



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

APLIKACE FYZIKÁLNÍCH A CHEMICKÝCH STRESOVÝCH FAKTORŮ V RŮZNÝCH FÁZÍCH RŮSTU NA AUTOTROFNÍ MIKROORGANISMY

APPLICATION OF PHYSICAL AND CHEMICAL STRESS FACTORS IN DIFFERENT STAGES OF GROWTH TO
AUTOTROPHIC MICROORGANISMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Pavlína Sniegoňová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1659/2021
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Pavlína Sniegoňová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.**

Akademický rok: 2021/22

Název diplomové práce:

Aplikace fyzikálních a chemických stresových faktorů v různých fázích růstu na autotrofní mikroorganismy

Zadání diplomové práce:

V rámci této práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- Přehledná literární rešerše zaměřená na vliv fyzikálních, chemických a biologických stresů na autotrofní mikroorganismy
- Screeningové kultivace vybraných kmenů autotrofních mikroorganismů v médiích se stresovými faktory
- Selektce nejvhodnějších stresových faktorů a optimalizace podmínek kultivace
- Charakterizace nakultivované biomasy
- Vyhodnocení výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

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

Bc. Pavlína Sniegoňová
studentka

Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

V současné době stále roste poptávka po metabolitech produkovaných mikrořasami a sinicemi, pro jejich pozitivní účinky na lidský organismus a zdraví. Mezi tyto metabolity se řadí především karotenoidní barviva, jejichž antioxidační vlastnosti jsou pro spotřebitele velmi atraktivní. Tyto látky se používají především v doplňcích stravy, ale uplatňují se i ve farmaceutickém průmyslu. Mezi tyto látky patří například β -karoten, ale také chlorofyly, které se významně podílejí na procesu fotosyntézy. Další významné metabolity jsou lipidy, které jsou součástí buněčných struktur, a slouží k celé řadě dalších funkcí. Teoretická část se zaměřuje na popis řas a sinic jejich kultivaci. Dále vlivu stresových faktorů na produkci biomasy a metabolitů. Metabolity jsou pak charakterizovány z hlediska vlastností a biochemických drah vedoucím k jejich produkci. Následně jsou zmíněny vyhodnocovací techniky použité k charakterizaci nakultivované biomasy. Ve výsledkové části jsou pak srovnány produkční vlastnosti v závislosti na vybraných stresových faktorech.

ABSTRACT

Nowadays, the demand for metabolites produced by microalgae and cyanobacteria is still growing, due to their positive effects on the human body and health. These metabolites include mainly carotenoid pigments, that have antioxidant properties, which very attractive to consumers. These substances are mainly used in food supplements; however they are also used in the pharmaceutical industry. These substances include, for example, β -carotene, but also chlorophylls, which are significantly involved in the photosynthesis process. Other important metabolites are lipids, which are part of cellular structures and serve a number of other functions. The theoretical part focuses on the description of algae and cyanobacteria and their cultivation. Furthermore, the influence of stress factors on the production of biomass and metabolites. Metabolites are then characterized in terms of properties and biochemical pathways leading to their production. Subsequently, there are mentioned evaluation techniques used to characterize the cultivated biomass. In the result part, the production properties are compared depending on the selected stress factors.

Klíčová slova

Mikrořasy, sinice, lipidy, karotenoidy, stresové faktory, kokultivace,

Key words

Microalgae, cyanobacteria, lipids, carotenoids, stress factors, cocultivation

SNIEGOŇOVÁ, Pavlína. Aplikace fyzikálních a chemických stresových faktorů v různých fázích růstu na autotrofní mikroorganismy [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-11]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139144>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martin Szotkowski.

Prohlášení

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

.....

podpis studenta

Poděkování

V této části bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Ing. Martinu Szotkovskému, PhD. za jeho vedení, pomoc, cenné rady a čas, který mi při tvorbě diplomové práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat svému konzultantovi Ing. Samueli Šimanskému a Ing. Jiřímu Holubovi za rady a pomoc při řešení práce. V neposlední řadě patří velké poděkování přátelům a rodině, kteří byli po dobu mého studia vůči mě trpěliví a vždy mě podporovali.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ PRÁCE	9
2.1	Řasy a sinice	9
2.1.1	Řasy.....	9
2.1.1.1	Morfologie	9
2.1.2	Sinice.....	9
2.1.3	Živiny.....	10
2.1.4	Kultivace	10
2.1.5	Vybrané rody řas a sinic	11
2.1.5.1	Rod Scenedesmus a Desmodesmus	11
2.1.5.2	Rod Chlamydomonas	12
2.1.5.3	Rod Chlorella	12
2.1.5.4	Rod Coccomyxa.....	13
2.1.5.5	Rod Spirulina	13
2.2	Stresové faktory	13
2.2.1	Oxidativní stres	14
2.2.2	Kokultivace	14
2.3	Odpadní látky.....	14
2.3.1	Fritovací olej	15
2.3.2	Kávuový olej.....	15
2.4	Metabolity.....	16
2.4.1	Lipidy.....	16
2.4.1.1	Mastné kyseliny, Triacylglyceroly.....	16
2.4.1.2	Metabolismus mastných kyselin	17
2.4.2	Karotenoidy.....	17
2.4.2.1	Biosyntéza.....	18
2.4.2.2	Mevalonátová syntéza/cesta.....	19
2.4.2.3	Deoxy-D-xylulóza 5-fosfátová cesta/ syntéza	19
2.4.2.4	Syntéza GGPP a karotenoidů.....	20
2.4.3	Koenzym Q10	21

2.4.4	Steroly	22
2.4.5	Chlorofyl.....	22
2.4.5.1	Biosyntéza chlorofylu	23
2.4.5.2	Fotosyntéza	24
2.4.5.3	Světelná fáze	24
2.4.5.4	Calvinův cyklus.....	25
2.5	Analytické techniky pro stanovení mikrobiální biomasy	25
2.5.1	Spektrofotometrie	26
2.5.2	HPLC	26
2.5.3	GC	27
3	CÍLE PRÁCE	28
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
4.1	Použité chemikálie.....	29
4.1.1	Chemikálie pro kultivaci řas a sinic.....	29
4.1.2	Chemikálie pro extrakce	29
4.1.3	Chemikálie pro měření lipázové aktivity.....	29
4.2	Použité přístroje a pomůcky	30
4.3	Použité kmeny řas a sinic	31
4.4	Kultivace mikroorganismů	31
4.4.1	Aplikace stresů.....	33
4.5	Analýza biomasy	34
4.5.1	Stanovení nakultivované biomasy	34
4.5.2	Příprava vzorků pro HPLC analýzu.....	34
4.5.3	Příprava vzorků pro GC analýzu.....	35
4.5.4	Stanovení lipázové aktivity.....	36
4.5.4.1	Sestrojení kalibrační křivky	36
4.5.4.2	Příprava substrátu pro reakci.....	36
4.5.4.3	Měření a výpočet lipázové aktivity.....	36
5	VÝSLEDKOVÁ ČÁST.....	37
5.1	Kultivace na BBM a Spirulina médiu současně s různými koncentracemi kobaltu	37
5.1.1	<i>Scenedesmus acutus</i> CCALA 904.....	37

5.1.2	<i>Desmodesmus velitaris</i> CCALA 468	39
5.1.3	<i>Anabaena torulosa</i> CCALA 3.....	41
5.1.4	<i>Spirulina</i> CCALA 28	42
5.2	Kultivace v přítomnosti různých koncentrací použitého fritovacího a kávového oleje 44	
5.2.1	<i>Desmodesmus armatus</i> CCALA 439	44
5.2.2	<i>Desmodesmus communis</i> 464	46
5.2.3	<i>Scenedesmus acutus</i> CCALA 904.....	48
5.2.4	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CCALA 973.....	50
5.2.5	<i>Chlorella cf. minutissima</i> CCALA 916.....	52
5.2.6	<i>Anabaena torulosa</i> CCALA 3.....	54
5.3	Kokultivace řas a sinic.....	56
5.3.1	<i>Anabaena torulosa</i> CCALA 3 a <i>Coccomyxa sp.</i> CCALA 912	56
5.3.2	<i>Anabaena torulosa</i> CCALA 3 a <i>Desmodesmus communis</i> CCALA 464	58
5.3.3	<i>Anabaena torulosa</i> CCALA 3 a <i>Scenedesmus acutus</i> CCALA 904.....	59
5.3.4	<i>Anabaena torulosa</i> CCALA 3 a <i>Scenedesmus obliquus</i> CCALA 455	62
5.3.5	<i>Spirulina</i> CCALA 28 a <i>Scenedesmus obliquus</i> CCALA 455	63
6	ZÁVĚR.....	66
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	76

1 ÚVOD

V současnosti stále roste obliba biotechnologické produkce určitých mikroorganismů. Mezi ně patří mikrořasy a sinice, které tvoří rozmanitou skupinu velmi důležitých mikroorganismů. Jejich nejznámější a nejdůležitější přínos je produkce O_2 během procesu fotosyntézy, kdy za spotřeby světelné energie fixují CO_2 za vzniku cukerných prekurzorů. Velmi významné jsou také jimi produkovány metabolity. Mohou to být například lipidické látky, pigmenty ale také významné biologicky aktivní látky (antioxidanty). Díky dalšímu využití těchto látek je možné je dále zpracovávat v doplňcích stravy či farmaceutických preparátech.

K většímu výnosu z kultivace mikrořas a sinic lze využít určité druhy stresových faktorů. V adaptaci na tyto nepříznivé podmínky zvyšují produkci některých metabolitů nebo celkové biomasy, které by měly sloužit jako obranný mechanismus. Tyto stresové podmínky mohou pocházet z fyzikálních či chemických zdrojů.

Jelikož velkoobjemové kultivace vyžadují velké provozní a tím také finanční prostředky, hledají se v současnosti možnosti, které by tyto náklady snížily. Slibným způsobem se nabízí využití odpadních substrátů z potravinářského průmyslu jako zdroje živin v médiu. Tímto způsobem by došlo k valorizaci odpadních látek, ale také ke snížení ceny na kultivaci, popřípadě i zvýšení produkce biomasy a metabolitů.

Velmi zajímavým způsobem zvýšení produkce mikrořasami a sinicemi může kokultivace dvou vybraných druhů mikroorganismů. Cílem této kokultivace byla tvorba synergického efektu na růst obohacené biomasy ať už u jedné, či obou řas spojená s produkcí široké palety metabolitů.

V dnešní době značně roste zájem o zlepšení kvality života a zdraví, proto lidé také více sahají po různých doplňcích stravy. Mikrořasy a sinice jsou schopné řadu těchto látek produkovat, je však prvně nutné najít a optimalizovat podmínky a konkrétní mikroorganismy pro možnost velkovýroby.

2 TEORETICKÁ PRÁCE

2.1 Řasy a sinice

2.1.1 Řasy

Mikrořasy jsou jedny z nejrozšířenějších mikroorganismů na Zemi. Je to značně různorodá skupina eukaryotických organismů, která je nedílnou součástí všech ekosystémů. Mikrořasy jsou fotosyntetické organismy, které ročně fixují téměř polovinu CO₂ spotřebovaného při fotosyntéze, což také znamená že produkují téměř polovinu O₂. Častý příklad dělení těchto organismů je podle produkovaných pigmentů, z nichž nejznámější jsou zelené, hnědé a červené řasy. Jejich výskyt není omezen téměř žádnými podmínkami. Značné množství řas lze nalézt jak se slaných, tak ve sladkých vodách, kde jsou základní součástí potravního řetězce, ale vyskytují se také v suchozemském prostředí a jsou schopné se z těchto prostředí dostat také do vzduchu. Jejich výskyt také není výjimkou ve značně nepříznivých podmínkách, které panují na Arktidě a Antarktidě. V těchto podmínkách jsou schopny přežívat díky adaptaci určitých vlastností, například snížení množství vody uvnitř buněk, čímž zabraňují tvorbě ledových krystalků. Obdobně se některé mikrořasy přizpůsobily vysokým teplotám. Řasy také žijí v symbióze s dalšími mikroorganismy, společně s houbami tvoří například lišejníky. Řasy jsou běžně využívány v řadě biotechnologických procesů. V současnosti je velmi častá produkce například *Spiruliny* a *Chlorelly*, které jsou využívány v doplňcích stravy. Velký význam mají převážně jejich metabolity, ať už to jsou různé biologicky aktivní látky, polynenasycené mastné kyseliny nebo pigmenty (například β -karoten). Používány jsou pak především v potravinářském nebo farmaceutickém průmyslu. Oblast, ve které řasy vykazují velký potenciál, je produkce biopaliv. Již nějakou dobu o tyto paliva roste zájem, zároveň se hledají možnosti, jak snížit a nahradit spotřebu fosilních paliv [1] [2] [3] [4].

2.1.1.1 Morfologie

Pro skupinu organismů, která je takto značně rozmanitá, není žádné překvapení, že jejich morfologie je velmi pestrá. Mezi řasami nalezneme mikroskopické jednobuněčné zástupce ale také makroskopické mnohobuněčné řasy. Mnohé řasy jsou jednobuněčné organismy, které se podle jejich přítomnosti či absence bičíku mohou pohybovat nebo zůstávají nehybné. Dalším řasám také vyhovuje, pokud se tyto buňky seskupí, a pracují společně v kolonii (cenobia). Co se tvaru buněk týče, i zde nalezneme několik možností. Pokud dochází k dělení tak, že buňky tvoří řetízek, jedná se o vláknité typy řas. Tyto vlákna mohou být jednoduchá nebo rozvětvená. Další možností je tvorba vícebuněčné stélky, které mohou být i větvené. Některé řasy mají velkou buňku trubkovitého tvaru obsahující velké množství jader [1].

2.1.2 Sinice

Mezi sinice řadíme prokaryotické mikroorganismy (bakterie), které mají schopnost fotosyntézy, jsou tedy významným producentem O₂. Podobně jako řasy je můžeme nalézt v celé škále různých prostředí a díky tomu jsou tyto mikroorganismy značně rozmanité. Na rozdíl od

řas jim však vyhovuje o něco teplejší prostředí, proto se jim v teplejších oblastech také velmi dobře daří. Také jim nedělá problém se adaptovat na prostředí s vysokým obsahem solí. Některé sinice adaptovaly způsoby, které jim umožňují fixovat N_2 . Tento děj je pro sinice nejrozšířenější v oceánském prostředí. Tato schopnost jim také umožňuje mít symbiotické vztahy s jinými organismy, kterým tento N_2 předávají. Portfolio metabolitů produkovaných sinicemi je značně podobné jako u řas, jsou tedy také potenciálním producentem biopaliv nebo jejich prekurzorů. Mimo to produkují mnohé bioaktivní látky využitelné třeba ve farmaceutickém průmyslu. Jelikož sinice a řasy sdílí řadu aspektů, také kultivace je závislá na podobných podmínkách. Vyžadují tedy přístup světla, které se střídá s tmou, zdroj CO_2 a optimální médium obsahující potřebné látky [4] [5] [6] [7].

2.1.3 Živiny

Jelikož jsou řasy převážně považovány za fotoautotrofní organismy, hlavními podmínkami pro růst a život je tedy zdroj světla (energie) a CO_2 . Při absorpci světla jsou schopny tuto energii přetvořit do podoby makroergických sloučenin, jejichž energii dále využívají při tvorbě cukerných prekurzorů při fixaci CO_2 ze vzduchu. Kromě toho však při tvorbě optimálních médií pro kultivaci těchto organismů často přidáváme další důležité mikronutrieny. Jednou z nejzákladnějších látek hrající roli třeba při ukládání energie je fosfor, obsažený ve sloučeninách uchovávajících energii. Dalšími důležitými prvky jsou pak například dusík, síra, hořčík či železo. Tyto prvky bývají běžnou součástí kultivačních médií, jejich složení se poté liší v závislosti na konkrétním mikroorganismu, který chceme kultivovat [1] [2] [8].

2.1.4 Kultivace

Procesem kultivace se rozumí děj, při kterém dochází k růstu a zpracování řasové biomasy. Při kultivaci je důležité, aby měl daný mikroorganismus ideální podmínky pro svůj růst, a to zajištěním dostatečného přísunu všech potřebných zdrojů. Co se týče dalších podmínek, jako je objem kultivace či kultivační prostředí, lze zvolit z mnoha možností. Pro experimentální a studijní účely lze kultivaci uskutečnit v laboratorních podmínkách, kde je zajištěno sterilní a kontrolované prostředí. Pro velkoobjemovou kultivaci by však tyto kapacity nestačily. Nejčastějším systémem pro kultivaci jsou venkovní vodní plochy. Mezi ně patří velké nádrže s malou hloubkou (raceway ponds). Jsou jednodušší na zhotovení ale také na provoz. Nevýhodou tohoto typu kultivace je nemožnost kontroly podmínek. Jelikož se jedná o otevřené plochy, dochází k odpařování ale také k nedokonalému proudění plynů či výkyvy teplot. Existují však také uzavřená jezírka, kde lze lépe kontrolovat podmínky prostředí. Jsou cenově nákladnější, ne však více než uzavřené bioreaktory. V bioreaktorech však lze lépe kontrolovat podmínky kultivace [1] [5] [9] [10].



Obrázek 1: Příklad kultivace mikrořas v laboratorních podmínkách

2.1.5 Vybrané rody řas a sinic

2.1.5.1 Rod *Scenedesmus* a *Desmodesmus*

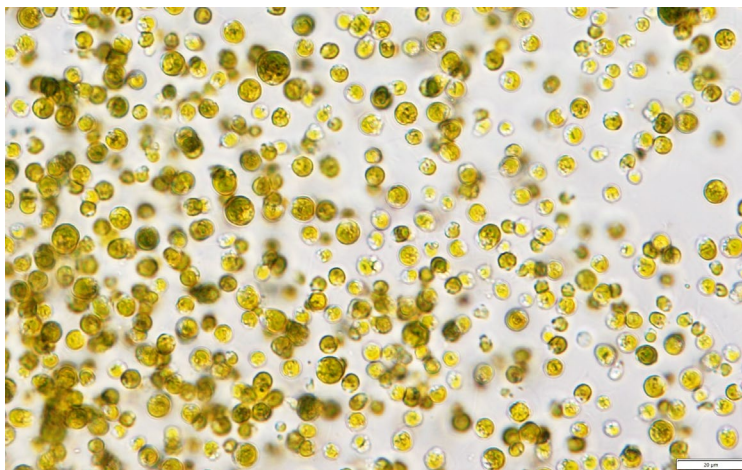
Rod *Scenedesmus* patří mezi nepohyblivé jednobuněčné zelené řasy. Tvoří plochá cenobia skládající se z jedné či dvou řad, obsahujících celkem 2-32 buněk. Jejich tvar a velikost není pro všechny zástupce jednotná. Tento rod se následně dělí na dva poddruhy, a to *Acutodesmus* a *Desmodesmus*. Pro poddruh *Desmodesmus* je charakteristická tvorba čtyřvrstvé obálky, chránící celou kolonii. V porovnání s ním tvoří *Acutodesmus* pouze třívrstvé obálky. Mezi zástupce rodu *Scenedesmus* řadíme například *Scenedesmus acutus* a *Scenedesmus obliquus*. Mezi rod *Desmodesmus* pak *Desmodesmus armatus*, *Desmodesmus quadricauda* nebo *Desmodesmus dimorphus* [11] [12] [13].



Obrázek 2: *Desmodesmus velitaris* CCALA 468

2.1.5.2 Rod *Chlamydomonas*

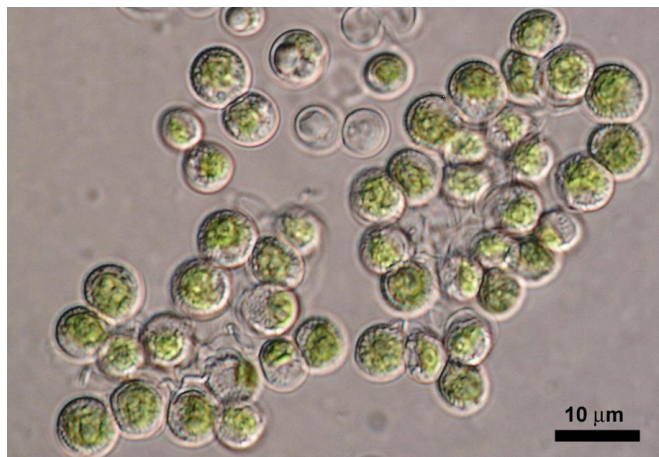
Chlamydomonas je rod jednobuněčných zelených řas, řadících se mezi největší rody obsahujících několik stovek (600) zástupců. Velikost buněk se mezi zástupci liší jak ve tvaru, tak ve velikosti, mají však dva stejně dlouhé bičíky blízko sebe. Buňka obsahuje chloroplasty s jedním či více pyrenoidy a buněčnou stěnu. Tato řasa také slouží jako modelový organismus pro studium fotosyntézy, biogeneze chloroplastů nebo kontrolu buněčného cyklu buňky. Mezi zástupce patří *Chlamydomonas reinhardtii* nebo *Chlamydomonas eugametos* [14] [15].



Obrázek 3: *Chlamydomonas reinhardtii* CCALA 973

2.1.5.3 Rod *Chlorella*

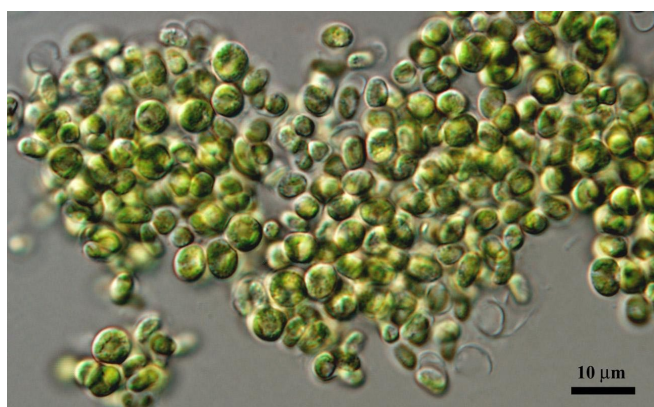
Tento rod se řadí k nejpopulárnějším řasám díky své relativní nenáročnosti kultivace a velmi dobře předvídatelnému růstu biomasy. Jsou dobrý modelový organismus pro studium fyziologických a biochemických vlastností. Mezi procesy zkoumané na kmeni *Chlorella* patří například fotosyntéza nebo nitrátový cyklus. Tento jednobuňčný nepohyblivý organismus se vyskytuje převážně ve sladkých vodách. Jeho tvar je převážně kulovitý a rozmnožuje se nepohlavně, tyto neurčité morfologické znaky přinesly obtíže při identifikaci dalších zástupců. Mezi zástupce se řadí *Chlorella vulgrais*, *Chlorella sorokiniana* nebo *Chlorella minutissima* [11] [16] [17].



Obrázek 4: *Chlorella* sp. CCALA 716

2.1.5.4 Rod *Coccomyxa*

Coccomyxa je zelená řasa vyskytující se celosvětově díky své schopnosti přizpůsobit se danému prostředí. Díky této vlastnosti se může vyskytovat v prostředích s širokým rozmezím pH, vysokou koncentrací soli, ale také v prostředích s vyššími teplotami. Jejich výskyt se nelimituje pouze na vodní prostředí, nalézt je můžeme jako součástí biofilmů v půdních ekosystémech. Tvoří také symbiotické vstahy s dalšími organismy. V porovnání s dalšími řasami, se tento rod vyznačuje malou velikostí pohybující se od 6-14 x 3-6 μm . Buňky jsou kulovité nebo tvoří nepravidelné elipsoidy. Prostudována byla celá genomová sekvence této řasy, používá se tedy jako modelový organismus. Mezi zástupce můžeme řadit například *Coccomyxa cubellipsoidea* [18] [19].



Obrázek 5: *Coccomyxa* sp. CCALA 912

2.1.5.5 Rod *Spirulina*

Spirulina se řadí mezi jednobuněčné vláknité sinice měřící napříč asi 10 μm . Přirozeně se vyskytuje ve vodních prostředích jako jsou jezera, rybníky nebo nádrže se zásaditým pH. Své velké popularitě vděčí převážně díky své vysoké produkci proteinů, vitamínů a minerálů a řadě dalších živin. Velké využití tak nalézá v potravinářském průmyslu jako doplněk stravy. Kromě toho, že je velmi bohatá na nutrienty, má významné antioxidační a protizánětlivé účinky, čímž se její uplatnění rozšiřuje také při podpoře lidského zdraví. Mezi zástupce řadíme například *Spirulina platensis* nebo *Spirulina maxima* [20] [21].

2.2 Stresové faktory

Častým způsobem produkce řasové biomasy je kultivace za stresových podmínek. Tento způsob produkce biomasy se využívá zejména z důvodu zvýšené produkce jak biomasy, tak určitých metabolitů. Stresovými faktory se pak rozumí podmínky, nebo látky, které určitým způsobem naruší ideální podmínky pro buňku. Tyto organismy se ve snaze o obranu před těmito vlivy musí určitým způsobem adaptovat. Díky tomu dochází ke zvýšené produkci určitých metabolitů, které mohou sloužit jako obrana před nepříznivými podmínkami. Stresové faktory mohou být fyzikálních původů, jako například zdroj a intenzita světla nebo teplota prostředí, nebo chemického, což může být vliv nedostatku či nadbytku zdroje živin či přítomnost jistých chemických látek [22] [23] [24].

2.2.1 Oxidativní stres

Jedním z příkladů je oxidační stres. Ten u řas zapříčiní produkci látek určených k jeho zvládnutí. Tento stres může být způsobený měnícími se podmínkami prostředí, jako například vnějším vlivem pro řasy toxických látek, či samotnými metabolickými procesy. Zdroji tohoto typu stresu mohou být určité chemikálie nebo kovy. Mezi látky se zvýšenou produkcí ze těchto podmínek se řadí například astaxanthin, který ve zvýšené míře produkuje řasa *Haematococcus*. Dalším z obraných mechanismů je produkce polynenasycených mastných kyselin. Řasy, které jsou schopné se s oxidačním stresem vyrovnat tímto způsobem jsou pak vhodnými kandidáty pro produkci biopaliv [23] [25].

2.2.2 Kokultivace

Dosavadní kultivace mikrořas se zakládaly na jedné kultuře. Častým problémem však je náročnost tohoto procesu. Jedním z hlavních problémů je kontaminace nežádoucími mikroorganismy, což zapříčiní snížení kvality a kvantity vyprodukované biomasy. Nedávno však vešla do popředí myšlenka kultivace dvou různých druhů mikrořas. Tento způsob kultivace by měl mít několik výhod. Ať už se jedná o zvýšenou produkci biomasy či metabolitů nebo jako ochranu před kontaminací. Řasy se často využívají pro výrobu biopaliv, jelikož jsou schopny produkovat potřebné lipidické látky. Problém nastává ve dvou případech. V prvním je řasa schopná produkovat velké množství těchto metabolitů, její rychlost růstu je však značně nízká. Naopak může řasa růst velmi rychle, ale neprodukuje vysoké množství lipidů. Určité druhy mikrořas při kokultivaci produkují více lipidických metabolitů. Tuto zvýšenou produkci si lze vysvětlit kombinací kokultivace a také nedostatečného zdroje živin. Kokultivace dvou sladkovodních mikrořas dokázala zvýšenou produkci biomasy v porovnání s kultivací každé mikrořasy zvlášť. Ačkoliv byla zaznamenána zvýšená produkce pouze jedné z řas, vznik synergického účinku je patrný. Při analýze konkrétních metabolitů byl jejich profil srovnatelný u obou typů kultivace [26] [27] [28].

2.3 Odpadní látky

V současnosti čelí svět mnoha různým problémům, mezi které náleží i produkce odpadních látek v různých průmyslech. S větší poptávkou po produktech potravinářského průmyslu je úzce spjata také zvýšená produkce odpadního materiálu. Takto produkováný odpad však stále obsahuje velkou škálu živin a anorganických látek. Nyní se používá například jako krmivo pro zvířata [29] [30].

Pro potencionální kultivaci mikrořas na odpadních substrátech jsou ideální odpadní produkty potravinářského průmyslu. Velkoobjemové produkce řasové biomasy jsou značně finančně nákladné, jelikož je potřeba pokrýt spotřebu energie, ale i velkou spotřebu vody a živin. Jedním ze slibných způsobů snížení nákladů na kultivaci řas je využití odpadních produktů. Nejen, že dojde ke snížení nákladů na produkci řasové biomasy, ale také tím využijeme jinak nevyužitelné odpadní produkty.

2.3.1 Fritovací olej

V oblasti přípravy jídla je olej velmi oblíbenou položkou, díky níž získává jídlo bohatší chuť, zlepšuj také vzhled a texturu celého pokrmu. S rostoucí poptávkou po takto připravovaných potravinách také roste spotřeba fritovacího oleje, a tedy i produkce odpadního produktu. Během smažení je olej danou potravinou absorbován, a naopak se do něj dostávají další látky jako například různé uhlovodíky, fosfáty či stopové kovy. Díky celému procesu je olej také vystaven několika reakcím, které mění jeho složení a chování. Mezi základní reakce, kterým olej podléhá je hydrolýza a polymerace a oxidace.

Díky obsahu vody ve smažené potravíně je olej podroben procesu hydrolýzy, během kterého dochází k rozkladu triacylglycerolů (TAG) na di- a mono-acylglyceroly, glycerol a volné mastné kyseliny (FFA). Rychlost hydrolýzy je závislá na obsahu vody v potravíně, přičemž vyšší obsah vody zvyšuje rychlost reakce. Také složení oleje ovlivňuje průběh reakce. Oleje obsahující větší množství krátkých mastných kyselin budou hydrolýze podléhat snadněji, jelikož kratší mastné kyseliny jsou lépe rozpustné ve vodě. Při opakovaném smažení stoupá počet FFA a jejich produkce lze zpomalit pravidelným doplňováním čerstvého fritovacího oleje. Glycerol, vzniklý při hydrolýze TAG, se při teplotě nad 150 °C vypaří.

Olej je během smažení vystaven vzduchu, a tedy k reakcím, ke kterým dochází, patří oxidace. Kyslík reaguje s olejem za vzniku hydroperoxidů, hydroxidů, ketonových látek atd. Takto produkované látky jsou buď těkavé nebo netěkavé, přičemž těkavé sloučeniny se vypaří spolu s vodou. Netěkavé látky dále zůstávají v oleji. Rychlost oxidace je závislá na několika faktorech jako je například teplota smažení nebo velikost povrchu, se kterým může kyslík reagovat.

Při vysoké míře oxidace dále dochází k další reakci, a to polymerizaci. Během této reakce mohou tuky tvořit nové C-C vazby. Tato reakce může probíhat na jedné mastné kyselině, čímž vzniká cyklická MK, dále se mohou vázat dvě MK v rámci jedné nebo dvou TAG. Proces polymerizace je také jedním z důvodů tvorby pěny [31] [32] [33].

2.3.2 Kávový olej

Káva patří mezi jedny z nejvýznamnějších surovin na celém světě. Tento nápoj je velice oblíbený a rozšířený po celém světě. S rostoucí poptávkou po kávě, či výrobcích jí obsahující, dochází také k velkému nárůstu produkce odpadu. Kávová sedlina vzniká jak při vaření kávy, tak při výrobě její instantní verze. Takto vyprodukovaný odpad však stále obsahuje velké množství látek, mezi které patří polysacharidy, proteiny, lipidy a mnohé další složky. Mnohé z těchto látek jsou však nevhodné pro zvířata, rostliny nebo mikroorganismy nacházející se v půdě, proto se primárně nepoužívají jako krmivo či hnojivo. Díky velkému obsahu sacharidů je možnost využít tyto látky jako zdroj uhlíku pro kultivaci mikroorganismů. Mimo to však kávová sedlina obsahuje až 15% olejové složky. Z kávové sedliny se olej extrahuje nejčastěji pomocí hexanu. Kávový olej má antioxidační a další vlastnosti vhodné pro jeho využití v kosmetickém průmyslu, dále však také při výrobě biopaliv [34] [35] [36] [37].

2.4 Metabolity

2.4.1 Lipidy

Lipidy, společně se sacharidy, bílkovinami a nukleovými kyselinami, jsou důležitým stavebním prvkem buněk. Jsou tvořeny velkou skupinou látek s rozlišnými strukturami a funkcemi. Společným znakem těchto látek je jejich hydrofobní charakter. Rozpustné jsou v organických rozpouštědlech jako je chloroform či hexan, což umožňuje jejich jednoduchou separaci od zbylého buněčného materiálu. Mezi jejich hlavní a zřejmou funkci řadíme tvorbu lipidových dvojvrstev, které tvoří hlavní strukturu buněčných membrán. Dlouhé řetězce některých lipidů slouží jako zásobárna pro energii, a v neposlední řadě se lipidy podílejí na signalizačních procesech jak uvnitř, tak mimo buněk. Lipidy však mají i více různých funkcí, například slouží jako rozpouštědlo pro určité vitamíny (A, D, E, K), nebo mají ochrannou a izolační funkci. Mezi lipidické látky řadíme tuky, oleje nebo některé vitamíny a hormony [38] [39] [40].

2.4.1.1 Mastné kyseliny, Triacylglyceroly

Mezi mastné kyseliny patří monokarboxylové kyseliny obsahující dlouhý uhlovodíkový řetězec. Ačkoliv se délka tohoto řetězce může lišit mezi hlavní patří ty, které mají C_{16} a C_{18} , mezi které se řadí kyselina palmitová, olejová nebo stearová. Menší, či větší počet uhlíků je pak o něco méně častý. Také mastné kyseliny obsahující lichý počet uhlíků se vyskytují zřídka, jelikož biosyntéza mastných kyselin je založena na spájení dvouuhlíkatých jednotek. Podle výskytu, či absence dvojných vazeb v uhlíkatém řetězci mastné kyseliny dále rozdělujeme na nenasycené (obsahují pouze jednoduché vazby) a mono či polynenasycené (obsahují jednu, či více dvojných vazeb). Dvojná vazba se vyskytuje především mezi 9 a 10 uhlíkem ve směru od uhlíku karboxylové skupiny a další mají tendenci se nacházet vždy na každém třetím atomu uhlíku. Podle polohy poslední dvojně vazby od poslední methylové skupiny je pak můžeme klasifikovat i jako ω -3 a ω -6 mastné kyseliny. Některé mastné kyseliny je nutné přijímat v potravě, jelikož si je naše tělo nedokáže vytvořit. Jedná se převážně o již zmíněné ω -3 a ω -6 z toho důvodu, že naše tělo není schopné v těchto místech syntetizovat dvojnou vazbu. V olejích a tucích pocházejících z rostlinných či živočišných zdrojů však nenalezneme volné mastné kyseliny ale převážně triacylglyceroly. Tyto látky jsou tvořeny glycerolem, na který jsou esterově navázány tři stejné či různé mastné kyseliny. Podle profilu těchto mastných kyselin a jejich vlastností pak také TAG mají rozdílné vlastnosti, například jejich skupenství za pokojové teploty. Rostlinné oleje, které jsou při pokojové teplotě tekuté, obsahují větší množství nasyčených mastných kyselin oproti živočišným tukům, které jsou pevné. TAG tvoří jednu z největších skupin lipidických látek a slouží jako zásobárna energie, které naše tělo ukládá v podobě podkožního a viscerálního tuku. Toto umístění zabraňuje velké ztrátě tepla, a tedy fungují i jako tepelná izolace. Jejich energetická hutnost je dána tím, že jsou méně oxidované než ostatní makronutrienty, a tak při degradaci poskytují mnohem více energie. Tyto zásoby nám umožňují získávat energii z tukových zásob v případě hladovění téměř tři měsíce. V porovnání s tím zásoby glykogenu v našem těle jsou schopné nás energií zásobovat pouze několik hodin [38] [41].

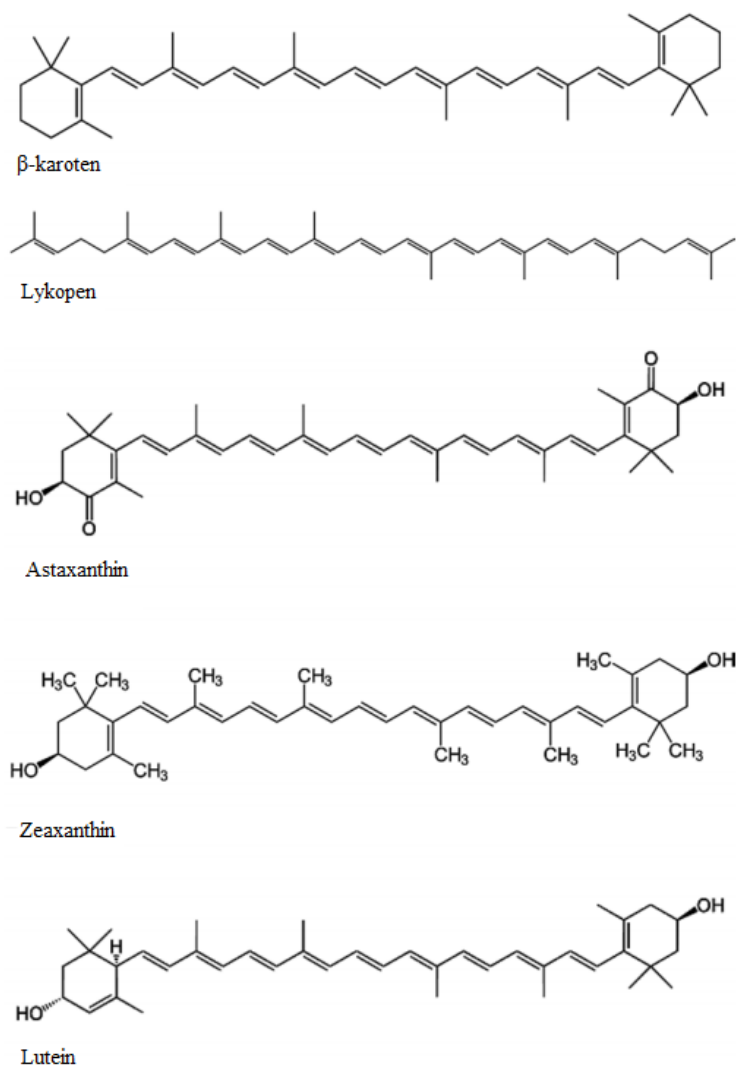
2.4.1.2 *Metabolismus mastných kyselin*

Ve své podstatě je biosyntéza mastných kyselin proces, při kterém dochází ke kondenzaci dvouuhlíkatých jednotek. Ačkoliv by se na první pohled mohlo zdát, že syntéza mastných kyselin je pouze obrácený proces β -oxidace, není tomu tak, a tyto dva metabolismy se od sebe liší. Na rozdíl od β -oxidace neprobíhá biosyntéza v mitochondriích ale v cytosolu buněk. Jelikož se jedná o anabolický děj, dochází při něm ke spotřebě ATP, a to hned v prvním kroku. Výchozím bodem syntézy mastných kyselin je přeměna acetyl-CoA pomocí enzymu acetyl-CoA karboxylázy na tříuhlíkatou sloučeninu malonyl-CoA. K tomu, aby mohlo dojít k syntéze mastné kyseliny je však třeba malonyl-CoA upevnit na acyl-carrier protein (ACP). Pro tuhle reakci nám slouží enzym malonyl-CoA transacyláza, který katalyzuje přeměnu malonyl-CoA na malonyl-ACP. Podobně je další molekula acetyl-CoA přeměněna na acetyl-ACP. Spojení těchto sloučenin tvorbou C-C vazby za současného odštěpení karboxylové skupiny dává za vznik čtyřuhlíkaté sloučenině β -oxoacyl-ACP. Za katalýzy β -oxoacyl reductázy dojde k redukci oxo skupiny a za současné oxidace kofaktoru NADPH získáváme 3-hydroxyacyl-ACP. V dalším kroku proběhne dehydratace za pomoci β -hydroxyacyl dehydrogenázy, čímž vzniká enoyl-ACP. Následuje další redukce na acyl-ACP (o dva uhlíky delší než původní) katalyzovaná enoyl-reduktázou. Tento postup se následně šestkrát opakuje, čímž vzniká šestnáctiuhlíkatý plamitoyl-ACP. Posledním krokem této syntézy je hydrolytické odštěpení ACP a vzniká konečný produkt, kyselina palmitová. Pro tvorbu dalších mastných kyselin jsou třeba následné enzymově katalyzované úpravy [38] [42] [43].

2.4.2 **Karotenoidy**

Karotenoidy jsou velká skupina látek, které lze nalézt u ptáků, rostlin, hmyzu či v řasách. Díky jejich charakteristickým barvám pohybujících se od žluté po červenou je řadíme do skupiny pigmentů. Nejtypičtějším příkladem je β -karoten, který dává typickou oranžovou barvu například mrkvi. Jejich výskyt je častý právě v ovoci a zelenině a jejich konzumaci pozitivně ovlivňujeme naše fyzické zdraví. Mají totiž značné antioxidační účinky, jsou tedy schopny negovat nežádoucí účinky volných radikálů. Mají také protizánětlivé účinky a pomáhají při prevenci před určitými chorobami čímž přispívají k udržování zdraví. Určité karotenoidy jsou také nezbytné jako prekurzory například pro syntézu vitamínu A. Karotenoidy jsou skupina látek jejichž prekurzor tvoří uhlíkatá kostra, skládající se z 8 izoprenoidních jednotek (každá jednotka obsahuje 5 uhlíků), tedy celkem je tvořena 40 uhlíky. Obsahuje systém konjugovaných dvojných vazeb, které jsou schopné absorbovat viditelné světlo v rozmezí 400-500 nm. Některé karotenoidy vyskytující se v tylakoidních membránách tak hrají důležitou roli při fotosyntéze. Příkladem může být lutein, který slouží jako doplňkový pigment. Zachycuje světelnou energii, kterou je schopen předat molekulám chlorofylu a rozšiřuje tak i spektrum absorpce světla. Podle struktury rozdělujeme karotenoidy na dvě hlavní skupiny: karoteny a xanthofyly. Karoteny jsou tvořeny pouze uhlovodíkovými strukturami. Mezi jejich nejznámější zástupce patří β -karoten nebo lykopen. Naproti tomu xanthofyly jsou kyslíkaté deriváty karotenů. Mohou obsahovat funkční skupiny jako je epoxy (mezi tyto xanthofyly patří violaxanthin či neoxanthin), dále také

hydroxy skupinu (zde můžeme zařadit lutein), či keto nebo methoxy skupinu. Tyto funkční skupiny také ovlivňují některé vlastnosti, mimo jiné způsobují to, že jsou xanthofyly více polární než karoteny. Karotenoidy dále můžeme na základě jejich struktury rozdělit na necyklické (jejich struktura je tvořena lineárním řetězcem), monocyklické (na jednom či druhém konci tvoří cyklus) či bicyklické (oba konce řetězce jsou zakončeny cyklem [44] [45] [46] [47]).



Obrázek 6: Chemická struktura vybraných karotenoidů (upraveno) [45]

2.4.2.1 Biosyntéza

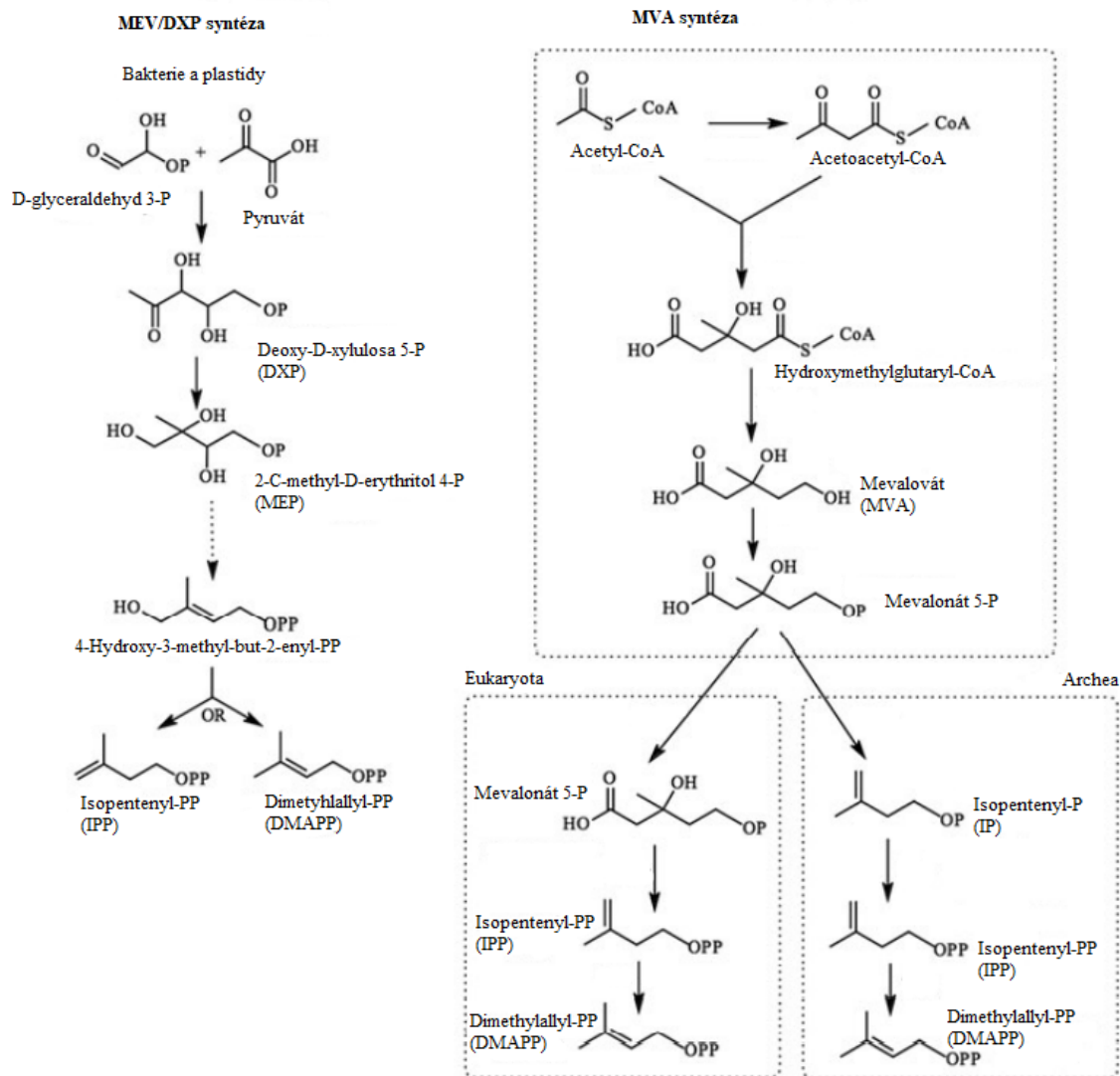
Prvním krokem tohoto procesu je syntéza prekurzorů karotenoidů, což jsou isopentenyl pyrofosfát (IPP) a dimethylallyl pyrofosfát (DMAPP). Obě sloučeniny lze syntetizovat pomocí dvou cest: mevalonátová (MVA). Touto cestou syntetizují organicky jako jsou eukaryota a archea, ale také rostliny, zatímco 2-C-methyl-D-erythritol-fosfátová (MEP) cesta je využívána většinou bakterií a sinic. IPP jednoty slouží jako stavební bloky, které podléhají sérii kondenzačních reakcí, díky nimž vzniká základní struktura karotenoidů [44] [48] [49].

2.4.2.2 Mevalonátová syntéza/cesta

Výchozí sloučeninou pro tuto metabolickou dráhu je acetyl-CoA, jehož kondenzací získáváme potřebné IPP a DMAPP. Kondenzací dvou molekul acetyl-CoA pomocí thiolázy získáváme acetoacetyl-CoA. Dále následuje kondenzace s další molekulou acetyl-CoA a působením enzymu HMG-CoA syntázy vznik sloučeniny 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Pomocí HMG reduktázy, což je klíčový enzym regulující tuto metabolickou dráhu, tuto sloučeninu redukujeme na mevalonát. Následující reakce se odlišují v závislosti na organismu, dochází však k fosforylačním a dekarboxylačním reakcím vedoucím ke vzniku isopentenyl pyrofosfátu (IPP). Ten lze v případě potřeby pomocí izomerázy přeměnit na DMAPP [44] [48] [49].

2.4.2.3 Deoxy-D-xylulóza 5-fosfátová cesta/ syntéza

Začátek této dráhy tvoří kondenzace D-glyceraldehyd 3-fosfátu a pyruvátu pomocí DXP syntázy. Během tohoto procesu dochází k uvolnění CO₂ a vzniku 1-deoxy-D-xyluloza 5-fosfátu (DXP). Pomocí DXP isomero-reduktázy je DXP redukováno a následně v několika enzymaticky katalyzovaných krocích konvertováno na IPP [44] [50] [51].

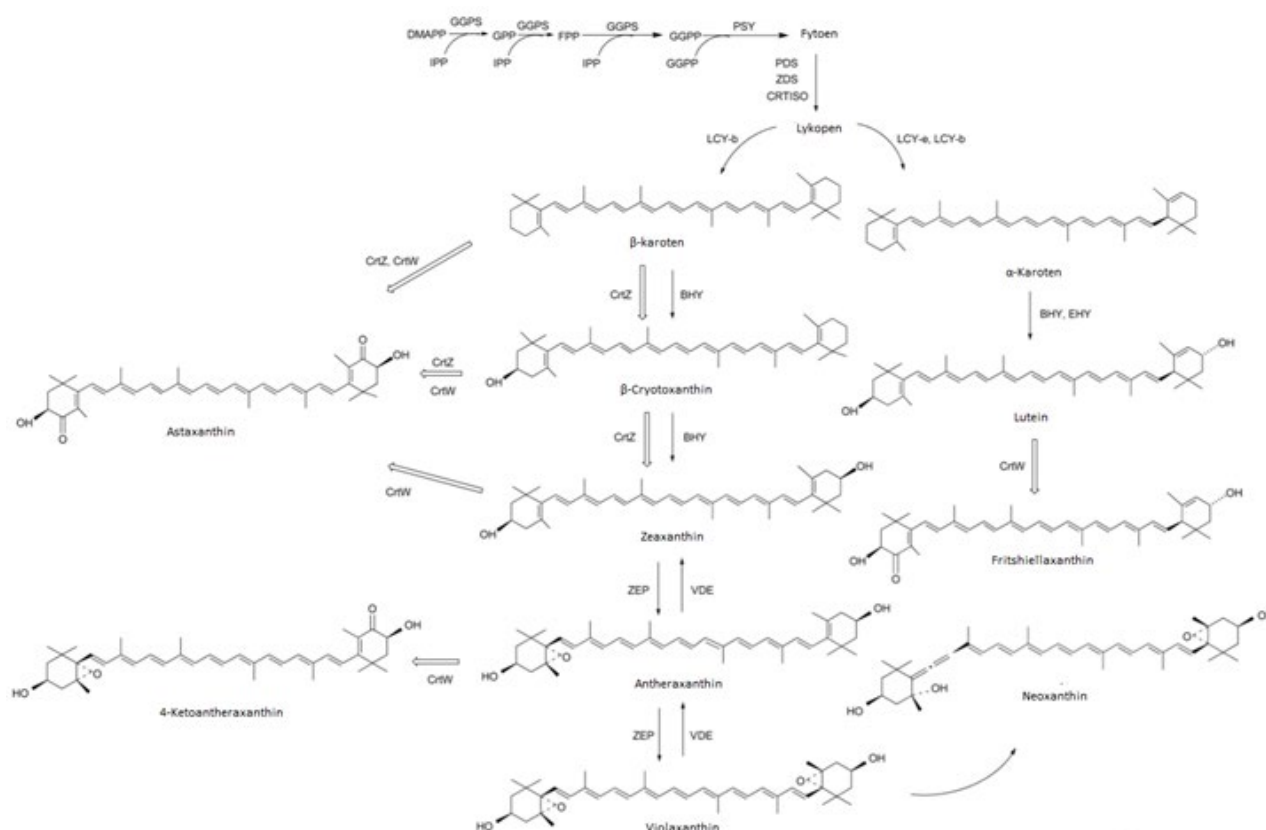


Obrázek 7: MEV a MVA syntéza (upraveno) [44]

2.4.2.4 Syntéza GGPP a karotenoidů

Biosyntéza isoprenoidů spočívá v kondenzaci pětiuhlíkatých isoprenových jednotek. Prvním krokem je kondenzace aktivních forem DMAPP a IPP ve stylu hlava-pata za vzniku geranyl pyrofosfátu (GPP; C10). Následují další dvě kondenzace IPP jednotek, dávající za vznik farnesyl pyrofosfátu (FPP; C15) a konečně geranylgeranyl pyrofosfátu (GGPP; C20). Další část syntézy karotenoidů začíná kondenzací dvou molekul GGPP ve stylu hlava-hlava pomocí enzymu fytoen syntázy, čímž vzniká první karotenoid fytoen (C40). Typické pro fytoen jsou 4 po sobě následující desaturační reakce, kterými vzniká lykopen.

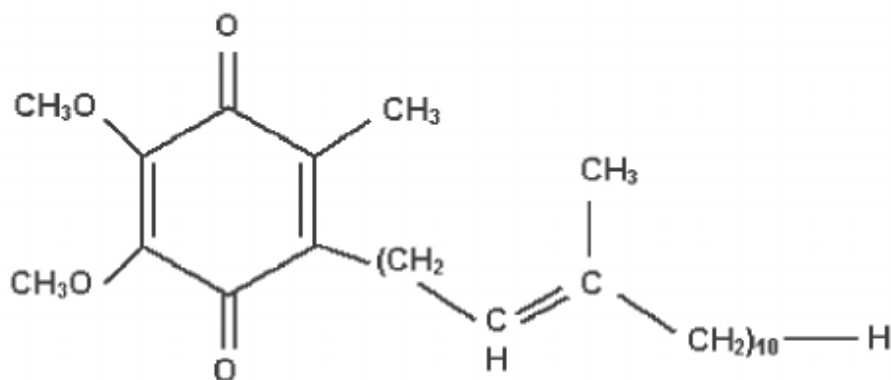
Ten podléhá dalším reakcím jako je cyklizace, jimiž vznikají například α -karoten, ze kterého pomocí hydroxylázy vzniká lutein, nebo γ -karoten. Ten může projít další cyklizací, díky níž získáváme β -karoten a z něj dále xanthofyly jako jsou astaxanthin nebo violaxanthin. Pokud nenásledují cyklizační, ale desaturační reakce získáváme sloučeninu jako je torulen, který se dalšími reakcemi přemění na torularhodin [44] [52].



Obrázek 8: Biosyntéza karotenoidů (upraveno) [44]

2.4.3 Koenzym Q10

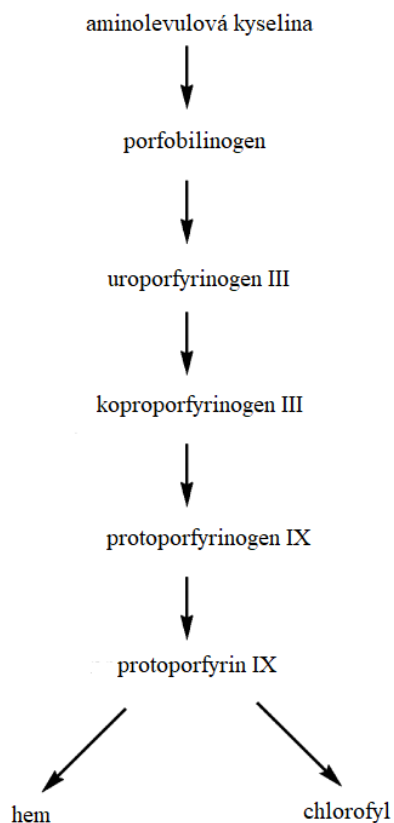
Koenzym Q je v tučích rozpustná sloučenina podobná vitamínům řadící se mezi chinony, známý také pod názvem ubichinon. Koenzym Q10 je pro svou funkci jedna z nejdůležitějších součástí elektronového transportního řetězce v mitochondriích v procesu známém jako oxidativní fosforylace. Během tohoto procesu dochází k oxidaci redukováných kofaktorů FADH_2 a NADH , která vede k syntéze ATP. Kromě toho má však koenzym Q10 další biologické funkce. Slouží jako oxidans při vzniku signálů a kontrole buněčného redoxního stavu [53] [54] [55].



Obrázek 9: Chemická struktura ubichinonu [56]

2.4.5.1 Biosyntéza chlorofylu

Biosyntéza chlorofylu je náročný proces vyžadující značné množství enzymů. Výchozím produktem vedoucím ke vzniku tetrapyrolu je kyselina 5-aminolevulová (ALA). Syntéza začíná konverzí glutamátu na ALA, kdy je zapotřebí připojení tRNA na α -karboxyl pomocí tRNA-glutamyl syntázy. Takto aktivovaný glutamyl následně podléhá redukci katalyzovanou enzymem Glu-tRNA reduktáza, čímž vzniká glutamát-1-semialdehyd. V dalším kroku enzym glutamát-semialdehyd aminotransferáza zajistí přeměnu na kyselinu 5-aminolevulovou. Následuje kondenzace dvou molekul ALA za vzniku porfobilinogenu za účasti enzymu porfyrin syntáza obsahující pyrolové jádro. Spojením čtyř molekul porfobilinogenu za katalýzy enzymem porfobilinogen deaminázy vzniká hydroxymethylbilan, kterému se také říká pseudoporfyrinogen. V dalším kroku enzym uroporfyrinogen syntáza uskuteční uzavření kruhu a dojde k přetočení jednoho z pyrolových jader, čímž vzniká struktura uroporfyrinogenu III. Ten je následně dekarboxylován za vzniku sloučeniny koproporfyrinogen III a následnými oxidačními reakcemi získáváme protoporfyrin IX. Pro vznik chlorofylu je zapotřebí, aby byl do porfyrinového jádra zabudován Mg^{2+} iont. Tento krok je katalyzován enzymem Mg-chelatázou a vzniká Mg-protoporfyrin IX. Další kroky jsou methyltransferace a cyklizace, z nichž vzniká divinyl protochlorofylid. Ten je následnými redukčními reakcemi přeměněn na chlorofylid. Poslední krok syntézy chlorofylu je katalyzován chlorofyl syntázou. Tento enzym esterifikuje postranní řetězec čtvrtého pyrolového jádra [3] [60] [63] [61] [62].



Obrázek 11: Schéma syntézy protoporfyrinu IX z ALA (upraveno) [63]

2.4.5.2 Fotosyntéza

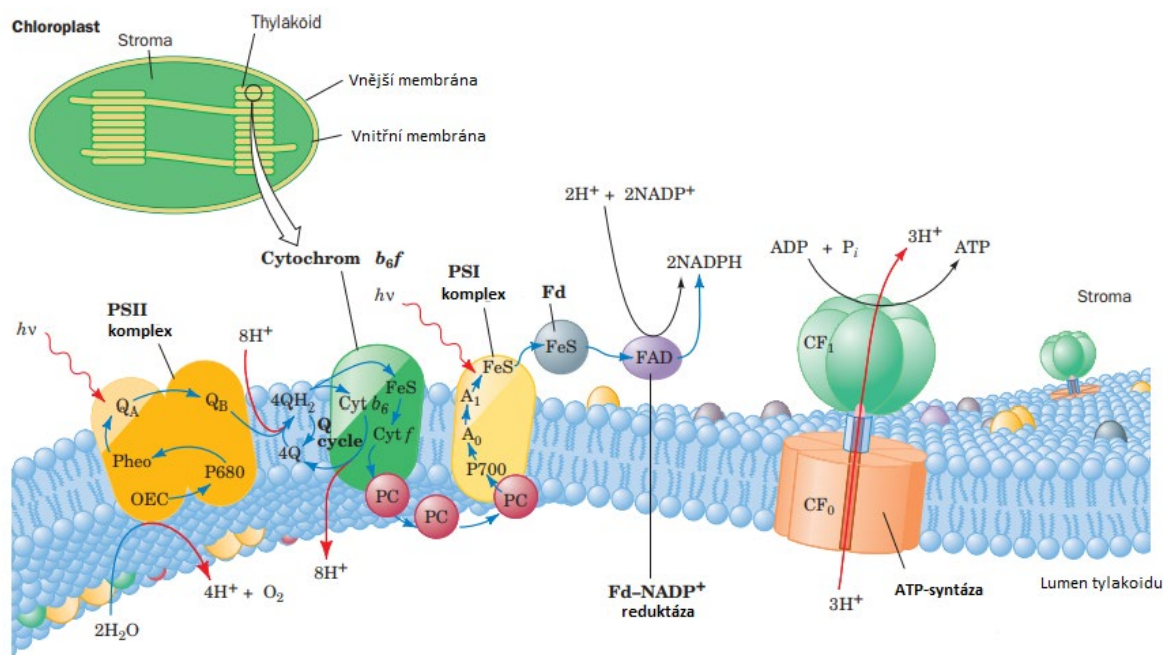
Fotosyntéza je proces, při kterém jsou určité organismy schopny přijímat energii ze světla, přetvořit ji a uložit ji do vazeb uhlovodíkových sloučenin tvořených fixací oxidu uhličitého ze vzduchu. Tyto uhlovodíky pak dále slouží jako zdroj energie pro nefotosyntetické organismy. Fotosyntéza probíhala v mikroorganismech od samého počátku vzniku života na Zemi. V průběhu evoluce však prošla velkými změnami.

Průběh fotosyntézy je rozdělen na dvě části, a to na světelnou (na světle závislou) fázi, kde dochází k příjmu energie ze světla pomocí speciálních pigmentů a následný řetězec transportu elektronů, během něhož dochází k produkci NADPH a ATP. Druhá fáze se nazývá temnostní (na světle nezávislá), kdy jsou vyprodukované NADPH a ATP využity k fixaci oxidu uhličitého pro tvorbu cukerných prekurzorů [3] [38] [64].

2.4.5.3 Světelná fáze

Během první fáze dochází k absorpci světla pomocí pigmentů, které se v eukaryotických buňkách nachází v chloroplastech. Předpokládá se, že se tyto organely vyvinuly z fotosyntetických bakterií (sinic). V chloroplastech najdeme tylakoidy v jejichž membránách se nachází proteinové komplexy zajišťující celý proces. Mezi tyto komplexy patří fotosystémy I a II, které obsahují reakční centra tvořená chlorofylem a dalšími molekulami.

Při dopadu světla na fotosystém II dochází k excitaci molekul uvnitř komplexu, dochází k přenosu získané energie na chlorofyl a následuje uvolnění elektronu o vysoké energii. Vzniká však vakance, kterou je nutné zaplnit. Ve fotosystému II se nachází oxidační místo, ve kterém dochází k oxidaci vody. Takto získané elektrony zaplní prázdná místa v molekulách chlorofylu a dále dostáváme protony a kyslík. Elektron, původně obsažený v chlorofylu následně přechází z komplexu na komplex, přičemž dochází k poklesu jeho energie. Tato energie je využita na transport protonů na opačnou stranu membrány. Ve fotosystému I světlo opět excituje elektrony na vyšší energetickou hladinu, a ty opět přecházejí na další komplexy kde je jako poslední přijímá NADP⁺ a dochází k jeho redukci na NADPH. Během celého procesu postupně vzniká gradient protonů, který při přechodu zpět pohání ATP-syntázu a dojde k produkci ATP. Oba produkty světelné fáze fotosyntézy jsou následně využity v Calvinově cyklu [3] [38].



Obrázek 12: Schéma světelné fáze fotosyntézy (upraveno) [38]

2.4.5.4 Calvinův cyklus

Po proběhlé světelné fázi dochází k využití vzniklého NADPH a ATP k fixaci vzdušného oxidu uhličitého do uhlovodíkové struktury pomocí enzymu ribuloosa-1,5-bisfosfát karboxylázy/oxygenázy (Rubisco). Prvním krokem v této reakci je fosforylace ribulose-5-fosfát za spotřeby ATP pomocí fosforibulokinázy za vzniku ribulose-1,5-bisfosfátu (RuBP). Následuje karboxylace, po níž nám vzniká 3-fosfoglycerát. V následující krok opět vyžaduje spotřebu ATP a vzniká sloučenina 1,3-bisfosfoglycerát. V dalším kroku pomocí dehydrogenázy za současné oxidace NADPH získáváme glyceraldehyd-3-fosfát. Následuje regenerační fáze, ve které dochází k přeměně na ribulose-5-fosfát, který následně vstupuje do dalšího cyklu. Glyceraldehyd-3-fosfát, který regeneraci nepodstoupí, slouží jako prekurzor pro tvorbu cukrů (glukosy) [3] [38].

2.5 Analytické techniky pro stanovení mikrobiální biomasy

Pro analýzu řasové biomasy lze využít řady analytických metod. Jelikož se jedná o analýzu mikroorganismů, jedna z prvních metod analýzy může být optická mikroskopie, díky které můžeme určit konkrétní studovaný mikroorganismus podle jeho morfologických znaků. Dále lze využít spektrofotometrických metod pro analýzu nárustu biomasy. Před samotnou analýzou konkrétních vyprodukovaných metabolitů je důležité zjistit také hmotnost vyprodukované biomasy, k čemuž lze využít gravimetrii. Pro stanovení kvality a kvantity produkovaných metabolitů lze využít chromatografických metod.

2.5.1 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je technika, při které analyzujeme míru pohlcení elektromagnetického záření v ultrafialové či viditelné oblasti vzorkem. Princip spočívá v tom, že analyzovaný vzorek je schopen záření absorbovat. Důsledkem toho je pohlcení energie a excitace elektronů v molekulových orbitalech do vyšší energetické vrstvy. Elektron se však následně navrácí na svou základní energetickou hladinu, přičemž dojde k vyzařování energie ve formě tepla či sekundárního záření. Ve spektrofotometrii využíváme jako měrnou veličinu Absorbanci. Tato hodnota nám udává, kolik záření měřený vzorek absorboval. Výpočet absorbance vychází z Lambert-Beerova zákona

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (1)$$

Absorbance se vypočítá z molárního absorpčního koeficientu (ε), délky optické dráhy (l) a koncentrace vzorku (c) [65] [66] [67].

2.5.2 HPLC

Chromatografické metody slouží k separaci látek mezi dvěma fázemi. Tyto fáze se dělí na stacionární – nehybnou, a mobilní, která jí prostupuje a unáší analyt. Během průchodu analytu tímto systémem dochází, na základě jeho afinity buď ke stacionární nebo mobilní fázi, k separaci jednotlivých látek, které obsahuje. Pokud využíváme kapalnou mobilní fázi, mluvíme pak o kapalinové chromatografii. Jednou z těchto metod je pak vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Mezi hlavní části instrumentace patří: zásobník mobilní fáze, čerpadlo, dávkovač, kolona uložená v termostatu, detektory a vyhodnocovací systém. Zásobní lahve obsahují složky mobilní fáze pro izokratickou (neměnnou) a gradientovou (změna složení) eluci mobilní fáze. Pro vložení vzorku do mobilní fáze nám slouží dávkovací smyčka, kde manuálně nastříkneme vzorek, který je následně uveden do mobilní fáze, nebo automatické dávkovače. Vzorek v mobilní fázi pak putuje do předkolony, která slouží k ochraně samotné kolony před případným znečištěním a zničením. Hlavní kolona je tvořena nerezovou trubicí, která je naplněna stacionární fází. Tou může být například čistý či modifikovaný silikagel. Následuje separace analytu v koloně následovaná detekcí těchto složek. Volba detektoru závisí především na analyzovaném vzorku. Běžně se používají: UV-VIS detektor, PDA detektor, refraktometrický detektor, fluorescenční detektor, hmotnostní spektrometr a další. Následně jsou naměřená data převedena do vyhodnocovacího programu, kde s nimi dále pracujeme [68] [69] [70].

2.5.3 GC

Podobným způsobem můžeme také analyzovat vzorky pomocí další chromatografické metody a tou je plynová chromatografie. Z názvu již vyplývá, že mobilní fází zde bude plyn, a od toho se také odvíjí, jaké vzorky budeme moct analyzovat. Plynnou fází zde bývá inertní nosný plyn, který nebude interagovat ani se vzorkem ani stacionární fází. Kolony pro plynovou chromatografii se od kapalinové liší, Jsou několikanásobně delší a tenčí a jsou svinuty do spirály. Náplně stacionární fáze se pak zvolí dle studovaného analytu. U této metody je důležité regulovat průtok plynu, k čemuž slouží regulační ventily. K nanesení analytu na kolonu se využívají mikrodávkače. Nedílnou součástí instrumentace je termostat, jelikož analýza mlže probíhat ve velkém rozsahu teplot. Další součástí instrumentace jsou detektory, ty jsou však velmi odlišné od HPLC detektorů. Mezi tyto detektory patří: tepelně vodivostní detektor, termoionizační detektor, plamenově (foto)ionizační detektor nebo již zmíněný hmotnostní spektrometr. I u GC jsou data dále zpracovávána v požadovaných programech [70] [71].

3 CÍLE PRÁCE

Přehledná literární rešerše zaměřená na vliv fyzikálních chemických a biologických stresů na autotrofní mikroorganismy

- Screeningové kultivace vybraných kmenů autotrofních mikroorganismů v médiích se stresovými faktory
- Selektce nejvhodnějších stresových faktorů a optimalizace podmínek kultivace
- Charakterizace nakultivované biomasy
- Vyhodnocení výsledků

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie pro kultivaci řas a sinic

- Dusičnan sodný p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Sířičitan hořečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Hdyrogenfosforečnan draselný, Sigma-Aldrich (SRN)
- Dihydrogenfosforečnan draselný, Sigma-Aldrich (SRN)
- Chlorid sodný p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- EDTA, Sigma-Aldrich (SRN)
- Hydroxid draselný p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Sířičitan železnatý (heptahydrát) , Penta (ČR)
- Kyselina sírová 96% p.a., Penta (ČR)
- Chlorid manganatý tetrahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
- Oxid molybdenový, Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Sířičitan měďnatý (pentahydrát) , Penta (ČR)
- Dusičnan kobaltnatý hexahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
- Hydrogenuhličitan sodný, Sigma-Aldrich (SRN)
- Uhličitan sodný, Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Sířičitan draselný, Penta (ČR)
- Sířičitan zinečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Kyselina boritá p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
- Molybdenan sodný, Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Sířičitan kobaltnatý (heptahydrát) , Lach-Ner, s.r.o. (ČR)

4.1.2 Chemikálie pro extrakce

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

4.1.3 Chemikálie pro měření lipázové aktivity

- p-nitrofenol, Sigma-Aldrich (SRN)
- p-nitrofenylpalmitát, Sigma-Aldrich (SRN)
- Dodecylsírán sodný (SDS), Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Triton-X-100, Lach-Ner, s.r.o. (ČR)

4.2 Použité přístroje a pomůcky

- Box Aura ini iBopTech, (ČR)
- Třepačka Yellow line, (SRN)
- Třepaný inkubátor, ZWYR-D2401 – Labwit, BioTech, (ČR)
- Kultivátor Multi-Cultivator MC 1000-OD PSI Drásov, (ČR)
- Stojan pro 8 zkumavek o objemu 80 ml
- Termostat s vodní lázní
- Vzduchová pumpa
- Zásobník s destilovanou vodou
- LED diodový zdroj pro každou zkumavku
- Detektor optické hustoty – detekce při 680 a 720 nm
- Spektrofotometr VIS, Helios δ , Unicam (GB)
- Centrifuga BioTech, (ČR)
- Lyofilizátor Labconco FreeZone 4.5 Freeze Dryer, (USA)
- Analytické váhy Boeco, (CRN)
- Termoblok VWR, (ČR)
- Vortex/homogenizátor disruptor Genie, Scientific Industries, Inc. (USA)
- HPLC/MS sestava: Sestava HPLC/MS 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-EVO, 150 nm délka, 5,0 μm částice, Phenomenex
 - Držák předkolony – KJ0 - 4282, ECOM (ČR)
 - Předkolony – C18-EVO, AJ0 – 8368, Phenomenex
 - Filtry pro HPLC, PRE-CUT, Alltech (GB)
- Systém MicroTime 200, Picoquant GmbH, objektiv s vodní imerzí Olympus UPLSAPO 60XW
- ELISA Reader BioTek ELx808
- 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 x 0,25 mm x 0,20 μm , Phenomenex

4.3 Použité kmeny řas a sinic

- *Anabaena torulosa* CCALA 3
- *Spirulina* CCALA 28
- *Desmodesmus armatus* CCALA 439
- *Desmodesmus communis* CCALA 464
- *Desmodesmus velitaris* CCALA 468
- *Chlamydomonas reinhardtii* CCALA 973
- *Chlorella cf. minutissima* CCALA 916
- *Coccomyxa sp.* CCALA 912
- *Scenedesmus acutus* CCALA 904
- *Scenedesmus cf. obliquus* CCALA 455

4.4 Kultivace mikroorganismů

Pro kultivaci mikrořas a sinic byly použity dva hlavní typy médií, a to BBM médium (viz. Tabulka 1) a Spirulina médium (viz. Tabulka 3). Mikrořasy a sinice byly do kultivačních médií zaočkovány při dostatečné absorbanci 0,150. Ta se následně měřila pomocí UV-VIS spektrofotometru při vlnové délce 680 nm ke stanovení růstové křivky, popřípadě byla absorbance měřena v rámci přístroje multikultivátoru. Kultivační podmínky zahrnovaly konstantní promíchávání kultury, a to buď pomocí třepacích zařízení, nebo provzdušňováním. Kultury byly také po celou dobu vystaveny osvětlení. Doba kultivace se pohybovala v rozmezí 7 až 35 dní podle požadavku na nárůst biomasy. Kultivace probíhala v uzavřených Erlenmayerových baňkách na třepacích zařízeních nebo v multikultivátoru. Tento přístroj se skládá z 8 od sebe oddělených komor do nichž jsou zasazeny zkumavky. Díky možnosti nastavit pro každý vzorek odděleně podmínky je tento přístroj vhodný pro paralelní kultivaci mikroorganismů za různých podmínek.

Tabulka 1: Složení BBM média

Látka	Zásobní roztok (g/l dH ₂ O)	Použité množství /l
NaNO ₃	25	10 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,5	10 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	47,5	10 ml
K ₂ HPO ₄	7,5	10 ml
KH ₂ PO ₄	17,5	10 ml
NaCl	2,5	10 ml
EDTA roztok	Tabulka 2	1 ml
Acidified iron	Tabulka 2	1 ml
H ₃ BO ₃	11,42	1 ml
Trace metals	Tabulka 2	1 ml

Tabulka 2: Složení roztoků BBM média

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

Tabulka 3: Složení Spirulina média

Látka	Zásobní roztok (g/l dH ₂ O)	Použité množství (/500ml)
Roztok I.		
NaHCO ₃	-	13,61 g
Na ₂ CO ₃	-	4,03 g
K ₂ HPO ₄	-	0,5 g
Roztok II.		
NaNO ₃	-	2,5 g
K ₂ SO ₄	-	1 g
NaCl	-	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	0,2 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	0,04 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	0,08 g
Trace metals		5 ml
Cyanocobalamin (B12)	5 mg/l	1 ml

Tabulka 4: Složení roztoků Spirulina média

Látka	Zásobní roztok (g/l dH ₂ O)	Použité množství /l
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	-	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	0,7 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1	1 ml
MnSO ₄ ·7H ₂ O	2	1 ml
H ₃ BO ₃	10	1 ml
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	1	1 ml
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1	1 ml
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005	1 ml

4.4.1 Aplikace stresů

V rámci této práce byly na mikrořasy aplikovány různé stresové faktory. V prvních experimentech byla na mikroorganismy aplikována přítomnost různých koncentrací kobaltu v médiu (viz. Tabulka 5). Dále byly řasy a sinice kultivovány na dvou hlavních typech kultivačních médií, a sice BBM médiu a Spirulina médiu. Na tento experiment dále navazovaly kokultivace řas se sinicemi. Pro tento experiment byl využit multikultivátor, který umožňoval paralelní pozorování kultivace různých poměrů řas a sinic (viz. Tabulka 6). Kultury byly zaočkovány v dostatečné absorbanci 0,150 - 0,2. Pro tyto experimenty byla zvolena sinice *Anabaena torulosa*, která se kultivuje na BBM médiu, a tím byl eliminován vliv média na úspěšnost kokultivace. Na základě screeningových kultivací pak byla vybrána řasa *Scenedesmus obliquus*, která velice dobře prosperovala na BBM i Spirulina médiu. V neposlední řadě byly vybrané řasy a sinice kultivovány na odpadních olejích. Vybrány byly fritovací a kávový olej v různých koncentracích (viz. Tabulka 7). Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda-li jsou řasy a sinice schopny v přítomnosti oleje přežívat. Pro eliminaci dalších negativních vlivů byly tyto kultivace prováděny v přítomnosti antibiotik a antitumorik. Tento experiment sloužil dále jako předstupeň pro navazující kultivační experimenty, které budou řešeny v následujících letech.

Tabulka 5: Koncentrace kobaltu v produkčních médiích

Zásobní roztok	Koncentrace [mmol/l]	Množství [μl]
CoSO ₄ ·7H ₂ O 0,183 mol/l Co ²⁺	0,1	54,5
	0,2	109,5
	0,3	164,5
	0,4	219,0
	0,5	274,0

Tabulka 6: Vybrané poměry kultur při kokultivace

Zkumavka	Řasový podíl	Sinicový podíl	Poměr
1	4	0	1:0
2	2	2	1:1
3	2	4	1:2
4	2	6	1:3
5	4	2	2:1
6	6	2	3:1
7	0	4	0:1
8	4	4	1:1

Tabulka 7: Množství oleje použitého v kultivačním médiu

Vzorek	Množství oleje g/50ml
Kontrola	0
50	0,585
75	0,878
100	0,170
125	0,146
150	0,176

Použití odpadního oleje vycházelo z experimentů provedených v předchozí práci, která se zabývala kokultivacemi sinic a mikrořas s kvasinkami. Množství uhlíku v médiu dané koncentraci oleje tak vycházelo z dosažených výsledků v kokultivačních experimentech. Údaje byly čerpány z disertační práce Ing. Martina Szotkowského, PhD. [72].

4.5 Analýza biomasy

4.5.1 Stanovení nakultivované biomasy

Po uběhnutí doby kultivace bylo potřebné narostlou biomasu oddělit a pročistit od kultivačního média. K tomu byla využita centrifuga, kdy se médium stáčelo po dobu 2-5 minut při 4000-8000 rpm. Vzorky obsahující olej byly pro jejich maximální odstranění promyty směsí hexan: destilovaná voda 2:8. Promývání bylo maximálně šetrné, aby nedocházelo k narušení struktury buněk vlivem hexanu. Po stočení byl odstraněn supernatant a biomasa byla převedena do příslušných zkumavek a následně zmrazena. Takto zpracovaná biomasa byla následně lyofilizovaná do kompletního vysušení. Pro gravimetrické stanovení suché biomasy byly použity analytické váhy.

4.5.2 Příprava vzorků pro HPLC analýzu

Ze získané vysušené biomasy byly připraveny vzorky pro HPLC analýzu barviv. Do Eppendorf zkumavek bylo pomocí analytických vah naváženo 10-20 mg biomasy, která byla následně rehydratována v 1 ml destilované vody po dobu 30 minut. Vzorek byl následně zcentrifugován a voda odstraněna. K rehydratované biomase se přidaly skleněné kuličky a 1 ml p.a. methanolu. Vzorky byly následně vloženy do dezintegrátoru, kde vlivem třepání a skleněných kuliček došlo k rozbití buněčné biomasy a rozpuštění barviv v methanolu. Vzorek byl následně kvantitativně převeden do 15 ml zkumavek společně se 2 ml p.a. chloroformu. Dále byly vzorky vloženy na vortex, kde se směs protřepávala po dobu 10 minut. Po uplynulé době byl k vzorkům přidán 1 ml destilované vody a vše bylo opět krátce protřepáno na vortexu, načež došlo k oddělení fází. Do skleněných zkumavek byla odebrána chloroformová fáze a vzorky byly vloženy do termobloku za současného provzdušňování dusíkem. K odpařeným vzorkům byl přidán 1 ml směci 2:1 acetornitril:ethylacetát a rozpuštěný extrakt byl přes filtr převeden do skleněné vialky. Takto připravené vzorky byly následně uloženy v mrazícím boxu a následně podrobeny HPLC analýze. Parametry měření jsou uvedeny viz. Tabulka 8.

Tabulka 8: Parametry měření pro analýzu pomocí HPLC

Kolona	Kinetex EvoC18 150 mm x 4,6 mm x 5 µm	
Detektor	DAD Vanquish series	
Složení mobilní fáze	MF A: ACN:TrisHCl:MeOH	MF B: MeOH:EtAc
	84:14:02	60:40:00
Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0	100	0
13	0	100
19	0	100
20	100	0
24	100	0

4.5.3 Příprava vzorků pro GC analýzu

Další vyhodnocení biomasy bylo provedeno pomocí GC analýzy. Do krymplovacích vialek bylo naváženo přibližně 10 mg biomasy, ke které bylo následně přidáno 1,8 ml transesterifikační směsi. Následně byly vzorky uzavřeny ve vialkách a vloženy do termobloku. Transesterifikační reakce probíhá při teplotě 85 °C po dobu 2 hodin. Po proběhnutí reakce byly vzorky převedeny do vialek o objemu 4 ml společně s 0,5 ml 0,5 mol/l NaOH a 1 ml hexanu HPLC kvality. Takto připravené vzorky byly vloženy do vortexu a třepány po dobu 5-10 minut. Po protřepání bylo z organické fáze odebráno 0,1 ml vzorku do skleněných vialek a pomocí hexanu byl objem doplněn na 1 ml. Hotové vzorky byly uloženy v mrazicím boxu a následně podrobeny HPLC analýze. Parametry měření jsou uvedeny viz. Tabulka 9.

Tabulka 9: Parametry měření pro analýzu pomocí GC

Kapilární kolona	LION LN-FAME 30 m x 0,32 mm x 0,20 µm
Dávkování	Autosampler Thermo Scientific AI 1310
Objem nástřiku vzorku	1 µl
Poměr nástřiku děliče toku	10
Konstantní průtok nosného plynu H ₂	1 ml/min
Detektor	FID
Teplota	250 °C
Průtok	Vzduch 350 ml/min, Make-up N ₂ 30 ml/min, H ₂ 35 ml/min

4.5.4 Stanovení lipázové aktivity

4.5.4.1 Sestrojení kalibrační křivky

K sestrojení kalibrační křivky byl použit roztok 0,5 mmol/l p-nitrofenolu. Z něj byla naředěna koncentrační řada od 0,005-0,05 mmol/l. Absorbance této řady byla změřena při 410 nm pomocí přístroje ELISA reader.

4.5.4.2 Příprava substrátu pro reakci

Jako substrát pro stanovení lipázové aktivity byl roztok připravený do 100 ml odměrné baňky z 0,0137 g p-nitrofenylpalmitátu, 0,017 g SDS a 1 g Triton-X-100. Roztok byl doplněn po rysku destilovanou vodou a následně uchován v lednici.

4.5.4.3 Měření a výpočet lipázové aktivity

Pro měření lipázové aktivity bylo do mikrotitrační destičky napipetováno 125 μ l 0,1M Tris-HCl pufru o pH=8,4, 125 μ l substrátu a 50 μ l vzorku (supernatant). Měření probíhalo v přístroji ELISA reader temperovaném na 30 °C při vlnové délce 410 nm v 5 minutových intervalech po dobu jedné hodiny. Lipázová aktivita byla následně vypočítána podle vzorce:

$$a = \frac{A_{410} + q}{k \cdot V \cdot t} \quad (2)$$

kde	a	lipázová aktivita vzorku [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} = \text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$]
	A_{410}	absorbance vzorku při vlnové délce 410 nm
	t	doba inkubace vzorku [min]
	V	objem vzorku [ml]
	k,q	koeficienty rovnice regresní přímky kalibrační křivky

5 VÝSLEDKOVÁ ČÁST

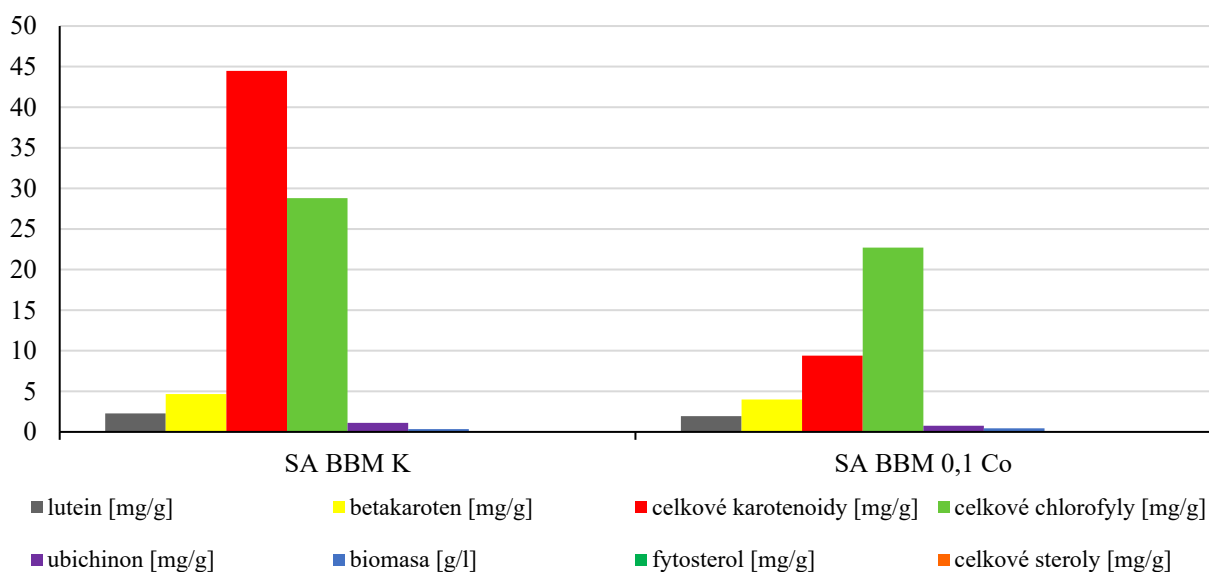
V těchto experimentech byly voleny kmeny řas a sinic *Anabaena torulosa*, *Spirulina*, *Desmodesmus armatus*, *Desmodesmus communis*, *Desmodesmus velutarius*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella cf. minutissima*, *Coccomyxa sp.*, *Scenedesmus acutus* a *Scenedesmus sc. obliquus*. Jako stresové faktory byla zvolena kultivace na BBM a Spirulina médiu současně s přítomností různých koncentrací kobaltu v médiu. Dále probíhala kultivace s různými koncentracemi použitého fritovacího a kávového oleje. Jako poslední byly zkoumány vlivy kokultivace řas a sinic v různých poměrech.

5.1 Kultivace na BBM a Spirulina médiu současně s různými koncentracemi kobaltu

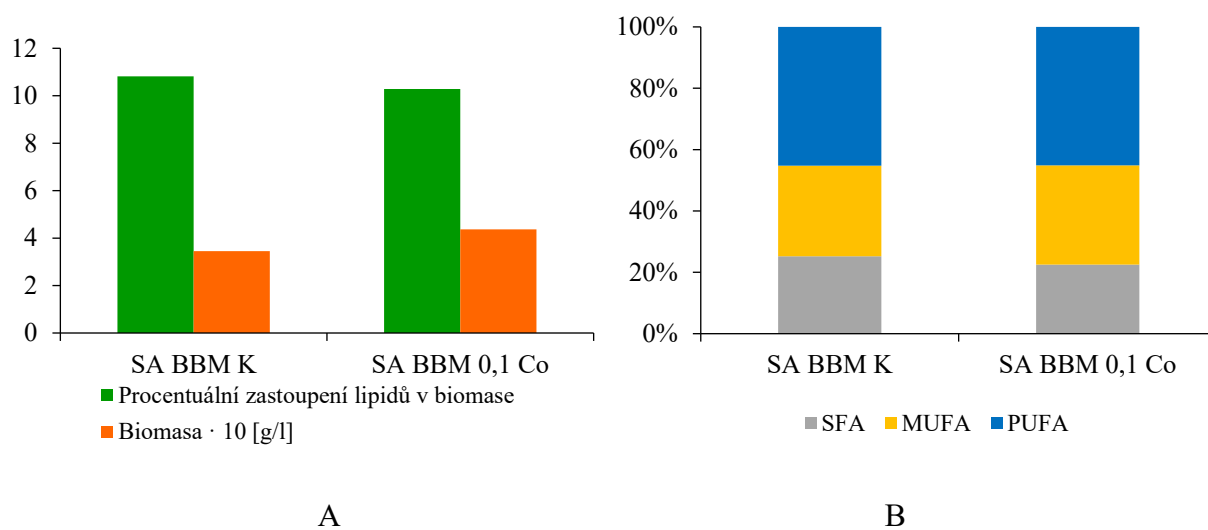
Tyto experimenty byly zaměřeny na zkoumání vlivu média na růst kultury a zároveň jejich reakce na přítomnost různých koncentrací kobaltu v daném médiu. Složení BBM a Spirulina média je značně podobné, avšak se částečně liší, co se použitých solí týče a jejich navážek. Použití jiného média, než je pro danou kulturu nejvhodnější pro ni představuje formu nutričního stresu. Zároveň jejich schopnost prosperovat v jiných typech médií může sloužit k volbě vybraných kmenů pro kokultivace řas a sinic.

5.1.1 *Scenedesmus acutus* CICALA 904

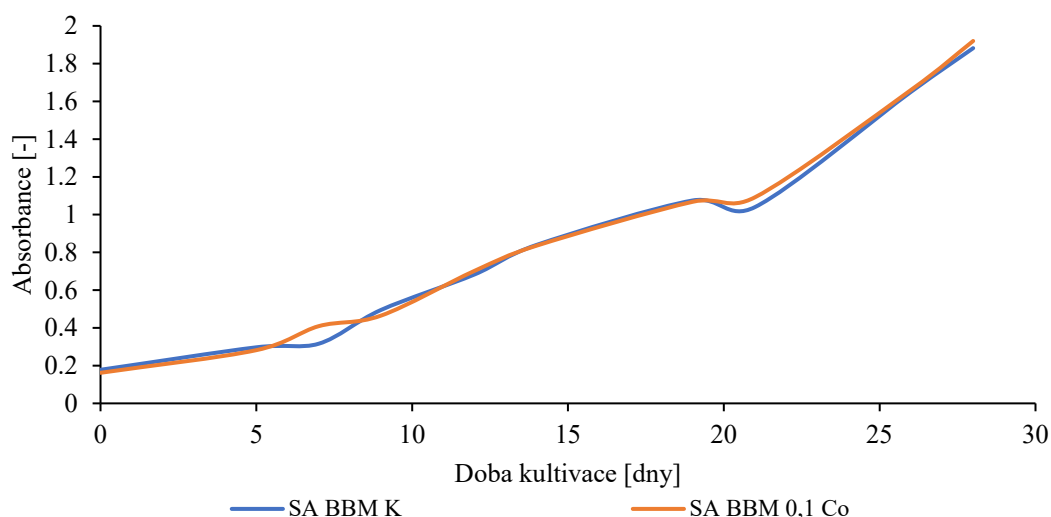
V tomto experimentu byla doba kultivace řasy *Scenedesmus acutus* 28 dní. Po celou dobu byl pozorován nárůst biomasy skrze růstovou křivku (Obrázek 15). Během kultivace měl nárůst lineární charakter. Během kultivace postupně docházelo k úhynu kultur zaočkovaných na Spirulina médiu ale také na téměř všech koncentracích kobaltu. Ze všech vzorků byla získána biomasa pouze kultur kultivovaných na BBM médiu, a to buď bez přítomnosti nebo v nejmenší koncentraci kobaltu. Při pohledu na graf produkce metabolitů (Obrázek 13) můžeme vidět, že produkce všech vybraných metabolitů byla ve vzorku s přidávkou 0,1 mmol/l Co nižší než v kontrolním vzorku. Největší pokles byl zaznamenán v produkci celkových karotenoidů, kde v kontrolním vzorku bylo celkové množství více než 4x vyšší (44,48 mg/g biomasy) než ve vzorku kultivovaném v přítomnosti kobaltu. V obou vzorcích také nedocházelo k výrazné produkci fytosterolu. Procentuální zastoupení lipidů (Obrázek 14 A) následovalo tento sestupný trend ovšem pokles byl v tomto případě pouze nepatrný, kdy lipidická složka byla u obou vzorků kolem 10 %. Zastoupení mastných kyselin v obou vzorcích (Obrázek 14B) bylo srovnatelné, kdy největší část tvořily PUFA. Ačkoliv byla u vzorku kultivovaného v přítomnosti kobaltu zaznamenána snížená produkce všech metabolitů, celková biomasa (0,437 g/l) dosáhla vyšší produkce než u vzorku kontrolního.



Obrázek 13: Graf závislosti produkce lipidických metabolitů v závislosti na použitém médiu a koncentraci kobaltu v něm pro *Scenedesmus acutus*



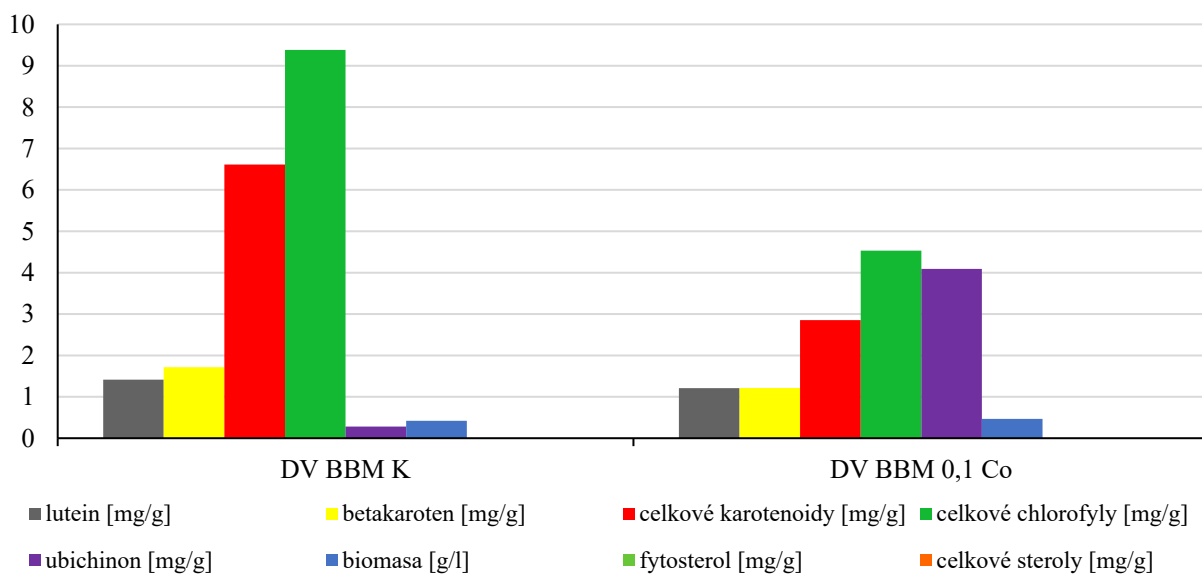
Obrázek 14: Graf procentuálního složení a zastoupení MK v závislosti na použitém médiu a koncentraci kobaltu v něm pro *Scenedesmus acutus*



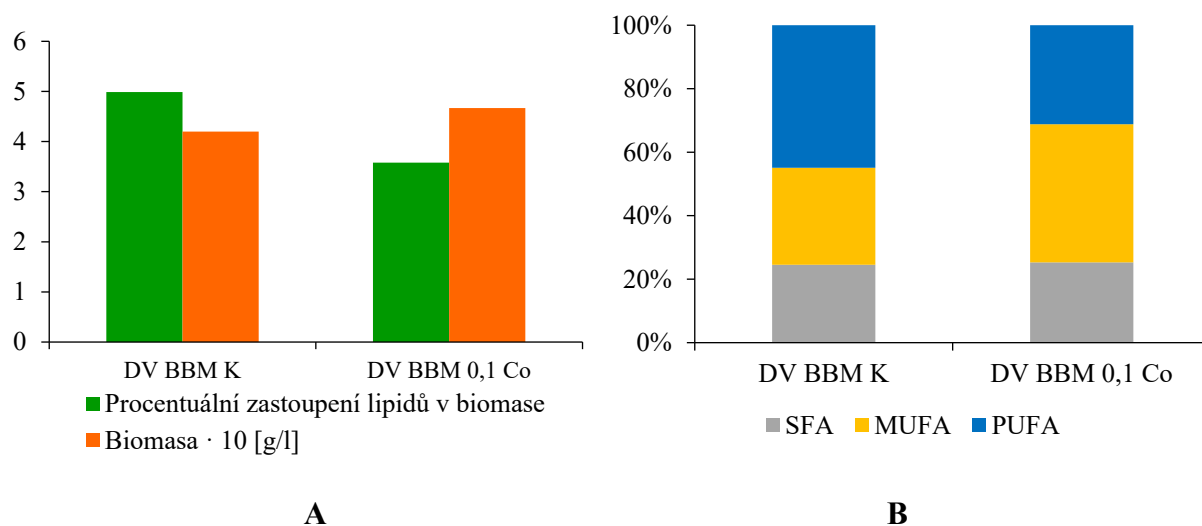
Obrázek 15: Graf růstové křivky v závislosti na médiu a koncentraci kobaltu v něm pro *Scenedesmus acutus*.

5.1.2 *Desmodesmus velitaris* CCALA 468

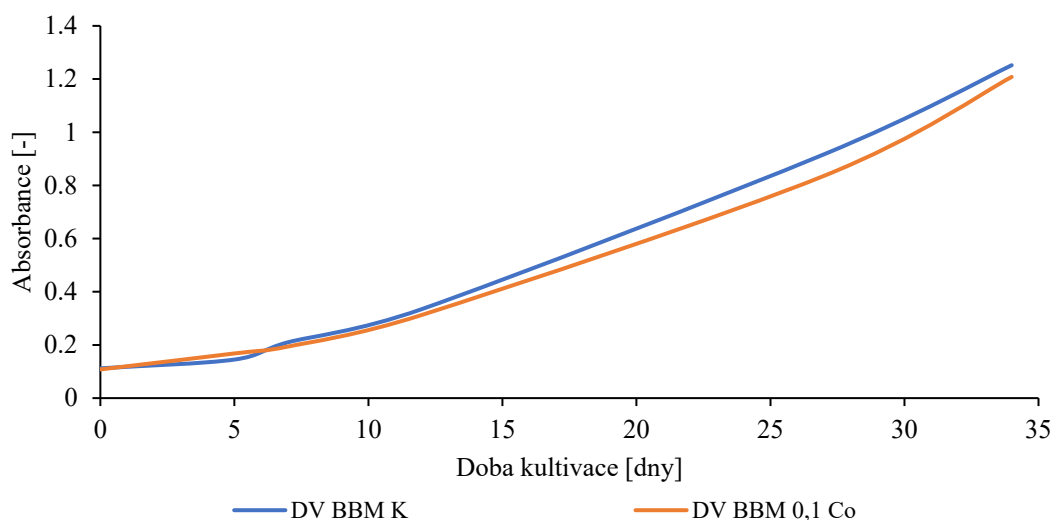
V důsledku pomalejšího růstu biomasy byla řasa *Desmodesmus velitaris* v tomto experimentu kultivována po dobu 34 dnů. Obdobně jako u předchozího experimentu s kmenem *Scenedesmus acutus* došlo během kultivace k postupnému úhynu všech vzorků kultivovaných na Spirulina médiu a také téměř na všech koncentracích kobaltu v BBM médiu. I v tomto případě byl pozorován lineární nárůst biomasy z růstové křivky (Obrázek 18). Oba experimenty mají podobný trend, a sice sníženou produkci vybraných metabolitů. Produkce chlorofylu klesla v přítomnosti kobaltu o polovinu (4,53 mg/g biomasy) viz. Obrázek 16. Značně snížená byla také produkce celkových karotenoidů. Oproti předchozímu experimentu byl však zaznamenán významný nárůst produkce ubichinonu (4,09 mg/g biomasy). Procentuální zastoupení lipidů (Obrázek 17 A) viditelně kleslo oproti kontrolnímu vzorku (4,99 %). Zastoupení MK v lipidické složce (Obrázek 17 B) se v obou vzorcích liší. Největší lipidickou část v kontrolním vzorku tvořily PUFA, v přítomnosti kobaltu zase MUFA, přičemž zastoupení SFA bylo v obou vzorcích srovnatelné.



Obrázek 16: Graf závislosti produkce lipidických metabolitů v závislosti na použitém médiu a koncentraci kobaltu v něm pro *Desmodesmus velitaris*



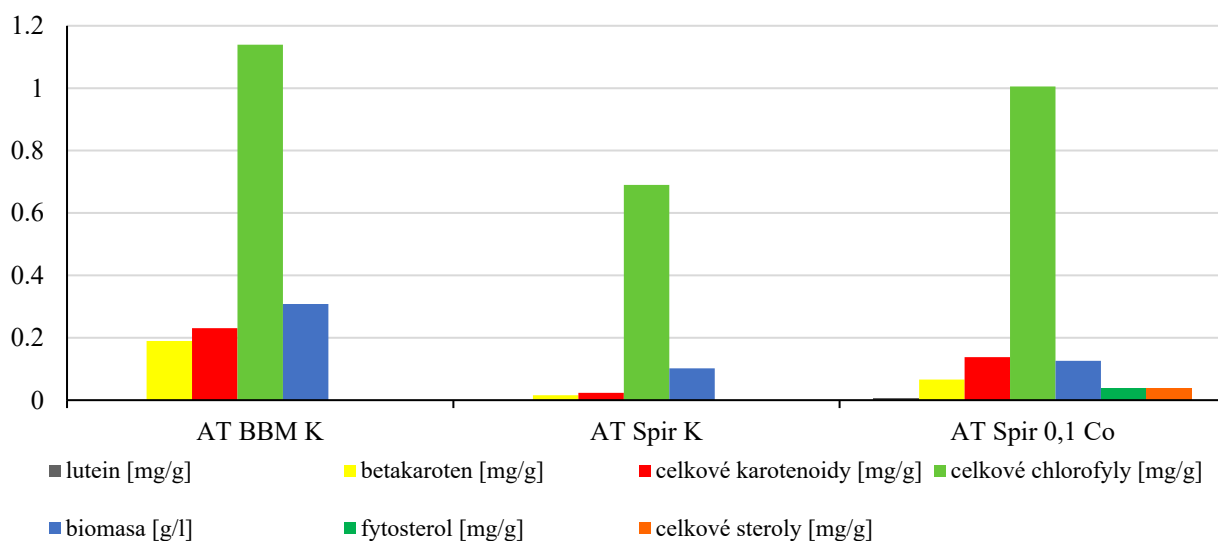
Obrázek 17: Graf procentuálního složení a zastoupení MK v závislosti na použitém médiu a koncentraci kobaltu v něm pro *Desmodesmus velitaris*



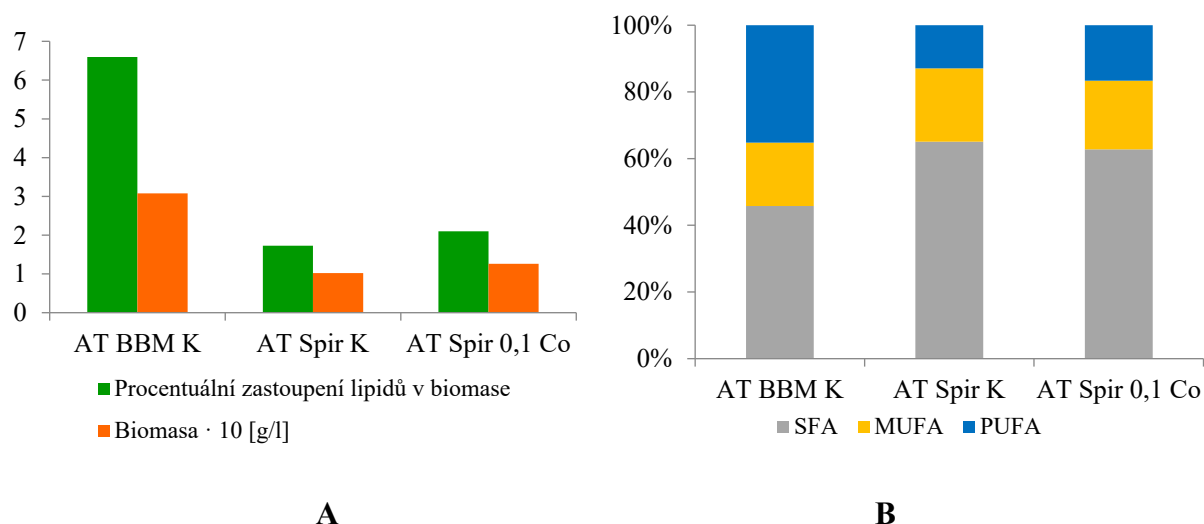
Obrázek 18: Graf růstové křivky v závislosti na médiu a koncentraci kobaltu v něm pro *Desmodesmus velutarius*

5.1.3 *Anabaena torulosa* CCALA 3

Doba kultivace sinice *Anabaena torulosa* byla oproti řasovým kultivacím kratší, a sice trvala po dobu 19 dní. Jelikož tvořila kultura v médiu shluky biomasy, nebylo měření na spektrofotometru přesné a růstová křivka sloužila spíše pro přibližný přehled. Pro *Anabaenu torulosu* je nejvhodnější BBM médium, tato sinice však byla schopná přežít a růst i na Spirulina médiu. Přídavek kobaltu do BBM média vedl ve všech použitých koncentracích k úmrtí kultury. Při pohledu na produkováné metabolity (Obrázek 19) vidíme nejvyšší produkci chlorofylu (1,14 mg/g biomasy) a celkových karotenoidů (0,23 mg/g biomasy) v kontrolním vzorku na BBM médiu. Dále pozorujeme nárůst všech metabolitů v přítomnosti kobaltu oproti kontrolnímu vzorku na Spirulina médiu. Značný je tento nárůst pro chlorofyl (1,01 mg/g biomasy), ale také pro celkové karotenoidy (0,14 mg/g biomasy). Je tedy možné, že přítomnost kobaltu kompenzovala neideální podmínky dané Spirulina médiem. Nárůst pozorujeme také v procentuálním zastoupení lipidů (Obrázek 20 A). V porovnání zastoupení lipidů kontrolního vzorku kultivovaném na BBM médiu (6,59 %) je však procentuální zastoupení na Spirulina médiu třetinové. Velikost naprodukované biomasy kopíruje procentuální zastoupení lipidů ve vzorku. Tedy k nejvyšší produkci biomasy došlo u kontrolního vzorku na BBM médiu (0,31 g/l) nejmenší na kontrolním vzorku na Spirulina médiu (0,10 g/l). Zastoupení MK záviselo pouze na vybraném médiu (Obrázek 20 B). Ve všech případech byla největší složka tvořena SFA a nejmenší MUFA. V případě vzorku na BBM médiu byla oproti vzorkům na Spirulině vyšší produkce PUFA na úkor SFA.



Obrázek 19: Graf závislosti produkce lipidických metabolitů v závislosti na použitém médiu a koncentraci kobaltu v něm pro *Anabaena torulosa*

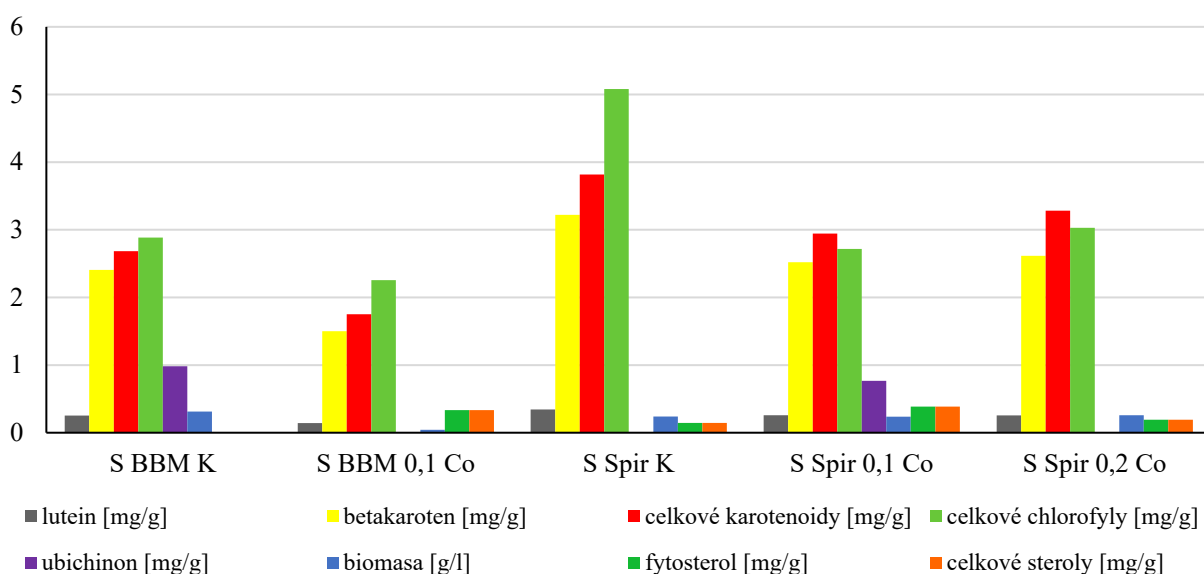


Obrázek 20: Graf procentuálního složení a zastoupení MK v závislosti na použitém médiu a koncentraci kobaltu v něm pro *Anabaena torulosa*

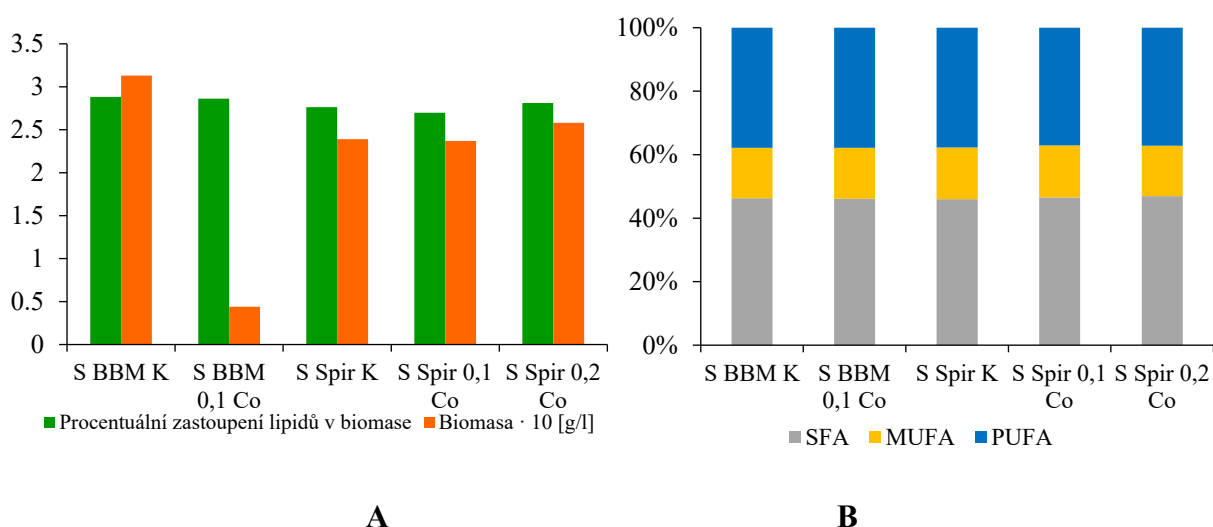
5.1.4 *Spirulina* CCALA 28

Stejně jako *Anabaena torulosa* byla sinice *Spirulina* kultivována v kratším časovém období a sice 21 dní. Biomasa rovněž tvořila v médiu shluky, tedy docházelo k velké interferenci při měření růstové křivky. Ačkoliv většina vzorků v průběhu kultivace uhynula, výsledné množství vzorků je ze všech experimentů nejvyšší. Při pohledu na produkováné metabolity (Obrázek 21) je produkce chlorofylů (5,08 mg/g biomasy), β -karotenu (3,22 mg/g biomasy) a celkově všech karotenoidů nejvyšší v kontrolním vzorku kultivovaném na *Spirulina* médiu. Produkce

metabolitů v kontrolním vzorku kultivovaném na BBM médiu je srovnatelná se vzorky na Spirulina médiu v přítomnosti kobaltu. Produkce nejvíce klesla ve vzorku kultivovaném na BBM médiu s přidavkem kobaltu. Dále lze vidět zvýšenou produkci ubiquinonu v kontrolním vzorku na BBM médiu a ve vzorku s přidavkem 0,1 mmol/l kobaltu na Spirulina médiu. Ačkoliv není BBM medium pro *Spirulinu* nejideálnější, došlo však v kontrolním vzorku k největší produkci biomasy (0,31 g/l) (Obrázek 22 A). Na spirulina médiu biomasa se zvyšující koncentrací kobaltu v médiu mírně roste. Lipidická složka se ve všech vzorcích pohybovala okolo 2,75 %. Profil MK je ve všech vzorcích srovnatelný (Obrázek 22 B). Necelou polovinu ve všech případech tvoří SFA nejmenší pak MUFA.



Obrázek 21: Graf závislosti produkce lipidických metabolitů v závislosti na použitém médiu a koncentraci kobaltu v něm pro *Spirulina*



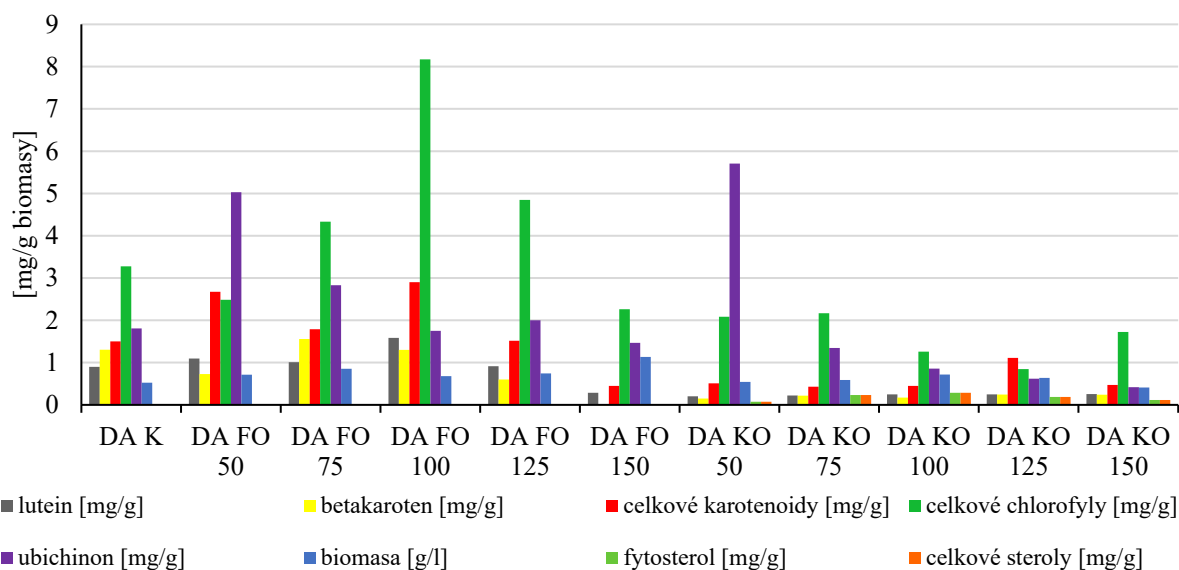
Obrázek 22: Graf procentuálního složení a zastoupení MK v závislosti na použitém médiu a koncentraci kobaltu v něm pro *Spirulina*

5.2 Kultivace v přítomnosti různých koncentrací použitého fritovacího a kávového oleje

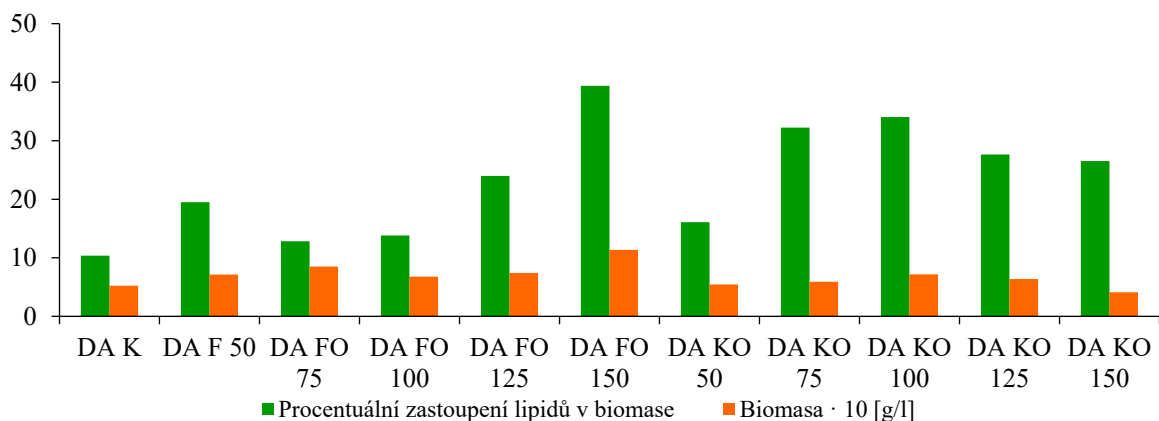
Pozorování nárůstu a charakteru biomasy kultivované v přítomnosti různých koncentrací fritovacího a kávového oleje sloužila k získání informací pro budoucí kultivační experimenty. Všechny kultivace v přítomnosti olejů trvaly 21 dní. Hlavním cílem bylo zjistit, zda-li jsou řasy a sinice schopny v prostředí s olejem přežít, a pokud ano, jaký měl vliv na produkci biomasy a její složení. V rámci eliminace dalších negativních vlivů byly v těchto experimentech použity antibiotika a antimykotika. Oleje však obsahují velké množství dalších nutrientů, a tedy mohou růst řasy naopak podpořit. Dalším vlivem je pak hlavně v případě kávového oleje obstrukce světelného záření způsobené jeho tmavou barvou, popřípadě tvorbou emulze.

5.2.1 *Desmodesmus armatus* CCALA 439

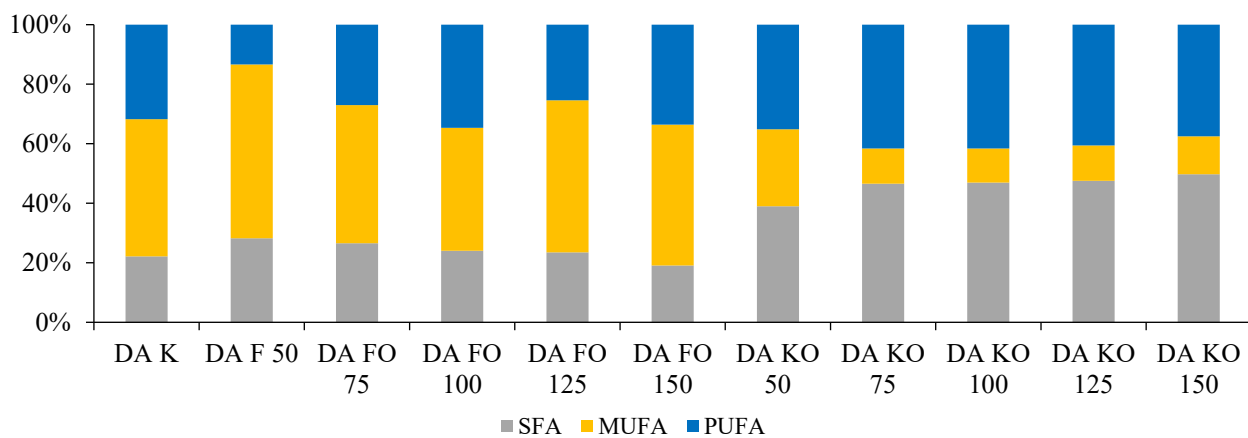
V tomto experimentu byla řasa *Desmodesmus armatus* kultivovaná odpadních olejích. Při pohledu na graf produkce metabolitů (Obrázek 23) je na první pohled patrná vysoká produkce chlorofylů, kdy nárůst stoupal a dosáhl nejvyšší produkce (8,17 mg/g biomasy) pro vzorek FO 100 a následně opět klesala. Celkový počet karotenoidů nebyl závislý na koncentraci oleje v médiu. Dále je také vidět, že nejvyšší produkce ubichinonu (5,03 mg/g biomasy) byla pozorována u vzorku FO 50 a se zvyšující koncentrací fritovacího oleje klesala. Nejnižší produkci vybraných metabolitů pak pozorujeme u vzorku s nejvyšší koncentrací fritovacího oleje. V porovnání byla produkce metabolitů na kávovém oleji mnohem nižší ať už z pohledu chlorofylů či celkových karotenoidů. Obdobně jako u fritovacího oleje, byl při použití kávového oleje zaznamenán nejvyšší nárůst ubichinonu (5,71 mg/g biomasy) u vzorku KO 50, což je nejvyšší hodnota ze všech vzorků. Se zvyšující se koncentrací kávového oleje tato produkce výrazně klesla. Na rozdíl od produkce těchto metabolitů bylo procentuální zastoupení lipidů ve vzorcích spíše opačné (Obrázek 24), tedy kultury produkovaly více lipidů na úkor ostatních metabolitů. Pro vzorky kultivované na fritovacím oleji produkce lipidů s výjimkou vzorku FO 50 rostla a nejvyšší procento (39,38 %) obsahoval vzorek FO 150. Také nárůst celkové biomasy byl u tohoto vzorku nejvyšší (1,13 g/l). Vzorky kultivované na kávovém oleji obecně dosahovaly vyšší produkce lipidů, a kromě vzorku KO 50 se pohybovala mezi 26 – 34 %. Produkce biomasy kopírovala procentuální zastoupení lipidů a nejvyšší hodnoty (0,72 g/l) dosáhl vzorek KO 125. Co se týče složení MK v lipidickém podílu týče (Obrázek 25), nebyly zaznamenány výrazné změny mezi jednotlivými koncentracemi na jednom oleji. Rozdíl je však mezi jednotlivými oleji. Dominantní složkou ve vzorcích kultivovaných na fritovacím oleji jsou MUFA, zatímco ve vzorcích na kávovém oleji je toto zastoupení minimální, největší podíl zde mají SFA.



Obrázek 23: Graf závislosti produkce lipidických metabolitů v závislosti na použitém oleji a jeho koncentraci pro *Desmodesmus armatus*



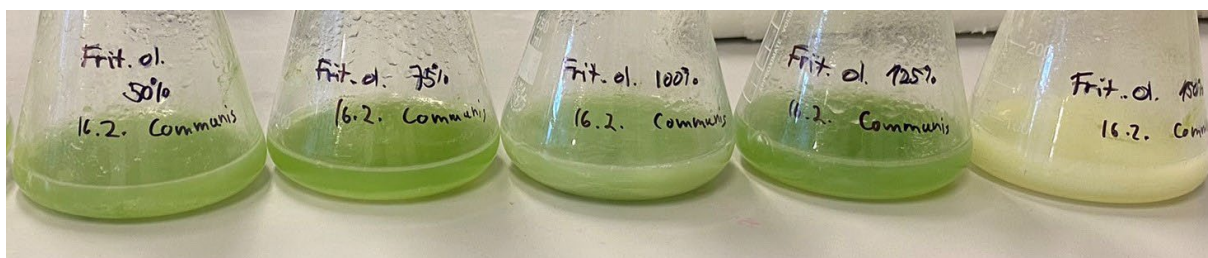
Obrázek 24: Graf procentuálního zastoupení lipidů v závislosti na použitém oleji a jeho koncentraci pro *Desmodesmus armatus*



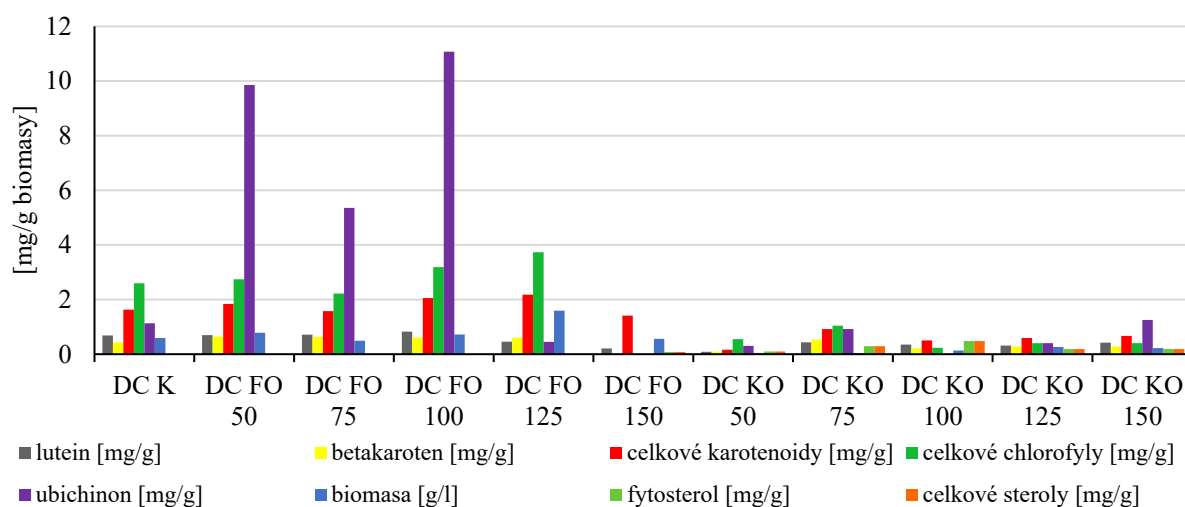
Obrázek 25: Graf procentuálního složení MK lipidické složky pro *Desmodesmus armatus*

5.2.2 *Desmodesmus communis* 464

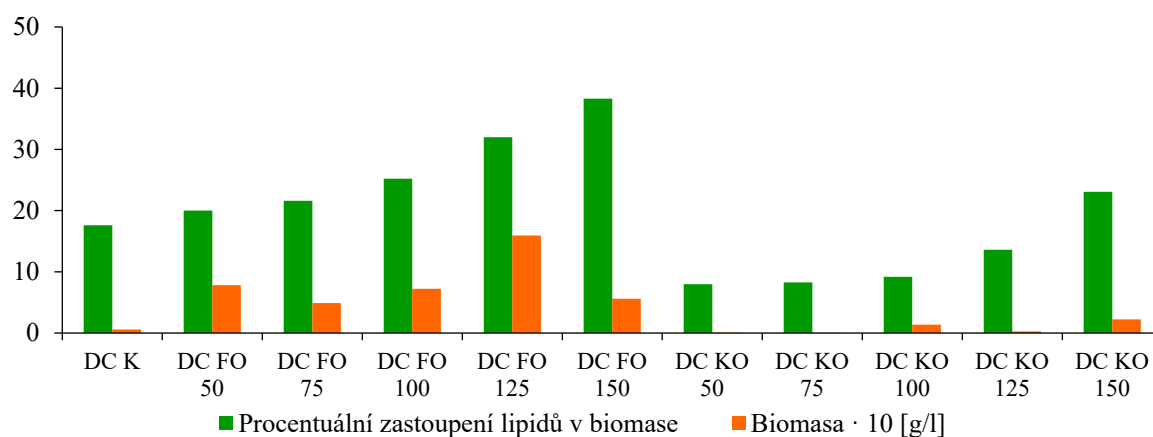
Při pohledu na Obrázek 26 můžeme pozorovat rapidní pokles zabarvení biomasy v médiu s fritovacím olejem o nejvyšší koncentraci. Tuto skutečnost odráží zastoupení jednotlivých metabolitů (Obrázek 27) ve vzorcích. Vzorek kultivovaný na nejvyšší koncentraci fritovacího oleje produkoval nejmenší množství chlorofylu a dalších metabolitů. Pokles produkce celkových karotenoidů však v porovnání s ostatními vzorky nebyl. Produkce chlorofylu s výjimkou vzorku FO 50 se zvyšující se koncentrací roste a nejvyšší hodnoty (3,73 mg/g biomasy) dosahuje ve vzorku FO 125. Obdobně se také pohybuje produkce celkových karotenoidů. Při vyšších koncentracích fritovacího oleje v médiu však výrazně klesá produkce ubiquinonu. Nejvyšší zastoupení pozorujeme u vzorků FO 50 a FO 100, kde je nejvyšší (11,07 mg/g biomasy). Ve srovnání s fritovacím olejem byla produkce na kávovém oleji výrazně nižší, a to téměř ve všech metabolitech. Jedinou výjimkou je produkce fytosterolu, která byla na fritovacím oleji nulová. Nejvyšší produkce (0,48 mg/g biomasy) byla u vzorku KO 100. Stejně jako u řasy *Desmodesmus armatus* procentuální zastoupení lipidů (Obrázek 28) ve vzorcích rostlo se zvyšující se koncentrací fritovacího oleje. Nejvyšší produkce (38,29 %) byla dosažena u vzorku DC FO 150. Nárůst celkové biomasy byl u tohoto vzorku také nejvyšší (1,59 %). Také u vzorků s kávovým olejem je produkce biomasy i zastoupení lipidů nejvyšší pro nejkoncentrovanější vzorek. Celková produkce biomasy je však oproti vzorkům s fritovacím olejem výrazně nižší. Profil MK (Obrázek 29) je pro vzorky na fritovacím oleji rovněž srovnatelný s předchozím experimentem, a sice největší složku tvoří MUFA a nejmenší SFA. U vzorků kultivovaných na kávovém oleji tvoří nejmenší složku MUFA.



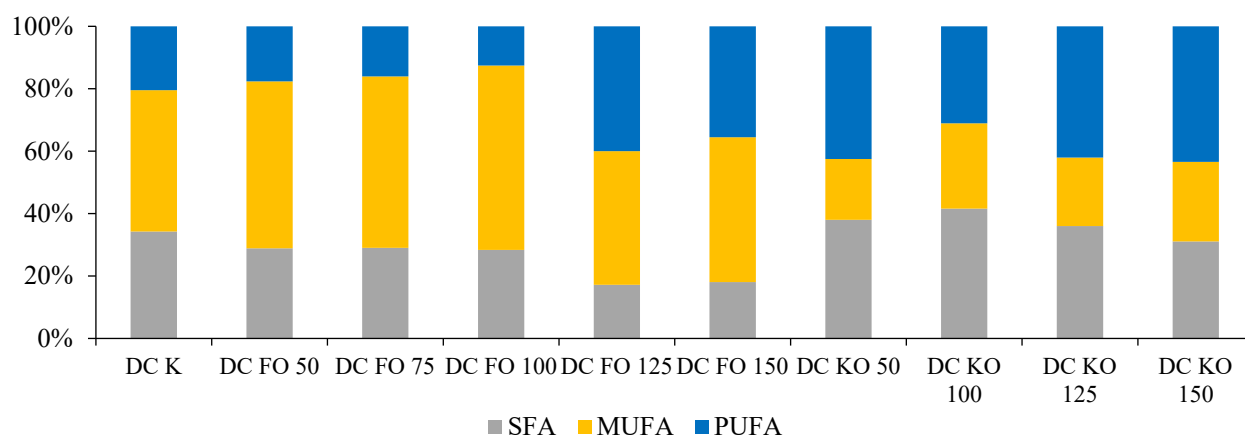
Obrázek 26: Kultivace *Desmodesmus communis* na fritovacím oleji s rostoucí koncentrací (zleva doprava)



Obrázek 27: Graf závislosti produkce lipidických metabolitů v závislosti na použitém oleji a jeho koncentraci pro *Desmodesmus communis*



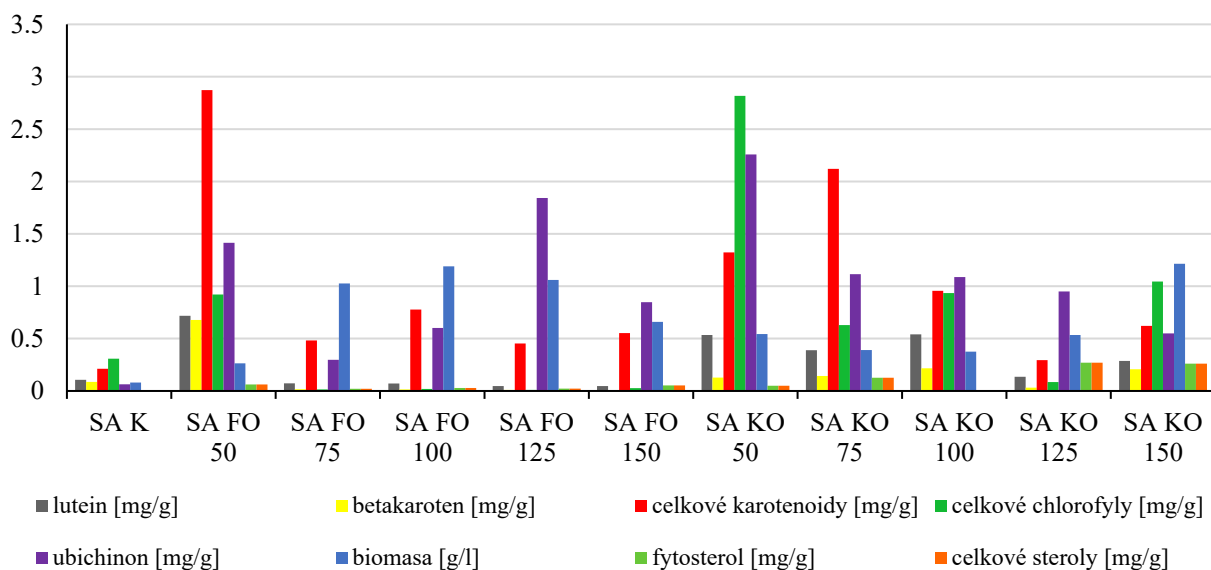
Obrázek 28: Graf procentuálního zastoupení lipidů v závislosti na použitém oleji a jeho koncentraci pro *Desmodesmus communis*



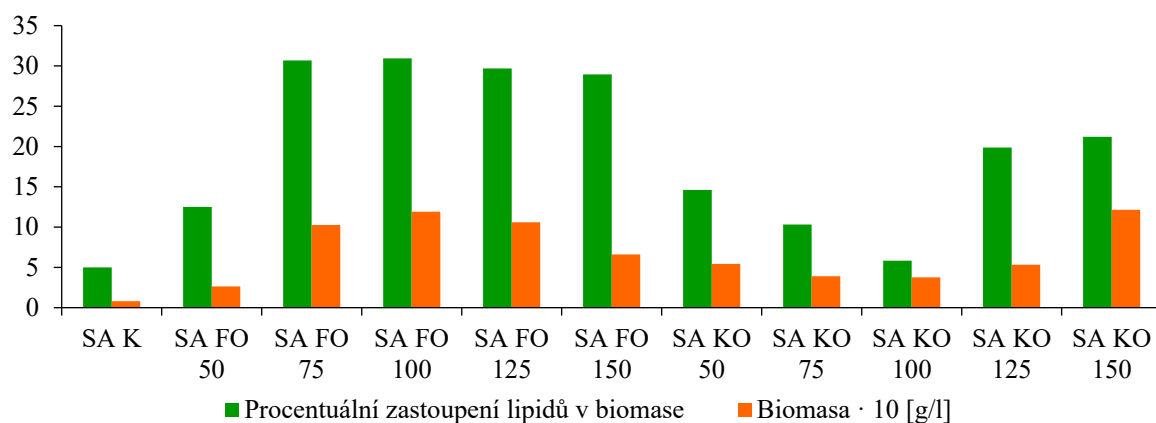
Obrázek 29: Graf procentuálního zastoupení MK lipidické složky v závislosti na použitém oleji a jeho koncentraci pro *Desmodesmus communis*

5.2.3 *Scenedesmus acutus* CICALA 904

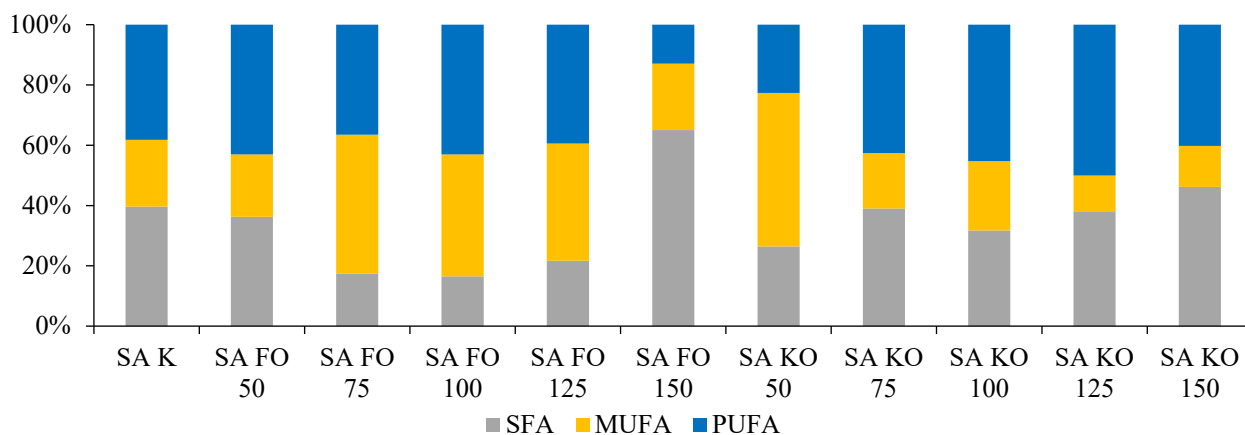
Pro řasu *Scenedesmus acutus* pozorujeme významný nárůst vybraných metabolitů (Obrázek 30) pro vzorek FO 50 oproti kontrole. Vzorek dosahuje nejvyššího nárůstu chlorofylu (1,41 mg/g biomasy) a celkových karotenoidů (2,87 mg/g) a fytosterolu ze všech vzorků kultivovaných na fritovacím oleji. Tento nárůst se však týká pouze nejnížší koncentrace fritovacího oleje v médiu. Ostatní koncentrace dosahují vyšších produkcí celkových karotenoidů a ubichinonu než kontrola, zastoupení chlorofylů je však v těchto vzorcích téměř nulové. K nejvyšší produkci ubichinonu (1,84 mg/g biomasy) pro tuto řadu vzorků došlo u nejvyšší koncentrace fritovacího oleje. Produkce chlorofylů byla značně zvýšená u vzorků kultivovaných na kávovém oleji, a to především ve vzorku KO 50, kde byla ze všech kultivovaných vzorků nejvyšší (2,82 mg/g biomasy). Také ubichinon dosahuje v tomto vzorku své nejvyšší hodnoty (2,26 mg/g biomasy). Ve vzorku KO 125 byla naopak produkce chlorofylů i celkových karotenoidů nejnížší. Oproti kontrole byla pro vzorky kultivované na kávovém oleji zaznamenána vyšší produkce luteinu, nejvíce pro vzorek KO 100 (0,54 mg/g biomasy). Obdobně jako u předchozích experimentů je produkce lipidů (Obrázek 31) opačná oproti produkci ostatních metabolitů, tedy čím nižší je jejich produkce, tím více stoupá zastoupení lipidů ve vzorku. Pro vzorky kultivované na fritovacím oleji pozorujeme patrný nárůst lipidů pro vzorky s vyšší koncentrací oleje, také biomasa je v těchto vzorcích vyšší. Největší procentuální zastoupení lipidů (30,94 %) a nejvyšší biomasu (1,19 g/l) má vzorek FO 100. Ve vzorcích s kávovým olejem s rostoucí koncentrací oleje zastoupení lipidů klesá, popté je skokově navýšeno pro dva nejkonzentrovanejší vzorky. Vzorek s nejvyšší koncentrací kávového oleje obsahuje jak největší procento lipidů (21,19 %) také nejvíce biomasy (12,14 g/l), což je nejvyšší hodnota pro všechno vzorky této řasy. Složení MK v lipidické složce (Obrázek 32) se pro tuto řasu již poněkud liší i pro vzorky kultivované na jednom druhu oleje. Pro vzorek kontroly, FO 50 a pro kávové vzorky bez nejnížší koncentrace KO 50 je nejmenší složka lipidů MUFA, přičemž SFA a PUFA jsou zastoupeny přibližně ve stejném poměru. Ve vzorku FO 150 tvoří asi 2/3 lipidického podílu SFA a nejméně jsou zastoupeny PUFA. Ve vzorcích FO 75 a 100 a KO 50 mají nejvyšší zastoupení MUFA a nejmenší SFA pro vzorky s fritovacím olejem a PUFA pro vzorek s kávovým olejem.



Obrázek 30: Graf závislosti produkce lipidických metabolitů v závislosti na použitém oleji a jeho koncentraci pro *Scenedesmus acutus*



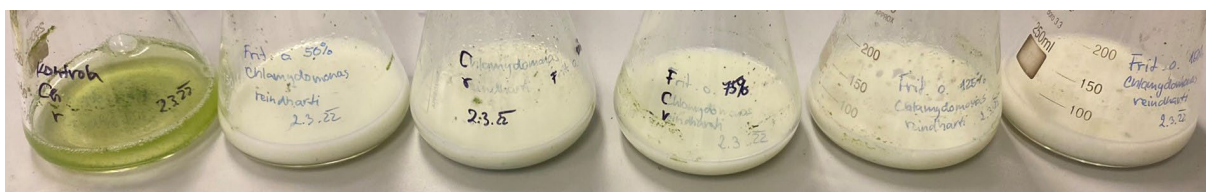
Obrázek 31: Graf procentuálního zastoupení lipidů v závislosti na použitém oleji a jeho koncentraci pro *Scenedesmus acutus*



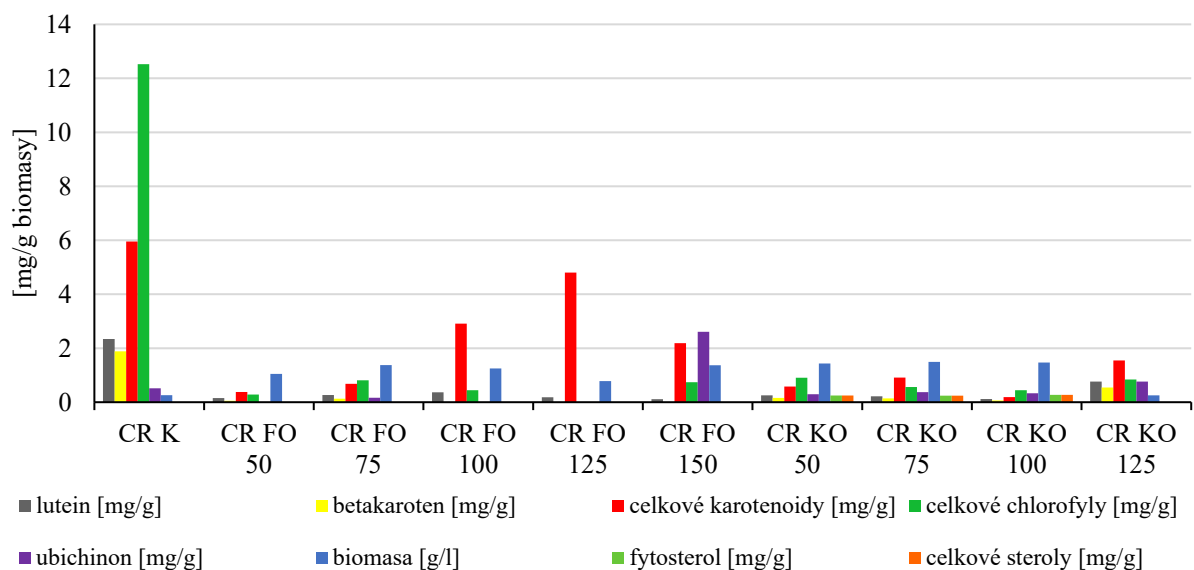
Obrázek 32: Graf procentuálního složení MK lipidické složky pro *Scenedesmus acutus*

5.2.4 *Chlamydomonas reinhardtii* CCALA 973

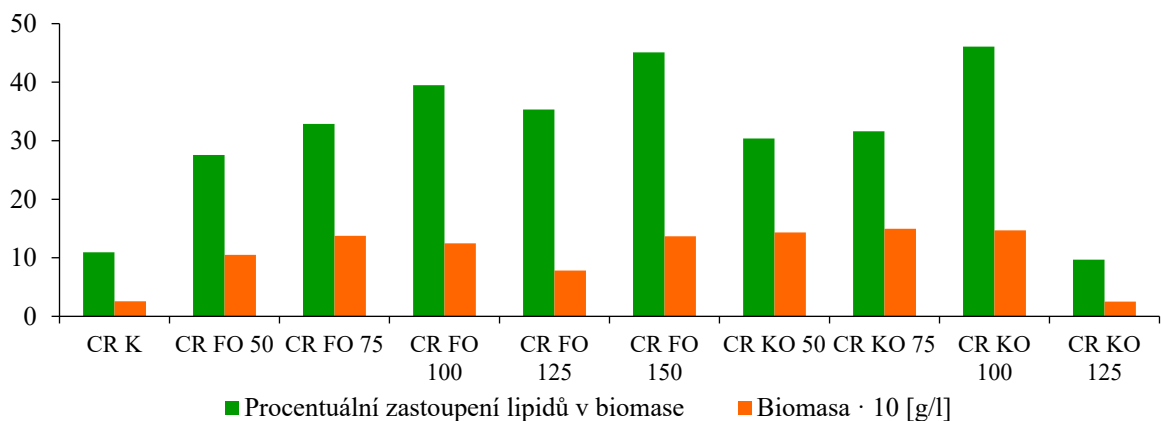
Z pohledu na Obrázek 33 je patrná výrazná tvorba emulze ve všech vzorcích obsahujících fritovací olej. Obdobně byla emulze přítomná ve vzorcích s kávovým olejem. Během kultivace došlo k prasknutí Erlenmayerovy baňky a vylití jejího obsahu. Vzorek KO 150 tedy není zahrnut. V předchozích experimentech byla produkce vybraných metabolitů v těchto vzorcích značně snížena, proto můžeme podobnou situaci pozorovat (Obrázek 34) i u řasy *Chlamydomonas reinhardtii*. Produkce vybraných metabolitů s výjimkou ubiquinonu a fytosterolu je proto nejvyšší pro kontrolní vzorek. V přítomnosti fritovacího oleje je produkce chlorofylu výrazně nižší. Zastoupení celkových karotenoidů však s rostoucí koncentrací oleje roste a dosahuje nejvyšší hodnoty (4,8 mg/g biomasy) u vzorku FO 125. Ve vzorku FO 150 také pozorujeme nejvyšší nárůst ubiquinonu (2,61 mg/g biomasy) ze všech vzorků této řasy. V přítomnosti kávového oleje je produkce metabolitů oproti kontrole rovněž výrazně snížena. Při nižších koncentracích však docházelo k produkci fytosterolu. Jak už bylo zmíněno v předchozích případech, je snížená produkce těchto metabolitů kompenzována nadměrnou produkcí lipidů (Obrázek 35). Procentuální zastoupení lipidů ve vzorcích kultivovaných na fritovacím oleji rostlo s jeho zvyšující se koncentrací, pouze ve vzorku FO 125 došlo k mírnému poklesu oproti předchozímu méně koncentrovanému vzorku. Nejvyšší hodnoty dosáhl vzorek FO 150 (45,09 %). Také produkce biomasy kopírovala tento trend. Lipidická složka ve vzorcích kultivovaných na kávovém oleji rovněž rostla, u vzorku KO 125 však skokově klesla. Vzorek KO 100 obsahoval nejvyšší procentuální zastoupení lipidů (46,07 %) ze všech vzorků pro tuto řasu. S výjimkou předchozího experimentu s řasou *Scenedesmus acutus*, je složení MK (Obrázek 36) srovnatelné pro všechny vzorky kultivované na jednom oleji. Ve vzorcích kultivovaných na fritovacím oleji tvoří největší část MUFA, které v kávovém oleji a kontrolním vzorkům tvoří naopak nejmenší část. Kávové vzorky pak v lipidické složce obsahují více než polovinu SFA.



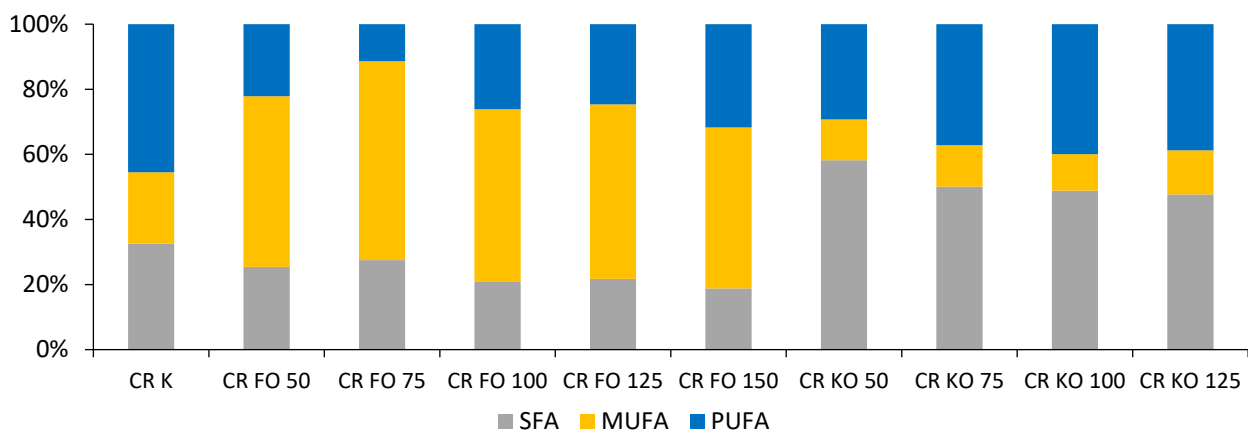
Obrázek 33: Kultivace *Chlamydomonas reinhardtii* na fritovacím oleji s rostoucí koncentrací (zleva doprava)



Obrázek 34: Graf závislosti produkce lipidických metabolitů v závislosti na použitém oleji a jeho koncentraci pro *Chlamydomonas reinhardtii*



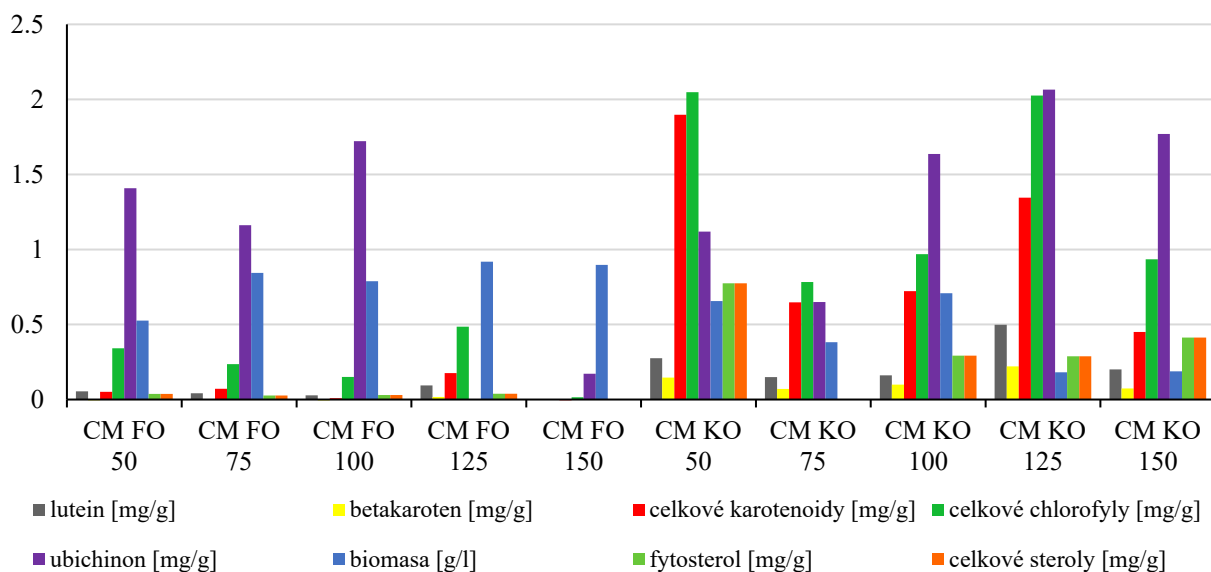
Obrázek 35: Graf procentuálního zastoupení lipidů v závislosti na použitém oleji a jeho koncentraci pro *Chlamydomonas reinhardtii*



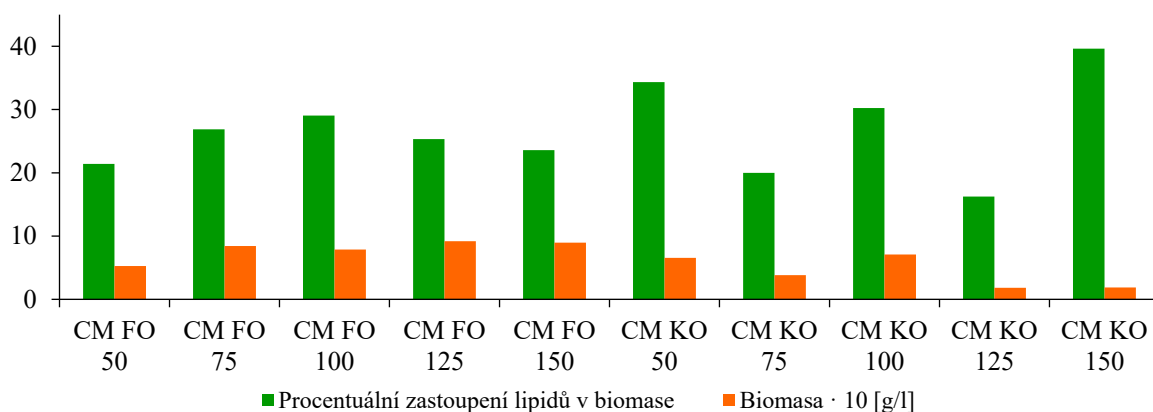
Obrázek 36: Graf procentuálního složení MK lipidické složky pro *Chlamydomonas reinhardtii*

5.2.5 *Chlorella cf. minutissima* CCALA 916

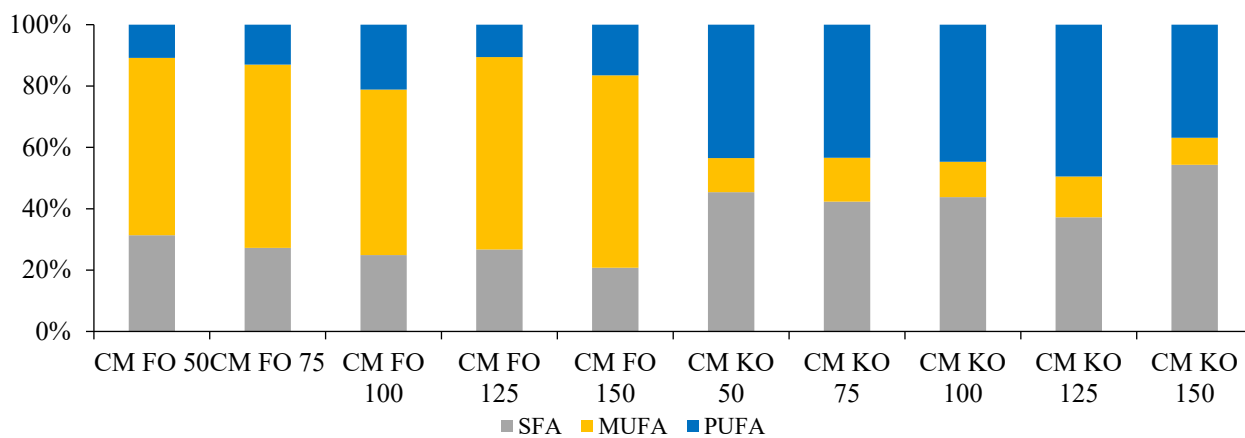
Rovněž v tomto případě došlo k naprasknutí Erlenmayerovy baňky. V obou případech bylo prasknutí pravděpodobně způsobeno opotřebením materiálu. Na rozdíl od předchozích experimentů docházelo ke snížené produkci chlorofylů a celkových karotenoidů (Obrázek 37) u vzorků kultivovaných na fritovacím oleji. Největší produkci těchto metabolitů docházelo u vzorku FO 125, v porovnání se vzorky kultivovanými na kávovém oleji však byly tyto hodnoty stále menší. Při menších koncentracích fritovacího oleje byl však pozorován zvýšený nárůst ubichinonu, nejvíce u vzorku FO 100 (1,72 mg/g biomasy). Produkce vybraných metabolitů na kávovém oleji se nedržela jednotného trendu, nejvyšších hodnot však dosahovaly vzorky KO 50 a KO 125. Největší množství chlorofylů (2,05 mg/g biomasy) a celkových karotenoidů (1,90 mg/g biomasy) dosáhl vzorek KO 50. Nárůst fytostreolu byl v tomto vzorku také nejvyšší (0,77 mg/g biomasy). Co se týče například metabolitu luteinu, byla jeho produkce nejvyšší (0,50 mg/g biomasy) ve vzorku KO 125. Na rozdíl od vzorků kultivovaných na fritovacím oleji, byl nárůst ubichinonu znatelnější u vyšších koncentrací kávového oleje v médiu. Nejvyšší hodnoty (2,07 mg/g biomasy) ve všech vzorcích pro tuto rasu dosahoval vzorek KO 125. Ačkoliv byla produkce metabolitů ve vzorcích s kávovým olejem zvýšená, nedocházelo ke snížené produkci lipidů (Obrázek 38), jako tomu zpravidla bylo v předchozích experimentech. Procentuální zastoupení lipidů ve vzorcích s kávovým olejem nemělo jednotný trend. Největší procento (39,62 %) lipidické složky měl vzorek KO 150, ačkoliv ze všech vzorků kultivovaných na kávovém oleji dosáhl nejmenšího výtěžku biomasy (0,19 g/l). Nárůst biomasy se zvyšující se koncentrací kávového oleje snižoval s výjimkou vzorku KO 100. Ve vzorcích kultivovaných na fritovacím oleji zastoupení lipidů se zvyšující se koncentrací nejprve stoupalo a pak klesalo, přičemž nejvyšší hodnoty (29,06 %) dosáhl vzorek FO 100. Nárůst biomasy se zvyšující koncentrací oleje také zvyšoval. Obdobně jako v předchozích experimentech bylo zastoupení MK (Obrázek 39) pro všechny vzorky kultivované na jednom oleji srovnatelné. Pro fritovací olej bylo ve vzorcích největší zastoupení MUFA a nejmenší PUFA. U kávových vzorků byly MUFA zastoupeny nejméně, a SFA a PUFA dosahovaly podobných hodnot.



Obrázek 37: Graf závislosti produkce lipidických metabolitů v závislosti na použitém oleji a jeho koncentraci pro *Chlorella cf. minutissima*



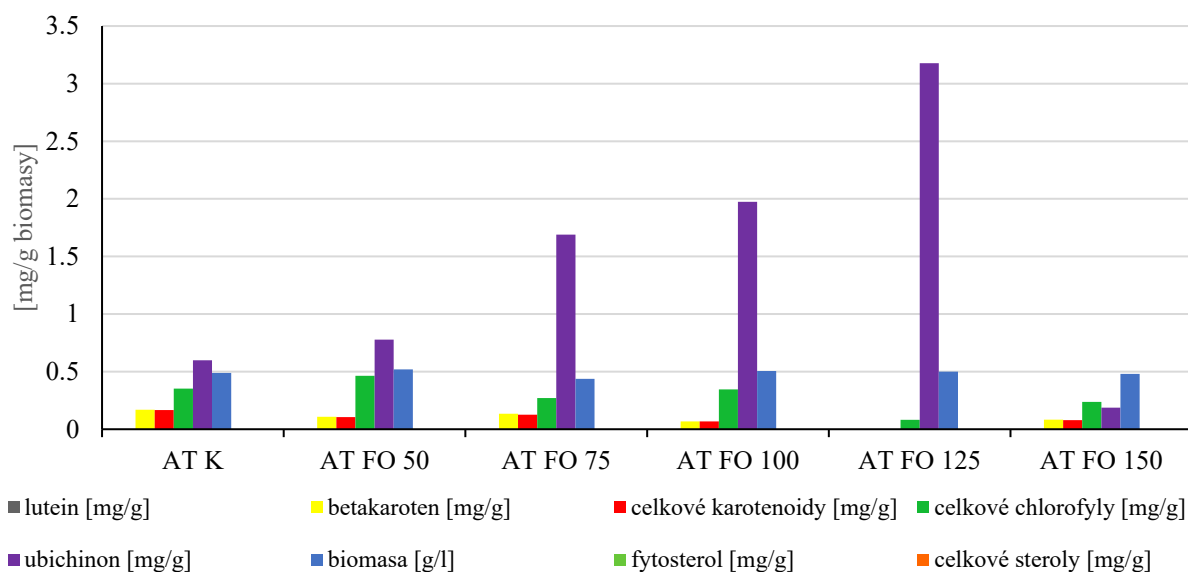
Obrázek 38: Graf procentuálního zastoupení lipidů v závislosti na použitém oleji a jeho koncentraci pro *Chlorella cf. minutissima*



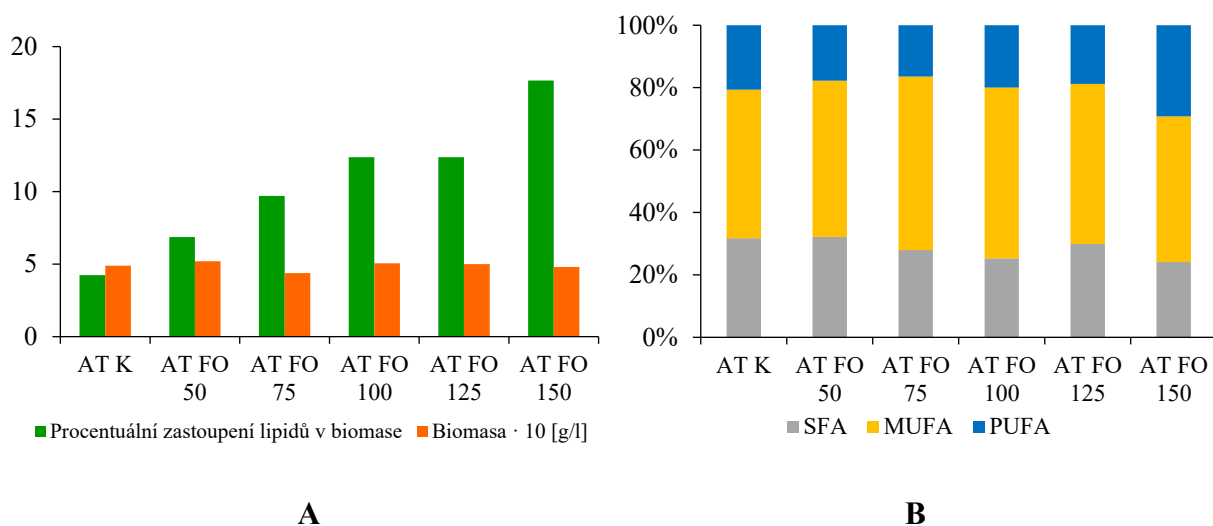
Obrázek 39: Graf procentuálního složení MK lipidické složky pro *Chlorella cf. minutissima*

5.2.6 *Anabaena torulosa* CCALA 3

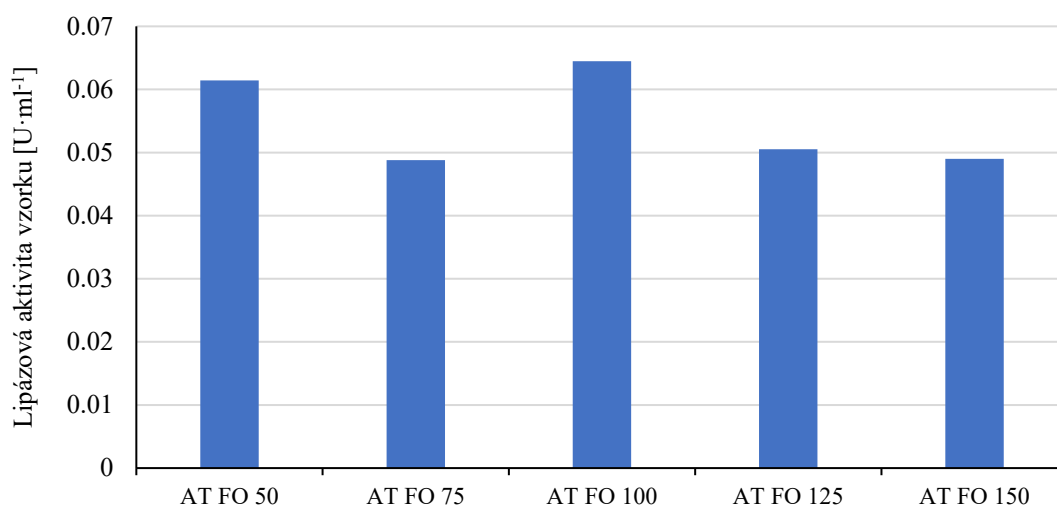
Při kultivaci sinice *Anabaena torulosa* došlo k rychlému úhynu všech vzorků kultivovaných na kávovém oleji. Z grafu produkce vybraných metabolitů (Obrázek 40) lze vyčíst, že se zvyšující se koncentrací fritovacího oleje v médiu klesala produkce chlorofylů a celkových karotenoidů. Největší produkce chlorofylu (0,46 mg/g biomasy) bylo pozorováno u vzorku FO 50 a nejvyšší nárůst celkových karotenoidů (0,13 mg/g biomasy) u vzorku FO 70. se zvyšující se koncentrací oleje také značně rostla produkce ubichinonu, která však ve vzorku s nejvyšší koncentrací oleje výrazně klesla. Nejvyšší hodnoty produkce (3,18 mg/g biomasy) dosáhl vzorek FO 125. Dále také jako u předchozích experimentu, nebyla na fritovacím oleji pozorována vysoká produkce fytosterolu. Ve všech vzorcích došlo ke srovnatelnému nárůstu biomasy (Obrázek 41A) a to v rozmezí od 0,48 – 0,52 g/l. Produkce lipidických látek rostla s koncentrací oleje v médiu a nejvyšší hodnoty (17,66 %) dosáhl vzorek FO 150. Složení MK (Obrázek 41 B) bylo opět srovnatelné s předchozími experimenty, kdy MUFA tvořily asi polovinu veškeré lipidické složky a nejméně byly zastoupeny PUFA. V tomto experimentu byla měřena lipázová aktivita pomocí přístroje ELISA reader. Lipázová aktivita byla vypočítána z naměřených dat po inkubaci po dobu 30 minut (Obrázek 42). Lipázová aktivita se pro jednotlivé vzorky výrazně neliší, nejvyšších hodnot dosahuje pro vzorky na fritovacím oleji FO 50 ($0,0614 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) a FO 125 ($0,0645 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$). Nejnižší hodnotu nabývá pro vzorek FO 75 ($0,0488 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$). Výsledky měření lipázové aktivity u této vybrané kultivace potvrzují námi zvolený předpoklad, že vybrané kmeny sinic a řas disponují extracelulárními lipázami, které štěpí použitý olej. Tento předpoklad dále potvrzují výše diskutované výsledky analýzy profilu MK, kdy při kultivacích na olejích je ovlivňován profil MK použitím vhodného oleje. V tomto případě sloužil kávový olej ke zvýšení obsahu PUFA a fritovací olej ke zvýšení obsahu MUFA. Tyto výsledky korespondují s experimenty s použitím karotenogenních kvasinek [72].



Obrázek 40: Graf závislosti produkce lipidických metabolitů v závislosti na použitém oleji a jeho koncentraci pro *Anabaena torulosa*



Obrázek 41: Graf procentuálního složení a zastoupení MK v závislosti na použitém oleji a jeho koncentraci pro *Anabaena torulosa*



Obrázek 42: Graf lipázové aktivity v závislosti na koncentraci fritovacího oleje pro *Anabaena torulosa*

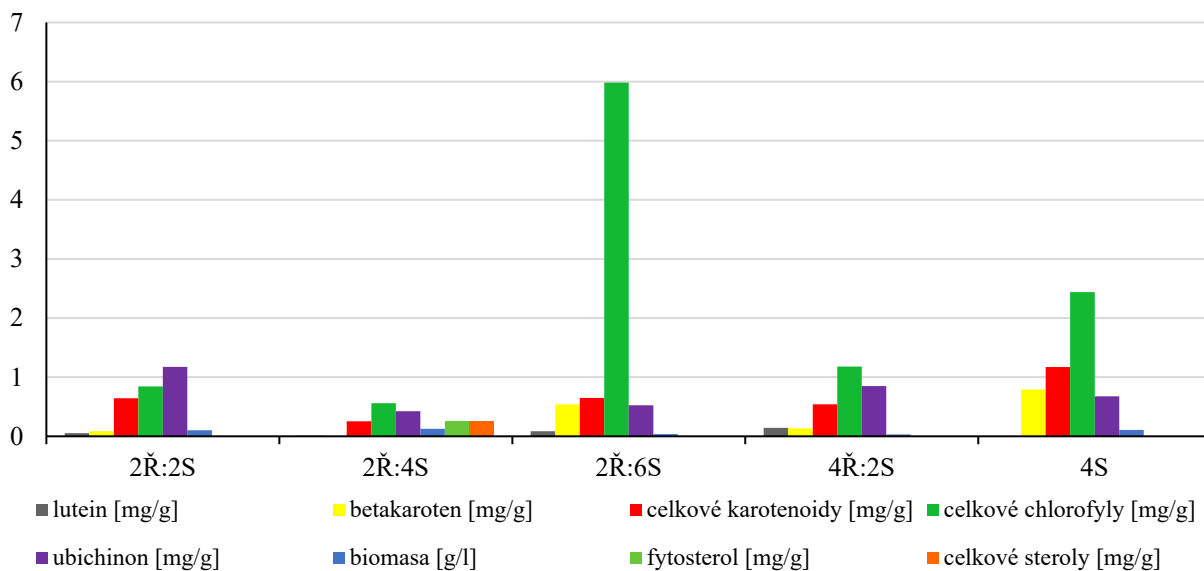
5.3 Kokultivace řas a sinic

Cílem kokultivačních experimentů bylo zjištění vlivů, které na sebe řasa a sinice mají při kultivaci v jednom médiu. V ideálním případě by docházelo ke tvorbě synergického efektu dáno buď symbiózou jednotlivých kultur nebo naopak jejich kompetitivním chováním. Přítomnost dvou odlišných kultur může způsobit formu nutričního stresu ať už v rámci jednotlivých prvků nebo jejich množství. Kokultivace by také mohla mít za následek rozšíření rozmezí produkovaných mastných kyselin, jelikož každá kultura produkuje pouze určitý profil. Řasy a sinice byly očkované v různých poměrech pro zjištění nejideálnějších podmínek pro kokultivaci. Kultivace v přístroji multikultivátor umožňuje kontinuální záznam absorbance pro jednotlivé zkumavky, V případě těchto kokultivací však docházelo k výraznému usazování kultury na dně zkumavky, a to i přes probublávání kyslíkem. Naměřené hodnoty pro sestrojení růstové křivky byly místy nahodilé a nárůst absorbance neodpovídal nárůstu biomasy.

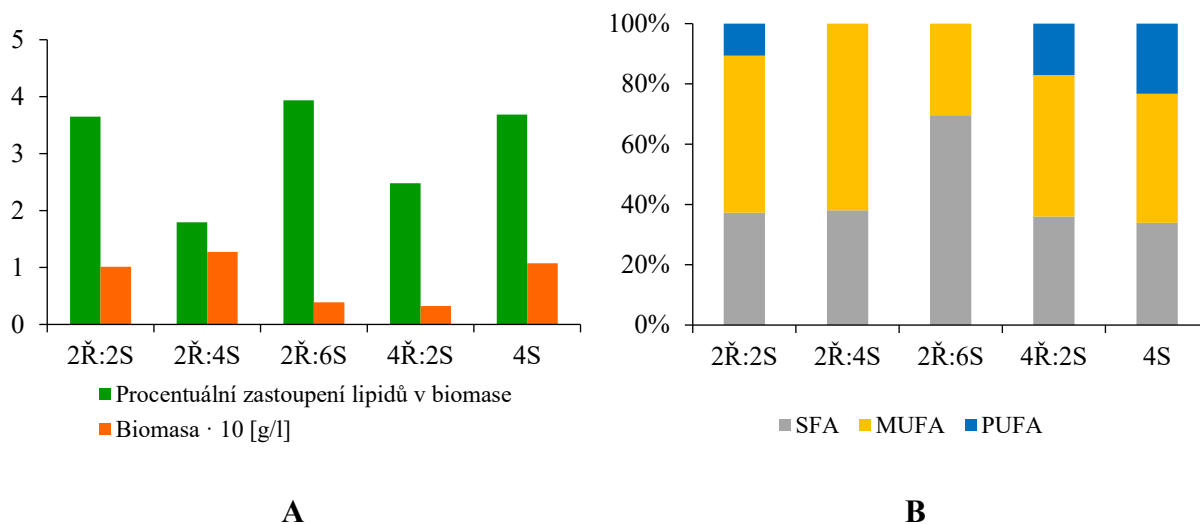
5.3.1 *Anabaena torulosa* CCALA 3 a *Coccomyxa* sp. CCALA 912

V tomto experimentu byly společně kokultivovány sinice *Anabaena torulosa* a řasa *Coccomyxa* sp. Pro tuto řasu však došlo k úhynu či kontaminaci několika vzorků během 2 týdnů kultivace. Na první pohled můžeme vidět (Obrázek 43) výraznou produkci chlorofylu (5,98 mg/g biomasy) u vzorku 2Ř:6S, o něco méně u vzorku 4S, u ostatních vzorků už byla produkce menší. Celkové karotenoidy byly nejvíce produkovány (0,79 mg/g biomasy) ve vzorku 4S. Dále byla nejvyšší produkce ubichinonu (1,17 mg/g biomasy) ve vzorku 2Ř:2S. Ze všech vzorků byla produkce metabolitů nejmenší ve vzorku 2Ř:4S, tento vzorek jako jediný však produkoval fytosterol (0,25 mg/g biomasy). Co se těchto vybraných metabolitů týče, není zde pozorován trend zvýšené či snížené produkce v závislosti na poměru řasa: sinice. Žádná závislost na tomto poměru není pozorována ani u procentuálního zastoupení lipidů v biomase či v nárůstu biomasy samotné (Obrázek 44 A). Procentuální zastoupení lipidů se ve všech vzorcích pohybovalo pod hranicí 4 %, pouze ve vzorku 2Ř:4S byla produkce snižena (1,79 %). Naopak biomasa tohoto vzorku byla nejvyšší (0,13 g/l). Naopak nejmenšího nárůstu biomasy

(0,039 g/l) dosáhl vzorek 2Ř:6S, byť zde byla nejvyšší produkce lipidů (3,94 %). Zastoupení MK (Obrázek 44 B) se ve vzorcích zásadně neliší. S výjimkou vzorku 2Ř:6S, kde jsou nejvíce zastoupeny SFA, byly nejvíce zastoupeny MUFA a ve vzorcích 2Ř:2S a 4S byly v menším množství zastoupeny i PUFA. V případě této kokultivace tedy nebyla pozorována souvislost mezi poměrem řasa:sinice a produkovanými metabolity a celkovou biomasou.



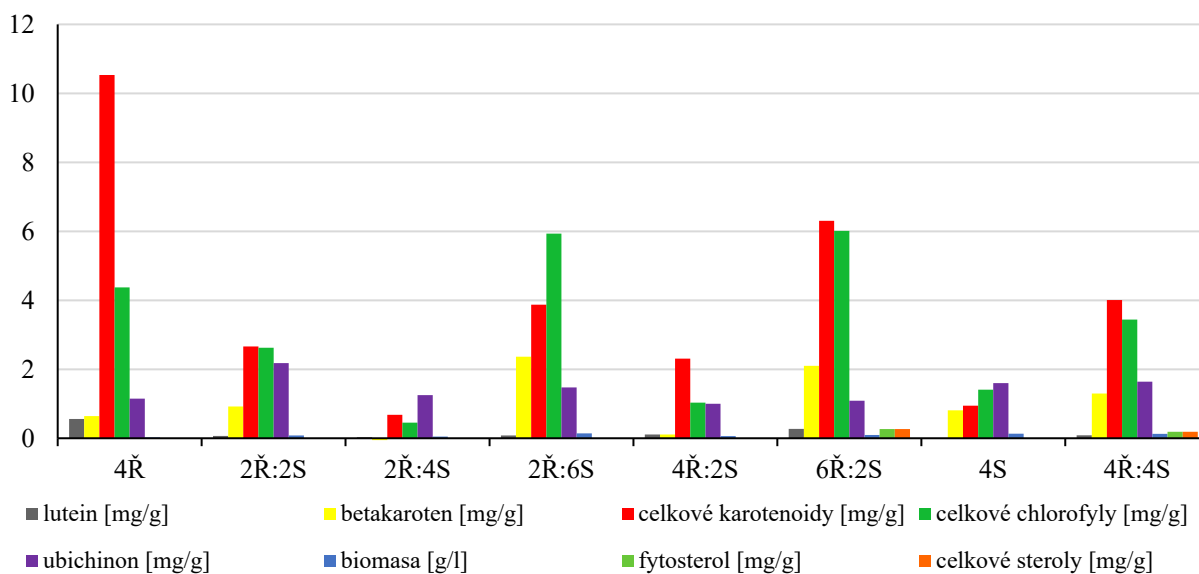
Obrázek 43: Graf závislosti produkce lipidických metabolitů v závislosti na kokultivaci sinice *Anabaena torulosa* a řasy *Coccomyxa* sp.



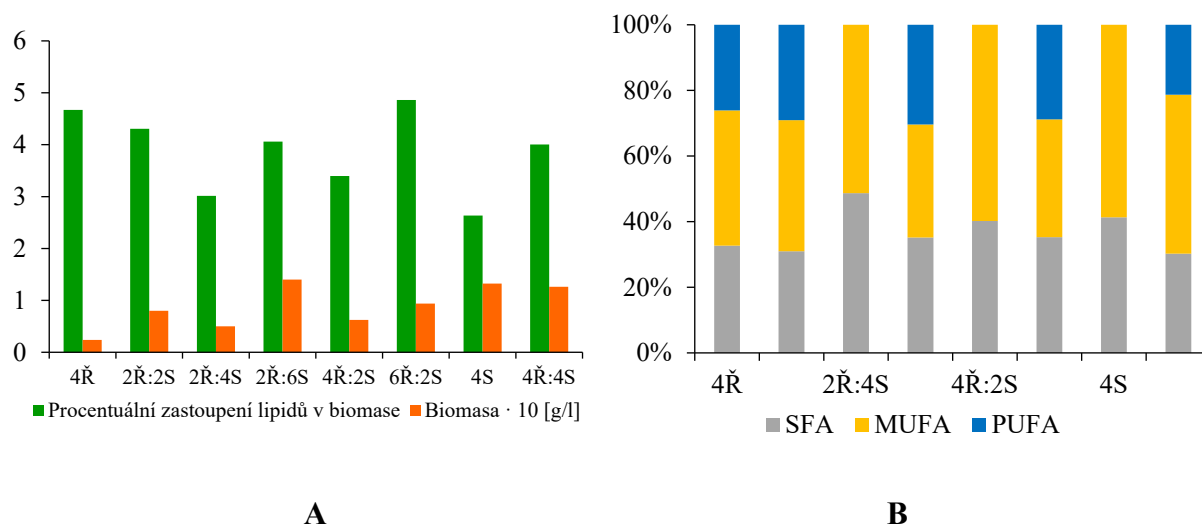
Obrázek 44: Graf procentuálního složení a zastoupení MK v závislosti na kokultivaci sinice *Anabaena torulosa* a řasy *Coccomyxa* sp.

5.3.2 *Anabaena torulosa* CCALA 3 a *Desmodesmus communis* CCALA 464

V této kokultivaci s řasou *Desmodesmus communis* můžeme vidět (Obrázek 45) rozdíl v produkci chlorofylu a celkových karotenoidů mezi vzorkem samotné řasy 4Ř a samotné sinice 4S, kdy byla produkce obou těchto metabolitů výrazně vyšší v případě řasového vzorku. Došlo zde k nejvyšší produkci celkových karotenoidů (10,53 mg/g biomasy) ze všech vzorků kokultivace. Nejvýraznější produkce chlorofylu pak byla u vzorku 2Ř:6S (5,93 mg/g biomasy) a 6Ř:2S (6,01 mg/g biomasy). Ve vzorcích 2Ř:4S, 4Ř:2S a 4S byla pak tato produkce mnohem nižší. Vysoký nárůst všech vybraných metabolitů pak lze pozorovat u vzorků 2Ř:6S, 6Ř:2S a 4Ř:4S. Produkce fytosterolu byla pozorována pouze u vzorků 6Ř:2S a 4Ř:4S. Produkce ubichinonu byla ve všech vzorcích velice podobná, nejvyšší hodnoty (2,18 mg/g biomasy) dosahovala u vzorku 2Ř:2S. Procentuální zastoupení lipidů (Obrázek 46 A) se ve všech vzorcích rovněž lišilo. Nejvyšší zastoupení (4,86 %) měl vzorek 6Ř:2S. Produkce celkové biomasy neodpovídaly procentuálnímu zastoupení lipidů, tedy větší nárůst biomasy neznamenal vyšší procento lipidické složky. Nejvyšší produkce se pohybovaly kolem hodnoty 0,13 g/l, a to pro vzorky 2Ř:6S, 4S a 4Ř:4S. Na grafu zastoupení MK (Obrázek 46 B) vidíme, že ve vzorcích s nižší produkcí lipidů nebyly zaznamenány PUFA a ostatní MK byly zastoupeny srovnatelně. MUFA byly přítomny pouze ve vzorcích s vyšší produkcí lipidů a tvořily asi 20 % této složky. V této kokultivaci byly v rámci všech vyprodukovaných metabolitů i celkové biomasy nejvýnosnější vzorky 2Ř:6S, 6Ř:2S a 4Ř:4S. Ostatní poměry řasa:sinice měly sníženou produkci, nebo neobsahovaly celé portfolio MK.



Obrázek 45: Graf závislosti produkce lipidických metabolitů v závislosti na kokultivaci sinice *Anabaena torulosa* a řasy *Desmodesmus communis*



Obrázek 46: Graf procentuálního složení a zastoupení MK v závislosti na kokultivaci sinice *Anabaena torulosa* a řasy *Scenedesmus communis*

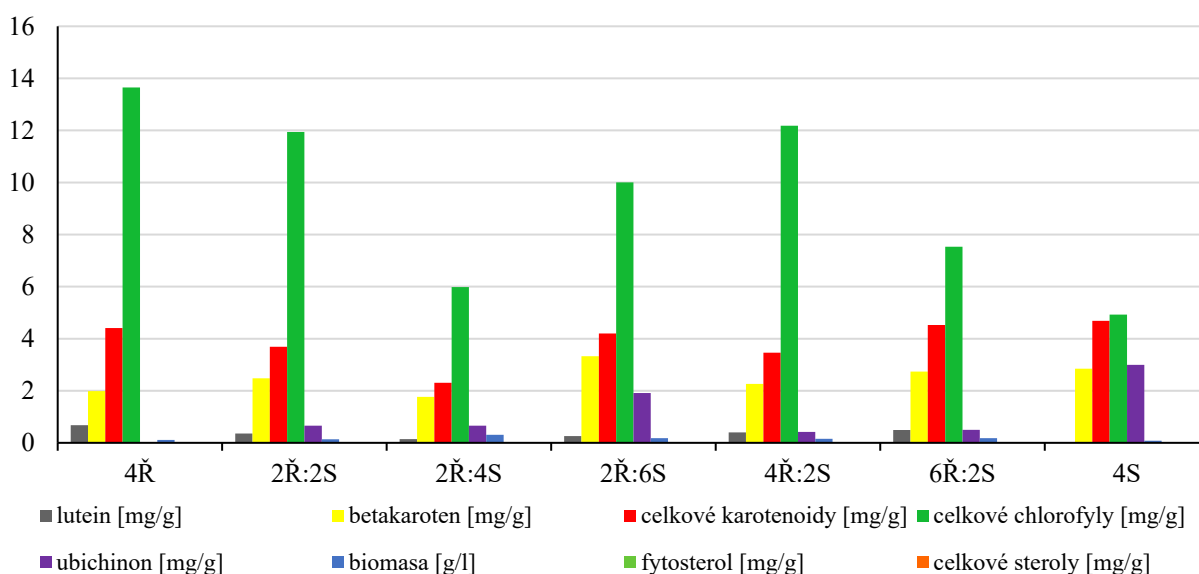
5.3.3 *Anabaena torulosa* CCALA 3 a *Scenedesmus acutus* CCALA 904

V případě této kombinace řasy a sinice byla provedena kultivace po dobu 2 týdnů a následně polovinu času. V prvním experimentu nepozorujeme (Obrázek 47) významný rozdíl v produkci celkových karotenoidů mezi jednotlivými vzorky s výjimkou vzorku 2Ř:4S, kde byla produkce znatelně nižší (2,30 mg/g biomasy). Při pohledu na chlorofyly, nelze pozorovat závislost produkce na poměru řasa: sinice. Nejvýraznější (13,65 mg/g biomasy) byla produkce čisté řasy 4S, dále pak ve vzorku 2Ř:2S a 4Ř:2S. Nejnižší produkce dosáhl vzorek čisté sinice 4S. V tomto vzorku však byla zaznamenána nejvyšší produkce (3,00 mg/g biomasy) ubiquinonu dále pak ve vzorku 2Ř:6S. Procentuální zastoupení lipidů (Obrázek 49A) se výrazně mezi vzorky nelišilo, výjimkou je však vzorek 2Ř:4S, kde byla produkce nejmenší (2,49 %). Ačkoliv byl tento vzorek v porovnání s ostatními, co se produkce metabolitů týče, nejméně výnosný, dosáhl nejvyšší produkce biomasy (0,31 g/l). Produkované metabolity v tomto experimentu nevykazují očividnou závislost na poměru řasa:sinice. Zastoupení MK (Obrázek 50A) je ve všech vzorcích srovnatelné se přibližně stejným zastoupením všech MK případně s mírně vyšším zastoupením MUFA.

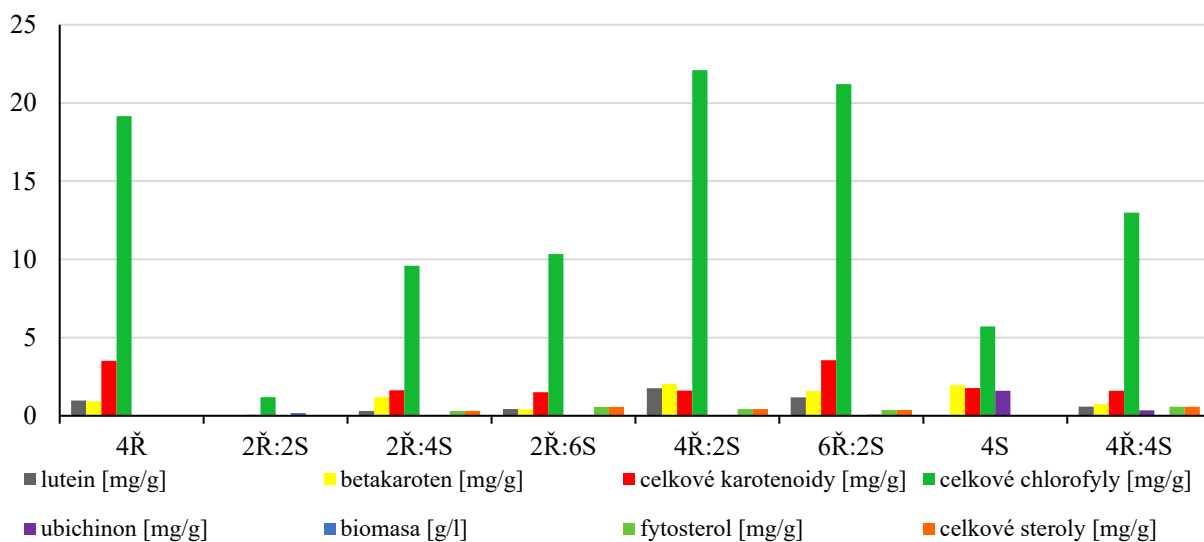
Vzorek pro analýzu lipidů a MK byl pro 4S vylit, pro zopakování extrakce nebyla pro tento vzorek další biomasa, vzorek tedy není ve výsledcích lipidů a MK zahrnut. Ve druhém experimentu trvajícím 1 týden lze z grafu (Obrázek 48) na první pohled vidět zvýšenou produkci chlorofylu ve vzorcích 4Ř, 4Ř:2S a 6Ř:2S, tedy ve vzorcích s vyšším zastoupením řasy v poměru řasa: sinice. Nejnižší produkci pozorujeme ve vzorcích 2Ř:2S a 4S. Největší nárůst chlorofylu (22,09 mg/g biomasy) měl vzorek 4Ř:2S. Ve vzorcích s vyšším zastoupením řasy také pozorujeme nejvyšší produkci luteinu. Celkové karotenoidy byly nejvíce produkovány (3,55 mg/g biomasy) ve vzorku 6Ř:2S méně pak ve vzorku 4Ř. Produkce fytosterolu byla pozorována hlavně u vzorků 2Ř:6S a 4Ř:4S. Lze tedy pozorovat zvýšené produkce určitých metabolitů ve vzorcích s vyšším zastoupením řasy v poměru řasa:sinice.

Tento trend však není patrný z pohledu procentuálního zastoupení lipidů v biomase (Obrázek 49 B). Produkce se pohybují v přibližně stejném rozsahu s výjimkou vzorku 2Ř:2S, kde je produkce výrazně nižší (1,69 %), dále pak u vzorků 4Ř:2S a 4Ř:4S, kde byla produkce naopak mírně vyšší. Podobně jako v experimentu 1, kde vzorek 2Ř:4S produkující nejmenší množství metabolitu, měl nejvyšší biomasu, tak i v tomto experimentu měl vzorek s nejnižší produkcí metabolitů 2Ř:2S nejvyšší nárůst biomasy. Zastoupení MK v lipidické složce (Obrázek 50 B) je zde pro všechny vzorky srovnatelné, kdy nejméně jsou zastoupeny MUFA a nejvíce PUFA.

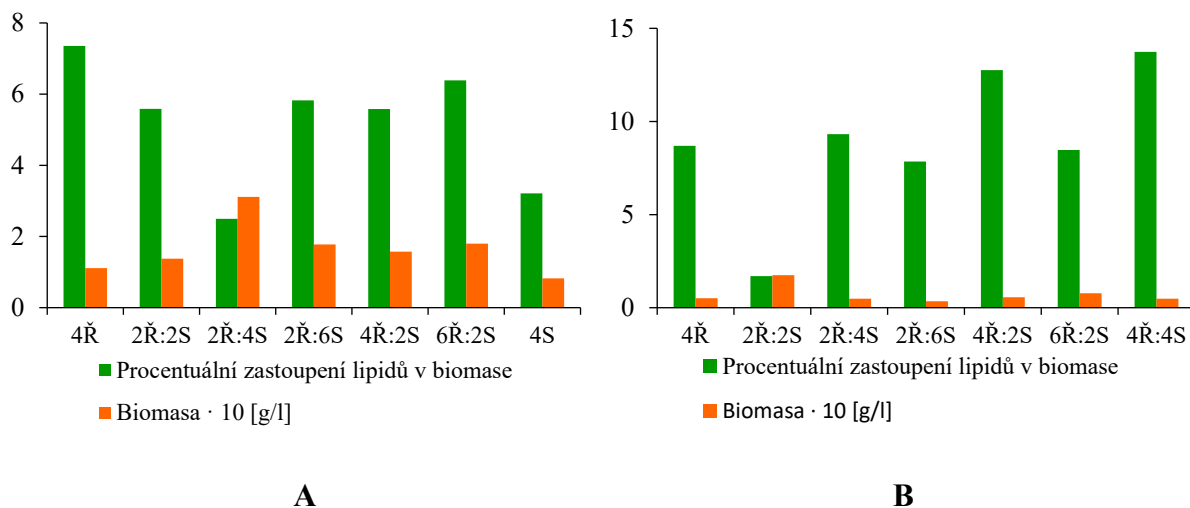
Při srovnání obou experimentů není na první pohled vidět podobnost. Obecně se však dá říct, že vyšších produkcí metabolitů dosahují vzorky s vyšším zastoupením řasy v poměru řasa:sinice. Dále byla nejvyšší produkce ubiquinonu naměřena u vzorku čisté sinice 4S. Procentuální zastoupení lipidů nemělo mezi jednotlivými vzorky v obou experimentech výrazné rozdíly a nedržely se jasného trendu. V obou případech však byla pozorována nejnižší produkce všech metabolitů ve vzorcích s nejvyšším nárůstem biomasy. Zastoupení mastných kyselin se mezi oběma experimenty lišilo převážně v zastoupení MUFA, kdy se poměr MUFA na úkor PUFA zvýšil s delší dobou kultivace.



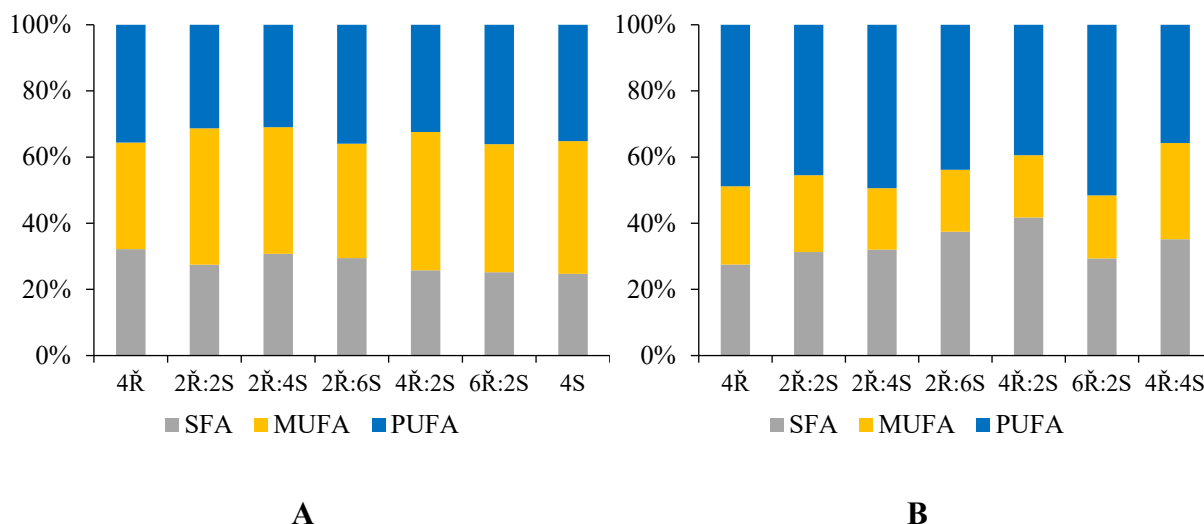
Obrázek 47: Graf závislosti produkce lipidických metabolitů v závislosti na kokultivaci sinice *Anabaena torulosa* a řasy *Scenedesmus acutus* po dobu 2 týdnů



Obrázek 48: Graf závislosti produkce lipidických metabolitů v závislosti na kokultivaci sinice *Anabaena torulosa* a řasy *Scenedesmus acutus* po dobu 1 týdne



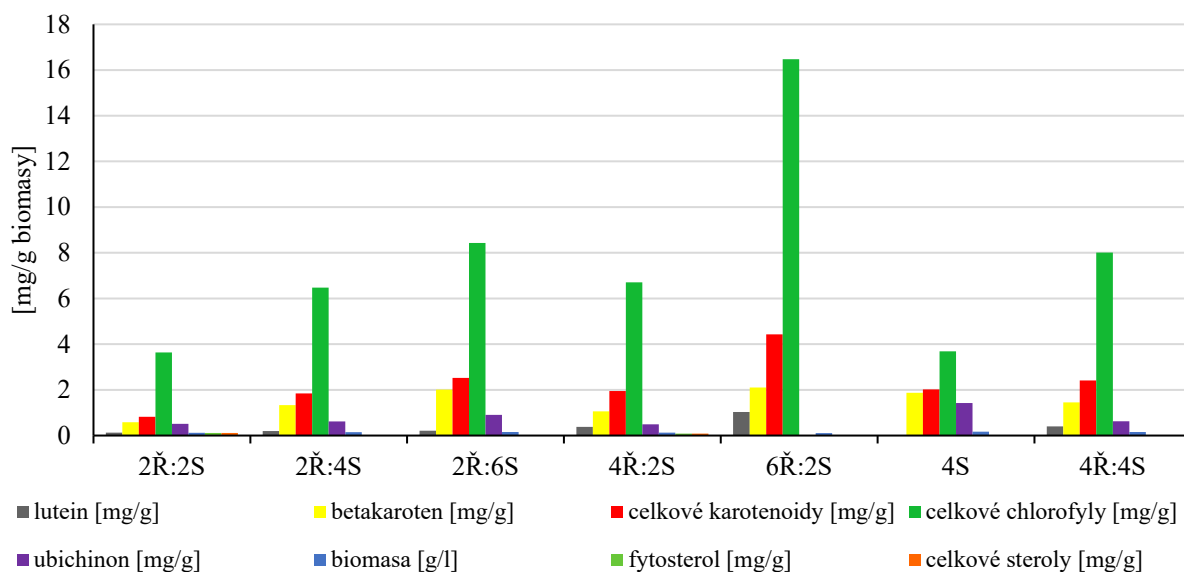
Obrázek 49: Graf procentuálního zastoupení lipidů v závislosti na kokultivaci sinice *Anabaena torulosa* a řasy *Scenedesmus acutus* po dobu 2 týdnů (A) a 1 týdne (B)



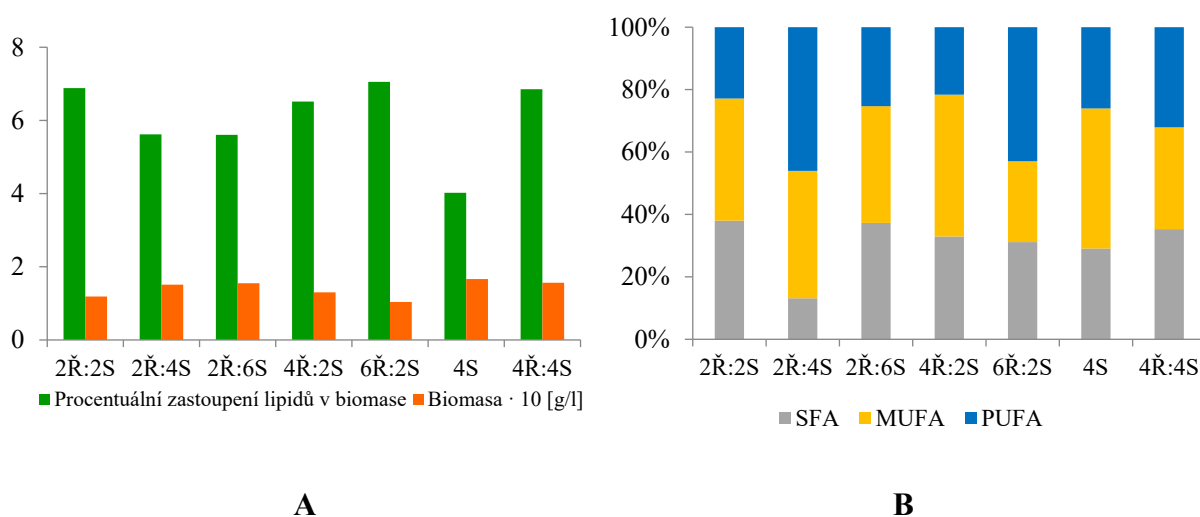
Obrázek 50: Graf procentuálního složení MK lipidické složky pro kokultivaci sinice *Anabaena torulosa* a řasy *Scenedesmus acutus* po dobu 2 týdnů (A) a 1 týdne (B)

5.3.4 *Anabaena torulosa* CCALA 3 a *Scenedesmus obliquus* CCALA 455

Tato kultivace probíhala po dobu 2 týdnů. Vzorek čisté řasy 4Ř byl kontaminován a uhynul. Na rozdíl od předchozích kultivací nejsou pozorovány (Obrázek 51) žádné významné rozdíly v produkci chlorofylu mezi jednotlivými vzorky s výjimkou vzorku 6Ř:2S, kde téměř dvojnásobného množství (16,48 mg/g biomasy) ve srovnání s většinou vzorků. Také produkce celkových karotenoidů (4,43 mg/g biomasy) je v tomto vzorku nejvýraznější. Vzorek s nejmenší produkcí těchto metabolitů 2Ř:2S. Nejvyšší produkce ubichinonu (1,42 mg/g biomasy) byla pozorována u vzorku samotné sinice 4S, naopak samotná řasa má produkci téměř nulovou. Obdobně na tom je vzorek 6Ř:2S. Z pohledu biomasy (Obrázek 52 A) nebyla produkce nijak výrazně ovlivněna poměrem řasa:sinice, nejnižší nárůst byl ve vzorcích 2Ř:2S a 6Ř:2S. Z toho lze usoudit že vyšší zastoupení sinice v poměru řasa:sinice přispělo k vyšší produkci biomasy. Procentuální zastoupení lipidů se také ve všech vzorcích pohybuje v malém rozmezí, výjimku dělá vzorek 4S, kde byla produkce o poznání nižší (4,02 %). Zastoupení MK (Obrázek 52 B) se sice výrazně neliší, nelze však říci, že je ve všech vzorcích srovnatelné. Například ve vzorku 2Ř:4S byla produkce SFA výrazně nižší ve prospěch PUFA. Kromě tohoto vzorku a vzorku 6Ř:2S byly nejméně zastoupeny právě PUFA. Ostatní mastné kyseliny byly zastoupeny přibližně stejně.



Obrázek 51: Graf závislosti produkce lipidických metabolitů v závislosti na kokultivaci sinice *Anabaena torulosa* a řasy *Scenedesmus obliquus*

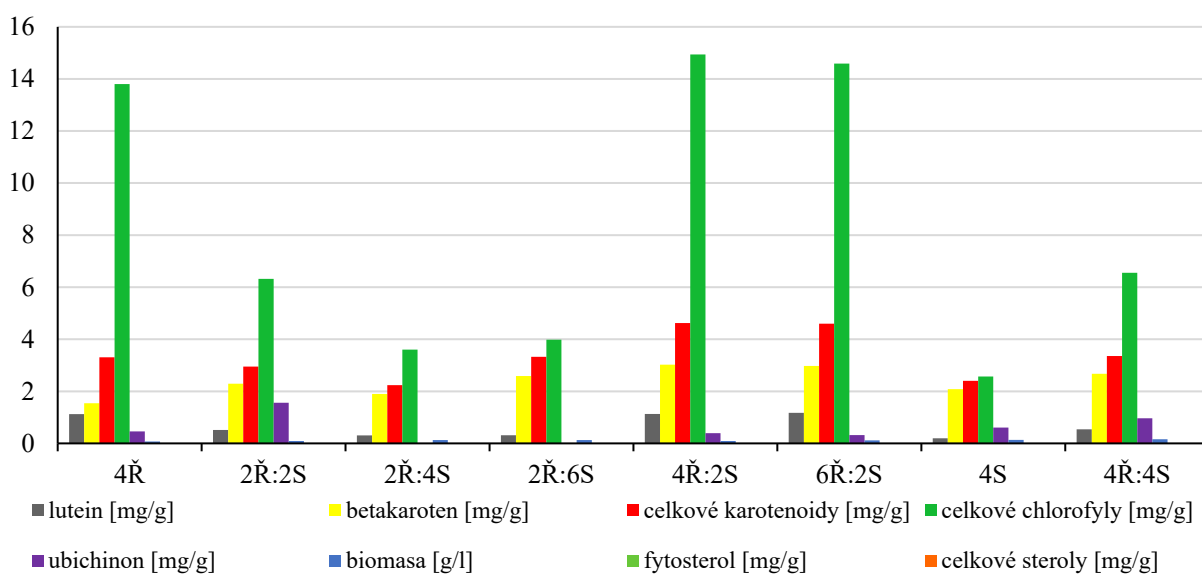


Obrázek 52: Graf procentuálního složení MK lipidické složky pro kokultivaci sinice *Anabaena torulosa* a řasy *Scenedesmus obliquus*

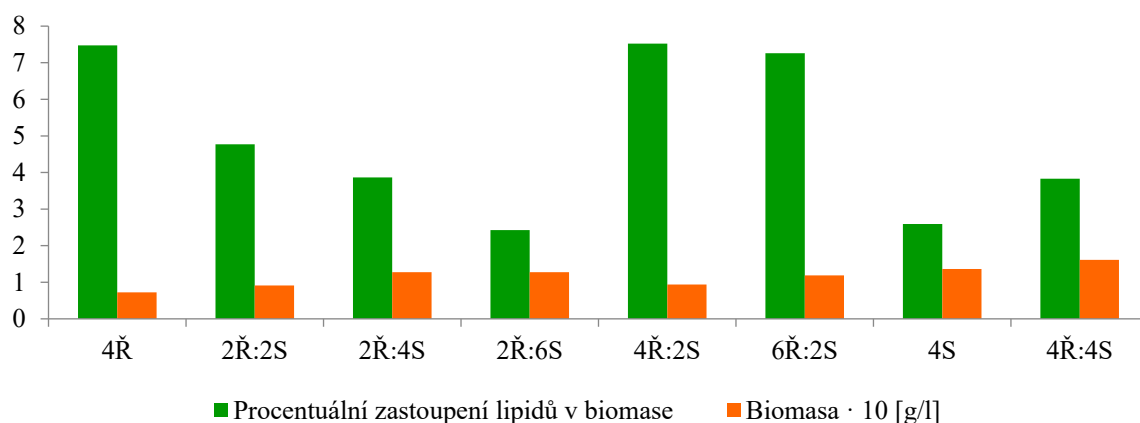
5.3.5 *Spirulina* CCALA 28 a *Scenedesmus obliquus* CCALA 455

V tomto experimentu byla na rozdíl od ostatních vybrána sinice *Spirulina*. Ze screeningových kultivací řas na *Spirulina* médiu byla následně vybrána řasa *Scenedesmus obliquus*, jejíž růst byl sice pomalejší, avšak byla schopná v tomto médiu přežít. Tato kokultivace probíhala po dobu 1 týdne. Již na první pohled je patrné (Obrázek 53), že vzorky mající větší zastoupení řasy v poměru řasa: sinice, produkovaly výrazně více chlorofylu. Nejvyšší hodnoty (14,94 mg/g biomasy) dosáhl vzorek 4Ř:2S. Ve vzorcích 4Ř:2S a 6Ř:2S došlo také k nejvyšší produkci celkových karotenoidů a něco méně pak ve vzorku 4Ř a 4Ř:4S. Pro produkci ubichinonu byl nejvhodnější vzorek 2Ř:2S (1,56 mg/g biomasy) a pak také 4Ř:4S. Podobně jako v případě chlorofylů, bylo procentuální zastoupení lipidů (Obrázek 54) nejvyšší

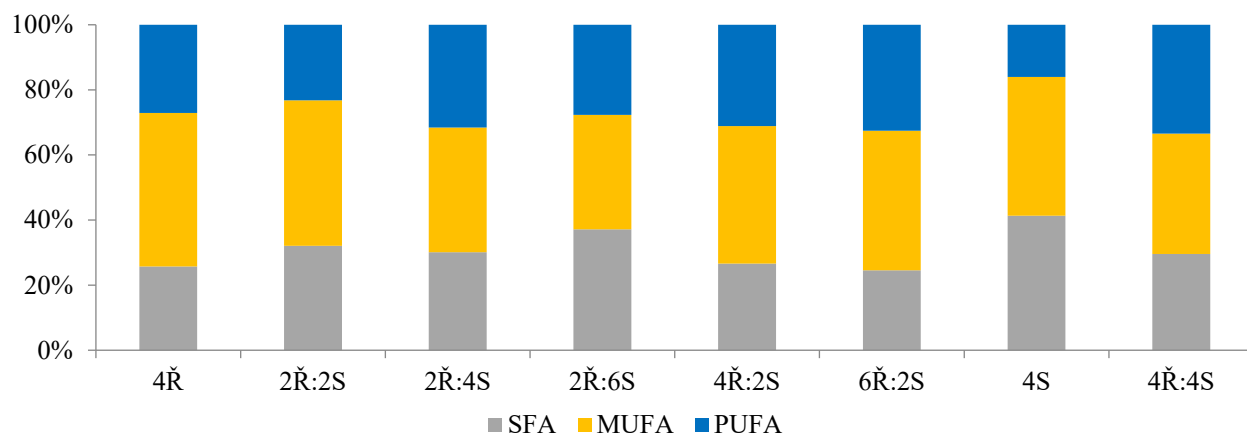
ve vzorcích s vyšším zastoupením řasy v poměru řasa:sinice. Nejvíce lipidů (7,52 %) bylo pozorováno u vzorku 4Ř:2S. S roustoucím zastoupením sinice v poměru řasa:sinice pak docházelo zpravidla k úbytku produkce lipidů, naopak rostla produkce celkové biomasy. Největší produkce (0,16 g/l) byla zaznamenána u vzorku 4Ř:4S. Z těchto skutečností je patrné, že pro vyšší produkci všech metabolitů jsou vhodnější vzorky s vyšším zastoupením řasy v poměru řasa: sinice, tedy ve vzorcích 4Ř:2S a 6Ř:2S. V této kokultivace se mezi jednotlivými vzorky nijak zásadně zastoupení MK (Obrázek 55) v lipidické složce. Nejvíce byly zpravidla zastoupeny MUFA a nejméně PUFA. Ve vzorku čisté sinice 4S bylo zastoupení PUFA ze všech vzorků nejnižší.



Obrázek 53: Graf závislosti produkce lipidických metabolitů v závislosti na kokultivaci sinice *Spirulina* a řasy *Scenedesmus obliquus*



Obrázek 54: Graf procentuálního zastoupení lipidů v závislosti na kokultivaci sinice *Spirulina* a řasy *Scenedesmus obliquus*



Obrázek 55: Graf procentuálního složení MK lipidické složky pro kokultivaci sinice *Spirulina* a řasy *Scenedesmus obliquus*

6 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byly sledovány vlivy vybraných stresových faktorů na produkci metabolitů produkované pomocí mikrořas a sinic. Řasy použité v tomto experimentu byly *Desmodesmus armatus*, *Desmodesmus velitaris*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella cf. minutissima*, *Coccomyxa sp.*, *Scenedesmus acutus* a *Scenedesmus obliquus*. Ze sinic byly vybrány *Anabaena torulosa* a *Spirulina*. Použité stresové faktory byly kultivace na BBM a Spirulina médiu, přítomnost různých koncentrací kobaltu v médiu, vliv přítomnosti různých koncentrací kávového a použitého fritovacího oleje a v neposlední řadě vliv kokultivace řasové a sinicové kultury. Ve vzorcích byla sledována produkce biomasy a produkovaných metabolitů v závislosti na aplikovaný stres. Mezi sledované metabolity se řadily chlorofyly, xanthiny, lutein, β -karoten a další karotenoidy, fytosterol, ubichinom, lipidy v jejichž rámci bylo také sledováno zastoupení MK.

V prvních experimentech byly vzorky kultivovány na BBM a Spirulina médiu současně za přítomnosti různých koncentrací kobaltu. Během doby kultivace, která se pro každou řasu lišila podle doby nárůstu biomasy, ve většině případech kultury řas na Spirulina médiu nepřežily. Také vyšší koncentrace kobaltu v médiu působily na řasy nepříznivě, a většinou přežily pouze vzorky na koncentraci 0,1 mmol/l kobaltu. V případě sinice *Spirulina* vzorky přežily na obou typech média, zároveň na Spirulina médiu přežily i koncentraci 0,2 mmol/l kobaltu. V produkci karotenoidů a chlorofylů byla nejproduktivnější řasa *Scenedesmus acutus*. Pro vzorek kultivovaný na BBM médiu bez přítomnosti kobaltu dosahovala produkce chlorofylu 44,18 mg/g biomasy a celkových karotenoidů 28,80 mg/g biomasy. Ze všech kultur dosáhly také nejvyšší produkce lipidů a to kolem 10 %. U řasy *Desmodesmus velitaris* zapříčinila přítomnost kobaltu v médiu vyšší produkci ubichinonu. Nejvíce při tomto experimentu prospívala sinice *Spirulina*, která zvládala kultivaci na obou médiích a zároveň snášela i přítomnost kobaltu v médiu. Narostlá biomasa byla pro všechny kultury ke konci kultivace srovnatelná, díky měření růstové křivky všech vzorků.

V dalším experimentu byly řasy a sinice kultivovány v přítomnosti různých koncentrací fritovacího a kávového oleje. Tento experiment sloužil zejména ke zjištění, zda-li jsou řasy schopné v přítomnosti oleje přežít a byl použit jako pilotní krok pro budoucí experimenty. Jelikož bylo nutné zajistit eliminaci co nejvíce negativních vlivů na kultivaci, byly do těchto vzorků přidány antibiotika a antimykotika. Ve všech kultivacích docházelo k tvorbě emulze oleje ve vodě, což v některých médiích mohlo působit negativně na průnik světelného záření do média. Také tmavá barva kávového oleje mohla hrát nepříznivou roli v těchto kultivacích. Při kultivaci řasy *Desmodesmus armatus* byla pozorována snížená produkce chlorofylů a celkových karotenoidů v médiích s kávovým olejem. Produkce ubichinonu byla nejvyšší pro oba oleje o nejnižší koncentraci. Na kávovém oleji byly však více produkovány lipidické látky. Řasa *Desmodesmus communis* rovněž zaznamenala pokles produkce chlorofylů a karotenoidů na kávovém oleji. Ze všech vzorků však v přítomnosti nižších koncentrací fritovacího oleje produkovala nejvíce ubichinonu a to až 11,07 mg/g biomasy.

Na rozdíl od předchozích případů byla pro řasu *Scenedesmus acutus* produkce chlorofylů a celkových karotenoidů nižší ve vzorcích kultivovaných na fritovacím oleji. Vliv tvorby emulze byl v tomto případě negativní na produkci těchto látek. Ve většině vzorků všech řas a sinic došlo při snížení produkce karotenoidů ke zvýšení produkce lipidů a naopak. Při kultivaci řasy *Clamydomonas reinhardtii* byla ve všech vzorcích v přítomnosti oleje snížená produkce chlorofylů a karotenoidů. Vzorky na vyšších koncentracích oleje však nabývaly nejvyššího zastoupení lipidů ze všech experimentů, a to více než 40 %. Obdobně jako v případě řasy *Scenedesmus acutus*, byla i v případě řasy *Chlorella cf. minutissima* snížená produkce chlorofylů a karotenoidů ve vzorcích s fritovacím olejem. Sinice *Anabaena torulosa* byla jediný případ, kdy kultura nepřežila v kávovém oleji. Produkce metabolitů odpovídala trendu v předchozích experimentech. V případě této sinice bylo však provedeno měření lipázové aktivity, která potvrdila přítomnost extracelulárních lipáz s poměrně vysokou lipázovou aktivitou. Zastoupení mastných kyselin ve vzorcích odpovídalo profilu mastných kyselin fritovacího a kávového oleje. Tyto experimenty potvrdily, že testované kmeny řas a sinic, s výjimkou kmene *Anabaena torulosa*, byly z hlediska utilizace olejů schopny částečně mixotrofního života a asimilovaly mastné kyseliny přítomné v olejích do své biomasy.

V návaznosti na první experiment byly prováděny kokultivace řas a sinic. Cílem bylo zjistit vliv kokultivace na produkovanou biomasu a metabolitů. Pokud se zaměříme na všechny kokultivační experimenty dohromady nenajdeme jednotný trend pro produkci metabolitů ani biomasy. Mezi jednotlivými kokultivacemi již můžeme najít jisté podobnosti a sice zvýšenou produkci metabolitů při vyšším zastoupení řasy v poměru řasa:sinice. Tuto skutečnost můžeme pozorovat při kokultivaci sinice *Anabaena torulosa* s řasou *Scenedesmus acutus* kultivovaném po dobu jednoho týdne a sinice *Spirulina* a řasy *Scenedesmus obliquus*. Z těchto experimentů je tedy patrné, že kokultivace v určitých poměrech může vést ke zvýšené produkci metabolitů a lipidických látek, neplatí tomu však ve všech případech. Dále bylo potvrzeno, že vybrané páry sinice a řasa jsou spolu schopny koexistovat a tyto informace budou využity v navazujících pracích.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] GUALTIERI, Paolo a L. BARSANTI. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. ISBN 978-0849314674.
- [2] BOROWITZKA, , Michael A., John BEARDALL a John RAVEN. *The Physiology of Microalgae*. Imprint: Springer, 2016. ISBN 978-3-319-24945-2.
- [3] DOUGLAS, Susan, A. LARKUM a John RAVEN. *Photosynthesis in algae*. Boston: Kluwer Academic, 2003. ISBN 0792363337.
- [4] KHATTAR, J., D. SINGH a Gurpreet KAUR. *Algal biology and biotechnology*. New Delhi: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., 2009. ISBN 9789380026190.
- [5] PARMAR, Asha, Niraj SINGH, Ashok PANDEY, Edgard GNANSOUNOU a Datta MADAMWAR. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology* [online]. 2011, **102**(22), 10163-10172 [cit. 2021-06-02]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2011.08.030
- [6] CARR, N. a Brian WHITTON. *The Biology of cyanobacteria*. Berkeley: University of California Press, 1982. ISBN 0520047176.
- [7] WHITTON, Brian a Malcolm POTTS. Introduction to the Cyanobacteria. WHITTON, Brian A., ed., Brian WHITTON. *Ecology of Cyanobacteria II* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012, s. 1-13 [cit. 2021-06-02]. ISBN 978-94-007-3854-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-007-3855-3_1
- [8] MARKOU, Giorgos, Dries VANDAMME a Koenraad MUYLAERT. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research* [online]. 2014, **65**, 186-202 [cit. 2022-05-10]. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2014.07.025
- [9] YOUSUF, Abu. Fundamentals of Microalgae Cultivation. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production* [online]. Elsevier, 2020, s. 1-9 [cit. 2022-05-10]. ISBN 9780128175361. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-817536-1.00001-1
- [10] ZUCCARO, Gaetano, Abu YOUSUF, Antonino POLLIO a Jean-Philippe STEYER. Microalgae Cultivation Systems. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production* [online]. Elsevier, 2020, s. 11-29 [cit. 2022-05-10]. ISBN 9780128175361. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-817536-1.00002-3
- [11] PEREIRA, Leonel a Joao NETO, ed. *Marine Algae* [online]. CRC Press, 2014 [cit. 2022-05-09]. ISBN 9781466581814. Dostupné z: doi:10.1201/b17540

- [12] AN, S., T. FRIEDL a E. HEGEWALD. Phylogenetic Relationships of Scenedesmus and Scenedesmus-like Coccoid Green Algae as Inferred from ITS-2 rDNA Sequence Comparisons. *Plant Biology* [online]. 1999, **1**(4), 418-428 [cit. 2022-05-10]. ISSN 1435-8603. Dostupné z: doi:10.1111/j.1438-8677.1999.tb00724.x
- [13] HEGEWALD, Eberhard a Anke BRABAND. A taxonomic revision of Desmodesmus serie Desmodesmus (Sphaeropleales, Scenedesmaceae). *Fottea* [online]. 2017, **17**(2), 191-208 [cit. 2022-05-10]. ISSN 18025439. Dostupné z: doi:10.5507/fot.2017.001
- [14] HARRIS, Elizabeth H. C HLAMYDOMONAS AS A M ODEL O RGANISM. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* [online]. 2001, **52**(1), 363-406 [cit. 2022-05-10]. ISSN 1040-2519. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.arplant.52.1.363
- [15] PROSCHOLD, T. Molecular Phylogeny and Taxonomic Revision of (Chlorophyta). I. Emendation of Ehrenberg and Gobi, and Description of gen. nov. and gen. nov. *Protist* [online]. 2001, **152**(4), 265-300 [cit. 2022-05-10]. ISSN 14344610. Dostupné z: doi:10.1078/1434-4610-00068
- [16] KRIENITZ, Lothar, Volker HUSS a Christina BOCK. Chlorella: 125 years of the green survivalist. *Trends in Plant Science* [online]. 2015, **20**(2), 67-69 [cit. 2022-05-09]. ISSN 13601385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2014.11.005
- [17] BOCK, Christina, Lothar KRIENITZ a Thomas PRÖSCHOLD. Taxonomic reassessment of the genus Chlorella (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea* [online]. 2011, **11**(2), 293-312 [cit. 2022-05-09]. ISSN 18025439. Dostupné z: doi:10.5507/fot.2011.028
- [18] DARIENKO, Tatyana, Lydia GUSTAVS, Anja EGGERT, Wiebke WOLF, Thomas PRÖSCHOLD a Diego FONTANETO. Evaluating the Species Boundaries of Green Microalgae (Coccomyxa, Trebouxiophyceae, Chlorophyta) Using Integrative Taxonomy and DNA Barcoding with Further Implications for the Species Identification in Environmental Samples. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(6) [cit. 2022-05-10]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0127838
- [19] FUENTES, Juan, Volker HUSS, Zaida MONTERO, Rafael TORRONTERAS, María CUARESMA, Inés GARBAYO a Carlos VÍLCHEZ. Phylogenetic characterization and morphological and physiological aspects of a novel acidotolerant and halotolerant microalga Coccomyxa onubensis sp. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Journal of Applied Phycology* [online]. 2016, **28**(6), 3269-3279 [cit. 2022-05-10]. ISSN 0921-8971. Dostupné z: doi:10.1007/s10811-016-0887-3
- [20] WU, Qinghua, Lian LIU, Anca MIRON, Blanka KLÍMOVÁ, Dan WAN a Kamil KUČA. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an

- overview. *Archives of Toxicology* [online]. 2016, **90**(8), 1817-1840 [cit. 2022-05-09]. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-016-1744-5
- [21] CAMPANELLA, L., G. CRESCENTINI a P. AVINO. Chemical composition and nutritional evaluation of some natural and commercial food products based on *Spirulina*. *Analisis* [online]. 1999, **27**(6), 533-540 [cit. 2022-05-10]. ISSN 0365-4877. Dostupné z: doi:10.1051/analisis:1999130
- [22] GOIRIS, Koen, Willem VAN COLEN, Isabel WILCHES, Fabián LEÓN-TAMARIZ, Luc DE COOMAN a Koenraad MUYLAERT. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. *Algal Research* [online]. 2015, **7**, 51-57 [cit. 2021-06-02]. ISSN 22119264. Dostupné z: doi:10.1016/j.algal.2014.12.002
- [23] CIRULIS, Judith, J. SCOTT a Gregory ROSS. Management of oxidative stress by microalgae. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* [online]. 2013, **91**(1), 15-21 [cit. 2021-06-02]. ISSN 0008-4212. Dostupné z: doi:10.1139/cjpp-2012-0249
- [24] FOGG, G. E. Algal Adaptation to Stress — Some General Remarks. RAI, Lal Chand a Jai Prakash GAUR, ed., Lal RAI, Jai GAUR. *Algal Adaptation to Environmental Stresses* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001, s. 1-19 [cit. 2022-05-10]. ISBN 978-3-642-63996-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-59491-5_1
- [25] PINTO, Ernani, Teresa SIGAUD-KUTNER, Maria LEITAO, Oswaldo OKAMOTO, David MORSE a Pio COLEPICOLO. HEAVY METAL-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN ALGAE1. *Journal of Phycology* [online]. 2003, **39**(6), 1008-1018 [cit. 2022-05-10]. ISSN 0022-3646. Dostupné z: doi:10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x
- [26] ZHAO, Peng, Xuya YU, Junjun LI, Xianhua TANG a Zunxi HUANG. Enhancing lipid productivity by co-cultivation of *Chlorella* sp. U4341 and *Monoraphidium* sp. FXY-10. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2014, **118**(1), 72-77 [cit. 2021-06-02]. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiosc.2013.12.014
- [27] ISHIKA, Tasneema, Navid MOHEIMANI a Parisa BAHRI. Sustainable saline microalgae co-cultivation for biofuel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2017, **78**, 356-368 [cit. 2021-06-02]. ISSN 13640321. Dostupné z: doi:10.1016/j.rser.2017.04.110
- [28] RASHID, Naim, Ae RYU, Ki JEONG, Bongsoo LEE a Yong-Keun CHANG. Co-cultivation of two freshwater microalgae species to improve biomass productivity and biodiesel production. *Energy Conversion and Management* [online]. 2019, **196**, 640-648 [cit. 2021-06-02]. ISSN 01968904. Dostupné z: doi:10.1016/j.enconman.2019.05.106
- [29] PLEISSNER, Daniel a Carol LIN. Valorisation of food waste in biotechnological

- processes. *Sustainable Chemical Processes* [online]. 2013, **1**(1) [cit. 2022-05-10]. ISSN 2043-7129. Dostupné z: doi:10.1186/2043-7129-1-21
- [30] SZOTKOWSKI, Martin, Dana BYRTUSOVA, Andrea HARONIKOVA, Marie VYSOKA, Marek RAPTA, Volha SHAPAVAL a Ivana MAROVA. Study of Metabolic Adaptation of Red Yeasts to Waste Animal Fat Substrate. *Microorganisms* [online]. 2019, **7**(11) [cit. 2022-05-10]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms7110578
- [31] ORTHOEFER, Frank a Gary LIST. Evaluation of Used Frying Oil. *Deep Frying* [online]. Elsevier, 2007, s. 329-342 [cit. 2022-05-09]. ISBN 9781893997929. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-893997-92-9.50024-4
- [32] CHOE, E. a D.B. MIN. Chemistry of Deep-Fat Frying Oils. *Journal of Food Science* [online]. 2007, **72**(5), 77-86 [cit. 2022-05-09]. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00352.x
- [33] SANLI, Huseyin, Mustafa CANAKCI a Ertan ALPTEKIN. *Characterization of Waste Frying Oils Obtained from Different Facilities* [online]. In: . s. 479-485 [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: doi:10.3384/ecp11057479
- [34] MCNUTT, Josiah a Quan HE. Spent coffee grounds: A review on current utilization. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [online]. 2019, **71**, 78-88 [cit. 2022-05-09]. ISSN 1226086X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jiec.2018.11.054
- [35] KHAN, N. a J. BROWN. The composition of coffee oil and its component fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 1953, **30**(12) [cit. 2022-05-09]. ISSN 0003021X. Dostupné z: doi:10.1007/BF02640975
- [36] CAMPOS-VEGA, Rocio, Guadalupe LOARCA-PIÑA, Haydé VERGARA-CASTAÑEDA a B. OOMAH. Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2015, **45**(1), 24-36 [cit. 2022-05-09]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2015.04.012
- [37] KOVALCIK, Adriana, Stanislav OBRUCA a Ivana MAROVA. Valorization of spent coffee grounds: A review. *Food and Bioproducts Processing* [online]. 2018, **110**, 104-119 [cit. 2022-05-09]. ISSN 09603085. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbp.2018.05.002
- [38] VOET, Donald, Judith VOET a Charlotte PRATT. *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*. 3rd ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2008. ISBN 978-0470129302.
- [39] BABA, Masato a Yoshihiro SHIRAIW. Biosynthesis of Lipids and Hydrocarbons in Algae. DUBINSKY, Zvy, ed., Zvy DUBINSKY. *Photosynthesis* [online]. InTech, 2013

- [cit. 2022-05-10]. ISBN 978-953-51-1161-0. Dostupné z: doi:10.5772/56413
- [40] SANTOS, Ana a Giulio PRETA. Lipids in the cell: organisation regulates function. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2018, **75**(11), 1909-1927 [cit. 2022-05-10]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-018-2765-4
- [41] DE CARVALHO, Carla a Maria CARAMUJO. The Various Roles of Fatty Acids. *Molecules* [online]. 2018, **23**(10) [cit. 2022-05-10]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23102583
- [42] QIU, Xiao, Xi XIE a Dauenpen MEESAPYODSUK. Molecular mechanisms for biosynthesis and assembly of nutritionally important very long chain polyunsaturated fatty acids in microorganisms. *Progress in Lipid Research* [online]. 2020, **79** [cit. 2022-05-10]. ISSN 01637827. Dostupné z: doi:10.1016/j.plipres.2020.101047
- [43] JOSHI, Anil, Vangipuram RANGAN, Andrzej WITKOWSKI a Stuart SMITH. Engineering of an Active Animal Fatty Acid Synthase Dimer with Only One Competent Subunit. *Chemistry & Biology* [online]. 2003, **10**(2), 169-173 [cit. 2022-05-10]. ISSN 10745521. Dostupné z: doi:10.1016/S1074-5521(03)00023-1
- [44] STANGE, Claudia, ed. *Carotenoids in Nature* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2016 [cit. 2021-06-02]. Subcellular Biochemistry. ISBN 978-3-319-39124-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-39126-7
- [45] LANGI, Panagiota, Sotirios KIOKIAS, Theodoros VARZAKAS a Charalampos PROESTOS. Carotenoids: From Plants to Food and Feed Industries. BARREIRO, Carlos a José-Luis BARREDO, ed., Carlos BARREIRO, José-Luis BARREDO. *Microbial Carotenoids* [online]. New York, NY: Springer New York, 2018, s. 57-71 [cit. 2021-06-02]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-8741-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-8742-9_3
- [46] ZAKYNTHINOS, G a T VARZAKAS. Carotenoids: From Plants to Food Industry. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal* [online]. 2016, **4**(1), 38-51 [cit. 2021-06-02]. ISSN 2347467X. Dostupné z: doi:10.12944/CRNFSJ.4.Special-Issue1.04
- [47] KIOKIAS, S., C PROESTOS a T VARZAKAS. A Review of the Structure, Biosynthesis, Absorption of Carotenoids-Analysis and Properties of their Common Natural Extracts. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal* [online]. 2016, **4**(1), 25-37 [cit. 2022-05-10]. ISSN 2347467X. Dostupné z: doi:10.12944/CRNFSJ.4.Special-Issue1.03
- [48] LIAO, Pan, Andréa HEMMERLIN, Thomas BACH a Mee-Len CHYE. The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production. *Biotechnology Advances* [online]. 2016, **34**(5), 697-713 [cit. 2022-05-10]. ISSN 07349750. Dostupné z:

doi:10.1016/j.biotechadv.2016.03.005

- [49] CHANDRAN, Sunil, James KEALEY a Christopher REEVES. Microbial production of isoprenoids. *Process Biochemistry* [online]. 2011, **46**(9), 1703-1710 [cit. 2022-05-10]. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2011.05.012
- [50] ZINGLÉ, Catherine, Lionel KUNTZ, Denis TRITSCH, Catherine GROSDÉMANGE-BILLIARD a Michel ROHMER. Isoprenoid Biosynthesis via the Methylerythritol Phosphate Pathway: Structural Variations around Phosphonate Anchor and Spacer of Fosmidomycin, a Potent Inhibitor of Deoxyxylulose Phosphate Reductoisomerase. *The Journal of Organic Chemistry* [online]. 2010, **75**(10), 3203-3207 [cit. 2022-05-10]. ISSN 0022-3263. Dostupné z: doi:10.1021/jo9024732
- [51] EISENREICH, W., A. BACHER, D. ARIGONI a F. ROHDICH. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2004, **61**(12) [cit. 2022-05-10]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-004-3381-z
- [52] PANIAGUA-MICHEL, J., Willian CAPA-ROBLES, Jorge OLMOS-SOTO a Luis GUTIERREZ-MILLAN. The Carotenogenesis Pathway via the Isoprenoid- β -carotene Interference Approach in a New Strain of *Dunaliella salina* Isolated from Baja California Mexico. *Marine Drugs* [online]. 2009, **7**(1), 45-56 [cit. 2022-05-10]. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md7010045
- [53] CRANE, F.L., I.L. SUN a E.E. SUN. The essential functions of coenzyme Q. *The Clinical Investigator* [online]. 1993, **71**(8) [cit. 2021-06-02]. ISSN 0941-0198. Dostupné z: doi:10.1007/BF00226841
- [54] YOUNG, A., Stephanie JOHNSON, David STEFFENS a P. DORAISWAMY. Coenzyme Q10: A Review of Its Promise as a Neuroprotectant. *CNS Spectrums* [online]. 2007, **12**(1), 62-68 [cit. 2021-06-02]. ISSN 1092-8529. Dostupné z: doi:10.1017/S1092852900020538
- [55] AUSSEL, Laurent, Fabien PIERREL, Laurent LOISEAU, Murielle LOMBARD, Marc FONTECAVE a Frédéric BARRAS. Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 2014, **1837**(7), 1004-1011 [cit. 2022-05-10]. ISSN 00052728. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbabi.2014.01.015
- [56] CHOI, Chee-Ho, Si-Hun KIM, Srinivasan SHANMUGAM et al. Relative Bioavailability of Coenzyme Q10 in Emulsion and Liposome Formulations. *Biomolecules and Therapeutics* [online]. 2010, **18**(1), 99-105 [cit. 2022-05-11]. ISSN 1976-9148. Dostupné z: doi:10.4062/biomolther.2010.18.1.099

- [57] VOLKMAN, J. Sterols in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2003, **60**(5), 495-506 [cit. 2021-06-02]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-002-1172-8
- [58] KODNER, R., A. PEARSON, R. SUMMONS a A. KNOLL. Sterols in red and green algae: quantification, phylogeny, and relevance for the interpretation of geologic steranes. *Geobiology* [online]. 2008, **6**(4), 411-420 [cit. 2021-06-02]. ISSN 14724677. Dostupné z: doi:10.1111/j.1472-4669.2008.00167.x
- [59] HANNAN, Md., Abdullah SOHAG, Raju DASH et al. Phytosterols of marine algae: Insights into the potential health benefits and molecular pharmacology. *Phytomedicine* [online]. 2020, **69** [cit. 2021-06-02]. ISSN 09447113. Dostupné z: doi:10.1016/j.phymed.2020.153201
- [60] VON WETTSTEIN, D., S. GOUGH a C. KANNANGARA. Chlorophyll Biosynthesis. *The Plant Cell* [online]. 1039-1057 [cit. 2021-06-02]. ISSN 1040-4651. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.7.7.1039
- [61] GÁLOVÁ, Eliška, Iveta ŠALGOVIČOVÁ, Viktor DEMKO, Katarína MIKULOVÁ, Andrea ŠEVČOVIČOVÁ, Ľudmila SLOVÁKOVÁ, Veronika KYSELÁ a Ján HUDÁK. A short overview of chlorophyll biosynthesis in algae. *Biologia* [online]. 2008, **63**(6), 947-951 [cit. 2022-05-10]. ISSN 0006-3088. Dostupné z: doi:10.2478/s11756-008-0147-3
- [62] WILLOWS, Robert D. Biosynthesis of Chlorophyll and Bilins in Algae. LARKUM, Anthony W.D., Arthur R. GROSSMAN a John A. RAVEN, ed., Anthony LARKUM, Arthur GROSSMAN, John RAVEN. *Photosynthesis in Algae: Biochemical and Physiological Mechanisms* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2020, s. 83-103 [cit. 2022-05-10]. Advances in Photosynthesis and Respiration. ISBN 978-3-030-33396-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-33397-3_5
- [63] CASTELFRANCO, P a S BEALE. Chlorophyll Biosynthesis: Recent Advances and Areas of Current Interest. *Annual Review of Plant Physiology* [online]. 1983, **34**(1), 241-276 [cit. 2021-06-02]. ISSN 0066-4294. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.pp.34.060183.001325
- [64] LAWLOR, David W. Photosynthesis, productivity and environment. *Journal of Experimental Botany* [online]. 1995, **46**(), 1449-1461 [cit. 2022-05-10]. ISSN 1460-2431. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/46.special_issue.1449
- [65] HOLLAS, J. Michael. *Modern spectroscopy*. 4th ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2004. ISBN 0-470-84416-7.

- [66] PAVIA, Donald L. *Introduction to spectroscopy*. 5th ed. Stamford: Cengage Learning, 2015. ISBN 978-1-285-46012-3.
- [67] GAUGLITZ, Günter a David MOORE, ed. *Handbook of spectroscopy*. 2nd, enlarged ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2014. ISBN 978-3-527-32150-6.
- [68] LINSKENS, H., J. JACKSON a G. BARENDSE. *High performance liquid chromatography in plant sciences*. New York: Springer-Verlag, 1987. ISBN 0387172432.
- [69] HAMILTON, R. a P. SEWELL. Introduction to high performance liquid chromatography. HAMILTON, R. J. a P. A. SEWELL, ed., R. HAMILTON, P. SEWELL. *Introduction to high performance liquid chromatography* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 1982, s. 1-12 [cit. 2022-05-09]. ISBN 978-94-009-5940-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-009-5938-5_1
- [70] RIVERA, S.M. a R. CANELA-GARAYOA. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, **1224**, 1-10 [cit. 2022-05-10]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2011.12.025
- [71] MCNAIR, Harold a James MILLER. *Basic gas chromatography*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, 2009. ISBN isbn978-0-470-43954-8(cloth).
- [72] SZOTKOWSKI, Martin. *Řízená produkce lipidů a dalších lipidických látek pomocí vybraných druhů kvasinek a mikrořas*. Brno, 2021. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AT – *Anabaena torulosa*

CR – *Chlamydomonas reinhardtii*

CM – *Chlorella cf. minutissima*

DA – *Desmodesmus armatus*

DC – *Desmodesmus communis*

DV – *Desmodesmus velitaris*

FFA – volné mastné kyseliny

FO – fritovací olej

GC – plynová chromatografie

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

KO – kávový olej

MK – mastné kyseliny

MUFA – mononenasycené mastné kyseliny

PUFA – polynenasycené mastné kyseliny

S – *Spirulina*

SA – *Scenedesmus acutus*

SDS – dodecylsírán sodný

SFA – nasycené mastné kyseliny

TAG – triacylglycerol