



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

CHARAKTERIZACE KVASINKOVÝCH A ŘASOVÝCH METABOLITŮ POMOCÍ INSTRUMENTÁLNÍCH TECHNIK

CHARACTERIZATION OF YEAST AND ALGAE METABOLITES BY INSTRUMENTAL
TECHNIQUES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Klára Kurowska

VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1439/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Klára Kurowska**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Němcová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Charakterizace kvasinkových a řasových metabolitů pomocí instrumentálních technik

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

1. Rešerše zaměřená na biologicky aktivní látky kvasinek a řas
2. Optimalizace metod stanovení karotenoidů, sterolů lipidů a dalších metabolitů; kultivace
3. Aplikace optimalizovaných metod na stanovení vybraných metabolitů v biomase karotenoidních kvasinek a mikrořas
4. 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. Klára Kurowska
student(ka)

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá analýzou a produkcí vybraných mikrobiálních metabolitů kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae* v porovnání s různými druhy mikrořas. V teoretické části byly shrnuty poznatky o podmínkách pro optimální růst a produkci sekundárních metabolitů. Dále byly popsány analytické metody, pomocí kterých byly metabolity kvantifikovány a vyhodnoceny. V rámci experimentální části této práce bylo studováno množství na akumulované biomasy, exoglykolipidů, intracelulárních lipidů, fykobiliproteinů a karotenoidů dle různých zdrojů živin v kultivačním médiu. Konkrétně byly zkoumány výtěžky těchto metabolitů při utilizaci různých zdrojů dusíku (kvasničný extrakt, močovina, síran amonný, chlorid amonný a dusičnan draselný), uhlíku (glukóza, manóza, xylóza, glycerol a laktóza) a při variabilních C/N poměrech (20; 40; 70; 100 a 120:1) ideálně vybraných zdrojů sledovaných živin v dílčích experimentech. Poslední část experimentální části byla zaměřena na srovnání analýz metabolitů autotrofních řas (chlorofyly, fykobiliproteiny a lipidy).

KLÍČOVÁ SLOVA:

Rhodotorula kratochvilovae, mikrořasy, kultivace, karotenoidy, HPLC, GC

ABSTRACT

The presented diploma thesis deals with the analysis and production of selected microbial metabolites of the yeast *Rhodotorula kratochvilovae* in comparison to various species of microalgae. The theoretical part summarizes the knowledge about the conditions for optimal growth and production of secondary metabolites. Analytical methods, by which metabolites were quantified and evaluated, were also described. In the experimental part of this thesis, the amount of accumulated biomass, exoglycolipids, intracellular lipids, phycobiliproteins and carotenoids according to various nutrient sources in the culture medium was studied. Specifically, the yields of these metabolites were investigated in the utilization of various sources of nitrogen (yeast extract, urea, ammonium sulfate, ammonium chloride and potassium nitrate), carbon (glucose, mannose, xylose, glycerol and lactose) and at variable C / N ratios (20; 40; 70; 100 and 120: 1) ideally selected sources of observed nutrients in partial experiments. The last part of the experiment was focused on comparison of the analysis of metabolites of autotrophic algae (chlorophylls, phycobiliproteins and lipids).

KEYWORDS:

Rhodotorula kratochvilovae, microalgae, cultivation, carotenoids, HPLC, GC

KUROWSKA, Klára. *Charakterizace kvasinkových a řasových metabolitů pomocí instrumentálních technik*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124176>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Andrea Němcová.

Prohlášení

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

.....

podpis studenta

Poděkování

Velmi ráda bych tímto poděkovala své vedoucí diplomové práce **Ing. Andrei Němcové, Ph.D** za cenné rady a připomínky během psání mé diplomové práce. Dále bych velmi ráda poděkovala za pomoc, podporu, rady a čas strávený při osobních konzultacích **Ing. Daně Byrtusové**.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za psychickou i finanční podporu během celého studia.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Biologické vlastnosti karotenoidů	8
2.1.1 Antioxidační vlastnosti	8
2.2 Produkce mikrobiálních karotenoidů	10
2.2.1 Metabolická dráha syntézy karotenoidů (mevalonátová dráha)	11
2.2.2 Metabolická dráha syntézy karotenoidů (non-mevalonátová dráha)	11
2.3 Karotenogenní kvasinky	13
2.4 Fotoautotrofní mikroorganismy	14
2.4.1 Sinice	14
2.4.2 Mikrořasy	15
2.5 Faktory ovlivňující produkci karotenoidů u karotenogenních kvasinek	16
2.6 Faktory ovlivňující produkci barevných pigmentů u <i>Haematococcus pluvialis</i>	16
2.7 Mikrobiální lipidy a glykolipidy	17
2.7.1 Lipidy	17
2.7.2 Glykolipidy	19
2.8 Analytické metody	20
2.8.1 Analýza mikrobiálních pigmentů	20
2.8.1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	21
2.8.2 Plynová chromatografie (GC)	22
2.8.2.1 Využití plynové chromatografie při analýze mastných kyselin	23
3 CÍL PRÁCE	25
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1 Materiál a chemikálie	26
4.2 Přístroje a pomůcky	27
4.3 Mikroorganismy	27
4.4 Kultivace mikroorganismů	28
4.4.1 Kultivace kvasinek	28
4.4.2 Kultivace mikrořas	29
4.5 Zpracování biomasy	31
4.6 Izolace a analýza karotenoidů	31
4.7 Izolace a analýza fykobiliproteinů	32

4.8 Analýza lipidů.....	32
4.9 Izolace a analýza exoglykolipidů	33
5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	34
5.1 Optimalizace kultivačních podmínek pro produkci exoglykolipidů a intracelulárních metabolitů u karotenogenních kvasinek	34
5.1.1 Vliv zdroje dusíku na produkci vybraných metabolitů	34
5.1.2 Vliv zdroje uhlíku na produkci vybraných metabolitů.....	39
5.1.3 Vliv různých C/N poměrů na produkci vybraných metabolitů	52
5.2 Screening produkce vybraných metabolitů u řas a sinic	59
6 ZÁVĚR.....	64
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	67
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	84
9 PŘÍLOHY.....	86

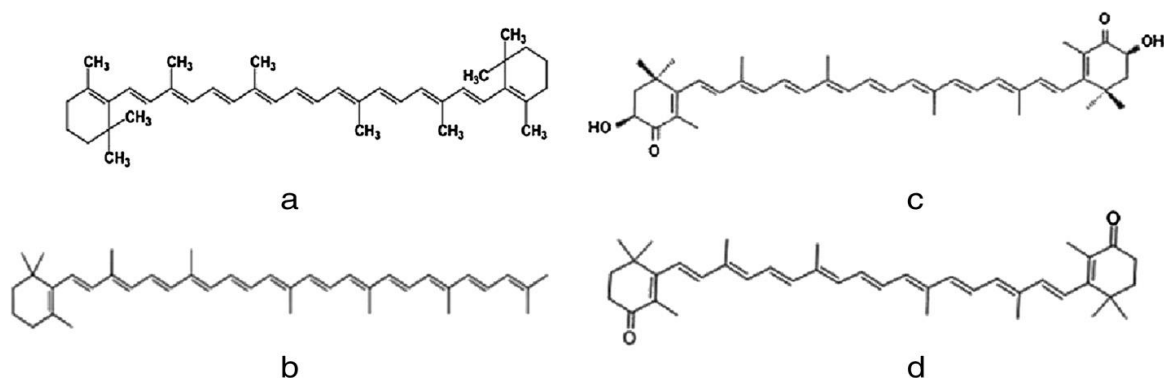
1 ÚVOD

Karotenoidy, a jiné mikrobiální pigmenty, jako například chlorofyl, patří mezi nejdůležitější složky vyskytující se v potravinách. Jedná se o přírodní barviva, se spektrem barev od žluté po červenou (karotenoidy) a od zelené po hnědou (chlorofyly). Některé karotenoidy jsou navíc prekurzory vitamínu A. Producenty barevných pigmentů mohou být například vyšší i nižší rostliny a také mikroorganismy (kvasinky, bakterie, mikrořasy a sinice), u kterých je momentálně prováděna celá řada výzkumů pro průmyslové využití, jakožto producenti daných látek. Chemicky se jedná o lipofilní látky, z nichž většina tvoří čtyřiceti-uhlíkové terpenoidy, které působí jako antioxidanty. U nefotosyntetických organismů jsou karotenoidy důležité při ochraně před fotooxidačním poškozením. Zájem o karotenoidy značně vzrostl, a to zejména v důsledku jejich aplikací v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Dalším významným produktem mikroorganismů, který je zde nutno zmínit, jsou lipidy, produkované oleogenními mikroorganismy. Ty mají uplatnění při produkci biopaliv nebo jako potravinová aditiva. Nejčastěji zde hovoříme o nenasycených mastných kyselinách akumulovaných některými mikroorganismy v buňce za specifických kultivačních podmínek. Pro efektivní produkci daných látek je nutné optimalizovat kultivační podmínky a analytické metody pro jejich stanovení.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biologické vlastnosti karotenoidů

Karotenoidy jsou terpenoidní pigmenty se 40-ti atomy uhlíku odvozené biosynteticky ze dvou jednotek isopentenyl-pyrofosfátu. V závislosti na jejich chemické struktuře rozlišujeme xantofyly (ve své molekule obsahují kyslík, např. astaxanthin) a bezkyslíkaté karoteny (β -karoten a torulen). Chemické struktury některých karotenů jsou znázorněny na Obr. 1 [1-5].



Obr. 1: Molekuly karotenoidů: a) β -karoten, b) torulen; xantofylů: c) astaxanthin, d) canthaxanthin [8]

Obvykle se karotenoidy interpretují jako prekurzor vitamínu A, proto jsou známy jako nutričně vysoce hodnotné molekuly. Nízký příjem vitamínu A je nutričním problémem v nerozvinutých oblastech světa. V důsledku jeho nedostatečného příjmu vznikají onemocnění jako problémy s produkcí slz, slepota (hlavně u dětí) a také předčasná smrt. Vitamín A tedy nejen že udržuje v dobrém stavu oční epitel, ale má dobrý vliv i na systémové funkce jako jsou růst a reprodukční účinnost. Molekula karotenoidů vykazuje antioxidační vlastnosti, díky své cyklické struktuře, která je propojená s řetězcem uhlíku [6-8].

2.1.1 Antioxidační vlastnosti

Konjugovaný polyenový řetězec karotenoidů poskytuje chemickou reaktivitu proti oxidačním činidlům a volným radikálům, které by mohly poškodit esenciální buněčné složky. Tato reaktivita činí karotenoidy účinnými chytači singletového molekulárního kyslíku a peroxylových radikálů a umožňuje rozptýlit energii z fotosenzibilizátorů. Různé karotenoidy mají různou účinnost ke zhašení singletového molekulárního kyslíku a k interakci s volnými radikály a mohou tak působit synergicky s jinými antioxidanty přítomnými v buňkách.

Celkově jsou karotenoidy široce přijímány jako ochranná činidla proti oxidačnímu stresu a různá pozorování podporují tuto biologickou úlohu také u hub [9-13].

Oxidační stres je také způsoben reaktivními kyslíkovými formami (ROS), které vznikají normálním buněčným metabolismem, jako je superoxidový anion ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál ($\cdot OH$). Expozice peroxidu vodíku zvyšuje akumulaci karotenoidů v různých houbách. Například, dochází ke zvýšení obsahu β -karotenu u *Blakeslea trispora*, astaxanthinu u *Phaffia rhodozyma* a neurosporaxanthinu u *Neurospora crassa* a *Fusarium aquaeductuum* [9-13].

Xantofyly obsahující keto skupiny, jako jsou astaxanthin a canthaxanthin, vykazují vyšší antioxidační účinky než karoteny uhlovodíků. Proto různé linie důkazů poukazují, že syntéza xantofylů je pro houby výhodnější než syntéza β -karotenu za zvýšených oxidačních podmínek. Hladiny astaxanthinu u *P. rhodozyma* se zvýšily v přítomnosti peroxidu vodíku při snížení obsahu β -karotenu. Zesílená aerace získaná použitím odsazených baněk, zvýšila kumulaci karotenoidů u *Sporobolomyces roseus* s významným zvýšením relativních podílů torularhodinu a jeho prekurzoru torulenu. Přidání chemikálií generujících singletový kyslík, superoxidové aniontové radikály nebo peroxy-radikály do kultur *Rhodotorula kratochvilovae* vedly k výraznému zvýšení hladin torulenu a torularhodinu, zatímco hladiny β -karotenu nebyly v podstatě ovlivněny. V důsledku toho mutant s nadprodukcí torularhodinu vykazoval nižší citlivost na inhibici růstu singletovým kyslíkovým generátorem – methylenovou modří ve srovnání s mutantem vysoceprodukcujícím β -karoten. Navíc torularhodin inhiboval v těchto kvasinkách rozklad 2,5-difenyl-3,4-benzofranu (furan) singletovým kyslíkem efektivněji než β -karoten. Konečně, kmeny *Mucor circinelloides* produkující canthaxanthin vytvořené heterologní expresí bakteriálního genu β -karoten ketolázy, byly schopny přežít při vyšších teplotách než divoký typ. Navíc přidání H_2O_2 a $CuSO_2$ zvýšilo podíl keto derivátů β -karotenu [14-21].

Antioxidační vlastnosti karotenoidů mohou prodloužit dobu přežití hub v jejich přirozených stanovištích. Konkurenční experimenty mezi kmeny lišícími se obsahem karotenu ukázaly ochranný účinek lycopenu a β -karotenu proti stárnutí *Phycomyces blakesleeanus*, zatímco stejný přístup neprošel ochrannými účinky proti oxidačnímu stresu nebo poškození γ -zářením [10, 22-24].

Příjem karotenoidů může zabránit stárnutí vlivem UV záření a chrání kůži před spálením při pobytu na slunci, avšak musí být požíván ve vyšším množství, aby se zvýšila jeho hladina v krvi a následně se zvýšila, již zmiňovaná, ochrana. Přírodní karotenoidy mají podobnou molekulární strukturu jako syntetické látky, což přináší hlavní výhody pro zdraví. Průmyslová

produkce přírodních karotenoidů může být prováděna biotechnologickými procesy s použitím vláknitých mikroskopických hub, kvasinek, bakterií, mikroskopických řas nebo extrakcí pevná látka – kapalina z rostlin. Bylo popsáno, že v celosvětové produkci β -karotenu tvoří pouze 2 % přírodní zdroje [7, 25-29].

2.2 Produkce mikrobiálních karotenoidů

Komerční karotenoidy se získávají extrakcí ze zeleniny a chemickou syntézou. V případě výroby a uvádění na trh několika barviv rostlinného původu však existují určité problémy týkající se sezónní a zeměpisné variability, kterou nelze kontrolovat. Chemická syntéza vytváří nebezpečné odpady, které mohou negativně ovlivnit životní prostředí. Karotenoidy jsou široce distribuovány v mikroorganismech, včetně bakterií, kvasinek, hub a řas. Komerční produkce mikrobiálních karotenoidů je vysoce účinná, protože může být během procesů řízena [30-33].

Papaioannou a Liakopolou-Kyriakides (2010) použili *B. trispora* k produkci β -karotenu. Další plíseň, *P. blakesleeanus*, je také známá svou schopností produkovat β -karoten v průmyslovém měřítku, kterou studovali Almeida a Cerda-Olmedo (2008). Studie provedené společností Cerda-Olmedo prokázaly, že nejvíce produktivní kmeny *P. blakesleeanus* dosahují maximálního karotenogenního potenciálu v systémech bez míchání, na rozdíl od kmenů *B. trispora*. Produkce karotenoidů kvasinkami, jako je *Rhodotorula* spp., byla popsána různými autory. Tato kvasinka, široce rozšířená v přírodě, může biosyntetizovat specifické karotenoidy, jako je β -karoten, torulen a torularhodin, a to v různých poměrech. Produkce karotenoidů rodem *Rhodotorula* se mezi jednotlivými druhy liší a je ovlivněna složkami růstového média a podmínkami prostředí. Bakterie jsou zejména známými producenty cantaxanthinu, o který je zájem v drůbežářství, rybářství, kosmetice, medicíně, farmacii a potravinářském průmyslu. Mezi nejvýznamnější bakteriální producenty patří *Corynebacterium michiganense*, *Micrococcus roseus*, *Brevibacterium* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Gordonia jacobaea* a *Dietzia natronolimnaea* [8, 34-43].

Mikroskopické řasy patřící do skupiny *Chlorophyceae* jsou nejuznávanějšími producenty významných komerčních karotenoidů, přičemž je třeba zdůraznit zejména rody *Chlorella*, *Dunaliella* a *Haematococcus*. Tyto mikroskopické řasy jsou schopny produkovat lutein, β -karoten a astaxanthin. Konkrétně produkce astaxanthinu u *Haematococcus pluvialis* vyžaduje určité podmínky během jeho kultivace, protože během růstových fází mění svou strukturu [8, 44, 45].

Obecně existuje obrovský počet mikroorganismů, které mohou biosyntetizovat karotenoidy, stále však chybí informace o strategiích maximalizace produkce v průmyslovém měřítku. Přestože existuje mnoho způsobů pro stimulaci biosyntetických drah karotenu v kvasinkách, pozornost je stále zaměřena na neprozkoumané biotopy pro výběr hyperprodukcujících kmenů, což je důležitý krok směrem ke způsobu a optimalizaci biotechnologického procesu tvorby pigmentů. Syntéza důležitého přírodního karotenoidu kvasinkami vede k úvaze o jejich kultivaci v průmyslovém měřítku [1, 46, 47].

2.2.1 Metabolická dráha syntézy karotenoidů (mevalonátová dráha)

Velmi důležité je také poznání metabolických drah, a to kvůli jejich možné manipulaci. V roce 1964 byla popsána možná dráha syntézy karotenoidů. Později Goodwin (1980) revidoval obecné cesty jejich biosyntézy kvasinkami a dospěl k závěru, že obecně se sestává z těchto tří kroků [48]:

1) Syntéza začíná konverzí acetyl-CoA na 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA), katalyzovanou HMG-CoA-syntázou. Poté se HMG-CoA převede na kyselinu mevalonovou (MVA), což je první prekurzor terpenoidní biosyntetické dráhy. MVA je fosforylována MVA-kinázou a dekarboxylací vznikne isopentenylpyrofosfát (IPP).

2) IPP je izomerizován na dimethylallylpyrofosfát (DMAPP) přidáním tří molekul IPP k DMAPP, katalyzovaných prenyltransferázou, vzniká geranyl-geranylpyrofosfát (GGPP). Kondenzace dvou molekul GGPP produkuje fytoen (první karoten C40 dráhy), který se následně desaturuje za vzniku lykopenu.

3) Mnoho cyklických karotenoidů je odvozeno od lykopenu, který prošel mnoha reakcemi, konkrétně vzniká β -karoten, γ -karoten, torulen, torularhodin a astaxanthin.

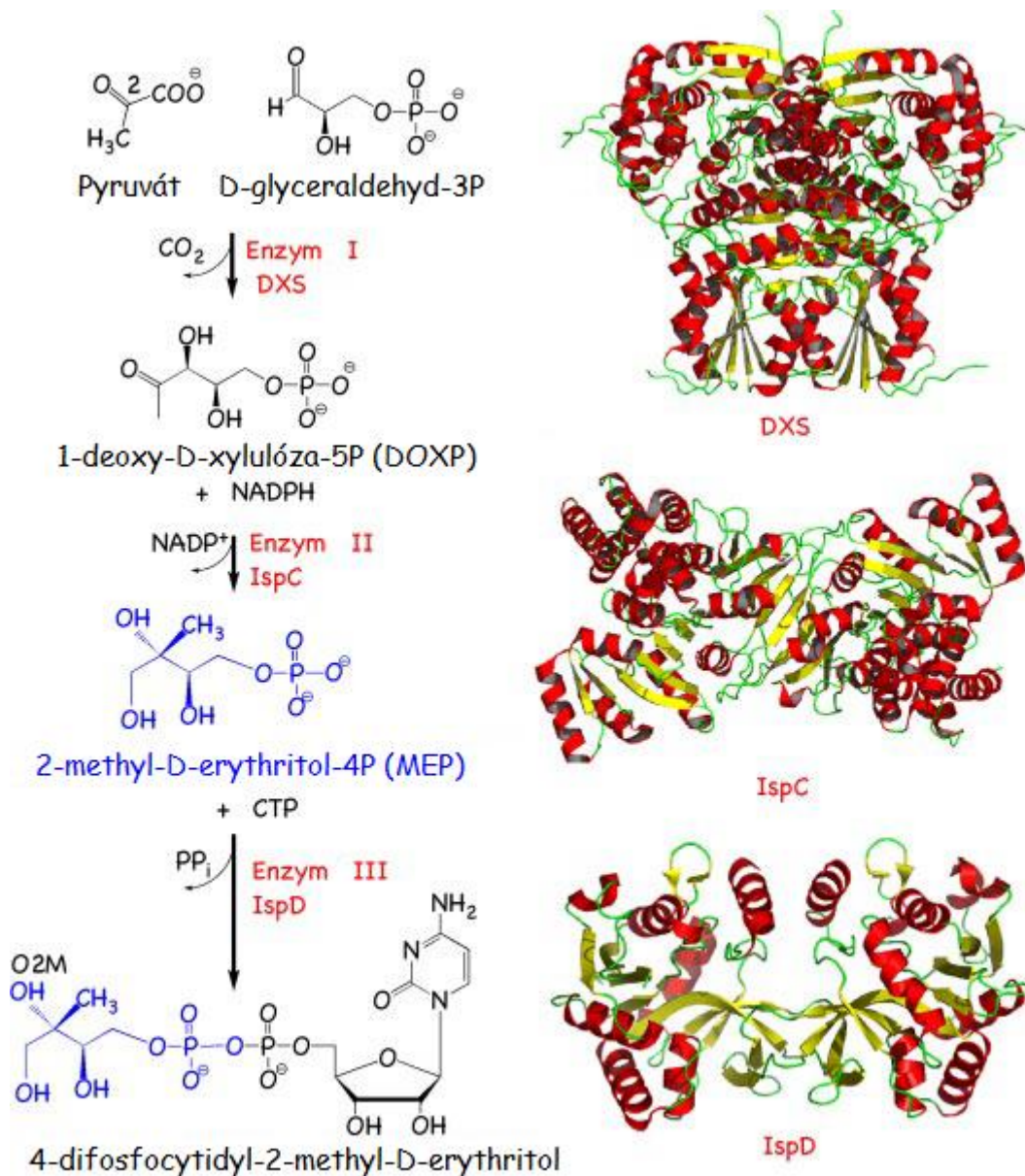
Jak již bylo zmíněno, β -karoten může být produkován mnoha mikroorganismy. Zaměřujeme se na kvasinky rodu *Rhodotorula* konkrétně na druhy jako *R. kratochvilovae*, *R. minuta*, *R. mucilaginoso*, *R. acheniorum* a *R. graminis*. Mezi další studované karotenogenní kvasinky patří *Sporobolomyces roseus*, *S. salmonicolor* a *S. patagonicus* [1, 8, 37, 49].

2.2.2 Metabolická dráha syntézy karotenoidů (non-mevalonátová dráha)

Jedná se o alternativní dráhu syntézy karotenoidů, která dominuje u řas. Dráha závisí na osmi enzymech, několika kofaktorech a iontech kovů. Tzv. DOXP dráha je alternativou k MVA, shora uvedné, dráze, ve které se ale nevyskytuje meziprodukt – kyselina mevalonová [50].

Tato dráha probíhá v osmi reakcích, a to:

- 1) Kondenzace pyruvátu a glyceraldehyd-3P na 1-deoxy-D-o-xylulóza-5P (DOXP), katalyzovaná 1-deoxy-D-o-xylulóza-5P-syntázou (DXS), za přítomnosti thiaminpyrofosfátu, jako kofaktoru. Enzym se sestává ze tří podjednotek.
- 2) V dalším kroku je DOXP převeden na 2-methyl-D-erythritol-4P (MEP) působením 1-deoxy-D-o-xylulóza-5P isomeráza (IspC). Enzym patří to třídy dehydrogenáz s využitím NADPH jako kofaktoru.
- 3) V této reakci jsou nukleotidové deriváty zavedeny jako substráty a přímo se účastní reakce. MEP reaguje s CTP za vzniku 4-difosfocytidyl-2-methyl-D-erythritolu (CDP-ME). Z reakce se uvolňuje pyrofosfát a reakce je katalyzována IspD.
- 4) V tomto stupni vzniká 4-difosfocytidyl-2-methyl-D-erythritol-2P (CDP-ME2P) a ADP. Katalytické centrum je umístěné hluboko v dutině poblíž rozhraní jednotlivých domén enzymu. IspE závislý na ATP je součástí 4-difosfocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kináza (GHMP kináza). Použití nehydrolyzovatelného derivátu ATP vytváří komplex slepého konce s IspE a CDP-ME.
- 5) Enzym 2-methyl-D-erythritol-2,4-cyklodifosfátsyntáza vyžaduje pro svou katalýzu dva kationty Zn^{2+} .
- 6) + 7) Tyto dva kroky jsou nejméně popsáným místem dráhy. Cyklodifosfát podléhá redukci a eliminaci na 4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl-4-difosfát a poté na IPP a DMAPP. IspG (obsah Fe a S) transformuje redukcí 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyklodifosfát (MECP) na 2-methyl-2-butenyldifosfát. IspH (obsah Fe a S) pak katalyzuje produkci IPP a DMAPP. Obsah Fe a S vysvětluje citlivost na kyslík. Kofaktory reakce jsou NADPH, flavodoxin reduktáza a flavodoxin (který je zapojen do dráhy jako redoxní pár pro oba enzymy – 1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-difosfát syntáza a 4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl-4-difosfát-reduktáza).
- 8) Izomerací vazby IPP vzniká DMAPP působením isopentenyl-difosfát izomerázy.



Obr. 2: Katalytické reakce prvních tří kroků non-mevalonátové dráhy, se zobrazením enzymů v sekundární struktuře [50]

Regulace této dráhy závisí na hladině produktu, přítomností potřebných enzymů, kofaktorů a iontů kovů, dále se jedná o kovalentní regulaci s ilustrovanou fosforylací HMG-Coa reductázy. MVA dráha pak probíhá v cytosolu a mitochondriích rostlin, zatímco DOXP dráha probíhá v chloroplastech [50].

2.3 Karotenogenní kvasinky

Karotenogenní kvasinky jsou jednobuněčné heterotrofní organismy, náležící do říše *Fungi*. Nejsou sice schopny fotosyntézy, ale mají v buňkách aparát, který jim umožňuje produkci

karotenoidních pigmentů za působení různých enzymů. Právě díky produkci těchto pigmentů, jsou buňky těchto kvasinek charakteristicky zbarvené. Nabývají spektra barev od žluté až po červenou, a to díky akumulaci karotenoidních pigmentů uvnitř buňky. Jiný název pro tyto kvasinky je tzv. „červené kvasinky“. Nejčastěji produkovanými karotenoidy jsou lykopen, β -karoten, astaxanthin, torulen či torularhodin a právě dle skladby těchto pigmentů v buňce daného mikroorganismu se liší jejich druh, vhodné živné médium, zdroj živin či doba distribuce a intenzita světla. Karotenogenní kvasinky patří mezi basidiomycety, konkrétně druhy *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* či *Cystophilobasidium*. Tyto rody rovněž patří mezi oleogenní mikroorganismy a jsou schopny nadprodukce lipidů [51-54].

Rod *Sporobolomyces* tvoří tzv. balistokonidie, buňky mají protáhlý až elipsoidní tvar a tento rod nemá kvasné schopnosti. Mezi nejčastěji produkovanými karotenoidy tohoto rodu jsou β -karoten, torularhodin a torulen. Kolonie mívají tmavě červenou barvu a jsou hladké [51, 52, 54, 55].

Rod *Rhodotorula* je imperfektní formou *Rhodosporidium* a má silný pentózový cyklus (nezkvašuje cukry). Buňky jsou oválné až protáhlé, nesporelující a nabývají širokého spektra barev. Kvasinky rodu *Rhodotorula* jsou ubikvitin pozitivními mikroorganismy a běžně se nacházejí v půdních a vodních ekosystémech. Buňky bývají nenaročné na kultivaci (zejména na zdroj dusíku). Charakteristicky rod produkuje β -karoten, torularhodin a torulen a velké množství lipidů (PUFA). Rozmnožování probíhá pučením [51, 52, 54, 56].

Rod *Cystophilobasidium* je podobný rodu *Rhodotorula*, akorát má jiný typ basidia – typ jednobuněčný (holobasidium). Tvoří lesklé kolonie buněk s oválným tvarem. Buněčná stěna tohoto rodu obsahuje xylózu a buňky jsou schopny využít glukuronát [51, 52, 55].

Co se týče nejznámějších druhů mezi producenty karotenoidů, tak mezi ty patří zejména *Sporobolomyces roseus*, *S. salmonicolor*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *R. kratochvilovae*, *Cystophilobasidium capitatum*, *C. bisporidii*, *C. infirmominiatum*.

2.4 Fotoautotrofní mikroorganismy

2.4.1 Sinice

Sinice neboli *Cyanobacteria*, jsou prokaryotní a fotosyntetizující skupinou, patří mezi gramnegativní bakterie. Rostou zpravidla fototrofně, ale některé druhy dokážou žít i chemoheterotrofně. Obecně jsou sinice slepou vývojovou větví. Buněčná stěna sinic je tvořena peptidoglykanovou vrstvou a někdy pozorujeme i výskyt dalšího vnějšího obalu – glykokalyxu, podle jehož povahy jsou pak jednotlivé kultury označovány jako gelovité až slizovité. Pomocným fotosyntetickým barvivem sinic je zejména β -karoten. Na povrchu

buněčné struktury thylakoidů se vyskytují fykobilizomy tvořené fykobiliproteiny. Sinice jsou schopny tzv. chromatické adaptace, což znamená, že po změně složení fykobiliproteinů dojde k optimálnímu využití čereveného a zeleného spektra slunečního záření pro fotosyntézu. U sinic lze identifikovat různé formy vegetativních buněk. Vytvořily si během vývoje struktury nazývané heterocyty a akinety, kde heterocytní buňky jsou schopny vázat vzdušný dusík (díky enzymu nitrogenáze, který redukuje dusík do formy amonných iontů) a akinety jsou pak obranné formy buněk vytvářené za nepříznivých podmínek. Sinice se rozmnožují nepohlavně. Můžeme je najít zejména v mořských i sladkých vodách na celém světě, kde tvoří tzv. plankton nebo jsou přisedlé na dně vod [57-60].

2.4.2 Mikrořasy

Karotenogenní mikrořasy jsou eukaryotními mikroorganismy, patřící mezi nižší rostliny. Jedná se o komplex nepříbuzných skupin organismů, které nemají společného předka. Řasy jsou schopny fotosyntézy a jejich chloroplasty vznikly pravděpodobně v symbióze se sinicemi nebo s jinou řasou. Některé řasy jsou schopny žít i mixotrofně (masožravé rostliny). Výskyt řas je detekován na celém světě za předpokladu, že se jedná o vodné prostředí (zejména u složitějších mnohobuněčných řas). Rozmnožují se pak pohlavně i nepohlavně [60-62].

Rod *Chlorella* čítá zelené jednobuněčné řasy, patřící mezi *Chlorophyta* a žijící ve sladkých vodách. Rozmnožují se výhradně dělením, buňky jsou nepohyblivé a mají kulovitý tvar. *Chlorella* je schopna velmi rychlé reprodukce, díky efektivnímu fotosyntetickému aparátu. Je poměrně nenáročná na kultivační podmínky. Své využití nachází jako potravinové aditivum s vysokým obsahem minerálů, vitamínů a bílkovin a také je schopna akumulace lipidů [60-63].

Rod *Chlamydomonas* jsou rovněž zelené řasy, kterých buňky jsou jednobuněčnými bičíkovci, kteří obývají zejména stojaté vody. Velkou částí buňky je chloroplast, který obsahuje neorganizované thylakoidy. Buňky *Chlamydomonas* obsahují rhodopsinové kanály, které plní funkci senzorů slunečního záření. Rhodopsin obsahuje kofaktor – retinal, jakožto jedna z forem vitamínu A. Excitace retinalu pak aktivuje rhodopsinový iontový kanál [61-63].

Rod *Desmodesmum* je rodem nepohyblivých řas, které rostou jednotlivě, anebo tvoří kolonie (cenobia). Za optimálních podmínek, co se světla týče, rostou samostatně, avšak v případě přítomnosti vnějšího stresu tvoří právě zmiňovaná cenobia. Buňky mají silnou buněčnou stěnu a slizký obal, který plní funkci ochrany, před dravci (slizovitý obal je pro ně

nestravitelný). Tyto řasy jsou součástí sladkovodního planktonu a v kooperaci s bakteriemi mají čistící účinky [61, 63].

2.5 Faktory ovlivňující produkci karotenoidů u karotenogenních kvasinek

V nedávné době se vědci zajímali o biotechnologické procesy, jejichž cílem bylo získat metabolity s vysokou přidanou hodnotou, jako jsou právě karotenoidy. Jejich výroba je v průmyslovém měřítku realizována prostřednictvím nízkonákladových procesů s vysokými výnosy a šetrností k životnímu prostředí. Některé z těchto důležitých faktorů, které ovlivňují biosyntézu karotenoidů, jsou:

- **Zdroj uhlíku** je nejvíce studovaným parametrem. Glukóza, a další fermentovatelné cukry, jsou metabolizovány glykolytickou cestou a následně alkoholickou fermentací. Na druhé straně, zdroje uhlíku, které nejsou fermentovatelné, jako ethanol a sukcinát, se aktivují oxidací na acetyl-CoA pro vstup do citrátového cyklu [64-68].
- **Světlo** (jeho intenzita a kvalita) je důležitým faktorem. Buňkám obecně nesvědčí vysoká intenzita světla, která může způsobovat jejich poškození. Proto je karotenogeneze označována jako fotoprotektivní proces. Produkce karotenoidů je pozitivně ovlivněna bílým světlem [8, 69-72].
- **Teplota** je dalším parametrem, který je nutné zohledňovat. Malisorn a Suntornsuk (2008) optimalizovali teplotní vliv na produkci karotenoidů a biomasy u druhu *R. kratochvilovae*, přičemž uvedli maximální produkci při 29 až 30 °C [66, 73-77].
- **Provzdušňování** velmi pozitivně ovlivňuje karotenogenezi, jelikož se jedná o aerobní proces. Saenge a kol. (2011) zkoumali vliv rychlosti provzdušňování na růst buněk, výtěžek lipidů, produkci karotenoidů a spotřebu glycerolu [64, 72, 78-89].

2.6 Faktory ovlivňující produkci barevných pigmentů u *Haematococcus pluvialis*

Mezi nejznámější producenty karotenoidů jsou považovány mikrořasy *Haematococcus pluvialis* (astaxanthin) a *Dunaliella salina* (β -karoten). *Haematococcus pluvialis* je zelená řasa, která je považována za jeden z biologických zdrojů astaxanthinu. Astaxanthin je karotenoid, který se široce využívá jako barvivo v potravinářství. Počátek zjištění akumulace astaxanthinu u *H. pluvialis* se datuje do roku 2005, kdy bylo stanoveno, že produkce probíhá zejména za stresových podmínek, jako je hladovění dusíkem, fosforem a při zvýšené salinitě média (octan sodný spolu se železem, solný stres a zvýšená teplota). Studie měly zkoumat vliv salinity během kultivace a fyziologický stav kultury versus stres na produkci astaxanthinu. Níže jsou uvedeny parametry ovlivňující karotenogenezy u *H. pluvialis* [90, 91].

- **Vliv zdroje dusíku na růst a produkci astaxanthinu:** Médium s obsahem KNO_3 , NaNO_3 a NH_4NO_3 , jakožto zdrojů dusíku, byly nezávisle připraveny a inokulovány s koncentrací 10 % v médiu. Výsledky získané při kultivaci na různých zdrojích dusíku určily jako nejlepší zdroj dusíku dusičnan sodný pro nejvyšší produkci chlorofylu. Celková produktivita astaxanthinu byla nejvyšší v kulturách inkubovaných na médiu s obsahem dusičnanu sodného, jakožto zdroje dusíku [90].
- **Vliv salinity (stresu):** Výsledky výtěžků kultur kultivovaných bez stresu po dobu šesti a devíti dní nevykazovaly zásadní rozdíly v obsahu karotenoidů. Naopak kultury stresované přidavkem soli (0,25 a 0,5 % NaCl) vykazovaly výrazné rozdíly v obsahu astaxanthinu. Při přidavku 1,0 % NaCl došlo k mírnému poklesu produkce a při koncentraci 2,0 % NaCl byly kultury úplně vyběleny. Salinita však měla výrazně negativní vliv na produkci chlorofylu [90, 92].
- **Vliv pH:** Ideální pH pro požadovanou produkci astaxanthinu je okolo 7,0. Při pH 5,0 již kultura nerostla. Nejnižší počet buněk v zásadité oblasti pH byl pozorován při pH 9,0 (buňky také změnilly svou barvu). Výtěžky biomasy v různých médiích korelovaly s hodnotou pH [90, 93].

2.7 Mikrobiální lipidy a glykolipidy

2.7.1 Lipidy

Mikroorganismy schopny akumulace lipidů patří mezi kvasinky, bakterie, vláknité mikroskopické houby i mikrořasy. Mikroorganismy, které dokážou akumulovat obsah nad 20 % lipidů v sušině biomasy, jsou klasifikovány jako oleogenní (tabulka 1) [94].

Tabulka 1: Obsah oleje v sušině některých oleogenních mikroorganismů [95, 96]

	Mikroorganismus	Obsah oleje (% v sušině)
Mikrořasy	<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
	<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
	<i>Chlorella</i> sp.	28-32
	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
	<i>Dunaliella primolecta</i>	23
	<i>Isochrysis</i> sp.	25-33
	<i>Monallanthus salina</i>	20
	<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
	<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
	<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
	<i>Nitzschia</i> sp.	45-47
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
	<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
	<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23
Bakterie	<i>Arthrobacter</i> sp.	40
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27-38
	<i>Rhodococcus opacus</i>	24-25
	<i>Bacillus alcalophilus</i>	18-24
Kvasinky	<i>Candida curvata</i>	58
	<i>Cryptococcus albidus</i>	65
	<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
	<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	72
Houby	<i>Aspergillus oryzae</i>	57
	<i>Mortierella isabellina</i>	86
	<i>Humicola lanuginosa</i>	75
	<i>Mortierella vinacea</i>	66

Mikrořasy jsou schopny obrovské produkce lipidů a jiných uhlovodíků za přítomnosti světla a oxidu uhličitého. Mohou být slibnou novou generací pro produkci biopaliv. Během exponenciální fáze růstu, mohou řasy produkovat až dvojnásobné množství lipidů. Růst buněk a akumulace lipidů řasami za fototrofních podmínek je ovlivněno intenzitou světla, pH, koncentrací rozpuštěného kyslíku, frakcí oxidu uhličitého a koncentrací živin (N, P, Si, Fe a přítomnost organického C). Omezení dusíku a fosforu v médiu vede ke zvýšené produkci

lipidů. V odborné literatuře byl studován růst pěti kmenů zelené řasy *Chlorella* s nízkým obsahem dusíku v médiu. Největší nárůst akumulace lipidů byl pozorován u *Ch. vulgaris*, který vzrostl až o 18 %. Olejnaté kvasinky jsou takové, kterých biomasa je tvořena alespoň z 20 % lipidy. Tyto kvasinky mají vysokou rychlost růstu a produkují zejména triacylglyceroly (TAG). Tyto organismy mohou růst na různých zdrojích uhlíku (glukóza, xylóza, arabinóza, manóza, glycerol aj.). Většina oleogenních kvasinek dokáže akumulovat až 70 % lipidů v sušině. Profil obsahu lipidů a mastných kyselin se liší druh od druhu. Mezi oleogenní kvasinky patří *Rhodotorula kratochvilovae*, *Cryptococcus albidus*, *Lipomyces sarkeyi* a *Candida curvata*. Hlavní podmínkou pro nadprodukcii lipidů je nadměrný přísun zdroje C a omezení ostatních živin (nejčastěji dusíku). Důležitý je proto poměr C/N, aerace, obsah anorganických solí, pH a teplota [94, 95, 96].

Komerční produkci mikrobiálních lipidů zatím brání vysoké náklady na substráty. Momentálně intenzivně probíhají studie za použití nízkonákladových substrátů, jakožto alternativních surovin [94].

2.7.2 Glykolipidy

Glykolipidy, s nejčastějším využitím jako biosurfaktanty, jsou amfifilní sloučeniny s hydrofilními a hydrofobními skupinami vykazující značnou povrchovou aktivitu, která mimo jiné pomáhá mikroorganismům solubilizovat hydrofobní substráty. V posledních letech byly biosurfaktanty zkoumány jako potenciální náhražky syntetických povrchově aktivních látek. Mohou mít potenciál pro průmyslové a enviromentální aplikace. Biosurfaktanty představují rodinu strukturně rozmanitých molekul s vysokou molekulovou hmotností. Zaměříme se na glykolipidy sestávající se z uhlovodíku s připojenými mastnými kyselinami nebo hydroxy-mastnými kyselinami. Analýza těchto látek je hlavně proteomická. Existují čtyři skupiny glykolipidů – rhamnolipidy, sophorolipidy, lipidické trehalózy a mannosylerythritolové lipidy [97].

Rhamnolipidy, produkované *Pseudomonas aeruginosa*, jsou složeny z jedné nebo dvou nosných jednotek, které jsou připojeny k jednomu nebo dvěma řetězcům β -hydroxy mastných kyselin o délce 8 – 12 uhlíků (nejhojnější jsou 10 C kyseliny) [97, 98].

Sophorolipidy jsou složeny ze dvou hlavních skupin, přičemž kyselá sophorolipidy obsahují disacharid (vázaný na subterminální či terminální uhlík mastné kyseliny) a lakton, kde je na čtvrtém uhlíku vázána hydroxy-mastná kyselina. Nejčastějšími producenty sophorolidů jsou druhy *Candida bombicola* a *C. apicola* [97, 99].

Lipidické trehalózy jsou pak tvořeny disacharidem a trehalózou vázanou esterově k α -větvené- β -hydroxy mastné kyselině. Lipidické trehalózy jsou produkovány druhy *Mycobacterium*, *Rhodococcus* a *Corynebacterium* [97, 100].

Mannosylerythritolové lipidy (MEL) mají čtyři hlavní strukturální skupiny a obsahují 4-o-P-D-mannopyranosyl-D-erythritol připojený ke dvěma středně dlouhým řetězcům acylů mastných kyselin. MEL jsou produkovány druhy *Pseudozyma rugulosa*, *P. aphidis* a *P. antarctica* [97, 101].

Chemická a strukturální analýza mikrobiálních glykolipidů může být prováděna širokým spektrem metod a technik, od jednoduchých kolorimetrických testů, až po sofistikovanou hmotnostní spektrometrii (MS) a nukleární magnetickou rezonanci (NMR) [97].

Klíčové kroky stanovení glykolipidů jsou:

- 1) Extrakce glykolipidů z kultivačního média
- 2) Detekce
- 3) Čištění a separace surového produktu
- 4) Strukturální analýza (HPLC, MS, NMR)

Důkladná identifikace a kvantifikace glykolipidové molekuly by vyžadovala kombinaci, nebo dokonce využití všech zmíněných analytických metod. Uvedné metody jsou nejběžněji používané [97].

2.8 Analytické metody

2.8.1 Analýza mikrobiálních pigmentů

Karotenoidy produkovány kvasinkami jako *Rhodotorula* sp. a *P. rhodozyma* jsou intracelulární metabolity, proto jsou pro extrakci požadovaného produktu potřebné extrakční procesy, což má za následek vysoké výrobní náklady. Ideální proces regenerace nesmí být časově náročný, musí generovat nízké náklady a vysoké výnosy [102].

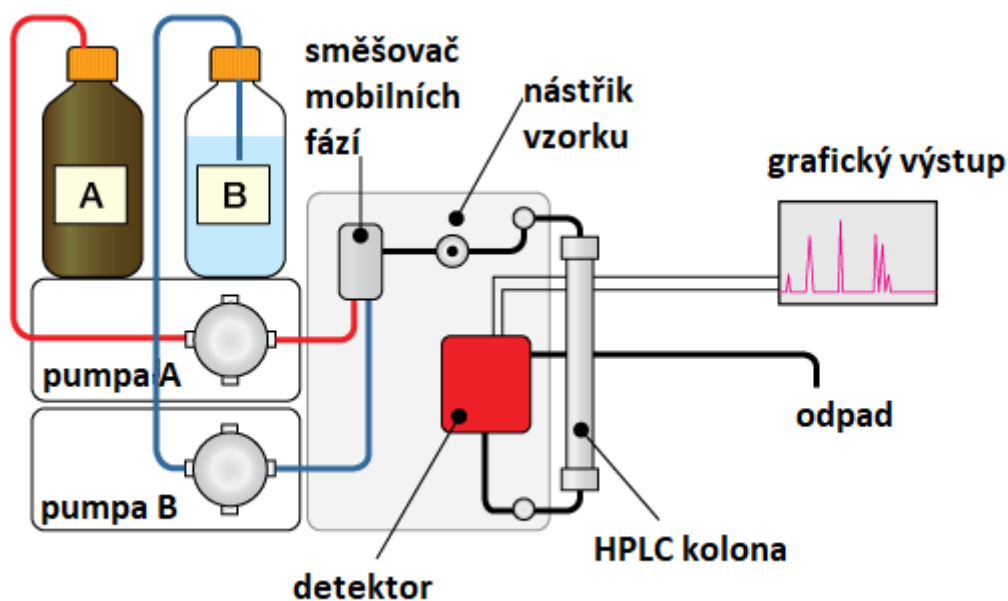
Procesy dezintegrace buněk a následná extrakce však musí také zajistit stabilitu karotenoidů. Torulen a torularhodin jsou vysoce nestabilní sloučeniny a měly by být chráněny před světlem, teplem a kyslíkem. Karotenoidy ztrácejí svou barvu při vystavení oxidačním vlivům. Tento proces zahrnuje porušení konjugovaných dvojných vazeb [103].

Pro dezintegraci se tradičně používají mechanické techniky jako vysokotlaká homogenizace a kulové mlýny. Při extrakci karotenoidů z mikrobiálních buněk se běžně používají organická rozpouštědla, jako aceton, petrolether, hexan, chloroform, ethanol a methanol. Tato rozpouštědla se častěji používají jako směsi a vykazují tak synergickou

aktivitu, navíc poškozují buněčnou stěnu, což vede k významně zvýšeným výtěžkům extrakce karotenoidů [102].

2.8.1.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC patří mezi často využívané separační metody a své využití nachází zejména při separaci směsí látek, které nemají těkavý charakter. Jedná se o běžně používanou analytickou metodu ke stanovení kvantity a kvality mikrobiálních karotenoidů. Principem kapalinové chromatografie je separace směsi látek mezi mobilní a stacionární fází, kde tou mobilní se rozumí kapalina, mezi které se analyt rozděluje a interaguje s nimi během separace. Prostup mobilní fáze systémem je zabezpečen vysokotlakými čerpadly, což vyžaduje odolnost přístroje vysokým tlakům (cca 50 MPa). Mezi další základní instrumentaci HPLC patří: zásobníky mobilní fáze, dávkovací zařízení, kolona se stacionární fází, termostat, detektor a výstupní zařízení s exaktním (grafickým) výstupem. Gradientová eluce, tzn. použití dvou a více mobilních směsí, se využívá k separaci směsí, které mají složky lišící se retenčními časy s konstantním složením mobilní fáze. Obecné schéma HPLC najdeme na Obr. 3. [104].



Obr. 3: Obecné schéma HPLC [URL 1]

K detekci karotenoidů mohou být použity různé metody, avšak nejběžněji používanou metodou pro identifikaci a kvantifikaci je HPLC v kombinaci s UV-VIS detektorem. Provádí se jak na normální, tak na reverzní fázi, přičemž mnohem vhodnější je fáze reverzní (normální fáze je nevhodná pro separaci polárních karotenoidů). HPLC na reverzní fázi nám umožňuje

zvýšit interakci analytu s nepolární stacionární fází. Nejvhodnější kolonou pro stanovení karotenoidů je kolona C18 s izokratickým nebo gradientním průtokem, nicméně ta není schopna rozlišit geometrické izomery, zejména lutein a zeaxanthin. Pro maximální chromatografické rozlišení, byla vyvinuta speciální RP-HPLC kolona (C30), která je schopná rozlišit i cis a trans izomery karotenoidů (oddělení karotenů, xantofylů, ubichinonů a tokoferolů v jednom měření). Nevýhodou této kolony je delší separační čas jednoho vzorku, a to až 60 minut [102, 104].

Během optimalizační fáze extrakce bylo použito binární rozpouštědlo (methanol / voda v poměru 95:5 obj./obj.) s přídavkem terc-methylbutyletheru (MTBE) [102, 104].

V poslední době se k analýze také využívá technika UHPLC na různých matricích. Tato technologie nabízí výhody oproti klasické HPLC, a to zejména zvýšenou citlivost, vyšší kapacitu píku nebo lepší chromatografické rozlišení. Kratší separační časy pak šetří množství rozpouštědla a mobilní fáze. Pro techniku UHPLC nejsou komerčně dostupné C30 kolony se stacionární fází, a proto se využívá kolon C18 i navzdory nedostatečnému rozlišení izomerů karotenoidů [102].

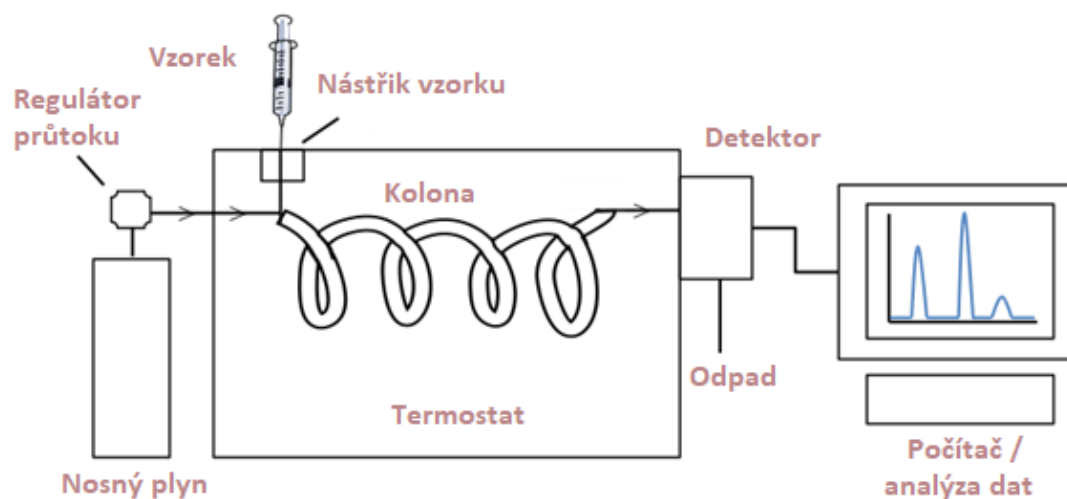
Optimalizace separace karotenoidů vyžaduje kombinaci vhodného injektorového rozpouštědla a mobilní fáze, obecně by se mělo jednat o rozpouštědlo kompatibilní s mobilní fází. V případě, že jsou karotenoidy rozpustnější než samotná mobilní fáze, dojde k precipitaci karotenoidů v injektoru a výsledky budou vykazovat píkové chvosty. Při opačném extrému dojde k absolutnímu rozpuštění vzorku v mobilní fází. Teplota během separace, která se jeví jako kompromis, je ± 23 °C [104, 104].

2.8.2 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie je další z řady separačních technik, která rovněž vznikla v průběhu 20. století. Na rozdíl od HPLC nám plynová chromatografie vyplní chybějící spektrum možných separací, a to pro látky těkavého charakteru, kde má HPLC značně omezenou funkci. GC má dále využití při stanovování organických látek a reziduí stopových množství [105].

Základní uspořádání systému je tvořeno kolonou s injektorovým systémem a detektorem, kdy kolona je po celou dobu separace udržovaná v určité teplotě a obklopena nosným plynem. Metoda je také založena na interakci složky s mobilní a stacionární fází, přičemž mobilní fáze je nosný plyn a stacionární fáze je kapalina. Detektor, který je svým využitím vyhodnocen pro naše separace jako nejužitečnější, je detektor plamenově – ionizační. Nosný plyn nejčastěji bývá vodík nebo helium. Mezi základní instrumentaci GC patří: mobilní fáze (nosný plyn),

dávkovací zařízení, injektor, kolona, detektor a výstupní zařízení s exaktním (grafickým) výstupem. Obecné schéma GC najdeme na Obr. 4 [105].



Obr. 4: Obecné schéma GC [URL 2]

2.8.2.1 Využití plynové chromatografie při analýze mastných kyselin

Nejčastěji využívané analytické metody pro stanovení MK jsou plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS), s plamenově ionizační detekcí (GC-FID), anebo ve spojení s kapalinovou chromatografií [106].

Příprava vzorků se pak sestává ze tří základních kroků:

- 1) Extrakce MK
- 2) Derivatizace MK
- 3) Samotná analýza

Existuje celá řada standardizovaných postupů pro extrakci MK, ale pro dosažení exaktních výsledků je vhodná optimalizace té konkrétní extrakce pro daný analyt. Nejznámější extrakcí MK na kapalně bázi jsou metody navržené Folchem a kol. (1957) a Blighem a Dyerem (1959). Folch a kol. (1959) použili jako rozpouštědlo chloroform / methanol v poměru 2:1 (obj./obj.). Pro oddělení fází pak přidali solný roztok nebo vodu. Bligh a Dyer (1959) použili chloroform / methanol / vodu v poměru 2:2:1,8 (obj./obj./obj.). Kvůli toxicitě chloroformu byla navržena náhrada tohoto rozpouštědla za MTBE, se kterým bylo dosaženo podobného výsledku, jako u Folchovy metody. Liu a kol. (2006) optimalizovali extrakci MK pomocí ultrazvukové extrakce (UAE) ze vzorků tkáně. Určili parametry doby extrakce, extrakční činidla a úroveň hlasitosti ultrazvuku. Další z řady optimalizovaných extrakcí je extrakce mikrovlnná (MAE), která má výhody zejména v rychlosti a robustnosti, čímž je snížena

spotřeba rozpouštědla. MAE byla využita zejména pro extrakci lipidů z biologických vzorků. Pro extrakci lipidů byla ověřena metoda ze vzorků ryb. Výsledkem bylo stanovení, že obsah MK vůči celkovému obsahu lipidů byl u obou biologických materiálů podobný. Vzhledem k obavě o stabilitu lipidů při mikrovlnném záření, byl výsledek porovnání překvapivý – stanovil, že toto záření nemá na obsah lipidů, resp. MK, zásadní vliv [105-108].

Derivatizační metody vedou ke vzniku methylesterů MK. Běžně používanými činidly jsou kyselina chlorovodíková, acetylchlorid, kyselina sírová a fluorid boritý. Úplně nejběžnější je použití methanolické HCl, kdy se vzorek zahřívá po určitý čas. Je nutné dbát opatrnosti u použití acetylchloridu, který dává exotermickou reakci (vybublání obsahu ze zkumavky) a problémem je také teplotní nestabilita některých polynenasycených MK (PUFA). U biologických vzorků se také široce využívá kyselina sírová, ale nedoporučuje se u analýzy PUFA. Derivatizace pomocí fluoridu boritého má výhodu zejména v rychlém reakčním čase, cca 10 min [105, 106].

3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je optimalizace metod stanovení vybraných metabolitů a aplikace na analýzu v buňkách karotenogenních kvasinek a mikrořas.

V rámci práce byly řešeny následující dílčí úkoly:

1. Rešerše zaměřená na biologicky aktivní látky kvasinek a řas.
2. Optimalizace metod stanovení karotenoidů, sterolů lipidů a dalších metabolitů; kultivace.
3. Aplikace optimalizovaných metod na stanovení vybraných metabolitů v biomase karotenogenních kvasinek a mikrořas.
4. Vyhodnocení a diskuse výsledků.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a chemikálie

Chloroform p.a., (Lach-Ner Ltd. Česká republika)

Methanol p.a., (Lach-Ner Ltd., Česká republika)

Kyselina sírová 96 %, (Lach-Ner Ltd., Česká republika)

Ethylacetát HPLC čistota (Lach-Ner Ltd., Česká republika)

Acetonitril HPLC čistota (Lach-Ner Ltd., Česká republika)

Methanol HPLC čistota (Lach-Ner Ltd., Česká republika)

Hexan HPLC čistota (Lach-Ner Ltd., Česká republika)

Analytický standard kyseliny heptadekanové (Sigma-Aldrich, Německo)

Analytický standard směsi karotenoidů (Sigma-Aldrich, Německo)

Analytický standard ergosterolu (Sigma-Aldrich, Německo)

Analytický standard chlorofylu A (Sigma-Aldrich, Německo)

Analytický standard chlorofylu B (Sigma-Aldrich, Německo)

Dusičnan sodný p.a., (Lach-Ner Ltd., Česká republika)

Kvasničný extrakt, HiMedia

Pepton, HiMedia

Glukóza, Lachner

Manóza, Lachner

Xylóza, Lachner

Dihydrát chloridu vápenatého p.a., (Lach-Ner Ltd., Česká republika)

Kyselina citrónová p.a., (Lach-Ner Ltd., Česká republika)

Na₂-EDTA.2H₂O p.a., (Sigma-Aldrich, Německo)

(NH₄)₅Fe (C₆H₄O₇)₂ p.a., (Sigma-Aldrich, Německo)

Uhličitan sodný p.a., (Lach-Ner Ltd., Česká republika)

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., (Lach-Ner Ltd., Česká republika)

Hydrogenfosforečnan draselný p.a., (Lach-Ner Ltd., Česká republika)

Hexahydrát chloridu železnatého p.a., (Lach-Ner Ltd., Česká republika)

Heptahydrát síranu železnatého p.a., (Lach-Ner Ltd., Česká republika)

Kyselina boritá p.a., (Lach-Ner Ltd., Česká republika)

Tetrahydrát chloridu manganatého p.a., (Sigma-Aldrich, Německo)

Dihydrát molybdenanu sodného p.a., (Sigma-Aldrich, Německo)

Hexahydrát dusičnanu kobaltnatého p.a., (Sigma-Aldrich, Německo)

Chlorid zinečnatý p.a., (Lach-Ner Ltd., Česká republika)

Hexahydrát chloridu kobaltnatého p.a., (Lach-Ner Ltd., Česká republika)

Chlorid sodný p.a., (Lach-Ner Ltd., Česká republika)

Síran amonný p.a. (Lachema, Česká republika)

Močovina p.a., (Lach-Ner Ltd., Česká republika)

4.2 Přístroje a pomůcky

Lyofilizátor Labconco FreeZone 4.5 Freeze Dryer (USA)

Termoblok VWR, (ČR)

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

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

- Termostat – LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)
- Detektor PDA – PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR
- Pumpa – MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR
- Vyhodnocovací systém Xcalibur
- Kolona Kinetex Core Shell C18, 150 mm délka, 5,0 µm částice, Phenomenex
- Držák předkolony – KJ0 – 4282, ECOM (ČR)
- Předkolona – C18, AJ0 – 4287, Phenomenex
- Filtry pro HPLC, PRE – CUT, Alltech (GB)
- Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)
- Thermo Scientific TRACETM 1300 Gas Chromatograph, (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Detektor FID (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Thermo Scientific AI 1310 Autosampler
- Kolona Zebron ZB-FAME, 30 m × 0,25 mm × 0,20 µm, Phenomenex

4.3 Mikroorganismy

Kmen *Rhodotorula kratochvilovae* CCY 20-2-26 byl zakoupen ze Sbírký kultur kvasinek (CCY, Bratislava, Slovensko). Kmeny řas a sinic byly získány ze Sbírký kultur autotrofních organismů (CCALA, Třeboň, Česká republika). Seznam mikroorganismů je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2: Seznam použitých kmenů řas a sinic

Číslo	Mikroorganismus	Sbírkové číslo kmene (CCALA)
1	<i>Botryococcus braunii</i>	777
2	<i>Chlorella vulgaris</i>	924
3	<i>Botryococcus braunii</i>	260
4	<i>Scenedesmus acutus</i>	437
5	<i>Desmodesmus quadricauda</i>	463
6	<i>Scenedesmus dimorfus</i>	443
7	<i>Scenedesmus obliquus</i>	455
8	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	928
9	<i>Porphyridium cruentum</i>	415
10	<i>Porphyridium purpureum</i>	416
11	<i>Porphyridium areuginosum</i>	419
12	<i>Rhodella violacea</i>	925
13	<i>Euglena gracilis</i>	349

4.4 Kultivace mikroorganismů

4.4.1 Kultivace kvasinek

Kultivace kvasinek byla vždy nejprve provedena na agarovém médiu YPD (složení: kvasničný extrakt – 10,0 g/l, pepton – 20,0 g/l, glukóza 20,0 g/l, agar – 20,0 g/l), kdy pomocí sterilní kličky byl zaočkován kvasinkový kmen z kryozkumavky. Po inkubaci misek při laboratorní teplotě po dobu 72 hod bylo použito tekuté YPD médium pro přípravu inokula. Inokulum bylo připraveno přenesením kvasinkových buněk sterilní kličkou z YPD agaru do 50 ml sterilního YPD tekutého média (kvasničný extrakt – 10,0 g/l, pepton – 20,0 g/l, glukóza – 20,0 g/l) do Erlenmeyerovy baňky (250 ml) a kultivováno po dobu 24 hodin, při teplotě 25 °C, za neustálého třepání na třepáče (100 rpm, 50 mm). Pro zajištění odstranění zbytkového média po kultivaci, byla biomasa inokula promyta destilovanou vodou a resuspendována do původního objemu produkčního média a to v poměru 1:5 (inokulum:produkční médium). Složení produkčních médií jsou uvedeny v Tabulkách 3 a 4.

Tabulka 3: Složení kultivačních médií s různými zdroji dusíku o C/N poměru 70:1

Základ	Množství [g/l]
Glukóza monohydrát	40,42
KH ₂ PO ₄	4,0
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,7
Zdroje dusíku	Množství [g/l]
Kvasničný extrakt	2,0
KNO ₃	1,52
NH ₄ Cl	0,80
(NH ₂) ₂ SO ₄	0,9906
Močovina	0,45

Tabulka 4: Složení kultivačních médií s různými zdroji uhlíku o C/N poměru 70:1

Základ 1 [g/l]	Základ 2 [g/l]
Močovina – 0,45	KNO ₃ – 1,52
KH ₂ PO ₄ – 4,0	KH ₂ PO ₄ – 4,0
MgSO ₄ ·7 H ₂ O – 0,7	MgSO ₄ ·7 H ₂ O – 0,7
Zdroje uhlíku	Množství [g/l]
Manóza	40,42
Laktóza	34,94
Glycerol	37,57
Xylóza	36,75

Pro následný experiment bylo zvoleno médium s manózou jako zdrojem uhlíku a dusičnanem draselným jako zdrojem dusíku. Byly zkoumány C/N poměry 20; 40; 100 a 120:1, kde bylo zachováno celkové množství dusíku (0,21 g) a měněno množství manózy v médiu.

4.4.2 Kultivace mikrořas

Zásobní kultury řasových kmenů byly přočkovávány každých 20 dní do nového BBM (Bold-Basal/Bristol medium) média (zelené řasy), ASW (artificial seawater medium) média (pro červené řasy) a Euglena média (pro *Euglenu gracilis*).

Složení jednotlivých médií – viz tabulka 5 a 6. Pro zaočkování jednotlivých kmenů byly použity 20 denní kultury, které byly naředěny na OD (optická hustota) 0,1 (680 nm) čerstvým médiem do Erlenmeyerových baněk. Mikrořasy rostly autofototrofně za stálého osvětlení a teplotě 25 °C. Po 14 dnech byla biomasa centrifugována (9 500 rpm/10 min), promyta destilovanou vodou a uchována při -80 °C do následné analýzy.

Tabulka 5: Složení médií pro kultivaci mikrořas

Chemické látky	Koncentrace [g/l]		
	BBM	ASW	Euglena medium
NaNO ₃	0,75	-	-
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,075	6,6	-
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,025	1,5	0,01
Na ₂ EDTA·2 H ₂ O	4,5·10 ⁻³	-	-
NaCl	0,01	27,0	-
K ₂ HPO ₄	0,075	-	-
K ₂ HPO ₄	0,175	0,07	-
FeCl ₃ ·6 H ₂ O	5,82·10 ⁻⁴	-	-
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	2,46·10 ⁻⁴	-	-
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	2,4·10 ⁻⁵	-	-
ZnCl ₂	3·10 ⁻⁵	-	-
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	1,2·10 ⁻⁵	-	-
Kvasničný extrakt	-	-	2
Acetát sodný	-	-	1
Beef extrakt	-	-	1
Trypton	-	-	2
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	-	5,6	-
KNO ₃	-	1,0	-
NaHCO ₃	-	0,04	-
Chemické látky	Objem [ml]		
1M Tris-HCl; pH 7,6	-	20 ml	-
Trace Metal	-	1 ml	-
Chelated Iron	-	1 ml	-

Tabulka 6: Složení médií pro kultivaci mikrořas – mikronutrienty

Trace metal solution [mg; ml]		Chelated Iron solution [mg; ml]	
ZnCl ₂	4,0 mg	FeCl ₃ ·4 H ₂ O	240 mg
H ₃ BO ₃	60,0 mg	0,05M EDTA, pH 7,6	100 ml
ClCl ₂ ·6 H ₂ O	1,5 mg	-	
CuCl ₂ ·2 H ₂ O	4,0 mg		
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	40,0 mg		
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4 H ₂ O	37,0 mg		
Destilovaná voda	100,0 ml		

4.5 Zpracování biomasy

Po kultivaci řas byl vzorek biomasy centrifugován při 4500 rpm po dobu 5 minut a při teplotě 4 °C. Biomasa byla poté třikrát promyta 0,1 % roztokem NaCl. Poté byla biomasa lyofilizována po dobu 48 hodin a zvážená pro stanovení. Následně byly vzorky uchovány v mrazáku při teplotě - 80 °C až do doby analýzy.

4.6 Izolace a analýza karotenoidů

Do plastových extrakčních zkumavek bylo naváženo 15±3 mg lyofilizované biomasy, která pak byla rehydratována přidavkem 1 ml destilované vody. Takto připravený vzorek byl ponechán na 20 minut ve tmě. Voda byla odstraněna centrifugací při 10 000 rpm/5 min/10 °C. Po odlití přebytečné vody bylo k biomase přidáno 300 ± 20 mg skleněných kuliček (průměr 250–500 µm, Roth, Německo) a 1 ml methanolu. Ruptura buněk kvasinkové biomasy byla zajištěna aktivním třepáním vzorku na vortexu po dobu 10 minut. Poté byl obsah zkumavky převeden do skleněné reakční zkumavky se šroubovacím víčkem a malá extrakční zkumavka byla propláchnuta 2 x 1 ml chloroformu. Skleněná zkumavka byla vortexována po dobu 10 minut, počemž byl znovu přidán 1 ml destilované vody pro oddělení fází. Po dalším odstředění (3 000 rpm/5 min/4 °C), byla oddělená spodní chloroformová fáze s extrahovanými pigmenty a následně odpařena pod dusíkem při teplotě 25 °C. Konečně byl pak přidán 1 ml finálního rozpouštědla ethylacetát:acetonitril (20:60). Finální rozpouštědlo s obsahem extrahovaných pigmentů bylo přefiltrováno přes injekční filtr (0,45 µm, PTFE membrána, 13 mm) a přeneseno do skleněné vialky pro HPLC analýzu.

Podmínky separace jsou uvedeny v tabulkách 7 a 8. Obsah jednotlivých pigmentů byl vypočten podle kalibračních křivek (β -karoten, astaxanthin, lykopen, lutein, neoxanthin, chlorofyl a, chlorofyl b, ergosterol) z regresních rovnic.

Tabulka 7: Podmínky separace

Kolona	Kinetex, EVO 150 x 4,6 mm, 2,6 μ m
Objem vzorku	20 μ l
Gradientová eluce	0-13 min: od 100 % A po 100 % B lineárně 13-19 min: 100 % B 19-20 min: od 100 % B po 100 % A lineárně 20-25 min: 100 % A
PDA	285, 435, 450 a 680 nm
Teplota	25 °C
Čas analýzy	25 min

Tabulka 8: Složení mobilních fází

A		B	
Rozpouštědlo	Množství	Rozpouštědlo	Množství
Acetonitril	840 ml	Methanol	680 ml
Methanol	20 ml	Ethylacetát	320 ml
0,1 M Tris-HCl (pH=8)	140 ml	-	-

4.7 Izolace a analýza fykobiliproteinů

Jeden ml kultury byl centrifugován při 10 000 rpm, a pak byl suspendován v 1 ml extrakčního pufru (0,1 M Tris-HCl, pH=7) s obsahem 0,002 M azidu sodného. Fykobiliproteiny byly extrahovány opakovaným zmrazením (-80 °C) a rozmrazením (30 °C), dokud buněčná biomasa nezezelenala. Buněčné zbytky byly odstraněny centrifugací (13 000 rpm/5 min) a extrakt byl zfiltrován přes 0,45 μ m nylonový filtr. Množství fykobiliproteinů bylo měřeno spektrofotometricky pomocí rovnice Bennett a Borogad (1973) [109].

4.8 Analýza lipidů

Do kryptovací vialky s objemem 2 ml bylo naváženo 10 ± 2 mg lyofilizované biomasy a přidáno 1,8 ml transesterifikačního rozpouštědla (15 % (v/v) H₂SO₄ v methanolu (HPLC čistoty), 0,5 mg/ml C17 jako standard) a vzorek byl inkubován po dobu 2 hodin v termobloku nastaveném na teplotu 85 °C. Po ochlazení na pokojovou teplotu byl plný objem vialky převeden do 4 ml vialky se šroubovacím víčkem a přidán 0,5 ml 0,05 M NaOH a 1 ml hexanu (GC čistoty). Vzorek byl vortexován po dobu 5 minut a po oddělení fází se 0,1 ml hexanového extraktu z vrchní vrstvy a 0,9 ml čistého hexanu napipetoval do skleněné vialky

se šroubovacím víčkem pro další GC analýzu. Celkový obsah lipidů (hm. % celkových methylesterů MK v sušině) a profil obsažených mastných kyselin byl stanoven pomocí plynového chromatografu Thermo Scientific TRACE™ 1300, vybaven kolonou Zebron ZB-FAME kolona, 30 m x 0,25 mm x 0,20 μm s plamenovým ionizačním detektorem (FID). Teplotní gradient je uveden v tabulce 9. Jeden μl vzorku byl vstříknut ve split módu do vstupu vytemperovaného na 260 °C. Pro identifikaci methylesterů MK byla použita standardní směs methylesterů MK (C4 – C24; Sigma Aldrich, Německo) rozpuštěných v hexanu. Kvantifikace byla založena na interním standardu C17:0 a faktorech relativní odezvy (RRF) vypočtených z 5-bodových kalibračních křivek jednotlivých methylesterů MK přítomných ve standardní směsi.

Tabulka 9: Teplotní program analýzy

Retenční čas [min]	Gradient [°C/min]	Cílová teplota [°C]	Čas zdržení teploty [min]
0	-	-	-
1	0	80	1
5	15	140	0
21,7	3	190	0
25,5	25	260	1
25,5	STOP	-	-

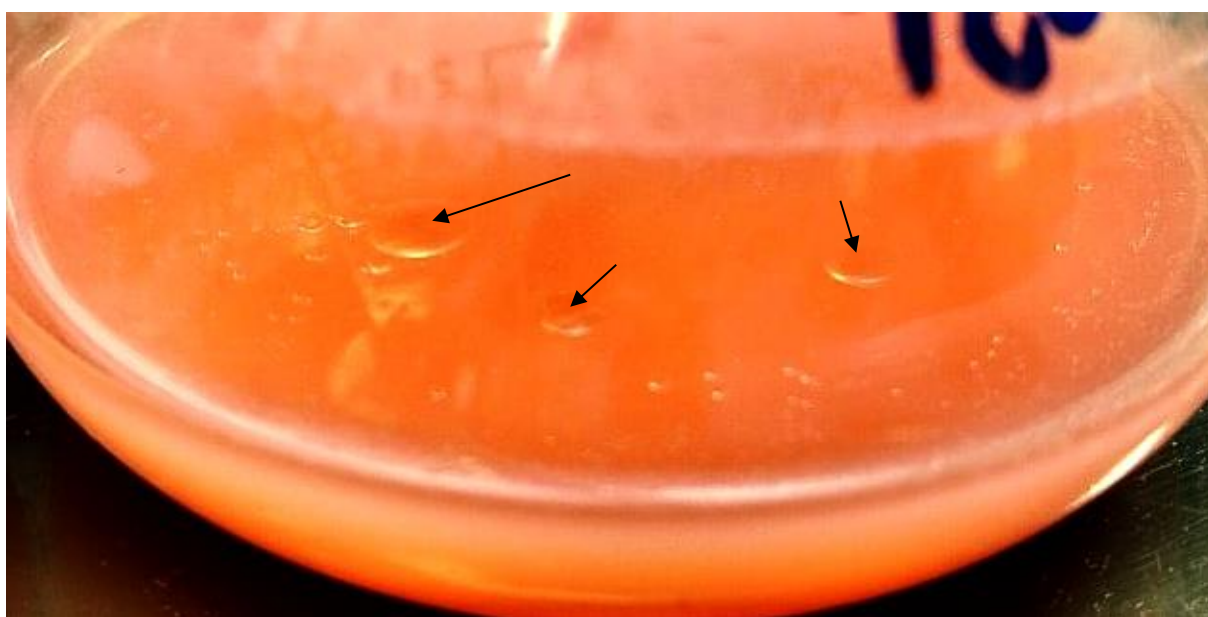
4.9 Izolace a analýza exoglykolipidů

Dvacet ml kultivačního média bylo odstředěno (6500 rpm/5 min), supernatant byl oddělen a promyt ethylacetátem (5 ml) pomocí třepání vzorku na třepače po dobu 2 hodin. Exoglykolipidy obsahující biomasa byla promyta 5 ml ethylacetátu a centrifugována (6500 rpm/5 min). Ethylacetátové frakce byly sloučeny dohromady, odpařeny pod proudem dusíku a lyofilizovány. Hmotnost ethylacetátového extraktu byla poté zvážena za účelem přepočtu množství gramů extracelulárních glykolipidů na litr kultury.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace kultivačních podmínek pro produkci exoglykolipidů a intracelulárních metabolitů u karotenogenních kvasinek

Pro optimalizaci kultivačních podmínek pro produkci exoglykolipidů byl vybrán karotenogenní kmen kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae* CCY 20-2-26, u něhož byla tato produkce prokázána předchozími experimenty (není zahrnuto v této práci) a rovněž byla prokázána produkce intracelulárních metabolitů. Zvýšená produkce exoglykolipidů je charakteristická přítomností „olejových“ kapek na povrchu produkčního média (viz. Obr. 5).



Obr. 5: Přítomnost olejových kapek na hladině kultury (černé šipky) kmene kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae* CCY 20-2-26

5.1.1 Vliv zdroje dusíku na produkci vybraných metabolitů

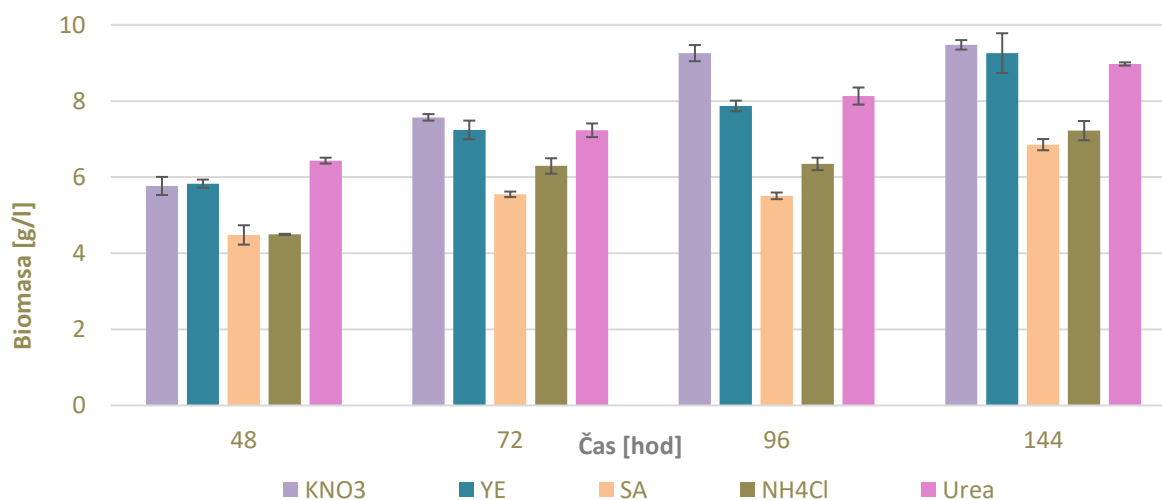
V prvním kroku byly provedeny kultivace za přítomnosti různých zdrojů dusíku, jako jsou dusičnan draselný, kvasničný extrakt, síran amonný, chlorid amonný a močovina. Jako zdroj uhlíku byla použita glukóza. Podmínky a složení kultivačních médií jsou uvedeny v kapitole 4.4.1.

V grafu na obrázku 6 je uvedena produkce biomasy v průběhu času a s různými zdroji dusíku. Jako nejlepší zdroj dusíku se jeví dusičnan draselný, kvasničný extrakt a močovina. Pro další experimenty, pak byly vybrány jako nejvhodnější zdroje dusíku dusičnan draselný a močovina. Výtěžky se pak pro tyto zdroje dostaly až na hodnotu okolo 9,0 g/l biomasy při submerzní kultivaci. Úplně nejvyššího výtěžku biomasy bylo dosaženo za použití dusičnanu

draselného, jakožto zdroje dusíku, ve 144. hodině kultivace, a to konkrétně 9,5 g/l biomasy. Naopak jako nejhorší zdroje dusíku byly vyhodnoceny síran amonný a chlorid amonný, proto pak tyto zdroje dále nebyly v experimentech použity. Obecně úplně nejhorším zdrojem byl síran amonný, napříč celým časovým spektrem, avšak konkrétně ve 48. hodině kultivace, hodnota biomasy přesahovala pouze hodnotu 4,0 g/l biomasy.

Co se týče celkového časového horizontu, tak nejvyšší produkce biomasy byly zaznamenány po 96 a 144 hodinách. Od 96. hodiny se pravděpodobně kultura dostala do stacionární fáze, vzhledem k tomu, že výtěžky biomasy byly konstatní pro jednotlivé zdroje dusíku.

Jiru a kol. (2017) uvádějí jako nejlepší zdroj dusíku síran amonný v kombinaci s kvasničným extraktem a peptonem. Při kultivaci v bioreaktorech dosahovalo množství biomasy hodnot okolo 17,0 g/l, což je hodnota vyšší než naše, avšak možnou příčinou je rozdílný způsob kultivace. Jako další zdroje dusíku také Jiri a kol. (2017) použili chlorid amonný opět v kombinaci s kvasničným extraktem a peptonem, tam však byly výtěžky biomasy o něco nižší, okolo 15,0 g/l. Stejně jako v našem experimentu byl chlorid amonný méně vhodným zdrojem dusíku [110].

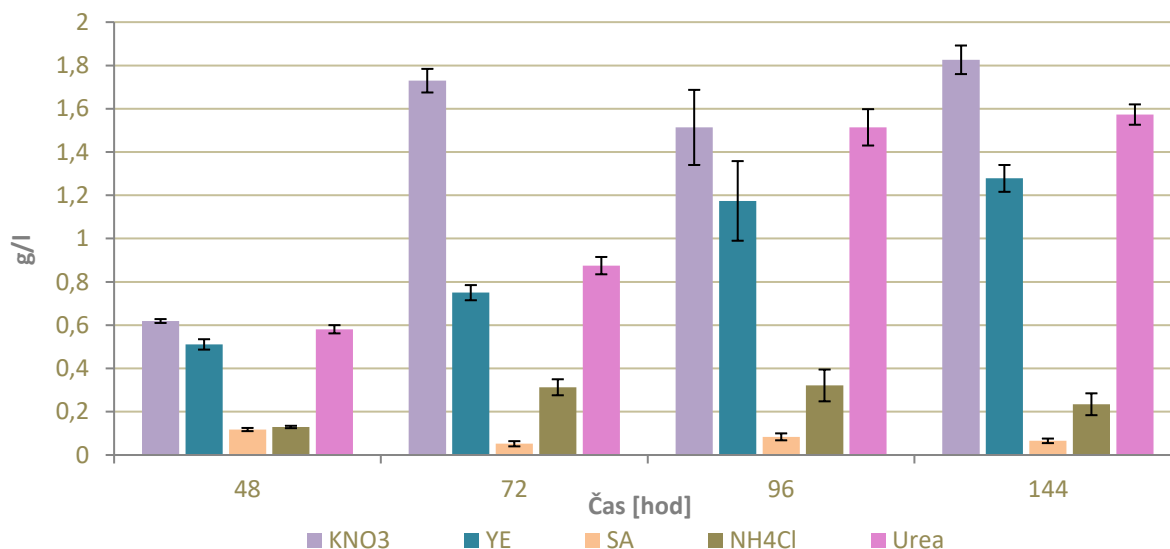


Obr. 6: Produkce biomasy v závislosti na čase a různých použitých zdrojích dusíku (dusičnan draselný – KNO₃, kvasničný extrakt – YE, síran amonný – SA, chlorid amonný – NH₄Cl a močovina – Urea)

Graf na obrázku 7 znázorňuje biosyntézu exoglykolipidů, kde rovněž nejlepšími zdroji dusíku byli dusičnan amonný, kvasničný extrakt a močovina, naopak nejhoršími zdroji byli opět síran amonný a chlorid amonný. Amplitudy bylo dosaženo ve 144. hodině za použití

dusičnanu draselného, kde koncentrace exoglykolipidů dosáhla až 1,8 g/l. Nejnižší výtěžek byl pozorován v 72. a 144. hodině kultivace s použitím síranu amonného, a to pouze 0,1 g/l.

U dusičnanu draselného pak byl pozorován mírný pokles množství exoglykolipidů mezi 72. a 144. hodinou, a tedy v 96. hodině kultivace hodnota výtěžku poklesla. U chloridu amonného také kultura dosáhla nejvyšší hodnoty v 96. hodině kultivace, a to 0,3 g/l, ve 144. hodině pak již byla hodnota nižší. Výtěžky při použití močoviny pak rostly v závislosti na čase od hodnoty 0,6 g/l ve 48. hodině kultivace, po 1,6 g/l ve 144. hodině.



Obr. 7: Biosyntéza exoglykolipidů v průběhu času a různých použitých zdrojích dusíku (dusičnan draselný – KNO₃, kvasničný extrakt – YE, síran amonný – SA, chlorid amonný – NH₄Cl a močovina – Urea)

Graf na obrázku 8 pak ukazuje produkci intracelulárních lipidů během kultivace na různých zdrojích dusíku. Výsledky obecně vykazují vysoké výtěžky obsahu intracelulárních lipidů, a to téměř 60 % lipidů v sušině. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo v 96. hodině kultivace, pak už množství kumulovaných lipidů spíše stagnovalo nebo klesalo, pravděpodobně se tedy kultura dostala do stacionární fáze růstu.

Kvasničný extrakt, jako zdroj dusíku, vykazoval takřka nejvyšší hodnotu výtěžku, 59 % v 96. hodině kultivace. Nejnižší akumulace lipidů pak byla pozorována na začátku kultivace (okolo 37 %).

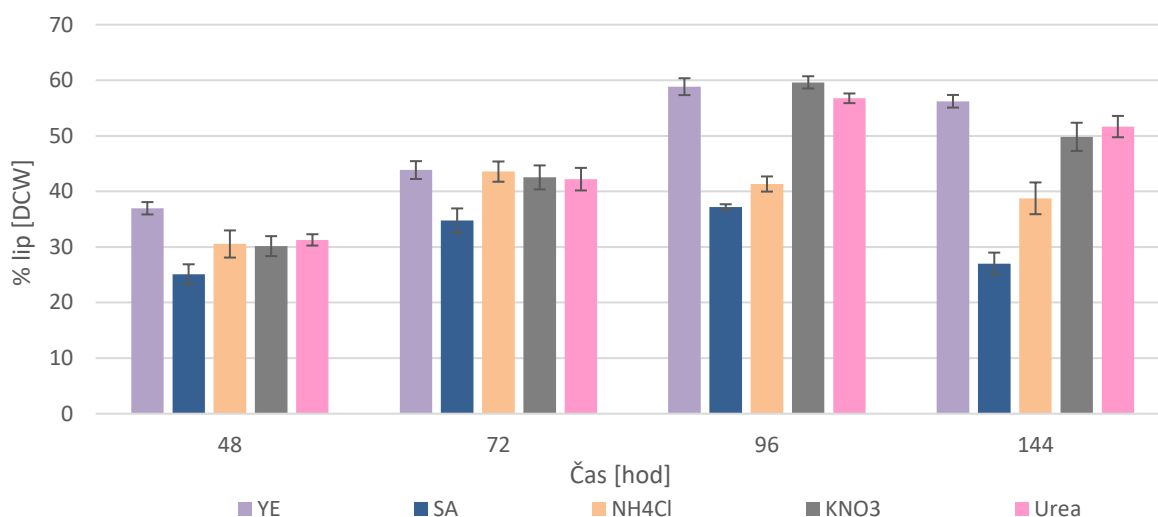
Nejhorším zdrojem dusíku, v tomto experimentu, byl síran amonný s množstvím okolo 25 % lipidů. Ačkoli i tento zdroj vykazoval během kultivace poměrně vysoké procento akumulace lipidů, a to až hodnoty blízké 40 %, celkově se jednalo o nejhorší zdroj. O něco lepším zdrojem než síran amonný, byl chlorid amonný, který vykazoval výtěžnost nad 40 %

lipidů. Avšak úplně nejlepším zdrojem byl vyhodnocen dusičnan draselný (což lze pozorovat i v předešlých experimentech). Dusičnan draselný vykazoval hodnotu 60 % akumulace intracelulárních lipidů, což je relativně vysoká hodnota. V závěru je pozorována močovina, která dosáhla maximálně hodnot nad 55 % akumulace lipidů.

Pokud bude porovnána produkce intracelulárních lipidů s odbornou literaturou, tak lze vycházet z experimentu kultivace *R. kratochvilovae*, kde byla jako zdroj uhlíku rovněž použita glukóza, ale zdroje dusíku byly měněny. Konkrétně se jednalo o tyto zdroje: síran amonný s kvasničným extraktem nebo močovinou nebo s přidavkem peptonu či chlorid amonný s kvasničným extraktem nebo močovinou nebo s přidavkem peptonu. Z experimentu vychází jako nejlepší zdroj dusíku síran amonný v kombinaci s kvasničným extraktem, kde akumulace lipidů dosahovala hodnoty 47 % v sušině biomasy. Avšak v našem experimentu bylo dosaženo hodnot vyšších, a to blízkých 60 %. Je tedy zřejmé, že vhodnějším zdrojem je dusičnan draselný, který byl použit v našem experimentu než síran amonný s přidavkem kvasničného extraktu, který je uveden v literatuře [110].

Jestliže budou porovnány hodnoty pro samotný síran amonný, v našem experimentu, bude závěrem, že naše hodnoty byly nižší než ty, které jsou uvedeny v literatuře, a tedy lze usoudit, že přidavek kvasničného extraktu pravděpodobně pomohl výtěžky zvýšit.

Pokud tedy konečně budou zhodnoceny všechny aspekty použitelnosti nejvhodnějšího zdroje dusíku, vychází, že nejlepší volbou bude pro použití dusičnan draselný a močovina, a to i vzhledem k dostupnosti a ceně.



Obr. 8: Produkce intracelulárních lipidů

(kvasničný extrakt – YE, síran amonný – SA, chlorid amonný – NH₄Cl, dusičnan draselný – KNO₃ a močovina – Urea)

Dalším vhodným literárním experimentem pro porovnání je kultivace *R. kratochvilovae*, kde bylo pozorováno množství biomasy a procentuální obsah intracelulárních lipidů v časovém horizontu až do 168 hodin. Jako médium byla použita živná půda, kde zdrojem dusíku byl síran amonný s přidavkem kvasničného extraktu a jako zdroj uhlíku posloužila melasa. Konečné složení média, co se týče uhlíkatých zdrojů, bylo: fruktóza – 21,05 %, glukóza 15,94 % a reziduá sacharózy – 1,29 %.

V samotném experimentu bylo dosaženo maximální hodnoty koncentrace biomasy 13,0 g/l ve 120. hodině kultivace. Zde byla kultura pravděpodobně ve stacionární fázi, protože v pozdějším časovém horizontu se výtěžek snížil na hodnotu pod 12,0 g/l a nastala tedy fáze odumírání. Co se týče akumulace intracelulárních lipidů, tak tam bylo maxima dosaženo ve 144. hodině kultivace, takřka 40 % obsahu lipidů v sušině [111].

Bude-li srovnán tento experiment s námi provedeným, je zřejmé, že s dusičnanem draselným a močovinou bylo dosaženo lepších výsledků než se zde uvedeným síranem amonným, byť v kombinaci s kvasničným extraktem, který se jeví také jako vhodný zdroj, ovšem zřejmě jako čistý, a ne v kombinaci s čímkoli jiným [111].

Konkrétně bylo v našem experimentu dosaženo pro síran amonný (bez kvasničného extraktu) ve stejném čase hodnoty okolo 6,0 g/l, tedy výrazně nižší než v experimentu z literatury. Co se pak týče akumulace lipidů, maxima bylo v našem experimentu dosaženo v 96. hodině, a to 37 % lipidů v sušině, avšak ve 144. hodině bylo dosaženo pouhých 27 % obsahu lipidů, kdežto v literatuře je uvedena hodnota ve 144. hodině okolo 40 % akumulace lipidů v sušině biomasy. Je tedy zřejmé, že melasa, která obsahuje nejen glukózu (jak tomu bylo v našem experimentu), ale i fruktózu a reziduá sacharózy, se jeví být vhodnějším zdrojem uhlíku než samotná glukóza [111].

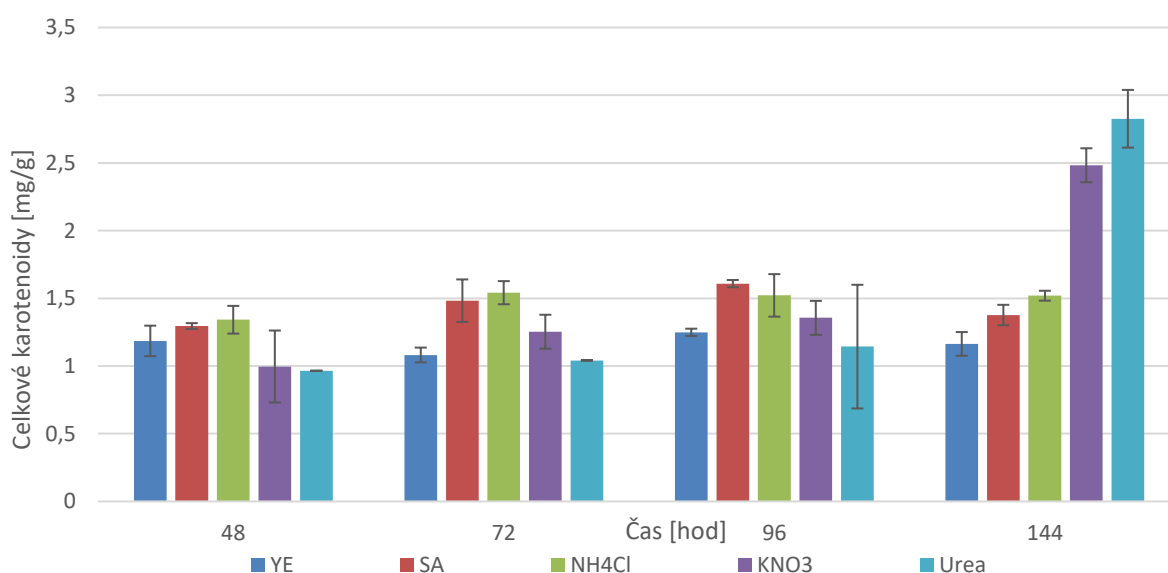
Poslední graf této kapitoly (Obrázek 9) zobrazuje celkové množství vyprodukovaných karotenoidů kvasinkami v médiu s různými zdroji dusíku – kvasničný extrakt, síran amonný, chlorid amonný, dusičnan draselný a močovina. Jako zdroj uhlík byla použita glukóza.

Nejlépším zdrojem pro produkci karotenoidů je dle výsledků močovina, kde bylo dosaženo hodnoty přes 2,8 mg/g karotenoidů na gram biomasy. Avšak tohoto výsledku bylo dosaženo až v poslední fázi kultivace, ve 144. hodině, dříve patřila močovina spíše mezi ty horší zdroje dusíku pro syntézu karotenoidů. Během kultivace od 48. po 96. hodinu byla hodnota pro močovinu okolo 1,0 mg/g (což je i nejnižší dosažená hodnota v celém experimentu). Následujícím vhodným zdrojem dusíku se jeví dusičnan draselný, který ale také zvýšil produkci na své maximum až ve 144. hodině kultivace, a to konkrétně na hodnotu 2,5 mg/g.

V prvních 96 hodinách kultivace rostly hodnoty výtěžků karotenoidů víceméně lineárně od hodnoty 1,0 mg/g až po 1,3 mg/g, až ve 144. hodině je pozorován rapidní nárůst.

Průměrně horšími zdroji dusíku pro biosyntézu karotenoidů jsou kvasničný extrakt, chlorid amonný a síran amonný. Nejnižší hodnota byla pozorována v 72. hodině pro kvasničný extrakt, a to téměř 1,1 mg/g. Maximem pro tento zdroj byla hodnota dosažená v 96. hodině kultivace, a to 1,25 mg/g. Pro síran amonný bylo nejvyšší hodnoty dosaženo v 96. hodině, a to 1,6 mg/g a nejnižší ve 48. hodině – 1,3 mg/g. Podobně na tom byl i chlorid amonný se svým maximem v 72. hodině, a to takřka 1,6 mg/g a minimem ve 48. hodině – 1,34 mg/g.

Nejčasteji se mezi karotenoidy vyskytoval β -karoten, torulen a malé množství lykopenu. Tyto karotenoidy byly stanoveny dle běžné standardizace a porovnáním se známými standardy.



Obr. 9: Produkce celkových karotenoidů (kvasničný extrakt – YE, síran amonný – SA, chlorid amonný – NH₄Cl, dusičnan draselný – KNO₃ a močovina – Urea)

5.1.2 Vliv zdroje uhlíku na produkci vybraných metabolitů

Dalším krokem experimentu byl výběr uhlíkatých zdrojů, které byly zvoleny podle drop testů z experimentů diplomové práce Ing. Moniky Roubalové, kdy tento kmen vykazoval nejlepší růst na manóze, laktóze, glycerolu a xylóze. U jiných monosacharidů byl růst příliš inhibován, a proto nebyly v této práci zahrnuty [112].

Jako zdroj dusíku byl vybrán dusičnan draselný a močovina, jelikož tyto dva zdroje vykazovaly v předchozím experimentu (viz. kap. 5.1.1) nejvyšší výtěžky biomasy, intracelulárních lipidů a hlavně exoglykolipidů. Vysoké výtěžky byly rovněž sledovány

u kvasničného extraktu, který je však náročným zdrojem vzhledem ke své ceně v porovnání se dvěma výše vybranými.

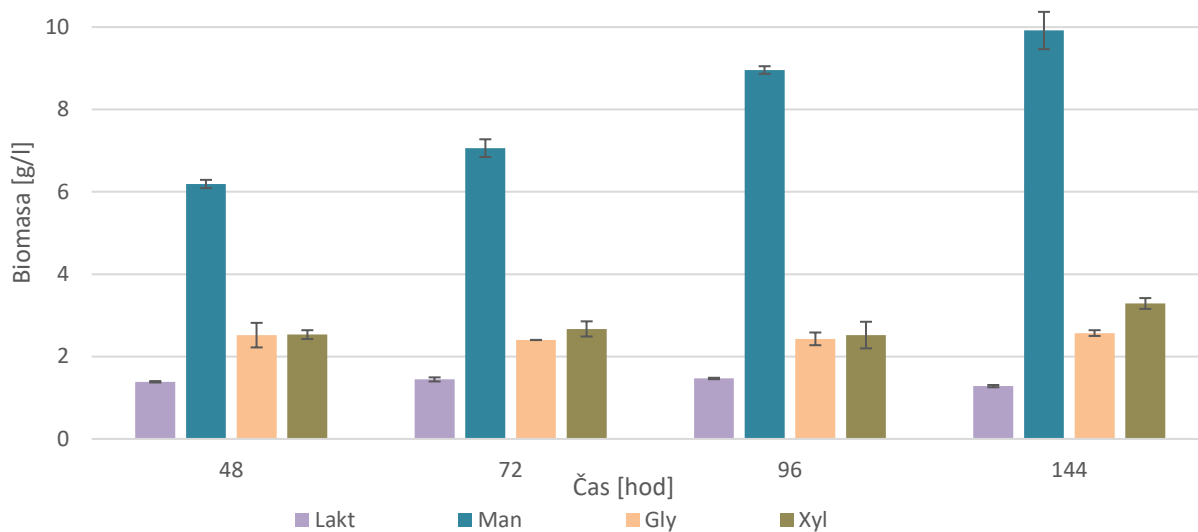
Na obrázku 10 pak můžeme pozorovat graf, který hodnotí produkci biomasy v závislosti na čase a s použitím různých zdrojů uhlíku, jako je laktóza, manóza, glycerol a xylóza. Jako zdroj dusíku byla použita močovina.

Úplně nejhorším zdrojem v experimentu byla laktóza, která je tedy pro kvasinku nejméně vhodným zdrojem uhlíku, pravděpodobně kvůli absenci, či nedostatku, laktázy k rozštěpení disacharidu na využitelné monosacharidy. Výtěžek biomasy byl maximálně jen okolo 1,0 – 1,5 g/l. Po laktóze následoval, také jako méně vhodný zdroj uhlíku, glycerol, který vykazoval hodnoty lehce nad 2,0 g/l biomasy a tyto hodnoty byly velmi podobné i napříč celým časovým horizontem. Velmi podobně jako glycerol se jeví i xylóza, která vykazovala mírně lepší výsledky, a to nejvíce asi v 72. a 144. hodině, kdy bylo dosaženo hodnot okolo 3,0 g/l.

Jako nejlepší zdroj uhlíku byla bezkonkurenčně manóza, která na počátku experimentu vykazovala hodnoty okolo 6,0 g/l, až po 10,0 g/l biomasy ve 144. hodině kultivace. Je evidentní, že tento zdroj byl úplně nejvhodnější a kvasinkám tedy nejvíce vyhovoval.

Lze tedy zhodnotit, že jako nejlepší zdroj uhlíku a dusíku pro produkci biomasy v závislosti na čase, se jeví močovina a manóza.

V předchozím experimentu, při využití močoviny, jako zdroje dusíku, byl získán maximální výtěžek okolo 9,0 g/l, kdy zdrojem uhlíku byla glukóza. Zde lze pozorovat, že při stejném zdroji dusíku a manóze, jako zdroji uhlíku, byly získány ještě o něco lepší výsledky (10,0 g/l). Je tedy zřejmé, že manóza je pro tento experiment ještě lepším zdrojem uhlíku než glukóza, byť rozdíl není nijak zásadní.

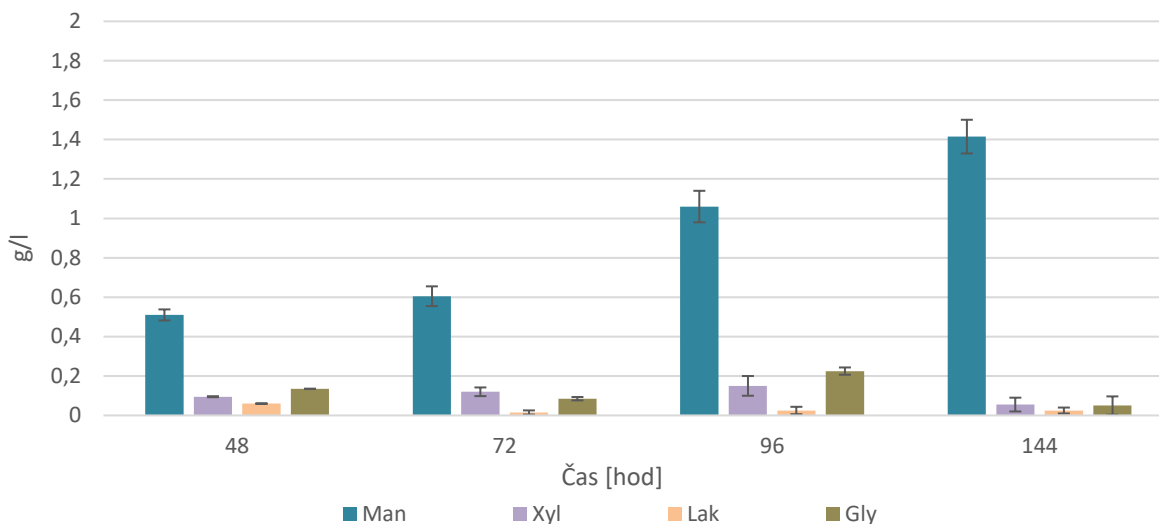


Obr. 10: Produkce biomasy v průběhu času a různých použitých zdrojích uhlíku a močoviny jako zdroji dusíku (laktóza – Lakt, manóza – Man, glycerol – Gly a xylóza – Xyl)

Níže vykreslený graf pak vypovídá o produkci exoglykolipidů v závislosti na čase s použitím různých zdrojů uhlíku a jediného zdroje dusíku – močoviny. Situace se analogicky opakuje, stejně jako u produkce biomasy s různými zdroji uhlíku. A tedy nejvhodnějším zdrojem uhlíku pro produkci exoglykolipidů je manóza a zbylé zdroje nechává daleko za sebou. S použitím manózy bylo dosaženo hodnot až 1,4 g/l exoglykolipidů.

Druhým nejlepším zdrojem se jeví glycerol, kde bylo dosaženo maximálního výtěžku v 96. hodině kultivace, a to lehce nad 0,2 g/l exoglykolipidů. Ostatní zdroje vykazovaly velmi nízké hodnoty v porovnání s manózou, a to přibližně okolo 0,1 g/l.

Bude-li porovnávána produkce exoglykolipidů s předchozím experimentem, závěrem bude, že koncentrace exoglykolipidů byla v tomto experimentu o něco nižší (dříve 1,8 g/l, nyní 1,4 g/l). Glukóza v kombinaci s močovinou se tedy jeví, pro produkci exoglykolipidů, jako mírně vhodnější zdroj.



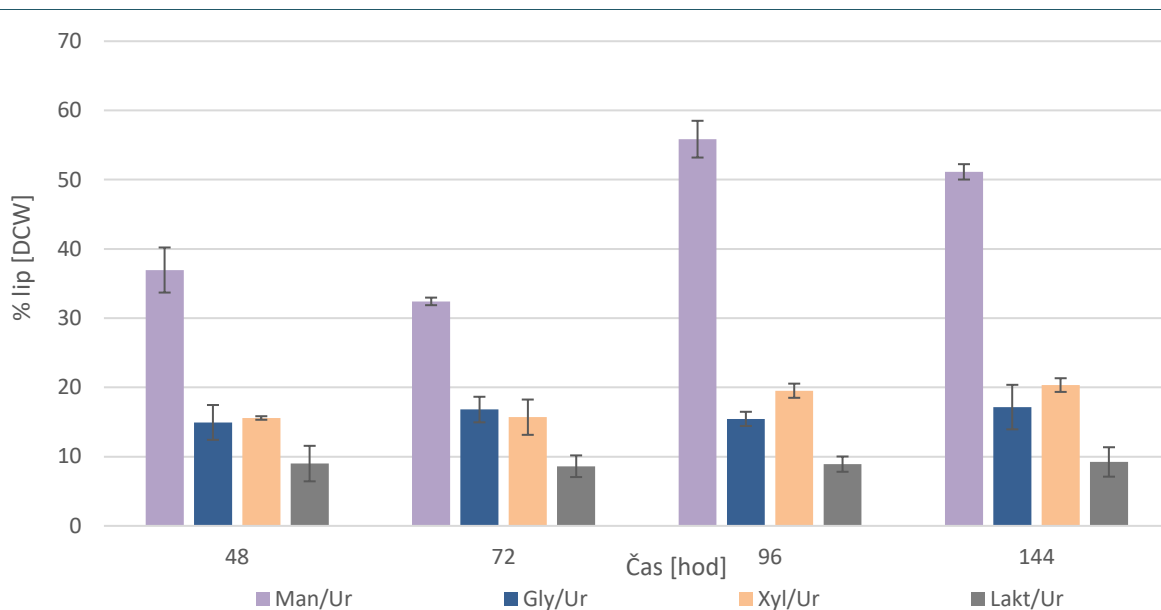
Obr. 11: Biosyntéza exoglykolipidů v průběhu času a různých použitých zdrojích uhlíku a močoviny jako zdroji dusíku (laktóza – Lakt, manóza – Man, glycerol – Gly a xylóza – Xyl)

Na dalším grafickém zobrazení, na obrázku 12, je možné vidět procentuální obsah intracelulárních lipidů v sušině. Zde byly opět použity různé zdroje uhlíku (manóza, glycerol, xylóza a laktóza) a jako zdroj dusíku byla opět použita močovina.

I na tomto grafu je zřejmé, že nejvhodnějším zdrojem uhlíku byla znovu manóza. Avšak celkově nebylo dosaženo tak vysokých hodnot jako při kultivaci s dusičnanem draselným a glukózou (viz. kap. 5.1.1).

Při použití manózy bylo dosaženo maximální hodnoty v 96. hodině, a to asi 55 % intracelulárních lipidů v sušině. Ve 144. hodině se kultura pravděpodobně dostala do fáze odumírání a výtěžek se začal snižovat.

Co se týče glycerolu a xylózy, tak tam byly výtěžky napříč spektrem poměrně podobné. Maxima dosáhl glycerol v 72. a 144. hodině, a to přibližně 17 % obsahu intracelulárních lipidů. U xylózy bylo dosaženo maxima ve 144. hodině, a to 20 % obsahu. Nejméně vhodným zdrojem je zde evidentně laktóza, která celkově nevedla k produkci vyšší než 8 %.



Obr. 12: Biosyntéza intracelulárních lipidů v průběhu času a různých použitých zdrojích uhlíku a močoviny jako zdroji dusíku (laktóza – Lakt, manóza – Man, glycerol – Gly a xylóza – Xyl)

Obrázek 13 graficky zobrazuje celkovou produkci karotenoidů *R. kratochvilovae*, kdy živné médium obsahovalo močovinu jako jediný zdroj dusíku a různé zdroje uhlíku – glycerol, manóza, xylóza a laktóza.

Evidentně nejlepší zdroj v tomto experimentu je xylóza, což tedy značně narušuje analogii předešlých experimentům, kde prvenství patřilo zejména manóze, kdy ta je zde přesunuta až na druhé místo, s nejvyšší produkcí ve 144. hodině kultivace s hodnotou 1,4 mg/g karotenoidů. Xylóza dosáhla svého maxima rovněž ve 144. hodině kultivace, a to 1,5 mg/g a s touto hodnotou si zaslouží post nejvhodnějšího zdroje produkce karotenoidů kvasinkami. Co se týče minimálních hodnot pro tyto zdroje uhlíku, tak pro manózu bylo minima dosaženo ve 48. hodině, 1,0 mg/g a pro xylózu také ve 48. hodině, a to hodnoty jen 0,9 mg/g karotenoidů.

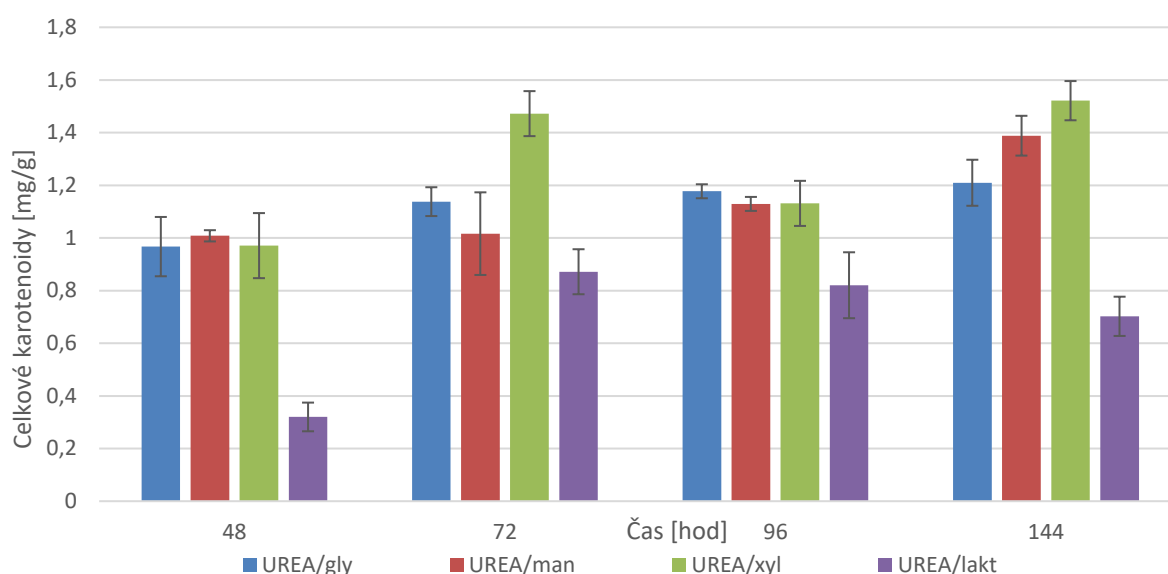
Zajímavý je i pokles hodnot produkce karotenoidů pro xylózu v 96. hodině (pád z 1,4 mg/g na 1,1 mg/g a opětovný nárůst na 1,5 mg/g na sklonku kultivace), kdy kultura nejspíše strádala na základních živinách, a proto došlo k poklesu biosyntézy sekundárních metabolitů, jako jsou, zde zmiňované, karotenoidy.

Nejhorším zdrojem byla určitě laktóza, která syntetizovala v maximu pouze 0,87 mg/g karotenoidů. Avšak z počátku kultivace byla situace ještě horší a nejnižší hodnota pro laktózu, i pro celý experiment, byla dosažena ve 48. hodině, a to 0,3 mg/g.

Mezi průměrné zdroje lze zařadit glycerol, který dosáhl své amplitudy ve 144. hodině, a to 1,2 mg/g. Obecně, během celé kultivace, hodnoty pro glycerol kolísaly okolo hodnoty 1,1 mg/g.

V porovnání s předchozím experimentem produkce karotenoidů na médiu s různými zdroji dusíku a glukózou, jako jediném zdroji uhlíku, došlo k zásadnímu poklesu hodnot celkových karotenoidů. A to následovně: dříve byla hodnota celkových karotenoidů pro močovinu, jako zdroj dusíku a glukózu, jako zdroj uhlíku, až okolo 2,8 mg/g karotenoidů, kdežto zde bylo dosaženo maxima (pro xylózu) 1,5 mg/g, a to ve stejném kultivačním čase (144 hodina).

Pak je tedy zřejmé, že pro produkci karotenoidů je vhodnější kombinace močoviny s glukózou než s jinými zdroji sacharidů.



Obr. 13: Biosyntéza karotenoidů v průběhu času a různých použitých zdrojích uhlíku a močoviny jako zdroji dusíku (laktóza – Lakt, manóza – Man, glycerol – Gly a xylóza – Xyl)

Graf na obrázku 14, pak znázorňuje produkci biomasy v průběhu času s použitím různých zdrojů uhlíku a dusičnanu draselného, jako jediného zdroje dusíku.

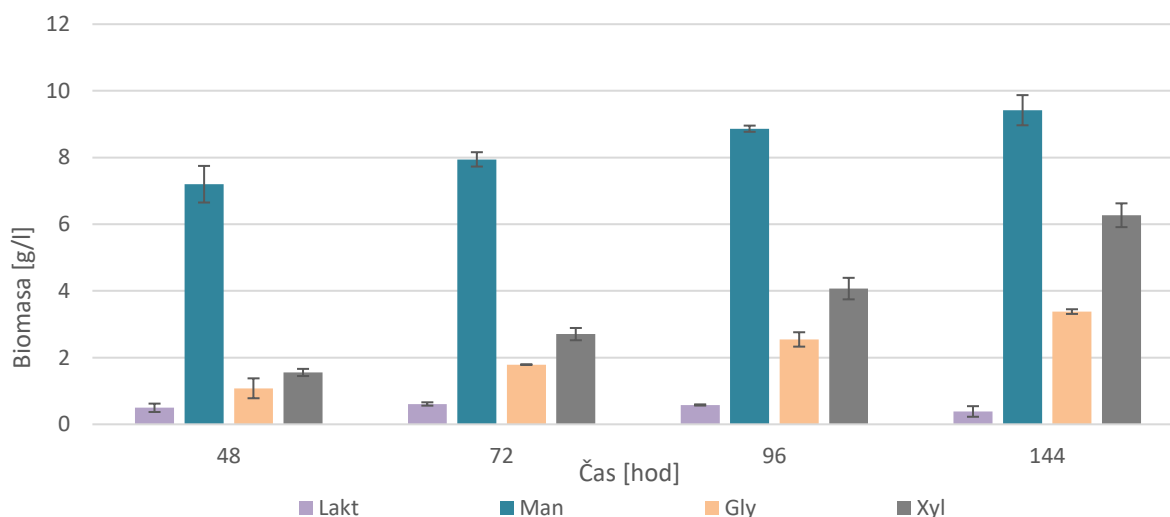
Evidentně nejlepším zdrojem uhlíku je v tomto experimentu opět manóza, a to konkrétně ve 144. hodině, kdy je možné pozorovat výtěžky až okolo 9,5 g/l biomasy. V časovém horizontu od počátku kultivace, kdy byla hodnota pro manózu po 48. hodině 7,2 g/l, výtěžky postupně rostly, avšak ne tak rapidně, jako na samém začátku kultivace. Tento fakt vypovídá o tom, že manóza je pro kvasinky opravdu vhodným zdrojem uhlíku v kombinaci s KNO_3 , kdy i při krátké expozici studovaného kmene takto sestavenému médiu, dochází nejspíše k nejrychlejší adaptaci na zvolené substráty v porovnání s předchozími výsledky.

Obecně lze říct, že dusičnan draselný je méně vhodným zdrojem dusíku než močovina, protože v předešlém experimentu, bylo pro manózu dosaženo hodnoty až okolo 10,0 g/l, což je pro biomasu maximum napříč spektrem všemi z vykonaných experimentů. Ovšem srovnatelné hodnoty biomasy, tedy okolo 9,5 g/l, bylo dosaženo v experimentu, kdy byla zdrojem uhlíku glukóza a zdrojem dusíku, již zmiňovaný, dusičnan draselný.

Druhým nejvhodnějším zdrojem uhlíku byla xylóza, která na sklonku kultivace dosahovala hodnot okolo 6,2 g/l. Nejnižších hodnot pro xylózu bylo dosaženo na počátku kultivace, asi 1,3 g/l, kde pak hodnota během kultivace de facto lineárně rostla, až ke zmíněnému maximu.

I zde je možné porovnat množství biomasy s experimentem s využitím močoviny a xylózy – hodnoty byly pro tuto kombinaci naopak nižší, jen okolo 3,5 g/l, než pro kombinaci močoviny a manózy. Lze tedy vyvodit, že kombinace močoviny s manózou vykazuje lepší výsledky než manóza s dusičnanem draselným, ale naopak xylóza, jako zdroj uhlíku, lépe funguje v kombinaci s dusičnanem draselným než s močovinou.

Upozaděnými zdroji uhlíku zde jsou glycerol a hlavně laktóza. Zatímco glycerol se během kultivace dostal alespoň k hodnotě 3,38 g/l, laktóza vykazovala výsledky mnohem horší, maximálně 0,61 g/l a nelze přehlédnout, že v časovém horizontu výtěžky takřka nerostly, což opětovně potvrzuje, že laktóza vhodným zdrojem opravdu není.



Obr. 14: Produkce biomasy v průběhu času a různých použitých zdrojích uhlíku a dusičnanu draselném jako zdroji dusíku (laktóza – Lakt, manóza – Man, glycerol – Gly a xylóza – Xyl)

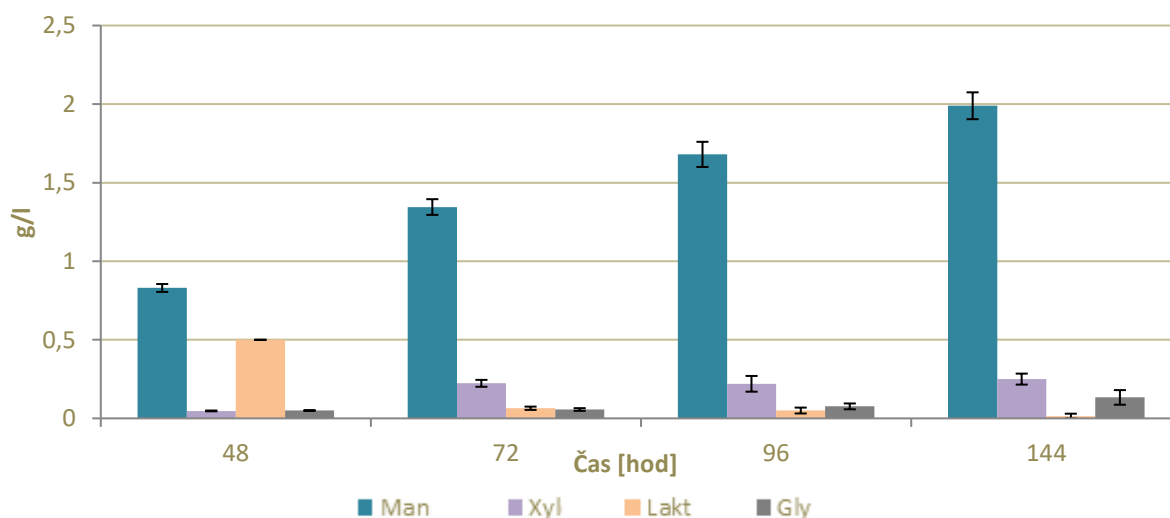
Grafický výstup dalšího experimentu (obr. 15) vypovídá o množství biosyntetizovaných exoglykolipidů při kultivaci na médiu s různými zdroji uhlíku a jediným zdrojem dusíku – dusičnem draselným, v závislosti na čase.

Opět je zde bezkonkurenčně nejlepším zdrojem uhlíku manóza, která dosáhla nejvyšších výtěžků, a to až okolo 2,0 g/l ve 144. hodině kultivace. Na grafu lze vidět takřka výstavní lineární růst biosyntézy exoglykolipidů pro manózu, během celé doby kultivace.

Pokud bude znovu porovnána koncentrace exoglykolipidů s předešlým experimentem (močovina, jako zdroj dusíku), výsledkem bude, že vhodnějším zdrojem pro biosyntézu exoglykolipidů se jeví dusičnan draselný, vzhledem k tomu, že v předchozím experimentu bylo dosaženo maximálních hodnot jen okolo 1,4 g/l exoglykolipidů.

Jako následující nevhodnější zdroj, vychází laktóza, což je ale vzhledem k celku velmi nahodilý výsledek, který bude nejspíše zatížen jistou chybou, byť vykazuje velmi malou odchylku měření. Pro laktózu, a to pouze ve druhém dni kultivace, bylo dosaženo hodnoty 0,5 g/l, která ale s časem razantně klesla až k hodnotě okolo 0,1 g/l. Průměrně se tedy druhým nejlepším zdrojem jeví xylóza s výtěžkem okolo 0,3 g/l od 72. až po 144. hodinu kultivace.

Ve srovnání s manózou jsou však všechny ostatní zdroje poměrně nevhodné a na samém dně lze vyhodnotit pravděpodobně glycerol s pouhými 0,05 – 0,13 g/l.



Obr. 15: Biosyntéza exoglykolipidů v průběhu času a různých použitých zdrojích uhlíku a dusičnanu draselném jako zdroji dusíku (laktóza – Lakt, manóza – Man, glycerol – Gly a xylóza – Xyl)

Na dalším obrázku je graficky vyobrazena biosyntéza intracelulárních lipidů ve stejném časovém horizontu, jako u předchozích experimentů, s různými zdroji uhlíku a s KNO_3 jako jediným zdrojem dusíku.

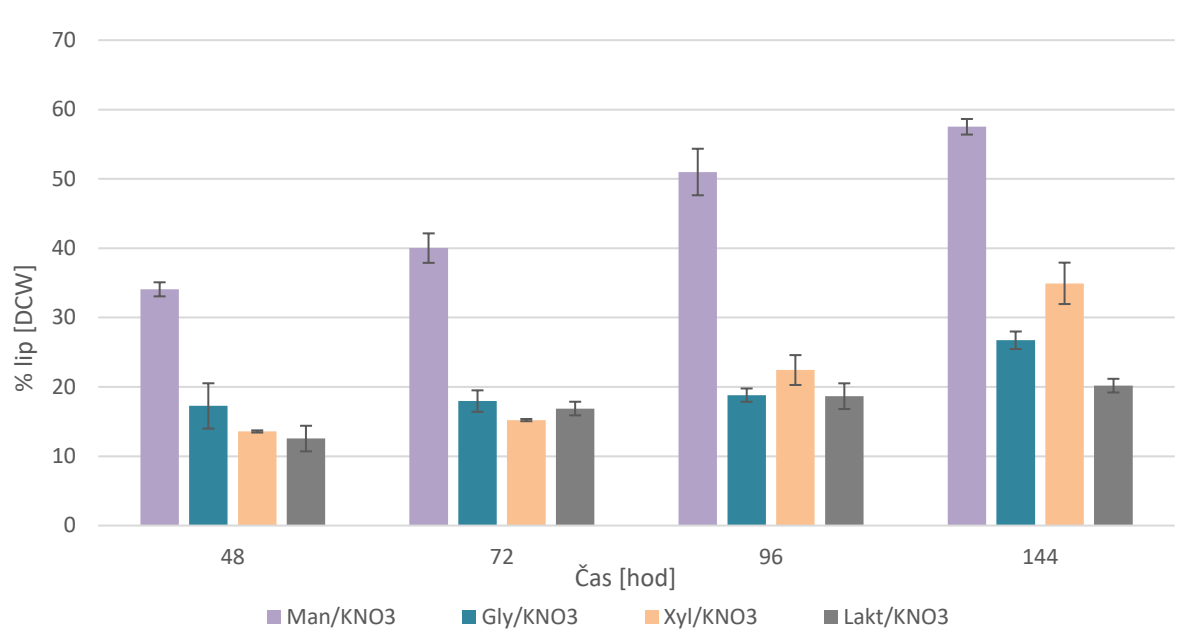
Nejvyšší procento intracelulárních lipidů v sušině, konkrétně 57 %, bylo kumulováno u manózy, jakožto použitého zdroje dusíku, a to ve 144. hodině kultivace. U experimentu s močovinou, jako zdroji dusíku, a manózy, jako zdroji uhlíku, byly hodnoty obsahu lipidů v sušině o něco nižší (asi 57 %), rozdíl je však poměrně malý. Jediným rozdílem bylo, že v experimentu s močovinou a manózou bylo maxima dosaženo v 96. hodině kultivace a zde až ve 144. hodině.

Druhým nejadekvátnějším zdrojem uhlíku byla xylóza, která dosahovala hodnoty asi 35 % nakumulovaných lipidů v sušině ve 144. hodině kultivace a tento trend byl zachován již z předchozího experimentu s močovinou, akorát maximální hodnota čítala 20 %, tedy byla asi o 15 % nižší než zde.

V zápětí za xylózou byl nejvhodnějším zdrojem glycerol, který se dostal k hodnotám okolo 27 %, také ve 144. hodině kultivace. Nejméně vhodným zdrojem byla opět laktóza, která byla schopna vyprodukovat pouze 20 % intracelulárních lipidů v sušině.

Trend pořadí vhodnosti zmíněných zdrojů uhlíku byl zachován i v experimentu, kde byla zdrojem dusíku močovina, avšak celkově bylo dosaženo o něco nižších nebo srovnatelných hodnot, snad jen kromě kombinace močoviny s manózou ve druhém dni kultivace, kdy hodnota byla okolo 47 % a zde (dusičnan draselný a manóza) je přibližně o 12 % nižší.

Obecně však lze konstatovat, že ve všech experimentech, kde byla sledována kumulace intracelulárních lipidů v sušině biomasy, bylo dosaženo poměrně vysokých výtěžků. U kombinace glukózy s dusičnanem draselným, jako zdrojů uhlíku a dusíku, bylo maximální hodnoty dosaženo v 96. hodině, a to 60 % lipidů. Pokud zhodnotíme, jako zdroje uhlíku a dusíku, manózu a močovinu, nejvyšší výtěžek byl rovněž dosažen v 96. hodině kultivace, a to 55 %. A konečně pro kombinaci zdrojů uhlíku a dusíku – manóza a dusičnan draselný – bylo maxima dosaženo ve 144. hodině, a to hodnoty 58 % intracelulárních lipidů v sušině.



Obr. 16: Biosyntéza intracelulárních lipidů v průběhu času a různých použitých zdrojích uhlíku a dusičnanu draselném jako zdroji dusíku (laktóza – Lakt, manóza – Man, glycerol – Gly a xylóza – Xyl)

Co se týče odborných článků ohledně kultivace kvasinek na živném médiu s různými zdroji uhlíku, bylo komplikované najít publikace, kde by se jako zdroj uhlíku vyskytovala manóza a jako zdroj dusíku močovina nebo dusičnan draselný, jako tomu bylo v našich experimentech. Většina odborných publikací uvádí využití jako zdroj uhlíku spíše glukózu, eventuálně xylózu či glycerol, které jsou lépe dostupnými zdroji než například manóza nebo laktóza [113].

Galafassi a kol. (2012) však uvádějí ve svém experimentu hodnoty výtěžků biomasy a lipidů za využití různých zdrojů uhlíku (glukóza, xylóza, galaktóza, manóza, celobióza a glycerol) a síranu amonného a kvasničného extraktu, jako zdroje dusíku. Výsledky tohoto experimentu pro kultivaci u *Rhodotorula graminis* jsou uvedeny v tabulce 10. Kultura dosahovala nejvyšších výtěžků ve 140. hodině kultivace, která probíhala v Erlenmyerových baňkách po dobu 6-ti dní [113].

Tabulka 10: Výtěžky biomasy a lipidů u *Rhodotorula graminis* s různými zdroji uhlíku

[113]

Zdroj uhlíku	Glukóza	Xylóza		Galaktóza	Manóza	Celobióza	Glycerol
Čas [hod.]	140	140	190	140	140	140	140
Biomasa [g/l]	16,09±1,12	10,78±0,95	11,96±0,82	12,44±1,03	14,28±1,26	12,00±0,85	13,00±0,56
Výtěžky lipidů v sušině [%]	40±2	17±1	21±1	24±2	24±1	16±1	22±1

Z tabulky 10 je zřejmé, že nejvhodnějším zdrojem uhlíku pro produkci biomasy byla glukóza, avšak manóza je hned na druhém místě. Množství biomasy pro kultivaci s manózou je pouze o cca 1,5 g/l nižší než při použití glukózy. Ostatní uhlíkaté zdroje vykazovaly poměrně podobné hodnoty koncentrace biomasy (okolo 12,0 – 13,0 g/l), avšak o něco nižší než glukóza a manóza [113].

V našich experimentech, kde byl sice použit jiný zdroj dusíku (dusičnan draselný nebo močovina) jsme nejvyšší hodnoty dosáhli ve 144. hodině kultivace, při kombinaci močoviny s manózou (10,0 g/l), hned záhy byla nejvyšší koncentrace pro glukózu a dusičnan draselný a stejná hodnota i pro manózu a dusičnan draselný (9,5 g/l).

Co se týče výtěžků lipidů, tak tam jsou výsledky uvedené v odborné publikaci hluboko pod výsledky, které byly dosaženy v našich experimentech. V publikaci byl nejvyšší výtěžek lipidů dosažen pro glukózu, jako zdroj uhlíku, a to 40 % lipidů v sušině biomasy. V našem experimentu, kde byla rovněž glukóza zdroj uhlíku a síran amonný zdroj dusíku, bylo maximální hodnoty dosaženo v 72. hodině kultivace, a to hodnoty blízké 35 % avšak při použití kvasničného extraktu, byla maximální hodnota blízka 60 %, čili o 20 % vyšší. Totéž platí pro dusičnan draselný, pro který bylo také dosaženo v 96. hodině hodnoty 60 % akumulace intracelulárních lipidů. Pokud ale bude porovnána hodnota pro jiné zdroje uhlíku, pak také bylo v našich experimentech obecně dosaženo vyšších hodnot, zejména co se týče manózy. Naše biomasa obsahovala v sušině okolo 50 % lipidů ve stejném čase, avšak v článku bylo dosaženo hodnot pouze okolo 24 %, což je podstatně méně. Rozdílným faktorem je zde zdroj dusíku, kde v našem experimentu byla použita močovina, případně

dusičnan draselný (maximální hodnota až okolo 60 %) a v článku byl použitý síran amonný s přídatkem kvasničného extraktu. Pro xylózu a glycerol, které byly použity i v našem experimentu, jako alternativní zdroje uhlíku, bylo dosaženo hodnot podobných, jako v publikaci, hovoříme-li o experimentu s močovinou, jakožto zdrojem dusíku. Pokud budou porovnány hodnoty z experimentu s dusičnanem draselným, jako zdrojem dusíku, bylo v našich podmínkách dosaženo hodnot vyšších, a to pro xylózu až 35 % a pro glycerol až 28 % [113].

Rozdílné hodnoty výtěžků mezi našim experimentem a experimentem z publikace bude jistě zapříčiněn jiným mikroorganismem a jinou skladbou kultivačního média. Navzdory námi vyprodukovanému nižšímu množství biomasy naše práce poskytuje výrazně vyšší akumulaci lipidů, než-li v uvedených publikacích.

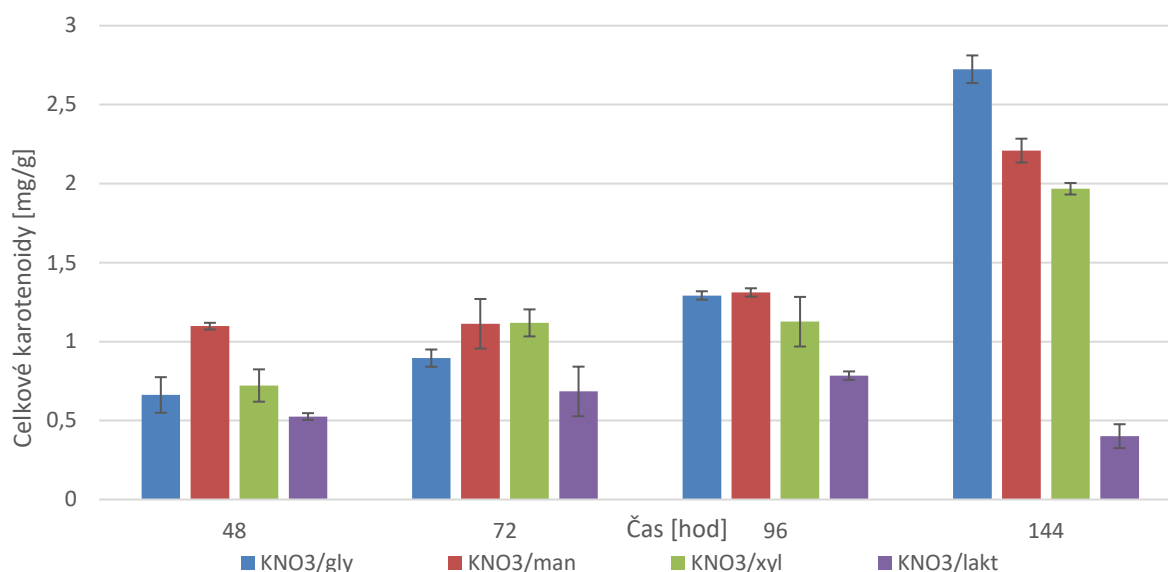
Graf na obrázku 17 znázorňuje výsledky hodnot biosyntézy celkových karotenoidů na různých zdrojích uhlíku (laktóza, manóza, glycerol a xylóza) a dusičnanu draselném, jako jediném zdroji dusíku. Na rozdíl od experimentu s močovinou je zde jako nejlepší zdroj vyhodnocen glycerol, pro kterého bylo dosaženo maxima ve 144. hodině kultivace, a to 2,7 mg/g karotenoidů. Během prvních fází kultivace však hodnoty pro glycerol byly podstatně nižší (0,6 mg/g ve 48. hodině, až po 1,3 mg/g v 96. hodině), což může být způsobeno upozaděním syntézy a stimulace produkce karotenoidů, jako, v této fázi, méně vhodného metabolitu.

Dalším nejvhodnějším zdrojem v tomto experimentu byla manóza, které hodnoty v prvních 96 hodinách oscilovaly okolo hodnoty 1,2 mg/g, teprve ve 144. hodině byl pozorován nejvyšší výtěžek, a to 2,2 mg/g karotenoidů.

Mezi méně vhodné zdroje lze zařadit xylózu (která byla v experimentu s močovinou vítězem), která nedosáhla hodnot vyšších než 1,97 mg/g ve 144. hodině a minimum je pak možné vidět na začátku kultivace, ve 48. hodině, a to 0,7 mg/g. Ve většině našich experimentů je možné pozorovat nejnižší výtěžky v úvodu kultivace a tato analogie je zachována i zde. Kultura se z počátku přizpůsobuje podmínkám, které médium nabízí a jak je všeobecně známo, sekundární metabolity jsou metabilizovány až ve stacionární fázi, kdy na začátku kultivace se kultura nachází spíše ve fázi exponenciální.

Nejhorším zdrojem pro produkci karotenoidů byla laktóza, která maximálně vyprodukovala 0,7 mg/g a minimálně 0,4 mg/g, paradoxně až na konci kultivace, ve 144. hodině. Kultura pravděpodobně prošla stacionární fází mezi 72. a 96. hodinou a na konci kultivace se již dostala do fáze odumírání.

V experimentu, který probíhal za stejných podmínek jako tento, s tím rozdílem, že zdrojem dusíku byla močovina, si lze povšimnout, že v tomto experimentu bylo dosaženo vyšších výtěžků, byť to není nijak zásadní. Pro močovinu, jakožto zdroj dusíku, bylo maxima dosaženo ve 144. hodině pro xylózu, a to 1,5 mg/g, zatímco zde byl vítězem glycerol, ve stejném kultivačním čase, ale s hodnotou 2,7 mg/g celkových karotenoidů. U laktózy můžeme propad na konci kultivace pozorovat v případě obou experimentů.



Obr. 17: Biosyntéza karotenoidů v průběhu času a různých použitých zdrojích uhlíku a dusičnanu draselném jako zdroji dusíku (laktóza – Lakt, manóza – Man, glycerol – Gly a xylóza – Xyl)

Pokud budou naše experimenty pro biosyntézu karotenoidů porovnány s těmi, které byly uvedeny v odborných publikacích, tak obecně v našem měřítku bylo dosaženo výsledků lepších. Dle výsledků (tabulka 11) z publikace Saenge a kol. (2011) je zřejmé, že jak výtěžky biomasy, tak lipidů i karotenoidů, jsou nižší než ty naměřené v našich experimentech [46].

Zvýrazněné hodnoty v tabulce 11 jsou nejvyšší napříč uvedeným experimentem z odborné publikace, a to pro kultivaci kvasinky *R. kratochvilovae* v bioreaktoru na médiu s glukózou, jako zdrojem uhlíku a kvasničním extraktem, jako zdrojem dusíku. Hodnota biomasy čítala maximálně 6,33 g/l, kumulace lipidů byla ve výši takřka 33 % a biosyntéza karotenoidů dosahovala hodnoty okolo 130 mg/l [46].

V našem experimentu bylo pro kvasinku téhož druhu a za stejných kultivačních podmínek dosaženo hodnot okolo 9,0 g/l biomasy a 60 % kumulace lipidů. Karotenoidy na tomto zdroji dusíku nebyly stanoveny, neboť vzhledem k dostupnosti a ceně kvasničního extraktu, byl

tento zdroj vyhodocen jako nevhodný. Lze však porovnat výtěžek karotenoidů pro kultivaci s glukózou a močovinou, kde v publikaci hodnota čítala přibližně 110 mg/l celkových karotenoidů, kdežto v našem experimentu byla hodnota rovna 2,8 mg/g (2 800 mg/l), tedy mnohonásobně vyšší.

Tabulka 11: Vliv variability dusíkového zdroje na produkci biomasy, lipidů a karotenoidů [46]

Zdroj dusíku	Biomasa [g/l]	Výtěžek lipidů v sušině [%]	Výtěžek karotenoidů [mg/l]
Kvasničný extrakt	6,33±0,01	32,63±0,08	129,94±1,68
Močovina	5,44±0,01	29,11±1,41	109,11±1,55
Pepton	4,46±0,03	26,89±2,04	99,55±1,09
Síran amonný	6,29±0,16	29,15±1,41	115,76±2,49
Dusičnan amonný	4,80±0,11	27,77±0,01	105,85±1,57
Chlorid amonný	4,19±0,04	26,82±1,27	92,74±1,24

5.1.3 Vliv různých C/N poměrů na produkci vybraných metabolitů

C/N poměr vypovídá o poměrovém zastoupení uhlíku a dusíku v živném médiu. Tento aspekt je velmi důležitým kritériem pro dosažení maximální produkce vybraných metabolitů a hraje v těchto procesech klíčovou roli. Je všeobecně známo, že při nízkých koncentracích dusíkatého zdroje (poměr C/N je 20:1), dochází k pomalejšímu využití uhlíkatého zdroje, ale i přesto bývá zdroj vyčerpán poměrně rychle, a tedy kultura nemá dostatečný časový prostor pro produkci požadovaných metabolitů. Co se týče vlivu C/N poměru na produkci biomasy, tak lze říct, že čím větší C/N poměr je, tím větších výtěžků biomasy jsme schopni dosáhnout [114].

Obecně platí, že k lepší produkci některých metabolitů oleogenními mikroorganismy, dochází v případě, že kultura postrádá (hladoví o) dusík. Proto je logická pozitivní korelace mezi C/N poměrem a produkcí metabolitů či výtěžky biomasy [114].

Graf na obrázku 18 popisuje závislost produkce biomasy na čase a různých koncentracích manózy, jakožto zdroje uhlíku. Jako zdroj dusíku byl zvolen, dříve experimentálně prověřený, dusičnan draselný. Použity byly poměry C/N = 20; 40; 100; 120:1 (C/N = 70:1 byl použit v předchozích experimentech).

Z grafu je zřejmé, že nejvyšších výtěžků biomasy bylo dosaženo při nejvyšší koncentraci manózy, a to ve 168. a 192. hodině kultivace, konkrétně okolo 15,0 g/l. Poměrně přívětivá

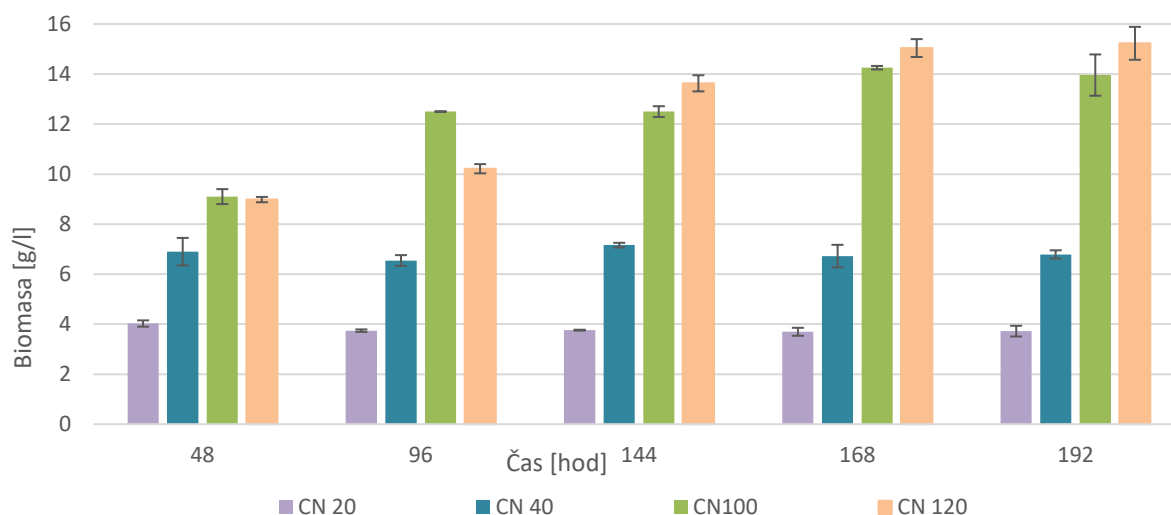
je situace i u C/N poměru 100:1, kde bylo nejvyššího výtěžku dosaženo ve 168. hodině kultivace, a to s hodnotou přesahující 14,0 g/l biomasy.

Pro C/N poměry 20:1 a 40:1 byly výtěžky zásadně nižší. Pro poměr 20:1 byla nejnižší koncentrace biomasy na začátku kultivace, a to pouhé 4,0 g/l. Tato koncentrace pak s časovým horizontem již nerostla, spíše mírně poklesla ke konstatní hodnotě okolo 3,8 g/l. Co se týče poměru 40:1, tak zde bylo také nejvyššího výtěžku dosaženo ve 48. hodině kultivace (7,0 g/l), dále hodnota spíše klesala a pohybovala se okolo 6,0 – 6,5 g/l.

Ve srovnání produkce biomasy v různých C/N poměrech, bylo dosaženo vyšších výsledků než v předešlých experimentech. V experimentu, kde byla zdrojem uhlíku manóza a zdrojem dusíku dusičnan draselný, bylo dosaženo maximálních hodnot okolo 9,5 g/l, a to ve 144. hodině kultivace. Zde bylo dosaženo ve 144. hodině, pro nejvyšší C/N poměr, přibližně o více než 4,0 g/l vyššího výtěžku, který s časem ještě rostl, až k maximální hodnotě 15,0 g/l. C/N poměr má tedy na výsledné množství biomasy zásadní vliv.

Braunwald a kol. (2013) zkoumali výtěžky biomasy u *Rhodotorula* sp. v závislosti na C/N poměrech a čase. Jako zdroj uhlíku byla použita glukóza a jako zdroj dusíku síran amonný. Při poměru 20:1 bylo maximálního výtěžku dosaženo v 96. hodině, a to okolo 6,0 g/l, pro poměr 70:1 byla maxima dosažena až ve 216. hodině kultivace, a to 11,0 g/l a konečně u poměru 120:1 bylo dosaženo maxima také ve 216. hodině kultivace, a to až 12,0 g/l. Z uvedeného tedy vyplývá, že pro maximální výtěžky biomasy byl nejvhodnější C/N poměr 120:1. Kultivace probíhala submerzně v Erlenmeyerových baňkách [114].

Pokud bychom tedy tyto situace porovnali, zdá se, že bylo v našem experimentu dosaženo vyšších hodnot při stejném způsobu kultivace, a tedy manóza a dusičnan draselný, jako zdroje uhlíku a dusíku, se jeví jako vhodnější. Hodnoty výtěžku dosahovaly cca v maximech o 3,0 g/l vyšší koncentrace biomasy pro C/N poměr 120:1.



Obr. 18: Produkce biomasy v průběhu času a pro různé C/N poměry

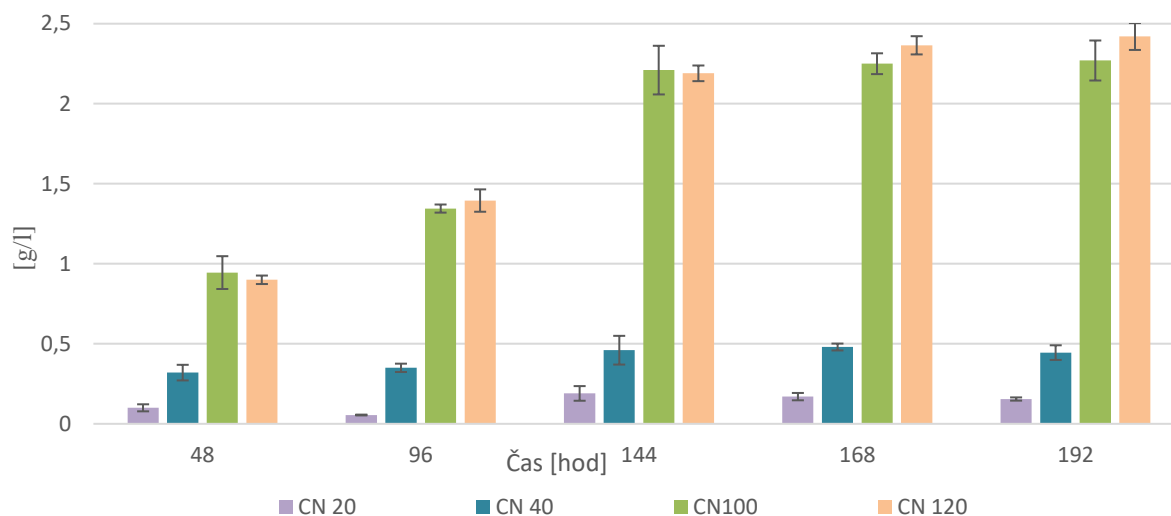
Na následujícím obrázku 19 je možné vidět graficky znázorněnou biosyntézu exoglykolipidů v osmi denní kultivaci s různými C/N poměry (manóza a dusičnan draselný). Jak bylo zmíněno již dříve, kultury, které mají nedostatečné množství dusíku, mnohem lépe produkují metabolity, jako jsou, zde uvedené, exoglykolipidy. Proto je zřejmý rozdíl mezi nízkými a vysokými C/N poměry, a to až 12-ti násobně je produkce vyšší u C/N poměru 120:1 než u poměru 20:1.

Nejvyšší hodnoty pro C/N poměr 120:1 bylo dosaženo ve 192. hodině kultivace (2,42 mg/g), byť rozdíl zjištěný o dva dny dříve byl malý, a to 2,36 g/l. Naopak nejnižší hodnota, pro tentýž poměr, byla pozorována ve 48. hodině, a to 0,9 g/l. Velmi podobná situace je vidět u C/N poměru 100:1, kde dokonce na počátku kultivace (48. hodina), byla produkce mírně vyšší než pro výše zmíněný poměr. Nejvyšší hodnota pro poměr 100:1 byla dosažena rovněž ve 192. hodině, a to 2,3 g/l.

Situace mnohonásobně horší byla pro nízké C/N poměry (20:1 a 40:1), kde bylo dosaženo úplně nejnižší hodnoty celého experimentu v 96. hodině, pro nejnižší zvolený poměr, a to 0,05 g/l. Nejvyšší produkce pro nízké poměry, byla vyhodnocena ve 168. hodině, pro poměr 40:1, a to 0,5 g/l. Obecně hodnoty pro nízké poměry moc nekolísaly, ale byly spíše podobné napříč celým časovým horizontem. Pro poměr 20:1 od hodnoty 0,1 g/l na počátku kultivace, přes mírný propad, až po hodnotu 0,15 g/l v závěru kultivace. U poměru 40:1 byla situace analogická, akorát start byl na hodnotě 0,3 g/l až po 0,5 g/l na konci.

Ve srovnání s předešlým našim experimentem, bylo zde dosaženo hodnot vyšších přibližně o 0,4 g/l. V experimentu se zdrojem uhlíku – manózou a zdrojem dusíku – dusičnanem draselným ve standardním C/N poměru (70:1), bylo dosaženo maximální hodnoty ve 144. hodině, a to 2,0 g/l, zde bylo dosaženo u C/N poměru 120:1 hodnoty o 0,4 g/l vyšší.

I v tomto případě tedy C/N poměr sehrál poměrně důležitou roli v produkci exoglykolipidů, zejména v jejím zvýšení.



Obr. 19: Biosyntéza exoglykolipidů v průběhu času a pro různé C/N poměry

Další graf na obrázku 20, vyjadřuje grafickou závislost mezi různě zvolenými C/N poměry a biosyntézou intracelulárních lipidů v sušině biomasy kvasinky.

Hodnoty jsou obecně velmi vysoké, zejména opět pro vysoké C/N poměry. Ve 168. hodině kultivace bylo pro poměr 120:1 dosaženo bezmála 67 % kumulace lipidů v buňce, což je úžasná hodnota.

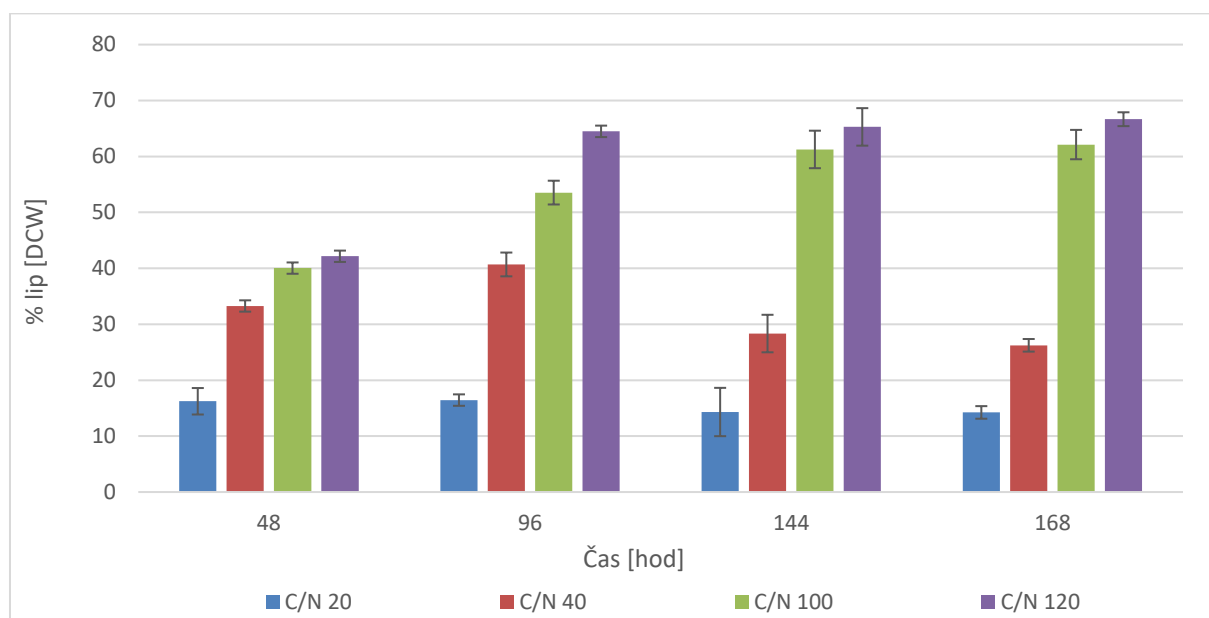
Právě selekcí všech vhodných kultivačních podmínek bylo dosaženo takto vysoké hodnoty. Po předešlých experimentech a vhodné eliminaci nevhodných zdrojů uhlíku a dusíku, byl zde optimalizován C/N poměr tak, že bylo dosaženo nejvyšších hodnot syntézy lipidů v rámci celé práce.

Pro vysoké C/N poměry bylo dosaženo hodnot blízkých 70 % akumulace lipidů. Konkrétně pro poměr 120:1 to bylo ve 168. hodině 68 %, ve 144. hodině o 2 % méně. Pro poměr 100:1 byla sledována nejvyšší akumulace ve 168. hodině kultivace, a to 62 %. Nejnižší hodnoty pak byly sledovány, logicky, z počátku kultivace, a to okolo 40 %, kde do třetího dne nastal strmý nárůst hodnot. Rovněž v tomto experimentu pozorujeme zřejmou pozitivní korelaci mezi C/N poměry a kumulací intracelulárních lipidů, znovu je potvrzen fakt, že nedostatek dusíku produkci těchto metabolitů zásadně stimuluje.

Pro nižší C/N poměry, bylo maximální hodnoty dosaženo v 96. hodině, pro poměr 40:1, a to 40 %. S narůstajícím časem, byla biosyntéza inhibována nadměrným množstvím dusíku

v médiu a hodnoty klesaly, což platí i pro nejnižší C/N poměr 20:1. Obecně nejnižší hodnoty bylo dosaženo ve 144. hodině, pro nejnižší zvolený poměr, a to pouhých 14 %.

V předešlém experimentu bylo maxima dosaženo ve 144. hodině kultivace s manózou a dusičnanem draselným, jakožto zdrojů uhlíku a dusíku (C/N poměr byl roven 70:1). Hodnota dosahovala 60 % akumulaci, kde v tomto experimentu byla takřka o 10 % navýšena po zvýšení C/N poměru. V experimentu s manózou a močovinou byla maximální hodnota rovna 55 %, což je číslo o něco nižší než v experimentu s dusičnanem draselným a zásadně nižší než zde. Proto pro tento pokus byl jako zdroj dusíku zvolen dusičnan draselný místo močoviny. Obecně ale lze říct, že hodnoty výtěžků jsou úctyhodné ve všech experimentech.



Obr. 20: Biosyntéza intracelulárních lipidů v průběhu času a pro různé C/N poměry

Braunwald a kol. (2013) pozorovali výtěžky lipidů u *Rhodotorula* sp. v závislosti na C/N poměrech a čase. Jako zdroj uhlíku byla použita glukóza a jako zdroj dusíku síran amonný. Pro porovnání s naším experimentem lze zhodnotit, že v publikaci bylo dosaženo nižších výtěžků. Co se týče konkrétních hodnot, pak bylo v publikaci dosaženo při C/N poměru 120:1 maximálně 0,48 g/l lipidů, o kousek lepší výsledky byly prokázány pro poměr 70:1, a to 0,52 g/l. Je tedy zřejmé, že náš experiment poskytl mnohem přínosnější výsledky, co se týče biomasy i lipidické biosyntézy [114].

V posledním grafu této kapitoly (obr. 21) byla stanovena výtěžnost biosyntézy celkových karotenoidů v závislosti na čase a různých C/N poměrech. Jako zdroj uhlíku byla použita

manóza a jako zdroj dusíku dusičnan draselný, ve sledovaných poměrech 20; 40; 100 a 120:1. Vhodnost vybraných zdrojů uhlíku a dusíku byla experimentálně stanovena již dříve.

Zde se jeví jako nejvhodnější poměr zmiňovaných živin 100:1, což úplně nekoresponduje s předešlými experimenty pro stanovení výtěžků biomasy, exoglykolipidů a intracelulárních lipidů. Důvod tohoto faktu lze jen těžko odhadnout. Pravděpodobně kultuře vyhovovalo pro syntézu karotenoidů mírně vyšší množství dusíku, než pro syntézu jiných metabolitů či biomasy. Dříve byl jako nevhodnější poměr stanoven poměr 120:1 a v drtivé většině až na konci kultivace.

Maxima tohoto experimentu bylo dosaženo pro poměr 100:1 ve 144. hodině kultivace, a to hodnoty 1,57 mg/g karotenoidů, minimum pro tento poměr bylo pozorováno v 72. hodině, 0,96 mg/g, kdy však odrazovým můstkem byla hodnota 1,08 mg/g, a to na samém začátku kultivace. Lze zde tedy zhodnotit mírný pokles během časového horizontu probíhající kultivace.

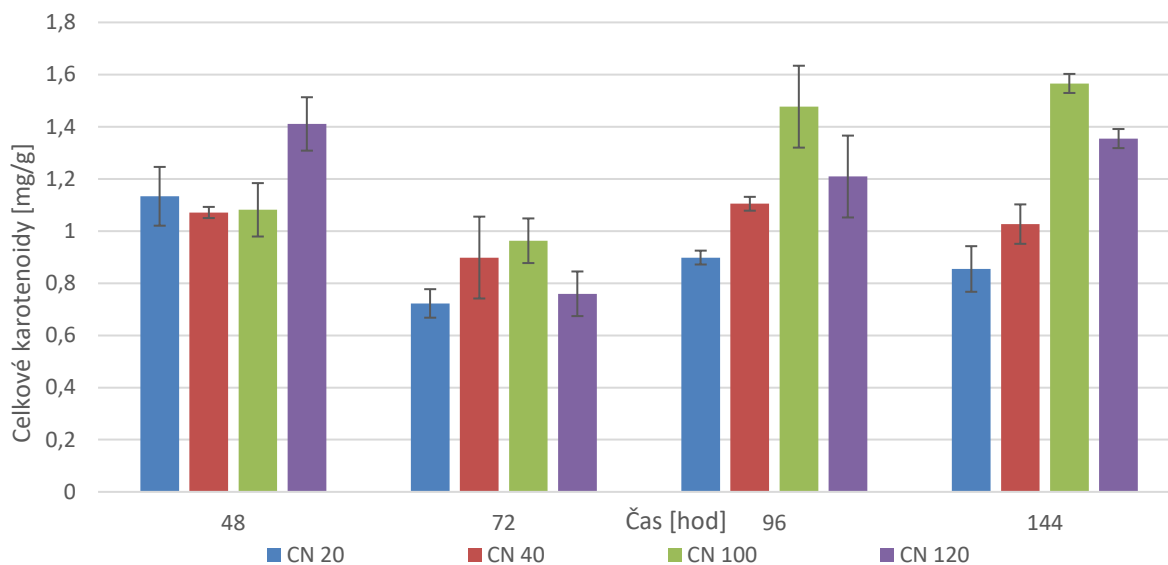
Druhým nejvhodnějším zdrojem zde vychází poměr 120:1, který paradoxně nejvyšší hodnoty dosáhl na začátku kultivace, ve 48. hodině, a to hodnoty 1,41 mg/g. Tento trend není v našich experimentech úplně častý, ale zde je jasně viditelný. Po počátku kultivace s maximální hodnotou, lze pozorovat poměrně rapidní propad v 72. hodině kultivace na hodnotu 0,76 mg/g. A poté poměrně lineární růst až k hodnotě 1,35 mg/g ve 144. hodině kultivace. Což znovu svědčí o tom, že mírně vyšší množství dusíku podpořilo, v tomto případě, biosyntézu karotenoidů.

Nejhorším C/N poměrem zde vyšel poměr 20:1, kde jistě velký nadbytek dusíku inhiboval syntézu, minimum bylo pozorováno v 72. hodině, a to 0,72 mg/g celkových karotenoidů. Nutno si ale povšimnout, že na počátku kultivace byla hodnota pro C/N poměry 20; 40 a 100:1 relativně podobná, okolo hodnoty 1,05 mg/g a poměr 120:1 mírně svou hodnotou odskočil výše.

Někde v prostřední linii vhodnosti C/N poměrů lze vidět poměr 40:1, který svého maxima dosáhl v 96. hodině kultivace, a to 1,1 mg/g a minima pak v 72. hodině, a to 0,9 mg/g.

V porovnání s předchozími experimenty, kde byla sledována produkce karotenoidů při různých zdrojích uhlíku (glycerol, manóza, laktóza a xylóza), respektive dusíku (dusičnan draselný, močovina, kvasničný extrakt, chlorid amonný a síran amonný) a stálém zdroji uhlíku (glukóza) respektive dusíku (močovina nebo dusičnan draselný), bylo vyhodnoceno množství obecně vyšší. Hodnota pro kombinaci glukózy (zdroj uhlíku) a močoviny (zdroj dusíku) byla nejvýše 2,82 mg/g (nejvyšší výtěžek karotenoidů v našich experimentech vůbec). Pro močovinu a xylózu bylo maximum tohoto experimentu 1,52 mg/g, pro močovinu

a manózu to bylo 1,39 mg/g. V experimentu s dusičnanem draselným a manózou, bylo maximum pozorováno na hodnotě 2,2 mg/g – což je naprostá analogie použitých zdrojů základních živin, jako zde a hodnota byla vyšší než zde (1,56 mg/g), což vypovídá o tom, že C/N poměr 70:1 byl pro tuto biosyntézu vhodnější. Avšak maximální produkce celkových karotenoidů s dusičnanem draselným byla pozorována v kombinaci s glycerolem, a to hodnota rovna 2,72 mg/g. Všechna maxima napříč veškerými experimenty byla pozorována ve 144. hodině kultivace.



Obr. 21: Biosyntéza karotenoidů v průběhu času a pro různé C/N poměry

V odborném článku, pak lze najít srovnání našeho experimentu pro celkový výtěžek karotenoidů u kvasinek *Rhodotorula* sp. v závislosti na C/N poměrech a čase. Jako zdroj uhlíku byla v publikaci použita glukóza a jako zdroj dusíku síran amonný. Celkově bylo v odborném článku dosaženo hodnot nižších napříč všemi zvolenými C/N poměry. Kultivace probíhala 216 hodin pro poměry 20; 70 a 120:1, kdy pro nejnižší poměr bylo dosaženo maximálně 0,45 mg/l, pro poměr 70:1 to bylo 1,0 mg/l a pro nejvyšší poměr (120:1) – 1,3 mg/l celkových karotenoidů. Druhové zastoupení stanovených karotenoidů je složeno z β -karotenu, γ -karotenu, torulenu a torularhodinu [114].

Je tedy evidentní, že náš experiment poskytl mnohem přínosnější výsledky, co se týče množství syntetizovaných karotenoidů, byť byly zvoleny jiné zdroje dusíku a uhlíku (dusičnan draselný a manóza) a kultivace probíhala kratší dobu (144 hodin).

5.2 Screening produkce vybraných metabolitů u řas a sinic

Níže v tabulce 12 jsou vyobrazeny výtěžky biomasy a lipidů u fotoautotrofních mikroorganismů, tedy sinic a mikrořas. Zvýrazněny jsou pak nejvyšší hodnoty stanovené koncentrace biomasy a procentuálního obsahu lipidů v sušině buňky. Nejvyšší produkce biomasy bylo dosaženo u *Porphyrium cruentum*, a to hodnoty okolo 1,0 g/l biomasy, naopak nejnižší hodnotu lze pozorovat u *Porphyridium areuginosum*, a to jen 0,3 g/l.

Dosažené hodnoty výtěžku biomasy u autotrofních mikroorganismů jsou tedy podstatně nižší než u kvasinek (kde se hodnoty dostaly až k 15,0 g/l), ale je potřeba vzít v potaz, že kultivace autotrofních mikroorganismů probíhá bez přídavku jakýchkoli živin, kromě anorganických solí a zdroje světla potřebného pro fotosyntézu. Produkce biomasy a biosyntéza ostatních cenných metabolitů je tak mnohem efektivnější a finančně méně náročná, byť nehovoříme o takových výtěžcích jako u kvasinek.

Co se týče procentuálních výtěžků lipidů v sušině biomasy u řas a sinic, pak nejvyšší hodnoty bylo dosaženo u *Scenedesmus obliquus*, a to hodnoty blízké 14 %. Naopak nejnižší hodnotu lze pozorovat u *Chlamydomonas reinhardtii*, a to pouze okolo 4 %. I zde je tedy zřejmé, že u kvasinek bylo dosaženo výtěžku mnohonásobně vyšších (až okolo 70 %).

Tabulka 12: Výtěžky biomasy a lipidů u fotoautotrofních mikroorganismů

Číslo	Mikroorganismus	CCALA	Biomasa [g/l]	Výtěžky lipidů v sušině [%]	SAT : MUFA : PUFA [%]
1	<i>Botryococcus braunii</i>	777	0,467±0,012	6,47±0,11	19,11 : 22,82 : 58,07
2	<i>Chlorella vulgaris</i>	924	0,436±0,007	8,10±0,62	17,66 : 9,10 : 73,24
3	<i>Botryococcus braunii</i>	260	0,377±0,011	5,60±0,27	19,05 : 17,57 : 63,38
4	<i>Scenedesmus acutus</i>	437	0,829±0,012	11,56±0,84	19,68 : 18,98 : 61,35
5	<i>Desmodesmus quadricauda</i>	463	0,520±0,023	8,96±0,91	20,99 : 10,81 : 68,19
6	<i>Scenedesmus dimorfus</i>	443	0,720±0,009	10,44±0,76	22,02 : 19,00 : 58,98
7	<i>Scenedesmus obliquus</i>	455	0,655±0,013	13,71±1,05	36,68 : 12,94 : 50,38
8	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	928	0,683±0,005	4,34±0,93	58,50 : 6,91 : 34,58
9	<i>Porphyridium cruentum</i>	415	1,037±0,021	6,17±0,29	32,99 : 12,36 : 54,65
10	<i>Porphyridium purpureum</i>	416	0,671±0,014	7,33±0,81	29,66 : 3,76 : 66,58
11	<i>Porphyridium areuginosum</i>	419	0,299±0,022	7,88±0,36	29,82 : 6,79 : 63,39
12	<i>Rhodella violacea</i>	925	0,607±0,007	5,76±0,15	30,16 : 9,43 : 60,42
13	<i>Euglena gracilis</i>	349	0,442±0,003	10,34±0,44	24,94 : 11,30 : 63,76

Co se pak týče biosyntézy cenných produktů, jako jsou chlorofyly, karotenoidy a fykobiliproteiny u řas a sinic, tak numerické a grafické vyhodnocení lze vidět v tabulce 13 a 14 a v grafech na obrázcích 22, 23.

V tabulce 13 jsou uvedeny celkové hodnoty výtěžků pro chlorofyl (kdežto v grafu jsou vyhodnoceny zvláště chlorofyl a, b a jiné změřené chlorofyly), pro karotenoidy (stejně tak i na grafickém zobrazení) a celkové fykobiliproteiny (v grafu opět znázorněn zvláště fykocyanin, allofykocyanin a fykoerythrin). Fykobiliproteiny byly však naměřeny pouze u těchto mikrobiálních druhů: *Porphyridium cruentum*, *Porphyridium purpureum*, *Porphyridium areuginosum* a *Rhodella violacea*, u zbylých druhů mikroorganismů nebyly fykobiliproteiny vůbec zjištěny.

Nejvyšší celkový výtěžek chlorofylů byl zjištěn u *Euglena gracilis*, kde hodnota převyšovala 28,0 mg/g tohoto pigmentu, což je úctyhodný výsledek. Naopak nejnižší výtěžek je zřejmý u *Rhodella violacea*, a to “pouze” 2,72 mg/g. Hodnoty napříč spektrem použitých mikroorganismů jsou velmi rozličné, druhý nejvyšší výtěžek je pozorován u *Chlorella vulgaris* (15,12 mg/g), což vypovídá o velkém rozdílu hodnot mezi nejlepším a druhým nejlepším producentem.

Porovnání výtěžků chlorofylů s biosyntézou u kvasinek není možné, neboť tyto nejsou schopny fotosyntézy, a proto je zde místo pro cennou kompenzaci nízkých výtěžků biomasy a lipidů oproti kvasinkám, vůči výtěžkům cenných sekundárních metabolitů. Je evidentní, že mikrořasy a sinice jsou obecně schopny účinnější akumulace sekundárních metabolitů, jako jsou například karotenoidy či chlorofyly, vzhledem k relativně nízkým výtěžkům biomasy, zatímco trend u kvasinek je přesně opačný (více biomasy, méně metabolitů). Na obranu kvasinek však lze zmínit schopnost růstu na nízkonákladových substrátech, jako jsou některé odpadní materiály (melasa, kávový hydrolyzát, peří, aj.), což zase není možné aplikovat v případě mikrořas či sinic, které jsou poměrně náročné na kultivační podmínky, zejména na světlo a aeraci.

Další měřenou komoditou jsou karotenoidy, konkrétně celkové karotenoidy. Naměřené spektrum, řasami a sinicemi produkovaných, karotenoidů obsahovalo zejména lutein, violaxanthin a neoxanthin a několik neznámých. Kvantifikace může tedy být mírně zkreslena absencí standardů.

Nejvyšší výtěžek celkových karotenoidů byl rovněž pozorován u *Euglena gracilis*, a to 9,86 mg/g. Zde je tedy také zřejmé, že řasy a sinice jsou efektivnějšími producenty karotenoidů než kvasinky, konkrétně více než trojnásobně (naměřené maximum celkových karotenoidů u kvasinek bylo 2,8 mg/g – obr 9).

Naopak samé dno syntézy karotenoidů osidluje *Desmodesmus quadricauda* s hodnotou pouhých 0,85 mg/g. Zbylí producenti syntetizují koncentraci karotenoidů v biomase v rozpětí 1,0 – 3,0 mg/g. Výjimky vyšší (respektive střední) produkce jsou *Botryococcus braunii* (5,64 resp. 6,12 mg/g), *Scenedesmus acutus* (8,61 mg/g), *Scenedesmus dimorfus* (4,07 mg/g) a *Chlamydomonas reinhardtii* (7,95 mg/g).

Poslední sledovaný metabolit byly fykobiliproteiny, které byly kvantifikovány pouze u některých producentů (viz výše). Nejvyšší výtěžek fykobiliproteinů byl zjištěn u *Porphyridium areuginosum*, a to skoro 111 mg/g. Zbylí producenti se v porovnání s *P. areuginosum* pohybovali pod polovičním množstvím produkovaných fykobiliproteinů (nejvíce pak 65,51 mg/g u *Porphyridium cruentum*). Ani zde není možno porovnat výtěžky s kvasinkami, neboť ani tento metabolit není jimi syntetizován.

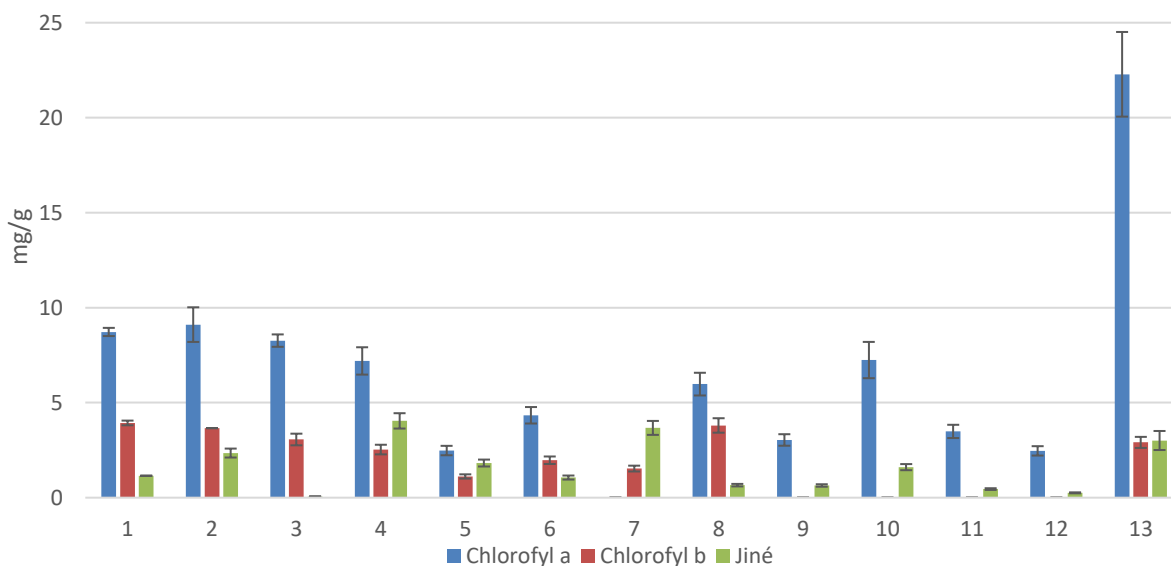
Tabulka 13: Celková produkce karotenoidů, chlorofylů a fykobiliproteinů

Číslo	Mikroorganismus	CCALA	Chlorofyly [mg/g]	Karotenoidy [mg/g]	Fykobiliproteiny [mg/g]
1	<i>Botryococcus braunii</i>	777	13,80	5,64	-
2	<i>Chlorella vulgaris</i>	924	15,12	1,26	-
3	<i>Botryococcus braunii</i>	260	11,39	6,12	-
4	<i>Scenedesmus acutus</i>	437	13,77	8,61	-
5	<i>Desmodesmus quadricauda</i>	463	5,42	0,85	-
6	<i>Scenedesmus dimorfus</i>	443	7,37	8,16	-
7	<i>Scenedesmus obliquus</i>	455	5,20	4,07	-
8	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	928	10,44	7,95	-
9	<i>Porphyridium cruentum</i>	415	3,68	2,67	65,51
10	<i>Porphyridium purpureum</i>	416	8,85	2,10	54,72
11	<i>Porphyridium areuginosum</i>	419	3,94	1,54	110,97
12	<i>Rhodella violacea</i>	925	2,72	1,64	53,69
13	<i>Euglena gracilis</i>	349	28,20	9,86	-

Jak bylo zmíněno výše, tak graf na obrázku 22 znázorňuje produkci chlorofylů výše jmenovanými mikrořasami a sinicemi. Celkově nejvyšší kumulace byla pro standardizovaný chlorofyl a, který byl syntetizován v nejvyšších koncentracích (produkce schází pouze u druhu číslo 7). Konkrétně pro druh číslo 13 zde biosyntéza dosahuje hodnoty až 22,28 mg/g (z celkových 28,20 mg/g). Chlorofyl a dominuje úplně u všech zmíněných druhů, kteří tento chlorofyl byly schopni syntetizovat. Nejnižší produkce byla kvantifikována u druhu číslo 12 (2,46 mg/g).

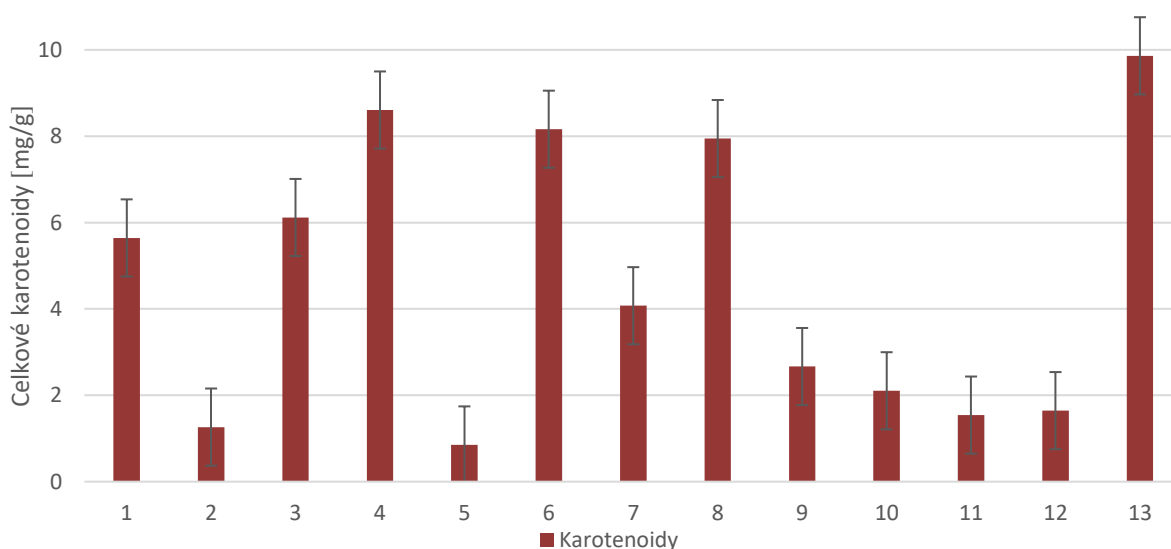
Co se týče chlorofylu b tak ten je naopak minoritním produktem mezi těmito pigmenty a u druhů číslo 9, 10, 11 a 12 úplně chybí. Nejvyšší produkce je pozorována u druhu číslo 1 (3,9 mg/g) a nejnižší mezi detekovanými u druhu číslo 5 (1,12 mg/g).

Zbylé jiné chlorofyly (pravděpodobně směsi různých) nebyly standardizovány vzhledem k chybějícím standardům pro porovnání a byly detekovány úplně u všech druhů, někde však ve velmi nízkých koncentracích. Nejvíce tzv. jiných chlorofylů se vyskytuje u druhu číslo 4 (4,04 mg/g), naopak nejméně u druhu číslo 12 (0,25 mg/g).



Obr. 22: Produkce chlorofylů různými druhy mikrořas

Komentář k celkové produkci karotenoidů (graf na obr. 23) je uveden výše, zde tedy lze pouze vidět grafické znázornění zastoupení koncentrace celkových karotenoidů pro sledované mikrořasy a sinice.



Obr. 23: Produkce karotenoidů různými druhy mikrořas

V tabulce 14 lze vidět výsledky biosyntézy fykobiliproteinů, kdy celková produkce pro jednotlivé druhy byla komentována již výše a bylo rovněž zmíněno, že produkce fykobiliproteinů nebyla pozorována u všech druhů, ale pouze u čtyř výše jmenovaných.

Zde, v tabulce 14, je přehledně znázorněná konkrétní produkce zastoupených a detekovaných fykobiliproteinů – fykocyanin, allofykocyanin a fykoerythrin.

Tabulka 14: Množství zastoupení jednotlivých fykobiliproteinů vyprodukovaných mikrořasami

Číslo	Mikroorganismus	Fykocyanin [mg/g]	Allofykocyanin [mg/g]	Fykoerythrin [mg/g]
9	<i>Porphyridium cruentum</i>	9,20	-	56,31
10	<i>Porphyridium purpureum</i>	16,41	11,67	26,64
11	<i>Porphyridium areuginosum</i>	61,93	39,62	9,42
12	<i>Rhodella violacea</i>	6,36	2,97	44,36

Zvýrazněné hodnoty v tabulce 14 jsou nejvyššími výtěžky pro jednotlivé fykobiliproteiny. Nejvyšší kumulaci fykocyaninu vykazuje *P. areuginosum* (61,93 mg/g), naopak nejnižší je u *R. violacea* (6,36 mg/g). Co se týče allofykocyaninů, tak tam patří prvenství rovněž *P. areuginosum* (39,62 mg/g) a nejnižší množství, stejně jako pro fykocyanin, je pozorováno u *R. violacea* (2,97 mg/g). Konečně fykoerythrin byl nejvíce produkován *P. cruentum* (56,31 mg/g), který však produkci fykocyaninu vykazuje na nízké úrovni a allofykocyanin nebyl u něj stanoven vůbec. A nejhorší výtěžek pro fykoerythrin byl u *P. areuginosum* (9,42 mg/g), který ale dominoval pro produkci předchozích dvou fykobiliproteinů.

6 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla optimalizace metod stanovení vybraných metabolitů a aplikace na analýzu v buňkách karotenogenních kvasinek a mikrořas. Pro tyto účely byl použitý kmen *Rhodotorula kratochvilovae* CCY 20-2-26 zakoupen ze Sbírkky kultur kvasinek (CCY, Bratislava, Slovensko) a kmeny řas a sinic ze Sbírkky kultur autotrofních organismů (CCALA, Třeboň, Česká republika). Seznam mikrořas a sinic je uveden v tabulce 2 (kap. 4.3).

Na začátku experimentální části byla optimalizována extrakce karotenoidů z biomasy kvasinek. Z rozpouštědel byl testován aceton a methanol v kombinaci s hexanem, petroletherem a chloroformem, avšak po extrakci nebyla biomasa dostatečně odbarvená. Proto jako nejvhodnější extrakční metoda byla zvolena izolace karotenoidů Folshovou metodou (viz kap. 4.6).

Analýza pigmentů pomocí kapalinové a plynové chromatografie je již zavedenou metodou, a proto byla využita i v této práci [115].

Dalším optimalizačním krokem bylo stanovení fykobiliproteinů, kdy byly testovány tyto pufrы: fosfátový, Tris-HCL (pH = 7), dále pak CaCl₂ a voda. Rovněž byl optimalizován krok izolace (mrazení a rozmrazování, ultrazvuk a kombinace těchto dvou metod), kdy se jako nejvhodnější jeví izolace pomocí pufru Tris-HCl a následné zmrazování a rozmrazování biomasy (viz kap. 4.7).

Mikroorganismy byly kultivovány za výše popsaných podmínek na různých kultivačních médiích o uvedeném složení.

V průběhu experimentální části byly zjištěny následující výsledky:

- Produkce metabolitů během kultivace *R. kratochvilovae* na médiu s glukózou, jako zdrojem uhlíku a různými zdroji dusíku (kvasničný extrakt, dusičnan draselný, síran amonný, chlorid amonný a močovina) byla následující:
 - Biomasa – nejlepší byla kombinace glukózy a dusičnanu draselného nebo glukózy a kvasničného extraktu – 9,5 g/l. Dalším nejvhodnějším zdrojem byla močovina (9,0 g/l)
 - Exoglykolipidy – nejlepší byla kombinace glukózy a dusičnanu draselného – 1,8 g/l

- Intracelulární lipidy – nejlepší byla kombinace glukózy a dusičnanu draselného – takřka 60 %. Ucházející byl i výsledek pro kvasničný extrakt – 59 %
- Celkové karotenoidy – nejlepší byla kombinace glukózy a močoviny – 2,8 mg/g karotenoidů
- Produkce metabolitů během kultivace *R. krachvilovae* na médiu s močovinou, jako zdrojem dusíku a různými zdroji uhlíku (glycerol, manóza, xylóza a laktóza) byla následující:
 - Biomasa – nejlepší byla kombinace močoviny a manózy – 10,0 g/l
 - Exoglykolipidy – nejlepší byla kombinace močoviny a manózy – 1,4 g/l
 - Intracelulární lipidy – nejlepší byla kombinace močoviny a manózy – 55 %
 - Celkové karotenoidy – nejlepší byla kombinace močoviny a xylózy – 1,52 mg/g
- Produkce metabolitů během kultivace *R. krachvilovae* na médiu s dusičnanem draselným, jako zdrojem dusíku a různými zdroji uhlíku (glycerol, manóza, xylóza a laktóza) byla následující:
 - Biomasa – nejlepší byla kombinace dusičnanu draselného a manózy – 9,5 g/l
 - Exoglykolipidy – nejlepší byla kombinace dusičnanu draselného a manózy – 2,0 g/l
 - Intracelulární lipidy – nejlepší byla kombinace dusičnanu draselného a manózy – 57,5 %
 - Celkové karotenoidy – nejlepší byla kombinace dusičnanu draselného a glycerolu – 2,72 mg/g
- Produkce metabolitů během kultivace *R. krachvilovae* na médiu s dusičnanem draselným, jako zdrojem dusíku a manózou, jako zdrojem uhlíku v rozličných C/N poměrech (20; 40; 100 a 120:1) byla následující:
 - Biomasa – nejlepší byl C/N poměr 120:1 – 15,2 g/l
 - Exoglykolipidy – nejlepší byl C/N poměr 120:1 – 2,4 g/l
 - Intracelulární lipidy – nejlepší byl C/N poměr 120:1 – 66 %
 - Celkové karotenoidy – nejlepší byl C/N poměr 100:1 – 1,57 mg/g

- Nejvyšší výtěžnost produkce metabolitů během kultivace různých druhů mikrořas a sinic na BBM médiu v případě zelených řas, ASW médiu v případě červených řas a na Euglena médiu v případě kultivace *Euglena gracilis* byla následující:
 - Biomasa – 1,037±0,021, druh: *Porphyridium cruentum*
 - Výtěžky lipidů – 13,71±1,05, druh: *Scenedesmus obliquus*
 - Celkové chlorofyly – 28,20 mg/g, druh: *Euglena gracilis*
 - Celkové karotenoidy – 9,86, druh: *Euglena gracilis*
 - Celkové fykobiliproteiny – 110,97 mg/g, druh: *Porphyridium areuginosum*

Dle výše uvedených výsledků je zřejmé, že kultivační podmínky pro daný mikroorganismus jsou velmi důležitým aspektem produkce cenných primárních i sekundárních metabolitů. Vhodně zvolený zdroj dusíku, uhlíku a jejich případné ideální zpoměrování, může vést ke značně vyšším výsledkům, než je uvedeno v odborných publikacích.

Zásadní rozdíly mezi produkcí mikrořas a kvasinek jsou vlastně paradoxem – řasy jsou náročnější na kultivační podmínky, ale dokážou při mnohem nižším množství biomasy akumulovat vyšší koncentrace sledovaných metabolitů, zatímco kvasinky jsou méně náchylným mikroorganismem ke změnám v kultivačních podmínkách, produkují vyšší množství biomasy, ale poměrově nižší množství sledovaných metabolitů.

Z pohledu biotechnologie a produkce v průmyslovém měřítku se jeví být vhodným zdrojem produkce lipidů a karotenoidů kvasinkami, médium s obsahem dusičnanu draselného a manózy ve vysokém C/N poměru. Nutná je však ještě další optimalizace extrakčních metod těchto metabolitů pro další stanovení, vzhledem k životnímu prostředí. Použité, relativně agresivní, chemikálie by v průmyslovém měřítku značně zhoršovaly čistotu ekosystému.

Budoucností biotechnologie se tak jeví být kultivace mikroorganismů na odpadních substrátech, hovoříme-li o kvasinkách. V případě kultivace řas je tento materiál nevyužitelný.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] MALDONADE, Iriani R., Delia B. RODRIGUEZ-AMAYA a Adilma R.P. SCAMPARINI. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chemistry* [online]. 2008, **107**(1), 145-150 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.07.075. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607007716>
- [2] BRITTON, G.; HORNERO-MENDEZ, D. Carotenoids and colour in fruit and vegetables. In *Phytochemistry of fruit and vegetables*. (Eds FA Tomás-Barberán, RJ Robins) pp. 11–27. 1997.
- [3] JOHNSON, Eric A. a William A. SCHROEDER. Microbial carotenoids. *Downstream Processing Biosurfactants Carotenoids* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996, 1995-12-27, s. 119-178 [cit. 2019-10-08]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. DOI: 10.1007/BFb0102327. ISBN 978-3-540-59308-9. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BFb0102327>
- [4] FRASER, P. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* [online]. 2004, **43**(3), 228-265 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/j.plipres.2003.10.002. ISSN 01637827. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016378270300064X>
- [5] BHOSALE, Prakash a Paul S. BERNSTEIN. Microbial xanthophylls. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2005, **68**(4), 445-455 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1007/s00253-005-0032-8. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-005-0032-8>
- [6] BRITTON, George (ed.). *Isolation and analysis*. Birkhäuser, 1995.
- [7] DELLAPENNA, Dean a Barry J. POGSON. VITAMIN SYNTHESIS IN PLANTS: Tocopherols and Carotenoids. *Annual Review of Plant Biology* [online]. 2006, **57**(1), 711-738 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144301. ISSN 1543-5008. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144301>
- [8] MATA-GÓMEZ, Luis, Julio MONTAÑEZ, Alejandro MÉNDEZ-ZAVALA a Cristóbal AGUILAR. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories* [online]. 2014, **13**(1) [cit. 2019-10-08]. DOI:

- 10.1186/1475-2859-13-12. ISSN 1475-2859. Dostupné z: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-13-12>
- [9] BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal* [online]. 1995, **9**(15), 1551-1558 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1096/fasebj.9.15.8529834. ISSN 0892-6638. Dostupné z: <http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fasebj.9.15.8529834>
- [10] AVALOS, Javier a M. CARMEN LIMÓN. Biological roles of fungal carotenoids. *Current Genetics* [online]. 2015, **61**(3), 309-324 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1007/s00294-014-0454-x. ISSN 0172-8083. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00294-014-0454-x>
- [11] YOUNG, Andrew J. a Gordon M. LOWE. Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2001, **385**(1), 20-27 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1006/abbi.2000.2149. ISSN 00039861. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986100921490>
- [12] STAHL, Wilhelm a Helmut SIES. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2003, **24**(6), 345-351 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/S0098-2997(03)00030-X. ISSN 00982997. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009829970300030X>
- [13] SKIBSTED, Leif H. Carotenoids in Antioxidant Networks. Colorants or Radical Scavengers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2012, **60**(10), 2409-2417 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1021/jf2051416. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf2051416>
- [14] SAKAKI, Hideyuki, Tatsuya NAKANISHI, Aki TADA, Wataru MIKI a Sadao KOMEMUSHI. Activation of torularhodin production by *Rhodotorula glutinis* using weak white light irradiation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2001, **92**(3), 294-297 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/S1389-1723(01)80265-6. ISSN 13891723. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172301802656>
- [15] SAKAKI, Hideyuki, Hidesato NOCHIDE, Sadao KOMEMUSHI a Wataru MIKI. Effect of active oxygen species on the productivity of torularhodin by *Rhodotorula glutinis* No. 21. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2002, **93**(3), 338-340 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/S1389-1723(02)80040-8. ISSN 13891723. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172302800408>

- [16] LIU, Yuan Shuai a Jian Yong WU. Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2006, **73**(3), 663-668 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1007/s00253-006-0501-8. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0501-8>
- [17] TERAO, J. Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoids in solution. *Lipids* [online]. 1989, **24**(7), 659-661 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1007/BF02535085. ISSN 0024-4201. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/BF02535085>
- [18] PALOZZA, Paola a Norman I. KRINSKY. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 1992, **297**(2), 291-295 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/0003-9861(92)90675-M. ISSN 00039861. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000398619290675M>
- [19] SAKAKI, Hideyuki, Hirokazu KANENO, Yasuji SUMIYA, et al. A New Carotenoid Glycosyl Ester Isolated from a Marine Microorganism, *Fusarium* Strain T-1. *Journal of Natural Products* [online]. 2002, **65**(11), 1683-1684 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1021/np010554v. ISSN 0163-3864. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np>
- [20] DAVOLI, P., V. MIERAU a R. W. S. WEBER. Carotenoids and Fatty Acids in Red Yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemistry and Microbiology* [online]. 2004, **40**(4), 392-397 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1023/B:ABIM.0000033917.57177.f2. ISSN 0003-6838. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/B:ABIM.0000033917.57177.f2>
- [21] PAPP, Tamás, Árpád CSERNETICS, Gábor NAGY, Ottó BENCSIK, Enrique A. ITURRIAGA, Arturo P. ESLAVA a Csaba VÁGVÖLGYI. Canthaxanthin production with modified *Mucor circinelloides* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2013, **97**(11), 4937-4950 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1007/s00253-012-4610-2. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-012-4610-2>
- [22] MARTÍN-ROJAS, V., A. GÓMEZ-PUERTO a E. CERDÁ-OLMEDO. Lack of protection by carotenes against gamma-radiation damage in *Phycomyces*. *Radiation and Environmental Biophysics* [online]. 1996, **35**(3), 193-197 [cit. 2019-10-08].

- DOI: 10.1007/s004110050030. ISSN 0301-634X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s004110050030>
- [23] STROBEL, Ingmar, Jürgen BREITENBACH, Christian Q. SCHECKHUBER, Heinz D. OSIEWACZ a Gerhard SANDMANN. Carotenoids and carotenogenic genes in *Podospora anserina*: engineering of the carotenoid composition extends the life span of the mycelium. *Current Genetics* [online]. 2009, **55**(2), 175-184 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1007/s00294-009-0235-0. ISSN 0172-8083. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00294-009-0235-0>
- [24] LANG-FEULNER, J. a W. RAU. REDOX DYES AS ARTIFICIAL PHOTORECEPTORS IN LIGHT-DEPENDENT CAROTENOID SYNTHESIS. *Photochemistry and Photobiology* [online]. 1975, **21**(3), 179-183 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1975.tb06649.x. ISSN 0031-8655. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.1975.tb06649.x>
- [25] PACKER, Lester; HIRAMATSU, Midori; YOSHIKAWA, Toshikazu (ed.). *Antioxidant food supplements in human health*. Elsevier, 1999.
- [26] RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B., Mieko KIMURA, Helena T. GODOY a Jaime AMAYA-FARFAN. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2008, **21**(6), 445-463 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/j.jfca.2008.04.001. ISSN 08891575. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157508000458>
- [27] KRINSKY, Norman I. a Elizabeth J. JOHNSON. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2005, **26**(6), 459-516 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/j.mam.2005.10.001. ISSN 00982997. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009829970500066X>
- [28] TAPIERO, H, D.M TOWNSEND a K.D TEW. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2004, **58**(2), 100-110 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/j.biopha.2003.12.006. ISSN 07533322. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332203002130>
- [29] VOUTILAINEN, Sari, Tarja NURMI, Jaakko MURSU a Tiina H RISSANEN. Carotenoids and cardiovascular health. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2012, **83**(6), 1265-1271 [cit. 2019-10-08]. DOI:

- 10.1093/ajcn/83.6.1265. ISSN 0002-9165. Dostupné z:
<https://academic.oup.com/ajcn/article/83/6/1265/4632969>
- [30] DUFOSSÉ, Laurent, Patrick GALAUP, Anina YARON, Shoshana Malis ARAD, Philippe BLANC, Kotamballi N. CHIDAMBARA MURTHY a Gokare A. RAVISHANKAR. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2005, **16**(9), 389-406 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/j.tifs.2005.02.006. ISSN 09242244. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224405001494>
- [31] COULSON, J. Miscellaneous naturally occurring coloring materials for foodstuff. *Developments in food colour*, 1980, 189: 218.
- [32] COUNSELL, J. Some synthetic carotenoids as food colours. *Developments in food colour*, 1980, 151: 187.
- [33] DE HAAN, A.; BURKE, R.; BONT, J. Microbial production of food colorants. *Med Fac Landbouww Rijisuniv Gent*, 1991, 56: 1655-1660.
- [34] PAPAIOANNOU, E.H. a M. LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES. Substrate contribution on carotenoids production in *Blakeslea trispora* cultivations. *Food and Bioproducts Processing* [online]. 2010, **88**(2-3), 305-311 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/j.fbp.2009.03.001. ISSN 09603085. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960308509000170>
- [35] ALMEIDA, Eduardo R. A. a Enrique CERDÁ-OLMEDO. Gene expression in the regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Current Genetics* [online]. 2008, **53**(3), 129-137 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1007/s00294-007-0170-x. ISSN 0172-8083. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00294-007-0170-x>
- [36] CERDÁ-OLMEDO, Enrique. *Phycomyces* and the biology of light and color. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2001, **25**(5), 503-512 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00588.x. ISSN 1574-6976. Dostupné z:
<https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00588.x>
- [37] TINOI, J., N. RAKARIYATHAM a R.L. DEMING. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry* [online]. 2005, **40**(7), 2551-2557 [cit.

- 2019-10-08]. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.11.005. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959204004388>
- [38] PERRIER, V., E. DUBREUCQ a P. GALZY. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Archives of Microbiology* [online]. 1995, **164**(3), 173-179 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1007/BF02529968. ISSN 0302-8933. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02529968>
- [39] DAVOLI, P., V. MIERAU a R. W. S. WEBER. Carotenoids and Fatty Acids in Red Yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemistry and Microbiology* [online]. 2004, **40**(4), 392-397 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1023/B:ABIM.0000033917.57177.f2. ISSN 0003-6838. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/B:ABIM.0000033917.57177.f2>
- [40] BOROWITZKA, Michael A., John M. HUISMAN a Ann OSBORN. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis* 1. Effects of nutrients on growth and cell type. *Journal of Applied Phycology* [online]. 1991, **3**(4), 295-304 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1007/BF02392882. ISSN 0921-8971. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02392882>
- [41] KOBAYASHI, Makio, Toshihide KAKIZONO a Shiro NAGAI. Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. *Journal of Fermentation and Bioengineering* [online]. 1991, **71**(5), 335-339 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/0922-338X(91)90346-I. ISSN 0922338X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0922338X9190346I>
- [42] SARADA, R, Usha TRIPATHI a G.A RAVISHANKAR. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochemistry* [online]. 2002, **37**(6), 623-627 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/S0032-9592(01)00246-1. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959201002461>
- [43] NASRI NASRABADI, Mohammad Reza a Seyed Hadi RAZAVI. Use of response surface methodology in a fed-batch process for optimization of tricarboxylic acid cycle intermediates to achieve high levels of canthaxanthin from *Dietzia natronolimnaea* HS-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2010, **109**(4), 361-368 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.10.013. ISSN 13891723. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172309009761>

- [44] DEL CAMPO, José A., Mercedes GARCÍA-GONZÁLEZ a Miguel G. GUERRERO. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2007, **74**(6), 1163-1174 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1007/s00253-007-0844-9. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-007-0844-9>
- [45] LUNA-FLORES, C.H., J.J. RAMÍREZ-CORDOVA, C. PELAYO-ORTIZ, R. FEMAT a E.J. HERRERA-LÓPEZ. Batch and fed-batch modeling of carotenoids production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* using *Yucca fillifera* date juice as substrate. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2010, **53**(1), 131-136 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/j.bej.2010.10.004. ISSN 1369703X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X10002792>
- [46] SAENGE, Chanika, Benjamas CHEIRSILP, Thanwadee Tachapattaweawrakul SUKSAROGÉ a Thawien BOURTOOM. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry* [online]. 2011, **46**(1), 210-218 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.08.009. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135951131000320X>
- [47] LIBKIND, Diego a María VAN BROOCK. Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2006, **22**(7), 687-692 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1007/s11274-005-9091-3. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-005-9091-3>
- [48] FRENGOVA, Ginka I. a Dora M. BESHKOVA. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2009, **36**(2), 163-180 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1007/s10295-008-0492-9. ISSN 1367-5435. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-008-0492-9>
- [49] GOODWIN, T. W. Biosynthesis of Carotenoids. GOODWIN, T. W. *The Biochemistry of the Carotenoids* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 1980, 1980, s. 33-76 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1007/978-94-009-5860-9_2. ISBN 978-94-009-5862-3. Dostupné z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-94-009-5860-9_2
- [50] HUNTER, William N. The Non-mevalonate Pathway of Isoprenoid Precursor Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2007, **282**(30), 21573-

- 21577 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1074/jbc.R700005200. ISSN 0021-9258.
Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.R700005200>
- [51] SZOTKOWSKI, M. *Srovnání metabolické aktivity a potenciálního využití mikrořas a pigmentotvorných kvasinek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 97 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..
- [52] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1982, 483 s.
- [53] KOCKOVÁ – KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Kvasinky*. Bratislava: Slov. vydav. techn. lit., 1957.
- [54] KURTZMAN, C., J. W. FELL a T. BOEKHOUT (eds.). *The yeasts: a taxonomic study*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 2011.
- [55] WALKER, G. M. *Yeast physiology and biotechnology*. New York: J. Wiley, c1998.
- [56] FRENGOVA, G. I., BESHKOVA, D. M. *Carotenoids from Rhodotorula and Phaffia: yeasts of biotechnological importance*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2009, vol. 36, no. 2, p. 163-180.
- [57] SEDLÁČEK, I. A J. G. VOET. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007.
- [58] HERRERO, A. a E. FLORES (eds.). *The cyanobacteria: molecular biology, genomics, and evolution*. Second edition. Norfolk, UK: Caister Academic Press, c2008.
- [59] SARMA, T. A., FLORES, E. (ed.). *Handbook of cyanobacteria: molecular biology, genomics, and evolution*. Second edition. Boca Raton, FL: CRC Press, c2013.
- [60] SHARMA, N. K., A. K. RAI a L. J. STAL. *Cyanobacteria: an economic perspective*. Second edition. Chichester, England: Wiley Blackwell, 2014.
- [61] BARSANTI, L. a P. GUALTIERI. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Second edition. Boca Raton, [Florida]: CRC Press/Taylor, 2014.
- [62] GRAHAM, L. E., L. W. WILCOX a L. J. STAL. *Algae: an economic perspective*. Second edition. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, c2000.
- [63] *Integrated Taxonomic Information System* [online]. [cit. 2016-04-24]. Dostupné z: <http://www.itis.gov>
- [64] JOHNSON, E. A. a M. J. LEWIS. Astaxanthin Formation by the Yeast *Phaffia rhodozyma*. *Journal of General Microbiology* [online]. 1979, **115**(1), 173-183 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1099/00221287-115-1-173. ISSN 0022-1287. Dostupné z:

- <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-115-1-173>
- [65] HANNIBAL, L., J. LORQUIN, N. A. D'ORTOLI, N. GARCIA, C. CHAINTREUIL, C. MASSON-BOIVIN, B. DREYFUS a E. GIRAUD. Isolation and Characterization of Canthaxanthin Biosynthesis Genes from the Photosynthetic *Bacterium Bradyrhizobium* sp. Strain ORS278. *Journal of Bacteriology* [online]. 2000, **182**(13), 3850-3853 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1128/JB.182.13.3850-3853.2000. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.182.13.3850-3853.2000>
- [66] OROSA, M. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology* [online]. 2005, **96**(3), 373-378 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.04.006. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852404001476>
- [67] MARCOLETA, Andrés, Mauricio NIKLITSCHKEK, Aniela WOZNIAK, Carla LOZANO, Jennifer ALCAÍNO, Marcelo BAEZA a Víctor CIFUENTES. "Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*". *BMC Microbiology* [online]. 2011, **11**(1) [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1186/1471-2180-11-190. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-11-190>
- [68] GU, W-L, G-H AN a E A JOHNSON. Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. 1997, **19**(2), 114-117 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1038/sj.jim.2900425. ISSN 1367-5435. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1038/sj.jim.2900425>
- [69] RAJA, R., S. HEMAISWARYA a R. RENGASAMY. Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2007, **74**(3), 517-523 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1007/s00253-006-0777-8. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0777-8>
- [70] WEEKS, O. B., F. K. SALEH, M. WIRAHADIKU-SUMAH a R. A. BERRY. Photoregulated carotenoid biosynthesis in non-photosynthetic microorganisms. *Pure and Applied Chemistry* [online]. 1973, **35**(1), 63-80 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1351/pac197335010063. ISSN 1365-3075. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.1973.35.issue-1/pac197335010063/pac197335010063.xml>

- [71] MATHEWS, Micheline M. a Norman I. KRINSKY. THE RELATIONSHIP BETWEEN CAROTENOID PIGMENTS AND RESISTANCE TO RADIATION IN NON-PHOTOSYNTHETIC BACTERIA. *Photochemistry and Photobiology* [online]. 1965, **4**(4), 813-817 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1965.tb07923.x. ISSN 0031-8655. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.1965.tb07923.x>
- [72] YEN, Hong-Wei a Zhiyong ZHANG. Enhancement of cell growth rate by light irradiation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology* [online]. 2011, **102**(19), 9279-9281 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.06.062. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852411008893>
- [73] MARTIN, Antonio M., Chun LU a Thakor R. PATEL. Growth parameters for the yeast *Rhodotorula rubra* grown in peat extracts. *Journal of Fermentation and Bioengineering* [online]. 1993, **76**(4), 321-325 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/0922-338X(93)90202-J. ISSN 0922338X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0922338X9390202J>
- [74] VIJAYALAKSHMI, Govindaswamy, Basavanna SHOBHA, Vasudeva VANAJAKSHI, Soundar DIVAKAR a Balaraman MANOHAR. Response surface methodology for optimization of growth parameters for the production of carotenoids by a mutant strain of *Rhodotorula gracilis*. *European Food Research and Technology* [online]. 2001, **213**(3), 234-239 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1007/s002170100356. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002170100356>
- [75] AKSU, Z. a A. Tuğba EREN. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry* [online]. 2005, **40**(9), 2985-2991 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/j.procbio.2005.01.011. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135951130500>
- [76] BHOSALE, P. a R.V. GADRE. Optimization of carotenoid production from hyper-producing *Rhodotorula glutinis* mutant 32 by a factorial approach. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2001, **33**(1), 12-16 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2001.00940.x. ISSN 0266-8254. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1472-765X.2001.00940.x>

- [77] MALISORN, C. a W. SUNTORNSUK. Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresource Technology* [online]. 2008, **99**(7), 2281-2287 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.05.019. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852407004348>
- [78] FRENGOVA, Ginka, Emilina SIMOVA, Konstantza PAVLOVA, Dora BESHKOVA a Drinka GRIGOROVA. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 1994, **44**(8), 888-894 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1002/bit.260440804. ISSN 0006-3592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260440804>
- [79] FRENGOVA, Ginka I., Simova D. EMILINA a Dora M. BESHKOVA. Carotenoid Production by Lactoso-Negative Yeasts Co-Cultivated with Lactic Acid Bacteria in Whey Ultrafiltrate. *Zeitschrift für Naturforschung C* [online]. 2003, **58**(7-8), 562-567 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1515/znc-2003-7-820. ISSN 1865-7125. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/znc.2003.58.issue-7-8/znc-2003-7-820/znc-2003-7-820.xml>
- [80] HU, Zhong-Ce, Yu-Guo ZHENG, Zhao WANG a Yin-Chu SHEN. PH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2006, **39**(4), 586-590 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.11.017. ISSN 01410229. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022905004928>
- [81] NI, Hui, Qi-he CHEN, Hui RUAN, Yuan-fan YANG, Li-jun LI, Guang-bin WU, Yang HU a Guo-qing HE. Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* [online]. 2007, **8**(5), 365-370 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1631/jzus.2007.B0365. ISSN 1673-1581. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1631/jzus.2007.B0365>
- [82] SIMOVA, E. D., G. I. FRENGOVA a D. M. BESHKOVA. Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultured with yogurt starter cultures in whey ultrafiltrate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. 2004, **31**(3), 115-121 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1007/s10295-004-0122-0. ISSN 1367-5435. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-004-0122-0>
- [83] ZHENG, Y.-G., Z.-C. HU, Z. WANG a Y.-C. SHEN. Large-Scale Production of Astaxanthin by *Xanthophyllomyces Dendrorhous*. *Food and Bioproducts*

- Processing* [online]. 2006, **84**(2), 164-166 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1205/fbp.05030. ISSN 09603085. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960308506705314>
- [84] BUZZINI, P. Batch and fed-batch carotenoid production by *Rhodotorula glutinis-Debaryomyces castellii* co-cultures in corn syrup. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2001, **90**(5), 843-847 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01319.x. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2001.01319.x>
- [85] FRENGOVA, Ginka, Emilina SIMOVA a Dora BESHKOVA. Use of Whey Ultrafiltrate as a Substrate for Production of Carotenoids by the Yeast *Rhodotorula Rubra*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. 2004, **112**(3), 133-142 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1385/ABAB:112:3:133. ISSN 0273-2289. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1385/ABAB:112:3:133>
- [86] MORIEL, Danilo Gomes, Miriam Blumel CHOCIAI, Iara Maria Pereira MACHADO, José Domingos FONTANA a Tania Maria Bordin BONFIM. Effect of feeding methods on the astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in fed-batch process. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online]. 2005, **48**(3), 397-401 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1590/S1516-89132005000300010. ISSN 1516-8913. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132005000300010&lng=en&tlng=en
- [87] BHOSALE, P. a R.V. GADRE. Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced beta-carotene production by mutant 32 of *Rhodotorula glutinis*. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2002, **34**(5), 349-353 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2002.01095.x. ISSN 0266-8254. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1472-765X.2002.01095.x>
- [88] CHAN, H.Y. a K.P. HO. *Biotechnology Letters* [online]. **21**(11), 953-958 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1023/A:1005638610564. ISSN 01415492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1005638610564>
- [89] SIMOVA, Emilina D., Ginka I. FRENGOVA a Dora M. BESHKOVA. Effect of Aeration on the Production of Carotenoid Pigments by *Rhodotorula rubra-lactobacillus casei* Subsp. *casei* Co-Cultures in Whey Ultrafiltrate. *Zeitschrift für Naturforschung C* [online]. 2003, **58**(3-4), 225-229 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1515/znc-2003-3-415. ISSN 1865-7125. Dostupné z:

- <http://www.degruyter.com/view/j/znc.2003.58.issue-3-4/znc-2003-3-415/znc-2003-3-415.xml>
- [90] SARADA, R, Usha TRIPATHI a G.A RAVISHANKAR. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochemistry* [online]. 2002, **37**(6), 623-627 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1016/S0032-9592(01)00246-1. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959201002461>
- [91] PISAL, Dipak S.; LELE, S. S. Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. 2005.
- [92] KATSUDA, Tomohisa, Abdolmajid LABABPOUR, Kazumichi SHIMAHARA a Shigeo KATOH. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2004, **35**(1), 81-86 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2004.03.016. ISSN 01410229. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022904000912>
- [93] SOLOVCHENKO, A. E. Physiology and adaptive significance of secondary carotenogenesis in green microalgae. *Russian Journal of Plant Physiology* [online]. 2013, **60**(1), 1-13 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1134/S1021443713010081. ISSN 1021-4437. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S1021443713010081>
- [94] SUBRAMANIAM, Ramalingam, Stephen DUFRECHE, Mark ZAPPI a Rakesh BAJPAI. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2010, **37**(12), 1271-1287 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1007/s10295-010-0884-5. ISSN 1367-5435. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-010-0884-595>.
- [95] CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* [online]. 2007, **25**(3), 294-306 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975007000262>
- [96] MENG, Xin, Jianming YANG, Xin XU, Lei ZHANG, Qingjuan NIE a Mo XIAN. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy* [online]. 2009, **34**(1), 1-5 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1016/j.renene.2008.04.014. ISSN 09601481. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960148108001468>

- [97] SMYTH, T. J. P., A. PERFUMO, R. MARCHANT a I. M. BANAT*. Isolation and Analysis of Low Molecular Weight Microbial Glycolipids. TIMMIS, Kenneth N., ed. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, 2010, s. 3705-3723 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1007/978-3-540-77587-4_291. ISBN 978-3-540-77584-3. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-77587-4_291
- [98] DESAI, Jitendra D.; BANAT, Ibrahim M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1997, 61. Jg., Nr. 1, S. 47-64.
- [99] NUÑEZ, A., R. ASHBY, T. A. FOGLIA a D. K. Y. SOLAIMAN. Analysis and characterization of sophorolipids by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization. *Chromatographia* [online]. 2001, **53**(11-12), 673-677 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1007/BF02493019. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02493019>
- [100] LANG, Siegmund a Jim C PHILP. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. **74**(1/3), 59-70 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1023/A:1001799711799. ISSN 00036072. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1001799711799>
- [101] FUKUOKA, Tokuma, Tomotake MORITA, Masaaki KONISHI, Tomohiro IMURA, Hideki SAKAI a Dai KITAMOTO. Structural characterization and surface-active properties of a new glycolipid biosurfactant, mono-acylated mannosylerythritol lipid, produced from glucose by *Pseudozyma antarctica*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2007, **76**(4), 801-810 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1007/s00253-007-1051-4. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-007-1051-4>
- [102] GUPTA, Prateek, Yellamaraju SREELAKSHMI a Rameshwar SHARMA. A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. *Plant Methods* [online]. 2015, **11**(1) [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1186/s13007-015-0051-0. ISSN 1746-4811. Dostupné z: <http://www.plantmethods.com/content/11/1/5>
- [103] KOT, Anna M., Stanisław BŁAŻEJAK, Iwona GIENKA, Marek KIELISZEK a Joanna BRYŚ. Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry?. *Microbial Cell Factories* [online]. 2018, **17**(1) [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1186/s12934-018-0893-z. ISSN 1475-2859. Dostupné z:

<https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-018-0893-z>

- [104] PUČ, V. *Stanovení beta-karotenu v ječmeni metodou HPLC*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 79 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Jaroslav Prýma.
- [105] GROSS, M. *Ověření výtěžnosti metody stanovení mastných kyselin* [online]. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/116523>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D..
- [106] CHIU, Huai-Hsuan a Ching-Hua KUO. Gas chromatography-mass spectrometry-based analytical strategies for fatty acid analysis in biological samples. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. 2020, **28**(1), 60-73 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1016/j.jfda.2019.10.003. ISSN 10219498. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949819300985>
- [107] FOLCH, Jordi; LEES, M.; STANLEY, GH Sloane. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 1957, 226. Jg., Nr. 1, S. 497-509.
- [108] BLIGH, E. G. a W. J. DYER. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* [online]. 1959, **37**(1), 911-917 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1139/y59-099. ISSN 0576-5544. Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/y59-099>
- [109] BENNETT, Allen a Lawrence BOGORAD. COMPLEMENTARY CHROMATIC ADAPTATION IN A FILAMENTOUS BLUE-GREEN ALGA. *The Journal of Cell Biology* [online]. 1973, **58**(2), 419-435 [cit. 2020-05-22]. DOI: 10.1083/jcb.58.2.419. ISSN 1540-8140. Dostupné z: <https://rupress.org/jcb/article/58/2/419/18179/COMPLEMENTARY-CHROMATIC-ADAPTATION-IN-A>
- [110] JIRU, Tamene Milkessa, Marizeth GROENEWALD, Carolina POHL, Laurinda STEYN, Nicholas KIGGUNDU a Dawit ABATE. Optimization of cultivation conditions for biotechnological production of lipid by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn, *Rhodosporidium kratochvilovae*) SY89 for biodiesel preparation. *3 Biotech* [online]. 2017, **7**(2) [cit. 2020-05-18]. DOI: 10.1007/s13205-017-0769-7.

ISSN 2190-572X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-017-0769-7>

- [111] JIRU, Tamene Milkessa, Laurinda STEYN, Carolina POHL a Dawit ABATE. Production of single cell oil from cane molasses by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn, *Rhodosporidium kratochvilovae*) SY89 as a biodiesel feedstock. *Chemistry Central Journal* [online]. 2018, **12**(1) [cit. 2020-05-18]. DOI: 10.1186/s13065-018-0457-7. ISSN 1752-153X. Dostupné z: <https://bmcchem.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13065-018-0457-7>
- [112] ROUBALOVÁ, M. Studium metabolismu karotenogenních kvasinek na molekulární úrovni. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. XY s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [113] GALAFASSI, Silvia, Daniela CUCCHETTI, Francesca PIZZA, Giuliana FRANZOSI, Daniele BIANCHI a Concetta COMPAGNO. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresource Technology* [online]. 2012, **111**, 398-403 [cit. 2020-05-18]. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.02.004. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852412002209>
- [114] BRAUNWALD, Teresa, Lisa SCHWEMMLEIN, Simone GRAEFF-HÖNNINGER, William Todd FRENCH, Rafael HERNANDEZ, William E. HOLMES a Wilhelm CLAUPEIN. Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2013, **97**(14), 6581-6588 [cit. 2020-05-18]. DOI: 10.1007/s00253-013-5005-8. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-013-5005-8>
- [115] BYRTUSOVÁ, D. Optimalizace podmínek kultivace řasových kultur ve fotobioreaktorech. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 105 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Radka Kočí, Ph.D.

[URL1]

https://www.google.com/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fchemdictionary.org%2Fwp-content%2Fuploads%2F2017%2F10%2FHPLC-1.png&imgrefurl=http%3A%2F%2Fburge.bjgmc-tb.org%2Fhplc-basics%2F&tbid=snw4LGh_XRS-OM&vet=12ahUKEwjAx4b2ltvnAhV3gM4BHQ9uDokQMygZegQIARA2..i&docid=3grgMZEAAFaubM&w=2000&h=1063&itg=1&q=high%20performance

%20liquid%20chromatography&ved=2ahUKEwjAx4b2ltvnAhV3gM4BHQ9uD
okQMygZegQIARA2#h=1063&imgdii=s4QJbYZ6yo73HM:&vet=12ahUKEwj
Ax4b2ltvnAhV3gM4BHQ9uDokQMygZegQIARA2..i&w=2000

[URL2]

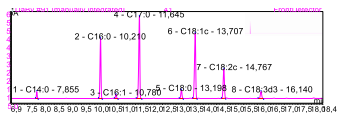
[https://www.google.com/search?q=gas+chromatography&tbm=isch&ved=2ahU
KEwiAiPCgyZToAhUKihoKHRfYC6EQ2-
cCegQIABAA&oq=gas+ch&gs_l=img.1.0.35i39j0l3j0i67j0l5.1069.2837..3980..
.0.0.0.758.1470.0j5j6-1.....0....1..gws-wiz-img.ENvnq-
S61lU&ei=E_ppXsCyHoqUapewr4gK#imgrc=t9yICpysirMoyM](https://www.google.com/search?q=gas+chromatography&tbm=isch&ved=2ahUKEwiAiPCgyZToAhUKihoKHRfYC6EQ2-cCegQIABAA&oq=gas+ch&gs_l=img.1.0.35i39j0l3j0i67j0l5.1069.2837..3980..0.0.0.758.1470.0j5j6-1.....0....1..gws-wiz-img.ENvnq-S61lU&ei=E_ppXsCyHoqUapewr4gK#imgrc=t9yICpysirMoyM)

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

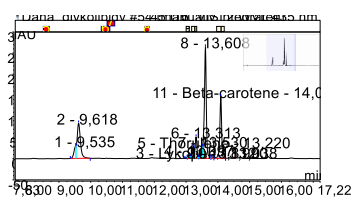
Acetyl-CoA	acetyl koenzym A
ADP	adenosindifosfát
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
ASW	artificial seawater medium
ATP	adenosintrifosfát
BHT	buthylhydroxytoluen
BBM	Bold-Basal/Bristol medium
CCALA	sbírkové číslo kmene
CDP – ME	4-difosfocytidyl-2-methyl-D-erytritol
CDP – ME2P	4-difosfocytidyl-2-methyl-D-erythritol-2P
CPE	extrakce odstředivým dělením
CTP	cytosintrifosfát
DMAPP	dimethylalylpyrofosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DOXP	1-deoxy-D-o-xylulóza-5P
DXS	1-deoxy-D-o-xylulóza-5P-syntáza
GC – FID	plynová chromatografie s indukčně vázanou plazmou
GC – MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GC	plynová chromatografie
GGPP	geranyl-geranylpyrofosfát
GHMP	4-difosfocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kináza
GRAS	všeobecně akceptované jako bezpečné
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A
HPLC – DAD	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem s diodovým polem
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IPP	isopentenylpyrofosfát
MAE	mikrovlánná extrakce
MECP	2-methyl-D-erythritol-2,4-cyklodifosfát
MEL	mannosylerythritolové lipidy
MEP	2-methyl-D-erythritol-4P
MK	mastná kyselina

MS	hmotnostní spektrometrie
MTBE	terc-methylbutylether
MVA	kyselina mevalonová
NADPH	niktoinamidadenindinukleotidfosfát
NMR	nuklerání magnetická rezonance
PBP	fykobiliproteiny
PTFE	polytetrafluorethylen
PUFA	polynenasycená mastná kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
RRF	faktory relativní odezvy
SOD	superoxid dismutasa
TAG	triacylglycerol
TFA	kyselina trifluoroctová
UAE	ultrazvuková extrakce
UV – VIS	ultrafialovo – viditelná spektroskopie

9 PŘÍLOHY



Obr. 24: Ukázkový chromatogram z plynové chromatografie



Obr. 25: Ukázkový chromatogram z kapalinové chromatografie