (Saccharomyces cerevisiae): A chemical

- and enzymatic investigation of the structure. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2003, **68**(11), 805-809. DOI: 10.2298/JSC0311805Z. ISSN 0352-5139. Dostupné také z: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0352-51390311805Z>
- [11] MANNERS, D., A.J. MASSON a J.C. PATTERSON. The structure of a β -(1 \rightarrow 3)-d-glucan from yeast cell walls. *Biochemical Journal*. 1973, **135**(1), 19-30.
- [12] PETRÁKOVÁ, E. Architecture of the Yeast Cell Wall: The linkage between chitin and beta(1-3)-glucan. *The Journal Of Biological Chemistry*. 1995, **270**(3), 1170-1178.
- [13] STONE, Bruce. *Chemistry, biochemistry, and biology of 1-3 beta glucans*. 1st ed. Amsterdam: Acad. Press, 2009. ISBN 978-012-3739-711.
- [14] KOGAN, G. (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)- β -D-glucans of yeasts and fungi and their biological activity. *Bioactive natural Products (Part D)*. Elsevier, 2000, **23**, 107-152. Studies in Natural Products Chemistry. DOI: 10.1016/S1572-5995(00)80128-3. ISBN 9780444506061. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1572599500801283>
- [15] DU, Bin, Zhaoxiang BIAN a Baojun XU. Skin Health Promotion Effects of Natural Beta-Glucan Derived from Cereals and Microorganisms: A Review. *Phytotherapy Research*. 2014, **28**(2), 159-166. DOI: 10.1002/ptr.4963. ISSN 0951418X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.4963>
- [16] KRAINER, Eduardo, Ruth STARK, Fred NAIDER, Kumar ALAGRAMAM a Jeffrey BECKER. Direct observation of cell wall glucans in whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* by magic-angle spinning ^{13}C -NMR. *Biopolymers*. 1994, **34**(12), 1627-1635. DOI: 10.1002/bip.360341207. ISSN 0006-3525. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bip.360341207>
- [17] BENCKO, Vladimír, Petr ŠÍMA a Bohumil TUREK. Immunomodulatory Effects of Beta-glucans. *Hygiena*. 2016, **61**(4), 167-171. DOI: 10.21101/hygiena.a1500. ISSN 18026281. Dostupné také z: http://apps.szu.cz/svi/hygiena/show_en.php?kat=archiv/h2016-4-07
- [18] KWIATKOWSKI, Stefan a Stefan EDGAR. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Glucan Polysaccharides – Occurrence, Separation and Application in Food, Feed and Health Industries. *The Complex World of Polysaccharides*. InTech, 2012. DOI: 10.5772/2947. ISBN 978-953-51-0819-1. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/the-complex-world-of-polysaccharides/yeast-saccharomyces-cerevisiae-glucan-polysaccharides-occurrence-separation-and-application-in-food>
- [19] YAN, Jun, Daniel ALLENDORF a Brian BRANDLEY. Yeast whole glucan particle (WGP) β -glucan in conjunction with antitumour monoclonal antibodies to treat cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2005, **5**(5), 691-702. DOI: 10.1517/14712598.5.5.691. ISSN 1471-2598. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.5.5.691>
- [20] BASSO, Luiz, Henrique DE AMORIM, Antonio DE OLIVEIRA a Mario LOPES. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*. 2008, **8**(7), 1155-1163. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x. ISSN 15671356. Dostupné také z:

<https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x>

- [21] KNAUF, M. a K. KRAUS. Specific yeasts developed for modern ethanol production. *Sugar industrie*. 2006, **131**(11), 753-758.
- [22] KIM, Y.H., S.W. KANG, J.H. LEE, H.L. CHANG, C.W. YUN a H.D. PAIK. High cell density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* JUL3 in fed-batch culture for the production of β -Glucan. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2007, **13**(1), 153-158.
- [23] LEE, Jung-Nam, Do-Youn LEE a In-Hye JI. Purification of soluble beta-glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2001, **65**(4), 837-841. DOI: 10.1271/bbb.65.837. ISSN 0916-8451.
- [24] KWIATKOWSKI, Stefan, Ursula THIELEN, Phyllis GLENNEY a Colm MORAN. A Study of *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Glucans. *Journal of the Institute of Brewing*. 2009, **115**(2), 151-158. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2009.tb00361.x. ISSN 00469750. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.2009.tb00361.x>
- [25] BARRETO-BERGTER, Eliana a Rodrigo FIGUEIREDO. Fungal glycans and the innate immune recognition. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2014, **4**, 1-17. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00145. ISSN 2235-2988. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00145/abstract>
- [26] BROWDER, W., D. WILLIAMS, P. LUCORE, H. PRETUS, E. JONES a R. MCNAMEE. Effect of enhanced macrophage function on early wound healing. *Surgery*. 1988, **104**(2), 224-230.
- [27] KOH, Timothy a Luisa DIPIETRO. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2011, **13**(23), -. DOI: 10.1017/S1462399411001943. ISSN 1462-3994. Dostupné také z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1462399411001943
- [28] DITTEOVÁ, G., S. VELEBNÝ a G. HRČKOVA. Modulation of liver fibrosis and pathophysiological changes in mice infected with *Mesocestoides corti* (*M. vogae*) after administration of glucan and liposomized glucan in combination with vitamin C. *Journal of Helminthology*. 2003, **77**(3), 219-226. DOI: 10.1079/JOH2002161. ISSN 14752697. Dostupné také z: http://journals.cambridge.org/abstract_S0022149X03000325
- [29] VERLHAC, Viviane, Jacques GABAUDAN, Alex OBACH, Willy SCHÜEP a Reid HOLE. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 1996, **143**(2), 123-133. DOI: 10.1016/0044-8486(95)01238-9. ISSN 00448486.
- [30] VETVICKA, Vaclav, Roberto BAIGORRI, Angel ZAMARREÑO, Jose GARCIA-MINA a Jean-Claude YVIN. Glucan and Humic Acid: Synergistic Effects on the Immune System. *Journal of Medicinal Food*. 2010, **13**(4), 863-869. DOI: 10.1089/jmf.2009.0178. ISSN 1096-620X. Dostupné také z: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/jmf.2009.0178>

- [31] VETVICKA, Vaclav a Jana VETVICKOVA. Glucan–Resveratrol–Vitamin C Combination Offers Protection against Toxic Agents. *Toxins*. 2012, **4**(11), 1301-1308. DOI: 10.3390/toxins4111301. ISSN 2072-6651. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2072-6651/4/11/1301>
- [32] CHEN, Jiezhong a Robert SEVIOUR. Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans. *Mycological Research*. 2007, **111**(6), 635-652. DOI: 10.1016/j.mycres.2007.02.011. ISSN 09537562. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0953756207000573>
- [33] GAWRONSKI, M., J.T. PARK, A.S. MAGEE a H. CONRAD. Microfibrillar structure of PGG-glucan in aqueous solution as triple-helix aggregates by small angle x-ray scattering. *Biopolymers*. 1999, **50**(6), 569–578.
- [34] DAOU, Cheickna a Hui ZHANG. Oat Beta-Glucan: Its Role in Health Promotion and Prevention of Diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2012, **11**(4), 355-365. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2012.00189.x. ISSN 15414337. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2012.00189.x>
- [35] LYLTY, Marika, Marjatta SALMENKALLIO-MARTTILA, Tapani SUORTTI, Karin AUTIO, Kaisa POUTANEN a Liisa LÄHTEENMÄKI. Influence of Oat β -Glucan Preparations on the Perception of Mouthfeel and on Rheological Properties in Beverage Prototypes. *Cereal Chemistry Journal*. 2003, **80**(5), 536-541. DOI: 10.1094/CCHEM.2003.80.5.536. ISSN 0009-0352. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1094/CCHEM.2003.80.5.536>
- [36] KITTISUBAN, Phatcharee, Pitiporn RITTHIRUANGDEJ a Manop SUPHANTHARIKA. Optimization of hydroxypropylmethylcellulose, yeast β -glucan, and whey protein levels based on physical properties of gluten-free rice bread using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*. 2014, **57**(2), 738-748. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.02.045. ISSN 00236438. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643814001212>
- [37] PETRAVI-TOMINAC, V. Rheological Properties, Water-Holding and Oil-Binding Capacities of Particulate β -Glucans Isolated from Spent Brewer's Yeast by Three Different Procedures: Properties of β -Glucans from Brewer's Yeast. *Food Technol. Biotechnol.* 2011, **49**(1), 56–64.
- [38] AHMAD, Asif, Faqir ANJUM, Tahir ZAHOOR, Haq NAWAZ a Syed DILSHAD. Beta Glucan: A Valuable Functional Ingredient in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2012, **52**(3), 201-212. DOI: 10.1080/10408398.2010.499806. ISSN 1040-8398. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2010.499806>
- [39] KNUCKLES, B., W. YOKOYAMA a M. CHIU. Molecular Characterization of Barley β -Glucans by Size-Exclusion Chromatography with Multiple-Angle Laser Light Scattering and Other Detectors. *Cereal Chemistry Journal*. 1997, **74**(5), 599-604. DOI: 10.1094/CCHEM.1997.74.5.599. ISSN 0009-0352. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1094/CCHEM.1997.74.5.599>

- [40] LEE, S., G. INGLETT a C. CARRIERE. Effect of Nutrim Oat Bran and Flaxseed on Rheological Properties of Cakes. *Cereal Chemistry Journal*. 2004, **81**(5), 637-642. DOI: 10.1094/CCHEM.2004.81.5.637. ISSN 0009-0352. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1094/CCHEM.2004.81.5.637>
- [41] TROGH, I., C.M. COURTIN, A.A.M. ANDERSSON, P. ÅMAN, J.F. SØRENSEN a J.A. DELCOUR. The combined use of hull-less barley flour and xylanase as a strategy for wheat/hull-less barley flour breads with increased arabinoxylan and (1→3,1→4)-β-D-glucan levels. *Journal of Cereal Science*. 2004, **40**(3), 257-267. DOI: 10.1016/j.jcs.2004.08.008. ISSN 07335210. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521004000931>
- [42] LAZARIDOU, A., D. DUTA, M. PAPAGEORGIOU, N. BELC a C.G. BILIADERIS. Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *Journal of Food Engineering*. 2007, **79**(3), 1033-1047. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2006.03.032. ISSN 02608774. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877406003025>
- [43] LAZARIDOU, A. a C.G. BILIADERIS. Molecular aspects of cereal β-glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. *Journal of Cereal Science*. 2007, **46**(2), 101-118. DOI: 10.1016/j.jcs.2007.05.003. ISSN 07335210. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521007000835>
- [44] YOKOYAMA, Wallace, Carol HUDSON, Benny KNUCKLES, Mei-Chen CHIU, Robert SAYRE, Judith TURNLUND a Barbara SCHNEEMAN. Effect of Barley β-Glucan in Durum Wheat Pasta on Human Glycemic Response. *Cereal Chemistry Journal*. 1997, **74**(3), 293-296. DOI: 10.1094/CCHEM.1997.74.3.293. ISSN 0009-0352. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1094/CCHEM.1997.74.3.293>
- [45] KONUKLAR, G., G.E. INGLETT, K. WARNER a C.J. CARRIERE. Use of a β-glucan hydrocolloidal suspension in the manufacture of low-fat Cheddar cheeses: textural properties by instrumental methods and sensory panels. *Food Hydrocolloids*. 2004, **18**(4), 535-545. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2003.08.010. ISSN 0268005X. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X03001553>
- [46] AHMAD, Asif, Faqir Muhammad ANJUM, Tahir ZAHOOR, Haq NAWAZ a Syed Muhammad Raihan DILSHAD. Beta Glucan: A Valuable Functional Ingredient in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2012, **52**(3), 201-212. DOI: 10.1080/10408398.2010.499806. ISSN 1040-8398. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2010.499806>
- [47] SCHUSTER, J., G. BENINCÁ, R. VITORAZZI a S. MORELO DAL BOSCO. Effects of oats on lipid profile, insulin resistance and weight loss. *Nutrición Hospitalaria*. 2015, **32**(5), 211-216. DOI: 10.3305/nh.2015.32.5.9590.
- [48] DEMIRCI, A. a A.L. POMETTO. Production of organically bound selenium yeast by continuous fermentation. *J Agric Food Chem*. 1999, **47**(6), 2491-2500.

- [49] MAPELLI, Valeria, Peter HILLESTRØM, Emese KÁPOLNA, Erik LARSEN a Lisbeth OLSSON. Metabolic and bioprocess engineering for production of selenized yeast with increased content of seleno-methylselenocysteine. *Metabolic Engineering*. 2011, **13**(3), 282-293. DOI: 10.1016/j.ymben.2011.03.001. ISSN 10967176.
- [50] TASTET, Laure, Dirk SCHAUMLÖFFEL, Brice BOUYSSIERE a Ryszard LOBINSKI. Identification of selenium-containing proteins in selenium-rich yeast aqueous extract by 2D gel electrophoresis, nanoHPLC–ICP MS and nanoHPLC–ESI MS/MS. *Talanta*. 2008, **75**(4), 1140-1145. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.01.003. ISSN 00399140. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914008000179>
- [51] TAPIERO, H, D.M TOWNSEND a K.D TEW. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2003, **57**(3-4), 134-144. DOI: 10.1016/S0753-3322(03)00035-0. ISSN 07533322. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332203000350>
- [52] YIANNIKOURIS, A., J. FRANCOIS a L. POUGHON. Influence of pH on Complexing of Model β -d-Glucans with Zearalenone. *Journal of Food Protection*. 2004, **67**(12), 2741-2746.
- [53] YIANNIKOURIS, Alexandros, Gwénaëlle ANDRÉ, Alain BULÉON, Georges JEMINET, Isabelle CANET, Jean FRANÇOIS, Gérard BERTIN a Jean-Pierre JOUANY. Comprehensive Conformational Study of Key Interactions Involved in Zearalenone Complexation with β - d -Glucans. *Biomacromolecules*. 2004, **5**(6), 2176-2185. DOI: 10.1021/bm049775g. ISSN 1525-7797. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm049775g>
- [54] YIANNIKOURIS, Alexandros, Jean FRANÇOIS, Laurent POUGHON, Claude-Gilles DUSSAP, Gérard BERTIN, Georges JEMINET a Jean-Pierre JOUANY. Alkali Extraction of β - d -Glucans from *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall and Study of Their Adsorptive Properties toward Zearalenone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, **52**(11), 3666-3673. DOI: 10.1021/jf035127x. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf035127x>
- [55] YIANNIKOURIS, Alexandros, Gwénaëlle ANDRÉ, Laurent POUGHON, Jean FRANÇOIS, Claude-Gilles DUSSAP, Georges JEMINET, Gérard BERTIN a Jean-Pierre JOUANY. Chemical and Conformational Study of the Interactions Involved in Mycotoxin Complexation with β - d -Glucans. *Biomacromolecules*. 2006, **7**(4), 1147-1155. DOI: 10.1021/bm050968t. ISSN 1525-7797. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm050968t>
- [56] PIOTROWSKA, Małgorzata a Anna MASEK. *Saccharomyces Cerevisiae* Cell Wall Components as Tools for Ochratoxin A Decontamination. *Toxins*. 2015, **7**(4), 1151-1162. DOI: 10.3390/toxins7041151. ISSN 2072-6651. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2072-6651/7/4/1151>
- [57] WISMAR, René, Susanne BRIX, Hanne FRØKIAER a Helle LAERKE. Dietary fibers as immunoregulatory compounds in health and disease. *Annals of the New York*

- Academy of Sciences*. 2010, **1190**(1), 70-85. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05256.x. ISSN 00778923.
- [58] BAURHOO, B., P. FERKET a ZHAO. Effects of diets containing different concentrations of mannanoligosaccharide or antibiotics on growth performance, intestinal development, cecal and litter microbial populations, and carcass parameters of broilers. *Poult Sci*. 2009, **88**(11), 2262-2272. DOI: 10.3382/ps.2008-00562. ISSN 0032-5791.
- [59] VENKATACHALAM, Geetha, Divyaa SRINIVASAN a Mukesh DOBLE. Cyclic β -(1, 2)-glucan production by *Rhizobium meliloti* MTCC 3402. *Process Biochemistry*. 2013, **48**(12), 1848-1854. DOI: 10.1016/j.procbio.2013.08.024. ISSN 13595113. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511313005333>
- [60] ABDEL-MOHSEN, A.M., J. JANCAR, D. MASSOUD, Z. FOHLEROVA a H. ELHADIDY. Novel chitin/chitosan-glucan wound dressing: Isolation, characterization, antibacterial activity and wound healing properties. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016, **510**(1), 86-99. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.06.003. ISSN 03785173.
- [61] S., Mohit a Frank X. 1,3-Beta-Glucans: Drug Delivery and Pharmacology. *The Complex World of Polysaccharides*. InTech, 2012, , 554-572. DOI: 10.5772/50363. ISBN 978-953-51-0819-1. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/the-complex-world-of-polysaccharides/1-3-beta-glucans-drug-delivery-and-pharmacology>
- [62] *Preparation method of beta-glucan from schizophyllum commune and composition for external application comprising the same*. 2008. USA. US20080160043A1. Uděleno 16.7.2007. Zapsáno 3.7.2008.
- [63] GRAEME M. WALKER., . *Yeast physiology and biotechnology*. Repr. Chichester [u.a.]: Wiley, 2000. ISBN 04-719-6447-6.
- [64] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [65] STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRICHTER. *Biopolymers: Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes*. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 35-273-0227-1.
- [66] DEAK, Tibor. On the existence of H⁻symport in yeasts. *Archives of Microbiology*. 1978, **116**(2), 205-211. DOI: 10.1007/BF00406038. ISSN 0302-8933. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00406038>
- [67] GALEOTE, V., M. NOVO, M. SALEMA-OOM, C. BRION, E. VALERIO, P. GONCALVES a S. DEQUIN. FSY1, a horizontally transferred gene in the *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 wine yeast strain, encodes a high-affinity fructose/H symporter. *Microbiology*. 2010, **156**(12), 3754-3761. DOI: 10.1099/mic.0.041673-0. ISSN 1350-0872. Dostupné také z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.041673-0>
- [68] FIECHTER, Armin a Wolfgang SEGHEZZI. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Journal of Biotechnology*. 1992, **27**(1), 27-45. DOI: 10.1016/0168-

- 1656(92)90028-8. ISSN 01681656. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168165692900288>
- [69] RICHMOND, Amos. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Ames, Iowa, USA: Blackwell Science, 2004. ISBN 06-320-5953-2.
- [70] MASOJÍDEK, R., R. LHOTSKÝ, J. KOPECKÝ a O. PRÁŠIL. *Mikrořasy – solární továrna v jedné buňce*. Vydání 1. Praha: Academia, 2016. ISBN 2464-6245. 2464-6245.
- [71] GAMBOA-DELGADO, Julián a Julia MÁRQUEZ-REYES. Potential of microbial-derived nutrients for aquaculture development. *Reviews in Aquaculture*. 2018, **10**(1), 1-23. DOI: 10.1111/raq.12157. ISSN 17535123. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/raq.12157>
- [72] SONNLEITNER, B. a O. KÄPPELI. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis: Formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnology and Bioengineering*. 1986, **28**(6), 927-937. DOI: 10.1002/bit.260280620. ISSN 0006-3592. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260280620>
- [73] KÄPPELI, O., B. SONNLEITNER a Harvey BLANCH. Regulation of Sugar Metabolism in *Saccharomyces* -Type Yeast: Experimental and Conceptual Considerations. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2008, **4**(3), 299-325. DOI: 10.3109/07388558609150798. ISSN 0738-8551. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388558609150798>
- [74] RIEGER, M., O. KAPPELI a A. FIECHTER. The Role Of Limited Respiration In The Incomplete Oxidation Of Glucose By *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microbiology*. 1983, **129**(3), 653-661. DOI: 10.1099/00221287-129-3-653. ISSN 1350-0872. Dostupné také z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-129-3-653>
- [75] LI, Chunji, Ning ZHANG, Bingxue LI, Qiong XU, Jia SONG a Na WEI. Increased torulene accumulation in red yeast *Sporidiobolus pararoseus*NGR as stress response to high salt conditions. *Food Chemistry*. 2017, **237**, 1041-1047. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.06.033. ISSN 03088146.
- [76] MANNAZZU, Ilaria, Sara LANDOLFO, Teresa DA SILVA a Pietro BUZZINI. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015, **31**(11), 1665-1673. DOI: 10.1007/s11274-015-1927-x. ISSN 0959-3993. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-015-1927-x>
- [77] PERRIER, V., E. DUBREUCQ a P. GALZY. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Arch Microbiol*. 1995, (164), 173–179.
- [78] SAMPAIO, José. *Cystofilobasidium*. *The Yeasts*. Elsevier, 2011, , 1423-1432. DOI: 10.1016/B978-0-444-52149-1.00111-7. ISBN 9780444521491. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444521491001117>

- [79] BIRGISSON, H., O. DELGADO, L. GARCÍA ARROYO, R. HATTI-KAUL a B. MATTIASSON. Cold-adapted yeasts as producers of cold-active polygalacturonases. *Extremophiles*. 2003, **7**(3), 185–193.
- [80] ALKORTA, Itziar, Carlos GARBISU, María LLAMA a Juan SERRA. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*. 1998, **33**(1), 21-28. DOI: 10.1016/S0032-9592(97)00046-0. ISSN 13595113. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959297000460>
- [81] HERZ, Stephanie, Roland WEBER, Heidrun ANKE, Adele MUCCI a Paolo DAVOLI. Intermediates in the oxidative pathway from torulene to torularhodin in the red yeasts *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *C. capitatum* (Heterobasidiomycetes, Fungi). *Phytochemistry*. 2007, **68**(20), 2503-2511. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.05.019. ISSN 00319422. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942207003342>
- [82] SCHWIETER, U., H. GUTMANN, H. LINDLAR, R. MARBET, N. RIGASSI, R. RÜEGG, S. SCHAEREN a O. ISLER. Synthesen in der Carotinoid-Reihe 20. Mitteilung* Neue Synthesen von Apocarotinoiden³. *Helvetica Chimica Acta*. 1966, **49**(1), 369-390. DOI: 10.1002/hlca.660490143. ISSN 0018019X.
- [83] SAMPAIO, José. *Sporidiobolus Nyland* (1949). *The Yeasts*. Elsevier, 2011, , 1549-1561. DOI: 10.1016/B978-0-444-52149-1.00130-0. ISBN 9780444521491. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444521491001300>
- [84] GLUSHAKOVA, A.M. a I.Yu. CHERNOV. Seasonal Dynamics in a Yeast Population on Leaves of the Common Wood Sorrel *Oxalis acetosella* L. *Microbiology*. 2004, **73**(2), 184–188.
- [85] KOŠÍKOVÁ, B. a E. SLÁVIKOVÁ. Biotransformation of lignin polymers derived from beech wood pulping by *Sporobolomyces roseus* isolated from leafy material. *Biotechnology Letters*. 2004, **26**(6), 517–519.
- [86] LIPKE, P.N. a R. OVALLE. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *Journal of Bacteriology*. 1998, **180**(15), 3735-3740.
- [87] STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRICHTER. *Biopolymers: Polysaccharides I: Polysaccharides from Prokaryotes*. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 35-273-0226-3.
- [88] STASINOPOULOS, S. a R. SEVIOR. Exopolysaccharide formation by isolates of *Cephalosporium* and *Acremonium*. *Mycological Research*. 1989, **92**(1), 55-60.
- [89] CYBULSKA, Justyna, Michal HALAJ, Vladimír CEPÁK, Jaroslav LUKAVSKÝ a Peter CAPEK. Nanostructure features of microalgae biopolymer. *Starch - Stärke*. 2016, **68**(7-8), 629-636. DOI: 10.1002/star.201500159. ISSN 00389056. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/star.201500159>
- [90] SCHULZE, Christian, Martin WETZEL, Jakob REINHARDT, Mandy SCHMIDT, Lisa FELTEN a Sabine MUNDT. Screening of microalgae for primary metabolites including β -glucans and the influence of nitrate starvation and irradiance on β -glucan production. *Journal of Applied Phycology*. 2016, **28**(5), 2719-2725. DOI: 10.1007/s10811-016-

- 0812-9. ISSN 0921-8971. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-016-0812-9>
- [91] GLADUE, Raymond a John MAXEY. Microalgal feeds for aquaculture. *Journal of Applied Phycology*. 1994, **6**(2), 131-141. DOI: 10.1007/BF02186067. ISSN 0921-8971. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02186067>
- [92] KOMOR, E. a W. TANNEB. The Hexose-Proton Symport System of *Chlorella vulgaris*: Specificity, Stoichiometry and Energetics of Sugar-Induced Proton Uptake. *European Journal of Biochemistry*. 1974, **44**(1), 219-223.
- [93] KOMOR, Ewald, Christian SCHOBERT a Bong-Heuy CHO. Sugar specificity and sugar-proton interaction for the hexose-proton-symport system of *Chlorella*. *European Journal of Biochemistry*. 1985, **146**(3), 649-656. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1985.tb08700.x. ISSN 0014-2956. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1985.tb08700.x>
- [94] VIZCAÍNO, A.J., G. LÓPEZ, M.I. SÁEZ et al. Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. *Aquaculture*. 2014, **431**, 34-43. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.05.010. ISSN 00448486.
- [95] ŠIVEL, M., B. KLEJDUS, S. KRÁČMAR a V. KUBÁŇ. LUTEIN – VÝZNAMNÝ KAROTENOID VE VÝŽIVĚ ČLOVĚKA. *Chem. Listy*. 2013, **107**, 456-463.
- [96] BANDYOPADHYAY, A., T. ELVITIGALA, E. WELSH, J. STOCKEL, M. LIBERTON a H. MIN. Novel Metabolic Attributes of the Genus *Cyanothece*, Comprising a Group of Unicellular Nitrogen-Fixing Cyanobacteria. *MBio*. 2011, **2**(5), 1-10. DOI: 10.1128/mBio.00214-11. ISSN 2150-7511.
- [97] CHI, Z., C.D. SU a W.D. LU. A new exopolysaccharide produced by marine *Cyanothece* sp. 113. *Bioresource Technology*. 2007, **98**(6), 1329–1332. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.05.001. ISSN 09608524.
- [98] DE PHILIPPIS, R. a M. VINCENZINI. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews*. 1998, **22**, 151-175.
- [99] SHAH, V., N. GARG a D. MADAMWAR. Exopolysaccharide production by a marine cyanobacterium *Cyanothece* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1999, **82**(2), 81–90.
- [100] PARIKH, Amit a Datta MADAMWAR. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Bioresource Technology*. 2006, **97**(15), 1822-1827. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.09.008. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852405004268>
- [101] DE PHILIPPIS, R., M.C. MARGHERI, R. MATERASSI a M. VINCENZINI. Potential of Unicellular Cyanobacteria from Saline Environments as Exopolysaccharide Producers. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 1998, **64**(3), 1130–1132.

- [102] RUPÉREZ, Pilar a Gema TOLEDANO. Indigestible fraction of edible marine seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2003, **83**(12), 1267-1272. DOI: 10.1002/jsfa.1536. ISSN 00225142. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.1536>
- [103] ŠANTEK, Božidar, Michael FELSKI, Karl FRIEHS, Martin LOTZ a Erwin FLASCHEL. Production of paramylon, a β -1,3-glucan, by heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* on a synthetic medium. *Engineering in Life Sciences*. 2009, **9**(1), 23-28. DOI: 10.1002/elsc.200700032. ISSN 16180240. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.200700032>
- [104] HONG, Eock. Study of Macrophage Activation and Structural Characteristics of Purified Polysaccharide from the Fruiting Body of *Cordyceps militaris*. *JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*. 2010, **20**(7), 1053-1060. DOI: 10.4014/jmb.0910.10022. ISSN 10177825. Dostupné také z: <http://jmb.or.kr/journal/main.html>
- [105] LUKONDEH, Tredwell. NMR confirmation of an alkali-insoluble glucan from *Kluyveromyces marxianus* cultivated on a lactose-based medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2003, **19**(4), 349-355. DOI: 10.1023/A:1023961411821. ISSN 09593993. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1023961411821>
- [106] BARRIENTOS, Rodell, Melody CLERIGO a Anamy PAANO. Extraction, isolation and MALDI-QTOF MS/MS analysis of β -D-Glucan from the fruiting bodies of *Daedalea quercina*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016, **93**, 226-234. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.08.044. ISSN 01418130. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016312363>
- [107] VELÍŠEK, Jan a Karel CEJPEK. *Biosynthesis of food components*. 1st ed. Tábor: OSSIS, 2008. ISBN 978-80-86659-12-1.
- [108] MATA-GÓMEZ, Luis, Julio MONTAÑEZ, Alejandro MÉNDEZ-ZAVALA a Cristóbal AGUILAR. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*. 2014, **13**(1), 12-. DOI: 10.1186/1475-2859-13-12. ISSN 1475-2859. Dostupné také z: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-13-12>
- [109] MADHOUR, Abderrahim, Heidrun ANKE, Adele MUCCI, Paolo DAVOLI a Roland WEBER. Biosynthesis of the xanthophyll plectanixanthin as a stress response in the red yeast *Dioszegia* (Tremellales, Heterobasidiomycetes, Fungi). *Phytochemistry*. 2005, **66**(22), 2617–2626. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.09.010. ISSN 00319422.
- [110] DUGO, Paola, Miguel HERRERO, Daniele GIUFFRIDA, Tiina KUMM, Giovanni DUGO a Luigi MONDELLO. Application of Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography To Elucidate the Native Carotenoid Composition in Red Orange Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, **56**(10), 3478-3485. DOI: 10.1021/jf800144v. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf800144v>

- [111] SOROKA, I.M., V.G. ARUSHIN, Y.D. TURIYANSKY a A.A. TYURENKOV. Spectroscopy analysis for simultaneous determination of lycopene and β -carotene in fungal biomass of *Blakeslea trispora*. *Acta Biochim Pol.* 2012, **59**(1), 65-69.
- [112] MALISORN, C. a W. SUNTORNSUK. Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresource Technology.* 2008, **99**(7), 2281-2287. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.05.019. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852407004348>
- [113] FREITAS, Cláudia, Beatriz NOBRE, Luísa GOUVEIA, José ROSEIRO, Alberto REIS a Teresa LOPES DA SILVA. New at-line flow cytometric protocols for determining carotenoid content and cell viability during *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 batch growth. *Process Biochemistry.* 2014, **49**(4), 554-562. DOI: 10.1016/j.procbio.2014.01.022. ISSN 13595113. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511314000634>
- [114] BELLOU, Stamatia, Irene-Eva TRIANTAPHYLLIDOU, Dimitra AGGELI, Ahmed ELAZZAZY, Mohammed BAESHEN a George AGGELIS. Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. *Current Opinion in Biotechnology.* 2016, **37**, 24-35. DOI: 10.1016/j.copbio.2015.09.005. ISSN 09581669. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166915001275>
- [115] ROMERO, Antonia, Tania JORDÁ, Nicolas ROZÈS, María MARTÍNEZ-PASTOR a Sergi PUIG. Regulation of yeast fatty acid desaturase in response to iron deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2018, **1863**(6), 657-668. DOI: 10.1016/j.bbalip.2018.03.008. ISSN 13881981.
- [116] PAPANIKOLAOU, Seraphim a George AGGELIS. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology.* 2011, **113**(8), 1052-1073. DOI: 10.1002/ejlt.201100015. ISSN 14387697. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201100015>
- [117] DONOT, F., A. FONTANA, J.C. BACCOU, C. STRUB a S. SCHORR-GALINDO. Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: Production and genetics. *Biomass and Bioenergy.* 2014, **68**, 135-150. DOI: 10.1016/j.biombioe.2014.06.016. ISSN 09619534. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953414003183>
- [118] YANG, Xiaobing, Guojie JIN, Yandan WANG, Hongwei SHEN a Zongbao ZHAO. Lipid production on free fatty acids by oleaginous yeasts under non-growth conditions. *Bioresource Technology.* 2015, **193**, 557–562. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.06.134. ISSN 09608524.
- [119] PRILLINGER, HANSJÖRG, FRANZ OBERWINKLER, CLAUDIO UMILE, KLAUDIA TLACHAC, ROBERT BAUER, CHRISTINE DÖRFLER a EDUARD TAUFRAZTHOFER. Analysis of cell wall carbohydrates (neutral sugars) from ascomycetous and basidiomycetous yeasts with and without derivatization. *The Journal of General and Applied Microbiology.* 1993, **39**(1), 31-34. DOI: 10.2323/jgam.39.1.

- ISSN 1349-8037. Dostupné také z:
<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/jgam1955/39.1?from=CrossRef>
- [120] BREIEROVÁ, Emilia, Milan ČERTÍK, Annamaria KOVÁROVÁ a Tomáš GREGOR. Biosorption of Nickel by Yeasts in an Osmotically Unsuitable Environment. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2008, **63**(11-12), -. DOI: 10.1515/znc-2008-11-1215. ISSN 1865-7125. Dostupné také z: <https://www.degruyter.com/view/j/znc.2008.63.issue-11-12/znc-2008-11-1215/znc-2008-11-1215.xml>
- [121] KURTZMAN, C. a Jack FELL. *The yeasts: a taxonomic study*. 4th ed. New York: Elsevier, 2000. ISBN 04-448-1312-8.
- [122] VADKERTIOVÁ, Renáta, Jana MOLNÁROVÁ a Alexander LUX. Yeasts associated with an abandoned mining area in Pernek and their tolerance to different chemical elements. *Folia Microbiologica*. 2016, **61**(3), 199-207. DOI: 10.1007/s12223-015-0424-9. ISSN 0015-5632.
- [123] HUANG, Gang. Extraction of Two Active Polysaccharides from the Yeast Cell Wall. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2008, **63**(11-12), -. DOI: 10.1515/znc-2008-11-1224. ISSN 1865-7125. Dostupné také z: <https://www.degruyter.com/view/j/znc.2008.63.issue-11-12/znc-2008-11-1224/znc-2008-11-1224.xml>
- [124] AGUILAR-USCANGA, B. a J.M. FRANCOIS. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology*. 2003, **37**(3), 268-274. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2003.01394.x. ISSN 0266-8254. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1472-765X.2003.01394.x>
- [125] BZDUCHA-WRÓBEL, Anna, Marek KIELISZEK a Stanisław Błażej JAK. Chemical composition of the cell wall of probiotic and brewer's yeast in response to cultivation medium with glycerol as a carbon source. *European Food Research and Technology*. 2013, **237**(4), 489-499. DOI: 10.1007/s00217-013-2016-8. ISSN 1438-2377. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-013-2016-8>
- [126] KIM, Kwang a Hyun YUN. Production of soluble β -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006, **39**(3), 495-500. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.12.020. ISSN 01410229. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022906001128>
- [127] MEYER, M.T. a H.J. PHAFF. Survey for α -(1-3)-Glucanase Activity Among Yeasts. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 1977, **131**(2), 702-706.
- [128] GLADUE, R.M. a J.E. MAXEY. Microalgal feeds for aquaculture. *Journal of Applied Phycology*. 1994, **6**, 131-141.
- [129] SCHULZE, Christian, Jakob REINHARDT, Martina WURSTER, José ORTIZ-TENA, Volker SIEBER a Sabine MUNDT. A one-stage cultivation process for lipid- and carbohydrate-rich biomass of *Scenedesmus obtusiusculus* based on artificial and natural water sources. *Bioresource Technology*. 2016, **218**, 498-504. DOI:

- 10.1016/j.biortech.2016.06.109. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416309269>
- [130] ŘEZANKA, Tomáš a Irena KOLOUCHOVÁ. Lipidomic analysis of psychrophilic yeasts cultivated at different temperatures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2016, **1861**(11), 1634–1642. DOI: 10.1016/j.bbalip.2016.07.005. ISSN 13881981.
- [131] HAN, Mei, Jian-Zhong XU, Zhen-Min LIU a He QIAN. Co-production of microbial oil and exopolysaccharide by the oleaginous yeast *Sporidiobolus pararoseus* grown in fed-batch culture. *RSC Advances*. 2018, **8**(6), 3348–3356. DOI: 10.1039/c7ra12813d. ISSN 2046-2069.
- [132] DAS, T., J. THURMOND, E. BOBIK, A. LEONARD, J. PARKER-BARNES, Y.-S. HUANG a P. MUKERJI. Polyunsaturated fatty acid-specific elongation enzymes. *Biochemical Society Transactions*. 2000, **28**(6), 658–660. DOI: 10.1042/bst0280658. ISSN 0300-5127. Dostupné také z: <http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/bst0280658>
- [133] LEONARD, A.E., B. KELDER a J.M. PARKER-BARNES. CDNA cloning and characterization of human $\Delta 5$ -desaturase involved in the biosynthesis of arachidonic acid. *Biochem. J.* 2000, **347**, 719–724.
- [134] TKÁČOVÁ, Jana, Tatiana KLEMPOVÁ a Milan ČERTÍK. Kinetic study of growth, lipid and carotenoid formation in β -carotene producing *Rhodotorula glutinis*. *Chemical Papers*. 2018, **72**(5), 1193–1203. DOI: 10.1007/s11696-017-0368-4. ISSN 2585-7290. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11696-017-0368-4>
- [135] DOHNAL, V., A. JEŽKOVÁ a J. SKLÁDANKA. ERGOSTEROL: KLÍČOVÝ STEROID HUB. *Kontakt*. 2008, **10**, 247–482.
- [136] PETRIK, Sinisa, Ivana MAROVA, Andrea HARONIKOVA, Iveta KOSTOVOVA a Emilia BREIEROVA. Production of biomass, carotenoid and other lipid metabolites by several red yeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production – a comparative screening study. *Annals of Microbiology*. 2013, **63**(4), 1537–1551. DOI: 10.1007/s13213-013-0617-x. ISSN 1590-4261. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s13213-013-0617-x>
- [137] POLBUREE, Pirapan, Wichien YONGMANITCHAI, Noppon LERTWATTANASAKUL, Takao OHASHI, Kazuhito FUJIYAMA a Savitree LIMTONG. Characterization of oleaginous yeasts accumulating high levels of lipid when cultivated in glycerol and their potential for lipid production from biodiesel-derived crude glycerol. *Fungal Biology*. 2015, **119**(12), 1194–1204. DOI: 10.1016/j.funbio.2015.09.002. ISSN 18786146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878614615001683>
- [138] COLET, Rosicler, Letícia URNAU, Jaine BAMPI et al. Use of low-cost agro products as substrate in semi-continuous process to obtain carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2017, **11**, 268–274. DOI:

10.1016/j.bcab.2017.07.015. ISSN 18788181. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878818117303092>

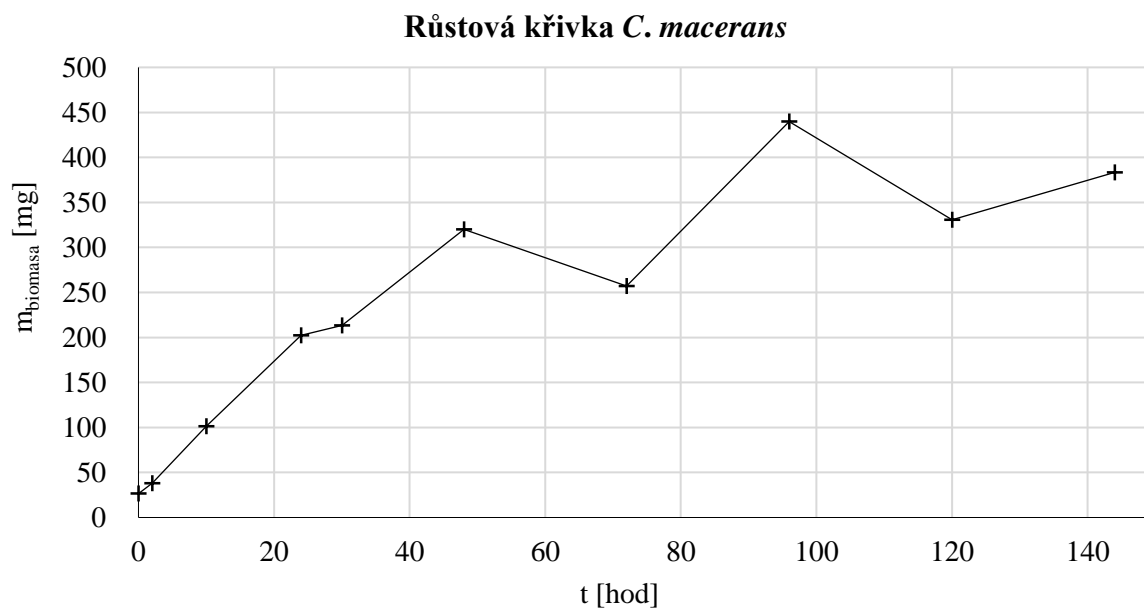
- [139] BLAGA, Alexandra, Corina CIOBANU, Dan CAȘCAVAL a Anca-Irina GALACTION. Enhancement of ergosterol production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch fermentation processes using n -dodecane as oxygen-vector. *Biochemical Engineering Journal*. 2018, **131**, 70-76. DOI: 10.1016/j.bej.2017.12.010. ISSN 1369703X. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X17303443>

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

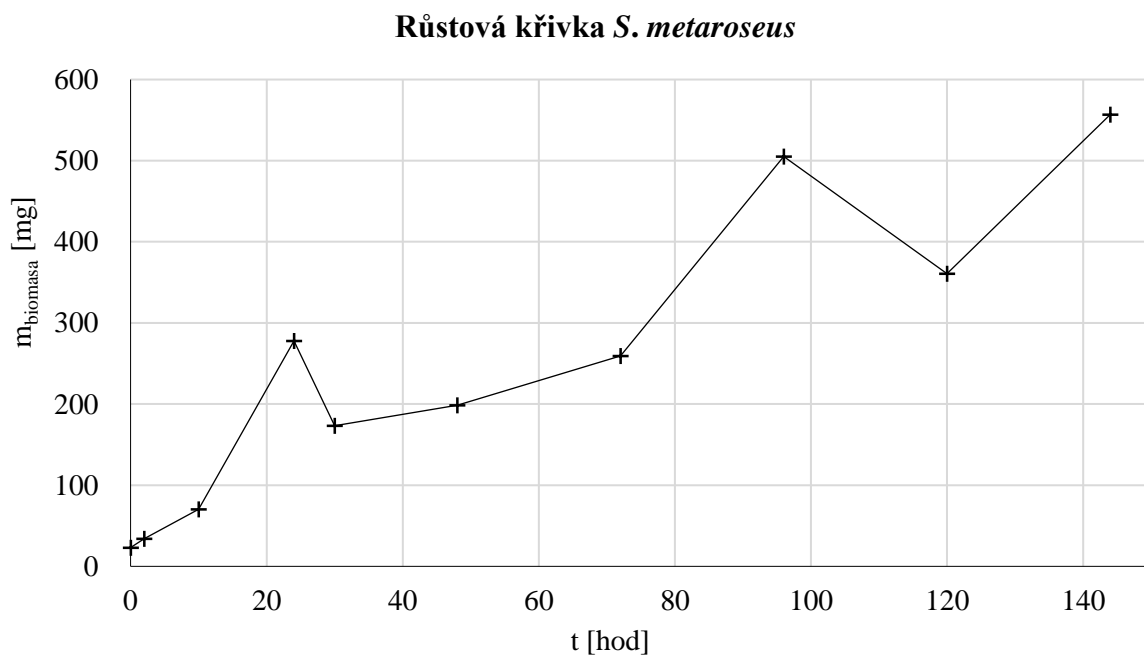
EPS	Exopolysacharidy
CR3	Complement receptor 3
TLR2	Toll-Like receptor 2
GRAS	Generally Recognized as Safe
FDA	US Food and Drug Administration
EFSA	European Food Safety Authority
DEAE-C	Diethylaminoethyl celulóza
ConA	Konkavalin A
¹³ C-NMR	C-13 Nukleární Magnetická Resonance
FA	Mastné kyseliny
SFA	Nasyčené mastné kyseliny
MUFA	Mononenasyčené mastné kyseliny
PUFA	Polynenasycené mastné kyseliny

8. PŘÍLOHY

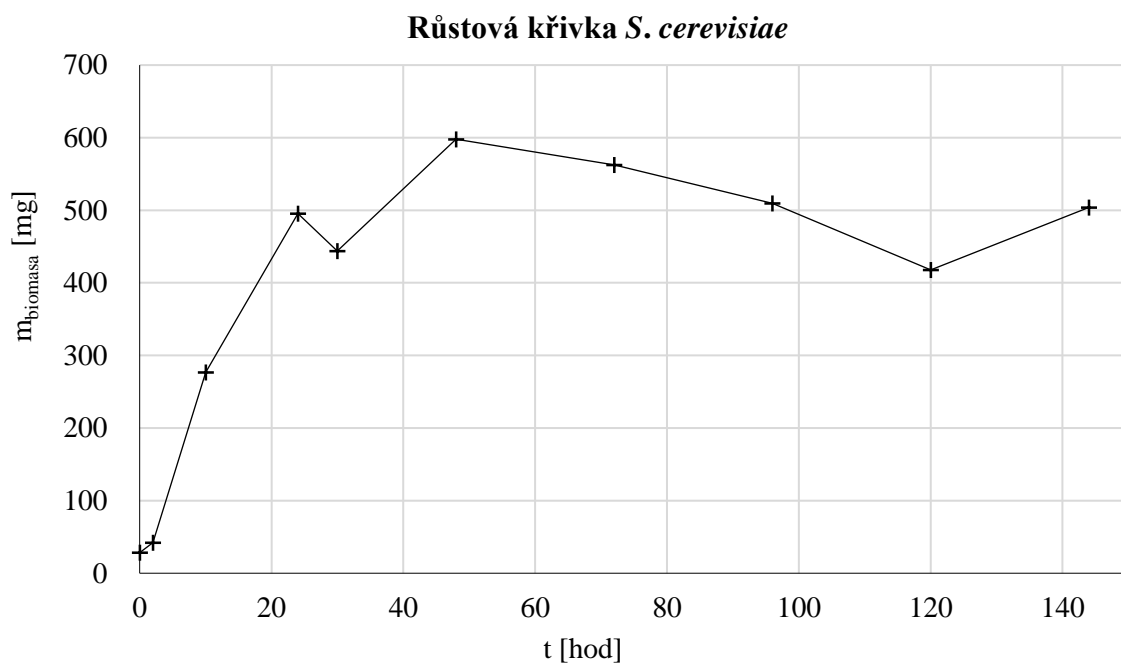
8.1 Růstové křivky kvasinek



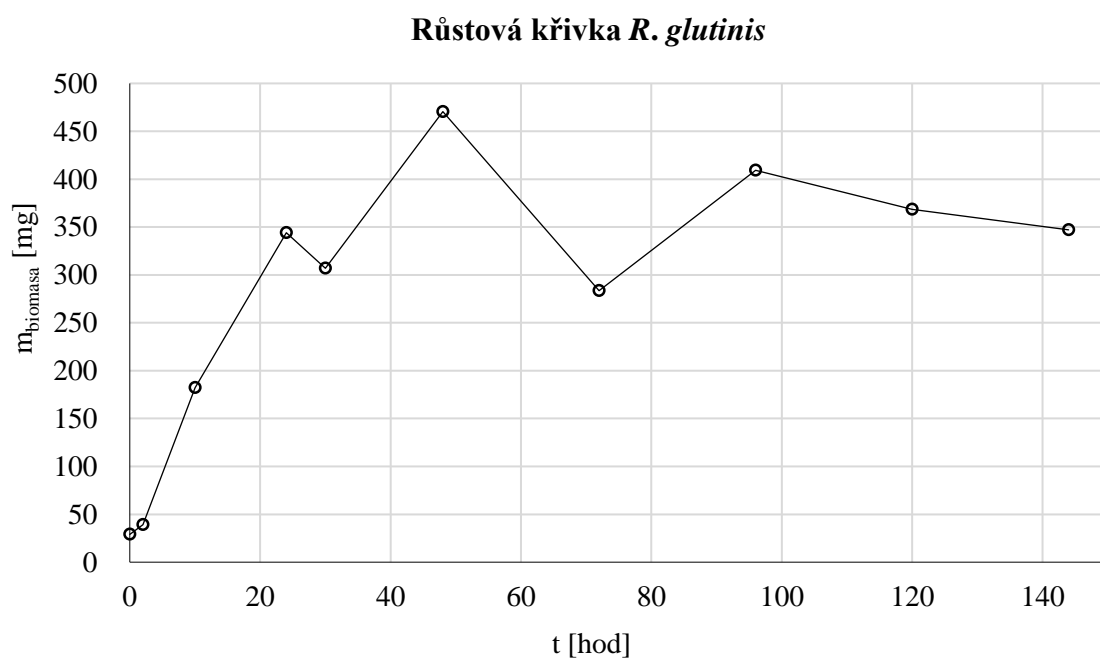
Graf 66: Závislost množství lyofilizované biomasy *C. macerans* na čase odběru buněčné suspenze



Graf 67: Závislost množství lyofilizované biomasy *S. metaroseus* na čase odběru buněčné suspenze



Graf 68: Závislost množství lyofilizované biomasy *S. cerevisiae* na čase odběru buněčné suspenze



Graf 69: Závislost množství lyofilizované biomasy *R. glutinis* na čase odběru buněčné suspenze