



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLÓGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**OPTIMALIZACE EXTRAKCE PIGMENTŮ Z BUNĚK
KVASINEK A ŘAS**

OPTIMIZATION OF EXTRACTION OF PIGMENTS FROM YEAST AND ALGAE CELLS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Samuel Šimanský

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1450/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Bc. Samuel Šimanský**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název diplomové práce:

Optimalizace extrakce pigmentů z buněk kvasinek a řas

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše – přehled metod extrakce lipofilních pigmentů
- 2) optimalizace metod kultivace vybraných kvasinek a řas za účelem vysoké produkce pigmentů
- 3) zavedení a optimalizace extrakčních postupů pro získání pigmentů z biomasy
- 4) charakterizace extraktů, stabilita

Termín odevzdání diplomové práce: 5.8.2020:

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

Bc. Samuel Šimanský
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Predložená diplomová práca sa zaoberá extrakciou a dlhodobou stabilitou lipofilných pigmentov produkovaných vybranými kmeňmi kvasiniek a rias. V rámci práce bol sledovaný vplyv vybraných rozpúšťadiel na účinok extrakcie a tiež vplyv teploty prostredia na stabilitu pigmentov počas uskladnenia. Práca je rozdelená na dve hlavné časti, teoretickú a praktickú časť. Teoretická časť obsahuje zhrnutie poznatkov o riasach, kvasinkách a ich kultivačných parametroch. Ďalej sú zmienené poznatky o sledovaných lipidických metabolitoch, ich vlastnostiach a možnostiach aplikácie v rôznych odvetviach priemyslu. Praktická časť sa zaoberá samotnou prípravou extraktov a stabilitnými testami. Z vybraných vzoriek biomasy boli pripravené extrakty v rozpúšťadlách vhodných pre aplikáciu v potravinárstve či kozmetike (etanol a hexán). Na týchto extraktoch boli následne vykonané dlhodobé stabilitné testy trvajúce 4 mesiace a tiež krátkodobé stabilitné testy trvajúce celkom 28 dní. Pigmenty boli stanovené pomocou HPLC a spektrofotometricky, obsah mastných kyselín bol stanovený pomocou GC. Pre extrakciu pigmentov z biomasy sa pre väčšinu vzoriek javí ako optimálne rozpúšťadlo etanol. Pre extrakciu lipidov z biomasy sa však pri významnejšom množstve vzoriek javí ako optimálne rozpúšťadlo hexán. Vo väčšine vzoriek vykazovalo uskladnenie v mraziacom boxe najpriaznivejší efekt na stabilitu pigmentov, niektoré vzorky však vykazovali porovnateľnú stabilitu aj pri uskladnení v chladničke.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Karotenogénne kvasinky, riasy, lipidy, karotenoidy, lipofilné metabolity, stabilita lipofilných pigmentov, extrakcia lipofilných pigmentov, HPLC/PDA, GC/FID, UV-VIS spektrofotometria

ABSTRACT

The presented diploma thesis deals with the extraction and storage stability of lipophilic pigments produced by selected strains of yeasts and algae. In this thesis, there was studied the influence of the selected solvents on the efficiency of extraction, as well as the effect of ambient temperature on the stability of the pigments during storage. The work is divided into two main parts, theoretical and practical part. In the theoretical part knowledge about algae, yeasts and their cultivation parameters is summarized. Furthermore, some information regarding the selected lipid metabolites, their properties and possibilities of application in various branches of industry is mentioned. The practical part deals with the preparation of extracts and stability tests. Extracts were prepared from selected biomass samples in solvents suitable for applications in food industry or cosmetics (ethanol and hexane). Subsequently, the long-term stability tests lasting 4 months and short-term stability tests lasting a total of 28 days were performed on these extracts. The pigments were determined by HPLC and spectrophotometrically, the fatty acid content was determined by GC. For the extraction of pigments from biomass, in the most cases ethanol appears to be the optimal solvent. However, for lipid extraction from biomass, hexane appears to be the optimal solvent for a significant number of samples. In most samples, storage in the freezer showed the most favourable effect on pigment stability, but some samples showed comparable stability even when stored in the refrigerator.

KEYWORDS

Carotenogenic yeast, algae, lipids, carotenoids, lipophilic compounds, lipophilic pigments stability, lipophilic pigments extraction, HPLC/PDA, GC/FID, UV-VIS spectrophotometry

ŠIMANSKÝ, Samuel. *Optimalizácia extrakcie pigmentov z buniek kvasiniek a rias*. Brno, 2020. Vysoké učení technické v Brne, Fakulta chemická, Ústav chémie potravín a biotechnológií. Vedúci práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

PodĎakovanie

Týmto by som rád by som poďakoval vedúcej svojej diplomovej práce pani prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc. za odborné vedenie práce, cenné rady a ochotu pri riešení danej problematiky. Tiež by som sa rád poďakoval môjmu odbornému konzultantovi Ing. Martinovi Szotkowskému za rozsiahlu trpezlivosť, ochotu a pomoc s realizáciou experimentálnej časti. Nakoniec by som sa chcel poďakovať svojej rodine a priateľom za podporu počas celého štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČASŤ	10
2.1	KAROTENOIDY	10
2.1.1	Chemická štruktúra	10
2.1.2	Fyzikálno-chemické vlastnosti	11
2.1.3	Výskyt v prírode	11
2.1.4	Izoprenoidy	12
2.1.5	Biosyntéza	12
2.1.5.1	Syntéza IPP MVA dráhou	13
2.1.5.2	Syntéza IPP DXP dráhou	13
2.1.5.3	Syntéza fytoénu	14
2.1.5.4	Syntéza karotenoidov	15
2.1.6	Biologické vlastnosti karotenoidov	16
2.1.6.1	Antioxidačná aktivita	16
2.1.6.2	Provitamín A aktivita	17
2.1.6.3	Iné efekty na ľudské zdravie	17
2.1.7	Potenciálne využitie v priemysle	17
2.2	ERGOSTEROL	18
2.3	UBICHINÓN	19
2.4	CHLOROFYL	19
2.5	LIPIDY	21
2.5.1	Delenie lipidov	21
2.5.2	Biosyntéza mastných kyselín	21
2.5.3	Biosyntéza TAG	22
2.5.4	Nenasýtené mastné kyseliny	24
2.5.5	Biopalivá a mikrobiálna produkcia lipidov	24
2.6	KVASINKY	26
2.6.1	Morfológia a cytológia	27
2.6.2	Charakteristika vybraných rodov kvasiniek	27
2.6.2.1	Rod Rhodotorula	28
2.6.2.2	Rod Sporobolomyces	28
2.6.2.3	Rod Cystofilobasidium	29
2.6.2.4	Rod Xanthophyllomyces	29
2.6.3	Biotechnologická výroba karotenoidov kvasinkami	29
2.6.3.1	Živné médium	30
2.6.3.2	Kultivačné podmienky	30
2.6.3.3	Bioreaktor a downstream proces	30
2.7	RIASY	31
2.7.1	Charakteristika vybraných rodov mikrorias	31
2.7.1.1	Rod Chlamydomonas	31
2.7.1.2	Rod Chlorella	32
2.7.1.3	Rod Scenedesmus	32
2.7.2	Kultivácia mikrorias	33
2.7.2.1	Teplota	33
2.7.2.2	pH	33
2.7.2.3	Živiny	34
2.7.2.4	Intenzita svetla	35
2.7.2.5	Miešanie	35
2.7.2.6	Kultivačné systémy	35
2.8	SINICE	36
2.8.1	Rod Synechococcus	38
2.8.2	Downstream proces kultúr siníc a rias	38
2.9	METÓDY ANALÝZY BUNEČNÝCH KULTÚR	38
2.9.1	Absorpčná spektrofotometria	38
2.9.2	Chromatografia	39
2.9.2.1	HPLC/PDA	39

2.9.2.2	GC/FID	39
3	CIEĽE PRÁCE	40
4	EXPRIMENTÁLNA ČASŤ	41
4.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	41
4.1.1	<i>Chemikálie použité pre kultiváciu kvasiniek a rias</i>	<i>41</i>
4.1.2	<i>Chemikálie použité pre extrakcie a transesterifikácie a HPLC.....</i>	<i>41</i>
4.2	POUŽITÉ KMENE MIKROORGANIZMOV	41
4.3	PRÍSTROJE A POMÔCKY	42
4.4	KULTIVÁCIE KVASINIEK	42
4.4.1	<i>Inokulum I a II</i>	<i>42</i>
4.4.2	<i>Bankové kultivácie</i>	<i>42</i>
4.4.3	<i>Fľaškové kultivácie</i>	<i>43</i>
4.4.4	<i>Fermentory</i>	<i>43</i>
4.5	KULTIVÁCIE RIAS	43
4.6	ANALÝZA BUNEČNÝCH KULTÚR	44
4.6.1	<i>Gravimetrické stanovenie množstva biomasy v médiu</i>	<i>44</i>
4.6.2	<i>Príprava vzoriek mikrobiálnej biomasy.....</i>	<i>44</i>
4.6.3	<i>Extrakcia lipofilných pigmentov do acetónu.....</i>	<i>44</i>
4.6.4	<i>Stanovenie lipofilných pigmentov na HPLC.....</i>	<i>45</i>
4.6.5	<i>Transesterifikácia mastných kyselín pre analýzu na GC</i>	<i>45</i>
4.6.6	<i>Stanovenie mastných kyselín na GC</i>	<i>46</i>
4.7	EXTRAKČNÉ A STABILITNÉ EXPERIMENTY	46
4.7.1	<i>Príprava etanolových a hexánových extraktov</i>	<i>46</i>
4.7.2	<i>Dlhodobé stabilitné testy extraktov fermentorov a fľaškových kultivácií.....</i>	<i>46</i>
4.7.3	<i>Krátkodobé stabilitné testy extraktov fermentorov a rias</i>	<i>47</i>
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	48
5.1	DLHODOBÉ STABILITNÉ TESTY	48
5.1.1	<i>Dlhodobé stabilitné testy fermentorov.....</i>	<i>48</i>
5.1.1.1	<i>Stabilita extraktov kmeňa Sporidiobolus pararoseus z fermentora (C/N 50; médium tuk + srvátka)</i>	<i>48</i>
5.1.1.2	<i>Stabilita extraktov kmeňa Rhodotorula kratochvilovae z fermentora (C/N 50; médium tuk + srvátka) ..</i>	<i>49</i>
5.1.1.3	<i>Stabilita extraktov kmeňa Rhodotorula mucilaginosa z fermentora (C/N 25, médium tuk + srvátka) ...</i>	<i>50</i>
5.1.1.4	<i>Stabilita extraktov kmeňa Cystofilobasidium macerans z fermentora (C/N 13, médium tuk + srvátka) ..</i>	<i>51</i>
5.1.1.5	<i>Zhrnutie výsledkov dlhodobých testov stability extraktov biomasy získanej z fermentorov</i>	<i>53</i>
5.1.2	<i>Dlhodobé stabilitné testy extraktov z fľaškových kultivácií, C/N 25</i>	<i>54</i>
5.1.2.1	<i>Stabilita extraktov kmeňa Sporidiobolus pararoseus, fľašková kultivácia</i>	<i>54</i>
5.1.2.2	<i>Stabilita extraktov kmeňa Rhodotorula kratochvilovae, fľašková kultivácia</i>	<i>55</i>
5.1.2.3	<i>Stabilita extraktov kmeňa Rhodotorula mucilaginosa, fľašková kultivácia</i>	<i>56</i>
5.1.2.4	<i>Stabilita extraktov kmeňa Cystofilobasidium macerans, fľašková kultivácia</i>	<i>57</i>
5.1.2.5	<i>Zhrnutie výsledkov dlhodobých testov stability fľaškových kultivácií</i>	<i>58</i>
5.2	KRÁTKODOBÉ TESTY STABILITY	59
5.2.1	<i>Krátkodobé testy stability rias</i>	<i>60</i>
5.2.1.1	<i>Stabilita extraktov kmeňa Desmodesmus acutus</i>	<i>60</i>
5.2.1.2	<i>Stabilita extraktov kmeňa Desmodesmus quadricauda</i>	<i>64</i>
5.2.1.3	<i>Stabilita extraktov kmeňa Chlorella vulgaris</i>	<i>67</i>
5.2.1.4	<i>Stabilita extraktov kmeňa Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>70</i>
5.2.1.5	<i>Stabilita extraktov kmeňa Scenedesmus obliquus.....</i>	<i>73</i>
5.2.1.6	<i>Stabilita extraktov kmeňa Scenedesmus dimorphus</i>	<i>76</i>
5.2.1.7	<i>Zhrnutie priebehu krátkodobých stabilitných experimentov rias.....</i>	<i>79</i>
5.2.2	<i>Krátkodobé stabilitné testy biomasy kvasiniek kultivovaných vo fermentoroch.....</i>	<i>80</i>
5.2.2.1	<i>Stabilita extraktov kmeňa Rhodosporidium toruloides (C/N 25; médium tuk + srvátka)</i>	<i>80</i>
5.2.2.2	<i>Stabilita extraktov kmeňa Rhodotorula mucilaginosa (C/N 13; médium tuk + kávový hydrolyzát)</i>	<i>83</i>
5.2.2.3	<i>Stabilita extraktov kmeňa Rhodotorula kratochvilovae (C/N 13; médium tuk + kávový hydrolyzát)</i>	<i>86</i>
5.2.2.4	<i>Stabilita extraktov kmeňa Cystofilobasidium macerans (C/N 13; médium tuk + kávový hydrolyzát).....</i>	<i>89</i>
5.2.2.5	<i>Zhrnutie priebehu krátkodobých testov stability vykonaných na extraktoch z biomasy kvasiniek kultivovaných vo fermentoroch.....</i>	<i>92</i>
6	ZÁVER	93

7	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	95
8	ZOZNAM SKRATIEK	101

1 ÚVOD

V súčasnej dobe zaznamenáva biotechnologický priemysel významný rast. Ten je podmienený jeho schopnosťou produkcie rôznych hodnotných látok z ľahko obnoviteľných alebo odpadných zdrojov. Využíva k tomu proces biotransformácie, v ktorom sú hlavnou výkonnou jednotkou mikroorganizmy. Tie sú schopné premeny najrôznejších substrátov na cenné metabolity, ktoré nachádzajú rozsiahle uplatnenia v rôznych častiach priemyslu. Za použitia nízkonákladových potravinárskych odpadov sa znížia celkové produkčné náklady a tiež sa zmierni ich negatívny dopad na životné prostredie. Ponúka sa tak alternatívna a zároveň ľahko obnoviteľná cesta produkcie žiadaných látok či biomasy.

Karotenoidy sú prirodzene sa vyskytujúce lipofilné pigmenty zodpovedné za charakteristické sfarbenie ovocia a zeleniny. Vďaka svojim priaznivým vplyvom na ľudské zdravie nachádzajú karotenoidy rozsiahle využitie vo farmaceutickom priemysle pri výrobe doplnkov výživy, v kozmetike či v krmivárskom priemysle. Jednými z mikrobiálnych producentov karotenoidov sú mikroriasy a karotenogénne kvasinky. Mikroriasy disponujú pozitívnymi vlastnosťami mikroorganizmov (rýchly rast a možnosť kultivácie v bioreaktoroch) a aj vlastnosťami vyšších rastlín (schopnosť fotosyntézy a jednoduché nutričné nároky). Karotenogénne kvasinky sú taktiež veľmi zaujímavým producentom karotenoidov, a to najmä vďaka ich schopnosti rastu na odpadných substrátoch.

Pred zavedením výrobného biotechnologického procesu do praxe je nutné uskutočniť radu štúdií. Hlavným cieľom je vždy optimalizácia kultivačných podmienok a selekcia najvhodnejšieho mikroorganizmu pre produkciu vybraných metabolitov. V neposlednom rade je nutné myslieť aj na samotné povýrobné spracovanie biomasy, a to najmä pri získavaní nestabilných látok ako sú karotenoidy. Už za účinku tepla, svetla či kyslého prostredia dochádza k izomeračným a oxidačným reakciám, ktoré vedú k strate ich fotochemických vlastností a provitamín A aktivity. Karotenoidy sú ešte k tomu intracelulárne metabolity, čo robí ich purifikáciu obzvlášť problematickou témou. Okrem problematiky extrakcie pigmentov sa ponúka aj ďalšia otázka, a to akým spôsobom je vlastne vhodné skladovať takéto nestabilné metabolity. K riešeniu tejto problematiky sa bude snažiť prispieť aj predložená práca.

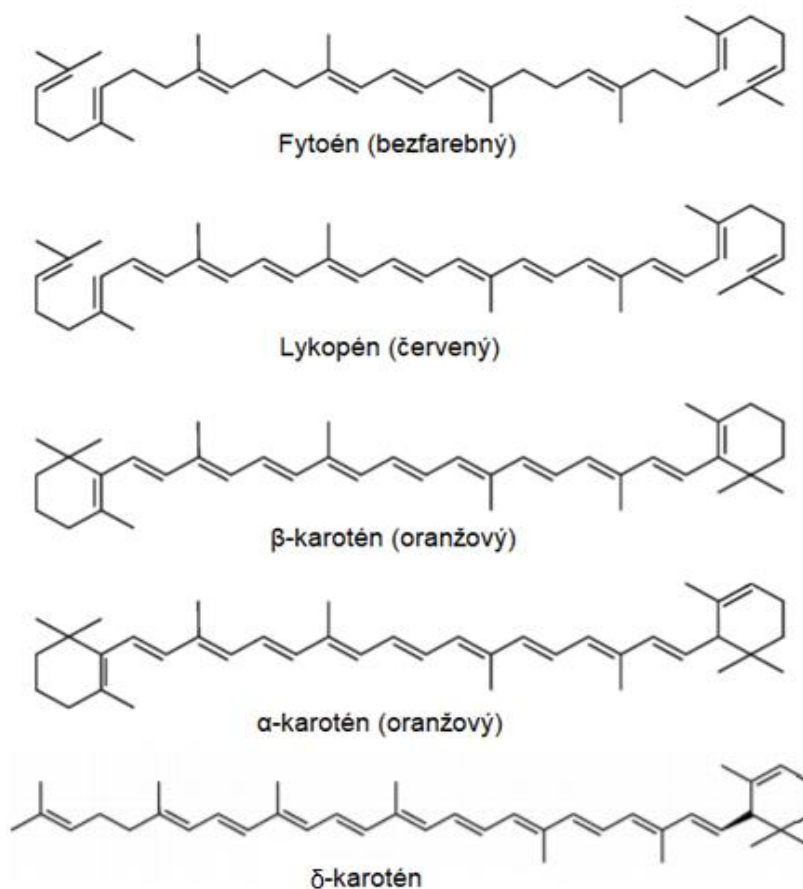
2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Karotenoidy

Karotenoidy sú prirodzene sa vyskytujúce lipofilné pigmenty zodpovedné najmä za žlté, oranžové a červené sfarbenie ovocia a zeleniny. Metabolizované sú však aj v riasach, fotosyntetizujúcich baktériách a červených kvasinkách. Karotenoidy a ich deriváty hrajú neodbytnú rolu v zdravom ľudskom stravovaní, a to najmä ako bunkové antioxidanty alebo provitamíny A. Tiež však plnia dôležitú úlohu vo funkcii imunitného systému, v intercelulárnej komunikácii, a génovej regulácii. Syntéza karotenoidov je tiež nevyhnutná pre fotosyntetickú aktivitu vyšších i nižších rastlín. Ich fyziologická úloha v bunkách červených kvasiniek je najmä ochrana pred oxidatívnym stresom, UV žiarením alebo voľnými radikálmi [1] [2] [3].

2.1.1 Chemická štruktúra

Z chemického hľadiska zaraďujeme karotenoidy medzi tetraterpenoidy, čiže oligoméry izoprénu (alebo izoprenoidy) obsahujúce celkom 8 izoprenových jednotiek v molekule, čo činí dohromady 40 atómov uhlíka. Ich skelet môže byť buď to rýdzio alifatický (lykopén), alebo môže byť zakončený jedným (δ-karotén), či dvoma päť alebo šesť-uhlíkovými cyklami (β-karotén). Dvojné väzby ktoré sú obsiahnuté v skelete umožňujú *cis-trans* izomériu, v prírode sa však väčšina karotenoidov vyskytuje v *all-trans* konfigurácii, ktorá umožňuje väčšiu stabilitu molekuly. Na základe funkčných skupín vyskytujúcich sa v molekule je možné karotenoidy rozdeliť na dve skupiny, a to na xantofyly (obsahujúce kyslík, ako napríklad keto-, epoxy-, karboxy-, alebo hydroxylové funkčné skupiny – Obrázok 2) a karotény (obsahujúce iba uhlíkovodíkový skelet – Obrázok 1) [1] [4].



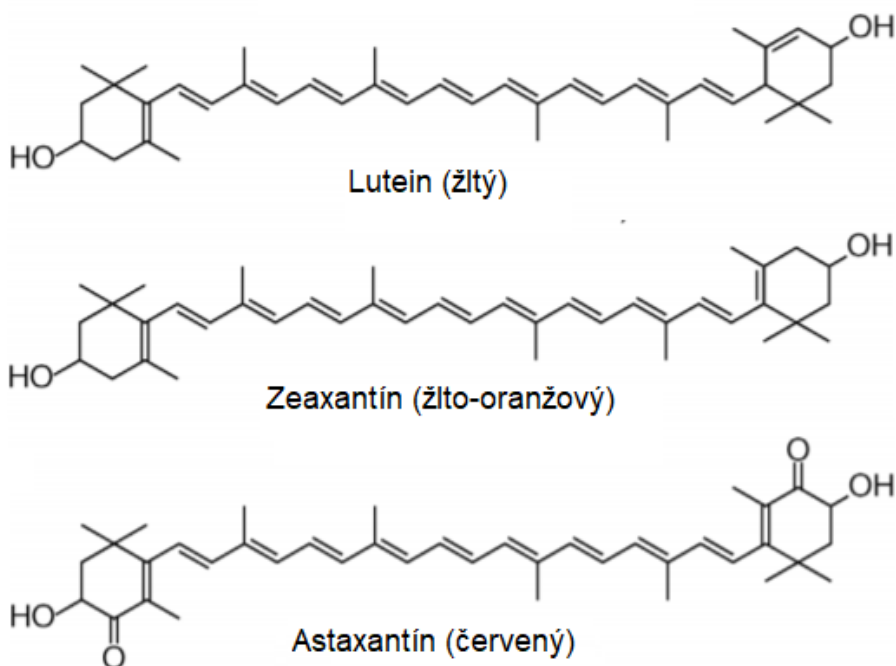
Obrázok 1: Štruktúra vybraných karotenoidov [5]

2.1.2 Fyzikálno-chemické vlastnosti

Charakteristický systém konjugovaných dvojných väzieb v molekule karotenoidov tvorí chromofor, ktorý absorbuje žiarenie v rozmedzí vlnových dĺžok 400 až 500 nm. Práve táto absorpcia žiarenia určitých vlnových dĺžok a odraz či tranzit žiarenia iných vlnových dĺžok vedie k pozorovateľnému sfarbeniu molekúl karotenoidov. To im dáva ich charakteristické sfarbenie od bledo žltej až po tmavo červenú. Väčšina karotenoidov dosahuje maxima absorpcie pri troch vlnových dĺžkach ($\lambda_{\max}$), čo vedie k trojpíkovým absorpčným spektrám. Množstvo konjugovaných dvojných väzieb v molekule súvisí s hodnotou $\lambda_{\max}$ priamou úmerou, pričom ich minimálne množstvo pre pozorovateľné sfarbenie je 7. Ako príklad je možné uviesť acyklický lykopén, ktorý má 11 konjugovaných dvojných väzieb, je červenej farby a absorbuje svetlo najvyšších vlnových dĺžok. Absorpčné spektrum karotenoidov slúži ako základ pre ich identifikáciu a kvantifikáciu [1] [5].

Až na pár výnimiek sa všetky karotenoidy vyznačujú lipofilnými vlastnosťami, čiže dobrou rozpustnosťou v tukoch a v nepolárnych rozpúšťadlách ako napríklad chloroform či hexán, ale aj v mierne polárnych ako je acetón či etanol. Všetky karotenoidy sú však, až na pár výnimiek, prakticky nerozpustné vo vode [4] [5].

Nenasýtený uhlíkový skelet karotenoidov ich činí prirodzene náchylnými k izomerácii a k oxidácii. Účinkami tepla, svetla, kyslého prostredia alebo aj adsorpciou na aktívny povrch (ako napríklad hliník) dochádza k ich izomerácii na *cis* formy a tým pádom k strate časti fotochemických vlastností a provitamín A aktivity. Hlavnou príčinou straty karotenoidov je však ich oxidatívna degradácia za vzniku nových zlúčenín s nižšou molekulovou hmotnosťou. Tá je závislá na množstve prítomného kyslíku v prostredí a je katalyzovaná enzymaticky, kovmi, svetlom, alebo lipidovými hydroperoxidázami [5].



Obrázok 2: Štruktúra vybraných xantofylov [5]

2.1.3 Výskyt v prírode

Väčšina karotenoidov v telách vyšších rastlín sa bezprostredne po ich biosyntéze akumuluje v špecializovaných plastidoch. Takmer všetky karotenoidy viazané v chloroplastoch sa aktívne podieľajú na fotosyntéze, alebo ochraňujú fotosyntetický aparát pred reaktívnymi radikálmi produkovanými nadmerným slnečným žiarením. V nezelených častiach rastlín sa nachádzajú hlavne v chromoplastoch, ktoré sú diferencované z už existujúcich pro-plastidov a chloroplastov počas dozrievania ovocia a kvitnutia kvetov.

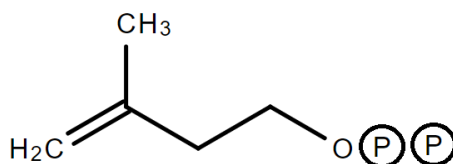
V priebehu diferenciácie dochádza k rozkladu membrán tylakoidov a k degradácii chlorofylu, čo vedie k strate fotosyntetickej aktivity. Následne dochádza k akumulácii karotenoidov vnútri chromoplastu, a to buď v kryštalických štruktúrach, alebo v plastoglobulách, kde vykazujú väčšiu fotostabilitu. Najzastúpenejšie karotenoidné farbivá v chromoplastoch žltých častí rastlín (napríklad kvety) sú xantofyly, kde sa nachádzajú prevažne v esterifikovanej forme s vyššími masnými kyselinami. Esterifikácia nenaruša ich chromofor a uľahčuje ich integráciu v lipofilnom prostredí plastoglobúl. Tiež sa predpokladá, že esterifikácia karotenoidmi je prirodzený mechanizmus ochrany polynenasýtených masných kyselín pred ich fotooxidáciou [1] [6] [7].

Karotenoidy sú široko zastúpené aj v ríši mikroorganizmov, pričom medzi hlavných producentov patria baktérie, kvasinky, riasy a iné huby. Jedným z biotechnologicky významných producentov sú červené kvasinky, ktoré nesú svoj názov práve kvôli ich vysokému obsahu karotenoidov. V ich bunkách sa nachádzajú buď to vo forme lipidových kvapôčok, alebo ako inkorporované do biomembrán. V oboch prípadoch hrajú rolu antioxidantov, kedy chránia molekuly náchylné na voľné kyslíkové radikály (ako napríklad polynenasýtené masné kyseliny). Tiež sa predpokladá, že primitívne organizmy obsahovali karotenoidy pre zosilnenie svojich biomembrán, čo je možné vďaka ich rigidnému skeletu konjugovaných dvojných väzieb. Mikroriasy (jednobunečné riasy) sú taktiež známe ako producenti komerčne významných karotenoidov, pričom ich hlavná rola spočíva, podobne ako vo vyšších rastlinách, vo fotosyntetických systémoch [3] [8] [9].

2.1.4 Izoprenoidy

Izoprenoidy sú označované ako najstaršie známe biomolekuly, ktorých prítomnosť bola preukázaná v až 2,5 miliárd rokov starých sedimentoch. V súčasnej dobe sa tiež jedná o najväčšiu skupinu v prírode sa vyskytujúcich organických látok, ktorá zahŕňa viac ako 30 000 chemikálií. V biologických systémoch plnia izoprenoidy najrôznejšie funkcie, medzi významné patria [10]:

- Chinóny v elektrónovom transportnom reťazci
- Steroly ako komponenty biomembrán
- Karotenoidy a bočné reťazce chlorofylu ako fotosyntetické pigmenty
- Gibberelíny, kyselina abscisová a brassinosteroidy ako rastlinné regulátory
- Monoterpény, diterpény a sesquiterpény ako rastlinné protilátky



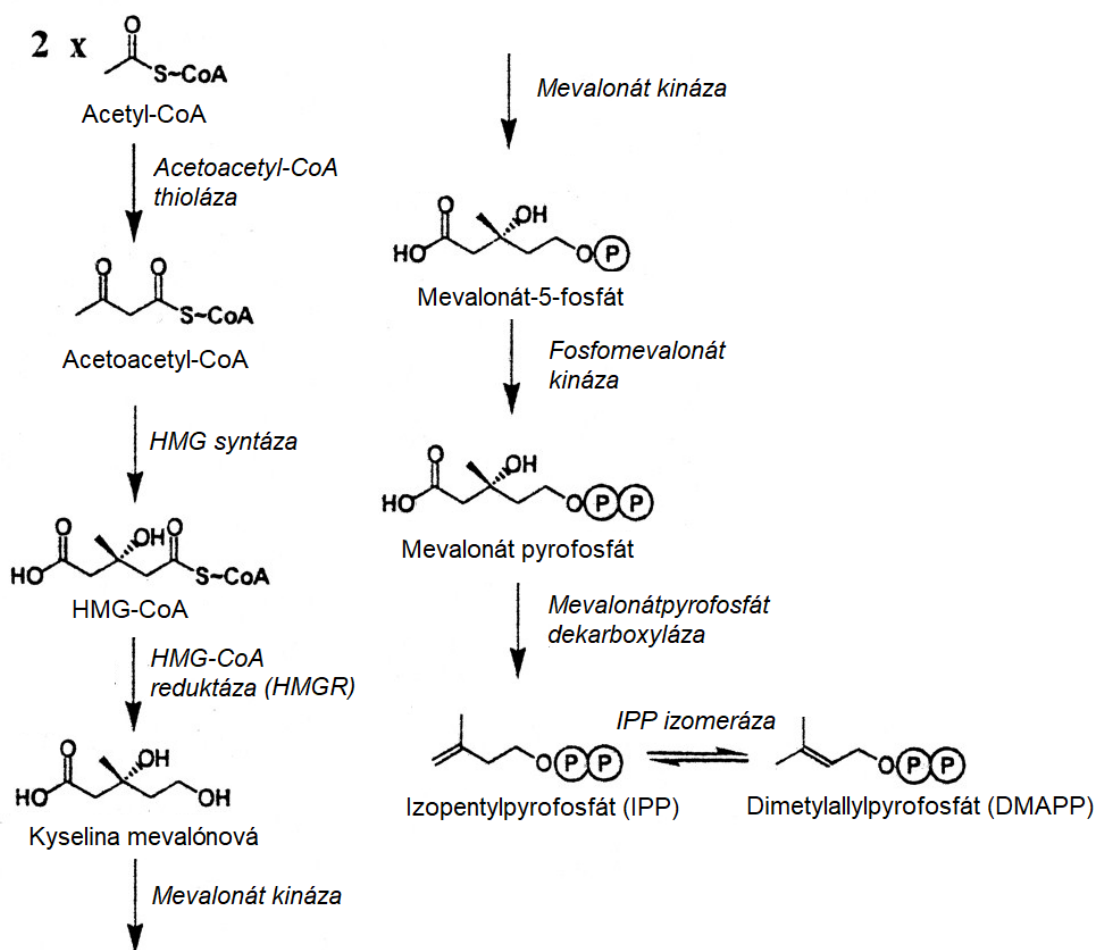
Obrázok 3: Izopentenyl pyrofosfát (IPP) – biosynteticky aktívna forma izoprénu [10]

2.1.5 Biosyntéza

Všetky karotenoidy sú biosynteticky prepojené s ostatnými izoprenoidmi, a to prostredníctvom 5-uhlíkovej molekuly izopentyl pyrofosfátu (IPP – Obrázok 3), alebo jeho izoméru dimetylallyl difosfátu (DMAPP). Hoci je syntéza izoprenoidov kondenzáciou molekúl IPP charakteristická pre prokaryoty, eukaryoty aj archey, biosyntetická formácia IPP môže prebiehať dvoma na sebe nezávislými metabolickými dráhami, ktorými sú dráha kyseliny mevalónovej (MVA dráha) a dráha 1-deoxyxylulóza-5-fosfátu (DXP dráha). Od objavu MVA dráhy v šiestom desaťročí minulého storočia bola táto dráha v organizmoch dlho považovaná za všadeprítomnú. Experimentálne dáta však konzistentne naznačovali, že MVA dráha nemôže byť zodpovedná za syntézu všetkých izoprenoidov v rastlinných plastidoch, čo viedlo k neskoršiemu objavu DXP dráhy nezávislej od kyseliny mevalónovej. S využitím funkčnej genomy sa neskôr preukázala prítomnosť DXP dráhy u rias, vyšších rastlín a aj mnohých baktérií. Najnovšie štúdie tiež preukázali, že rastlinné plastidy sú schopné v určitých štádiách vývinu využívať obidve tieto dráhy [10] [11].

2.1.5.1 Syntéza IPP MVA dráhou

Prvým krokom MVA biosynthetickej dráhy je kondenzácia dvoch molekúl acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA (Obrázok 4). Ten následne kondenzuje s ďalšou molekulou acetyl-CoA za vzniku 3-hydroxy-3-metylglutaryl-CoA (HMG-CoA) pomocou enzýmu HMG-CoA syntázy. Redukčná premena HMG-CoA na kyselinu mevalónovú je katalyzovaná enzýmom HMG-reduktáza (HMGR), ktorý je jeden z najviac regulovaných enzýmov v prírode a udáva rýchlosť celej MVA dráhy. Jeho syntéza je pri neprítomnosti sterolových izoprenoidov v bunke regulovaná proteínmi viažucimi sa na regulačné prvky sterolov (SREBPs), ktoré priamo aktivujú génovú transkripciu enzýmu HMGR, a aj zvyšujú syntézu ostatných enzýmov MVA dráhy. Bunečné požiadavky na nesterolové izoprenoidy zasa ovplyvňujú transláciu mRNA enzýmu HMGR. Kyselina mevalónová následne podlieha dvom fosforylačným reakciám katalyzovaným enzýmami mevalonátkináza (MK) a fosfomevalonát kináza (PMK). Hoci enzým MK nedisponuje rýchlosť riadiacimi vlastnosťami ako má HMGR, môže byť spätne inhibovaný intermediátmi izoprenoidnej/cholesterolovej dráhy, ako sú geranylpyrofosfát alebo geranylgeranylpyrofosfát. V poslednom kroku je mevalonátpyrofosfát dekarboxylovaný za vzniku IPP [12].

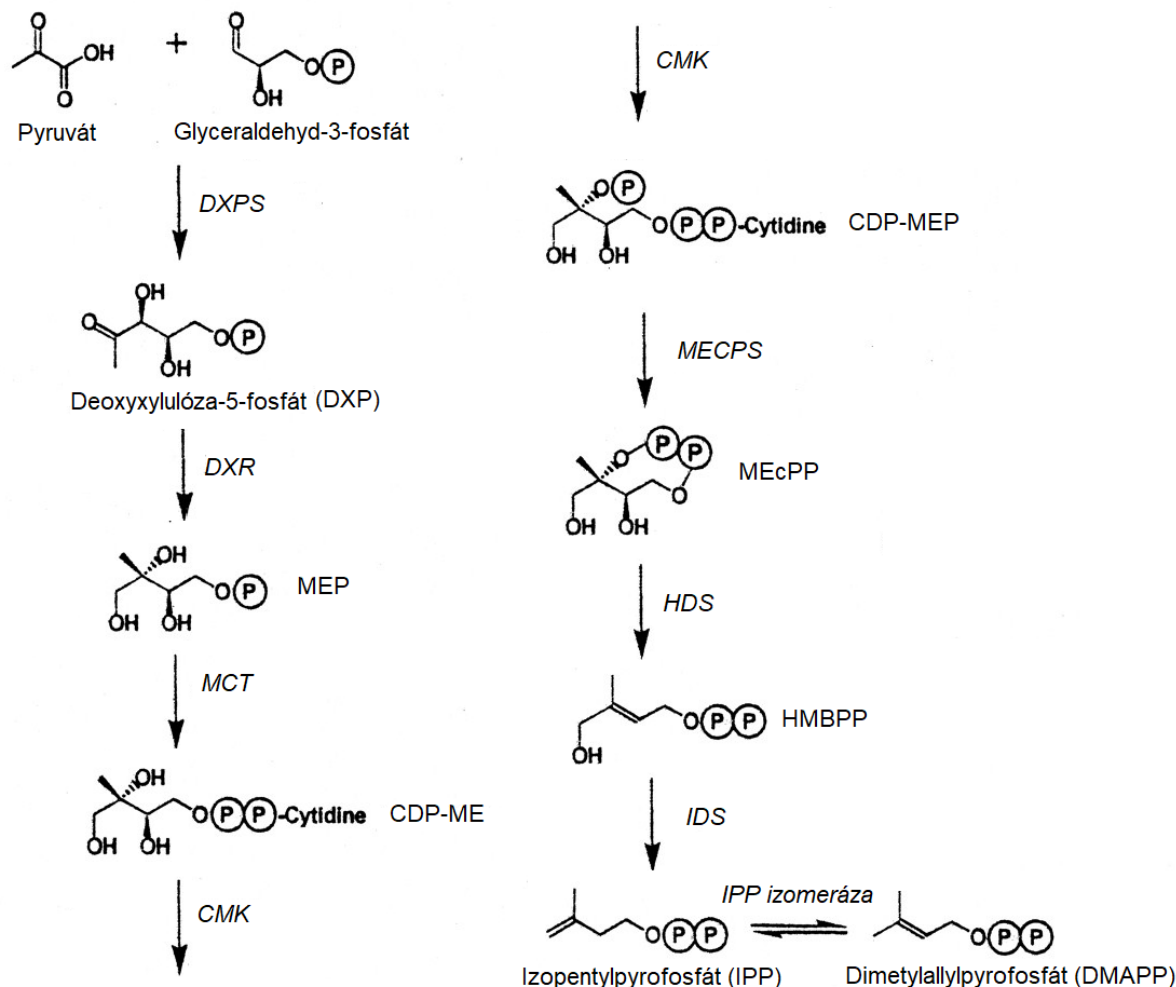


Obrázok 4: Schéma MVA dráhy [10]

2.1.5.2 Syntéza IPP DXP dráhou

Ako prvá prebieha kondenzácia pyruvátu s glyceraldehyd-3-fosfátom, čo vedie ku vzniku 1-deoxyxylulóza-5-fosfátu a CO₂ (Obrázok 5). DXP produkované touto reakciou môže byť využité aj ako prekursor pre syntézu vitamínu B1 (tiamín) a B6 (pyridoxal).

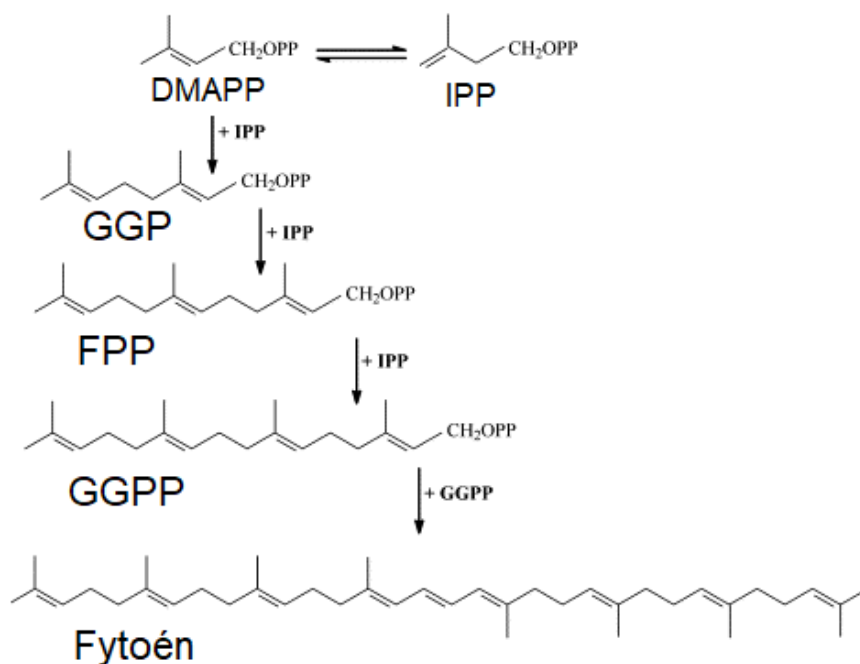
Potom nasleduje prvá unikátna reakcia tejto biosynthetickej dráhy, ktorou je intramolekulárny prešmyk a následná redukcia DXP na 2-C-metyl-D-erytritol-4-fosfát (MEP). MEP je následne premenený na IPP štyrmi reakciami, ktorých intermediáty sú 4-(cytidín-5'-difosfo)-2-C-metyl-D-erytritol (CDP-ME), 2-fosfo-4-(cytidín-5'-difosfo)-2-C-metyl-D-erytritol (CDP-MEP), 2-C-metyl-D-erytritol-2,4-cyklodifosfát (MEcPP) a 1-hydroxy-2-metyl-(E)-butenyl-4-difosfát (HMBPP) [11].



Obrázok 5: Schéma DXP dráhy [10] [11]

2.1.5.3 Syntéza fytoénu

Fytoén je bezfarebný uhľovodík so symetrickou štruktúrou, ktorého systém konjugovaných dvojných väzieb pozostáva iba z 3 väzieb. Jeho 40 uhlíkový skelet však tvorí základnú štruktúru, od ktorej sú odvodené všetky karotenoidy. Jeho syntéza vychádza z molekuly izopentyl pyrofosfátu (IPP) a alylového izoméru IPP dimetylallyl difosfátu (DMAPP). Kondenzáciou IPP a DMAPP v smere „hlava k päte“ vzniká 10-uhlíková molekula geranyl pyrofosfát (GPP). Mechanizmus tejto kondenzačnej reakcie je v podstate rovnaký ako pri iných prenylačných reakciách, kedy karbón-aniónový intermediát DMAPP atakuje 3,4-dvojnú väzbu na molekule IPP. Nová uhlíková väzba vzniká medzi C4 uhlíkom IPP a C1 uhlíkom DMAPP a zároveň sa uvoľňujú dve molekuly anorganického fosfátu. Postupnou adíciou ďalších dvoch molekúl IPP vzniká 15 uhlíkový farnesyl pyrofosfát (FPP) a 20 uhlíkový geranylgeranyl pyrofosfát (GGPP). Celú syntézu GGPP z molekúl IPP/DMAPP katalyzuje enzým GGPP syntáza. V závere kondenzujú dve molekuly GGPP v smere „hlava k hlave“, nastáva eliminácia dvoch zvyšných fosfátových molekúl a stereošpecifické odňatie protónov za vzniku molekuly fytoénu (katalyzovaná enzýmom fytoénsyntáza – Obrázok 6) [2] [11].

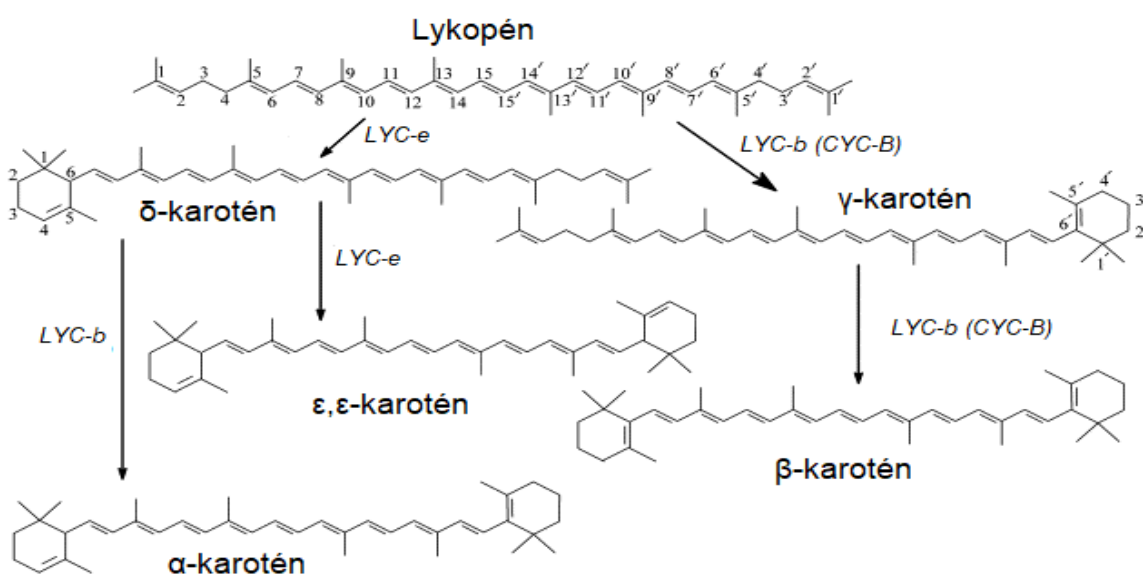


Obrázok 6: Schéma syntézy fytoénu [11]

2.1.5.4 Syntéza karotenoidov

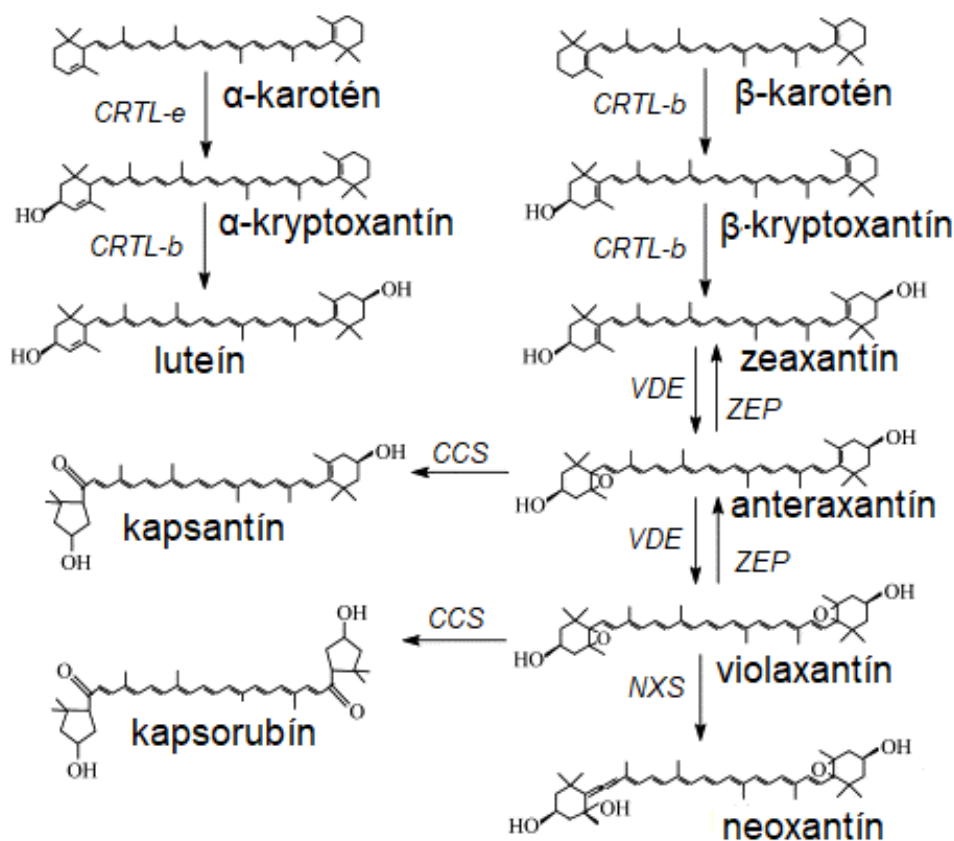
Aby mohol vzniknúť systém konjugovaných dvojných väzieb tvoriaci chromofor, ktorým sú karotenoidy charakteristické, musí nastať séria desaturačných reakcií fytoénu. Štyrmi desaturačnými reakciami sa postupne odštiepujú vždy dve molekuly vodíka a bezfarebný fytoén sa mení na červený *all-trans*-lykopén. Vo väčšine prípadov je fytoén produkovaný a akumulovaný ako jeho 15-*cis* izomér, individuálna izomeráza však neexistuje, preto sa predpokladá, že s desaturačnými reakciami je spojená aj izomerácia [2] [11].

All-trans-lykopén je obvyklým substrátom cyklizačných reakcií vedúcich ku formácii šesťčlenných α - alebo β -iononových kruhov na koncoch molekuly. Tieto dva typy cyklických koncových skupín sa od seba odlišujú polohou dvojitej väzby vo vnútri cyklohexánového kruhu (Obrázok 7). Ako typického zástupcu cyklických karotenoidov je možné uviesť α -karotén alebo β -karotén [11].



Obrázok 7: Schéma cyklizačných reakcií lykopénu [11]

Xantofyly sú produkty enzymatickej oxidácie α - alebo β -karoténu. Najčastejšie vyskytujúce sa funkčné skupiny kyslíka v molekulách xantofylov sú hydroxylová naviazaná na C3, keto- na C4, alebo epoxy- na 5,6 pozícií iononového kruhu. Ako príklad je možné uviesť luteín (3,3'-dihydroxy- α -karotén) syntetizovaný v riasach a vyšších rastlinách, alebo zeaxantín (3,3'-dihydroxy- β -karotén) syntetizovaný všetkými fotosyntetizujúcimi organizmami a niektorými heterotrofickými baktériami. Z toho čo je doposiaľ známe, všetky kyslíkové funkčné skupiny v molekulách xantofylov pochádzajú z molekulárneho kyslíka [2].



Obrázok 8: Schéma syntézy vybraných xantofylov [11]

2.1.6 Biologické vlastnosti karotenoidov

Karotenoidy sú charakteristické niekoľkými významnými biologickými vlastnosťami, medzi ktoré patrí najmä antioxidačná aktivita, aktivita provitamínu A a niektoré ďalšie funkcie.

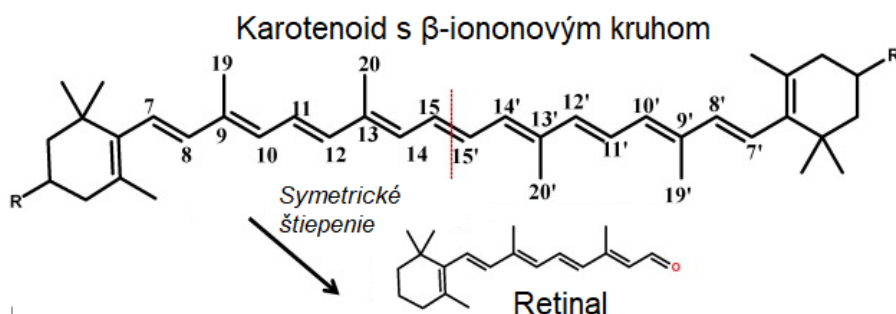
2.1.6.1 Antioxidačná aktivita

Antioxidačná aktivita karotenoidov je priamo závislá na množstve konjugovaných dvojných väzieb obsiahnutých v molekule a prípadne na prítomnosti kyslíkových funkčných skupín naviazaných na skelet. Napríklad acyklický lykopén sa vyznačuje vyššou efektivitou zachytávať singletový kyslík a iné reaktívne formy kyslíka ako cyklický β -karotén, a to kvôli jeho väčšiemu počtu nenasýtených dvojných väzieb. Podobný trend vykazujú aj xantofyly astaxantín a cantaxantín, ktorých konjugovaný systém dvojných väzieb je predĺžený o karbonylové skupiny na konci reťazca, čo im umožňuje priečnu orientáciu v biomembránach (Obrázok 8). Lykopén má aj nepriamy antioxidačný efekt a to preto, že pôsobí ako induktor niektorých bunecných enzýmov s antioxidačnými vlastnosťami, ako napríklad superoxid dismutáza. Nutné je taktiež spomenúť synergický efekt karotenoidov s inými bunecnými antioxidantmi ako sú vitamín C a vitamín E, ktorých radikály je lykopén schopný regenerovať [5] [13].

2.1.6.2 Provitamín A aktivita

Vitamín A je esenciálny pre správnu funkciu zraku, imunitného systému, reprodukcie, rastu a všeobecného zdravia človeka. Karotenoidy sú jedným z hlavných zdrojov vitamínu A, nie všetky sa však vyznačujú provitamín A aktivitou. Zo 600 rôznych karotenoidov, ktoré boli doposiaľ identifikované, sa touto schopnosťou vyznačuje iba asi 50 z nich, pričom za hlavný prekursor tohto vitamínu je považovaný *all-trans*- β -karotén. Iné karotenoidy, ktoré tiež obsahujú neoxidovaný β -iononový kruh, napríklad α -karotén, majú provitamín A aktivitu [5].

Vyššie živočíchy nemajú schopnosť syntézy karotenoidov de novo, musia ich preto prijímať v potrave. Vlastnou provitamín A aktivitou sa rozumie schopnosť konverzie karotenoidov na vitamíny skupiny A retinol a retinal (Obrázok 9 **Error! Reference source not found.**), pomocou štiepiaceho enzýmu karotén dioxygenáza [1].



Obrázok 9: Štruktúra a syntéza retinalu [1]

2.1.6.3 Iné efekty na ľudské zdravie

Karotenoidy majú aj množstvo iných biologických funkcií vrátane zlepšenia reaktivity imunitného systému, inhibície bunecnej proliferácie, indukcie bunecnej diferenciácie prostredníctvom retinoidov, stimulácie intercelulárnej komunikácie alebo regulácie génovej expresie. Tiež prispievajú k prevencii niektorých chorôb, ako napríklad chronických ochorení pečene, kardiovaskulárnych ochorení a makulárnej degenerácie spojennej s vekom [5].

2.1.7 Potenciálne využitie v priemysle

Vďaka svojim pozitívnym vplyvom na ľudské zdravie, nachádzajú karotenoidy široké uplatnenie v rôznych odvetviach priemyslu. Vo farmaceutickom priemysle sú hojne využívané ako doplnky výživy, alebo ako prídavné látky do niektorých kozmetických výrobkov. V potravinárskom priemysle nachádzajú uplatnenie ako prírodné farbivá pridávané do nealkoholických nápojov, alebo pečiva či klobás. Tiež je nutné spomenúť ich význam v niektorých odvetviach poľnohospodárstva, a to hlavne v chove rýb a hydiny [9].

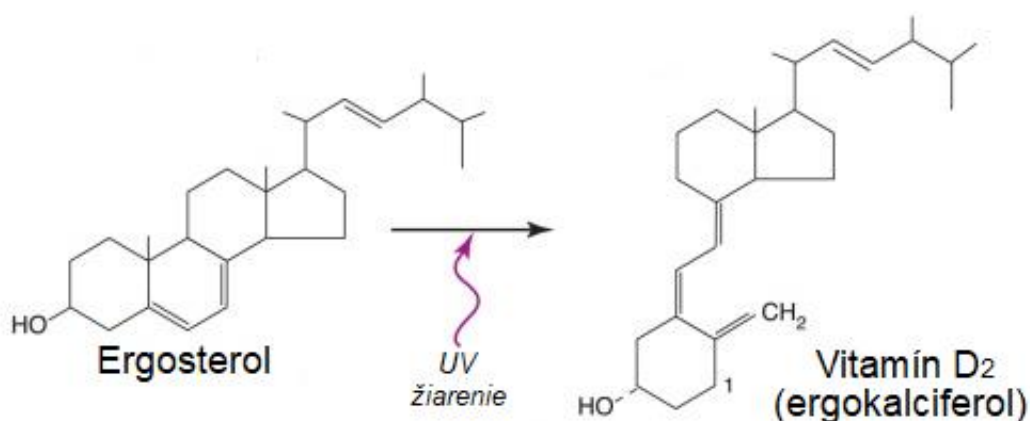
Komerčne sa najbežnejšie získavajú karotenoidy chemickou syntézou, alebo extrakciou z rastlinného materiálu. Obe tieto metódy sa vyznačujú nízkymi výnosmi, čo vedie k vysokým produkčným nákladom. Chemická syntéza navyše môže produkovať nebezpečné vedľajšie produkty. Produkcia extrakciou z rastlín je zasa závislá na sezónnych a geografických podmienkach, ktoré nie je možné úplne kontrolovať. Okrem spomínaných metód sa však ponúka aj ďalšia cesta, ktorou je mikrobiálna produkcia karotenoidov. Tá má značnú výhodu v tom, že je schopná využívať nízkonákladový poľnohospodársky odpad ako substrát pre mikroorganizmy. Znížia sa tak produkčné náklady a tiež sa nájde alternatívne využitie pre tieto odpady. Červené kvasinky sa ukazujú byť vhodnými producentami pre túto výrobu, keďže poľnohospodárske odpady sú dobrým zdrojom uhlíku a dusíku potrebného pre ich rast. Ďalším vhodným producentom sú mikroriasy, ktoré kombinujú vhodné vlastnosti vyšších rastlín (schopnosť fotosyntézy a jednoduché nutričné nároky) s biotechnologickými výhodami mikroorganizmov (rýchly rast vo vodnom prostredí a schopnosť akumulácie či sekrécie významných metabolitov) [9] [14].

2.2 Ergosterol

Z chemického hľadiska zaradujeme ergosterol do skupiny organických molekúl nazývaných steroly. Všetky eukaryotické organizmy obsahujú steroly inkorporované vo svojich biomembránach, pričom poznáme troch hlavných zástupcov tejto skupiny molekúl: cholesterol v stavovcoch, ergosterol v hubách a fytosteroly v rastlinách. Tieto steroly sú koncové produkty dlhých a zložitých biosyntetických dráh, ktoré sa vzájomne líšia, avšak vychádzajú z jednej spoločnej, a tou je dráha od acetylkoenzýmu A ku skvalénu. Každý z týchto spomínaných sterolov tiež reprezentuje, v porovnaní so svojimi prekurzormi, doterajšiu evolučnú perfektnosť, čo sa týka fyziologických a bunecných požiadaviek ktoré sú naňho kladené. Špecifické zastúpenie jednotlivých sterolov v rôznych ríšach eukaryotických organizmov je pravdepodobne spôsobené rozdielnou biologickou evolúciou. Dôvod preferencie ergosterolu hubami pred cholesterolom však stále nie je úplne jasný, keďže syntéza ergosterolu je energeticky náročnejšia a štúdie vzťahu štruktúry s funkciou týchto molekúl nepriniesli objasňujúce výsledky. Predpokladá sa teda, že ergosterol môže plniť aj radu zatiaľ neidentifikovaných funkcií. Jednou z nich môže byť aj ochrana pred osmotickým stresom a oxidačným stresom, ktoré súvisia s častými zmenami vlhkosti v prostredí, v ktorom huby žijú [15].

Ergosterol je jedným z hlavných komponentov biomembrán húb. Jeho biologická funkcia spočíva v modulácii membránovej fluidity, regulácii a distribúcii integrálnych membránových proteínov alebo riadenia bunecného cyklu. Pre život húb a plesní je teda syntéza ergosterolu esenciálna, a to práve robí ergosterol a jeho biosyntetickú dráhu vhodným cieľom pre antimykotiká pri liečbe závažných mykotických infekcií [16].

Ergosterol sa vyznačuje aj jednou významnou biologickou vlastnosťou, provitamín D aktivitou, čo mu dáva široké možnosti uplatnenia v rôznych odvetviach medicíny, potravinárstva a kozmetológie. Rastúci záujem o ergosterol podmienil vznik biomedicínskych štúdií, ktoré poukazujú na možnosť využitia ergosterolu ako aktívnej zložky nových liečiv s imunomodulačnými, protirakovinotvornými, protizápalovými, hematopoetickými a protivírusovými vlastnosťami. Tieto liečivá by tiež mohli slúžiť pre udržiavanie bunecnej homeostázy, ale aj pre prevenciu niektorých chorôb endokrinného a reprodukčného systému človeka. Vlastná konverzia na vitamín D₂ v telách živočíchov prebieha v koži a nastáva vplyvom ultrafialového (UV) žiarenia, ktoré štiepi β kruh ergosterolu za vzniku vitamínu D₂ (ergokalciferol – Obrázok 10). Tento jav nachádza uplatnenie napríklad aj pri priemyselnej produkcii vitamínu D₂, a to ožiarením kvasničnej biomasy bohatej na ergosterol [17] [18].



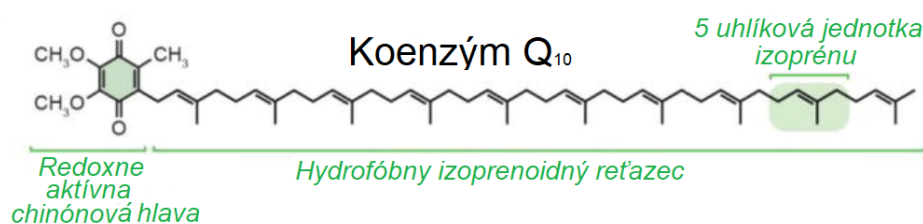
Obrázok 10: Schéma premeny ergosterolu na ergokalciferol [17]

2.3 Ubichinón

Ubichinón, alebo koenzým Q₁₀, bol prvý krát izolovaný v roku 1957 dvoma rozdielnymi výskumnými skupinami, čo je príčinou jeho dvojného označovania. Výraz ubichinón pochádza z anglického „ubiquinone“ alebo „ubiquitous quinone“ (v preklade: všadeprítomný chinón) a vychádza z jeho univerzálnej prítomnosti v rôznych tkanivách. Jeho druhý názov, koenzým Q₁₀ vystihuje jeho charakteristickú funkciu ako koenzým a štruktúru „hlava a chvost“ (chinónová hlava a izoprenoidný postranný reťazec - Obrázok 11). Množstvo izoprenových jednotiek v reťazci sa pohybuje medzi 6 a 10 v závislosti na druhu organizmu, pričom pre človeka je charakteristických 10 [19] [20].

Prítomnosť ubichinónu v prírode je možné pozorovať v mnohých aeróbných organizmoch, od baktérií až po cicavce. Všetky živočíšne tkanivá sú schopné syntézy ubichinónu *de novo*. Ubichinón je tiež prítomný v skoro všetkých bunkách ľudského tela, kde jeho chinónová hlava pôsobí ako transportér elektrónov medzi proteínovými komplexami v dýchacom reťazci. Dlhý postranný reťazec izoprenových jednotiek má zasa svoju dôležitosť v začlenení ubichinónu do lipofilného prostredia mitochondriálnej membrány. Vlastný transport elektrónov prebieha z proteínového komplexu I (NADH dehydrogenáza) a komplexu II (sukcinát dehydrogenáza) na proteínový komplex III (bc₁ komplex), a to redukciou ubichinónu na ubichinol komplexom I alebo II a následnou reoxidáciou komplexom III. V orgánoch s vyššími energetickými nárokmi, ako napríklad srdce, mozog, obličky alebo pečeň, je teda možné pozorovať zvýšené množstvo koenzýmu Q₁₀. Okrem jeho dôležitej roly v dýchacom reťazci má aj významné antioxidačné vlastnosti. Ako príklad je možné uviesť neutralizáciu voľných radikálov, alebo redukciu α -tokoferyl radikálu späť na α -tokoferol (vitamín E). Prispieva tak k ochrane DNA, proteínov a prevencii lipidovej peroxidácie. Rola vitamínu E je veľmi podobná role ubichinónu, avšak ubichinón je jediným endogénne syntetizovaným lipofilným antioxidantom [19] [20] [21].

Unikátne biochemické funkcie ubichinónu v tele človeka sú spojené so všeobecným zdravím, ale aj radou ochorení, ktoré sú charakteristické poklesom koncentrácie ubichinónu v tele, príkladom môže byť metabolický syndróm. Jeho úbytok býva tiež spôsobený aj inými faktormi ako je starnutie, alebo genetické predispozície. Existujú teda predpoklady že suplementácia týmto koenzýmom môže mať pozitívny vplyv na stabilizáciu a obnovenie prirodzenej obranyschopnosti organizmu. Jeho zvýšený príjem bol tiež navrhnutý ako terapia pre rôzne ochorenia ako Alzheimerova, Parkinsonova a Huntingtonova choroba [21] [22].

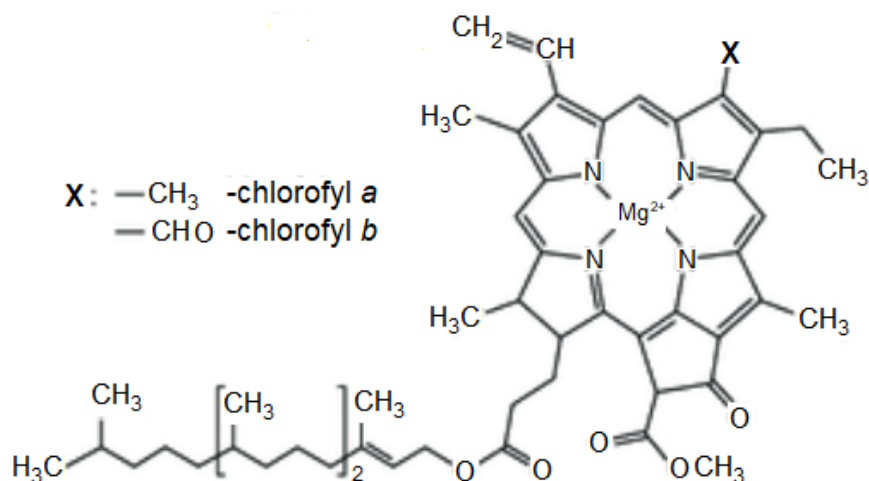


Obrázok 11: Štruktúra koenzýmu Q₁₀ [22]

2.4 Chlorofyl

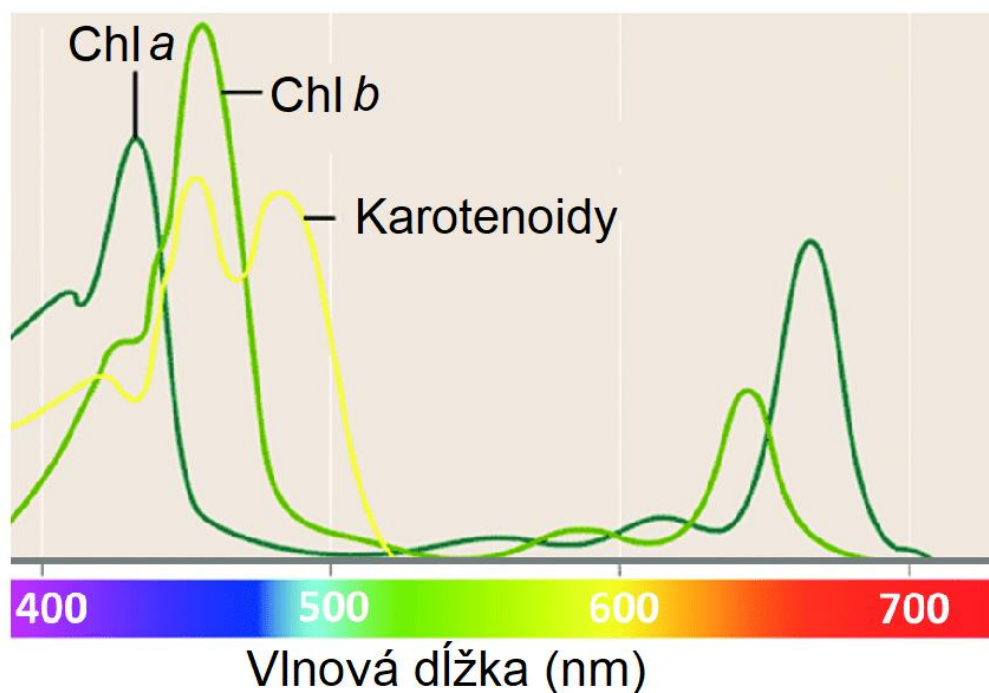
Chlorofyl je primárnym farbivom absorbujúcim svetelné žiarenie v membránach baktérií a v chloroplastoch rias a vyšších rastlín. Štruktúra chlorofylu sa vyznačuje svojím tetrapyrrolovým jadrom a je veľmi podobná štruktúre hému, odlišuje sa však od neho atómom ktorý je viazaný koordinačnými väzbami v centre molekuly, ktorým je horčík. Molekula chlorofylu navyše obsahuje aj dlhý alifatický reťazec (Obrázok 12). V prírode sa vyskytujú rôzne formy chlorofylu, najzastúpenejšie formy v telách vyšších rastlín a rias sú chlorofyl a a b.

Podobne ako karotenoidy, aj molekuly chlorofylu sa vždy účastnia na fotosyntéze naviazané na bielkoviny. Tieto bielkoviny sa nachádzajú v membránových štruktúrach chloroplastov a aj keď všetky dokážu absorbovať svetlo, iba malá časť z nich (v chloroplastoch iba asi 1 z 300) má fotochemické funkcie a je aktívnou súčasťou reakčného centra. Zvyšné molekuly tvoria svetlozberný komplex, ktorý je schopný absorpcie energie fotónu a následnej konvekcie energie do reakčného centra mechanizmom rezonančného prenosu, pričom celý tento proces sa vyznačuje vysokou efektivitou a usporiadanosťou [23] [24].



Obrázok 12: Štruktúra chlorofylu a a chlorofylu b [23]

Absorpčné maximá chlorofylov (Obrázok 13: Absorpčné spektrum chlorofylu a (chl a), chlorofylu b (chl b) a karotenoidov) v chloroplastoch sa pohybujú medzi 400-450 nm a 670-710 nm, čo indikuje, že chlorofyly nie sú schopné efektívnej absorpcie žltozeleného svetla. Svoj význam tu teda zohrávajú ďalšie pigmenty, ako napríklad karotenoidy, ktoré sú schopné efektívnej absorpcie svetla až do 500 nm a následného rezonančného prenosu energie na chlorofyl [1] [23].



Obrázok 13: Absorpčné spektrum chlorofylu a (chl a), chlorofylu b (chl b) a karotenoidov [25]

2.5 Lipidy

Lipidy sú pomerne rozmanitá skupina organických látok rastlinného aj živočíšneho pôvodu. Všetky sa vyznačujú výrazne obmedzenou rozpustnosťou v polárnych látkach (napríklad voda) a naopak dobrou rozpustnosťou v nepolárnych rozpúšťadlách a v bunečnom prostredí. Ich funkcie v organizmoch sú rovnako rôznorodé ako skupiny látok, ktoré medzi lipidy patria. Triacylglyceroly tvoria jednu z hlavných zásobární chemickej energie pre živočíchy, v telách ktorých sa akumulujú vo forme podkožného tuku, a aj pre rastliny, kde sa ukladajú v ich semenách a plodoch. V porovnaní so sacharidmi a proteínmi sa odbúraním lipidov dosiahne omnoho väčšie množstvo energie, a to až 9 kcal/g energie. Tukové tkanivo navyše telá živočíchov tepelne izoluje a mechanicky chráni. Podobnú funkciu majú aj vosky na povrchoch listov rastlín, ktoré ich chránia pred vysychaním a čiastočne pred patogénmi. Zložené polárne lipidy (napríklad fosfolipidy) sú hlavnou zložkou biologických membrán. Z hľadiska funkcie je tiež vhodné spomenúť regulačné steroidné hormóny, eikosanoidy a vitamíny A, D, E a K [23] [26].

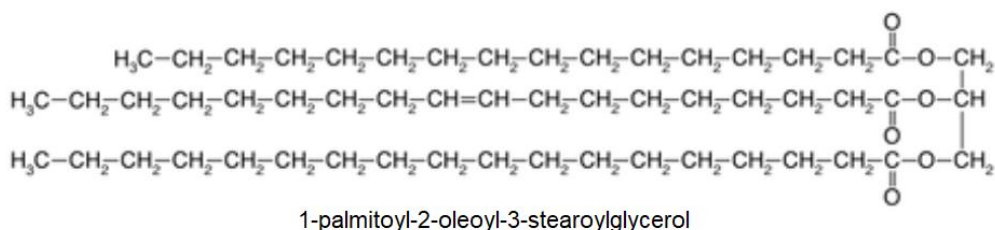
2.5.1 Delenie lipidov

Z hľadiska chemickej štruktúry je možné rozdeliť lipidy na jednoduché a zložené. Medzi jednoduché lipidy patria [23]:

- **Acylglyceroly** vyskytujúce sa hlavne ako triacylglyceroly (**TAG**) – estery glycerolu a vyšších mastných kyselín (Obrázok 14)
- **Vosky** – estery vyšších mastných kyselín a vyšších jednosýtnych alkoholov
- **Izoprenoidy** – terpény, karotenoidy, steroidy a iné

Naopak medzi zložené lipidy patria:

- **Fosfolipidy** – zložené lipidy obsahujúce zbytok kyseliny fosforečnej a iné polárne skupiny spoločne vytvárajúce hydrofílnu polárnu hlavicu, ktorá spolu s nepolárnou časťou molekuly (dvoma zvyšnými acylovými skupinami) dáva celej molekule amfipatický charakter; na základe štruktúry základného alkoholu v molekule rozlišujeme deriváty glycerolu (fosfatidy) a deriváty sfingozínu (sfingolipidy); tieto molekuly sú vo vode obmedzene rozpustné a majú tendencie formovať micely
- **Glykolipidy** – vznikajú spojením membránového fosfolipidu so sacharidovým reťazcom; ich hlavná rola je účasť na bunečnom rozpoznávaní
- **Lipoproteíny** – micely lipidov a lipofilných látok s proteínmi na povrchu, ktorých funkcia je transport vo vode nerozpustných látok v krvi.

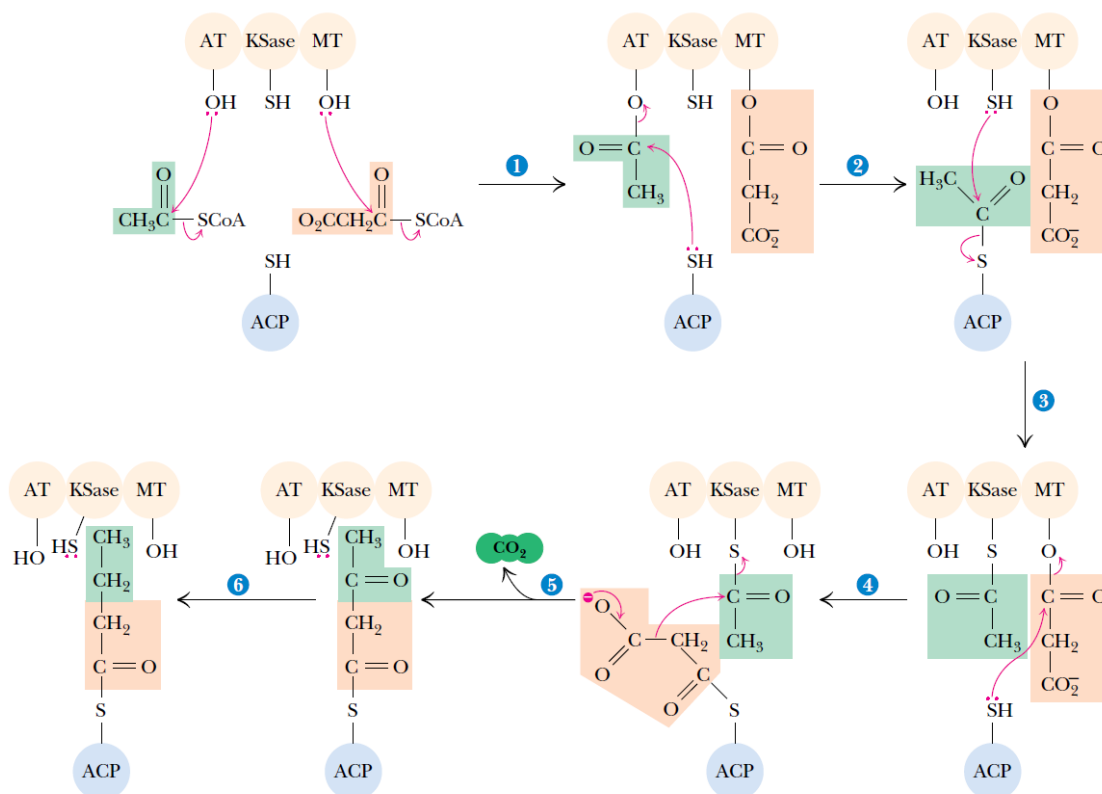


Obrázok 14: štruktúra triacylglycerolu obsahujúceho 3 rôzne mastné kyseliny [23]

2.5.2 Biosyntéza mastných kyselín

Všetky uhlíkové atómy, ktoré tvoria skelet mastných kyselín, vychádzajú z dvojuhlíkového prekursoru acetyl-CoA. Až do roku 1958 sa predpokladalo, že syntéza mastných kyselín využíva enzýmy β -oxidácie (rozkladu) mastných kyselín, ktoré pracujú v opačnom smere. Vedecké štúdie v tomto období však preukázali účasť CO_2 , ktoré sa využíva na karboxyláciu acetyl-CoA za vzniku malonyl-CoA ako kosubstrátu. Táto reakcia je energeticky závislá a slúži pre obchádzanie termodynamickej bariéry tvorenej kondenzáciou dvoch molekúl acetyl-CoA [27].

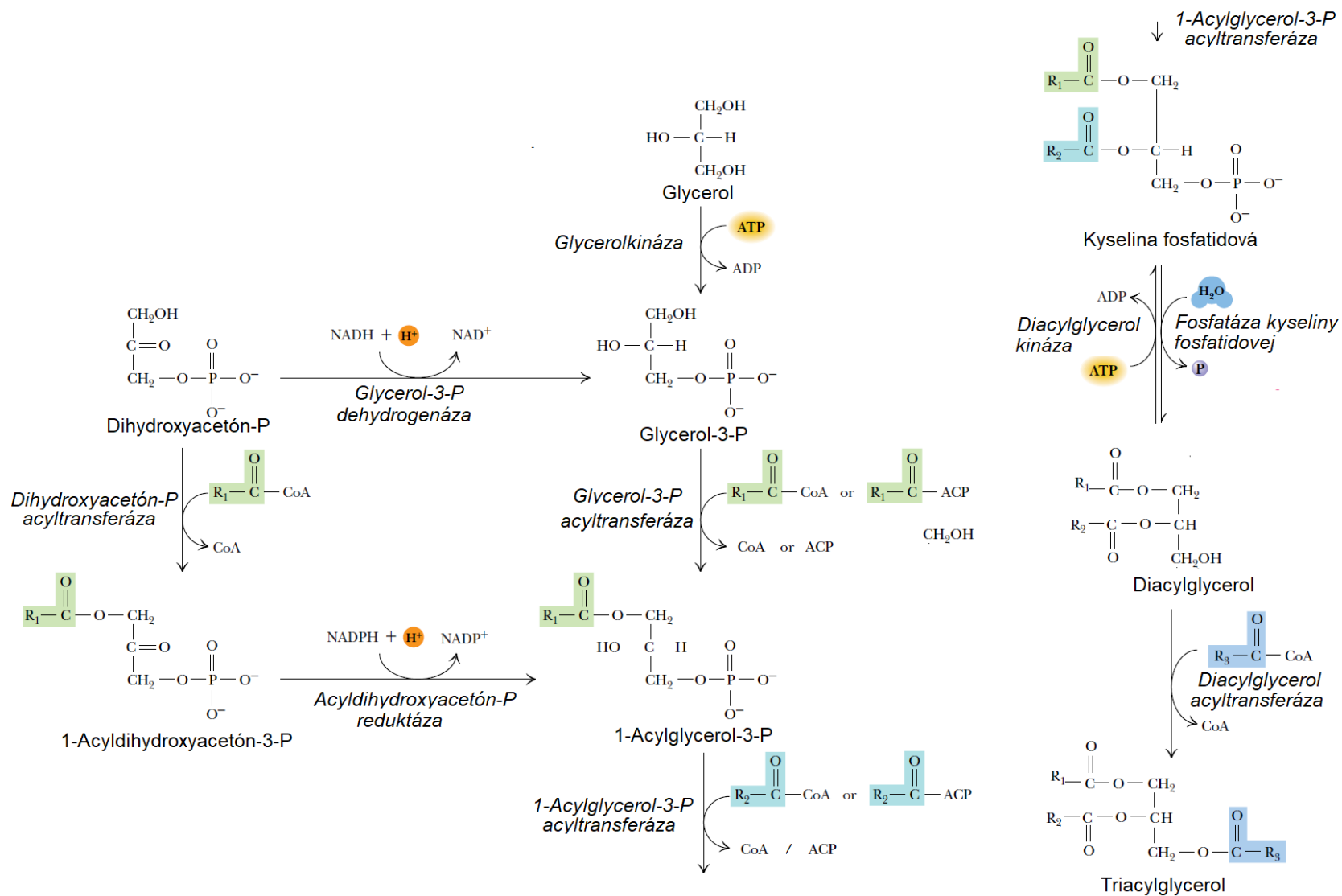
V prokaryotických organizmoch je biosyntéza nasýtených mastných kyselín katalyzovaná viac ako 10 individuálnymi enzýmami, pričom tento systém označujeme ako FAS II. Pre eukaryotické organizmy, ako napríklad živočíchy a kvasinky, je charakteristický systém FAS I, ktorý je tvorený enzýmami kovalentne spojenými do multifunkčných polypeptidov. Jediným voľným metabolitom celej dráhy je malonyl-CoA, všetky ostatné metabolity sú kovalentne spojené v acyl-enzýmových komplexoch. Enzýmy účinkujúce vo FAS I komplexe sú acetyl-CoA karboxyláza (ACC) a syntáza mastných kyselín (FAS). Transkripcia oboch týchto enzýmov je regulovaná špecifickým spôsobom, a to ako reakcia na rôzne hormonálne, vývojové či nutričné podnety. ACC je navyše regulovaná alosterickými a fosforylačnými mechanizmami a považuje sa za enzým udávajúci mieru rýchlosti celej dráhy. Biosyntetická dráha je znázornená na Obrázok 15 [27].



Obrázok 15: Biosyntetická dráha mastných kyselín v eukaryotoch [28]

2.5.3 Biosyntéza TAG

V eukaryotických organizmoch figurujú molekuly triacylglycerolov ako primárne úložiská energie. Ich biosyntetickými prekurzormi sú diacylglyceroly a kyselina fosfatidová, ktorá je prekurzorom všetkých glycerolipidov. Syntéza kyseliny fosfatidovej môže v eukaryotických systémoch vychádzať z dvoch rôznych molekúl, a to z glycerolu alebo z dihydroxyacetón fosfátu. Syntéza z glycerolu začína jeho fosforyláciou enzýmom glycerolkináza za vzniku glycerol-3-fosfátu, ktorý je následne acylovaný na pozícií 1- a 2- za vzniku kyseliny fosfatidovej. Dihydroxyacetón fosfát sa môže začleniť do dráhy redukčnou premenou na glycerol-3-fosfát, alebo najprv dôjde k adícii prvej acylovej skupiny špecifickou acyltransferázou na jeho molekulu a vzápätí nastane redukcia keto skupiny za vzniku 1-acylglycerol-3-fosfátu. Biosyntetická dráha je znázornená na Obrázok 16 Obrázok 15 [28].

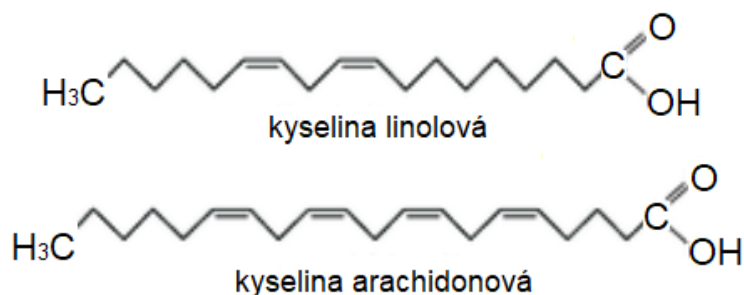


Obrázok 16: Syntéza triacylglycerolov v eukaryotoch [28]

2.5.4 Nenasýtené mastné kyseliny

Mastnými kyselinami sú označované všetky monokarboxylové kyseliny, ktorých soli je možné pripraviť hydrolýzou prírodných lipidov. V živých organizmoch ich bolo identifikovaných viac ako 1000, čo vypovedá o ich naozaj veľkej štruktúrnej rozmanitosti. Všetky sa vyznačujú dlhým alkylovým reťazcom, ktorý môže byť aj rozvetvený, môže obsahovať rôzne funkčné skupiny, alebo dvojné väzby, ktoré sú prevažne v *cis* konfigurácii. Na základe charakteru ich reťazca rozlišujeme nasýtené (bez dvojných väzieb) a nenasýtené (obsahujúce dvojnú väzbu), pričom mastné kyseliny s viac ako jednou dvojnou väzbou v reťazci označujeme ako polynenasýtené. Vďaka svojej rozmanitosti nachádzajú mastné kyseliny rozsiahle využitie v oleochemickom, potravinárskom a kozmetickom priemysle, ale aj vo výrobe mydiel, mazív, detergentov či povlakov [23] [29].

Najväčší význam v stravovaní človeka majú mastné kyseliny, ktoré si ľudské telo nedokáže samo syntetizovať a pre zachovanie správnych životných funkcií ich teda musí prijímať v potrave. Tieto mastné kyseliny označujeme ako esenciálne, pričom medzi ne zaradujeme iba také látky ktoré sú aktívne využívané pre rast a udržiavanie dermálnej integrity, a to konkrétne kyselinu linolovú, arachidonovú a ich metabolické deriváty. Ich hlavnou rolou je *in vivo* enzymatická produkcia eikosanoidov, medzi ktoré patria prostaglandíny, tromboxány a leukotriény. Tie majú vplyv na množstvo fyziologických funkcií, napríklad ako mediátory a regulátory zápalových reakcií. Ako prevencia negatívnych vplyvov spôsobených nedostatkom esenciálnych mastných kyselín je odporúčané, aby ich príjem zastupoval 1 až 2% denného kalorického výdaju [29] [30] [31].



Obrázok 17: Štruktúra kyselina arachidonovej a linolovej [23]

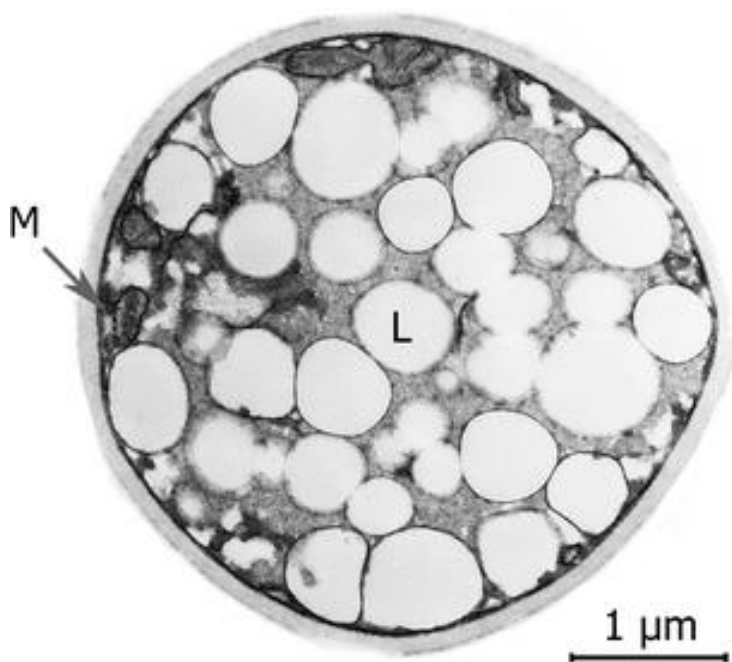
2.5.5 Biopalivá a mikrobiálna produkcia lipidov

V dnešnej dobe sa čoraz častejšie rieši otázka udržateľnosti využívania fosílnych palív ako energetického zdroja. Okrem toho sa tiež zohľadňuje ich nepriaznivý vplyv na životné prostredie, čo má za následok klimatické zmeny a globálne otepľovanie. V dôsledku toho prudko narastá dopyt po obnoviteľných zdrojoch takzvanej „čistej energie“. Jednou z takýchto alternatívnych možností, ktorá má zároveň najvyšší potenciál uspokojiť globálny dopyt, sú biopalivá. Táto situácia vedie k ďalšej otázke, a to ktoré biopalivá sa vzhľadom na ich zdroj biomasy a konkrétne výťažky, javia ako najvhodnejšie z ekonomického a z environmentálneho hľadiska. Biopalivá prvej generácie sa získavajú priamo z potravinových surovín, alebo nepotravinových plodín zámerne pestovaných pre tento účel, čo má však značné nevýhody. Príkladom môže byť výroba bionafty *trans*-esterifikáciou mastných kyselín jedlých rastlinných olejov, čo vedie k zvýšeniu ich ceny a tiež k súťaži o už teraz obmedzenú poľnohospodársku pôdu s inými potravinovými plodinami. Takéto biopalivá sa preto nepovažujú za udržateľné a obnoviteľné, čo prirodzene vedie k ďalšej snahe nájsť iné nekonvenčné zdroje olejov použiteľné na výrobu bionafty alebo obnoviteľnej nafty. Vhodným riešením sa ukazujú byť olejnaté mikroorganizmy, ktoré sú charakteristické schopnosťou akumulovať vo svojich bunkách lipidy. Medzi významné olejnaté mikroorganizmy patria druhy rias, siníc, kvasiniek a húb, ktorých zastúpenie lipidov v suchej biomase činí minimálne 20% hmotnosti. Medzi významnými biopalivami má svoje miesto aj bio-etanol produkovaný fermentáciou nepotravinových plodín a rastlín, ktorého využitie však limituje jeho nízka energetická hustota [32] [33] [34] [35].

Kvasinky, ako heterotrofné eukaryoty, potrebujú na svoj rast a ako ja produkciu lipidov organický zdroj uhlíka. Hlavné ekonomické požiadavky sú teda kladené na čo najväčšie možné zníženie nákladov spojených s druhom substrátu, pričom ako ideálne riešenie sa javí využitie odpadných poľnohospodárskych surovín. Kultivácia, ktorá by umožnila valorizáciu týchto odpadov, čím by znížila záťaž kladenú na životné prostredie a zároveň umožnila produkciu hodnotných mikrobiálnych olejov, by mohla mať veľký význam pre implikované potravinárske závody. Medzi najbežnejšie rody olejnatých kvasiniek patria rody *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Yarrowia*, *Trichosporon*, *Candida* a *Lipomyces*, pričom niektoré kmene sú schopné dosiahnuť až 70-75% lipidov v suchej biomase. V porovnaní s plesňami majú kvasinky radu výhod, ktorými sú napríklad kratšia a jednoduchšia kultivácia a väčšia tolerancia prítomnosti kovových iónov a nedostatku kyslíka. Za výhodu kvasiniek môže byť považovaná aj nezávislosť kultivácie na slnečnom žiarení, čo umožňuje nepretržitú kultiváciu a tiež znižuje prípadné náklady tvorené umelým osvetlením [35] [36].

V kontraste s kvasinkami sú riasy autotrofné mikroorganizmy, ktoré pre svoj rast vyžadujú iba slnečnú energiu a atmosférický CO₂, čo ich robí atraktívnym zdrojom bionafty. Medzi bežné rody mikrorias, ktoré dosahujú vysokých výťažkov lipidov v suchej biomase (od 20 do 75%), patrí napríklad rod *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Botryococcus* alebo *Neochloris*. V rámci autotrofných fotosyntetizujúcich mikroorganizmov je tiež potrebné spomenúť význam siníc, ktorý spočíva v ich mimoriadne účinných fotosyntetických schopnostiach. Sinice dokážu premeniť až 10% slnečnej energie na biomasu, čo významne prevyšuje konvenčné rastlinné plodiny dosahujúce asi 1%, a aj mikroriasy dosahujúce 5% účinnosti [32] [34] [35].

Okrem využitia mikrobiálnych olejov ako biopalív, je tiež vhodné spomenúť ich významný obsah cenných polynenasýtených mastných kyselín, a to hlavne u rias, siníc a húb, ktoré môžu byť využívané ako doplnky stravy ľudí či zvierat. Svoj význam majú aj kvasinky, tie sa však vykazujú nižším stupňom nenasýtenosti mastných kyselín ako huby [34] [35].

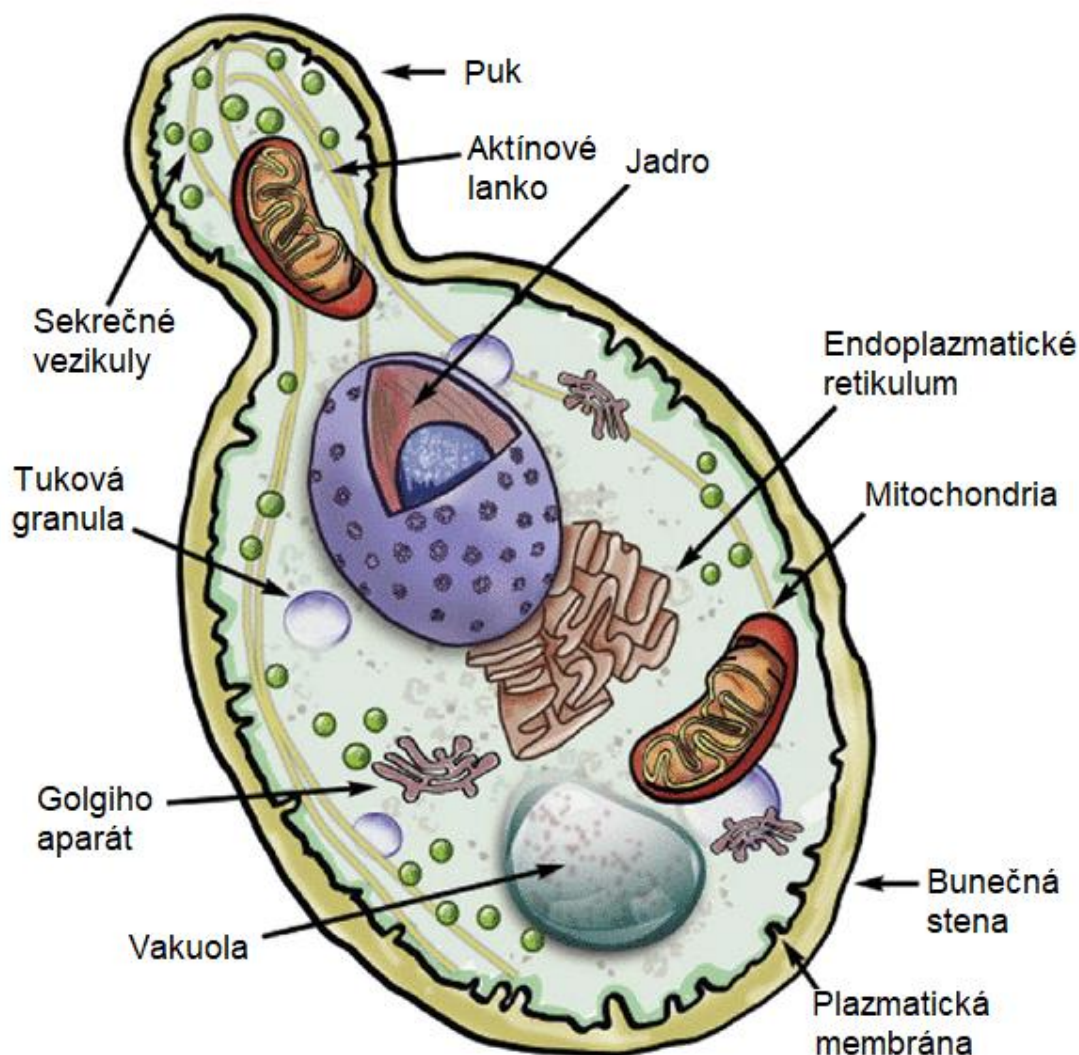


Obrázok 18: *Cryptococcus curvata* D kultivovaný za nedostatku dusíka, celkový obsah lipidov asi 40%; M – mitochondria, L – tukové kvapôčky [37]

2.6 Kvasinky

Kvasinky sú jednobunkové eukaryotické organizmy patriace do skupiny organizmov nazývanej huby, ktorá zahŕňa aj plesne a hriby. Väčšina kvasiniek je vďaka rýchlemu rastu za anaeróbných podmienok dobre prispôsobená životu v tekutom prostredí, je schopná tolerancie nízkeho pH a na rozdiel od iných húb neprodukuje toxické sekundárne metabolity. Kvasinky často kolonizujú potraviny či nápoje s vysokým obsahom cukru alebo soli a nízkym pH, kde prispievajú k ich skazeniu, ako napríklad chlieb, ovocie, džúsy, nakladané uhorky či mliečne výrobky. Niektoré druhy sú schopné rasti na povrchoch mäsa alebo syra. Rýchlosť rozmnožovania kvasiniek je však v porovnaní s baktériami pomalšia, čo spôsobuje neschopnosť im konkurovať v prostredí priaznivom pre baktérie (neutrálne pH a vyššia teplota) [38].

Kvasinky sa rozmnožujú najčastejšie pučaním, zriedkavejšie štiepením (Obrázok 19). Počas pučania dôjde k narušeniu bunečnej steny a vytvoreniu dcérskej bunky, pričom tento proces zanecháva na bunečných stenách oboch buniek jazvu a nemôže byť nekonečne opakovaný (obvyklá kvasinka používaná pri výrobe piva typu ležiak sa dokáže rozmnožiť pučaním asi 20 krát) [38] [39].



Obrázok 19: Schématické znázornenie bunky kvasiniek [39]

2.6.1 Morfológia a cytológia

Bunky kvasiniek sa prirodzene vyskytujú osamotene, v pároch, reťazcoch alebo iných zhlukoch. Ich tvar je zvyčajne sférický, cylindrický alebo oválny, pričom priemerne dosahujú rozmeru 5 až 10 μm . Na povrchu buniek sa nachádza bunečná stena, ktorá je hrubá asi 250 nm a tvorí asi 25% hmotnosti sušiny kvasiniek. Bunečná stena je komponovaná z troch rôznych vrstiev sacharidov, pričom vnútorná chitínová vrstva je tvorená hlavne glukánmi, vonkajšia je tvorená mannoproteínmi a stredná je kombináciou vonkajšej a vnútornej vrstvy. Jazvy na bunečnej stene, ktoré vznikli počas pučania sú tvorené iba chitínom [39].

Pod bunečnou stenou sa nachádza plazmatická membrána, čo je selektívne priepustná fosfolipidová dvojvrstva ohraničujúca vnútorný priestor bunky. Plazmatická membrána má viacero rôznych funkcií, medzi ktoré patrí bránenie voľnej difúzie molekúl, regulácia výmeny látok s prostredím, poskytovanie väzobných miest pre špecifické molekuly zapojené do metabolických signálnych dráh, vytváranie organizovanej matrice pre enzýmové komplexy zapojené v biosyntéze iných bunkových komponentov. Je tvorená primárne z lipidov, sterolov a proteínov, čo ju robí prirodzene fluidnú a flexibilnú. Hlavný vplyv na fluiditu má úroveň saturácie mastných kyselín, ktorá má priamy vplyv na mieru vzájomnej interakcie (viazania) vodíkových atómov mastných kyselín a teda vzájomné viazanie lipidov. Kontrolou úrovne saturácie mastných kyselín je kvasinka schopná udržať si dostatočnú fluiditu aj za rôznej teploty prostredia [39].

Vnútorné prostredie bunky ohraničené plazmatickou membránou, vynímajúc membránovo viazané organely, označujeme ako cytoplazmu, pričom vlastné tekuté prostredie bunky označujeme ako cytosol. Nachádzajú sa v ňom enzýmy a najrôznejšie bunečné metabolity. Mitochondria je bunečná organela obsahujúca dvojitú membránu. Prebieha v nej aeróbna respirácia a cyklus trikarboxylových kyselín. Bunečné jadro je membránová organela, ktorá obsahuje DNA, prostredníctvom ktorého sú uložené genetické informácie bunky. Transfer informácií z DNA do cytoplazmy pre použitie v proteosyntéze prebieha pomocou mRNA. Bunka ďalej obsahuje vakuolu, ktorá je hlavným miestom proteolýzy a zásobárňou živín. Endoplazmatické retikulum je membránová sieť, v ktorej sú syntetizované proteíny, lipidy a sacharidy určené ako stavebné prvky plazmatickej membrány alebo pre sekréciu. Okrem iného sa bunke nachádzajú aj iné glykogénové častice alebo lipidové granule [39].

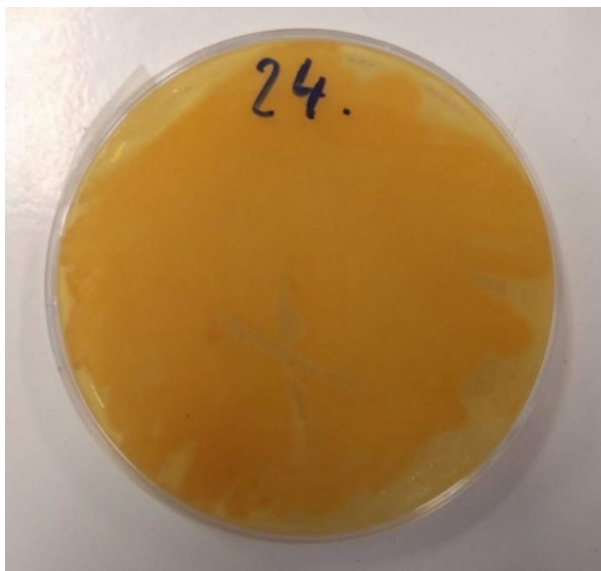
2.6.2 Charakteristika vybraných rodov kvasiniek

Kvasinky sú pomerne heterogénnou skupinou často málo príbuzných húb. Na svete bolo popísaných už asi 1500 rôznych druhov kvasiniek, pričom sa odhaduje, že ďalších 669 tisíc existujúcich druhov zatiaľ nebolo popísaných [38] [39].

Medzi červené kvasinky patria napríklad rody *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, a ich teleomorfy *Rhodospiridium* alebo *Sporidiobolus*. Ich zástupcov je možné nájsť po celom svete a môžu byť izolované z ovzdušia, fytoplánu či rozkladajúcich sa častí rastlín. Tieto druhy produkujú zmes karotenoidov zloženú z β -karoténu, γ -karoténu, torulénu a torularodínu. Najznámejším priemyslene využívaným zástupcom červených kvasiniek je však bezpochyby druh *Phaffia rhodozyma*, známy svojím špecifickým profilom produkovaných karotenoidov, z ktorých hlavným je astaxantín [40].

2.6.2.1 Rod *Rhodotorula*

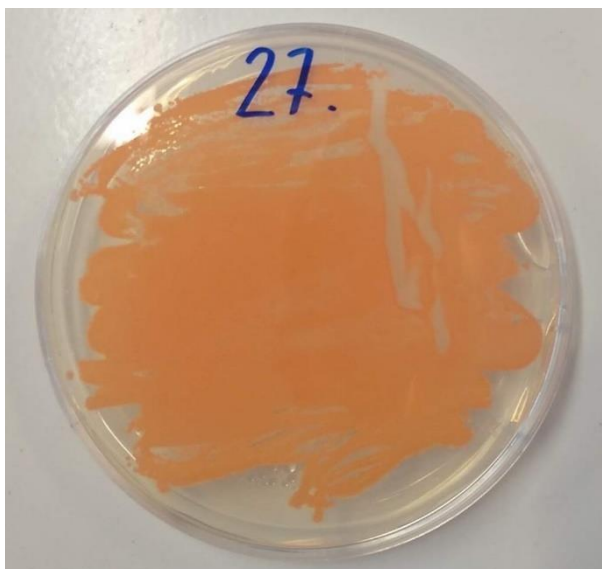
Kvasinky rodu *Rhodotorula* je obvykle možné izolovať z prírodného prostredia ako je pôda, voda či fyloplán, pričom rod *R. mucilaginosa* je považovaný za najviac rozšírený rod bazídiomycét na svete. Bunky tohto rodu kvasiniek sú obvykle malé, guľatého tvaru, nevytvárajúce balistokonídie. Kolónie majú charakteristickú lososovo-ružovú až koralovo-červenú farbu. Medzi významné druhy patrí napríklad *R. mucilaginosa*, *R. glutinis* a *R. minuta* [41] [42].



Obrázok 20: *Rhodotorula mucilaginosa* na agare [43]

2.6.2.2 Rod *Sporobolomyces*

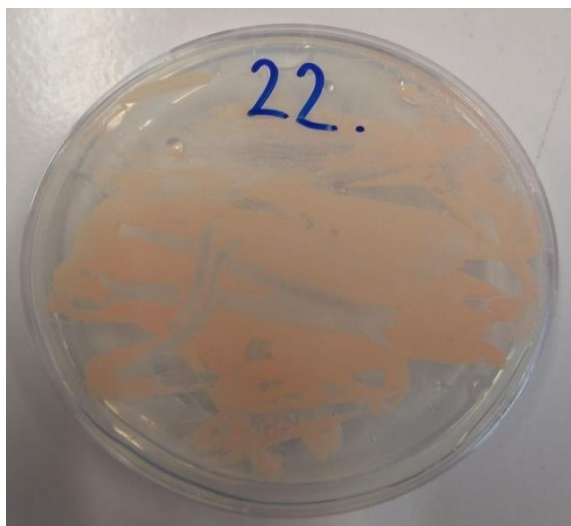
Bunky kvasiniek rodu *Sporobolomyces* vytvárajú lososovo-ružové, oranžové, červené až žltó-hnedé kolónie, ktoré sú hladké alebo zvrásnené, často pripomínajúce kolónie rodu *Rhodotorula*. Patrí sem viac ako 20 popísaných druhov a taktiež aj viac ako 30 doposiaľ nezarađených druhov. Samotný tvar buniek je oválny až tyčinkovitý. Bunky tohto rodu môžu vytvárať hýfy či pseudohýfy, alebo vytvárať balistokonídie. Významnými zástupcami toho rodu sú *Sporobolomyces roseus* či *Sporobolomyces salmonicolor* [41] [42].



Obrázok 21: *Sporidiobolus pararoseus* na agare [43]

2.6.2.3 Rod *Cystofilobasidium*

Zástupcovia rodu *Cystofilobasidium* sú charakteristickí výrazne oranžovou, lososovo ružovou, až škoricovou farbou kolónií. Ich bunky majú zväčša vajcovitý až pretiahnutý tvar a nevytvárajú balistokonídie. V niektorých druhoch môžu byť formované primitívne pseudohýfy. Pravé mycélium je formované počas obdobia sexuálnej reprodukcie. Niektoré druhy môžu mať schopnosť fermentácie. K najvýznamnejším zástupcom patrí *C. capitatum* a *C. infirmominiatum* [41] [42].



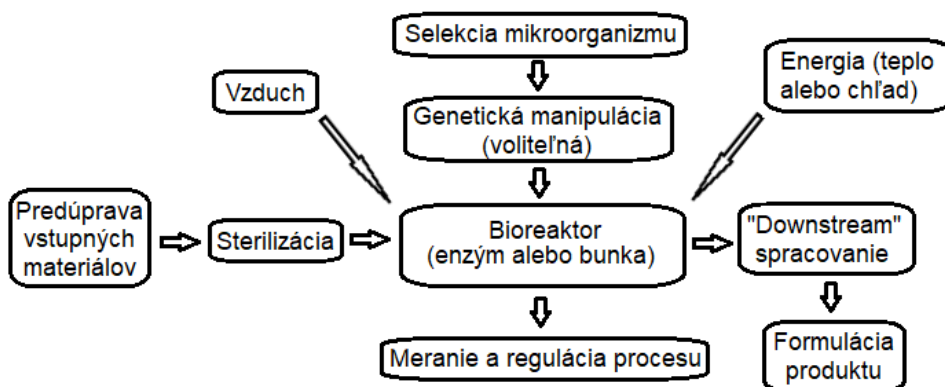
Obrázok 22: *Cystofilobasidium infirmominiatum* na agare [43]

2.6.2.4 Rod *Xanthophyllomyces*

Najznámejším zástupcom tohto rodu je zrejme *Xanthophyllomyces dendrorhous*, viac známy pod názvom svojho anamorfu *Phaffia rhodozyma*. Tento rod sa vyznačuje produkciou astaxantínu, ktorého hodnota spočíva v jeho mimoriadne vysokých antioxidačných účinkoch, ktoré sú až niekoľko krát vyššie ako má napríklad vitamín E [41] [44].

2.6.3 Biotechnologická výroba karotenoidov kvasinkami

Kvôli rastúcemu záujmu o mikrobiálnu produkciu karotenoidov s aplikáciami v rôznych odvetviach priemyslu vzniká čím ďalej tým väčšia snaha o celkovú optimalizáciu tohto biotechnologického procesu. Hlavnými kritériami produkcie karotenoidov na industriálnej úrovni sú čo najnižšie náklady spojené s výrobou, vysoké výťažky a šetrnosť k životnému prostrediu. Celkový výťažok, ako aj kompozícia karotenoidov, sa dramaticky líšia v závislosti na použítom kmeni kvasiniek, zložení živného média a kultivačných podmienkach. Zloženie živného média, alebo lepšie povedané druh substrátu, má nezanedbateľný vplyv aj na ekonomickú stránku výroby a na celkový dopad na životné prostredie [9] [36] [40].



Obrázok 23: Všeobecné schéma biotechnologického procesu pre výrobu karotenoidov [9]

2.6.3.1 Živné médium

Karotenoidy patria medzi sekundárne metabolity kvasiniek, karotenogenéza teda nastáva až v neskorej logaritmickú fáze rastu. Bunky kvasiniek teda potrebujú vo svojom živnom médiu spoľahlivý zdroj uhlíka, z ktorého môžu získať energiu a využiť ho pre svoj rast. Takýmto zdrojom môže byť napríklad glukóza, xylóza, celobióza, glycerol alebo sorbitol. Hoci je rafinovaná glukóza excelentným zdrojom uhlíka pre kvasinky, jej cena je naozaj vysoká. Dôsledkom toho sa v poslednej dobe veľké množstvo štúdií sústreďuje práve na skúmanie schopností kvasiniek produkovať karotenoidy za využitia rôznych poľnohospodárskych odpadných surovín, s veľmi nízkou, či negatívnou cenou. Ako príklad takýchto substrátov je možné uviesť surový glycerol, industriálne tuky, mliečnu srvátku, a rôzne sacharidové extrakty a hydrolyzáty vedľajších produktov poľnohospodárskeho priemyslu. Samotné spracovanie niektorých z týchto odpadov predstavuje vysoké náklady a záťaž na životné prostredie. Okrem zdroja uhlíka je tiež potrebné vziať do úvahy zdroj dusíka, ktorý je taktiež potrebný pre rast kvasiniek. Ako príklad najvhodnejších dusíkatých substrátov je možné uviesť kvasničný extrakt, peptón, močovinu alebo síran amónny, a ako príklad alternatívnych substrátov hydínové perie. Na záver je potrebné vziať do úvahy samotný pomer uhlíku a dusíku v médiu (C/N pomer), ktorý má vplyv na druh akumulovaných metabolitov. Nižší C/N pomer je priaznivý pre produkciu karotenoidov, zatiaľ čo vysoký C/N pre akumuláciu lipidov. Štúdium kvasinky *Rhodotorula gracilis* z roku 2000 [45] napríklad ukazuje až 15 krát vyššie zasupenie karotenoidov v suchej biomase kvasiniek pri C/N pomere 10, v porovnaní s C/N pomerom 160. C/N pomer 160 mal zasa za následok vzrast akumulácie lipidov na 55% suchej hmotnosti, z 20% pri C/N pomere 10 [9] [36] [45].

2.6.3.2 Kultivačné podmienky

Keďže cieľom optimalizácie biotechnologického procesu je dosiahnutie čo najvyššej produkcie za čo najnižších nákladov, je v prvom rade potrebné optimalizovať kultivačné podmienky. Na biosyntézu karotenoidov má vplyv množstvo faktorov, niektoré z tých najdôležitejších sú [9] [36] [40]:

- **Svetelné žiarenie** vyvolávajúce fotooxidačný stres, čo má indukujúci účinok na karotenogenézu; jedná sa o fotoprotektívny mechanizmus, ktorým sa mikroorganizmy chránia pred fotooxidačným poškodením
- **Teplota** majúca vplyv na bunkový rast, ale aj biosyntetické dráhy, a to konkrétne istou reguláciou koncentrácie enzýmov zúčastňujúcich sa v syntéze karotenoidov; optimálna teplota pre produkciu karotenoidov kmeňom *Rhodotorula glutinis* bola stanovená na 29 - 30 °C
- **Aerácia** alebo tiež vzdušenie má priam vplyv na množstvo rozpusteného kyslíka, ktorý je potrebný jak pre bunkový rast, tak pre karotenogenézu
- **Osmotický stres** alebo solný stres môže mať indukčný účinok na produkciu karotenoidov; príliš veľký prebytok rozpustenej soli má však opačný efekt
- **Kovové ióny** a soli niektorých prvkov (napríklad Ba, Fe, Mg, Zn, Ca a Co) môžu mať selektívny vplyv na profil produkovaných karotenoidov; Al^{3+} a Zn^{2+} stimulujú produkciu β -karoténu a γ -karoténu, zatiaľ čo Mn^{2+} a Zn^{2+} inhibujú produkciu torulénu a torularodínu; ich účinok sa pripisuje buď to aktivácii alebo inhibícii špecifických karotenogénnych enzýmov, alebo aktivácii bunkových obranných mechanizmov ako reakcie na prítomnosť kyslíkovým radikálov generovaných niektorými kovmi
- **Rozpúšťadlá** a prírodné či chemické látky pridané do média, ako napríklad etanol, metanol, izopropanol, etylénglykol či kyselina octová, môžu stimulovať produkciu karotenoidov i celkový nárast biomasy.

2.6.3.3 Bioreaktor a downstream proces

Dizajn a konfigurácia bioreaktoru hrajú kľúčovú rolu pre dosiahnutie požadovaného výťažku cieľového metabolitu. Do úvahy je potrebné vziať veľké množstvo už spomínaných faktorov ovplyvňujúcich daný proces a aj typ fermentácie (jedna várka, prítoková alebo kontinuálna).

Pri optimálnom nastavení je plnofunkčný bioreaktor schopný zaistiť efektívnu a dôslednú kontrolu kritických parametrov, ako je teplota, miešanie, prevzdušňovanie, pH a rozpustený kyslík [9].

„Downstream processing“ alebo pofermentačné spracovanie predstavuje často najvyššie náklady spojené s biotechnologickým procesom. Karotenoidy produkované červenými kvasinkami sú syntetizované a uložené vo vnútri buniek, čo robí ich extrakciu a purifikáciu pomerne zložitou a nákladnou. Kritickým krokom je disrupcia buniek napríklad zmrazením, enzymaticky, lyofilizáciou, rozdrvením, alebo účinkom organickým rozpúšťadiel ako DMSO alebo acetón. Vývoj rôznych techník získavania karotenoidov sa teda stal predmetom rady štúdií [9] [36].

2.7 Riasy

Riasy sú súborom prevažne vodných, fotosyntetizujúcich eukaryotických organizmov ktoré sa vyznačujú obsahom chlorofylu a zároveň absenciou pravých koreňov, stonky a listov. Ich rozmanitosť siaha od jednobunkových mikroorganizmov veľkosti baktérií, po obrovské morské riasy. Riasy zaberajú naozaj širokú škálu biotopov a vyskytujú sa vo všetkých klimatických zónach, od tropických oblastí až po arktické či antarktické oblasti. Môžeme ich nájsť v sladkej vode, oceánoch, ústiach riek, vlhkých pôdach, horúcich prameňoch, kamenných povrchoch, snehových poliach či dokonca aj v púšťach. Riasy sa rozdeľujú na dva hlavné typy - makroriasy a mikroriasy [46] [47].

Makroriasy je všeobecné pomenovanie všetkých druhov rias, ktoré aspoň v jednom zo štádií svojho životného cyklu tvoria mnohobunečné tálium. Na rozdiel od jednobunečných mikrorias môže nastať v rámci ich organizmu aj rôzna diferenciácia tkaniva a vznik reprodukčných systémov. Najrozmernejší zástupcovia sa nazývajú morské riasy a môžu dosahovať rozmeru až 25 m na dĺžku. Akumulácia lipidov v makroriasach sa pohybuje v rozmedzí 10% až 30% hmotnosti [48].

Mikroriasy sú jednoduché autotrofné i heterotrofné organizmy mikroskopických rozmerov (1 až 50 μm). Často sa vyskytujú v jazerách a v prostrediach s dostatočnou vlhkosťou. Väčšina z nich obsahuje chlorofyl, čo umožňuje priebeh fotosyntézy, pričom sú zodpovedné až za 50% fotosynteticky vyprodukovaného O_2 na Zemi. Celkový počet druhov mikrorias sa odhaduje na 200 až 800 tisíc, avšak iba asi 40 000 až 50 000 bolo zatiaľ popísaných v literatúre [48] [49].

2.7.1 Charakteristika vybraných rodov mikrorias

2.7.1.1 Rod *Chlamydomonas*

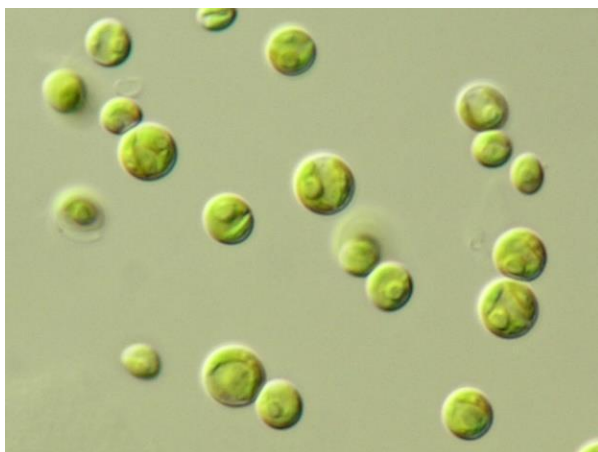
Zástupcovia rodu *Chlamydomonas* sa relatívne bežne vyskytujú vo vlhkých pôdach či sladkých vodách, a to aj ak sú značne znečistené. Z väčšiny sa jedná o sladkovodné bičíkovce, so kvapkovým až vajcovitým tvarom bunky (viď. Obrázok 24). Rozmnožovanie môže prebiehať pohlavne i nepohlavne, pričom za priaznivých podmienok je preferované asexuálne rozmnožovanie. Ich názov je odvodený od glykoproteínovej vrstvy, ktorou sú bunky pokryté (chlamys). Druh *Ch. nivalis* sa vyznačuje produkciou astaxantínu a je veľmi častým pôvodcom červeného sfarbenia snehu v horských a polárnych oblastiach. Druh *Ch. reinhardtii* je rozsiahlo využívaný ako modelový organizmus, napríklad pri štúdiu fototaxie alebo pri eko-toxikologických štúdiách [50] [51] [52].



Obrázok 24: *Chlamydomonas reinhardtii* [53]

2.7.1.2 Rod *Chlorella*

K rodu *Chlorella* patrí veľké množstvo sladkovodných i morských druhov, Tento rod zahŕňa druhy s dobrou teplotnou toleranciou (schopné rasti pri 15 až 40°C). Niektoré druhy sú navyše schopné jak autotrofného rastu v anorganickom médiu, tak aj mixotrofného a heterotrofného rastu. Tento rod sa tiež vyznačuje schopnosťou syntetizovať veľké množstvo karotenoidov, využíva sa teda k izolácii týchto látok a následnej aplikácii vo farmaceutickom priemysle, ale aj k príprave potravinových doplnkov vo forme sušenej biomasy. Okrem intenzívnej syntézy karotenoidov bola tiež preukázaná vysoká produkcia proteínov, produkcia viacerých esenciálnych mikroelementov, nenasýtených mastných kyselín a vitamínu C a E [50] [54].



Obrázok 25: *Chlorella vulgaris* [53]

2.7.1.3 Rod *Scenedesmus*

Jedná sa o cenobiálne riasy, ktorá sa vyznačujú charakteristickou schopnosťou vytvárať kolónie až ôsmich buniek. Takéto zhukovanie buniek nastáva ako ochranná reakcia pred predátormi (zooplanktón) ktorý už nie sú schopný požiť takto rozmerného útvaru. Všeobecne sa jedná o veľmi početný rod mikrorias s veľkou morfológickou variabilitou. Zástupcovia tohto rodu sú schopní tolerancie širokého rozmedzia vonkajších podmienok a boli jedny z prvých laboratórne kultivovaných mikrorias. Niektorí zástupcovia sú používaní ako modelové organizmy, napríklad pri stanovení trofického potenciálu povrchovej vody. Ich význam tkvie i v ich produkcii hodnotných karotenoidov, ako je luteín či astaxantín [50] [51] [55].



Obrázok 26: *Scenedesmus obtusiusculus* [56]

2.7.2 Kultivácia mikrorias

Význam mikrorias tkvie v ich širokom spektre využitia, a to napríklad ako zdroja lipidov, enzýmov, biomasy, polymérov, pigmentov či toxínov, ako doplnkov výživy, prostriedkov terciárneho čistenia odpadnej vody, zdroja „zelenej energie“ alebo potenciálneho zdroja biopalív. Ich využitie je primárne možné vďaka ich výnimočným vlastnostiam, ktoré ich robia atraktívnejšími, než sú iné energetické rastliny, a tými sú [46] [48]:

- Možnosť kultivácie na neorných a marginálnych pôdach
- Možnosť kontinuálnej kultivácie, nezávislej na ročnom období
- Ich schopnosť tolerancie širokého rozmedzia pH, teploty a salinity
- Ich schopnosť redukcie atmosférického alebo industriálne produkovaného CO₂
- Možnosť kompletného využitia ich biomasy
- Obnoviteľnosť a udržateľnosť ich produkcie
- Krátky životný cyklus a vysoké výťažky cieľových metabolitov.

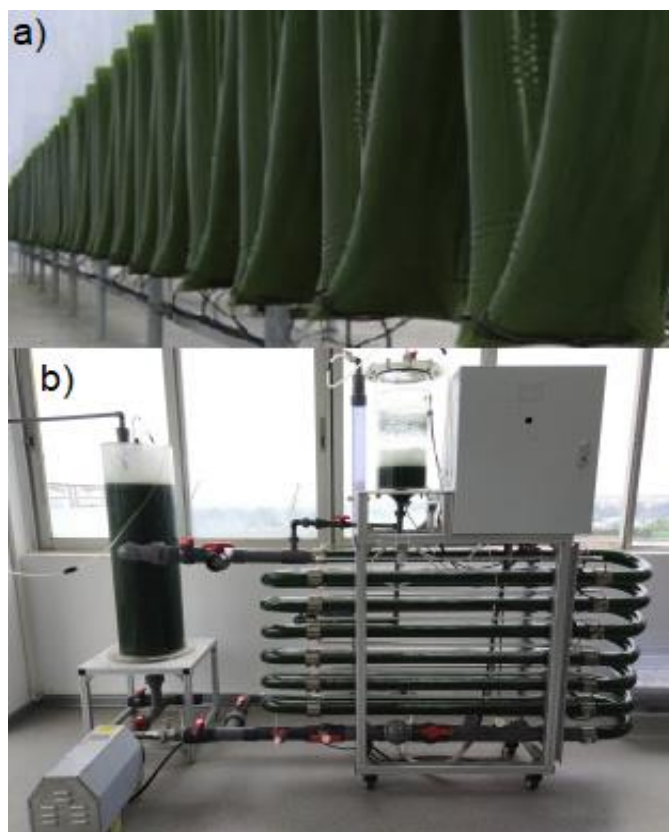
Kultivácia mikrorias sa nezaobíde bez špecifickej regulácie podmienok ich kultivačného prostredia, a to napríklad regulácie teploty, pH, svetelnej intenzity, bunečnej hustoty, salinity, prestupu plynov či prísunu živín. Pre rast mikrorias sú podstatné aj správne procesné parametre ako napríklad miešanie, hydrodynamický stres, rýchlosť riedenia a frekvencia zberu [49].

2.7.2.1 Teplota

Optimálna teplota rastu rias sa líši v závislosti na druhu a ich požadovanej reakcie. Horná hranica teploty prostredia pre eukaryotické fotosyntetizujúce riasy je 62 °C, za čo môže nestabilita chlorofylu. Väčšina druhov olejnatých rias rastie najlepšie v tepelnom rozmedzí 25 až 30 °C. Podobne ako kvasinky, aj riasy menia úroveň saturácie ich mastných kyselín v závislosti na teplote. Vyššia teplota je zodpovedná za akumuláciu nasýtených lipidov, zatiaľ čo nízka za vyššiu akumuláciu nenasýtených lipidov. Nízka teplota sa ukázala byť priaznivou aj pre produkciu karotenoidov [48] [49] [57].

2.7.2.2 pH

Hodnota pH média má priamy efekt na metabolizmus mikrorias, a to konkrétne reguláciou enzýmovej aktivity a prísunu iónov, vplyvom na dostupnosť fosforu a anorganického uhlíka alebo vplyvom na toxicosť dusíka. Vhodná hodnota pH pre morské riasy sa pohybuje v rozmedzí 7,9 až 8,3 a pre sladkovodné medzi 6 až 8. Dá sa povedať, že rast väčšiny druhov mikrorias je citlivý na zmeny pH. Prirodzený proces asimilácie CO₂ pre rast biomasy však vedie aj k rastu pH hodnoty, ktorá v uzavretých systémoch môže vystúpiť až na 10. Tento rast pH hodnoty môže byť regulovaný preplachovaním média s CO₂, alebo prídavkom anorganických či organických kyselín [48] [49].



Obrázok 27: Uzavreté systémy; a) plastové vaky; b) tubulárny fotobioreaktor [49] [58]

2.7.2.3 Živiny

Živné médium mikrorias musí obsahovať dostatočné množstvo všetkých potrebných makroživín, mikroživín a vitamínov v biologicky dostupných formách [49].

Medzi makroživiny patria [48] [49]:

- **Uhlík**, ktorý je najzastúpenejším prvkom v biomase mikrorias tvoriaci až 50% suchej hmotnosti; hlavným zdrojom uhlíka je anorganický CO_2 , ktorý je viazaný v Calvinovom cykle fotosyntézy enzýmom Rubisco
- **Dusík**, ktorý je druhým najviac zasupeným prvkom (1% až 14% suchej hmotnosti); zdrojom môžu byť napríklad NO_3^- , NO_2^- , NO a NH_4^+ , ale aj organické formy ako močovina či aminokyseliny
- **Fosfor**, ktorý je obsiahnutý v DNA, RNA, membránových fosfolipidoch a aj ATP; vstrebáva sa najmä vo forme fosforečnanov intra i extracelulárnymi enzýmami pripojenými k plazmatickej membráne.

Kultivácia mikrorias sa nezaobíde ani bez rady mikroživín, tie sú [48] [49]:

- **Horčík** nachádzajúci sa vo forme Mg^{2+} je považovaný ako aktivátor viacerých enzýmov a súčasť fotosyntetického aparátu; jeho obvyklé zdroje sú MgSO_4 a MgCl_2
- **Síra** ktorá je súčasťou niektorých aminokyselín, vitamínov a lipidov; síra je primárne viazaná zo sulfátov (SO_4^{2-}), zatiaľ čo sulfity sú pre riasy toxické
- **Vápnik** sa často pridáva do média vo forme CaCl_2 ; ióny Ca^{2+} ovplyvňujú delenie buniek a morfogézu
- **Železo** je zapojené v zásadných biochemických procesoch, ako je metabolizmus kyslíka, syntéza chlorofylu, prenos elektrónov alebo asimilácia dusíka
- Ďalšie stopové kovy ako napríklad **Mn, B, Mo, K, Co a Zn**.

Nutričný stres spôsobený nedostatkom dusíka, fosforu, síry, a chlóru môže viesť k stimulácii nadmernej produkcie β -karoténu ovplyvnením fotosyntetickej dráhy tak, že pozmení pomer fotoprotektívnych pigmentov a chlorofylu [57].



Obrázok 28: Otvorený kultivačný systém [48]

2.7.2.4 Intenzita svetla

Molekuly chlorofylu dokážu absorbovať energiu slnečného žiarenia a premeniť ju na chemickú energiu vo forme krátkodobých energetických molekúl procesom fotosyntézy. Je teda zrejmé, že medzi intenzitou svetelného žiarenia a rýchlosťou rastu kultúry je priamy vzťah. Avšak ak intenzita svetla presiahne limitnú hodnotu, začne dochádzať k javom fotoinhibície a fotooxidácie, ktoré majú negatívny vplyv na bunkový rast. Takáto stresová situácia má však pozoruhodný vplyv na produkciu karotenoidov, pretože karotenogénna je jednou z prirodzených fyziologických stratégií obrany voči prebytočnému svetelnému žiareniu. Optimálnu intenzitu svetla je teda vždy potrebné experimentálne stanoviť [49] [57].

2.7.2.5 Miešanie

Miešanie média je dôležité nielen pre prevenciu sedimentácie rias, ale aj pre udržiavanie homogenity a rovnomerného prestupu rias medzi viac a menej osvetlenými časťami bioreaktora. Bez dostatočného premiešavania by ľahko mohla nastať situácia, kedy by boli riasy na povrchu vystavené príliš veľkej intenzite svetla a teda fotoinhibícii, zatiaľ čo riasy hlbšie v médiu by trpeli nedostatkom svetla. Na dôraz je tiež potrebné vziať fakt, že veľa druhov mikrorias nemá dobrú toleranciu k intenzívnemu miešaniu [48].

2.7.2.6 Kultivačné systémy

Pre veľkokapacitnú produkciu biomasy mikrorias sa používajú rôzne kultivačné techniky. V princípe ich môžeme rozdeliť do dvoch skupín a to na otvorené systémy (jazierka a nádrže) a uzavreté systémy (fotobioreaktory). Príklady kultivačných systémov sú znázornené na Obrázok 27 a na Obrázok 28: Otvorený kultivačný systém.

Otvorené systémy sú obvykle tvorené jednoduchou vodnou nádržou zhotovenou z betónu, vykopanou do zeme. Zdrojom svetla je slnečné žiarenie a zdrojom CO₂ atmosférický vzduch. Miešanie buniek a živín je väčšinou zaistené lopatkovým kolesom. Otvorené systémy sú vďaka ich nízkym počiatočným nákladom najvyužívanejšie. Viac ako 80% globálne vyprodukovanej biomasy mikrorias pochádza z otvorených kultivačných systémov. Výhody, nevýhody a porovnanie s uzavretými kultivačnými systémami sú zhrnuté v Tabuľka 1: Porovnanie otvoreného a uzavretého kultivačného systému.

Fotobioreaktor je uzavretý kultivačný systém, v ktorom kultivačné médium cirkuluje medzi sériou priehľadných trubiek alebo platničiek a medzi centrálnym zásobníkom. Tento kultivačný mód predstavuje vyššie náklady na prevádzku v podobe umelého osvetlenia, CO₂ a kultivačného média, avšak ponúka lepšie možnosti regulácie kultivačných podmienok a ochranu pred kontamináciou. Výhody, nevýhody a porovnanie s otvorenými kultivačnými systémami sú zhrnuté v Tabuľka 1: Porovnanie otvoreného a uzavretého kultivačného systému [48] [49].

Parameter	Otvorená nádrž	Fotobioreaktor
Risk kontaminácie	Extrémne vysoký	Nízky
Potrebný priestor	Vysoký	Nízky
Straty vody	Extrémne vysoké	Takmer žiadne
Straty CO ₂	Vysoké	Takmer žiadne
Kvalita biomasy	Náchylná	Nenáchylná
Kultivovaný kmeň	Limitovaný, len niektoré druhy	Takmer všetky druhy rias
Flexibilita produkcie	Zmeny v produkcii medzi možnými variáciami takmer nemožná	Zmena produkcie bez akýchkoľvek problémov
Reprodukovateľnosť procesu	Závislá na vonkajších podmienkach	Možná, s istými odchýlkami
Riadenie procesu	Nemožné	Možné
Štandardizácia	Nemožná	Možná
Vplyv počasia	Absolútny, produkcia nemožná počas dažďa	Nevýznamný
Koncentrácia biomasy	Nízka, približne 0,1 až 0,2 g/l	Vysoká, približne 2 až 8 g/l
Efektivita procesu	Nízka, zdĺhavá, nízka hustota biomasy	Výrazne vyššia hustota biomasy

Tabuľka 1: Porovnanie otvoreného a uzavretého kultivačného systému [48]

2.8 Sinice

Sinice sú fotosyntetizujúce prokaryotické mikroorganizmy, radia sa medzi gramnegatívne baktérie a vyvinuli sa pred 3,5 miliardami rokov. Všeobecne sa vyznačujú dobrou metabolickou prispôsobivosťou, vďaka ktorej sa im darí v rôznych ekologických nikách. Na svete už bolo charakterizovaných viac ako 10 000 kmeňov siníc, od psychrofilných až po termofilné kmene, pričom celkový počet kmeňov sa odhaduje na viac ako 100 000. Extrémofilné kmene sú schopné prežiť v horúcich prameňoch pri teplote nad 60 °C, na ľadovcových poliach Antarktídy pri teplote menej ako 0 °C, na extrémne suchých pôdach ako je púšť Negev v Izraeli alebo na miestach s vysokou salinitou a alkalinitou (pH~11). Sinice sú asi najznámejšie pre mrzký zákal, ktorý spôsobujú v sladkovodných jazerách, rezervoároch či povodiach riek počas leta. V poslednej dobe sa však niektoré sinice stávajú známymi aj pre svoju schopnosť produkcie hepatotoxínov, či neurotoxínov [59] [60] [61] [62].

Bunky siníc môžu mať sférický, tyčinkový alebo špirálový tvar a vyskytujú sa ako jednotlivé bunky, alebo v kolóniách či vláknach. Na povrchu buniek sa nachádza bunečná stena, ktorá je na rozdiel od bunečných stien iných gramnegatívnych baktérií veľmi hrubá. Na povrchu plazmatickej membrány je vysoko zosieťovaná vrstva peptidoglykánú a vonkajšia membrána. Vonkajšia vrstva je zložená z exopolysacharidového obalu a z povrchových polymerizovaných proteínov. V zrovnaní s mikroriasami, sinice neobsahujú zložité membránové organely a uchovávajú svoj fotosyntetický a aj dýchací elektrónový transportný systém v jednom membránovom systéme - tylakoidoch. Samotný zber svetla nastáva pomocou anténových proteínov nazývaných fykobilizómy, ktoré absorbujú energiu svetla a následne ju prenášajú na fotosystém I a fotosystém II. Inkorporáciou rôznych chromofórov ako napríklad fykocyanínu a fykoerytrínu do fykobilizómov sa dokážu bunky prispôbiť meniacim sa podmienkam prostredia. Genóm väčšiny siníc je tvorený kruhovou DNA veľkosti 1,66 až 8,36 Mbp, avšak niektoré druhy sú tiež známe svojím obsahom lineárnych chromozomálnych prvkov [61] [62].



Obrázok 29: *Anabaena* sp. [60]

Fotoautotrofný metabolizmus siníc im umožňuje využiť pre svoj rast anorganické látky ako CO₂, nitráty, fosfáty a iné mikroelementy. Sinice preto nepotrebujú pre svoj rast organický uhlíkový substrát, ale vystačia si so slnečným svetlom, oxidom uhličitým a vodou obohatenou o anorganické minerály.

Všetky tieto spomínané kultivačné komponenty predstavujú nízke náklady, a to hlavne slnečné žiarenie, ktoré je v podstate dostupné takmer celosvetovo a je zadarmo. Sinice sú navyše rýchlo rastúce, vykazujú vyššiu efektivitu fotosyntézy ako vyššie rastliny a relatívne jednoduché možnosti genetickej manipulácie. Sinice tiež produkujú viac 1100 sekundárnych metabolitov, medzi ktoré patria napríklad polyketidy, nekanonické krátke peptidy, terpény, alkaloidy, karotenoidy a lipidy s antimikrobiálnym, antivírusovým a protirakovinotvorným účinkom. Tieto skutočnosti robia sinice atraktívnym predmetom súčasných biotechnologických výskumov [61] [62].



Obrázok 30: Fotobioreaktor pre potenciálnu kultiváciu siníc typu „flat-bed“ [61]

2.8.1 Rod *Synechococcus*

Z ekologického a topologického hľadiska zaraďujeme rod *Synechococcus* spolu s rodom *Prochlorococcus* medzi pikocyanobaktérie, čo sú v podstate najviac rozšírené fotosyntetické organizmy v morských potravinových reťazcoch a na Zemi. Na rozdiel od všetkých kmeňov rodu *Prochlorococcus*, väčšina kmeňov rodu *Synechococcus* disponuje schopnosťou utilizovať dusičnany a to vďaka ich schopnosti syntetizovať enzýmy nitrátpermeáza a nitrátreduktáza. Rod *Synechococcus* je taktiež charakteristický širším geografickým výskytom. Tieto spomínané rody majú tiež schopnosť syntézy enzýmu kyanázy, ktorý rozkladá toxické kyanatany a v prítomnosti špecifického transportéru tiež umožňuje ich asimiláciu z prostredia [51] [63].

2.8.2 Downstream proces kultúr siníc a rias

Záverečný proces sparovania biomasy rias a siníc je závislý na niekoľkých faktoroch ako je typ kultivovanej kultúry, typ substrátu a požadovaný produkt. Všeobecným problémom ktorým downstream a spracovanie biomasy rias a siníc čelí, sú vysoký obsah vody, dusíku, fosforu a pomerne odolná bunčná stena. Na záver je potrebné vziať do úvahy celkovú ekonomickú a praktickú stránku veci, ako napríklad energetické výdaje, miesto závodu v spojení s prepravou, recyklácia a kvalita používanej vody [34].

Prvým krokom spracovania je skoncentrovanie riasovej alebo sinicovej suspenzie do vzniku hustej pasty. Medzi typické techniky používané v tomto procese patrí centrifugácia, filtrácia, sedimentácia a flotácia. Filtrácia má niekoľko značných výhod, ako je schopnosť zachytu buniek s nízkou hustotou, ale aj radu nevýhod ako možnosť upchania filtru. Centrifugácia je metóda zrýchleného usadzovania buniek na dne nádoby vplyvom odstredivých síl, hoci má vysoké počiatočné náklady, táto metóda je ekonomicky prijateľná. Flokulácia je metóda, v ktorej sa pomocou prídavku chemického činidla (flokulantu) dosiahne zväčšenia bunčných agregátov. Po flokulácii vždy nasleduje sedimentácia alebo flotácia [34].

Nasledujúcim krokom je odvodňovanie a sušenie biomasy. To môže prebiehať v bubnových sušičkách, ktoré však pracujú za zvýšenej teploty. Za využitia nepríliš vlhkého vzduchu je možné aj voľné sušenie, ktoré však prináša dodatočné náklady spojené s priestorom a časom [34].

Na záver nasleduje extrakcia a čistenie. Pre rozbitie bunčnej steny sa využívajú rôzne techniky mechanickej disrupcie, ako napríklad opakované mrazenie a topenie, mletie buniek zmrazených tekutým dusíkom, mletie lyofilizovanej biomasy, ultrasonifikácia, alebo lisovanie s expellerom. Medzi chemické extrakčné metódy patrí extrakcia do hexánu, extrakcia podľa Soxhleta, superkritická fluidná extrakcia (metanolom alebo CO₂), extrakcia rozpúšťadlom akcelerovaná vysokým tlakom, alebo subkritická vodná extrakcia. Ako možnosť sa ponúka aj využitie enzymatických techník, avšak ich vysoká cena ich robí ekonomicky neprijateľné [34].

2.9 Metódy analýzy bunčných kultúr

2.9.1 Absorpčná spektrofotometria

Princípom absorpčnej spektrofotometrie je schopnosť absorpcie svetelného žiarenia atómami alebo molekulami analytu. Svetelné žiarenie prechádzajúce vzorkou excituje jeho častice do vyšších energetických hladín, ktoré vzápätí uvoľnia získanú energiu návratom na nižšiu energetickú hladinu. Uvoľnená energia sa transformuje na teplo, alebo na sekundárne žiarenie (fluorescencia alebo fosforescencia). Spravidla je sledovaný pokles intenzity monochromatického žiarenia prechádzajúceho roztokom vzorku. Tento jav popisuje Bouguer-Lambert-Beerov zákon, ktorý je v podstate vzťahom medzi intenzitou dopadajúceho a prechádzajúceho žiarenia, koncentráciou analytu a dĺžkou absorbujúcej vrstvy. Meranou veličinou je absorbancia vzorku, ktorá je priamo úmerná koncentrovanej analytu a ich funkčná závislosť je priamková. Bouguer-Lambert-Beerov zákon však platí iba pre zriedené roztoky a monochromatické žiarenie.

Tento zákon je znázornený na rovnici nižšie, kde A značí absorbanciu, l dĺžku optickej dráhy, ε_λ molárny absorpčný koeficient a c koncentráciu analytu v roztoku [64].

$$A = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c$$

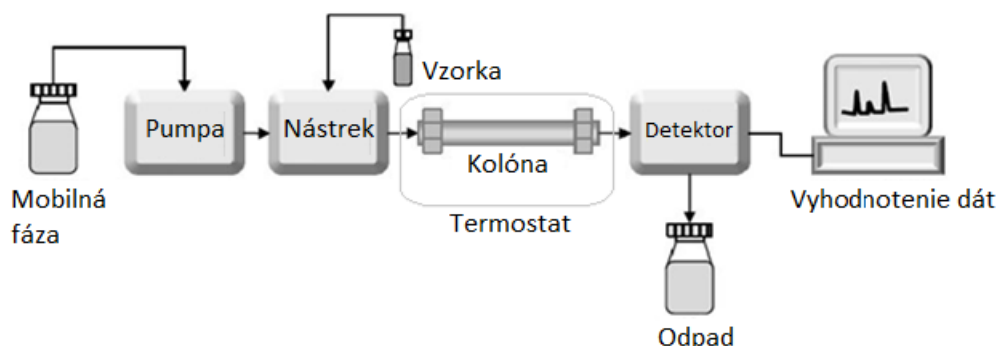
Rovnica 1: Bouger-Lambert-Beerov zákon

2.9.2 Chromatografia

Chromatografické separačné metódy slúžia k oddeľovaniu zložiek zmesi na princípe mnohonásobne opakovaného nastoľovania rovnovážneho stavu, ktorý je vytváraný rôznymi fyzikálno-chemickými interakciami medzi zložkami zmesi, mobilnou a stacionárnou fázou. Každá zložka zmesi má svoj charakteristický retenčný čas (doba pobytu zložky v chromatografickom systéme), ktorý je závislý na afinite danej zložky k mobilnej a k stacionárnej fáze. Okrem rozdeľovania zložiek zmesi umožňujú chromatografické metódy aj ich identifikáciu a kvantitatívne stanovenie. V kolónovom chromatografickom systéme sú jednotlivé zóny separovaných zložiek zmesi vnášané do detekčného systému, kde sú na základe ich fyzikálno-chemických vlastností zaznamenané a vyhodnotené. Na základe charakteru mobilnej fáze delíme chromatografické metódy na plynovú chromatografiu, kvapalinovú chromatografiu a v poslednej dobe aj chromatografiu s mobilnou fázou v nadkritickom stave [64].

2.9.2.1 HPLC/PDA

Kvapalinová chromatografia s vysokou účinnosťou (HPLC) sa hojne využíva k separácii a analýze málo alebo vôbec neprchavých látok, či látok termolabilných. Vlastná separácia prebieha na kolónach s vhodnou stacionárnou fázou, ktoré umožňujú dosiahnutie vysokej úrovne separácie. Identifikácia a kvantifikácia karotenoidov je možná pomocou kvapalinovej chromatografie s využitím reverznej stacionárnej fáze. V tomto prípade je vhodným detektorom detektor diódového poľa, ktorý umožňuje nepretržité snímanie absorpčného spektra eluovanej látky počas analýzy [64] [65].



Obrázok 31: Schéma HPLC [43]

2.9.2.2 GC/FID

Plynová chromatografia (v skratke GC) využíva pri separácii plynnú mobilnú fázou. Táto technika sa najčastejšie využíva pre separovanie a stanovenie či identifikáciu zložiek plyných zmesí, prchavých látok, a predovšetkým organických látok s bodom varu nižším ako 400°C. Analýza začína nástrekom vzorku na kolónu, následne sú jednotlivé zložky unášané interným nosným plynom a separované na základe ich rozdielnej afinity k stacionárnej fáze. Zložky postupne vychádzajúce z kolóny sú zaznamenávané detektorom. Plameňový ionizačný detektor (v skratke FID) je často využívaný detektor v plynovej chromatografii a to hlavne pre detekciu organických zlúčenín. Princípom je spaľovanie analytu vo vodíkovo-vzduchovom plameni horiacom medzi dvoma elektródami. Iónové častice vzniknuté pri spaľovaní zvyšujú vodivosť plameňa, pričom prúd prebiehajúci detektorom je priamo úmerný koncentrácii analytu v nosnom plyne [64].

3 CIEĽE PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce je optimalizácia extrakcie pigmentov z buniek kvasiniek a rias. V rámci práce boli riešené tieto čiastkové úlohy:

- 1) Literárna rešerš – prehľad metód extrakcie lipofilných pigmentov
- 2) Optimalizácia metód kultivácie vybraných kvasiniek a rias za účelom vysokej produkcie pigmentov
- 3) Zavedenie a optimalizácia extrakčných postupov pre získanie pigmentov z biomasy
- 4) Charakterizácia extraktov, stabilita

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité pre kultiváciu kvasiniek a rias

Kvasničný autolyzát, Himedia (Indie)
Pepton aus Casein, Roth (Nemecko)
D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner s r.o. (ČR)
Glycerol bezvodý p.a., Lach-ner, S.r.o.(ČR)
Síran amónny p.a., Lachema (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Síran horečnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o I (ČR)
Dusičnan sodný p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Hydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema. (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema. (ČR)
Chlorid sodný p.a., Penta (CZ)
Kyselina boritá p.a., Lachema (ČR)
Hydroxid draselný p.a., Lachema (ČR)
Na₂-EDTA.2H₂O p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Síran železnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Kyselina sírová 96%, Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Síran zinočnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Chlorid manganatý tetrahydrát p.a., Lachema (ČR)
Molybdenan sodný dihydrát p.a., Penta (ČR)
Síran meďnatý pentahydrát p.a, Penta (ČR)
Dusičnan kobaltnatý hexahydrát p.a., Penta (ČR)

4.1.2 Chemikálie použité pre extrakcie a transesterifikácie a HPLC

Methanol pre HPLC, Sigma- Aldrich (SRN)
Kyselina sírová 96%, Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Hydroxid sodný, Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Hexán p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)
Hexán pre HPLC, Sigma- Aldrich (SRN)
Etanol p.a., VWR International S.A.S.
Ethanol pre UV VWR International S.A.S.
Acetonitril pre HPLC, Sigma- Aldrich (SRN)
Etyl acetát pre HPLC, Sigma- Aldrich (SRN)
Tris base, Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Kyselina chlorovodíková (36 %), Lach-ner, S.r.o. (ČR)

4.2 Použité kmene mikroorganizmov

Rhodotorula kratochvilovae CCY 20-2-26
Rhodotorula mucilaginosa CCY 19-4-6
Cystofilobasidium macerans CCY 10-1-2
Sporidiobolus pararoseus CCY 19-9-6
Rhodospiridium toruloides 062-002-004
Scenedesmus obliquus CCALA 455
Scenedesmus dimorphus CCALA 443
Chlorella vulgaris CCALA 924
Desmodesmus acutus CCALA 439
Desmodesmus quadricauda CCALA 463
Chlamydomonas reinhardtii CCALA 928

4.3 Prístroje a pomôcky

Box Aura mini BioTech (ČR)
Trepáčka Yellow line, (SRN)
Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)
GKB Color Digital CCD kamera (Tchajwan)
Centrifúga BioTech, (ČR)
Lyofilizátor Labconco FreeZone 4.5 Freeze Dryer (USA)
Analytické váhy Boeco (SRN)
Vortex/homogenizátor disruptor Genie, Scientific Industries, Inc. (USA)
Vákuová odparka RV 06, IKA (SRN)
Vodná lázeň EL-20, Merci a.s. (ČR)
Spektrofotometer VIS, Helios δ, Unicam (GB)
Termoblok VWR, (ČR)
HPLC filtre, PRE-CUT, Alltech (GB)
HPLC/PDA zostava:

- HPLC zostava (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Dionex Ultimate Series 3000 Pump
- Dionex Ultimate Series 3000 Autosampler
- Kolona Kinetex EVO c18 150x4.6x2.6
- Thermo Fisher Vanquish detector
- Vyhodnocovací systém Chromeleon

TRACE GC/FID (Thermo Fisher Scientific, USA)
Kapilárna kolóna Zebron ZB-FAME, dĺžka 30 m

4.4 Kultivácie kvasiniek

4.4.1 Inokulum I a II

Pred začiatkom každej kultivácie kvasiniek bolo pripravené submerzné inokulačné médium. Zloženie inokulačného média je v Tabuľka 2. Inokulačné médiá boli pripravované v Erlenmeyerových bankách a sterilizované v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 45 minút. Kultivácie prebiehali pri stále udržiavanej teplote (20°C), za stáleho osvetlenia a miešanie bolo zaistené nepretržitým trepaním na trepačkách. Vlastná inokulácia bola dvojstupňová, pričom do prvého inokula bola zaočkovaná (asepticky v boxe) kultúra danej kvasinky z Petriho misky v pomere 1 klička na 10 ml média. Po 24 hodinách bola kultúra preočkovaná do druhého inokula väčšieho objemu tak, aby objemový pomer $I_1 : I_2$ bol 1 : 5. Kultúra z Inokula II bola po ďalších 24 hodinách využitá pre zaočkovanie produkčných médií v rovnakom objemovom pomere (1 : 5).

Tabuľka 2: Zloženie inokulačného média

Zložka	Množstvo
Glukóza monohydrát	20 g
Pepton	20 g
Kvasničný autolyzát	10 g
Voda	1000 ml

4.4.2 Bankové kultivácie

Pre zvolenie optimálneho C/N pomeru bola vykonaná séria kultivačných experimentov v Erlenmeyerových bankách pri rôznych C/N pomeroch (13, 25, 50 a 100). Tieto kultivácie prebiehali za rovnakých podmienok a boli pripravené rovnakým spôsobom ako inokulačné kultivácie. Kultivácie boli terminované po 4 dňoch, kedy boli z média dobrane vzorky pre analýzu lipofilných pigmentov, mastných kyselín a nárastu biomasy. Zloženie kultivačných médií je možné nájsť v Tabuľka 3.

Tabuľka 3: Zloženie produkčných médií pre bankové a fľaškové kultivácie

Zložka	Množstvo zložky			
	C/N 13	C/N 25	C/N 50	C/N 100
Glycerol	24,16 g	46,46 g	92,92 g	185,8 g
Voda	1000 ml			
(NH ₄) ₂ SO ₄	4 g			
KH ₂ PO ₄	4 g			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,696 g			

4.4.3 Fľaškové kultivácie

Pre získanie čo najväčšieho množstva biomasy pre extrakčné a stabilné experimenty boli vybrané kmene karotenogénnych kvasiniek kultivované v submerznom živnom médiu v sklených fľaškách o objeme 5 litrov. Nepretržité premiešavanie a aerácia boli zaistené pomocou zavedenej vzduchovej hadičky. Počas celej kultivácie bolo udržiavané konštantné osvetlenie a konštantná teplota prostredia (20°C). Kultivačné médiá boli sterilizované v autokláve pri teplote 121°C po dobu 15 minút. Kultivácia bola terminovaná po 4 dňoch, pričom bol celý objem média scentrifugovaný a biomasa uchovaná v mraziacom boxe. Zloženie produkčných médií je uvedené v Tabuľka 3, pričom ako C/N pomer bol zvolený pomer 25.

4.4.4 Fermentory

Pre extrakčné a stabilné experimenty bola tiež využitá biomasa z niekoľkých fermentorov z práce [66], kde je možné nájsť detailné zloženie a prípravu médií spolu s inými kultivačnými parametrami. Základné kultivačné informácie je možné nájsť v Tabuľka 4.

Tabuľka 4: Základné kultivačné parametre použitých fermentorov

Kmeň	Substrát	C/N	Množstvo živín
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Tuk + srvátka	50	100 %
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	Tuk + srvátka	50	100 %
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Tuk + srvátka	25	100 %
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	Tuk + srvátka	13	100 %
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Tuk + srvátka	25	100 %
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Tuk + káva	13	100 %
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	Tuk + káva	13	80 %
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Tuk + káva	13	100 %

4.5 Kultivácie rias

Pre produkciu veľkého množstva biomasy boli vybrané kmene rias kultivované v sklených fľaškách o objeme 5 litrov. Počas kultivácie bolo udržiavané nepretržité osvetlenie. Miešanie a aerácia bola zaistená vzduchovou hadicou zavedenou do média. Médium bolo sterilizované v autokláve pri teplote 121°C po dobu 15 minút. Po ukončení kultivácie bol celý objem produkčného média scentrifugovaný a biomasa bola uchovaná v mraziacom boxe. Zloženie živného média je uvedené v Tabuľka 5.

Tabuľka 5: Zloženie BBM média pre riasy

Zložka	Koncentrácia [g/l]
NaNO ₃	0,25
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,025
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,075
K ₂ HPO ₄	0,075
KH ₂ PO ₄	0,175
NaCl	0,025
Na ₂ EDTA	0,05
KOH	0,031
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	$8,82 \cdot 10^{-3}$
MnCl ₂ ·4H ₂ O	$1,44 \cdot 10^{-3}$
MoO ₃	$0,71 \cdot 10^{-3}$
CuSO ₄ ·5H ₂ O	$1,57 \cdot 10^{-3}$
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	$0,49 \cdot 10^{-3}$
FeSO ₄ ·7H ₂ O	$0,498 \cdot 10^{-3}$
H ₂ SO ₄ (96%)	$0,1 \cdot 10^{-3}$ ml

4.6 Analýza bunečných kultúr

4.6.1 Gravimetrické stanovenie množstva biomasy v médiu

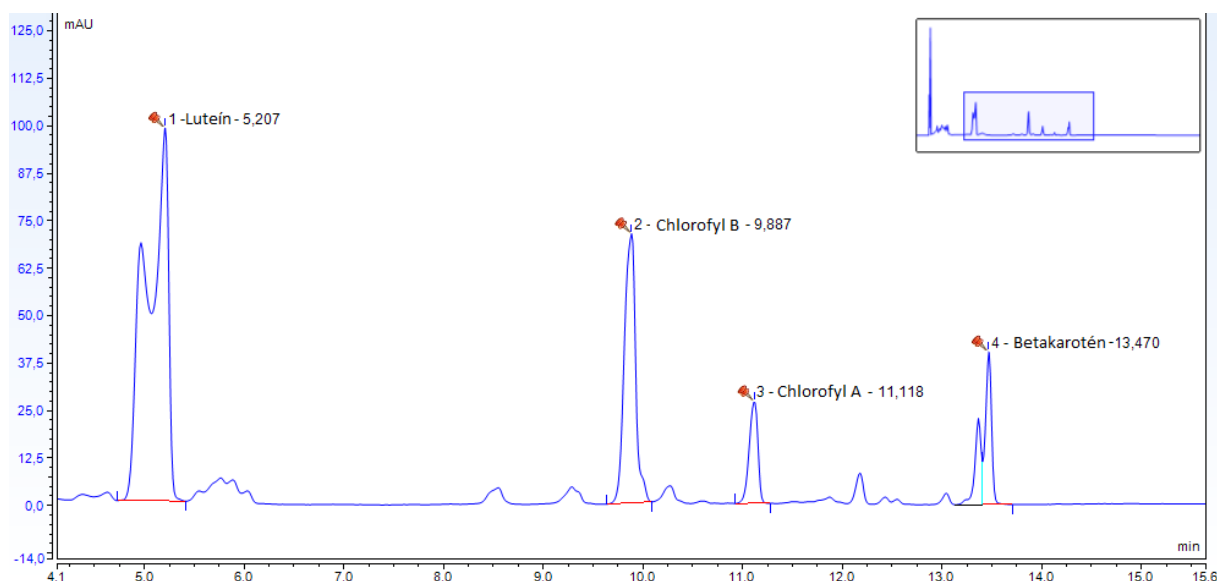
Množstvo biomasy v médiu v bankových kultiváciách bolo stanovené odobraním vzorku o objeme 1 ml. Ten bol následne scentrifugovaný, biomasa bola oddelená od supernatantu a premytá 0,5 ml destilovanej vody. Biomasa bola opäť scentrifugovaná a oddelená od supernatantu. Takto pripravená biomasa bol zmrazená, lyofilizovaná a zvážená na analytických váhach.

4.6.2 Príprava vzoriek mikrobiálnej biomasy

Vzorky biomasy používanej pre prípravu extraktov boli pripravené podobným spôsobom ako biomasa pre gravimetrické stanovenie, a to vždy dvojstupňovou centrifugáciou a jedným premytím destilovanou vodou v objeme jednej polovice objemu média. Takto prečistená biomasa bola zmrazená a následne lyofilizovaná.

4.6.3 Extrakcia lipofilných pigmentov do acetónu

Pre extrakciu lipofilných pigmentov bolo do mikroskúmavky typu Eppendorf navážených 15 až 20 mg lyofilizovanej biomasy kvasiniek alebo 5 až 15 mg lyofilizovanej biomasy rias. K biomase bolo pridaných tiež 0,1 ml destilovanej vody pre rehydratáciu. Takto rehydratovaná biomasa bola na krátko zmrazená, čím sa dosiahla účinnejšia disrupcia buniek. Po rozmrazení boli do skúmavky pridané sklenené guľičky a 1 ml acetónu. Objem pridaných guľčiek tvoril asi štvornásobok objemu biomasy. Skúmavky boli potom umiestnené na vortex, kde boli intenzívne pretrepávané po dobu 20 minút. Po ukončení pretrepávania bol obsah skúmavky kvantitatívne prevedený pomocou 3 ml acetónu do 15 ml centrifugačnej skúmavky. Skúmavky boli následne mierne scentrifugované (2 minúty, 3000 ot./min). Z celkového objemu acetónového extraktu boli odobrané 2 ml do sklenej skúmavky. Pre odparenie acetónu boli sklené skúmavky umiestnené do termobloku vyhriateho na 37 °C a prefukované stlačeným dusíkom. Vzorky boli následne rozpustené v 2 ml zmesi acetonitrilu a etylacetátu HPLC kvality v pomere 2:1 a prefiltrované pomocou PTFE filtra do sklenej vialky pre HPLC/GC. Takto pripravené vzorky je možné priamo analyzovať na HPLC.



Obrázok 32: HPLC chromatogram etanolového extraktu riasy *Scenedesmus dimorphus*

4.6.4 Stanovenie lipofilných pigmentov na HPLC

Pre stanovenie pigmentov boli vyextrahované vzorky podrobené analýze na HPLC značky Thermo Fisher Scientific na kolóne EVO C18 s rozmermi 150x4,6x2,6 mm. Celková doba analýzy bola 25 minút s prietokom mobilnej fázy mal hodnotu 1,2 ml/min a gradientovou elúciou. Zloženie mobilných fáz, ako aj priebeh gradientovej elúcie je možné nájsť v Tabuľka 6 a v Tabuľka 7. Pre detekciu analytov bol využitý PDA detektor, pričom stanovenie karotenoidov a chlorofylu bola použitá vlnová dĺžka 450 nm. Identifikácia a kvantifikácia jednotlivých zlúčenín bola uskutočnená pomocou ich predom premeraných štandardov. Pre vyhodnotenie bol využitý program Chromeleon.

Tabuľka 6: Zloženie mobilných fáz pre HPLC

Mobilná fáza	Zložka	% (obj)
A	Metanol	2
	Acetonitril	84
	100 mM trisHCl pufer	14
B	Etylacetát	40
	Metanol	60

Tabuľka 7: Priebeh gradientovej elúcie

Čas analýzy [min]	MF A [%]	MF B [%]
0	100	0
13	0	100
19	0	100
20	100	0
25	100	0

4.6.5 Transesterifikácia mastných kyselín pre analýzu na GC

Prvým krokom bolo naváženie lyofilizovanej biomasy do sklenených vialiek, pričom bolo navážených 5 až 10 mg biomasy rias alebo 10 až 15 mg biomasy kvasiniek. K biomase bola pridaná transesterifikačná zmes v objeme 1,8 ml, s obsahom interného štandardu C:17 s koncentráciou 0,5 mg/ml rozpusteného v roztoku 15 % kyseliny sírovej rozpustenej v metanole. Vialky boli následne zakrimpované a zahrievané v termobloku po dobu 2 hodín pri teplote 85 °C. Po vychladnutí bol obsah vialiek prevedený do 4 ml vialky a zmiešaný s 0,05 M NaOH.

K zmesi bol ešte pridaný 1 ml HPLC hexánu, vialky boli uzatvorené a pretrepané na vortexe po dobu 5 minút. Po oddelení fáz bolo z vialky odpipetovaných 0,1 ml hexánovej fáze do čistej vialky pre GC, kde bol objem hexánu doplnený na 1 ml. Takto pripravené vzorky je možné premerať na GC.

4.6.6 Stanovenie mastných kyselín na GC

Vzorky obsahujúce metylestery mastných kyselín boli analyzované na plynovom chromatographe Thermo Fisher TRACE™ Gas Chromatograph s autosamplerom Thermo Scientific A1 1310, s automatickým dávkovaním a s deličom toku. Pre analýzu bola použitá kolóna Zebron-FAME s rozmermi 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Pre detekciu látok bol použitý plameňovo ionizačný detektor (FID). Analýza prebiehala za nasledujúcich podmienok:

- Nosný plyn – vodík, s prietokom 1 ml/min
- Objem nástreku vzorku – 1 µl
- Teplota injektoru – 250 °C, pomer deliča toku 10
- Teplota detektoru – 260 °C, s prietokom 350 ml/min vzduchu, 35 ml/min vodíka a 30 ml/min dusíka
- Teplotný program: 1 minútu udržiavaná teplota 80 °C ($t_R = 1$ min), zvyšovanie teploty s gradientom 15 °C/min až na 140 °C ($t_R = 5$ min), zníženie teplotného gradientu na 3 °C/min až do dosiahnutia 190 °C ($t_R = 21,7$ min), záverečné zvýšenie teplotného gradientu na 25 °C/min do dosiahnutia 260 °C, udržanie teploty 260 °C po dobu 1 minúty ($t_R = 25,5$ min)
- Celková doba analýzy 25,5 min

4.7 Extrakčné a stabilitné experimenty

4.7.1 Príprava etanolových a hexánových extraktov

Extrakt boli pripravené zo vzoriek lyofilizovanej biomasy. Pre dosiahnutie čo najvyššej možnej účinnosti extrakcie bola biomasa najprv rozotretá v trecej miske, potom zmiešaná s malým množstvom vody a nakrátko zmrazená. Po rozmrazení bola prebytočná voda odstránená centrifugáciou a biomasa bola zmiešaná so sklenenými guľôčkami v objemovom pomere 1:2 a s organickým rozpúšťadlom. Pre takúto extrakciu bolo vždy využitých asi 1 g lyofilizovanej kvasničnej biomasy a 25 ml daného rozpúšťadla, alebo 0,5 g riasovej biomasy a 15 ml rozpúšťadla. Extrakcia bola vykonaná v centrifugáčnych skúmavkách o objeme 50 ml a ich vortexovaním po dobu 30 minút. Separácia biomasy a extraktu bola vykonaná pomocou centrifugácie. Pre čo najväčšie odstránenie pigmentov z biomasy bola táto extrakcia dodatočne zopakovaná 1 krát. Extrakt boli následne uchované v odmerných bankách a ich objem bol doplnený po rysku. Z takto pripravených extraktov bolo stanovené množstvo lipofilných pigmentov na HPLC, množstvo mastných kyselín na GC a tiež stanovené množstvo karotenoidov a chlorofylu pomocou spektrofotometra.

4.7.2 Dlhodobé stabilitné testy extraktov fermentorov a fľaškových kultivácií

Hexánové a etanolové extrakt biomasy boli uchované v mraziacom boxe pri teplote -40 °C po dobu 4 mesiacov. Po uplynutí tejto doby bolo v extraktoch stanovené množstvo lipofilných pigmentov na HPLC, množstvo mastných kyselín na GC a tiež stanovené množstvo karotenoidov pomocou spektrofotometra. Množstvo karotenoidov v extraktoch kvasiniek bolo stanovené pomocou štandardu β-karoténu a kalibračnej krivky.

$$Chl_A = (13.36 \cdot A_{664} - 5.19 \cdot A_{649}) \cdot \text{faktor riedenia}$$

$$Chl_B = (27.43 \cdot A_{649} - 8.12 \cdot A_{664}) \cdot \text{faktor riedenia}$$

$$Carot_{total} = \frac{\text{faktor riedenia} \cdot 1000 \cdot A_{470} - 2.13 \cdot Chl_A - 97.63 \cdot Chl_B}{209}$$

Rovnica 2: Lichtenthalerova rovnica [67]

4.7.3 Krátkodobé stabilitné testy extraktov fermentorov a rias

Krátkodobé stabilitné experimenty boli vykonané na niekoľkých vzorkách biomasy fľaškových kultivácií rias a kvasničných fermentorov. Extrakty boli po ich príprave a analýze na HPLC, GC a spektrofotometri uchované pri troch rôznych teplotách. Zvolené teploty boli -40 °C (mraziaci box), 8 °C (chladiaci box) a 20 °C (laboratórna teplota). Vo vzorkách uchovávaných pri laboratórnej teplote bola sledovaná stabilita karotenoidov a chlorofylu meraním na spektrofotometri 3 krát do týždňa, stabilita lipofilných pigmentov na HPLC meraním raz za týždeň a stabilita lipidov meraním na GC raz za týždeň po dobu 2 týždňov. Vo vzorkách uchovávaných v chladiacom boxe a v mraziacom boxe bola sledovaná stabilita karotenoidov a chlorofylu na spektrofotometri meraním 2 krát týždenne, stabilita lipofilných pigmentov na HPLC a stabilita lipidov na GC meraním raz za 2 týždne po celkovú dobu 4 týždňov. Extrakty boli uchované bez prístupu svetla, ktoré by mohlo negatívne ovplyvniť experiment. Množstvo karotenoidov bolo spektrofotometricky stanovené podľa Lichtenthalerovej rovnice (1987) [67].

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

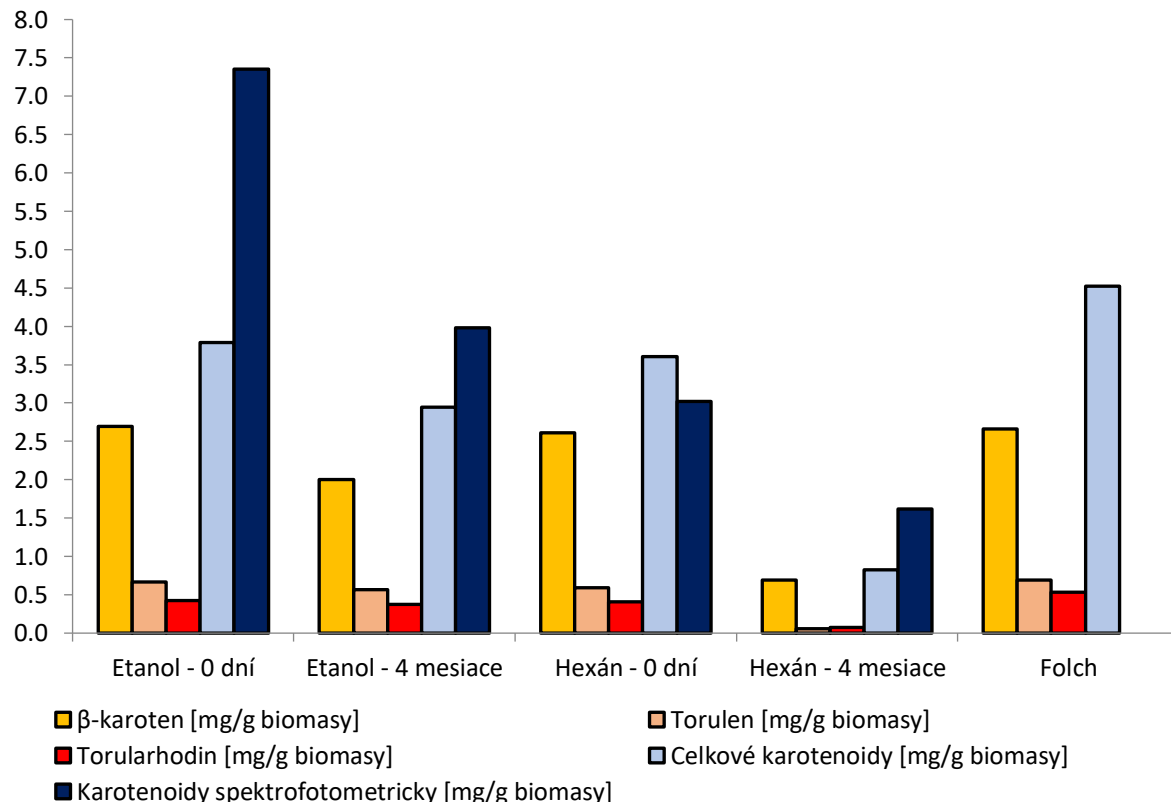
5.1 Dlhodobé stabilitné testy

Dlhodobé stabilitné testy boli vykonané na celkom 4 vzorkách biomasy kvasiniek kultivovaných vo fermentoroch a na celkom 4 kmeňoch kvasiniek kultivovaných vo fľaškách. Údaje získané z HPLC, z GC a spektrofotometrickým meraním boli vynesené do série grafov. Pre každý extrakt bola zhodnotená extrakčná účinnosť jednotlivých metabolitov a celkového zastúpenia karotenoidných pigmentov v biomase v porovnaní s referenčným stanovením. Referenčným stanovením konkrétneho vzorku sa rozumie stanovenie karotenoidných pigmentov na HPLC za použitia acetónu ako rozpúšťadla pre pigmenty produkované kvasinkami kultivovanými vo fľaškách, alebo stanovenie karotenoidných pigmentov na HPLC extrakciou podľa Folcha pre pigmenty produkované kvasinkami kultivovanými vo fermentoroch, alebo stanovenie mastných kyselín na GC transesterifikáciou biomasy kvasiniek. Hodnoty referenčného stanovenia biomasy kvasiniek kultivovaných vo fermentoroch boli prevzaté z práce [66]. V rámci testu bola zhodnotená stabilita metabolitov počas 4 mesiacov za uskladnenia v mraziacom boxe pri teplote -40 °C.

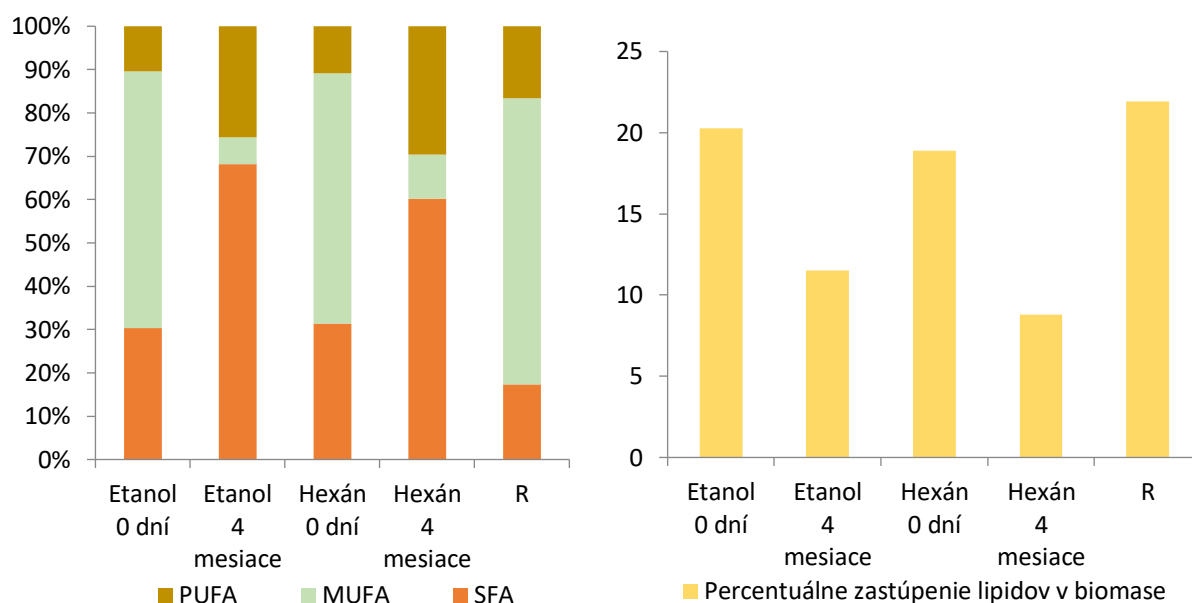
Do hodnôt koncentrácie celkových karotenoidov vo vzorkách kvasiniek (stanovenej na HPLC) v čerstvých extraktoch (0 hod.) boli zahrnuté všetky detekované karotenoidné pigmenty vo vzorku, i tie, ktoré nebolo možné presne identifikovať, pričom ich koncentrácia bola určená pomocou kalibračnej krivky beta-karoténu. V extraktoch analyzovaných po 4 mesiacoch bolo množstvo celkových karotenoidov určené jednoduchým súčtom.

5.1.1 Dlhodobé stabilitné testy fermentorov

5.1.1.1 Stabilita extraktov kmeňa *Sporidiobolus pararoseus* z fermentora (C/N 50; médium tuk + srvátka)



Graf 1: Časový vývin koncentrácie pigmentov v extraktoch kmeňa *Sporidiobolus pararoseus* v porovnaní s referenčnou extrakciou (Folch)

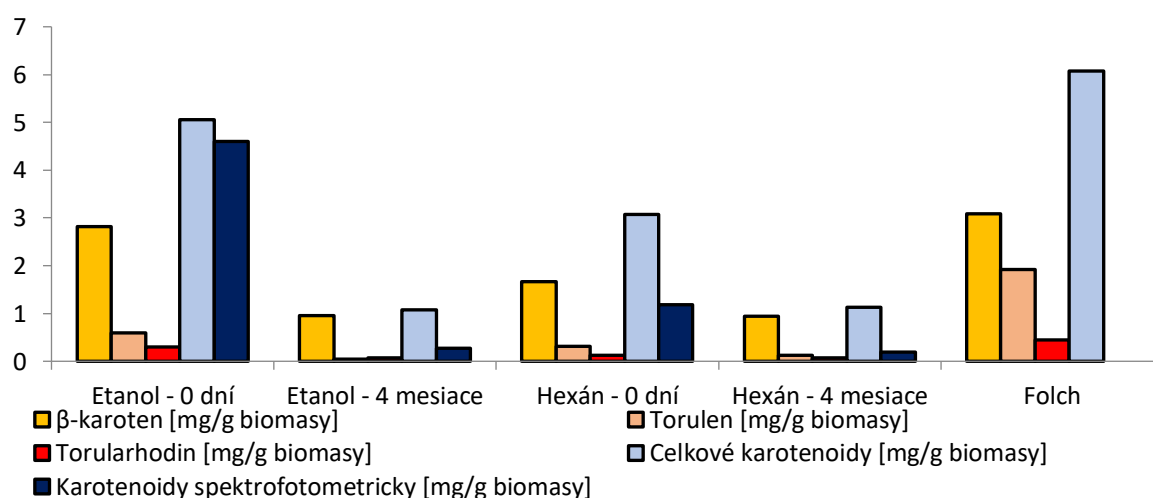


Graf 2: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v extraktoch kmeňa *Sporidiobolus pararoseus* v porovnaní s referenčným stanovením (R)

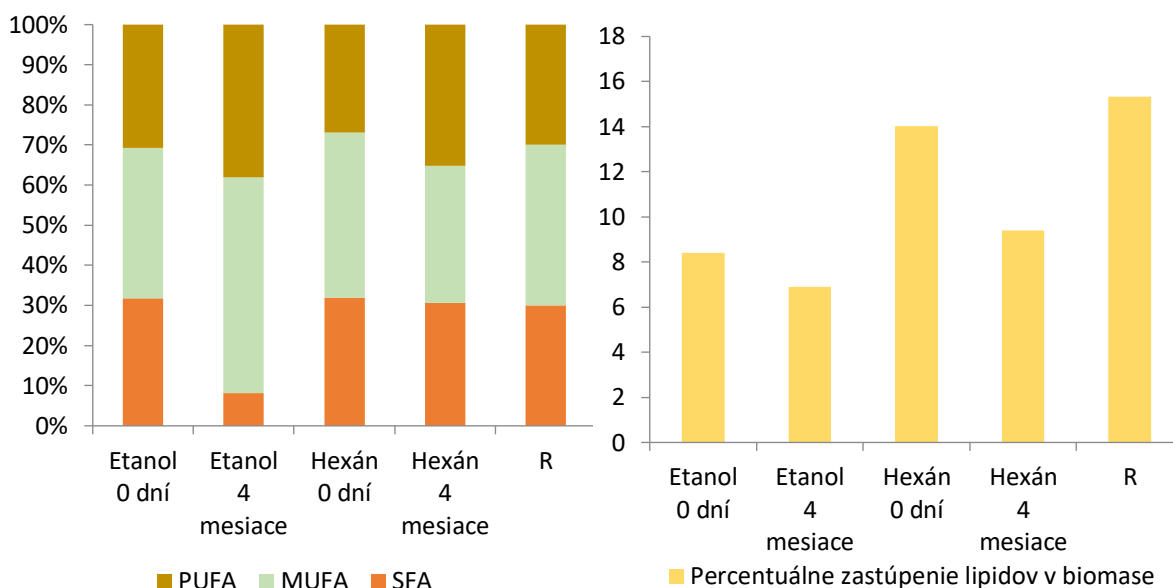
Ako je možné si všimnúť na Graf 1, extrakcia karotenoidov do hexánu prebehla s výťažkom 79,6 % a do etanolu s výťažkom 83,7 %. Množstvo všetkých stanovených pigmentov značne pokleslo v hexánovom extrakte. Etanolový extrakt sa naopak zdá byť pomerne stabilný, koncentrácia beta-karoténu v ňom poklesla iba o 25,7 %. Spektrofotometricky určená koncentrácia karotenoidov sa značne odchyľuje od hodnôt stanovených na HPLC. V tomto prípade sa nedá táto metóda považovať za spoľahlivú.

Z Graf 2 je možné stanoviť výťažok lipidov, ktorý činil 92,5 % za použitia etanolu a 86,2 % za použitia hexánu. Hexánový extrakt sa prejavil ako nevhodný aj z hľadiska stability lipidov. Ďalej je možné pozorovať značný nárast percentuálneho zastúpenia PUFA na úkor zastúpenia MUFA. Dá sa teda predpokladať, že PUFA produkované kmeňom *Sporidiobolus pararoseus* sú pomerne stabilné v priebehu dlhodobého uchovávaní.

5.1.1.2 Stabilita extraktov kmeňa *Rhodotorula kratochvilovae* z fermentora (C/N 50; médium tuk + srvátka)



Graf 3: Časový vývin koncentrácie pigmentov v extraktoch kmeňa *Rhodotorula kratochvilovae* v porovnaní s referenčnou extrakciou (Folch)

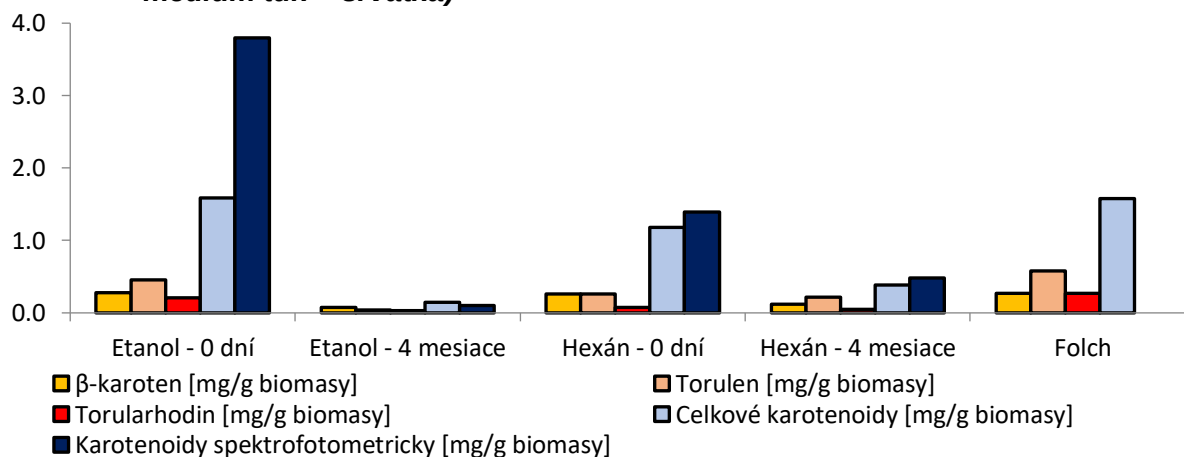


Graf 4: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v extraktoch kmeňa *Rhodotorula kratochvilovae* v porovnaní s referenčným stanovením (R)

Ako je možné si povšimnúť na Graf 3, extrakcia celkových karotenoidov prebehla z 83,2 % do etanolu a z 50,6 % do hexánu. Etanol sa teda javí byť vhodnejším rozpúšťadlom pre extrakciu pigmentov. Z hľadiska ich stability po 4 mesiacoch sa však oboje rozpúšťadlá zdajú približne rovnako vhodné, keďže koncentrácie celkových karotenoidov dosiahli podobné hodnoty (1,08 mg/g pre etanol a 1,14 mg/g pre hexán). Za povšimnutie stojí mimoriadne nízky výťažok torulínu, a to za použitia oboch rozpúšťadiel (30,5 % v prípade etanolu a 16,5 % v prípade hexánu). Mimoriadne vysokú účinnosť dosiahla extrakcia beta-karoténu pomocou etanolu, a to 91,6 %. Údaje získané spektrofotometrickým meraním tentokrát poskytli presnejšie výsledky, avšak iba v prípade čerstvého etanolového extraktu.

Z Graf 4 je zasa možné vyčítať mimoriadne nízku účinnosť extrakcie celkových lipidov do etanolu, a to iba 54,8 %. Hexán sa preto javí byť zasa vhodnejším rozpúšťadlom pre ich extrakciu, pričom výťažok tejto extrakcie dosiahol až 91,5 %. V extrakte, ktorý podľahol najintenzívnejšiemu rozkladu (etanolový), došlo k značnému poklesu zastúpenia SFA, dá sa teda predpokladať, že ako prvé podliehajú rozkladu.

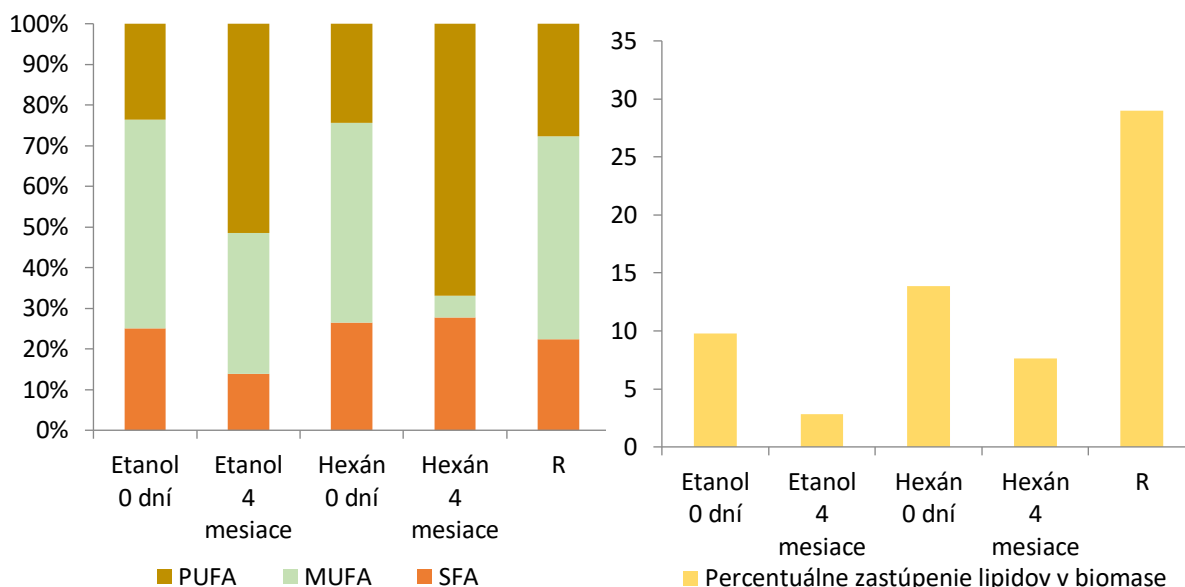
5.1.1.3 Stabilita extraktov kmeňa *Rhodotorula mucilaginosa* z fermentora (C/N 25, médium tuk + srvátka)



Graf 5: Časový vývin koncentrácie pigmentov v extraktoch kmeňa *Rhodotorula mucilaginosa* v porovnaní s referenčnou extrakciou (Folch)

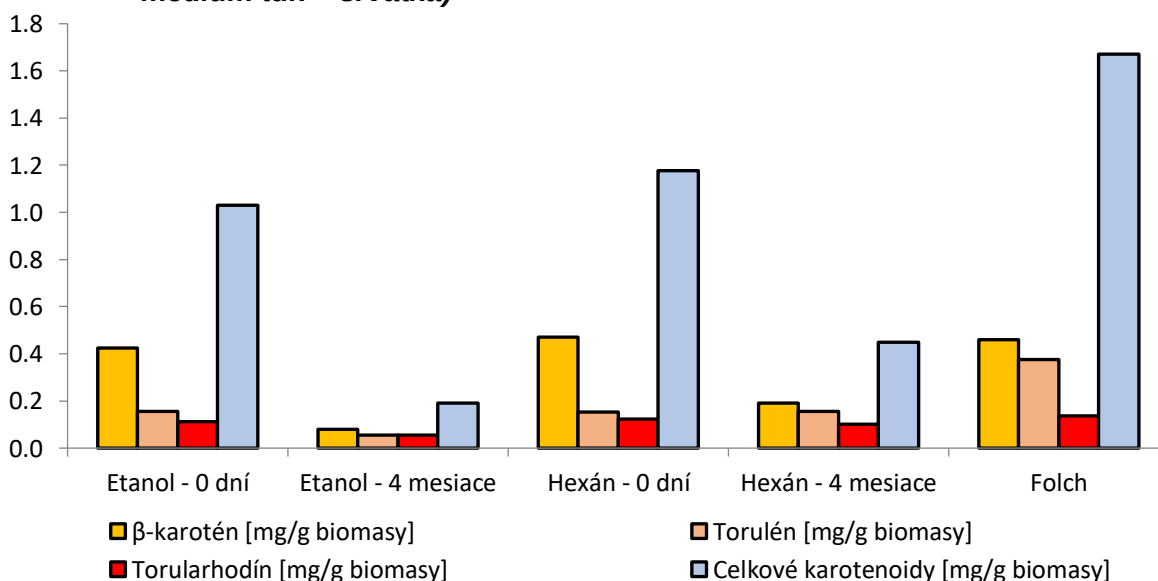
Ako je možné si povšimnúť na Graf 5, tak podľa stanovenia dosiahla miera extrakcie karotenoidov do etanolu viac ako 100 %. Dá sa teda predpokladať, že ich extrakcia prebehla úplne. Hexán sa prejavil ako menej účinné rozpúšťadlo, s výťažkom 75,1 % celkových karotenoidov a malými výťažkami torulínu a torularhodínu, pre dlhodobé skladovanie pigmentov sa však preukázal ako vhodnejšia voľba. Spektrofotometrické stanovenie opäť nevystihuje obsah karotenoidov v extrakte úplne správne, v tomto prípade sa zdá že vo vzorke s etanolom interferujú s meraním iné látky.

Graf 6 vypovedá o vyššej účinnosti extrakcie lipidov do hexánu než do etanolu. Stále však boli dosiahnuté iba veľmi malé hodnoty (13,9 % v porovnaní s 28,9 %). Celkové lipidy i PUFA sa javia najstabilnejšie v hexánovom extrakte.

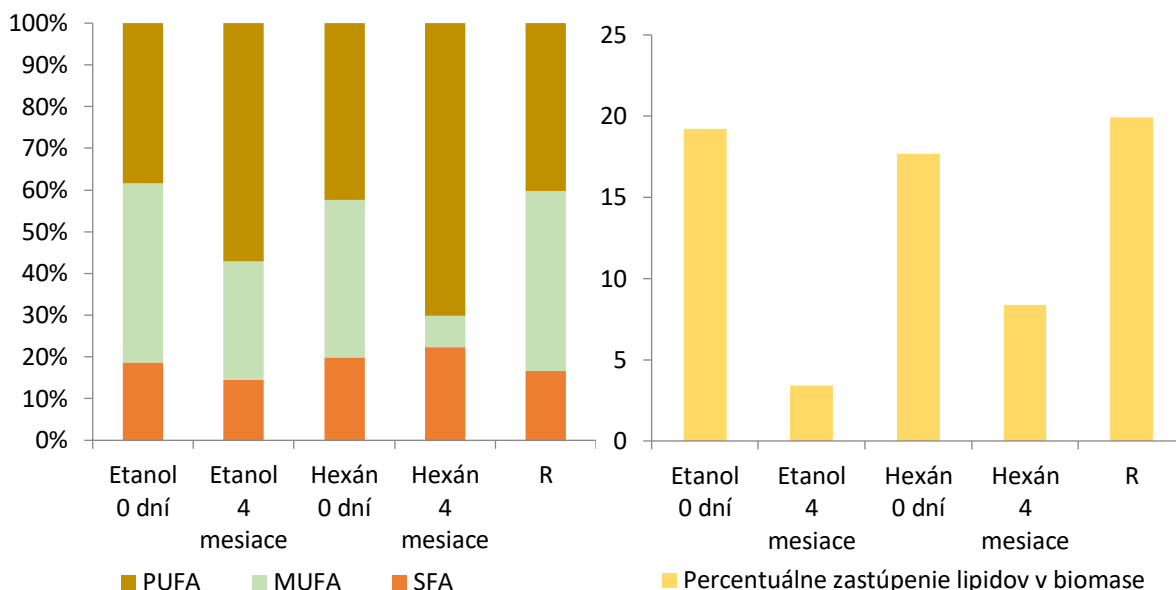


Graf 6: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v extraktoch kmeňa *Rhodotorula mucilaginosa* v porovnaní s referenčným stanovením (R)

5.1.1.4 Stabilita extraktov kmeňa *Cystofilobasidium macerans* z fermentora (C/N 13, médium tuk + srvátka)



Graf 7: Časový vývin koncentrácie pigmentov v extraktoch kmeňa *Cystofilobasidium macerans* v porovnaní s referenčnou extrakciou (Folch)

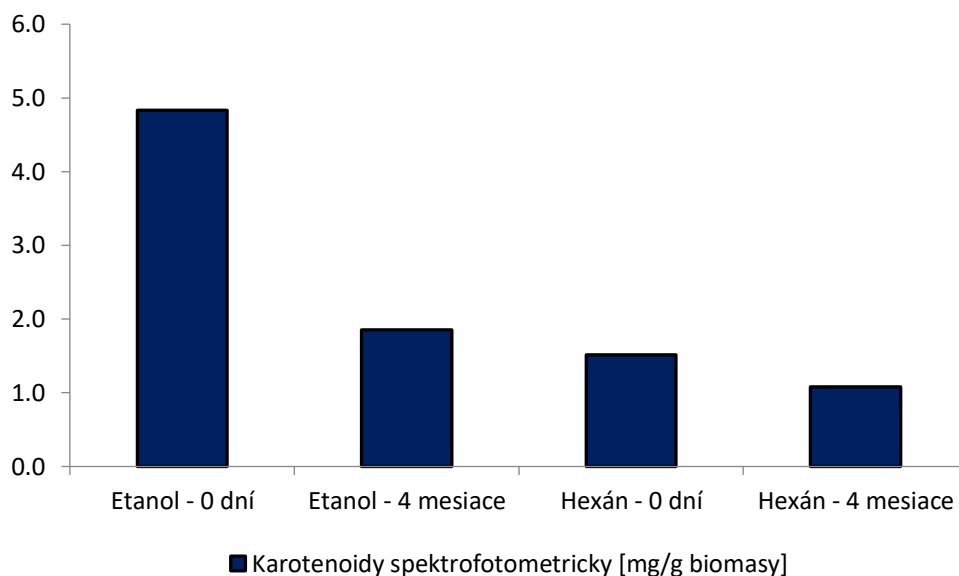


Graf 8: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v extraktoch kmeňa *Cystofilobasidium macerans* v porovnaní s referenčným stanovením (R)

Ako je možné si všimnúť na Graf 7, pre extrakciu i uchovanie pigmentov z biomasy kmeňa *Cystofilobasidium macerans* je vhodnejším rozpúšťadlom hexán.

V tomto extrakte bol zaznamenaný vysoký výťažok beta-karoténu, ktorý až prevyšoval hodnotu referenčného stanovenia. Dá sa teda predpokladať že došlo k jeho úplnej extrakcii. Pomerne nízky výťažok bol zaznamenaný pre pigment torulén, a to v extraktoch oboch rozpúšťadiel. Spektrofotometricky určená koncentrácia znázornená na Graf 7 i v tomto prípade vykazuje vysoké hodnoty pre etanolový extrakt. V extrakte sa pravdepodobne nachádzali i iné látky absorbujúce žiarenie pri vlnovej dĺžke 470 nm.

Z Graf 8 je možné určiť, že etanol je v tomto prípade pre extrakciu lipidov účinnejším rozpúšťadlom. Etanolový extrakt však zároveň prejavil pomerne nízku stabilitu celkových lipidov viazaných ako triacylglyceroly.



Graf 9: Časový vývin koncentrácií pigmentov v extraktoch kmeňa *Cystofilobasidium macerans*, určené spektrofotometricky

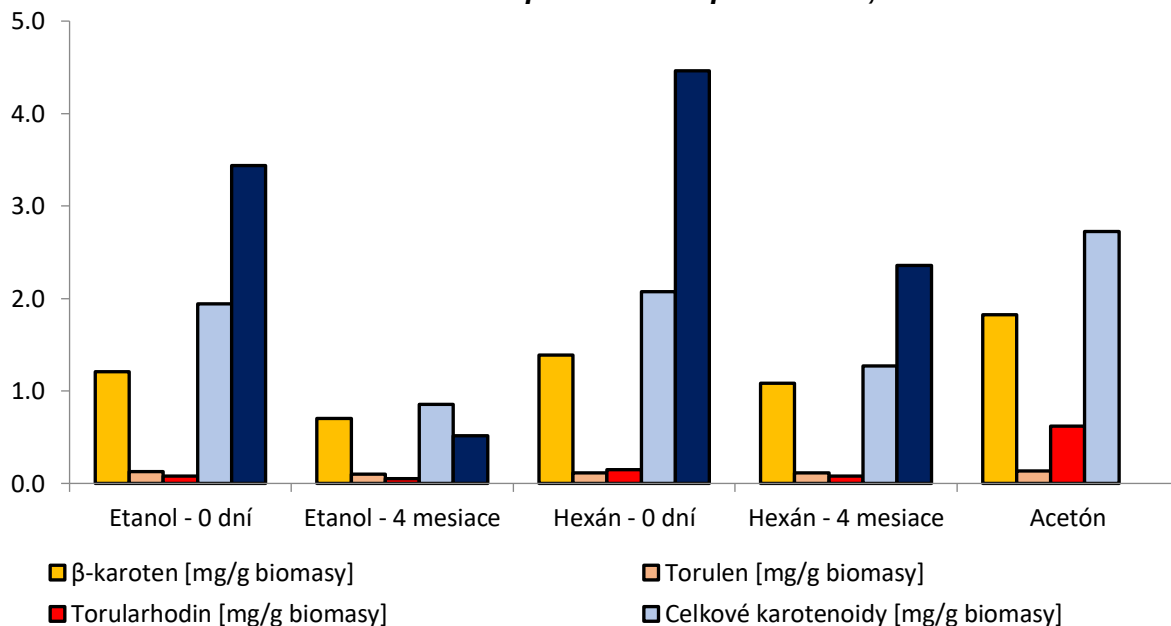
5.1.1.5 Zhrnutie výsledkov dlhodobých testov stability extraktov biomasy získanej z fermentorov.

Z výsledkov extrakčných experimentov a testov stability biomasy kvasiniek produkovanej vo fermentoroch je možné pozorovať, že účinnosť extrakcie pigmentov z biomasy bola do veľkej miery závislá na použitom kmeni mikroorganizmu a tiež na použitom rozpúšťadle. Na výsledky mala nezanedbateľný vplyv aj odlišná zostava pigmentov produkovaných daným kmeňom kvasiniek. Pre extrakciu pigmentov z väčšiny vzoriek biomasy sa prejavil ako optimálne rozpúšťadlo etanol, do ktorého boli vyextrahované pigmenty vo vysokých výťažkoch. Pigmenty niektorých kmeňov, ako napríklad *Cystofilobasidium macerans*, je však vhodnejšie extrahovať s použitím hexánu, ktorý v tomto prípade dosiahol tiež vysokého výťažku. Vo všetkých extraktoch, s výnimkou kmeňa *Sporidiobolus pararoseus*, sa pre dlhodobé uchovanie extraktov prejavil ako najlepšia voľba hexán.

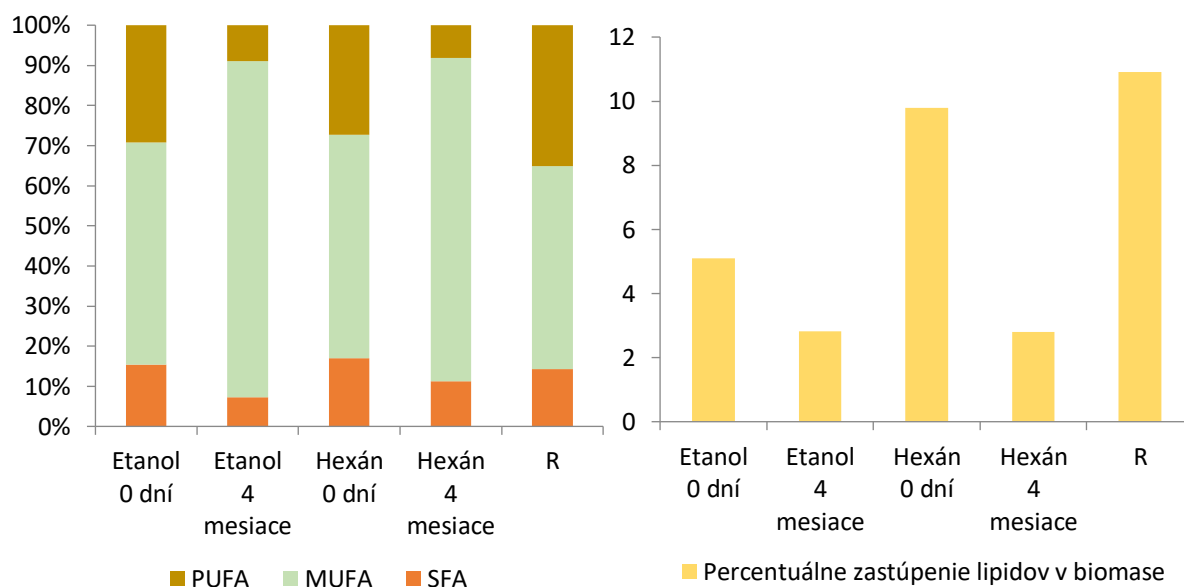
Extrakcia lipidov prebehla najlepšie za použitia etanolu pre vzorky biomasy kmeňov *Cystofilobasidium macerans* a *Sporidiobolus pararoseus*. Stabilita lipidov sa však preukázala najvyššia v hexánových extraktoch, a to pre všetky vzorky biomasy, s výnimkou fermentorovej kultivácie kmeňa *Sporidiobolus pararoseus*. PUFA sa preukázali ako pomerne stabilné vo všetkých extraktoch.

5.1.2 Dlhodobé stabilitné testy extraktov z fľaškových kultivácií, C/N 25

5.1.2.1 Stabilita extraktov kmeňa *Sporidiobolus pararoseus*, fľašková kultivácia



Graf 10: Časový vývin koncentrácie pigmentov v extraktoch kmeňa *Sporidiobolus pararoseus* v porovnaní s referenčnou extrakciou (Acetón)



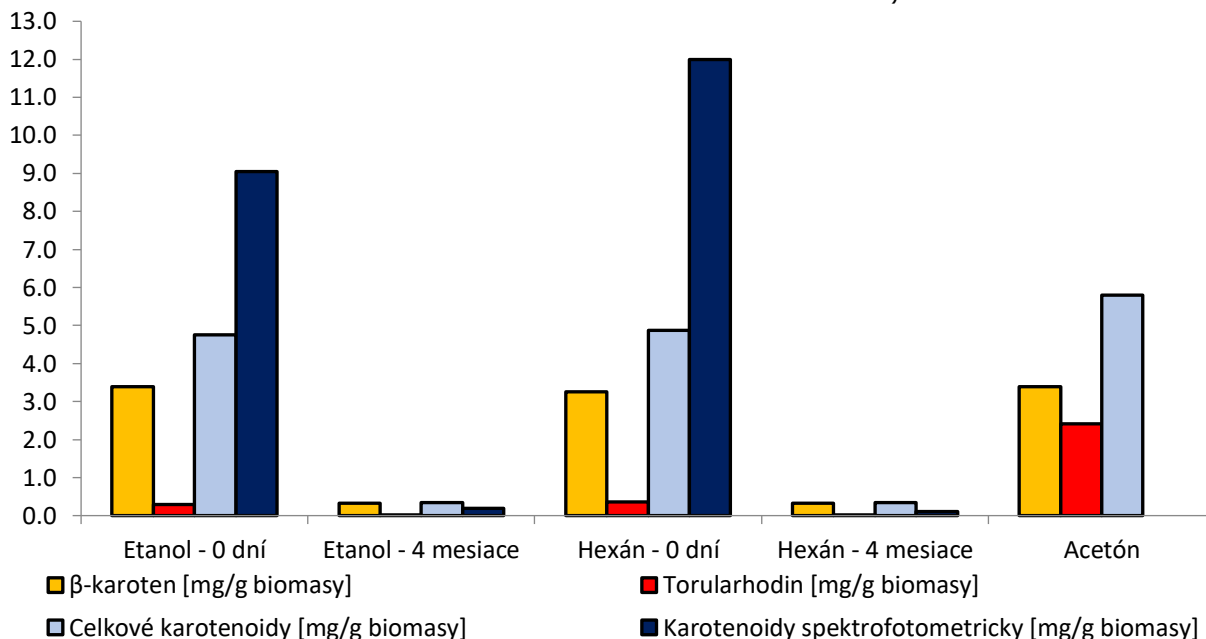
Graf 11: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v extraktoch kmeňa *Sporidiobolus pararoseus* v porovnaní s referenčným stanovením (R)

Ako je možné pozorovať na Graf 10: Časový vývin koncentrácie pigmentov v extraktoch kmeňa *Sporidiobolus pararoseus* v porovnaní s referenčnou extrakciou (Acetón), pre tento kmeň sa ukázal byť vhodnejším rozpúšťadlom pre extrakciu pigmentov hexán, ktorý dosiahol 76,1 % výťažok celkových karotenoidov. Pri extrakcii do hexánu bol dosiahnutý aj väčší výťažok beta-karoténu, a to 1,39 mg/g v porovnaní s 1,21 mg/g za použitia etanolu. Zo vzorku sa podarilo získať iba malé výťažky torularhodínu, a to nezávisle od použitého rozpúšťadla. Z hľadiska stability sa preukázalo byť vhodnejšie uskladnenie do hexánu, na čo poukazujú i údaje získané spektrofotometrickým meraním.

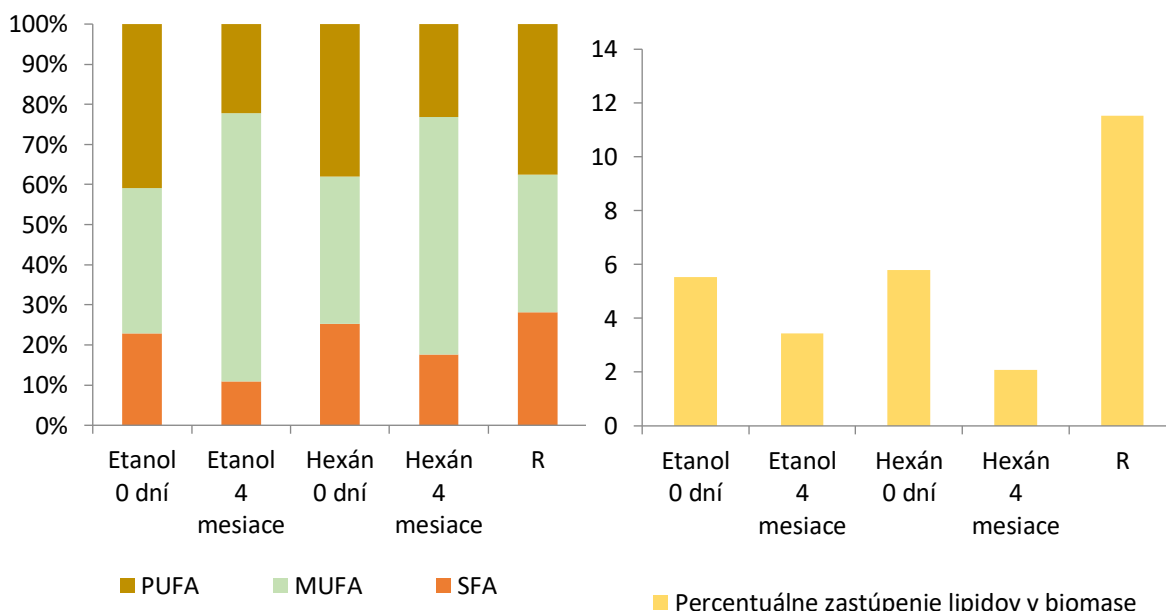
Tieto výsledky však zároveň nesprávne charakterizujú rozdiel obsahu karotenoidov vo vzorkách po 4 mesiacoch skladovania, pričom poukazujú na oveľa vyššie rozdiely medzi hexánovým a etanolovým extraktom.

Graf 11 vypovedá že hexán je v tomto prípade i vhodnejším rozpúšťadlom pre extrakciu lipidov, pričom ich výťažok činil až 89,7 %. Koncentrácia lipidov však dosiahla po 4 mesiacoch obdobné hodnoty pre oboje rozpúšťadlá. Pre túto vzorku sa javia byť najmenej stabilnými PUFA.

5.1.2.2 Stabilita extraktov kmeňa *Rhodotorula kratochvilovae*, fľašková kultivácia



Graf 12: Časový vývin koncentrácie pigmentov v extraktoch kmeňa *Rhodotorula kratochvilovae* v porovnaní s referenčnou extrakciou (Acetón)

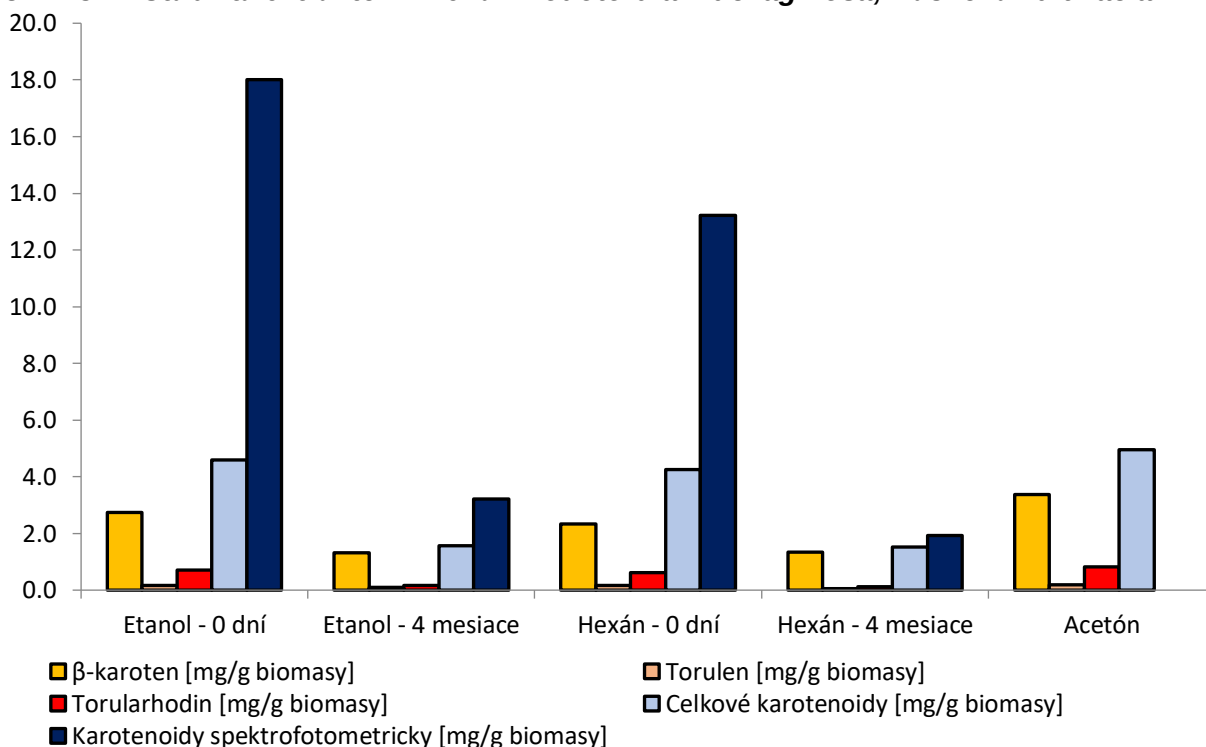


Graf 13: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v extraktoch kmeňa *Rhodotorula kratochvilovae* v porovnaní s referenčným stanovením (R)

Ako je možné si všimnúť na Graf 12, extrakcia pigmentov do etanolu dosiahla v tomto prípade výťažok 81,8 % a extrakcia do hexánu 84 %. Hexán sa teda javí ako mierne vhodnejšie rozpúšťadlo. Karotenoidy sa v tomto vzorku prejavili ako pomerne nestabilné, pričom koncentrácie beta-karoténu klesli až na približne 1/10 ich pôvodných hodnôt pre obidva spôsoby uskladnenia (v etanole i v hexáne). Z biomasy tohto rodu nebol získaný žiadny výťažok torulénu a všeobecne veľmi nízke výťažky torularhodínu. Spektrofotometrické stanovenie poukazuje na vysoké koncentrácie karotenoidov v hexánovom extrakte, reálne rozdiely koncentrácií karotenoidov medzi etanolovým a hexánovým extraktom však nedosahujú takéto rozdiely. Dá sa predpokladať, že pri meraní hexánového extraktu interferovali iné látky.

Graf 13 vypovedá, že hexán je vhodnejším i pre extrakciu lipidov zo vzorku, pričom ich výťažok dosiahol 50,3 %. Lipidy v hexánovom extrakte sa však prejavili ako najmenej stabilné, pričom ich koncentrácia klesla na 35,8 % pôvodnej hodnoty, čiže ešte nižšie hodnoty ako nadobudnuté uskladnením v etanole. PUFA sa v tomto prípade javia ako najmenej stabilné mastné kyseliny.

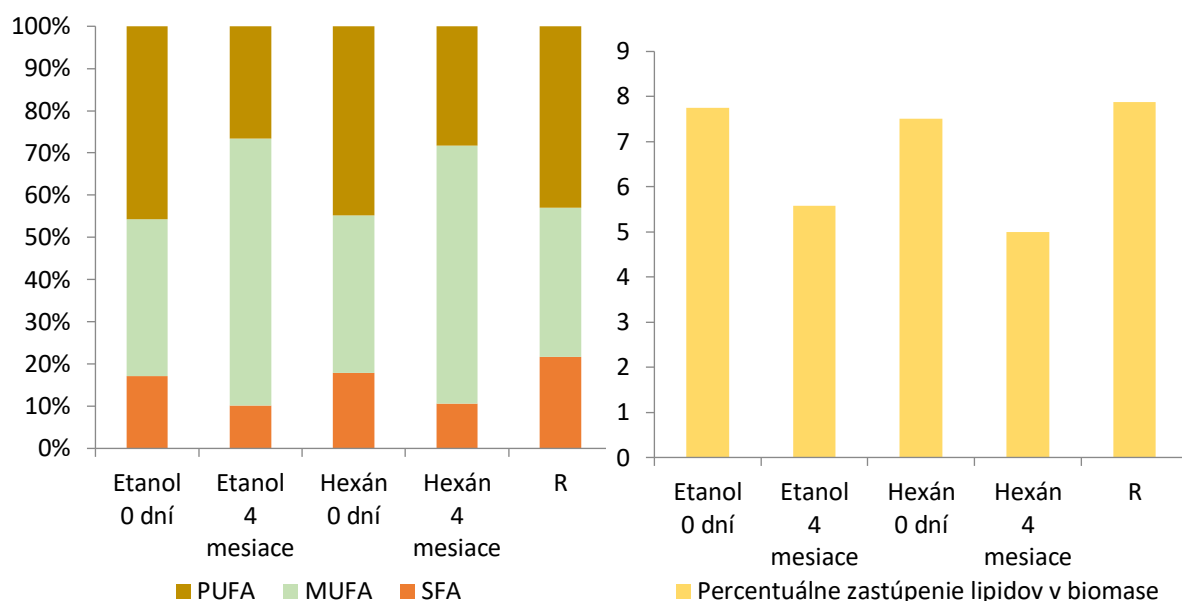
5.1.2.3 Stabilita extraktov kmeňa *Rhodotorula mucilaginosa*, fľašková kultivácia



Graf 14: Časový vývin koncentrácie pigmentov v extraktoch kmeňa *Rhodotorula mucilaginosa* v porovnaní s referenčnou extrakciou (Acetón)

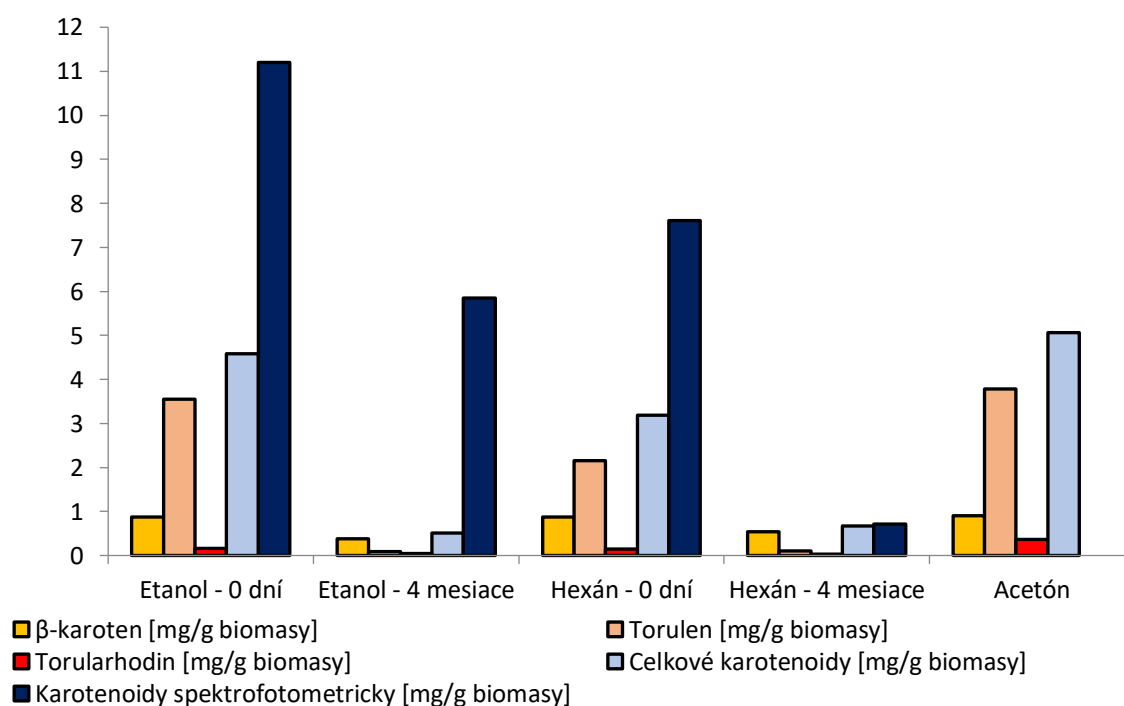
Z Grafu 15 je možné pozorovať, že v tomto prípade prebehla extrakcia pigmentov lepšie za použitia etanolu, získaných bolo až 92,3 % celkových karotenoidov. Pri dlhodobom skladovaní však klesla ich koncentrácia na podobnú hodnotu v etanolovom i v hexánovom extrakte. Z tohto vzorku biomasy boli extrakciou do etanolu získané aj pomerne dobré výťažky torulénu (84,2 %) a torularhodínu (86,1 %). Spektrofotometrické stanovenie ani v tomto prípade neposkytuje presné výsledky.

Graf 15 vypovedá, že pre extrakciu lipidov z biomasy u tejto kultivácie je vhodnejšie použiť etanol, pričom bol dosiahnutý výťažok až 98,4 %. Hexán však dosiahol tiež pomerne vysoký výťažok a to 95,3 %. Ako najmenej stabilné sa prejavili PUFA, a to nezávisle od použitého rozpúšťadla.

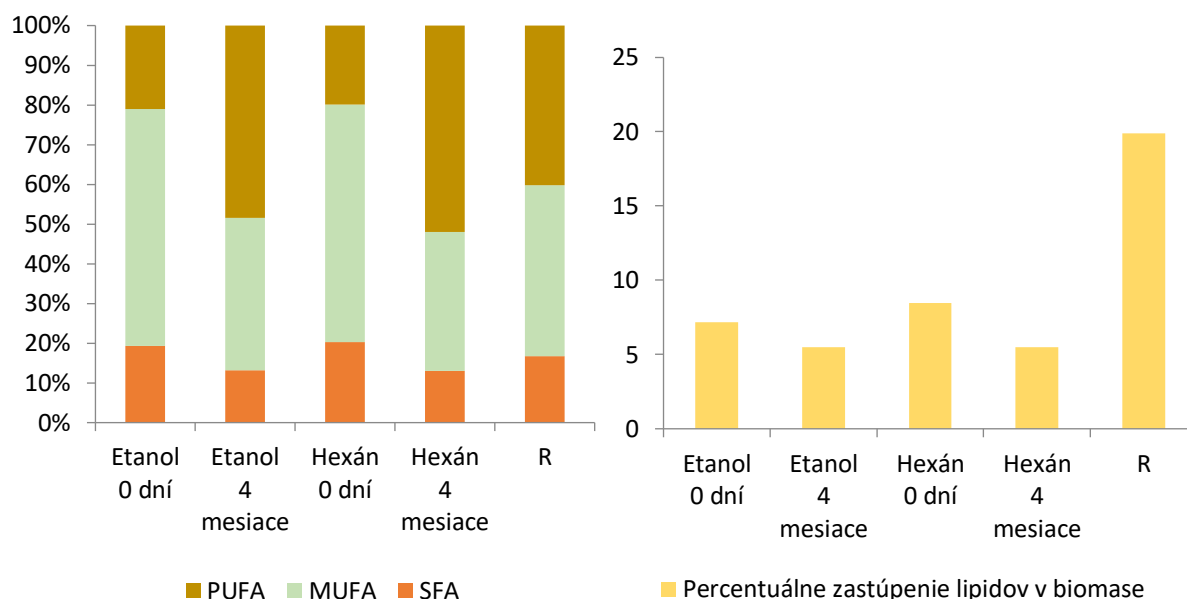


Graf 15: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v extraktoch kmeňa *Rhodotorula mucilaginosa* v porovnaní s referenčným stanovením (R)

5.1.2.4 Stabilita extraktov kmeňa *Cystofilobasidium macerans*, fľašková kultivácia



Graf 16: Časový vývin koncentrácie pigmentov v extraktoch kmeňa *Cystofilobasidium macerans* v porovnaní s referenčnou extrakciou (Acetón)



Graf 17: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v extraktoch kmeňa *Cystofilobasidium macerans* v porovnaní s referenčným stanovením (R)

Graf 16 vypovedá o tom, že výtazok celkových karotenoidov dosiahol maximum za použitia etanolu, a to hodnotu 90,7 %. Hexán, s výtazkom 60,3 %, sa javí ako pomerne nevhodná voľba. Do etanolu sa podarilo vyextrahovať i pomerne veľké množstvo torulínu, a to s výtazkom až 93,7 %. Pigment torulín však zároveň podľahol najintenzívnejšiemu rozkladu. Ako pomerne stabilný sa prejavil beta-karotén v hexánovom extrakte, kedy jeho koncentrácia klesla po 4 mesiacoch pri teplote -40 °C iba na 61,5 % pôvodnej hodnoty. Za povšimnutie stojí vysoké množstvo celkových karotenoidov stanovených spektrofotometricky v etanolovom extrakte skladovanom 4 mesiace. Mohlo to byť spôsobené prítomnosťou rozkladných produktov, ktoré neboli identifikované pomocou HPLC, ale interferovali s meraním na spektrofotometri.

Ako je znázornené na Graf 17, extrakcia lipidov dosiahla v tomto prípade väčšie výtazku za použitia hexánu, a to 68,5 %. Koncentrácia lipidov v extrakte však klesla po 4 mesiacoch na podobné hodnoty. PUFA sa v tomto vzorku zdajú byť pomerne dosť stabilné, pričom ich percentuálne zastúpenie stúplo až na 48,4 % pre etanol a 51,9 % pre hexán.

5.1.2.5 Zhrnutie výsledkov dlhodobých testov stability fľaškových kultivácií

Z výsledkov extrakčných experimentov a dlhodobých testov stability biomasy fľaškových kultivácií je možné pozorovať, že extrakcia pigmentov prebehla najlepšie do etanolu pre kmeň *Rhodotorula mucilaginosa* a *Cystofilobasidium macerans*. Do hexánu prebehla extrakcia lepšie pre kmeň *Sporidiobolus pararoseus* a *Rhodotorula kratochvilovae*, pre oba kmene však poskytoval dobré výsledky i etanol. Značné rozdiely medzi konečnou koncentráciou celkových karotenoidov v etanolových a hexánových extraktoch sa prejavili iba pre kmeň *Sporidiobolus pararoseus*, a to v prospech hexánového extraktu.

Extrakcia lipidov prebehla lepšie za použitia hexánu, s výnimkou kmeňa *Rhodotorula mucilaginosa*. Stabilita lipidov sa ukázala byť nižšou v hexánových extraktoch biomasy kmeňov *Rhodotorula kratochvilovae* a *Rhodotorula mucilaginosa*. Extrakty biomasy kmeňov *Cystofilobasidium macerans* a *Sporidiobolus pararoseus* dosiahli obdobnú koncentráciu lipidov po 4 mesiacoch za použitia oboch rozpúšťadiel. PUFA sa prejavili v tomto prípade ako pomerne nestabilné, s výnimkou extraktu kmeňa *Cystofilobasidium macerans*.

Rozdiely v účinnosti extrakcie metabolitov individuálnych druhov kvasiniek do rôznych rozpúšťadiel môžu súvisieť s odlišnou stavbou bunkovej steny a celkovým zložením buniek.

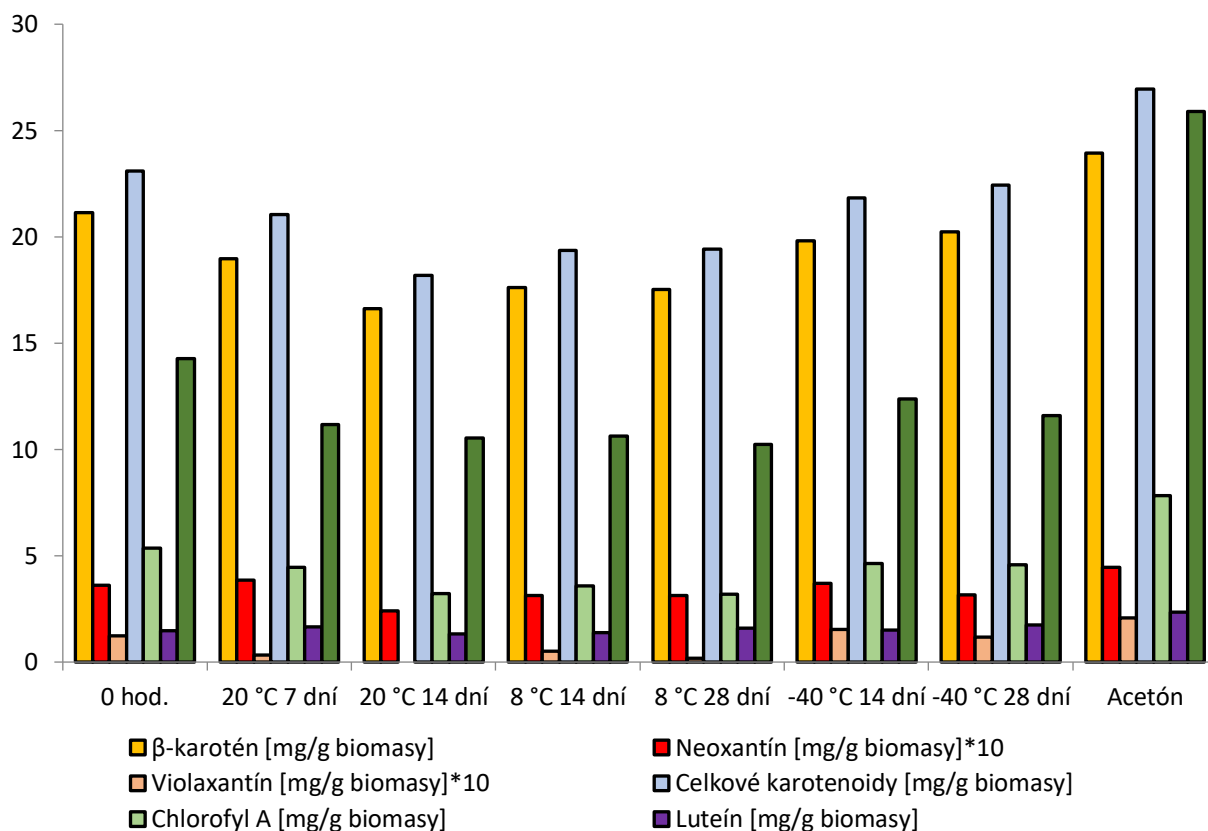
5.2 Krátkodobé testy stability

Zmienené stabilitné testy boli vykonané na celkom 6 kmeňoch mikrorias a 4 kmeňoch kvasiniek kultivovaných vo fermentoroch. Údaje získané z HPLC, z GC a spektrofotometrickým meraním boli vynesené do série grafov. Pre každý extrakt bola zhodnotená extrakčná účinnosť jednotlivých metabolitov a celkového zastúpenia karotenoidných pigmentov v biomase v porovnaní s referenčným stanovením. Referenčným stanovením konkrétneho vzorku sa rozumie stanovenie pigmentov na HPLC za použitia acetónu ako rozpúšťadla pre pigmenty produkované riasami, alebo stanovenie kvasinkových pigmentov na HPLC extrakciou podľa Folcha, alebo stanovenie mastných kyselín na GC transesterifikáciou biomasy rias či kvasiniek. Hodnoty referenčného stanovenia biomasy kvasiniek kultivovaných vo fermentoroch boli prevzaté z práce [66]. V rámci testu bola zhodnotená stabilita metabolitov počas 28 dní za uskladnenia pri teplote 8 °C v chladiacom boxe a pri teplote -40 °C v mraziacom boxe. Pre porovnanie bola sledovaná aj stabilita metabolitov pri laboratórnej teplote (20 °C) v intenzívnejších intervaloch, avšak kratšiu dobu.

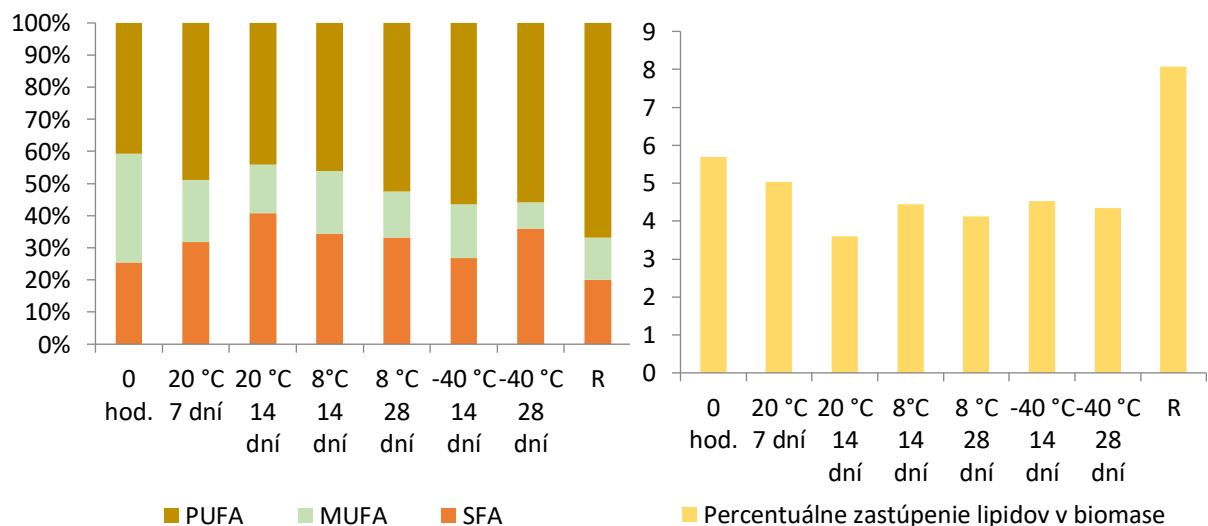
Do hodnôt koncentrácie celkových karotenoidov vo vzorkách kvasiniek (stanovenej na HPLC) v čerstvých extraktoch (0 hod.) boli zahrnuté všetky detekované karotenoidné pigmenty vo vzorku, i tie ktoré nebolo možné presne identifikovať, pričom ich koncentrácia bola určená pomocou kalibračnej krivky beta-karoténu. V extraktoch kvasiniek analyzovaných počas testov stability a vo všetkých extraktoch rias bolo množstvo celkových karotenoidov určené jednoduchým súčtom.

5.2.1 Krátkodobé testy stability rias

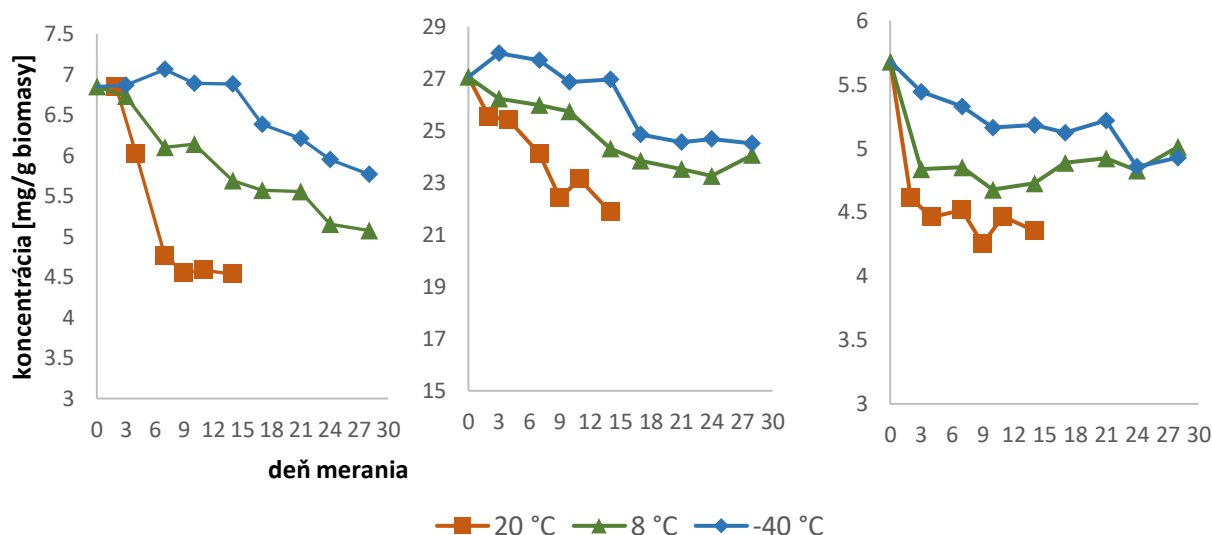
5.2.1.1 Stabilita extraktov kmeňa *Desmodesmus acutus*



Graf 18: Časový vývin koncentrácie pigmentov v etanolovom extrakte kmeňa *Desmodesmus acutus* v porovnaní s referenčnou extrakciou do acetónu (Acetón), stanovené na HPLC



Graf 19: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v etanolovom extrakte pre kmeň *Desmodesmus acutus* v porovnaní s referenčným stanovením (R)



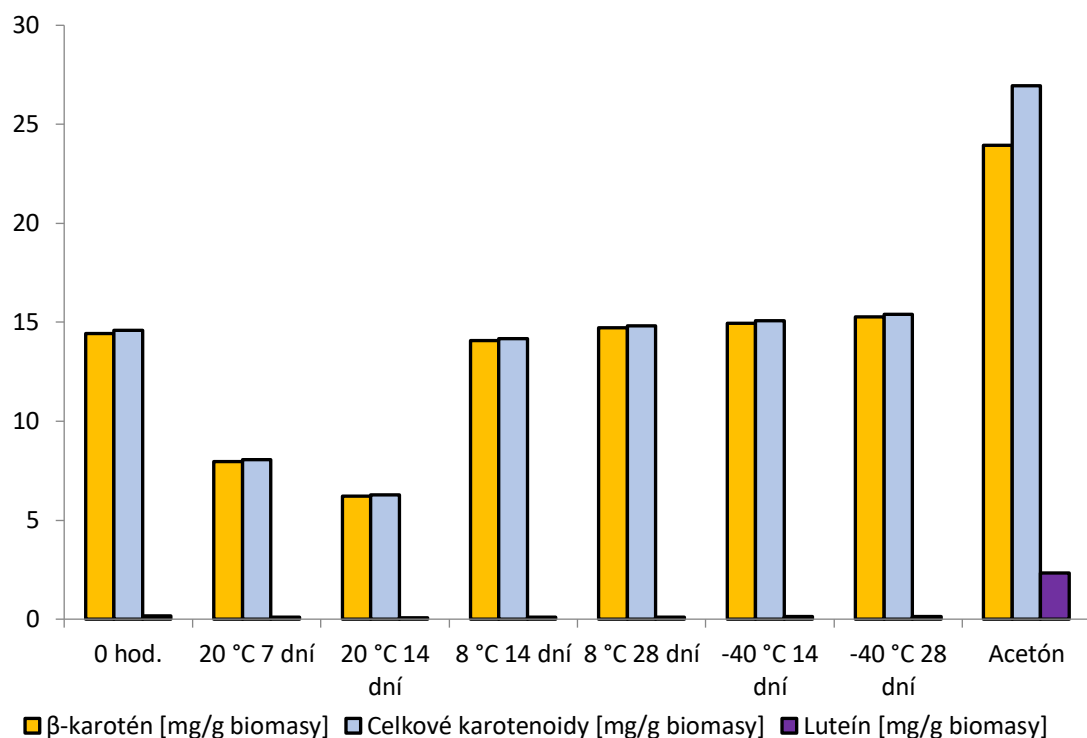
Graf 20: Časový vývin koncentrácie karotenoidov (vľavo), chlorofylu A (v strede) a chlorofylu B (vpravo) stanovená spektrofotometricky v etanолоvom extrakte pre kmeň *Desmodemus Acutus*

Na základe Graf 18 je možné porovnať účinnosť extrakcie lipofilných pigmentov do etanolu a do acetónu, pričom množstvo celkových karotenoidov v etanолоvom extrakte činilo 78,9 % množstva v acetónovom extrakte. Z hľadiska teploty uskladnenia sa pre všetky metabolity javí optimum pri -40 °C, pričom najnáchylnejší na rozklad bol violaxantín. Niektoré metabolity, ako napríklad neoxantín, vykazovali pomerne dobrú stabilitu aj za iných podmienok, avšak len krátkodobo. Množstvo celkových karotenoidov vo vzorku uskladnenom pri -40 °C kleslo po 28 dňoch iba o 3 %. Zelené rastlinné farbivá chlorofyly tiež vykazovali najlepšiu stabilitu pri -40 °C, pozoruhodné je však, že ich stabilita počas prvých 14 dňoch skladovania je pri 8 °C a pri 20 °C takmer rovnaká.

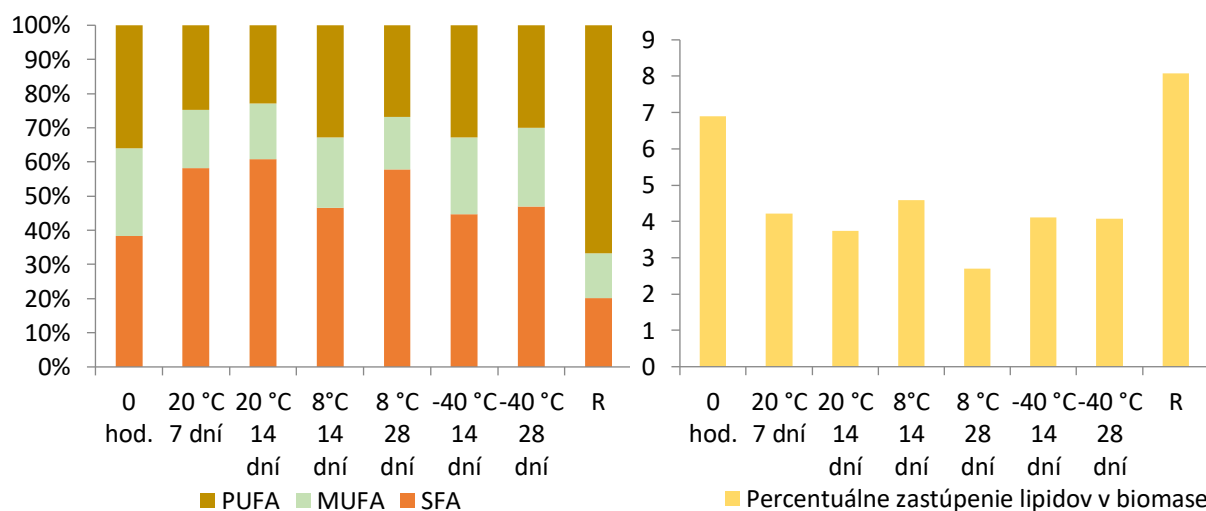
Z Graf 20 je možné vyčítať, že koncentrácia lipidov postupom času mierne klesá. Lipidy vykazovali najvyššiu stabilitu pri -40 °C. Z hľadiska zloženia mastných kyselín sa ako najlabilnejšie javia mononenasýtené kyseliny.

Polynenasýtené mastné kyseliny vykazujú vyššiu stabilitu, avšak značne nízku mieru extrakcie do etanolu (70,5 %) v porovnaní s tradičnou transesterifikáciou z biomasy.

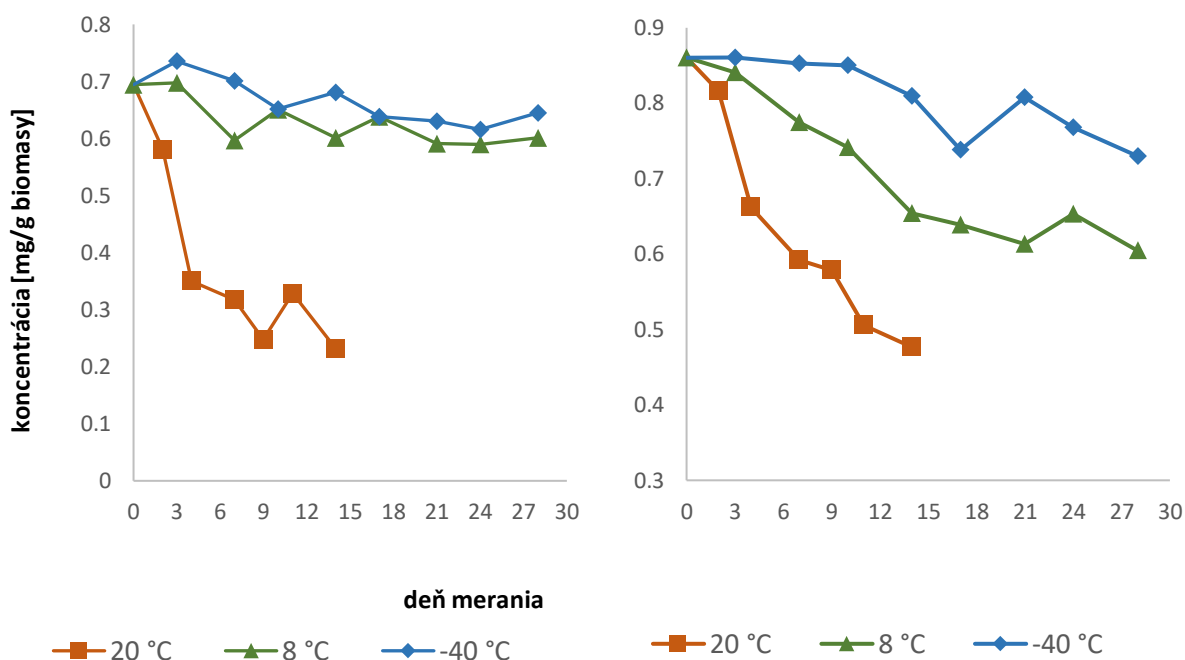
Z Graf 21 je možné pozorovať vývoj koncentrácie pigmentov v extrakte. Pre karotenoidy a rovnako aj chlorofyly javí uskladnenie pri 20 °C ako nevhodné. Je tiež možné pozorovať značné rozdiely medzi uskladnením pri 8 °C a -40 °C.



Graf 21: Časový vývin koncentrácie pigmentov v hexánovom extrakte kmeňa *Desmodesmus acutus* v porovnaní s referenčnou extrakciou do acetónu (Acetón), stanovené na HPLC



Graf 22: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v hexánovom extrakte pre kmeň *Desmodesmus acutus* v porovnaní s referenčným stanovením (R)

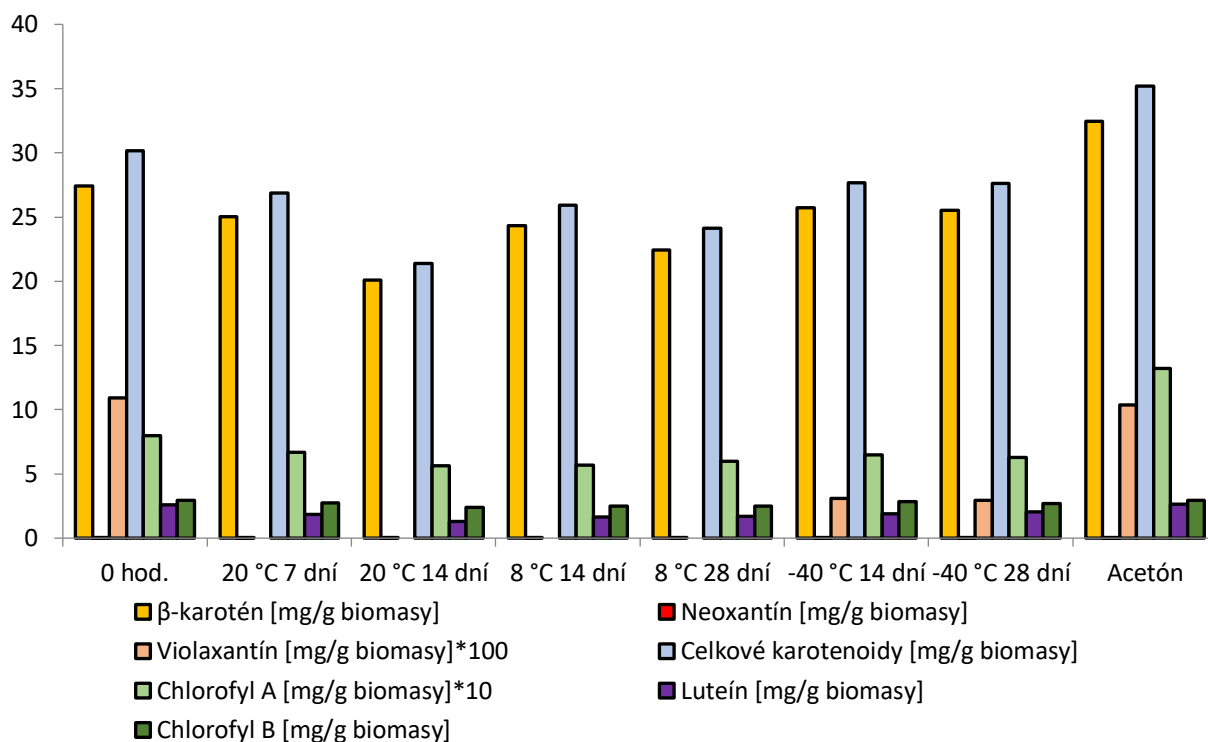


Graf 23: Časový vývin koncentrácie karotenoidov (vľavo) a chlorofylu A (vpravo) stanovená spektrofotometricky v hexánovom extrakte pre kmeň *Desmodesmus acutus*

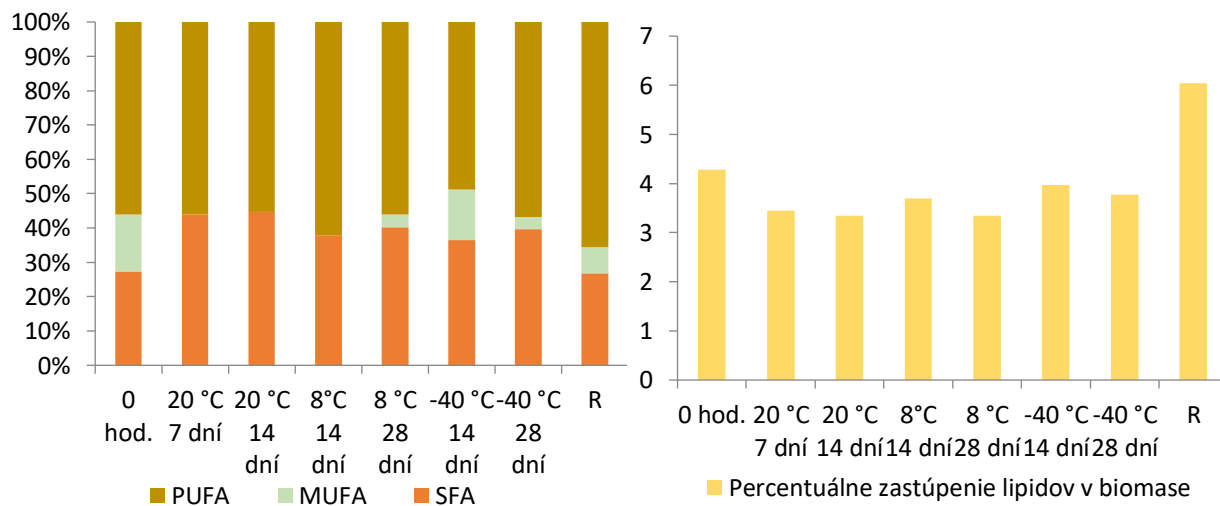
Na základe Graf 21 je možné prehlásiť u *Desmodesmus acutus* jednoznačne menšiu účinnosť extrakcie pigmentov do hexánu ako do etanolu. Množstvo celkových karotenoidov dosiahlo výťažok iba 54,2 % v zrovnaní s acetónovou extrakciou. Niektoré pigmenty ako neoxantín, violaxantín neboli detekované v analyticky významných koncentráciách. Chlorofyl B nebol detekovaný pri spektrofotometrickom stanovení (Graf 24), v ktorom bol detekovaný iba chlorofyl A. Z Graf 21 je možné pozorovať porovnateľne dobrú stabilitu karotenoidov pri -40 °C ako aj pri 8 °C, čo je možné pozorovať aj pri spektrofotometrickom stanovení.

Na Graf 23 je možné pozorovať značnú nestabilitu vyextrahovaných lipidov. Hoci účinok extrakcie dosahoval až 85,3 %, lipidy v tomto vzorku podliehali rýchlemu rozpadu. Jedná sa pravdepodobne o rozklad PUFA a do menšej miery aj rozklad MUFA. Je teda možné prehlásiť, že z krátkodobého hľadiska je lepšie pre extrakciu lipidov použiť hexán, avšak pri dlhodobom skladovaní dosiahne zastúpenie lipidov v etanolovom a v hexánovom extrakte podobné hodnoty (4,1 % pre hexán a 4,34 % pre etanol za -40 °C).

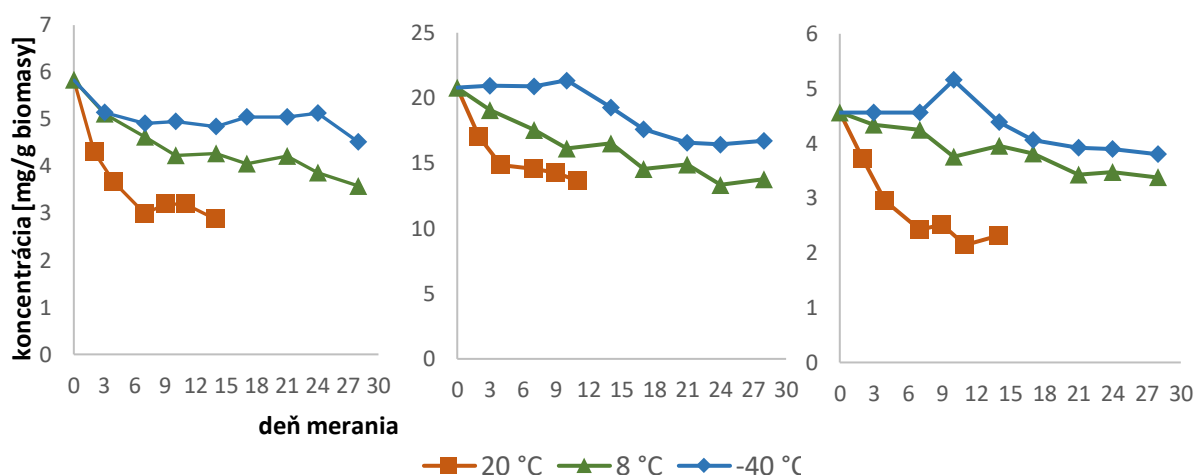
5.2.1.2 Stabilita extraktov kmeňa *Desmodemus quadricauda*



Graf 24: Časový vývin koncentrácie pigmentov v etanолоvom extrakte kmeňa *Desmodemus quadricauda* v porovnaní s referenčnou extrakciou do acetónu (Acetón), stanovené na HPLC



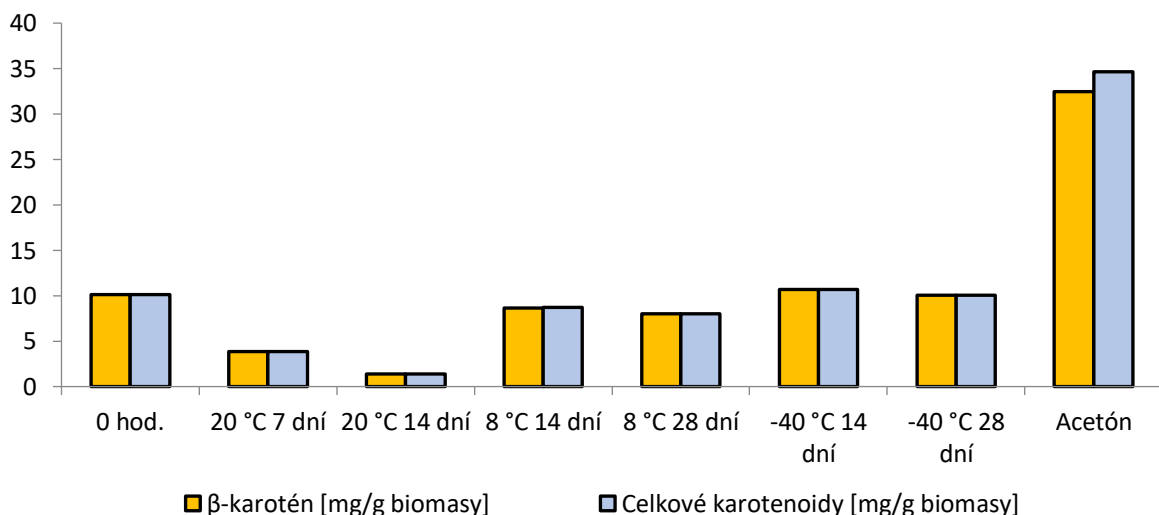
Graf 25: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v etanолоvom extrakte pre kmeň *Desmodemus quadricauda* v porovnaní s referenčným stanovením (R)



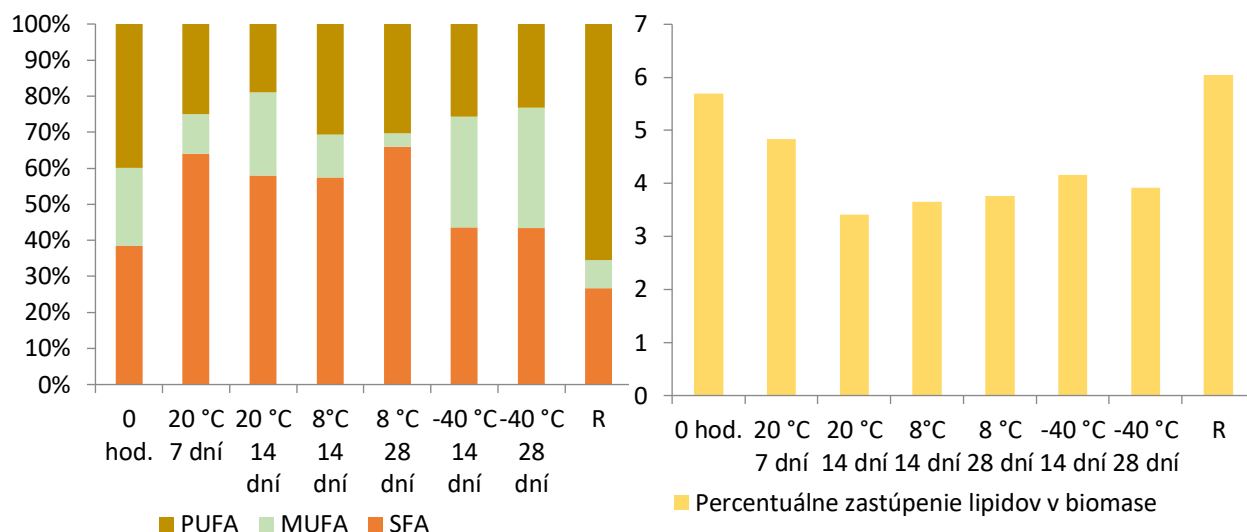
Graf 26: Časový vývin koncentrácie karotenoidov (vľavo), chlorofylu A (v strede) a chlorofylu B (vpravo) stanovená spektrofotometricky v etanolextrakte kmeňa *Desmodesmus quadricauda*

Z Graf 24 je možné vyvodiť že extrakčná účinnosť kmeňa *Desmodesmus quadricauda* pre celkové karotenoidy dosahovala 85,7 %. Z hľadiska stability karotenoidov sa opäť javí ako optimálna teplota prostredia -40 °C, pri ktorej klesol ich celkový obsah iba o 9 %. Najmenšiu stabilitu vykazoval pigment violaxantín, ktorého koncentrácia dosiahla veľmi nízkych hodnôt už po 14 dňoch pri teplote 20 °C alebo po 28 dňoch pri 8 °C. Tento extrakt sa tiež vyznačuje pomerne nízkou mierou extrakcie chlorofylu A, ktorá dosiahla iba 60,4 % referenčného vzorku. Na Graf 26 je tiež možné pozorovať najvyššiu stabilitu všetkých pigmentov pri teplote -40 °C.

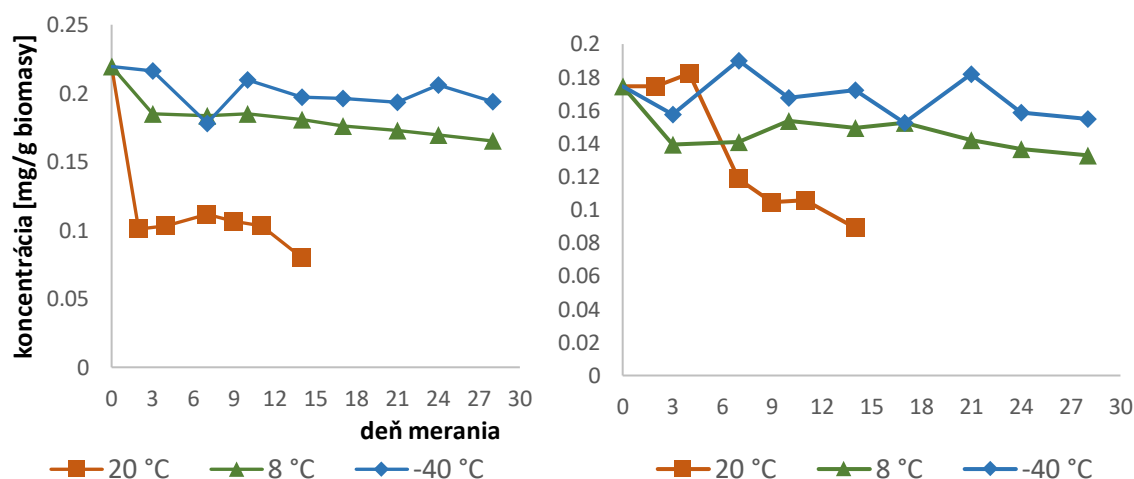
Z Graf 25 je možné vyvodiť, že teplota uskladnenia má iba malý vplyv na stabilitu lipidov vo vzorku po dobe 28 dní (3,34 % pre 8 °C a 3,77 % pre -40 °C). Z tohto grafu je tiež zrejmé, že najskôr podliehajú rozkladu MUFA, ktorých percentuálne zastúpenie rýchlo klesá, s výnimkou vzorku uskladneného pri -40 °C po 14 dní. Miera extrakcie lipidov dosiahla v tomto prípade 70,7 %.



Graf 27: Časový vývin koncentrácie pigmentov v hexánovom extrakte kmeňa *Desmodesmus quadricauda* v porovnaní s referenčnou extrakciou do acetónu (Acetón), stanovené na HPLC



Graf 28: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v hexánovom extrakte pre kmeň *Desmodesmus quadricauda* v porovnaní s referenčným stanovením (R)

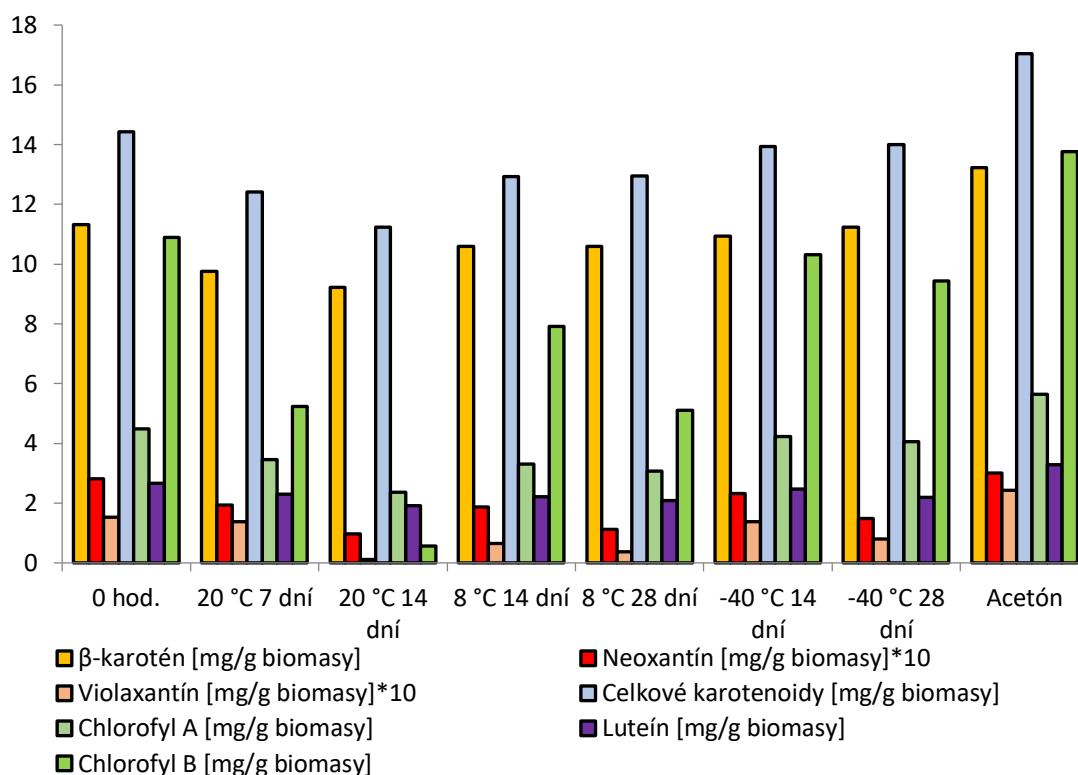


Graf 29: Časový vývin koncentrácie karotenoidov (vľavo) a chlorofylu A (vpravo) stanovená spektrofotometricky v hexánovom extrakte kmeňa *Desmodesmus quadricauda*

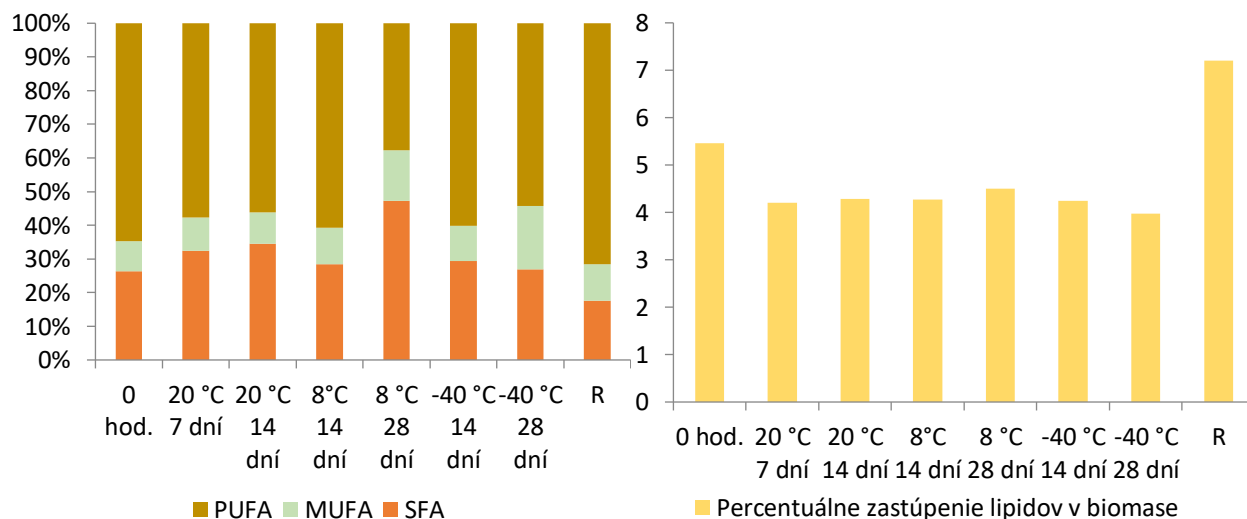
Na Graf 27 je opäť možné pozorovať nízku mieru extrakcie pigmentov do hexánu. V analyticky významných koncentráciách bol detekovaný iba β -karotén, pričom najvyššiu stabilitu vykazoval pri -40 °C a naopak pri 20 °C zaznamenal rýchly rozklad. Podobný trend je možné pozorovať aj na Graf 29. Spektrofotometricky bolo detekované aj malé množstvo chlorofylu A, tieto výsledky však vykazujú nízku presnosť, zrejme kvôli veľmi nízkej koncentrácii analytu. Účinok extrakcie celkových karotenoidov činil iba 29,1 % v porovnaní s referenčným acetónovým extraktom.

Z Graf 28 je možné vyčítať pomerne dosť účinnú extrakciu lipidov do hexánu (94,3 %). Tiež je možné pozorovať veľmi rýchly pokles ich koncentrácie. Jedná sa pravdepodobne o prvotný rozklad PUFA a MUFA, ktorých percentuálne zastúpenie vo vzorke skladovanej 28 dní pri 8 °C značne klesol.

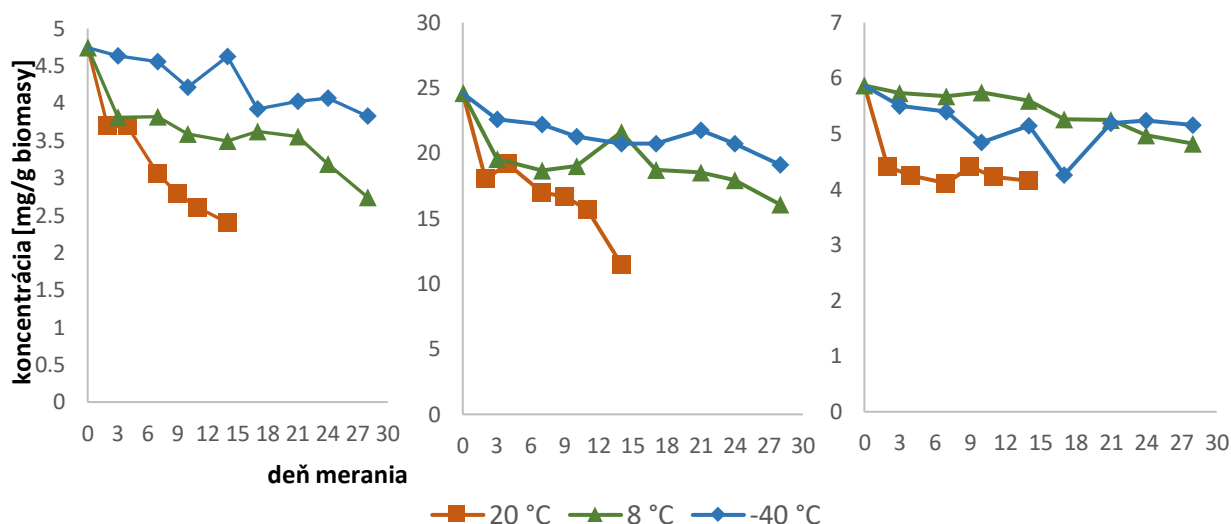
5.2.1.3 Stabilita extraktov kmeňa *Chlorella vulgaris*



Graf 30: Časový vývin koncentrácie pigmentov v etanolvom extrakte kmeňa *Chlorella vulgaris* v porovnaní s referenčnou extrakciou do acetónu (Acetón), stanovené na HPLC



Graf 31: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v etanolvom extrakte pre kmeň *Chlorella vulgaris* v porovnaní s referenčným stanovením (R)

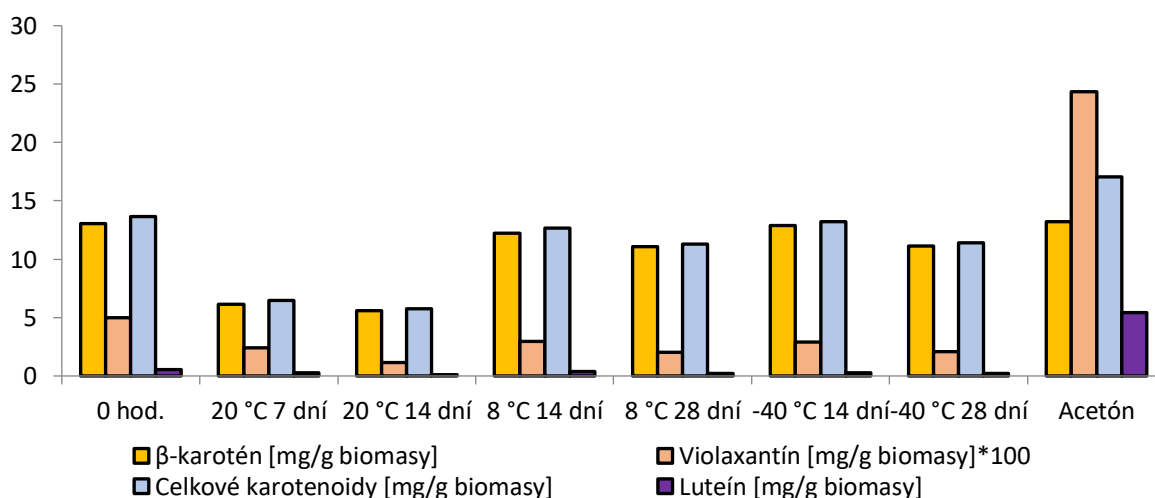


Graf 32: Časový vývin koncentrácie karotenoidov (vľavo), chlorofylu A (v strede) a chlorofylu B (vpravo) stanovená spektrofotometricky v etanолоvom extrakte kmeňa *Chlorella vulgaris*

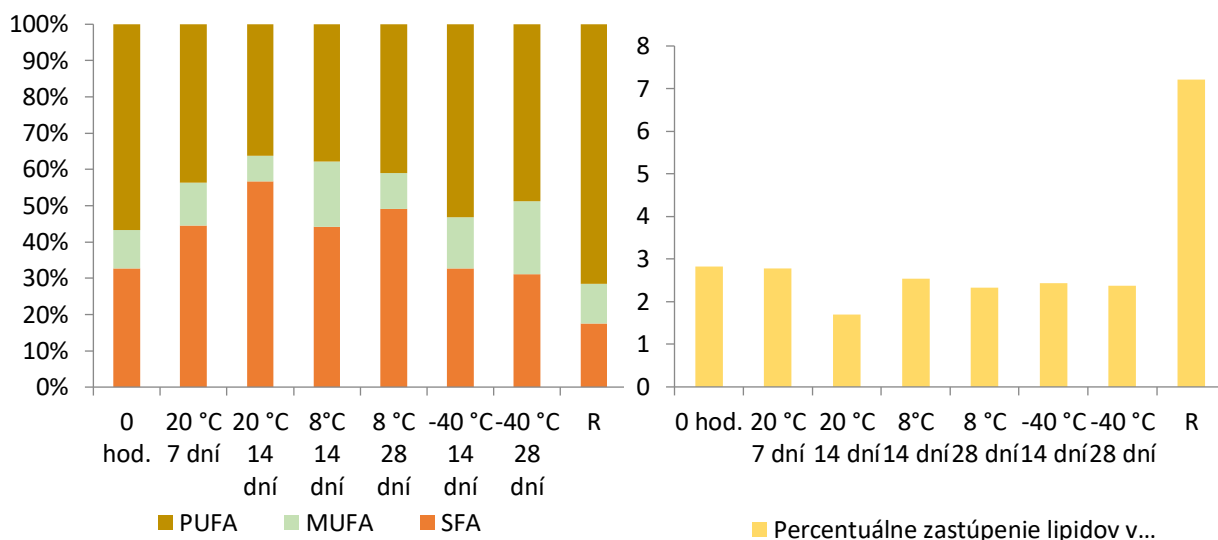
Ako je možné pozorovať na Graf 30, do etanolu sa podarilo vyextrahovať asi 84,6 % celkových karotenoidov v porovnaní s acetónom. Z hľadiska stability karotenoidných pigmentov je opäť najlepšou voľbou teplota -40 °C, pri ktorej sa ich množstvo počas 28 dní zmenšilo iba o 3 %. Pozoruhodnú stabilitu prejavili aj vzorky uskladnené pri 8 °C (89,6 % pôvodnej hodnoty). Podobné tvrdenie sa však nedá prehlásiť o stabilite chlorofylu A a B, ktoré pri teplote 20 °C podliehali rýchlemu rozkladu. Pomerne rýchlemu rozkladu podliehali aj pigmenty neoxantín a violaxantín, ktorých koncentrácia klesla po 28 dňoch pri teplote -40 °C takmer o 50 %.

Ako je možné pozorovať na Graf 32, najvyššia stabilita karotenoidov i chlorofylu A bola zaznamenaná spektrofotometricky pri teplote -40 °C. Chlorofyl B je podľa týchto výsledkov približne rovnako stabilný pri teplote -40 °C ako pri 8 °C, čo poukazuje na nie príliš veľkú spoľahlivosť tejto metódy stanovenia koncentrácie.

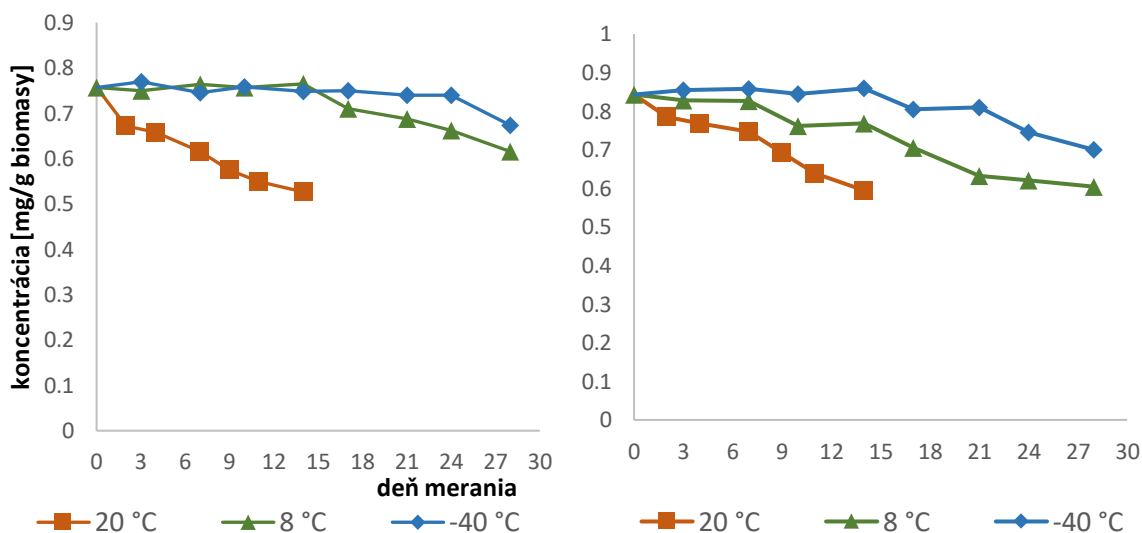
Podľa Graf 31 je možné predpokladať, že lipidy tohto extraktu majú počas prvých dvoch týždňov približne rovnakú stabilitu vzhľadom na testované teploty prostredia. Na grafe je tiež možné pozorovať prvotný pokles koncentrácie lipidov spojený so znížením zastúpenia PUFA, ktoré dosiahli minimálne zastúpenie po 28 dňoch skladovania pri teplote 8 °C. Extrakcia lipidov prebehla v tomto prípade z 75,8 %.



Graf 33: Časový vývin koncentrácie pigmentov v hexánovom extrakte kmeňa *Chlorella vulgaris* v porovnaní s referenčnou extrakciou do acetónu (Acetón), stanovené na HPLC



Graf 34: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v hexánovom extrakte pre kmeň *Chlorella vulgaris* v porovnaní s referenčným stanovením (R)

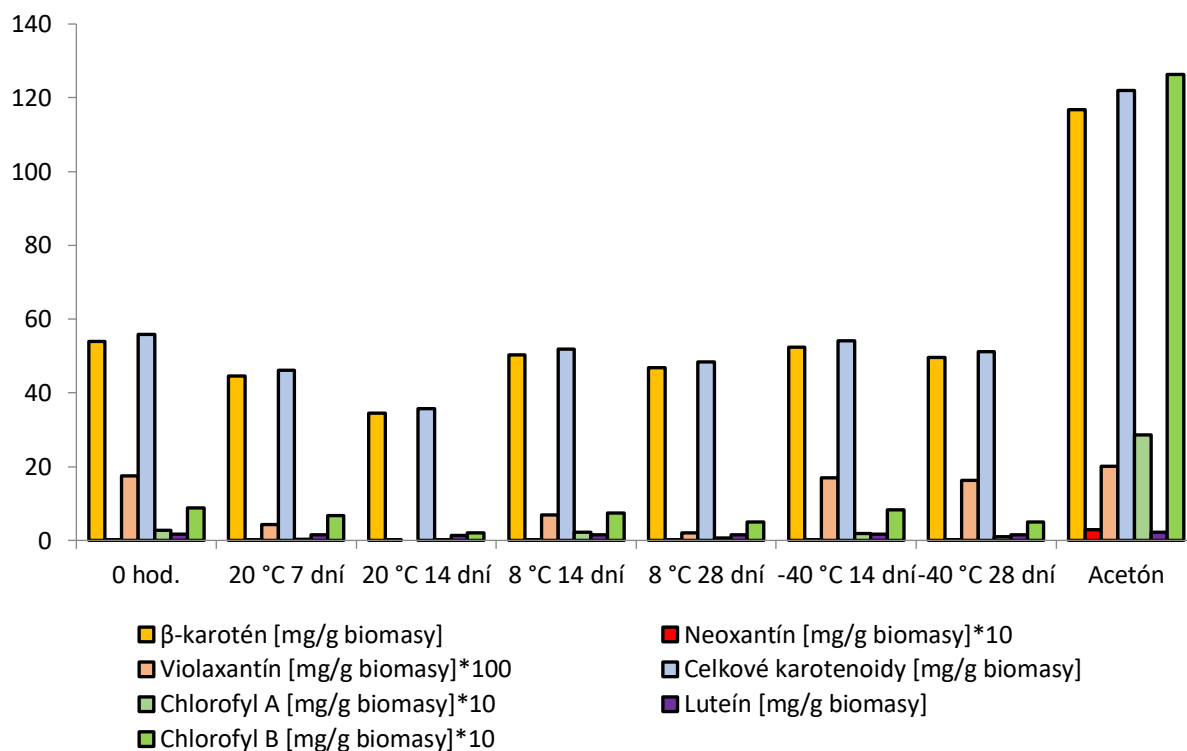


Graf 35: Časový vývin koncentrácie karotenoidov (vľavo), chlorofylu A (vpravo) stanovená spektrofotometricky v hexánovom extrakte kmeňa *Chlorella vulgaris*

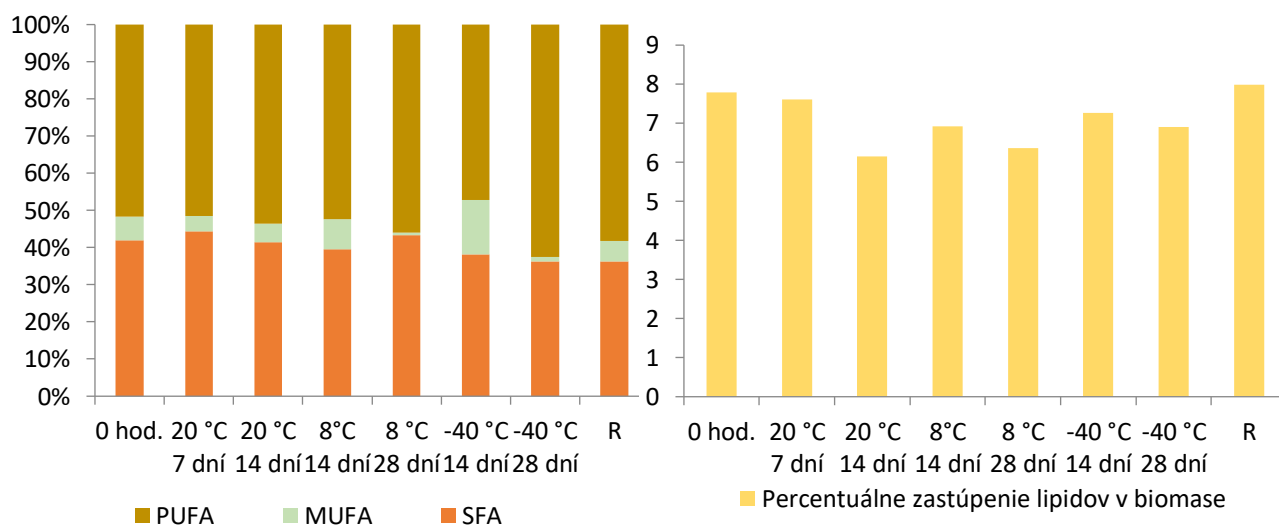
Ako je možné pozorovať v Graf 33, v hexánovom extrakte kmeňa *Chlorella vulgaris* bol detekovaný vo významných koncentráciách beta-karotén, luteín a violaxantín. Extrakčná účinnosť celkových karotenoidov dosiahla hodnotu 80,1 %. Stabilita beta-karoténu pri teplote 8 °C a pri -40 °C vykazuje porovnateľné hodnoty (11,05 mg/g pre 8 °C a 11,14 mg/g pre -40 °C). Podobný trend je možné pozorovať aj v Graf 35, kde sa spektrofotometricky určená koncentrácia karotenoidov javí ako stabilná, avšak iba počas prvých 14 dní merania. Podľa tohto stanovenia sa vo vzorku nachádza aj malé množstvo chlorofylu A, ktorého koncentrácia klesá najmenej pri -40 °C. Pre extrakciu pigmentov z biomasy kmeňa *Chlorella vulgaris* je jednoznačne výhodnejšie použiť etanol.

Z Graf 34 je možné pozorovať pomerne nízku mieru extrakcie lipidov do hexánu, a to iba 39,3 %. V tomto prípade je teda pre extrakciu lipidov výhodnejšie použiť etanol. Vo vzorkách je tiež možné pozorovať zníženie obsahu lipidov, ktoré je spojené so znížením koncentrácie PUFA, ktorá dosiahla minimum (41,7 %) po 28 dňoch pri teplote 8 °C. Z hľadiska stability celkových lipidov sa javí ako prijateľné i skladovanie pri 8 °C, avšak v tomto prípade klesá percentuálne zastúpenie cenných PUFA.

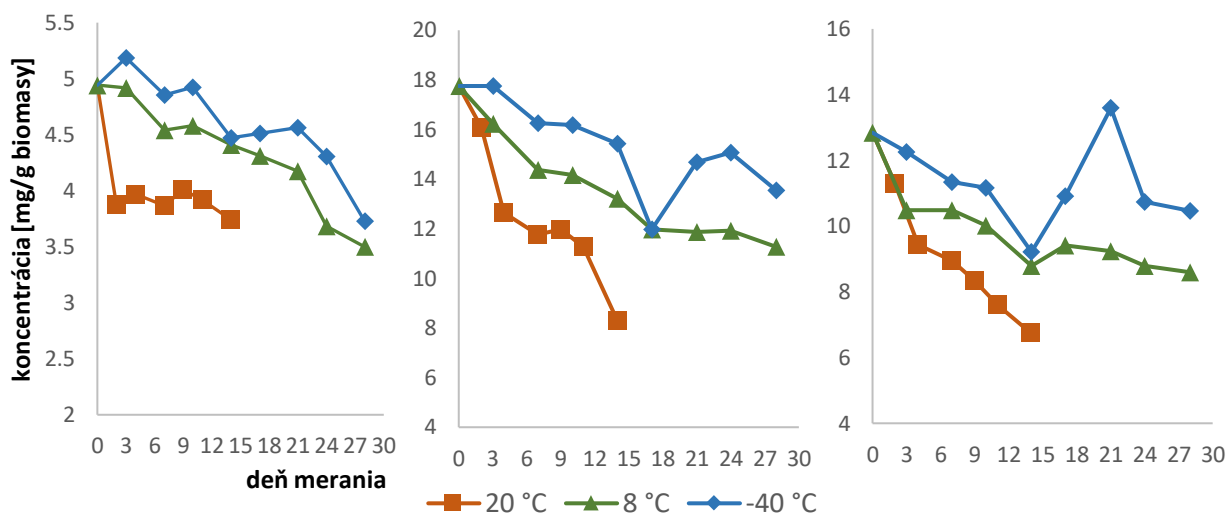
5.2.1.4 Stabilita extraktov kmeňa *Chlamydomonas reinhardtii*



Graf 36: Časový vývin koncentrácie pigmentov v etanolovom extrakte kmeňa *Chlamydomonas reinhardtii* v porovnaní s referenčnou extrakciou do acetónu (Acetón), stanovené na HPLC



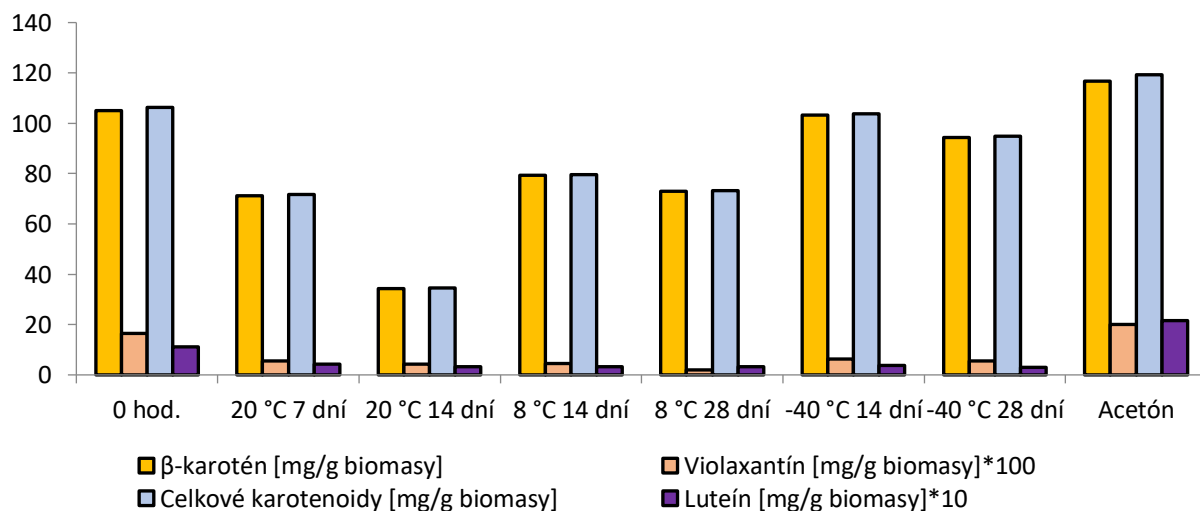
Graf 37: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v etanolovom extrakte pre kmeň *Chlamydomonas reinhardtii* v porovnaní s referenčným stanovením (R)



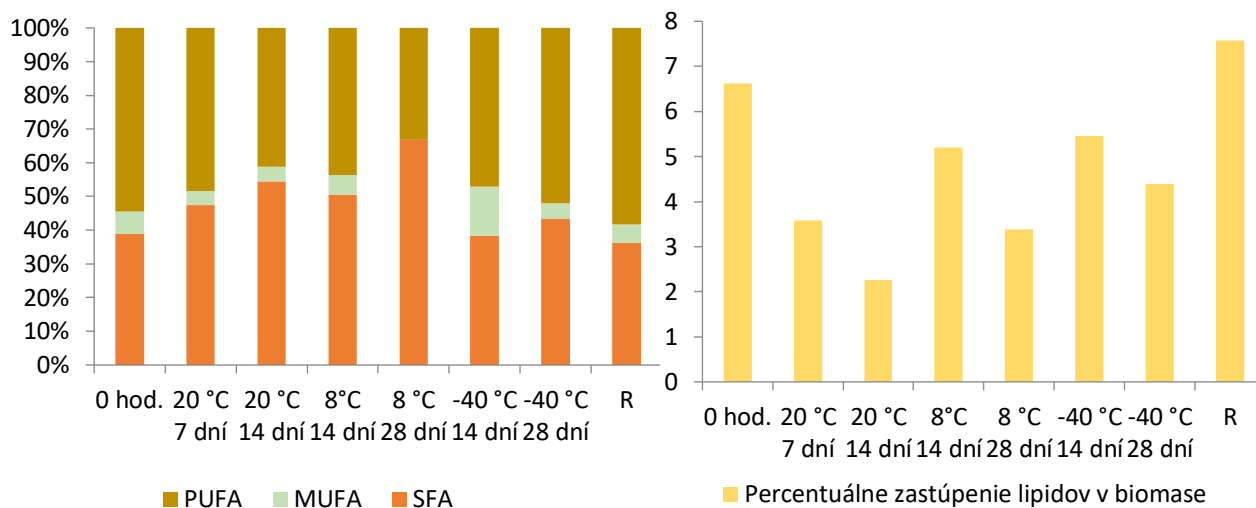
Graf 38: Časový vývin koncentrácie karotenoidov (vľavo), chlorofylu A (v strede) a chlorofylu B (vpravo) stanovená spektrofotometricky v etanolvom extrakte kmeňa *Chlamydomonas reinhardtii*

Z Graf 36 je možné vyčítať nízku extrakčnú účinnosť (iba 45,7 % celkových karotenoidov) a zároveň vysoké produkčné vlastnosti tohto kmeňa. Tento extrakt tiež vykazuje, v porovnaní s acetónovým, veľmi nízke koncentrácie chlorofylu A, chlorofylu B a neoxantínu. Opačný trend vykazujú pigmenty luteín (76 % v porovnaní s acetónom) a violaxantín (87,3 % v porovnaní s acetónom). Čo sa týka stability pigmentov, celkové karotenoidy sa zdajú byť pomerne stabilné za uskladnenia pri teplote -40 °C (pokles o 9%) a aj pri teplote 8 °C (pokles o 14 %). Obzvlášť nestabilný za uskladnenia pri inej teplote ako -40 °C sa však javí byť violaxantín, ktorého koncentrácia po 28 dňoch pri 8 °C klesla na 11 % pôvodnej hodnoty. Graf 38 taktiež indikuje najvyššiu stabilitu všetkých pigmentov za uskladnenia pri -40 °C.

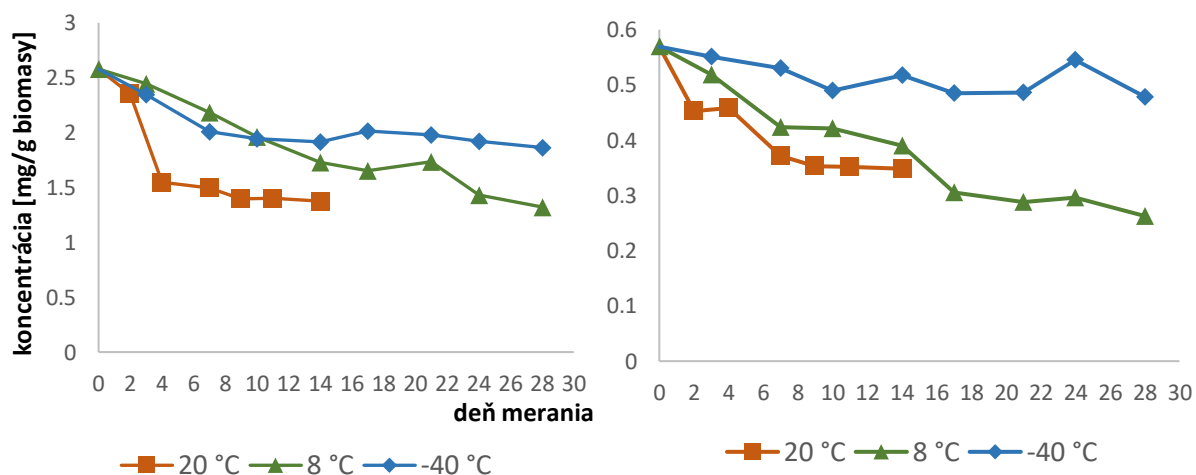
Na Graf 37 je možné pozorovať veľmi vysokú účinnosť extrakcie lipidov, ktorá dosiahla až 97,6 %. Ďalej je možné pozorovať pomerne dobrú stabilitu lipidov v extrakte pri všetkých teplotách uskladnenia, okrem 20 °C. Pokles koncentrácie lipidov po 28 dňoch merania bol pravdepodobne spôsobený rozkladom MUFA, ktorých zastúpenie kleslo na veľmi nízke hodnoty.



Graf 39: Časový vývin koncentrácie pigmentov v hexánovom extrakte kmeňa *Chlamydomonas reinhardtii* v porovnaní s referenčnou extrakciou do acetónu (Acetón), stanovené na HPLC



Graf 40: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v hexánovom extrakte pre kmeň *Chlamydomonas reinhardtii* v porovnaní s referenčným stanovením (R)

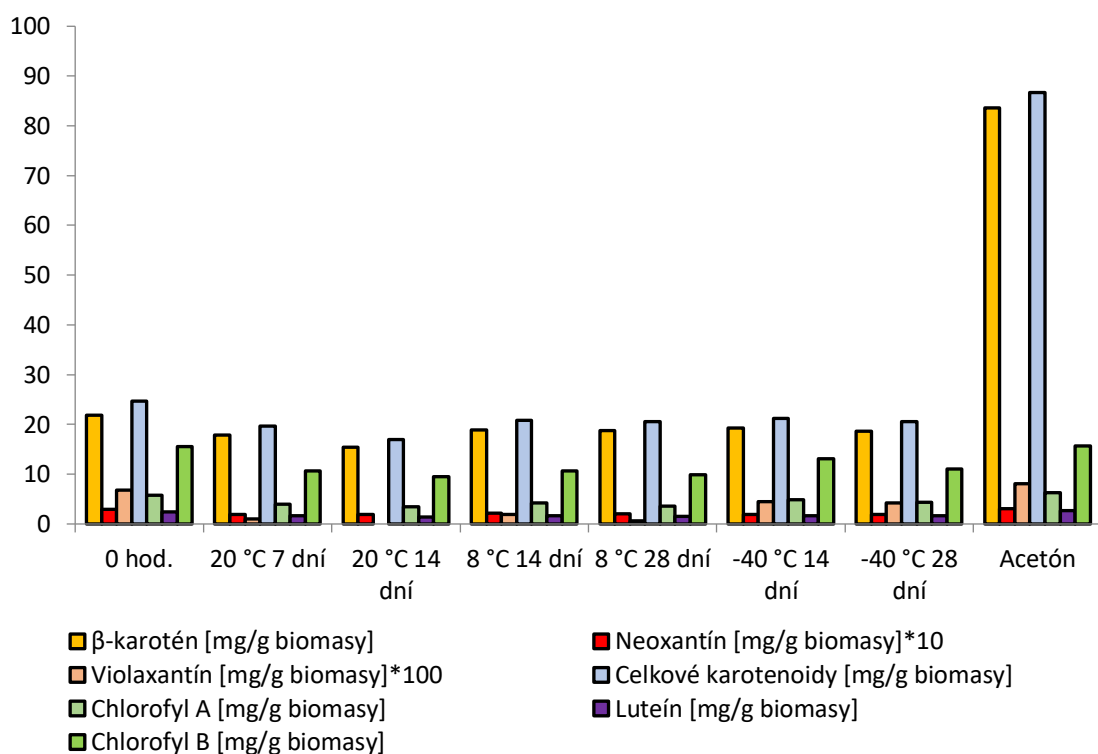


Graf 41: Časový vývin koncentrácie karotenoidov (vľavo), chlorofylu A (vpravo) stanovená spektrofotometricky v hexánovom extrakte kmeňa *Chlamydomonas reinhardtii*

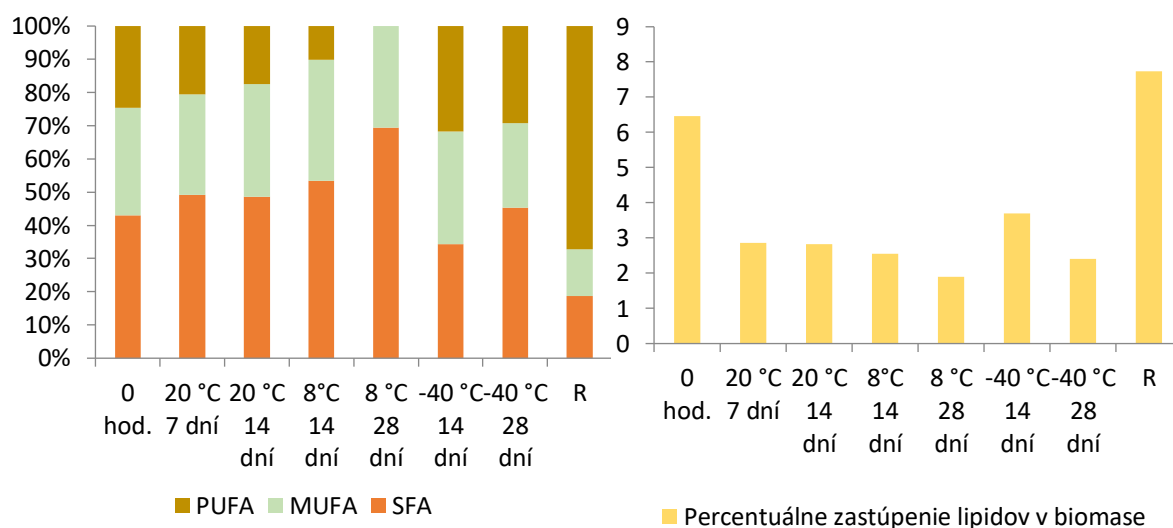
Ako je možné pozorovať na Graf 39, hexán je pre extrakciu pigmentov z tohto vzorku biomasy skutočne optimálnym rozpúšťadlom. Miera extrakcie celkových karotenoidov dosiahla až 89,1 %, čo činí takmer dvojnásobok hodnoty dosiahnutej pri použití etanolu. Treba však brať do úvahy veľmi zlé extrakčné vlastnosti hexánu pre neoxantín a chlorofyl A a B, ktoré v tomto extrakte neboli detekované vo významných koncentráciách. Pre tento extrakt je jednoznačne najvhodnejším uskladnením -40 °C, pri ktorom dochádza k najmenšiemu rozkladu pigmentov, tento trend je možné pozorovať aj v Graf 41.

Na prvý pohľad sa podľa Graf 40 sa hexán javí ako pomerne dobré rozpúšťadlo pre extrakciu lipidov pre tento kmeň, s výťažkom 87,3 %. Treba však brať do úvahy mimoriadne účinnú extrakciu lipidov do etanolu (97,6 %). Je tiež možné pozorovať podobný trend ako pri etanolvom extrakte, kedy je s poklesom lipidov spojený aj pokles koncentrácie MUFA.

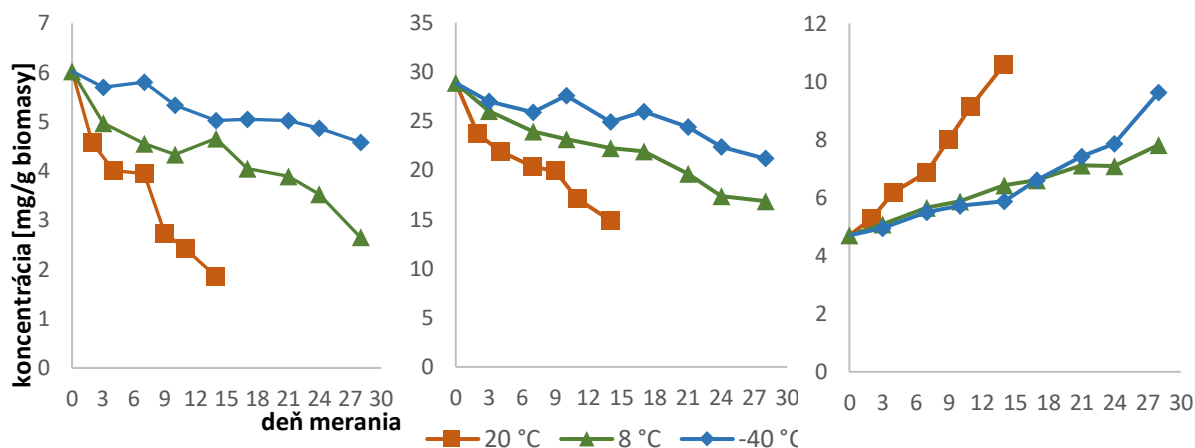
5.2.1.5 Stabilita extraktov kmeňa *Scenedesmus obliquus*



Graf 42: Časový vývin koncentrácie pigmentov v etanolvom extrakte kmeňa *Scenedesmus obliquus* v porovnaní s referenčnou extrakciou do acetónu (Acetón), stanovené na HPLC



Graf 43: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v etanolvom extrakte pre kmeň *Scenedesmus obliquus* v porovnaní s referenčným stanovením (R)

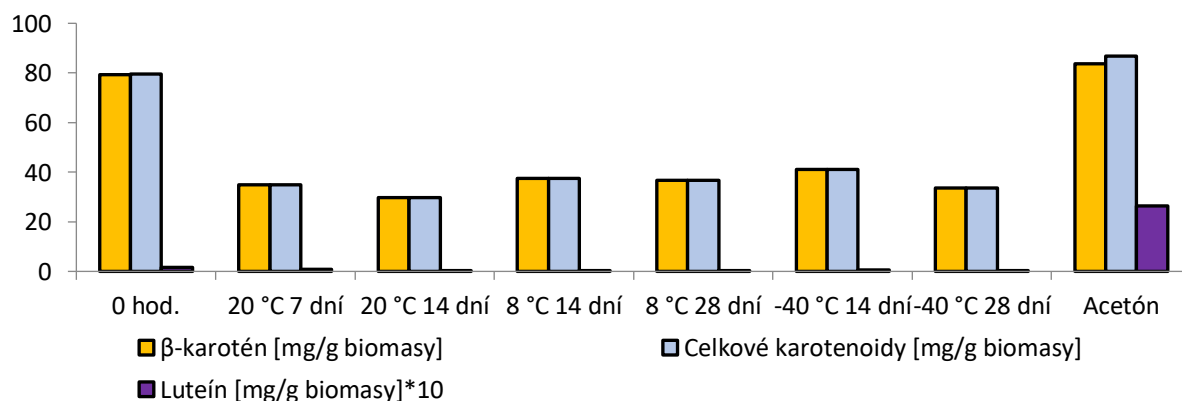


Graf 44: Časový vývin koncentrácie karotenoidov (vľavo), chlorofylu A (v strede) a chlorofylu B (vpravo) stanovená spektrofotometricky v etanolevom extrakte kmeňa *Scenedesmus obliquus*

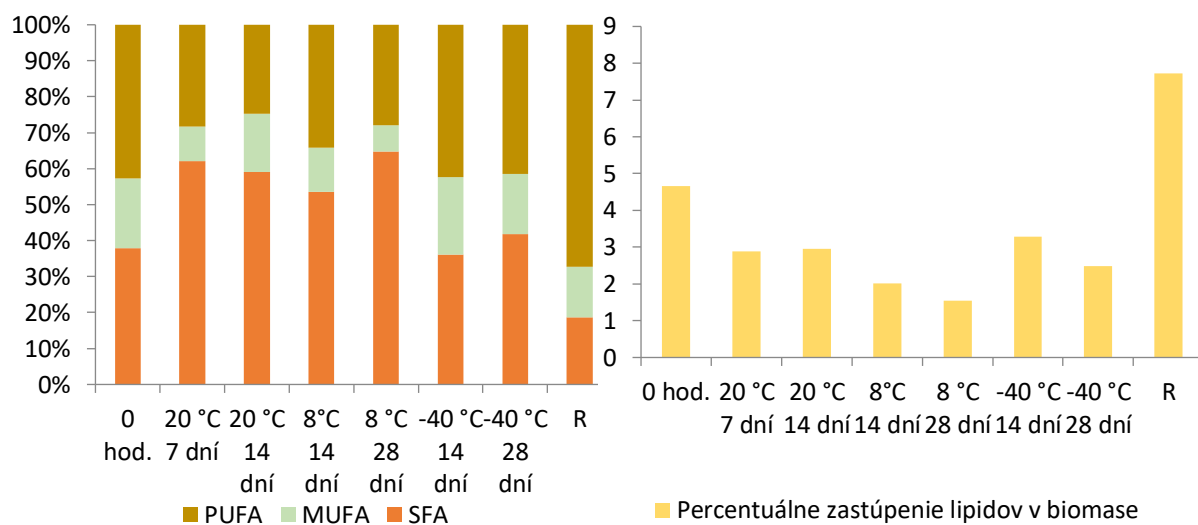
Z Graf 42: Časový vývin koncentrácie pigmentov v etanolevom extrakte kmeňa *Scenedesmus obliquus* v porovnaní s referenčnou extrakciou do acetónu (Acetón), stanovené na HPLC je možné vyčítať niekoľko údajov. V prvom rade je si vhodné všimnúť veľmi nízku extrakčnú účinnosť, do etanolu bolo vyextrahovaných iba 28,4 % celkových karotenoidov zo vzorku. Pigment violaxantín sa opäť prejavil ako veľmi nestabilný za skladovania pri 20 °C i 8 °C. Pigment neoxantín naopak preukázal mierne vyššiu stabilitu za skladovania pri 8 °C ako pri -40 °C. Čo sa týka ostatných karotenoidov a chlorofylov, tie preukázali najvyššiu stabilitu pri teplote -40 °C, avšak väčšina z nich sa preukázala byť pomerne stabilnými i pri teplote 8 °C. Ako príklad je vhodné uviesť chlorofyl B, ktorého koncentrácia poklesla za 28 dní o 28,9 % pri -40 °C a o 35,7 % pri 8 °C.

Z **Error! Reference source not found.** Graf 44 je tiež zrejmé, že najvyššiu stabilitu preukázali pigmenty pri teplote -40 °C. Za povšimnutie však stojí, že vývin koncentrácie karotenoidov v tomto grafe nekorešponduje s reálnymi hodnotami stanovenými na HPLC. Spektrofotometrická metóda totižto poukazuje na značný rozdiel koncentrácie karotenoidov medzi vzorkami uskladnenými pri 8 °C (2,65 mg/g) a pri -40 °C (4,58 mg/g), zatiaľ čo výsledky merania z Graf 42 poukazujú iba na minimálne rozdiely. Ďalej je vhodné spomenúť obrátený vývin hodnôt spektrofotometricky stanovenej koncentrácie chlorofylu B, čo mohlo byť spôsobené vznikom určitých rozkladných produktov ktoré mohli interferovať s odozvou analytov.

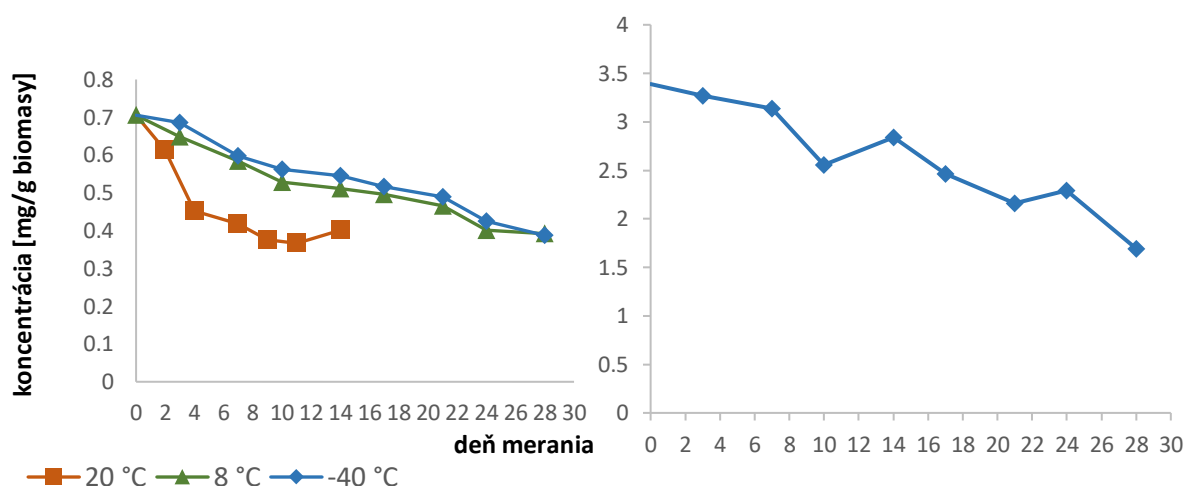
Z Graf 43 je možné vyčítať pomerne dobrú extrakčnú účinnosť lipidov zo vzorku pri použití etanolu (83,6 %). Ďalej je možné pozorovať vysokú nestabilitu lipidov v tomto vzorku a nízke množstvo vyextrahovaných PUFA. Etanol sa teda nezdá byť vhodným rozpúšťadlom pre ich extrakciu.



Graf 45: Časový vývin koncentrácie pigmentov v hexánovom extrakte kmeňa *Scenedesmus obliquus* v porovnaní s referenčnou extrakciou do acetónu (Acetón), stanovené na HPLC



Graf 46: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v hexánovom extrakte pre kmeň *Scenedesmus obliquus* v porovnaní s referenčným stanovením (R)

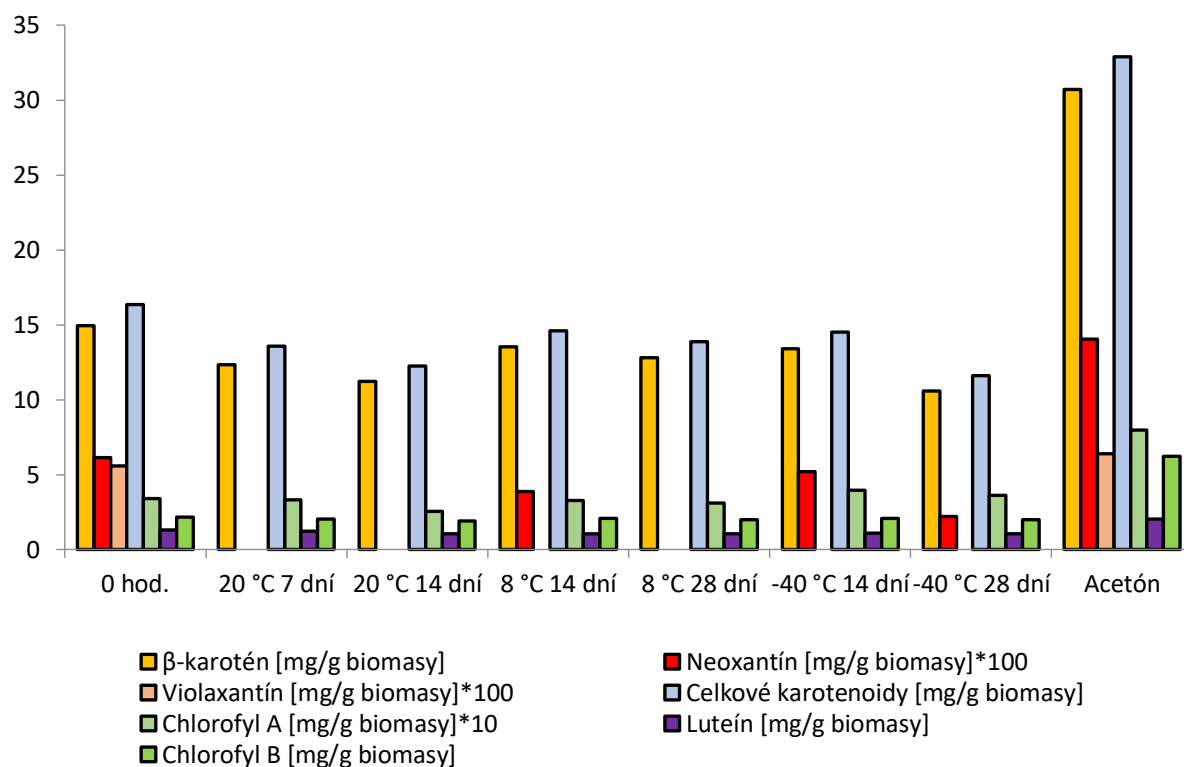


Graf 47: : Časový vývin koncentrácie karotenoidov (vľavo), chlorofylu A (vpravo) stanovená spektrofotometricky v hexánovom extrakte kmeňa *Scenedesmus obliquus*

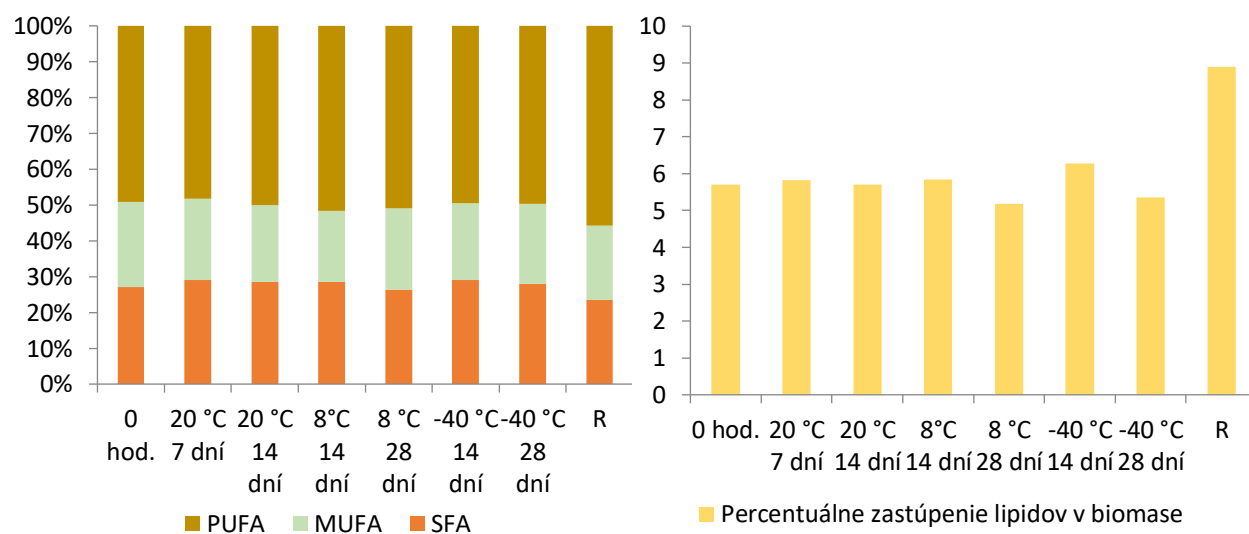
Na Graf 45 je možné si všimnúť vysokú extrakčnú účinnosť za použitia hexánu, ktorá dosiahla až 91,8 % pre celkové karotenoidy. Do hexánu sa však nepodarilo vo významných koncentráciách vyextrahovať iné pigmenty okrem beta-karoténu a luteínu. Koncentrácia luteínu dosiahla iba 6 % referenčného stanovenia. Pre zachovanie čo najvyššieho množstva pigmentov sa pre tento extrakt javí ako optimálna teplota 8 °C. Podobný trend je možné pozorovať aj na Graf 47.

Ako je možné vidieť v Graf 46, hexán sa javí ako menej vhodné rozpúšťadlo pre extrakciu lipidov, kedy dosiahnutý výťažok tvoril 60,4 %. Vyššiu hodnotu dosiahlo však zastúpenie PUFA, ktorých zastúpenie činilo až 42,7 %. Absolútne nevhodnou metódou uskladnenia sa javí teplota 8 °C, pri tejto teplote klesla koncentrácia lipidov po 2 týždňoch ešte intenzívnejšie ako pri 20 °C.

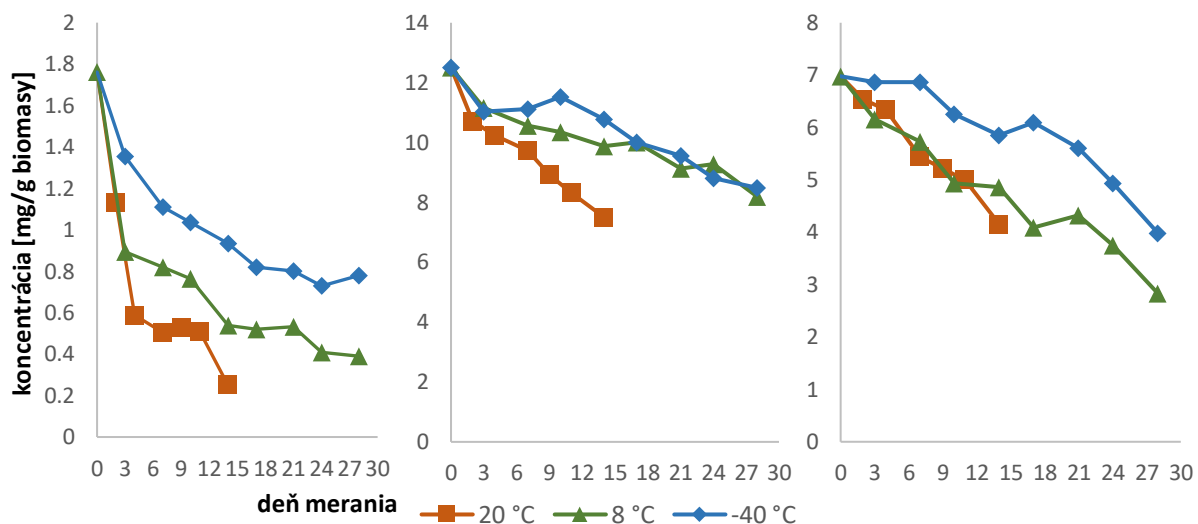
5.2.1.6 Stabilita extraktov kmeňa *Scenedesmus dimorphus*



Graf 48: Časový vývin koncentrácie pigmentov v etanolvom extrakte kmeňa *Scenedesmus dimorphus* v porovnaní s referenčnou extrakciou do acetónu (Acetón), stanovené na HPLC



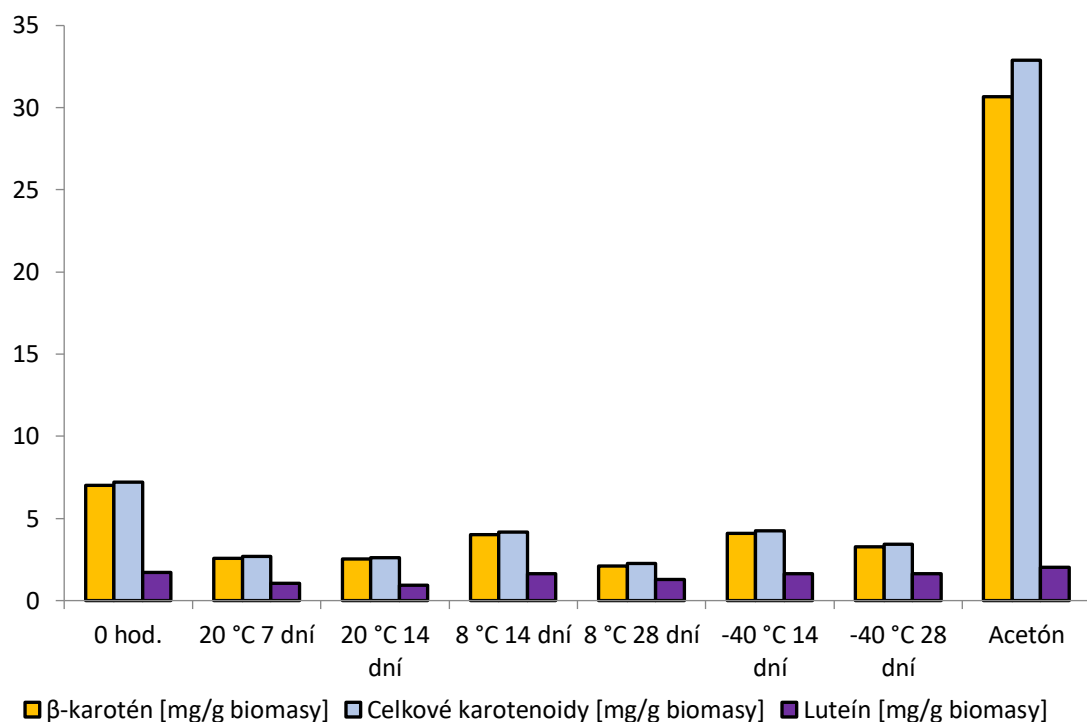
Graf 49: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v etanolvom extrakte pre kmeň *Scenedesmus dimorphus* v porovnaní s referenčným stanovením (R)



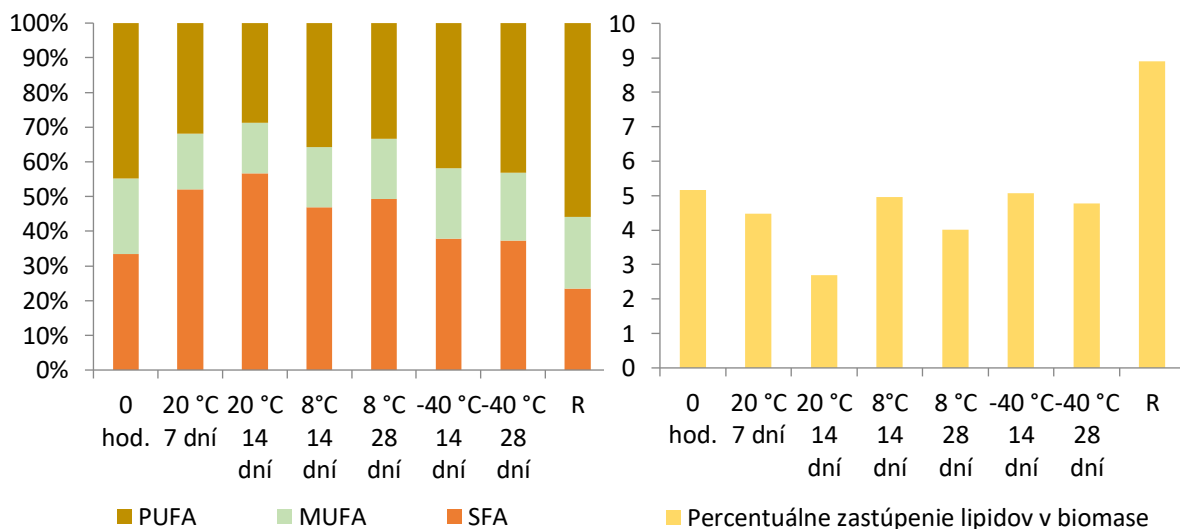
Graf 50: Časový vývin koncentrácie karotenoidov (vľavo), chlorofylu A (v strede) a chlorofylu B (vpravo) stanovená spektrofotometricky v etanолоvom extrakte kmeňa *Scenedesmus dimorphus*

Z Graf 48 je možné odpozorovať, že extrakcia karotenoidov pigmentov prebehla s výťažkom 49,7 %. Stabilita celkových karotenoidov i beta-karoténu sa preukázala byť najvyššou za skladovania pri 8 °C. Koncentrácia karotenoidov klesla za 28 dní pri teplote 8 °C o 15,4 %, zatiaľ čo pri -40 °C klesla až o 29 %. Vo vzorku bol stanovený aj pigment violaxantín, ktorý však podliehal rýchlemu rozkladu. Rýchlemu rozkladu podliehal aj pigment neoxantín, ktorý sa však podarilo zachovať v malom množstve pri teplote -40 °C. Koncentrácia chlorofylu B a luteínu dosiahla na konci analýzy podobné hodnoty pri teplote -40 °C i pri 8 °C. Dá sa teda predpokladať, že Graf 50 necharakterizuje priebeh rozkladu karotenoidov a chlorofylu B správne. Spektrofotometricky určená koncentrácia týchto analytov totižto dosiahla po 28 dňoch výrazne nižšie hodnoty za skladovania pri 8 °C ako za skladovania pri -40 °C.

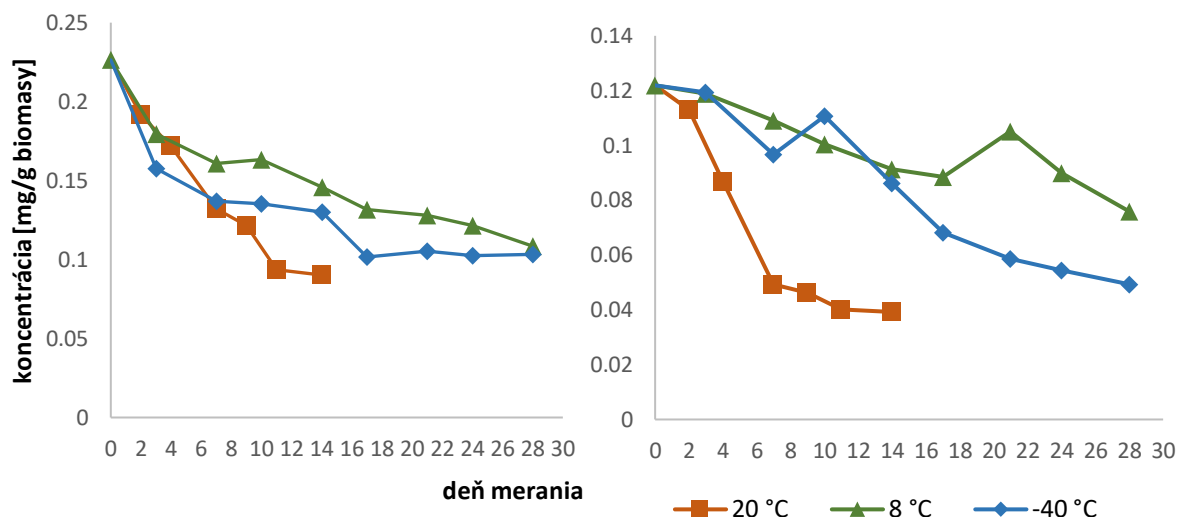
Na Graf 49 je možné pozorovať, že koncentrácia lipidov i zloženie mastných kyselín sa menilo v priebehu experimentu len veľmi málo. Koncentrácia lipidov dosiahla 64,1 % výťažku referenčného stanovenia.



Graf 51: Časový vývin koncentrácie pigmentov v hexánovom extrakte kmeňa *Scenedesmus dimorphus* v porovnaní s referenčnou extrakciou do acetónu (Acetón), stanovené na HPLC



Graf 52: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v hexánovom extrakte pre kmeň *Scenedesmus dimorphus* v porovnaní s referenčným stanovením (R)



Graf 53: Časový vývin koncentrácie karotenoidov (vľavo), chlorofylu A (vpravo) stanovená spektrofotometricky v hexánovom extrakte kmeňa *Scenedesmus dimorphus*

Ako je možné si všimnúť na Graf 51, výťažok extrakcie do hexánu dosahuje pre tento kmeň veľmi nízkych hodnôt. Zo vzorku sa podarilo vyextrahovať iba 21,9 % celkových karotenoidov a medzi úspešne stanovené karotenoidy patria iba beta-karotén a luteín. Oba tieto pigmenty sa prejavili ako najstabilnejšie za skladovania pri -40 °C, čo potvrdzuje aj Graf 53. Pomocou spektrofotometra sa podarilo určiť aj malé koncentrácie chlorofylu A, čo však môže byť spôsobené interferenciou iných analytov.

Z Graf 52 je možné stanoviť výťažok extrakcie celkových lipidov, ktorý bol 58 %. Do hexánu sa z tohto vzorku biomasy podarilo vyextrahovať mierne nižšie množstvo lipidov ako z etanolu. V tomto extrakte, v zrovnaní s etanolovým, sa tiež mení zastúpenie mastných kyselín, ktoré je charakteristické poklesom zastúpenia PUFA. Zastúpenie PUFA a značne nemení iba za skladovania pri -40 °C.

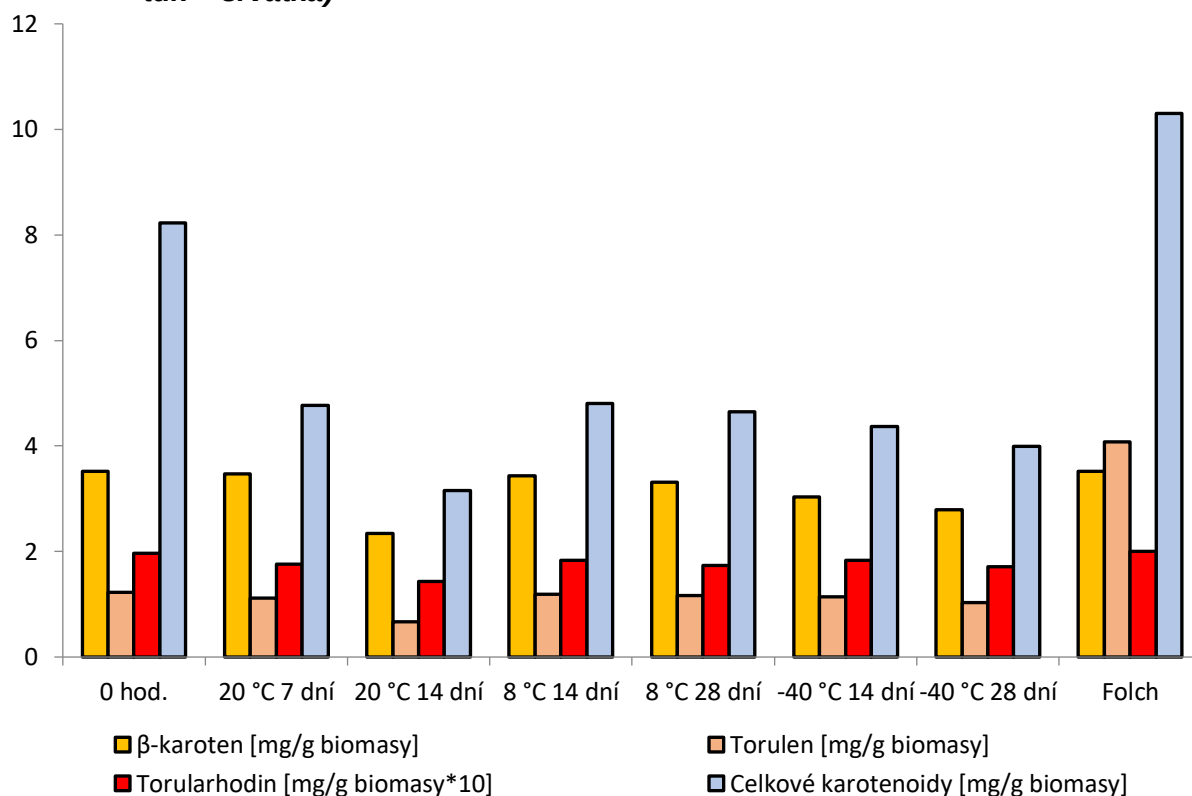
5.2.1.7 Zhrnutie priebehu krátkodobých stabilitných experimentov rias

Z výsledkov krátkodobých testov stability extraktov vybraných kmeňov rias je možné určiť najvhodnejšie rozpúšťadlo pre extrakciu pigmentov. Pre kmene *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus quadricauda*, *Scenedesmus dimorphus* je to jednoznačne etanol. Kmene *Scenedesmus obliquus* a *Chlamydomonas reinhardtii* preukázali naopak najväčšie výťažky pigmentov pri extrakcii do hexánu. Kmeň *Chlorella vulgaris* dosiahol porovnateľné hodnoty výťažkov pigmentov pri použití etanolu i hexánu. Stabilita pigmentov sa v drvivej väčšine vzoriek javí byť najvyššou pri teplote -40 °C, a to v hexánových i etanolových extraktoch. Extrakty, ktoré vykázali porovnateľnú stabilitu pigmentov i pri teplote 8 °C, sú etanolové extrakty kmeňov *Scenedesmus dimorphus* a hexánové extrakty kmeňov *Desmodesmus acutus* a *Scenedesmus obliquus*.

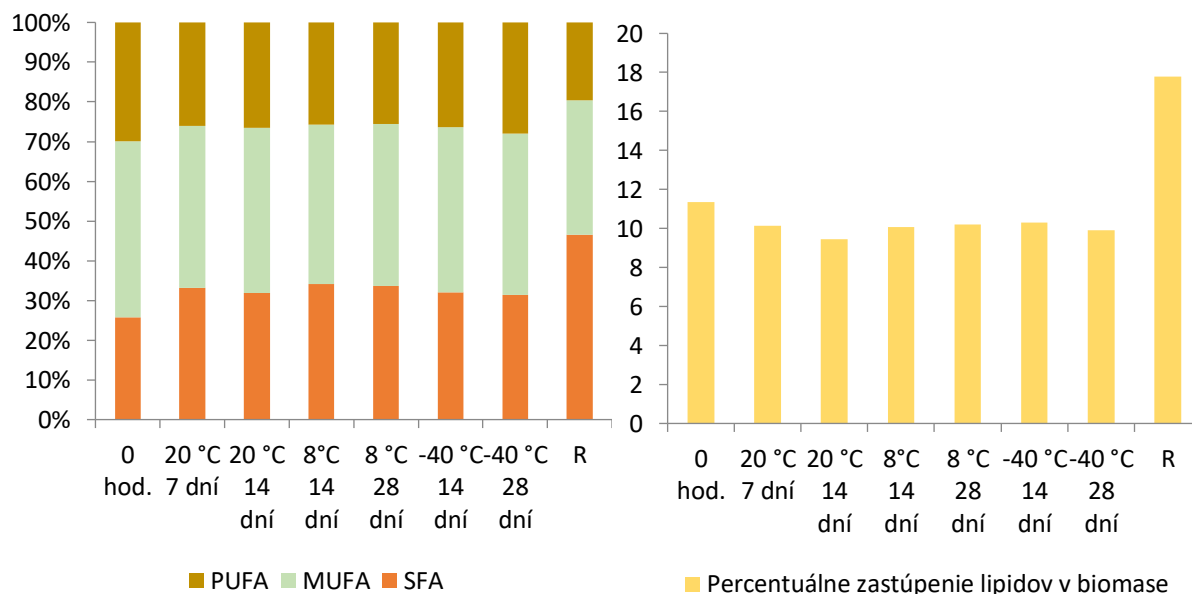
Extrakcia lipidov do hexánu dosiahla vyššiu účinnosť extrakcie než do etanolu iba v prípade kmeňa *Desmodesmus quadricauda* a *Desmodesmus acutus*. Etanol sa prejavil ako jednoznačne účinnejšie extrahovadlo lipidov z biomasy pre kmene *Scenedesmus obliquus* a *Chlorella vulgaris*. Väčšina etanolových extraktov prejavila porovnateľne dobrú stabilitu lipidov v extrakte pri teplotách -40 °C a 8 °C, výnimkou sú extrakty kmeňov *Scenedesmus dimorphus* a *Desmodesmus acutus*. Čo sa týka stability lipidov v hexánových extraktoch, optimálnou teplotou skladovania je pre väčšinu kmeňov -40 °C, výnimkou je len extrakt kmeňa *Chlorella vulgaris*.

5.2.2 Krátkodobé stabilitné testy biomasy kvasiniek kultivovaných vo fermentoroch

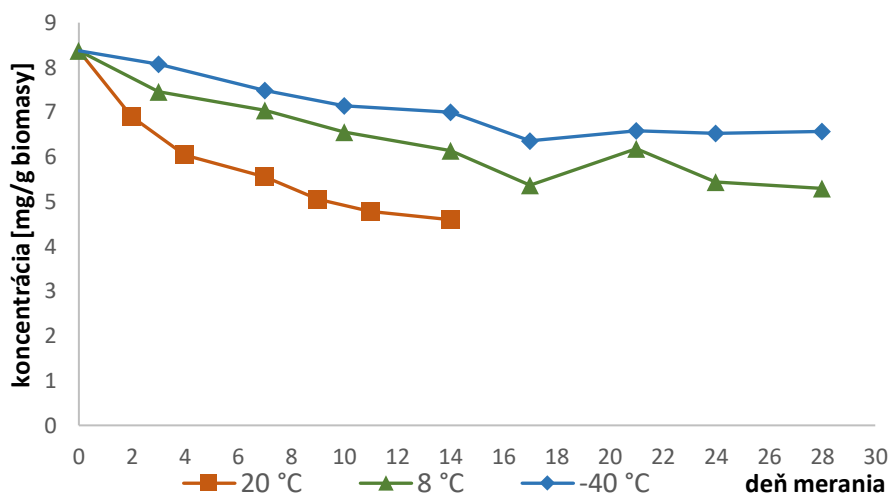
5.2.2.1 Stabilita extraktov kmeňa *Rhodosporidium toruloides* (C/N 25; médium tuk + srvátka)



Graf 54: Časový vývin koncentrácie pigmentov v etanolovom extrakte kmeňa *Rhodospiridium toruloides* v porovnaní s referenčnou extrakciou (Folch), stanovené na HPLC



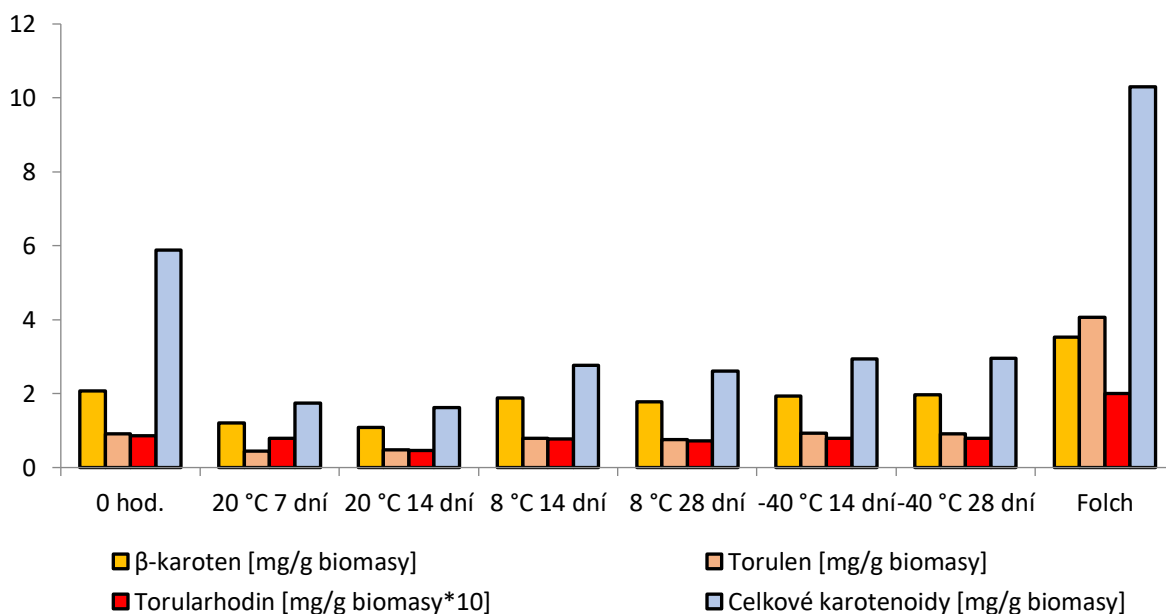
Graf 55: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v etanolovom extrakte pre kmeň *Rhodospiridium toruloides* v porovnaní s referenčným stanovením (R)



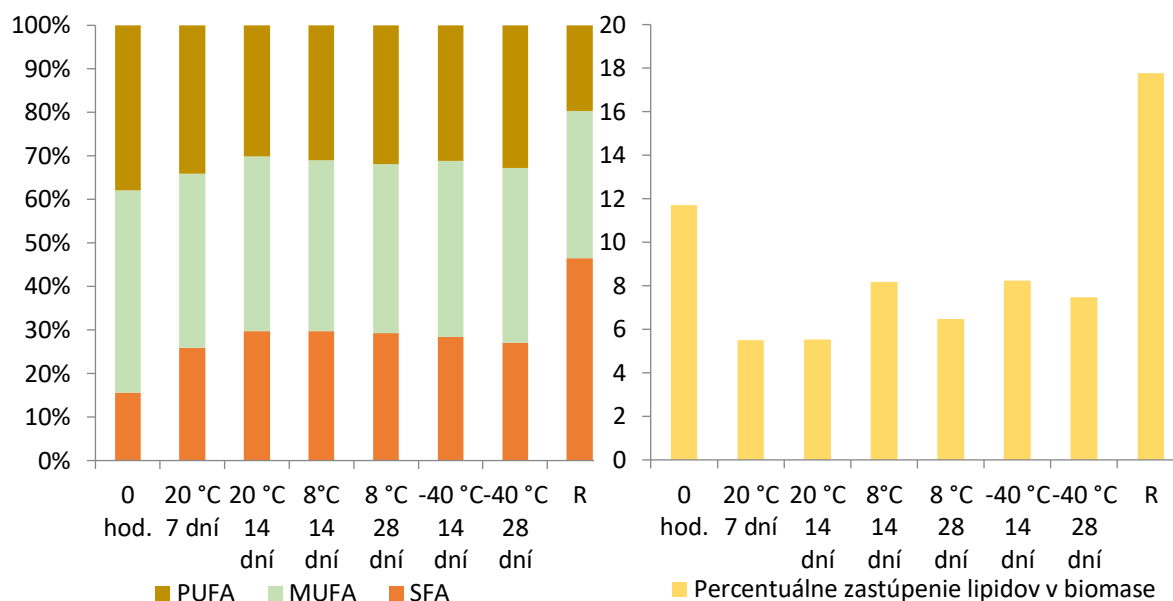
Graf 56: Časový vývin koncentrácie karotenoidov stanovená spektrofotometricky v etanolovom extrakte kmeňa *Rhodosporidium toruloides*

Z Graf 54 je možné určiť výťažok celkových karotenoidov, ten činil 79,9 %. V tomto extrakte je vhodné si povšimnúť pomerne vysokú stabilitu karotenoidov pri teplote 8 °C, ktorú prejavil beta-karotén i torulén. Koncentrácia torularhodínu nadobudla po 28 dňoch približne rovnaké hodnoty pri -40 °C i pri 8 °C. Tiež je vhodné si povšimnúť nízku extrakčnú účinnosť pre torulén (30,9 %). Údaje získané spektrofotometrickým meraním znázornené v Graf 56 úplne nekorešponujú s výstupom z HPLC merania, čo môže byť spôsobené prítomnosťou rozkladných produktov, ktoré neboli identifikované na HPLC a mohli interferovať so spektrofotometrickým meraním. Koncentrácia celkových karotenoidov určená oboma metódami v nulte hodine sa však približne zhoduje (8,225 mg/g biomasy pre HPLC a 8,37 mg/g pre spektrofotometriu).

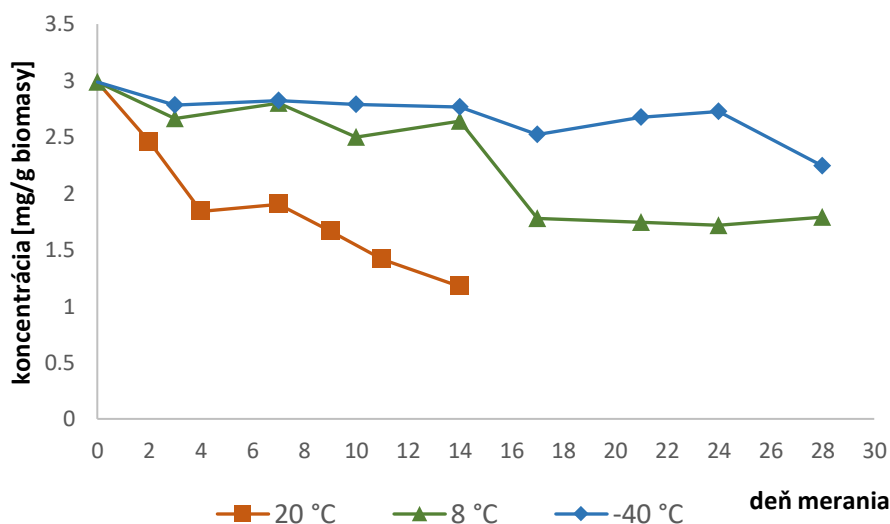
Podľa Graf 55 je možné prehlásiť, že extrakcia lipidov prebehla z 63,7 %. I v prípade lipidov sa javí ako vhodnejšia teplota skladovania 8 °C, avšak medzi ňou a medzi teplotou -40 °C je iba malý rozdiel. PUFA a MUFA sa v tomto vzorku javia ako pomerne stabilné a ich extrakcia v pomere ku SFA prebehla s vyššou účinnosťou.



Graf 57: Časový vývin koncentrácie pigmentov v hexánovom extrakte kmeňa *Rhodosporidium toruloides* v porovnaní s referenčnou extrakciou (Folch), stanovené na HPLC



Graf 58: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v hexánovom extrakte pre kmeň *Rhodosporidium toruloides* v porovnaní s referenčným stanovením (R)

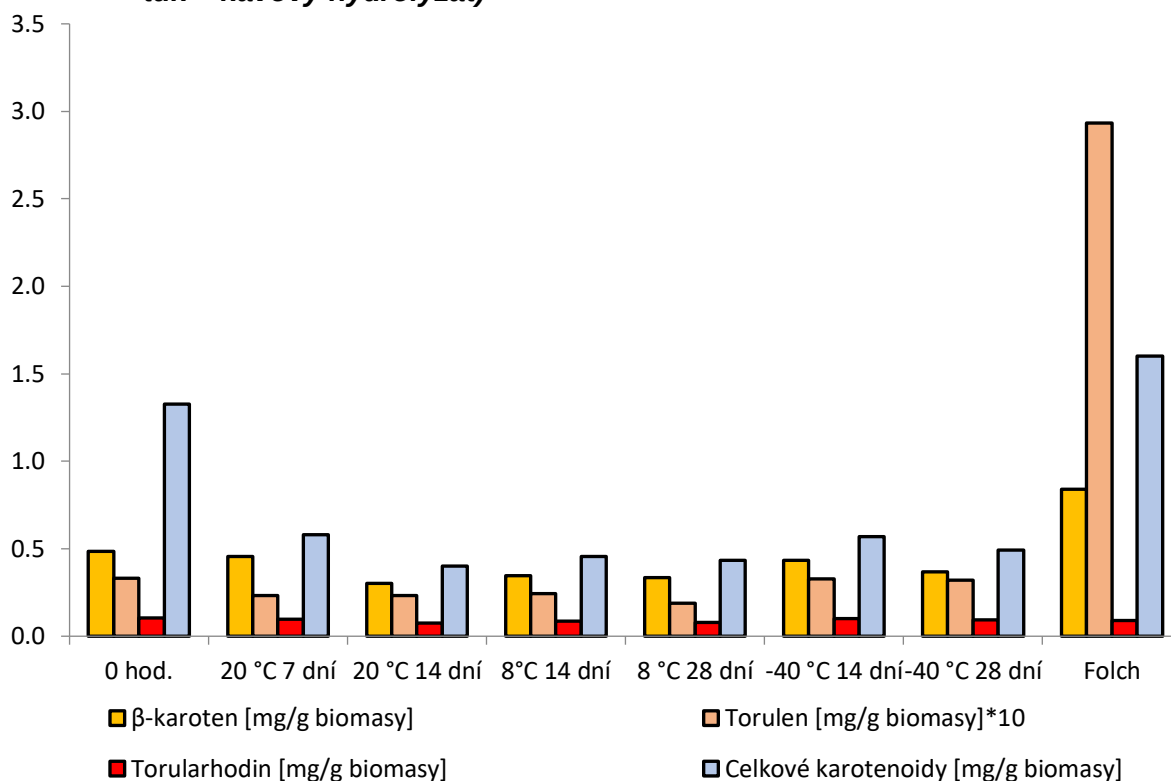


Graf 59: Časový vývin koncentrácie karotenoidov stanovená spektrofotometricky v hexánovom extrakte kmeňa *Rhodosporidium toruloides*

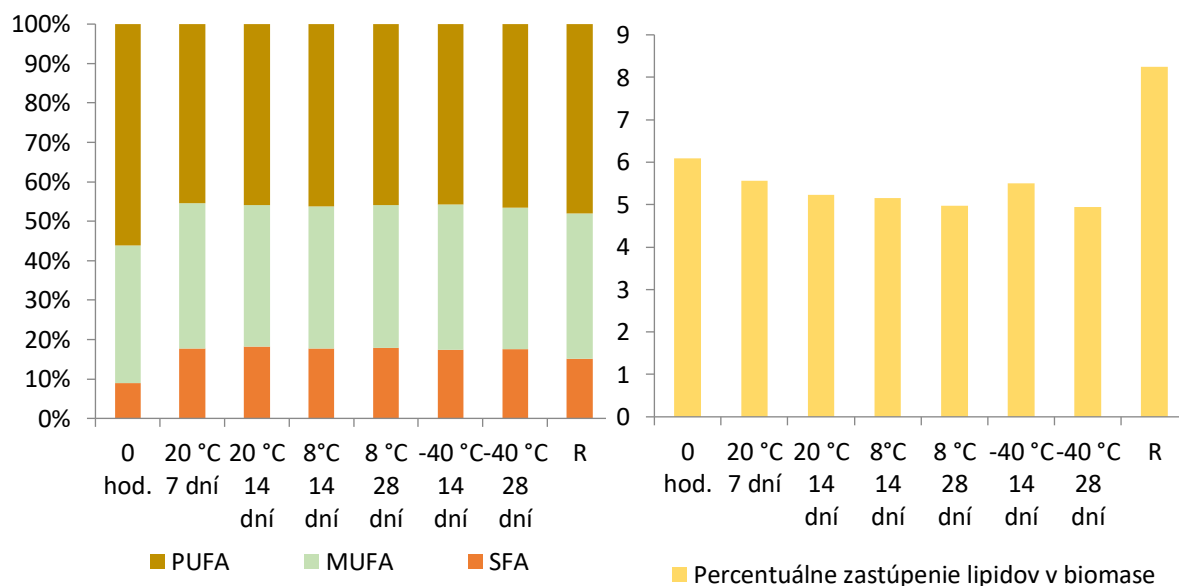
Podľa Graf 57 dosiahla táto extrakcia výťažok 57,1 % celkových karotenoidov. Ako optimálne sa pre všetky stanovené metabolity javí uskladnenie pri -40 °C. Podobne ako pri etanolovom extrakte, aj v hexánovom bol zaznamenaný veľmi nízky výťažok pre torulén, a to iba 22,3 % referenčne určenej koncentrácie. Graf 59 správne poukazuje na vyššiu stabilitu karotenoidov pri teplote -40 °C, avšak nesprávne odhaduje koncentráciu celkových karotenoidov vo vzorku.

Z výstupu z merania na GC znázorneného na Graf 58 sa dá prehlásiť že hexán je pre extrakciu lipidov mierne vhodnejším rozpúšťadlom, s výťažkom 65,9 %. Celkové lipidy v tomto prípade podliehali rýchlemu rozkladu, a to i pri teplote -40 °C. PUFA a MUFA sa vzhľadom k SFA javia ako pomerne stabilné i za teploty 8 °C. Tiež je možné pozorovať mierne vyššiu účinnosť extrakcie nenasýtených mastných v pomere k SFA.

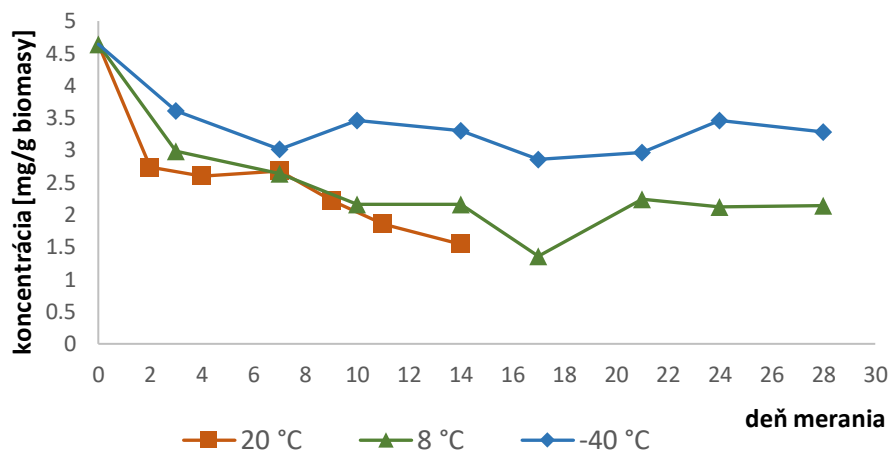
5.2.2.2 Stabilita extraktov kmeňa *Rhodotorula mucilaginosa* (C/N 13; médium tuk + kávový hydrolyzáť)



Graf 60: Časový vývin koncentrácie pigmentov v etanolovom extrakte kmeňa *Rhodotorula mucilaginosa* v porovnaní s referenčnou extrakciou (Folch), stanovené na HPLC



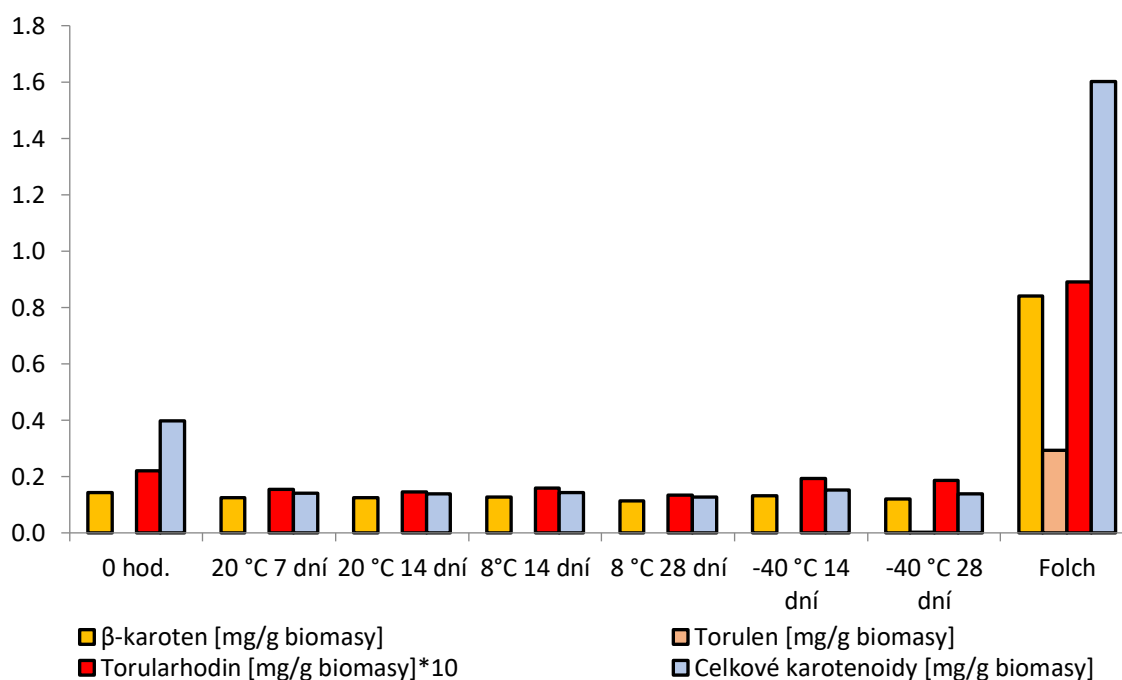
Graf 61: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v etanolovom extrakte pre kmeň *Rhodotorula mucilaginosa* v porovnaní s referenčným stanovením (R)



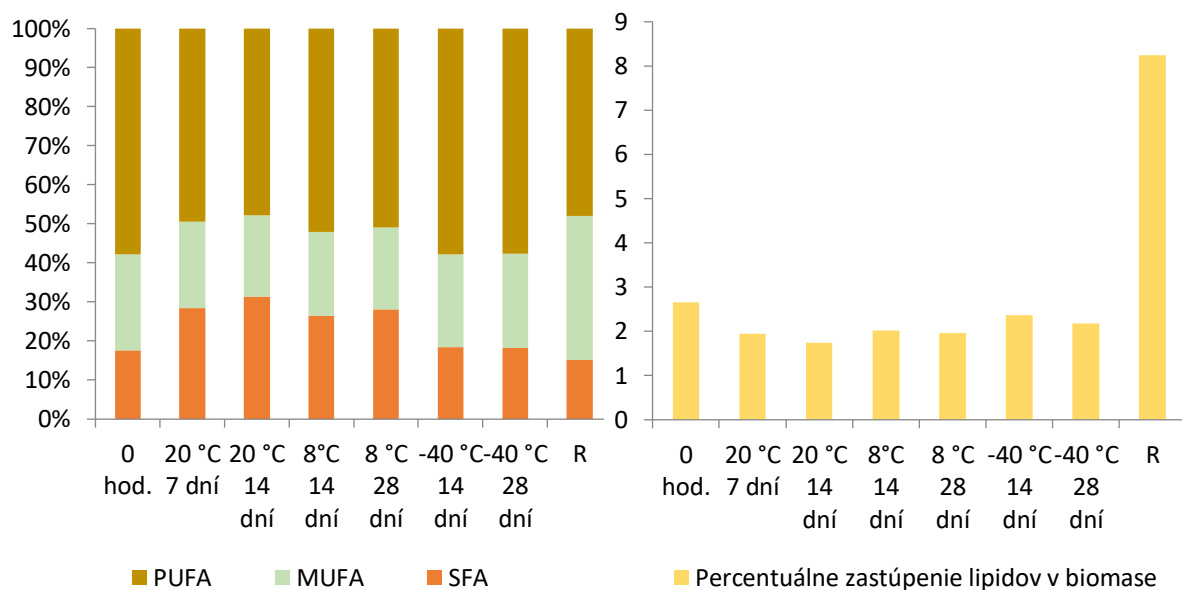
Graf 62: Časový vývin koncentrácie karotenoidov stanovená spektrofotometricky v etanovom extrakte kmeňa *Rhodotorula mucilaginosa*

Na Graf 60 je možné si povšimnúť že extrakcia karotenoidov do etanolu prebehla v tomto prípade z 82,9 %. Mimoriadne neúčinnou sa javí byť extrakcia torulínu, ktorá dosiahla výťažok 11,4 %. Z hľadiska uskladnenia sa táto vzorka síce javí byť najstabilnejšou pri -40 °C, pozoruhodnú stabilitu však prejavila i pri teplote 8 °C. Beta-karotén sa v tomto vzorku javí byť pomerne stabilný, jeho koncentrácia klesla po 28 dňoch pri -40 °C o 24,3 %. Graf 62 poukazuje na vývin spektrofotometricky určenej koncentrácie karotenoidov však naznačuje väčšie odchýlky medzi stabilitou pri teplote -40 °C a pri 8 °C. Hodnoty takto určenej koncentrácie sa taktiež niekoľkonásobne odlišujú od hodnôt určených na HPLC. Táto metóda sa teda nedá označiť za spoľahlivú v tomto konkrétnom prípade.

Z Graf 61 je možné vyčítať, že extrakcia lipidov z biomasy tohto vzorku prebehla s 73,9 % účinnosťou. Stabilita lipidov a zloženia mastných kyselín nevykazuje značné rozdiely medzi skladovaním pri 8 °C či pri -40 °C. PUFA sa opäť prejavili ako najmenej stabilné, keďže ich zastúpenie pokleslo hneď po prvej analýze.



Graf 63: Časový vývin koncentrácie pigmentov v hexánovom extrakte kmeňa *Rhodotorula mucilaginosa* v porovnaní s referenčnou extrakciou (Folch), stanovené na HPLC

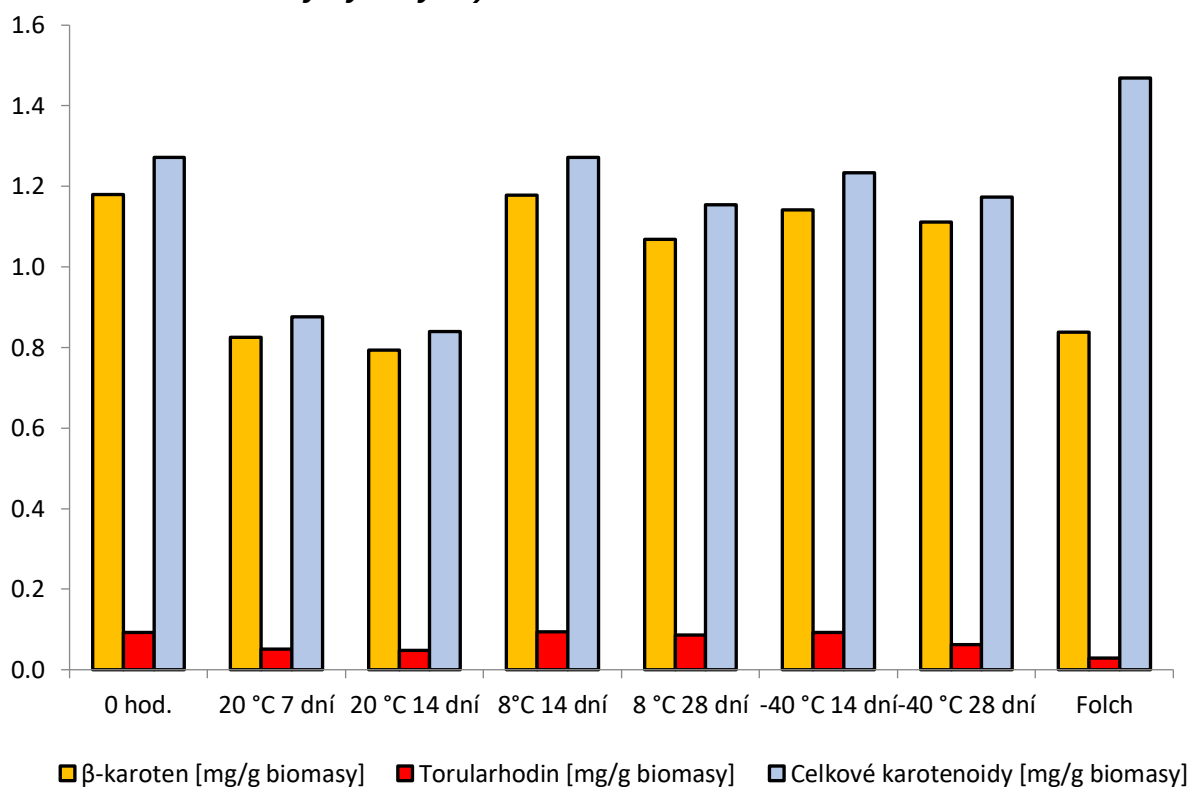


Graf 64: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v hexánovom extrakte pre kmeň *Rhodotorula mucilaginosa* v porovnaní s referenčným stanovením (R)

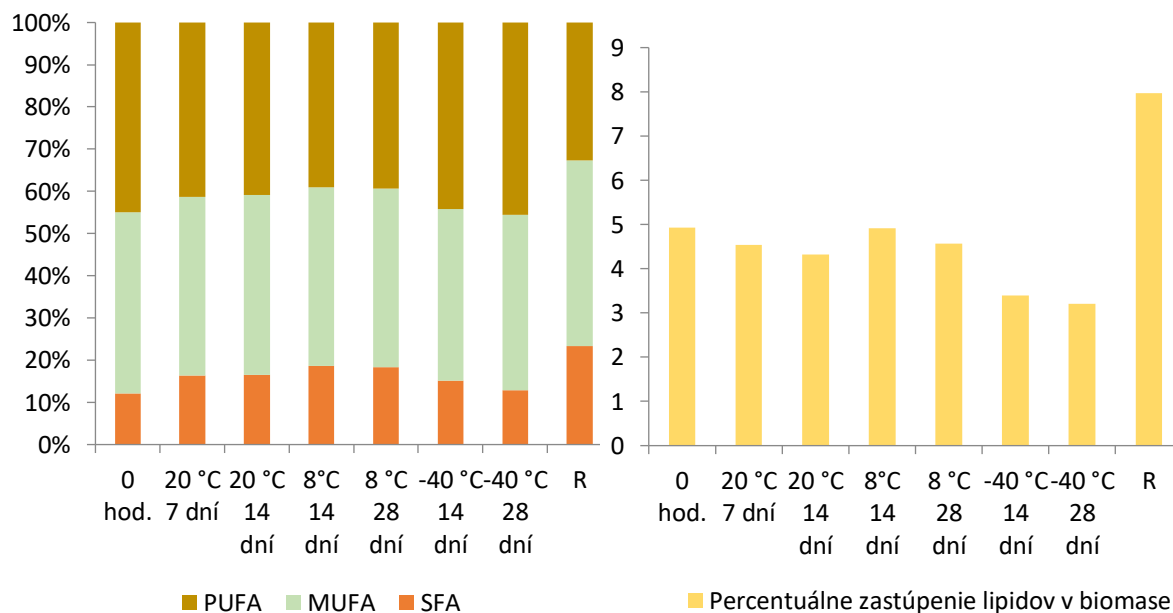
Z Graf 63 je možné vyčítať, že za použitia hexánu bol dosiahnutý iba veľmi malý výťažok extrakcie karotenoidných pigmentov (24,9 %). Pigment torulén nebol v extrakte detekovaný vôbec a pigment torularhodin iba v malom množstve. Spektrofotometrické určenie karotenoidov v tomto prípade nebolo možné, a to kvôli ich príliš nízkej koncentrácii vo vzorku. Hlavný pigment beta-karotén prejavil najvyššiu stabilitu pri teplote -40 °C.

Ako je možné si povšimnúť na Graf 64, extrakcia lipidov prebehla pomerne v malom množstve (32,1 %). Najvyššiu stabilitu prejavili PUFA i celkové zastúpenie lipidov pri teplote -40 °C. Zastúpenie SFA najrýchlejšie stúpalo pri vzorkách uskladnených pri 20 °C.

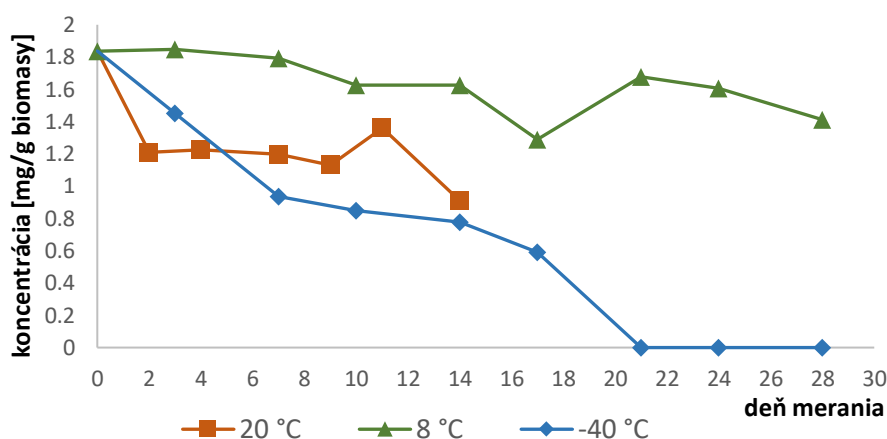
5.2.2.3 Stabilita extraktov kmeňa *Rhodotorula kratochvilovae* (C/N 13; médium tuk + kávový hydrolyzáť)



Graf 65: Časový vývin koncentrácie pigmentov v etanolovom extrakte kmeňa *Rhodotorula kratochvilovae* v porovnaní s referenčnou extrakciou (Folch), stanovené na HPLC



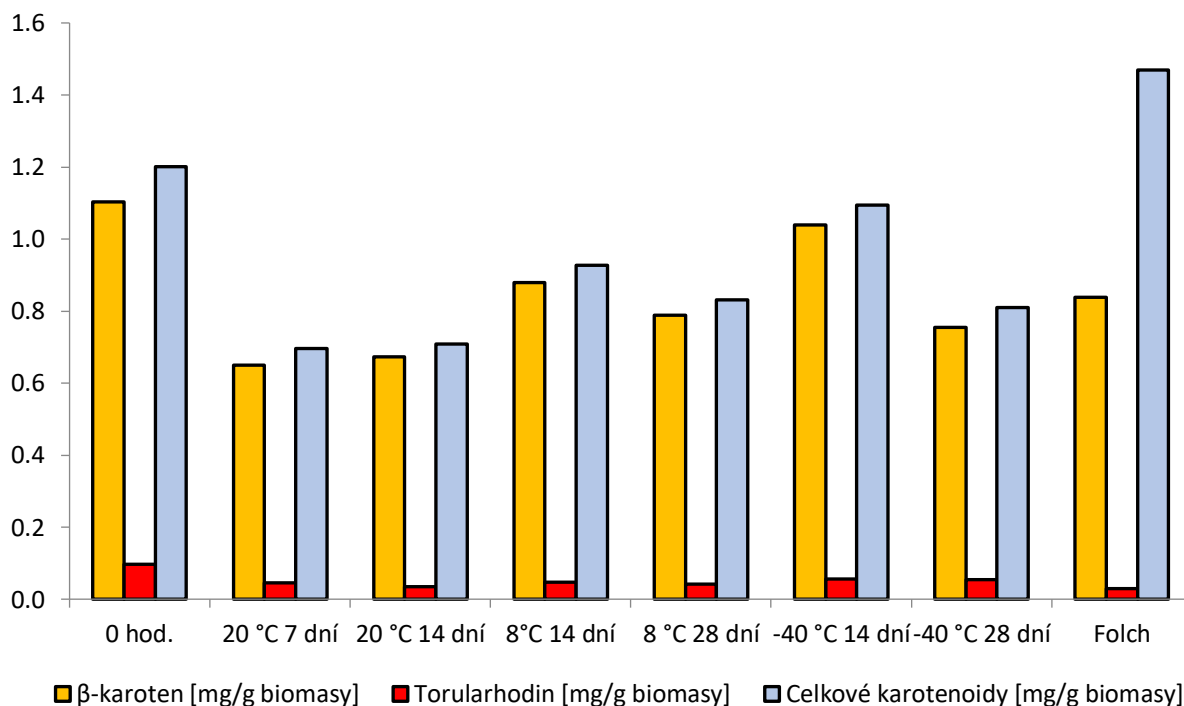
Graf 66: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v etanolovom extrakte pre kmeň *Rhodotorula kratochvilovae* v porovnaní s referenčným stanovením (R)



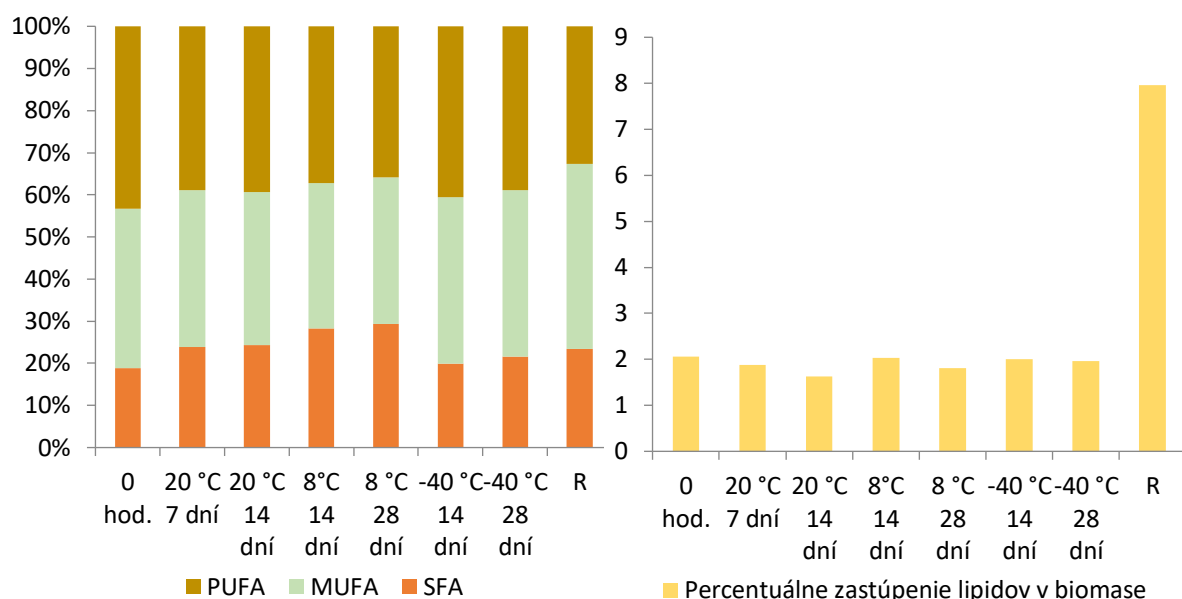
Graf 67: Časový vývin koncentrácie karotenoidov stanovená spektrofotometricky v etanолоvom extrakte kmeňa *Rhodotorula kratochvilovae*

Ako je možné si povšimnúť na Graf 65, extrakcia prebehla v tomto prípade s veľkou účinnosťou 86,5 %. Stabilita karotenoidov je najvyššia pri -40 °C, rovnako stabilné sa však prejavili aj za skladovania pri 8 °C. Medzi detekované pigmenty v tomto prípade patrí iba beta-karotén a torularhodín. Graf 67 správne vypovedá o vysokej stabilite pigmentov uskladnených pri 8 °C. Avšak hodnoty určené pre vzorku skladovanú za -40 °C sa absolútne nezhodujú s výstupom z HPLC. V konečnej fáze merania dokonca nadobudli nulové hodnoty, čo mohlo byť spôsobené veľmi nízkou mierou absorbancie tohto vzorku.

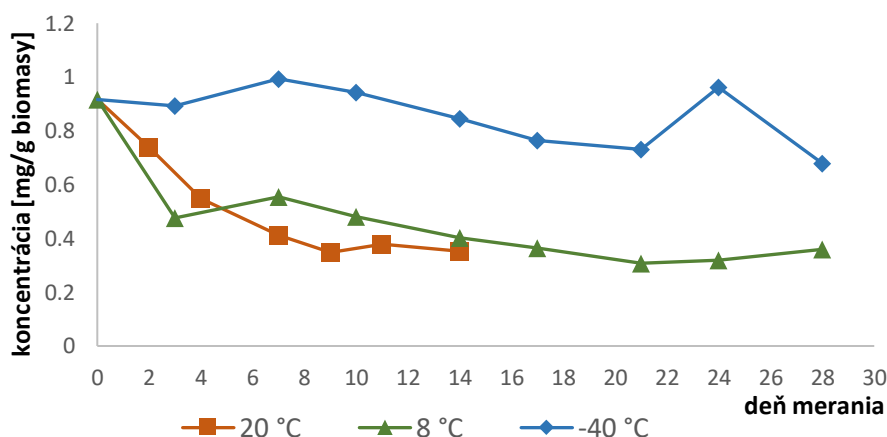
Z Graf 66 je možné určiť výťažok celkových lipidov, ktorý nadobudol 61,8 % referenčného stanovenia. Lipidy sa v tomto prípade zdajú byť veľmi nestabilnými pri teplote skladovania -40 °C, pri ktorej klesla ich hodnota po 28 dňoch na 65 % pôvodnej hodnoty. Zloženie MK neprejavilo počas priebehu experimentu značné zmeny.



Graf 68: Časový vývin koncentrácie pigmentov v hexánovom extrakte kmeňa *Rhodotorula kratochvilovae* v porovnaní s referenčnou extrakciou (Folch), stanovené na HPLC



Graf 69: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v hexánovom extrakte pre kmeň *Rhodotorula kratochvilovae* v porovnaní s referenčným stanovením (R)

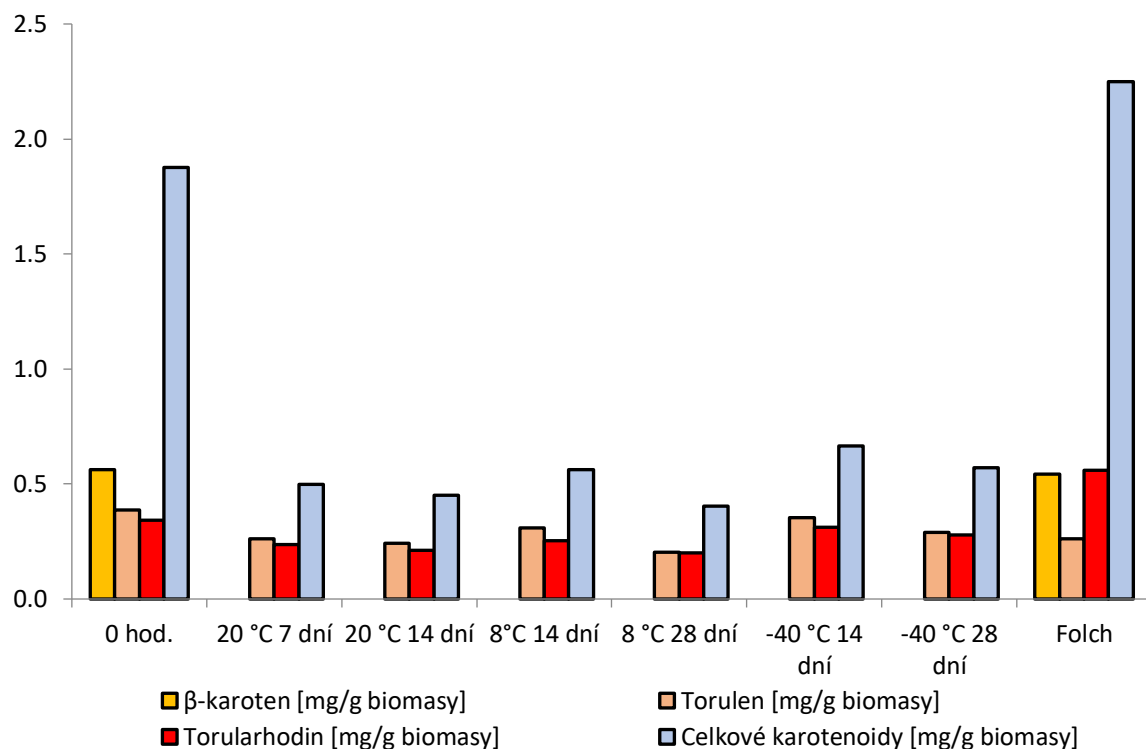


Graf 70: Časový vývin koncentrácie karotenoidov stanovená spektrofotometricky v hexánovom extrakte kmeňa *Rhodotorula kratochvilovae*

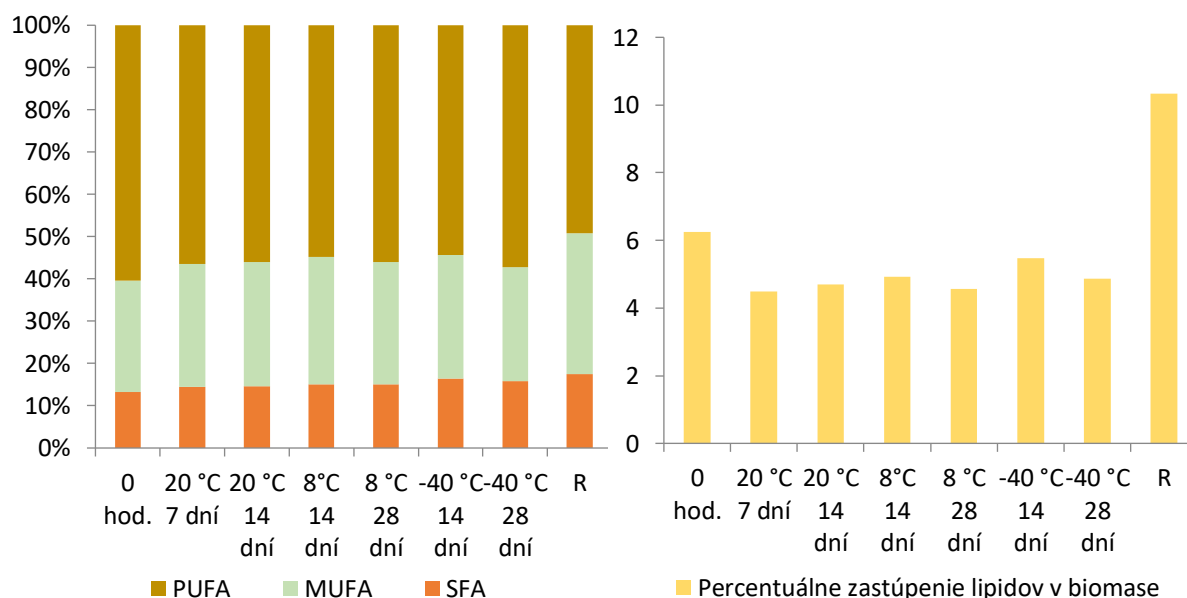
Ako je možné pozorovať na Graf 68, i za použitia hexánu dosiahla extrakcia pigmentov z tohoto vzorku mimoriadne vysokú účinnosť, avšak mierne nižšiu ako za použitia etanolu, a to iba 81,7 %. Hexánový extrakt sa prejavil po 28 dňoch ako najstabilnejší pri teplote 8 °C. Tieto údaje však nepotvrdzuje Graf 70, ktorý poukazuje na značné rozdiely medzi stabilitou pigmentov pri 8 °C a pri -40 °C. Výťažok extrakcie stanovený spektrofotometricky tiež nekorešponduje s hodnotou stanovenou na HPLC.

Podľa Graf 69 dosiahla extrakcia lipidov výťažok iba 25,9 %. Pre zachovanie lipidov je v tomto prípade vhodné extrakt skladovať pri -40 °C. Zloženie mastných kyselín v extrakte sa počas 28 dní zmenilo len veľmi málo.

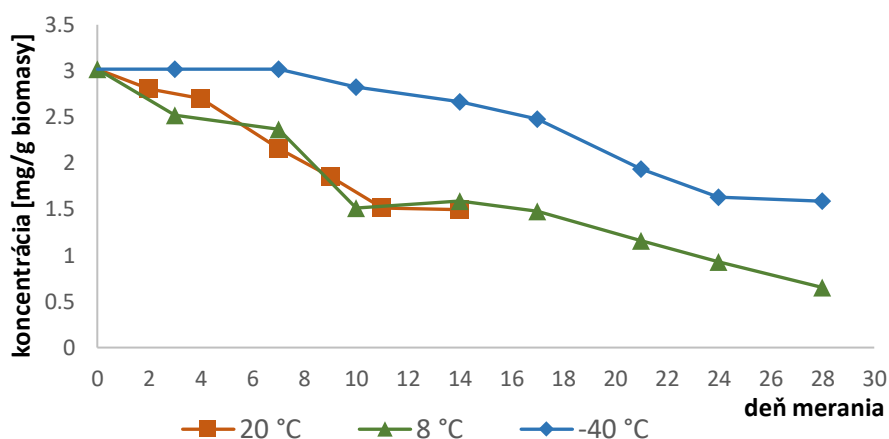
5.2.2.4 Stabilita extraktov kmeňa *Cystofilobasidium macerans* (C/N 13; médium tuk + kávový hydrolyzáť)



Graf 71: Časový vývin koncentrácie pigmentov v etanolovom extrakte kmeňa *Cystofilobasidium macerans* v porovnaní s referenčnou extrakciou (Folch), stanovené na HPLC



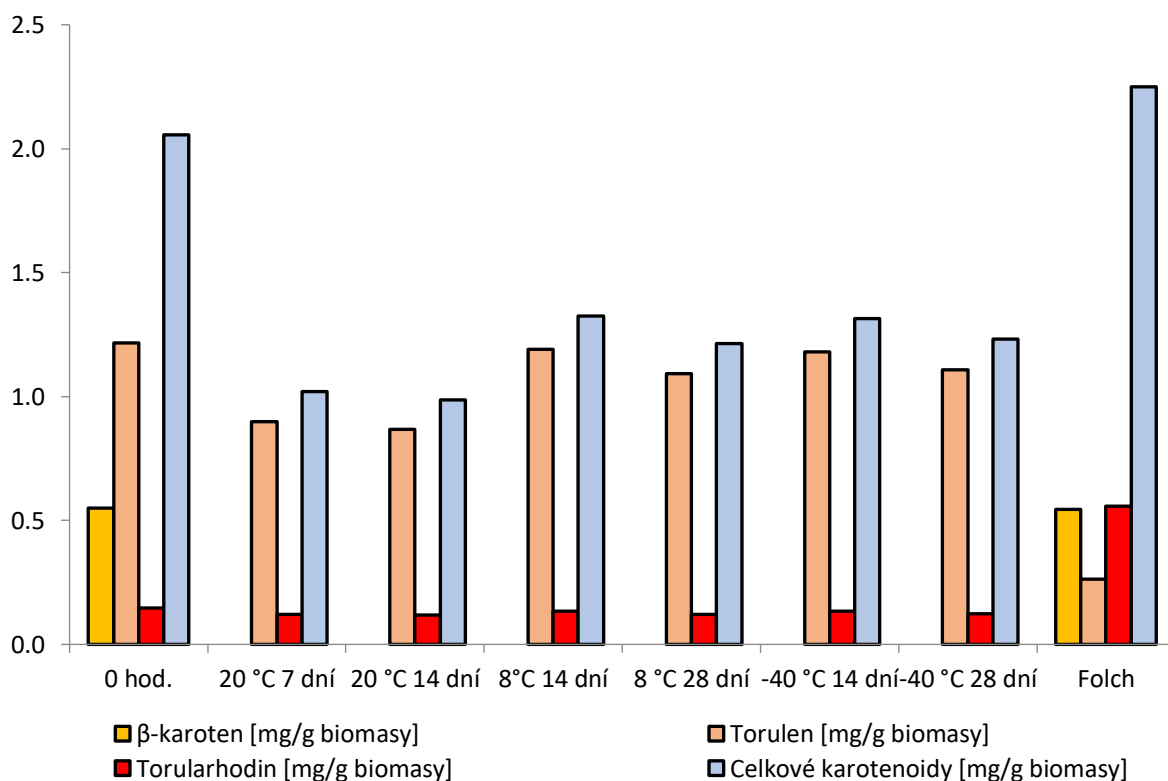
Graf 72: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v etanolovom extrakte pre kmeň *Cystofilobasidium macerans* v porovnaní s referenčným stanovením (R)



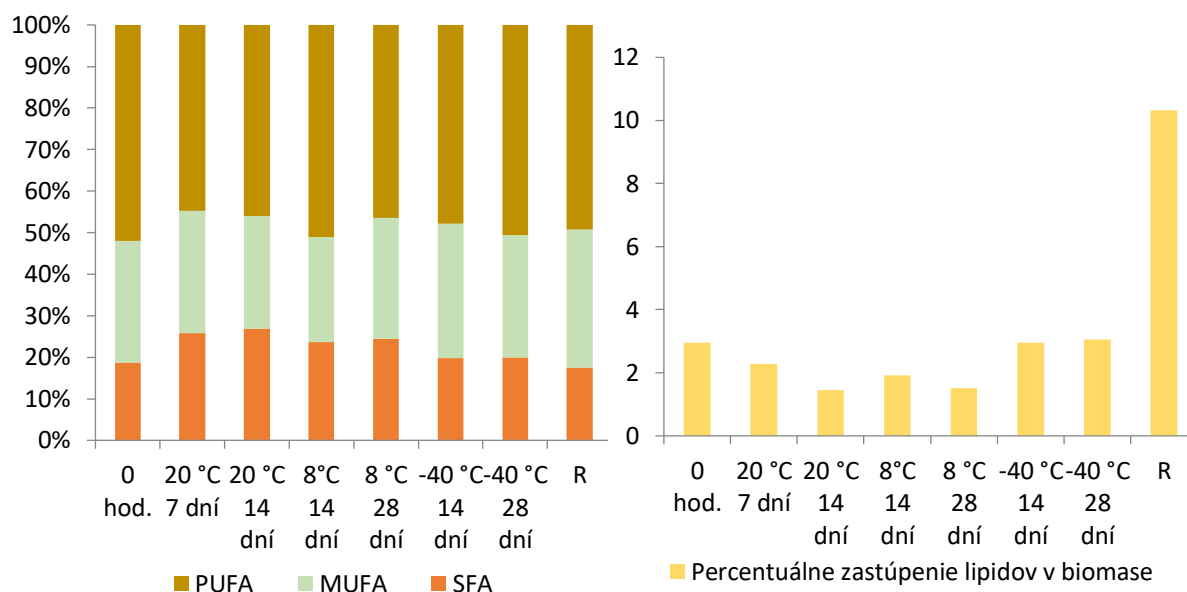
Graf 73: Časový vývin koncentrácie karotenoidov stanovená spektrofotometricky v etanovom extrakte kmeňa *Cystofilobasidium macerans*

Ako je možné pozorovať na Graf 71, extrakcia celkových pigmentov prebehla s výťažkom 83,4 %. Pigment beta-karotén sa prejavil ako veľmi nestabilný, pričom jeho koncentrácia klesla pod detekovateľné hodnoty pri akomkoľvek spôsobe uskladnenia. Za povšimnutie stojí veľmi vysoký výťažok extrakcie pigmentu torulínu. Miera rozkladu pigmentov v extrakte dosahuje najnižšie hodnoty pri uskladnení za -40 °C, na čo poukazuje aj Graf 73.

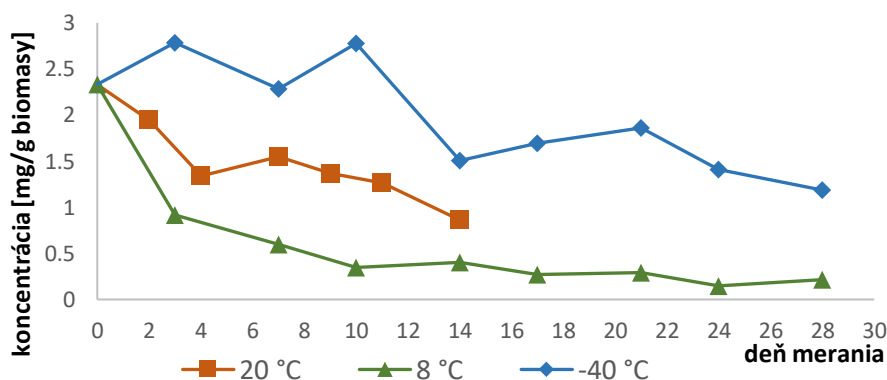
Podľa Graf 72 je možné stanoviť výťažok lipidov, ktorý činil 60,5 %. Zloženie mastných kyselín sa v priebehu merania zmenilo iba veľmi málo. Lipidy sa v tomto vzorku javia ako najstabilnejšie pri teplote -40 °C.



Graf 74: Časový vývin koncentrácie pigmentov v hexánovom extrakte kmeňa *Cystofilobasidium macerans* v porovnaní s referenčnou extrakciou (Folch), stanovené na HPLC



Graf 75: Časový vývin koncentrácie celkových lipidov (vpravo) a percentuálneho zastúpenia mastných kyselín (vľavo) v hexánovom extrakte pre kmeň *Cystofilobasidium macerans* v porovnaní s referenčným stanovením (R)



Graf 76: Časový vývin koncentrácie karotenoidov stanovená spektrofotometricky v hexánovom extrakte kmeňa *Cystofilobasidium macerans*

Podľa Graf 74 je možné určiť, že výťažok extrakcie celkových karotenoidov do hexánu bol vysoký v zrovnaní s referenčnou extrakciou, a to 91,4 %. Podľa všetkého je teda pre tento kmeň vhodnejšie použiť, pre extrakciu pigmentov, hexán. Podobne ako pri etanolovom extrakte, sa prejavil beta-karotén ako veľmi nestabilný. Tento extrakt je podľa všetkého približne rovnako vhodný skladovať pri teplote 8 °C ako pri -40 °C, pretože koncentrácie celkových karotenoidov na konci experimentu dosahovali veľmi podobné hodnoty. Zo vzorku biomasy bolo tiež vyextrahované pozoruhodne vysoké množstvo torulínu, dá sa teda predpokladať, že počas extrakcie metódou podľa Folcha z tohto vzorku biomasy dochádza k jeho rozkladu. Ako je zrejmé z Graf 76, zastúpenie karotenoidov v extrakte určené pomocou HPLC a spektrofotometricky nadobúda relatívne podobných hodnôt (2,32 mg/g spektrofotometricky a 2,05 mg/g pomocou HPLC). Absolútne však nevystihuje priebeh rozkladu týchto pigmentov počas experimentu.

Na Graf 75 je možné pozorovať, že celkový výťažok extrakcie lipidov činil 28,7 %. Jedná sa o pomerne nízky výťažok, a to aj v zrovnaní s extrakciou do etanolu. Lipidy i PUFA sa v tomto extrakte javia byť veľmi stabilnými pri teplote -40 °C.

5.2.2.5 Zhrnutie priebehu krátkodobých testov stability vykonaných na extraktoch z biomasy kvasiniek kultivovaných vo fermentoroch

Na základe výsledkov tohto experimentu sa pre extrakciu pigmentov z vybraných vzoriek biomasy javí byť optimálnym rozpúšťadlom etanol, ktorý dosiahol pomerne vysoké výťažky (väčšinou viac ako 80 %). Výnimkou je biomasa kmeňa *Cystofilobasidium macerans*, ktorej hexánový extrakt dosiahol výťažok až 91,4 %. Pozoruhodne nízky výťažok pigmentov bol získaný extrakciou biomasy kmeňa *Rhodotorula mucilaginosa* do hexánu, a to iba 24,9 %. Čo sa týka stability pigmentov v etanolových extraktoch, najvhodnejším uskladnením sa javí byť teplota -40 °C, pre kmene *Rhodospiridium toruloides* a *Rhodotorula kratochvilovae* sa však javí byť vhodnou i teplota 8 °C. Stabilita pigmentov v hexánových extraktoch prejavila väčšiu závislosť na teplote prostredia, pričom optimálnou teplotou bolo -40 °C, okrem extraktu kmeňa *Rhodotorula kratochvilovae*, ktorý je vhodnejšie skladovať v chladiacom boxe pri teplote 8 °C.

Lipidy boli z týchto vzoriek biomasy najúčinnnejšie extrahované do etanolu, pričom boli zaznamenané až dvakrát vyššie výťažky ako pri extrakcii do hexánu. Výnimkou bo však kmeň *Rhodospiridium toruloides*, ktorého hexánová extrakcia prebehla s mierne vyššou účinnosťou ako etanolová. Lipidy uskladnené v etanolových extraktoch prejavili najvyššiu stabilitu pri skladovaní za -40 °C, c výnimkou extraktu kmeňa *Rhodospiridium toruloides*, ktorý je lepšie skladovať pri 8 °C a s výnimkou extraktu kmeňa *Rhodotorula kratochvilovae*, v ktorom dochádzalo k značne rýchlejšiemu rozkladu lipidov pri teplote -40 °C. Zloženie mastných kyselín sa v prípade etanolových extraktov menilo počas experimentu len veľmi málo. Hexánové extrakty prejavili najvyššiu stabilitu lipidov pri teplote -40 °C. Zastúpenie mastných kyselín v extrakte sa i v hexánových extraktoch v priebehu experimentu výrazne nemenilo.

6 ZÁVER

Diplomová práca bola zameraná na optimalizáciu extrakčných postupov pre získanie vysokého množstva lipofilných pigmentov z biomasy vybraných kmeňov mikroorganizmov. Medzi použité kmene mikroorganizmov patria, kvôli ich charakteristickej produkcii karotenoidov, karotenogénne kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* CCY 19-4-6, *Rhodotorula kratochvilovae* CCY 20-2-26, *Cystofilobasidium macerans* CCY 10-1-2, *Sporidiobolus pararoseus* CCY 19-9-6 a *Rhodospiridium toruloides* 062-002-004. Medzi použité kmene mikroorganizmov patrí aj rada kmeňov mikrorias, ktorými boli *Scenedesmus dimorphus* CCALA 443, *Scenedesmus obliquus* CCALA 455, *Desmodesmus acutus* CCALA 439, *Desmodesmus quadricauda* CCALA 463, *Chlorella vulgaris* CCALA 924 a *Chlamydomonas reinhardtii* CCALA 928, ktoré sú charakteristické akumuláciou chlorofylu a karotenoidov. Práca bola ďalej zameraná na charakterizáciu extraktov pomocou kvapalinovej chromatografie, plynovej chromatografie a UV-VIS spektrofotometrie. U vybraných extraktov kvasiniek bola určená koncentrácia pigmentov a lipidov v extrakte po dobe 4 mesiacov uchovávaní. U vybraných extraktov rias a kvasiniek bola sledovaná stabilita pigmentov po dobu 28 dní za uskladnenia v chladniacom boxe (8 °C) a v mraziacom boxe (-40 °C) a stabilita za uskladnenia pri laboratórnej teplote (20 °C) počas 14 dní. Zloženie extraktov skladovaných pri 8 °C a -40 °C bolo charakterizované každé 2 týždne a extraktov skladovaných pri 20 °C každý týždeň pomocou HPLC a GC. Pre detailnejšie charakterizovanie priebehu experimentu boli extrakty charakterizované pomocou UV-VIS spektrofotometrie v kratších intervaloch.

Dlhodobé testy stability boli vykonané na celkom 4 vzorkách biomasy kvasiniek kultivovaných vo fermentore a 4 vzorkách biomasy kvasiniek kultivovaných vo fľaškách s objemom 5 litrov. Pre extrakciu pigmentov z biomasy bolo v prípade fľaškových kultívácií najvhodnejšie použiť etanol pre kmene *Rhodotorula mucilaginosa* a *Cystofilobasidium macerans*, a pre kmene *Sporidiobolus pararoseus* a *Rhodotorula kratochvilovae* bolo zasa vhodnejšie použitie hexánu. Extrakcia pigmentov z biomasy kvasiniek kultivovaných vo fermentore prebiehala naopak najvhodnejšie do etanolu, s výnimkou extraktu kmeňa *Cystofilobasidium macerans*. Pozoruhodné bolo, že značné rozdiely medzi konečnými koncentraciami celkových karotenoidov vo extraktoch fľaškových kultívácií sa prejavili iba pre kmeň *Sporidiobolus pararoseus*. Etanolvý extrakt biomasy z fermentora kmeňa *Sporidiobolus pararoseus* sa tiež preukázal vyššou stabilitou ako iné etanolové extrakty získané z biomasy kultivovanej vo fermentoroch, na ktorých boli vykonané dlhodobé testy stability.

Krátkodobé testy stability boli vykonané na 6 vzorkách biomasy už spomínaných kmeňov mikrorias. Z výsledkov tohto experimentu je možné určiť, že extrakcia pigmentov do etanolu a hexánu prebieha vždy špecificky pre daný kmeň mikrorias. Kmene, pre ktoré bolo identifikované vhodnejšie použitie hexánu sú *Scenedesmus obliquus* a *Chlamydomonas reinhardtii*. Kmene, pre ktoré sa preukázal ako vhodnejší etanol sú *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus quadricauda* a *Scenedesmus dimorphus*. Kmeň *Chlorella vulgaris* dosiahol porovnateľné hodnoty výťažkov pigmentov pri použití etanolu i hexánu. Stabilita väčšiny pigmentov bola najvyššia pri teplote -40 °C, a to v hexánových i etanolvých extraktoch. Extrakty, ktoré vykázali porovnateľnú stabilitu pigmentov i pri teplote 8 °C sú etanolové extrakty kmeňov *Scenedesmus dimorphus* a hexánové extrakty kmeňov *Desmodesmus acutus* a *Scenedesmus obliquus*.

Krátkodobé testy stability boli vykonané i na celkom 4 vzorkách biomasy kvasiniek kultivovaných vo fermentoroch. Pre extrakciu pigmentov z biomasy väčšiny vzoriek sa javil optimálnym rozpúšťadlom etanol, a to iba s výnimkou extraktu kmeňa *Cystofilobasidium macerans*. Pre kmeň *Cystofilobasidium macerans* bol zaznamenaný jeden z najvyšších výťažkov celkových karotenoidných pigmentov pri extrakcii kvasničnej biomasy do hexánu, ktorý činil až 91,4 %. Hexán sa však preukázal ako absolútne nevhodný pre extrakciu pigmentov z biomasy kmeňa *Rhodotorula mucilaginosa*. Medzi extrakty, ktoré je vhodnejšie, alebo aspoň porovnateľne vhodné krátkodobo skladovať pri teplote prostredia 8 °C, patrí

etanolový extrakt kmeňa *Rhodosporidium toruloides* a *Rhodotorula kratochvilovae* a hexánový extrakt kmeňa *Rhodotorula kratochvilovae*.

Účinnosť extrakcie a stabilita pigmentov vzhľadom na konkrétny kmeň mikroorganizmu sa preukázala byť naozaj rozmanitá. Tieto výsledky pravdepodobne súvisia s odlišnosťami v stavbe buniek a organel a zložením sady produkovaných pigmentov. Odlišnosti v účinkoch extrakcie sa však prejavili i medzi niekoľkými vzorkami biomasy toho istého kmeňa, ktoré však boli získané rozdielnymi metódami kultivácie. Príkladom môže byť kmeň *Cystofilobasidium macerans*, ktorého biomasa získaná z kultivácií vo fermentoroch vykazovala najlepšiu účinnosť extrakcie do hexánu, zatiaľ čo jeho biomasa získaná kultiváciou vo fľaškách vykazovala najlepšiu mieru extrakcie do etanolu. Je teda zrejmé, že na účinok extrakcie má vplyv i konkrétne fyziologické rozpoloženie bunky. Dá sa teda všeobecne predpokladať, že extrakcia pigmentov bude prebiehať vždy špecificky pre daný kmeň i kultivačný spôsob. Z hľadiska dlhodobého skladovania je cieľom identifikovať extrakty, ktoré dosahujú mimoriadne vysokú stabilitu. Miera stability pigmentov v tomto prípade nutne nemusí súvisieť s účinnosťou extrakcie. Ako príklad je možné uviesť výsledky dlhodobého testovania stability, počas ktorého koncentrácia celkových pigmentov v etanolových extraktoch klesla na ešte nižšie hodnoty ako v extraktoch hexánových, hoci tieto etanolové extrakty pôvodne dosiahli vyššie výťažky. Príkladom rôznej stability pigmentov toho istého kmeňa v závislosti na spôsobe kultivácie môže byť kmeň *Sporidiobolus pararoseus*, ktorého extrakt z biomasy kultivovanej vo fermentore vykázal vyššiu stabilitu za použitia etanolu (26 % rozklad beta-karoténu po 4 mesiacoch), zatiaľ čo jeho extrakt biomasy kultivovanej vo fľaške vykázal vyššiu stabilitu za použitia hexánu (22 % rozklad beta-karoténu po 4 mesiacoch).

7 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] SAINI, Ramesh, Shivraj NILE a Se PARK. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International*. 2015, **76**(3), 735-750. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.07.047. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996915301356>
- [2] SANDMANN, Gerhard. Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *European Journal of Biochemistry*. 1994, **223**(1), 7-24. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18961.x. ISSN 0014-2956. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18961.x>
- [3] MADHOUR, Abderrahim, Heidrun ANKE, Adele MUCCI, Paolo DAVOLI a Roland WEBER. Biosynthesis of the xanthophyll plectanixanthin as a stress response in the red yeast *Dioszegia* (Tremellales, Heterobasidiomycetes, Fungi). *Phytochemistry*. 2005, **66**(22), 2617-2626. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.09.010. ISSN 00319422. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942205004577>
- [4] DOUŠA, Michal. *Vlastnosti karotenoidů: News from HPLC analysis* [online]. c1996-2004 [cit. 2020-04-02]. Dostupné z: http://hplc1.sweb.cz/Carotenoids/ch_karotenoids.htm
- [5] YAHIA, Elhadi, José DE JESÚS ORNELAS-PAZ, Tatiana EMANUELLI, Eduardo JACOB-LOPES, Leila ZEPKA a Braulio CERVANTES-PAZ. Chemistry, Stability, and Biological Actions of Carotenoids. *Fruit and Vegetable Phytochemicals*. Chichester, UK, 2017, , 285-346. DOI: 10.1002/9781119158042.ch15. ISBN 9781119158042. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781119158042.ch15>
- [6] ARIIZUMI, Tohru, Sanae KISHIMOTO, Ryo KAKAMI et al. Identification of the carotenoid modifying gene PALE YELLOW PETAL 1 as an essential factor in xanthophyll esterification and yellow flower pigmentation in tomato (*Solanum lycopersicum*). *The Plant Journal*. 2014, **79**(3), 453-465. DOI: 10.1111/tpj.12570. ISSN 09607412. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/tpj.12570>
- [7] HOWITT, CRISPIN a BARRY POGSON. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell and Environment*. 2006, **29**(3), 435-445. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2005.01492.x. ISSN 0140-7791. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3040.2005.01492.x>
- [8] RIBEIRO, Daniela, Marisa FREITAS, Artur SILVA, Félix CARVALHO a Eduarda FERNANDES. Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. *Food and Chemical Toxicology*. 2018, **120**, 681-699. DOI: 10.1016/j.fct.2018.07.060. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691518305052>
- [9] MATA-GÓMEZ, Luis, Julio MONTAÑEZ, Alejandro MÉNDEZ-ZAVALA a Cristóbal AGUILAR. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*. 2014, **13**(1). DOI: 10.1186/1475-2859-13-12. ISSN 1475-2859. Dostupné z: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-13-12>
- [10] LANGE, B., T. RUJAN, W. MARTIN a R. CROTEAU. Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000, **97**(24), 13172-13177. DOI: 10.1073/pnas.240454797. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.240454797>
- [11] FRASER, P. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*. 2004, **43**(3), 228-265. DOI: 10.1016/j.plipres.2003.10.002. ISSN 01637827. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016378270300064X>
- [12] BUHAESCU, Irina a Hassane IZZEDINE. Mevalonate pathway: A review of clinical and therapeutical implications. *Clinical Biochemistry*. 2007, **40**(9-10), 575-584. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2007.03.016. ISSN 00099120. Dostupné z:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912007001403>
- [13] JOMOVA, Klaudia a Marian VALKO. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013, 70, 102-110. DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.09.054. ISSN 02235234. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523413006351>
 - [14] DEL CAMPO, José, Mercedes GARCÍA-GONZÁLEZ a Miguel GUERRERO. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, 74(6), 1163-1174. DOI: 10.1007/s00253-007-0844-9. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-007-0844-9>
 - [15] DUPONT, Sebastien, Guillaume LEMETAIS, Thierry FERREIRA, Philippe CAYOT, Patrick GERVAIS a Laurent BENEY. ERGOSTEROL BIOSYNTHESIS: A FUNGAL PATHWAY FOR LIFE ON LAND?. *Evolution*. 2012, 66(9), 2961-2968. DOI: 10.1111/j.1558-5646.2012.01667.x. ISSN 00143820. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1558-5646.2012.01667.x>
 - [16] ALCAZAR-FUOLI, Laura a Emilia MELLADO. Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. *Frontiers in Microbiology*. 2013, 3. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00439. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00439/abstract>
 - [17] ENGELKING, Larry. Vitamin D. Textbook of Veterinary Physiological Chemistry. Elsevier, 2015, , 288-293. DOI: 10.1016/B978-0-12-391909-0.50045-1. ISBN 9780123919090. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123919090500451>
 - [18] MOLDOIU, Elena, Nadejda EFREMOVA a Natalia CHISELITA. Microbiological and technological investigations concerning the obtaining ergosterol from yeasts. *Analele Stiintifice ale Universitatii "Al. I. Cuza" Din Iasi*. (Serie Noua). Sectiunea 2.a. Genetica si Biologie Moleculara; Iasi. Romania, Iasi: Universitatea "Alexandru Ioan Cuza", 2012, 13(3), . ISSN 15823571. Dostupné z: <https://search.proquest.com/docview/1316242606?accountid=17115>
 - [19] CHOI, Jin-Ho, Yeon-Woo RYU a Jin-Ho SEO. Biotechnological production and applications of coenzyme Q10. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, 68(1), 9-15. DOI: 10.1007/s00253-005-1946-x. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-005-1946-x>
 - [20] ERNSTER, Lars a Gustav DALLNER. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1995, 1271(1), 195-204. DOI: 10.1016/0925-4439(95)00028-3. ISSN 09254439. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443995000283>
 - [21] CASAGRANDE, Daniela, Paulo WAIB a Alceu JORDÃO JÚNIOR. Mechanisms of action and effects of the administration of Coenzyme Q10 on metabolic syndrome. 2018, 13, 26-32. DOI: 10.1016/j.jnim.2018.08.002. ISSN 23523859. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S235238591830032X>
 - [22] STEFELY, Jonathan a David PAGLIARINI. Biochemistry of Mitochondrial Coenzyme Q Biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*. 2017, 42(10), 824-843. DOI: 10.1016/j.tibs.2017.06.008. ISSN 09680004. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000417301160>
 - [23] Biochemie: chemický pohled na biologický svět. 2. přepracované vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2018, s. 257-259. ISBN 978-80-7592-013-3.
 - [24] VON WETTSTEIN, D., S. GOUGH a C. KANNANGARA. Chlorophyll Biosynthesis. *The Plant Cell*. 1995, (7), 1039-1057. DOI: 10.1105/tpc.7.7.1039. ISSN 1040-4651. Dostupné z: <http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.7.7.1039>
 - [25] GUIDI, Lucia, Massimiliano TATTINI a Marco LANDI. How Does Chloroplast Protect Chlorophyll Against Excessive Light?. *Chlorophyll. InTech*, 2017. DOI: 10.5772/65594.

- ISBN 978-953-51-3107-6. Dostupné z:
<http://www.intechopen.com/books/chlorophyll/how-does-chloroplast-protect-chlorophyll-against-excessive-light->
- [26] HARDIN, Charles a James KNOPP. Biochemistry: essential concepts. New York: Oxford University Press, 2013. ISBN 978-0199765621. Dostupné z:
<https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpBEC00001/biochemistry-essential/biochemistry-essential>
- [27] VANCE, D.E. a J.E. VANCE. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes: Chapter 6 - Fatty acid synthesis in eukaryotes. 4. Elsevier Science, 2002. ISBN 9780444511393.
- [28] GARRETT, R.H. a C.M. GRISHAM. Biochemistry. Cengage, 1999, 821 s. ISBN 9780030973697.
- [29] KENAR, James, Bryan MOSER a Gary LIST. Naturally Occurring Fatty Acids. Fatty Acids. Elsevier, 2017, , 23-82. DOI: 10.1016/B978-0-12-809521-8.00002-7. ISBN 9780128095218. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128095218000027>
- [30] LANDS, William. Fish, Omega-3 and Human Health. 2nd Edition. AOCS Press, 2005. ISBN 978-1-893997-81-3. Dostupné z:
<https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFOHHE004/fish-omega-3-human-health/fish-omega-3-human-health>
- [31] ENGELKING, Larry. Saturated and Unsaturated Fatty Acids. Textbook of Veterinary Physiological Chemistry. Elsevier, 2015, , 345-350. DOI: 10.1016/B978-0-12-391909-0.50054-2. ISBN 9780123919090. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123919090500542>
- [32] ZHU, L., Z. LI a E. HILTUNEN. Strategies for Lipid Production Improvement in Microalgae as a Biodiesel Feedstock. BioMed Research International. 2016, 2016, 1-8. DOI: 10.1155/2016/8792548. ISSN 2314-6133. Dostupné z:
<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/8792548/>
- [33] TRAN, N.H., J.R. BARTLETT, G.S.K. KANNANGARA, A.S. MILEV, H. VOLK a M.A. WILSON. Catalytic upgrading of biorefinery oil from micro-algae. Fuel. 2010, 89(2), 265-274. DOI: 10.1016/j.fuel.2009.08.015. ISSN 00162361. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016236109003767>
- [34] PARMAR, Asha, Niraj SINGH, Ashok PANDEY, Edgard GNANSOUNOU a Datta MADAMWAR. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. Bioresource Technology. 2011, 102(22), 10163-10172. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.08.030. ISSN 09608524. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852411011187>
- [35] ATHENAKI, M., C. GARDELI, P. DIAMANTOPOULOU, S.S. TCHAKOUTEU, D. SARRIS, A. PHILIPPOUSSIS a S. PAPANIKOLAOU. Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. Journal of Applied Microbiology. 2018, 124(2), 336-367. DOI: 10.1111/jam.13633. ISSN 13645072. Dostupné z:
<http://doi.wiley.com/10.1111/jam.13633>
- [36] ANSCHAU, Andréia. Lipids from oleaginous yeasts: production and encapsulation. Nutrient Delivery. Elsevier, s. 749-794. DOI: 10.1016/B978-0-12-804304-2.00020-2. ISBN 9780128043042. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128043042000202>
- [37] AGEITOS, Jose, Juan VALLEJO, Patricia VEIGA-CRESPO a Tomas VILLA. Oily yeasts as oleaginous cell factories. Applied Microbiology and Biotechnology. 2011, 90(4), 1219-1227. DOI: 10.1007/s00253-011-3200-z. ISSN 0175-7598. Dostupné z:
<http://link.springer.com/10.1007/s00253-011-3200-z>
- [38] PERRICONE, Marianne, Mariangela GALLO, Maria CORBO, Milena SINIGAGLIA a Antonio BEVILACQUA. Yeasts. The Microbiological Quality of Food. Elsevier, 2017, s.

- 121-131. DOI: 10.1016/B978-0-08-100502-6.00008-X. ISBN 9780081005026. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978008100502600008X>
- [39] HILL, Annie. *Brewing Microbiology - Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste: Part I. Yeast: Properties and Management*. Elsevier, 2015. ISBN 978-1-78242-331-7. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpBMMMEQV1/brewing-microbiology/brewing-microbiology>
- [40] MANNAZZU, Ilaria, Sara LANDOLFO, Teresa DA SILVA a Pietro BUZZINI. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015, 31(11), 1665-1673. DOI: 10.1007/s11274-015-1927-x. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-015-1927-x>
- [41] KURTZMAN, Cletus a Jack FELL. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Štvrtá edícia. Elsevier Science B.V., 1998. ISBN 978-0-444-81312-1.
- [42] LIU, Dongyou. *Molecular detection of human fungal pathogens*. Taylor & Francis Group, 2011. ISBN 978-1-4398-1241-9.
- [43] ŠIMANSKÝ, Samuel. Srovnání produkce lipidů a lipidických metabolitů vybranými kvasinkami a řasami [online]. Brno, 2018 [cit. 2020-07-16]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/82809>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.
- [44] LEI, Y. a I. KIM. Effect of *Phaffia rhodozyma* on performance, nutrient digestibility, blood characteristics, and meat quality in finishing pigs. *Journal of Animal Science*. 2014, 92(1), 171-176. DOI: 10.2527/jas.2013-6749. ISSN 0021-8812. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jas/article/92/1/171/4701915>
- [45] SOMASHEKAR, D. a R. JOSEPH. Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2000, 16(5), 491-493. DOI: 10.1023/A:1008917612616. ISSN 09593993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1008917612616>
- [46] HALFORD, Nigel a Angela KARP. *Energy Crops: 18. Algae*. Energy and Environment Series No. 3. The Royal Society of Chemistry, 2011. ISBN 978-1-84973-032-7. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00AAR3S2/energy-crops/energy-cro-algae>
- [47] *Problem Organisms in Water: Identification and Treatment MANUAL OF WATER SUPPLY PRACTICES: 10. Algae*. M7 (Third Edition). American Water Works Association (AWWA), 2003. ISBN 978-1-58321-292-9. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt008BVY55/problem-organisms-in/algae>
- [48] YOUSUF, Abu. *Fundamentals of Microalgae Cultivation*. Microalgae Cultivation for Biofuels Production. Elsevier, 2020, , 1-9. DOI: 10.1016/B978-0-12-817536-1.00001-1. ISBN 9780128175361. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128175361000011>
- [49] ZUCCARO, Gaetano, Abu YOUSUF, Antonino POLLIO a Jean-Philippe STEYER. *Microalgae Cultivation Systems*. Microalgae Cultivation for Biofuels Production. Elsevier, 2020, , 11-29. DOI: 10.1016/B978-0-12-817536-1.00002-3. ISBN 9780128175361. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128175361000023>
- [50] BABULA, Petr. *Archebakterie, bakterie, houby, protista*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2008. ISBN 978-80-7305-057-3.
- [51] KLABAN, Vladimír. *Obecná a environmentální mikrobiologie: fascinující, neuvěřitelný a tajemný svět mikrobů v přírodním prostředí*. Hradec Králové: Gaudeamus, 2018. ISBN 978-80-7435-673-5.
- [52] LI, Shuangxi, Panpan WANG, Chao ZHANG et al. Influence of polystyrene microplastics

- on the growth, photosynthetic efficiency and aggregation of freshwater microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Science of The Total Environment*. 2020, **714**. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.136767. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969720302771>
- [53] ŠKALOUD, Pavel. Virtuální algologické praktikum [online]. [cit. 2020-07-17]. Dostupné z: <https://botany.natur.cuni.cz/algo/praktika/17.html>
- [54] MASOJÍDEK, J. a G. TORZILLO. Mass Cultivation of Freshwater Microalgae. *Encyclopedia of Ecology* [online]. Elsevier, 2008, s. 2226-2235 [cit. 2020-07-18]. DOI: 10.1016/B978-008045405-4.00830-2. ISBN 9780080454054. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080454054008302>
- [55] LÜRLING, M. Metribuzin impairs the unicell-colony transformation in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Chemosphere*. 2011, 82(3), 411-417. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.09.070. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653510011100>
- [56] TOLEDO-CERVANTES, Alma, Marcia MORALES, Eberto NOVELO a Sergio REVAH. Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresource Technology*. 2013, 130, 652-658. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.12.081. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852412019396>
- [57] RAJESH, K., M.V. ROHIT a S. VENKATA MOHAN. Microalgae-Based Carotenoids Production. *Algal Green Chemistry*. Elsevier, 2017, , 139-147. DOI: 10.1016/B978-0-444-63784-0.00007-2. ISBN 9780444637840. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444637840000072>
- [58] ZHOU, Wenguang, Qian LU, Pei HAN a Jingjing LI. Microalgae Cultivation and Photobioreactor Design. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*. Elsevier, 2020, , 31-50. DOI: 10.1016/B978-0-12-817536-1.00003-5. ISBN 9780128175361. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128175361000035>
- [59] LI, Yaqiong, Yuankui LIN, Patrick LOUGHLIN a Min CHEN. Optimization and effects of different culture conditions on growth of *Halomicronema hongdechloris* – a filamentous cyanobacterium containing chlorophyll f. *Frontiers in Plant Science*. 2014, 5. DOI: 10.3389/fpls.2014.00067. ISSN 1664-462X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00067/abstract>
- [60] Waterborne Pathogens - Manual of Water Supply Practices: 8. Cyanobacteria. M48 (Second edition). American Water Works Association (AWWA), 2006. ISBN 1-58321-403-8. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt008BCLN2/waterborne-pathogens/cyanobacteria-description>
- [61] KÜCK, Ulrich a Nicole FRANKENBERG-DINKEL. Biotechnology: 6. Biotechnological Potential of Cyanobacteria. De Gruyter, 2015. ISBN 978-3-11-034110-2. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt010ZJFC2/biotechnology/biotechnological-potential>
- [62] KLEMENČIČ, M., A.Z. NIELSEN, Y. SAKURAGI, N.-U. FRIGAARD, H. ČELEŠNIK, P.E. JENSEN a M. DOLINAR. Synthetic biology of cyanobacteria for production of biofuels and high-value products. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*. Elsevier, 2017, , 305-325. DOI: 10.1016/B978-0-08-101023-5.00013-3. ISBN 9780081010235. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081010235000133>
- [63] KIM, Yihwan, Jehyun JEON, Min KWAK, Gwang KIM, InSong KOH, Mina RHO a Qunfeng DONG. Photosynthetic functions of *Synechococcus* in the ocean microbiomes of diverse salinity and seasons. *PLOS ONE*. 2018, 13(1). DOI: 10.1371/journal.pone.0190266. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0190266>
- [64] SOMMER, Lumír. Základy analytické chemie. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [65] PACHECO, Sidney, Fernanda PEIXOTO, Renata BORGUINI, Luzimar NASCIMENTO,

Claudio BOBEDA, Manuela SANTIAGO a Ronoel GODOY. Microscale extraction method for HPLC carotenoid analysis in vegetable matrices. *Scientia Agricola*. 2014, **71**(5), 416-419. DOI: 10.1590/0103-9016-2013-0402. ISSN 0103-9016.

- [66] HOLUB, Jiří. Optimalizace kultivace karotenogenních kvasinek na směsných odpadních substrátech [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-07-29]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123930>. Diplomová práce. Vysoké učení technické, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

8 ZOZNAM SKRATIEK

PUFA	– Polynenasýtené mastné kyseliny
MUFA	– Mononenasýtené mastné kyseliny
SFA	– Nasýtené mastné kyseliny
MK	– Mastné kyseliny
ČR	– Česká republika
GB	– Veľká Británia
SRN	– Spolková republika Nemecko
I2	– Inokulum II
HPLC	– Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
GC	– Plynová chromatografia
FID	– Plameňový ionizačný detektor
PDA	– Detektor diódového poľa
C/N	– Pomer uhlíku a dusíku
UV	– Ultrafialové žiarenie
VIS	– Viditeľné žiarenie
TAG	– Triacylglycerol
R	– Referenčné stanovenie