



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

KULTIVACE KAROTENOGENNÍCH KVASINEK V PŘÍTOMNOSTI BIOLOGICKÉHO STRESU INDUKOVANÝM VYBRANÝMI KMENY AUTOTROFNÍCH MIKROŘAS

CULTIVATION OF CAROTENOGENIC YEASTS IN THE PRESENCE OF BIOLOGICAL STRESS INDUCED BY SELECTED
STRAINS OF AUTOTROPHIC MICROALGAE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Pavlína Sikorová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1657/2021
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Pavlína Sikorová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.**

Akademický rok: 2021/22

Název diplomové práce:

Kultivace karotenogenních kvasinek v přítomnosti biologického stresu indukovaným vybranými kmeny autotrofních mikrořas

Zadání diplomové práce:

V rámci této práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- Přehledná literární rešerše zaměřená na vybrané kmeny mikrořas, karotenogenních kvasinek a principy a výhody kokultivace
- Otestování produkčních vlastností vybraných kmenů karotenogenních kvasinek na řasových minerálních médiích
- Kokultivace vybraných kmenů kvasinek se zástupci mikrořas
- Selektce vhodných kokultivačních partnerů
- Optimalizace složení kokultivačního média a podmínek kultivace
- Charakterizace získané biomasy pomocí chromatografických technik
- Vyhodnocení výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

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

Bc. Pavlína Sikorová
studentka

Ing. Martin Szotkowski, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývala především biologickým a nutričním stresem v kultivacích karotenogenních kvasinek a zelených mikrořas. Byl sledován nárůst biomasy v závislosti na kultivačním prostředí, produkce metabolitů (převážně karotenoidů a chlorofylů) a také produkce lipidů a lipofilních látek. Všechny typy těchto stresů se snažily vést ke zvýšení produkce jak biomasy, tak i sledovaných metabolitů.

Teoretická část je zaměřena na popis jednotlivých mikroorganismů, popis produkovaných metabolitů a jejich stručnou biosyntézou. Jsou představeny a podrobněji popsány jednotlivé typy kultivačních stresů. V této části jsou také uvedeny jednotlivé metody určené pro kvantitativní i kvalitativní analýzu sledovaných metabolitů.

Experimentální část je zaměřena na studium produkce biomasy, karotenoidů, chlorofylů, koenzymu Q, sterolů a lipidických látek. Biologický stres byl indukován kokultivací řasy a kvasinky v rámci jednoho média. V případě nutričního stresu se jednalo o kultivace, kdy bylo médium navýšeno o určité množství konkrétních makroprvků, anebo byl do média přidán odpadní olej. Studovanými kvasinkami byly *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula kratochvilovae* a *Sporobolomyces pararoseus*. Zástupce mikrořas tvořili *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus armatus*, *Scenedesmus obliquus*, *Desmodesmus velitaris*, *Desmodesmus communis*, *Coccomyxa* sp. *Chlamydomonas reinhardtii* a *Chlorella minutissima*.

Obecně nejúspěšnější kokultivační multikultivátorové experimenty jsou ty s kvasinkou *R. kratochvilovae*. V případě kultivací na odpadních olejích, byly nejlepšími producenty biomasy a metabolitů kokultivační experimenty s kvasinkou *R. toruloides*. U mikrořasových experimentů bylo zjištěno, že nutriční stres v podobě přidaného glycerolu do média mělo inhibiční vliv na růst i metabolismus mikrořas.

KLÍČOVÁ SLOVA

Karotenogenní kvasinky, mikrořasy, stresové faktory, kokultivace, karotenoidy, chlorofyly, lipidy, odpadní oleje, HPLC/PDA, GC/FID

ABSTRACT

Presented Master's thesis was focused on biological and nutrient stress in cultivations of green microalgae and carotenogenic yeasts. The focus of interest was production of biomass in different types of cultivation media, production of metabolites (mainly carotenoids and chlorophylls) and also production of lipids and lipophilic substances. All types of applied stress was used to lead to an increased production of biomass and metabolites.

The theoretical part deals with introduction of individual genera of carotenogenic yeast and green microalgae. The types of cultivation stress were also described. In addition, the analytic methods for qualitative and quantitative analysis are also introduced.

The experimental part was focused on the study of biomass, carotenoids, chlorophylls, coenzyme Q, sterols and lipids production. Biological stress was induced by cocultivation of microalgae and yeasts together. Nutrient stress meant adding macroelements or waste oils to the medium. Yeasts of interest were *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula kratochvilovae* and *Sporobolomyces pararoseus*. Microalgae was represented by *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus armatus*, *Scenedesmus obliquus*, *Desmodesmus velitaris*, *Desmodesmus communis*, *Coccomyxa* sp. *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella minutissima*.

Generally the most successful multicultivator experiment was cocultivation with yeast *R. kratochvilovae*. In the case of cultivation on waste oils, the best producers of biomass and metabolites were co-cultivation experiments with the yeast *R. toruloides*. In microalgal experiments, it was found that nutritional stress in the form of glycerol added to the medium had an inhibitory effect on the growth and metabolism of microalgae.

KEYWORDS

Carotenogenic yeasts, microalgae, stress factors, co-cultivation, carotenoids, chlorophylls, lipids, waste oils, HPLC/PDA, GC/FID

SIKOROVÁ, Pavlína. *Kultivace karotenogenních kvasinek v přítomnosti biologického stresu indukovaným vybranými kmeny autotrofních mikrořas*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139143>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martin Szotkowski.

Prohlášení

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

.....
podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala své rodině za velkou psychickou i finanční podporu. Dále také svému vedoucímu Ing. Martinu Szotkowskému za cenné rady, trpělivost a pomoc při vypracovávání a řešení diplomové práce.

OBSAH

ABSTRAKT	3
1 Úvod.....	9
1 Teoretická část	10
1.1 Řasy	10
1.1.1 Morfologie mikrořas	10
1.1.2 Světelná fáze fotosyntézy a Calvinův cyklus	11
1.1.3 Rozmnožování mikrořas.....	13
1.1.4 Vybrané druhy mikrořas.....	13
1.2 Kvasinky	14
1.2.1 Cytologie kvasinek.....	14
1.2.2 Rozmnožování kvasinek.....	15
1.3 Karotenogenní kvasinky	16
1.3.1 Vybrané druhy červených kvasinek	16
1.4 Produkované metabolity	18
1.4.1 Izoprenoidy	18
1.4.2 Lipidy	24
1.5 Vliv prostředí na růst a rozmnožování mikroorganismů	26
1.5.1 Růst mikroorganismů	26
1.5.2 Biologické stresové faktory	27
1.6 Nutriční potřeby mikroorganismů	28
1.6.1 Výživa mikrořas.....	28
1.6.2 Výživa kvasinek.....	29
1.7 Odpadní substráty.....	29
1.7.1 Oleje	29
1.7.2 Syrovátka.....	30
1.8 Analytické metody.....	30
1.8.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	30
1.8.2 Plynová chromatografie (GC).....	31
1.8.3 Spektrofotometrie.....	31
2 Cíl práce	32
3 Experimentální část	33
3.1 Použité chemikálie.....	33

3.1.1	Chemikálie pro kultivaci kvasinek, mikrořas a sinic	33
3.1.2	Chemikálie pro extrakce, transesterifikaci a analýzu pro GC a HPLC	33
3.2	Přístroje a pomůcky	33
3.2.1	Přístroje a pomůcky pro kultivace	33
3.2.2	Přístroje pro izolaci a analýzu vybraných analytů	34
3.3	Použité mikroorganismy	34
3.3.1	Kvasinky	34
3.3.2	Mikrořasy	34
3.4	Kultivace mikroorganismů	35
3.4.1	Kultivace karotenogenních kvasinek	35
3.4.2	Kultivace mikrořas s glycerolovým stresem	37
3.4.3	Kokultivace mikrořas a kváinek na odpadních olejích	37
3.4.4	Zpracování vzorků	38
4	Výsledky a diskuze	40
4.1	Multikultivátorové kokultivační experimenty	40
4.1.1	<i>Rhodosporidium toruloides</i> a <i>Desmodesmus armatus</i>	40
4.1.2	<i>Rhodosporidium toruloides</i> a <i>Desmodesmus acutus</i>	43
4.1.3	<i>Rhodosporidium toruloides</i> a <i>Scenedesmus obliquus</i>	46
4.1.4	<i>Rhodosporidium toruloides</i> a <i>Desmodesmus velitaris</i>	48
4.1.5	<i>Sporobolomyces pararoseus</i> a <i>Coccomyxa</i> sp.	50
4.1.6	<i>Sporobolomyces pararoseus</i> a <i>Desmodesmus armatus</i>	53
4.1.7	<i>Rhodotorula kratochvilae</i> a <i>Desmodesmus communis</i>	55
4.1.8	<i>Rhodotorula kratochvilae</i> a <i>Desmodesmus armatus</i>	58
4.1.9	<i>Rhodotorula kratochvilae</i> a <i>Desmodesmus velitaris</i>	60
4.1.10	<i>Rhodotorula kratochvilae</i> a <i>Desmodesmus acutus</i>	63
4.1.11	<i>Rhodotorula kratochvilae</i> a <i>Scenedesmus obliquus</i>	65
4.2	Experimenty kokultivací s odpadními oleji	68
4.2.1	<i>Rhodotorula kratochvilae</i> a <i>Desmodesmus velitaris</i>	68
4.2.2	<i>Rhodotorula kratochvilae</i> a <i>Desmodesmus communis</i>	70
4.2.3	<i>Rhodotorula kratochvilae</i> a <i>Desmodesmus armatus</i>	72
4.2.4	<i>Rhodotorula kratochvilovae</i> a <i>Scenedesmus obliquus</i>	74
4.2.5	<i>Rhodotorula kratochvilae</i> a <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	76
4.2.6	<i>Rhodotorula kratochvilae</i> a <i>Desmodesmus acutus</i>	78

4.2.7	<i>Rhodotorula kratochvilae</i> a <i>Chlorella minutissima</i>	80
4.2.8	<i>Rhodosporidium toruloides</i> a <i>Desmodesmus velitaris</i>	82
4.2.9	<i>Rhodosporidium toruloides</i> a <i>Desmodesmus communis</i>	84
4.2.10	<i>Rhodosporidium toruloides</i> a <i>Desmodesmus armatus</i>	86
4.2.11	<i>Rhodosporidium toruloides</i> a <i>Scenedesmus obliquus</i>	88
4.2.12	<i>Rhodosporidium toruloides</i> a <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	90
4.2.13	<i>Rhodosporidium toruloides</i> a <i>Chlorella minutissima</i>	93
4.2.14	<i>Rhodosporidium toruloides</i> a <i>Desmodesmus acutus</i>	95
4.3	Experimenty mikrořas s glycerolem.....	98
4.3.1	<i>Desmodesmus communis</i>	98
4.3.2	<i>Desmodesmus armatus</i>	100
4.3.3	<i>Scenedesmus obliquus</i> a <i>Desmodesmus acutus</i>	102
5	Závěr.....	103
6	Seznam použité literatury	106
7	Seznam použitých zkratek a symbolů	112

1 Úvod

V posledních letech rapidně vzrůstá zájem o vývoj biotechnologických metod, ve kterých jsou odpadní substráty zpracovávány rozmanitými mikroorganismy. Mnoho potravinářských odpadů jako je syrovátka, tuky, oleje, kávová sedlina a další jsou poměrně složitě zpracovatelné, a navíc mnoho z nich obsahuje velké množství živin, pro které je možné najít biotechnologické uplatnění, a tak zajistit jejich lepší a účinnější zpracování. V rámci této diplomové práce se pracuje s kvasinkami a mikrořasami a možnosti jejich využití při zpracování právě těchto potravinářských odpadů.

Kvasinky jsou prvními biotechnologicky využívanými mikroorganismy. Používají se už po mnoho let k produkci kvasných produktů (např. piva, vína a dalších). Jejich další využití spočívá v produkci enzymů, polysacharidů a lipidických látek. Karotenogenní kvasinky jsou specifické svým enzymatickým aparátem schopným syntetizovat karotenoidní látky. Patří do skupiny oleogenních mikroorganismů díky své schopnosti produkovat velké množství lipidů. Karotenogenní kvasinky jsou schopny získávat živiny z mnoha různých druhů produkčních médií, mezi které mohou patřit i již zmíněné odpady potravinářského průmyslu. Díky jejich vysoké rychlosti růstu a schopnosti zpracovávat potravinářské odpady se stávají velmi důležitými a slibnými biotechnologickými mikroorganismy. Jsou schopné produkce velkého množství biomasy s vysokým obsahem tělu prospěšných látek za velice krátký čas.

Mikrořasy a sinice jsou autotrofními mikroorganismy schopné produkce stejných metabolitů jako kvasinky, navíc ale produkují i látky pro ně specifické (např. chlorofyly). Ve většině případů jsou striktně aerobní a nejsou schopny získávat uhlík z organických zdrojů a odpadních substrátů. Jejich velkou výhodou je ale to, že jako zdroj uhlíku využívají oxid uhličitý a mají menší požadavky na množství solí v médiu, čímž se náklady na jejich kultivaci snižují. Mikrořasy také spadají pod oleogenní mikroorganismy, kdy jejich produkce lipidických látek může překročit až 50% hmotnosti jejich biomasy. Nevýhodou ale je jejich pomalý růst, nízká produkce biomasy a poměrně velké nároky na produkční podmínky (dostatečný přísun světla a vzduchu, přesně dané složení produkčního média a vysoké nároky na sterilitu prostředí a média).

Mimo zpracování zmíněných potravinářských odpadů mají tyto typy kultivací velký potenciál v produkci metabolitů, které mají velké antioxidační schopnosti, dále to mohou být esenciální mastné kyseliny a prekurzory velké škály vitamínů.

1 Teoretická část

1.1 Řasy

Řasy jsou skupinou fototrofních jednobuněčných nebo mnohobuněčných eukaryotických organismů. Mnohobuněčné řasy jsou vývojově vyspělejší a jsou diferencovány do struktur, které plní různé funkce. Nacházejí se všude na planetě a potřebují ke svému růstu a správnému vývoji vodu. U komplexnějších mnohobuněčných mikrořas jsou nároky na vodu mnohem vyšší a její přítomnost je striktně vyžadována. Tyto mikroorganismy se mohou nacházet jak ve slané, tak i ve sladké vodě.

Obecně se dá říci, že neexistuje přesná definice řas. Celá skupina sice sdílí určité prvky, jako například zelený pigment chlorofyl, který zastává funkci primárního fotosyntetického pigmentu. Obecná struktura a morfologie chloroplastů naznačuje, že všechny mikrořasy mají společného předchůdce sinice. Nicméně v procesu vývoje mikrořas se od sebe jednotlivé druhy nezanedbatelně liší. Kmeny mikrořas se rozdělují do několika skupin:

- (a) *Rhodopyta* (Červené řasy)
- (b) *Dinophyta*
- (c) *Cryptophyta*
- (d) *Chromophyta* (Hnědé řasy)
- (e) *Euglenophyta*
- (f) *Chlorophyta* (Zelené řasy)

Jednobuněční zástupci řas se označují jako mikrořasy. Je to méně vyvinutá forma řas. Jejich předchůdce vznikl endosymbiózou heterotrofní eukaryotické buňky se sinicí. Mikrořasy se nacházejí všude na světě, dokonce i v arktických podmínkách. Evolučně se vyvinuly tak, aby byly schopny přežít v podstatě ve všech podmínkách, ať už na nejsušších místech planety (*Chroococcoidiopsis* sp.) nebo ve velmi kyselém prostředí (*Coccomyxa* sp.)

Zastupují esenciální část potravinového řetězce a společně se sinicemi jsou zodpovědné za přibližně až 50% fotosynteticky produkovaného O₂ na Zemi. [1] -[4]

1.1.1 Morfologie mikrořas

Mikrořasy sdílí základní charakteristiky a strukturu eukaryotických buněk. Hlavní rozdíl je v přítomnosti chloroplastů. Chloroplasty jsou semi-autonomní orgány schopné replikace, transkripce a translace genů. Jsou tvořeny vnější membránou, která obklopuje vnitřní matrix chloroplastu. Vnitřní membránu tvoří diskovité útvary thylakoidy, které jsou sloupcovité naskládány na sobě a tvoří granum.

Buněčná stěna mikrořas je složena primárně z celulózy, která je poskládána v několika vrstvách a tím tvoří tenkou ochrannou vrstvu. Jiné molekuly přítomné v buněčné stěně jsou ligniny, hemicelulózy, alginát, fucin a fucoidin. Přítomnost těchto látek závisí na specifickém druhu mikrořasy. Extrémofilní kmeny mají mnohem tlustší buněčnou stěnu a její složení je přímo závislé na prostředí, ve kterém žijí. U mikrořas je velmi časté tvoření kolonií, které jsou zapouzdřené do cenobií. Tyto struktury se skládají z derivátů polysacharidů, terpenů nebo lipidů. Další typickou strategií je vytvoření schránky podobné struktury jako u již výše zmíněných cenobií u jednobuněčných mikrořas. Buněčná stěna nemůže být příliš tlustá.

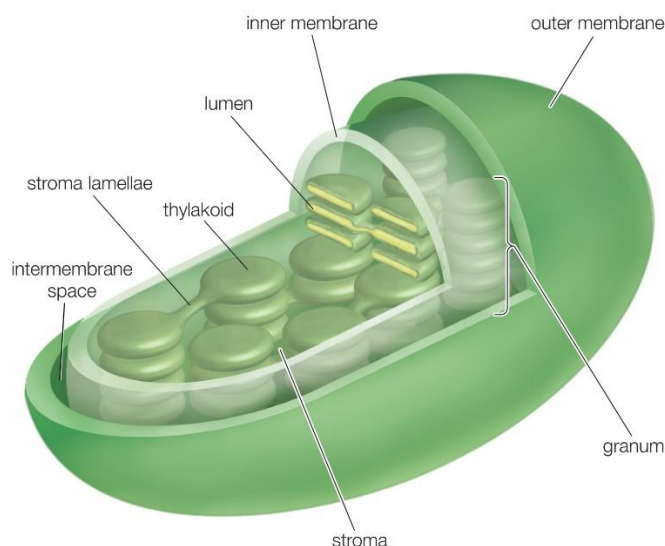
Lze konstatovat, že její tloušťka je kompromisem mezi ochrannou funkcí a schopností přijmout a propouštět do buňky co největší množství světla. [1]-[4]

1.1.2 Světelná fáze fotosyntézy a Calvinův cyklus

Fotosyntéza je biologický proces, ve kterém je zachycena sluneční energie a sérií procesů je přeměněna z energie světla na energii potřebnou k životu. Fotosynteticky aktivní vlnové délky se nacházejí v rozmezí od 400 do 700 nm.

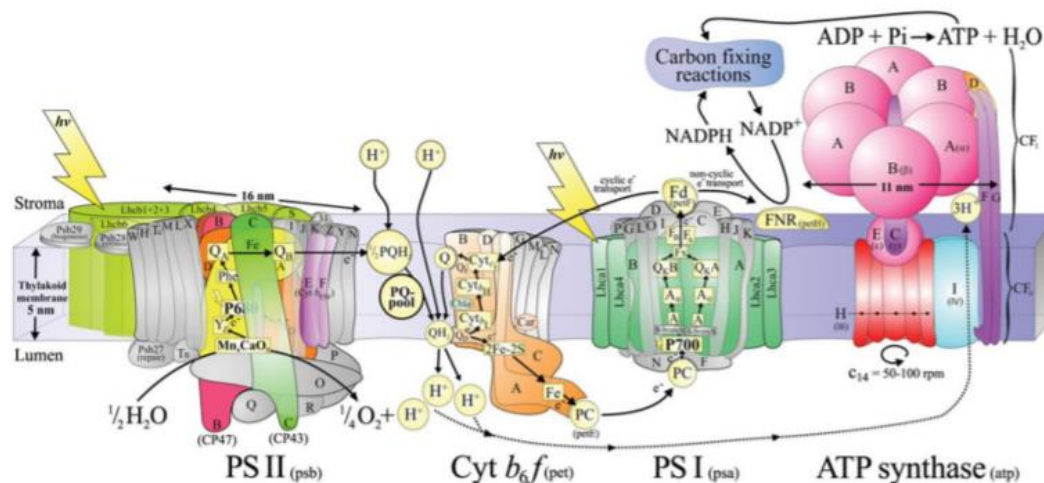
V zelených eukaryotických buňkách probíhá fotosyntéza v útvech známých jako chloroplasty. Tyto organely obsahují pigmenty chlorofyly a pomocná barviva a ve většině případů zahrnují všechny významné fáze fotosyntézy.

Uvnitř chloroplastů se vyskytují vnitřní membránové struktury thylakoidy. Celý vnitřní prostor chloroplastů vyplňuje hustý roztok stroma, která obsahuje velké množství rozpustných enzymů. V prokaryotických fotosyntetických buňkách probíhá fotosyntéza na speciálních membránách odvozených od buněčné cytoplazmy. [5]



Obrázek 1: Struktura chloroplastu [6]

Hlavní složky oxygenní fotosyntézy jsou dva fotochemická reakční centra, která spolu pracují v takzvaném necyklickém elektronovém transportním řetězci. Tato centra se označují jako fotosystém I (PSI) a fotosystém II (PSII). PSII rozkládá Hillovou reakcí vodu a využívá vzniklé elektrony. Jako odpadní produkt vzniká kyslík. Elektrony vzniklé rozpadem vody jsou přenášeny chinony a cytochrom b6f komplexem do PSI. V tomto fotosystému se akceptor elektronů NADP^+ redukuje na NADPH. Protony vzniklé Hillovou reakcí z vody jsou přenášeny elektrochemickým gradientem do lumenu thylakoidů a dále slouží k produkci ATP. [5][7]



Obrázek 2: Schéma světelné fáze fotosyntézy [3]

Jako Calvinův cyklus se označuje metabolická dráha fotosyntézy, která zpracovává produkty světelné fáze fotosyntézy (ATP a NADPH) a dále je používá k fixaci oxidu uhličitého za vzniku uhlikátého skeletu. V tomto metabolickém cyklu probíhá 13 reakcí katalyzovaných 11 enzymy. Klíčovým enzymem poté ribulosa bisfosfát karboxyláza (Rubisco). [5]

Calvinův cyklus se skládá ze tří fází:

1. Fixace oxidu uhličitého ribulosa-1,5-bisfosfátem za vzniku dvou molekul 3-fosfoglycerátu
2. Redukce 3-fosfoglycerátu za vzniku hexózových cukrů
3. Zpětná regenerace ribulosa-1,5-bisfosfátu a následná fixace dalších molekul CO_2

Proces karboxylace produkuje 3-fosfoglycerát. Následuje druhá fáze Calvinova cyklu-redukční fáze. Tato část využívá produkty vytvořené ve světelné fázi fotosyntézy (ATP a NADPH) a energii v nich uloženou k vytvoření sacharidů. Jmenuje se redukční fáze z toho důvodu, že se využívá redukce NADPH, který poskytuje elektron 3-fosfoglycerátu a tím je možné vytvořit jednoduchý cukr glyceraldehyd-3-fosfát. Poslední regenerační fáze Calvinova cyklu slouží jednak k tvorbě sacharidů (převážně glukózy) a také k regeneraci původní molekuly ribulosa-1,5-fosfátu. Oba tyto procesy využívají jako prekurzor vzniklý glyceraldehyd-3-fosfát. Tato fáze vyžaduje dodání energie v podobě ATP molekul a obsahuje sérii mnoha reakcí. Celý cyklus musí proběhnout šestkrát, aby byla vytvořena jedna molekula glukózy z původního CO_2 . [8]

Každé proběhnutí Calvinova cyklu fixuje jednu molekulu CO_2 . Cyklus musí proběhnout třikrát, aby se vytvořil glyceraldehyd-3-fosfát. Po šesti cyklech se mohou spojit dvě molekuly glyceraldehyd-3-fosfátu za vzniku glukózy. Každý průběh cyklu spotřebovává 3 ATP a 2 NADPH a regeneruje ribulosa-1,5-bisfosfát. Celková spotřeba ATP a NADPH k vytvoření jedné molekuly glukózy činí 18 ATP a 12 NADPH. [8]

1.1.3 Rozmnožování mikrořas

Mikrořasy se nejčastěji rozmnožují vegetativně nebo nepohlavně. Buď rozdělením buňky, oddělením části kolonie nebo produkcí pohyblivých sporů. Z mateřské buňky vznikají dvě totožné dceřiné buňky. Toto dělení může být přímé nebo podélné. Některé mikrořasy se rozmnožují i pohlavně. Tím umožní výměnu genetické informace a udržuje genetickou různorodost v populaci. [9]

1.1.4 Vybrané druhy mikrořas

1.1.4.1 Rod *Desmodesmus*

Rod *Desmodesmus* původně patřil do rodu *Scenedesmus*. Na přelomu 70. a 80. let dvacátého století byl tento rod rozdělen do tří podrodů: *Scenedesmus*, *Desmodesmus* a *Acutodesmus*. V roce 1997 došlo ke sloučení podrodů *Scenedesmus* a *Acutodesmus*. Tím zůstaly pouze dva taxonomické podrody: *Scenedesmus* a *Desmodesmus*.

Charakteristickým znakem pro rod *Desmodesmus* je tvorba lineárních cenobií, složených nejčastěji ze 4 (ale mohou se skládat i ze 2, 8 a více buněk). Cenobiální buňky jsou vřetenovitého tvaru s mírně zaoblenými vrcholy. *Desmodesmus* je v současné době jediný známý organismus obsahující chlorofyly, který je schopný způsobit lidem infekci. [10][11]

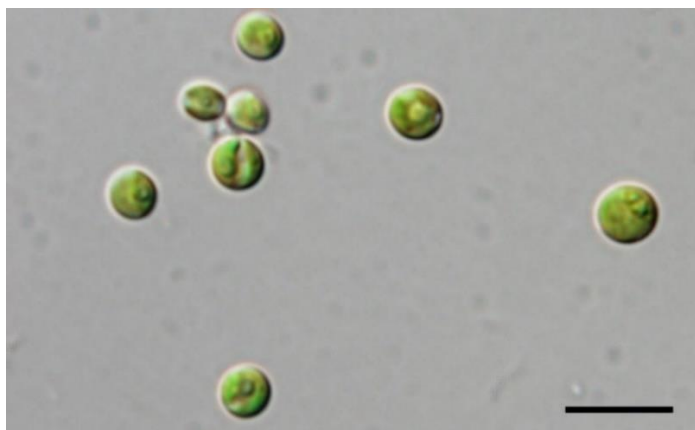


Obrázek 3: *Desmodesmus communis* [12]

1.1.4.2 Rod *Chlorella*

Chlorella je jednou z nejznámějších mikrořas, kdy bylo identifikováno přes sto druhů. Vyskytuje se buď jednotlivě nebo ve shlucích ve sladké i slané vodě a půdě. Buňka je kruhového tvaru a obsahuje pohárkovité chloroplasty a škrobová zrna. Rozmnožují se nepohlavně za pomoci spor. Velikost se pohybuje v rozmezí 2 μm-10 μm.

Velmi často se používá jako doplněk stravy. Zástupci tohoto rodu jsou *Chlorella vulgaris*, *Ch. sorokiniana* a *Ch. pyrenoidosa*. [13]



Obrázek 4: *Chlorella vulgaris* [14]

1.2 Kvasinky

Přestože většina hub existuje ve formě vícebuněčných organismů, některé druhy si osvojily jednobuněčnou existenci. Takovým organismům se říká kvasinky. [15]

V přírodě je to převládající organismus schopný zpracovat uhlovodíky. Také zahrnují důležité organismy využívané v průmyslu (např. *Saccharomyces cerevisiae* jako pekařské droždí), některé patogeny, a také slouží jako modelové mikroorganismy ve vědeckém světě pro pochopení, jak přesně fungují eukaryotické buňky. Bylo popsáno několik set druhů kvasinek, ale to pořád představuje jen malou část všech kvasinek žijících na Zemi.

Jako heterotrofní organismy vyžadují příjem energie z uhlíkového zdroje (většinou uhlovodíky). Vedle vegetativního rozmnožování pučením a dělením jsou schopny také pohlavního rozmnožování. [15]

1.2.1 Cytologie kvasinek

Kvasinková buňka se skládá ze silné buněčné stěny, pod kterou se nachází cytoplazmatická membrána sloužící k ochraně cytoplazmy.

V cytoplasmě se nachází jádro oddělené od ní dvojitou membránou, stejně jako organely typické pro eukaryotické buňky jako endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, mitochondrie, plastidy, vakuoly a ribosomy. [16]-[20]

Hlavním úkolem buněčné stěny je ochránit buňku před vnějšími vlivy a oddělit ji od prostředí. Současně ale musí zajistit dostatečný transport živin do buňky.

Taky umožňuje individuálním buňkám spolu v rámci kolonie komunikovat. Kvasinková buněčná stěna se skládá z chitinové vrstvy, na které se nachází vrstva β -glukanů.

β -glukany se skládají z monosacharidových jednotek, které jsou spojeny β -1,3-glykosidickými vazbami a větvení je umožněno díky β -1,6-glykosidickým vazbám. Vrstva proteinů a fosfátů, která tvoří finální vrstvu obsahuje i krátké řetězce manózy. [17]-[20]

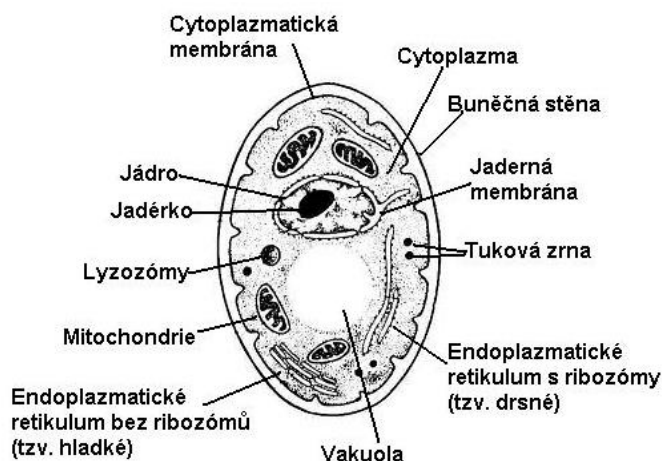
Cytoplazmatická membrána se skládá z fosfolipidové dvojvrstvy, kde jsou proteiny, steroly, antioxidanty, signální molekuly a další jsou dále upevňovány a rozpouštěny. Cytoplazmatická membrána obklopuje buněčné protoplasty. Membrána je semipermeabilní a vytváří rozhraní mezi buňkou a prostředím. Je neomezeně propustná pro malé molekuly a plyny. Větší molekuly musí procházet skrze transportní kanály. [17]-[20]

Cytoplazma je průhledná hmota, ve které jsou lokalizovány všechny buněčné organely, enzymy a zásobní látky. Nachází se zde endoplazmatické retikulum (ER), které je tvořeno systémem membrán a je zodpovědné za syntézu a formování proteinů v oblasti nazývané drsné ER. V části hladkého ER probíhají procesy přeměny a modifikace lipidů, polysacharidů, syntéza karotenoidů a další enzymatické reakce. Dále se v cytoplazmě nachází mitochondrie, které slouží jako zásobárna energie pro buňku. V mitochondriích jsou enzymy dýchacího řetězce a oxidativní fosforylace. Mitochondrie patří mezi semi-autonomní organely (podobně jako chloroplasty), což znamená, že mají samostatnou schopnost replikace, transkripce a translace nukleových kyselin. [16]-[20]

V cytoplazmě se dá nalézt i útvar známý jako vakuola. Tvoří se jako sférický útvar obklopen jednovrstevnou membránou. Její funkcí je skladování všech nezbytných enzymů a látek.

Golgiho aparát je mezimembránová formace ve formě vezikul. Jeho primární funkcí jsou posttranslační úpravy proteinů, jejich transport do cílového místa a syntéza polysacharidů. [17]-[20]

Další důležitou organelou je jádro, které je od cytoplazmy odděleno pórovitou jadernou membránou. Je nositelem genetické informace buňky. Zajišťuje nezbytný proces dělení buňky. [16]-[20]



Obrázek 5: Cytologie kvasinkové buňky [21]

1.2.2 Rozmnožování kvasinek

U kvasinek se vyskytují dva typy rozmnožování, pohlavní a vegetativní. Vegetativní rozmnožování se dále dělí na pučení a dělení. V případě pohlavního rozmnožování se vytvářejí spóry a ty mohou být buď askospory nebo bazidiospory.

Na základě těchto spor se kvasinky dělí na *Basidiomycota* (stopkovýtrusné) a *Ascomycota* (vřeckovýtrusné). Karotenogenní kvasinky upřednostňují hlavně nepohlavní rozmnožování.

1.2.2.1 Nepohlavní rozmnožování

Drtivá většina kvasinek preferuje pučení jako typ vegetativního rozmnožování. V procesu pučení se na povrchu mateřské buňky vytvoří malá dceřinná buňka.

Na začátku procesu se membrány ER spojí a pak rozdělí. Proces se opakuje do vytvoření dostatečného množství membrány. Tvar mitochondrie se změní a protáhne do válcovitého tvaru.

Tento krok je následován procesem jaderného mitotického dělení a současně jeho migrací (spolu s dalšími organelami jako mitochondriemi, vakuolami atd) do nově se tvořícího pupenu. Potom, co všechny potřebné organely do pupenu dorazí se kanál mezi dceřinou a mateřskou buňkou uzavře. Na obou buňkách se vytvoří nová buněčná stěna a na mateřské buňce vznikne charakteristická jizva po pučení. Mateřská a dceřinná buňka jsou geneticky totožné. [17]-[20]

1.2.2.2 Pohlavní rozmnožování

Pohlavní rozmnožování u kvasinek znamená, že se spojí dvě buňky s haploidním charakterem (obsahujícím jednu sadu chromozomů). Proces se jinak nazývá také kopulace nebo konjugace. Po spojení dvou jader dochází ke vzniku diploidního jádra. To je meiózou štěpeno na 4 nová jádra. Každé nově vzniklé jádro je opět haploidní a obsahuje polární tělísko s mikrotubuly. [16]

1.3 Karotenogenní kvasinky

Některé druhy kvasinek produkují karotenoidní pigmenty jako jsou β -karoten, torulen a torularhodin. Díky těmto pigmentům získávají kvasinky své charakteristické žluté, oranžové neb červené zbarvení a jsou nazývány jako červené (karotenogenní) kvasinky. Tyto pigmenty jsou produkovány obzvláště ve stresových situacích, a to převážně oxidační a světelný stres. Je to skupina nepříbuzných mikroorganismů. Taxonomicky se řadí převážně do třídy *Basidiomycetes*, díky skutečnosti, že se většina z nich vyznačuje tvorbou bazidiospor. Jedná se o kvasinky, které jsou všudypřítomné. Mohou se nacházet ve slané a sladké vodě, na rostlinách, také v potravinách a často bývají asociovány se zvířaty. Dalšími metabolickými produkty těchto kvasinek mohou být ergosterol, nenasycené mastné kyseliny, koenzymy Q9 a Q10. [22]-[26]

1.3.1 Vybrané druhy červených kvasinek

1.3.1.1 Rod *Rhodotorula*

Rod *Rhodotorula* je striktně aerobní. Je schopný produkce glykogenu během exponenciální fáze růstu a lipidů a karotenoidů během stacionární fáze růstu. Mají elipsoidní tvar a oranžově-červenou barvu. Jejich velikost je 5 μ m a mohou se rozmnožovat jak pohlavně, tak nepohlavně. Vyskytují se v půdě, ve vzduchu a přidavkem v mléce a mléčných produktech. [27]

Rhodotorula produkuje ureázu a nemá schopnost přijímat inositol a zkvašený cukr. Některé druhy jsou hlavními producenty karotenoidů s převládající syntézou β -karotenu, torulenu a torularhodinu. Jsou také skvělým zdrojem proteinů, lipidů a vitamínů. Nejznámějším zástupcem je *Rhodotorula kratochvilovae*, známá svou produkcí lipidů ve formě triacylglycerolů (TAG). Dalšími druhy jsou *R. mucilaginosa*, *R. psychrophila* a *R. glacialis*. [27][28]

Některé druhy jsou schopné neobvyklého tvoření pseudomycelií, které by mohlo mít souvislost s gastrointestinální poruchou. [28]

Do tohoto rodu spadají i kvasinky *Rhodosporidium*.

Jediným rozdílem mezi nimi je to, že kvasinky rodu *Rhodotorula* se rozmnožují nepohlavně pučením nebo dělením, zatímco kvasinky rodu *Rhodosporidium* se rozmnožují pohlavně. Zástupci tohoto rodu jsou *Rhodosporidium azoricum*, *Rhodosporidium diobovatum*, *Rhodosporidium kratochvilovae*, a *Rhodosporidium toruloides*. [29][30]



Obrázek 6: *Rhodotorula kratochvilovae*

1.3.1.2 Rod *Sporobolomyces*

Do rodu *Sporobolomyces* spadá asi 20 druhů červených kvasinek. Patří do čeledi *Basidiomycotes* a vytvářejí většinou symetrické balistokonidie.

Jedná se o mikroorganismy vyskytující se v atmosféře a fylosféře, kde je častým zdrojem výživy dusíku nitrát nebo redukované formy dusíkatých sloučenin. Tyto kultury nemají kvasné schopnosti. Buňky jsou tmavě červené, kulovité (elipsoidní až protáhlé) s velikostí 5-18 μm . Rod *Sporidiobolus* je telomorfem (rozmnožuje se pohlavně) *Sporobolomyces*. Zástupci tohoto rodu mohou být *Sporobolomyces roseus* a *Sporobolomyces salmonicolor*. [22]



Obrázek 7: *Sporobolomyces pararoseus*

1.4 Produkované metabolity

1.4.1 Izoprenoidy

Izoprenoidy jsou jednou z nejstarších a nejrozsáhlejších skupin látek na Zemi. Řadí se zde přes 30 000 zástupců s rozlišnými strukturami a funkcemi. Mohou to být růstové faktory, esenciální oleje, jedy, feromony a různé polymery nacházející se ve všech organismech.

Dlouhé nenasyčené izoprenoidní řetězce se nacházejí ve struktuře ubichinonu, známého také jako koenzym Q₁₀. Do skupiny izoprenoidů se řadí také steroly. Je to skupina látek, které jsou esenciálními složkami biomembrán. V neposlední řadě se mezi izoprenoidy pokládají také karotenoidy.

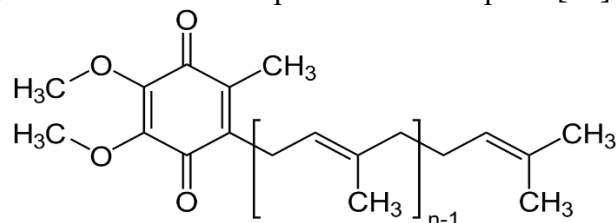
Izoprenoidy jsou odvozené od pěti uhlíkaté struktury izoprenu. Obrovská diverzita struktur a rozmanitost funkcí a rysů jednotlivých zástupců jsou podmíněny počtem zkondenzovaných izoprenoidních jednotek, jejich konkrétní cyklizací, oxidací a dalšími reakcemi. [35]-[39]

1.4.1.1 Ubichinon

Ubichinon, známý také jako koenzym Q, patří do skupiny molekul sdílejících základní strukturu chinonového jádra. Zbytek molekuly se skládá z polyprenylového řetězce vzniklého kondenzací izoprenových jednotek. Počet izoprenových jednotek a délka řetězce jsou vyjádřeny číslem ve jméně molekuly, např. koenzym Q₁₀. Tento koenzym je nejznámějším zástupcem a je přítomen ve většině eukaryotických buněk, primárně v mitochondriích. [40]-[42]

Jeho hlavní využití je v dýchacím řetězci, ve kterém sbírá a transportuje elektrony vzniklé re oxidací FADH₂ a NADH+H⁺ kofaktorů.

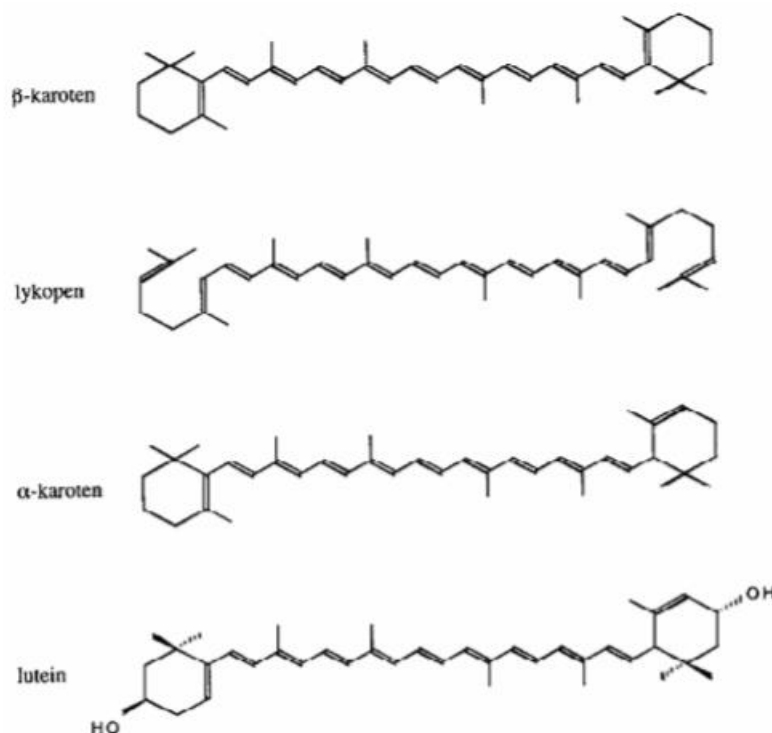
Je také významným antioxidantem a chrání lipidické membrány před oxidačním poškozením a peroxidací. Nejvíce je spojován s kosmetickým a farmaceutickým průmyslem. Používá se v kosmetice, která má zamezit a zpomalit stárnutí pleti. [40]-[43]



Obrázek 8: Struktura molekuly ubichinonu

1.4.1.2 Karotenoidy

Karotenoidy jsou velkou různorodou skupinou přírodních pigmentů nacházejících se na celé planetě a zastávají mnoho důležitých funkcí. Nacházejí se v nižších i vyšších organismech, jako sinicích, bakteriích, kvasinkách, řasách a rostlinách. Chemicky se jedná o deriváty terpenů skládajících se z 8 izoprenových (pětiuhlíkatých) jednotek. Jsou charakteristické svým žlutým, oranžovým nebo červeným zbarvením. [44]-[46]



Obrázek 9: Struktura vybraných molekul karotenoidů

1.4.1.2.1 Funkce karotenoidů

Karotenoidy mají množství esenciálních biologických funkcí. Poskytují ochranu fotosyntetizujícím ale i ostatním organismům fotooxidativní ochranu proti účinku singletového kyslíku a jeho radikálů tvořených v přítomnosti světla. U zvířat a lidí jsou tyto molekuly prekurzorem vitamínu A, retinolu a retinové kyseliny. Tím mají velmi jedinečnou úlohu ve výživě a v procesu buněčné diferenciaci. U lidí jsou to také látky schopné prevence různých nemocí, jako je rakovina, srdeční a cévní onemocnění a další.

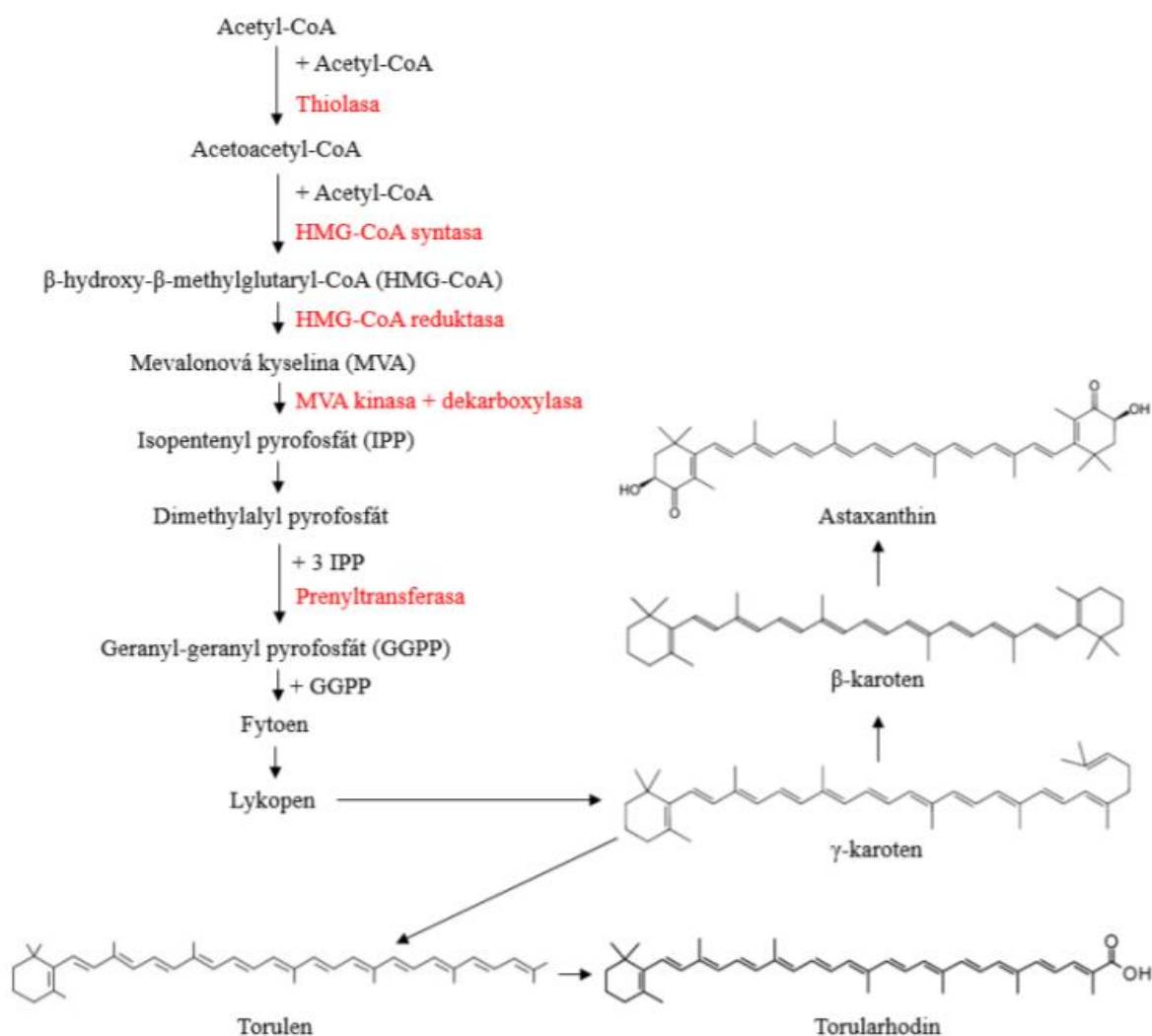
U rostlin slouží jako regulátory růstu a vývoje, pigmenty účastníci se fotosyntézy a slouží jako prekurzory pro kyselinu abscisovou (ABA) a strigolaktony. Jednou z jejích funkcí jsou také atraktanty. [47][48]

Mimo jiné jsou také využívány průmyslově, a to jako nutriční suplementy, potravinářská barviva, přídavek do krmiva pro zvířata a pro farmaceutické účely. Důsledkem toho jsou karotenoidy velmi studovanými látkami. [47][48]

1.4.1.2.2 Biosyntéza karotenoidů

Karotenoidy jsou produkty izoprenoidní dráhy, která je součástí primárního i sekundárního metabolismu. Jejich syntéza je dvoukrokový proces. Prvním krokem je syntéza aktivní izoprenové jednotky ve formě izopenentyl pyrofosfátu (IPP) nebo dimethylallyl pyrofosfátu (DMAPP). Toto je součástí sekundárního metabolismu nezbytného pro všechny organismy, protože vyjma karotenoidů slouží aktivovaná forma izoprenu k syntéze jiných esenciálních molekul (sterolů, steroidních hormonů nebo ubiquinonu).

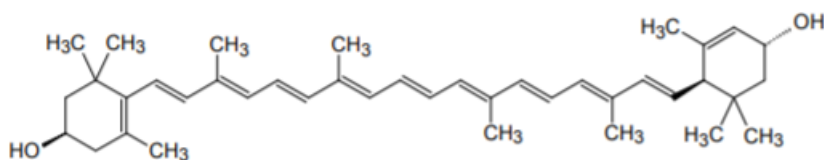
Ve druhém kroku procesu je syntéza IPP je následována sledem kondenzačních reakcí. Tyto aktivní jednotky se na sebe připojují třemi různými způsoby: „hlava-hlava“, „pata-pata“, „pata-hlava“. [44][49] -[51]



Obrázek 10: Biosyntéza karotenoidů. Červeně jsou značeny enzymy katalyzující reakce [52]

1.4.1.3 Lutein

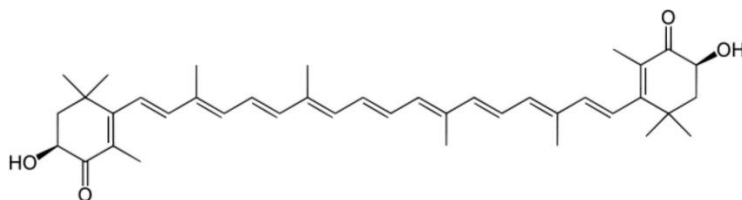
Lutein je žlutý rostlinný pigment patřící mezi karotenoidy, konkrétně mezi xanthofyly. Xanthofyly jsou oxidovanými karotenoidy. Ve své čisté formě je to červeno-oranžová krystalická látka nerozpustná ve vodě, ale rozpustná v tucích a polárních rozpouštědlech. Je přítomen v mnoha druzích ovoce a zeleniny, nachází se ale i ve vaječném žloutku a očních tkáních. V lidském těle nemá lutein schopnost přeměnit se na vitamin A, ale je velmi účinným antioxidantem. Největší význam pro člověka spočívá v jeho schopnosti neutralizovat volné radikály vznikající v důsledku působení UV paprsků na oční sítnici a tím oči chrání. Zastavuje také degenerativní změny na žluté skvrně, které často bývají příčinou slepoty. Lidské tělo jej neumí syntetizovat, a proto jeho příjem zcela závisí na přírodních zdrojích jako již zmíněném ovoci a zelenině, popř. potravinových doplncích. [53]



Obrázek 11: Struktura molekuly luteinu

1.4.1.4 Astaxanthin

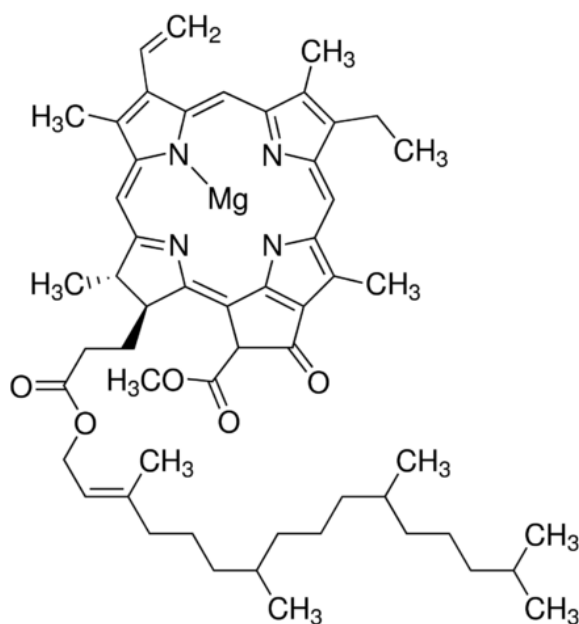
Astaxanthin je červeno-oranžový pigment patřící do rodiny xanthofylů. Tato látka je také významná svými antioxidačními účinky, o kterých se říká, že jsou dokonce lepší než ty od β -karotenu. Díky těmto vlastnostem je velmi významnou látkou v ochraně proti kardiovaskulárním onemocněním, různým druhům rakovin a některým nemocem imunologického systému. Jeho přírodními zdroji jsou řasy, kvasinky, korýši, nachází se také v peří plameňáků a křepelek. [54]



Obrázek 12: Struktura molekuly astaxanthinu

1.4.1.5 Chlorofyly

Chlorofyly jsou pigmentové molekuly nacházející se v rostlinách, sinicích a řasách. Hrají zásadní roli v procesu fotosyntézy. Způsobují zelenou barvu rostlin a nacházejí se v membránách thylakoidů eukaryotických buněk, kde jsou vázány k hydrofóbním proteinům. Organismy schopné fotosyntézy pomocí chlorofylů zachycují sluneční světlo a spolu s dalšími nezbytnými molekulami jej mění na chemickou energii. Jejich zelená barva je způsobena absorpcí modrého a červeného spektra slunečního světla. Obecná struktura se skládá z porfyrinového kruhu s navázaným chelátem Mg^{2+} v jeho centru. Na vnější uhlík porfyrinového kruhu je navázán uhlovodíkový řetězec (fytol). V přírodě se vyskytuje několik druhů chlorofylů. Lze je rozdělit do skupin A, B, C, D, E a F. Nejčastější jsou chlorofyly A a B, ostatní typy jsou přítomné v minoritním množství ve specifických mikroorganismech, jako jsou červené a hnědé řasy. Každá skupina fotoautotrofních organismů má svůj specifický poměr chlorofylů. Ten je dán evolučně, typem prostředí a podmínkami v médiu. V případě mikroorganismů se poměr chlorofylů mění i jako odezva na stresové podmínky. [45][55] -[58]

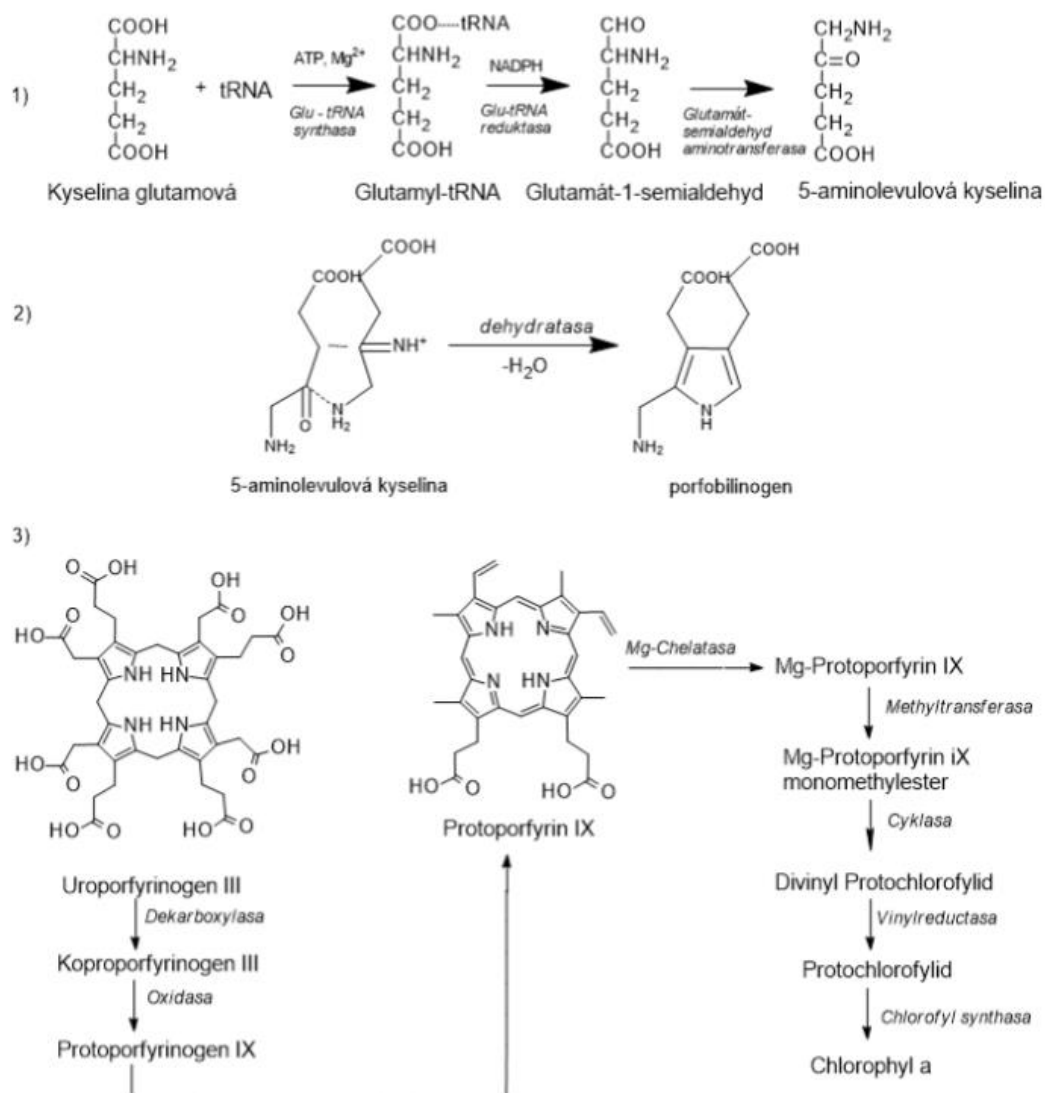


Obrázek 13: Struktura molekuly chlorofylu A

1.4.1.5.1 Biosyntéza chlorofylů

Syntéza chlorofylu probíhá u eukaryotických buněk v chloroplastech a u prokaryotických buněk v cytoplasmě. Biosyntetická cesta začíná syntézou prekurzoru kyseliny 5-aminolevulové (ALA). Proces tvorby prekurzoru začíná kondenzací molekuly glutamátu s tRNA za vzniku glutamyl-tRNA enzymem glutamyl-tRNA syntázou. V dalším kroku je nově vzniklá molekula přeměněna na glutamát-1-semialdehyd enzymem glutamyl-tRNA reduktázou. Následně vznikne procesem transaminace 5-aminolevulová kyselina (ALA). Syntéza chlorofylu pokračuje kondenzací dvou ALA prekurzorových jednotek za vzniku porfobilinogenu enzymem porfobilinogen syntázou. Následuje kondenzace čtyř porfobilinogenových molekul s pyrolovými kruhy a tím se vytvoří hydroxymethylbilan (HMB). Enzym uroporfyrinogen syntáza hydrolyzuje HMB a tvoří strukturu cyklického tytrapyrolu uroporfyrinogenu III. Tento enzym katalyzuje další přeměny molekuly vedoucí ke vzniku koproporfyrinogenu III a následně protoporfyrinu IX. Enzym Mg-chelatáza katalyzuje připojení Mg^{2+} za vzniku Mg-protoporfyrinu IX. Následuje sled cyklizačních reakcí, kdy se produktem stává divinyl protochlorofylid. Po tomto kroku následuje redukční reakce za tvorby chlorofylidu.

Posledním krokem procesu je esterifikace vedlejšího řetězce kyseliny propionové ftytyldifosfátem katalyzována enzymem chlorofyl syntáza za vzniku finální molekuly chlorofylu. [45][55] -[58]

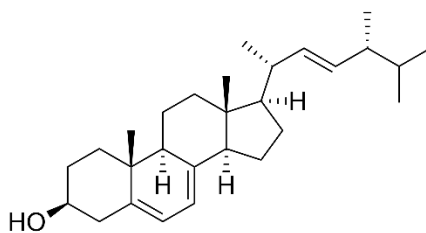


Obrázek 14: Biosyntéza chlorofylu A [59]

1.4.1.6 Ergosterol

Ergosterol je sloučenina se sterolovou strukturou. Vyskytuje se pouze v houbách, plísních a některých mikroorganismech. Je lokalizován v buněčných stěnách, kde zajišťuje správnou funkci lipidické membrány. S jeho přítomností souvisí také permeabilita buněčné membrány a aktivita membránových enzymů. Lze ho najít i v cytosolu, kde hraje nezastupitelnou roli při procesech látkové výměny. Strukturně je velmi blízký cholesterolu, kdy jediný rozdíl je přítomnost methylové skupiny vázané na uhlík C-24 a dvě dvojné vazby mezi uhlíky C7-C8 a C22-C23.

Ergosterol je prekurzorem vitaminu D. Ozářením ergosterolu se otevírá kruh mezi atomy uhlíku C9 a C10. Tímto krokem vzniká ergokalciferol. Ten se později v játrech a poté v ledvinách mění na 10,25-dihydroxyergokalciferol, což je aktivovaná forma vitaminu D. Vitamin D má tři hlavní funkce: pomáhá koordinovat metabolismus fosfátů, podporuje mineralizaci kostí a ve střevní sliznici indukuje biosyntézu bílkovin nezbytných pro resorpci vápenatých iontů Ca^{2+} . Ve velkých dávkách je vitamin D toxický a lze se jím předávkovat. [60]



Obrázek 15: Struktura molekuly ergosterolu

1.4.2 Lipidy

Lipidy jsou velkou skupinou látek s rozdílnou strukturou a funkcí. Současně vykazují nepolární charakter a rozpustnost v organických rozpouštědlech, jako například v chloroformu nebo hexanu. Z chemického hlediska se jedná o estery alkoholů a vyšší mastné kyseliny (tedy látky skládající se z kyslíku, uhlíku a vodíku). Jsou produktem primárního buněčného metabolismu. Lipidy se dělí do tří základních skupin:

1. Jednoduché lipidy – dále se dělí na acylglyceroly (oleje a tuky) a vosky, což jsou estery vyšších alkoholů a vyšších mastných kyselin.
2. Složené lipidy – strukturně spadají pod acylglyceroly, kde je jedna esterová vazba esterifikována jinou kyselinou, například fosforovou. Ve své struktuře obsahují také alkoholy, uhlovodíky a další. Složené lipidy vykazují amfipatický charakter. Do této skupiny patří fosfolipidy, glykolipidy a sfingosin.
3. Poslední skupinou jsou deriváty lipidů a prekursorů. Zahrnují se zde steroly, steroidy, hormony, karotenoidy, vitaminy rozpustné v tucích a další. [44][49]

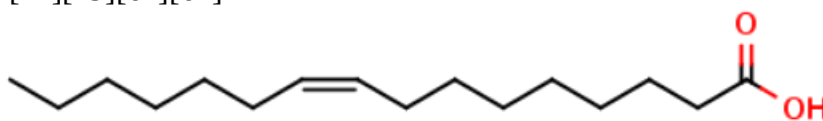
1.4.2.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny hrají klíčovou roli v buňkách všech živých organismů. Jsou to skupinou monokarboxylových kyselin ve formě esterů. Jedná se o stavební jednotku lipidů. V závislosti na počtu dvojných vazeb se dělí na nasycené a nenasyčené mastné kyseliny. Nasycené MK obsahují ve své struktuře pouze jednoduché vazby mezi atomy uhlíku. U nenasyčených se vyskytuje minimálně jedna dvojná vazba (MK známé jako MUFA), ale zpravidla více dvojných vazeb (PUFA). Mastné kyseliny zastávají v živých organismech několik funkcí. Jejich dlouhý hydrofobní řetězec je schopen vytvořit membránové dvouvrstvé struktury.

Tyto struktury slouží k subbuněčné kompartmentaci. Dále mastné kyseliny slouží jako prekursor biologicky aktivních sloučenin, a tudíž nesou signální funkci (kyselina arachonidová).

Další funkcí mastných kyselin je zásobárna energie. Energie uložená v mnoha C-C vazbách může být uvolněna procesem β -oxidace a dále v Krebsově cyklu.

Mastné kyseliny mohou ale také představovat riziko pro buňku. Ve vyšších koncentracích se jejich amfipatický řetězec chová jako detergent a rozrušuje strukturu membrán a proteinů. Z tohoto důvodu se v buňkách nacházejí v lipidických kapičkách, nejčastěji vázány ve formě triacylglycerolů. [44][49][61][62]

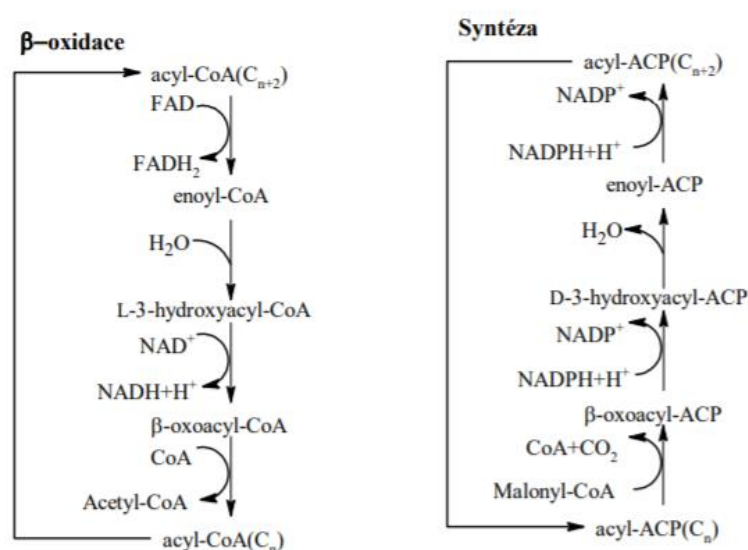


Obrázek 16: Kyselina palmitová

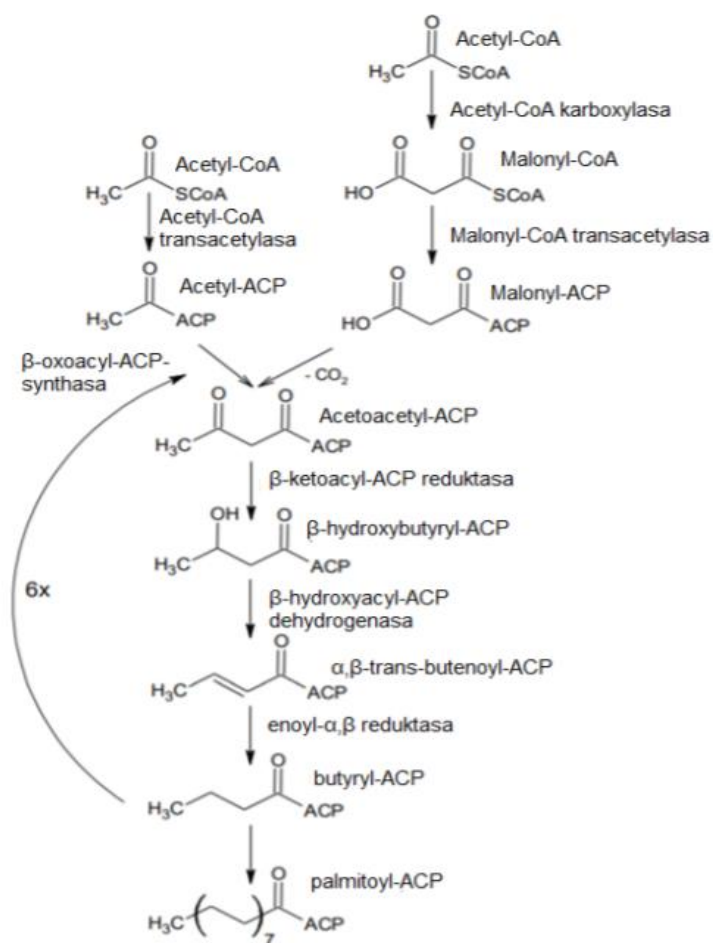
1.4.2.2 Syntéza a odbourávání mastných kyselin

Biosyntéza mastných kyselin probíhá v cytoplazmě buněk. Celý proces začíná karboxylací výchozí látky acetyl-CoA na malonyl-CoA za pomoci enzymu acetyl-CoA karboxylázy. Tento krok je energeticky náročný a dochází při něm ke spotřebě ATP. Následně enzym malonyl-CoA transacetyláza přemění malonyl-CoA na malonyl-ACP. V dalším kroku probíhá kondenzační reakce mezi malonyl-ACP a acetyl-ACP. Acetyl-ACP byl vytvořen pomocí enzymu acetyl-CoA transacetylázy z acetyl-CoA. Kondenzací těchto dvou molekul vzniká acetoacetyl-ACP a uvolňuje se oxid uhličitý. Následuje redukce acetoacetyl-ACP za pomoci enzymu β -ketoacyl-ACP reduktázy na β -hydroxybutyryl-ACP. Tato nově vzniklá molekula je enzymem β -hydroxyacyl dehydrogenázou za vzniku krotonyl-ACP. Následuje redukce a vznik butyryl-ACP za přítomnosti enzymu enoylreduktázy. Tímto způsobem se původní řetězec acetyl-CoA prodlužuje o dva uhlíky. Proces se opakuje, dokud se uhlíkatý řetězec neskládá ze 16 uhlíků. V tu chvíli získáváme výsledný produkt kyselinu palmitovou. Výsledná bilance k její syntéze je 8 molekul acetyl-CoA, 7 molekul ATP a 14 molekul NADPH. [23][49]

Mastné kyseliny jsou velmi bohatým zdrojem energie. K jejímu uvolnění slouží odbourávací dráha zvaná β -oxidace. Na rozdíl od syntézy mastných kyselin probíhá β -oxidace v matrixu mitochondrií. Mastné kyseliny se zde transportují přes mitochondriální membránu pomocí karnitinového transportního systému. Proces β -oxidace spočívá v aktivaci mastné kyseliny pomocí koenzymu A, který je navázán místo hydroxylové skupiny na karboxylovém uhlíku. Aktivaci katalyzuje enzym acyl-CoA syntáza a je umožněna pouze za spotřeby energie z ATP. Během tohoto procesu se acyl oxiduje a postupně zkracuje o 2 uhlíky v podobě acetylů. Acyl-CoA (C_{n+2}) je pomocí acyl-CoA dehydrogenázy a oxidačního koenzymu FAD nejprve dehydrogenován na enoyl-CoA. Ten je pomocí enoyl-CoA hydratázy podroben hydrataci za vzniku L-3-hydroxyacyl-CoA. Tato nově vzniklá molekula je dehydrogenována β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenázou za vzniku β -oxoacyl-CoA. Od něj se poté odštěpuje acetyl-CoA za vzniku acyl-CoA (C_n). [44][63]



Obrázek 17: Schéma biosyntézy a β -oxidace mastných kyselin [44]



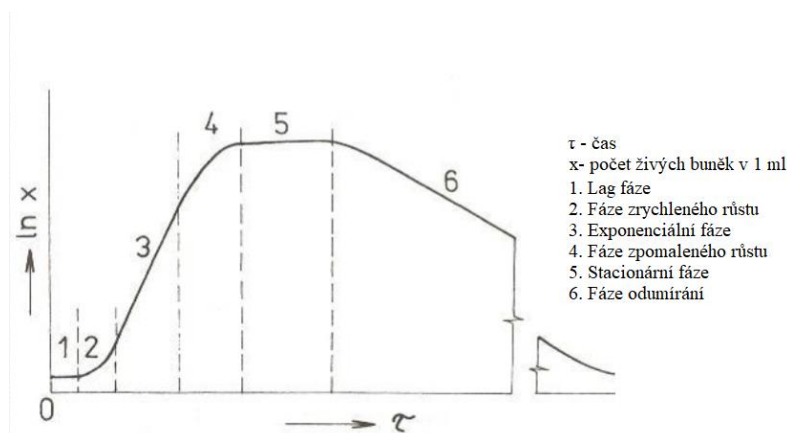
Obrázek 18: Podrobné schéma biosyntézy mastných kyselin [44]

1.5 Vliv prostředí na růst a rozmnožování mikroorganismů

1.5.1 Růst mikroorganismů

Závislost růstu mikrobiální kultury na čase popisuje tzv. růstová křivka. Po inokulaci do kultivačního média prochází kultura sérií růstových fází. První fáze po inokulaci se nazývá lag fáze. V této fázi se nejprve kultura přizpůsobuje novým podmínkám a nedochází k jejímu rozmnožování. Dochází k sérii enzymatických reakcí, které zpracovávají produkční substrát a buňky rostou a připravují se k dělení. Délka lag fáze závisí na fyziologickém stavu buněk a množství a složení kultivačního média. Jako další následuje fáze zrychleného růstu, ve které se buňky rychle a intenzivně množí. Poté se přechází do fáze exponenciálního růstu, kdy mají buňky nejkratší generační dobu a začínají produkovat primární metabolity. S docházejícími živinami v médiu se rychlost množení buněk snižuje. Této fázi se říká fáze zpomaleného růstu. S docházejícími živinami v médiu přechází ve stacionární fázi. Rychlost rozmnožování buněk se v tomto okamžiku rovná rychlosti odumírání buněk.

Mikroorganismy začínají tvořit sekundární metabolity. Poslední fáze se nazývá fází odumírání a dochází k ní při vyčerpání veškerých živin z média a kultura postupně odumírá. [24][64]



Obrázek 19: Růstová křivka

1.5.2 Biologické stresové faktory

Společné soužití mikroorganismů je pro ně nelehká a velice stresující záležitost. Tento biologický stres je zapříčiněn geneticky a je dán tím, že po milióny let mikroorganismy musely s ostatními druhy bojovat o život. Evoluce vyústila ve dvě strategie k životu. První z nich je být predátorem a mikroorganismy specializující se v téhle oblasti získaly zbraně (antibiotika) a výhody (rychlejší schopnost rozmnožování). Tyto přednosti jim dovolily získat kompetitivní náskok oproti ostatním druhům. Druhá strategie přežití znamenala adaptaci na jiný zdroj uhlíku, dusíku a dalších prvků. Tyto mikroorganismy se vyvíjely procesem kooperace a symbiózy, kdy dva a více druhů vytvoří uspořádání a všechny mikroorganismy tímto soužitím získávají výhody, které by jinak neměly. Typickým příkladem je evoluce eukaryotických řas. Jak již bylo zmíněno, řasy původně vznikly predací, kdy byla sinice pohlcena eukaryotní buňkou, což vedlo k vývoji mikrořasy. Dalším příkladem může být symbióza organismů žijících sice odděleně, ale vzájemně se podporující (kolonie).

Přítomnost více mikroorganismů v prostředí se tedy označuje za biologický stres, který jednotlivé kultivované kmeny nějakým způsobem ovlivňuje. Důsledky stresu mohou být pozitivní (což může znamenat rychlejší růst mikroorganismů nebo větší produkci metabolitů), anebo negativní (predace, kontaminace kultury, úhyn mikroorganismů). [65]-[69]

1.5.2.1 Kokultivace

Kokultivací se rozumí cílená kultivace dvou nebo více druhů mikroorganismů v rámci jednoho produkčního média. Cílem je zajistit, pokud možno symbiotický růst za účelem studia přirozených interakcí mezi mikroorganismy, větší produkce mikrobiální biomasy a produkovaných metabolitů. Tento druh kultivace byl dlouho využíván ke studiu interakcí mezi jednotlivými buňkami a jejich populacemi. [70][71]

Kokultivační podmínky imitují přírodní mikrobiální prostředí a v mnoha případech se díky tomuto typu kultivace povedla produkce metabolitů, které by mikroorganismy kultivované odděleně neprodukovaly.

Tyto produkované metabolity pak pro ostatní druhy slouží jako chemické podmínky a mohou způsobovat velké množství rozmanitých odezev, jako například změny myceliální morfologie, syntézu rozmanitých sekundárních metabolitů a produkci extracelulárních enzymů. [70][71]

Existuje mnoho rozmanitých typů kokultivačních systémů. Mohou se lišit v různém množství jednotlivých mikroorganismů (využívají se poměrové kultivace, kdy jedné kultury je poměrově více než druhé), v podobnosti mikroorganismů, v různých produkčních prostředích, kultivačním objemu a čase kultivace.

Použité buněčné populace mohou být velmi podobné jedna druhé (např. stejný kmen lišící se pouze v genové expresi), nebo se můžou lišit až do té míry, že se spolu kultivují dva úplně rozlišné organismy. Rozdíl mezi jednotlivými populacemi může být také v jejich přirozeném vztahu, např. predátor a kořist, parazit a hostitel atd. Panuje přesvědčení, že kokultivace podobných mikroorganismů je snadnější a úspěšnější, ale existuje mnoho příkladů a výzkumů o velmi úspěšné kokultivaci naprosto odlišných mikroorganismů. Obecně se dá říci, že existují tři typy kokultivací týkající se mikroorganismů. Prvním z nich je kokultivace autotrof-autotrof, druhým může být autotrof-heterotrof a posledním pak je heterotrof-heterotrof. [71]

Tato diplomová práce se zabývá kokultivačním systémem autotrof-heterotrof. Hlavní myšlenkou kultivace je spotřeba organického zdroje uhlíku a kyslíku z média heterotrofním mikroorganismem za produkce CO_2 do média. Ten je poté spotřebován autotrofem, který dále produkuje kyslík spotřebováván opět heterotrofem. Větší množství CO_2 a O_2 v médiu by mělo urychlit růst jednotlivých mikroorganismů a nemělo by docházet k soutěžení o zdroj organického uhlíku. Prakticky je ale velmi těžké docílit podmínek, ve kterých by tento druh kokultivace byl vůbec možný. Je třeba zajistit produkční médium vhodné pro všechny mikroorganismy, důležité je správné pH média a také ne vždy spolu budou jednotlivé druhy doopravdy symbioticky koexistovat. [65]-[69]

1.6 Nutriční potřeby mikroorganismů

1.6.1 Výživa mikrořas

Pro správný růst mikrořas je důležité, aby kultivační médium obsahovalo dostatečné množství všech nezbytných makronutrientů, mikronutrientů a vitamínů v takové formě, aby je buňky mohly zpracovat.

Mezi nejvýznamnější výživové makroprvky se řadí uhlík, dusík, síra a fosfor.

Uhlík je nejhojněji se vyskytující prvek mikrořasové biomasy, tvořící až 50% suché váhy buňky. Jeho hlavním zdrojem je anorganický CO_2 , který je vázán v Calvinově cyklu fotosyntézy enzymem zvaným Rubisco. Mixotrofní mikrořasy jsou schopné přijímat uhlík z organických zdrojů, jako je acetát, glukóza a glycerol. Druhým nejzastoupenějším makroprvkem v mikrořasové biomase je dusík. Slouží jako esenciální složka klíčových molekul. Mikrořasy ho mohou získávat jak z anorganických (amoniak, dusitan, dusičnan), tak i organických (urea, proteiny, aminokyseliny) zdrojů. Vzdušný dusík N_2 jsou schopny fixovat pouze některé kmeny sinic a bakterií. Mikrořasy vzdušný dusík fixovat nemohou. Síra je nedílnou součástí některých amino-kyselin, vitamínů a lipidů.

Primárně je vstřebávána ze síranů. Fosfor je nezbytný pro DNA, RNA, správnou funkci fosfolipidových membrán a také pro tvorbu ATP. Mikrořasy přijímají fosfor hlavně ve formě fosfátů díky extra a intracelulárním enzymům přichyceným k plazmatické membráně.

Dalšími nezbytnými prvky pro kultivaci mikrořas jsou výživové mikroprvky. Hrají rozhodující roli v enzymové a vitamínové aktivitě. Železo má nezastupitelnou roli při nezbytných biochemických procesech jako je syntéza chlorofylů, transport elektronů a při vstřebávání dusíku. Vápník ve formě vápenatých iontů ovlivňuje dělení buněk a morfogenezi. Hořčík ve formě hořečnatých iontů slouží jako aktivátor mnoha enzymů a je to část fotosyntetického aparátu. Dále jsou důležité stopové prvky jako Mn, K, Co, Zn, B a Mo. [2][4][5][44]-[49][72]

1.6.2 Výživa kvasinek

Kvasinky ke svému růstu a vývoji potřebují esenciální prvky uhlík, vodík, kyslík, dusík, fosfor, draslík, hořčík a síru, a to v makronutrientním množství. V případě stopových prvků jim stačí množství mikronutrientní. Kvasinky jsou chemoorganotrofy využívající organické sloučeniny jako zdroje uhlíku a energie.

V případě, že kvasinkám chybí nějaké esenciální živiny, tak se dostanou do stacionární fáze, ve které se nerozmnožují. Jediným cílem vstoupení do této fáze je přežití období hladovění. V nepřítomnosti uhlíku nastává sporulace. Nedostatek živin je poměrně běžný stresový faktor mikroorganismů. Z hlediska nedostatku živin jsou kvasinky nejvíce závislé na uhlíku a dusíku. V případě nedostatku jiných prvků, jako je fosfor, síra a stopové kovy není moc běžné, že by mikroorganismy vstoupily do stacionární fáze. [73]

1.7 Odpadní substráty

Celosvětový potravinářský průmysl produkuje obrovská kvanta pevných i kapalných odpadních produktů. Vědci se zabývají novými způsoby, jak tyto odpadní produkty využít, aby se předešlo zbytečnému plýtvání. V mnoha případech je navíc tento potravinářský odpad velice špatně zpracovatelný. Mimo jiné tento odpad v sobě často obsahuje pořád ještě velké množství živin a látek, které potencionálně mohou být využity a tím zvýšit efektivitu zpracovávání těchto materiálů. S vývojem biotechnologií se stále více vědců zabývá myšlenkou zpracování těchto odpadů pomocí mikroorganismů, za vzniku jejich užitečných metabolických produktů. [74][75]

1.7.1 Oleje

Olejové odpady představují velmi nebezpečné riziko pro životní prostředí, hlavně z toho důvodu, že jejich degradační proces se považuje za vysoce energeticky náročný. Jejich průmyslové zpracování je často velice obtížné.

Lidé odpad většinou pouze vylejí do odpadní výlevky a olej se poté dostává do vody a ucpává rozvody. Rostlinné oleje jsou nepolární chemické sloučeniny, patřící do skupiny jednoduchých lipidů. Jedná se o hydrofóbní sloučeniny.

Skládají se z mastných kyselin a glycerolu, což je trojsytný alkohol. Na glycerol jsou esterovou vazbou navázány zpravidla rozdílné acyly, které se liší délkou řetězce a stupněm nenasycenosti. Na druhý uhlík glycerol se převážně váže řetězec nenasycené kyseliny. Kromě již zmíněných hlavních složek obsahují oleje menší množství diacylglycerolů, monoacylglycerolů, volných mastných kyselin a další látky rozpustné v tucích. [67][77]

Vědci v poslední době zkoumají možnost zpracování oleje za pomoci mikroorganismů, převážně oleogenních kvasinek. Cílem těchto experimentů je přeměnit tyto odpadní substráty na užitečné produkty, v tomto případě mastné kyseliny.

Růst mikroorganismů na různých substrátech s odpadním olejem ukázal zvýšenou produkci celkových lipidů, kdy nejvyšší byla za použití rostlinného oleje použitého ke smažení zeleniny. Obsah vyprodukovaných mastných kyselin se lišil v závislosti na použité odpadním oleji. [77]

1.7.2 Syrovátka

Syrovátka je známá pro svou vysokou výživovou hodnotu a všestranné využití v potravinářském průmyslu. Je bohatým zdrojem makro a mikronutrientů. Je to žlutobílá heterogenní kapalná látka, která vzniká jako vedlejší produkt při výrobě sýrů. Procentuální chemické složení se mění v závislosti na složení mléka, na jeho původu (kravské, ovčí, ...), na zdraví zvířete, na teplotě v procesu pasterizace, na ředění syrovátky vodou a na stupni fermentace laktózy. Obecně ale obsahuje dusíkaté látky, laktózu a kyselinu mléčnou. Je bohatá na minerální látky a vitamíny. Rozlišuje se sladká a kyselá syrovátka. Hlavním syrovátkovým proteinem je kasein. Obsahuje vysoký podíl prolinu a hydrofóbních aminokyselin. Nemá pevně dán sekundární a terciální strukturu, protože není stabilizován disulfidickými vazbami. Vyskytuje se ve více variantách, které se liší složením aminokyselin, obsahem fosforu, chemickými a fyzikálními vlastnostmi.

Dělí se do čtyř typů : α -, β -, γ -, κ - kasein Díky skutečnosti, že se váže na vápník a fosfor se jeho uvolněním uvolní také důležité množství těchto minerálů. [78]-[80]

1.8 Analytické metody

Analytickými metodami označujeme takové metody, které slouží ke stanovení kvalitativních a kvantitativních složek ve vzorku. V rámci této práce jsou nejdůležitější chromatografické metody, protože metabolity (konkrétně pigmenty, ergosterol a ubiquinon) lze separovat a analyzovat za pomoci vysoce účinné kapalinové chromatografie s gradientovou elucí. Analýze mastných kyselin probíhá po transesterifikaci na plynovém chromatografu. [81]

1.8.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Chromatografické metody jsou založené na rozdílné distribuci částic mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Tyto fáze se nazývají stacionární a mobilní. Jedná se o kolonovou separační techniku. Kolona je naplněna stacionární (pevnou fází), skrz kterou protéká mobilní fáze ve formě kapaliny nesoucí vzorek. Mobilní fáze protéká kolonou za vysokého tlaku.

Jednotlivé složky ve vzorku jsou stacionární fází zachytávány a zdržují se v koloně. Doba, kterou složky stráví v mobilní nebo stacionární fázi závisí na jejich afinitě k daným fázím. Dále se v koloně zdrží látky s větší afinitou ke stacionární fázi. Účinnost separace závisí na délce a náplni kolony a složení mobilní fáze. Metoda, při které se složení mobilní fáze v závislosti na čase mění se nazývá gradientová eluce. Tato eluce spočívá ve změnách poměrů použitých rozpouštědel v průběhu separace látek. Metoda eluce, při které se složení mobilní fáze nemění se nazývá izokratická eluce. [82]-[85]

Při výstupu z kolony pokračuje eluát na detektor. Ten je spojen s programem analýzy dat, který převádí signál z detektoru na graf chromatogram, a ten ukazuje změny na detektoru v průběhu času. [82]-[85]

1.8.2 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie využívá při separaci plynnou mobilní fázi. Tato technika se nejčastěji používá pro separování a identifikaci složek plynných, těkavých látek, a především organických látek s bodem varu nižším než 400°C. Analýza začíná nástřikem vzorku na kolonu, kdy jsou následně jednotlivé složky vzorku unášeny inertím nosným plynem (mobilní fází) a jsou separovány na základě jejich afinity ke stacionární fázi. Složky postupně vycházející z kolony jsou zaznamenávány detektorem.

Často používaným detektorem je tzv. FID (plamenový ionizační detektor). Principem je spalování analytu ve vodíkovo-vzduchovém plameni hořícím mezi dvěma elektrodami. Shořením vznikají iontové částice, které zvyšují vodivost plamene a proud probíhající detektorem je přímo úměrný koncentraci analytu v nosném plynu. [81]

1.8.3 Spektrofotometrie

Princip absorbní spektrofotometrie spočívá ve schopnosti atomů nebo molekul analytů absorbovat světelné záření. Světelné záření procházející vzorkem excituje elektrony molekulových orbitalů do vyšších energetických hladin. Excitované částice ale vzápětí uvolní získanou energii ve formě tepla nebo sekundárního záření a vrátí se na nižší energetickou úroveň. Jako sekundární záření označujeme fosforescenci a fluorescenci. Sleduje se pokles intensity monochromatického záření vstupujícího a vystupujícího ze vzorku. Tento jev popisuje Bouguer-Lambert-Beerův zákon, což je podstatě vztah mezi intenzitou dopadajícího a procházejícího záření, koncentrací analytu a délkou absorbující vrstvy. Měřenou veličinou je absorbance vzorku. Bouguer-Lambert-Beerův zákon platí pouze pro zředěné roztoky a monochromatické záření. [81]

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l \quad (1)$$

Rovnice 1: Bouguer-Lambert-Beerův zákon, kdy A je absorbance, ε_{λ} je molární absorbní koeficient, l je délka optické dráhy a c je koncentrace analytu v roztoku

2 Cíl práce

- Přehledná literární rešerše zaměřená na vybrané kmeny mikrořas, karotenogenních kvasinek a principy a výhody kokultivace
- Otestování produkčních vlastností vybraných kmenů karotenogenních kvasinek na řasových minerálních médiích
- Kokultivace vybraných kmenů kvasinek se zástupci mikrořas
- Selektce vhodných kokultivačních partnerů
- Optimalizace složení kokultivačního média a podmínek kultivace
- Charakterizace získané biomasy pomocí chromatografických technik
- Vyhodnocení výsledků

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

3.1.1 Chemikálie pro kultivaci kvasinek, mikrořas a sinic

Kvasničný autolyzát, Himedia (Indie)
Pepton z kaseinu, Roth (SRN)
Agar-Agar, Roth (SRN)
Síran amonný Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Glycerol Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Močovina Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Dusičnan sodný p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný
Hydrogenfosforečnan draselný
Chlorid sodný p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Hydroxid draselný p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Síran železnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Kyselina sírová 96% p.a., Penta (ČR)
Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Chlorid manganatý tetrahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Síran měďnatý pentahydrát p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Dusičnan kobaltnatý hexahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Kyselina boritá p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)

3.1.2 Chemikálie pro extrakce, transesterifikaci a analýzu pro GC a HPLC

Methanol pro HPLC, Penta (ČR)
Kyselina heptadekanová pro GC, Sigma-Aldrich (SRN)
Hexan pro GC, Penta (ČR)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Acetonitril pro HPLC, Penta (ČR)
Ethylacetát pro HPLC, Penta (ČR)

3.2 Přístroje a pomůcky

3.2.1 Přístroje a pomůcky pro kultivace

Box Aura mini iBopTech (ČR)
Třepačka Yellow line, (SRN)
Třepaný inkubátor, ZWYR-D2401 – Labwit, BioTech (ČR)
Centrifuga Hermle Z36 HK, (ČR)
Analytické váhy Boeco (CRN)
Kultivátor Multi -Cultivator MC 1000 -OD PSI Drásov (ČR)
Stojan pro 8 zkumavek o objemu 80 ml 27

Termostat s vodní lázní
Vzduchová pumpa
Zásobník s destilovanou vodou
LED diodový zdroj pro každou zkumavku
Detektor optické hustoty – detekce při 680 nm a 720 nm

3.2.2 Přístroje pro izolaci a analýzu vybraných analytů

Spektrofotometr VIS, Helios δ, Unicam (GB)
Lyofilizátor Labconco FreeZone 4.5 Freeze Dryer (USA)
Termoblok VWR, (ČR)
Vortex/homogenizátor disruptor Genie, Scientific Industries, Inc. (USA)
HPLC/PDA sestava: Sestava HPLC/MS (Thermo Fischer Scientific, USA)

- Termostat - LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)
- Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR
- Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR
- Vyhodnocovací systém Xcalibur
- Kolona Kinetex Core Shell C18-EVO, 150 mm délka, 4,6 mm šířka, 5,0 µm částice, Phenomenex
- Držák předkolony - KJ0 - 4282, ECOM (ČR)
- Předkolona - C18-EVO, Phenomenex
- Filtry pro HPLC, PTFE, Chromservis
- Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)
- Systém MicroTime 200, Picoquant GmbH, objektiv s vodní imerzí Olympus UPLSAPO 60XW

Thermo Scientific TRACETM 1300 Gas Chromatograph, (Thermo Fischer Scientific, USA)

- Detektor FID (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Thermo Scientific AI 1310 Autosampler
- Kolona LION LN-FAME, 30 m × 0,32 mm × 0,20 µm, Chromservis

3.3 Použité mikroorganismy

3.3.1 Kvasinky

Rhodotorula kratochvilovae CCY 20-2-26
Rhodospiridium toruloides CCY 062-002-004
Sporidiobolus pararoseus CCY 19-9-6

3.3.2 Mikrořasy

Desmodesmus acutus CCALA 904
Desmodesmus armatus CCALA 439
Scenedesmus obliquus CCALA 455
Desmodesmus velitaris CCALA 468
Desmodesmus communis CCALA 463

Coccomyxa sp. CCALA 912
Chlamydomonas reinhardtii CCALA 928
Chlorella minutissima CCALA 886

3.4 Kultivace mikroorganismů

3.4.1 Kultivace karotenogenních kvasinek

Karotenogenní kvasinky byly kultivovány společně s mikrořasami ve formě kokultivací v prostředí BBM média s různými poměry dusičných, fosforečných a hořečnatých iontů.

3.4.1.1 Inokulum I a II

Začátkem každé kultivace je příprava univerzálního živného média, v tomto případě YPD kvasinkové médium (složení viz Tabulka č. 1). Kultivace je nutno provádět dvoufázovou kultivací, kdy první den se do objemu 50 ml inokulačního média I zaočkovala kultura kvasinky ze zásobní Petriho misky (očkovala se 1 klička kvasinky na 10 ml média). Druhý den se část objemu inokula I přeočkovalo do inokula II v poměru 1:5, kdy inokulum II mělo objem 125 ml. Složení inokula I a II je totožné, inokula se liší pouze v objemu.

Tabulka č. 1. Složení YPD média

Složení inokulačního média	
Složka	Množství
Destilovaná voda	1000 ml
Kvasničný autolýzát	10 g
Bakteriologický pepton	20 g
Glycerol	20 g

3.4.1.2 Produkční média multikultivátorových experimentů

Následující fází kultivace bylo přenesení kvasinek z inokula II do připravených produkčních médií. Média obsahovala místo běžně používané destilované vody BBM medium (složení viz Tabulka č. 2 a Tabulka č. 3), v případě kokultivačních experimentů byly navíc baňky obohaceny o glycerol v koncentraci 30 g/l a dusičné, fosforečné a hořečnaté ionty viz Tabulka č. 4. Kontrolní baňka čistě kvasinkového média byla kultivována také v BBM médiu obohaceném glycerolem v koncentraci 30 g/l.

Pro kultivaci mikrořas a sinic byl využit přístroj multikultivátor. Ten se skládá z osmi oddělených komor pro kultivační zkumavky. Každá zkumavka má svůj vlastní přívod vzdušnění. Multikultivátory obsahují LED osvětlení, které je možné nastavit s rozdílnou intenzitou pro každou zkumavku zvlášť. Díky této skutečnosti lze paralelně provádět osm experimentů s rozdílnými stresovými parametry. V případě těchto prováděných experimentů byla teplota i osvětlení udržovány v konstantních hodnotách. Bylo použito osm kultivačních baněk, kdy první obsahovala pouze samotnou kvasinku, očkovanou s hodnotou absorbance $A=0,15$, v BBM médiu s glycerolem v koncentraci 30 g/l.

Druhá baňka obsahovala pouze řasu v BBM médiu, která byla očkována z roztoku o absorbanci 0,25, zbylých 6 baněk obsahovaly kokultivaci řas ($A = 0,25$) a kvasinek ($A=0,15$) s přidávanými esenciálními prvky viz Tabulka č. 4. Kultivace trvaly 4 dny. Studovanými kvasinkami byly *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodotorula kratochvilovae* a *Sporobolomyces pararoseus*. Zástupci mikrořas byli *Coccomyxa* sp., *Desmodesmus armatus*, *Desmodesmus acutus*, *Scenedesmus obliquus*, *Desmodesmus velitaris* a *Desmodesmus communis*.

Tabulka č. 2. Složení BBM média

Složka	Zásobní roztok (g/l dH ₂ O)	Množství na 1 l
NaNO ₃	25,00	10
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,50	10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,50	10
K ₂ HPO ₄	7,50	10
KH ₂ PO ₄	17,50	10
NaCl	2,50	10
EDTA	-	1
Acidified iron	-	1
H ₃ BO ₃	11,42	1
Trace metals	-	1

Tabulka č. 3. Složení jednotlivých složek BBM média

Roztok	Složka	Množství (g/l)
EDTA	EDTA	50,00
	KOH	31,00
Acidified iron	FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,98
	H ₂ SO ₄ (96%)	1 ml
Trace metals	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,82
	MnCl ₂ ·4 H ₂ O	1,44
	MoO ₃	0,71
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57
	Co(NO ₃) ₂ ·6 H ₂ O	0,49

Tabulka č. 4. Obsah kultivačních baněk

Mikroorganismy	Přidané prvky	Množství prvků oproti samotnému BBM médiu (%)
Kvasinka kontrola	-	100
Mikrořasa kontrola	-	100
Kokultivace	P+N	200 + 200
Kokultivace	P+N	300 + 300
Kokultivace	P+N	400 + 400
Kokultivace	Mg ²⁺	200
Kokultivace	Mg ²⁺	200
Kokultivace	P+N+ Mg ²⁺	300+300+300

3.4.2 Kultivace mikrořas s glycerolovým stresem

Pro tyto kultivace bylo pro jeden kmen řasy připraveno 6 Erlenmeyerových baněk o objemu 250 ml. Ty byly naplněny 50 ml BBM média (Tabulka č. 2 a Tabulka č. 3). První baňka obsahovala pouze médium a sloužila jako kontrolní. Do ostatních byl přidán glycerol v množstvích 5g/l, 10 g/l, 15 g/l, 20 g/l a 25 g/l. Glycerol je pro mikrořasy stresovým faktorem a cílem experimentu bylo zjistit, jakou koncentraci jsou nejvíce schopné tolerovat a růst v ní. Kultivace probíhala 21 dní. Studovanými mikrořasami byly *Scenedesmus obliquus*, *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus communis* a *Desmodesmus armatus*.

3.4.3 Kokultivace mikrořas a kvasinek na odpadních olejích

V těchto experimentech byly použity různé kombinace mikrořas a kvasinek, které byly kultivovány na BBM médiu (Tabulka č. 2 a Tabulka č. 3) obohaceném o glycerol (30% C složky) a kávový nebo fritovací olej (70% C složky). Poměr C:N byl 25. Kontrolní baňka s mikrořasami byla kultivována na čistém BBM médiu bez přidané C složky. Cílem experimentů bylo zjistit, zda jde za použití odpadních olejů vytvořit optimální kokultivační médium, které způsobí vyšší produkci biomasy a metabolitů. Tabulka č. 5 udává, jakým způsobem byly připraveny kultivační baňky. Kultivace probíhala 4 dny. Studovanými kvasinkami byly *Rhodotorula kratochvilovae* a *Rhodospiridium toruloides*. Z mikrořas to byly *Desmodesmus velitaris*, *Desmodesmus communis*, *Desmodesmus armatus*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella minutissima* a *Desmodesmus acutus*.

Tabulka č. 5. Obsah baněk olejových experimentů

Baňka	Mikroorganismus	Olej
1	Kontrolní kvasinka	Kávový
2	Kontrolní kvasinka	Fritovací
3	Kontrolní mikrořasa	-
4	Kokultivace	Kávový
5	Kokultivace	Fritovací

3.4.4 Zpracování vzorků

3.4.4.1 Zpracování biomasy

Po ukončení kultivací se biomasa stočí v centrifuze při 8000ot/min po dobu 8 minut. Supernatant je slit, zcentrifugovaná biomasa je promyta destilovanou vodou a znovu dána do centrifugy po stejnou dobu za stejných otáček. Supernatant je opět slit a biomasa je vložena do -80°C. Po jejím zmrznutí je vložena do lyofilizátoru až do úplného vysušení. Poté se zváží a dále se odebírá na HPLC a GC.

3.4.4.2 Příprava vzorků pro analytickou metodu HPLC dle Folsche

Začátkem extrakce bylo odvážení 8-15 mg lyofilizované biomasy do mikrozkušavky typu Eppendorf se závitem a těsněním. Vzorek byl hydratován 1 ml destilované vody a byl vložen do -80°C mrazáku, kde se ponechal po dobu 20-30 min. Po uplynutí doby byly vzorky vytaženy a rozmrazeny. Následně byly centrifugovány a supernatant byl vylit. Byly přidány skleněné kuličky (glass pearls) a 1 ml methanolu p.a. Vzorky byly 15 minut třepány na vortexu. Vzorek byl převeden do 15 ml centrifugační zkumavky a přidalo se k němu ještě 2 ml chloroformu laboratorní kvality. Zkumavky byly na 10 min třepány na vortexu.

Po uplynutí této doby byl do vzorku napipetován 1 ml destilované vody a vzorky byly stáčeny na centrifuze při 2000 rpm po dobu 1 minuty. Po stočení vzorků byla odpipetována spodní chloroformová fáze. Následovalo její odpaření v termobloku, kde inertní atmosféru zajišťoval N₂. Po odpaření chloroformu byl k vysušenému vzorku přidán 1 ml směsi ethylacetátu a acetonitrilu HPLC kvality v poměru 1:2. Posledním krokem bylo přefiltrování vzorku přes 0,4 µm filtr PTFE do vialky se závitem o objemu 1,8 ml. Parametry HPLC sestavy jsou uvedeny v tabulce (Tabulka č. 6).

Tabulka č. 6. Gradientový program a složení mobilních fází pro HPLC analýzu karotenoidů

Kolona		Nepolární C18
Detektor		DAD
Složení MF	MF A: ACN:TrisHCl:MeOH	MF B: MeOH:EtAc
	84:14:2	60:40
Čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0	100	0
13	0	100
19	0	100
20	100	0
24	100	0

3.4.4.3 Transesterifikace vzorku mikrobiální biomasy

Do kryptovacích vialek bylo odváženo přibližně 5-10 mg zlyofilizované biomasy. K ní bylo napipetováno 1,8 ml transesterifikační směsi, obsahující 15% H₂SO₄ v methanolu HPLC kvality a interní standard kyseliny heptadekanové v koncentraci 0,5 mg/ml.

Takto připravené vzorky byly zakrymplovány a inkubovány v termobloku po dobu 2 hodin při teplotě 85°C. Po uplynutí této doby byly transesterifikované vzorky volně ponechány, aby vychladly na laboratorní teplotu.

Do skleněných vialek o objemu 5 ml byl kvantitativně převeden obsah vialky se vzorkem, a byl napipetován 0,5 ml 0,05 mol/l NaOH. Poté byl přidán 1 ml hexanu HPLC kvality, vialka byla uzavřena a třepána na vortexu po dobu 5-10 minut. Po oddělení fází bylo z hexanové fáze pipetou odebráno 0,1 ml a převedeno do čisté 1,8 ml vialky spolu s 0,9 ml hexanem HPLC kvality. Takto připravený vzorek byl analyzován pomocí GC. Parametry GC sestavy jsou uvedeny v tabulce (Tabulka č. 7)

Tabulka č. 7. Parametry GC/FID

Kapilární kolona	LION LN-FAME
Rozměry	30 m × 0,32 mm × 0,20 μm,
Dávkování	Autosampler Thermo Scientific AI 1310
Objem nástřiku vzorku	1 μl
Poměr nástřiku děliče toku	10
Konstantní průtok nosného plynu H ₂	1 ml/min
Detektor	Plamenově ionizační
Teplota	240 °C
Průtok	Vzduch 350 ml/min, make-up N ₂ 30 ml/min, H ₂ 35 ml/min

4 Výsledky a diskuze

4.1 Multikultivátorové kokultivační experimenty

V rámci multikultivátorových experimentů byly kombinovány různé druhy mikrořas a kvasinek. V každém experimentu bylo zachováno stejné prvkové a obsahové složení médií, viz Tabulka č. 4 na straně 37. Hlavním cílem těchto experimentů bylo vystavit mikroorganismy stresové situaci z důvodu nadbytku minerálních prvků v různých poměrech a zjistit, jak na dané stresové situace reagují.



Obrázek 20: Multikultivátor s kokultivacemi

4.1.1 *Rhodosporidium toruloides* a *Desmodesmus armatus*

Tabulka č. 8. Produkce biomasy multikultivátorového experimentu s *R. toruloides* a *D. armatus*

	Mikrořasa kontrola	Kvasinka kontrola	P+N 200%	P+N 300%	P+N 400%	Mg ²⁺ 200%	Mg ²⁺ 300%	P+N+Mg ²⁺ 300%
Biomasa (g·l ⁻¹)	0,28	2,67	3,12	Nepřežila	4,75	1,50	3,11	2,67

U těchto multikultivátorových experimentů byla největším kokultivačním metabolickým producentem kokultivace v prostředí s Mg²⁺ + 300% (Obrázek 21), kdy nejvíce produkovány byly ubiquinon (3,1 mg/g sušiny), poté následovaly srovnatelné hodnoty celkových sterolů (2,43 mg/g sušiny) a celkových karotenoidů (2,42 mg/g sušiny). Méně zastoupené byly celkové chlorofyly (0,96 mg/ g sušiny) a β-karoten s luteinem.

V případě P+N experimentů platilo, že P+N 200% byla menším producentem biomasy, ale větším producentem ubiquinonu a celkových sterolů. U P+N 400% kokultivace byla pozorována větší produkce biomasy, ale ubiquinonu i celkových sterolů bylo méně.

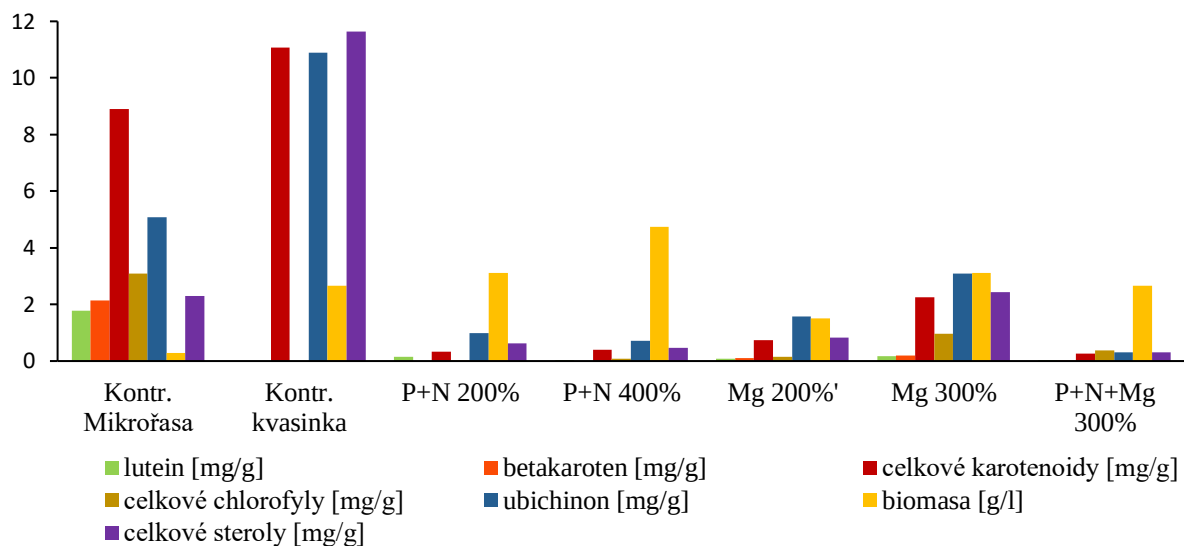
Celkových karotenoidů bylo mezi těmito dvěma kultivace srovnatelné množství. Mg^{2+} 200% kokultivace obsahovala stejné metabolity jako Mg^{2+} 300% kultivace, ale v přibližně polovičním množství. Posledním typem kokultivace byla P+N+ Mg^{2+} 300%, kdy byly produkovány stejné metabolity jako v případech Mg^{2+} + médií s tím rozdílem, že hodnoty produkce metabolitů byly velmi nízké. Nejvíce zastoupeny byly celkové chlorofyly, a to v hodnotě pouhých 0,39 mg/g sušiny.

Porovnáním P+N kultivací s kontrolní kvasinkou, dosahovaly obě většího nárůstu biomasy, ale výrazně menší produkce zmíněných metabolitů. Řasové metabolity nebyly pozorovány téměř žádné. U Mg^{2+} kultivací je větší rozmanitost metabolitů, jsou tam zastoupené řasové, tak i kvasinkové. I v tomto případě lze ale konstatovat, že byly produkovány mnohem méně než u kontrolních mikroorganismů. Co se biomasy týče tak Mg^{2+} 300% a P+N+ Mg^{2+} 300% dosahovaly srovnatelné produkce s biomasou kontrolní kvasinky. Mg^{2+} 200% biomasy produkovala méně.

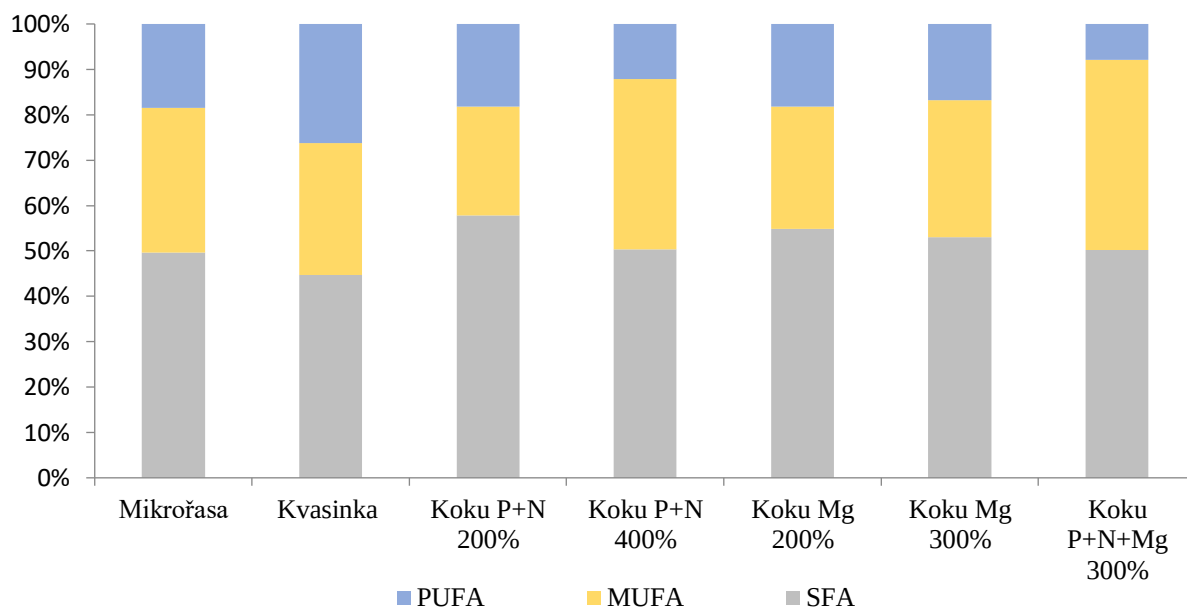
V grafickém znázornění (Obrázek 22) lze vidět procentuální zastoupení mastných kyselin vyprodukovaných tímto typem kultivace. Ve všech experimentech jsou obecně nejvíce zastoupeny SFA, následují MUFA a nejméně zastoupené jsou PUFA. V případě kokultivačního média s P+N 200% je posunuta produkce MK ve prospěch SFA (57,88%), kdy je tato produkce nejvyšší ze všech experimentů. Hodnota MUFA odpovídala 23,9%. Nejméně zastoupené byly PUFA (18,22%). U P+N 400% kultivace byly také nejvíce produkovány SFA, ale méně, než v předchozím případě (50,27%). Procentuální zastoupení MUFA činilo 37,55% a PUFA zastávaly pouhých 12,18%.

Kokultivací v prostředí Mg^{2+} 200% byly nejvíce zastoupenými MK opět SFA (54,91%), MUFA zastupovaly 26,9% a PUFA 18,19%. Profil MK u kokultivace Mg^{2+} se skládal z 53,01% SFA, 30,17% MUFA a 16,82% PUFA. V případě média s P+N+ Mg^{2+} převažovaly opět produkce SFA (50,18%) a MUFA (41,9%) na úkor PUFA, kterých bylo produkováno pouze 7,92%. Celkový profil MK tohoto experimentu byl poměrně stejnorodý. Kokultivace produkovaly méně PUFA a více SFA než kontrolní kvasinka i mikrořasa. Produkce PUFA byla také vyšší ve všech případech, kromě P+N 200% a Mg^{2+} 200%.

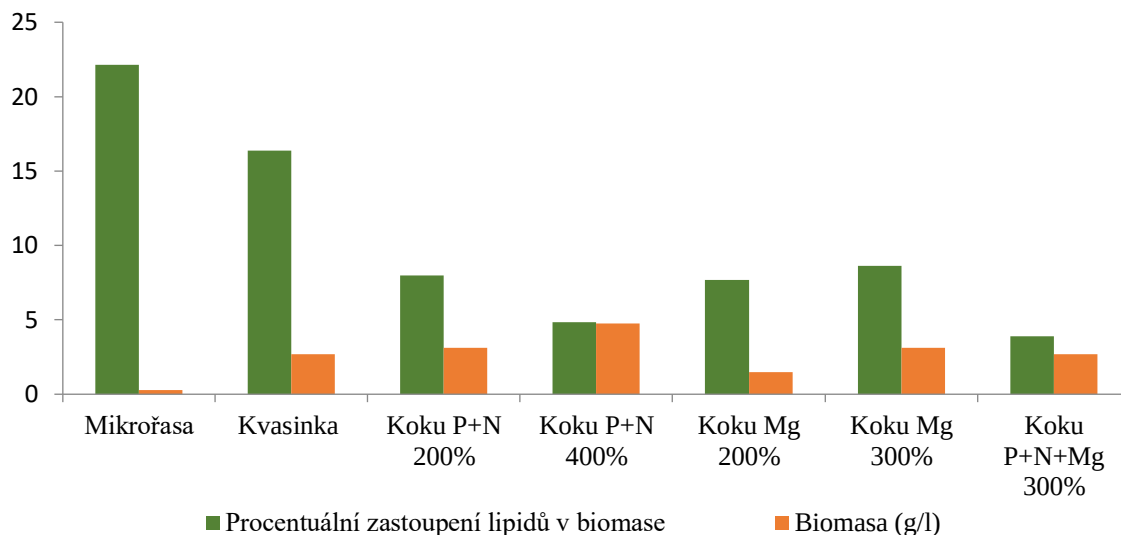
Množství celkových lipidů (Obrázek 23) v porovnání s kontrolní mikrořasou a kvasinkou bylo u kokultivačních experimentů nižší. Největší množství bylo zjištěno u kokultivací Mg^{2+} 300%, Mg^{2+} 200% a P+N 200%. Nejméně lipidů bylo zaznamenáno ve vzorku P+N+ Mg^{2+} 300%. Nižší množství lipidů u experimentů P+N 200% a P+N 400% mohla být způsobená větší produkcí biomasy právě na úkor syntézy lipidických látek.



Obrázek 21: Grafické znázornění produkce metabolitů mutikultivátorového experimentu s *R. toruloides* a *D. armatus*



Obrázek 22: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin multikultivátorového experimentu s *R. toruloides* a *D. armatus*



Obrázek 23: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů multikultivátorových experimentů s *R. toruloides* a *D. armatus* s jejich biomasou

4.1.2 *Rhodosporidium toruloides* a *Desmodesmus acutus*

Tabulka č. 9. Produkce biomasy multikultivátorového experimentu s *R. toruloides* a *D. acutus*

	Mikrořasa kontrola	Kvasinka kontrola	P+N 200%	P+N 300%	P+N 400%	Mg ²⁺ 200%	Mg ²⁺ 300%	P+N+Mg ²⁺ 300%
Biomasa (g·l ⁻¹)	0,08	2,13	1,63	2,38	2,19	0,78	0,55	0,95

Metabolity produkované tímto typem experimenty byly velice rozmanité (Obrázek 24). Největším metabolickým producentem se ukázala být kokultivace s P+N 200%. Vzorek obsahoval ubichinon (5,71 mg/ g sušiny), steroly (5,72 mg/g sušiny), karotenoidy (5,89 mg/g sušiny), chlorofyly, β -karoten a lutein. Taková produkce může být odůvodněna upřednostněním syntézy metabolitů na úkor nárustu biomasy. Metabolity P+N 300% kokultivace byly steroly (4,56 mg/g sušiny), ubichinon, chlorofyly, karotenoidy, lutein a β -karoten. P+N 400% kokultivace obsahovala stejné metabolity jako právě popsané experimenty, ale v menším množství. Nejvíce bylo vyprodukováno celkových karotenoidů (3,66 mg/g sušiny).

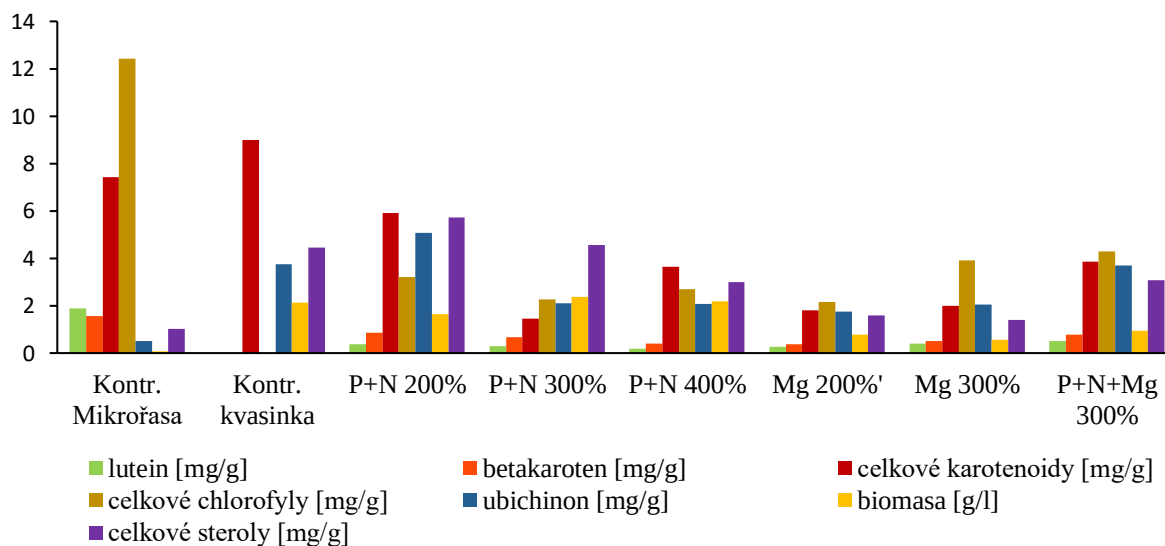
Mg²⁺ 200% a Mg²⁺ 300% mělo srovnatelnou produkci všech metabolitů, až na celkové chlorofyly, kterých bylo více u kultivace Mg²⁺ 300% kultivace (3,92 mg/g sušiny).

Vzorek P+N+Mg²⁺ 300% obsahoval chlorofyly (4,28 mg/g sušiny), ubichinon (3,71 mg/g sušiny), karotenoidy (3,87 mg/g sušiny), steroly, lutein a β -karoten. V porovnání s kontrolní mikrořasou produkovaly kokultivace více sterolů, ostatní metabolity byly zastoupeny více u mikrořasy. Kromě P+N 200% kultivace, kdy bylo produkováno sterolů více, byla i kontrolní kvasinka větším metabolickým producentem, než kokultivace.

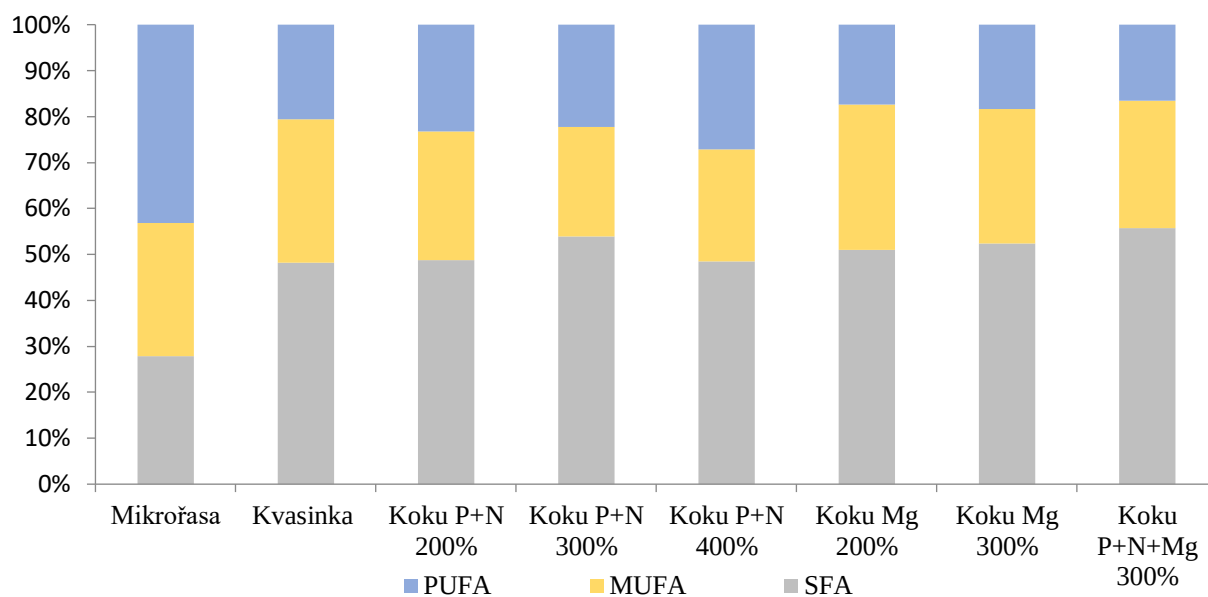
V tomto experimentu bylo ve všech typech kultivace (kromě mikrořasy v kontrolním médiu) vyprodukováno nejvíce SFA, poté MUFA a nejméně PUFA. U všech kokultivací byl pozorován poměrně stejnorodý profil produkce MK. Kokultivace P+N 200% měla největší zastoupení SFA (48,8%), následovaly MUFA (27,99%) a PUFA (23,21%). Profil MK u kokultivace P+N 300% byl tvořen 53,9% SFA, 23,89% MUFA a 22,21% PUFA. U P+N 400% kokultivace zůstává stejný poměr MK jako v předchozích případech, produkce SFA činila 48,54%, MUFA 24,34% a PUFA 27,12%. Produkce PUFA této kultivace byla obecně nejvyšší ze všech kultivací.

U kokultivací s přidáním Mg^{2+} prvky lze mluvit o naprosto srovnatelných produkcích MK. V případě Mg^{2+} 200% se profil skládal z 50,94% SFA, 31,72% MUFA a 17,35% PUFA. V případě Mg^{2+} 300% byla produkce SFA (52,4%) a PUFA (18,32%) vyšší, množství MUFA naopak kleslo (29,28%). Kokultivace s přidáním P+N+ Mg^{2+} o 300% se ukázala být obecně největším producentem SFA (55,67%). Dále se produkce MK skládala z 27,82% MUFA a 16,52% PUFA. V porovnání kontrolní mikrořasou bylo vyprodukováno podstatně větší množství SFA na úkor PUFA, produkce MUFA byla srovnatelná. MK zastoupené v kontrolní kvasince byly srovnatelné s kokultivacemi. (Obrázek 25).

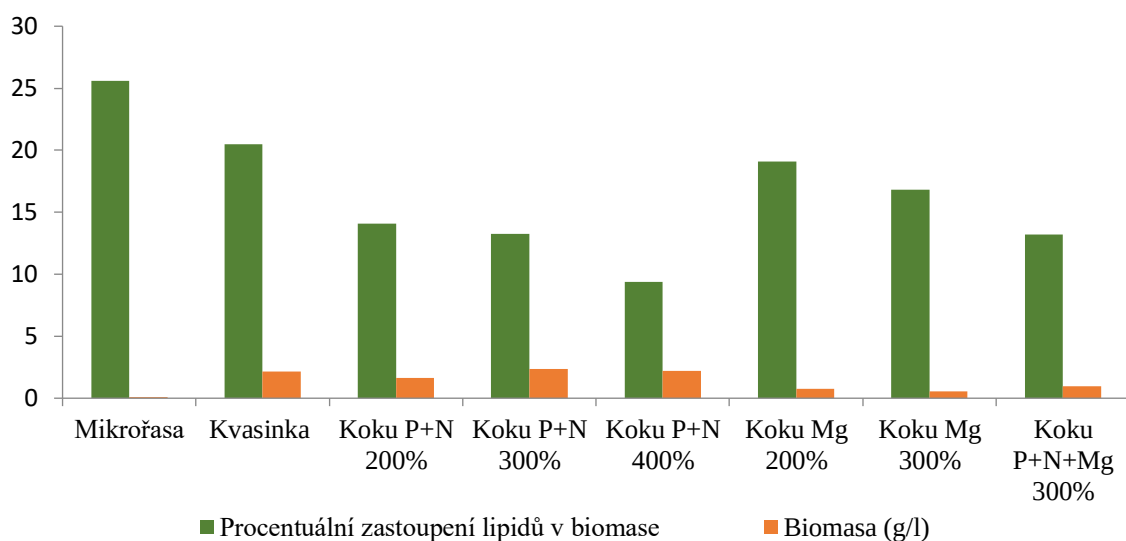
Co se týče procentuálního zastoupení lipidů v závislosti na biomase (Obrázek 26), nejvíce jich bylo vyprodukováno kokultivací Mg^{2+} 200%. Produkce lipidů u všech tří typů P+N kultivací je nižší než u Mg^{2+} kokultivací. Mezi stejným typem kultivace platí, že čím menší množství přidávaných prvků, tím větší obsah lipidů. Srovnáním s kontrolními mikroorganismy bylo množství lipidů obsahovaných v kokultivačních experimentech menší.



Obrázek 24: Grafické znázornění produkce metabolitů mutikultivátorového experimentu s *R. toruloides* a *D. acutus*



Obrázek 25: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin multikultivátorového experimentu s *R. toruloides* a *D. acutus*



Obrázek 26: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů multikultivátorových experimentů s *R. toruloides* a *D. acutus* s jejich biomasou

4.1.3 *Rhodosporidium toruloides* a *Scenedesmus obliquus*

Tabulka č. 10. Produkce biomasy multikultivátorového experimentu s *R. toruloides* a *Sc. obliquus*

	Mikrořasa kontrola	Kvasinka kontrola	P+N 200%	P+N 300%	P+N 400%	Mg ²⁺ 200%	Mg ²⁺ 300%	P+N+Mg ²⁺ 300%
Biomasa (g·l ⁻¹)	0,07	1,13	0,63	0,51	1,14	0,81	0,67	0,99

V rámci tohoto experimentu (Obrázek 27) nebyly kokultivace, ale ani kontrolní kvasinka, schopné výrazné produkce metabolitů. P+N 200% byla obecně (včetně kontrolní kvasinky) nejlepším producentem ubiquinonu (2,95 mg/g sušiny). V případě zbylých P+N kultivací byl také největším produktem ubiquinon, ale v podstatně menším množství. Mg²⁺ 200% obsahoval také nejvíce ubiquinonu, následují celkové steroly. Kokultivace Mg²⁺ 300% byla největším kokultivačním producentem chlorofylů (1,56 mg/g sušiny), poté následoval opět ubiquinon.

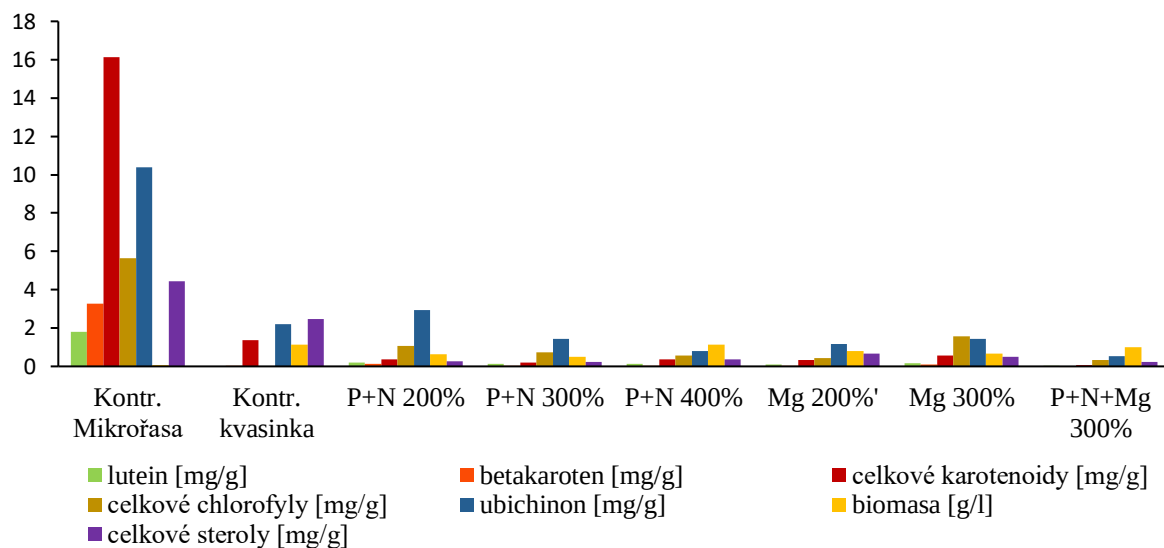
V případě P+N+Mg²⁺ 300% kultivace byla tvorba všech metabolitů téměř úplně potlačena. Na základě grafického znázornění lze pozorovat, že ani kontrolní kvasinka nebyla zvláště velkým metabolickým producentem. Můžeme tvrdit, že v tomto případě typ kultivace a prostředí samotné kvasince nevyhovoval.

Profil MK experimentu byl velmi různorodý. (Obrázek 28). Kokultivace s obsahem P+N 200% obsahovala 47,61% SFA, 42,06% MUFA a 9,8% PUFA. V experimentech s P+N 300%, P+N 400% a Mg²⁺ 200% je zvýšená produkce SFA a MUFA na úkor PUFA, které se zde neprodukovaly vůbec. V případě P+N 300% SFA činily 53,83% a MUFA 46,17%, což je největší MUFA produkce všech kultivací. V případě P+N 400% byl profil MK složen z 72,16% SFA (což je obecně největší produkce) a 27,84% MUFA.

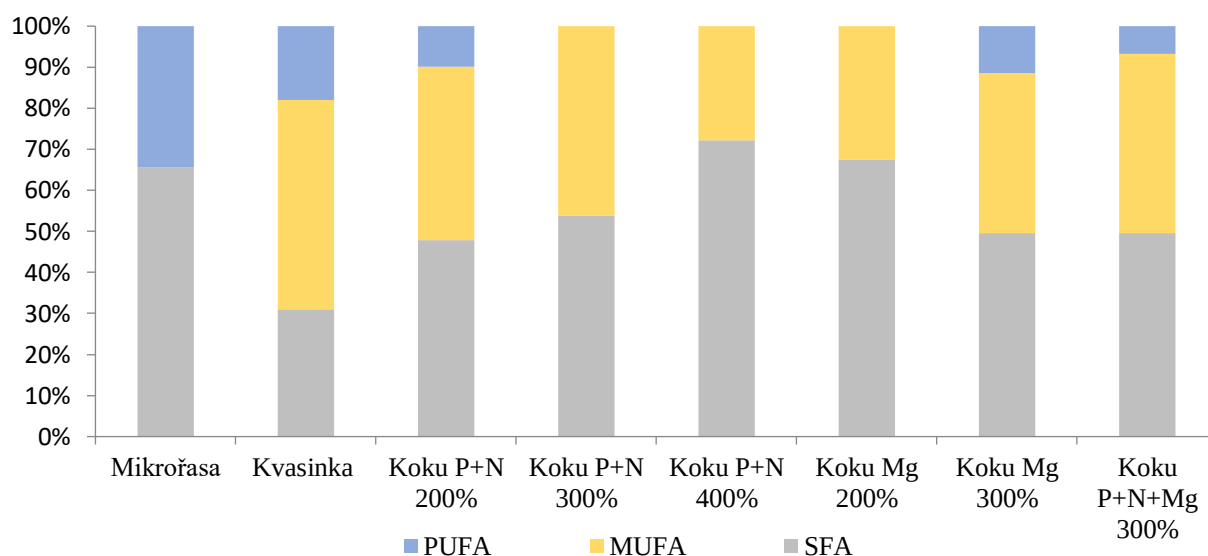
V posledním případě Mg²⁺ 200% se MK skládaly z 67,55% SFA a 32,45% MUFA. U kokultivace Mg 300% jsou SFA zastoupeny z 49,63%. Produkce MUFA je vyšší (38,9%) na úkor PUFA (kterých bylo ve vzorku pouhých 11,46%). Kokultivace P+N+Mg²⁺ obsahovala srovnatelné množství SFA jako předchozí popisovaná kultivace (49,55%). Produkce PUFA (6,74%) byla ještě více potlačena ve prospěch MUFA (43,17%).

Kontrolní mikrořasa v tomto případě obsahovala pouze majoritní složku SFA a minoritní PUFA, MUFA nebyly produkovány vůbec. V porovnání s kontrolní kvasinkou, u které byla zaznamenána nejvyšší produkce MUFA, byl profil MK na úkor MUFA posunut k vyšší produkci SFA.

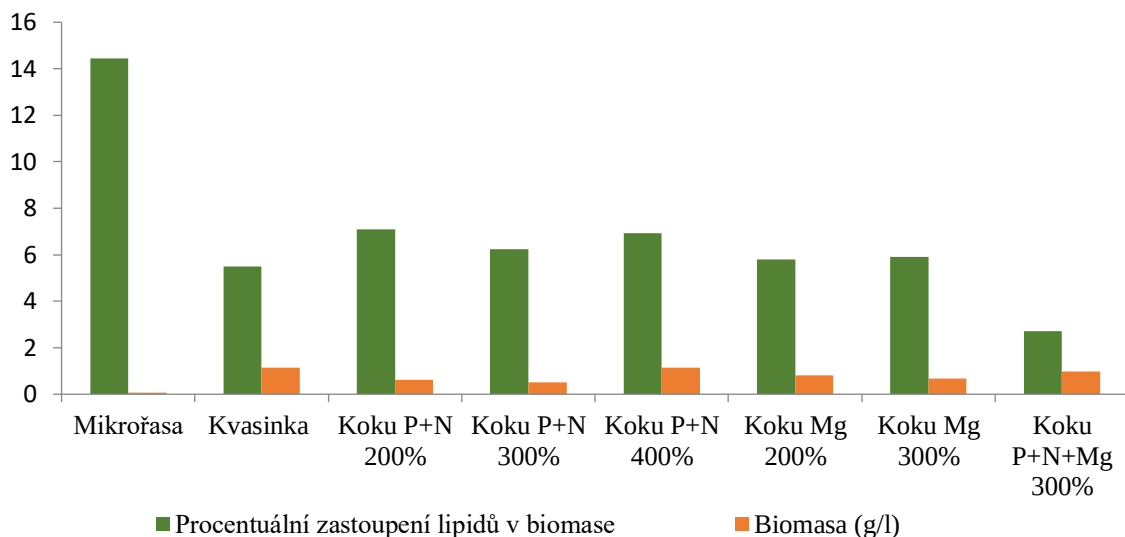
Co se týče procentuálního obsahu lipidických látek v biomase (Obrázek 29), tak největší množství bylo obsaženo ve srovnatelných produkcích kokultivací P+N 300%, Mg²⁺ 200% a Mg²⁺ 300%. Nejmenší množství lipidů obsahovala kokultivace P+N+Mg²⁺ 300%. Zbylé kultivace vyprodukovaly srovnatelné množství lipidických látek. Kontrolní mikrořasa vyprodukovala výrazně vyšší množství lipidických látek oproti kokultivacím. V případě kontrolní kvasinky ale byly kokultivacemi většími lipidickými producenty ve všech případech, kromě P+N+Mg²⁺ 300%.



Obrázek 27: Grafické znázornění produkce metabolitů mutikultivátorového experimentu s *R. toruloides* a *S. obliquus*



Obrázek 28: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin multikultivátorového experimentu s *R. toruloides* a *S. obliquus*



Obrázek 29: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů multikultivátorových experimentů s *R. toruloides* a *S. obliquus* s jejich biomasou

4.1.4 *Rhodosporidium toruloides* a *Desmodesmus velitaris*

Tabulka č. 11. Produkce biomasy multikultivátorového experimentu s *R. toruloides* a *D. velitaris*

	Mikrořasa kontrola	Kvasinka kontrola	P+N 200%	P+N 300%	P+N 400%	Mg ²⁺ 200%	Mg ²⁺ 300%	P+N+Mg ²⁺ 300%
Biomasa (g·l ⁻¹)	0,02	0,50	0,73	0,38	0,29	0,51	0,31	0,22

V případě těchto kokultivací je velice zajímavé, že obsahují srovnatelné, anebo vyšší množství řasových metabolitů jako kontrolní mikrořasa (Obrázek 30). U P+N kultivací platí, že se zvyšujícím se obsahem přidaných prvků v médiu klesá množství biomasy a zároveň klesají celkové karotenoidy, lutein i β -karoten. V případě P+N 200% je nejvíce produkovaným metabolitem ubichinon (1,28 mg/g sušiny), poté celkové chlorofyly (0,99 mg/g sušiny), karotenoidy a steroly. P+N 300% vzorek obsahoval nejvíce chlorofylů (1,81 mg/g sušiny), karotenu a ubichinonu. Mikroorganismy v P+N 400% médiu vyprodukovaly nejvíce ubichinonu (1,92 mg/g sušiny), celkových sterolů (1,43 mg/g sušiny), chlorofylů (1,27 mg/g sušiny) a karotenoidů.

V případě Mg²⁺ kultivací platí, že se zvyšujícím se obsahem přidaných prvků v médiu klesá produkce jak metabolitů, tak biomasy (s výjimkou celkových karotenoidů, kterých je v kultivaci Mg²⁺ 300% znatelně více). Poslední P+N+Mg²⁺ 300% kokultivace syntetizovala obecně nejvíce celkových chlorofylů ze všech kultivací 2,86 mg/g sušiny), následují celkové karotenoidy, ubichinon a lutein. Biomasy tato kokultivace vyprodukovala obecně nejméně.

Porovnáním s kontrolní kvasinkou dosahovaly všechny kokultivace menší produkce metabolitů, a kromě P+N 200% kultivace i biomasy, avšak v porovnání s kontrolní mikrořasou byly u všech kokultivací řasové metabolity přítomny minimálně srovnatelně.

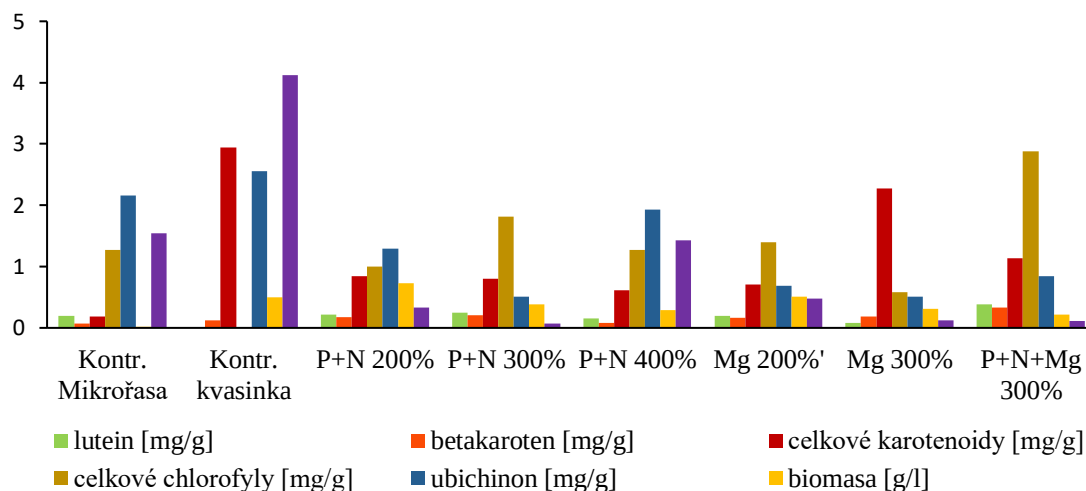
Produkce MK v tomto experimentu byla velice různorodá (Obrázek 31). V médiích s přidanými P+N prvky jsou nejvíce zastoupené MUFA, dále SFA a nejméně PUFA. U kokultivace s P+N 200% byl profil MK konkrétně tvořen 45,78% MUFA, těsně za nimi následovaly SFA (45,19%) a nejméně zastoupené byly PUFA (9,03%).

U mikroorganismů kultivovaných v prostředí s P+N 300% tvořily MUFA 44,74%, SFA 35,1% a PUFA 20,16% celkového profilu MK. Složky MK v kokultivacích s P+N 400% tvořilo 47,21% SFA, 44,07% MUFA a 8,72% PUFA.

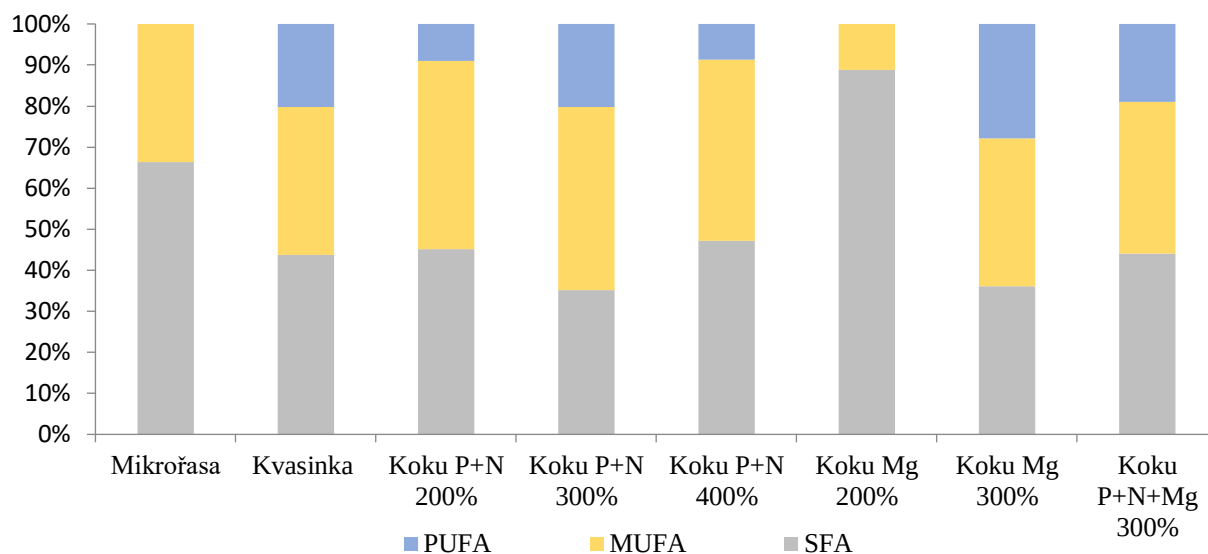
V případě kokultivačního média s Mg^{2+} 200% byla úplně potlačena produkce PUFA a omezena produkce MUFA (11,15%) za účelem většího zisku SFA (88,85%). Toto množství SFA bylo největší ze všech kultivací. U Mg^{2+} 300% jsou majoritním produktem SFA (36,14%), velice těsně následují MUFA (36,01%) a PUFA (27,85%). Poslední kokultivační experiment s přidanými prvky P+N+ Mg^{2+} na 300% měl nejvíce zastoupenou složku SFA (44,03%), následovaly MUFA (36,97%) a PUFA (19%).

Profilu MK kontrolní mikrořasy nejvíce odpovídá kokultivace s Mg^{2+} 200%. V případě kokultivace byla ještě více podpořena produkce SFA na úkor MUFA. V ostatních experimentech mikroorganismy tvořily PUFA na úkor produkce SFA. Profil MK kontrolní kvasinky byl srovnatelný se všemi kokultivacemi kromě P+N 200%, P+N 400% a Mg^{2+} 200%. V případě P+N kultivací byla oproti kvasince zvýšená produkce MUFA a snížená produkce PUFA. U Mg^{2+} kokultivace lze konstatovat, že byly všechny produkce potlačeny na úkor produkce SFA. PUFA zde nebyly produkovány vůbec.

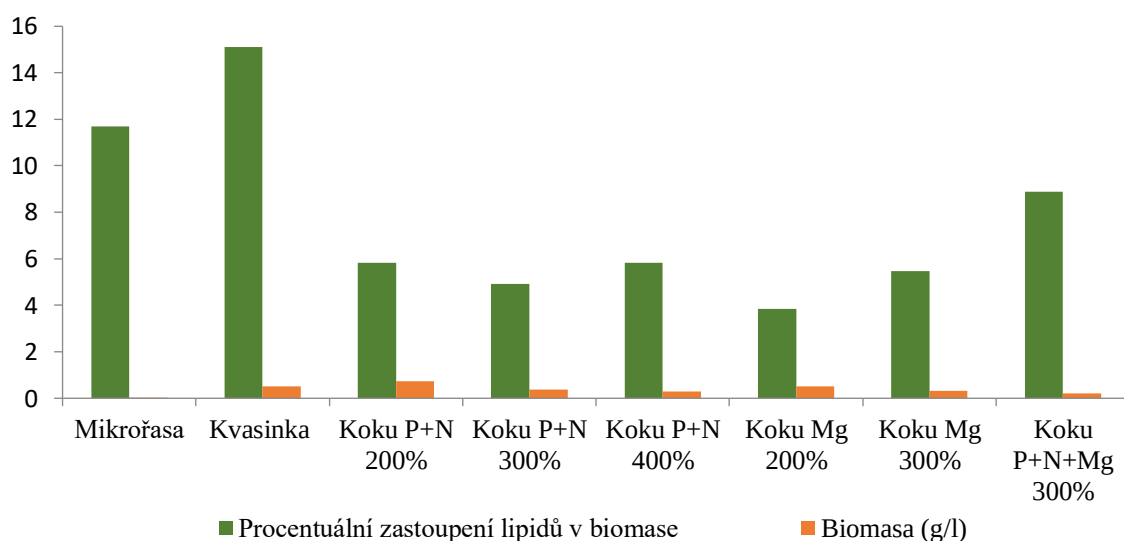
Největším producentem celkových lipidů (Obrázek 32) se ukázala být kokultivace s P+N+ Mg^{2+} 300%. V Mg^{2+} kultivacích platilo, že se zvyšujícím se obsahem Mg^{2+} v médiu rostla i produkce lipidů. V případě P+N 200% a 400% je množství lipidů srovnatelné, u P+N 300% je v porovnání s předchozími zmíněnými menší. Obecně nejmenší produkce byla zaznamenána u Mg^{2+} 200%. Oba kontrolní mikroorganismy produkovaly více lipidických látek než kokultivace.



Obrázek 30: Grafické znázornění produkce metabolitů mutikultivátorového experimentu s *R. toruloides* a *D. velitaris*



Obrázek 31: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin multikultivátorového experimentu s *R. toruloides* a *D. velitaris*



Obrázek 32: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů multikultivátorových experimentů s *R. toruloides* a *D. velitaris* s jejich biomasou

4.1.5 *Sporobolomyces pararoseus* a *Coccomyxa* sp.

Tabulka č. 12. Produkce biomasy multikultivátorového experimentu s *S. pararoseus* a *Coccomyxa* sp.

	Mikrořasa kontrola	Kvasinka kontrola	P+N 200%	P+N 300%	P+N 400%	Mg ²⁺ 200%	Mg ²⁺ 300%	P+N+Mg ²⁺ 300%
Biomasa (g·l ⁻¹)	0,18	0,85	1,27	1,13	0,77	7,94	0,73	0,98

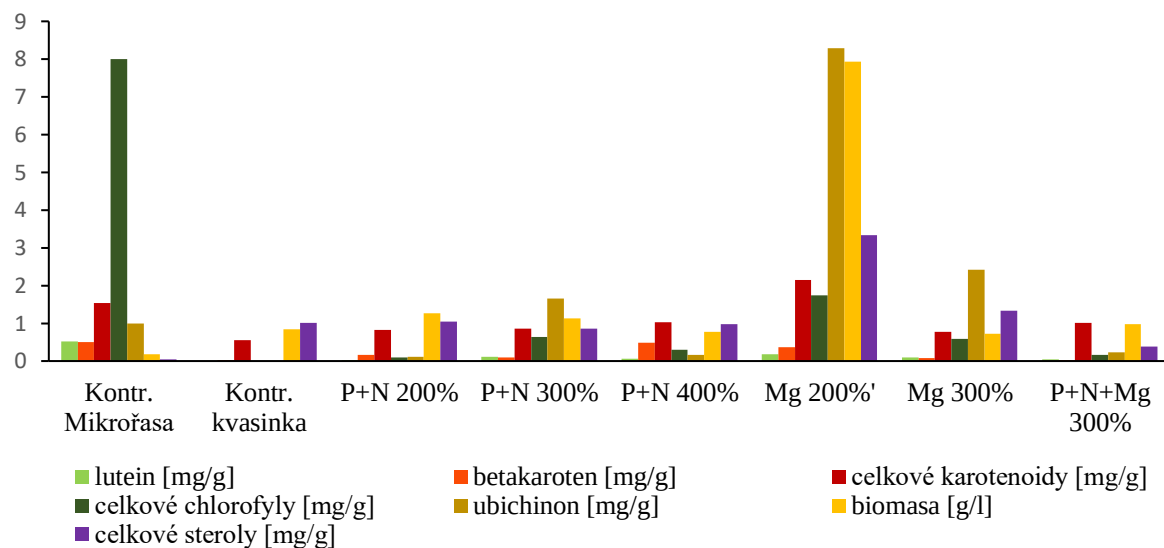
V grafickém znázornění metabolické produkce tohoto experimentu (Obrázek 33) lze pozorovat, že výrazně největším producentem metabolitů a biomasy (i včetně kontrolních mikroorganismů) je kokultivace na médiu s obsahem Mg^{2+} 200%. Nejvíce zastoupeny jsou celkové chlorofyly (8,28 mg/g sušiny), dále poté steroly (3,34 mg/g sušiny), celkové karotenoidy (2,15 mg/g sušiny), ubiquinon (1,75 mg/g sušiny), β -karoten a lutein.

V případě ostatních kokultivačních experimentů a kontrolní kvasinky jsou metabolické produkce srovnatelné. Kokultivace jsou navíc obohaceny o produkty řasového metabolismu, ale s výjimkou Mg^{2+} 300% a P+N 300% (kde byly výrazněji zastoupeny chlorofyly) nedosahovaly vyšších hodnot. Kontrolní mikrořasa vyprodukovala největší množství ubiquinonu, ale chlorofyly byly detekovány ve větším množství u kokultivací Mg^{2+} 200%, Mg^{2+} 300% a P+N 300%.

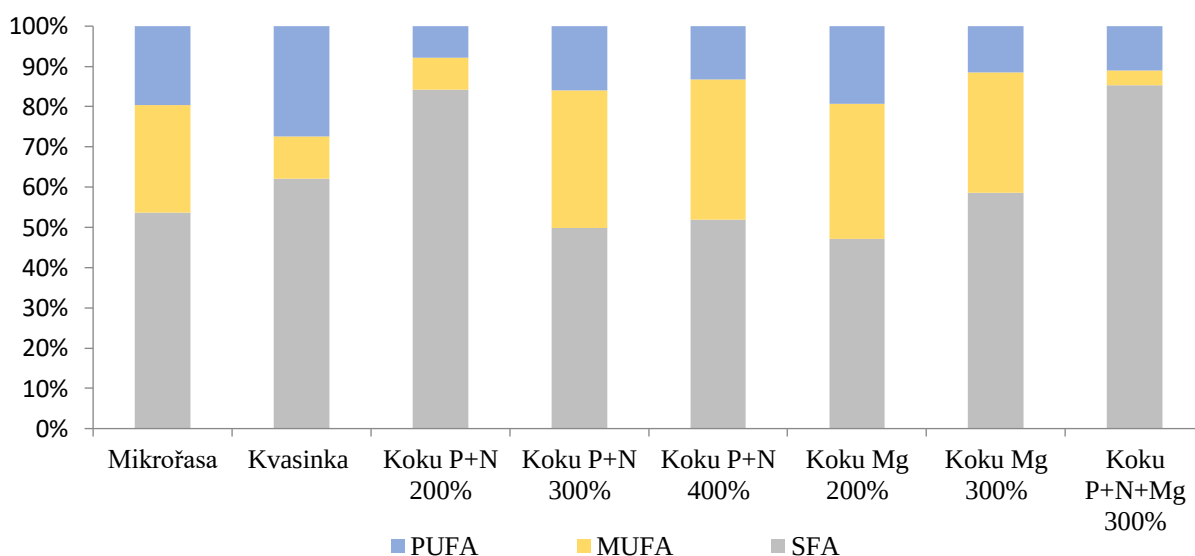
Celý profil MK této sady experimentů je uveden na grafu níže (Obrázek 34). Ve všech kultivacích lze vypořadovat stejný trend, kdy nejvíce produkovanými MK jsou SFA, druhé nejvíce zastoupené jsou MUFA (kromě P+N+ Mg^{2+} 300%). V případě P+N 200% byla naprosto markantně upřednostněna tvorba SFA (84,22%) na úkor zbylých MK. Produkce MUFA (8%) a PUFA (7,78%) byla téměř stejná. Profil MK zbylých P+N kokultivací byl velmi srovnatelný. U P+N 300% byl tvořen 49,92% SFA, 34,08% MUFA a 16% PUFA. U kokultivace P+N 400% byl tvořen 51,97% SFA, 34,77% MUFA a 13,26% PUFA. V případě vzorku obsahujícího Mg^{2+} 200% byly opět nejvíce zastoupeny SFA (47,13%), následovaly MUFA (33,53%) a PUFA (19,34%).

Mikroorganismy v médiu s Mg^{2+} 300% na rozdíl od předchozího případu mírně upřednostnily tvorbu SFA (58,55%) na úkor MUFA (30,02%) a PUFA (11,43%). Největším celkovým producentem SFA (85,4%) byla kokultivace s P+N+ Mg^{2+} 300%. V tomto případě se mikroorganismy rozhodly vyprodukovat větší množství SFA na úkor MUFA (3,6%). Zastoupení PUFA tvořilo 11%.

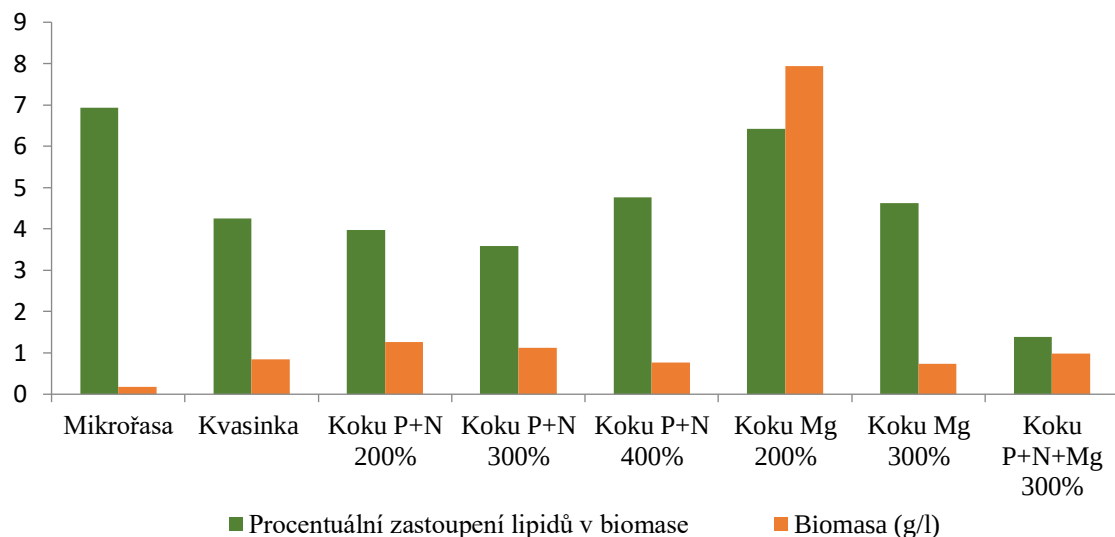
Procentuálně nejvíce vyprodukovaných MK v závislosti na biomase (Obrázek 35) se nacházelo v kokultivaci Mg^{2+} 200%, následovaly srovnatelné hodnoty kokultivací v P+N 400% a Mg^{2+} 300%. U zbylých P+N kultivací platilo, že s větším obsahem přidaných prvků klesala produkce lipidů. Nejmenší množství poté vyprodukovala kokultivace P+N+ Mg^{2+} 300%. Množství lipidů obsažené v kontrolní mikrořase bylo srovnatelné s Mg^{2+} 200% (tedy s největší kokultivační produkcí). Výrazně méně lipidů než kontrolní kvasinka obsahovala pouze kokultivace P+N+ Mg^{2+} 300%.



Obrázek 33: Grafické znázornění produkce metabolitů mutikultivátorového experimentu se *S. pararoseus* a *Coccomyxa* sp.



Obrázek 34: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin multikultivátorového experimentu se *S. pararoseus* a *Coccomyxa* sp.



Obrázek 35: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů multikultivátorových experimentů se *S. pararoseus* a *Coccomyxa* sp. s jejich biomasou

4.1.6 *Sporobolomyces pararoseus* a *Desmodesmus armatus*

Tabulka č. 13. Produkce biomasy multikultivátorového experimentu s *S. pararoseus* a *D. armatus*

	Mikrořasa kontrola	Kvasinka kontrola	P+N 200%	P+N 300%	P+N 400%	Mg ²⁺ 200%	Mg ²⁺ 300%	P+N+Mg ²⁺ 300%
Biomasa (g·l ⁻¹)	0,07	0,75	0,40	0,54	0,75	0,96	0,65	0,56

V případě těchto kultivací se musí konstatovat, že veškeré kokultivace kromě P+N 300% a Mg²⁺ 200% dosahovaly výrazně menší produkce metabolitů než kontrolní mikroorganismy (Obrázek 36). U dvou zmíněných kultivací dosahovala zvýšených hodnot pouze produkce ubiquinonu. U P+N 300% činila 8,43 mg/g sušiny, u Mg²⁺ 200% to bylo 6,54 mg/g sušiny. U P+N experimentů platí, že se zvyšujícím se obsahem přidaných prvků v médiu se zvyšuje i nárůst biomasy. Množství metabolitů bohužel zůstává stejné. V případě P+N 400% kokultivace byly ve vzorku navíc přítomny chlorofyly, lutein a β-karoten.

V případě Mg²⁺ kultivací platí, že s přidáním prvků do média klesá produkce biomasy, ubiquinonu i celkový karotenoidů, produkce celkových sterolů zůstává stejná. P+N+Mg²⁺ kokultivace vyprodukovala nejvíce ubiquinonu, dále srovnatelné hodnoty celkových sterolů a karotenoidů. Jak již bylo zmíněno na začátku, tak žádná z kokultivací nedosáhla v produkci biomasy ani metabolických produktu výrazného zlepšení oproti kontrolním mikroorganismům.

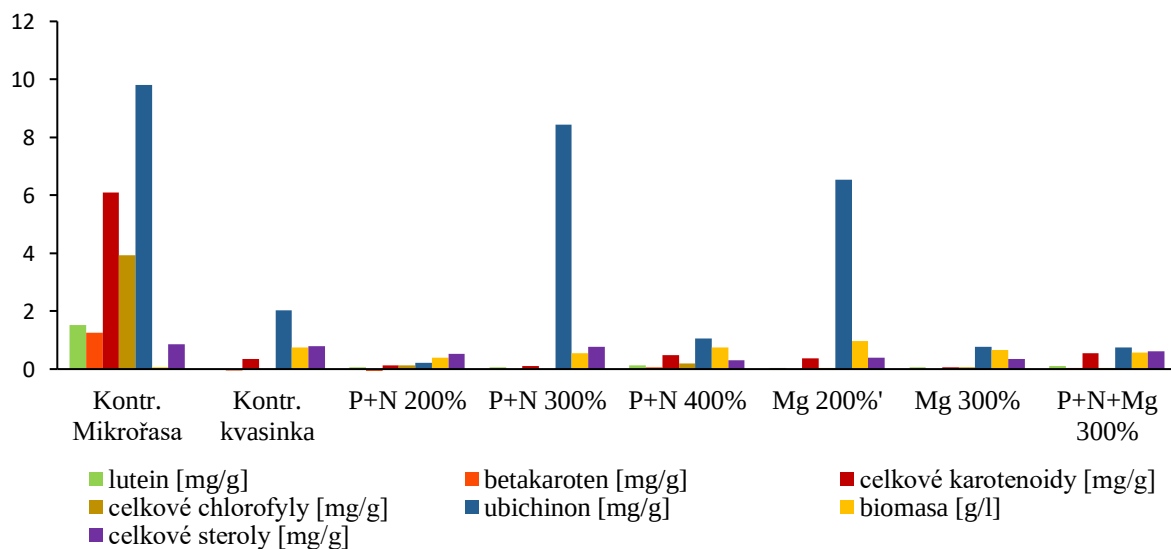
Na grafickém znázornění produkce mastných kyselin (Obrázek 37) lze vidět, že kromě kokultivace P+N 300% byl profil MK srovnatelný, kdy majoritní produkt tvořily SFA a minoritní PUFA. Kokultivace P+N 200% výrazně upřednostnila tvorbu SFA (65,54%) na

úkor MUFA (18,51%) a stala se tím obecně největším SFA producentem. Hodnota PUFA odpovídala 15,94%.

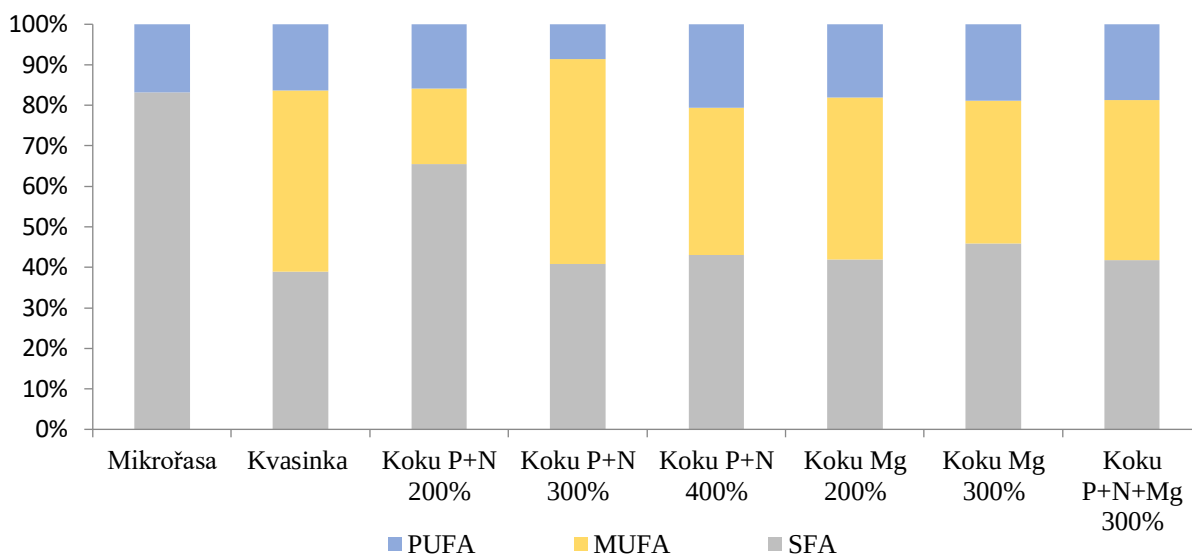
Výjimku ze zjištěného trendu profilu MK tvořila již zmíněná kokultivace s P+N 300%. V tomto případě mikroorganismy upřednostnily větší produkci MUFA (50,57%) na úkor jak SFA (40,81%) tak i PUFA (20,58%). Tato MUFA produkce se obecně ukázala být nejvyšší. Poslední P+N kokultivace (400%) nevykazuje tak markantní rozdíly v produkci SFA a MUFA. SFA tvoří 43,11%, MUFA 36,31% a PUFA 20,58% profilu MK.

Profil zastoupení MK u Mg^{2+} kokultivací je srovnatelný. U Mg^{2+} 200% je tvořen 42% SFA, 39,99% MUFA a 18,01% PUFA. U Mg^{2+} 300% je to poté 45,84% SFA, 35,33% MUFA a 18,83% PUFA. V případě vzorku s obsahem P+N+ Mg^{2+} 300% je profil MK srovnatelný s profily Mg^{2+} experimentů, konkrétně je tvořen 41,76% SFA, 39,6% MUFA a 18,64% PUFA. V porovnání s kontrolní mikrořasou kokultivace upřednostnily produkci MUFA na úkor SFA. Produkce MUFA nebyla u mikrořasy vůbec zaznamenána. S výjimkou kokultivace s P+N 300% je profil MK kvasinky srovnatelný s kokultivačními produkcemi MK.

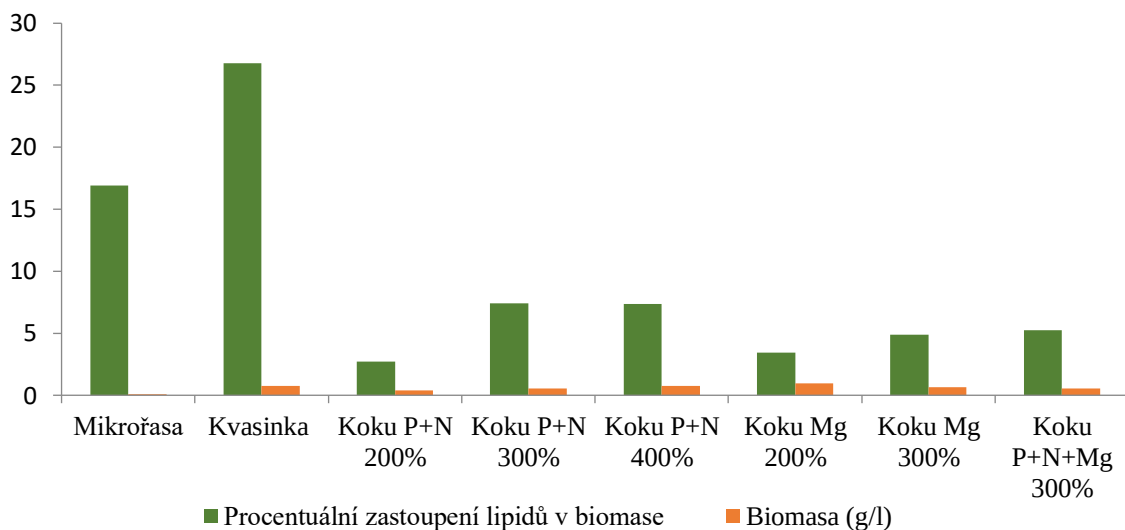
Nejvíce produkované lipidy (Obrázek 38) byly u kokultivací pozorovány u srovnatelných hodnot u kokultivací P+N 300% a P+N 400%. Následovaly opět srovnatelné produkce experimentů Mg^{2+} 300% a P+N+ Mg^{2+} 300%. Nejmenší množství lipidických látek vyprodukovaly kokultivace P+N 200% a Mg^{2+} 200%. Produkce lipidických látek obou kontrolních mikroorganismů několikanásobně převyšují produkce kokultivační.



Obrázek 36: Grafické znázornění produkce metabolitů mutikultivátorového experimentu se *S. pararoseus* a *D. armatus*



Obrázek 37: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin multikultivátorového experimentu se *S. parvoseus* a *D. armatus*



Obrázek 38: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů multikultivátorové kokultivace *S. parvoseus* se *D. armatus* s jejich biomasou

4.1.7 *Rhodotorula kratochvilae* a *Desmodesmus communis*

Tabulka č. 14. Produkce biomasy multikultivátorového experimentu s *R. kratochvilovae* a *D. communis*

	Mikrořasa kontrola	Kvasinka kontrola	P+N 200%	P+N 300%	P+N 400%	Mg ²⁺ 200%	Mg ²⁺ 300%	P+N+Mg ²⁺ 300%
Biomasa (g·l ⁻¹)	0,08	3,92	4,18	1,68	4,72	2,03	2,60	2,77

Porovnáním P + R experimentů (Obrázek 39) v tomto typu kultivace se ukazuje, že P+N 400% kultivace byla největším producentem jak biomasy, tak celkových sterolů (5,19 mg/g biomasy) a ubichinonu (6,58 mg na sušiny), následovaly celkové karotenoidy. P+N 300% kokultivace měla naprosto srovnatelné hodnoty produkce ubichinonu a celkových sterolů, v menší míře byly přítomny i celkové karotenoidy. V poslední P+N 200% kultivaci byla nejvíce zastoupen ubichinon a opět celkové karotenoidy.

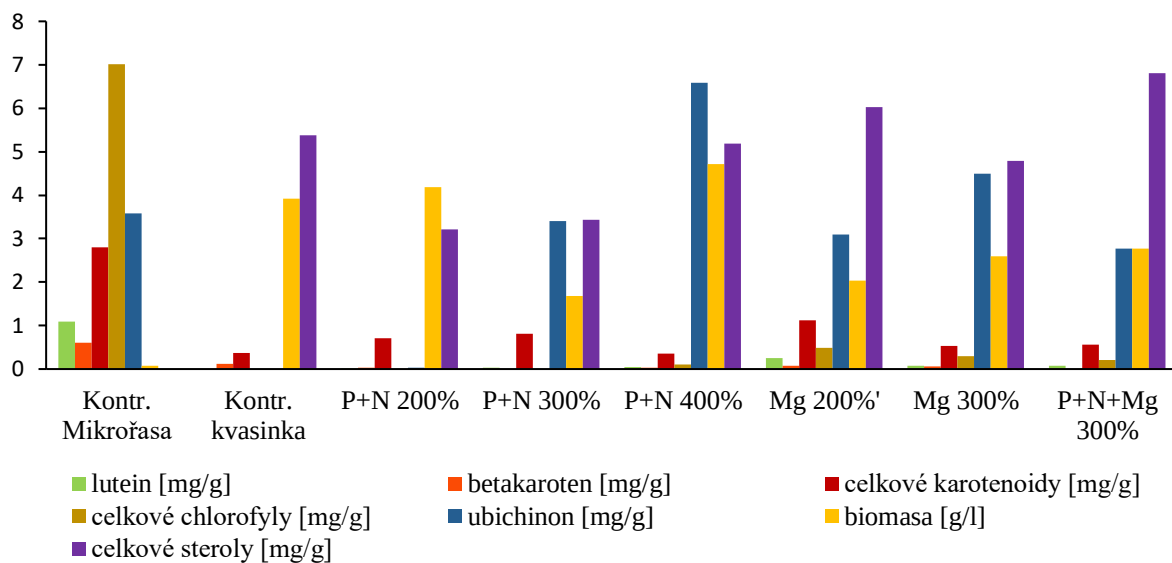
Z Mg^{2+} kokultivací byla lepším producentem biomasy Mg^{2+} 300% kultivace, následovala produkce ubichinonu (4,49 mg/g sušiny) a celkových sterolů (4,79 mg/g sušiny). Mg^{2+} 200% kultivace vyprodukovala sice méně biomasy a ubichinonu, ale znatelně více celkových sterolů (6,02 mg/g sušiny), luteinu a celkových karotenoidů. U těchto vzorků platí, že se zvyšujícím se obsahem Mg^{2+} v médiu klesá produkce celkových chlorofylů.

Posledním typem kultivací je P+N+ Mg^{2+} 300% kdy byly ve vzorku nejvíce zastoupeny celkové steroly a ubichinon. V porovnání s kontrolní kvasinkou vyprodukovaly více biomasy P+N 200% a P+N 400% kultivace. Celkových sterolů bylo více u Mg^{2+} 200% a P+N+ Mg^{2+} 300%. Celkových karotenoidů bylo více ve všech kokultivacích. Srovnáním s kontrolní kvasinkou obsahovaly kultivace Mg^{2+} a P+N+ Mg^{2+} 300% stejné produkty řasového metabolismu, ale v mnohem menší míře než u kontrolní mikrořasy.

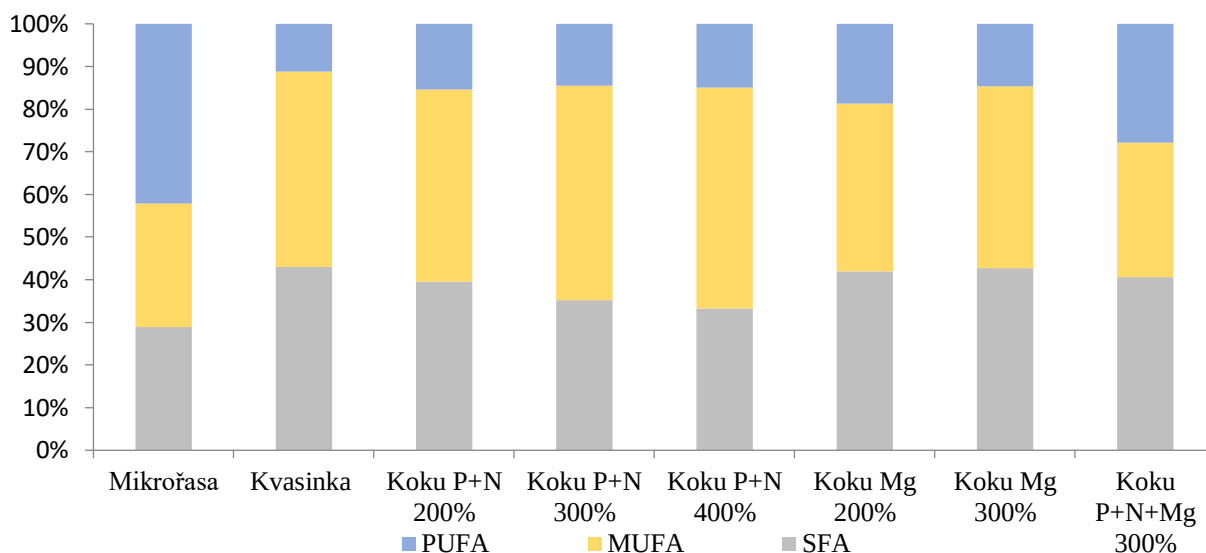
V případě tohoto experimentu jsou produkce MK všech kultivací (kokultivace Mg^{2+} 200% a P+N+ Mg^{2+} 300%) stejnorodé (Obrázek 40). Nejvíce zastoupeny jsou MUFA, následovány SFA a nejmenší složku MK tvoří PUFA. U kokultivace P+N 200% je profil MK tvořen 45,07% MUFA, 39,6% SFA a 15,33%. V případě kokultivace P+N 300% bylo procentuální složení MK následující- 50,21% MUFA, 35,22% SFA a 14,57% PUFA. Obecně největším producentem MUFA se ukázala být kokultivace P+N 400% (51,84%). Dále bylo produkováno 33,19% SFA a 14,96% PUFA.

U obou Mg^{2+} experimentů nejsou rozdíly mezi produkcí SFA a MUFA tak markantní. Mikroorganismy v médiu s Mg^{2+} 200% tvořily 41,93% SFA, 39,37% MUFA a 18,7% PUFA, čímž se produkce lišila od ostatních kultivací, kde byly majoritním produktem MUFA. Kokultivace Mg^{2+} 300% odpovídala zjištěnému trendu a vyprodukovala největší množství MUFA (42,73%), těsně následovaly SFA (42,69%) a nejméně zastoupené byly PUFA (14,58%). Druhou výjimkou, kdy byly SFA produkovány více než MUFA byla kokultivace s P+N+ Mg^{2+} 300%. Profil MK byl v tomto případě tvořen 40,58% SFA, 31,54% MUFA a 27,88% PUFA. Profil MK kvasinky odpovídá profilu MK kokultivací (kromě dvou již zmíněných výjimek, kdy byly více produkovány MUFA).

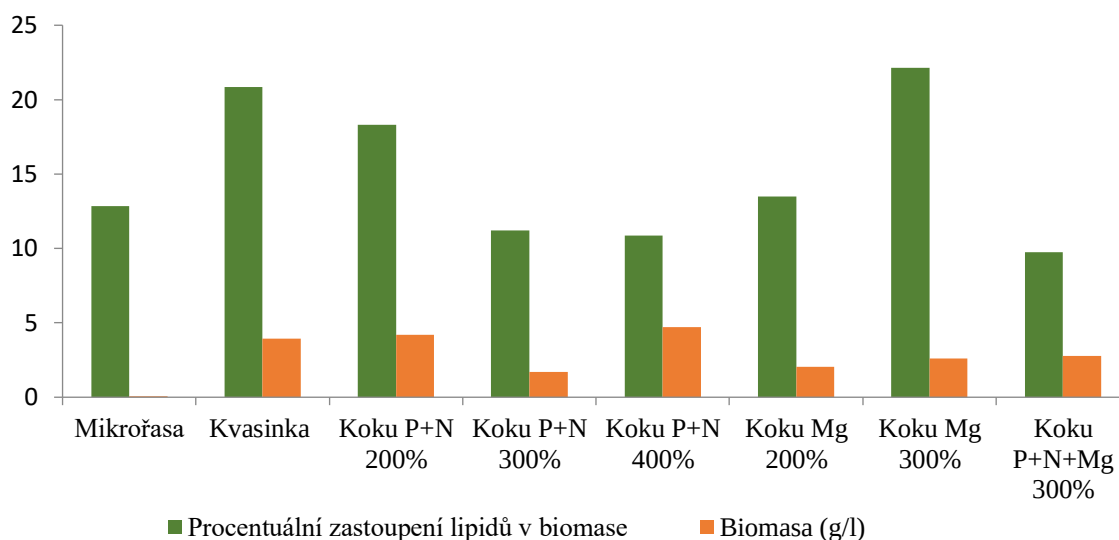
Ve srovnání s mikrořasou kokultivace upřednostnily větší tvorbu MUFA na úkor PUFA. Nejvíce lipidických látek (Obrázek 41) vyprodukovala kokultivace Mg^{2+} 300%, následuje kokultivace P+N 200%. Nejmenší produkce byla zaznamenána u kokultivace P+N+ Mg^{2+} 300%. V případě kokultivací P+N 300% a P+N 400% je produkce lipidických látek srovnatelná. Kromě kultivace s Mg^{2+} 300%, byla u kontrolní kvasinky pozorována větší produkce lipidů než u kokultivací. Naopak produkce kontrolní mikrořasy byla srovnatelná s nejmenšími produkcemi kokultivací.



Obrázek 39: Grafické znázornění produkce metabolitů mutikultivátorového experimentu s *R. kratochvilovae* a *D. communis*



Obrázek 40: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin multikultivátorového experimentu s *R. kratochvilovae* a *D. communis*



Obrázek 41: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů multikultivátorových experimentů s *R. kratochvilovae* a *D. communis* s jejich biomasou

4.1.8 *Rhodotorula kratochvilae* a *Desmodesmus armatus*

Tabulka č. 15. Produkce biomasy multikultivátorového experimentu s *R. kratochvilovae* a *D. armatus*

	Mikrořasa kontrola	Kvasinka kontrola	P+N 200%	P+N 300%	P+N 400%	Mg ²⁺ 200%	Mg ²⁺ 300%	P+N+Mg ²⁺ 300%
Biomasa (g·l ⁻¹)	0,31	0,58	1,83	1,19	1,56	1,49	0,76	1,87

Metabolická produkce následujícího experimentu (Obrázek 42) byla velmi rozmanitá. Z P+N kokultivací se ukázala být nejlepším producentem ubichinonu P+N 300% kokultivace. Následovala zde produkce celkových chlorofylů a sterolů. Celkové steroly byly nejvíce zastoupeny u P+N 400% kultivace, následovaly celkové karotenoidy a v menší míře poté chlorofyly, β -karoten, lutein a ubichinon (toho zde bylo produkováno nejméně ze všech kultivací). Co se týče biomasy, byla nejlepším producentem P + N 200% kokultivace.

U Mg²⁺ kultivací platilo, že s vyšším obsahem přidaných Mg²⁺ prvků v médiu klesala produkce jak biomasy tak i metabolitů. V obou případech byl nejvíce zastoupen ubichinon a poté celkové karotenoidy. V poslední P+N+Mg²⁺ 300% kokultivaci byly nejvíce zastoupeny ubichinon (4,99 mg/g sušiny), celkové steroly (2,43 mg/g biomasy) a karotenoidy (2,17 mg/g biomasy). Tato kokultivace byla obecně největším producentem biomasy a již zmíněných metabolitů. V porovnání s kontrolní kvasinkou byly všechny kokultivace většími producenty biomasy a kromě Mg²⁺ kultivací také metabolitů.

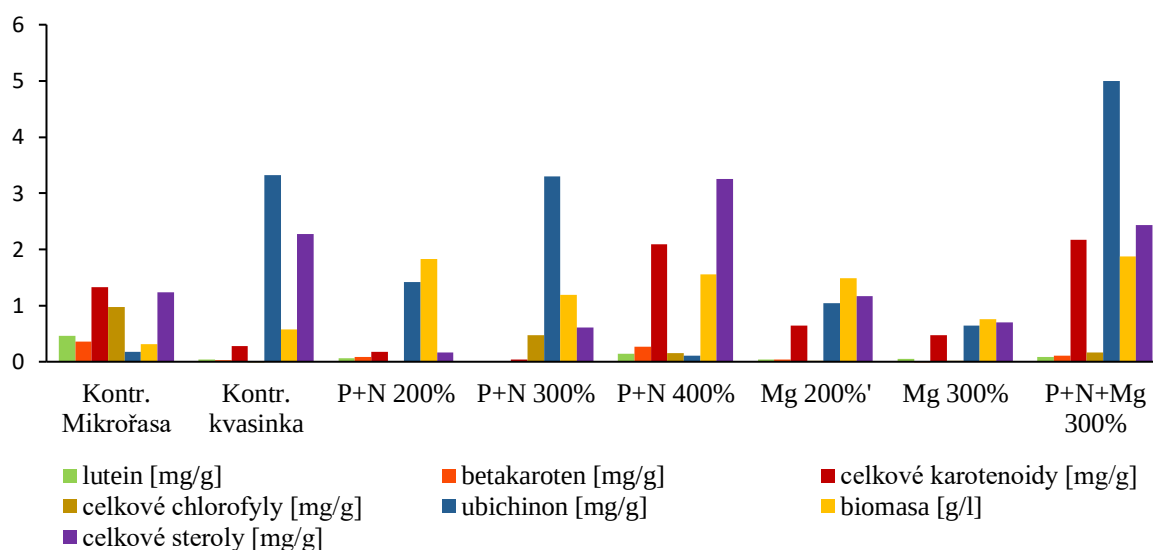
V případě této sady experimentů je procentuální produkce MK (Obrázek 43) stejnorodá. Ve všech typech kokultivací byl profil MK tvořen nejvíce SFA, následovaly MUFA a nejméně zastoupené byly PUFA.

Co se týče konkrétních hodnot jednotlivých složek, tak u experimentu s P+N 200% byly SFA zastoupeny z 40,31%, MUFA odpovídaly 34,22% a PUFA (25,46%). U P+N 300% byl profil MK následovný – SFA 48,82% (což je obecně největší SFA produkce ze všech experimentů), MUFA 35,26% a PUFA 15,93%.

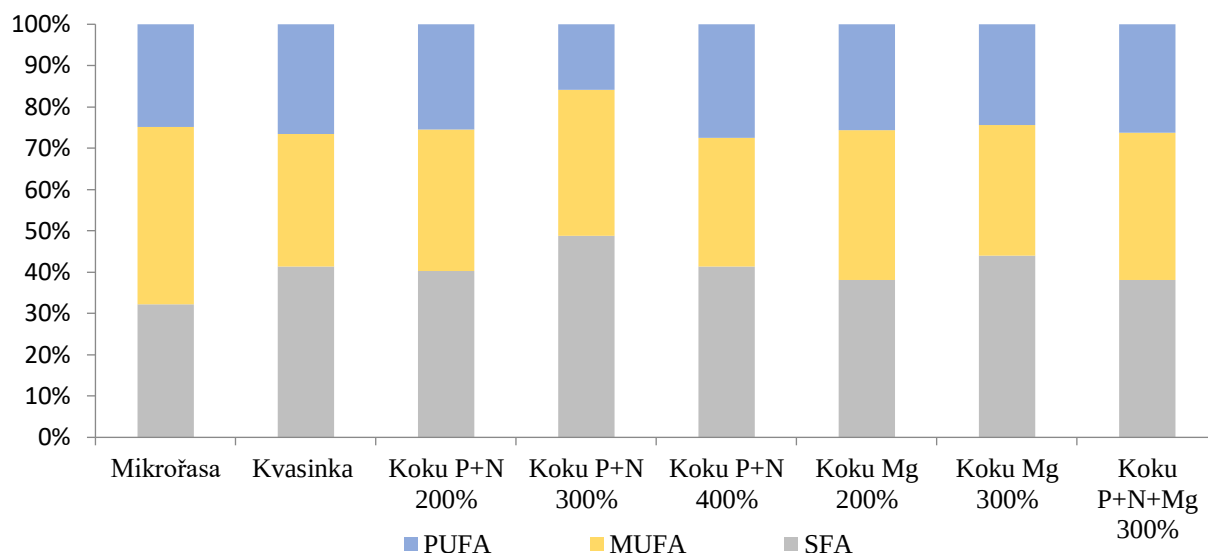
U kokultivací s P+N 400% v porovnání s předchozími P+N experimenty trochu poklesla produkce SFA (41,36%) a MUFA (31,22%) na úkor PUFA (27,42%), kterých bylo v tomto vzorku produkováno obecně nejvíce. vyprodukovaly kokultivace P+N+Mg²⁺, P+N 400% a P+N 200%. Nejmenším producentem byla kokultivace Mg²⁺ 300%.

Oba Mg²⁺ experimenty měly téměř srovnatelný profil MK. U Mg²⁺ 200% byl tvořen 38,08% SFA, 36,24% MUFA a 25,69% PUFA. Produkce MUFA byla v tomto případě největší ze všech kokultivací. U Mg²⁺ 300% tvořily SFA 43,93%, MUFA 31,62% a PUFA 24,26% profilu MK. Mikroorganismy v prostředí s P+N+Mg²⁺ 300% produkovaly nejvíce SFA (38,12%), těsně následovány MUFA (35,66%) a nejmenší podíl tvořily PUFA (26,21%). Oproti kontrolní kultivaci mikrořasy byly v kokultivacích potlačeny produkce MUFA na úkor většího množství SFA. Profil MK kontrolní kvasinky je s tím kokultivačním srovnatelný.

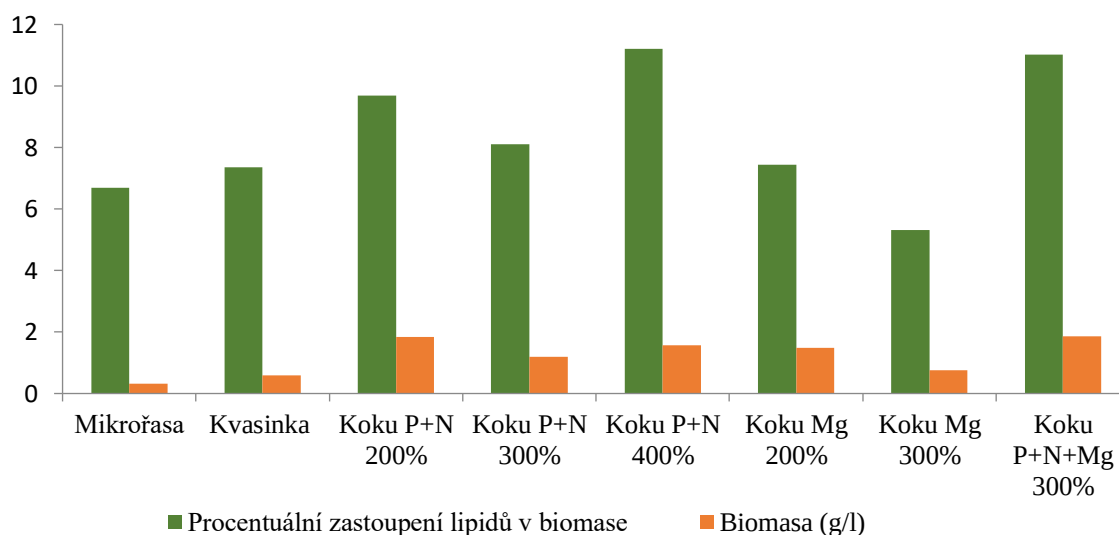
Největšími producenty lipidů (Obrázek 44) se ukázaly být kokultivace s P+N 400%, P+N+Mg²⁺ 300% a P+N 200%. Nejmenším producentem byly mikroorganismy v médiu s Mg²⁺ 200%. V porovnání s oběma kontrolními mikroorganismy se kokultivace ukázaly být lepší producenty MK, s výjimkou již zmíněné kokultivace Mg²⁺ 200%.



Obrázek 42: Grafické znázornění produkce metabolitů mutikultivátorového experimentu s *R. kratochvilovae* a *D. armatus* s jejich biomasou



Obrázek 43: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin multikultivátorového experimentu s *R. kratochvilovae* a *D. armatus*



Obrázek 44: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů multikultivátorových experimentů s *R. kratochvilovae* a *D. armatus* s jejich biomasou

4.1.9 *Rhodotorula kratochvilae* a *Desmodesmus velitaris*

Tabulka č. 16. Produkce biomasy multikultivátorového experimentu s *R. kratochvilovae* a *D. velitaris*

	Mikrořasa kontrola	Kvasinka kontrola	P+N 200%	P+N 300%	P+N 400%	Mg ²⁺ 200%	Mg ²⁺ 300%	P+N+Mg ²⁺ 300%
Biomasa (g·l ⁻¹)	0,10	0,94	0,52	1,53	0,59	0,31	1,39	1,57

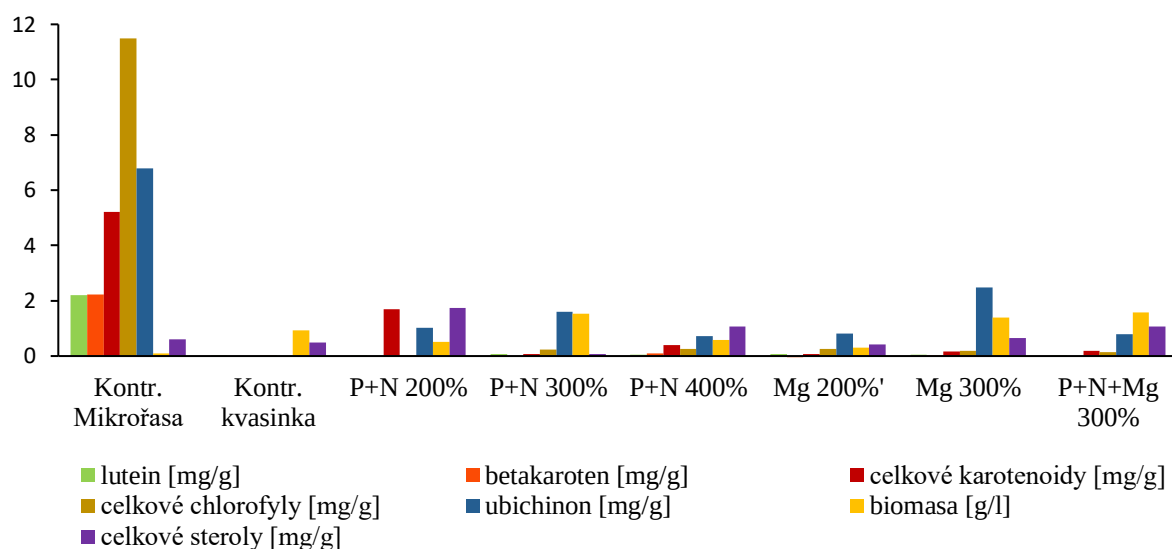
V tomto případě se každá z kokultivací ukázala být lepší metabolickým producentem než kontrolní kvasinka (Obrázek 45). Ta produkovala pouze biomasu a celkové steroly. Z P+N kokultivací byla největším producentem celkových karotenoidů (1,69 mg/g sušiny) a sterolů (1,75 mg/g sušiny) P+N 200% kokultivace. P+N 300% kokultivace zase produkovala nejvíce ubichinonu (1,59 mg/g sušiny) a biomasy. Poslední P+N 400% kokultivace měla v biomase nejvíce zastoupeny celkové steroly a ubichinon, avšak v mnohem menší míře než předchozí kultivace.

U Mg^{2+} kultivací byla lepší ta s obsahem Mg^{2+} 300%, kdy byl nejvíce zastoupen ubichinon (2,49 mg/g sušiny) a následovaly celkové steroly. Tato kultivace vyprodukovala také více biomasy než Mg^{2+} 200% kultivace. Posledním kultivačním typem byla P+N+ Mg^{2+} 300% kokultivace. Zde byly nejvíce zastoupeným celkové steroly a poté ubichinon. V porovnání s kontrolní mikrořasou obsahovaly kokultivace, kromě luteinu, všechny metabolické produkty mikrořas ale v nezanedbatelně menší míře.

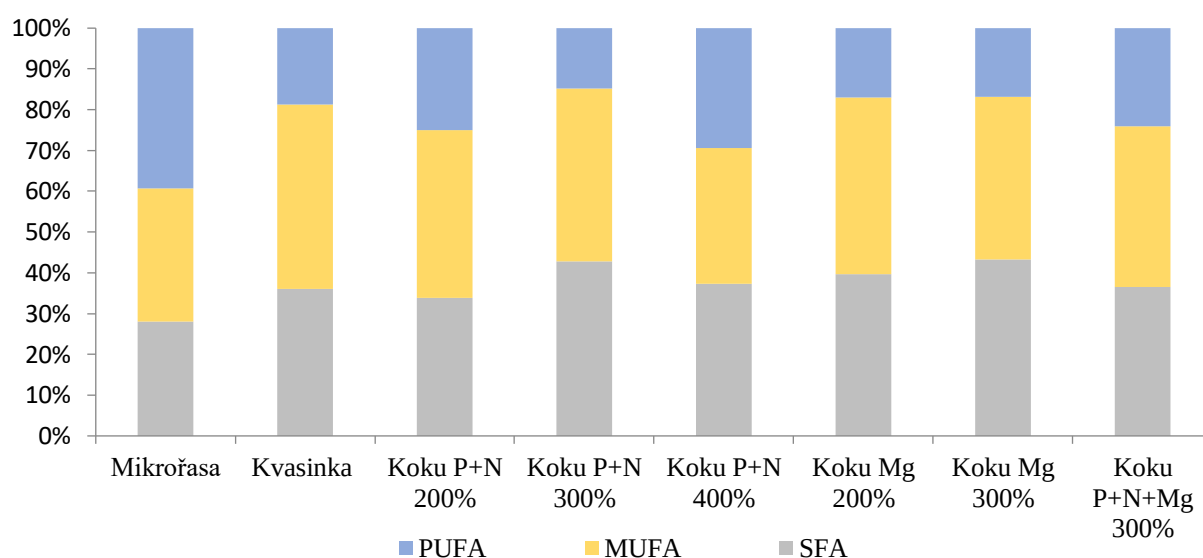
V tomto případě nelze pro experimenty vytvořit obecný profil složek MK, výsledky jsou totiž dost různorodé. U P+N 200% experimentu byly nejvíce produkovány MUFA (41,06%), poté SFA (33,89%) a PUFA (25,05%). Mikroorganismy v médiu s P+N 300% vyprodukovaly naprosto srovnatelné množství SFA (42,79%) a MUFA (42,36%), PUFA tvořily 14,85% celkové složky MK. Kokultivace s P+N 400% měla téměř stejné hodnoty jednotlivých složek, a to SFA tvořily 37,29%, MUFA 33,33% a PUFA 39,38%.

Kokultivace Mg^{2+} 200% se ukázala být obecně největším producentem MUFA (43,32%), jen o něco méně byly zastoupeny SFA (39,73%) a nejmenší složku opět tvořily PUFA (16,95%). U Mg^{2+} 300% vzorku se profil MK skládal z 43,24% SFA, 39,9% MUFA a 16,86% PUFA. U posledního typu kokultivace s P+N+ Mg^{2+} 300% byly nejvíce zastoupeny MUFA (39,35%). Těsně následovaly SFA (36,57%) a nejméně produkovány byly opět PUFA (24,08%). Ve srovnání s kontrolní mikrořasou byla u kokultivací potlačená produkce PUFA na úkor vyšších hodnot MUFA. Profil kvasinkových MK přibližně odpovídá profilům MK ostatních kultivací. (Obrázek 46).

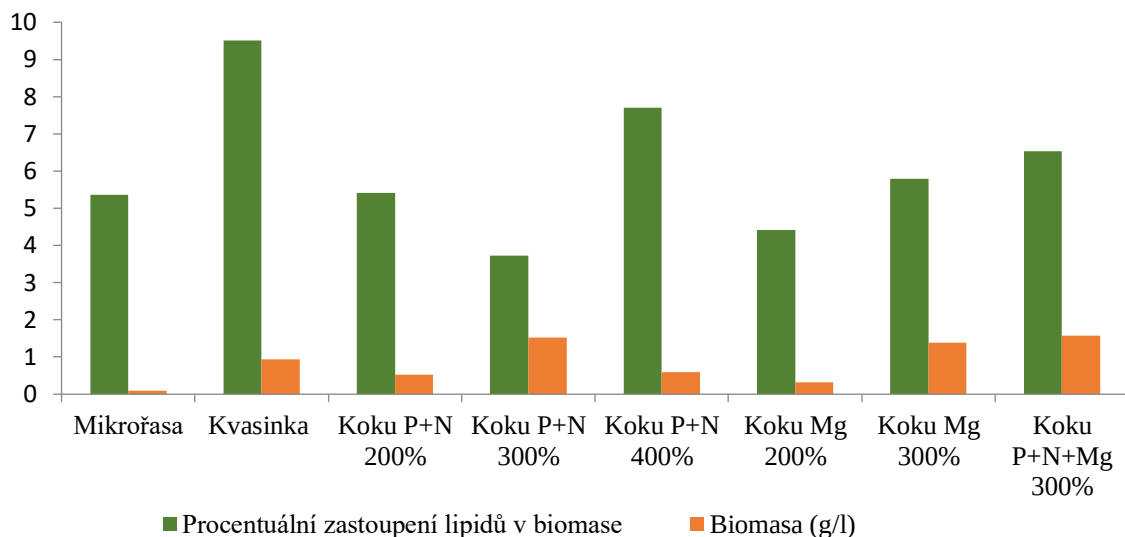
Nejvíce celkových lipidů (Obrázek 47), co se týče kokultivací, vyprodukovaly mikroorganismy v prostředí s P+N 400% a P+N+ Mg^{2+} 300%. U P+N 200% a P+N 300% platí, že s větším obsahem přidaných prvků klesala produkce lipidů. U Mg^{2+} experimentů naopak větší obsah Mg^{2+} prvků v médiu znamenal větší lipidickou produkci. V porovnání s kontrolní kvasinkou bylo ale množství syntetizovaných lipidických látek u všech kokultivací menší. Mikrořasa měla menší množství vyprodukovaných lipidů než kokultivace, kromě dvou případů, a to kokultivací P+N 300% a Mg^{2+} 200%.



Obrázek 45: Grafické znázornění produkce metabolitů mutikultivátorového experimentu s *R. kratochvilovae* a *D. velitaris* s jejich biomasou



Obrázek 46: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin multikultivátorového experimentu s *R. kratochvilovae* a *D. velitaris*



Obrázek 47: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů multikultivátorových experimentů s *R. kratochvilovae* a *D. velitaris* s jejich biomasou

4.1.10 *Rhodotorula kratochvilae* a *Desmodesmus acutus*

Tabulka č. 17. Produkce biomasy multikultivátorového experimentu s *R. kratochvilovae* a *D. acutus*

	Mikrořasa kontrola	Kvasinka kontrola	P+N 200%	P+N 300%	P+N 400%	Mg ²⁺ 200%	Mg ²⁺ 300%	P+N+Mg ²⁺ 300%
Biomasa (g·l ⁻¹)	0,08	0,54	4,26	0,37	0,29	0,50	0,84	0,45

V rámci tohoto kultivačního experimentu (Obrázek 48) se ukázaly být nejlepším metabolickým producentem P+N kokultivace s tím, že nejlepším se ukázala být P+N 300% kokultivace. Je zde majoritně zastoupen ubichinon (12,50 mg/g sušiny), dále následují celkové steroly (5,25 mg/g sušiny), celkové karotenoidy a chlorofyly. U P + N 200% byl nejvíce zastoupen také ubichinon (10,11 mg/g sušiny), dále následuje steroly a v téměř zanedbatelnou míře celkové chlorofyly a karotenoidy.

Tato kokultivace měla ze všech kultivací, a to včetně kontrolní kvasinky, největší zastoupení biomasy. Poslední P + N 400% kultivace obsahovala opět nejvíce ubichinonu, dále steroly, celkové chlorofyly a celkové karotenoidy. Produkce karotenoidů a chlorofylu byla stejná s P + N 300%, ale ubichinonu a sterolů bylo výrazně méně. U P+N kultivací platí, že se zvyšující se koncentrací přidaných vzorků do média klesá produkce biomasy.

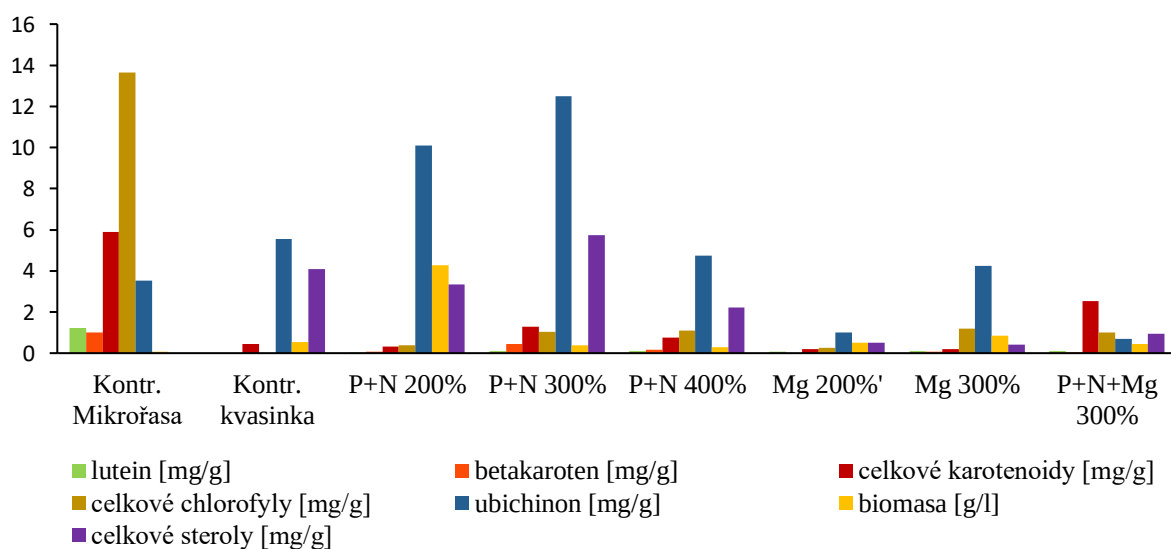
Z Mg²⁺ kokultivací se ukázala být lepším producentem celkových metabolitů Mg²⁺ 300%. V P+N+Mg²⁺ 300% kultivaci byly nejvíce zastoupeným celkové karotenoidy (a to nejvíce ze všech kultivací včetně kontrolní kvasinky). Ostatní metabolity tam byly zastoupeny v malé míře. Srovnáním s kontrolní kvasinkou byli celkově lepšími producenty P+ N kultivace. Mg²⁺ a P+N+Mg²⁺ kultivace dosahovaly výrazně nižší produkce metabolitů.

Porovnáním s kontrolní mikrořasou jsou v kokultivacích obsaženy stejné metabolity, ale v mnohem menší míře.

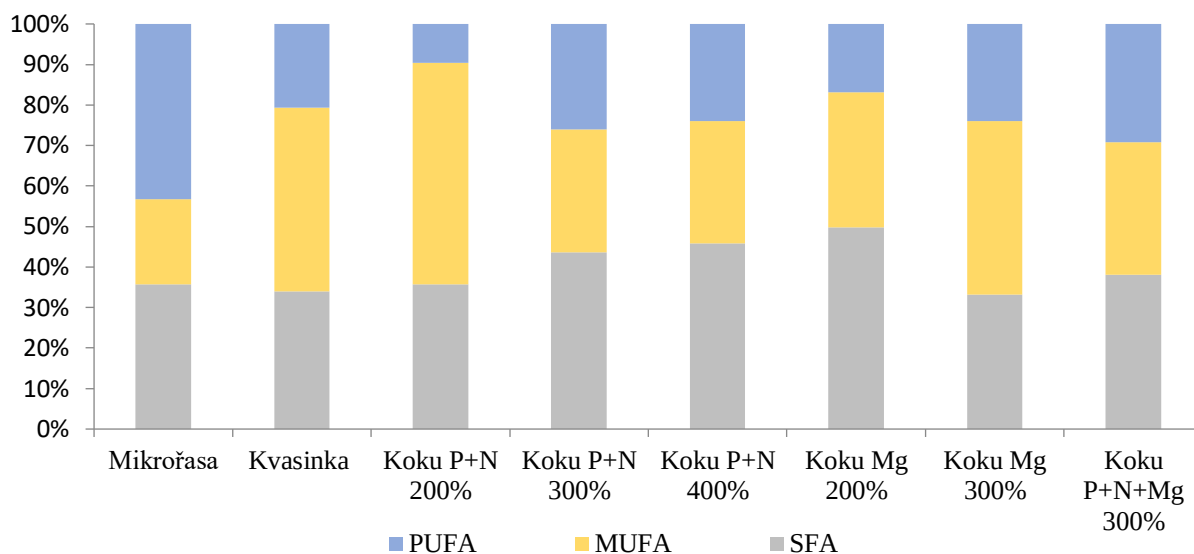
Profil vyprodukovaných MK byl v této kultivaci poměrně různorodý (Obrázek 49). Kokultivace s P+N 200% majoritně produkovala SFA (54,75%), následovaly SFA (35,69%) a PUFA (9,56%). Tento vzorek vyprodukoval obecně nejvíce MUFA a spolu s kokultivací Mg^{2+} 300% jsou jedinými experimenty, kdy produkce MUFA převyšovaly SFA. U kultivace s navýšením P+N na 300% byl profil MK tvořen 43,66% SFA, 30,37% MUFA a 25,97% PUFA. V případě poslední P+N (400%) kultivace byla produkce MK téměř naprosto srovnatelná s P+N 300% kultivací, SFA činily 45,82%, MUFA odpovídaly 30,13% a PUFA tvořily 24,05%.

Mikroorganismy v médiu s Mg^{2+} 200% produkovaly nejvíce SFA (49,78%), následovaly MUFA (33,32%) a PUFA (16,9%). V kokultivaci s Mg^{2+} 300%, jak již bylo řečeno, jsou hlavní složkou MK MUFA (42,9%), až poté SFA (33,19%) a PUFA (23,9%). V kokultivačním médiu s přidanými prvky P+N+ Mg^{2+} 300% byly hlavní složkou MK SFA (38,14%), poměrně těsně poté následovaly MUFA (32,68%) a PUFA (29,18%). V porovnání s kontrolní mikrořasou byly v kokultivacích podpořeny tvorby MUFA na úkor PUFA. Kontrolní kvasinka měla profil produkovaných MK srovnatelný s kokultivacemi (kromě již zmíněných kokultivací, kdy byly majoritním produktem MUFA).

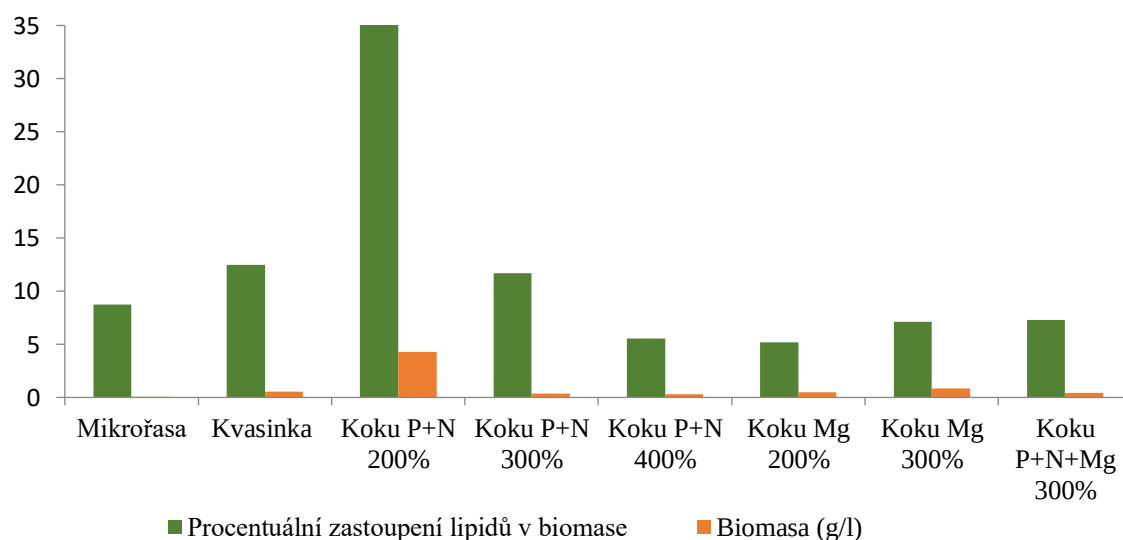
S přehledem největší množství celkových lipidů bylo zjištěno u kokultivace v prostředí s P+N 200%, produkce této kokultivace několikanásobně převyšuje všechny ostatní kultivace (Obrázek 50). Za ní následuje kontrolní kvasinka a kokultivace P+N 300%. Množství lipidů kokultivací P+N 400% a Mg^{2+} 200% je srovnatelné, stejně tak u kokultivací Mg^{2+} 300% a P+N+ Mg^{2+} 300%. Kontrolní kvasinka vyprodukovala srovnatelné množství lipidů s kokultivací v prostředí s P+N 300% a produkce mikrořasy se dá srovnat s Mg^{2+} 300% a P+N+ Mg^{2+} 300% experimenty.



Obrázek 48: Grafické znázornění produkce metabolitů mutikultivátorového experimentu s *R. kratochvilovae* a *D. acutus* s jejich biomasou



Obrázek 49: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin multikultivátorového experimentu s *R. kratochvilovae* a *D. acutus*



Obrázek 50: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů multikultivátorových experimentů s *R. kratochvilovae* a *D. acutus* s jejich biomasou

4.1.11 *Rhodotorula kratochvilae* a *Scenedesmus obliquus*

Tabulka č. 18. Produkce biomasy multikultivátorového experimentu s *R. kratochvilovae* a *S. obliquus*

	Mikrořasa kontrola	Kvasinka kontrola	P+N 200%	P+N 300%	P+N 400%	Mg ²⁺ 200%	Mg ²⁺ 300%	P+N+Mg ²⁺ 300%
Biomasa (g·l ⁻¹)	0,07	0,62	0,77	9,11	0,37	1,15	0,70	0,15

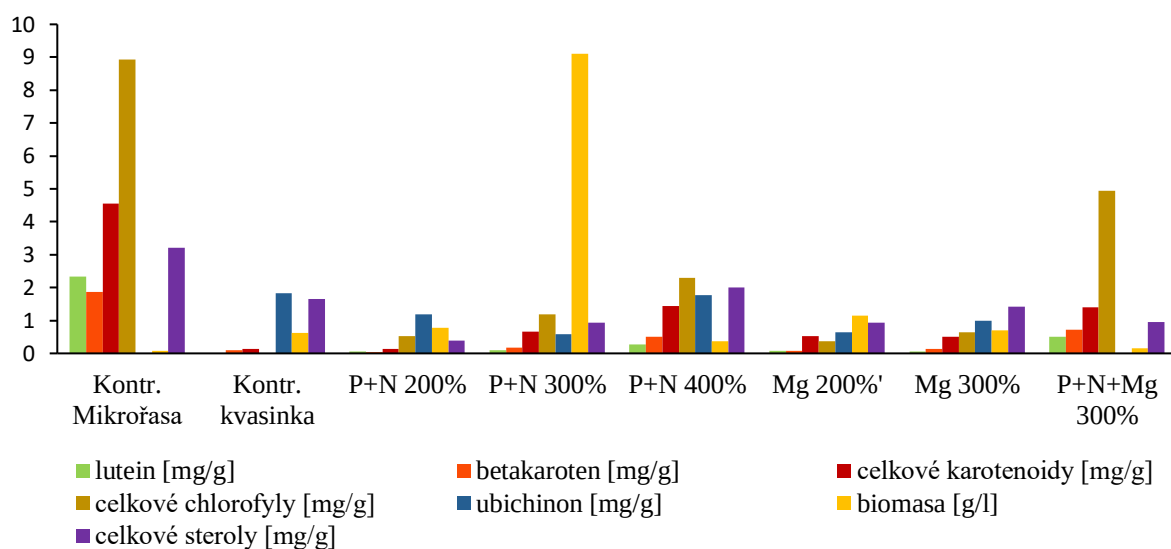
Z grafického znázornění produkovaných metabolitů (Obrázek 51) u P+N experimentů platí, že se zvyšujícím se množstvím přidávaných prvků stoupá produkce karotenoidních látek i sterolů. Nejvíce jich tedy bylo přítomno v P+N 400%, a to chlorofyly (2,29 mg/g sušiny) steroly (2,01 mg/g sušiny), ubiquinon (1,78 mg/g sušiny), celkové karotenoidy, β -karoten a lutein. P+N 300% kultivace je také s přehledem výrazně největším producentem biomasy ze všech experimentů (včetně kontrolních mikroorganismů).

U Mg^{2+} kultivací platilo, že se zvyšujícím se obsahem přidávaných prvků stoupá syntéza metabolitů (v obou kultivacích byly přítomny stejné), ale klesá produkce biomasy. U Mg^{2+} 300% vzorku bylo nejvíce celkových sterolů a ubiquinonu. U P+N+ Mg^{2+} 300% kultivace to vypadá, jako by mikroorganismy téměř úplně potlačily produkci biomasy na úkor syntézy metabolitů. Nejvíce zde byly zastoupeny chlorofyly (4,94 mg/g sušiny) a obecně to byla jejich největší produkce ze všech kokultivací. V menší míře potom byly syntetizovány celkové karotenoidy, steroly, lutein a β -karoten. Kontrolní kvasinka vyprodukovala více sterolů a ubiquinonů než kokultivace, ale karotenoidních látek produkovaly více kokultivace. Mikrořasové metabolity byly zastoupeny ve všech kokultivacích, ale méně než u kontrolní mikrořasy.

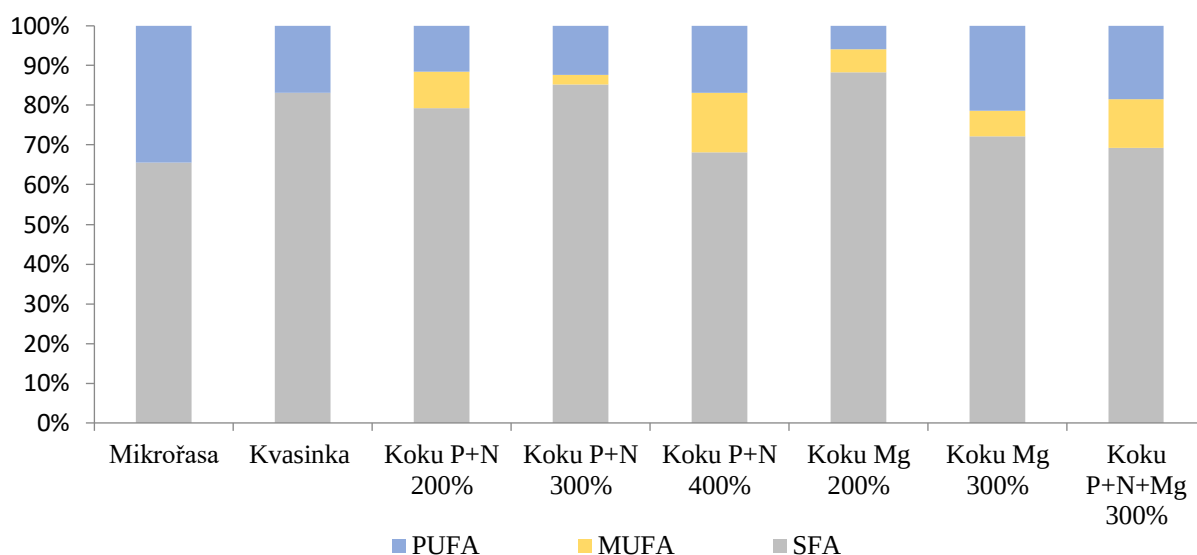
V této sadě kokultivačních experimentů jsou drtivým majoritním produktem SFA, na úkor produkce MUFA a PUFA. V případě kokultivace s P+N 200% činila produkce MK 79,2% SFA, 9,2% MUFA a 11,6% PUFA. Následující kultivace v prostředí P+N 300% měla profil MK složený z 85,3% SFA, 2,38% MUFA (což je obecně nejmenší MUFA produkce) a 12,32% PUFA. V kokultivaci s P+N 400% byla produkce SFA (68,2%) mírně potlačena na úkor nárůstu MUFA (15%) a PUFA (16,8%).

V případě média s obsahem Mg^{2+} 200% byly opět nejvíce zastoupeny SFA, jejich procentuální zastoupení činilo 88,32%, což je obecně největší SFA produkce ze všech kultivací. Na úkor vysoké SFA produkce bylo vyprodukováno pouze 5,81% MUFA a 5,87% PUFA. U Mg^{2+} 300% kultivace byl zaznamenán nárůst PUFA (21,36%). Hodnoty zastoupení MUFA odpovídaly 6,49% a SFA 72,15%. V poslední kokultivaci v prostředí P+N+ Mg^{2+} 300% byl profil MK tvořen 69,19% SFA, 12,4% MUFA a 18,41% PUFA. V porovnání s kontrolními mikroorganismy produkují kokultivace stejné majoritní produkty (SFA), navíc ale ještě díky médiu obohaceném o přidané prvky jsou schopné produkce MUFA, které u obou kontrolních mikroorganismů chybí (Obrázek 52).

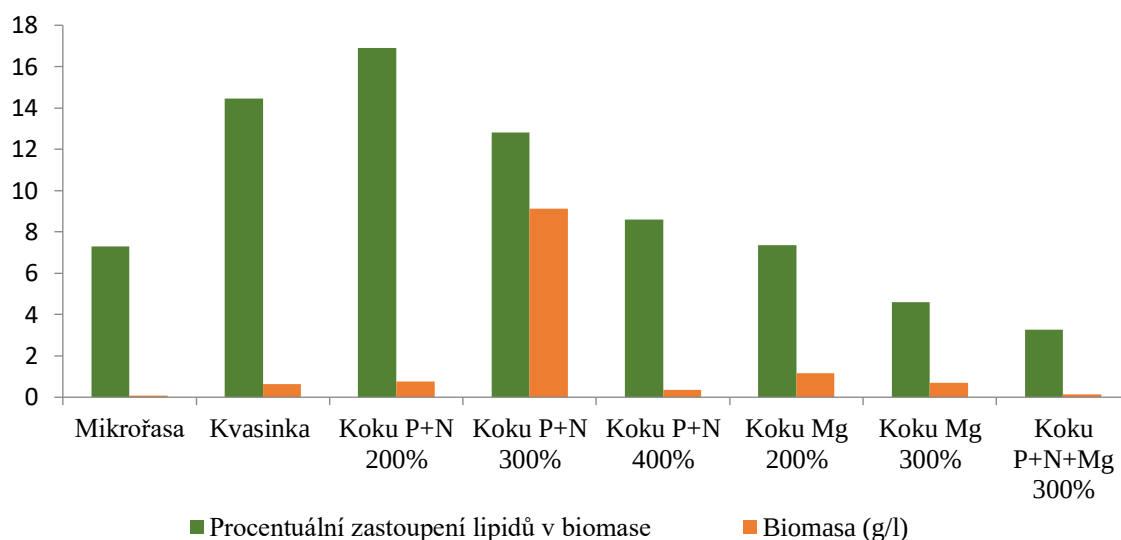
Nejvíce celkových lipidů (Obrázek 53) vyprodukovala kokultivace P+N 200%. Za ní následuje kokultivace P+N 300%. U P+N a Mg^{2+} kokultivací platí, že se zvyšujícím se obsahem přidávaných prvků klesá množství vyprodukovaných lipidů. Mg^{2+} kultivace vyprodukovaly obecně méně lipidů než ty s přidanými P+N prvky. Vzorek s P+N+ Mg^{2+} 300% vyprodukovala z této sady experimentů obecně nejméně lipidických látek. V porovnání s kontrolní kvasinkou dosáhla vyšší produkce pouze kokultivace s P+N 200%, produkce P+N 300% je srovnatelná a ostatní jsou nižší. U kontrolní mikrořasy jsou nižší hodnoty lipidů pozorovány pouze u Mg^{2+} 300% a P+N+ Mg^{2+} 300% kokultivací.



Obrázek 51: Grafické znázornění produkce metabolitů mutikultivátorového experimentu s *R. kratochvilovae* a *S. obliquus* s jejich biomasou



Obrázek 52: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin multikultivátorového experimentu s *R. kratochvilovae* a *S. obliquus*



Obrázek 53: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů multikultivátorových experimentů s *R. kratochvilovae* a *S. obliquus* s jejich biomasou

4.2 Experimenty kokultivací s odpadními oleji

Cílem těchto experimentů bylo zjistit vliv kokultivací na růst mikroorganismů a produkci jejich metabolitů v prostředí odpadních olejů, kdy právě ony zajišťují zdroje živin, převážně uhlíku. Mikrořasy byly vybrány na základě současně prováděných experimentů mikrořas na odpadních olejích kolegyně Bc. Pavlíný Sniegoňové. [86]

4.2.1 *Rhodotorula kratochvilae* a *Desmodesmus velitaris*

Tabulka č. 19. Produkce biomasy kokultivačních experimentů s *R. kratochvilovae* a *D. velitaris* na odpadních olejích

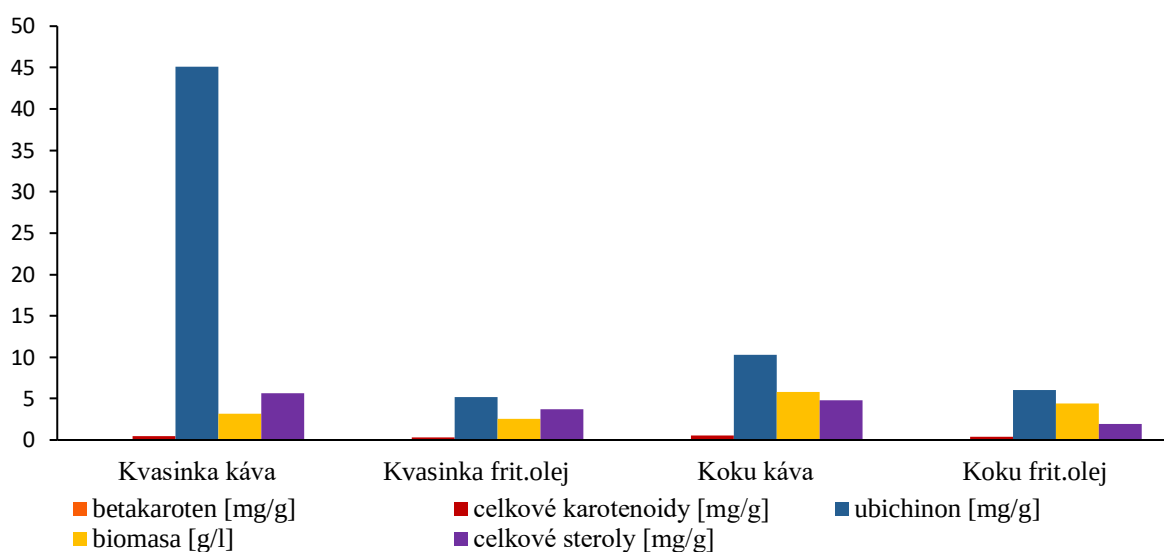
	Kvasinka káva	Kvasinka frit.olej	Mikrořasa	Kokultivace káva	Kokultivace frit. olej
Biomasa ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	3,16	2,52	0,01	5,83	4,43

Na grafickém znázornění produkovaných metabolitů (Obrázek 54) lze vidět, že kávová kokultivace vyprodukovala více biomasy než kontrolní kvasinka. Produkce ubichinonu (10,32 mg/g sušiny) a celkových sterolů (4,83 mg/g sušiny) byla u kokultivace nižší a množství celkových karotenoidů je srovnatelné. Kokultivační experiment na fritovacím oleji vyprodukoval více biomasy a ubichinonu (6,01 mg/g sušiny) než kontrolní kvasinka. Naopak sterolů a celkových karotenoidů bylo v kokultivačním vzorku přítomno méně.

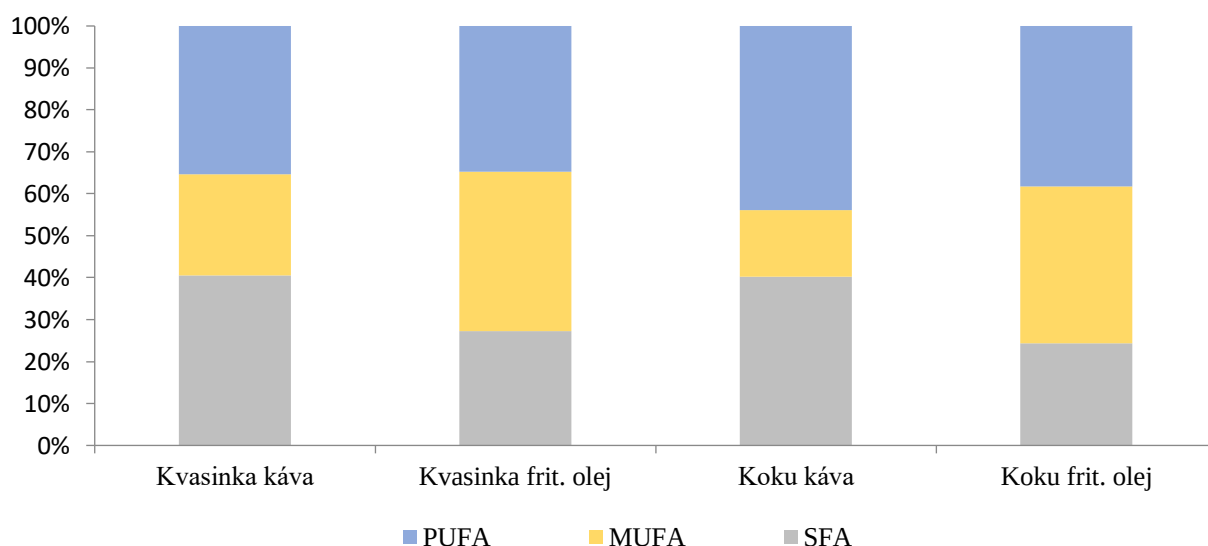
Profil MK tohoto typu kultivace (Obrázek 55) je následovný. Kokultivace v prostředí s kávovým olejem byla největším producentem PUFA (43,9%), druhým největším producentem SFA (40,26%) a zároveň nejmenším producentem MUFA (15,84%) ze všech kultivací.

V porovnání s kontrolní kvasinkou na kávovém oleji byla podpořena produkce PUFA na úkor SFA. Kokultivace na fritovacím oleji měla srovnatelné hodnoty produkce PUFA (38,3%) a MUFA (37,29%), nejméně bylo vyprodukováno SFA (24,41%). V porovnání s kvasinkou kultivovanou na fritovacím oleji byl profil MK obou kultivací srovnatelný. Nejvíce lipidů (Obrázek 56) kokultivace na fritovacím oleji, která ale produkovala méně lipidů než její kontrolní kvasinka. Na kávovém oleji byl lepším producentem lipidických látek kokultivace než samotná kvasinka.

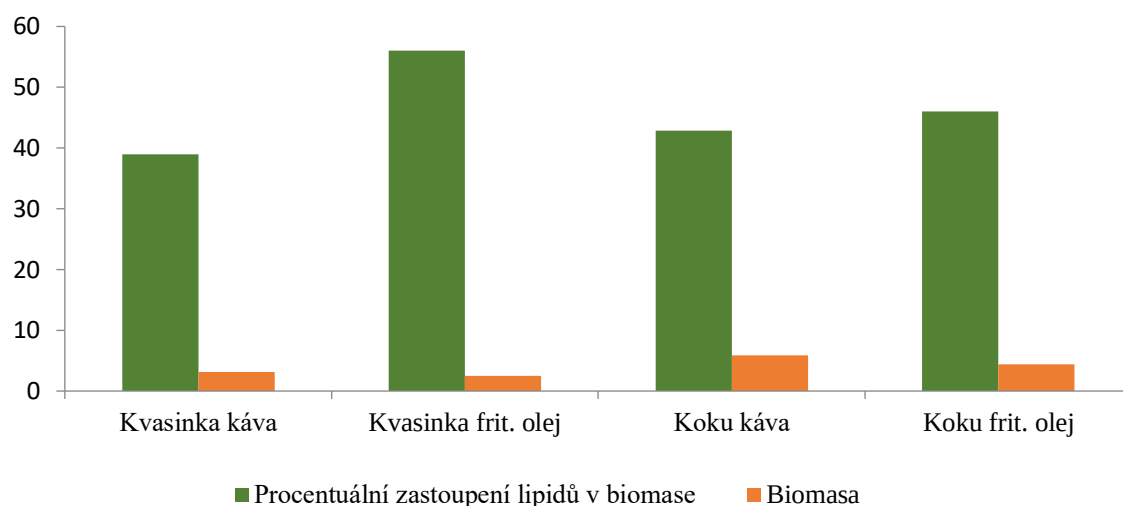
Na žádném grafu není uvedena kontrolní mikrořasa, protože množství biomasy bylo tak malé, že nešlo zpracovat na chromatografická stanovení.



Obrázek 54: Grafické znázornění produkce metabolitů *R. kratochvilovae* a *D. velitaris* na odpadních olejích



Obrázek 55: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin kokultivace *R. kratochvilovae* s *D. velitaris* na odpadních olejích



Obrázek 56: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů kokultivace *R. kratochvilovae* s *D. velitaris* na odpadních olejích s jejich biomasou

4.2.2 *Rhodotorula kratochvilae* a *Desmodesmus communis*

Tabulka č. 20. Produkce biomasy kokultivačních experimentů s *R. kratochvilovae* a *D. communis* na odpadních olejích

	Kvasinka káva	Kvasinka frit.olej	Mikrořasa	Kokultivace káva	Kokultivace frit. olej
Biomasa (g·l ⁻¹)	3,16	2,52	0,02	6,40	2,24

Grafické znázornění produkce metabolitů (Obrázek 57) ukazuje vyšší produkci biomasy u kávové kokultivace než u její odpovídající kontrolní kvasinky. Množství ubichinonu (10,37 mg/g sušiny), sterolu (3,27 mg/g sušiny) a celkových karotenoidů (0,41 mg/g sušiny) je u kokultivace nižší. Je možné, že je to způsobeno tím, že mikroorganismy upřednostnily tvorbu biomasy na úkor produkce metabolitů.

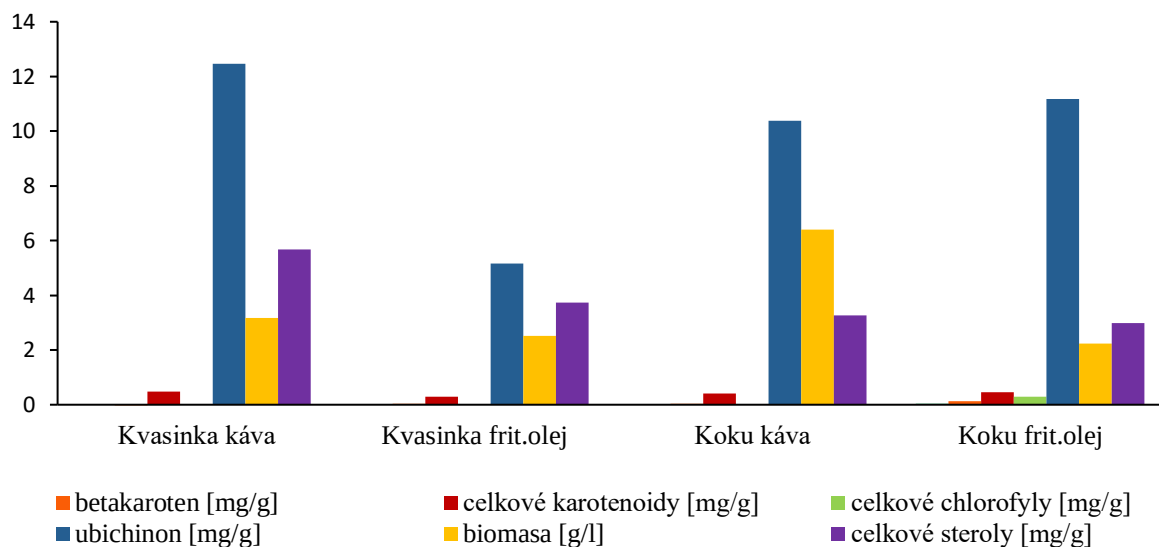
V rámci kokultivace na fritovacím oleji lze hovořit o opaku. Množství biomasy je nižší než u kontrolní kvasinky, ale ubichinonu je výrazně více (11,17 mg/g sušiny). Vzorek navíc obsahoval celkové karotenoidy, chlorofyly a β -karoten. Jediným metabolitem, kterého je více u kontrolní kvasinky jsou celkové steroly.

Kokultivace na kávovém odpadním oleji vyprodukovala nejvíce SFA a také nejvíce PUFA (45,27%) ze všech kultivací. Zároveň vyprodukovala nejmenší množství MUFA (14,17%). Oproti kvasince na kávovém oleji byla v tomto případě podpořena produkce PUFA na úkor MUFA. Kokultivace na fritovacím odpadním oleji se ukázala být nejlepším producentem MUFA (39,52%), následují SFA (34,17%) a nejméně PUFA (26,31%). V porovnání se svou kontrolní kvasinkou bylo produkováno více SFA na úkor PUFA (viz Obrázek 58).

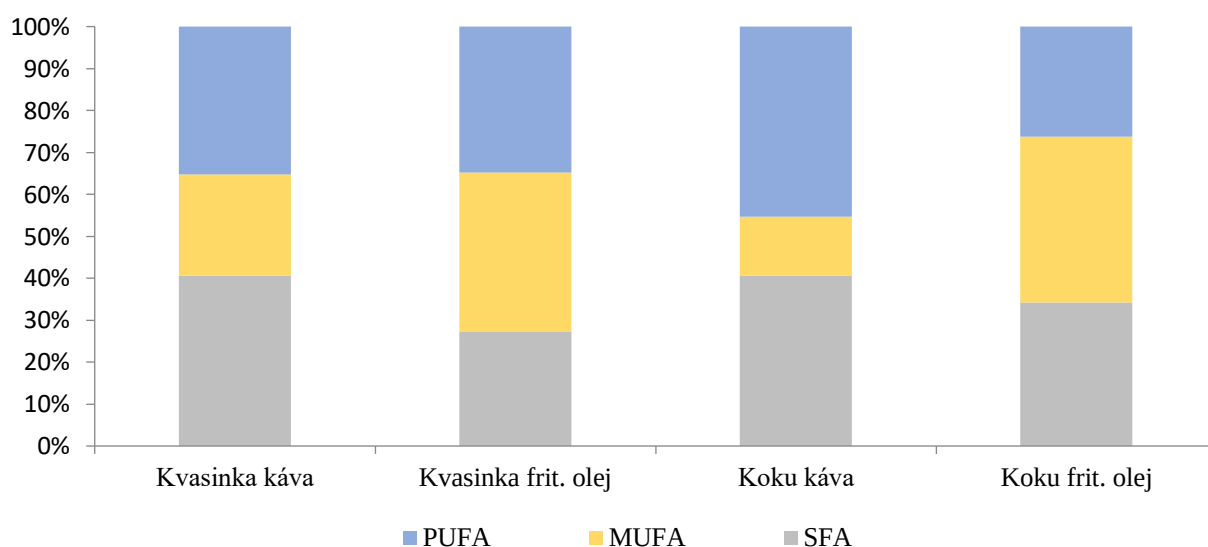
Největší procentuální zastoupení lipidů v biomase bylo u kokultivace na fritovacím oleji, ale opět bylo menší než u kontrolní kvasinky na fritovacím oleji.

Z kávových experimentů se i zde ukázala být lepším producentem lipidických látek kokultivace než samotná kvasinka (Obrázek 59).

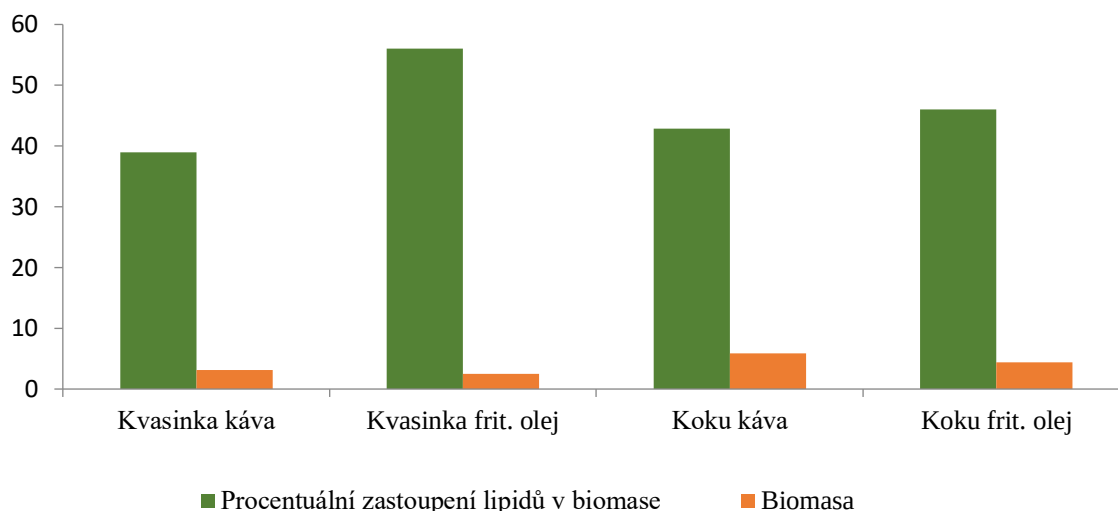
I v tomto případě bohužel v grafech není uvedena kontrolní mikrořasa, z důvodu nedostatečného množství biomasy.



Obrázek 57: Grafické znázornění produkce metabolitů *R. kratochvilovae* a *D. communis* na odpadních olejích



Obrázek 58: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin kokultivace *R. kratochvilovae* s *D. communis* na odpadních olejích



Obrázek 59: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů kokultivace *R. kratochvilovae* s *D. communis* na odpadních olejích s jejich biomasou

4.2.3 *Rhodotorula kratochvilae* a *Desmodesmus armatus*

Tabulka č. 21. Produkce biomasy kokultivačních experimentů s *R. kratochvilovae* a *D. armatus* na odpadních olejích

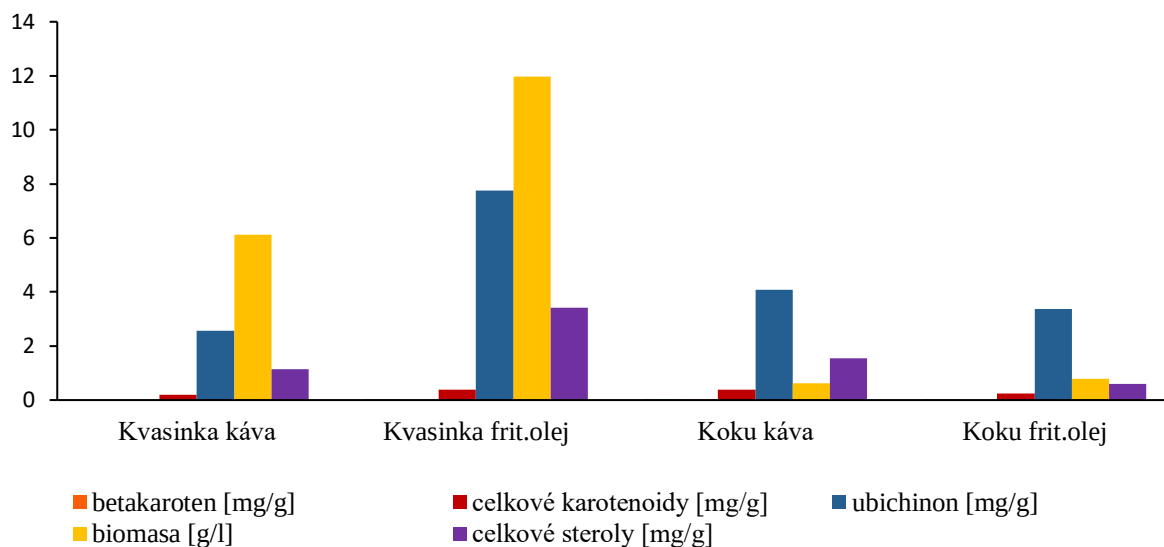
	Kvasinka káva	Kvasinka frit.olej	Mikrořasa	Kokultivace káva	Kokultivace frit. olej
Biomasa (g·l ⁻¹)	6,13	11,96	0,04	0,63	0,78

V grafickém znázornění produkovaných metabolitů (Obrázek 60) lze vidět, že žádná kokultivace nebyla schopna srovnatelné produkce ani biomasy ani metabolitů v porovnání s její odpovídající kontrolní kvasinkou. V obou kokultivacích byly zastoupeny stejné metabolity, ale v podstatně menším množství než u kontrolních kultivací. u kávové kokultivace byl nejvíce zastoupen ubiquinon (4,08 mg/g sušiny), steroly (1,54 mg/g sušina) a celkové karotenoidy (0,37 mg/g sušiny). V případě kokultivace na fritovacím oleji bylo produkováno 3,36 mg/g sušiny ubiquinonu 1,54 mg/g sušiny sterolů a 0,25 mg/g sušiny celkových karotenoidů.

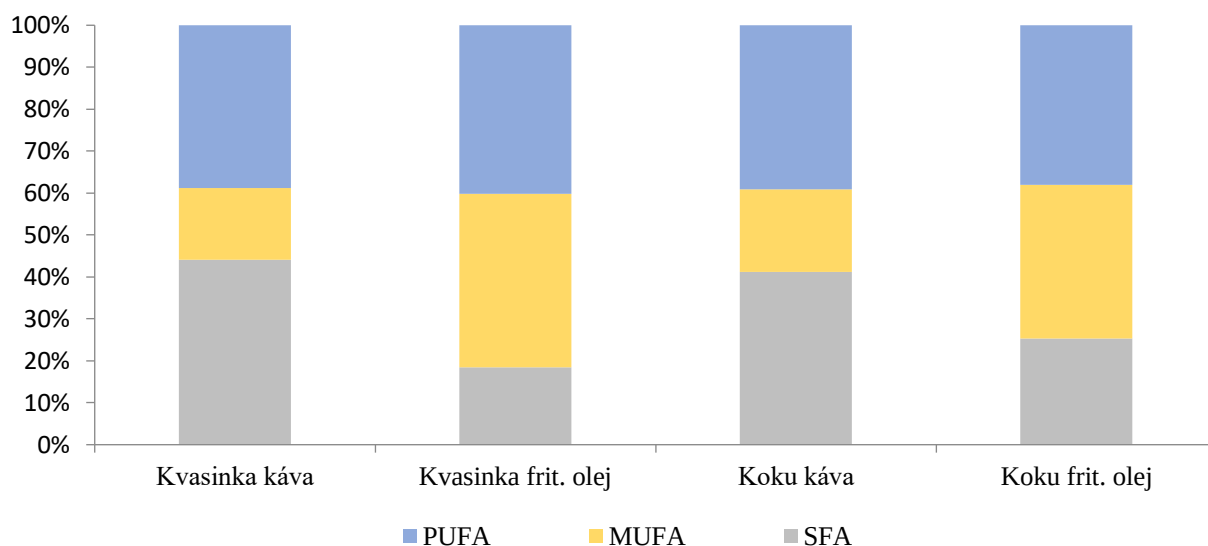
Dle profilu vyprodukovaných MK (Obrázek 61) lze říci, že kávová kokultivace měla přibližně srovnatelné produkce SFA (41,22%) a PUFA (39,05%), MUFA bylo vyprodukováno nejméně (19,73%). Profil MK byl v tomto případě srovnatelný s kontrolní kvasinkou. V kokultivaci v přítomnosti fritovacího oleje vyšly srovnatelné výsledky produkce MUFA (36,76%) a PUFA (37,99%), nejmenší produkce byla zaznamenána u SFA (25,25%). V tomto případě byly oproti kontrolní kvasince podpořeny produkce SFA na úkor MUFA.

V otázce celkové produkce lipidů (Obrázek 62) kokultivací byla lepším producentem kávová kokultivace.

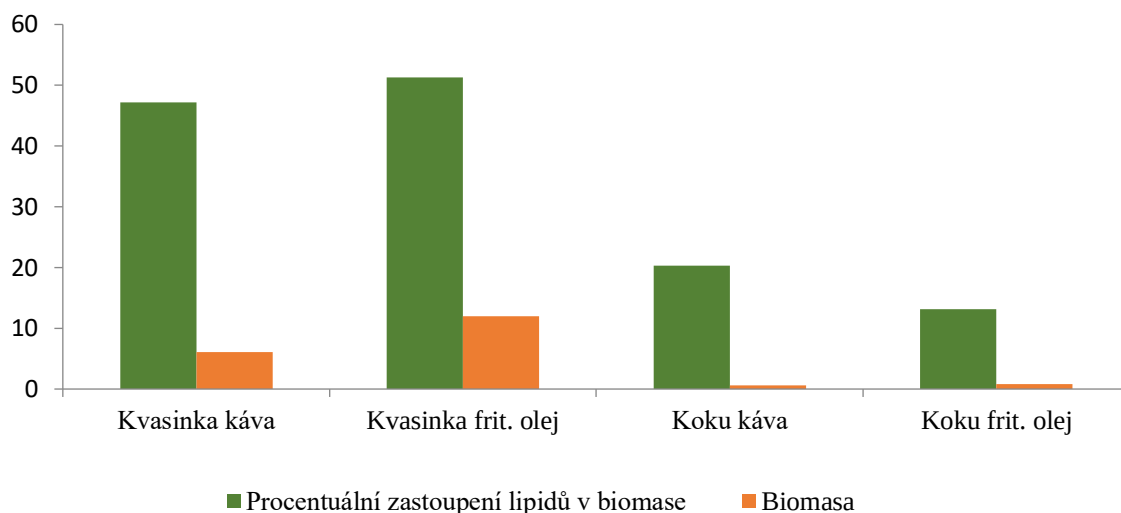
V porovnání s kontrolní kvasinkou bylo ale množství přítomných lipidů v obou kokultivacích menší než u kontrolních kvasinek. Může to být způsobeno celkovou velmi nízkou produkcí biomasy kokultivačních experimentů.



Obrázek 60: Grafické znázornění produkce metabolitů *R. kratochvilovae* a *D. armatus* na odpadních olejích



Obrázek 61: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin kokultivace *R. kratochvilovae* s *D. armatus* na odpadních olejích



Obrázek 62: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů kokultivace *R. kratochvilovae* s *D. armatus* na odpadních olejích s jejich biomasou

4.2.4 *Rhodotorula kratochvilovae* a *Scenedesmus obliquus*

Tabulka č. 22. Produkce biomasy kokultivačních experimentů s *R. kratochvilovae* a *S. obliquus* na odpadních olejích

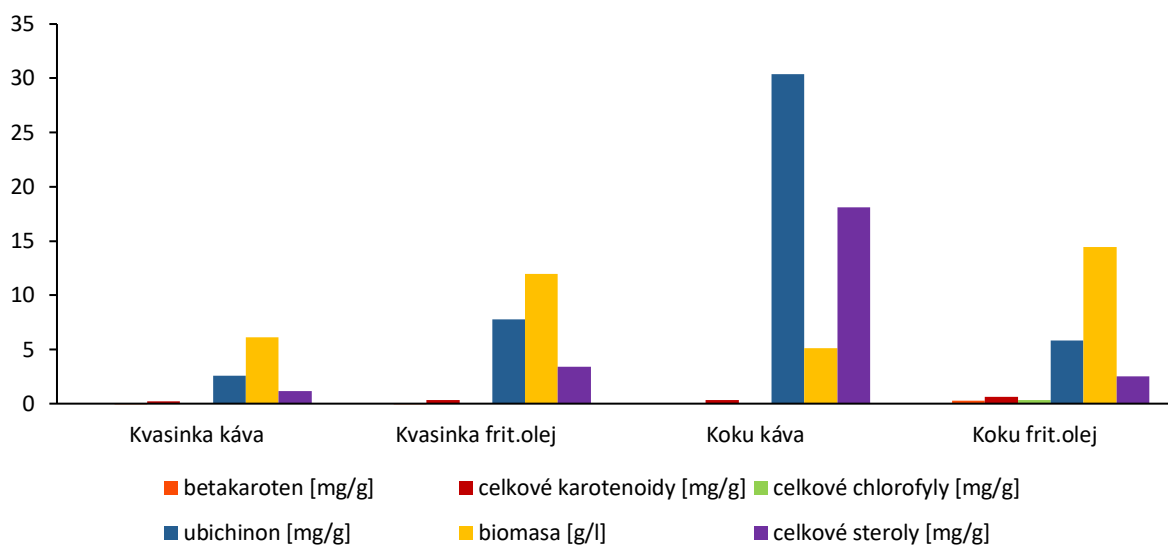
	Kvasinka káva	Kvasinka frit.olej	Mikrořasa	Kokultivace káva	Kokultivace frit. olej
Biomasa (g·l ⁻¹)	6,13	11,96	0,03	5,13	14,45

Srovnáním kávových experimentů (Obrázek 63) lze vidět, že kokultivace výrazně větším producentem ubichinonu (30,37 mg/g sušiny) a sterolů (18,12 mg/g sušiny). Vyprodukovaných celkových karotenoidů bylo ve vzorku kokultivace také více. Kontrolní kvasinka naopak tvořila více biomasy.

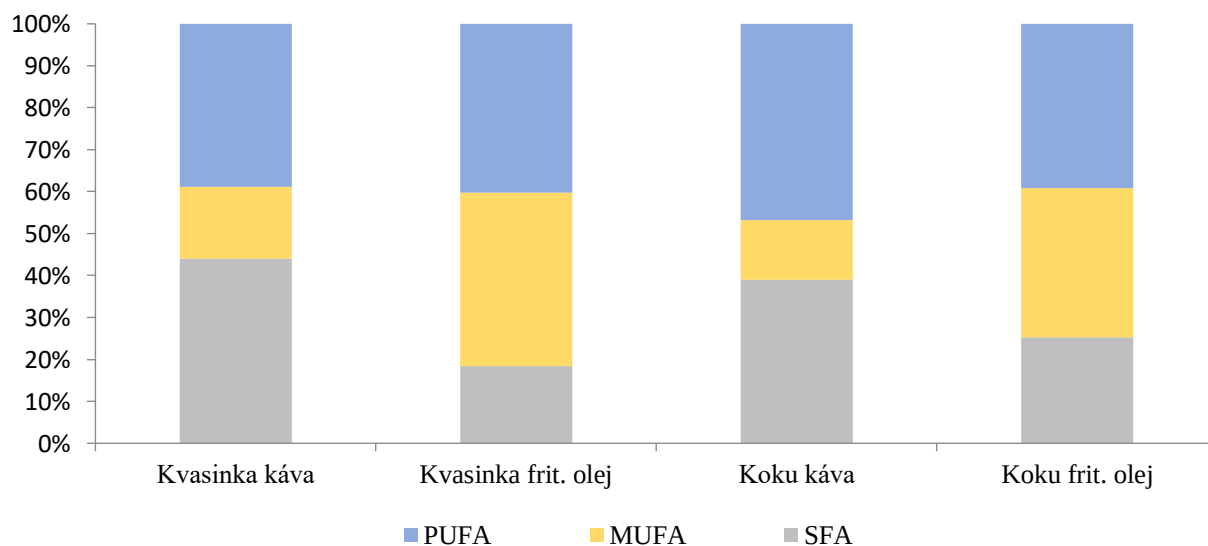
V případě experimentů na fritovacím oleji to naopak vypadá, že kokultivace upřednostnila tvorbu biomasy před metabolity, kterých vyprodukovala méně než kontrolní kvasinka. V kokultivačním vzorku byl přítomen ubichinon (5,79 mg/g sušiny), steroly (2,52 mg/g sušiny), celkové karotenoidy, chlorofyly a β -karoten.

Kokultivace v médiu s kávovým olejem byla největším producentem PUFA (46,83%), pak SFA (38,96%) a MUFA (14,22%). U kokultivace byla oproti kontrolní kvasince potlačena produkce MUFA na úkor PUFA. U kokultivace na fritovacím oleji byly nejvíce zastoupenými MK PUFA (39,19%), následují MUFA (35,51%) a SFA (25,3%). V porovnání s kontrolní kvasinkou kokultivace produkovala více SFA na úkor MUFA. Grafické zobrazení přiloženo níže (Obrázek 64).

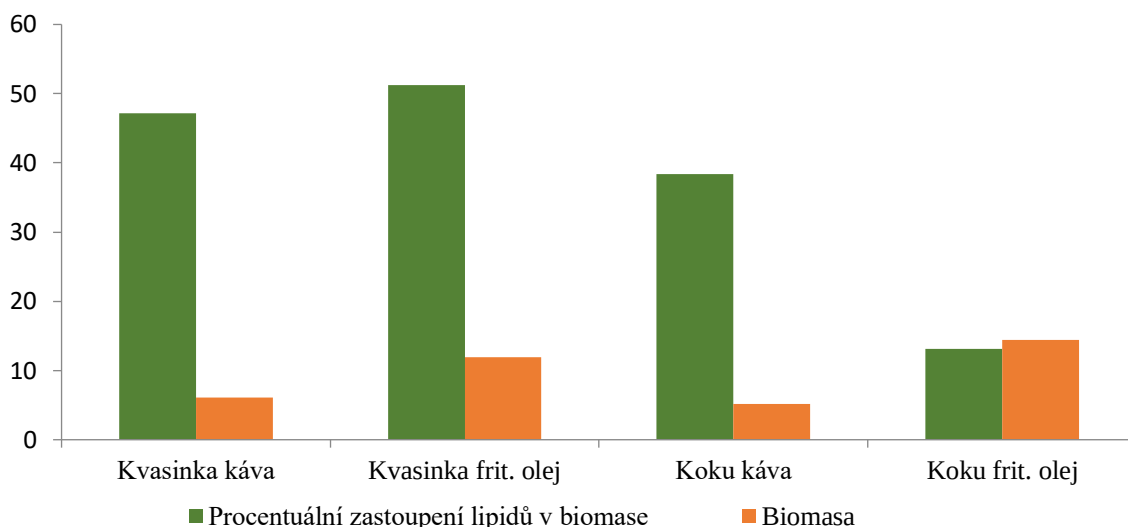
Z kokultivací se ukázala být lepším lipidickým producentem kokultivace na kávovém oleji (Obrázek 65). Oproti kontrolní kvasince bylo ale množství produkovaných lipidů kokultivací menší. U kokultivace na fritovacím oleji bylo množství vyprodukovaných lipidů v porovnání s kontrolní kvasinkou poměrně malé, tato skutečnost ale může souviset s faktem, že kokultivace upřednostnila produkci biomasy na úkor syntézy lipidických látek.



Obrázek 63: Grafické znázornění produkce metabolitů *R. kratochvilovae* a *S. obliquus* na odpadních olejích



Obrázek 64: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin kokultivace *R. kratochvilovae* s *S. obliquus* na odpadních olejích



Obrázek 65: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů kokultivace *R. kratochvilovae* se *S. obliquus* na odpadních olejích s jejich biomasou

4.2.5 *Rhodotorula kratochvilae* a *Chlamydomonas reinhardtii*

Tabulka č. 23. Produkce biomasy kokultivačních experimentů s *R. kratochvilovae* a *Ch. reinhardtii* na odpadních olejích

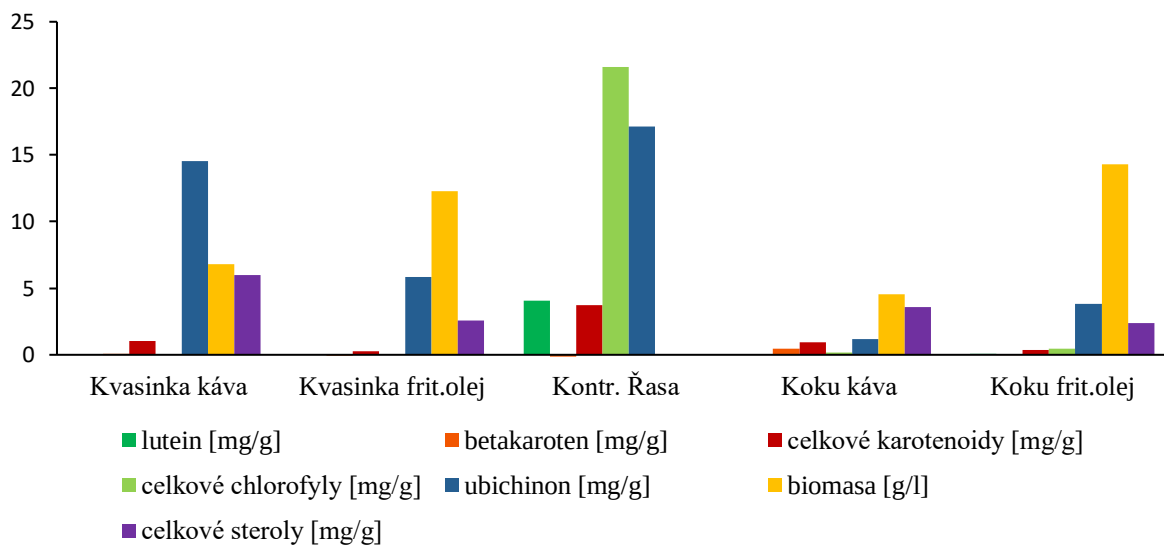
	Kvasinka káva	Kvasinka frit.olej	Mikrořasa	Kokultivace káva	Kokultivace frit. olej
Biomasa (g·l ⁻¹)	6,79	12,28	0,03	4,53	14,31

Z experimentů na kávovém oleji se ukázala lepším producentem biomasy, ubiquinonu i celkových sterolů kontrolní kvasinka (Obrázek 66). Kokultivace produkovala stejné metabolity jako kvasinka, ale v menším množství, nejvíce zastoupen byl ubiquinon (3,59 mg/g sušiny), celkové steroly (1,17 mg/g sušiny) a celkové karotenoidy. β -karotenu vyprodukovala kokultivace více než kontrolní kvasinka.

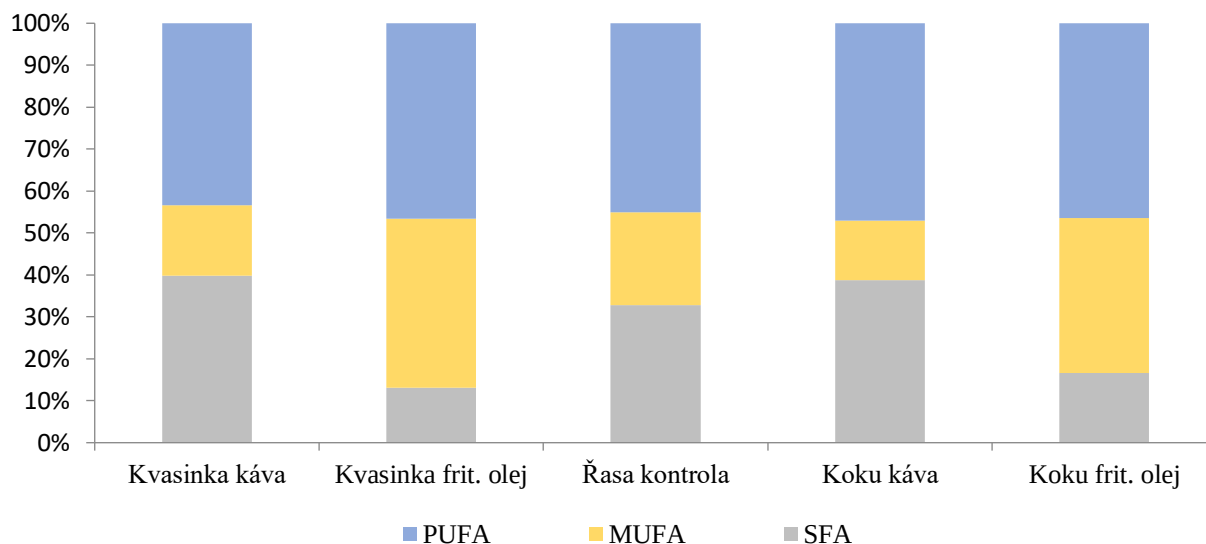
V kokultivaci na fritovacím oleji je nejvíce zastoupen ubiquinon (3,8 mg/g sušiny) a celkové steroly (2,38 mg/g biomasy). Tyto hodnoty produkce jsou menší než u odpovídající kontrolní kvasinky, může to být ale způsobeno tím, že kokultivace upřednostnila tvorbu biomasy na úkor metabolitů. Biomasy vyprodukovala kokultivace více než kontrolní kvasinka. V menším množství byly ve vzorku zastoupeny i celkové karotenoidy a β -karoten. V obou kokultivacích byly přítomny metabolity mikrořas, lutein a chlorofyly, ale ve výrazně menší míře než u kontrolní kvasinky.

Profil produkovaných MK tímto typem kultivace je graficky znázorněn níže (Obrázek 67). Profil kávové kokultivace byl nejvíce tvořen PUFA (47,1%), poté následují SFA (38,8%) a MUFA (14,1%). U kokultivace se profil MK skládal z 46,44% PUFA, 36,93% MUFA a 16,62% SFA. Jednotlivé produkované složky kokultivací a jejich příslušných kontrolních kvasinek jsou srovnatelné.

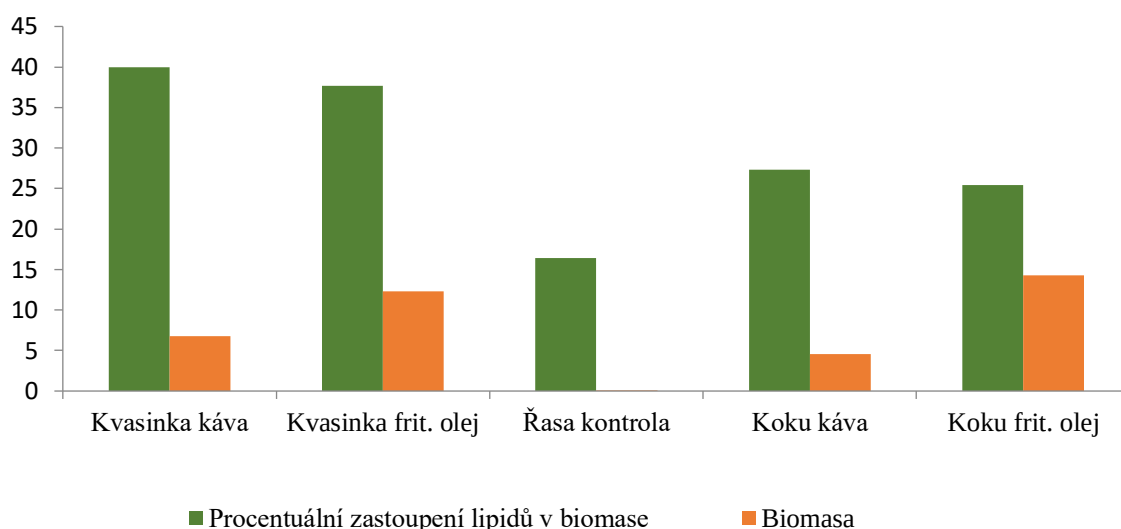
Největšími producenty celkových lipidů (Obrázek 68) z kokultivací se ukázala být lepším producentem ta, kultivovaná na kávovém oleji. Obě kokultivace vytvořily menší množství lipidů než jejich kontrolní kvasinky. Nejmenším producentem ze všech kultivací se ukázala být kontrolní mikrořasa.



Obrázek 66: Grafické znázornění produkce metabolitů *R. kratochvilovae* a *Ch. reinhardtii* na odpadních olejích



Obrázek 67: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin kokultivace *R. kratochvilovae* s *Ch. reinhardtii* na odpadních olejích



Obrázek 68: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů kokultivace *R. kratochvilovae* s *Ch. reinhardtii* na odpadních olejích s jejich biomasou

4.2.6 *Rhodotorula kratochvilae* a *Desmodesmus acutus*

Tabulka č. 24. Produkce biomasy kokultivačních experimentů s *R. kratochvilovae* a *D. acutus* na odpadních olejích

	Kvasinka káva	Kvasinka frit.olej	Mikrořasa	Kokultivace káva	Kokultivace frit. olej
Biomasa (g·l ⁻¹)	6,79	12,28	0,03	4,61	13,61

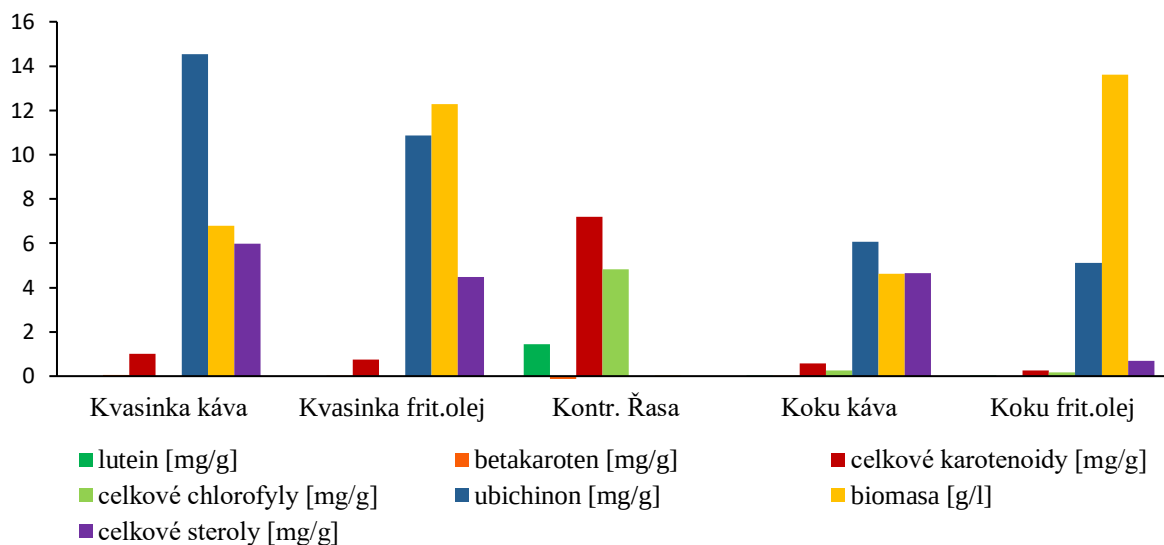
Z kávových experimentů byla lepším metabolickým producentem kontrolní kvasinka (Obrázek 69). U kokultivace byly přítomny všechny metabolity, jako u kvasinky, ale v menší míře. Nejvíce zastoupen byl ubiquinon (6,08 mg/g sušiny), dále celkové steroly (4,64 mg/g sušiny) a celkové karotenoidy. Produkce biomasy byla u kokultivace také nižší.

U vzorku kokultivace na fritovací oleji byla zaznamenána výrazně vyšší produkce biomasy na úkor syntézy ostatních metabolitů než u její kontrolní kvasinky. Nejvíce zastoupený metabolit byl ubiquinon (5,12 mg/g sušiny), celkové steroly a karotenoidy. Oba kokultivační vzorky obsahovaly také chlorofyly, ale v mnohem menší míře než kontrolní mikrořasa.

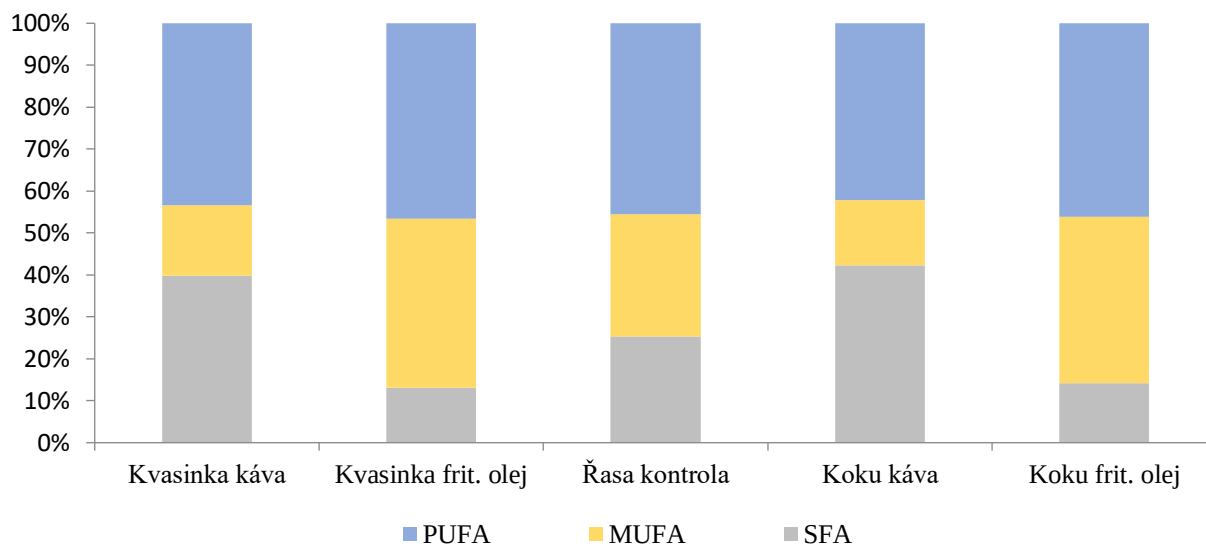
Profil produkovaných MK tímto typem kultivace je graficky znázorněn níže (Obrázek 70). Profil MK kokultivace s kávovým olejem obsahoval 42,11% PUFA, 42,27% SFA a 15,63% MUFA. V porovnání s kontrolní kvasinkou je zde mírně upřednostněn produkce SFA na úkor MUFA. Kokultivace s fritovacím olejem vyprodukovala 46,19% PUFA, 39,68% MUFA a 14,13% SFA.

V tomto případě je profil MK kokultivace a kontrolní kvasinky téměř srovnatelná. V porovnání s kontrolní mikrořasou jsou u kávové kokultivace více produkovány SFA oproti MUFA a u kokultivace na fritovacím oleji byla zaznamenána větší produkce MUFA na úkor SFA.

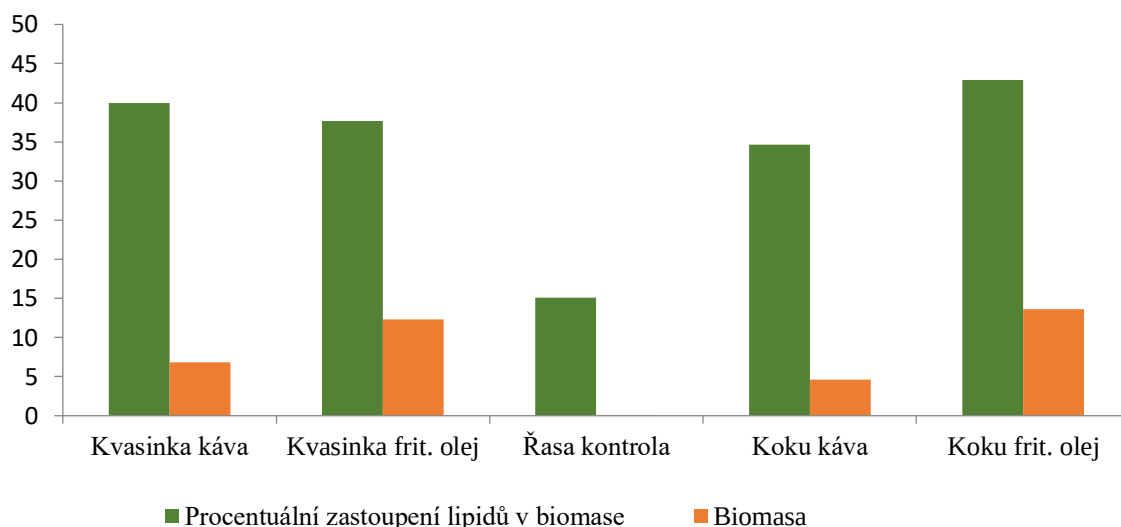
Nejvíce lipidů (Obrázek 71) vyprodukovala kokultivace s fritovacím olejem, a to i porovnání se svou kontrolní kvasinkou. Produkce kokultivace s kávou je o něco nižší než u příslušné kontrolní kvasinky. Nejméně lipidů ze všech kultivací vyprodukovala kontrolní mikrořasa.



Obrázek 69: Grafické znázornění produkce metabolitů *R. kratochvilovae* a *D. acutus* na odpadních olejích



Obrázek 70: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin kokultivace *R. kratochvilovae* s *D. acutus* na odpadních olejích



Obrázek 71: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů kokultivace *R. kratochvilovae* s *D. acutus* na odpadních olejích s jejich biomasou

4.2.7 *Rhodotorula kratochvilae* a *Chlorella minutissima*

Tabulka č. 25. Produkce biomasy kokultivačních experimentů s *R. kratochvilovae* a *Ch. minutissima* na odpadních olejích

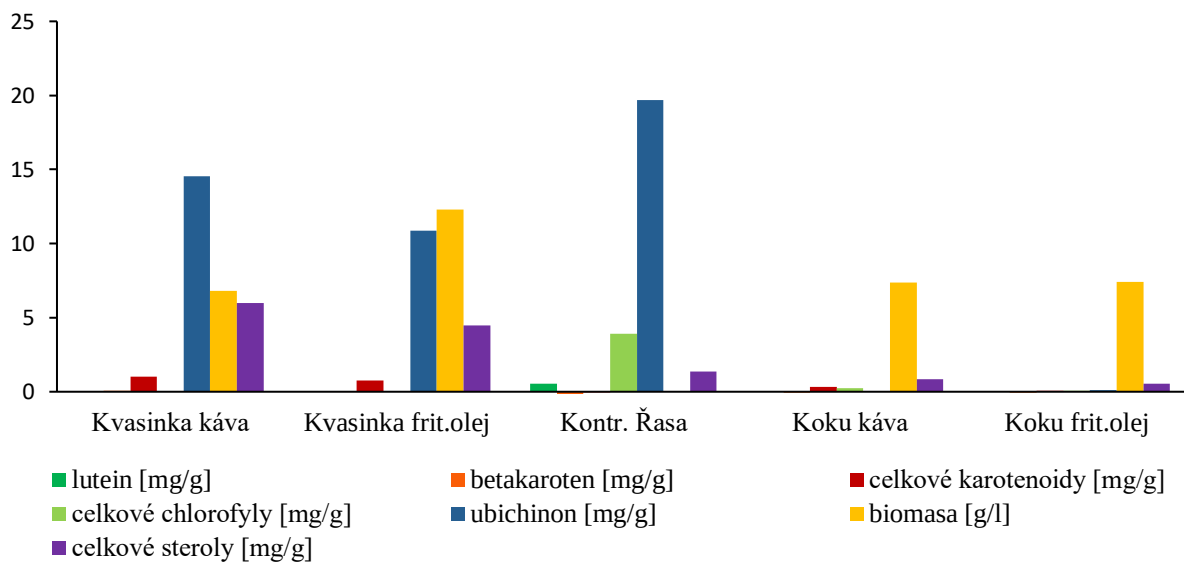
	Kvasinka káva	Kvasinka frit.olej	Mikrořasa	Kokultivace káva	Kokultivace frit. olej
Biomasa (g·l ⁻¹)	6,79	12,28	0,03	7,37	7,43

Dle grafického znázornění produkce metabolitů (Obrázek 72), lze vidět, že ani jeden kokultivační experiment nebyl lepším producentem metabolitů a biomasy než jejich odpovídající kontrolní kvasinka. Ve vzorku kávové kokultivace byly nejvíce zastoupeny celkové steroly (0,85 mg/g sušiny), dále zde byly přítomny celkové karotenoidy a chlorofyly (celkových chlorofylů kokultivace vyprodukovala více než kontrolní mikrořasa).

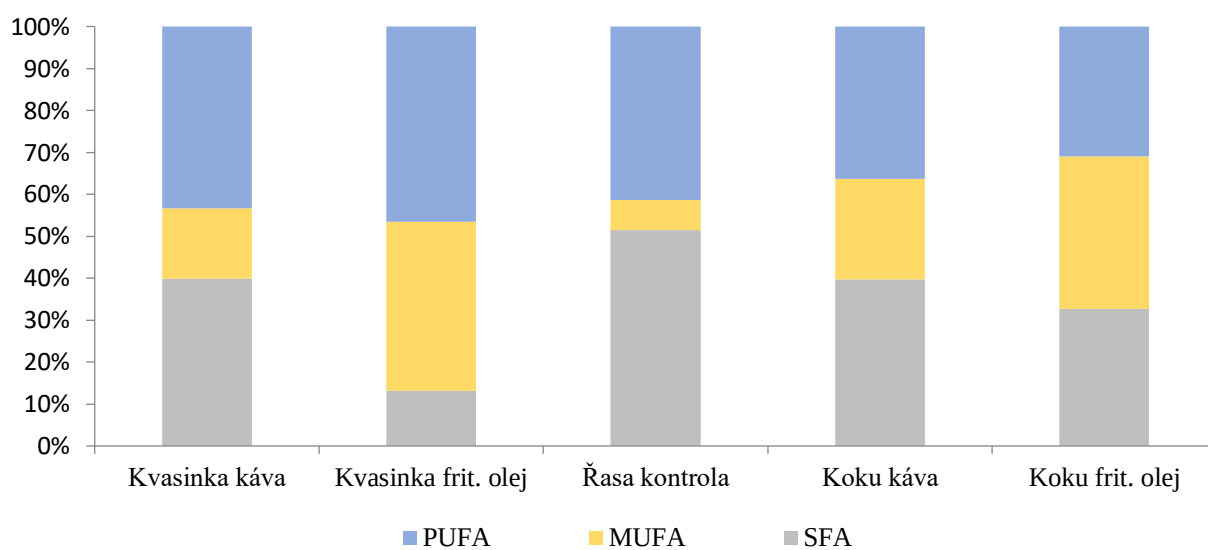
U experimentu s kokultivací na fritovacím oleji byly detekovány pouze celkové steroly (0,55 mg/g sušiny), ostatní metabolity byly zastoupeny v tak malé míře, že byly pod hranicí detekce.

Kávová kokultivace měla srovnatelný obsah PUFA (36,25%) a SFA (39,65%), množství MUFA bylo stanoveno na 24,1%. Oproti své kontrolní kvasince upřednostnila tvorbu MUFA namísto PUFA. Kokultivace na fritovacím oleji vyprodukovala 30,94% PUFA, 36,44% MUFA a 32,62% SFA. V tomto případě kokultivace tvořila více SFA na úkor PUFA. Obě kokultivace syntetizovaly více MUFA na úkor SFA oproti kontrolní mikrořase (Obrázek 73).

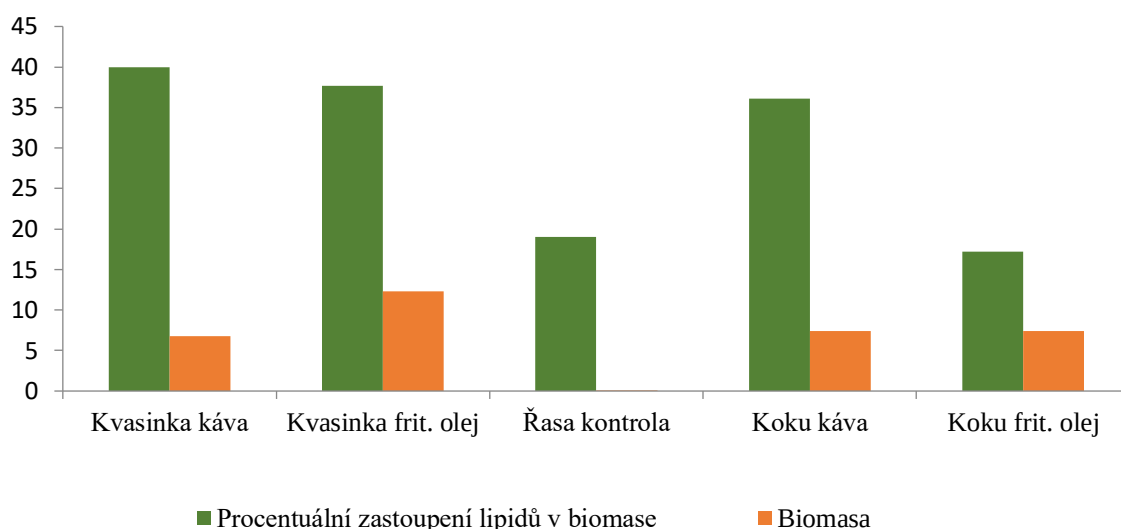
Největším producentem celkových lipidů (Obrázek 74) v kokultivacích byla zaznamenána u kokultivace s kávovým olejem. Obě kokultivace vyprodukovaly méně lipidických látek než jejich příslušné kontrolní kvasinky, ale více než kontrolní mikrořasa.



Obrázek 72: Grafické znázornění produkce metabolitů *R. kratochvilovae* a *Ch. minutissima* na odpadních olejích



Obrázek 73: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin kokultivace *R. kratochvilovae* s *Ch. minutissima* na odpadních olejích



Obrázek 74: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů kokultivace *R. kratochvilovae* s *Ch. minutissima* na odpadních olejích s jejich biomasou

4.2.8 *Rhodosporidium toruloides* a *Desmodesmus velitaris*

Tabulka č. 26. Produkce biomasy kokultivačních experimentů s *R. toruoides* a *D. velitaris* na odpadních olejích

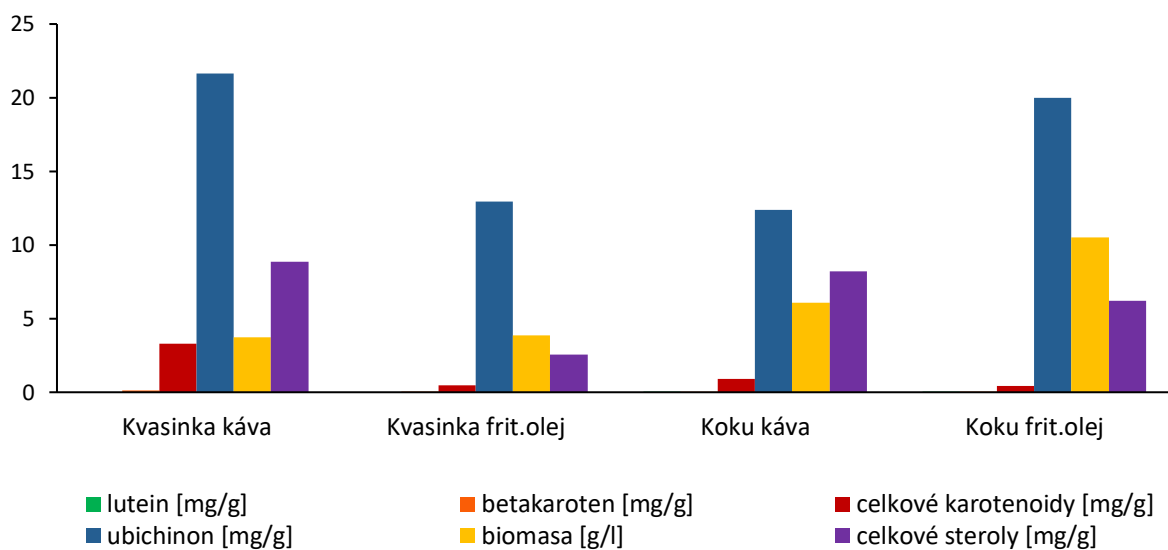
	Kvasinka káva	Kvasinka frit.olej	Mikrořasa	Kokultivace káva	Kokultivace frit. olej
Biomasa (g·l ⁻¹)	3,72	3,85	Nepřežila	6,1	10,53

Srovnáním mikroorganismů kultivovaných na kávovém oleji lze vidět (Obrázek 75), že kokultivace byla lepším producentem biomasy. Naopak ubichinon, celkové steroly a celkové karotenoidy byly více zastoupeny ve vzorku kontrolní kvasinky. Může to být způsobeno skutečností, že kokultivace upřednostnila produkci biomasy na úkor metabolitů.

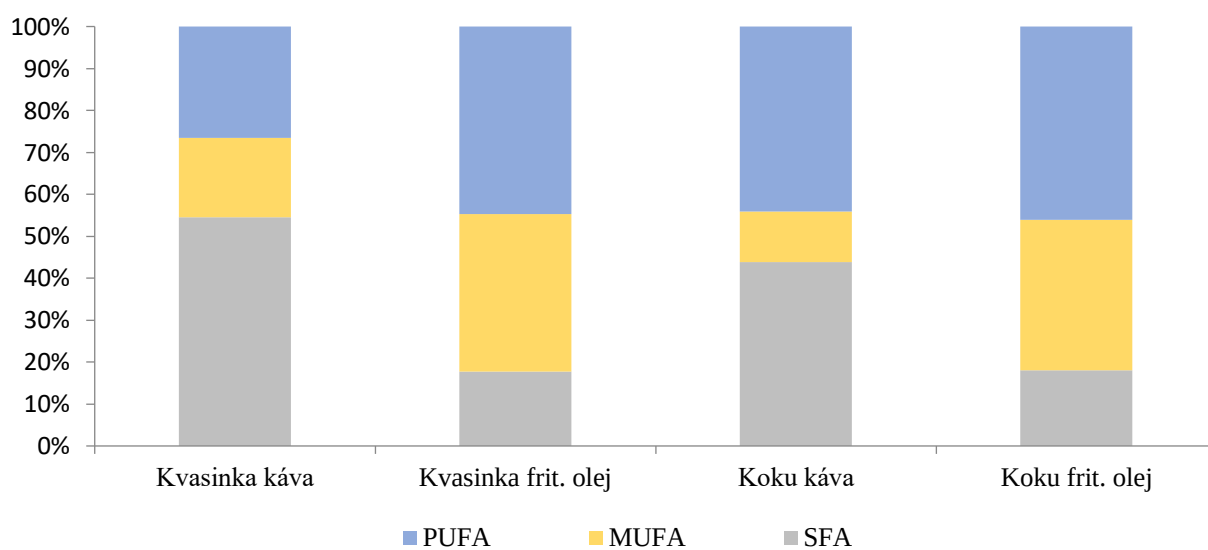
Kokultivace na fritovacím oleji byla naopak výrazně větším producentem biomasy, ale i ubichinonu (19,98 mg/g sušiny), celkových sterolů (6,19 mg/g sušiny) i karotenoidů, než její kontrolní kvasinka. V obou kokultivačních vzorcích byl v menší míře přítomen lutein a β -karoten.

Z grafické znázornění profilu MK (Obrázek 76) lze vidět, že MK produkované kávovou kokultivací byly PUFA (44,14%), SFA (12,04%) a MUFA (43,82%). Tato kokultivace oproti své kontrolní kvasinky dala přednost tvorbě PUFA místo SFA. Procentuální zastoupení MK u kokultivace na fritovacím oleji činilo 46,14% PUFA, 35,81% MUFA a 16,04% SFA. Profil MK kokultivace na fritovacím oleji a příslušné kontrolní mikrořasy je téměř shodný.

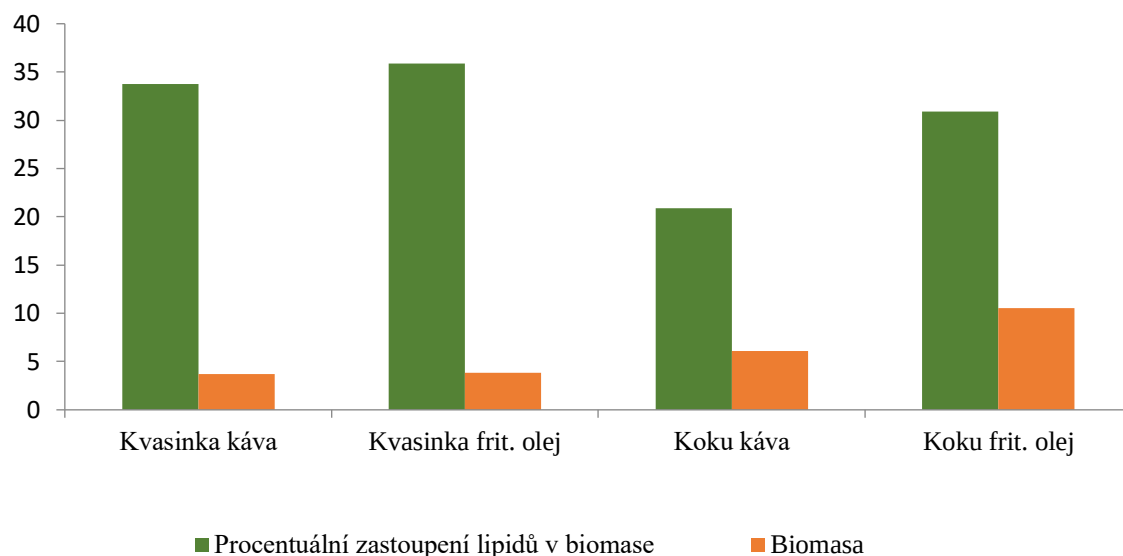
Nejvíce celkových lipidů (Obrázek 77) u kokultivací bylo zjištěno u kokultivace na fritovacím oleji, až poté následovala kávová kokultivace. V porovnání s danými kontrolními kvasinkami vyprodukovaly obě kokultivace méně lipidických látek.



Obrázek 75: Grafické znázornění produkce metabolitů *R. toruloides* a *D. velitaris* na odpadních olejích



Obrázek 76: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin kokultivace *R. toruloides* s *D. velitaris* na odpadních olejích



Obrázek 77: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů kokultivace *R. toruloides* s *D. velitaris* na odpadních olejích s jejich biomasou

4.2.9 *Rhodosporidium toruloides* a *Desmodesmus communis*

Tabulka č. 27. Produkce biomasy kokultivačních experimentů s *R. toruoides* a *D. communis* na odpadních olejích

	Kvasinka káva	Kvasinka frit.olej	Mikrořasa	Kokultivace káva	Kokultivace frit. olej
Biomasa (g·l ⁻¹)	3,72	3,85	0,13	4,1	4,34

Kávová kokultivace se ukázala být lepším producentem biomasy, celkových sterolů (11,33 mg/g sušiny) a ubichinonu (9,19 mg/g sušiny) než její kontrolní kvasinka. Ta byla naopak větším producentem celkových karotenoidů. V kokultivačním vzorku byly přítomny i chlorofyly, lutein a β -karoten.

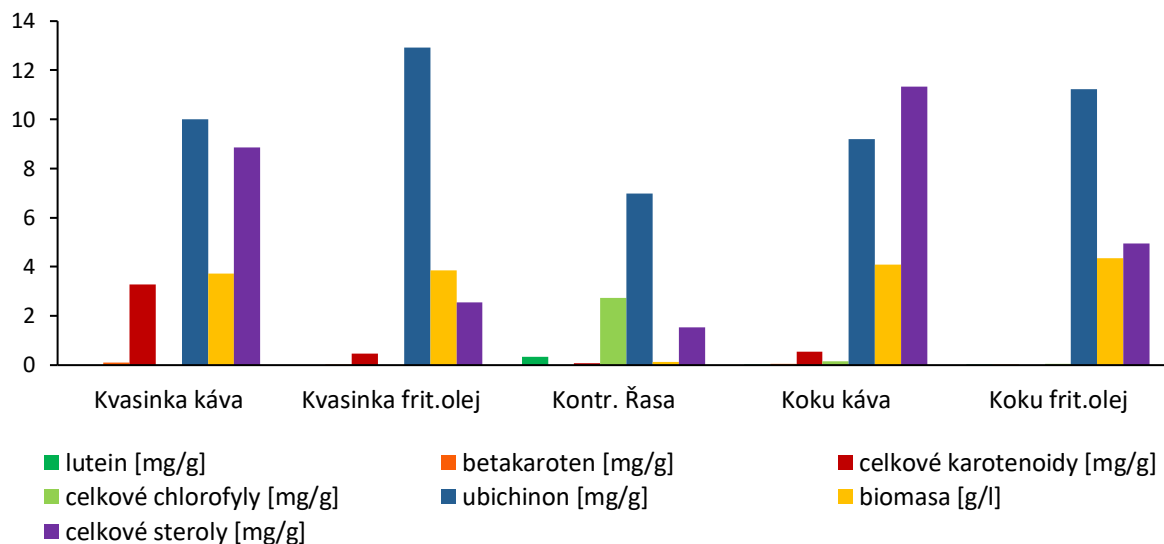
Kokultivace na fritovacím oleji byla lepším producentem biomasy a celkových sterolů (4,95 mg/g sušiny), ale zastoupení ubichinonu a celkových karotenoidů bylo menší než u kontrolní kvasinky. I v tomto vzorku byly přítomny chlorofyly, lutein a β -karoten, ale v menším množství než u kávové kokultivace. Ve srovnání s kontrolní mikrořasou měly obě kokultivace ve vzorku větší zastoupení sterolů a ubichinonu, a menší zastoupení chlorofylů a luteinu (Obrázek 78)

Zastoupení MK v grafickém znázornění (Obrázek 79) ukazuje, že kávová kokultivace obsahovala srovnatelné zastoupení PUFA (44,14%) a SFA (43,82%), nejméně zastoupenou složkou byly MUFA (12,04%). Oproti své kontrolní kvasince upřednostnila kokultivace tvorbu PUFA místo SFA. Složení profilu MK u kokultivace kultivované na médiu s fritovacím oleji bylo následující – PUFA (46,14%), MUFA (35,81%) a SFA (18,04%). Tento profil je srovnatelný s kontrolní kvasinkou na fritovacím oleji.

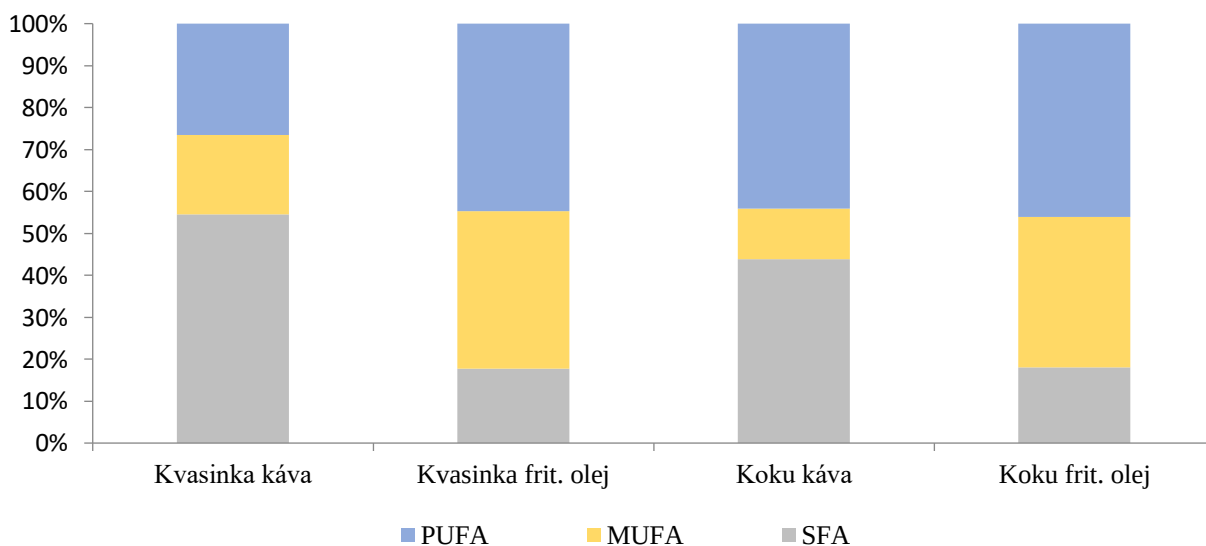
Co se týká celkového zastoupení lipidů (Obrázek 80) byla z kokultivací lepším producentem ta, na fritovacím oleji.

Obecně ale byla tvorba lipidů v kokultivaci menší než u kontrolní kvasinky. V případě kávové kokultivace opět platilo, že více lipidů vyprodukovala kontrolní kvasinka namísto kokultivace.

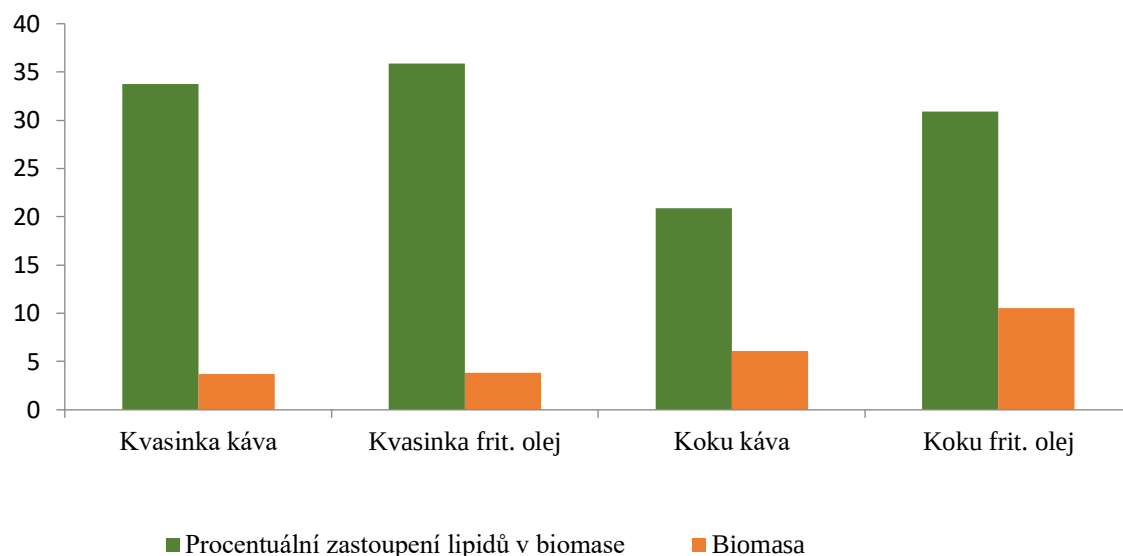
Kontrolní mikrořasa není zahrnuta v žádném grafu, protože nepřežila kultivaci.



Obrázek 78: Grafické znázornění produkce metabolitů *R. toruloides* a *D. communis* na odpadních olejích



Obrázek 79: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin kokultivace *R. toruoides* s *D. communis* na odpadních olejích



Obrázek 80: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů kokultivace *R. toruloides* s *D. communis* na odpadních olejích s jejich biomasou

4.2.10 *Rhodosporidium toruloides* a *Desmodesmus armatus*

Tabulka č. 28. Produkce biomasy kokultivačních experimentů s *R. toruloides* a *D. armatus* na odpadních olejích

	Kvasinka káva	Kvasinka frit.olej	Mikrořasa	Kokultivace káva	Kokultivace frit. olej
Biomasa (g·l ⁻¹)	3,72	3,85	0,08	4,14	3,57

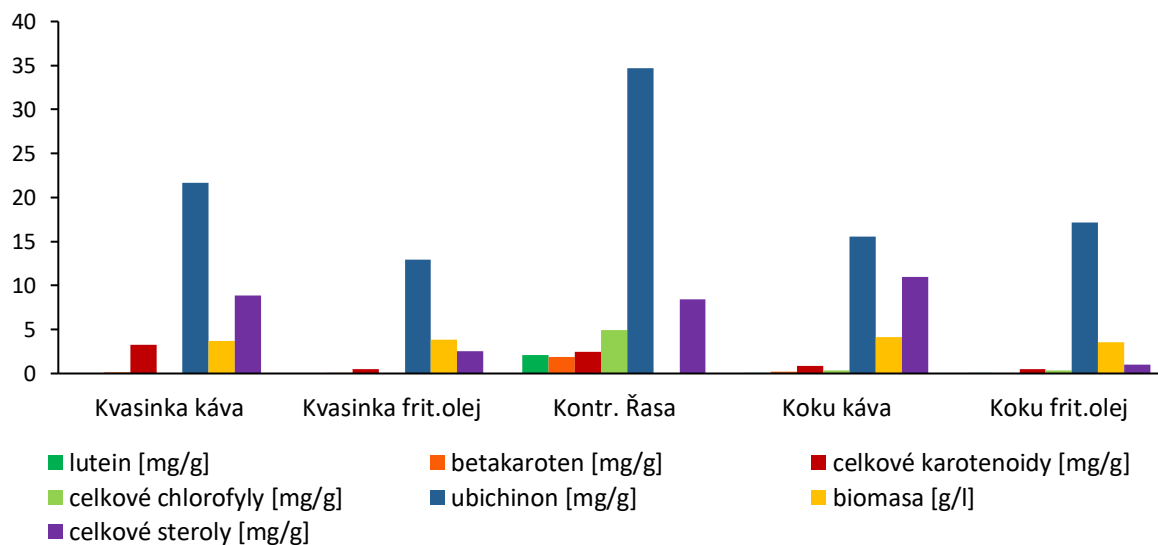
Kávová kokultivace se ukázala být nejlepším producentem celkových sterolů (11,05 mg/g sušiny). Druhým nejvíce zastoupeným metabolitem byl ubiquinon (15,56 mg/g sušiny) a poté celkové karotenoidy, chlorofyly, lutein a β -karoten. Srovnáním s kontrolní mikrořasou byla produkce všech metabolitů (kromě celkových sterolů) nižší. U kokultivace bylo zjištěno větší množství celkových sterolů a biomasy, naopak zde bylo méně ubiquinonu a celkových karotenoidů oproti kontrolní kvasince.

Kokultivace na fritovacím oleji vyprodukovala více všech metabolitů než její odpovídající kontrolní kvasinka (pouze celkových sterolů bylo syntetizováno méně). Hodnota ubiquinonu činila 17,18 mg/g sušiny, dále byly ve vzorku zastoupeny celkové karotenoidy, lutein a chlorofyly. V tomto případě byly produkty kokultivace výrazně nižší než u kontrolní mikrořasy. (Obrázek 81)

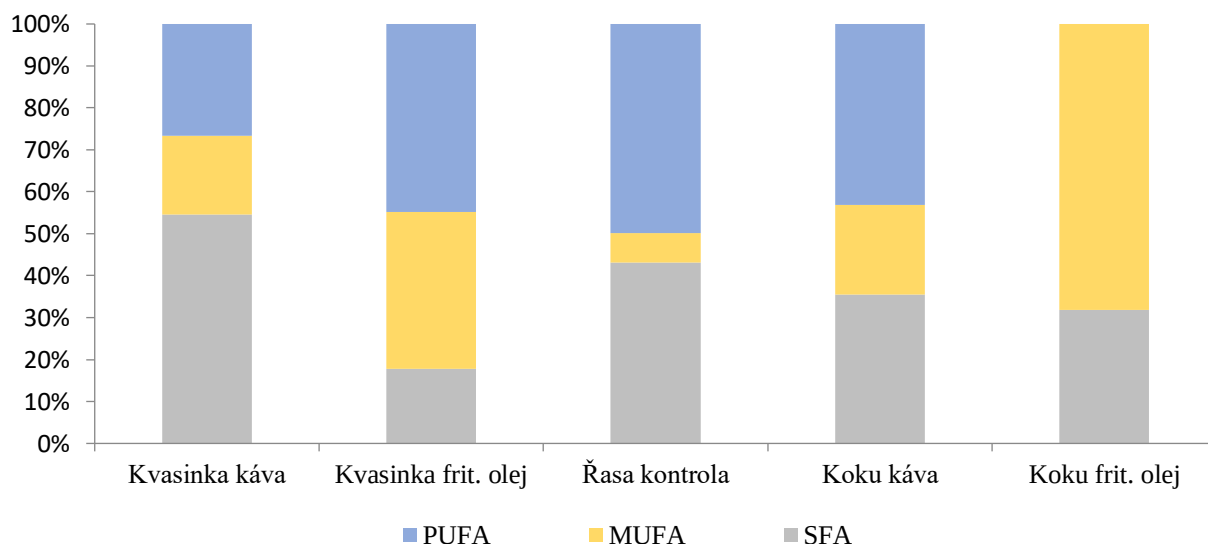
Profilu MK (Obrázek 82) v tomto případě ukazuje, že profil kávové kokultivace tvořily z největší části PUFA (43,11%), Druhými nejzastoupenějšími byly SFA (35,46%) a až poté následovaly MUFA (21,42%). Tato kokultivace oproti své kontrolní kvasinky upřednostnila tvorbu PUFA oproti SFA.

U kokultivace na fritovacím oleji úplně chybí složka PUFA, profil je tvořen pouze MUFA (68,2%) a SFA (31,8%). Tato kokultivace dala oproti své kontrolní kvasince přednost tvorbě MUFA a úplně potlačilo tvorbu PUFA.

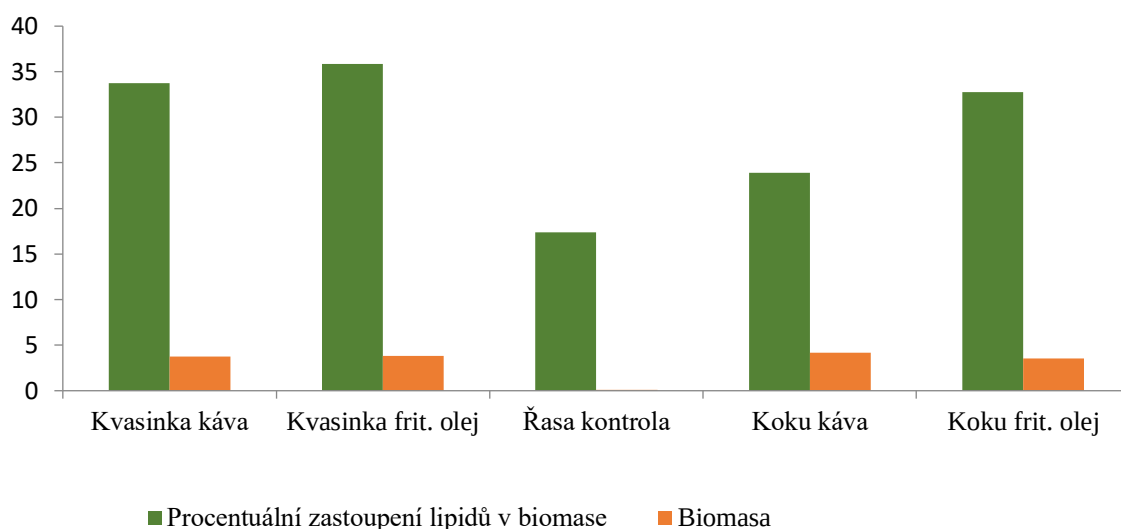
Nejlepším producentem lipidických látek (Obrázek 83) v kokultivacích byla kokultivace na fritovacím oleji. Množství obsažených lipidických látek je v tomto případě srovnatelné s kontrolní kvasinkou kultivovanou na fritovacím oleji. Množství lipidů tvořených kávovou kokultivací je nižší než u kontrolní kávové kvasinky. Mikrořasa vyprodukovala ze všech kultivací nejméně lipidů.



Obrázek 81: Grafické znázornění produkce metabolitů *R. toruloides* a *D. armatus* na odpadních olejích



Obrázek 82: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin kokultivace *R. toruoides* s *D. armatus* na odpadních olejích



Obrázek 83: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů kokultivace *R. toruloides* s *D. armatus* na odpadních olejích s jejich biomasou

4.2.11 *Rhodosporidium toruloides* a *Scenedesmus obliquus*

Tabulka č. 29. Produkce biomasy kokultivačních experimentů s *R. toruoides* a *S. obliquus* na odpadních olejích

	Kvasinka káva	Kvasinka frit.olej	Mikrořasa	Kokultivace káva	Kokultivace frit. olej
Biomasa (g·l ⁻¹)	3,72	3,85	0,10	4,10	3,17

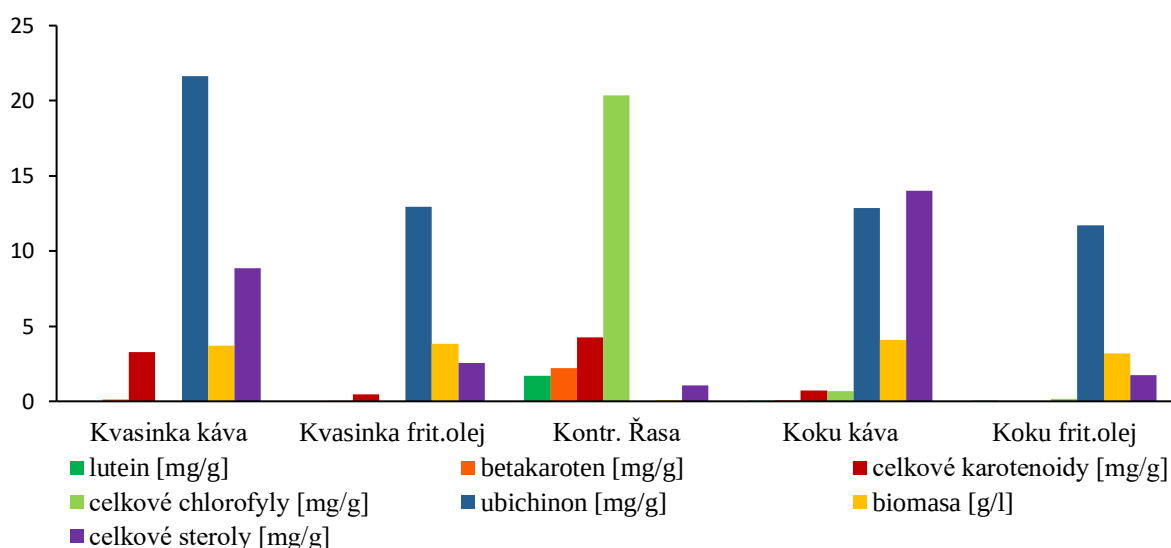
Lepším producentem celkových metabolitů (Obrázek 84) se v tomto případě ukázala být kokultivace na kávovém médiu, kdy byly nejvíce produkovány celkové steroly (14,0 mg/g sušiny), následoval ubichinon (12,85 mg/g sušiny), celkové karotenoidy (0,73 mg/g sušiny) a celkové chlorofyly (0,68 mg/g sušiny). V porovnání se svojí kontrolní kvasinkou byly produkce všech látek, kromě ubichinonu vyšší. Co se množství biomasy týče ta byla mezi kokultivací a kontrolní kvasinkou přibližně srovnatelná.

V případě kokultivace na fritovacím olej byl také největším produktem ubichinon (11,73 mg/g sušiny), druhým nejvíce zastoupeným metabolitem byly celkové steroly (1,76 mg/g sušiny). Žádné další hlavní metabolity nebyly detekovány. Porovnáním se svou kontrolní kvasinkou byly produkce ubichinonu srovnatelné, ale hodnoty biomasy i celkových sterolů byly nižší. Kávová kokultivace byla jediná, která ve svých metabolitech obsahovala detekovatelné množství celkových chlorofylů, v případě kultivace na fritovacím oleji nebyly zjištěny řasové metabolity žádné. Žádná kokultivace nebyla schopná ani srovnatelné produkce řasových metabolitů kontrolní mikrořasy.

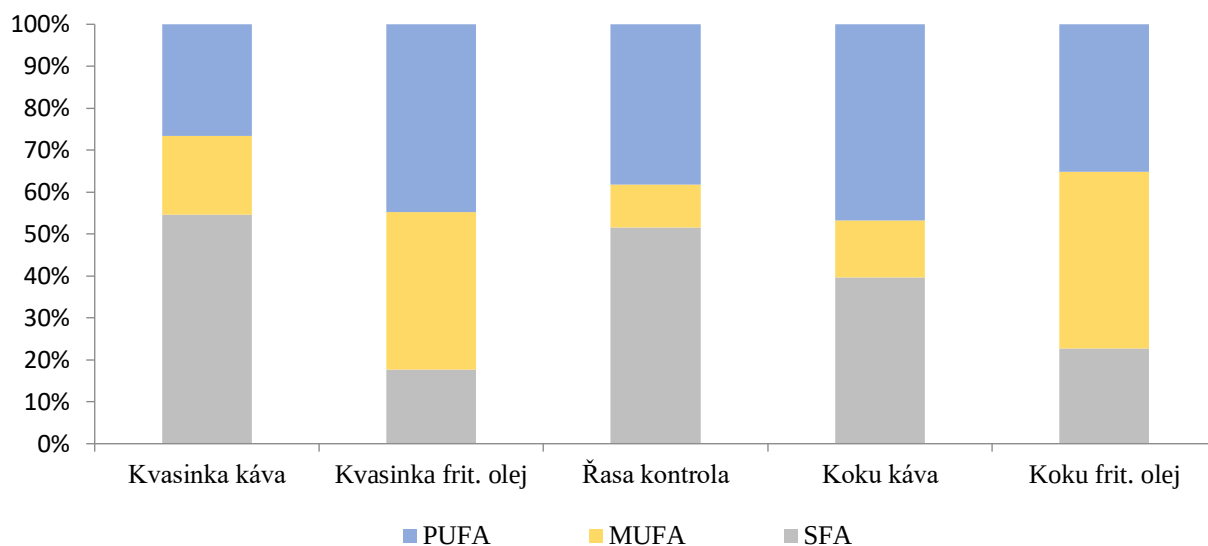
Z profilu MK (Obrázek 85) lze konstatovat, že se kávová kokultivace ukázala být obecně nejlepším producentem PUFA (46,73%), druhými nejvíce zastoupenými MK byly SFA (39,69%) a poté MUFA (13,58%). Oproti kontrolní kvasince kokultivace upřednostnila tvorbu PUFA na úkor SFA.

Kokultivace na fritovacím oleji byla obecně největším producentem MUFA (42,21%), dále vyprodukovala 35,1% PUFA a 22,69% SFA. Profil MK byl srovnatelný s kontrolní kvasinkou, jen s tím rozdílem, že kokultivace vyprodukovala menší množství PUFA na úkor MUFA. Kokultivace na kávovém oleji produkovala srovnáním s kontrolní mikrořasou více PUFA na úkor SFA a kokultivace na fritovacím oleji měla větší zastoupení MUFA na úkor SFA.

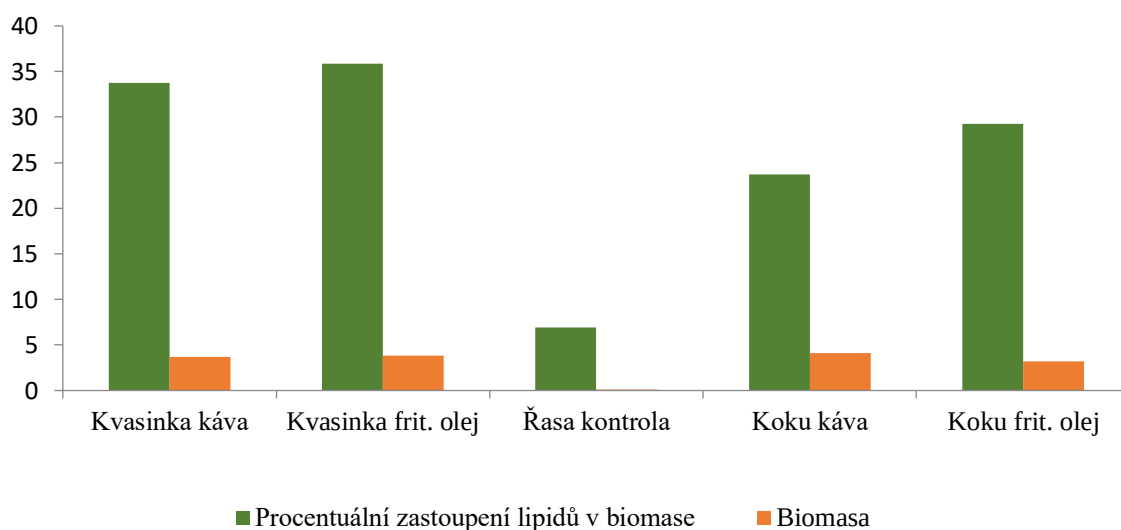
Nejlepšími producenty lipidických látek (Obrázek 86) se opět ukázala být kokultivace na fritovacím oleji. V tomto případě byla produkce lipidů kontrolní kvasinkou vyšší než u kokultivace. Kontrolní mikrořasa obsahovala ve srovnání se všemi kultivacemi nejmenší množství lipidů.



Obrázek 84: Grafické znázornění produkce metabolitů *R. toruloides* a *S. obliquus* na odpadních olejích



Obrázek 85: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin kokultivace *R. toruloides* a *S. obliquus* na odpadních olejích



Obrázek 86: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů kokultivace *R. toruloides* se *S. obliquus* na odpadních olejích s jejich biomasou

4.2.12 *Rhodosporidium toruloides* a *Chlamydomonas reinhardtii*

Tabulka č. 30. Produkce biomasy kokultivačních experimentů s *R. toruloides* a *Ch. reinhardtii* na odpadních olejích

	Kvasinka káva	Kvasinka frit.olej	Mikrořasa	Kokultivace káva	Kokultivace frit. olej
Biomasa (g·l ⁻¹)	3,72	3,85	0,25	5,77	7,16

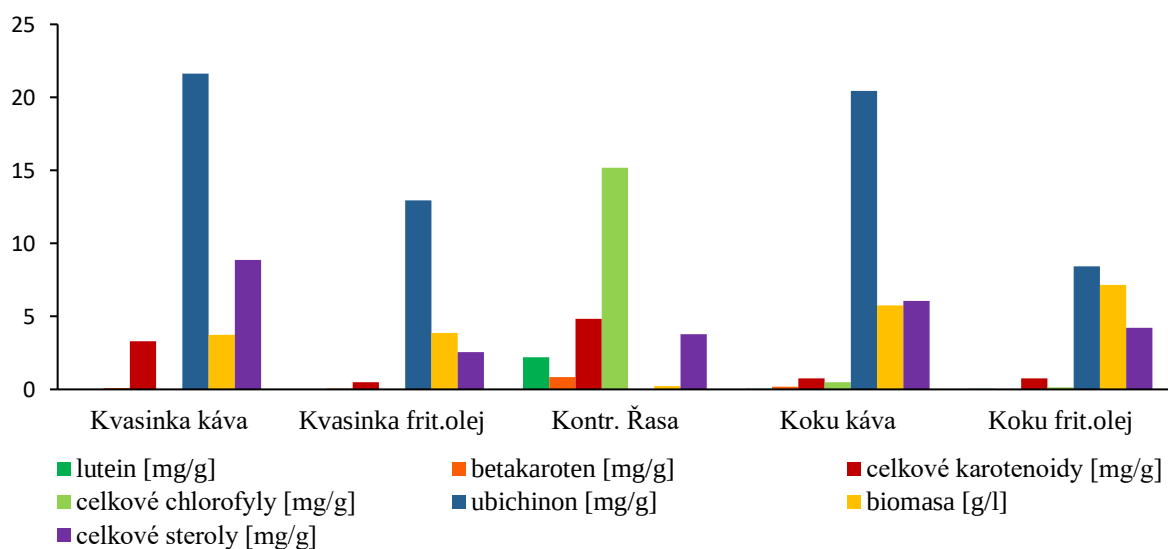
U následujících kokultivací byl nejvíce produkovaným metabolitem ubichinon (Obrázek 87). Tato produkce byla zaznamenána u kokultivace na kávovém oleji a dosahovala hodnoty 20,43 mg/g sušiny, následovala produkce celkových sterolů (6,05 mg/g sušiny) a poté celkové karotenoidy (0,78 mg/g sušiny). Ve srovnání s kontrolní kvasinkou byla produkce ubichinonu srovnatelná, celkových sterolů se tvořilo méně. Kokultivace byla ale větším producentem biomasy a celkových karotenoidů.

V případě kokultivace na fritovacím oleji byl také nejvíce zastoupen ubichinon (8,44 mg/g sušiny), poté celkové steroly (4,23 mg/g sušiny) a celkové karotenoidy (0,77 mg/g sušiny). Kokultivace na fritovacím oleji je ze všech kultivací největším producentem biomasy. Srovnáním se svou kontrolní kvasinkou byla produkce ubichinonu menší, ale produkce sterolů i karotenoidů je naopak vyšší. V porovnání obou kokultivací s kontrolní mikrořasou lze vidět, že ani jedna nebyla schopná ani srovnatelné produkce řasových metabolitů.

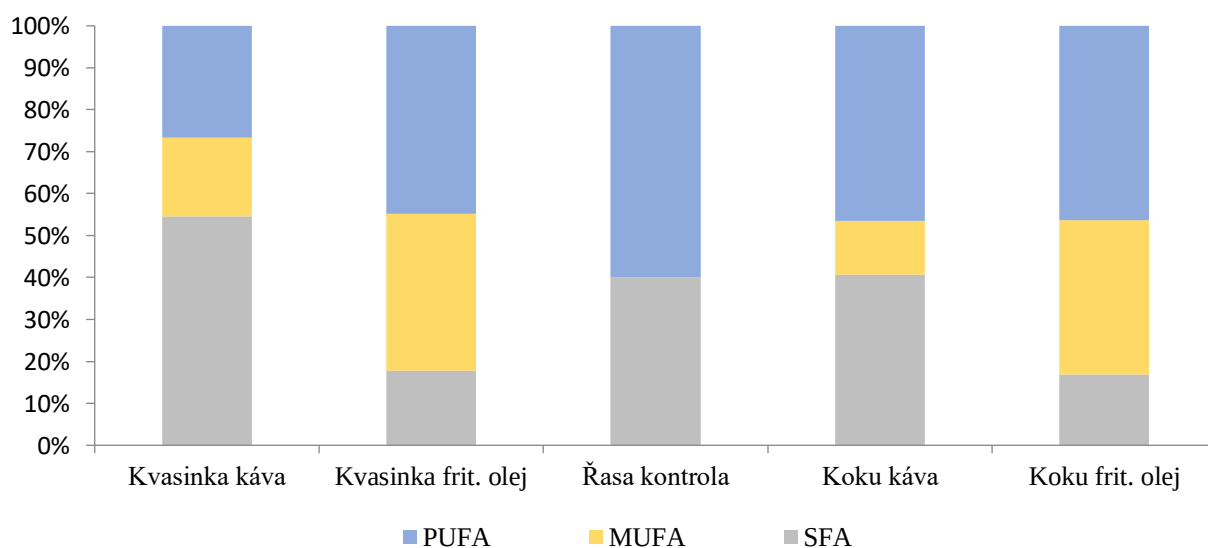
Na grafickém znázornění níže (Obrázek 88) lze pozorovat, že u kávové kokultivace byly nejvíce zastoupenou MK PUFA (46,54%), následují SFA (40,63%) a nejméně zastoupeny byly MUFA (12,83%). Kokultivace se odlišuje od kontrolní kvasinky svou produkcí MK tím, že bylo produkováno více PUFA oproti MUFA i SFA.

Profil MK kokultivace na fritovacím oleji ukázal největší zastoupení PUFA (46,29%), následují MUFA (36,79%) a nejméně zastoupené byly SFA (16,92%). Profily MK kokultivace i kontrolní kvasinky jsou téměř stejné. Srovnáním mikrořasy a kávové kokultivace lze konstatovat, že množství SFA je srovnatelné, ale v případě kokultivace bylo množství PUFA menší na úkor MUFA. V kontrolní mikrořase nebylo MUFA produkováno vůbec. U kokultivace na fritovacím oleji byla MUFA oproti mikrořase produkována na úkor SFA i PUFA.

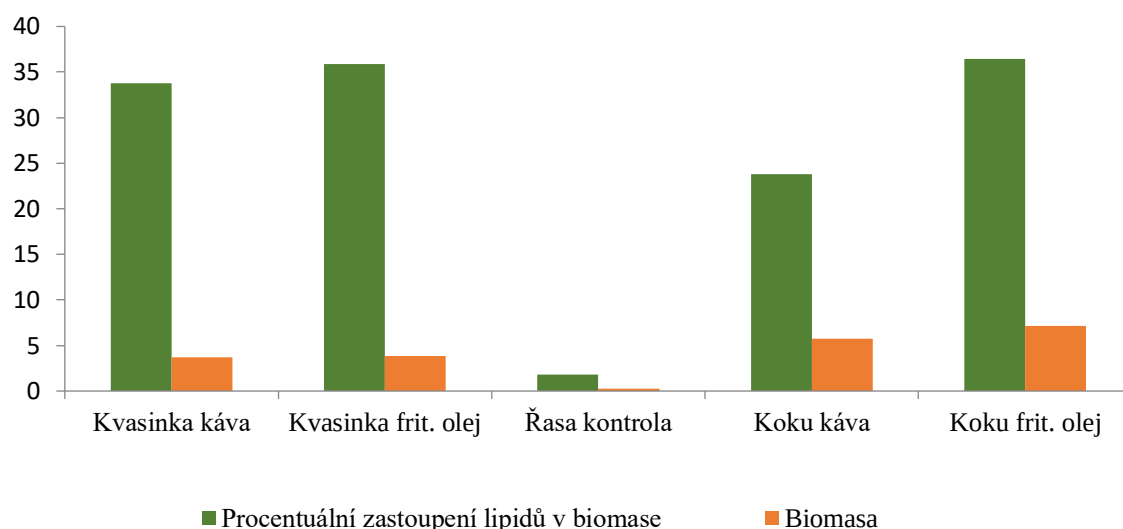
V otázce celkového zastoupení lipidů (Obrázek 89) se ukázala být nejlepším producentem kokultivace na fritovacím oleji. Samotná kvasinka na fritovacím oleji syntetizovala méně lipidů než kokultivace. V případě kávových kultivací se ukázala být lepším producentem lipidických látek kontrolní kvasinka než kokultivace. Nejmenší zastoupení lipidů se ukázalo být u kontrolní mikrořasy, toto množství bylo mnohem menší než u kokultivací.



Obrázek 87: Grafické znázornění produkce metabolitů *R. toruloides* a *Ch. reinhardtii* na odpadních olejích



Obrázek 88: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin kokultivace *R. toruloides* s *Ch. reinhardtii* na odpadních olejích



Obrázek 89: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů kokultivace *R. toruloides* s *Ch. reinhardtii* na odpadních olejích s jejich biomasou

4.2.13 *Rhodosporidium toruloides* a *Chlorella minutissima*

Tabulka č. 31. Produkce biomasy kokultivačních experiment s *R. toruloides* a *Ch. Minutissima* na odpadních olejích

	Kvasinka káva	Kvasinka frit.olej	Mikrořasa	Kokultivace káva	Kokultivace frit. Olej
Biomasa (g·l ⁻¹)	3,72	3,85	0,14	6,96	3,57

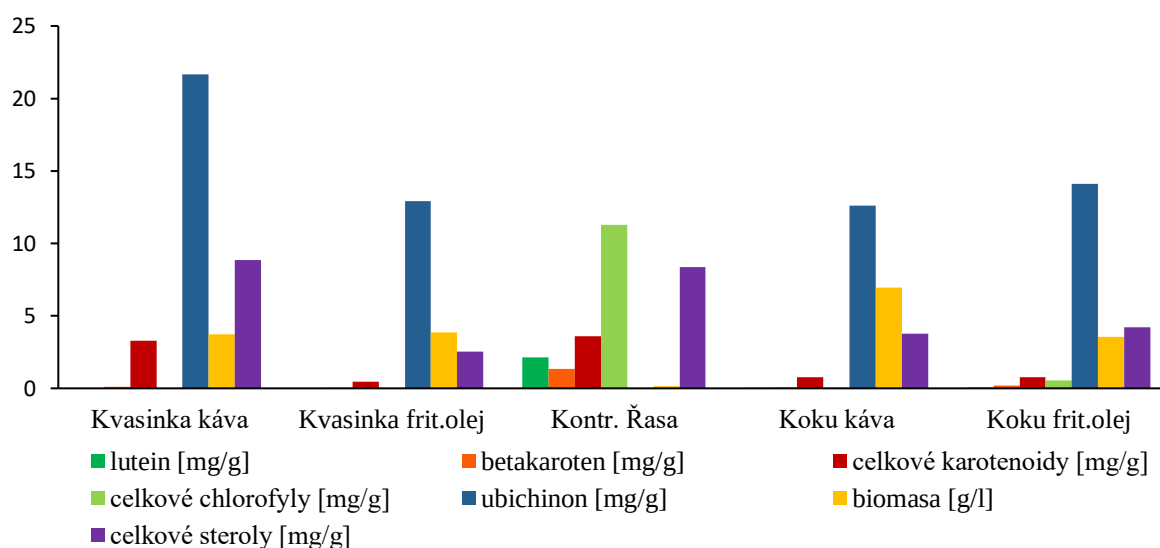
V případě tohoto experimentu se ukázala být jako nejlepší kokultivací v otázce produkce metabolitů kokultivace na fritovacím oleji (Obrázek 90). Nejvíce produkován byl ubichinon (14,10 mg/g sušiny), poté následovaly celkové steroly (4,20 mg/g sušiny), dále to byly celkové karotenoidy (0,75 mg/g sušiny). V porovnání se svojí kontrolní kvasinkou byla produkce všech metabolitů vyšší, celková biomasa pak byla u kokultivace o něco nižší. V porovnání s kontrolní mikrořasou se kokultivace ukázala být horším producentem řasových metabolitů.

U kokultivace na kávovém oleji byly nejvíce zastoupeným produktem opět ubichinon, s hodnotou produkce 12,63 mg/g sušiny, opět následovaly celkové steroly (3,75 mg/g sušiny) a celkové karotenoidy (0,78 mg/g sušiny). Po porovnání s kontrolní kvasinkou byly ovšem veškeré syntézy metabolitů nižší. Může to být způsobeno tím, že kokultivace upřednostnila produkci biomasy (která je vyšší než u kontrolní kvasinky) na úkor tvorby metabolitů. Srovnáním s kontrolní mikrořasou platilo i v tomto případě, že kokultivace nebyla schopná ani srovnatelné produkce metabolitů.

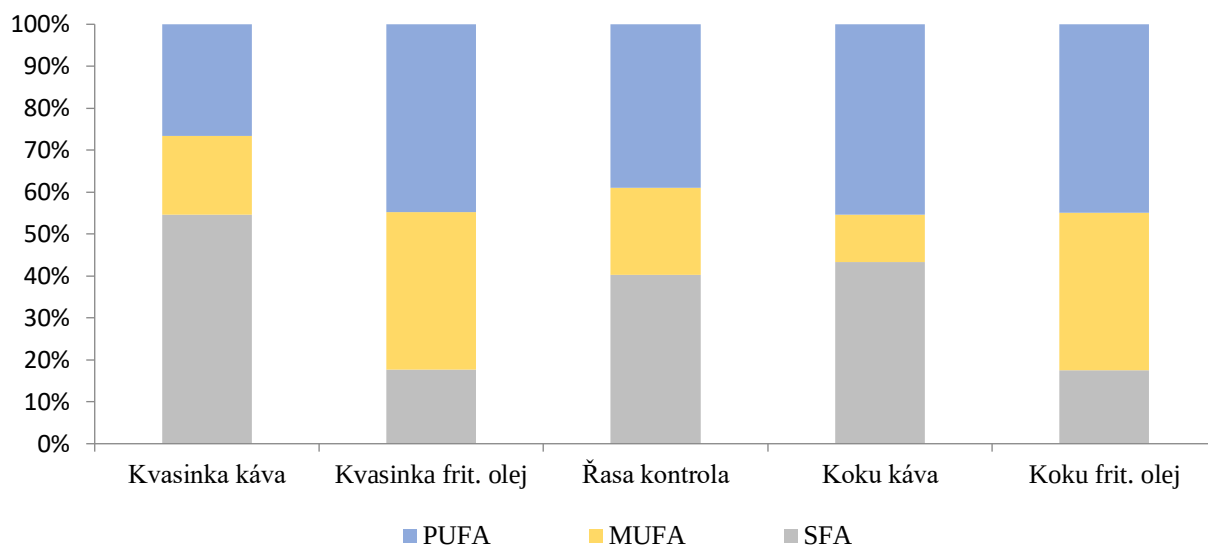
Srovnáním produktů vyprodukovaných MK (Obrázek 91) ukazuje, že kávová kokultivace je obecně největším producentem PUFA (45,45%), následují SFA (43,32%) a MUFA (11,23%).

Oproti odpovídající kvasinkové kontrole kokultivace produkovala více PUFA na úkor zbylých MK. U kokultivace ve fritovacím oleji jsou největším produktem PUFA (44,86%), poté MUFA (37,67%) a SFA (17,47%). V tomto případě jsou profily MK kokultivace a kvasinky na fritovacím oleji srovnatelné. Ve srovnání s kontrolní mikrořasou produkovala kávová kokultivace více PUFA a SFA na úkor MUFA, v případě kokultivace na fritovacím oleji byla podpořena syntéza MUFA na úkor SFA.

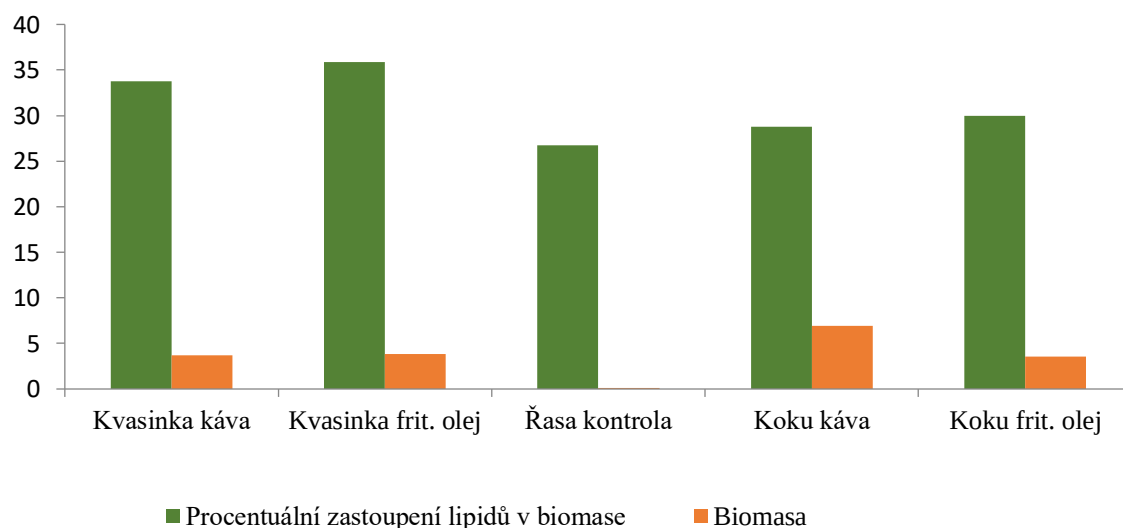
Z kokultivací se ukázala být lepším producentem celkových lipidů (Obrázek 92) ta v přítomnosti fritovacího oleje, ale její produkce je menší než produkce odpovídající kontrolní kvasinky. Také množství lipidů přítomných v kávové kokultivaci je nižší než v kvasince kultivované na kávovém oleji. V tomto případě to může být způsobeno větším nárůstem biomasy na úkor syntézy lipidických látek. Kontrolní mikrořasa byla menší producent lipidů než obě kokultivace.



Obrázek 90: Grafické znázornění produkce metabolitů *R. toruloides* a *Ch. minutissima* na odpadních olejích



Obrázek 91: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin kokultivace *R. toruloides* s *Ch. minutissima* na odpadních olejích



Obrázek 92: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů kokultivace *R. toruloides* s *Ch. minutissima* na odpadních olejích s jejich biomasou

4.2.14 *Rhodosporidium toruloides* a *Desmodesmus acutus*

Tabulka č. 32. Produkce biomasy kokultivačních experimentů s *R. toruloides* a *D. acutus* na odpadních olejích

	Kvasinka káva	Kvasinka frit.olej	Mikrořasa	Kokultivace káva	Kokultivace frit. olej
Biomasa (g·l ⁻¹)	3,72	3,85	Nepřežila	1,98	4,64

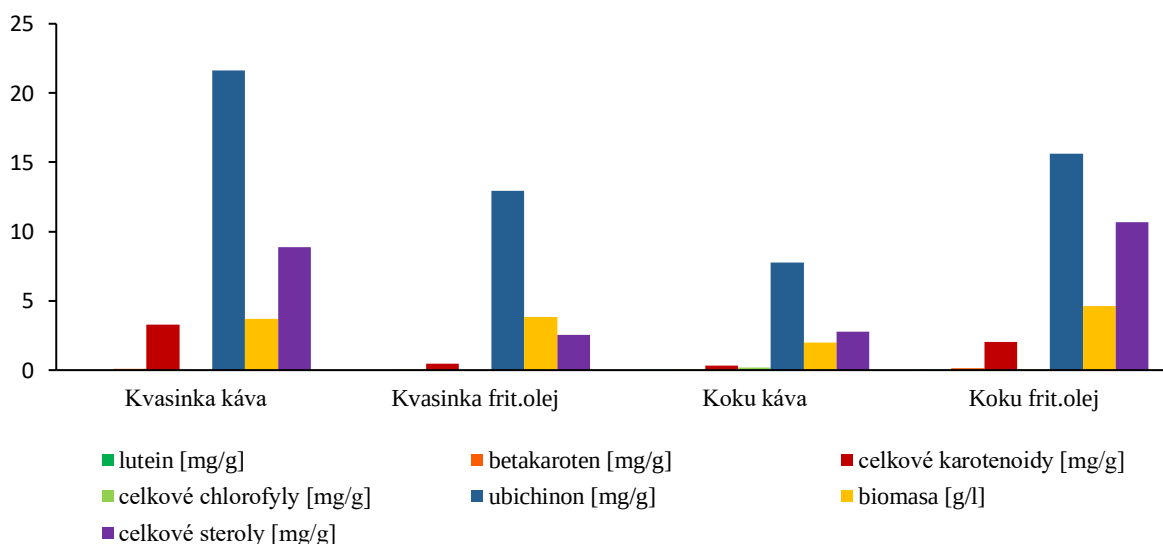
Z kokultivačních experimentů (Obrázek 93) se ukázala být lepším metabolickým producentem kokultivace na fritovacím oleji. Jejími hlavními metabolity byly ubichinon (15,62 mg/g sušiny), steroly (10,68 mg/g sušiny) a karotenoidy (2,03 g/mg sušiny). V porovnání s odpovídající kvasinkou jsou produkovány stejné hlavní metabolity a v případě kokultivací jsou produkovány ve větších množstvích. I biomasa produkovaná touto kokultivací dosahovala vyšší hodnoty.

Kokultivace na kávovém oleji produkovala také ubichinon (7,78 mg/g sušiny), karotenoidy (0,34 mg/g sušiny) a sterolické látky (2,79 mg/g sušiny). V tomto případě je ale tvorba všech metabolitů nižší než u odpovídající kontrolní kvasinky.

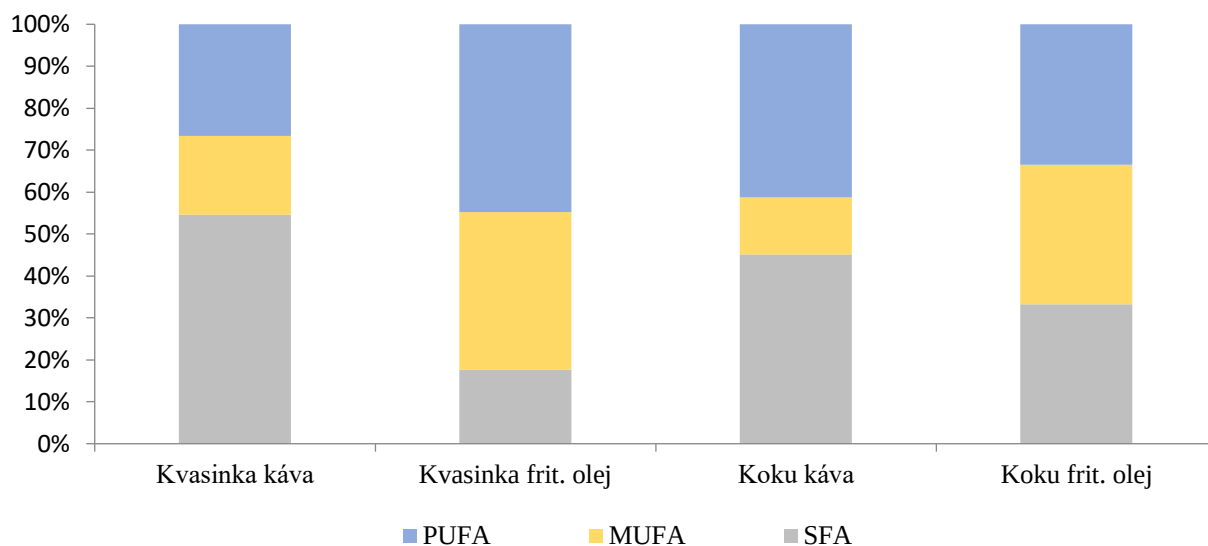
Z grafického zobrazení profilu MK (Obrázek 94) lze vidět, že v kokultivacích v kávovém oleji byly produkce SFA (45,14%) a PUFA (41,33%) poměrně srovnatelné. Tato kokultivace je obecně nejmenším producentem MUFA (13,53%). Oproti kontrolní kvasince na kávovém oleji tato kokultivace vyprodukovala více PUFA na úkor ostatních MK. Následuje kokultivace v přítomnosti fritovacího oleje, kdy jsou produkce všech MK srovnatelné – SFA 33,27%, MUFA 33,23% a PUFA 33,49%. V porovnání s kontrolní kvasinkou kultivovanou na fritovacím oleji byla podpořena produkce SFA na úkor MUFA A PUFA.

V otázce celkového množství produkovaných lipidů (Obrázek 95) kokultivacemi vyprodukovala největší na fritovacím oleji. Odpovídající kontrolní kvasinka byla ovšem zodpovědná za větší lipidickou produkci než kokultivace. U kávové kokultivace bylo množství přítomných lipidů menší než u kokultivace na fritovacím oleji a dokonce i menší než u odpovídající kontrolní kvasinky.

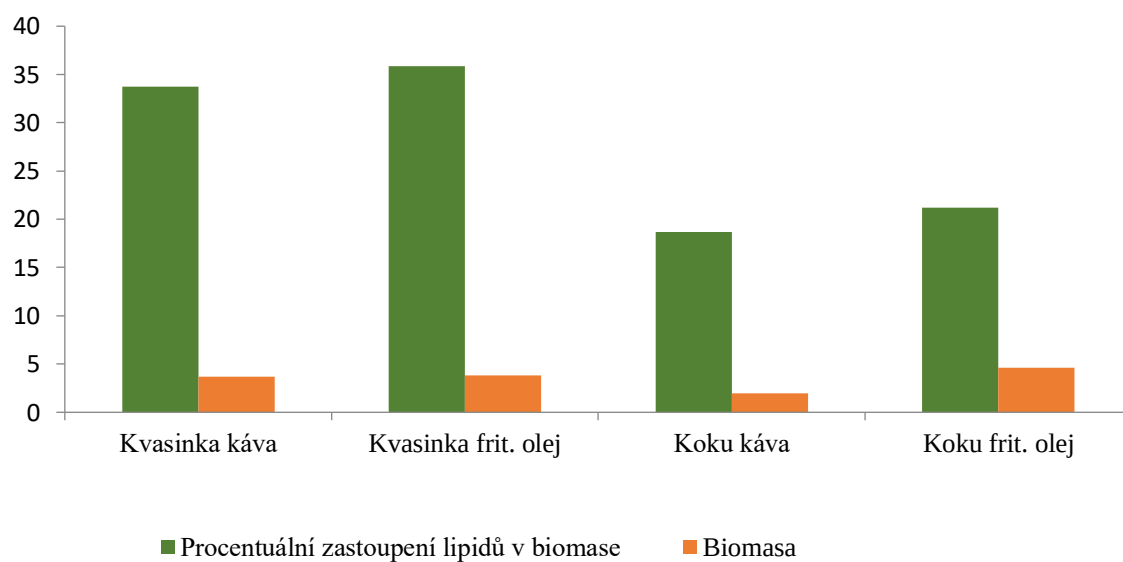
V grafech není uvedena kontrolní kvasinka z toho důvodu, že nepřežila kultivaci.



Obrázek 93: Grafické znázornění produkce metabolitů *R. toruloides* a *D. acutus* na odpadních olejích



Obrázek 94: Grafické znázornění vyprodukovaných mastných kyselin kokultivace *R. toruloides* s *D. acutus* na odpadních olejích



Obrázek 95: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů kokultivace *R. toruloides* s *D. acutus* na odpadních olejích s jejich biomasou

4.3 Experimenty mikrořas s glycerolem

Cílem těchto experimentů bylo zjistit jaký vliv na růst a metabolismus mikrořas má kultivace mikroorganismů v produkčních médiích obohacených o určité koncentrace glycerolu a tím vystavením mikrořas stresové situaci.

4.3.1 *Desmodesmus communis*

Tabulka č. 33. Produkce biomasy *D. communis* v médiích s různou koncentrací glycerolu

Koncentrace glycerolu (g·l ⁻¹)	Biomasa (g·l ⁻¹)
0	0,004
5	0,023
10	0,070
15	0,109
20	0,085
25	0,069

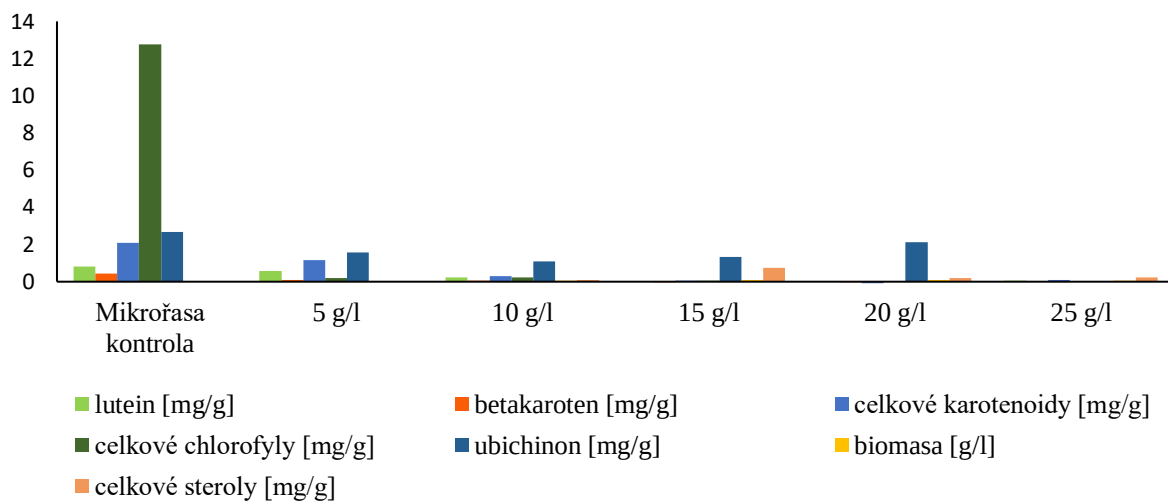
Nejvíce produkovaným metabolitem sledovaných mikrořas byl ubiquinon a byl detekován u média s koncentrací glycerolu 20 g/l (Obrázek 96), jeho hodnota byla 2,11 mg/g sušiny. U médií s koncentrací glycerolu 5, 10 a 15 g/l byla jeho produkce srovnatelná a při koncentraci 25 g/l se neprodukoval vůbec.

U poslední zmíněné koncentrace se, v porovnání s ostatními experimenty, netvořily metabolity téměř vůbec. V porovnání s kontrolní mikrořasou jsou ale veškeré výtěžky kultivací s glycerolem minimální produkci metabolitů. Lze bezpečně tvrdit, že přidáním glycerolu do média dochází k poklesu produkce biomasy i metabolitů.

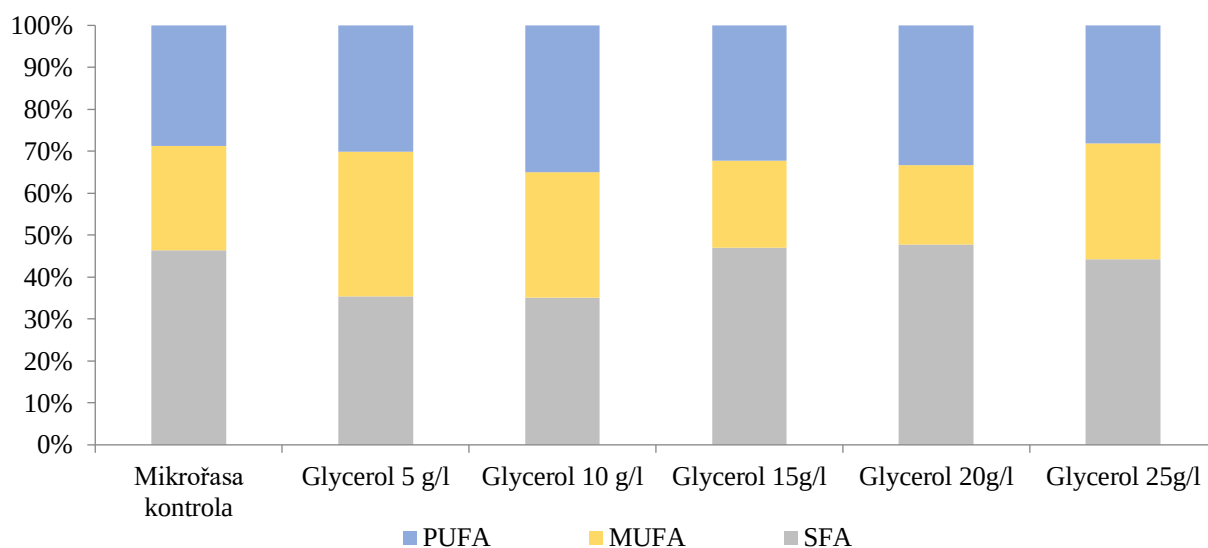
U všech typů kultivace tohoto experimentu jsou majoritními MK SFA (Obrázek 97). Jejich největším producentem byla mikrořasa v prostředí s 15 g/l koncentrací glycerolu (47,06%) a mikrořasa v prostředí s 20 g/l koncentrací glycerolu (47,76%).

U všech kultivací kromě mikrořasy v koncentraci glycerolu 5g/l byly druhou nejvíce zastoupenou složkou MK PUFA. U glycerolu 5g/l to byly MUFA, kterých bylo obecně vyprodukováno nejvíce ze všech kultivací (34,48%). Nejvíce PUFA bylo zjištěno u kultivace v glycerolu 10g/l (34,97%). Profil produkovaných MK byl srovnatelný s kontrolní mikrořasou.

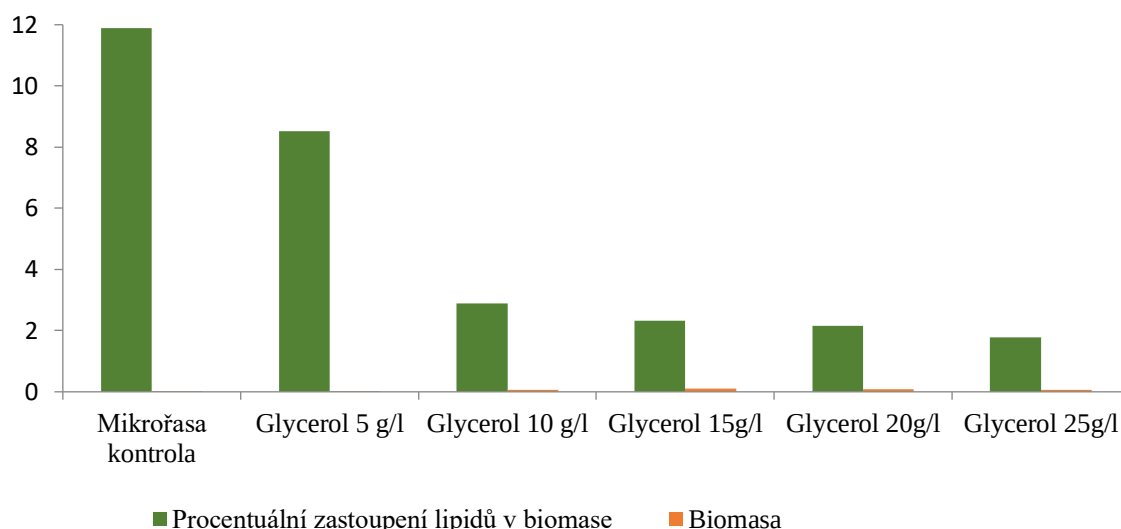
Co se týče procentuálního zastoupení lipidických látek v závislosti na vyprodukované biomase (Obrázek 98), lze sledovat, že se zvyšující se koncentrací glycerolu v médiu klesá produkce lipidických látek. Ve všech případech je množství lipidů menší než u kontrolní mikrořasy.



Obrázek 96: Grafické porovnání produkovaných metabolitů *D. communis* v různých koncentracích glycerolu



Obrázek 97: Grafické porovnání profilů produkovaných MK *D. communis* v různých koncentracích glycerolu



Obrázek 98: Celková produkce lipidů *D. communis* v prostředí s různou koncentrací glycerolu

4.3.2 *Desmodesmus armatus*

Tabulka č. 34. Produkce biomasy *D. armatus* v médiích s různou koncentrací glycerolu

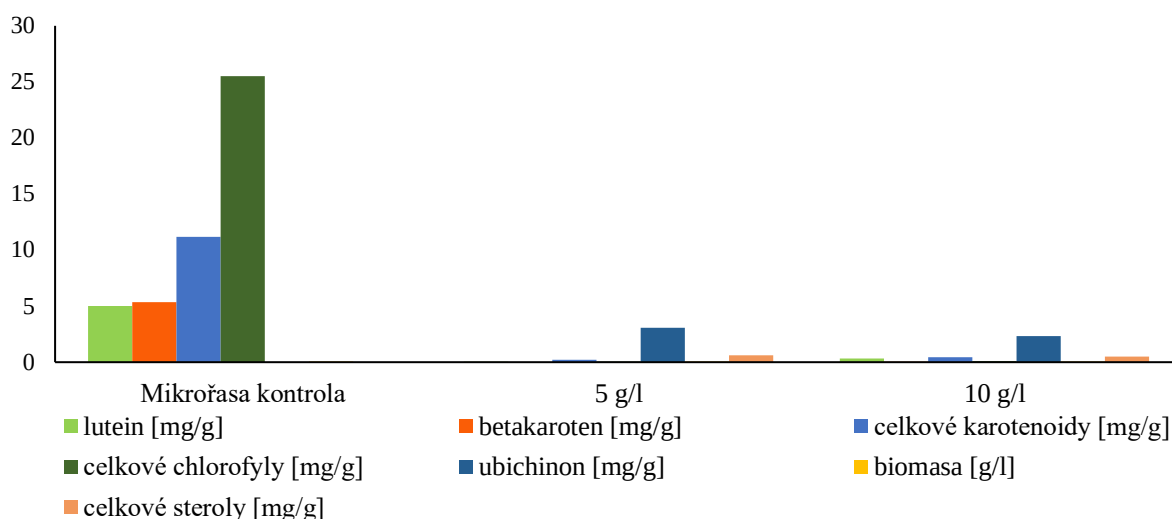
Koncentrace glycerolu (g·l ⁻¹)	Biomasa (g·l ⁻¹)
0	0,004
5	0,025
10	0,018
15	Nepřežila
20	Nepřežila
25	Nepřežila

Z grafického znázornění produkce metabolitů (Obrázek 99) lze vidět, že po přidání jakékoli koncentrace jsou metabolity řas srovnatelné. Největších hodnot dosahovala produkce ubichinonu a poté následují v menším množství celkové steroly. V porovnání s kontrolní mikrořasou je ale produkce obou mikrořas v médiu s glycerolem výrazně nižší a neobsahuje všechny metabolity, které produkovala samotná mikrořasa. Ta mimo již zmíněné metabolity produkovala i lutein, β -karoten. I v tomto případě se dá pozorovat, že aplikovaný stres v podobě přidání glycerolu do média má za vliv pokles jak produkce biomasy, tak i metabolitů.

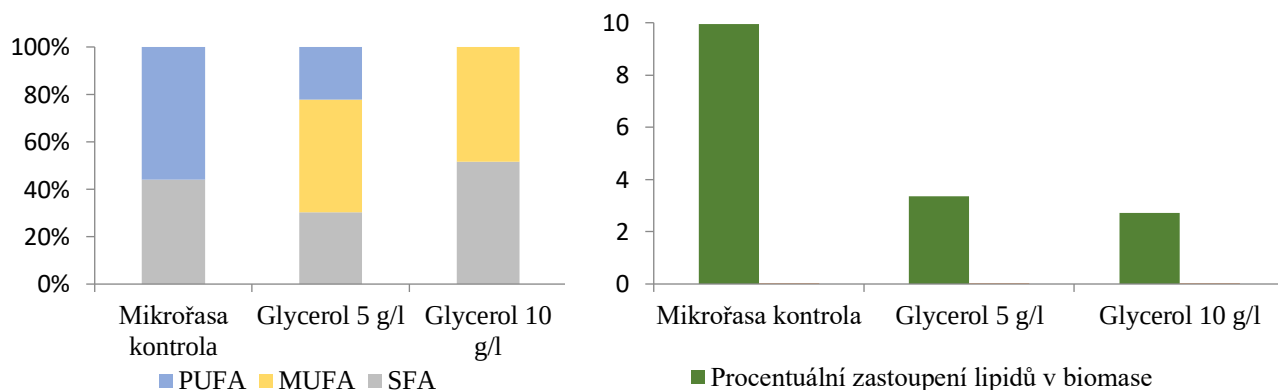
Nejvíce SFA vyprodukovala mikrořasa (Obrázek 100) v prostředí s koncentrací glycerolu 10 g/l (51,7%). Zároveň vyprodukovala také nejvíce MUFA (48,3%). PUFA neprodukovala vůbec. Mikrořasa v prostředí s koncentrací glycerolu 5 g/l vyprodukovala SFA (30,22%), MUFA (47,5%) i PUFA (22,28%).

Oproti kontrolní mikrořasě (kdy byly produkovány primárně PUFA a poté SFA), tato mikrořasa upřednostnila produkci MUFA oproti jak SFA tak PUFA. U kultivace mikrořasy s koncentrací glycerolu 10 g/l byly produkovány pouze SFA (51,7%) a MUFA (48,3%).

V případě procentuálního zastoupení lipidů v závislosti na biomase (Obrázek 101) je graficky zobrazena pouze procentuální závislost. Je to z důvodu minimálního nárůstu biomasy a tedy neschopností zobrazit ji v grafu společně s procentuálním zastoupením. Nejvíce lipidických látek vyprodukovala kontrolní kvasinka oproti glycerolovým kultivacím. dále následuje médium s koncentrací glycerolu 5 g/l a nejméně jich vyprodukovala mikrořasa v médiu s glycerolem 10 g/l. Lze vidět, že se zvyšující se koncentrací glycerolu klesala produkce lipidických látek.



Obrázek 99: Grafické porovnání profilů produkovaných MK *D. armatus* v různých koncentracích glycerolu



Obrázek 100: Grafické porovnání profilů produkovaných MK *D. armatus* v různých koncentracích glycerolu

Obrázek 101: Celková produkce lipidů *D. armatus* v prostředí s různou koncentrací glycerol

4.3.3 *Scenedesmus obliquus* a *Desmodesmus acutus*

Tabulka č. 35. Získaná biomasa *Scenedesmus obliquus*

Koncentrace glycerolu ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	Biomasa ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
0	0,06
5	Nepřežila
10	Nepřežila
15	Nepřežila
20	Nepřežila
25	Nepřežila

Tabulka č. 36. Získaná biomasa *Desmodesmus acutus*

Koncentrace glycerolu ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	Biomasa ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
0	0,14
5	Nepřežila
10	Nepřežila
15	Nepřežila
20	Nepřežila
25	Nepřežila

V případě kultivací *Sc. Obliquus* a *D. acutus* ve stresových glycerolových médiích lze vidět (102aTabulka č. 35 a Tabulka č. 36), že ani jedna mikrořasa nebyla schopná přežít v přítomnosti žádné koncentrace glycerolu. Tyto dvě mikrořasy se ukázaly naprosto neschopné kultivace v prostředí, kdy je mimo vzdušného C navíc uhlík ve formě glycerolu.

5 Závěr

Diplomová práce byla zaměřena na karotenogenní kvasinky a zelené mikrořasy a jejich vystavní biologickému nutričnímu a světelnému stresu. Biologický stres zajišťovaly kokultivace (tj. cílená kultivace řas a kvasinek v rámci jednoho média. Nutriční stres byl způsoben přidáním esenciálních prvků (v pozdějším případě olejů) do standardizovaného kultivačního média. Světelný stres bylo možné vyvolat v multikultivátorových experimentů, s řízenou intenzitou osvětlení. Studovanými kvasinkami byly *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula kratochvilovae* a *Sporobolomyces pararoseus*. Zástupce mikrořas tvořili *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus armatus*, *Scenedesmus obliquus*, *Desmodesmus velitaris*, *Desmodesmus communis*, *Coccomyxa* sp. *Chlamydomonas reinhardtii* a *Chlorella minutissima*.

Kultivací mikrořas v médiu s přidaným obsahem glycerolu (nutriční stres), bylo možné pozorovat klesající produkci biomasy, metabolitů i lipidických látek v závislosti na zvyšující se koncentraci glycerolu v médiu. Lze konstatovat, že vystavením těchto mikrořas tomuto konkrétnímu stresovému faktoru zapříčinilo utlumení životaschopnosti mikroorganismů až jejich úhyn.

V následující části budou popsány nejvýznamnější kultivace jak v multikultivátorech, tak i na odpadních olejích.

Nejúspěšnějším multikultivátorovým experimentem s *R. toruloides* a *D. acutus* se ukázal největším producentem biomasy v médiích s obsahem P+N 200% a P+N 400%. Metabolická ani lipidická produkce nedosahovala u kokultivací ani srovnatelných hodnot s kontrolními mikroorganismy. U kokultivace *R. toruloides* a *D. acutus* byla produkce biomasy v porovnání s kontrolní kvasinkou vyšší pouze u média s obsahem P+N 300%. V případě produkce metabolitů je třeba zmínit, že v kokultivačních vzorcích bylo obnaženo nezanedbatelné množství řasových metabolitů, i když v menší míře než i kontrolní mikrořasy. Akumulace lipidů byla u kokultivací nižší než u kontrolních mikroorganismů a platilo, že v odpovídajících sadách experimentů akumulace lipidů klesala se zvyšujícím se obsahem přidaných prvků v médiu. Kokultivace *R. toruloides* s *D. acutus* sice nebyla významným producentem biomasy, ale tvorba metabolitů byla nezanedbatelná. Vzorky obsahovaly jak kvasinkové tak i řasové metabolity. U akumulace lipidů opět platilo, že v odpovídajících sadách experimentů akumulace lipidů klesala se zvyšujícím se obsahem přidaných prvků v médiu. Poslední zmíněnou kultivací bude *R. toruloides* s *D. velitaris*. Ani v tomto případě nelze hovořit o významné produkci biomasy, ale v profilu metabolitů je v tomto případě zastoupeno větší množství řasových metabolitů než v předchozím případě. Vypadá to, že mikrořasa byla v tomto případě schopna konkurovat jak růstem, tak i metabolickou produkcí kvasince.

Multikultivátorový kokultivační experiment se *S. pararoseus* a *Coccomyxa* sp. vyprodukoval nejvíce biomasy v případě médií s obsahem P+N 200%, P+N 300%, Mg^{2+} 200% a P+N+ Mg^{2+} 300%. Mg^{2+} 200% experiment vyprodukoval také výrazně největší množství metabolitů a celkových lipidů. V experimentu s *S. pararoseus* a *D. armatus* byla nejvýznamnějším producentem biomasy kokultivace v médiu s obsahem Mg^{2+} 200%. Média s obsahem P+N 300% a Mg^{2+} 200% byly nejvýznamnějšími producenty ubiquinonu. V tomto případě kokultivace nebyly schopné výraznější akumulace lipidů.

Z mutlikultivátorových experimentů s *R. kratochvilovae* a *D. communis* byla vyšší produkce biomasy než u kontrolních mikroorganismů u médií s přidavkem P+N 200% a P+N 400%. Metabolická produkce byla u všech kokultivací velmi rozmanitá a zpravidla vyšší než u kontrolní kvasinky. V otázce celkové akumulace lipidů byla pouze kokultivace v médiu s Mg^{2+} 300% vyšší než u kontrolní kvasinky. Kokultivace *R. kratochvilovae* s *D. armatus* byla ve všech kokultivacích s přidanými prvky větším producentem biomasy než kontrolní kvasinka. Největší metabolická produkce byla pozorována u média s P+N+ Mg^{2+} 300%. Nejvíce akumulovaných lipidů byla obsaženo ve vzorcích kokultivací s P+N 400% a P+N+ Mg^{2+} 300%. Ostatní kultivace akumulovaly méně lipidů než kontrolní mikroorganismy. V případě kultivace *R. kratochvilovae* s *D. velitaris* byla produkce biomasy nejvyšší u médií se složením P+N 300%, Mg^{2+} 300% a P+N+ Mg^{2+} 300%. V ostatních kultivacích byla biomasa nižší než u kontrolních mikroorganismů. Metabolická produkce kokultivací byla ve všech případech vyšší než u kontrolní kvasinky. Kokultivace sice obsahovaly i řasové metabolity, ale ve výrazně menším množství než u kontrolní mikrořasy. Lipidická produkce všech kokultivací byla nižší než u kontrolní kvasinky. Výrazně největší produkce biomasy oproti kontrolní kvasinky u kokultivace *R. kratochvilovae* s *D. acutus* byla zjištěna u média s P+N 200%. Metabolická produkce byla nejvyšší u P+N sady kokultivací. Akumulace lipidů byla výrazně nejvyšší opět u média s obsahem P+N 200%. Nejvíce tvořené biomasy u *R. kraochvilovae* se *S. obliquus* byla pozorována u média s obsahem P+N 300% a Mg^{2+} 200%. U tohoto experimentu je nutný zmínit fakt, že kokultivace byly schopné minimálně srovnatelné produkce řasových metabolitů s kontrolní mikrořasou. Akumulace lipidů je obecně nejvyšší u média s obsahem P+N 200%.

Z kokultivačních experimentů na odpadních olejích se ukázaly být úspěšnější kokultivace s kvasinkou *R. toruloides*. Tato kvasinka se s mikrořami *D. velitaris*, *D. communis* a *Ch. reinhardtii* ukázala být lepším producentem biomasy kultivací na obou odpadních olejích i metabolitů než jejich kontrolní kultivace. V případě experimentu s *R. toruoides* a řasami *D. acutus*, *S. obliquus* a *Ch. minutissima* byly v případě kokultivací na kávovém oleji zaznamenány větší produkce biomasy ve srovnání s kontrolní kvasinkou. Kokultivace *R. toruloides* s *D. acutus* se ukázala být jedinou kokultivací této sady experimentů dosahující lepším produkcí kokultivací na fritovacím oleji. Produkce metabolitů byla u kokultivací obecně minimálně srovnatelná s kontrolní kvasinkou. Metabolity mikrořas byly přítomné ve všech kokultivacích, ale v tomto případě ve výrazně menším množství než u kontrolních mikrořas. V otázce celkové produkce lipidů byla kokultivace *R. toruloides* s *Ch. reinhardtii* na fritovacím oleji jedinou kultivací, kdy kvasinka s mikrořasou vyprodukovaly více lipidických látek než kontrolní kvasinka. Ve všech ostatních případech byla produkce lipidů u kokultivací menší než u kontrolních kvasinek. U této sady experimentů je třeba ještě zmínit, že u všech sad kokultivací byla minimálně jedna, která svou produkcí biomasy překonala odpovídající kontrolní mikrořasu.

Z kokultivací na odpadních olejích s *R. kratochvilae* byla vyšší produkce biomasy u obou typů odpadních olejů zaznamenána pouze u kokultivace s *D. velitaris*. *R. kratochvilovae* s mikrořasami *D. communis* a *Ch. minutissima* vyprodukovala více biomasy v médiu s kávovým olejem. Vyšší tvorbu biomasy v médiu s odpadním fritovacím olejem byla zjištěna u kokultivací s *R. kratochvilae* a *D. acutus*, *Ch. reinhardtii* a *Sc. obliquus*.

Největší metabolická produkce byla zaznamenána u kokultivace s *D. communis*. V ostatních případech byly metabolity u kokultivací zastoupeny méně než u kontrolních kvasinek. V otázce lipidické produkce byla vyšší u kokultivací na kávovém oleji (v případě *R. kratochvilovae* s *D. communis* a *D. velitaris*), v médiu na fritovacím oleji byla jediná kokultivace s vyšší akumulací lipidů ta, s *D. acutus*.

V případě multikultivátorových experimentů nebyl nárůst biomasy natolik významný, aby její produkce byla hlavní motivací experimentu. V případě, že by ale hlavním cílem kultivací měl být zisk metabolitů, poté se kokultivace ukázaly jako poměrně výrazný producent jak řasových, tak i kvasinkových metabolitů a měly by být provedeny další experimenty, sloužící k optimalizaci média za účelem co nejvyšší metabolické produkce.

Kokultivace na odpadních olejích mají velký potenciál v tvorbě biomasy i produkce metabolitů. Všechny experimenty popsané v téhle práci byly pouze pilotní. Další experimenty by měly cílit na optimalizaci média, dále na zjištění vlivů množství koncentrace olejů v médiu na růst a metabolismus kvasinek a mikrořas, a také snaha nalézt nejvhodnější kokultivační mikroorganismy. V neposlední řadě by bylo vhodné provést velkoobjemové experimenty ve fermentorech s řízeným prostředím.

Experimenty s mikrořasami v prostředí s přidaným glycerolem ukázaly, že přítomnost glycerolu mikroorganismy hubí a nemá tedy smysl v kultivacích za těchto podmínek pokračovat.

6 Seznam použité literatury

- [1] BOROWITZKA, Michael. The physiology of microalgae. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2016. ISBN 978-3-319-24943-8.
- [2] PEREIRA, Leonel a Joao MAGALHAES NETO. Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology. CRC Press, 2014. ISBN 9781466581678.
- [3] BARSANTI, L. a Paolo. GUALTIERI. Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology. Second edition. Boca Raton, [Florida]: CRC Press/Taylor & Francis Group, [2014]. ISBN 978-1-4398-6732-7.
- [4] RICHMOND, Amos. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phyecology. Ames, Iowa, USA: Blackwell Science, 2004. ISBN 06-320-5953-2
- [5] BLANKENSHIP, Robert E. Molecular mechanisms of photosynthesis. 2nd ed. Chichester: Wiley Blackwell, 2014. ISBN 978-1-4051-8976-7
- [6] Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "Chloroplast". *Encyclopedia Britannica*, 28 Jan. 2021, <https://www.britannica.com/science/chloroplast>. Accessed 6 May 2021.
- [7] RAINES, C.A. The Calvin cycle revisited. *Photosynthesis Research* (2003) 75: 1. <https://doi.org/10.1023/A:1022421515027>
- [8] Biologydictionary.net Editors. "Calvin Cycle." *Biology Dictionary*, Biologydictionary.net, 10 Nov. 2016, <https://biologydictionary.net/calvin-cycle/>
- [9] *Algal Culturing Techniques*, 2004. 1. Londýn: Elsevier Academic Press. ISBN 0-12-088426-7.
- [10] WESTBLADE, Lars F., Sangeetha RANGANATH, William Michael DUNNE, Carey-Ann D. BURNHAM, Robert FADER a Bradley A. FORD. Infection with a Chlorophyllic Eukaryote after a Traumatic Freshwater Injury. *New England Journal of Medicine* [online]. 2015, 372(10), 982-984 [cit. 2021-5-6]. ISSN 0028-4793
- [11] KESSLER, E., SCHAFER, M., HUMMER, C., KLOBOUCEK, A. et HUSS, V.A.R. 1997. Physiological, biochemical, and molecular characters for the taxonomy of the subgenera of *Scenedesmus* (Chlorococcales, Chlorophyta). – *Botanica Acta* 110: 244-250.
- [12] *Desmodesmus communis. Culture Collection of Autotrophic Organisms (CCALA)* [online]. Třeboň, Czech republic [cit. 2021-5-6].
- [13] Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "Chlorella". *Encyclopedia Britannica*, 19 Jan. 2018, <https://www.britannica.com/science/Chlorella>. Accessed 28 April 2021.
- [14] *Chlorella vulgaris. Culture Collection of Autotrophic Organisms (CCALA)* [online]. Třeboň, Czech republic [cit. 2021-5-6].
- [15] WALKER, Graeme M. Yeast physiology and biotechnology. New York: J. Wiley, c1998. ISBN 0-471-96446-8
- [16] KURTZMAN, C., J. W. FELL a T. BOEKHOUT (eds.). The yeasts: a taxonomic study. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 2011.
- [17] WALKER, Graeme M. Yeast physiology and biotechnology. New York: J. Wiley, c1998. ISBN 0-471-96446-8
- [18] SATYANARAYANA, T. a Gotthard. KUNZE. Yeast biotechnology: diversity and applications. New York: Springer, [2009]. ISBN 978-1-4020-8292-4.
- [19] Molecular mechanisms in yeast carbon metabolism. New York: Springer, 2014. ISBN 978-3-642-55012-6.
- [20] SAMPAIO, José Paulo. The Yeasts. Elsevier, 2011, 2011, , 1423-1432. DOI: 10.1016/B978-0-444-52149-1.00111-7. ISBN 9780444521491
- [21] Eukaryotické organismy. *Vysoká škola technologická v Praze* [online]. Praha, Czech republic [cit. 2021-5-6]. Dostupné z: <https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid-es-006/ebook.html?p=E005>

- [22] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1982, 483 s.
- [23] VODRÁŽKA, Zdeněk. Biochemie. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [24] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [25] GADANHO, M a J SAMPAIO. 2002. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus: sensu stricto and comb. nov. FEMS Yeast Research [online]. Roč. 2, č. 1, s. 47-58 [cit. 2021-05-06]. DOI 10.1016/S15671356(01)00062-9.
- [26] ROSA, Carlos a GÁBOR PÉTER (EDS.). Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Berlin: Springer, 2006. ISBN 9783540309857. KURTZMAN, Cletus. 2011. The yeasts: a taxonomic study. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, xxii, 289, 48, 178 s. ISBN 978-012-3847-089.
- [27] HERNÁNDEZ-ALMANZA, Ayerim, Julio CESAR MONTANEZ, Miguel A. AGUILARGONZÁLEZ, Cristian MARTÍNEZ-ÁVILA, Raúl RODRÍGUEZ-HERRERA a Cristóbal N. AGUILAR. Rhodotorula glutinis as source of pigments and metabolites for food industry. Food Bioscience [online]. 2014, 5, 64-72. DOI: 10.1016/j.fbio.2013.11.007. ISSN 22124292
- [28] KOT, Anna M., Stanisław BŁAŻEJAK, Agnieszka KURCZ, Iwona GIENKA a Marek KIELISZEK. Rhodotorula glutinis—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. Applied Microbiology and Biotechnology [online]. 2016, 100(14), 6103-6117 [cit. 2021-05-06]. DOI: 10.1007/s00253-016-7611-8. ISSN 01757598.
- [29] SAMPAIO, José Paulo. Rhodosporidium. *The Yeasts* [online]. Elsevier, 2011, 2011, s. 1523-1539 [cit. 2021-05-06]. DOI: 10.1016/B978-0-444-52149-1.00127-0. ISBN 9780444521491.
- [30] LYMAN, Mathew, Salustra URBIN, Cheryl STROUT a Bonnee RUBINFELD. The Oleaginous Red Yeast Rhodotorula/Rhodosporidium: A Factory for Industrial Bioproducts. PEIXOTO BASSO, Thalita, ed. *Yeasts in Biotechnology* [online]. IntechOpen, 2019, 2019-8-7 [cit. 2021-06-05]. DOI: 10.5772/intechopen.84129. ISBN 978-1-78923-927-0.
- [31] KUAN, Chee Sian, Rokiah ISMAIL, Zhenli KWAN, et al. Isolation and Characterization of an Atypical Metschnikowia sp. Strain from the Skin Scraping of a Dermatitis Patient. *PLOS ONE* [online]. 2016, 11(6) [cit. 2021-5-6]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0156119
- [32] MORATA, Antonio, Iris LOIRA, Carlos ESCOTT, Juan Manuel DEL FRESNO, María Antonia BAÑUELOS a José Antonio SUÁREZ-LEPE. Applications of Metschnikowia pulcherrima in Wine Biotechnology. *Fermentation*. 2019, 5(3). DOI: 10.3390/fermentation5030063.
- [33] CSUTAK, ORTANSA, TATIANA VASSU, PETRUTA CORNEA a IRINA GREBENISAN. Genetic characterization of two new Metschnikowia strains with antifungal activity [online]. In: . University of Bucharest, Faculty of Biology, Department of Genetics, Aleea Portocalilor 1-3, 060101 Bucharest; USAMV Bucharest, Faculty of Biotechnology, Bd.Marasti 59, sector 1, Bucharest, 2007, 25. března 2007 [cit. 2021-06-05]
- [34] CSUTAK, ORTANSA, TATIANA VASSU, PETRUTA CORNEA a IRINA GREBENISAN. Genetic characterization of two new Metschnikowia strains with antifungal activity [online]. In: . University of Bucharest, Faculty of Biology, Department of Genetics, Aleea Portocalilor 1-3, 060101 Bucharest; USAMV Bucharest, Faculty of Biotechnology, Bd.Marasti 59, sector 1, Bucharest, 2007, 25. března 2007 [cit. 2021-06-05]

- [35] SANTAMAURO, Fabio, Fraeya M WHIFFIN, Rod J SCOTT, Christopher J CHUCK, M. ANTONUCCI, C. TRUZZI, G. SCARPONI a M. CIANI. Low-cost lipid production by an oleaginous yeast cultured in non-sterile conditions using model waste resources. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7(1), 34-. DOI: 10.1186/1754-6834-7-34. ISSN 1754-6834
- [36] LIAO, Pan, Andréa HEMMERLIN, Thomas J. BACH a Mee-Len CHYE. The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production. *Biotechnology Advances*. 2016, 34(5), 697-713. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.03.005. ISSN 07349750.
- [37] CHANDRAN, Sunil S., James T. KEALEY a Christopher D. REEVES. Microbial production of isoprenoids. *Process Biochemistry*. 2011, 46(9), 1703-1710. DOI: 10.1016/j.procbio.2011.05.012. ISSN 13595113.
- [38] NIU, Fu-Xing, Qian LU, Yi-Fan BU a Jian-Zhong LIU. Metabolic engineering for the microbial production of isoprenoids: Carotenoids and isoprenoid-based biofuels. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2017, 2(3), 167-175. DOI: 10.1016/j.synbio.2017.08.001. ISSN 2405805X.
- [39] LOHR, Martin, Jörg SCHWENDER a Jürgen E.W. POLLE. Isoprenoid biosynthesis in eukaryotic phototrophs: A spotlight on algae. *Plant Science*. 2012, 185-186, 9-22. ISSN 01689452. Dostupné z: doi:10.1016/j.plantsci.2011.07.018
- [40] AUSSEL, Laurent, Fabien PIERREL, Laurent LOISEAU, Murielle LOMBARD, Marc FONTECAVE a Frédéric BARRAS. Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2014, 1837(7), 1004-1011. DOI: 10.1016/j.bbabi.2014.01.015. ISSN 00052728.
- [41] BENTINGER, Magnus, Michael TEKLE a Gustav DALLNER. Coenzyme Q – Biosynthesis and functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010, 396(1), 74-79. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.147. ISSN 0006291X.
- [42] KWON, Ohsuk a R. MEGANATHAN. Biosynthesis of Menaquinone (Vitamin K2) and Ubiquinone (Coenzyme Q). *EcoSal Plus*. 2009, 3(2), -. DOI: 10.1128/ecosalplus.3.6.3.3. ISSN 2324-6200.
- [43] KAGAN, V. E. a P. J. QUINN. Coenzyme Q: molecular mechanisms in health and disease. Boca Raton: CRC Press, c2001
- [44] MURRAY, Robert K. Harperova Biochemie. 23. vyd., (4. české vyd.), v H. Jinočany: H, 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- [45] JEREMY M. BERG, JOHN L. TYMOCZKO a Lubert STRYER. Biochemistry. 7th ed., International ed. Basingstoke: Palgrave Macmillan, 2011. ISBN 14-292-7635-5.
- [46] BLACK, Paul N. a Concetta C. DIRUSSO. Yeast acyl-CoA synthetases at the crossroads of fatty acid metabolism and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2007, 1771(3), 286-298. ISSN 13881981. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbalip.2006.05.003
- [47] P. BHOSALE: Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003. 63(4): p. 351-361. ISSN 0175-7598
- [48] H. J. NELIS and A. P. DE LEENHEER: Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *Journal of Applied Microbiology*, 2008. 70(3): p. 181 - 191. ISSN 1364-5072
- [49] VOET, Donald a Judith G. VOET. Biochemistry. 4th ed. Hoboken: Wiley, c2011. ISBN 978-0470570951
- [50] G. Britton, S. Liaanen-Jensen, a H. Pfander, Carotenoids. Handbook. 2004.

- [51] BRITTON G., LIAAEN-JENSEN S., and PFANDER H.: Carotenoids, Volume 4: Natural Functions. 2008, Basel – Boston - Berlin: Birkhäuser Verlag. 370 p. ISBN 978-3-7643-7498-3
- [52] MATA-GÓMEZ, Luis, Julio MONTAÑEZ, Alejandro MÉNDEZ-ZAVALA a Cristóbal AGUILAR. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. Microbial Cell Factories [online]. 2014, 13(1), 12- [cit. 2021-05-06]. DOI: 10.1186/1475-2859-13-12. ISSN 14752859.
- [53] ŠIVEL, Miroslav, Bořivoj KLEJDUS, Stanislav KRÁČMAR a Vlastimil KUBÁŇ, 2013. Lutein – významný karotenoid ve výživě člověka. *Chemické listy*. **107**(Vol 107 No 6 (2013), 456-463.
- [54] HIGUERA-CIAPARA, I., L. FÉLIX-VALENZUELA a F. M. GOYCOOLEA. Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2006, **46**(2), 185-196 [cit. 2021-5-6]. ISSN 1040-8398.
- [55] GÁLOVÁ, Eliška, Iveta ŠALGOVIČOVÁ, Viktor DEMKO, Katarína MIKULOVÁ, Andrea ŠEVČOVIČOVÁ, Ľudmila SLOVÁKOVÁ, Veronika KYSELÁ a Ján HUDÁK. A short overview of chlorophyll biosynthesis in algae. *Biologia*. 2008, 63(6). ISSN 1336-9563. Dostupné z: doi:10.2478/s11756-008-0147-3
- [56] WILLOWS, Robert D. Biosynthesis of Chlorophyll and Bilins in Algae. Photosynthesis in Algae: Biochemical and Physiological Mechanisms. Cham: Springer International Publishing, 2020, 2020-06-04, , 83-103. Advances in Photosynthesis and Respiration. ISBN 978-3-030-33396-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-33397-3_5
- [57] YAHIA, E. M. Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry and human health. 2nd edition. Hoboken, NJ, 2018. ISBN 978-111-9157-977.
- [58] MIZOGUCHI, T., Y. KIMURA, T. YOSHITOMI a H. TAMIaki. The stereochemistry of chlorophyll-c3 from the haptophyte *Emiliania huxleyi*: The (132R)-enantiomers of chlorophylls-c are exclusively selected as the photosynthetically active pigments in chromophyte algae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2011, 1807(11), 1467-1473. DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.07.008. ISSN 00052728.
- [59] VON WETTSTEIN, D. Chlorophyll Biosynthesis. THE PLANT CELL ONLINE. 7(7), 1039- 1057. DOI: 10.1105/tpc.7.7.1039. ISSN 10404651.
- [60] DOHNAL, Vlastimil, Alena JEŽKOVÁ a Jiří SKLÁDANKA. Ergosterol: Klíčový steroid hub. *Kontakt* [online]. 2009, **10**(2), 449-454 [cit. 2021-5-6]. ISSN 12124117.
- [61] CERTIK, M. a S. SHIMIZU. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1999, 87(1), 1-14
- [62] WANG, Yanan, Sufang ZHANG, Zhiwei ZHU, Hongwei SHEN, Xiping LIN, Xiang JIN, Xiang JIAO a Zongbao Kent ZHAO. Systems analysis of phosphate-limitation-induced lipid accumulation by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnology for Biofuels* [online]. 2018, 11(1) [cit. 2020-07-13]. DOI: 10.1186/s13068-018-1134-8. ISSN 1754-6834.
- [63] ŠÍCHO, Vladislav, Zdeněk VODRÁŽKA a Blanka KRÁLOVÁ. Potravinařská biochemie. 2. dopl. a přeprac. vyd. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1981, 360 s. : il. ; 8°
- [64] KAŠTÁNEK, František. Bioinženýrství. 1. Praha: Academia, 2001. ISBN 80-200- 0768-7.
- [65] CHU, Ruoyu, Shuangxi LI, Liandong ZHU, Zhihong YIN, Dan HU, Chenchen LIU a Fan MO. A review on co-cultivation of microalgae with filamentous fungi: Efficient harvesting, wastewater treatment and biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2021, 139. ISSN 13640321. Dostupné z: doi:10.1016/j.rser.2020.110689

- [66] ISHIKA, Tasneema, Navid R. MOHEIMANI a Parisa A. BAHRI. Sustainable saline microalgae co-cultivation for biofuel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017, 78, 356-368. ISSN 13640321. Dostupné z: doi:10.1016/j.rser.2017.04.110
- [67] LIU, Lu, Junhui CHEN, Phaik-Eem LIM a Dong WEI. Dual-species cultivation of microalgae and yeast for enhanced biomass and microbial lipid production. *Journal of Applied Phycology*. 2018, 30(6), 2997-3007. ISSN 0921-8971. Dostupné z: doi:10.1007/s10811-018-1526-y
- [68] CHEIRSILP, Benjamas, Suleeporn KITCHA a Salwa TORPEE. Co-culture of an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and a microalga *Chlorella vulgaris* for biomass and lipid production using pure and crude glycerol as a sole carbon source. *Annals of Microbiology*. 2012, 62(3), 987-993. ISSN 1590-4261. Dostupné z: doi:10.1007/s13213-011-0338-y
- [69] WANG, Shikai, Yong WU a Xu WANG. Heterotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* using sucrose as the sole carbon source by co-culture with *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology*. 2016, 220, 615-620. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2016.09.010
- [70] Sun, Y., Liu, WC., Shi, X. *et al.* Inducing secondary metabolite production of *Aspergillus sydowii* through microbial co-culture with *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact* **20**, 42 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01527-0>
- [71] GOERS, Lisa, Paul FREEMONT a Karen M. POLIZZI. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2014, **11**(96) [cit. 2021-5-23]. ISSN 1742-5689. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2014.0065
- [72] MARKOU, Giorgos, Dries VANDAMME a Koenraad MUYLAERT. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research*. 2014, 65, 186- 202. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2014.07.025
- [73] MAROVA, Ivana, Milan CERTIK a Emilia BREIEROV. Production of Enriched Biomass by Carotenogenic Yeasts - Application of Whole-Cell Yeast Biomass to Production of Pigments and Other Lipid Compounds. MATOVIC, Miodrag Darko, ed. *Biomass - Detection, Production and Usage* [online]. InTech, 2011, 2011-09-09 [cit. 2021-5-7]. ISBN 978-953-307-492-4.
- [74] PLEISSNER, Daniel a Carol Sze Ki LIN. Valorisation of food waste in biotechnological processes. *Sustainable Chemical Processes*. 2013, 1(1). ISSN 2043-7129.
- [75] SZOTKOWSKI, Martin, Dana BYRTUSOVA, Andrea HARONIKOVA, Marie VYSOKA, Marek RAPTA, Volha SHAPAVAL a Ivana MAROVA. Study of Metabolic Adaptation of Red Yeasts to Waste Animal Fat Substrate. *Microorganisms*. 2019, 7(11). ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms7110578
- [76] DOSTÁL, J., *et al.* *Lékařská chemie II: Bioorganická chemie*. Brno : Masarykova univerzita, 2007. 166 s. ISBN 978-80-210-3789-2
- [77] BIALY, Heba El, Ola M. GOMAA a Khaled Shaaban AZAB. Conversion of oil waste to valuable fatty acids using Oleaginous yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2011, **27**(12), 2791-2798 [cit. 2021-5-7].
- [78] BALCAR, a kol.: *Výroba sušených a zahuštěných mléčných výrobků*, vyd. SNTL, Praha, 1978, 328 s., 04-824-78.
- [79] JELEN, P. *WHEY PROCESSING | Utilization and Products*. Encyclopedia of Dairy Sciences. Elsevier, 2002, 2002, 2739-2745. DOI: 10.1016/B0-12-227235-8/00511-3. ISBN 9780122272356.
- [80] VELÍŠEK, Jan. *The Chemistry of food*. 2. opr. vyd. Chichester: Wiley, 2014. ISBN 978-1-118- 38384-1

- [81] SOMMER, Lumír. Základy analytické chemie II. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0
- [82] PATNAIK, Pradyot. Dean's analytical chemistry handbook. 2. McGraw Hill Professional, 2004. ISBN 0071410600, 9780071410601.
- [83] ARMAREGO, W. L. F. a Christina CHAI LI LIN. Purification of laboratory chemicals [online]. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2003 [cit. 2017-12-04]. ISBN
- [84] Giddings, J. C. Analytical chemistry. 1965. Zv. 37.
- [85] Klouda, P. Moderní analytické metody. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [86] SNIEGOŇOVÁ, Pavlína. Aplikace fyzikálních a chemických stresových faktorů v různých fázích růstu na autotrofní mikroorganismy. Brno, 2022.

7 Seznam použitých zkratek a symbolů

ACN – acetonitril

DAD - detektor diodového pole

FID - plamenově ionizační detektor

GC - plynová chromatografie

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

MeOH - methanol

MF A – mobilní fáze A

MF B – mobilní fáze B

MK- mastné kyseliny

MO - mikroorganismy

MUFA – mononenasycené mastné kyseliny

PTFE – polytetrafluorethylen

PUFA – polynenasycené mastné kyseliny

SFA – nasycené mastné kyseliny

TrisHCl – pufr kyseliny chlorovodíkové

YPD - yeast extract-pepton-dextrose