



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

ANALÝZA GLUKANŮ V ROSTLINNÝCH A MIKROBIÁLNÍCH VZORCÍCH

ANALYSIS OF GLUCANS IN PLANT AND MICROBIAL SAMPLES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Radek Vít

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1419/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Radek Vít**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název diplomové práce:

Analýza glukanů v rostlinných a mikrobiálních vzorcích

Zadání diplomové práce:

Cílem práce je stanovení glukanů u vybraných kvasinek, řas a materiálu rostlinného původu.

V průběhu práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše
- 2) optimalizace metod pro stanovení glukanů a jejich složek
- 3) analýza glukanů v kvasinkách kultivovaných za různých podmínek
- 4) analýza glukanů u řas a rostlin
- 5) vyhodnocení a diskuse výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 29.5.2020:

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

Bc. Radek Vít
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá studiem gluknanů u vybraných druhů kvasinek, řas a materiálů rostlinného původu. Kultivace byly prováděny za účelem co nejvyšší produkce gluknanů za různých teplotních podmínek a v různých médiích. Pro kultivace kvasinek byly vybrány kmeny *Saccharomyces cerevisiae* (CCY 6646), *Sporidiobolus pararoseus* (CCY 19-9-6), *Phaffia rhodozyma* (CCY 77-1), *Rhodotorula glutinis* (CCY 20-78-26) a *Cystofilobasidium infirmominiatum* (CCY 17-18-4). Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* sloužila jako kontrolní kmen, jelikož je dnes již považována za ověřený zdroj β -glukanů. Stanovení β -glukanů bylo provedeno pomocí enzymatického kitu K-YBGL Megazyme. Ze zástupců řas byla vybrána *Euglena gracilis* (CCALA 349), z řad vyšších hub shiitake, hlíva ústříčná, ucho Jidášovo a žampión zahradní, z obilovin pšenice, žito, oves, rýže a ječmen. U zástupců kvasinek byl také stanovován obsah mastných kyselin pomocí GC/FID. Jako nejlepší producent β -glukanů byla vyhodnocena *Rhodotorula glutinis* CCY 20-7-26, která vykazovala nejvyšší produkci biomasy (12-14 g/l) a také poměrně vysoké zastoupení β -glukanů (25-30 %) u kultivace při 15 °C v médiu s obsahem kvasničného extraktu v kombinaci se síranem amonným. U mikrořasy *Euglena gracilis* (CCALA 349) byla prokázána přítomnost β -glukanů, stejně tak i ve vzorcích vyšších hub a obilovin.

KLÍČOVÁ SLOVA

Beta-glukany, lipidy, kvasinky, houby, obiloviny, mikrořasy

ABSTRACT

The aim of the diploma thesis is study of glucans production in selected species of yeasts, algae and plants. Cultivation conditions for yeast strains were performed to gain increased production of glucans under different temperature conditions and in media of different composition. Into the set of tested yeasts species strains *Saccharomyces cerevisiae* (CCY 6646), *Sporidiobolus pararoseus* (CCY 19-9-6), *Phaffia rhodozyma* (CCY 77-1), *Rhodotorula glutinis* (CCY 20-78-26) and *Cystofilobasidium infirmominiatum* (CCY 17-18-4) were enrolled. *Saccharomyces cerevisiae* was cultivated as a control strain because of its verified production of β -glucans. β -glucans were determined by the enzyme kit K-YBGL Megazyme. For comparison, algal strain *Euglena gracilis* (CCALA 349), some species of mushrooms (shiitake, oyster mushroom, garden champignon and Jew's ear) and cereals (wheat, rye, oats, rice and barley) were analysed too. Further, fatty acid content in the yeast cells was determined by the GC/FID. The best producer of yeast β -glucans was *R. glutinis* CCY 20-7-26, which showed the highest biomass production (12-14 g/l) and also a relatively high amount of β -glucans (25-30 %), in cultivation at 15 °C in a medium containing yeast extract in combination with ammonium sulphate. The presence of β -glucans has been demonstrated in the microalgae, *Euglena gracilis* CCALA 349, as well as in samples of higher fungi and cereals.

KEYWORDS

Beta-glucans, lipids, yeast, mushrooms, cereals, algae

VÍT, Radek. Analýza glukánů v rostlinných a mikrobiálních vzorcích. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123916>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ivana Márová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a všechny použité literární zdroje jsem odcitoval správně a úplně.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych tímto poděkoval vedoucí své diplomové práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za odborné vedení práce. Velmi děkuji také Ing. Daně Byrtusové za ochotu, trpělivost, odborné a cenné rady, které mi usnadnily vypracování diplomové práce. Za trpělivost a zázemí bych také rád poděkoval své rodině.

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Teoretická část.....	10
2.1	β-D-glukany	10
2.1.1	Chemické vlastnosti a struktura β-glukanů	10
2.2	Možnosti aplikace β-glukanů.....	12
2.2.1	Potravinářský průmysl.....	12
2.2.2	Farmaceutický průmysl	12
2.2.3	Kosmetický průmysl.....	12
2.3	Mikrobiální produkce glukanů.....	13
2.3.1	Kvasinky jako zdroje glukanů	13
2.3.2	Řasy	15
2.3.3	Plísně	16
2.4	Rostlinné zdroje β-glukanů.....	16
2.5	Metody stanovení β-glukanů.....	17
2.5.1	FTIR.....	17
2.5.2	NMR	17
2.5.3	HPLC.....	18
2.5.4	Enzymatické stanovení	18
2.6	Lipidy v mikroorganismech.....	18
2.7	Metody stanovení lipidů	20
2.7.1	Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (GC – FID) ..	20
2.7.2	Extrakce a stanovení lipidů.....	20
3	Cíl práce	22
4	Experimentální část.....	23
4.1	Použité chemikálie	23
4.1.1	Kultivace mikroorganismů	23
4.1.2	Stanovení mastných kyselin	23
4.2	Přístroje a pomůcky	23
4.2.1	Kit K-YBGL – Megazym.....	23
4.2.2	Kultivace mikroorganismů	23
4.2.3	Stanovení mastných kyselin	23
4.3	Použité kmeny mikroorganismů	23

4.3.1	Kvasinky	23
4.3.2	Řasy	24
4.4	Další vzorky	24
4.4.1	Vyšší houby	24
4.4.2	Obiloviny	24
4.5	Kultivace mikroorganismů.....	24
4.5.1	YPD agar	24
4.5.2	YPD inokulum.....	25
4.5.3	Produkční média s různými zdroji dusíku	25
4.6	Kultivace řasy <i>Euglena gracilis</i>	25
4.7	Izolace a analýza β -D-glukanů z kvasinek a hub.....	26
4.7.1	Obsah balení kitu pro stanovení β -glukanů.....	26
4.7.2	Příprava reakčních roztoků z jednotlivých částí kitu.....	26
4.7.3	Pomocné roztoky	27
4.7.4	Stanovení celkových glukanů.....	27
4.7.5	Stanovení α -glukanů.....	28
4.8	Izolace a analýza β -D-glukanů z obilovin	28
4.8.1	Obsah balení kitu pro stanovení β -glukanů.....	28
4.8.2	Příprava reakčních roztoků z jednotlivých částí kitu.....	28
4.8.3	Pomocné roztoky	29
4.8.4	Kontrola a doporučení	29
4.8.5	Stanovení β glukanů	29
4.9	Stanovení paramylonu	30
4.10	Transesterifikace a stanovení lipidů.....	30
5	Výsledky a diskuse.....	30
5.1	Vliv složení médií a teploty kultivace na produkci biomasy a obsah β -glukanů. 31	
5.1.1	Produkce β -glukanů u kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
5.1.2	Produkce β -glukanů u kvasinky <i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	35
5.1.3	Produkce β -glukanů u kvasinky <i>Sporidiobolus pararoseus</i>	39
5.1.4	Produkce β -glukanů u kvasinky <i>Phaffia rhodozyma</i>	43
5.1.5	Produkce β -glukanů u kvasinky <i>Rhodotorula glutinis</i>	48
5.2	Stanovení obsahu celkových, α a β glukanů u vybraných zástupců vyšších hub .52	
5.3	Stanovení obsahu β -glukanů u vybraných zástupců obilovin.....	53

5.4	Stanovení paramylonu u řasy <i>Euglena gracilis</i>	54
5.5	Produkce mastných kyselin kvasinkami	57
5.5.1	Produkce mastných kyselin u kvasinky <i>Cystofilobasidium infirmominatum</i>	57
5.5.2	Produkce mastných kyselin u kvasinky <i>Sporidiobolus pararoseus</i>	59
5.5.3	Produkce mastných kyselin u kvasinky <i>Phaffia rhodozyma</i>	61
5.5.4	Produkce mastných kyselin u kvasinky <i>Rhodotorula glutinis</i>	63
6	Závěr.....	66
7	Použité zdroje	68
8	Seznam použitých zkratk.....	74

1 ÚVOD

Dobře fungující imunitní systém je zásadní pro udržení zdraví. Potenciál přírodních látek k posílení imunitního systému je proto již delší dobu předmětem výzkumu. Existuje velké množství syntetických nebo přírodních přípravků, které se prezentují jako imunomodulátory. Mezi ty nejznámější rostlinné přípravky, s účinností na imunitní systém, patří výrobky z *Echinacea*, *Viscum* (jmelí) a *Pelargonium*. Existuje však další velmi zajímavý a intenzivně studovaný druh imunomodulátorů, β -glukany.

Dlouho předtím, než byla identifikována třída látek samotných β -glukanů jako imunomodulátorů byly již v tradiční orientální medicíně využity příznivé účinky hub obsahujících β -glukan, jako je shiitake (*Lentinus edodes*) v Japonsku nebo lingzhi (*Ganoderma lucidum*) v Číně, k posílení imunitního systému.

Výzkum β -glukanů začal v polovině minulého století, kdy byl poprvé prokázán imunomodulační účinek nerozpustné frakce v kvasinkách. Později bylo zjištěno, že imunologická aktivita tohoto přípravku je odvozena od β -(1, 3)-D-glukanů.

Většina našich současných znalostí o jejich zdravotních benefitech, základním způsobu účinku a jeho vztahu ke struktuře, byla objevena během posledních 20 let. Mezitím bylo publikováno více než 6000 publikací zkoumajících jejich imunomodulační účinky, jako jsou protizánětlivé nebo antimikrobiální schopnosti. Účinky na zdraví byly prokázány nejen u lidí, ale také u bezobratlých, hlodavců, ryb a hospodářských zvířat. Mnohé studie dále uváděly další zdravotní přínosy β -glukanů, včetně hepatoprotektivního účinku, hojení ran, hubnutí, antidiabetik a snižování cholesterolu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 β -D-glukany

β -glukany jsou široce zastoupeny v přírodě, obzvláště v řasách, houbách a kvasinkách, ale také ve vyšších rostlinách. Jsou považovány za imunomodulační sloučeniny, které mohou aktivovat imunitní systém hostitele a iniciovat zánětlivé procesy, a tím stimulovat odolnost proti infekcím a růstu rakoviny [1].

V západním světě jsou potravinové doplňky obsahující β -glukany většinou odvozeny od pekařských kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Pekařské droždí se používá při výrobě fermentovaných potravin a nápojů již po tisíce let, a proto některé přípravky z kvasinkové biomasy byly schváleny Evropským úřadem pro bezpečnost potravin jako nové složky potravin a podle FDA jsou obecně uznávány jako bezpečné. Evropský úřad pro bezpečnost potravin dosud neschválil zdravotní tvrzení týkající se imunitní funkce přípravků obsahujících kvasničný β -glukan [2].

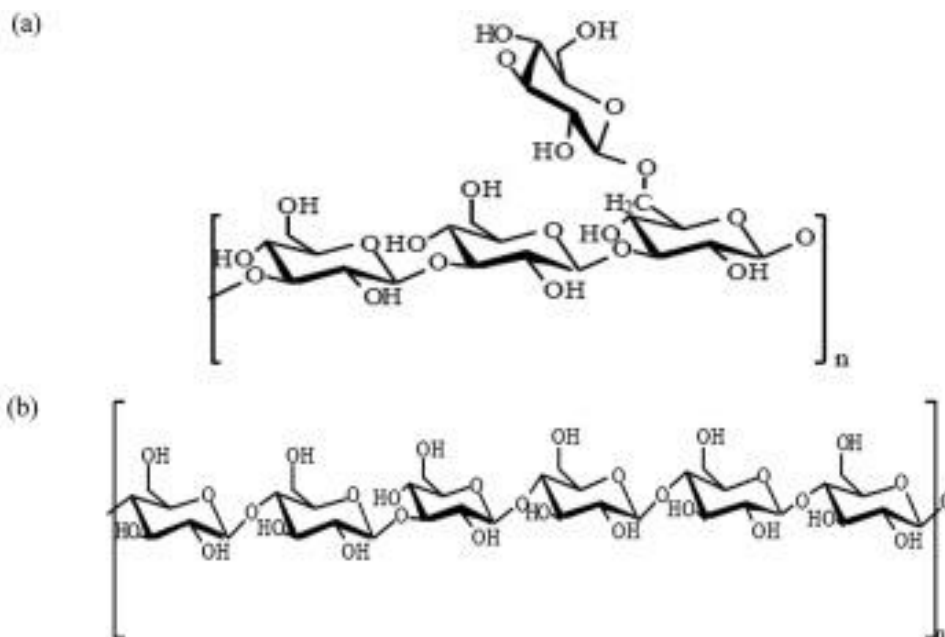
2.1.1 Chemické vlastnosti a struktura β -glukanů

Počet jednotlivých β -glukanů je téměř stejně rozsáhlý jako počet zdrojů a metod použitých pro jejich purifikaci. Jejich aktivita je ovlivněna stupněm větvení, velikostí a jejich molekulární strukturou. Neaktivnější mají společnou strukturu: hlavní řetězec sestávající z (1-3) vázaných β -D-glukopyranózových jednotek, podél nichž jsou náhodně rozptýlené jednotlivé β -D-glukopyranózové jednotky vázané 1-6 nebo 1-4 vazbami. Nejen typ, délka a frekvence těchto větví se liší v závislosti na různých zdrojích β -glukanů, ale také na délce jejich hlavního řetězce, a také jejich aktivity. Výsledkem je, že β -1,3-glukany mají specifické molekulární konformace (např. trojitá spirála, jednoduchá spirála a náhodné spirálové struktury) a molekulová hmotnost [3], [4].

Jako druh vlákniny v potravě lze β -glukany nalézt v různých přírodních zdrojích, jako jsou kvasinky, houby, bakterie, řasy, ječmen a oves. V průběhu let přitahovaly pozornost kvůli svým fyzikálním a chemickým vlastnostem. Tyto biopolymery vykazují široké spektrum biologických aktivit, včetně protinádorových, imunomodulačních a protizánětlivých vlastností. β -glukany z pekařských kvasnic obsahují vazby β -(1 \rightarrow 3) a (1 \rightarrow 6) (Obrázek 1 (a)). Jiné β -glukany, odvozené od obilovin, jsou polysacharidy glukózových zbytků s vazbami β -(1 \rightarrow 3) a β -(1 \rightarrow 4) (Obrázek 1 (b)). Dále se β -glukany liší polohou β vazby, celulóza obsahuje vazbu (1 \rightarrow 4), kurdlan (1 \rightarrow 3), β -glukan z lišejníků může obsahovat (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4) nebo (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6) vázané glukany. Obecně, fungální β -glukan prokázal účinnost jako stimulant imunitního systému a protinádorová látka, z obilovin zase napomáhá snižovat hladinu cholesterolu a glukózy v krvi [1].

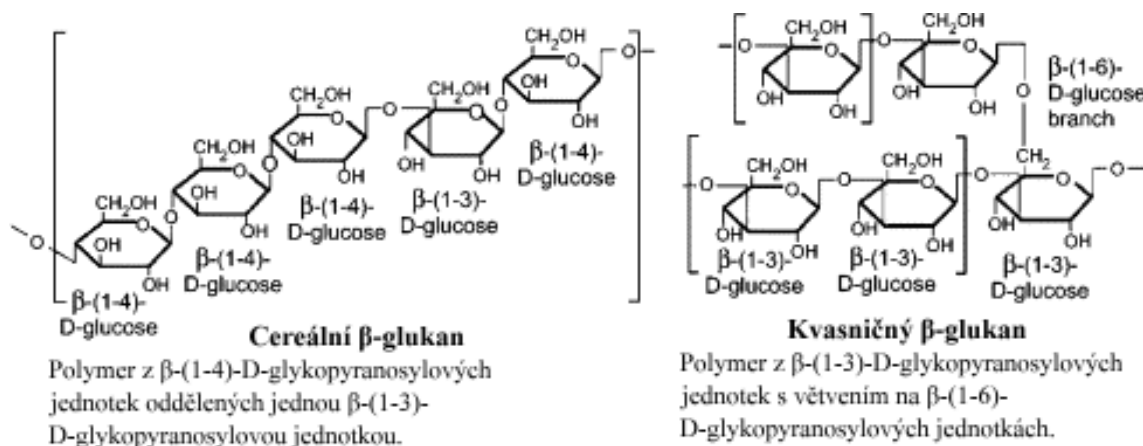
Avšak ne všechny β -glukany jsou schopné modulovat imunitní funkce. Tyto vlastnosti jsou závislé hlavně na primární chemické struktuře β -glukanů. Například celulóza, β -(1, 4) vázaný glukan, nevykazuje imunomodulační účinky. Nejen zdroj, ale také i výrobní proces, a tedy i způsob izolace, může ovlivnit strukturu β -glukanů a následně jejich účinky na imunitní systém.

Předpokládá se, že β -glukany s molekulovou hmotností kolem 5 000 až 10 000 kD budou nejúčinnější, dále ale záleží také na způsobu podání. Intravenózní podání glukanů vyžaduje snížení molekulové hmotnosti, a to kvůli jejich zvýšení rozpustnosti ve vodě [7], [8], [9], [57], [58].



Obrázek 1: Struktury β -glukanů. (a) $(1 \rightarrow 3)$ β -glukan s rozvětvením $\beta (1 \rightarrow 6)$, (b) β -glukan s rozvětvením $\beta (1 \rightarrow 4)$ [1].

Zdroje β -glukanů se liší v jednotlivých částech světa zejména z hlediska dostupnosti. V Evropě a USA se pro imunomodulační studie využívá zymosan získávaný z kvasnic používaných v pivovarnictví nebo pekařství, ve Francii jsou hlavním zdrojem glukanů mořské řasy, v Kanadě a Brazílii získávají glukany z obilovin, Japonsko, Čína a Rusko získávají glukany z hub, jako jsou např. shiitake, maitake, či reiši [5].



Zdroj β -glukanu	Struktura	Popis
Bakteriální		Lineární β -1,3-glukan (např. Curdlan)
Houbový		Krátké β -1,6 větvení, β -1,3 glukan (např. Schizophyllan)
Kvasničný		Dlouhý β -1,6 větvený, β -1,3 glukan (např. WGP β -glukan, Betafectin)
Cereální		Lineární β -1,3/ β -1,4-glukan (např. oves, ječmen, žito)

Obrázek 2: Strukturní rozdíly β -glukanů v závislosti na zdroji [6].

2.2 Možnosti aplikace β -glukanů

β -glukan má různé fyzikální vlastnosti a aplikace, jako je zahušťování, stabilizace, emulgace a gelace. Má potenciál být použit ve zdravotních přípravcích, které nabízejí širokou škálu benefitů. Velká část zájmu o aplikaci obilných β -glukanů pramení z jejich využití jako funkční vlákniny. β -Glukany mají potenciální využití v lékařství a farmacii, potravinářském, kosmetickém a chemickém průmyslu, ve veterinární medicíně a ve výrobě krmiv [1].

2.2.1 Potravinářský průmysl

Z ovesných nebo ječmenných zrn byl získán produkt s vysokým obsahem β -glukanu, který může být použit jako potravinářská přídatná látka obsahující alespoň 18 % β -glukanu v sušině. Metody umožňující obohacení produktu o β -glukanovou aglomerovanou potravinářskou přídatnou látku se využívají při přípravě klobás, které mají optimalizované probiotické složení (rezistentní škrob, β -glukan). β -glukan měl znatelný účinek na sensorické vlastnosti klobásy. [1].

Kittisuban a kol. (2014) analyzovali účinky hydroxypropylmethylcelulózy, kvasinkového β -glukanu a syrovátkového proteinu na fyzikální vlastnosti bezlepkového chleba pečeného z přípravků na bázi rýžového škrobu. Bylo zjištěno, že takto připravený chléb je přijatelný podle výsledků sensorické analýzy. V případě začlenění β -glukanu o vysoké molekulové hmotnosti může docházet také ke snížení obsahu kalorií a cholesterolu [1], [59].

2.2.2 Farmaceutický průmysl

β -glukany byly použity v několika klinických studiích k testování jejich obecných účinků na zdraví. Cyklické β -glukany byly testovány jako materiál pro obvazy ran. Navíc komplexy β -glukanu a chitosanu tvoří transparentní krytí rány. Při vyhodnocování na ranách vytvořených na hřbetech myši, tyto komplexy prokázaly srovnatelnou nebo dokonce i lepší terapeutickou účinnost než komerčně dostupné obvazy, Komplex chitosan- β -glukan by také mohl napomáhat při léčbě popálenin, kde by měl snižovat bolest při poranění [1], [59], [69].

Kromě toho byl β -glukan navržen jako spojovací činidlo pro kombinování granulární keramiky do nového kompaktního a elastického kompozitu v důsledku neuspokojivé chirurgické praktičnosti v implantovatelné granulární biokeramice. Tato studie měla připravit bifázický hydroxyapatit / glukanový kompozit s elastickými vlastnostmi, který by umožnil snadnou manipulaci a dobré přizpůsobení tvaru a rozměrům i velkých kostních defektů. Výsledky potvrdily, že flexibilní materiál hydroxyapatit / glukan měl potenciál jako materiál nahrazující kosti [60].

2.2.3 Kosmetický průmysl

Již několik desetiletí se používají β -glukany v ochranných krémech, mastech, prášcích a suspenzích. Přisuzovaná aktivita β -glukanům je zvýšení produkce kolagenu, zmenšení vrásek, celulitidy, akné, dermatitidy, ekzému, lupénky a dalších kožních stavů. Bylo zjištěno, že β -glukan napomáhá zvlhčování a vytváří film usnadňující hojení ran [1].

Pillai a kol. (2005) zjistili, že ovesný β -glukan je schopný penetrace v modelech lidské kůže a klinicky zhodnotili jeho účinnost při snižování jemných linií a vrásek. Výsledky ukázaly, že β -glukan hluboko pronikl kůží do epidermis a dermis. Výzkum podporuje jejich využívání v péči o zdravou pokožku a kosmetické ošetření známek stárnutí. Další studie ukázala [63], že nízká koncentrace specifického polysacharidu třídy skleroglukanu je užitečná v oblasti kůže

a dermatologických kompozic. Glukanová kompozice vykazuje výhodné účinky, jako je zvlhčení kůže nebo sliznice, a působí proti stárnutí a revitalizačnímu účinku na kůži [1], [61].

2.3 Mikrobiální produkce glukanů

2.3.1 Kvasinky jako zdroje glukanů

Buněčná stěna houbových organismů je dynamická struktura, která poskytuje ochranu před nepřátelským prostředím. Polysacharidy představují více než 90 % buněčné stěny. Centrální kosterní složka buněčné stěny, která je společná pro velkou většinu hubových druhů, je rozvětvené jádro β -(1,3) glukanu, spojené s chitinem prostřednictvím β -(1,4) vazby. β -(1,6) glykosidické vazby představují 3 až 4 % celkových glykanových vazeb v *Saccharomyces cerevisiae* a *Aspergillus fumigatus*. V kvasinkách se β -glukany nacházejí v buněčné stěně spolu s mannany a chitinem. β -glukany z kvasinek se skládají z primárního řetězce a rozvětvených polymerů [41], [42].

Hlavními složkami buněčných stěn hub jsou polysacharidy a glykoproteiny. Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* obsahuje buněčnou stěnu složenou z β (1 \rightarrow 3) - D - glukanu, β (1 \rightarrow 6) - D-glukanu, chitinu a mannoproteinů. Polysacharidy plní strukturální funkci, zatímco mannoproteiny působí jako „plnivo“ a jsou důležité pro propustnost buněčné stěny. Pevnost buněčné stěny kvasinek lze vysvětlit existencí kovalentních vazeb mezi různými součástmi stěny, které by vedly ke vzniku souvislé a následně silnější struktury. Předchozí studie prokázaly přítomnost vazeb mezi chitinem a β (1 \rightarrow 3) -glukanem a také mezi glykoproteiny, β (1 \rightarrow 6) -glukanem a β (1 \rightarrow 3) -glukanem [43], [44], [45].

Kvasinky se jeví jako vhodný zdroj pro izolaci glukanů i přes to, že jejich biologická aktivita je ovlivňována fyzikálními a chemickými procesy. Hlavním výhodou oproti jiným zdrojům je jejich snazší identifikace, čistota a biologická aktivita, také se jedná o levný zdroj [40]. Kvasinky jsou eukaryotické jednobuněčné mikroorganismy patřící do taxonomické říše houby. První zmínky pocházejí z období před stovkami miliónu let a v současné době je známo nejméně 1500 druhů kvasinek [26].

Jejich velikost se velmi liší v závislosti na druhu a prostředí, nejčastěji měříme velikost kvasinek 3-4 μm v průměru, některé druhy mohou dorůst až na 40 μm . Nejčastěji se rozmnožují asexuálně pomocí pučení. Jádro z mateřské buňky se rozdělí a vytvoří jádro dceřiné buňky, které potom putuje do dceřiné buňky. Pupen poté pokračuje v růstu, dokud se neoddělí od mateřské buňky a nevytvoří buňku novou. Mohou se množit také sexuálně tvorbou vřecek (meióza), k tomu dochází při stresových podmínkách (nedostatečném obsahu živin). Diploidní buňky mohou postoupit sporulaci a vstoupit do sexuální reprodukce. Tím dochází k produkci různých haploidních spor, které se mohou dále konjugovat a měnit diploid [27][28].

Kvasinky jsou chemoorganotrofy, jako zdroj energie používají organické sloučeniny a nevyžadují k růstu sluneční záření. Jako zdroj uhlíku využívají nejčastěji hexózoové cukry, jako jsou glukóza nebo fruktóza, dále také využívají disacharidy, sacharózu a maltózu. Některé druhy dokážou metabolizovat i pentózoové cukry, jako je ribóza, alkoholy a organické kyseliny [29].

Některé druhy kvasinek vyžadují kyslík pro aerobní buněčné dýchání (obligátně aerobní), nebo jsou anaerobní, ale využívají aerobní procesy k produkci energie (fakultativně aerobní). Většina kvasinek roste nejlépe při neutrálním nebo mírně kyselém pH prostředí. Teplotní rozsah pro ideální růst se liší podle druhu. Buňky kvasinek mohou přežít zamrazení, přičemž jejich životaschopnost se postupem času snižuje [30].

V přírodě se běžně vyskytují na povrchu ovoce či bobulovin, jako jsou hrozny, jablka nebo broskve. Lze je objevit také ve spojení půdy a hmyzu. Kvasinky svou rozmanitostí jsou relativně neznámé ve srovnání s jinými mikroorganismy. Nalézt je můžeme také na lidské kůži, ve střevní flóře savců a některých druhů hmyzu, a dokonce i v hlubinných prostředích [31], [32].

Nacházejí využití v oblasti biotechnologií pro své vhodné fyziologické vlastnosti. Fermentace cukrů patří k nejstarším a nejvíce využívaným aplikacím kvasinek. Mnoho jich nachází využití v potravinářském průmyslu pro výrobu potravin, pekařské kvasnice při výrobě pečiva, pivovarské kvasnice při fermentaci piva. Kvasinky patří k nejvíce používaným modelovým organismům pro genetiku a buněčnou biologii [33].

V dalším textu jsou uvedeny některé druhy kvasinek, které byly studovány jako potenciální zdroje glukánů.

2.3.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasinka z oddělení vřecokvůtrusných hub je využívána již od neolitu člověkem při kvasných procesech. Lze je dělit do geneticky spřízněných kmenů na základě toho, který substrát kvasí (pivní, pekařské a vinné kvasinky). Tvarově jsou buňky *S. cerevisiae* oválné až kulovité o velikosti 5-10 μm .

Pivní kvasinka patří mezi jeden z nejstudovanějších eukaryotních organismů v oblastech molekulární a buněčné biotechnologie, a to hlavně při studiu buněčného cyklu, vnitrobuněčné signalizace a protein-protein interakcí [11], [12], [13].

Všechny kmeny *S. cerevisiae* mohou růst aerobně na glukóze, maltóze a trehalóze, nikoliv však na laktóze a celobióze. Růst na jiných druzích cukru je však také možný (např. na galaktóze a fruktóze). Všechny kmeny mohou využívat jako jediný zdroj dusíku amoniak nebo močovinu, naopak dusičnany se nedají použít, protože nemají schopnost redukovat se na amonné ionty. Kvasinky také vyžadují fosfor.

S. cerevisiae se využívá jako modelový organismus. Jako jednobuněčný organismus má *S. cerevisiae* krátkou generační dobu a lze ji snadno kultivovat. Tyto vlastnosti umožňují její rychlou produkci a udržování při nízkých nákladech [14], [15], [16].

2.3.1.2 *Cystofilobasidium infirmominatum*

Rod *Cystofilobasidium* se vyznačuje tím, že nedochází ke zkvašování cukrů, ale má široké spektrum substrátů, které využívá. V přírodě se nejčastěji kvasinky rodu *Cystofilobasidium* vyskytují ve vodním prostředí, zejména v chladnějších oblastech. V tekutém médiu má červené zbarvení a její kolonie jsou hladké s lesklým povrchem [16], [17], [18].

C. infirmominatum byla izolována z povrchových vod do hloubky 2000 m. V Argentině byly dříve izolovány tři kmeny *C. infirmominatum* ze sladkovodních ekosystémů z jezer na severozápadě Patagonie. Bioprospekce kvasinky pro produkci pektináz za použití pektinového agarového media byla pozitivní, ale dosud nebyly provedeny žádné další studie [19].

2.3.1.3 *Sporidiobolus pararoseus*

Kvasinkové buňky jsou vejčité, elipsoidní nebo protáhlé. *S. pararoseus* produkuje karotenoidy, kultury proto mají růžovou až oranžovou barvu. Produkce karotenoidů je závislá na vnějších podmínkách (teplotě, pH, zdroji uhlíku) [20].

U rodu *Sporidiobolus* nedochází ke zkvašování substrátu. Dominantním koenzymem je v jeho buňkách koenzym Q10. *Sporidiobolus pararoseus* byl izolován z půdy, vzduchu, různých druhů rostlinného materiálu a mořské vody. Zvláštností *S. pararoseus* je nepřítomnost basidií po klíčení teliosporu [21].

2.3.1.4 *Phaffia rhodozyma*

Basidiomycetózní kvasinka, která produkuje karotenoidní astaxanthin. Kvůli této vlastnosti se fermentuje ve velkém měřítku. Astaxanthin je jedním z nejrozšířenějších karotenoidů v biosféře, zejména v mořském prostředí [21].

Vegetativní buňky *P. rhodozyma* se reprodukuje pučením, jsou elipsoidní a vyskytují se samostatně, v párech nebo příležitostně v krátkých řetězcích. Způsob tvorby pupenů je charakteristický pro heterobasidiomycetové kvasinky. Polysacharidy buněčné stěny obsahují hlavně β -(1-3) a β -(1-6) glukán a také α -(1-3) glukán a žádné nebo malé množství chitin. Buňky jsou obklopeny kapslí kyselých polysacharidů obsahujících D-xylózu [22].

2.3.1.5 *Rhodotorula glutinis*

R. glutinis je schopna syntetizovat celou řadu cenných sloučenin s širokým průmyslovým využitím. Biomasa těchto kvasinek představuje zdroj mikrobiálních olejů a mastných kyselin, zejména olejové, linolové a palmitové. Tato kvasinka je dále schopná syntetizovat karotenoidy, jako je beta-karoten, torulen a torularhodin, které se běžně používají v kosmetickém, farmaceutickém a potravinářském průmyslu. Významnou charakteristikou *R. glutinis* je její schopnost produkovat četné enzymy, zejména fenylalanin lyázu (PAL), který se používá v potravinářském průmyslu při výrobě L-fenylalaninu, který tvoří substrát pro syntézu aspartamu (sladidlo používané v potravinářském průmyslu) [23].

2.3.2 Řasy

Řasy obvykle obsahují kolem 38 % až 74 % polysacharidů v sušině. Tyto polysacharidy jsou však většinou stavební (agary, algináty, karagenany). V hnědých mořských řasách lze nalézt zásobní polysacharid laminarin, (1 \rightarrow 3) - β -glukán [40].

Glukany fungují jako potravinový zásobní materiál ve všech živých organismech. (1 \rightarrow 3) spojené β -D-glukany, u řas nazývané chrysolaminaran ((1 \rightarrow 3) - β -glukán s občasným větvením β (1 \rightarrow 6), vykonávají tuto funkci v nejméně šesti z jedenácti rozpoznávaných řas, včetně *Bacillariophyta*, nebo rozsivek. V kultuře je jejich obsah glukánu obvykle v exponenciální fázi růstu nízký, ale ve stacionární fázi se výrazně zvyšuje, když je N nebo P v omezeném množství. Světlo a teplota ovlivňují také obsah glukánů, naopak slanost vliv nemá. Čím vyšší je poměr N / P v médiu, tím nižší je čistá produkce glukánu v rozsivkách [47].

Jednobuněčné druhy řas, které existují jednotlivě nebo v řetězcích nebo shlucích, patří do říše eukaryota (řasy) a prokaryota (sinice). Jedná se o velmi staré organismy, které se dokážou přizpůsobit i extrémním podmínkám, díky čemuž produkuje různé sekundární metabolity, ochranné nebo zásobní látky. V závislosti na druhu se jejich velikost může pohybovat od několika jednotek mikrometrů až do několik stovek mikrometrů. Jsou speciálně přizpůsobené prostředí, kterému dominují viskózní síly. Mikrořasy jsou schopné provádět fotosyntézu, čímž jsou velmi důležité pro život na Zemi. Mikrořasy vyprodukuje přibližně 50 % atmosférického kyslíku a současně využívají oxid uhličitý k fotoautotrofnímu růstu [34], [35].

Biodiverzita mikrořas je obrovská a představují téměř nevyčerpatelný zdroj obnovitelné energie, biomasy a metabolických produktů. Odhaduje se, že v mnoha různých rodech existuje asi 200 000 až 800 000 druhů, z nichž je dosud popsáno asi 50 000 druhů. Chemicky bylo stanoveno asi 15 000 nových sloučenin pocházejících z řasové biomasy. Většina z těchto řas produkuje jedinečné produkty jako jsou karotenoidy, antioxidanty, mastné kyseliny, enzymy, polymery, peptidy, toxiny a steroly [36], [37].

Chemické složení mikrořas není stálé, mění se v závislosti na druhu či podmínkách kultivace. Některé mikrořasy mají schopnost přizpůsobit se okolním podmínkám změnou svého chemického složení v reakci na proměnlivost prostředí. Jako příklad lze uvést jejich schopnost nahradit fosfolipidy lipidy bez fosfátových membrán v prostředí zbaveného fosforu [38].

Mikrořasy mají jednoduchou buněčnou strukturu a jejich růst vyžaduje světlo, oxid uhličitý, vodu a živiny (fosfor a dusík jako hlavní živiny). Fotosynteticky mohou mikrořasy přeměnit tyto potřeby na energii a využít ji při vývoji buněk. Hlavními chemickými složkami mikrořas jsou lipidy, proteiny a uhlovodíky s různým složením, které jsou uloženy v buňce mikrořas [39].

2.3.2.1 *Euglena gracilis*

Euglena gracilis patří k nejstudovanějším řasám z čeledě *Euglenaceae*. Žije ve sladkých a brakických vodách, jako jsou rybníky, které bývají bohaté na organickou hmotu. Některé druhy mohou v rybnících nebo jezerech vytvářet zelené nebo červené „květy“ [24].

Má sekundární chloroplasty a je mixotrofem schopným žít se fotosyntézou nebo fagocytózou. Má vysoce flexibilní povrch buněk, což jí umožňuje měnit tvar z tenké buňky až do délky 100 μm na sféru přibližně 20 μm . Každá buňka má dva bičíky, z nichž pouze jeden se vynoří z bičíkové kapsy (rezervoáru) v přední části buňky. Může se pohybovat plaváním, nebo tzv. „euglenoidním pohybem“ přes povrchy. *Euglena gracilis* se v laboratoři hojně využívá jako modelový organismus, hlavně při studiu buněčné biologie a biochemie [25].

β -glukany extrahované z řas *Euglena gracilis* jsou spojeny (1 \rightarrow 3) -glykosidickými vazbami a jsou kategorizovány jako paramylon [46], [50].

Paramylon je sacharid podobný škrobu. Chloroplasty nacházející se u *Euglena gracilis* obsahují chlorofyl, který pomáhá při syntéze sacharidů, které mají být uloženy ve formě škrobových zrn a paramylonu. Paramylon je zhotoven v pyrenoidu eugleny [48].

Euglenoidy obsahují chlorofyly a a b, které ukládají produkty fotosyntézy v neobvyklé formě nazývané paramylonový škrob (polymer β (1 \rightarrow 3) glukózy). Ten je ukládán ve formě tyčinek v cytoplazmě [40], [49].

2.3.3 Plísně

β -glukany jsou důležitou součástí spor plísní a imunitní systém je rozpoznává receptorem Dectin-1. Ten je exprimován na makrofázích, monocytech, neutrofilech a dendritických buňkách. Spory *Cladosporium cladosporioides* mají vysoký obsah β -glukanů, ale β -glukany nejsou dostupné na povrchu živých spor.

Hlavní složkou houbových buněčných stěn jsou (1 \rightarrow 3)- β -D-glukany, které se běžně používají jako ukazatel expozice plísní v životním prostředí. β -glukany tvoří až 60 % hmotnosti buněčné stěny. Řada studií ukazuje, že β -glukany v plísňových sporách jsou důležité pro vývoj postupu a typu imunitní reakce [51].

2.4 Rostlinné zdroje β -glukanů

β -glukany jsou významnou součástí vlákniny cereálií, která je tvořena nerozvětvenými polysacharidy z β -D-glukopyranózových jednotek vázaných (1,4) a (1,3) glykosidovými vazbami. β -glukany se obvykle koncentrují ve vnitřních buněčných stěnách a endospermu ječmene, ovsa a pšenice. Největší obsah β -glukanů lze najít u ječmene (3-11 % sušiny) a ovsa (3-7 % sušiny) [10].

Obilné β -glukany jsou tvořeny polymery glukózy, které se liší od ostatních polymerů nejen svým zdrojem, ale svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Extrakce cereálního β -glukanu je

velmi obtížná, takže se cereální β -glukan stává dražším než β -glukan z jiných zdrojů. Postup výroby byl v průběhu let vyvíjen a optimalizován. Metody extrakce jsou založeny na rozpustnosti β -glukanu v horké vodě a v alkalických roztocích, separaci rozpuštěných proteinů izoelektrickou precipitací s následným srážením síranem amonným, 2-propanolem nebo ethanolem. Pro výzkumné účely se v dalším čištění používají opakovaná srážení a enzymatická hydrolyza zbytkového škrobu, díky čemuž se dosáhlo čistoty až 99 % [1].

Vysoká čistota získaného β -glukanu umožňuje přípravu čirých, bezbarvých viskózních kapalných přípravků. Tyto přípravky mají stabilní gelové účinky, jsou-li udržovány při okolní teplotě a nízkých koncentracích popela [1].

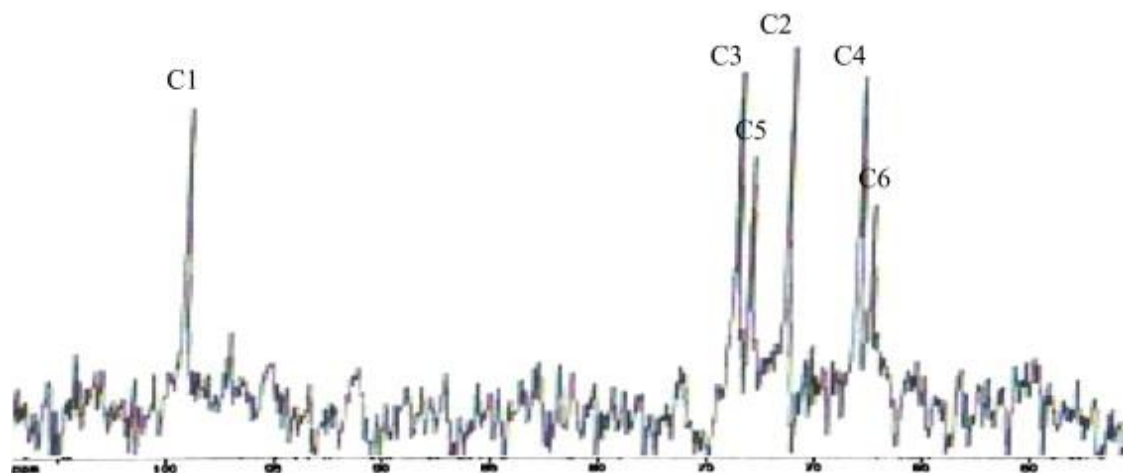
2.5 Metody stanovení β -glukanů

2.5.1 FTIR

Infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací lze použít pro stanovení obsahu polysacharidů ve vzorku. Pro stanovení je potřeba použít purifikované polysacharidy ve formě stlačené tablety s KBr. Transmittanci měříme v rozmezí vlnové délky $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, v tomto rozmezí můžeme pozorovat stretching vazeb O-H a C-H (u C-H vazeb pozorujeme také charakteristickou vibraci). Polysacharidy se nejčastěji projevují v sérii píků v oblasti $1200\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ [52], [55].

2.5.2 NMR

Z hlediska strukturní charakterizace polysacharidů, ^1H a ^{13}C , se jeví nukleární magnetická rezonance (NMR) jako dobrý nástroj pro odhalení vlastností a strukturálních změn. ^{13}C NMR polysacharidů obvykle představuje čtyři regiony posunů, které jsou charakteristické: oblast anomerních atomů uhlíku (98 a 108 ppm), uhlíků C2-C5 glykosidického kruhu (70 a 80 ppm), oblast primárních uhlíků, které se nachází kolem 60 ppm a oblast kyselých skupin kolem 170-180 ppm, které jsou indikovány přítomností karbonylových skupin, charakteristických pro kyselé cukry. Konfigurace anomerních uhlíků může být také hodnocena ^1H NMR. Na uhlíkovém spektru jsou zřetelné posuny atomů uhlíku (C1-C6), které jsou charakteristické pro β -glukan (1 \rightarrow 6). Intenzita píku charakteristického pro konkrétní β -glukan znázorňuje jeho převahu ve složení izolovaného materiálu. Podobné vyhodnocení lze provést také pro vodíkové spektrum, kde jsou posuny charakteristického protonu dotyčného glukanu jasně identifikovány [53].



Obrázek 3: ^{13}C NMR spektrum pro izolovaný glukan [53]

2.5.3 HPLC

Za použití methylovaných derivátů glukózy lze využít HPLC ke stanovení obsahu glukanů ve vzorku. Methylace hydroxylových skupin probíhá v přebytku methylačního činidla (např. methyljodid) a je následována kyselou hydrolyzou. Uvolněné methylované deriváty glukózy (2, 3, 4, 6-O-tetramethyl-D-glukóza; 2, 3, 4-O-trimethyl-D-glukóza; 2, 4-dimethyl-D-glukóza) jsou analyzovány pomocí HPLC/MS. Větvení a konfiguraci zjišťujeme podle poměru methylovaných derivátů [54].

2.5.4 Enzymatické stanovení

Za využití chemické hydrolyzy buněčné stěny a štěpení glukanů za pomoci enzymů je možné stanovit obsah β -glukanů rozdílem obsahu celkových glukanů a α -glukanů.

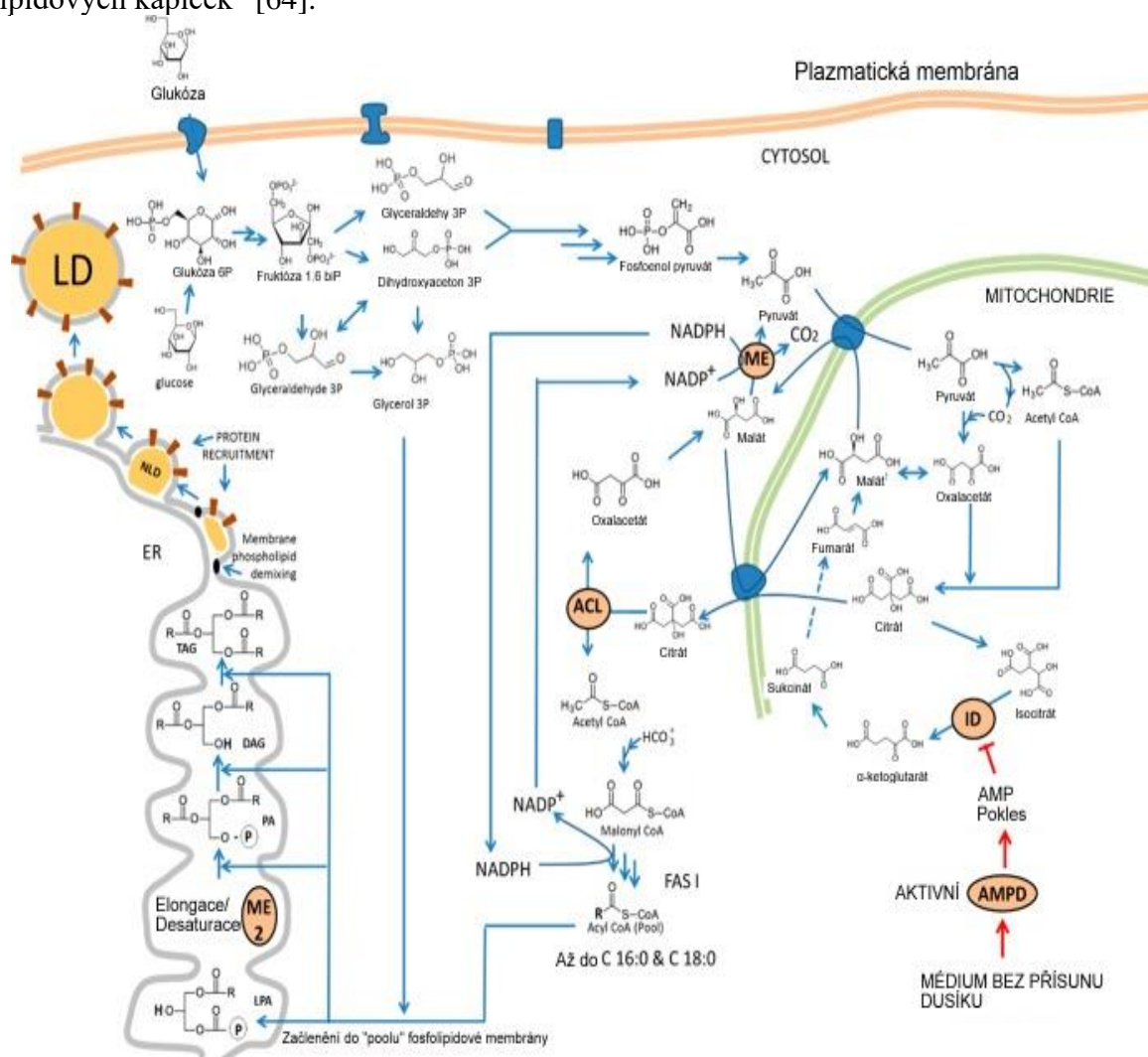
Celkový obsah glukanů (volná glukóza a glukóza ze sacharózy) lze měřit pomocí řízené kyselé hydrolyzy s H_2SO_4 při zvýšené teplotě, specificky uvolněná glukóza je měřena pomocí činidla glukózaoxidáza / peroxidáza (GOD-POD). α -glukan (škrob / glykogen) plus volná glukóza a glukóza ze sacharózy jsou specificky měřeny po hydrolyze škrobu / glykogenu na glukózu pomocí glukosamylázy, sacharóza po hydrolyze na glukózu plus fruktózu s invertázou a glukóza je specificky měřena pomocí GOD-POD činidla. Bylo porovnáno několik metod založených na kyselině a enzymu pro hydrolyzu β -glukanů a nejlepší možností byla metoda používající H_2SO_4 . U většiny vzorků byly získány podobné hodnoty β -glukanů jako při optimalizované proceduře jak s HCl, tak s H_2SO_4 . Avšak v případě některých vzorků, konkrétně *Ganoderma lucidum* a *Poria cocos*, vedl postup s H_2SO_4 k výrazně vyšším hodnotám. Bylo zjištěno, že hydrolyza 2 N kyselinou trifluoroctovou při 120 °C je mnohem méně účinná než kterákoli z ostatních hodnocených dvou kyselin. Testy založené zcela na enzymatické hydrolyze obecně poskytovaly mnohem nižší hodnoty než ty, které byly získány postupem s H_2SO_4 [56].

2.6 Lipidy v mikroorganismech

Lipidy jsou estery alkoholů a vyšších mastných kyselin a můžeme je klasifikovat na fosfolipidy, glykolipidy (mají strukturní funkci v buněčných membránách) a triacylglyceroly (zásobní lipidy, zdroje energie). V posledních letech byl značný zájem o mikrobiální lipidy kvůli možnosti komerční produkce olejů a tuků z mikrobiálních zdrojů. Složení lipidů z mikroorganismů, je také užitečné v taxonomii [62].

Akumulace lipidů je biologický proces, který plní několik úloh v mikroorganismech. Skladování lipidů přispívá k růstu buněk, buněčnému dělení, stresové reakci a jako zásobní zdroj energie pro přežití. Různé mikroorganismy produkují různé druhy neutrálních lipidů. Například oleogenní kvasinky produkují triacylglycerol (TAG) nebo estery sterolů (SE), které hromadí uvnitř buňky, zatímco některé bakterie a Archaea produkují polyhydroxyalkanoáty (PHA) a v menší míře TAG. K akumulaci lipidů dochází při stresových podmínkách (zejména při omezeném přísunu dusíku) a s dostatečným nebo nadměrným přísunem uhlíku. Dojde k zastavení replikace a dostupný uhlík je využit k jeho syntéze a následnému uložení ve formě redukováných lipidů. V případě TAG a SE má proces akumulace čtyři hlavní fáze. V první fázi dojde k posunu metabolismu tak, aby vytvořil acetyl koenzym A (Ac-CoA) a NADPH. Ve druhé fázi je Ac-CoA, karboxylován za vzniku malonyl-CoA, převeden na acylový nosičový protein (ACP) a dále transformován na acyl ACP postupným stáčením v syntéze mastných kyselin. Třetí krok závisí na potřebách buňky a typu mikroorganismu, acylový řetězec může skončit jako specifický typ lipidového „poolu“ (membránový lipid) nebo může být nakonec začleněn do jádra neutrálních „lipidových kapiček“ (buněčné organely bohaté na lipidy). Povaha, umístění

a dynamika této fáze se u jednotlivých druhů liší. V této fázi může dojít také k dalšímu prodloužení a desaturaci acylových řetězců. Konečná čtvrtá fáze zahrnuje tvorbu intracelulárních „lipidových kapiček“ [64].



Obrázek 4: Schématické znázornění metabolických kroků zapojených do akumulace lipidů v kvasinkách. Schéma zobrazuje také spojení mezi syntézou mastných kyselin, syntézou TAG a tvorbou lipidových kapiček. Použité zkratky: ME (malic enzym, cytosolický); ME2 (malic enzym, ER membrána); ACL, ATP (citrát lyáza); ID (isocitrát dehydrogenáza); NLD (rodící se lipidové kapičky); LD (lipidové kapičky); ER (endoplazmatické reikulum; LPA (kyselina lysofosfatidová); PA (kyselina fosfatidová); FAS I (syntéza mastných kyselin I); DAG (diacyl glycerol); TAG (triacylglycerol); AMPD, AMP (deamináza) [64].

Makrořasy, jako jsou mořské řasy a fytoplankton, mají obecně nízký obsah lipidů, ale mikrořasy pěstované v přítomnosti světla a v médiu chudém na dusík akumulují lipidy bohaté na triacylglyceroly, které jsou v buňce uskladněny v tzv. „lipid bodies“. Obsah lipidů až 70 % lze dosáhnout u řas pěstovaných za speciálních podmínek, kdy jsou pro daný kmen optimalizovány různé parametry růstu, jako jsou osvětlení, teplota, složení média a různé stresové faktory.

Kvasinky se dělí na základě obsahu lipidů na kvasinky s nízkým obsahem lipidů (pod 5 % v sušině), středním (5-15 %) a vysokým obsahem (nad 15 %) lipidů. Oleogenní kvasinky byly definovány jako ty, které jsou schopny produkce více než 20 % lipidů. Jejich obsah a složení se liší mezi různými kvasinkami a členy určitého rodu, ale také se liší v rámci kmenů a závisí na podmínkách růstu. Až 65 % biomasy oleogenních kvasinek, jako např. *Candida curvata*, *Rhodotorula* nebo *Lipomyces*, mohou představovat lipidy, pokud jsou kvasinky kultivovány v podmínkách s limitací dusíkem [62].

Existuje rovněž mnoho příkladů oleogenních plísní, které jsou schopné akumulace více než 25 % lipidů. Plísně vykazují větší rozmanitost ve složení mastných kyselin v porovnání s kvasinkami, ale obecně většina druhů obsahuje kyselinu olejovou, kyselinu palmitovou a kyselinu linolovou jako majoritní kyselinu. V plísních se vyskytují vyšší podíly polynenasycených mastných kyselin než v kvasinkách a proto jsou i komerčně zajímavější pro potravinářské aplikace [62].

2.7 Metody stanovení lipidů

Běžné metody kvantifikace lipidů v oleogenních mikroorganismech zahrnují gravimetrické testy, transesterifikaci a chromatografii spojenou se spektroskopií. Gravimetrické metody pro celkovou kvantifikaci lipidů zahrnují řadu postupů, od kultivace mikrobiální biomasy, lyofilizace, narušení buněčné integrity a extrakce lipidů. U této metody je možné pouze odhadnout celkové množství lipidů, nikoli jejich složení. Proto se tradičně pro analýzu lipidů využívají chromatografické techniky, jako je plynová chromatografie (GC) ve spojení s vhodným detektorem [65].

Nejběžnější chromatografické metody pro analýzu lipidů jsou tenkovrstvá chromatografie (TLC), GC a vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC), používané samostatně nebo ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS), tandemovými kvadrupóly (MS / MS), plamenově ionizačním detektorem (FID) anebo analyzátozem doby letu (TOF) [65].

2.7.1 Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (GC – FID)

Principem metody plynové chromatografie je rovnovážná distribuce složek mezi dvě fáze, plynou (mobilní) a kapalnou nebo tuhoun (stacionární). K separaci složek dochází vždy v plyné fázi, k tomu je zapotřebí, aby všechny složky mohly být vypařeny definovaným způsobem. Z tohoto důvodu je GC vhodnou technikou pro analýzu organických látek, které mají teplotu varu do 400 °C [66].

GC se skládá z nosného plynu, čistícího a regulačního zařízení, dávkovacího zařízení (injektoru) a kolony, termostatu, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Kolona patří k nejdůležitější části přístroje. Složky stanovovaného vzorku jsou transportovány nosným plynem a separovány na koloně na základě rozdílných interakcí stanovované látky ke stacionární fázi ukotvené na koloně. Dochází k eluci vzorku, která je poté detekována. Nejčastěji používané nosné plyny jsou vodík, dusík, hélium a argon, které se uchovávají v tlakových lahvích [66].

Plamenově ionizační detektor se řadí mezi jeden z nejrozšířenějších detektorů. Principem FID je ionizace molekul plynu v kyslík-vodíkovém plameni hořícím mezi dvěma elektrodami. Je-li přítomný vzorek, dojde ke zvýšení ionizace a detektorem bude probíhat proud úměrný koncentraci sloučeniny v nosném plynu. Detekční limity FID se pohybují v pikogramech analytu. Nejčastěji se využívá pro stanovení organických látek [66].

2.7.2 Extrakce a stanovení lipidů

Samotnému stanovení lipidů předchází transesterifikace, která převádí uvolněné mastné kyseliny na methylestery. Pokud vzorek obsahuje extracelulární tuk, například z kultivačního média, je dobré promýt suspenzi buněk ethanolem, nebo hexanem a až poté přidat transesterifikační směs. Často se využívá extrakce podle Folche, která je založená na extrakci pomocí směsi chloroformu a methanolu, následována homogenizací za studena. Transesterifikačním činidlem bývá směs silné kyseliny a methanolu. Vzorek je v této směsi ponechán vždy za zvýšené teploty. Po transesterifikaci je přidáván vodný roztok NaCl, nebo NaOH, čímž dochází k oddělení vodné a lipidové fáze (to může být urychlenou centrifugací směsí). Lipidová frakce je odebrána

a následně rozpuštěna v chloroformu určeného pro chromatografii. Pomocí GC jsou poté analyzovány estery mastných kyselin při daném teplotním gradientu [18].

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je stanovení glukanů u vybraných kvasinek, řas a materiálu rostlinného původu. V průběhu práce byly řešeny následující dílčí úkoly:

- Literární rešerše
- Optimalizace metod pro stanovení glukanů a jejich složek
- Analýza glukanů v kvasinkách kultivovaných za různých podmínek
- Analýza glukanů u řas a rostlin
- Vyhodnocení a diskuse výsledků

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 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)
Síran amonný p.a.,
Močovina p.a.,

4.1.2 Stanovení mastných kyselin

Heptadekanová kyselina, Sigma-Aldrich (DE)

4.2 Přístroje a pomůcky

4.2.1 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)
Spektrofotometr UV-VIS S-220, Boeco (DE)
Termoblok SBH2000, Stuart (GB)

4.2.2 Kultivace mikroorganismů

Třepačka Yellow line RS10, (DE)
Analytické váhy Boeco (DE)
Sterilační LIFE BOX, Esco Technologies, Inc. (US)
Lyofilizátor, Labconco (US)

4.2.3 Stanovení mastných kyselin

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

4.3 Použité kmeny mikroorganismů

4.3.1 Kvasinky

Saccharomyces cerevisiae CCY 6646
Cystofilobasidium infirmominatum CCY 17-18-4
Sporidiobolus pararoseus CCY 19-9-6
Phaffia rhodozyma CCY 77-1

Rhodotorula glutinis CCY 20-7-26

Uvedené kmeny byly získány ve Sbirce kultur kvasinek (Culture Collection of Yeasts, CCY) při Chemickém ústavu SAV v Bratislavě, Slovensko.

4.3.2 Řasy

Euglena gracilis CCALA 349

4.4 Další vzorky

4.4.1 Vyšší houby

Shiitake – houževnatec jedlý, sušený, původ Vietnam, dovozce Non Lá

Ucho Jidášovo – boltcovitka bezová, sušená, původ ČR

Žampion zahradní – čerstvý, původ ČR, dodavatel České houby

Hlíva ústříčná – čerstvá, původ ČR, dodavatel České houby

4.4.2 Obiloviny

Ječmen

Mladý ječmen

Oves

Žito

Pšenice

Rýže

Uvedené obiloviny byly nakoupeny ve formě mouk.

4.5 Kultivace mikroorganismů

Všechny použité druhy kvasinek byly očkované z kryozkumavek, které byly uchovány v glycerolu při teplotě -80 °C. Následně byly kultivovány ve stresových podmínkách při různých teplotách kultivace a složení médií. Nejprve byly kvasinky kultivovány na agarových plotnách (složení viz. Tabulka 1), následně byly zaočkovány do inokula (Tabulka 2) a následně přímo do produkčních médií (Tabulka 3). Každé médium bylo před zaočkováním sterilizováno po dobu 45 minut při 120 °C a následně ochlazeno na laboratorní teplotu. Každé médium bylo následně ještě vystaveno UV záření po dobu 20 minut.

4.5.1 YPD agar

Před zahájením kultivace v produkčním médiu rostly kvasinky nejprve na YPD agaru po dobu 3 dnů. Agarové plotny byly zaočkovány kulturou z kryozkumavek a byly následně kultivovány za laboratorní teploty. Po 3 dnech růstu byly kvasinky zaočkovány do tekutého YPD inokula. Složená YPD agaru je uvedeno v Tabulka 1.

Tabulka 1: Složení YPD agaru

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

4.5.2 YPD inokulum

V YPD inokulu byly kvasinky kultivovány 24 hodin. Kultivace v inokulu probíhala na temperované třepačce (8, 15, 22 a 30 °C, v závislosti na teplotě kultivace v produkčním médiu) za intenzivního míchání (125 rpm). Z inokula byly kvasinky přímo očkovány do produkčního média v poměru 1:5. Složení YPD inokula je uvedeno v Tabulka 2.

Tabulka 2: Složení YPD inokula

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

4.5.3 Produkční média s různými zdroji dusíku

V produkčním médiu byly kvasinky kultivovány po dobu 7 dní za intenzivního míchání. Jednotlivá produkční média se lišila složením, zejména zdrojem dusíku (síran amonný a močovina a v kombinaci s kvasničným extraktem). C/N poměr v médiích byl vždy C/N = 70. Složení jednotlivých medií je uvedeno v Tabulka 3.

Tabulka 3: Složení produkčních medií

Médium 1		Médium 2		Médium 3		Médium 4	
Složka	c [g/l]	Složka	c [g/l]	Složka	c [g/l]	Složka	c [g/l]
Glukóza	40,4	Glukóza	40,4	Glukóza	40,4	Glukóza	40,4
Kvasničný extrakt	0,5	Kvasničný extrakt	-	Kvasničný extrakt	-	Kvasničný extrakt	0,5
KH ₂ PO ₄	4,0	KH ₂ PO ₄	4,0	KH ₂ PO ₄	4,0	KH ₂ PO ₄	4,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,7	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,7	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,7	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,7
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,7	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0	Močovina	0,5	Močovina	0,4

4.6 Kultivace řasy *Euglena gracilis*

Zásobní kultura eugleny byla přeočkována každých 20 dní do nového média (složení – Tabulka 4). Pro zaočkování jednotlivých Erlenmeyerových baněk byly použity 6-denní kultury, které byly

naředěny na OD 0,1 (680 nm) čerstvým médiem. *Euglena gracilis* byla kultivována mixotrofně a heterotrofně (octan nahrazen glukózou – 10 a 20 g/l) za stálého osvětlení a teplotě 25 °C.

Tabulka 4: Složení produkčních médií

Euglena médium	g/l
Kvasničný extrakt	2
Trypton	2
Beef extrakt	1
Octan sodný	1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,01
Heterotrofní kultivace	
Glukóza	10
Glukóza	20

4.7 Izolace a analýza β-D-glukanů z kvasinek a hub

Před samotným stanovením β-D-glukanů byly připraveny pomocné roztoky, které nejsou součástí kitu K-YBGL Megazyme. Následně byly rozředěny jednotlivé části kitu podle výrobcem přiloženého návodu. Takto připravené roztoky byly využity pro stanovení β-D-glukanů v biomase kvasinek a řas. Lyofilizovaná biomasa byla navažována ve formě jemného prášku. Navážka byla přibližně 25 mg, avšak ne u všech vzorků, a to hlavně z důvodu nedostatečného nárůstu biomasy. Pro vzorky obsahující méně než 15 mg biomasy byl postup měření upraven. Pro ověření správnosti měření byl použit přiložený kontrolní vzorek β-glukanu, jenž má deklarovaný obsah β-glukanů.

4.7.1 Obsah balení kitu pro stanovení β-glukanů

- Láhev 1 - 2 ml suspenze síranu amonného (NH₄)₂SO₄ obsahující exo-1,3-β-glukanázu (100U/ml) a β-glukosidázu (20U/ml). Láhev je třeba uchovávat při 4 °C.
- Láhev 2 - 20 ml roztoku 50 % glycerolu obsahující amyloglukosidázu (1,63U/ml) a invertázu (500U/ml). Láhev je třeba uchovávat při 4 °C (popř. – 20 °C).
- Láhev 3 - 50 ml reakčního pufru GOPOD o pH = 7,4 obsahující p-hydroxybenzoovou kyselinu a azid sodný. Láhev je třeba uchovávat při 4 °C.
- Láhev 4 - Reakční směs GOPOD obsahující glukóza-oxidázu (GOD), peroxidázu (POD) a 4-aminoantipyrin. Láhev je třeba uchovávat při -20 °C.
- Láhev 5 - 5 ml standardního roztoku glukózy v 0,2 % kyselině benzoové obsahující D-glukózu (1,00g/ml). Láhev je třeba uchovávat při pokojové teplotě.
- Láhev 6 - Kontrolní vzorek β-glukanu (cca. 2 g). Láhev je třeba uchovávat při pokojové teplotě.

4.7.2 Příprava reakčních roztoků z jednotlivých částí kitu

K obsahu láhve 1 bylo přidáno 9 ml pomocného roztoku č. 1 a roztok byl poté rozdělen na vhodné alikvoty a uchováván v plastových zkumavkách při teplotě -20 °C. Obsah láhve 2 nebylo třeba

dále upravovat. Obsah láhve 3 byl rozpuštěn a doplněn na objem 1 litr pomocí destilované vody. Je třeba dbát na to, aby se nevytvořily krystalky pufru, pokud se vytvoří, je třeba je rozpustit. Obsah láhve 4 byl rozpuštěn v cca 20 ml pomocného roztoku č. 1 a poté byl kvantitativně převeden do zbývajících množství pomocného roztoku č. 1, získáme tak GOPOD reagent, který je potřeba chránit proti světlu (alobalem). Takto připravený roztok je třeba uchovávat při 2-5 °C, po dobu maximálně 3 měsíců, nebo při -20 °C po dobu 12 měsíců. Obsah láhve 5 a 6 nebylo třeba upravovat.

4.7.3 Pomocné roztoky

Pro přípravu acetátového pufru (200 mM, pH 5) bylo odměřeno 11,6 ml ledové kyseliny sírové a 900 ml destilované vody. Pomocí 4 M roztoku hydroxidu sodného bylo upraveno pH na 5,0. Roztok byl následně doplněn na objem 1 litr. Uchováván byl při 4 °C.

Pro přípravu acetátového pufru (1,2 M, pH 3,8) bylo odměřeno 69,6 ml ledové kyseliny a 800 ml destilované vody. Pomocí 4 M roztoku hydroxidu sodného bylo upraveno pH na 3,8. Roztok byl následně doplněn na objem 1 litr. Uchováván byl při pokojové teplotě.

Hydroxid draselný (10 M) byl připraven navážením 561 g hydroxidu draselného a odměřením 700 ml destilované vody (prováděno v digestoři, potřeba míchat). Po zchladnutí na pokojovou teplotu byl roztok doplněn na objem 1 litr. Uchováván byl při pokojové teplotě.

Pro přípravu hydroxidu draselného (2 M) bylo naváženo 112 g hydroxidu draselného a odměřeno 800 ml destilované vody (prováděno v digestoři, potřeba míchat). Po zchladnutí na pokojovou teplotu byl roztok doplněn na objem 1 litr. Uchováván byl při pokojové teplotě.

Kyselina sírová (12 M) byla připravena odměřením 640 ml 98 % kyseliny sírové a 300 ml destilované vody (prováděno v digestoři, potřeba míchat). Po zchladnutí na pokojovou teplotu byl roztok doplněn na objem 1 litr. Uchováván byl při pokojové teplotě.

Hydroxid sodný (4 M), pro úpravu pH byl připraven navážením 16 g hydroxidu sodného a odměřením 70 ml destilované vody. Po rozpuštění veškerého NaOH a zchladnutí na pokojovou teplotu byl roztok doplněn na objem 100 ml. Uchováván byl při pokojové teplotě.

4.7.4 Stanovení celkových glukánů

Bylo naváženo přibližně 25 mg vzorku do reakčních zkumavek s uzávěrem a poté byl přidán 1 ml 12 M H₂SO₄. Vzorek byl promíchán a uložen do ledové lázně po dobu 2 hodin, zkumavky byly uzavřeny uzávěrem. Během lázně byly zkumavky několikrát vortexovány. Po 2 hodinách bylo přidáno 5 ml destilované vody, obsah byl následně vortexován po dobu 10 s. Zkumavky byly dále umístěny na 2 hodiny do termobloku (100 °C). Po 5 minutách v termobloku byly zkumavky zazátkovány. Po ochlazení vzorku na laboratorní teplotu a uvolnění uzávěrů, byl hydrolyzát kvantitativně přelit do 50 ml centrifugačních zkumavek, které obsahovaly 17,5 ml 200 mM acetátového pufru (pH 5), a doplněn 1,5 ml 10 M KOH. Následně byly zkumavky centrifugovány 10 minut při 1 500 g. Hydrolyzáty byly připraveny k okamžitému měření.

Bylo napipetováno 50 µl hydrolyzátu a 50 µl části 1. Roztok byl promíchán na vortexu a následně inkubován po dobu 1 hodiny ve vodní lázni při teplotě 40 °C. Poté bylo napipetováno 1,5 ml roztoku GOPOD (část 4) a vzorek byl opět ponechán ve vodní lázni, 40 °C, po dobu 20 minut. Absorbance byla měřena při 510 nm. Měření se provádělo ve dvou stanoveních proti slepému vzorku. Slepý vzorek (blank) byl připraven 0,1 ml acetátového pufru pH 5 a 1,5 ml roztoku část 4. Jako standart sloužil roztok D-glukózy, který byl připraven napipetováním 0,1 ml složky 5 a 0,1 ml acetátového pufru (pH 5).

4.7.5 Stanovení α -glukanů

Bylo naváženo 25 mg vzorku do kultivačních zkumavek s uzávěrem a poté byl přidán 1 ml 2 M KOH. Obsah zkumavky byl promíchán a ponechán po dobu 20 minut v ledové lázni. Následně byly přidány 4 ml acetátového pufru o pH 3,8 a ihned 0,1 ml části 2. Vzorek byl promíchán na vortexu a ponechán 30 minut ve vodní lázni nastavené na teplotu 40 °C, vzorek byl několikrát promíchán. Po 30 minutách byl vzorek kvantitativně převeden do centrifugačních zkumavek a vzorky byly centrifugovány při 1 500 g po dobu 10 minut.

Bylo pipetováno 50 μ l hydrolyzátu a 50 μ l části 1. Následně bylo přidáno 1,5 ml roztoku GOPOD (část 4) a vzorek byl ponechán ve vodní lázni po dobu 20 minut při teplotě 40 °C. Absorbance byla měřena při 510 nm proti slepému vzorku. Slepý vzorek a standart byly totožné jako v předešlé části.

4.8 Izolace a analýza β -D-glukanů z obilovin

Před samotným stanovením β -D-glukanů byly připraveny pomocné roztoky (uvedené v kapitole 4.8.3), které nejsou součástí kitu K-BGLU Megazyme. Následně byly rozředěny jednotlivé části kitu podle výrobcem přiloženého návodu. Takto připravené roztoky byly využity pro stanovení β -D-glukanů v obilovinách. Rozemleté obiloviny byly navažovány ve formě jemného prášku. Navážka byla přibližně 100 mg. Pro ověření správnosti měření byl použit přiložený kontrolní vzorek β -glukanu, jenž má deklarovaný obsah β -glukanů.

4.8.1 Obsah balení kitu pro stanovení β -glukanů

- Láhev 1 - 1 ml suspenze lichenázy (obsahující endo-(1,3) (1,4) - β -D-glukan-4-glukanohydrolázy). Láhev je třeba uchovávat při 4 °C.
- Láhev 2 - 1 ml suspenze β -Glukosidázy. Láhev je třeba uchovávat při 4 °C.
- Láhev 3 - 50 ml reakčního pufru GOPOD o pH = 7,4 obsahující p-hydroxybenzoovou kyselinu a azid sodný (0,095% w/v). Láhev je třeba uchovávat při 4 °C.
- Láhev 4 - Reakční směs GOPOD obsahující glukóza-oxidázu (GOD), peroxidázu (POD) a 4-aminoantipyrin. Láhev je třeba uchovávat při -10 °C.
- Láhev 5 - 5 ml standardního roztoku glukózy v 0,2 % kyselině benzoové obsahující D-glukózu (1,00g/ml). Láhev je třeba uchovávat při pokojové teplotě.
- Láhev 6 - Kontrolní vzorek β -glukanu z ječmene. Láhev je třeba uchovávat při pokojové teplotě.
- Láhev 7 - Kontrolní vzorek β -glukanu z ovsa. Láhev je třeba uchovávat při pokojové teplotě.

4.8.2 Příprava reakčních roztoků z jednotlivých částí kitu

Obsah láhve 1 byl rozředěn 20 ml 20 mM roztoku sodno – acetátového pufru (pH 6,5). Následně byl roztok rozdělen na vhodné alikvoty do polypropylenových zkumavek. Takto připravená část 1 byla uchována při teplotě -10 °C.

Celý obsah láhve 2 byl rozředěn 20 ml 50 mM roztoku sodno – acetátového pufru (pH 4,0). Následně byl roztok rozdělen na vhodné alikvoty do polypropylenových zkumavek. Takto připravená část 1 byla uchována při teplotě -10 °C.

Obsah láhve 3 byl rozpuštěn a doplněn na objem 1 litr pomocí destilované vody (Je třeba dbát na to, aby se nevytvořily krystalky pufru, pokud se vytvoří, je třeba je rozpustit).

Obsah láhve 4 byl rozpuštěn v cca 20 ml části 3 a poté byl kvantitativně převeden do zbývajících množství části 3, získáme tak GOPOD reagent, který je potřeba chránit proti světlu (alobalem). Takto připravený roztok je třeba uchovávat při 2-5 °C, po dobu maximálně 3 měsíců, nebo při -10 °C po dobu 12 měsíců.

4.8.3 Pomocné roztoky

Sodno-fosfátový pufr (20 mM, pH 6,5) byl připraven rozpuštěním 3,12 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ v 900 ml destilované vody. Pomocí 100 mM roztoku hydroxidu sodného (4 g/l) bylo upraveno pH na 6,5. Roztok byl následně doplněn na objem 1 litr. Nakonec bylo přidáno 0,2 g azidu sodného. Uchováván byl při 4 °C.

Sodno-acetátový pufr (50 mM, pH 4,0) byl připraven odměřením 2,9 ml ledové kyseliny do 900 ml destilované vody. Pomocí 1 M roztoku hydroxidu sodného bylo upraveno pH na 4,0. Roztok byl následně doplněn na objem 1 litr. Nakonec bylo přidáno 0,2 g azidu sodného. Uchováván byl při 4 °C.

Sodno-acetátový pufr (200 mM, pH 4,0) byl připraven odměřením 11,6 ml ledové kyseliny do 900 ml destilované vody. Pomocí 1 M roztoku hydroxidu sodného bylo upraveno pH na 4,0. Roztok byl následně doplněn na objem 1 litr. Nakonec bylo přidáno 0,2 g azidu sodného. Uchováván byl při 4 °C.

4.8.4 Kontrola a doporučení

- Slepý vzorek se skládá z 0,1 ml destilované vody, 0,1 ml sodno – acetátového pufru a 3 ml GOPOD reagentu.
- Vzorek glukózového standardu se skládá z 0,1 ml sodno – acetátového pufru, 0,1 ml D-glukózového standardu a 3,0 ml GOPOD reagentu.
- S každým nově připraveným GOPOD reagentem je třeba počítat s různou dobou maximálního zbarvení se 100 μg D-glukózového standardu. Tato doba bývá obvykle kolem 15 minut.
- Je nezbytné, aby při přípravě enzymu lichenázy nedošlo ke kontaminaci s β -glukosidázou.

4.8.5 Stanovení β glukanu

Bylo naváženo přibližně 100 mg rozemletého vzorku do reakčních zkumavek s uzávěrem, dbáme na to, aby všechny částice vzorku byly na dně zkumavky. Bylo přidáno 0,2 ml vodného roztoku ethanolu (50 % v/v) pro usnadnění rozpuštění. Dále byly přidány 4 ml sodno – fosfátového pufru (20 mM, pH 6,5) a vše bylo promícháno na vortexu. Poté byly zkumavky umístěny do termobloku (100 °C) na 60 s. Směs byla důkladně rozmíchána na vortexu a opět inkubována další 2 minuty, následně opět vortexována. Takto připravené vzorky byly inkubovány při 50 °C po dobu 5 minut. Bylo přidáno 0,2 ml lichenázy, promícháno, uzavřeny zkumavky a inkubováno 1 hodinu v 50 °C s pravidelným mícháním. Po 1 hodině přidáme 5 ml sodno – acetátového pufru (200 mM, pH 4) a promícháme na vortexu. Zkumavky necháme vychladnout na pokojovou teplotu a centrifugujeme (10 min, 1000 g). Opatrně a přesně napipetujeme 0,1 ml roztoku vzorku na dno tří čistých zkumavek. Přidáme 0,1 ml β -glukosidázy (v 50 mM sod. – ac. Pufru, pH 4) do dvou nových zkumavek („the reaction“), obsahujících vzorek, do třetí zkumavky přidáme 0,1 ml

sodno – acetátového pufru (50 mM, pH 4,0) („reagent blank“). Všechny zkumavky inkubujeme 10 min v 50 °C. Následně přidáme 3 ml GOPOD reagentu a opět inkubujeme v 50 °C, 20 minut. Po vyjmutí z vodní lázně měříme absorbanci při 510 nm proti „reagent blank“.

4.9 Stanovení paramylonu

15±3 mg zmražené a vysušené biomasy bylo naváženo do skleněných zkumavek s uzávěrem, do kterých byl přidán roztok složený z 1% SDS a 5% Na₂EDTA. Suspenze byla vortexována a poté inkubována 30 minut při 37 °C, následně centrifugována 10 minut při 1 000 g. Pročištění s SDS-Na₂EDTA bylo opakováno. Poté byly pelety pročištěny dvakrát za použití horké destilované vody (70 °C). Po druhém promytí byla suspenze centrifugována a vzniklé granule byly přes noc vysušeny při 90 °C pro stanovení hmotnosti. Množství paramylonu bylo vyjádřeno jako poměr hmotnosti na množství biomasy.

4.10 Transesterifikace a stanovení lipidů

Na analytických vahách bylo do skleněných vialek naváženo přibližně 10 mg vzorku. Poté bylo do vialek přidáno 1,8 ml transesterifikační směsi (15 % H₂SO₄ v MeOH (p.a.), 0,5 mg/ml standartu (C17 kyselina heptadekanová)). Vialky byly zazátkovány víčkem a poté ponechány v termobloku při 85 °C po dobu 2 hodin. Po 2 hodinách byly vialky z termobloku vyjmuty a ponechány stát, aby vychladly na laboratorní teplotu. Poté se obsah vialek kvantitativně převedl do větších vialek (4 ml) a bylo přidáno 0,5 ml 0,05M NaOH a 1 ml hexanu. Vialky byly následně znovu uzavřeny. Po oddělení fází bylo do nových vialek odpipetováno 0,1 ml horní hexanové fáze a doplněny 0,9 ml hexanu pro GC. Vialky byly před měřením uschovány v mrazáku (-80 °C). Připravené vzorky byly analyzovány na plynovém chromatografu TRACE FC (ThermoQuest S.p.A., Itálie).

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

U vybraných pěti druhů kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae* CCY 6646, *Cystofilobasidium infirmominium* CCY 17-18-4, *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6, *Phaffia rhodozyma* CCY 77-1 a *Rhodotorula glutinis* CCY 20-7-26) byla stanovena růstová křivka pro kultivace za různých teplotních podmínek. *S. cerevisiae* byla použita jako kontrolní kmen z důvodu jejího komerčního využívání, jako jediného zástupce kvasinek, pro produkci β-glukanů. Růstové křivky byly stanoveny pro kultivace, které probíhaly na čtyřech různých médiích (složené jednotlivých médií viz. Tabulka 3). Odběry biomasy probíhaly v časech 48, 72, 96, 144 a 168 hodin (u kultivace při 30 °C byly časy odběru pozmeněny na 48, 96, 144 a 192 z důvodu epidemiologické situace). Biomasa byla po odběru lyofilizována a následně analyzována na obsah β-glukanů a mastných kyselin.

Pro porovnání produkce β-glukanů byl vybrán také zástupce mikrořas, *Euglena gracilis* CCALA 349, u kterého byl stanovován obsah paramylonu, který je složen právě z β-glukanů.

Dále byli vybráni 4 zástupci vyšších hub (shiitake, ucho Jidášovo, hlíva ústříčná a žampion zahradní). U těchto hub byl stanoven obsah glukanů pro porovnání produkce β-glukanů u kvasinek a vyšších hub. Závěr práce byl zaměřen na obiloviny, kdy byl stanovován obsah β-glukanů v komerčně dostupných preparátech (zelený ječmen, ječná mouka, pšeničná mouka, žitná mouka, ovesná mouka a rýžová mouka). U vyšších hub a obilovin byl stanovován pouze obsah β-glukanů.

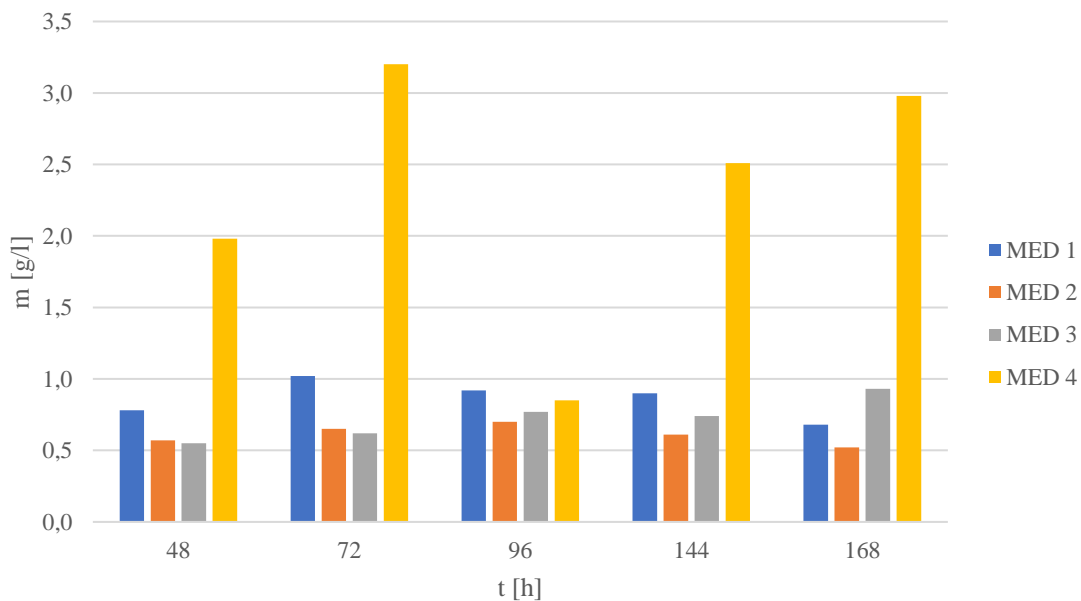
5.1 Vliv složení médií a teploty kultivace na produkci biomasy a obsah β -glukanů

Každý z vybraných druhů kvasinek byl kultivován ve čtyřech médiích, lišících se složením, resp. zdrojem dusíku (viz. Tabulka 3: Složení produkčních médií. C/N poměr byl vždy shodný, CN 70. Kultivace probíhala na uzavřené, temperované třepačce, čímž byla zajištěna konstantní teplota (8, 15, 22 a 30 °C) po celou dobu kultivace. Teploty byly voleny tak, aby došlo k dostatečnému pokrytí teplotního rozsahu a mohlo dojít k porovnání produkci biomasy a β -glukanů v závislosti na změně teploty. Časy odběrů byly stanoveny tak, aby došlo k dostatečnému nárůstu biomasy. Kultivace byly zahájeny zaočkováním na agarových plotnách, následující den byly převedeny do tekutého inokula a následně do jednotlivých produkčních médií. Poté následoval první odběr po 48 hodinách kultivace. Sledován byl vliv teploty a složení média na obsah glukanů v jednotlivých kmenech.

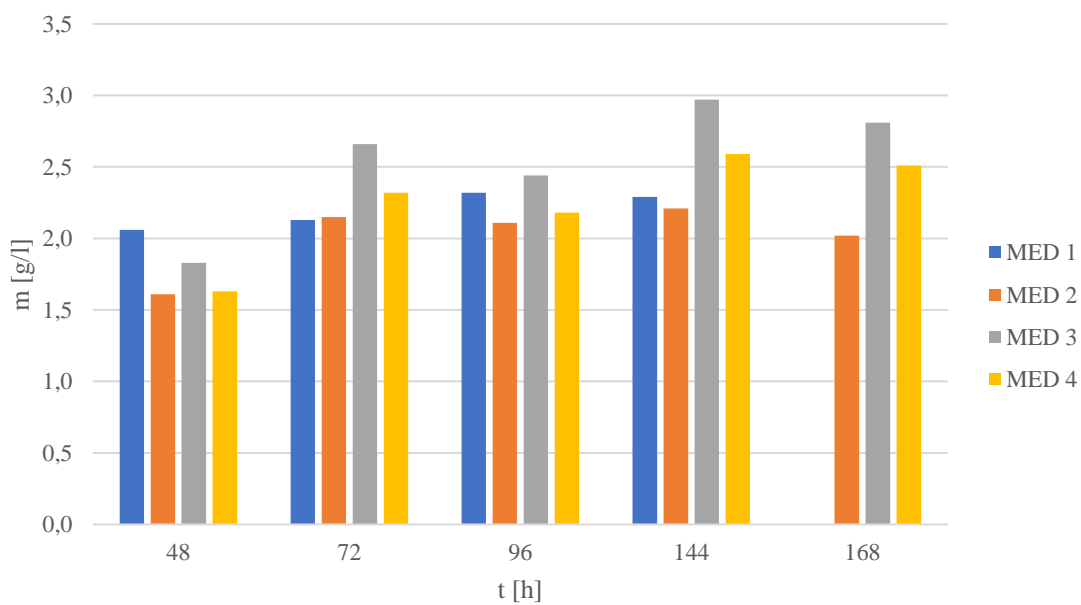
5.1.1 Produkce β -glukanů u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae je již hojně využívána pro produkci β -glukanů v komerčním prostředí. Obsah glukanů v buněčné stěně této kvasinky byl prokázán již v několika studiích [67], [68], avšak z důvodu nedostatečných literárních zdrojů pro produkci β -glukanů ze *S. cerevisiae* a patentové ochrany pro jeho izolaci nelze dohledat ideální nastavení podmínek pro kultivaci a růst této kvasinky.

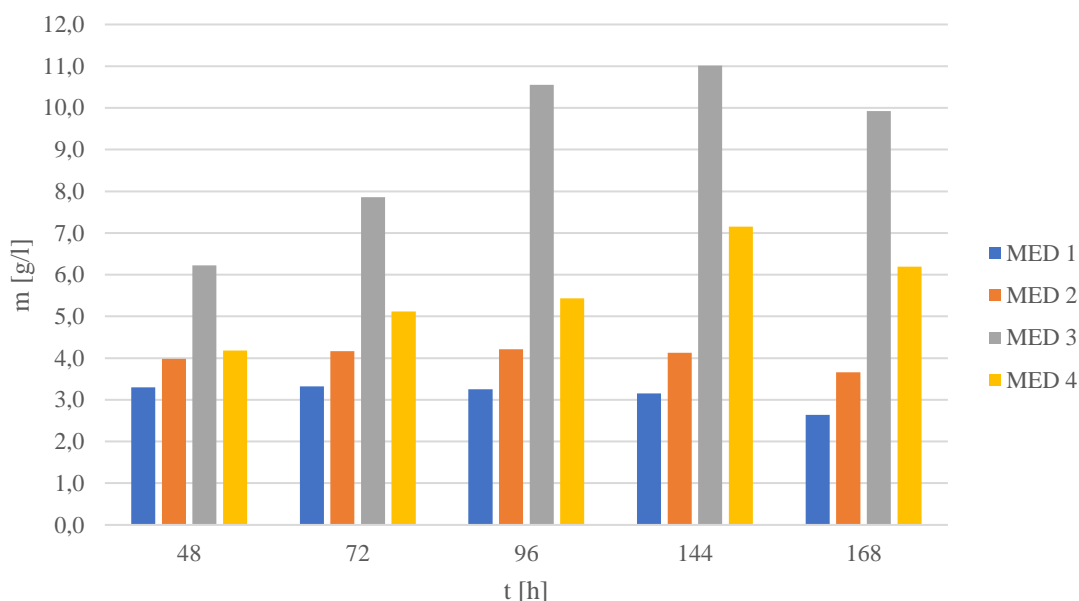
Z grafů, které jsou uvedeny níže, bylo pozorováno, že při nízkých teplotách došlo k inhibici růstu (Obrázek 5-8). U kultivace při 8 °C byla nejlepším zdrojem dusíku močovina s přidavkem kvasničného extraktu, kdy růst byl třikrát vyšší v porovnání s ostatními médii. Naopak při kultivacích za vyšších teplot (22 °C a 30 °C) došlo k výraznému nárůstu biomasy oproti chladnějším kultivacím. Největší množství biomasy bylo získáno u kultivace v médiu 3, při teplotě 22 °C (odběr ve 144 hodině) a i v průběhu času kultivace byly výtěžky oproti zbývajícím odběrům nadprůměrné. Při teplotách 8 a 30 °C byly nárůsty biomasy nejvyšší v médiu 4, zde došlo nejspíše k pozitivnímu vlivu složení média, kdy růstu biomasy prospěla přítomnost minerálů, vitamínů a živin z kombinace kvasničného extraktu a močoviny. U zbývajících teplot, 15 a 22 °C, pozorujeme nejvyšší růst v médiu 3 (médiu obsahující jako zdroj dusíku pouze močovinu). Jako nejideálnější kombinace podmínek pro kultivace *S. cerevisiae*, z hlediska nárůstu biomasy, byla vyhodnocena kultivace při 22 °C v médiu 3 (obsahující jako zdroj dusíku močovinu).



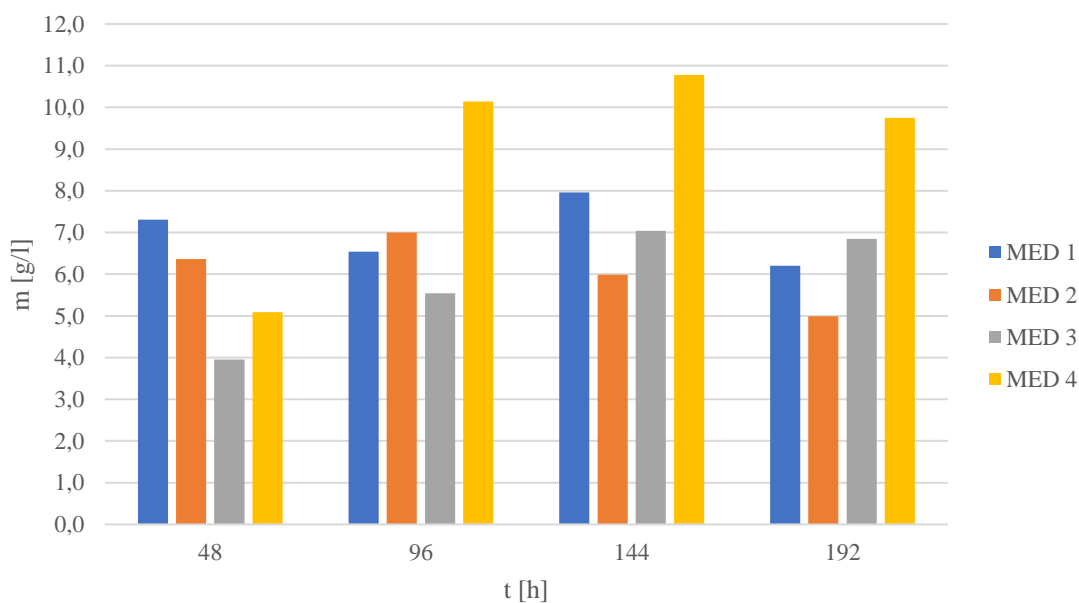
Obrázek 5: Produkce biomasy při kultivaci *S. cerevisiae* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 8 °C



Obrázek 6: Produkce biomasy při kultivaci *S. cerevisiae* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 15 °C



Obrázek 7: Produkce biomasy při kultivaci *S. cerevisiae* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 22 °C

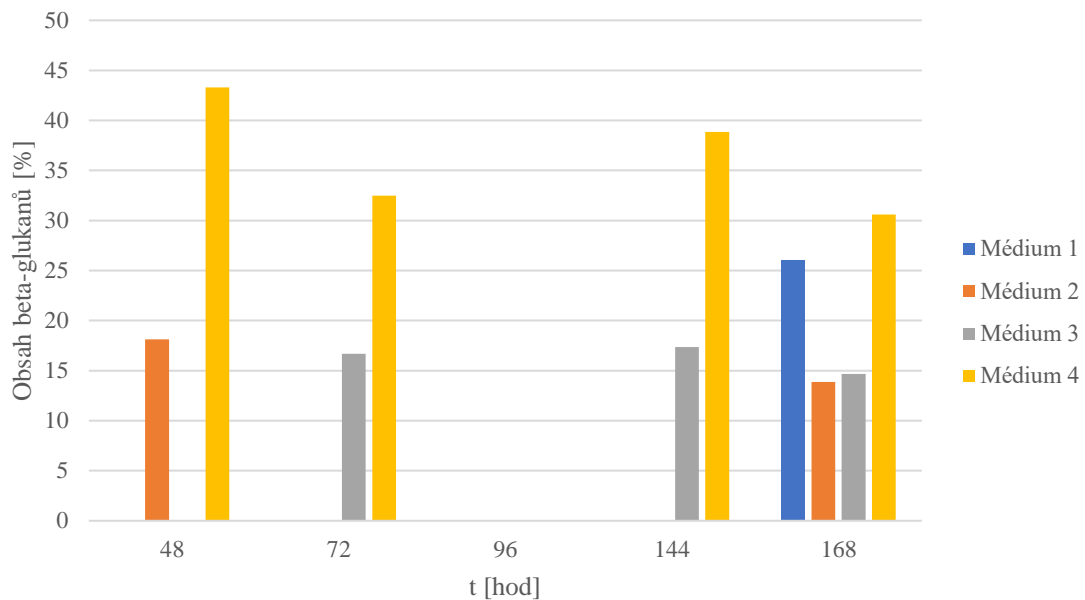


Obrázek 8: Produkce biomasy při kultivaci *S. cerevisiae* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 30 °C

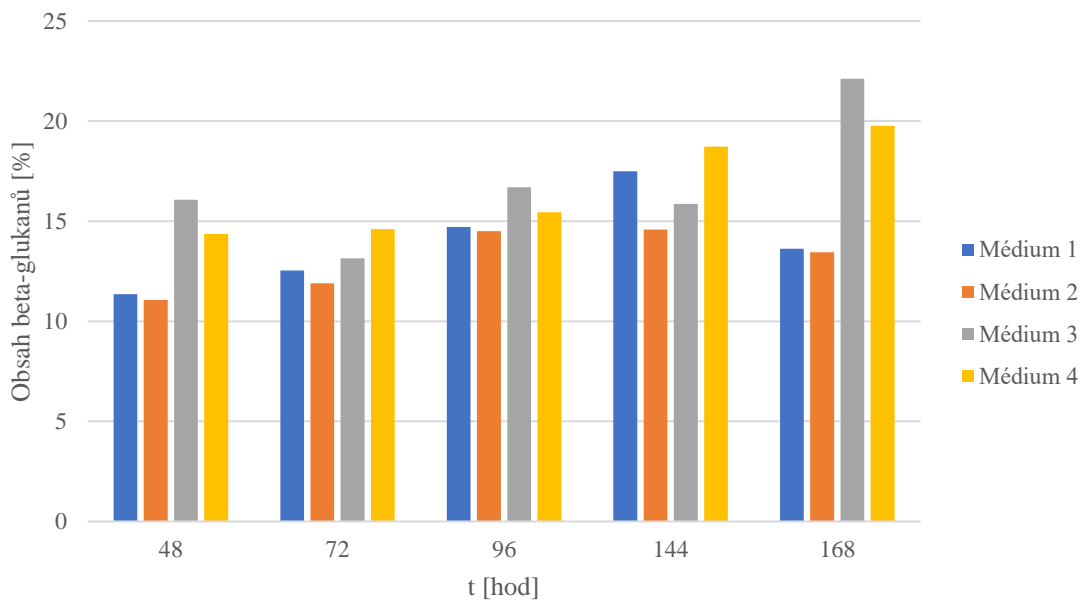
Pomineme-li obsah β -glukanů u kultivace při 8 °C (došlo k příliš nízkému nárůstu, a tudíž nebyly naměřeny glukany), vidíme z níže uvedených grafů, že nejvyšší koncentraci nalezneme u kultivace při 22 °C v médiu 4 (čas odběru 168 hodin). Vyšší hodnoty byly naměřeny také při 15 °C, kde vidíme, že vliv média byl, krom odběru v čase 168 hodin, minimální. Vliv média byl pozorován při 30 °C, kdy média 1 a 2 vykazují vyšší produkci β -glukanů.

Při porovnání výsledků množství biomasy a produkce glukanů, u teploty kultivace 15 °C, bylo pozorováno, že obsah glukanů přibližně odpovídá množství produkované biomasy. Teploty 15 °C a 22 °C vychází jako vhodné pro kultivace, za účelem zisku glukanů, v médiích 3 a 4. U teploty 30 °C byl sledován propad množství glukanů u medií 3 a 4, naopak u medií 1 a 2 pozorujeme stabilní koncentraci glukanů v rozmezích 7-10 %. Lze tedy říct, že na produkci

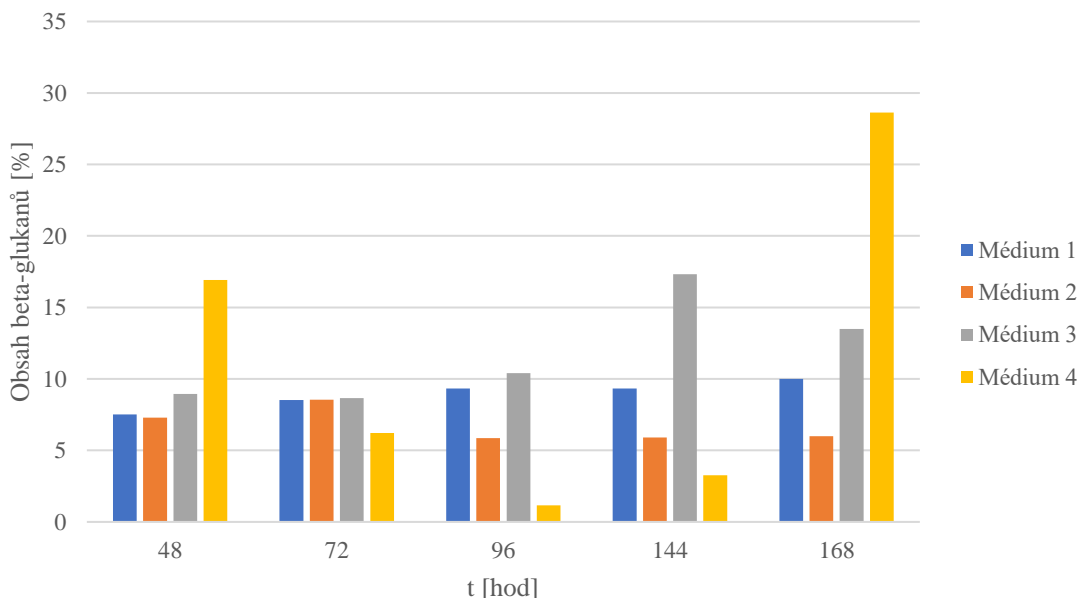
glukanů v těchto dvou médiích (1 a 2) má teplota minimální vliv, na rozdíl od médií 3 a 4, kde s rostoucí teplotou klesal obsah glukanů. Jako nejideálnější podmínky kultivace, za účelem vysokého zisku biomasy a následně i glukanů, z experimentu vychází složení média 3 při teplotě 15 °C. Při této kultivaci bylo dosaženo nejvyššího nárůstu biomasy a obsah glukanů se pohyboval v rozmezí od 15 do 22 %.



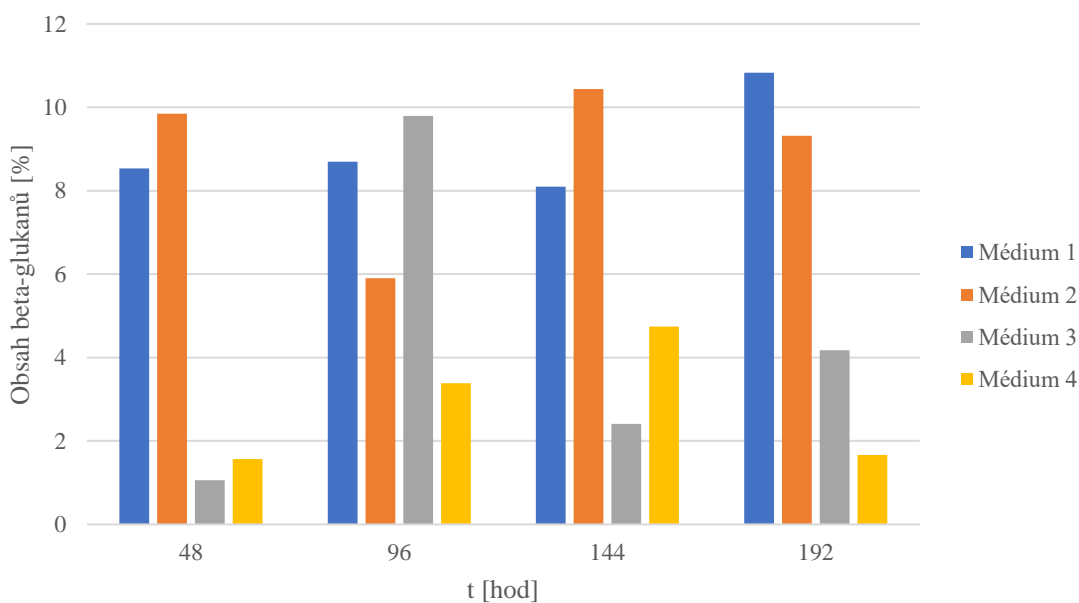
Obrázek 9: Produkce β glukanů při kultivaci *S. cerevisiae*, teplota kultivace 8 °C



Obrázek 10: Produkce β glukanů při kultivaci *S. cerevisiae*, teplota kultivace 15 °C



Obrázek 11: Produkce β glukanů při kultivaci *S. cerevisiae*, teplota kultivace 22 °C



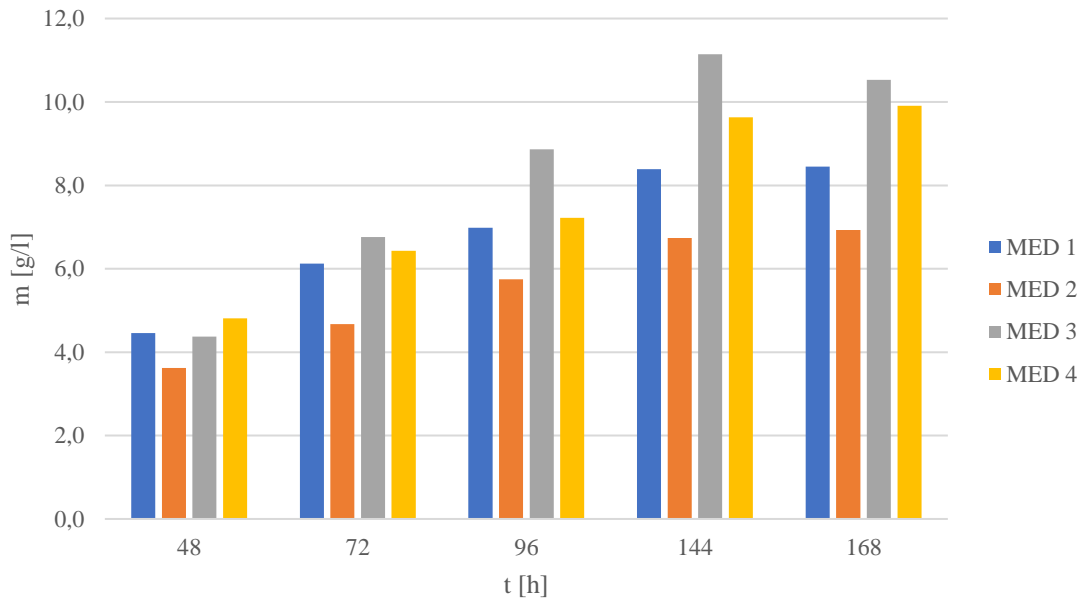
Obrázek 12: Produkce β glukanů při kultivaci *S. cerevisiae*, teplota kultivace 30 °C

5.1.2 Produkce β -glukanů u kvasinky *Cystofilobasidium infirmominatum*

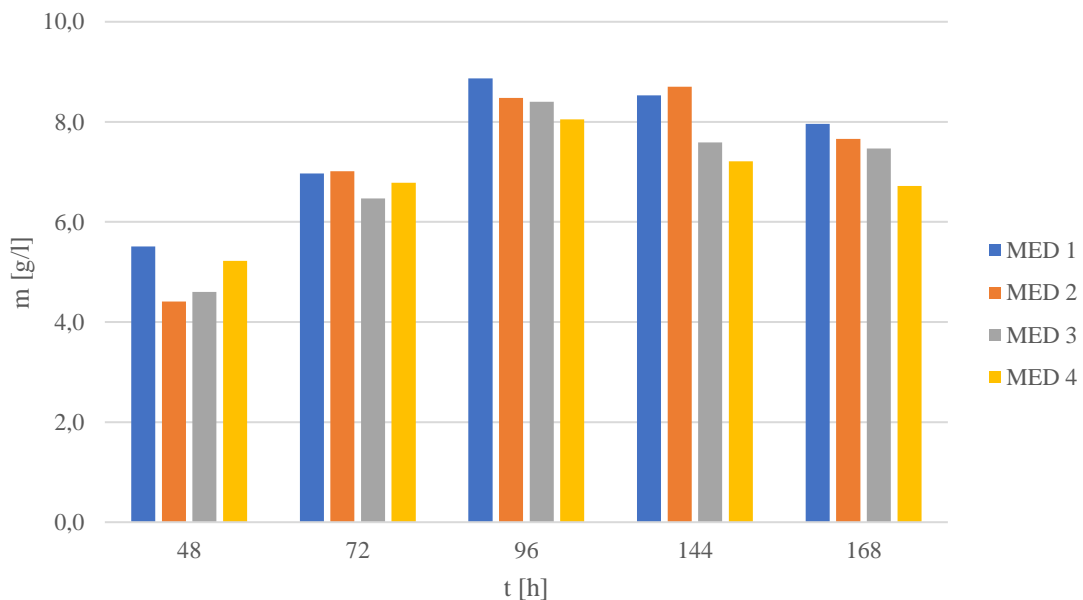
U kvasinky *C. infirmominatum*, podobně jako u *S. cerevisiae*, byla prokázána produkce β -glukanů. Jelikož jde o kvasinku běžně se vyskytující v chladnějších oblastech, tak zde byl pozorován dostatečný nárůst biomasy i při nižších teplotách [19].

Z níže přiložených grafů (Obrázek 13-16) bylo pozorováno, že růsty biomasy se příliš nelišily vlivem teploty ani složením média. Jediným výraznějším rozdílem byl čas dosažení stacionární fáze, kde vidíme, že u většiny stanovovaných vzorků došlo k dosažení stacionární fáze v rozmezí

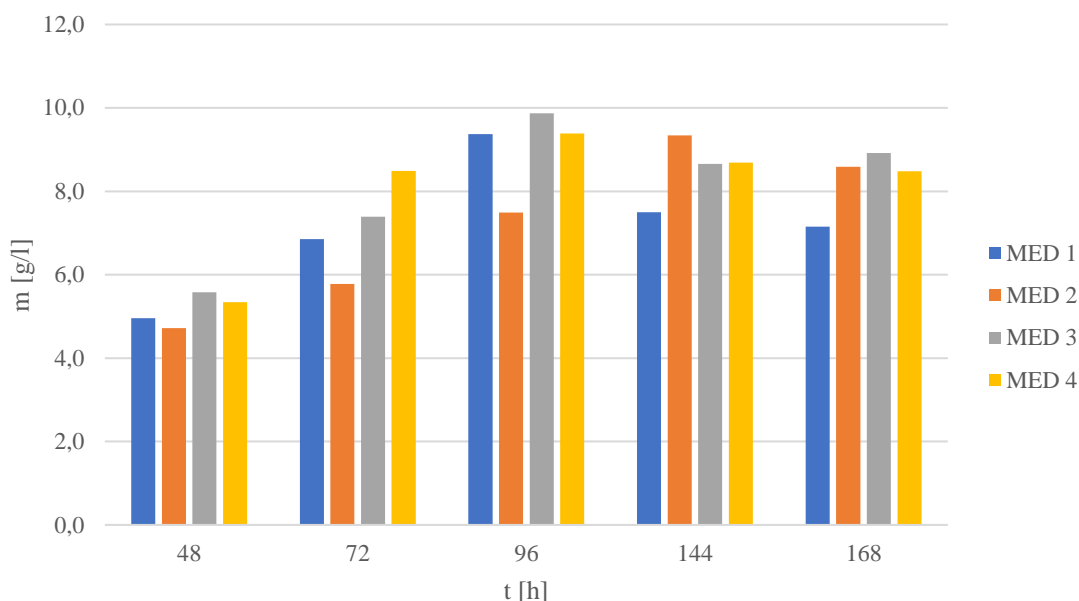
96 a 144 hodiny odběru, ale u vzorků v médiích 3 a 4 (teplota kultivací 8 a 22 °C) k tomu došlo v časech mezi 144 a 168 hodinou odběru. Avšak i v tomto případě se nejedná o významné rozdíly. Největší množství biomasy bylo odebráno z kultivace při 8 °C v médiu 3, v čase 144 hodin.



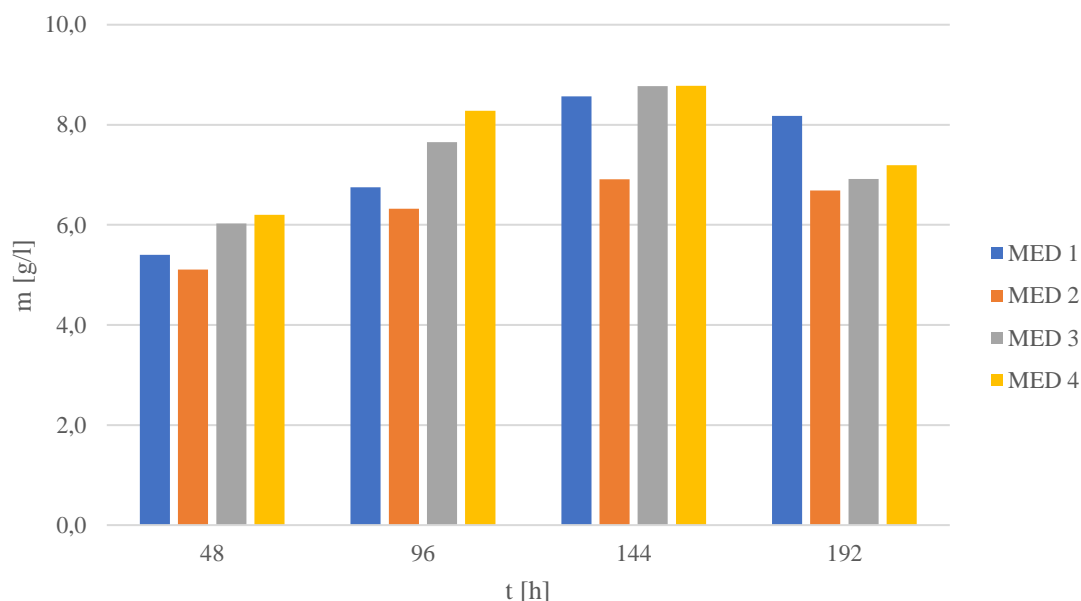
Obrázek 13: Produkce biomasy při kultivaci *C. infirmominiatum* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 8 °C



Obrázek 14: Produkce biomasy při kultivaci *C. infirmominiatum* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 15 °C



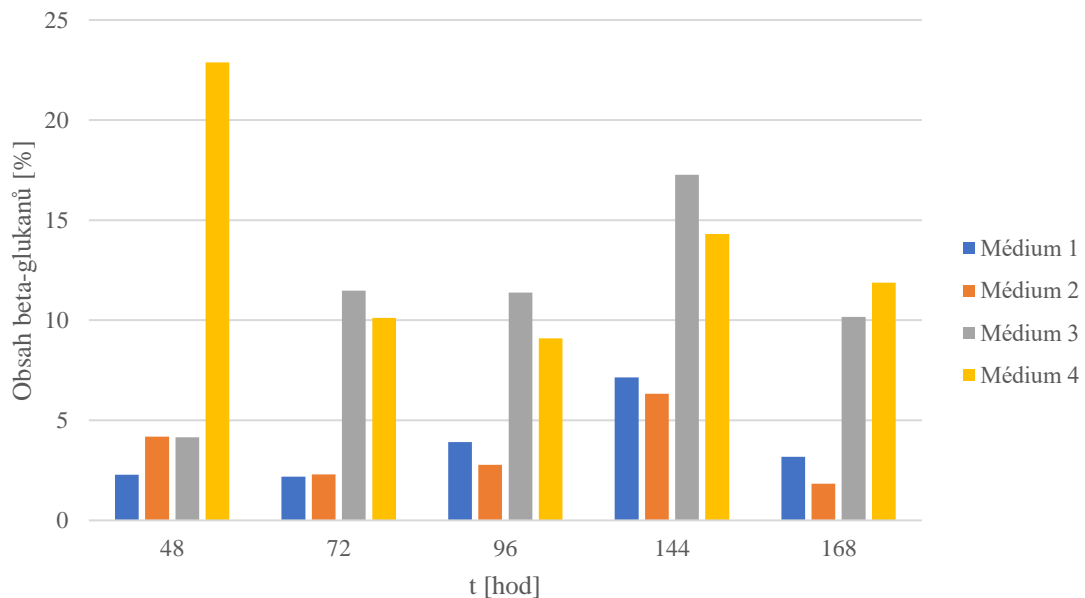
Obrázek 15: Produkce biomasy při kultivaci *C. infirmominiatum* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 22 °C



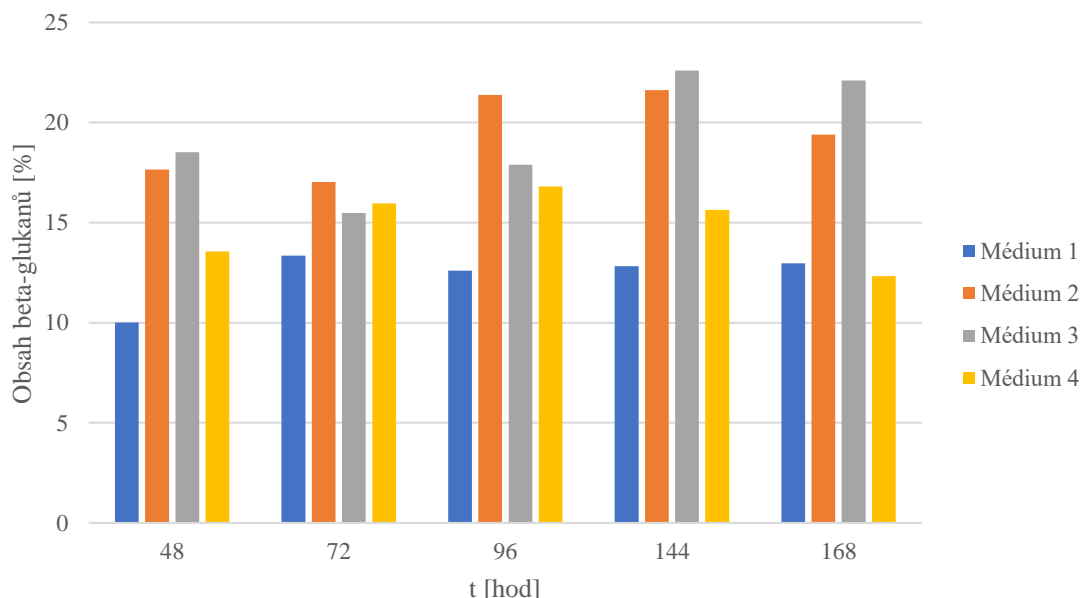
Obrázek 16: Produkce biomasy při kultivaci *C. infirmominiatum* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 30 °C

Vliv složení média a teploty se významněji projevuje až ve výsledcích týkajících se obsahu β -glukanů. Z grafů (Obrázek 17-20) bylo pozorováno, že v krajních teplotách (8 °C a 30 °C) je obsah glukanů nižší než u teplot 15 a 22 °C. Dále byl pozorován možný negativní vliv kvasničného extraktu obsaženého v médiích 1 a 4 (nižší C/N poměr), konkrétně u kultivace při teplotě 15 °C a částečně také při 22 °C. Nejlepší výsledky obsahu β -glukanů byly naměřeny u kultivace při 22 °C v médiu 2. Při této kultivaci byl jejich obsah přes 30 % již v prvním čase odběru a koncentrace poté postupně klesala. Tento trend neodpovídá chování kvasinky při ostatních kultivacích, kdy zdánlivě obsah glukanů rostl s množstvím biomasy, což pozorujeme i

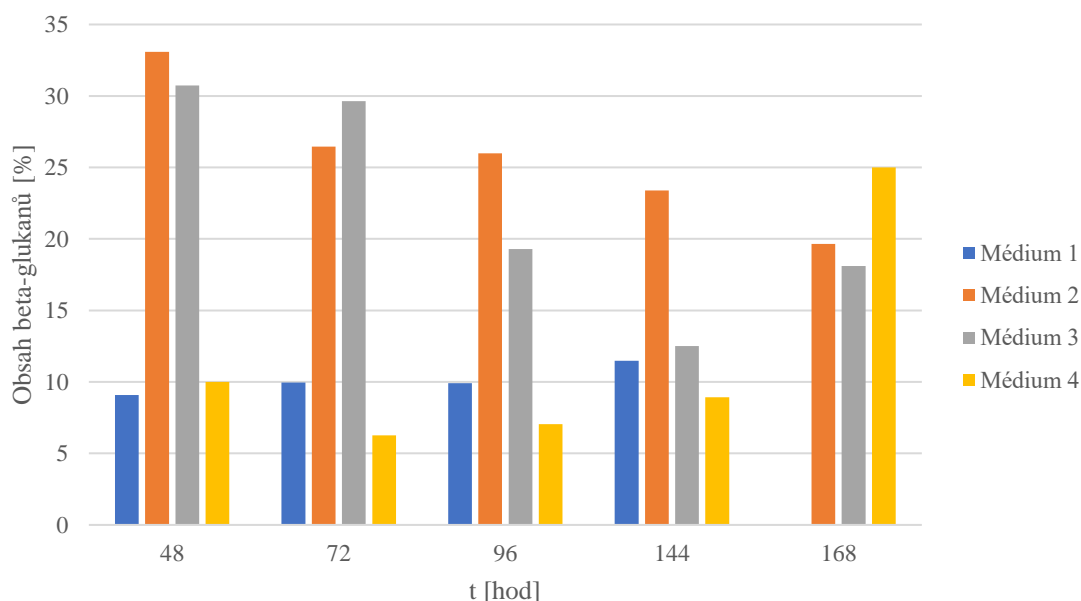
u zbývajících médií a teplot kultivací. U kultivace v médiu 4 (8 °C a 30 °C) a 3 (30 °C) byly naměřeny výrazně odchylené hodnoty obsahu β -glukanů, proto by bylo vhodné měření zopakovat a ověřit dosažené výsledky. Pro kvasinku *C. infirmominiatum* se z biotechnologického hlediska jeví jako nejideálnější podmínky kultivace 22 °C a složení média 2, kde jako zdroj dusíku slouží síran amonný. Při těchto podmínkách bylo dosaženo nejvyšší koncentrace glukanů ve vzorku (přes 33 %) a také výsledky ostatních odběrů z média 2 byly oproti zbývajícím kultivacím nadprůměrné.



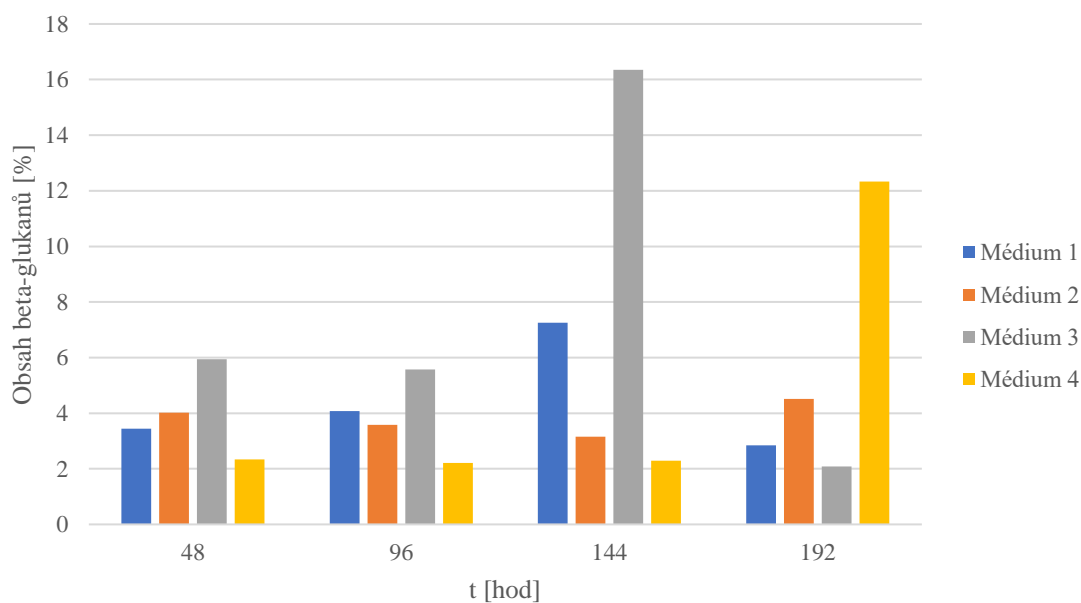
Obrázek 17: Produkce β glukanů při kultivaci *C. infirmominiatum*, teplota kultivace 8 °C



Obrázek 18: Produkce β glukanů při kultivaci *C. infirmominiatum*, teplota kultivace 15 °C



Obrázek 19: Produkce β gluknanů při kultivaci *C. infirmominiatum*, teplota kultivace 22 °C

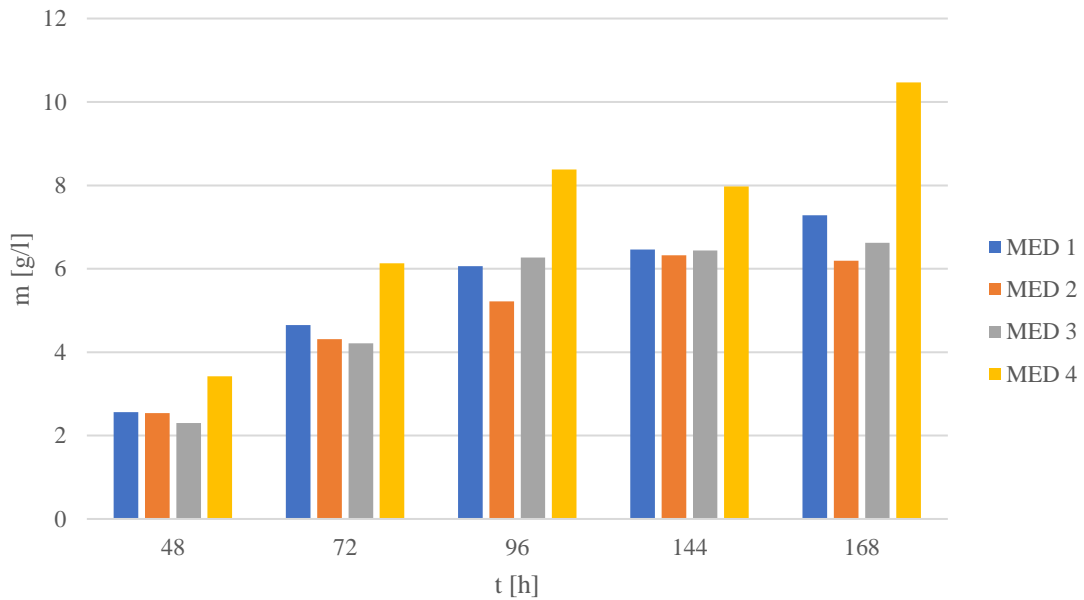


Obrázek 20: Produkce β gluknanů při kultivaci *C. infirmominiatum*, teplota kultivace 30 °C

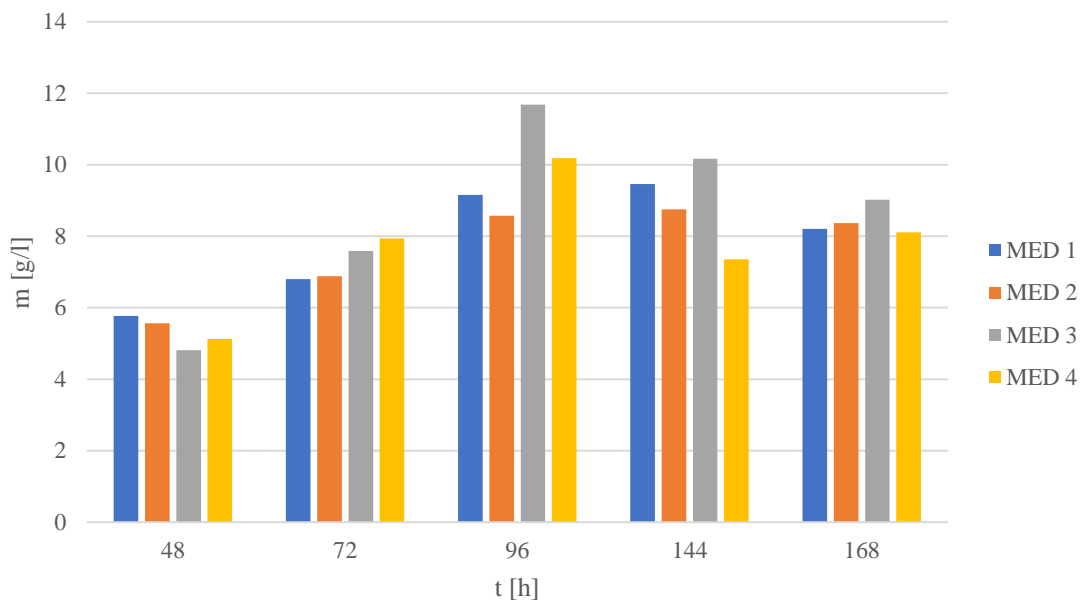
5.1.3 Produkce β -glukanů u kvasinky *Sporidiobolus pararoseus*

Z grafů (Obrázek 21-24) byl pozorován teplotní vliv na růst biomasy, kdy opět v krajních teplotách (8 °C a 30 °C) je produkce nižší, než je tomu u teplot 15 °C a 22 °C. Stacionárních fází bylo dosaženo u všech kultivací v čase 96 hodin, kromě kultivace při teplotě 22 °C v médiu 3, kdy ještě v čase 168 hodin docházelo k růstu, a také u kultivace při 8 °C v médiu 4, kde pozorujeme nárůst biomasy také v čase 168 hodin. Největší množství biomasy bylo odebráno při teplotě 22 °C v médiu 4. Kultivace v médiu 4 vykazují nejvyšší množství biomasy také

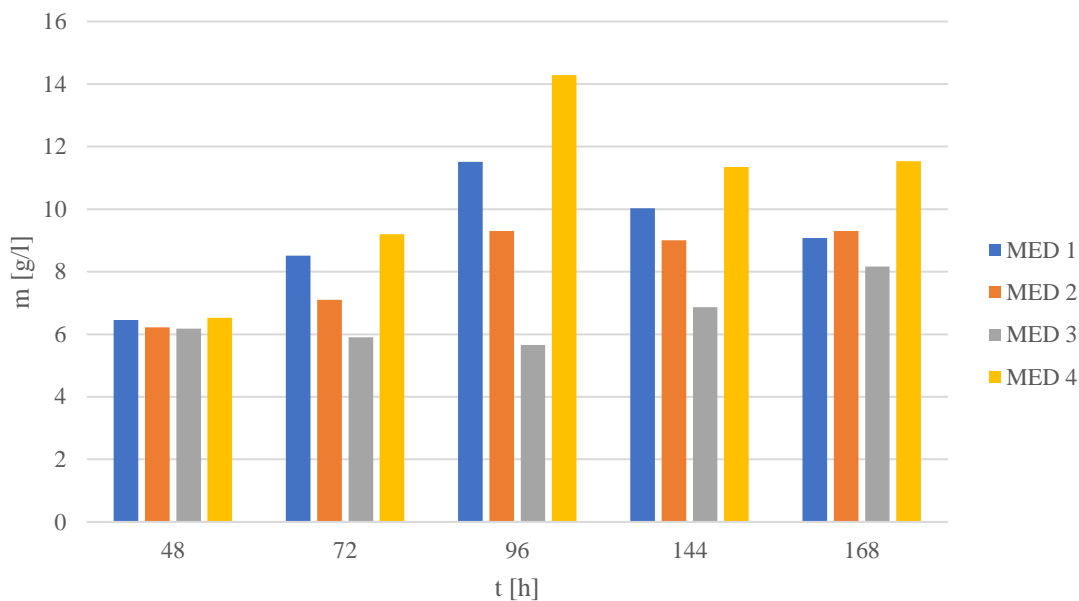
u teploty 8 °C. U teplot 15 a 30 °C byly nejvyšší produkce zaznamenány u média 3 (při 15 °C) a média 1 (30 °C). Při pohledu na grafy vidíme ale, že rozdíly mezi produkcí biomasy v jednotlivých médiích nejsou nikterak výrazné, kromě výsledků u kultivací v médiu 4 (8 a 22 °C).



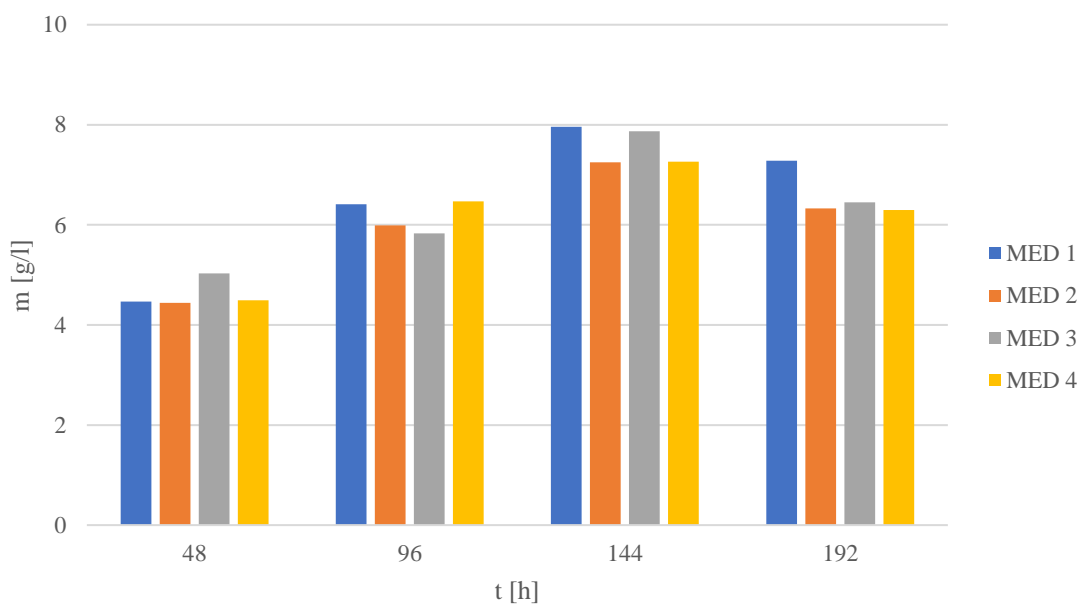
Obrázek 21: Produkce biomasy při kultivaci *S. pararoseus* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 8 °C



Obrázek 22: Produkce biomasy při kultivaci *S. pararoseus* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 15 °C



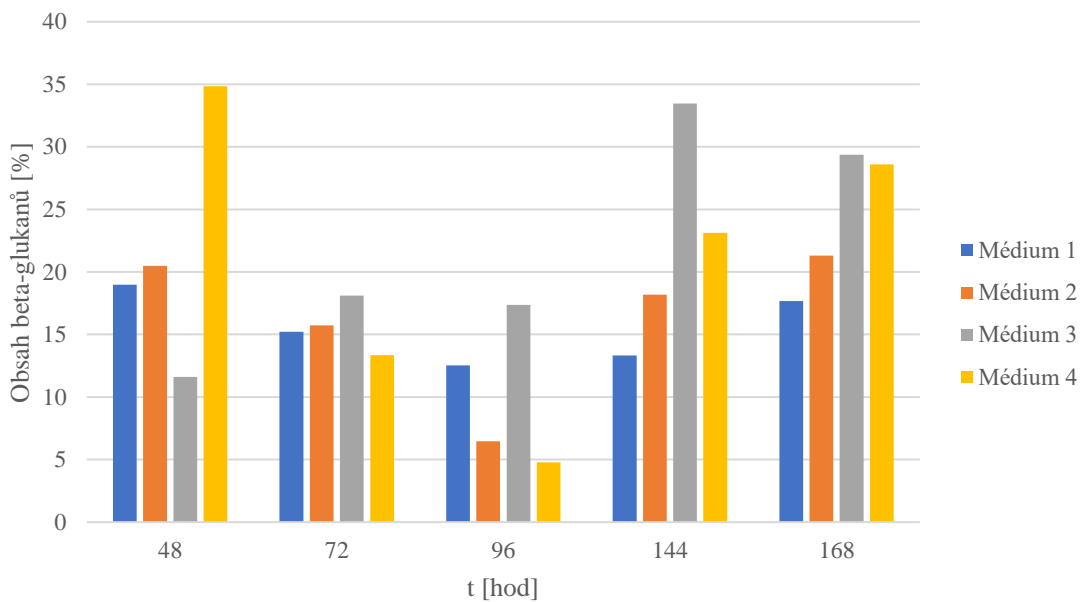
Obrázek 23: Produkce biomasy při kultivaci *S. pararoseus* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 22 °C



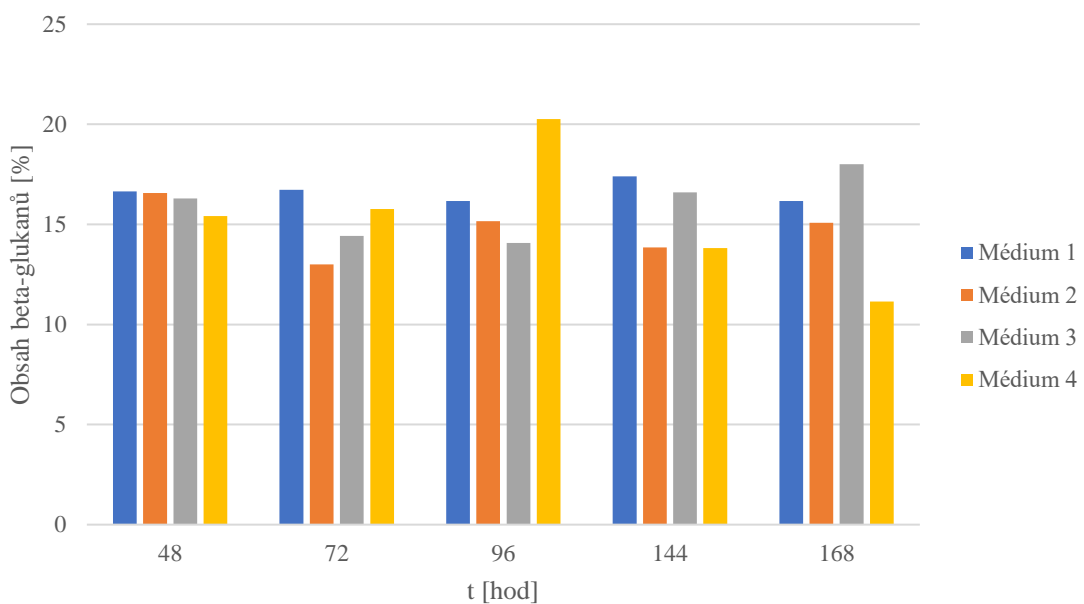
Obrázek 24: Produkce biomasy při kultivaci *S. pararoseus* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 30 °C

Při stanovování obsahu glukanů u *S. pararoseus* je z grafů (Obrázek 24-27) patrné, že při teplotě kultivace 15 °C byly mezi jednotlivými médii a časy odběrů minimální rozdíly. U zbývajících kultivací již byly pozorovány rozdíly jak mezi jednotlivými médii, tak i časy odběru biomasy. U kvasinky kultivované v médiu 1 vidíme obsah β -glukanů při teplotě 8 °C a 15 °C v intervalu 10-15 %. S narůstající teplotou poté obsah β -glukanů měl tendenci klesat (obsah β -glukanů v médiu 1 při teplotě 30 °C, v čase 144 hodin, se vymyká, a proto by bylo vhodné experiment zopakovat a ověřit dosažený výsledek). Největší množství β -glukanů bylo naměřeno u vzorku kultivovaného při teplotě 22 °C v médiu 1 (čas odběru 48 hodin). Z hlediska

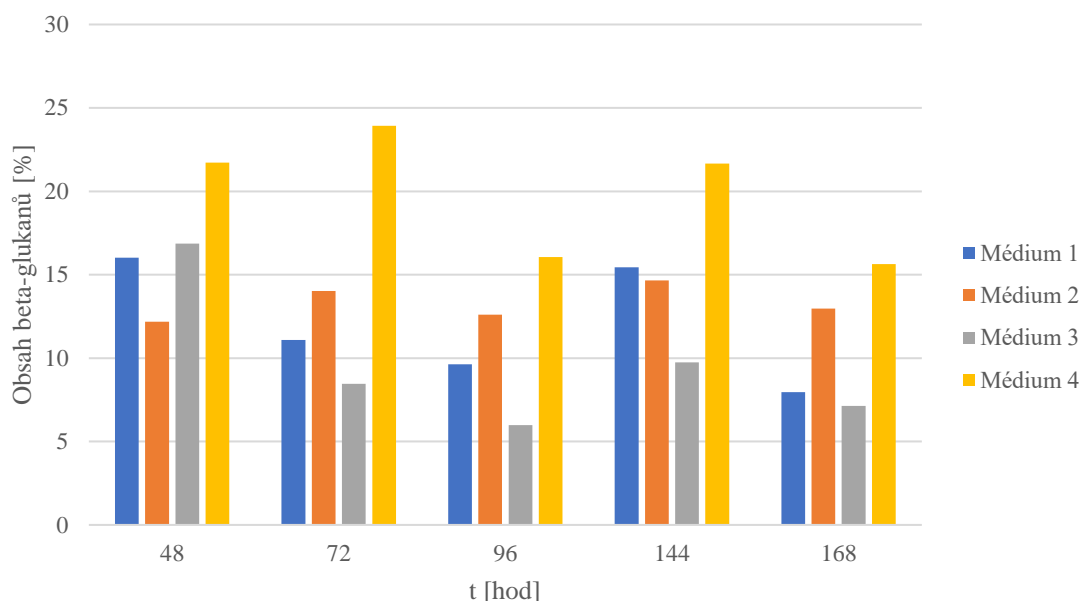
biotechnologické produkce β -glukanů se jako nejvhodnější jeví kultivace při 15 °C v médiu obsahujícím jako zdroj dusíku kvasničný extrakt v kombinaci se síranem amonným (médiu 1), při této kultivaci byl obsah β -glukanů nezávislý na čase odběru.



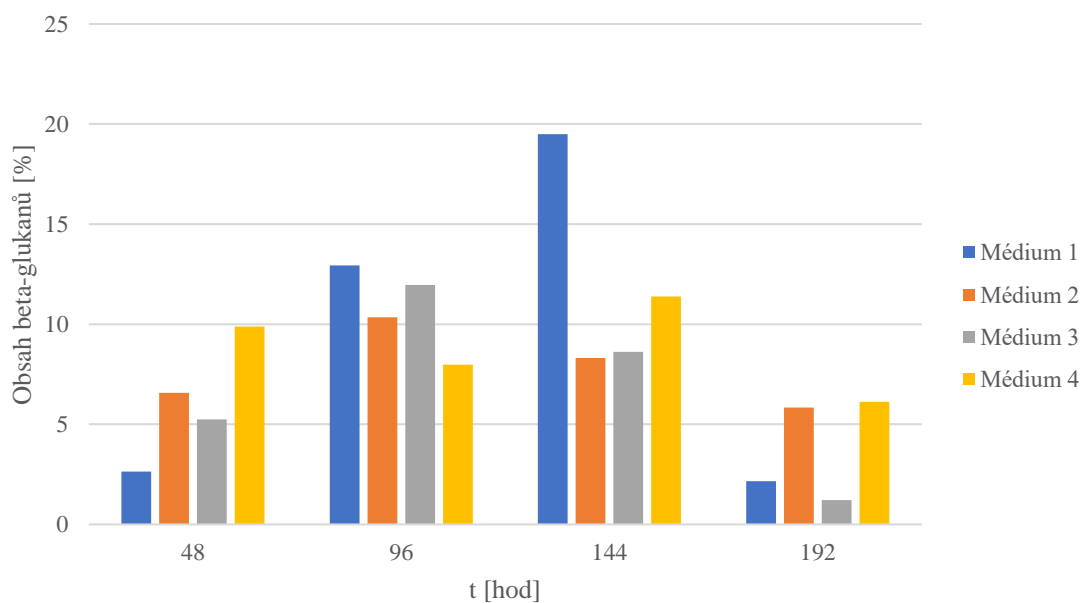
Obrázek 25: Produkce β glukanů při kultivaci *S. pararoseus*, teplota kultivace 8 °C



Obrázek 26: Produkce β glukanů při kultivaci *S. pararoseus*, teplota kultivace 15 °C



Obrázek 27: Produkce β glukanu při kultivaci *S. pararoseus*, teplota kultivace 22 °C



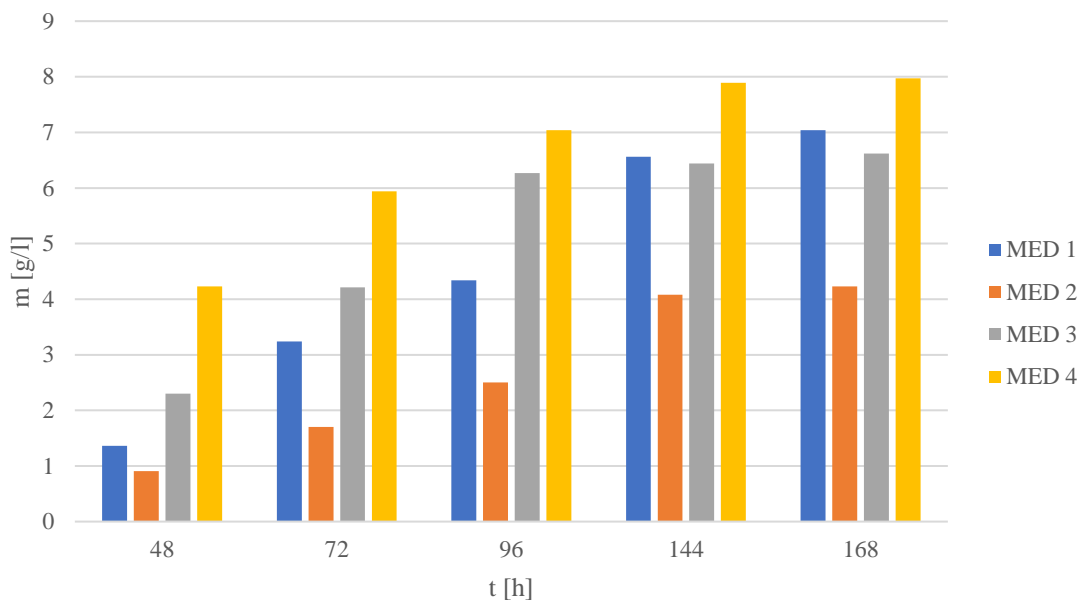
Obrázek 28: Produkce β glukanu při kultivaci *S. pararoseus*, teplota kultivace 30 °C

5.1.4 Produkce β -glukanů u kvasinky *Phaffia rhodozyma*

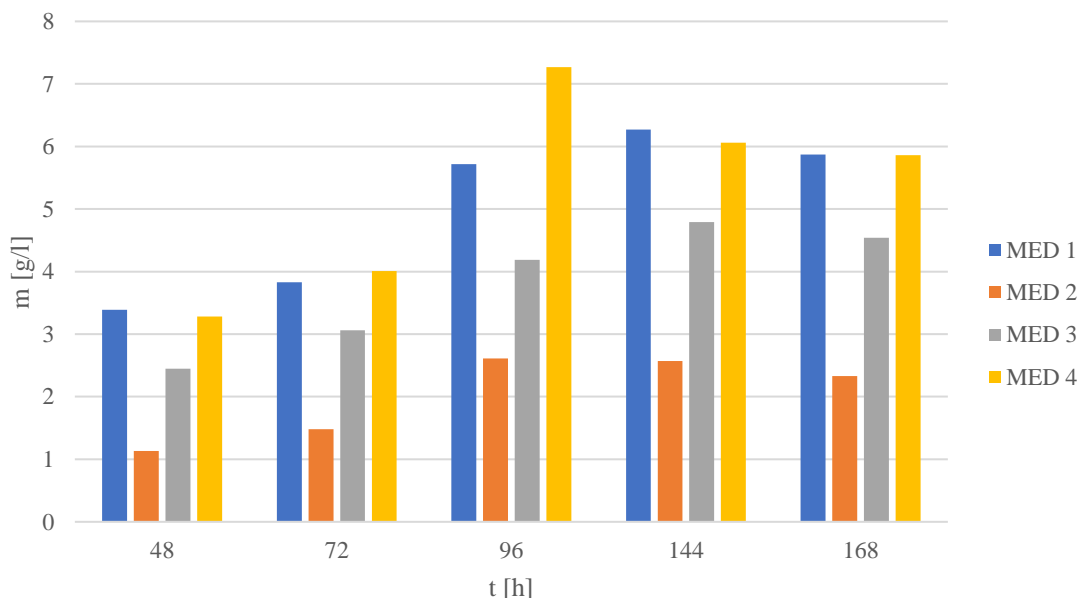
P. rhodozyma patří do oddělení *Basidiomycetes* má buněčnou stěnu tvořenou polysacharidy, hlavně β -(1-3), β -(1-6) a α -(1-3) glukany. Dále také obsahuje v malém množství chitin [22]. Je to psychrofilní kvasinka a obvykle preferuje spíše nižší teploty pro růst.

Z grafů (Obrázek 29-32) bylo zjištěno, že nárůst biomasy nedosáhl stacionární fáze u kultivací při 8 °C, a také v médiích 2, 3 a 4 při kultivaci při 22 °C. U média 1, při 30 °C, také nebylo dosaženo stacionární fáze růstu. Ve zbývajících případech nastala stacionární fáze růstu při

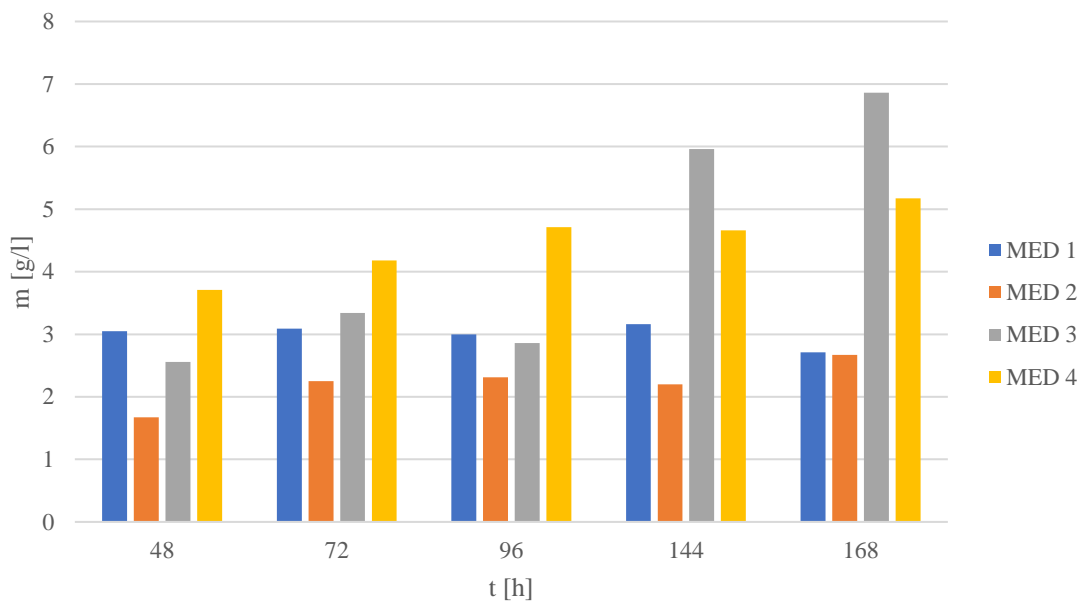
odběru ve 144 hodině. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán při teplotě na 8 °C v médiu 4, při odběru ve 168 hodině. Jako vhodný zdroj potřebného dusíku se v médiu jeví kvasničný extrakt v kombinaci s močovinou (médiu 4), dobré výsledky byly také dosaženy v médiu 1 (kvasničný extrakt + síran amonný) a v médiu 3 (močovina). Naopak, jako nevhodné složení média z grafů vychází médium 2 (síran amonný), který vykazoval nejnižší produkci biomasy ve všech případech.



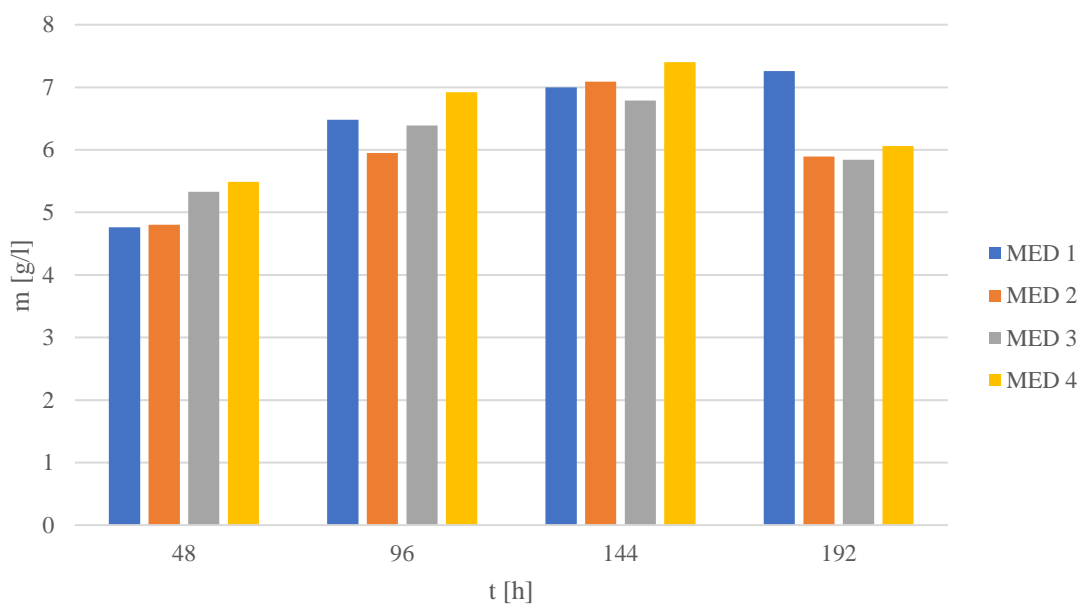
Obrázek 29: Produkce biomasy při kultivaci *P. rhodozyma* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 8 °C



Obrázek 30: Produkce biomasy při kultivaci *P. rhodozyma* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 15 °C



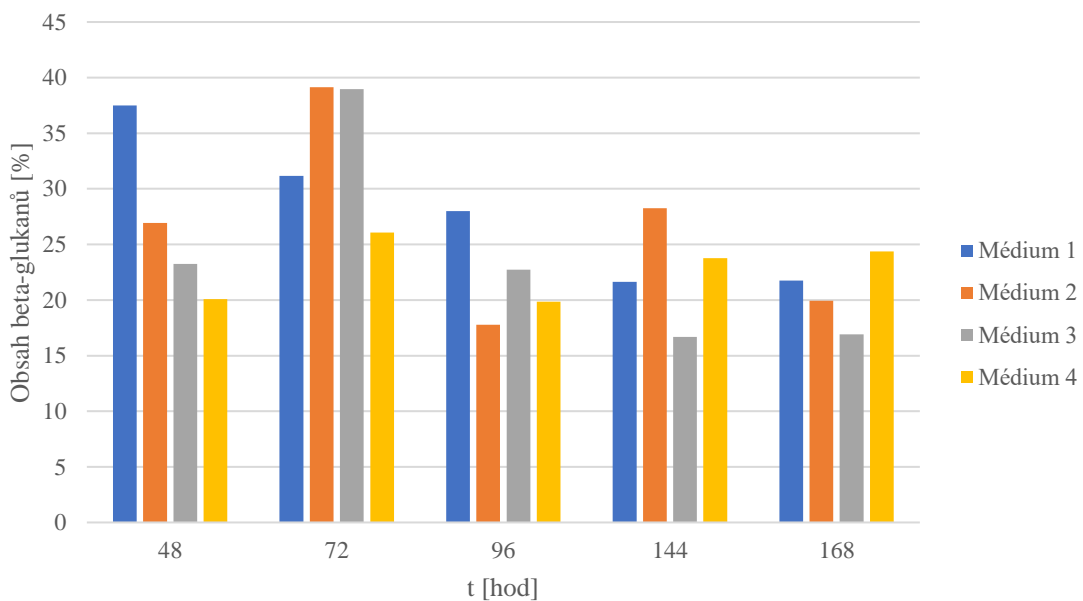
Obrázek 31: Produkce biomasy při kultivaci *P. rhodozyma* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 22 °C



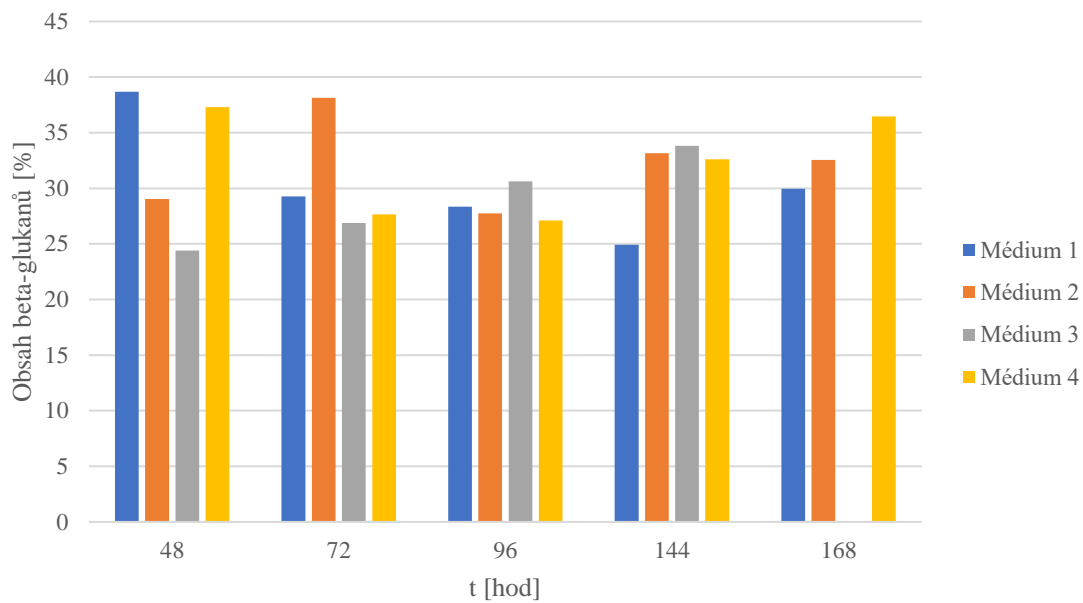
Obrázek 32: Produkce biomasy při kultivaci *P. rhodozyma* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 30 °C

P. rhodozyma dosáhla produkce β -glukanů až k 20 %. U kultivace při 30 °C byl pozorován výrazný úbytek jeho množství, krom média 3 při kultivaci při 30 °C, kde byla zaznamenána výrazná odchylka oproti zbytku výsledků ve stejném médiu při předchozích odběrech. Tato odchylka by mohla být způsobena chybou při měření, pro potvrzení výsledku by bylo vhodné experiment provést opakovaně. Při provádění stanovení došlo u vzorku (médiu 3, 15 °C, odběr 168 hodin) k odpaření vzorku, při teplotě (100 °C), a proto nebylo možné tento vzorek proměřit (zůstatek biomasy již neumožnil opakování měření).

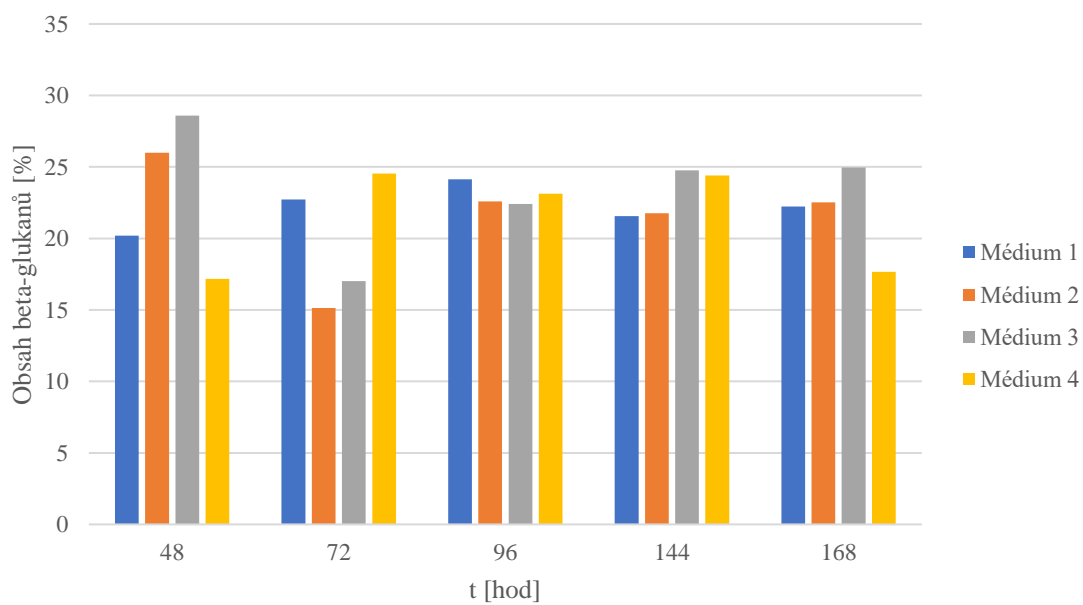
Nejvyšší obsah glukanu byl naměřen při kultivaci v médiu 2, teplotě 8 °C, při odběru v čase 72 hodin. U kultivace při 8 °C pozorujeme klesající tendenci v množství β -glukanů. U zbývajících vzorků vidíme maximum v čase 72 hodin. Při 15 °C sledujeme opět klesající množství u média 1, u média 3 naopak rostoucí trend v množství β -glukanů. V médiích 2 a 4 vidíme vysoké množství glukanu v čase 48 hod (médiu 4), resp. v čase 72 hod (médiu 2), dále má pak obsah glukanu rostoucí tendenci. Byly pozorovány také podobné výsledky u médií s obsahem kvasničného extraktu (médiu 1 a 2). Při 22 °C byly výsledky v časech 96, 144 a 168 relativně shodné, nezávisle na médiu (krom média 4 v čase odběru 168 hodin). V časech odběrů 48 a 72 hodin vidíme opět podobnost mezi médii 1 a 4 (kvasničný extrakt). Množství β -glukanů při teplotě 30 °C bylo nejnižší. Pro biotechnologické účely, při porovnání produkce biomasy a β -glukanů, vychází jako nejvhodnější kultivace v médiu 4 při teplotě 15 °C, kde sledujeme vysoké koncentrace glukanu a dostatečný nárůst biomasy.



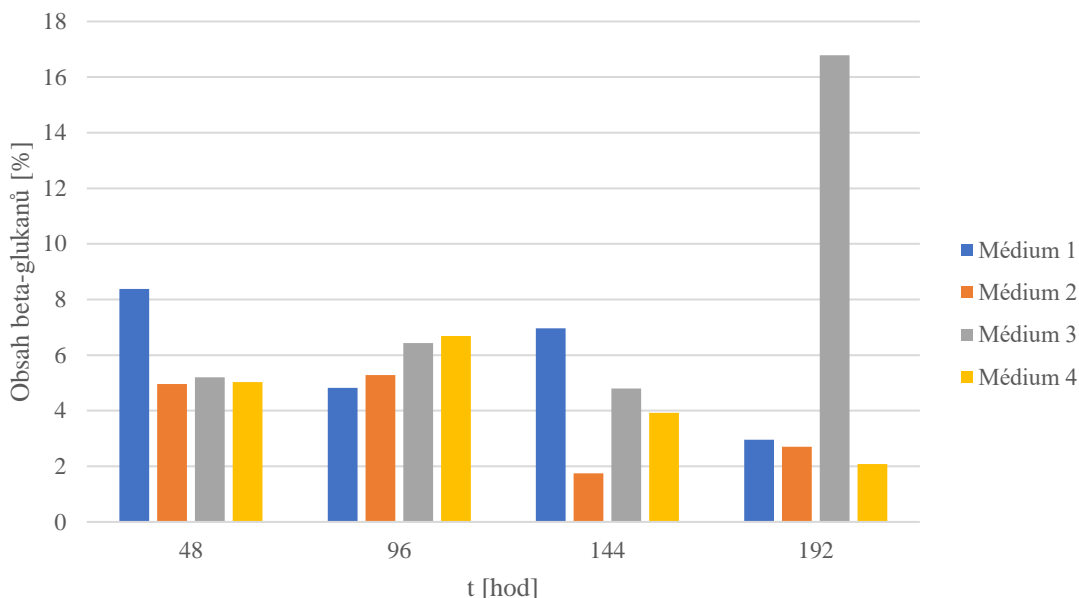
Obrázek 33: Produkce β glukanu při kultivaci *P. rhodozyma*, teplota kultivace 8 °C



Obrázek 34: Produkce β glukanu při kultivaci *P. rhodozyma*, teplota kultivace 15 °C



Obrázek 35: Produkce β glukanu při kultivaci *P. rhodozyma*, teplota kultivace 22 °C



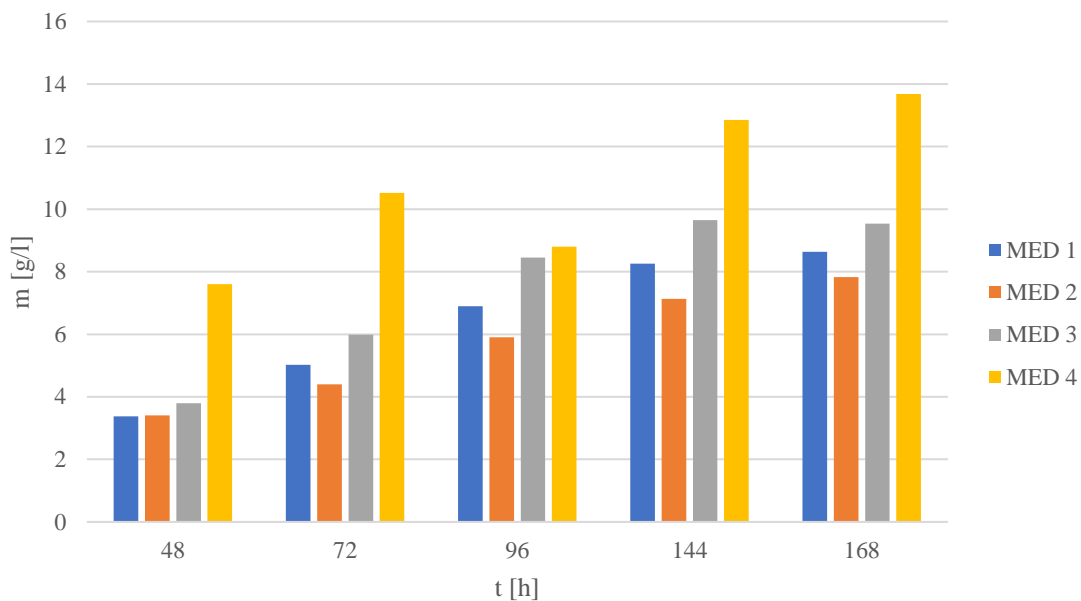
Obrázek 36: Produkce β glukánů při kultivaci *P. rhodozyma*, teplota kultivace 30 °C

5.1.5 Produkce β -glukanů u kvasinky *Rhodotorula glutinis*

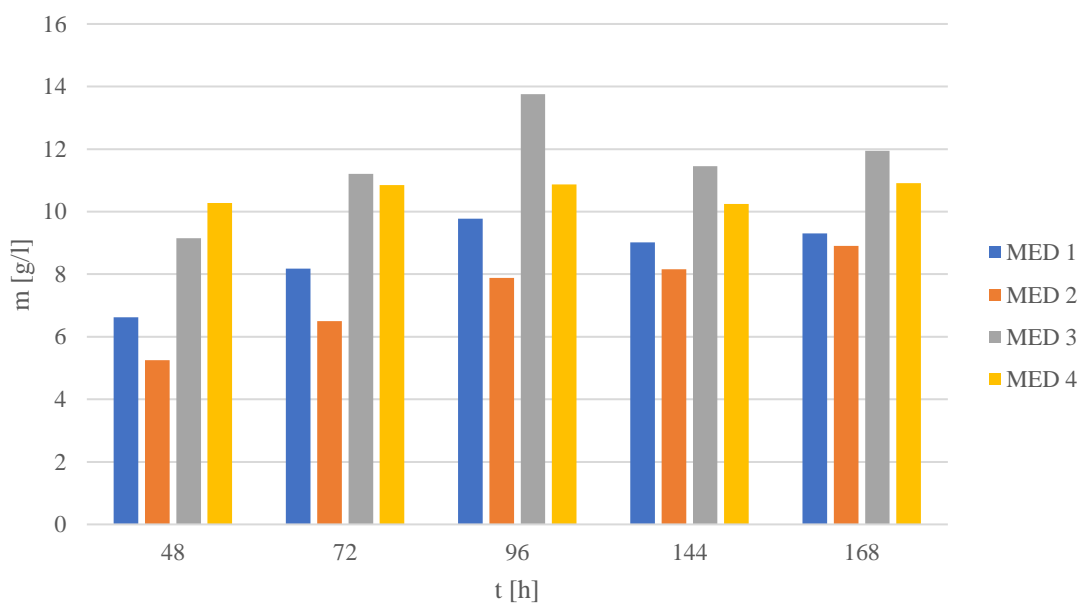
R. glutinis patří, podobně jako *P. rhodozyma*, do oddělení *Basidiomycetes*. Proto lze očekávat v buněčné stěně zastoupení glukánů.

U grafů (Obrázek 37-40) byl pozorován přírůstek biomasy v daných intervalech. Při teplotách kultivace 22 a 15 °C došlo k ustavení stacionární fáze v čase 96 hodin (výjimku tvoří pouze kultivace v médiu 2, kdy byl pozorován stálý nárůst biomasy i v čase 168 hodin). Při kultivace v 8 °C bylo sledováno rostoucí množství biomasy po celou dobu odběrů, nedošlo zde tedy k ustavení stacionární fáze. U 30 °C zase pozorujeme vyšší nárůsty u kultivací v médiích s obsahem močoviny (médiá 3 a 4). Všeobecně vykazovala *R. glutinis* nejvyšší růsty v médiích 3 a 4. Naopak média s obsahem síranu amonného, jakožto zdroje dusíku, mají nárůsty biomasy nižší. Vliv teploty sledujeme u všech médií. U médií 3 a 4 byl zaznamenán rostoucí trend v souvislosti s rostoucí teplotou. Média 1 a 2 mají svá maxima při teplotách od 8 do 22 °C. Při teplotě 30 °C byla pozorována snížená produkce biomasy.

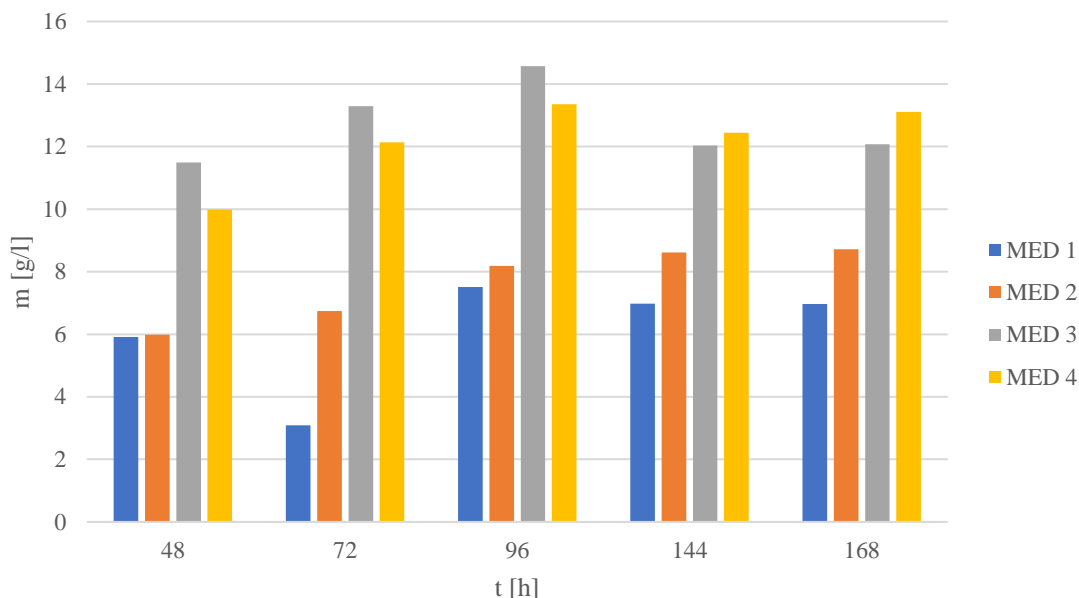
Během kultivace při 30 °C došlo ke kontaminaci vzorků v čase 144 hodin (u médií 1 a 2), z tohoto důvodu nebylo možné stanovit biomasu a obsah glukánů v těchto vzorcích.



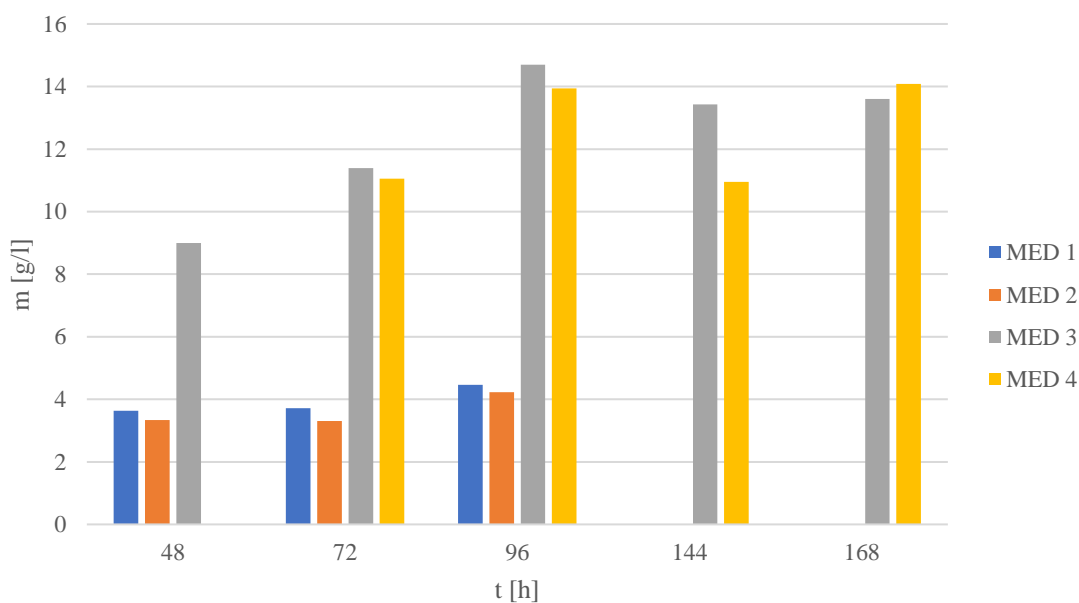
Obrázek 37: Produkce biomasy při kultivaci *R. glutinis* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 8 °C



Obrázek 38: Produkce biomasy při kultivaci *R. glutinis* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 15 °C



Obrázek 39: Produkce biomasy při kultivaci *R. glutinis* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 22 °C

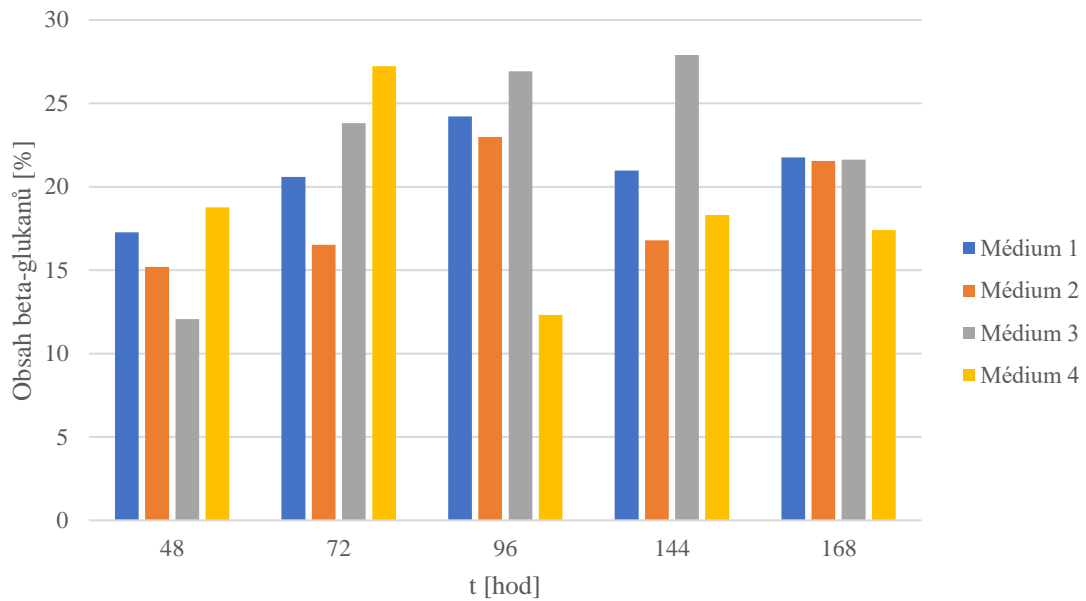


Obrázek 40: Produkce biomasy při kultivaci *R. glutinis* v jednotlivých médiích, teplota kultivace 30 °C

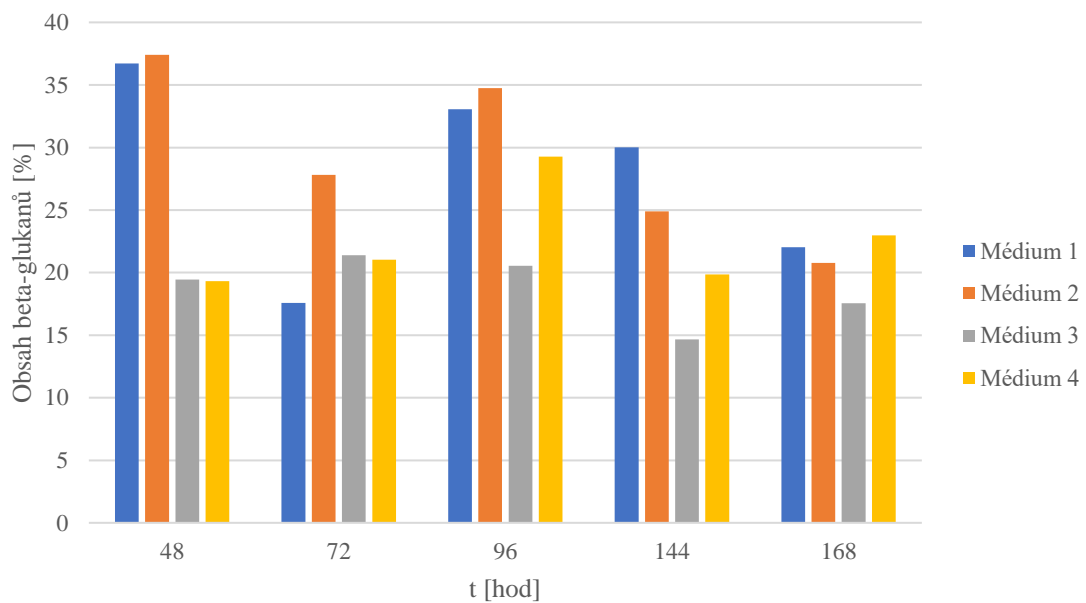
Z hlediska produkce β -glukanů můžeme pozorovat vztah mezi nárůstem biomasy a výsledným množstvím β -glukanů, kdy bylo množství glukanů v jednotlivých médiích a časech odběrů odpovídající míře nárůstu biomasy. Při nižších teplotách byla sledována vyšší produkce glukanů v médiu 3 (v čase 96 hodin až téměř 27 %). Nejvyšší obsah glukanů byl naměřen při kultivaci v 15 °C (čas 48 hodin), u odběru z média 2 (cca. 37 %). Pozorována byla také vyšší produkce glukanů při nižších teplotách. Výjimku tvoří kultivace v médiích 3 a 4 při 22 °C, kde bylo sledováno podobné množství glukanů, jako tomu bylo při nižších teplotách. U kultivace při 30 °C jsou pak již obsahy β -glukanů vždy pod 10 %.

Pro dosažení co nejvyšších zisků β -glukanu vychází jako nejideálnější varianta kultivace při 15 °C v médiu s obsahem síranu amonného (médium 1 a 2). Za takových podmínek bylo

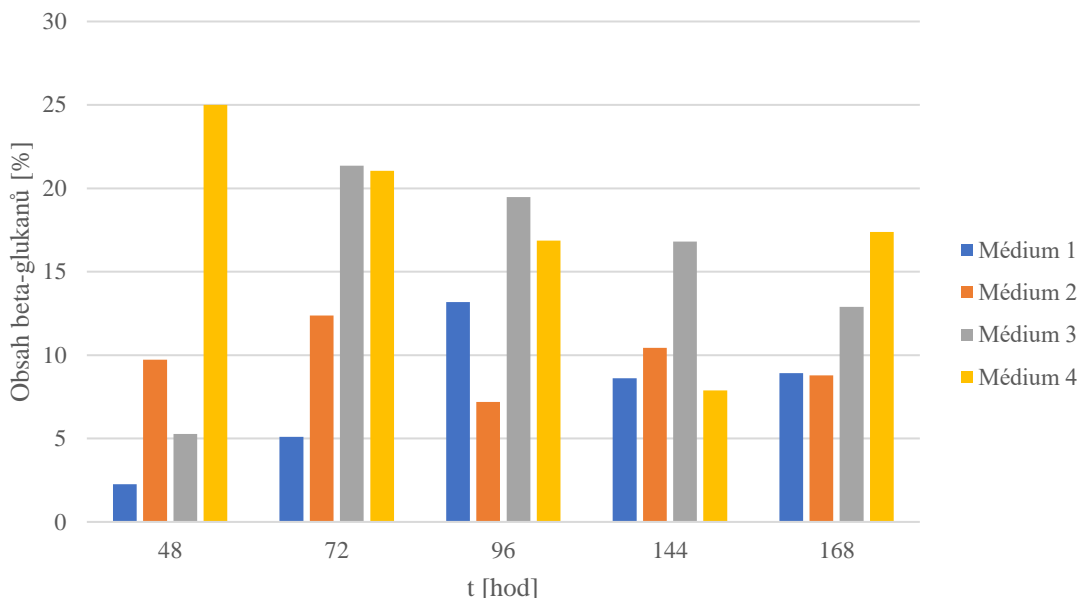
dosaženo dostatečného růstu biomasy po celou dobu experimentu, a také nejvyšších obsahů glukánů v biomase.



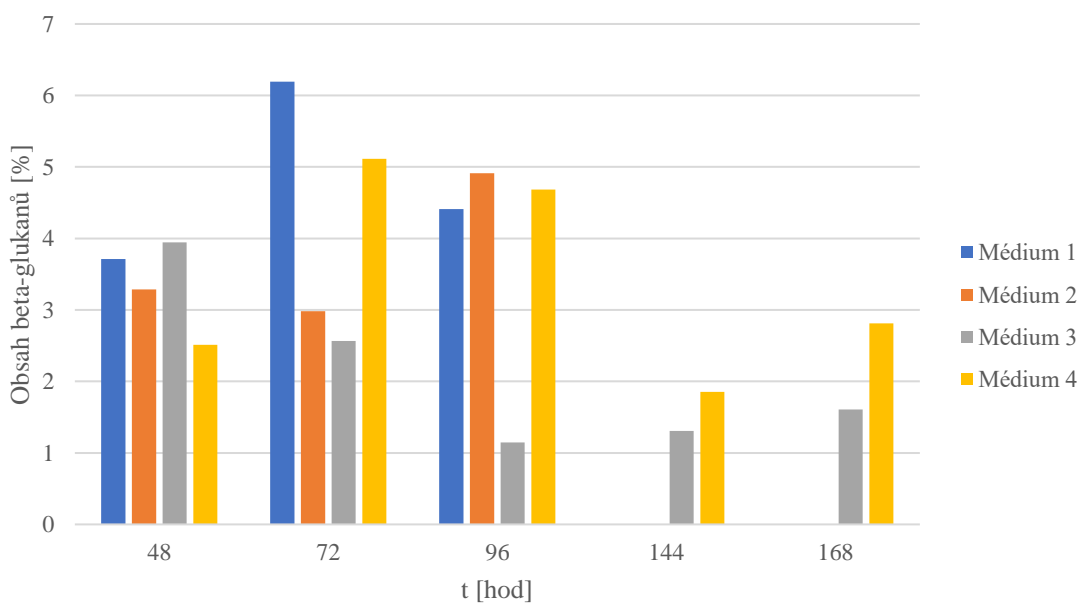
Obrázek 41: Produkce β glukánů při kultivaci *R. glutinis*, teplota kultivace 8 °C



Obrázek 42: Produkce β glukánů při kultivaci *R. glutinis*, teplota kultivace 15 °C



Obrázek 43: Produkce β glukanu při kultivaci *R. glutinis*, teplota kultivace 22 °C

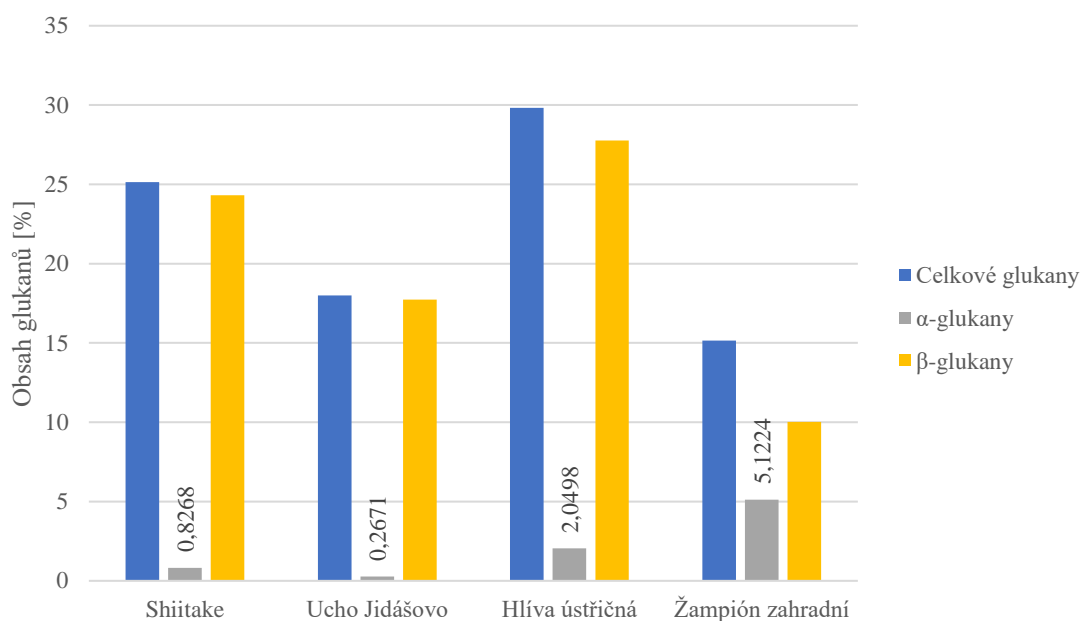


Obrázek 44: Produkce β glukanu při kultivaci *R. glutinis*, teplota kultivace 30 °C

5.2 Stanovení obsahu celkových, α a β glukanu u vybraných zástupců vyšších hub

V rámci práce byly stanovovány obsahy glukanu také u vybraných vyšších hub. Pro tyto účely byly vybrány shiitake, ucho Jidášovo, hlíva ústříčná a žampion zahradní. Vzorky hlívy ústříčné a žampionu zahradního byly před samotným měřením sušeny při teplotě 80 °C po dobu 24 hodin. Zbývající vzorky, shiitake a ucho Jidášovo, byly pořízeny již ve vysušeném stavu. Před samotným začátkem měření byly vzorky rozdrčeny na jemný prášek, který byl následně

analyzován. Analýza obsahu glukanů ve vzorcích vyšších hub probíhala za použití kitu, který byl již použit u stanovení obsahu β -glukanů u kvasinek, podle postupu uvedeného v kapitole 4.7. K vyhodnocení výsledků byl využit software dodaný výrobcem kitu.



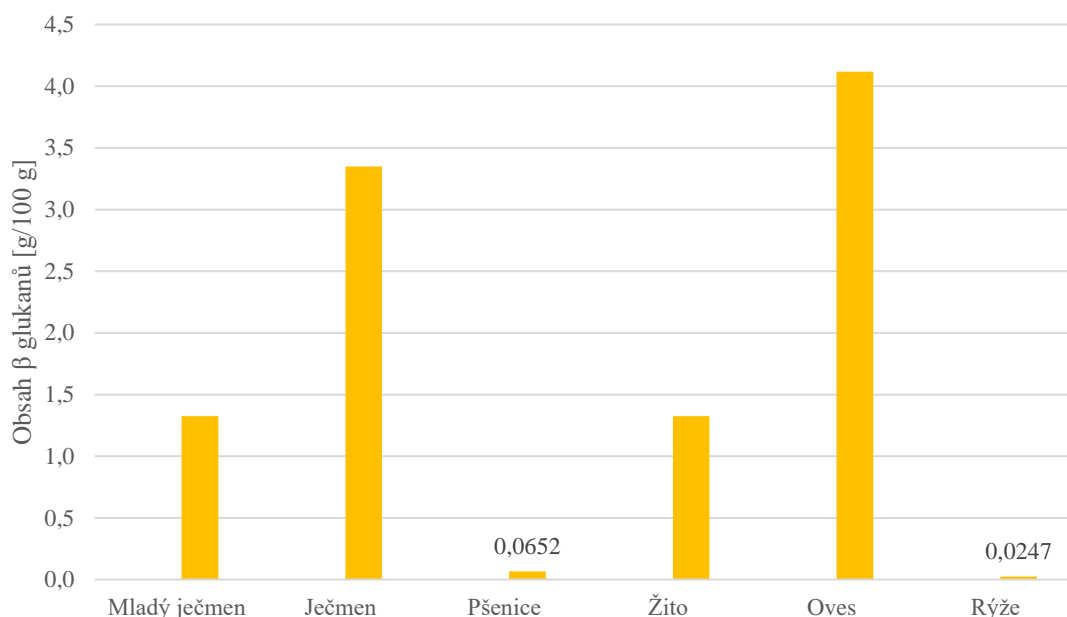
Obrázek 45: Výsledné obsahy glukanů ve vybraných vzorcích hub

Největší množství glukanů (Obrázek 45) bylo stanoveno v hlívě ústříčné (jednalo se o houbu v syrovém stavu, která byla vysušena). Nejvyšší obsah α -glukanů byl naměřen u žampiónu zahradního. U zbývajících hub byl obsah α -glukanů velmi nízký v porovnání s celkovým obsahem glukanů. Pouze u výše zmíněného žampiónu zahradního dosahovala koncentrace α -glukanů přibližně 30 % obsahu všech glukanů.

Výsledné množství β -glukanů bylo získáno rozdílem celkových a α -glukanů. Nejvyšší obsah byl naměřen pro hlívu ústříčnou, kde β -glukany tvoří velkou část všech glukanů. Výsledné obsahy β -glukanů se pohybovaly u všech vzorků nad 10 %, kromě žampiónu zahradního (10 %). Obsah glukanů zjištěný ve vyšších houbách je podobný nebo nižší než u kvasinek.

5.3 Stanovení obsahu β -glukanů u vybraných zástupců obilovin

Pro stanovení obsahu glukanů v obilovinách byli vybráni zástupci ječmene (mladý ječmen a ječná mouka), pšenice, žita, oves a rýže (všechny vzorky ve formě mouky). Poněvadž vzorky byly pořízeny již ve formě prášku, nebyla potřeba žádná další jejich úprava. Na rozdíl od kvasinek a vyšších hub bylo potřeba použít jiného kitu (Megazyme K-BGLU, viz. kapitola 4.8) z důvodu odlišných vazeb v polymeru. Postup práce s tímto kitem je uveden v kapitole 4.8. Výsledky byly zpracovány pomocí výrobcem dodávaného softwaru.



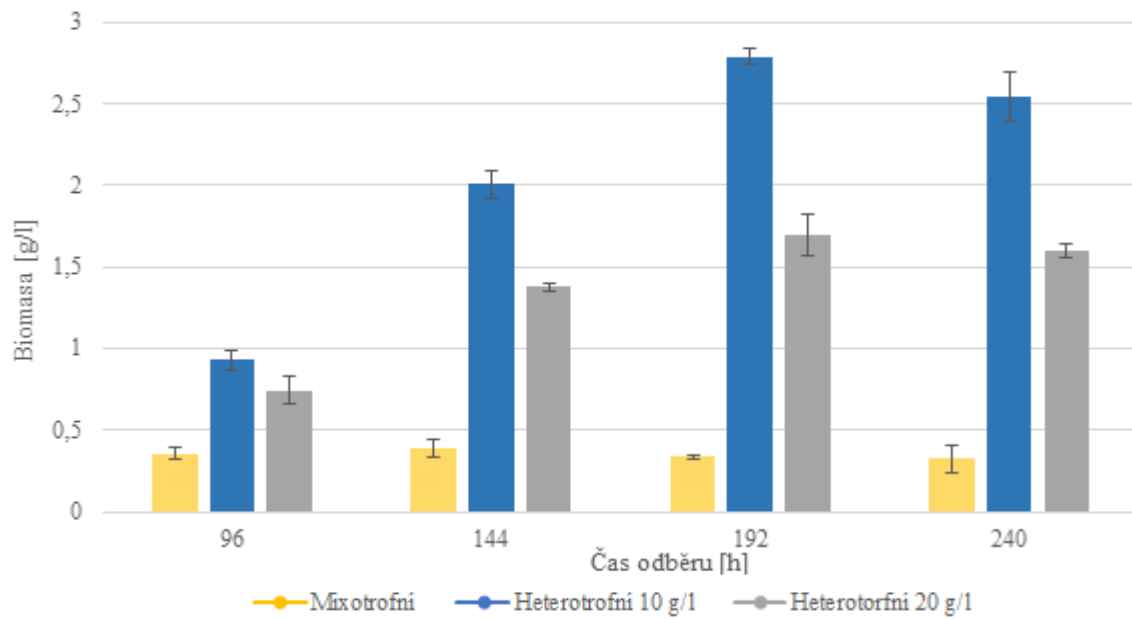
Obrázek 46: Obsah β -glukanů u vybraných druhů obilovin

Z obrázku 46 bylo stanoveno, že obsah β -glukanů byl prokazatelně potvrzen ve vzorcích ječmene (u obou forem), žita a ova. Ve vzorcích rýže bylo stanovené množství příliš malé, aby se dalo hovořit o prokázání přítomnosti β -glukanů. Nejvyšší obsah byl stanoven u ovesné mouky (cca. 4,1 g/100 g vzorku). Zajímavé je pozorovat rozdíl u ječné mouky a mladého ječmene, tento rozdíl mohl být způsoben rozdílným zpracováním při výrobě těchto surovin. Mladý ječmen je sklizen v ranném stádiu, kdy je ještě zelený. Z toho důvodu nemusí dojít k produkci β -glukanů v takové míře jako u běžně sklizeného ječmene.

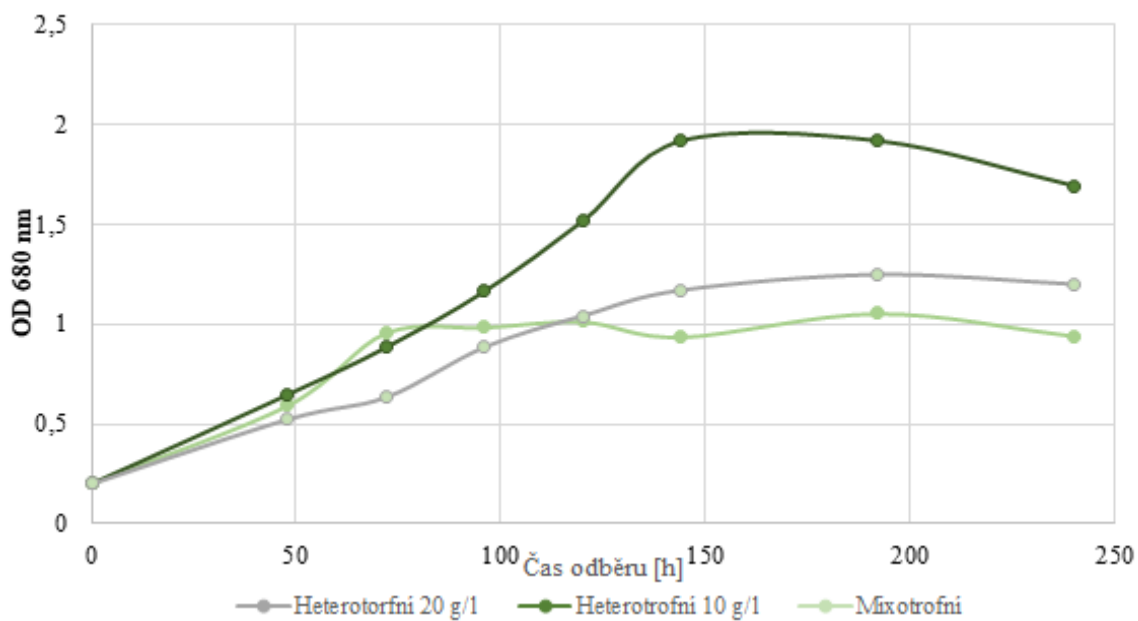
5.4 Stanovení paramylonu u řasy *Euglena gracilis*

Paramylon je sacharid podobný škrobu. U řasy *E. gracilis* nacházíme β -glukany spojené (1 \rightarrow 3)-glykosidickými vazbami, které nazýváme paramylon. Tento polysacharid se podobá škrobu [46, 50].

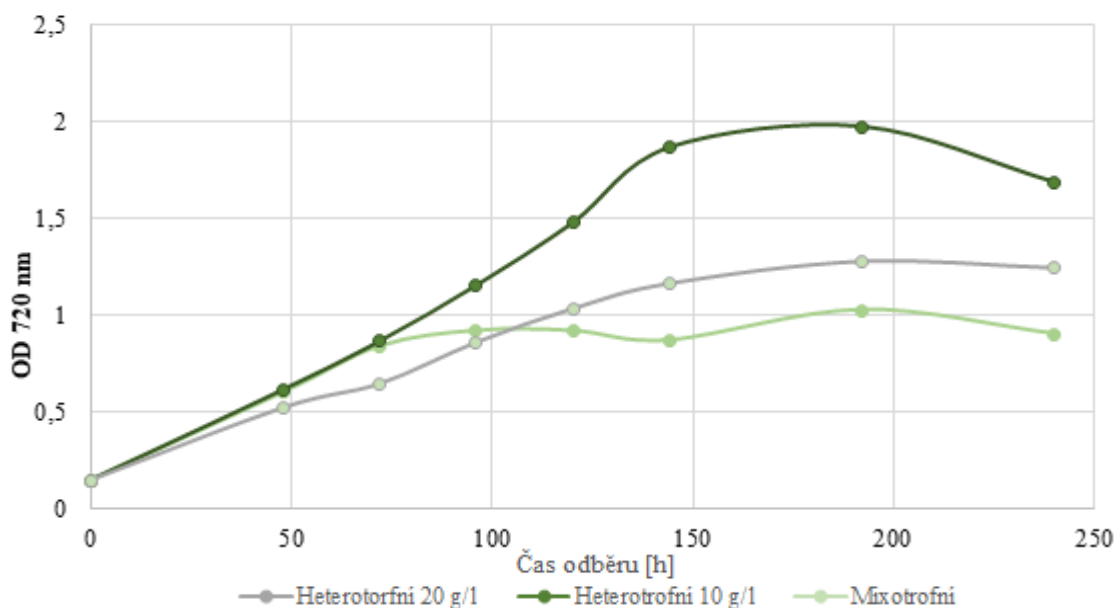
E. gracilis byla kultivována za mixotrofně a heterotrofně (octan nahrazen přidavkem glukózy 10 a 20 g/l). Na grafu (Obrázek 47) vidíme, že k nejvyšší produkci biomasy došlo u heterotrofní kultivace s přidavkem glukózy 10 g/l. U mixotrofní kultivace naopak byla sledována nejnižší produkce. Na dalších grafech (obrázek 48 a 49) byla sledována změna optické hustoty. Při 680 nm byla měřena absorbance chlorofylu a rozptylu světla biomasou, u 720 nm pouze rozptyl světla biomasou. Díky těmto měřením byla sledována akumulace biomasy, aniž by byla potřeba stanovovat sušinu. Stacionární fáze bylo u kultivací s přidavkem glukózy dosaženo v obou případech kolem 144 hodiny, zatímco u mixotrofní kultivace již v čase 72 hodin (při měření OD 680), resp. v čase 96 hodin při OD 720.



Obrázek 47: Nárůst biomasy u jednotlivých kultivačních podmínek



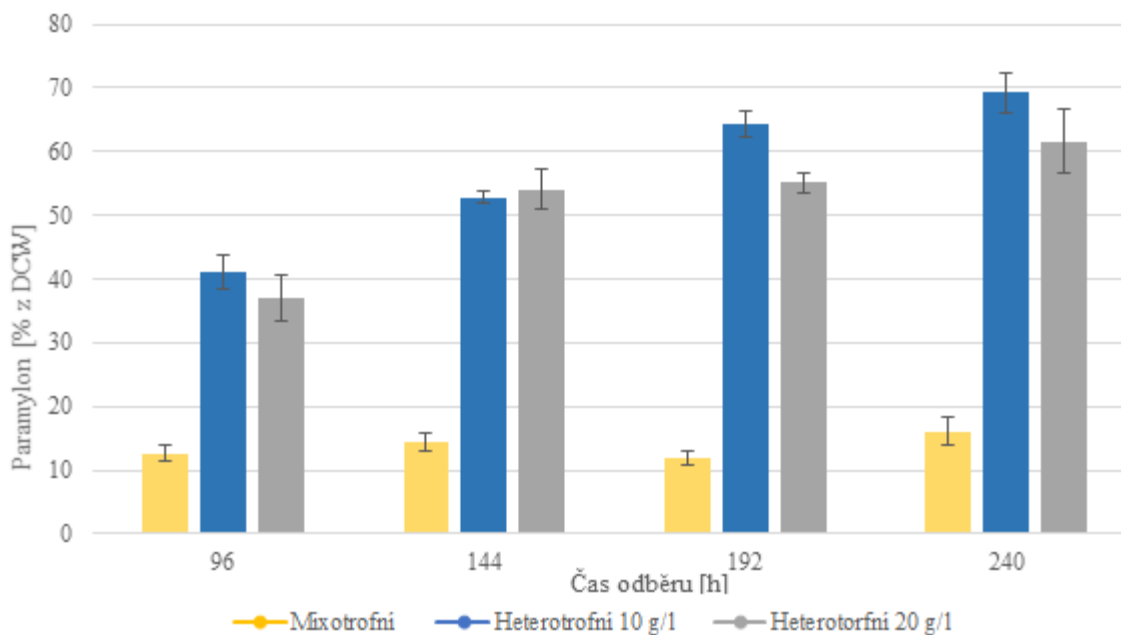
Obrázek 48: Růst *E. gracilis* při OD 680 nm



Obrázek 49: Růst *E. gracilis* při OD 720 nm

Na grafu (Obrázek 50) bylo sledováno množství obsaženého paramylonu v lyofilizované biomase *E. gracilis*. Nejnižší množství nacházíme při mixotrofní kultivaci. Naopak heterotrofní podmínky růstu výrazně zvyšují produkci paramylonu. Nejvíce paramylonu bylo obsaženo v biomase v čase 240 hodin, u přídatku 10 g/l glukózy (téměř 70 % hmotnosti biomasy), dobrých výsledků bylo dosaženo také při přídatku 20 g/l glukózy.

Jako ideální kombinace pro biotechnologické využití vychází kultivace za heterotrofních podmínek s koncentrací glukózy 10 g/l. Za těchto podmínek dosáhla *E. gracilis* nejvyššího nárůstu biomasy a také obsahu paramylonu, jakožto zdroje glukánů.



Obrázek 50: Množství paramylonu obsažené u *E. gracilis*

5.5 Produkce mastných kyselin kvasinkami

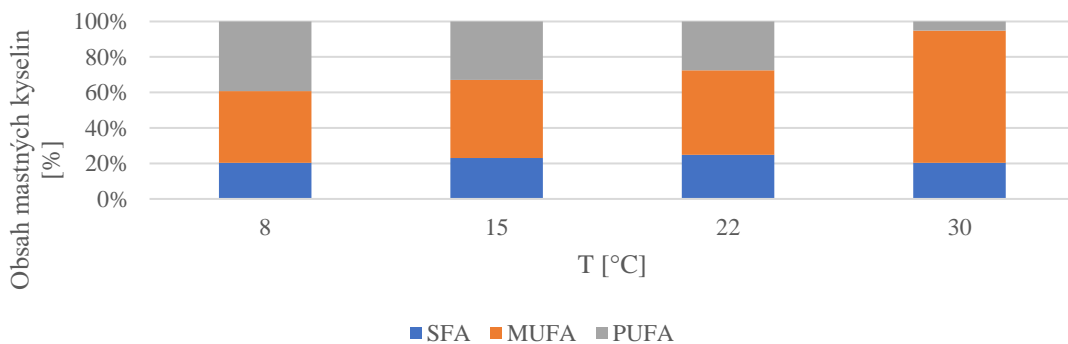
Pomocí plynové chromatografie bylo stanoveno paralelně s produkcí glukánů také množství produkováných lipidů a obsahové složení mastných kyselin u lyofilizované biomasy kvasinek. Takto stanovené mastné kyseliny byly rozděleny do tří skupin, polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), mononenasycené mastné kyseliny (MUFA) a nasycené mastné kyseliny (SFA). Výsledky byly graficky vyhodnoceny znázorněním jednotlivých poměrů PUFA, MUFA a SFA v celkovém množství mastných kyselin v biomase. Také bylo hodnoceno celkové procentuální zastoupení mastných kyselin v navážce biomasy.

Z každé kultivace byl vybrán zástupce v čase největšího nárůstu biomasy. Z důvodu jejího nedostatku u vzorků kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, nebylo možné stanovit obsah mastných kyselin. Tento případ nastal také u několika vzorků *Phaffia rhodozyma*.

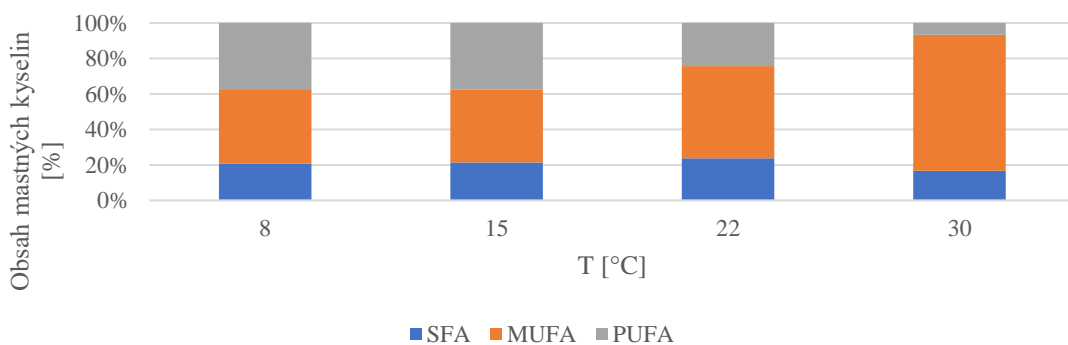
5.5.1 Produkce mastných kyselin u kvasinky *Cystofilobasidium infirmominatum*

Na grafech (Obrázek 51-54) bylo sledováno zvyšující se množství MUFA na úkor PUFA s rostoucí teplotou. Tento jev byl pozorován u všech použitých médií. V rámci jednotlivých médií bylo ověřeno, že zastoupení mastných kyselin zůstává procentuálně neměnné.

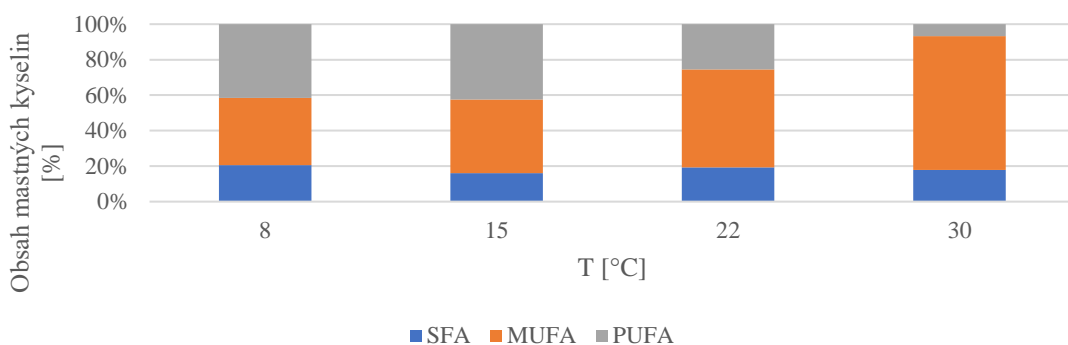
U kvasinky *C. infirmominatum* dále bylo pozorováno klesající množství produkováných mastných kyselin s rostoucí teplotou, tento jev sledujeme na grafu (Obrázek 55). Také si můžeme všimnout rozdílů mezi jednotlivými médii, které se s rostoucí teplotou vyrovnávají. Největší produkce mastných kyselin byla naměřena v médiu 1 při teplotě 8 °C (37 %), naopak nejnižší obsah nalezneme v médiu 4 při teplotě 15 °C (9 %). Obecně byly sledovány podobnosti mezi médii s obsahem síranu amonného (médiá 1 a 2) a médii s močovinou (médiá 3 a 4). Distribuce mastných kyselin se významně mění s teplotou kultivace, a to na každém použitém médiu – zatímco při nižších teplotách je zastoupení PUFA až je 40%, při teplotě 30 °C je podíl PUFA zanedbatelný a převládají MUFA, což by mohlo souviset se strukturou membrán.



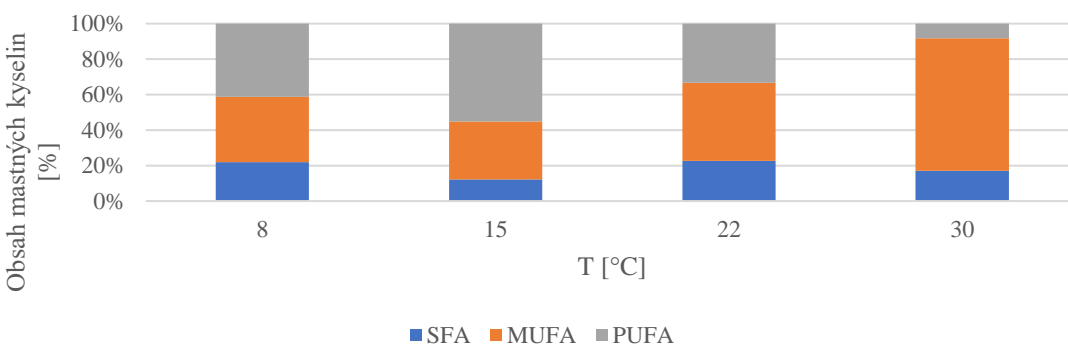
Obrázek 51: Složení mastných kyselin u kvasinky *C. infirmominiatum*, médium 1



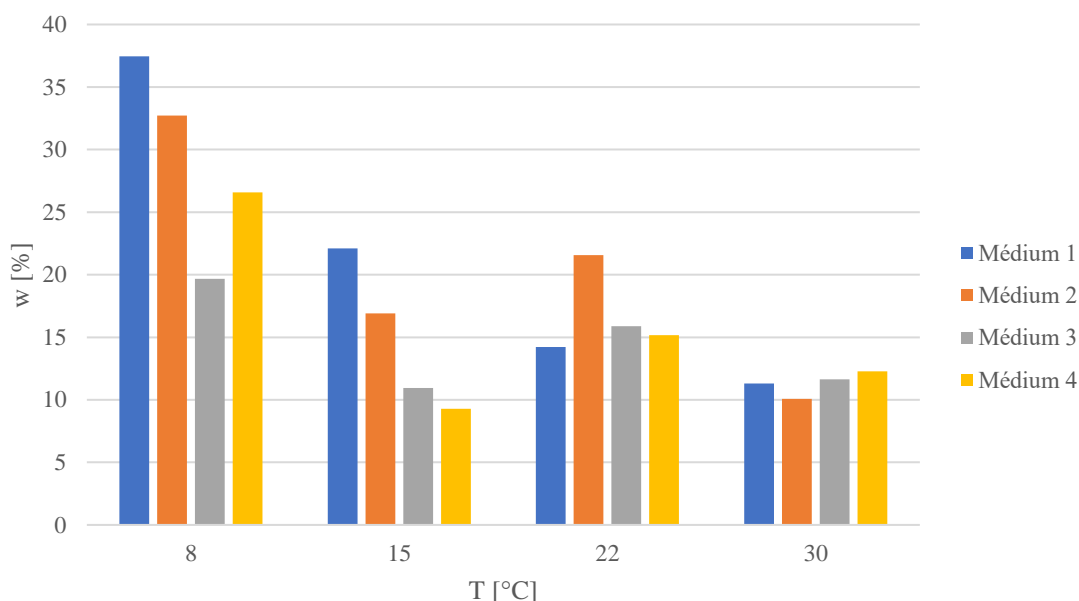
Obrázek 52: Složení mastných kyselin u kvasinky *C. infirmominiatum*, médium 2



Obrázek 53: Složení mastných kyselin u kvasinky *C. infirmominiatum*, médium 3



Obrázek 54: Složení mastných kyselin u kvasinky *C. infirmominiatum*, médium 4

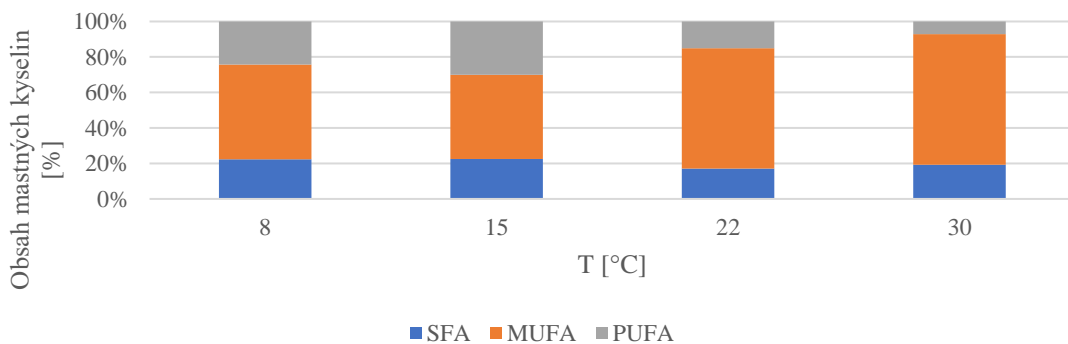


Obrázek 55: Závislost celkového množství mastných kyselin v navážkách biomasy *C. infirmominiatum* na teplotě

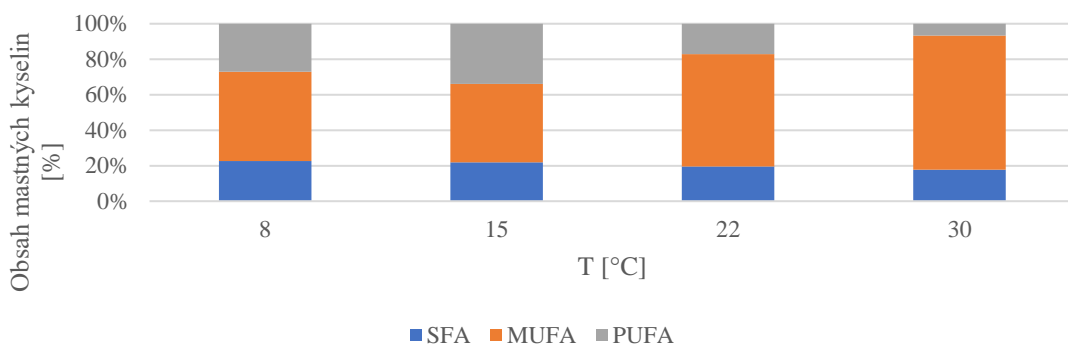
5.5.2 Produkce mastných kyselin u kvasinky *Sporidiobolus pararoseus*

I u této kvasinky byly pozorovány (Obrázek 56-59) rozdíly v distribuci mastných kyselin v závislosti na teplotě, podobně jako u *C. infirmominiatum*. S rostoucí teplotou byl pozorován rostoucí obsah MUFA, konstantní množství SFA a klesající obsah PUFA, přičemž zastoupení PUFA bylo celkově nižší (maximálně cca 25 %). U médií 1 a 2 bylo sledováno téměř shodné zastoupení SFA, MUFA a PUFA u jednotlivých teplot. Nejnižší obsah MUFA byl v těchto médiích stanoven při teplotách 15 °C. U médií 3 a 4 naopak sledujeme s rostoucí teplotou i růst obsahu MUFA na úkor SFA a PUFA. Rozdíly v zastoupení mastných kyselin i ve změnách distribuce s teplotou jsou zřejmě rodově závislé.

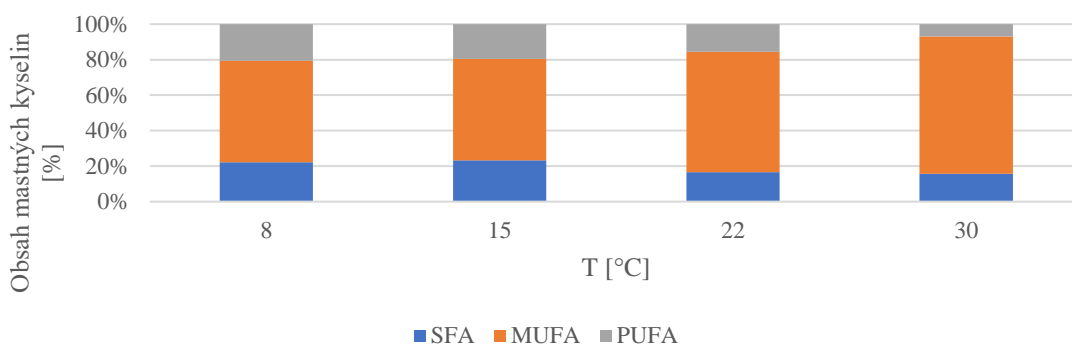
U kvasinky *S. pararoseus* bylo rovněž pozorováno (Obrázek 60) klesající množství produkovaných mastných kyselin s rostoucí teplotou. V médiu 1 došlo k úbytku mastných kyselin s rostoucí teplotou. U média 2 bylo sledováno konstantní množství mastných kyselin při teplotě od 8 do 22 °C a následně výrazný pokles při 30 °C. Při teplotě 30 °C došlo k vyrovnání produkci mastných kyselin ve všech médiích. Nejvyšší produkce byla zaznamenána v médiu 4 při teplotě 22 °C (40 %).



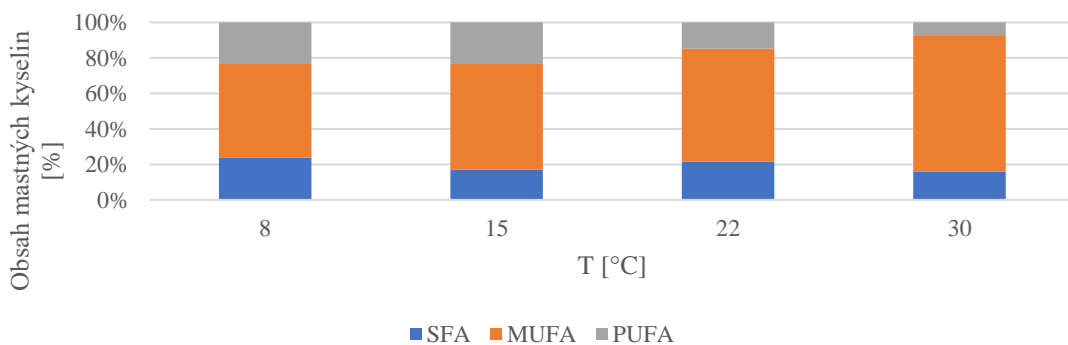
Obrázek 56: Složení mastných kyselin u kvasinky *S. pararoseus*, médium 1



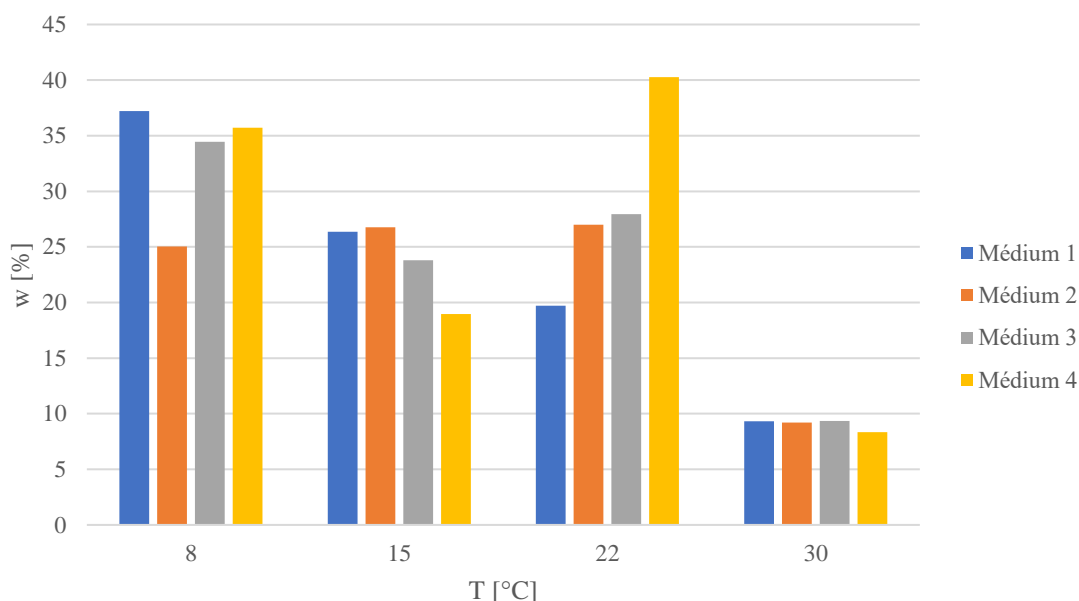
Obrázek 57: Složení mastných kyselin u kvasinky *S. pararoseus*, médium 2



Obrázek 58: Složení mastných kyselin u kvasinky *S. pararoseus*, médium 3



Obrázek 59: Složení mastných kyselin u kvasinky *S. pararoseus*, médium 4



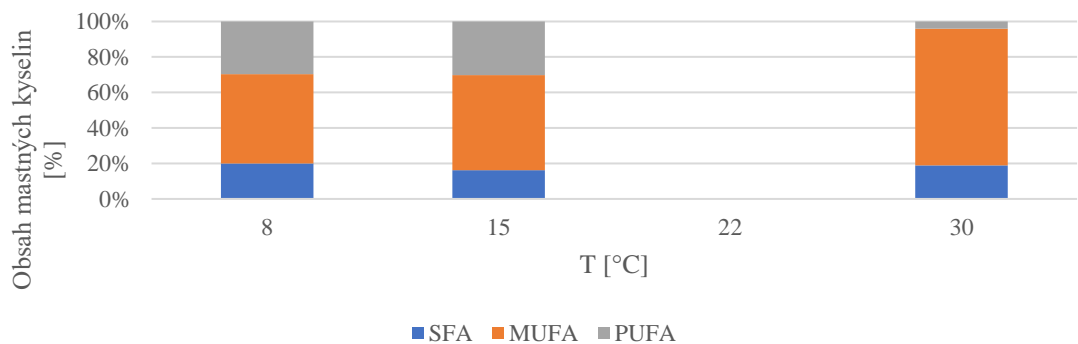
Obrázek 60: Závislost celkového množství mastných kyselin v navážkách biomasy *S. pararoseus* na teplotě

5.5.3 Produkce mastných kyselin u kvasinky *Phaffia rhodozyma*

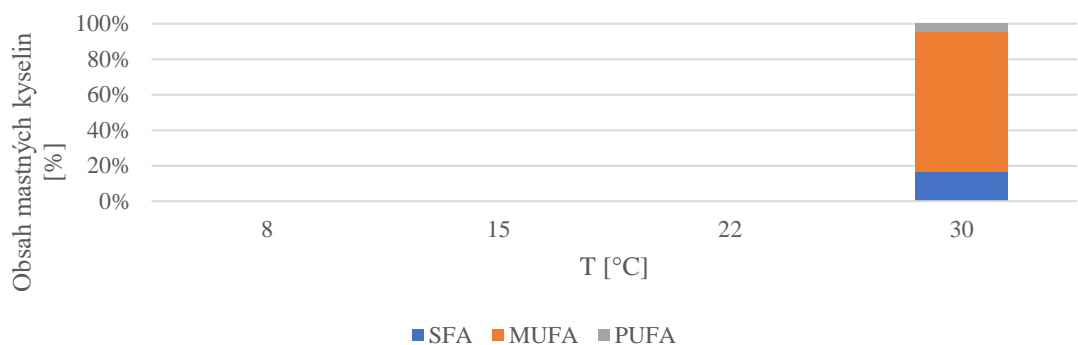
Stanovení mastných kyselin pro *P. rhodozyma* bylo provedeno pouze pro vzorky s dostatečným množstvím biomasy, z tohoto důvodu nejsou data kompletní. Při předpokladu analogického chování s předchozími kvasinkami je rovněž možné si povšimnout klesajícího procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase s rostoucí teplotou.

Na grafech (Obrázek 61-64) byla opět pozorována rozdílná distribuce mastných kyselin v závislosti na teplotě. Stabilní zastoupení MUFA v médiu 1 při teplotách 8 a 15 °C se s rostoucí teplotou zvyšuje a dosahuje až 76 % na úkor PUFA. V médiu 2 vidíme shodný výsledek při teplotě 30 °C, jako v médiích 1, 3 a 4 (výrazně vyšší produkce MUFA oproti SFA a PUFA). V médiu 4 při teplotách 8 a 15 °C došlo k vyrovnání koncentrací MUFA a PUFA a k mírnému poklesu SFA.

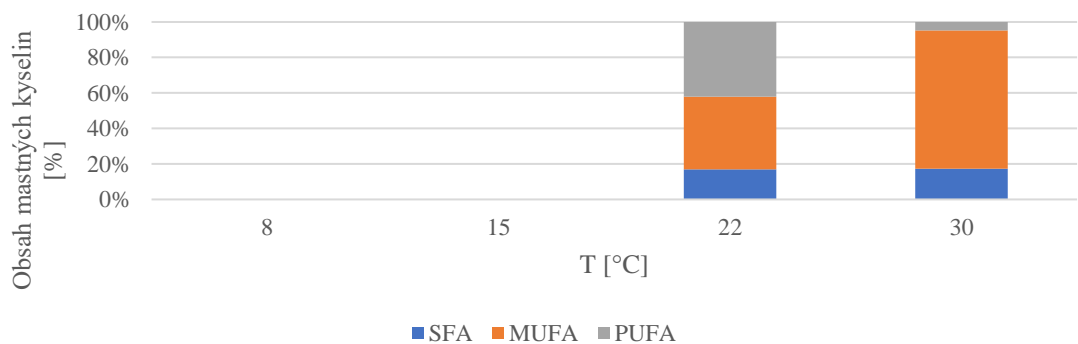
Z grafu (Obrázek 65) bylo zjištěno, že nejvíce mastných kyselin bylo vyprodukováno v médiu 1 při 8 °C. Při teplotě 30 °C došlo k vyrovnání koncentrací mastných kyselin v biomase ve všech médiích. Opět byla sledována klesající tendence množství mastných kyselin u média 1, ve kterém kvasinky dosahují nejvyššího obsahu při 8 °C.



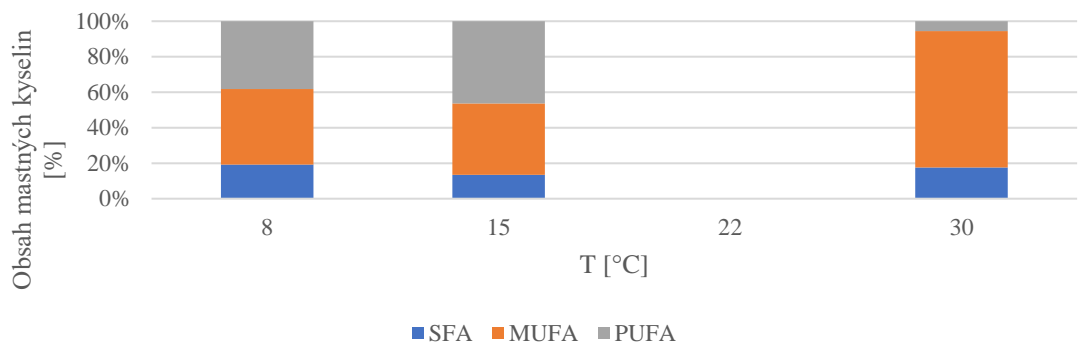
Obrázek 61: Složení mastných kyselin u kvasinky *P. rhodozyma*, médium 1



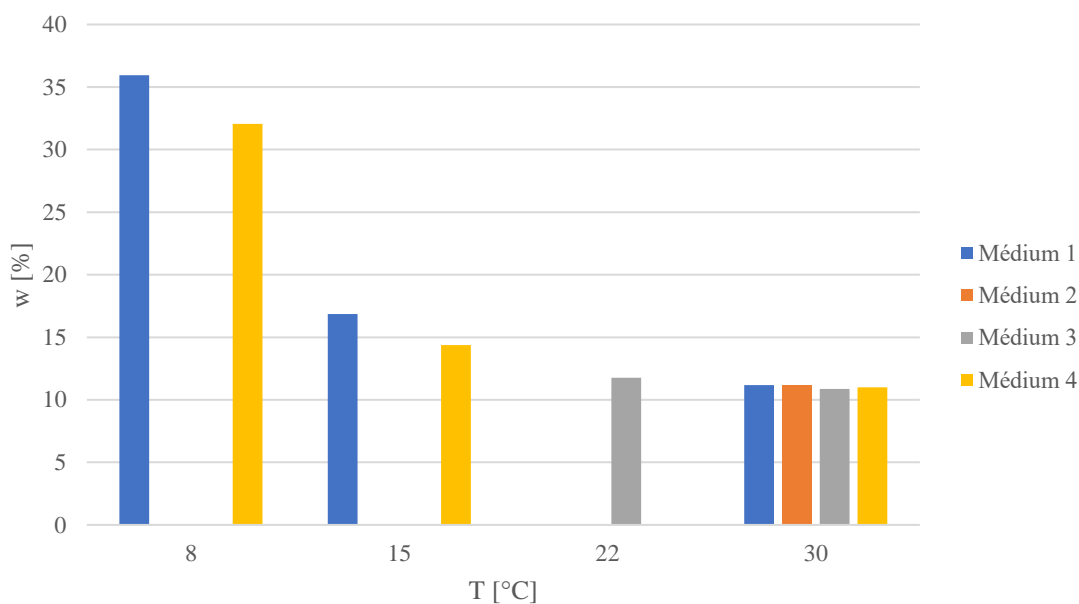
Obrázek 62: Složení mastných kyselin u kvasinky *P. rhodozyma*, médium 2



Obrázek 63: Složení mastných kyselin u kvasinky *P. rhodozyma*, médium 3



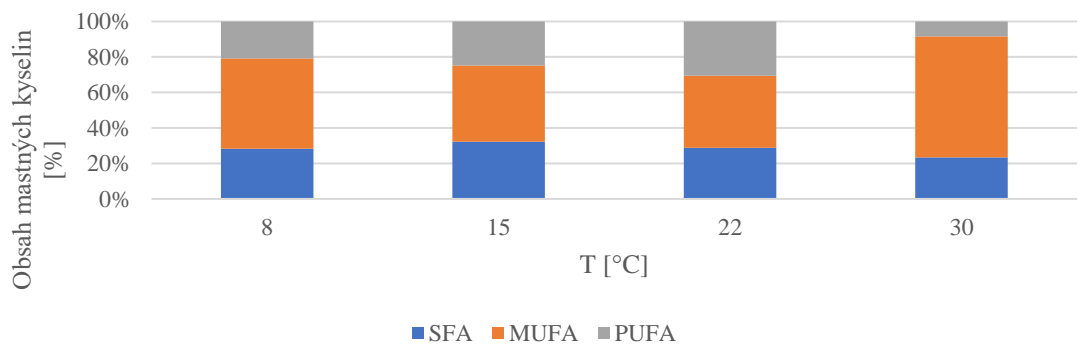
Obrázek 64: Složení mastných kyselin u kvasinky *P. rhodozyma*, médium 4



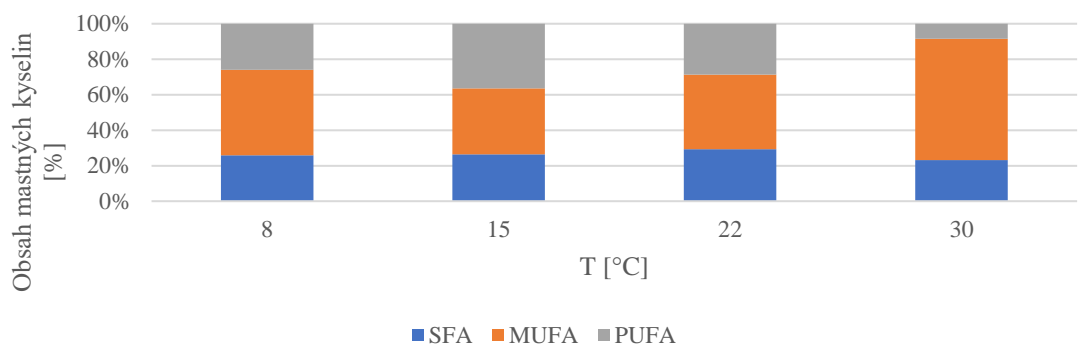
Obrázek 65: Závislost celkového množství mastných kyselin v navážkách biomasy *P. rhodozyma* na teplotě

5.5.4 Produkce mastných kyselin u kvasinky *Rhodotorula glutinis*

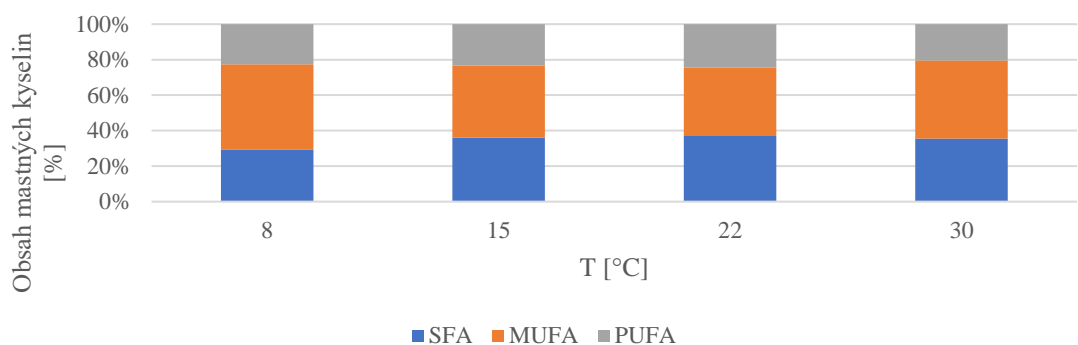
V rozmezí teplot 8 až 22 °C byla u média 1 (Obrázek 66) stejně jako u ostatních kmenů sledována klesající koncentrace MUFA a rostoucí PUFA, podíl SFA zůstal s minimálními rozdíly. Při teplotě 30 °C byl sledován pokles koncentrace SFA a prudký nárůst MUFA s poklesem PUFA. V případě medií 2 a 4 (Obrázek 67 a Obrázek 69) byly pozorovány podobné výsledky s poklesem koncentrace MUFA při teplotě 15 °C. V případě 30 °C došlo v médiu 4 (Obrázek 69) k nárůstu SFA a poklesu koncentrací MUFA a PUFA. V médiu 3 nebyly sledovány výraznější rozdíly se změnami teplot.



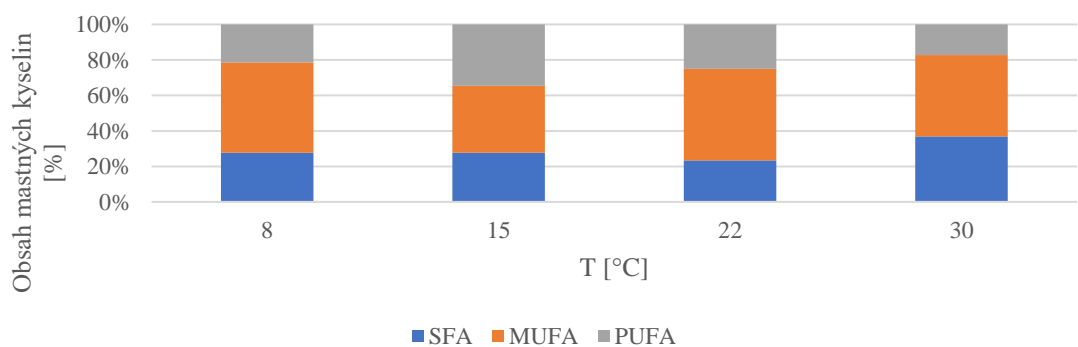
Obrázek 66: Zastoupení mastných kyselin u kvasinky *R. glutinis*, médium 1



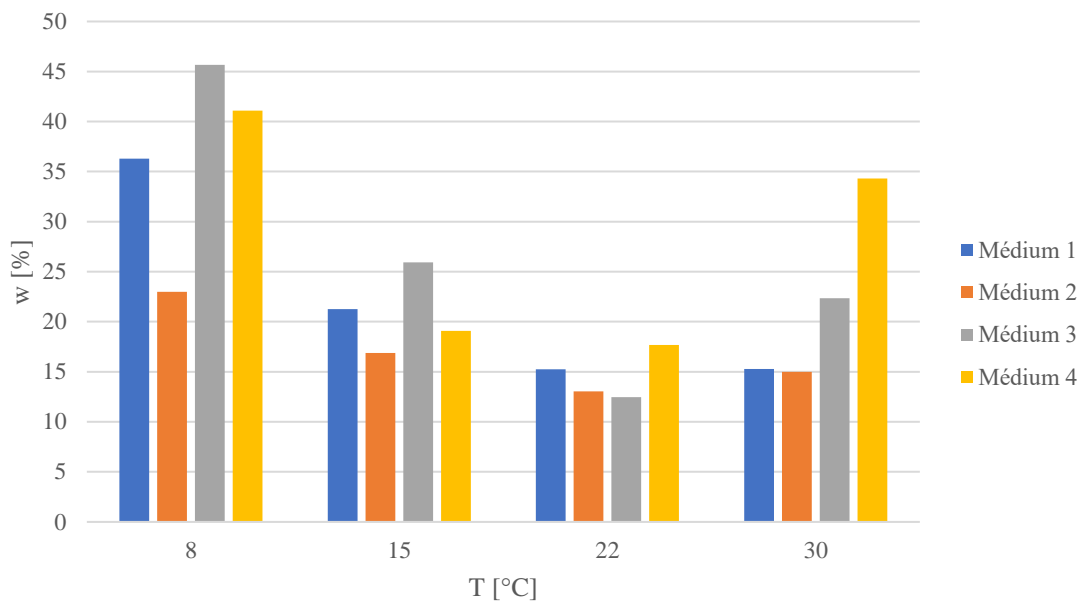
Obrázek 67: Zastoupení mastných kyselin u kvasinky *R. glutinis*, médium 2



Obrázek 68: Zastoupení mastných kyselin u kvasinky *R. glutinis*, médium 3



Obrázek 69: Zastoupení mastných kyselin u kvasinky *R. glutinis*, médium 4



Obrázek 70: Závislost celkového množství mastných kyselin v navážkách biomasy *R. glutinis* na teplotě

U kvasinky *R. glutinis* byly pozorovány výraznější rozdíly mezi médii. Jako u jediného druhu bylo zde zaznamenáno (Obrázek 70) největší zastoupení mastných kyselin v médiu 3 (u zbývajících kmenů vždy v médiu 1). Množství lipidů opět klesalo s teplotou kultivace, výjimkou byla média 3 a 4, u kterých při teplotě 30 °C byl sledován růst množství mastných kyselin. Je možné, že zde dochází již k působení teplotního stresu. U *R. glutinis* došlo k pozitivnímu vlivu močoviny, obsažené v médiích 3 a 4, na produkci lipidů.

6 ZÁVĚR

Beta-glukany jsou přírodní polymery složené z glukózových jednotek. Jsou široce zastoupeny v přírodě, obzvláště v řasách, houbách a kvasinkách, ale také ve vyšších rostlinách. U řady z nich byl již prokázán stimulační účinek na imunitu, mohou aktivovat imunitní systém, zvyšovat odolnost proti infekcím a mít protektivní účinek proti progresi rakovinných onemocnění.

V této diplomové práci byla zkoumána produkce β -glukanů u vybraných druhů kvasinek, řas, vyšších hub a obilovin. Zvláštní pozornost byla věnována karotenogenním kvasinkám, které dosud nebyly považovány za vydatné zdroje beta-glukanů. Pro kultivaci kvasinek byla zvolena čtyři různá média lišící se navzájem různými zdroji dusíku či jejich kombinací. Kromě složení média byl také sledován vliv teploty na produkci biomasy a výsledný obsah glukanů. Byly zvoleny čtyři odlišné teploty kultivace (8, 15, 22 a 30 °C).

U řasy *Euglena gracilis* byl sledován nárůst biomasy v médiu s octanem sodným (mixotrofní kultivace) a s přísadkou glukózy (heterotrofní kultivace, sledovány byly přísadky 10 a 20 g/l). Vzorky hub byly zakoupeny z komerčních zdrojů v čerstvé nebo sušené formě, a obiloviny byly pořízeny ve formě prášku (mouky). U vzorků kvasinek a hub byl analyzován obsah celkových glukanů a α -glukanů, na základě jejichž rozdílu byl poté stanoven obsah β -glukanů. U obilovin byl stanoven obsah beta-glukanů. U řas byl stanovován obsah paramylonu, který je zdrojem β -glukanů.

Při porovnání produkce biomasy u kvasinek, v různých médiích a při různých teplotách, byly dosažené výsledky porovnávány v rámci jednotlivých druhů. U kvasinky *S. cerevisiae* bylo dosaženo nejvyšších výtěžků při 22 °C v médiu 3 (jako zdroj dusíku zde byla použita močovina). Z porovnání s ostatními médii a výsledky lze přisoudit tyto zisky přítomnosti močoviny v médiu, která posloužila jako vhodný zdroj dusíku. Teplotní vliv na produkci biomasy nebyl zaznamenán pro kmen *C. infirmominatum*, u kterého byly patrné pouze nepatrné rozdíly i v závislosti na složení média. Pozitivní vliv zvyšující se teploty na produkci biomasy byl zaznamenán pro *S. pararoseus*, kdy nejvyšší nárůst biomasy byl u teploty 22 °C (při použití médií 1, 2 a 4), pouze u média 3 došlo k nejvyššímu růstu již při 15 °C. V médiu 3 je obsažena jako zdroj dusíku pouze močovina, u zbývajících médií jde o kvasničný extrakt v kombinaci se síranem amonným (médium 1), samotný síran amonný (médium 2) anebo kombinaci kvasničného extraktu a močoviny (médium 4). Nejvyšších produkcí bylo dosaženo v médiích obsahujících močovinu, nikoliv však v kombinaci s kvasničným extraktem (médium 3). *P. rhodozyma* dosahovala nejlepších výsledků opět v médiích s obsahem močoviny (média 3 a 4). S rostoucí teplotou obsah biomasy klesal u médií 3 a 4, opačně tomu bylo u média 1 (kombinace kvasničného extraktu se síranem amonným). V médiu 2 (zdroj dusíku byl síran amonný) nedocházelo k výraznému vlivu teploty na produkci biomasy. Nejvyššího nárůstu v médiu s močovinu bylo dosaženo také pro *R. glutinis*, kdy u kultivací při 15 °C a 22 °C bylo dosaženo nejvyšších zisků biomasy ze všech analyzovaných kmenů a podmínek.

U většiny kultivací byla pozorována souvislost mezi množstvím β -glukanů a produkcí biomasy. Nejlepším zdrojem dusíku pro produkci beta-glukanů byla u většiny kvasinek močovina, popřípadě její kombinace s kvasničným extraktem. Pouze v několika málo případech byl obsah β -glukanů nejvyšší u kultivací v médiu 1, které obsahuje kvasničný extrakt v kombinaci se síranem amonným. Nejvyšší obsah β -glukanů byl stanoven v biomase kvasinky *P. rhodozyma* (39 %), u kultivace při 8 °C v médiu 2. Produkce biomasy u *P. rhodozyma* je však za těchto podmínek nejnižší oproti jiným médiím. Při porovnání zisků biomasy a glukanů poté vychází nejlépe kultivace v médiu s obsahem močoviny a kvasničného extraktu při 15 °C (odběr ve 168. hodině), kdy byl naměřen obsah glukanů 36 %. Celkově nejstabilnějším a pravděpodobně nejvhodnějším kvasinkovým producentem glukanů pro případné průmyslové využití se jeví

kmen *Rhodotorula glutinis* CCY 20-7-26, která vykazovala nejvyšší produkce biomasy (cca 12-14 g/l) s poměrně vysokým zastoupením beta-glukanů (25-30 %). Současně tato kvasinka produkuje karotenoidní pigmenty, steroly, koenzym Q a lipidy, což představuje biotechnologicky zajímavý produkční systém využitelný k zisku jednotlivých skupin metabolitů nebo obohacené kvasinkové biomasy.

Přítomnost glukanů u vyšších hub byla prokázána u všech analyzovaných vzorků. Nejvyšší zastoupení celkových glukanů bylo naměřeno u hlívy ústřičné (téměř 30 %). Nejvíce α -glukanů bylo obsaženo u žampionu zahradního (5 %). β -glukany byly zastoupeny ve všech případech, nejvíce jich bylo obsaženo ve vzorcích hlívy ústřičné (27,8 %) a shiitake (24,3 %).

Z analyzovaných vzorků obilovin byly glukany jednoznačně potvrzeny u vzorků mladého ječmene, ječmene, žita a ovsa. Vzorky pšenice a rýže obsahovaly méně jak 0,1 g/100g. Největší zastoupení mají β -glukany v případě ovsa (4,1 g/100 g) a ječmene (3,3 g/100 g).

V případě *E. gracilis* byl nejvyšší nárůst biomasy u heterotrofní kultivace (10 g/l glukózy). Naopak, nejnižší množství bylo stanoveno u kultivace mixotrofní. Nejvíce paramylonu (vztaženého v % na množství sušiny) bylo naměřeno rovněž u heterotrofní kultivace (téměř 70 %) při koncentraci glukózy 10 g/l.

Produkce mastných kyselin byla zvýšena při nižších teplotách kultivace. Nejvyšší produkce mastných kyselin byla u *R. glutinis* v médiu s obsahem močoviny při kultivaci v 8 °C (45,6 %).

Celkově lze shrnout, že všechny analyzované materiály jsou za vhodných podmínek využitelné k produkci β -glukanů. Efektivní produkce lze dosáhnout zejména u kvasinek, které rostou rychle, heterotrofně a na poměrně levných médiích, přičemž produkce biomasy je v laboratorním měřítku kolem 15 g/l a obsah glukanů v této biomase dosahuje až 35 %. V průmyslovém měřítku lze předpokládat podstatně vyšší produkce biomasy, což činí kvasinky perspektivní. Za mimořádně zajímavé lze považovat zjištění týkající se simultánní produkce glukanů a dalších metabolitů karotenogenními kvasinkami. Zde je třeba podrobněji analyzovat strukturu a zejména biologické účinky těchto glukanů. Zajímavými producenty glukanů mohou být i řasy, zejména pokud by mohl být levně realizován autotrofní růst spotřebovávající CO₂.

7 POUŽITÉ ZDROJE

- [1] 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
- [2] SAMUELSEN, Anne Berit C., Jürgen SCHREZENMEIR a Svein H. KNUTSEN. Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans: A review. *Food Hydrocolloids*. 2014, 58(1), 183-193. DOI: 10.1002/mnfr.201300338. ISSN 16134125. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.201300338>
- [3] VĚTVIČKA, Václav. Beta Glukan: tajemství přírody. Brno: Gynpharma, 2011. ISBN 978-80-254-9143-0.
- [4] 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>
- [5] HOLUBOVÁ, Jana. Biologicky aktivní látky Hlívy ústříčné. Zlín, 2007. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Ing. Pavel Valášek, Csc.
- [6] VOLMAN, Julia J., Julian D. RAMAKERS a Jogchum PLAT. Dietary modulation of immune function by β -glucans. 2008, 94(2), 276-284. DOI: 10.1016/j.physbeh.2007.11.045. ISSN 00319384. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938407004702>
- [7] 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://hygiena.szu.cz/doi/10.21101/hygiena.a1500.html>
- [8] 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->
- [9] YAN, Jun, Daniel J 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>
- [10] CHARALAMPOPOULOS, D, R WANG, S.S PANDIELLA a C WEBB. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2002, 79(1-2), 131-141. DOI: 10.1016/S0168-1605(02)00187-3. ISSN 01681605. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160502001873>
- [11] MCGOVERN, P. E., J. ZHANG, J. TANG, et al. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004, 101(51), 17593-17598. DOI: 10.1073/pnas.0407921102. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0407921102>

- [12] SICARD, Delphine, Jean-Luc LEGRAS, J. TANG, et al. Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus Biologies*. 2011, 334(3), 229-236. DOI: 10.1016/j.crv.2010.12.016. ISSN 16310691. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1631069110003057>
- [13] LEGRAS, JEAN-LUC, DIDIER MERDINOGLU, JEAN-MARIE CORNUET, et al. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology*. 2007, 16(10), 2091-2102. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x. ISSN 0962-1083. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x>
- [14] MORTIMER, Robert K., Patrizia ROMANO, Giovanna SUZZI a Mario POLSINELLI. Genome renewal: A new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast*. 1994, 10(12), 1543-1552. DOI: 10.1002/yea.320101203. ISSN 0749-503X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/yea.320101203>
- [15] MASEL, Joanna, David N. LYTTLE, Giovanna SUZZI a Mario POLSINELLI. The consequences of rare sexual reproduction by means of selfing in an otherwise clonally reproducing species: A new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Theoretical Population Biology*. 2011, 80(4), 317-322. DOI: 10.1016/j.tpb.2011.08.004. ISSN 00405809. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040580911000736>
- [16] SAMPAIO, José Paulo, Stanisław BŁAŻEJAK, Agnieszka KURCZ, Iwona GIENKA a Marek KIELISZEK. *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *The Yeasts*. Elsevier, 2011, 2011, 100(14), 1423-1432. DOI: 10.1016/B978-0-444-52149-1.00111-7. ISBN 9780444521491. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444521491001117>
- [17] ALKORTA, Itziar, Carlos GARBISU, María J. LLAMA, Juan L. SERRA a Marek KIELISZEK. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*. Elsevier, 1998, 2011, 33(1), 21-28. DOI: 10.1016/S0032-9592(97)00046-0. ISBN 9780444521491. ISSN 13595113. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959297000460>
- [18] VESELÁ, Markéta. *Produkce beta-glukanů vybranými druhy kvasinek, řas a sinic*. Brno, 2018. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [19] CAVELLO, Ivana, Agustín ALBANESI, Dante FRATEBIANCHI, Gabriela GARMEDIA, Silvana VERO a Sebastián CAVALITTO. Pectinolytic yeasts from cold environments: novel findings of *Guehomyces pullulans*, *Cystofilobasidium infirmominium* and *Cryptococcus adeliensis* producing pectinases. *Extremophiles*. 2017, 21(2), 319-329. DOI: 10.1007/s00792-016-0904-0. ISSN 1431-0651. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00792-016-0904-0>
- [20] SAMPAIO, José Paulo. *Sporidiobolus Nyland* (1949). *The Yeasts*. Elsevier, 2011, 2011, , 1549-1561. DOI: 10.1016/B978-0-444-52149-1.00130-0. ISBN 9780444521491. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444521491001300>
- [21] KURTZMAN, C., FELL, J., BOEKHOUT, T. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 5th ed. 2011. ISBN 978-0-444-52149-1.

- [22] KUCSERA, Judit, Ilona PFEIFFER a Kanji TAKEO. Biology of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Mycoscience*. 2000, 41(3), 195-199. DOI: 10.1007/BF02489671. ISSN 13403540. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1340354000707947>
- [23] KOT, Anna M., Stanisław BŁAŻEJAK, Agnieszka KURCZ, Iwona GIENKA a Marek KIELISZEK. *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100(14), 6103-6117. DOI: 10.1007/s00253-016-7611-8. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7611-8>
- [24] LEVINE, Ira A. a Joël FLEURENCE, ed. *Microalgae in Health and Disease Prevention*. 1. London: Academic Press, 2018. ISBN 978-0-12-811405-6.
- [25] ADL, Sina M., Alastair G. B. SIMPSON, Christopher E. LANE, et al. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2012, 59(5). DOI: 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x. ISSN 10665234. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>
- [26] KURTZMAN, Cletus P. a Jack W. FELL. *Yeast Systematics and Phylogeny — Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology*. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006, , 11-30. *The Yeast Handbook*. DOI: 10.1007/3-540-30985-3_2. ISBN 3-540-26100-1. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/3-540-30985-3_2
- [27] WALKER, Karen, Henry SKELTON a Kathleen SMITH. *Cutaneous lesions showing giant yeast forms of Blastomyces dermatitidis*. *Journal of Cutaneous Pathology*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2002, 29(10), 616-618. *The Yeast Handbook*. DOI: 10.1034/j.1600-0560.2002.291009.x. ISBN 3-540-26100-1. ISSN 0303-6987. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0560.2002.291009.x>
- [28] BALASUBRAMANIAN, Mohan K., Erfei BI a Michael GLOTZER. *Comparative Analysis of Cytokinesis in Budding Yeast, Fission Yeast and Animal Cells: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts*. *Current Biology*. 2004, 14(18), R806-R818. DOI: 10.1016/j.cub.2004.09.022. ISSN 09609822. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982204006980>
- [29] BARNETT, J. A. *The Entry of D-Ribose into some Yeasts of the Genus Pichia*. *Journal of General Microbiology*. 1975, 90(1), 1-12. DOI: 10.1099/00221287-90-1-1. ISSN 0022-1287. Dostupné také z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-90-1-1>
- [30] ARTHUR, H a K WATSON. *Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts*. *Journal of Bacteriology*. 1976, 128(1), 56-68. DOI: 10.1128/JB.128.1.56-68.1976. ISSN 0021-9193. Dostupné také z: <https://JB.asm.org/content/128/1/56>
- [31] HERRERA, Carlos M. a María I. POZO. *Nectar yeasts warm the flowers of a winter-blooming plant: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2010, 277(1689), 1827-1834. DOI: 10.1098/rspb.2009.2252. ISSN 0962-8452. Dostupné také z: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2009.2252>

- [32] OYEKA, C. A. a L. O. UGWU. Fungal flora of human toe webs: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. *Mycoses*. 2002, 45(11-12), 488-491. DOI: 10.1046/j.1439-0507.2002.00796.x. ISSN 09337407. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1439-0507.2002.00796.x>
- [33] BOTSTEIN, David, Gerald R. FINK a Michael GLOTZER. Yeast: An Experimental Organism for 21st Century Biology. *Genetics*. 2011, 189(3), 695-704. DOI: 10.1534/genetics.111.130765. ISSN 0016-6731. Dostupné také z: <http://www.genetics.org/lookup/doi/10.1534/genetics.111.130765>
- [34] THURMAN, Harold V. *Introductory oceanography*. 8th ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, c1997. ISBN 0132620154.
- [35] Microscopic algae produce half the oxygen we breathe - The Science Show - ABC Radio National. ABC (Australian Broadcasting Corporation) [online]. Copyright © [cit. 27.03.2020]. Dostupné z: <https://www.abc.net.au/radionational/programs/scienceshow/microscopic-algae-produce-half-the-oxygen-we-breathe/5041338>
- [36] CARDOZO, Karina H.M., Thais GUARATINI, Marcelo P. BARROS, et al. Metabolites from algae with economical impact. 2007, 146(1-2), 60-78. DOI: 10.1016/j.cbpc.2006.05.007. ISSN 15320456. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045606001530>
- [37] A place in the sun | Flanders Today. Home | Flanders Today [online]. Copyright © Filip Van Roe [cit. 27.03.2020]. Dostupné z: <http://www.flanderstoday.eu/current-affairs/place-sun>
- [38] BONACHELA, J. A., M. RAGHIB, S. A. LEVIN, et al. Dynamic model of flexible phytoplankton nutrient uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011, 108(51), 20633-20638. DOI: 10.1073/pnas.1118012108. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1118012108>
- [39] ZULLAIKAH, Siti, Adi Tjipto UTOMO, Medina YASMIN, et al. Ecofuel conversion technology of inedible lipid feedstocks to renewable fuel. *Advances in Eco-Fuels for a Sustainable Environment*. Elsevier, 2019, 2019, 108(51), 237-276. DOI: 10.1016/B978-0-08-102728-8.00009-7. ISBN 9780081027288. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081027288000097>
- [40] VĚTVIČKA, Václav. *Beta Glukan: tajemství přírody*. Brno: Gynpharma, 2011. ISBN 978-80-254-9143-0.
- [41] LATGÉ, Jean-Paul. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*. 2007, 66(2), 279-290. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x. ISSN 0950-382X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x>
- [42] DICKINSON, J. Richard a Michael SCHWEIZER. *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, c2004. ISBN 0415299004.
- [43] KOLLÁR, Roman, Bruce B. REINHOLD, Eva PETRÁKOVÁ, et al. Architecture of the Yeast Cell Wall. *Journal of Biological Chemistry*. 1997, 272(28), 17762-17775. DOI: 10.1074/jbc.272.28.17762. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.272.28.17762>
- [44] HURTADO-GUERRERO, Ramon, Alexander W. SCHÜTTELKOPF, Isabelle MOUYNA, et al. *Molecular Mechanisms of Yeast Cell Wall Glucan*

- Remodeling. *Journal of Biological Chemistry*. 2009, 284(13), 8461-8469. DOI: 10.1074/jbc.M807990200. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M807990200>
- [45] ADAMS, David J., Alexander W. SCHÜTTELKOPF, Isabelle MOUYNA, et al. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. 2004, 150(7), 2029-2035. DOI: 10.1099/mic.0.26980-0. ISSN 1350-0872. Dostupné také z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.26980-0>
- [46] KIM, Kwangwook, Amy EHRLICH, Vivian PERNG, et al. Algae-derived β -glucan enhanced gut health and immune responses of weaned pigs experimentally infected with a pathogenic *E. coli*. *Animal Feed Science and Technology*. 2019, 248, 114-125. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2018.12.004. ISSN 03778401. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840118306783>
- [47] Yasmin Daglio, María Laura Salum, María Cecilia Rodríguez, Rosa Erra-Balsells, María Cristina Matulewicz. (2018) Characterization of nutrient status of *Halophora luciae* (Bacillariophyceae) using matrix-assisted ultraviolet laser-desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *European Journal of Phycology* 53:3, pages 422-432.
- [48] KIM, Kwangwook, Amy EHRLICH, Vivian PERNG, et al. Algae-derived β -glucan enhanced gut health and immune responses of weaned pigs experimentally infected with a pathogenic *E. coli*. *Animal Feed Science and Technology*. 2019, 248, 114-125. DOI: doi:10.1007/BF00385311. ISSN 03778401. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840118306783>
- [49] MONFILS, Anna K., Richard E. TRIEMER, Emily F. BELLAIRS, et al. Characterization of paramylon morphological diversity in photosynthetic euglenoids (Euglenales, Euglenophyta). *Phycologia*. 2019, 50(2), 156-169. DOI: 10.2216/09-112.1. ISSN 0031-8884. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2216/09-112.1>
- [50] SCHULZE, Christian, Martin WETZEL, Jakob REINHARDT, et al. 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>
- [51] MINTZ-COLE, Rachael A., Eric B. BRANDT, Stacey A. BASS, et al. Surface availability of beta-glucans is critical determinant of host immune response to *Cladosporium cladosporioides*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013, 132(1), 159-169.e2. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.01.003. ISSN 00916749. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674913000584>
- [52] 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: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852405004268>
- [53] GONZAGA, Maria Leônia C., Thiago M.F. MENEZES, José Roberto R. DE SOUZA, Nágila M.P.S. RICARDO a Sandra de A. SOARES. Structural characterization of β glucans isolated from *Agaricus blazei* Murill using NMR and FTIR spectroscopy. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 2013, 2(2), 152-156. DOI: 10.1016/j.bcdf.2013.10.005. ISSN 22126198. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212619813000466>

- [54] KWIATKOWSKI, Stefan, Stefan EDGAR, José Roberto R. DE SOUZA, Nágila M.P.S. RICARDO a Sandra de A. SOARES. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Glucan Polysaccharides – Occurrence, Separation and Application in Food, Feed and Health Industries. The Complex World of Polysaccharides. InTech, 2012, 2012-10-31, 2(2), 152-156. DOI: 10.5772/48100. ISBN 978-953-51-0819-1. ISSN 22126198. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/the-complex-world-of-polysaccharides/yeast-saccharomyces-cerevisiae-glucan-polysaccharides-occurrence-separation-and-application-in-food->
- [55] BARRIENTOS, Rodell C., Melody M. CLERIGO a Anamy Ma. C. 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(15), 226-234. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.08.044. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016312363>
- [56] MCCLEARY, Barry V a Anna DRAGA. Measurement of β -Glucan in Mushrooms and Mycelial Products. Journal of AOAC INTERNATIONAL. 2016, 99(2), 364-373. DOI: 10.5740/jaoacint.15-0289. ISSN 1060-3271. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/jaoac/article/99/2/364-373/5658031>
- [57] STIER, Heike, Veronika EBBESKOTTE a Joerg GRUENWALD. Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1,3/1,6-D-glucan. Nutrition Journal. 2014, 13(1). DOI: 10.1186/1475-2891-13-38. ISSN 1475-2891. Dostupné také z: <http://nutritionj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2891-13-38>
- [58] PILLEMER, L., M. D. SCHOENBERG, L. BLUM a L. WURZ. Properdin System and Immunity: II. Interaction of the Properdin System with Polysaccharides. Science. 1955, 122(3169), 545-549. DOI: 10.1126/science.122.3169.545. ISSN 0036-8075. Dostupné také z: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.122.3169.545>
- [59] 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: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643814001212>
- [60] BELCARZ, Anna, Grażyna GINALSKA, Teodozja PYCKA, Aneta ZIMA, Anna ŚLÓŠARCZYK, Izabela POLKOWSKA, Zofia PASZKIEWICZ a Wojciech PIEKARCZYK. Application of β -1,3-glucan in production of ceramics-based elastic composite for bone repair. Open Life Sciences. 2013, 8(6), 113-118. DOI: 10.2478/s11535-013-0169-2. ISSN 2391-5412. Dostupné také z: <http://www.degruyter.com/view/j/biol.2013.8.issue-6/s11535-013-0169-2/s11535-013-0169-2.xml>
- [61] PILLAI, R., M. REDMOND, J. RODING, Aneta ZIMA, Anna ŚLÓŠARCZYK, Izabela POLKOWSKA, Zofia PASZKIEWICZ a Wojciech PIEKARCZYK. Anti-Wrinkle Therapy: Significant New Findings in the Non-Invasive Cosmetic Treatment of Skin Wrinkles with Beta-Glucan. International Journal of Cosmetic Science. 2005, 27(5), 292-292. DOI: 10.1111/j.1463-1318.2005.00268_3.x. ISSN 0142-5463. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1463-1318.2005.00268_3.x
- [62] GORDON, M.H., M. REDMOND, J. RODING, Aneta ZIMA, Anna ŚLÓŠARCZYK, Izabela POLKOWSKA, Zofia PASZKIEWICZ a Wojciech PIEKARCZYK. FATS |

- Occurrence: Significant New Findings in the Non-Invasive Cosmetic Treatment of Skin Wrinkles with Beta-Glucan. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Elsevier, 2003, 2003, 63(4), 2293-2296. DOI: 10.1016/B0-12-227055-X/00702-1. ISBN 9780122270550. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B012227055X007021>
- [63] Baschong, W., Monglat, S., & Ochs, D. (2009). Glucan compositions. US patent 0156563 A1.
- [64] GARAY, Luis A., Kyria L. BOUNDY-MILLS a J. Bruce GERMAN. Accumulation of High-Value Lipids in Single-Cell Microorganisms: A Mechanistic Approach and Future Perspectives. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2014, 62(13), 2709-2727. DOI: 10.1021/jf4042134. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf4042134>
- [65] PATEL, Alok, Io ANTONOPOULOU, Josefine ENMAN, Ulrika ROVA, Paul CHRISTAKOPOULOS a Leonidas MATSAKAS. Lipids detection and quantification in oleaginous microorganisms: an overview of the current state of the art. BMC Chemical Engineering. 2019, 1(1). DOI: 10.1186/s42480-019-0013-9. ISSN 2524-4175. Dostupné také z: <https://bmcchemeng.biomedcentral.com/articles/10.1186/s42480-019-0013-9>
- [66] VÍT, R. Analýza a charakterizace beta-glukanů z vybraných přírodních zdrojů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 56 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..
- [67] SHAHINIAN, Serge a Howard BUSSEY. B-1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Microbiology. 2000, 35(3). DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01713.x. ISSN 0950382X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2000.01713.x>
- [68] HUNTER, K.W., R.A. GAULT a M.D. BERNER. Preparation of microparticulate beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. Letters in Applied Microbiology. 2002, 35(4), 267-271. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2002.01201.x. ISSN 0266-8254. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1472-765X.2002.01201.x>
- [69] DELATTE, Stephen J., Jill EVANS, André HEBRA, William ADAMSON, H.Biemann OTHERSEN a Edward P. TAGGE. Effectiveness of beta-glucan collagen for treatment of partial-thickness burns in children. Journal of Pediatric Surgery. 2001, 36(1), 113-118. DOI: 10.1053/jpsu.2001.20024. ISSN 00223468. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022346801921104>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

GRAS	Generally Recorgnized as Safe
FDA	US Food and Drug Administration
OD	Optická hustota
DCW	Sušená buněčná biomasa
SFA	Nasyčené mastné kyseliny
MUFA	Mononenasycené mastné kyseliny
PUFA	Polynenasycené mastné kyseliny