



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 MIKROŘAS A KAROTENOGENNÍCH
KVASINEK VE STRESOVÝCH PODMÍNKÁCH**

CULTIVATION OF MICROALGAE AND CAROTENOGENIC YEASTS UNDER STRESS CONDITIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Pavλίna Sniegoňová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Martin Szotkowski

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1541/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Pavλίna Sniegoňová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Martin Szotkowski**

Název bakalářské práce:

Kultivace mikrořas a karotenogenních kvasinek ve stresových podmínkách

Zadání bakalářské práce:

V rámci této práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- Přehledná literární rešerše zaměřená na vybrané kmeny červených kvasinek a mikrořas
- Kultivace vybraných kmenů za stresových podmínek
- Optimalizace složení produkčních médií pro vybrané kmeny mikroorganismů
- Příprava a izolace různých extraktů z buněčné biomasy a jejich charakterizace
- Srovnání produkčních vlastností vybraných kmenů
- Vyhodnocení výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

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

Pavλίna Sniegoňová
student(ka)

Ing. Martin Szotkowski
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

V biotechnologickém průmyslu se čím dál více využívají mikroorganismy, jako jsou mikrořasy či karotenogenní kvasinky k produkci vybraných látek či k možnosti valorizace odpadu. Mezi metabolity produkované těmito mikroorganismy patří karotenoidy, což jsou přirozená barviva mající antioxidační a další biologické účinky. Další významné produkované látky patří lipidy, které zastupují velkou škálu látek v živých organismech. Tvoří například buněčné membrány a slouží jako rezerva energie. Využit těchto látek lze v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu, ale také k produkci biopaliv. Teoretická část je věnována popisu vybraných rodů mikroorganismů, jejich kultivaci a produkovaných metabolitů. Dále jsou zde zmíněny stresové faktory, kterým byly tyto organismy vystaveny a analytické metody použity pro zjištění zastoupení produkovaných metabolitů. V další části byly srovnány produkční vlastnosti vybraných mikroorganismů v závislosti na použitém stresovém faktoru. Z kvasinkových kmenů dosahovaly zvýšené produkce lipidů kmeny *C. macerans* a *S. metaroseus* při vyšší koncentraci FeCl_3 . Při použití syrovátky jako zdroje uhlíku docházelo u kvasinek zpravidla ke snížené produkci karotenoidů. U řas a sinic docházelo k nejvyšší produkci lipidů u kmenů *S. acutus* a *D. quadricaudea*. Produkce karotenoidů závisela na použitém stresu a nejvyšších produkcí dosahovaly kmeny *C. sorokiniana*, *C. reinhardtii*, *D. quadricaudea* a *Coccomyxa* sp.

ABSTRACT

In biotechnological industry we can register greater use of microorganisms like microalgae and carotenogenic yeast for production of selected substances or for valorisation of waste materials. Among metabolites produced by these microorganisms are carotenoids, which are natural pigments with antioxidant and other biological effects. Other significant produced substances are lipids, which represent large range of substances in living organisms. They form cellular membranes and serve as a reservoir of energy. These substances can be used in food, cosmetic and pharmaceutical industry and also in production of biofuels. Theoretical part is focused on description of selected genera of microorganisms, their cultivation and produced metabolites. Stress factors to which they were exposed are also mentioned, as are the analytical methods used for detection of produced metabolites. Next part is dedicated to the comparison of production properties of selected microorganisms depending on used stress factor. Increased production of lipids in yeast is observed in *C. macerans* and *S. metaroseus* with higher concentrations of FeCl_3 . While using whey as a source of carbon, yeasts show decreased production of carotenoids. Highest production of lipids in algae and cyanobacteria was observed in *S. acutus* and *D. quadricaudea*. Production of carotenoids depended on applied stress factor and highest productions was observed in *C. sorokiniana*, *C. reinhardtii*, *D. quadricaudea* and *Coccomyxa* sp.

KLÍČOVÁ SLOVA

Karotenogenní kvasinky, sinice, mikrořasy, lipidy, karotenoidy, stresové faktory

KEYWORDS

Carotenogenic yeast, cyanobacteria, microalgae, lipids, carotenoids, stress factors

SNIEGOŇOVÁ, Pavlína. *Kultivace mikrořas a karotenogenních kvasinek ve stresových podmínkách* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-07-29]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123946>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martin Szotkowski.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská 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 vedoucímu své bakalářské práce Ing. Martinu Szotkowskiému za odborné vedení, cenné rady a nesmírnou ochotu při jejím řešení. Dále Fakultě chemické za vytvoření podmínek a možností pro realizaci této práce. Na závěr bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří mě při studiu podporovali.

OBSAH

1 ÚVOD	9
2 TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Řasy	10
2.1.1 Cytologie.....	10
2.1.2 Rozmnožování	10
2.1.2.1 Vegetativní a nepohlavní rozmnožování.....	10
2.1.2.2 Pohlavní rozmnožování.....	11
2.1.3 Kmeny.....	11
2.1.3.1 Chlorella.....	11
2.1.3.2 Coccomyxa sp.	11
2.1.3.3 Chlamydomonas.....	12
2.1.3.4 Desmodesmus	12
2.1.3.5 Scenedesmus	12
2.2 Sinice	13
2.2.1 <i>Synechococcus nidulans</i>	13
2.3 Kultivace mikroorganismů.....	13
2.4 Kvasinky.....	14
2.4.1 Rozmnožování	14
2.4.2 Kmeny.....	14
2.4.2.1 Rhodotorula.....	14
2.4.2.2 Rhodosporidium.....	15
2.4.2.3 Cystofilobasidium	15
2.4.2.4 Sporidiobolus	15
2.5 Karotenoidy	15
2.5.1 Karoteny.....	16
2.5.2 Biosyntéza karotenů.....	16
2.5.3 Xanthofyly	17
2.6 Chlorofyly	17
2.6.1 Biosyntéza chlorofylu	18
2.7 Lipidy	18
2.7.1 Mastné a vyšší mastné kyseliny	19

2.7.2	Biosyntéza mastných kyselin.....	19
2.8	Ergosterol	20
2.9	Ubichinon – koenzym Q10	21
2.10	Odpadní substráty.....	21
2.10.1	Glycerol.....	21
2.10.2	Syrovátka	21
2.10.3	Melasa	22
2.11	Stresové faktory.....	22
2.11.1	Intenzita a zdroj osvětlení	22
2.11.2	Zdroj dusíku.....	22
2.12	Stanovování metabolitů.....	22
2.12.1	Princip HPLC.....	23
2.12.2	Princip plynové chromatografie.....	23
3	CÍL PRÁCE	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1	Použité chemikálie	26
4.1.1	Chemikálie pro kultivaci mikrořas a sinic	26
4.1.2	Chemikálie pro kultivaci kvasinek.....	26
4.1.3	Chemikálie pro extrakce	26
4.2	Použité přístroje a pomůcky	26
4.3	Použité kmeny mikroorganismů.....	27
4.3.1	Použité kmeny mikrořas	27
4.3.2	Použité kmeny sinic	27
4.3.3	Použité kmeny kvasinek	27
4.4	Kultivace mikroorganismů.....	28
4.4.1	Kultivace mikrořas a sinic	28
4.4.1.1	Aplikace stresů.....	28
4.4.2	Kultivace Kvasinek.....	29
4.4.2.1	Inokulum 1 a 2	29
4.4.2.2	Produkční médium a aplikace stresů.....	30
4.5	Stanovení látek	31
4.5.1	Stanovení biomasy	31

4.5.2	Příprava vzorků pro analýzu pomocí HPLC	31
4.5.2.1	Příprava vzorků mikrořas	31
4.5.2.2	Příprava vzorků kvasinek.....	31
4.5.3	Příprava vzorků pro analýzu pomocí GC.....	32
4.5.3.1	Trasesterifikační směs.....	32
5	VÝSLEDKOVÁ ČÁST	33
5.1	Kvasinky.....	33
5.1.1	Kultivace za použití alternativních zdrojů uhlíku.....	33
5.1.1.1	Kmen <i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i> a <i>Cystofilobasidium macerans</i>	33
5.1.1.2	Kmen <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (24) a <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (28)	35
5.1.1.3	Kmen <i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	36
5.1.2	Kultivace v přítomnosti chloridu sodného	38
5.1.2.1	Kmen <i>Rhodospiridium toruloides</i>	38
5.1.2.2	Kmen <i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	39
5.1.2.3	Kmen <i>Sporidiobolus metaroseus</i>	41
5.1.2.4	Kmen <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (28).....	43
5.1.3	Kultivace v přítomnosti chloridu železitého	44
5.1.3.1	Kmen <i>Rhodotorula kratochvilovae</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (24) a (28)	44
5.1.3.2	Kmen <i>Rhodospiridium toruloides</i> , <i>Cystofilobasidium macerans</i> a <i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	46
5.1.3.3	Kmen <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> a <i>Sporidiobolus metaroseus</i>	47
5.2	Mikrořasy a sinice	49
5.2.1	Kultivace v závislosti na zdroji a koncentraci dusíku.....	49
5.2.1.1	Kmen <i>Synechococcus nidulans</i>	49
5.2.1.2	Kmen <i>Chlorella vulgaris</i>	51
5.2.1.3	Kmen <i>Chlorella sorokiniana</i>	53
5.2.1.4	Kmen <i>Coccomyxa</i> sp.	55
5.2.2	Kultivace v závislosti na koncentraci fosforu.....	57
5.2.2.1	Kmeny <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlorella sorokiniana</i> a	

Chlamydomonas reinhardtii	57
5.2.2.2 Kmen Scenedesmus acutus	59
5.2.2.3 Kmen Scenedesmus dimrphus	60
5.2.2.4 Kmen Desmodesmus quadricauda	61
5.2.2.5 Kmen Desmodesmus obliquus.....	63
5.2.2.6 Kmen Coccomyxa sp.	64
5.2.3 Kultivace v přítomnosti chloridu železitého	65
5.2.3.1 Kmeny Chlorella vulgaris a Chlorella sorokiniana.....	65
5.2.3.2 Kmeny Scenedesmus acutus a Scenedesmus dimorphus.....	67
5.2.3.3 Kmeny Desmodesmus quadricauda a Desmodesmus obliquus	69
5.2.3.4 Kmeny Coccomyxa sp. A Chlamydomonas reinhardtii.....	70
6 ZÁVĚR.....	72
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	75
8 SEZNAM ZKRATEK.....	79

1 ÚVOD

Oblast výzkumu řas a kvasinek a jejich produkce rozličných látek se v poslední době dočkala velkého rozmachu. Jedná se o organismy schopné produkovat například biopaliva, pigmenty, léčiva ale i důležité živiny, hlavně vitamíny a minerály. Z tohoto důvodu jsou velmi hojně využívány především v potravinářském průmyslu a farmaceutickém průmyslu. Tyto mikroorganismy jsou schopny přežít téměř ve všech podnebných podmínkách a přizpůsobit se měnícím se podmínkám. Nejdůležitějšími metabolity těchto mikroorganismů jsou karotenoidy a lipidické látky. Karotenoidy jsou velká skupina přírodních barviv, produkované rostlinami, živočichy a mikroorganismy. Mají významné biologické vlastnosti, kdy jsou schopné například vychytávat volné radikály z organismu. Díky této antioxidační schopnosti mohou přispívat k prevenci před chronickými onemocněními. Dále jsou součástí fotosyntetického aparátu rostlin. V neposlední řadě slouží jako prekursory pro řadu vitamínů a hormonů, a jsou tak využívány pro výrobu léčiv a doplňků stravy.

Lipidické látky v organismu slouží k řadě důležitých funkcí. Jsou hlavní složkou biomembrán buněk, slouží jako zásobárna energie nebo tvoří prostředí pro rozpouštění vitamínů, například A, D, E, K. Tyto látky je možné využít v potravinářském průmyslu jako doplňky stravy s obsahem převážně nenasycených mastných kyselin. Využit se také nachází v biopalivech. Cílem této bakalářské práce je optimalizace produkčních médií, za účelem zisku co nejbohatší biomasy. Tohoto cíle je možno dosáhnout pomocí aplikace stresových faktorů, jako jsou alternativní zdroje dusíku, uhlíku nebo různé intenzity osvětlení. Dále je možné využít odpadních produktů průmyslového odvětví za účelem valorizace odpadu a snížení nákladů na kultivaci.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Řasy

Řasy jsou rozsáhlá skupina jednoduchých organismů schopných fotosyntézy (autotrofní organismy), řadících se mezi nižší rostliny. Řasy a rostliny produkují stejné zásobní látky a existují mezi nimi určité morfologické podobnosti. Rozdílů by se mezi nimi ovšem našlo mnohem více. Řasy jsou součástí mnoha ekosystémů nacházejících se na celé planetě. Vodní řasy můžeme nalézt téměř všude od tekoucích potoků k solným jezerům. Vyskytují se jak v polárních oblastech, tak v horkých pramenech. Dokážou se velice dobře přizpůsobit podmínkám, ve kterých žijí – pH, teplota, koncentrace kyslíku a oxidu uhličitého, intenzita světla. Řasy se dělí do několika základních tříd:

Chlorophyceae (zelené řasy)

Phaeophyceae (hnědé řasy)

Pyrrophyceae (obrněnky)

Rhodophyceae (červené řasy)

Chrysophyceae (žluto-zelené řasy)

Řasy jsou většinou považovány za fototrofní organismy, což znamená, že energii získávají pomocí fotosyntézy. Jsou však řasy, které musí živiny přijímat z jiného zdroje, jsou tedy heterotrofní. Organismus schopný využívat oba dva zdroje energie se nazývá mixotrof. V extrémních podmínkách může řasa přikročit k alternativnímu způsobu příjmu živin, čímž se řadí do kategorie mixotrofních organismů. Díky své různorodosti produkují také širokou škálu látek, které pak nacházejí velké využití v potravinářství, farmacii, kosmetice, zemědělství, atd. I když máme k dispozici z velkého množství řas, nejčastěji se využívá pouze několika rodů – *Arthrospira* (*Spirulina*), *Chlorella*, *Dunaliella*, *Coccomyxa* a *Haematococcus* [1] [2].

2.1.1 Cytologie

Řasy jsou rozmanitá skupina organismů. Jejich morfologie je velmi různorodá. Velikost řas se pohybuje jak v mikroskopických, tak v makroskopických měřítkách. Mnoho řas je jednobuněčných. Některé mají bičíky, které jim umožňují pohyb. Další řasy se nacházejí v seskupeních, kde se jednotlivé buňky ne velmi pevně drží pohromadě nebo tvoří vysoce organizované kolonie [1].

2.1.2 Rozmnožování

Řasy se mnohou rozmnožovat buď rozdělením buňky nebo oddělením části kolonie, nepohlavní produkcí pohyblivých sporů nebo pohlavně spojením gamet. Vegetativní a nepohlavní rozmnožování umožňuje ustálení přizpůsobeného genotypu a jeho předání z generace na generaci. Pohlavní rozmnožování zahrnuje spojení buněk, jader, styk chromozomů/genů a meiózu, kterými dojde ke genetické rekombinaci [1].

2.1.2.1 Vegetativní a nepohlavní rozmnožování

Nejjednodušší forma reprodukce; rozdělení buňky na dvě stejné části, každá nesoucí informace mateřské buňky. Toto dělení může u řas probíhat podélně nebo napříč. Zoospóry jsou pohyblivé spóry, které mohou být produkovány uvnitř vegetativní mateřské buňky. Před uvolněním se vyvíjí uvnitř mateřské buňky a následně jsou uvolněny díky trhlině ve stěně buňky. Tyto buňky jsou téměř dokonalými replikami původní vegetativní buňky. Když kolonie dospěje do rozmnožovací fáze, každá buňka může vytvořit novou kolonii podobnou té předchozí. Dochází k vytvoření vícebuněčných skupin. Některé kolonie se rozpadnou na části, které jsou schopny dále vytvářet nové jedince [1].

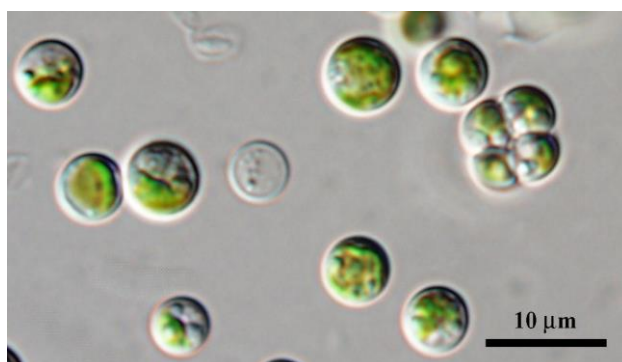
2.1.2.2 Pohlavní rozmnožování

Různé druhy řas mohou mít gamety, které se morfologicky odlišují od vegetativních buněk nebo mohou být identické. Hlavním rozdílem je haploidní DNA. Řasy mají tři stadia životního cyklu lišící se mezi skupinami. Hlavním rozdílem je to, kde dochází k meióze a jaký typ buněk produkuje [1].

2.1.3 Kmeny

2.1.3.1 *Chlorella*

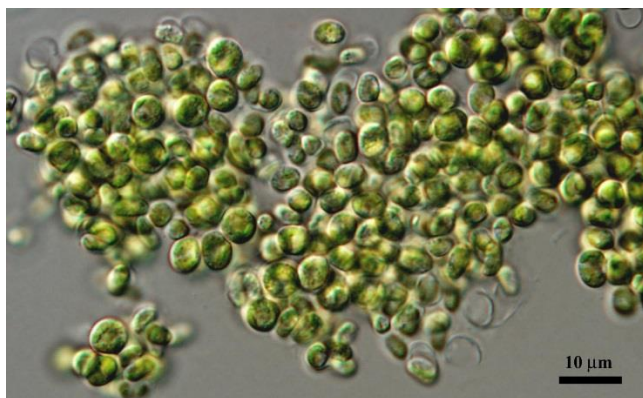
Chlorella je zelená mikrořasa tvořící malé nepohyblivé kulovité či elipsoidní buňky o velikosti v rozsahu 2-10 μm . Můžeme zde zařadit rody *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* nebo *Chlorella saccharophila*. Má vysokou odolnost vůči teplotě a dokáže růst v teplotách mezi 15-40°C. *Chlorella* byla dlouho využívána jako model mikroorganismů pro studium fotosyntézy, díky její metabolické podobnosti s vyššími rostlinami. *Chlorella* roste fototrofně v anorganickém médiu, ale dokáže se chovat i jako mixotrof a heterotrof (s přidavkem kyseliny octové a glukózy). Je velmi nenáročná na intenzitu osvětlení a díky její rychlosti růstu dokáže snížit riziko kontaminace. Kultivuje se v polouzavřených fotobioreaktorech nebo v kaskádách nakloněných ploch. *Chlorella* je jedna z nejvíce kultivovaných řas, díky jejímu využití v potravinářství, farmacii nebo v kosmetickém průmyslu. Obsahuje velké množství proteinů, polysacharidů, lipidů a v menším množství nenasycené mastné kyseliny, karotenoidy, vitaminy a minerály [1][2][46].



Obrázek č. 2 *Chlorella vulgaris* [44]

2.1.3.2 *Coccomyxa* sp.

Coccomyxa patří mezi velmi rozšířený kmen zelených řas, který můžeme nalézt takřka po celém světě jak ve vodních, tak v suchozemských prostředích. Díky schopnosti přizpůsobovat se podmínkám prostředí je můžeme nalézt jak v oceánech, tak ve sladkovodních prostředích ve velkém rozmezí teplot. Tvoří malé kulaté či eliptické buňky o velikostech v rozmezí 40-100 μm . *Coccomyxa* se používá jako modelový organismus a má nejprostudovanější genom [40][41].



Obrázek č. 3 *Coccomyxa* sp. [44]

2.1.3.3 *Chlamydomonas*

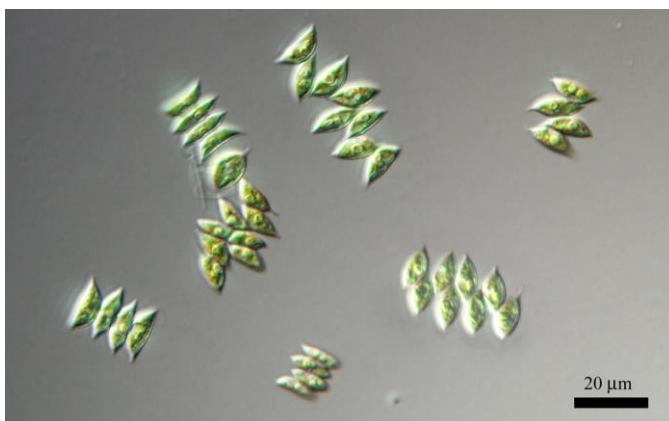
Chlamydomonas je zelená řasa žijící ve vodě, půdě ale také například ve sněhu. Jsou to vynikající modelové organismy například při studiu mobility bičíků a dá se využít i v genetice, biochemii či molekulární biologii. Typickým znakem pro tento rod jsou dva bičíky velkou část buňky tvoří chloroplasty. Tyto buňky disponují rhodopsinovými iontovými kanálky, které slouží jako sensory slunečního záření a dále kontrolují další procesy v buňce. Zástupci tohoto rodu jsou například *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlamydomonas nivalis* nebo *Chlamydomonas geitleri* [1].

2.1.3.4 *Desmodesmus*

Tento rod žije jednotlivě nebo v případě stresových podmínek v nepohyblivých koloniích tvořící cenobia o 4, 8 nebo 16 buněk. Vytváří ochranná pouzdra, kterými se chrání před predátory. Tvoří součást sladkovodního planktonu. Ten to rod je velice rozsáhlý, zástupci jsou například *Desmodesmus quadricauda* a *obliquus* [1][39].

2.1.3.5 *Scenedesmus*

Scenedesmus je sladkovodní řasa žijící jak jednotlivě, tak v koloniích tvořící cenobia o 2, 4, 8, 16 až 32 buněk. Tvoří součást sladkovodního planktonu a využívá se ve zpracovávání odpadních vod. Tohoto rodu existuje velké množství druhů, zástupci jsou například *Scenedesmus acutus* nebo *Scenedesmus dimorphus* [38].



Obrázek č. 4 *Scenedesmus acutus* [44]

2.2 Sinice

Sinice tvoří jednu z největších skupin patřící mezi prokaryotické organismy schopné fotosyntézy. Jedná se o fotosyntetické gram-negativní bakterie. Jsou to jedny z nejstarších organismů a vyskytují se ve velké škále vodních a suchozemských prostředích. Většina sinic žije v oceánech a sladkých vodách a tvoří podíl fytoplanktonu. Přemnožením sinic vzniká vodní květ, který je pro člověka spíše nežádoucím. Často se jim také říká modro-zelené řasy, díky jejich modrému pigmentu fykocyaninu, který se společně s chlorofyly podílí na fotosyntéze. Jejich podobnost s řasami je tedy velká. Oba mikroorganismy potřebují jako zdroj energie sluneční záření a jako zdroj uhlíku oxid uhličitý. Jsou také schopny syntetizovat podobnou škálu metabolitů. Na rozdíl od řas jsou však méně náročné na kultivace. Jako prokaryotické organismy se také podobají bakteriím, oproti kterým však mají větší velikost [36].

2.2.1 *Synechococcus nidulans*

Synechococcus patří mezi jednobuněčné bakterie schopné fotosyntézy a je důležitou součástí fytoplanktonu vyskytujícího se v teplejších tropických oceánech. Řadí se do třídy *Cyanophyta*. Buňky jsou kulovitého tvaru a pohybují se v rozmezí velikostí od 0,6 – 1,5 μm . Vykazuje vysokou schopnost adaptace na změny prostředí, jako je třeba intenzita osvětlení nebo salinita. Díky tomu ho dokážeme v určitých případech najít i ve sladkých vodách [35].

2.3 Kultivace mikroorganismů

Řasy se pěstují v kontrolovaných médiích. Primárním faktorem pro růst řas je světlo. Vhodné podmínky jako intenzita osvětlení, výživa, výměna plynů se vybírají pro optimální účinnost fotosyntézy. Při kultivaci je důležité, aby se biomasa neusazovala. Proto jsou média intenzivně promíchávána, což zajistí i dostatečný přísun živin. V kultivaci se také využívá dvojího způsobu sklizení biomasy. Metoda vsádkování spočívá v tom, že se řasy po určité době zpracují najednou. Druhá možnost je metoda kontinuální. Při ní se biomasa sklízí průběžně, podle toho, jak rychle naroste.

Otevřené kultivační systémy představují přírodní nebo umělé nádrže (hloubka 10-30 cm), kde se řasy kultivují za přímého kontaktu s prostředím. Slouží ke kultivaci velkého množství řas a jsou levnější a konstrukčně jednodušší. Použité materiály na stavbu těchto systémů se liší podle podnebí a místních podmínek. Otevřené systémy se využívají zejména pro rychle rostoucí kmeny nebo pro kultivaci za speciálních podmínek.

Opakem otevřených systémů jsou uzavřené nebo polouzavřené systémy – fotobioreaktory. Na rozdíl od otevřených systémů mohou být osvětlovány i umělým světlem, dosahují vyšší hustoty a jsou lépe promíchávány – podmínky kultivace jsou mnohem lépe nastavitelné. Díky určité izolaci od okolního prostředí je možné řasy kultivovat bez ohledu na vlivy prostředí. Také se podstatně sníží pravděpodobnost kontaminace z okolí. Nevýhodou oproti otevřeným systémům je pak jejich provozní cena a obtížnější údržba [1][2].

Co se kvasinek týče, nejčastější kultivace probíhají v bioreaktorech. Jsou to zařízení, které pomocí mechanických a chemických prostředků ovlivňují biologické procesy při kultivaci buněk. Využívají se v biotechnologické výrobě, farmacii a v potravinářství ale také při zpracovávání odpadních vod. Tyto zařízení musí zajišťovat rovnoměrné rozdělení buněk, zajišťují udržení požadovaných koncentrací plynů, živin a pH. Podle požadavků na kultivace se mohou rozdělovat například na otevřené či uzavřené, aerobní nebo anaerobní, míchané a nemíchané [5].

2.4 Kvasinky

Kvasinky jsou jednobuněčné eukaryotické chemoheterotrofní organismy, které náleží do říše hub. Žijí jednotlivě nebo v koloniích, kde tvoří pseudomycelia. Tvoří buňky různých a velikostí které se pohybují v rozměrech v rozmezí 3 – 4 μm . Velikost je však ovlivněna prostředím a podmínkami ve kterých žijí. Jsou to všudypřítomné organismy vyskytující se v půdě, ve sladkých vodách i v mořích a jsou také součástí rostlin. Významnou částí jsou karotenogenní kvasinky. Tyto mikroorganismy se vyznačují svou typickou barvou, která je způsobena akumulací produkovaných žlutých a červených pigmentů. Z nich jsou nejvýznamnější například β -karoten, astaxanthin, torulen či torularhodin. Mimo karotenoidů syntetizují širokou škálu lipidických látek s velkým obsahem nenasycených mastných kyselin, ergosterol či koenzym Q_{10} . Z tohoto důvodu se mohou uplatnit ve vývoji a výrobě biopaliv, nebo v potravinářském či farmaceutickém průmyslu [8][28].

2.4.1 Rozmnožování

Kvasinky se mohou vegetativně rozmnožovat jak pučením (*Saccharomyces*), které je nejtypičtější, tak přímým dělením (*Schizosaccharomyces*), nebo mohou tvořit mycelia. Pučení probíhá na pólech, buňky zůstávají spojené a tvoří dlouhé řetězky. V případě pohlavního rozmnožování kvasinky dojde ke splynutí dvou buněk a tvorbě nové buňky ze vzniklé zygoty [8].

2.4.2 Kmeny

2.4.2.1 *Rhodotorula*

Tento kmen tvoří rychle rostoucí hladké kolonie narůžovělé či korálové barvy. Buňky mohou být kulovitého, ale převážně elipsoidního tvaru. Má převážně aerobní metabolismus, a proto nekvasí cukry. Kmen *Rhodotorula* je jeden z nejhlavnějších karotenogenních mikroorganismů a jejími hlavními produkty jsou β -karoten, torulen a torularhodin. V určitých případech mohou produkovat větší množství žlutých pigmentů. Produkují také značné množství lipidů. Kvasinky kmenu *Rhodotorula* jsou organismy přítomné téměř ve všech prostředích a nejsou náročné na kultivaci ani zdroje živin. Mezi zástupce patří tři hlavní druhy; *Rhodotorula kratochvilovae*, *Rhodotorula minuta* a *Rhodotorula mucilaginosa* [11][37].



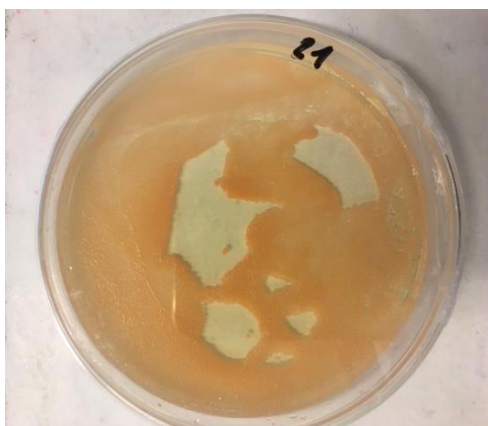
Obrázek č. 5 *Rhodotorula kratochvilovae*

2.4.2.2 *Rhodosporidium*

Kvasinky tohoto rodu jsou příbuzné kmenu *Rhodotorula*, rozdíl je pouze v rozmnožování, kdy se kvasinky kmenu *Rhodosporidium* rozmnožují pohlavně. *Rhodosporidium* tvoří kolonie růžové nebo oranžové barvy. Tento kmen se používá pro produkci vitamínů a lipidů, nově se však využívají pro vývoj nových biopaliv [23].

2.4.2.3 *Cystofilobasidium*

Tento kmen se zařazuje do čeledi *Cystofilobasidiaceae* a mezi jeho nejznámější zástupce patří *Cystofilobasidium macerans* nebo *Cystofilobasidium infirmominatum*. Tvoří kulaté nebo protáhlé buňky, a na agarovém nátěru tvoří hladké lesklé kolonie oranžové či růžové barvy, jsou však známe i nepigmentované druhy [17][24].



Obrázek č. 6 *Cystofilobasidium macerans*

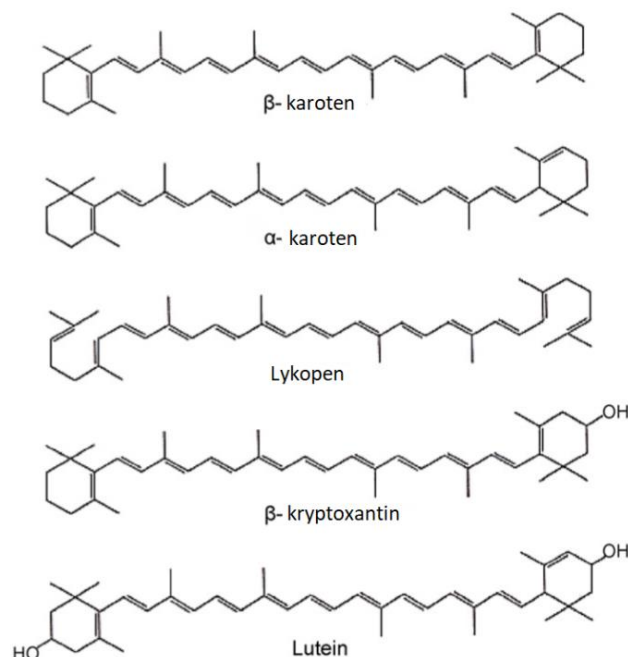
2.4.2.4 *Sporidiobolus*

Kvasinky rodu *Sporidiobolus* tvoří kulovité či elipsoidní buňky, které na agaru tvoří lososově či korálově zbarvené kolonie. Mezi zástupce patří nejznámější *Sporidiobolus salmonicolor* nebo *Sporidiobolus metaroseus*. *Sporidiobolus salmonicolor* tvoří buňky o rozměrech (2-12)x(3-35) μm a povrch nátěru je silně hrbolatý [37].

2.5 Karotenoidy

Karotenoidy jsou velká skupina přírodních žlutých a červených barviv rozpustných v tucích. Nachází se převážně v barevném ovoci a zelenině, ale také ve vaječném žloutku. Díky jejich biologickým vlastnostem jsou využívány jako aditiva v chemii, farmacii, kosmetologii a potravinářství. Všechny karotenoidy patří do skupiny isoprenoidů, přesněji tetraterpenů, což jsou molekuly skládající se z řetězce o 40 uhlíků. Jejich struktura je odvozena modifikacemi základní struktury nebo cyklizací. Karotenoidy tvoří *cis-trans* izomery díky přítomnosti konjugovaných dvojných vazeb v jejich struktuře, častěji se však vyskytují v *trans* konformaci. Dělí se převážně na dvě hlavní skupiny: karoteny a jejich kyslíkaté deriváty xanthofyly, kam se řadí většina karotenoidů. Karotenoidy podléhají strukturním změnám převážně působením oxidace, ale také působením teploty, světelného záření, pH. Pro lidský organismus jsou karotenoidy významné zejména pro jejich silné antioxidační vlastnosti, a tím přispívají prevenci před některými chronickými onemocněními nebo tlumení jejich projevů.

V lidském organismu se vyskytují volné radikály, které pozměňují strukturu důležitých sloučenin. Karotenoidy tak slouží k odchyťování radikálů. Karotenoidy jsou také významnou součástí fotosyntetických systémů vyšších rostlin a fototrofních bakterií [4][25][27][30].



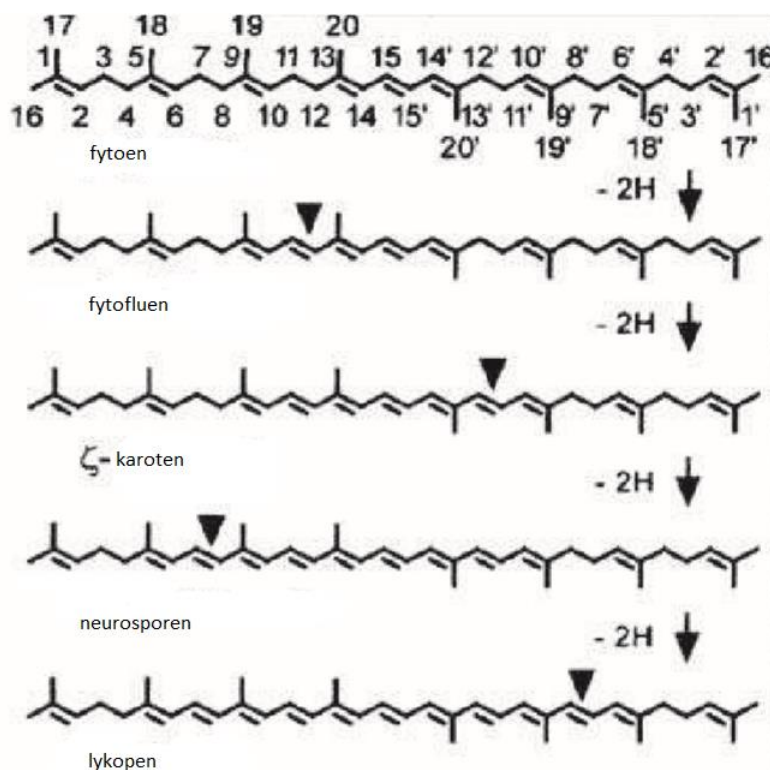
Obrázek č. 7 Struktura vybraných karotenoidů - upraveno [25]

2.5.1 Karoteny

Karoteny jsou molekuly skládající se z řetězce o délce 40 uhlíků. Nejjednodušším karotenem, který tvoří základ pro další karoteny je lykopen, jehož strukturu tvoří alifaticky nenasycený uhlovodíkový řetězec. Z něj se pak derivují další karoteny, jako je α-karoten a asi nejznámější β-karoten, cyklizací na koncích řetězce. Dalším příkladem může být torulen [4][27][30].

2.5.2 Biosyntéza karotenů

Výchozí látkou pro syntézu karotenů je fytoen, což je 40-ti uhlíkatá molekula vznikající kondenzací dvou molekul geranylgeranylfosfátu (GGPP) pomocí enzyme fytoen syntázy. Fytoen postupuje řadu desaturačních a cyklizačních reakcí. Desaturačními reakcemi dochází ke vzniku lykopenu. Dále dochází k cyklizačním reakcím s různými enzymatickými katalýzami, kde podle typů těchto reakcí vzniká β-karoten, torulen a další karoteny [21].



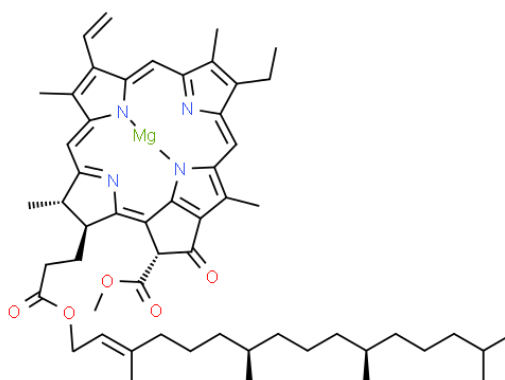
Obrázek č. 8 Biosyntéza karotenů – upraveno [21]

2.5.3 Xanthofyly

Pomocí oxidace vznikají z karotenů deriváty – xanthofyly. Do této skupiny patří například torularhodin nebo nejznámější astaxanthin. Astaxanthin je sloučenina, která má vysokou antioxidační aktivitu, využívá se tak například v potravinových doplncích. Na trhu je dostupný jak přírodní, tak syntetický, ten však na rozdíl od přírodního obsahuje směs chirálních forem [4].

2.6 Chlorofyly

Chlorofyly jsou pigmenty vyskytující se v rostlinách a zelených řasách, které hrají klíčovou roli při fotosyntéze. Organismy schopné fotosyntézy zachycují sluneční záření a vytváří na Zemi podmínky vhodné pro život. Jsou zodpovědné za zelenou barvu rostlin a vyskytují se v tylakoidních membránách chloroplastů vázané na hydrofobní proteiny. Jeví se jako zelené, jelikož pohlcují červené a modré složky světla. Jejich struktura je tvořena substituovanými porfyrinovými kruhy s centrálně vázaným kationtem Mg^{2+} a dlouhým uhlovodíkovým řetězcem – fytolem. V přírodě se vyskytují v několika formách, přičemž u rostlin pozorujeme dvě hlavní formy: chlorofyl A a chlorofyl B v poměru 3:1. Tyto dvě formy se od sebe liší pouze v substituci jedné methylové skupiny za aldehydovou. Tento rozdíl v chemické struktuře způsobuje nažloutlé zbarvení chlorofylu B. Ve všech fotosyntetických organismech se nachází chlorofyl *a*, který absorbuje červené záření o vlnové délce 480 - 670 nm. Chlorofyl B absorbuje modré světelné záření při délkách 480 - 650 nm a vyskytuje se pouze v zelených řasách a vyšších rostlinách. Dále také existují chlorofyly *c*, *d*, *e* a *f*. Vyskytují se v malém množství v přítomnosti chlorofylů A a B například v červených nebo hnědých řasách [4][32][33].



Obrázek č. 9 Struktura chlorofylu A [43]

2.6.1 Biosyntéza chlorofylu

Prvním krokem v syntéze chlorofylu je připojení glutamátu na tRNA za vzniku glutamyl-tRNA. Tento komplex je katalyzován za pomoci glutamyl-tRNA reduktázy na glutamát-1-semialdehyd. Ten je v dalším kroku převeden na 5-aminolevulovou kyselinu. Následnou katalýzou pomocí dedehydratázy dochází ke kondenzaci dvou těchto molekul za tvorby porfobilonogenu. Spojením čtyř podjednotek za přítomnosti katalyzátoru uroporfyrinogensyntázy a kofaktoru vzniká uroporfyrinogen III. Pomocí uroporfyrinogen III dekarboxylázou je převeden na koproporfyrinogen III. Dále dojde k oxidaci propionových postranních řetězců na vinylové skupiny a vzniká protoporfyrin IX. Následně pomocí Mg-chlatazy dojde ke včlenění ionu Mg^{2+} do molekuly a vzniká Mg-porfyrin IX. Pomocí methylesterázy dojde k esterifikaci propionových postranních řetězců a dále dochází k cyklizaci za vzniku divinyl protochlorofylidu. Opět následuje krok odstranění postranních řetězců za vzniku protochlorofylidu a za katalýzy chlorofyl-syntázou vzniká chlorofyl A [20][22].

2.7 Lipidy

Pojem lipidy představuje rozsáhlou škálu organických látek s rozdílným chemickým složením. Jsou to deriváty vyšších alifatických monokarboxylových kyselin. Hlavní a nejvýznamnější lipidy jsou mastné kyseliny, triacylglyceroly, steroly, případně vitamíny a steroidní hormony. Jednou z nejdůležitějších funkcí lipidů je tvorba buněčných membrán, které jsou složeny z dvojvrstvy fosfolipidů. Podle druhu mastné kyseliny, je určena její funkce a místo v membráně. Dále se na lipidy nahlíží z hlediska výživy. Lipidy jsou důležitou součástí našeho příjmu a slouží nám jako rezerva energie. V těle je dále plní ochrannou a izolační funkci, a také se podílí na transportu látek. Lidské tělo není schopno syntetizovat všechny potřebné mastné kyseliny, a proto je musíme přijmout v potravě. Ačkoliv jsou nezbytné, často jsou v potravě nadměru zastoupeny (převážně živočišné tuky) nebo jsou zastoupeny ve špatném poměru. Nadměrný příjem lipidů se podílí na mnoha onemocněních např. obezita, cévní problémy a rakovina [3][13][18].

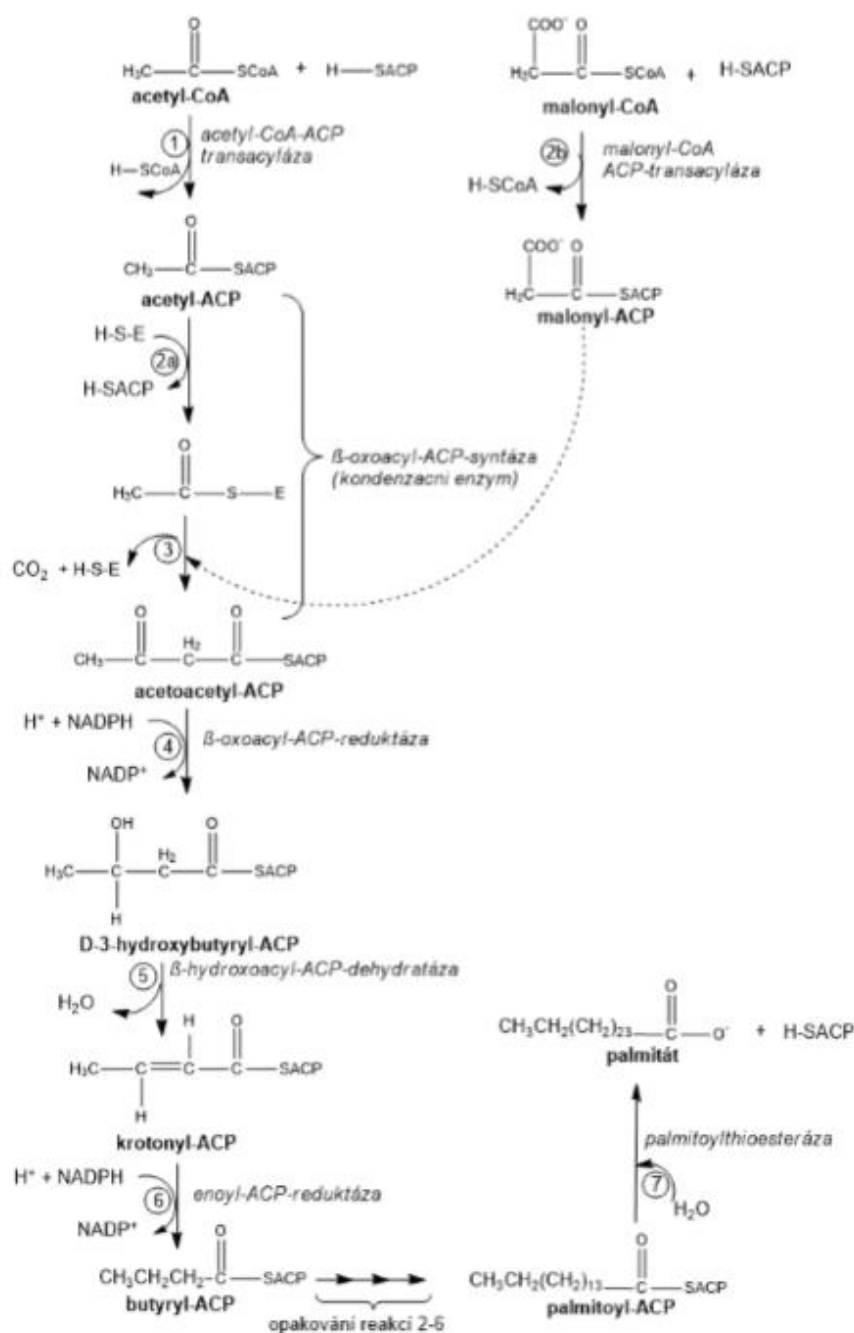
Mikroorganismy profukují velkou škálu lipidů, jejichž produkce se dá značně ovlivnit podmínkami kultivace. Lipidy produkované mikroorganismy většinou obsahují nenasycené mastné kyseliny s násobnými dvojnými vazbami, tzv. polynenasycené mastné kyseliny (PUFA). Hlavním zdrojem těchto PUFA jsou ryby a rybí olej (pocházejí z planktonu, kterým se ryby krmí). Ideální produkce PUFA a neutrálních lipidů pochází z deficitu živin zejména pak zdrojů fosforu dusíku a křemíku. Změny vyvolané nedostatkem živin se liší jak podle druhu mikroorganismu, tak podle nepřítomné živiny [6][7].

2.7.1 Mastné a vyšší mastné kyseliny

Nejjednodušší lipidy se řadí mezi monokarboxylové kyseliny, které se skládají z řetězce o délce 4 – 26 uhlíků. Vyskytují se buď volně, nebo jsou esterově vázány na další látky. Takto vázané mastné kyseliny pak tvoří triacylglyceroly nebo fosfolipidy. Mastné kyseliny se vyskytují jak nenasycené, tak nasycené. Ty se podle počtu násobných vazeb dělí na mononenasycené (MUFA) nebo polynenasycené (PUFA). Polynenasycené mastné kyseliny jsou obecně známy jako ω MK. Označení ω udává číslo uhlíku, na kterém se nachází násobná vazba, číslujeme však z opačného konce, než se nachází karboxylová kyselina. Nejčastěji se udávají ω -3 nebo ω -6 MK, méně známé jsou pak také ω -9 MK. PUFA jsou důležité pro správné fungování našeho těla, záleží však na poměru, ve kterém jsou přijímány. V těle však mohou mít i protichůdné účinky, a tak je třeba dbát na jejich správný poměr ve stravě [3][13][18].

2.7.2 Biosyntéza mastných kyselin

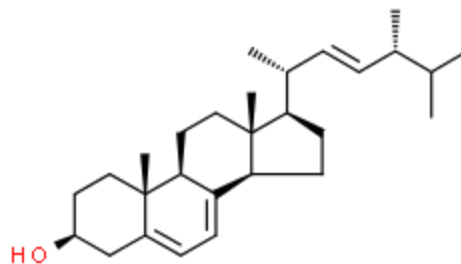
V procesu biosyntézy dochází ke koncentraci jednotek C_2 , což je obrácený proces β -oxidace. Oba procesy však využívají jiných enzymů a uskutečňují se na jiných místech. V první řadě je nutná reakce, kde je acetyl-CoA pomocí karboxylázy přeměněn na malonyl-CoA, ten je dále převeden na malonyl-ACP. Tento krok je nevratný a je jeden z kroků určujících rychlost biosyntézy. Jako výchozí látka biosyntézy je acetyl-CoA, který je pomocí acetyl-CoA transacetylázy převeden na acetyl-ACP. V dalším kroku reakce dojde k dekarboxylaci malonyl-ACP a enzymu β -oxyl-ACP-syntáza katalyzuje vznik β -oxoacyl-ACP. V následujícím kroku probíhá redukce pomocí koenzymu NADPH za vzniku D-3-hydroxybutyryl-ACP. Tento krok následuje dehydratace a dochází ke vzniku enoyl-ACP. Opět dochází k redukci za vzniku butyryl-ACP. Tento proces se několikrát opakuje a dochází k navázání dalších C_2 jednotek. Pokud tento cyklus proběhne sedmkrát, dochází ke vzniku palmitoyl-ACP, který je katalyzován palmitoyl-esterázou na palmitát. Při syntéze delších mastných kyselin pak následují další enzymatické reakce [3][18].



Obrázek č. 10 Biosyntéza mastných kyselin [45]

2.8 Ergosterol

Ergosterol se řadí do skupiny organických látek sterolů, jejichž zástupci jsou také cholesterol nebo steroidní hormony. Tyto molekuly jsou kyslíkaté deriváty základní sloučeniny steranu. Nahází se v buněčných membránách hub a kvasinek a je zodpovědný za fluiditu membrány podobně jako živočišný cholesterol. Je to sloučenina esenciální pro růst mikroorganismů, ale také pro adaptaci na stresové podmínky prostředí, ve kterém se tyto mikroorganismy vyskytují. Ergosterol je také provitaminem vitamínu D₂ (ergokarciferol). Ten vzniká při několikakrokové transformaci ergosterolu jako reakce vystavení ultrafialovému záření. Z tohoto důvodu se využívá ve farmacii a potravinářském průmyslu [17][34].



Obrázek č. 11 Ergosterol [43]

2.9 Ubichinon – koenzym Q10

Koenzym Q₁₀ patří do skupiny látek, jejichž základní strukturu tvoří chinonové jádro. Ubichinony se dělí podle délky postranního řetězce izoprenových jednotek. Je to provitamin vyskytující se v mitochondriích rostlinných a živočišných buněk. V mitochondriích se podílí na elektronovém transportu při buněčném dýchání, jehož nejdůležitějším produktem je energie. Vyskytuje se ve všech buňkách organismu, díky čemuž získal své jméno (ubi – všudypřítomný) a je esenciální pro život. Je schopen přijímat a transportovat elektrony a radikály a je tak velmi důležitým antioxidantem převážně v mitochondriích. Při stárnutí dochází k úbytku koenzymu Q, dochází k zvýšení výskytu volných radikálů v těle, které pak narušují struktury v buňce. Koenzym Q je syntetizován v těle podobným způsobem jako cholesterol a využívá i některé stejné enzymy. Při užívání léků na snížení hladiny cholesterolu tak mohou snížit i hladinu koenzymu Q [34].

2.10 Odpadní substráty

V posledních letech průmyslová výroba stoupá a s ní stoupá také produkce odpadních substrátů. Je tedy důležité využívat tyto produkty co nejvíce, a tak například snížit náklady na výrobu, či produkci určitých látek. Odpadní produkty, obsahující například sacharidy, je tedy možné využít jako alternativní zdroje uhlíku při mikroorganismů [26].

2.10.1 Glycerol

Glycerol, 1,2,3-propantriol, je hygroskopická bezbarvá viskózní kapalina bez zápachu, sladké chuti. Jako metabolit je v nízkých koncentracích produkován všemi buňkami lidského těla. Díky svému polárnímu charakteru je mísitelný s vodou a jednoduchými alkoholy. Hlavním zdrojem glycerolu jsou přírodní tuky, neboť je součástí triacylglycerolů. Glycerol jako odpadní produkt je možné využít v širokém rozmezí průmyslových odvětví [28].

2.10.2 Syrovátka

Syrovátka je nažloutlá tekutina, která vzniká při vysrážení kaseinu z mléka, a tvoří velký podíl odpadních substrátů z průmyslových výrob. Nejvýhodnější zpracování je v dnešní době zpracování syrovátky a její další využití v potravinách a farmaceutických produktech [26].

2.10.3 Melasa

Melasa tvoří odpadní produkt při výrobě cukru z cukrové řepy a třtiny. Je to tmavě hnědá, hustá lepkavá hmota, která obsahuje asi 50 % zbylých cukrů (glukóza, fruktóza, sacharóza). V současnosti se využívá například pro výrobu alkoholů, či kyseliny citrónové [31].

2.11 Stresové faktory

Mikroorganismy vystavujeme stresovým podmínkám, abychom zvýšili produkci látek. Mikroorganismy na stresové podmínky reagují nadměrnou produkcí určité látky. Aplikací určitých stresů zjišťujeme množství a portfolio jejich metabolitů, a upravujeme je podle potřeby. Použité stresové faktory mohou být fyzikální, jako je teplota nebo intenzita světelného záření. Dále také můžeme produkci ovlivnit přidávkou solí. S vyšší koncentrací rozpuštěných solí stoupá osmotický tlak. Buňky se snaží vnějšímu prostředí přizpůsobit a může tak docházet ke zvýšené produkci metabolitů. Chemickými stresovými faktory jsou pak koncentrace CO_2 , solí, pH nebo využití různých zdrojů živin, či odpadních produktů. Limitace určitých živin má také za následek nadprodukcí metabolitů [9][15].

2.11.1 Intenzita a zdroj osvětlení

Působení světla na buňky se na první pohled zdá neškodné, viditelné světlo má na metabolismus kvasinek dopad. Světlo může modifikovat buněčný chod a metabolismus skrze fotosenzitivní dráhy [19].

Různé zdroje a intenzity osvětlení mají vliv také na metabolismus mikrořas. V rámci adaptace na vyšší intenzity záření má za následek vyšší produkci určitých mastných kyselin. Řasy kultivované na stejném médiu ale jiných světelných zdrojích o stejné intenzitě vykazují nárůst produkce lipidů [9][14].

2.11.2 Zdroj dusíku

Působením stresových faktorů také může dojít k produkci různých poměrů a druhů MK, jako jsou např.: kyselina myristová, palmitová, olejová, dokosatrienová a další. Nedostatek dusíku je nejefektivnější a nejprozkoumanější stresový faktor. Dostupnost dusíkatých živin ovlivňuje obsah MK. V systémech s dostatkem dusíkatých látek ($>4,7$ mM) byl naměřen nejnížší obsah MK. Hlavní produkované MK jsou pak kyseliny myristová, olejová a dokosaenová. Se snižováním dusíkatých látek v médiích dochází k nárůstu produkce MK. Použitý zdroj dusíku také hraje roli při růstu a produkci látek. Je důležité se zaměřit na to, jak mikroorganismy dusík využívají, a jestli nedochází k následné produkci látek, které by negativně ovlivňovaly růst a produkci metabolitů [10][12][14].

2.12 Stanovování metabolitů

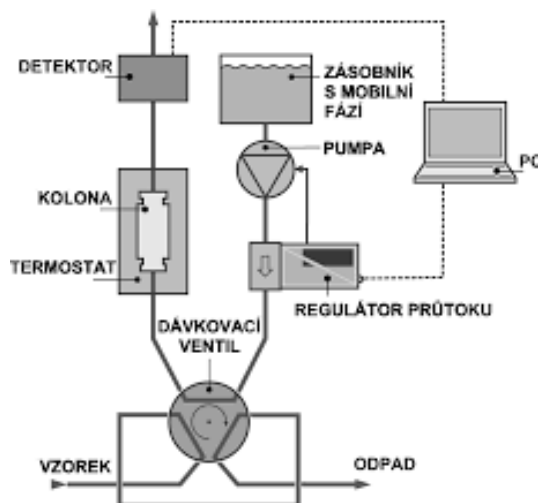
Jedna z nejvýznamnějších analytických separačních metod je chromatografie. Tuto metodu je možné využít k analýze jak makromolekulárních látek, tak k ultrastopovému stanovení iontů. Chromatografie je separační proces, založený na rozdělování mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Jedná se o fázi pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární). Analyt se rozděluje v závislosti na afinitě k jednotlivým fázím. Může nastat případ, kdy má sloučenina vysokou afinitu k mobilní fázi a je unášena chromatografickým systémem rychlostí toku mobilní fáze. Tato látka opouští systém v tzv. mrtvém čase. Doba od nástřiku analytu po detekci se označuje jako retenční čas, který částečně udává, o jakou látku se jedná. Strukturně podobné látky však mohou mít podobné retenční časy, a proto je nutné je analyzovat i podle jiných parametrů [16].

2.12.1 Princip HPLC

Chromatografie je založena na distribuci složek mezi stacionární a mobilní fází. Mobilní fáze obsahující vzorek prochází stacionární fází podél kolony. Pomocí čerpadla je dále vháněna do kolony, kde se separovaná látka absorbuje na stacionární fázi. Podle doby od nástřiku vzorku zachycení látky (retenční čas) se určuje, co za látku se separovalo. Separovaná látka je zaznamenána detektorem. Na průběhu separace se také podílí povaha stacionární a mobilní fáze. Pro optimální separaci je nutné upravit mobilní fázi.

Hnací sílu mobilní fázi poskytují membránová nebo pístová čerpadla. Je důležité klást velký důraz na správný výběr čerpadla. Musí se vhodně volit materiál, hlavně však musí zajišťovat konstantní průtok mobilní fáze. Jakékoliv kolísání průtoku negativně ovlivňuje analýzu. Další částí systému je samotné dávkování analytu, které se může provádět pomocí přímého nástřiku, což je metoda jednoduchá, avšak málo efektivní. Výhodnější je k dávkování vzorku použít dávkovací smyčku. Vzorek se do kolony vytlačuje rychlým pootočením ventilu a proudem mobilní fáze z čerpadel. Dalším způsobem dávkování je použití autosampleru. Ten má oproti ostatním způsobům dávkování výhodu v tom, že při analýze není třeba neustálé obsluhy přístroje.

Samotný vzorek dále vstupuje do kolony, kde probíhá samotná separace. Při vysokoúčinné kapalinové chromatografii se využívají pouze náplňové kolony o různých parametrech a náplních. Pro ochranu kolony před znečištěním a škodlivými materiály se může do systému zařadit předkolona. Pro eliminaci znečištění je také nutné zajistit, aby vzorek neobsahoval velké nebo nerozpustné částice, je tedy nutné před analýzou vzorek přefiltrovat. Při separaci je kolona temperována na vhodnou teplotu pomocí termostatu. V poslední části systému se nachází detektor. Využít můžeme například fluorescenčních, fotometrických, voltametrických, refraktometrických, hmotnostních či PDA detektorů [16].

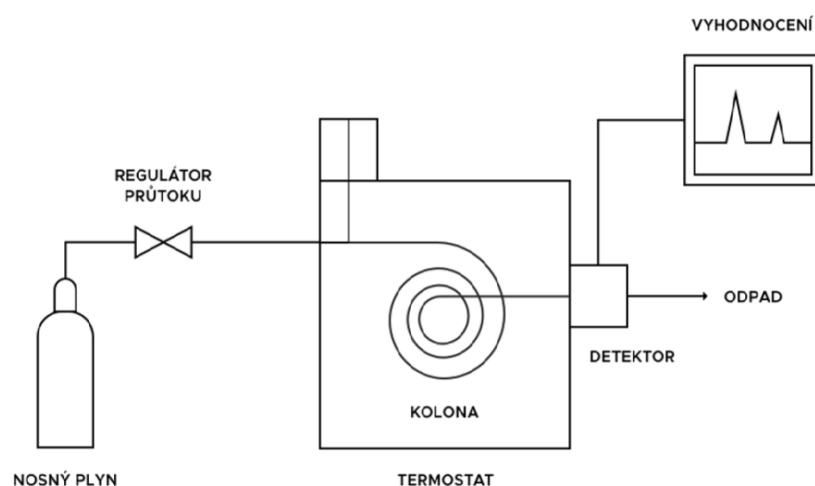


Obrázek č. 12 Schéma HPLC

2.12.2 Princip plynové chromatografie

V plynové chromatografii dochází stejně jako ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii k separaci látek v závislosti na afinitě k mobilní nebo stacionární fázi. V případě plynové chromatografie je však mobilní fáze zpravidla inertní plyn. Plyn s analytem však neinteraguje, pouze jej unáší chromatografickým systémem. Mobilní fází v tomto případě může být vodík, dusík, helium nebo argon. Volíme ji na základě různých parametrů, jako jsou například fyzikální vlastnosti plynu, jejich bezpečnost ale nejčastěji podle typu detektoru.

Jelikož je mobilní fáze v plynném stavu, je nutné zajistit, aby byl vzorek těkavý a dostatečně koncentrovaný. Teplota také může ovlivnit výsledky měření. Podle skupenství analytu se pak vzorek dávkuje buď pomocí dávkovacích ventilů v případě plynného vzorku, nebo pomocí dávkovacích stříkaček v případě kapalného vzorku. Kolony používané v plynové chromatografii jsou nejčastěji kapilární, a tím je omezen objem vstříknutého vzorku. Další součástí chromatografického systému je detektor. Detektory používané v plynové chromatografii mohou být stejné jako v kapalinové, například hmotnostní spektrometr, většinou se však liší. Nejčastěji se používají ionizační detektory, jako jsou například plamenově ionizační detektor, detektor elektronového záchytu či fotoionizační detektor [42].



Obrázek č. 13 Schéma plynové chromatografie

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je studium produkčních vlastností vybraných mikroorganismů ve stresových podmínkách. V rámci této práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- Přehledná literární rešerše zaměřená na vybrané kmeny červených kvasinek a mikrořas
- Kultivace vybraných kmenů za stresových podmínek
- Optimalizace složení produkčních médií pro vybrané kmeny mikroorganismů
- Příprava a izolace různých extraktů z buněčné biomasy a jejich charakterizace
- Srovnání produkčních vlastností vybraných kmenů
- Vyhodnocení výsledků

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie pro kultivaci mikrořas a sinic

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 p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Hydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Chlorid sodný p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Na₂-EDTA·2O p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Hydroxid draselný p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Síran železnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Chlorid manganatý tetrahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Oxid molybdenový p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
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)
Močovina p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)

4.1.2 Chemikálie pro kultivaci kvasinek

Kvasničný autolýzát, Himedia (Indie)
Pepton z kaseinu, Roth (SRN)
Agar-Agar, Roth (SRN)
D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Síran amonný p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Glycerol p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Melasa třtinová, Natural, Jihlava
Syrovátka, Agrikol S.r.o. (ČR)

4.1.3 Chemikálie pro extrakce

Aceton p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Methanol pro HPLC, Penta (ČR)
Chloroform p.a., Penta (ČR)
Kyselina sírová 96 % p.a., Penta (ČR)
Acetonitril pro HPLC, Penta (ČR)
Ethylacetát pro HPLC, Penta (ČR)

4.2 Použité přístroje a pomůcky

Spektrofotometr VIS, Helios δ, Unicam (GB)
Box Aura ini iBopTech (ČR)
Třepačka Yellow line, (SRN)
Třepaný incubator, ZWYR-D2401 – Labwit, BioTech (ČR)
Centrifuga BioTech, (ČR)
Analytické váhy Boeco (CRN)
Kultivátor Multi-Cultivator MC 1000-OD PSI Drásov (ČR)

- Stojan pro 8 zkumavek o objemu 80 ml

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

Lyofilizátor Labconco FreeZone 4.5 Freeze Dryer (USA)

Termoblok VWR, (ČR)

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

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

- Termostat – LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)
- Detektor PDA – PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR
- Pumpa – MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR
- Vyhodnocovací systém Xcalibur
- Kolona Kinetex Core Shell C18-EVO, 150 mm délka, 5,0 µm částice, Phenomenex
- Držák předkolony – KJ0 – 4282, ECOM (ČR)
- Předkolona – C18-EVO, AJ0 – 8368, Phenomenex
- Filtry pro HPLC, PRE-CUT, Alltech (GB)
- Systém MicroTime 200, Picoquant GmbH, objektiv s vodní imerzí Olympus UPLSAPO 60XW

Thermo Scientific TRACE™ 1300 Gas Chromatograph, (Thermo Fischer Scientific, USA)

- Detektor FID, (thermo Fischer Scientific, USA)
- Thermo Scientific AI 1310 Autosampler
- Kolona Zebron ZB-FAME, 30m x 0,25 mm x 0,20 µm, Phenomenex

4.3 Použité kmeny mikroorganismů

4.3.1 Použité kmeny mikrořas

Chlorella sorokiniana CCALA 260

Chlorella vulgaris CCALA 924

Chlamydomonas reinhardtii CCALA 928

Coccomyxa sp. CCALA 912

Desmodesmus quadricauda CCALA 463

Desmodesmus obliquus CCALA 455

Scenedesmus dimorphus CCALA 443

Scenedesmus acutus CCALA 439

4.3.2 Použité kmeny sinic

Synechococcus nidulans CCALA 188

4.3.3 Použité kmeny kvasinek

Rhodotorula kratochvilovae CCY 20-2-26

Cystofilobasidium macerans CCY 10-1-2

Cystofilobasidium infirmominiatum CCY 17-18-4

Rhodotorula mucilaginosa CCY 19-4-6 (24)

Rhodotorula mucilaginosa CCY 20-9-7 (28)

Sporidiobolus salmonicolor CCY 19-4-25

Sporidiobolus salmonicolor CCY 19-6-20

Rhodospiridium toruloides CCY 062-002-004

4.4 Kultivace mikroorganismů

4.4.1 Kultivace mikrořas a sinic

Mikrořasy a sinice byly zaočkovány ze zásobních kultur do BBM média o složení viz. tabulky (Tabulka č. 1 a Tabulka č. 2). Po dostatečném nárůstu biomasy byly mikrořasy a sinice zaočkovány do produkčních BBM médií na přibližnou absorbanci $A=0,07$. Pro měření absorbance byly kultury měřeny pomocí UV-VIS spektrofotometru při vlnové délce 680 nm. Mikrořasy a sinice byly kultivovány v provzdušňovacích lahvích za neustálého osvětlení a přístupu vzduchu s 15 % koncentrací CO_2 po dobu 10 dní. Pro stanovení růstové křivky byly průběžně odebrány vzorky a měřena absorbance narostlé biomasy.

Tabulka č. 1 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. 2 Složení částí 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 ·4H ₂ O	1,44
	MoO ₃	0,71
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,49

4.4.1.1 Aplikace stresů

Pro další kultivace byl využit multikultivátor, který se skládá z osmi oddělených komor pro kultivační zkumavky s přístupem k vzdušnění. Díky tomu jsme schopni provádět paralelně kultivace mikrořas a sinic pro 8 různých stresových parametrů. Multikultivátory dále poskytují LED osvětlení, které je možné nastavit pro každou kultivační zkumavku zvlášť. Stresové podmínky v tomto experimentu byly různé zdroje a koncentrace dusíku jejichž koncentrace jsou uvedeny v tabulce (Tabulka č. 3). Teplota a osvětlení byly po celou dobu konstantní. Další kultivace již probíhaly v Erlenmayerových baňkách, které byly neustále protřepávány. Dalšími stresovými faktory byly různé koncentrace fosforu nebo přidavek různých koncentrací chloridu železitého.

Tabulka č. 3 Procentuální koncentrace zdrojů dusíku

Složka	Procentuální zastoupení dusíku			
	60 %	80 %	100 %	150 %
NaNO ₃ (10g/100ml)	120 µl	160 µl	200 µl	300 µl
močovina (10g/100ml)	42 µl	56 µl	70 µl	105 µl



Obrázek č. 14 Multikultivátor

4.4.2 Kultivace Kvasinek

Kmeny kvasinek byly kultivovány v tekutých živných médiích za aplikace stresových podmínek. Pro kultivaci kvasinek na různých zdrojích uhlíku byly využity provzdušňovací lahve o objemu 1 l a kultivace probíhala za konstantního osvětlení. Následující kultivace již probíhaly v Erlenmayerových baňkách za neustálého protřepávání. Dalšími zvolenými stresovými faktory byly přidavek různých koncentrací NaCl při osvětlení, tak v jeho absenci. Všechny kmeny kvasinek byly také kultivovány na různých koncentracích chloridu železitého.

4.4.2.1 Inokulum 1 a 2

Prvním krokem při kultivaci kvasinek je zaočkování požadované kultury ze zásobní kryozkumavky na Petriho misku s YPD agarem. Složení YPD agaru je uvedeno níže v tabulce (Tabulka č. 4). Inokulum 1 a 2 je stejného složení bez přídavku zpevňujícího agaru. Zaočkována Petriho miska je zalepena parafilmem a ponechána tři dny na kultivaci. Po uplynutí této doby se v boxu zaočkuje připravené inokulum 1 pomocí kliček. Jedna klička odpovídá asi 10 ml inokula 1. Zaočkované inokulum se ponechá 24 hodin na třepačce. Do inokula 2 následně očkujeme v poměru objemů 1:5. Inokulum 2 kultivujeme stejným způsobem jako inokulum jedna.

Tabulka č. 4 Tab. 1 – Složení YPD média a inokula I a II

Složka	Koncentrace (g/l)
Agar-agar	20
Kvasničný autolyzát	10
Pepton	20
Glukóza	20

4.4.2.2 Produkční médium a aplikace stresů

Pro všechna produkční media byl použit stejný základ viz. tabulka (Tabulka č. 5). Toto medium bylo následně doplněno chemikáliemi podle vybraného stresu. Nejprve byly jako stresové podmínky zvoleny různé koncentrace chloridu sodného při normálním osvětlení a při absenci světla. Tyto koncentrace jsou popsány v tabulce (Tabulka č. 6). Dalšími stresovými podmínkami byly zvoleny různé zdroje uhlíku. Glukóza v produkčních médiích byla nahrazena glycerolem, melasou, syrovátkou, glycerolem se syrovátkovým proteinem a melasou se syrovátkovým proteinem, jejichž koncentrace jsou uvedeny v tabulce (Tabulka č. 7). Kultivace probíhala buď za použití provzdušňovacích lahví, nebo baněk a trvala 96 hodin.

Tabulka č. 5 Složení glukózového média

Složka	Koncentrace (g/l)
KH_2PO_4	4,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,7
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,0
Glukóza	30,0

Tabulka č. 6 Koncentrace NaCl v produkčních médiích

Složka	Koncentrace (mol/l)
NaCl	0,00
	0,50
	1,00
	1,50
	2,00

Tabulka č. 7 Koncentrace alternativních zdrojů uhlíku

Složka	Koncentrace (g/l)
Glycerol	30
Melasa	51
	Koncentrace (ml/l)
Syrovátka	83
Syrovátkový protein	50



Obrázek č. 15 *Kultivace kvasinek za použití stresů*

4.5 Stanovení látek

4.5.1 Stanovení biomasy

Po uplynutí doby kultivace daného mikroorganismu byla odebrána celá biomasa, která byla následně zcentrifugována po dobu 4 minut při 9000 rpm. Následně byl supernatant odlit a v případě potřeby byla biomasa promyta destilovanou vodou a opět zcentrifugována. Opět byl odlit supernatant a biomasa byla v předem zvážených zkumavkách zmrazena. Dále byly zmražená biomasa lyofylizována po dobu 24-48 hodin. Po lyofylizaci byly zkumavky s vysušenou biomasou zváženy a byla stanovena celková hmotnost biomasy. Vzorky byly uchovávány v mrazicím boxu a dále zpracovávány pro analýzy.

4.5.2 Příprava vzorků pro analýzu pomocí HPLC

4.5.2.1 Příprava vzorků mikrořas

Pro přípravu vzorků mikrořas na HPLC analýzu bylo do Eppendorf zkumavek naváženo 20-35 mg lyofylizované biomasy. K biomase bylo přidáno 1000 μ l destilované vody a zkumavky byly uloženy na 1 hodinu do mrazicího boxu. Působením vzniku ledových krystalů došlo k porušení buněk, díky čemuž byly lépe extrahovány produkované metabolity mikroorganismu. Přebytná voda byla zcentrifugována a odlita. Dále byl do zkumavky přidán 1 ml acetonu a skleněné kuličky přibližně odpovídající množství biomasy. Zkumavky byly umístěny do vortexu a protřepávány do úplného rozmělnění biomasy. Obsah zkumavky byl převeden do centrifugační zkumavky a byly přidány další 3 ml acetonu. Z tohoto extraktu byly odebrány 2 ml, které byly odpařeny v termobloku a následně rozpuštěny ve 2 ml směsi 2:1 Acetonitril:Ethylacetát. Rozpuštěný extrakt byl přefiltrován přes filtr o velikosti pórů 45 μ m do vialky a uložen do mrazicího boxu pro analýzu na HPLC. Parametry HPLC sestavy jsou uvedeny v tabulce (0).

4.5.2.2 Příprava vzorků kvasinek

Kvůli nedostatečné extrakci karotenoidů pomocí acetonu byla pro kvasinky vybrána extrakce podle Folche. Pro analýzu bylo do Eppendorf zkumavek naváženo 10-35 mg lyofylizované biomasy, která byla následně po dobu 30 minut hydratována v 1 ml destilované vody. Po odstředění vody se k hydratované biomase přidal 1 ml methanolu a skleněné kuličky. Vzorky byla protřepány na vortexu po dobu 10 minut do rozmělnění biomasy, která byla následně přidána do zkumavky obsahující 2 ml chloroformu. Zkumavka byla opět umístěna do vortexu kde došlo k intenzivnímu míchání obou fází. Následně byl přidán 1 ml destilované vody a po pár vteřinovém protřepání se zkumavky umístily do centrifugy na dobu 1 minuty při 2000 ot/min. Po centrifugaci byla spodní fáze převedena do zkumavky a odpařena v termobloku. Po odpaření byl obsah zkumavky rozpuštěn v 1 ml směsi 2:1 Acetonitril:Ethylacetát a rozpuštěný extrakt byl převeden do vialky přes filtr o velikosti pórů 45 μ m. Vzorky byly uchovány v mrazicím boxu. Parametry HPLC sestavy jsou uvedeny v tabulce (0).

Tabulka č. 8 Gradientový program a složení mobilních fází pro HPLC analýzu karotenoidů

Kolona		Nepolární C18
Detektor		PDA
Složení MF	MF A: ACN:TrisHCl:MeOH	MF B: MeOH:EtAc
	84:14:02	60:40:00
Čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0	100	0
13	0	100
19	0	100
20	100	0
24	100	0

4.5.3 Příprava vzorků pro analýzu pomocí GC

Do kryptoplovací vialky bylo odváženo přibližně 10 mg biomasy a přidáno 1,8 ml transesterifikační směsi. Vialky byly zakryptovány a inkubovány v termobloku při 85 °C po dobu 2 hodin. Po vychladnutí byly vialky odkryptovány a převedeny do vialek o objemu 4 ml. Dále bylo přidáno 0,5 ml (0,5 mol/l) NaOH a 1 ml hexanu HPLC kvality. Vialky byly uzavřeny a vloženy do vortexu po dobu několika minut. Z organické fáze bylo následně odebráno 0,1 ml vzorku do čisté vialky a vzorek byl doplněn 0,9 ml hexanu na objem 1 ml. Vialky byly uloženy do mrazícího boxu pro analýzu na GC. Parametry GC sestavy jsou uvedeny v tabulce (Tabulka č. 9).

Tabulka č. 9 Parametry GC/FID

Kapilární kolona	Zebtron ZB-FAME, o rozměrech 30 m x 0,25 mm x 0,20 μm
Dávkování	Autosampler Thermo Scientific AI 1310
Objem nástřiku vzorku	1 μl
Poměr nástřiku děliče toku	10
Konstantní průtok nosného plynu H ₂	1 ml/min
Detektor	Plynově ionizační
Teplota	250 °C
Průtok	Vzduch 350 ml/min, make-up N ₂ 30 ml/min, H ₂ 35 ml/min

4.5.3.1 Trasesterifikační směs

Tato směs se připravuje pro transesterifikaci látek k tomu, aby byly vhodnější pro analýzu pomocí GC. Směs tvoří 15 % (v/v) H₂SO₄ v methanolu HPLC kvality a 0,5 mg/ml interního standardu C17 v ní rozpuštěného.

5 VÝSLEDKOVÁ ČÁST

5.1 Kvasinky

Pro tyto experimenty byly zvoleny kmeny kvasinek *Rhodotorula kratochvilovae*, *Rhodotorula mucilaginosa* (24) a *Rhodotorula mucilaginosa* (28), *Rhodospiridium toruloides*, *Cystofilobasidium macerans*, *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Sporidiobolus salmonicolor* a *Sporidiobolus metaroseus*. Při kultivaci byly pro určité kmeny zvoleny alternativní zdroje uhlíku. Dalšími stresovými faktory byly koncentrace chloridu sodného v přítomnosti a absenci světla a koncentrace chloridu železitého.

5.1.1 Kultivace za použití alternativních zdrojů uhlíku

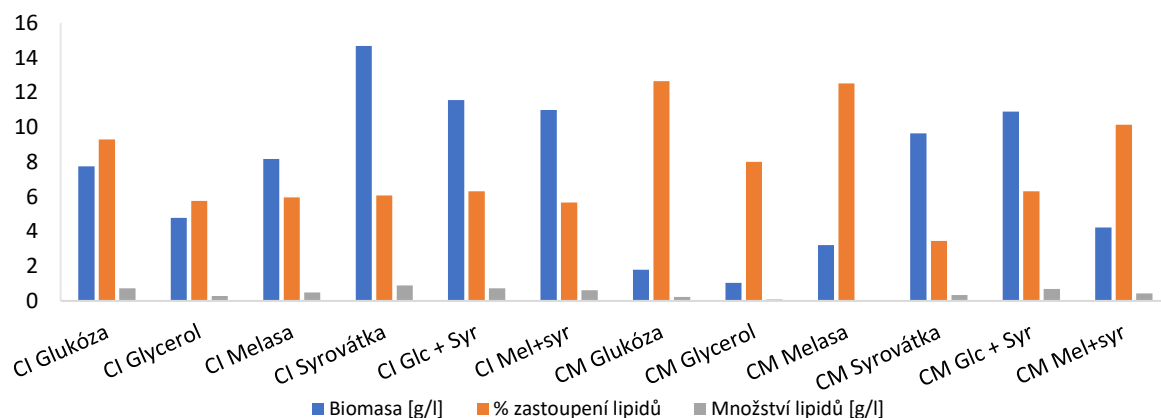
V tomto experimentu bylo za cíl porovnání zisku biomasy a produkovaných metabolitů při kultivaci na glukóze (kontrolní médium), glycerolu, melase, syrovátce a při kombinaci syrovátky a glycerolu a syrovátky a melasy.

5.1.1.1 Kmen *Cystofilobasidium infirmominiatum* a *Cystofilobasidium macerans*

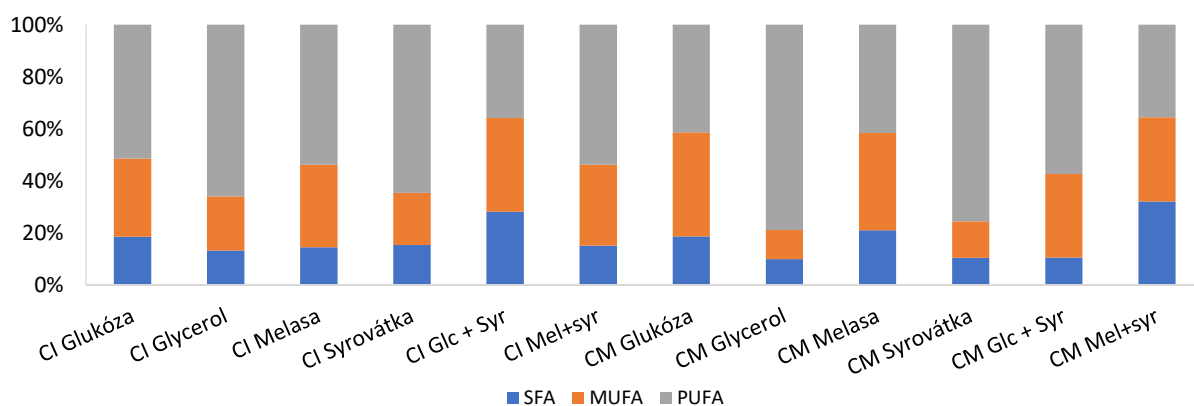
V tomto experimentu byly na první pohled větší výtěžky biomasy při použití jednoho ze syrovátkových zdrojů uhlíku, naopak nejnížší nárůst byl pozorován při použití glycerolového media. U kmene *C. infirmominiatum* můžeme pozorovat značné nárůsty biomasy ve všech syrovátkových médiích, v čisté syrovátce nejvyšší 14,7 g/l. Pokud se však zaměříme na procentuální zastoupení lipidů, můžeme si všimnout, že se ve všech typech médií pohybuje kolem stejné hodnoty, s výjimkou glukózy. Většinu lipidového podílu pak tvoří PUFA mastné kyseliny, pouze u syrovátky v kombinaci s melasou tvoří všechny druhy mastných kyselin přibližně třetinovou část.

Celkové karotenoidy dosahovaly nejvyšších koncentrací na glukóze (3,11 mg/g) a melase v kombinaci se syrovátkou (3,45 mg/g), kde můžeme zaznamenat také nejvyšší produkci ergosterolu. Ostatní syrovátková média nepřispěla zvýšené produkci karotenoidů naopak ji snižovala. V závislosti na médiu také dosahovaly metabolity svých maximálních hodnot na různých médiích. Tento kmen má v porovnání s kmenem *C. macerans* obecně nižší produkci karotenoidů. Maximální hodnoty pro torulen a koenzym Q však bylo dosaženo na glukózovém médiu.

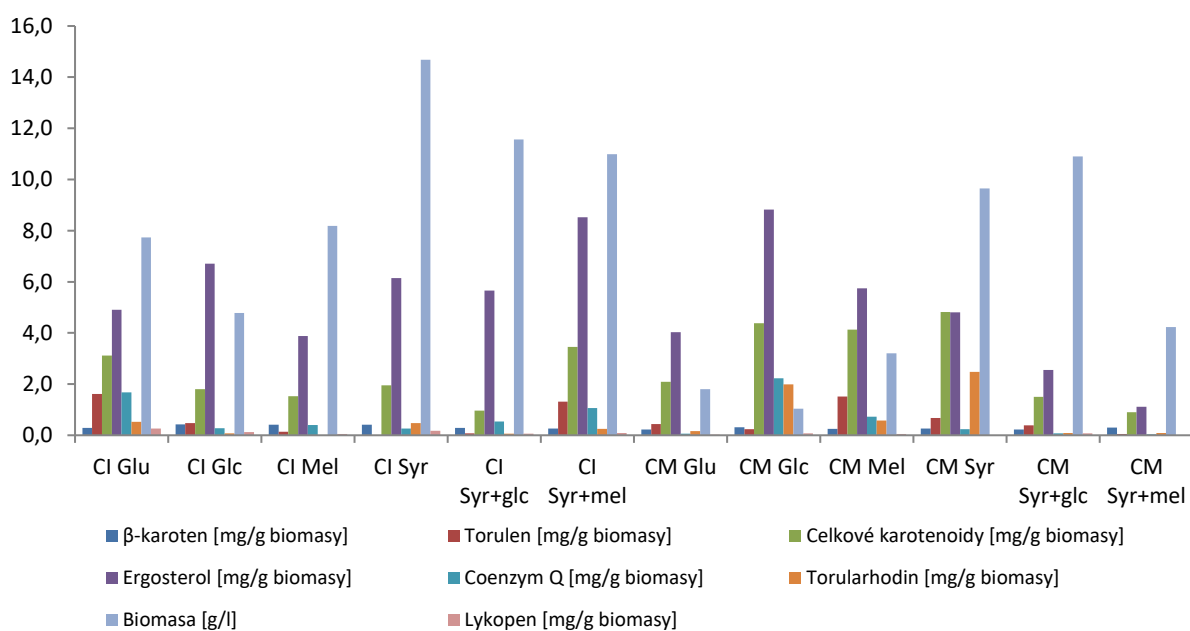
Pro kmen *C. macerans* byl největší nárůst biomasy na médiu syrovátka v kombinaci a glycerolem 10,9 g/l. Na rozdíl od kmene *C. infirmominiatum* bylo procentuální zastoupení lipidů nejvyšší na glukózovém a melasovém médiu. Také zastoupení mastných kyselin mezi médii poměrově lišilo mnohem více. Největší zastoupení měly PUFA mastné kyseliny, které při kultivaci na glycerolu a syrovátce tvořily více než dvě třetiny všech MK. Z obrázku (Obrázek č. 17) lze vyčíst, že nejvyšší koncentrace karotenoidů pozorujeme na syrovátkovém médiu (4,82 mg/g). Na dalších syrovátkových médiích byla produkce značně nižší. Na glycerolovém médiu také pozorujeme vyšší hodnoty koenzymu Q.



Obrázek č. 16 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na zdroji uhlíku v produkčním médiu u kmenů *Cystofilobasidium infirmominium* a *Cystofilobasidium macerans*



Obrázek č. 17 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech



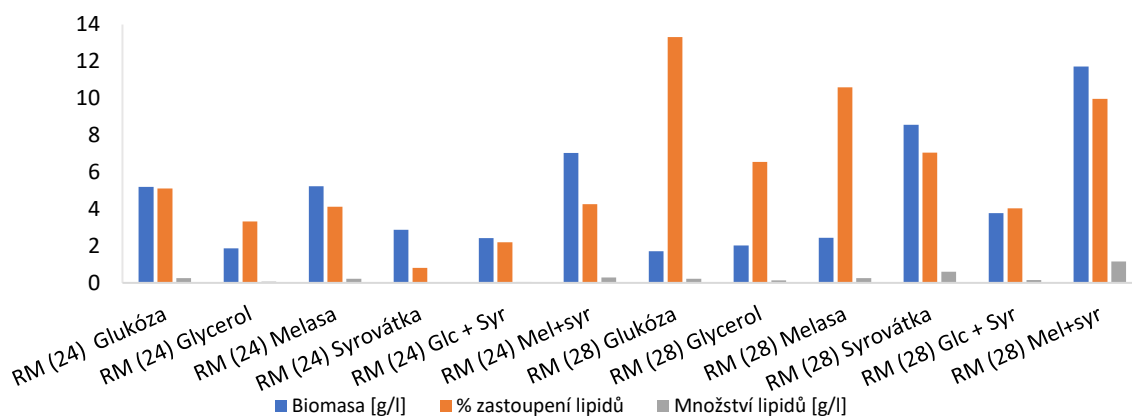
Obrázek č. 18 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na zdroji uhlíku v produkčním médiu u kmenů *Cystofilobasidium infirmominium* a *Cystofilobasidium macerans*

5.1.1.2 Kmen *Rhodotorula mucilaginosa* (24) a *Rhodotorula mucilaginosa* (28)

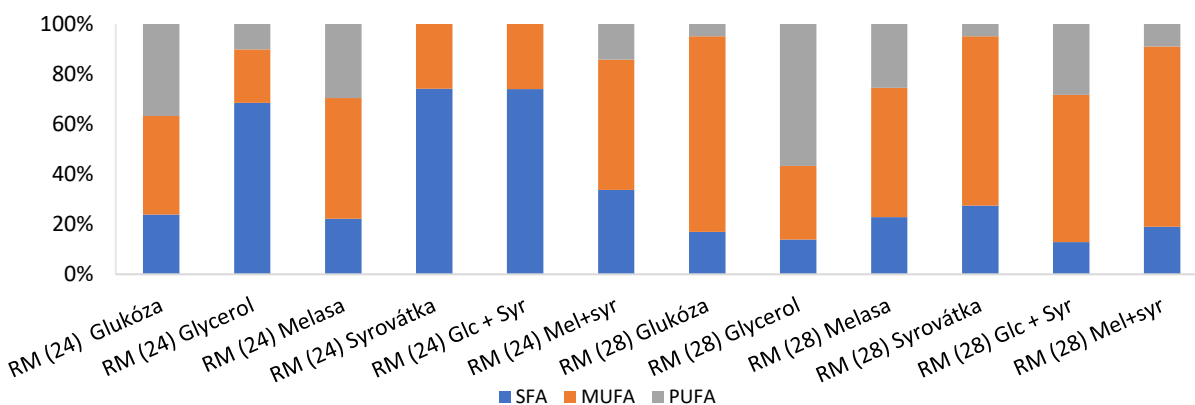
V případě kmene *R. mucilaginosa* (24) nelze v nárůstu biomasy pozorovat zvýšení, či snížení produkce biomasy vlivem syrovátky jako u ostatních experimentů. Významný nárůst biomasy můžeme pozorovat u média s glukózou, melasou a největší u syrovátky v kombinaci s melasou. Dále můžeme vidět, že syrovátka měla nepříznivý vliv na produkci lipidů. Pokud se zaměříme na zastoupení mastných kyselin v lipidické složce, nemůžeme zde vyčíst jednoznačný trend. U glycerolu, syrovátky a jejich kombinace tvoří největší podíl SFA mastné kyseliny, v ostatních případech jsou ve většině SFA a MUFA mastné kyseliny.

Produkce karotenoidů v tomto experimentu byla velice nízká. Největší koncentraci můžeme nalézt ve vzorku kultivovaném na melasovém médiu (1,73 mg/g). Z obrázku (Obrázek č. 20) je také patrné, že produkce na syrovátkových médiích byla velice nízká. U kmene *R. mucilaginosa* (28) už je patrné, že syrovátka měla kladný vliv na nárůst biomasy. Ačkoliv byla zjištěná produkce biomasy na glukózovém médiu nejmenší, procentuální zastoupení lipidické složky v sušině dosahovalo maximální hodnoty. Dále můžeme vidět, že největší část lipidového podílu tvoří MUFA mastné kyseliny s výjimkou Glycerolového média, kde je tvořen PUFA mastnými kyselinami.

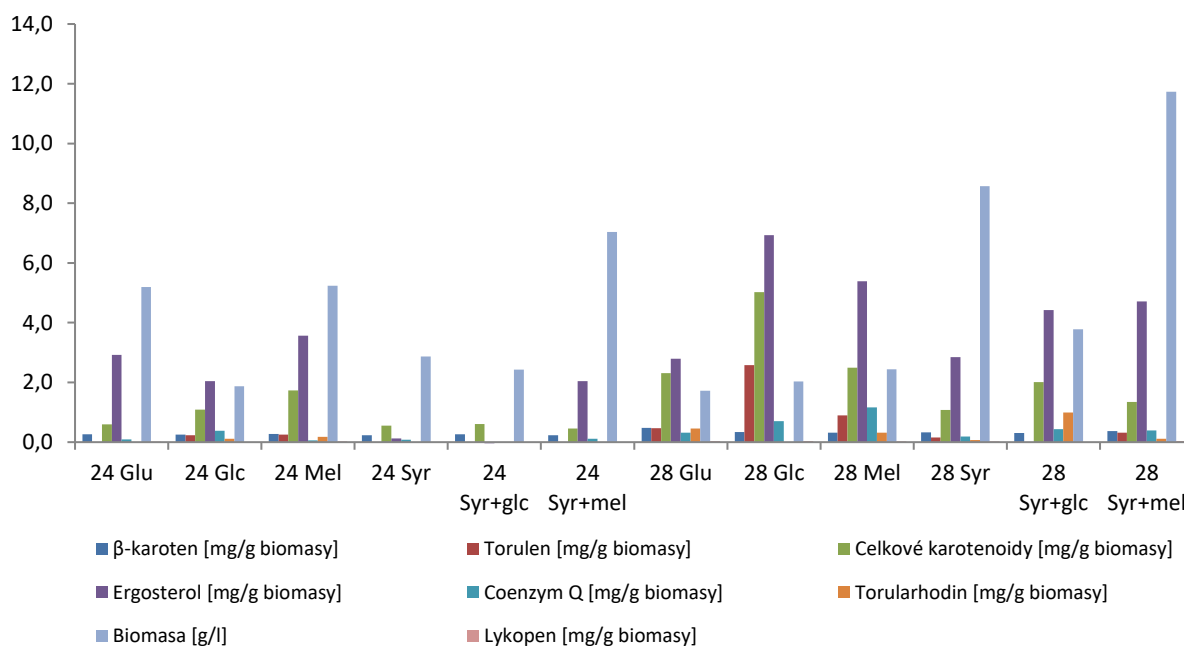
Přestože na rozdíl od předchozího případu můžeme pozorovat vyšší produkci karotenoidů, u syrovátkových médií nejsou jejich koncentrace nijak vysoké. Nejvyšší zastoupení karotenoidů nalezneme u vzorku kultivovaném na glycerolu (5,02 mg/g), kde nejvyšších hodnot dosahují i torulen a ergosterol. Nejvyšší zastoupení koenzymu Q bylo na melase.



Obrázek č. 19 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na zdroji uhlíku v produkčním médiu u kmenů *Rhodotorula mucilaginosa* (24) a *Rhodotorula mucilaginosa* (28)



Obrázek č. 20 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech

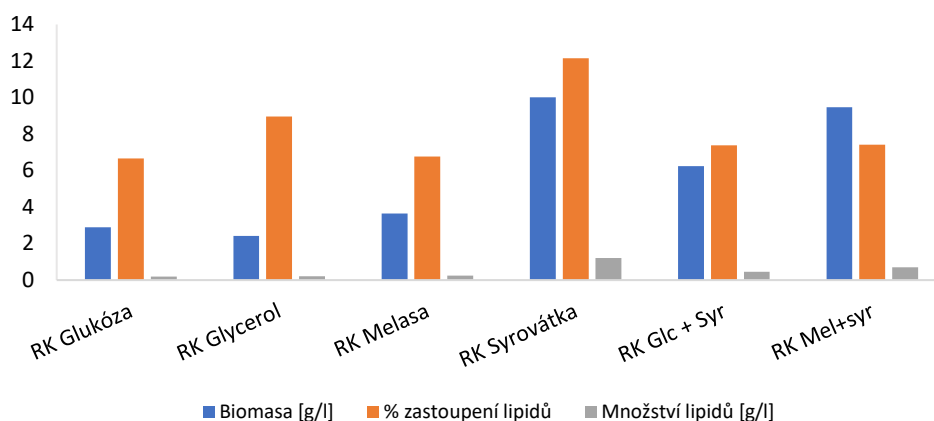


Obrázek č. 21 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na zdroji uhlíku v produkčním médiu u kmenů *Rhodotorula mucilaginosa* (24) a *Rhodotorula mucilaginosa* (28)

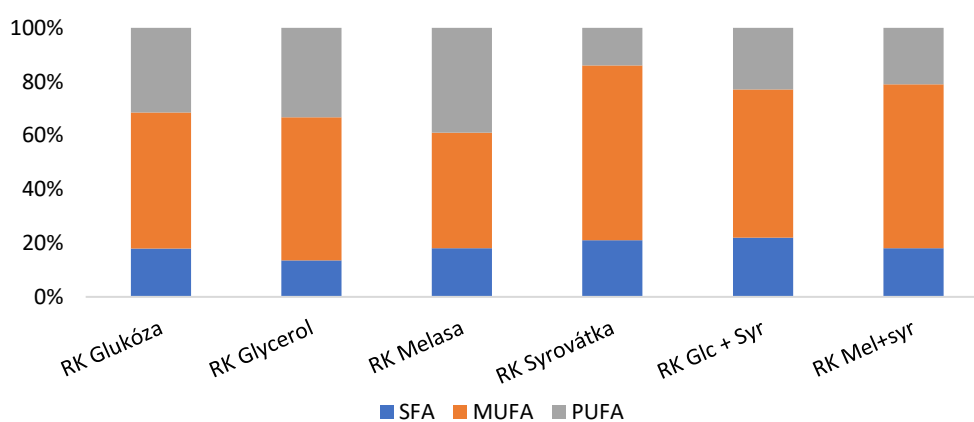
5.1.1.3 Kmen *Rhodotorula kratochvilovae*

V experimentech pro kmen *R. kratochvilovae* docházelo k největšímu nárůstu biomasy na syrovátkových médiích zejména pak na čisté syrovátce, kde činila 10 g/l. V porovnání s ostatními médii, byl nárůst biomasy více než dvojnásobný. V grafu můžeme vidět, že se procentuální zastoupení lipidů bylo největší na syrovátkovém médiu. Zastoupení mastných kyselin v lipidickém podílu bylo u všech vzorků velmi podobné. Největší část tvořily MUFA mastné kyseliny.

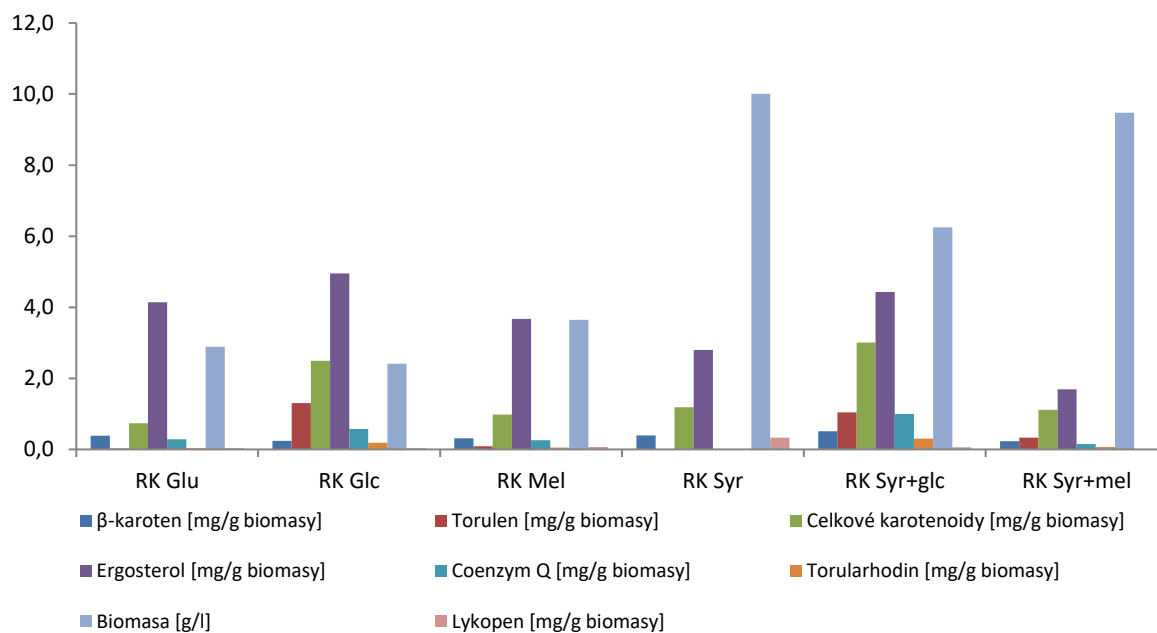
Na obrázku (Obrázek č. 25) můžeme vidět, že největší zastoupení karotenoidů měly vzorky kultivované na glycerolových médiích. V případě média glycerolu v kombinaci se syrovátkou byla jejich koncentrace nejvyšší (3,01 mg/g) a maximální hodnoty zde nabýval i koenzym Q. Největší koncentraci dalších karotenoidů jako je torulen nebo ergosterol můžeme pozorovat u vzorku kultivovaném na čistém glycerolu. Příznivý vliv na vysokou produkci karotenoidů měl převážně glycerol, jelikož na dalších syrovátkových médiích byla produkce karotenoidů nejnižší. Optimálním médiem, kde dojde jak k velkému nárůstu biomasy, tak k velkému zastoupení metabolitů, je zde kombinace syrovátky a glycerolu.



Obrázek č. 22 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na zdroji uhlíku v produkčním médiu u kmene *Rhodotorula kratochvilovae*



Obrázek č. 23 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech



Obrázek č. 24 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na zdroji uhlíku v produkčním médiu u kmene *Rhodotorula kratochvilovae*

5.1.2 Kultivace v přítomnosti chloridu sodného

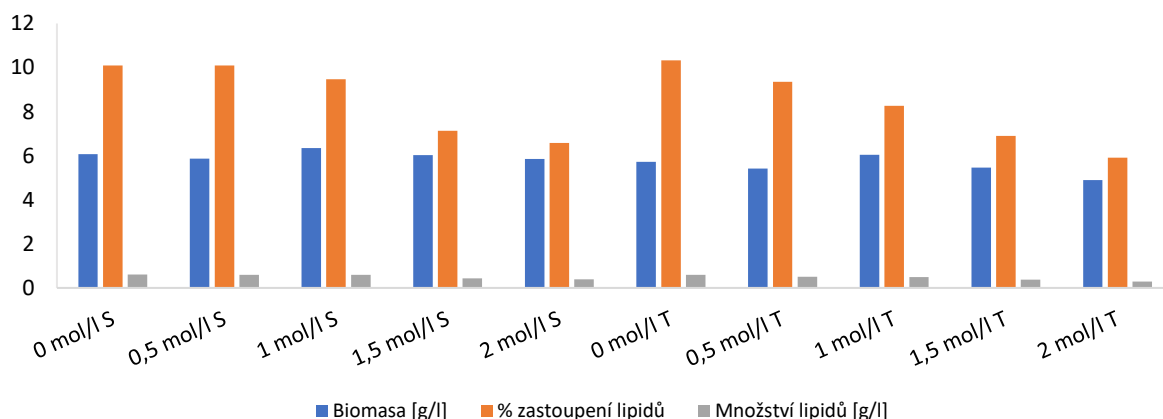
V tomto experimentu byly kvasinky kultivovány v přítomnosti chloridu sodného o koncentraci 0; 0,5; 1; 1,5 a 2 mol/l. Kmeny byly kultivovány ve dvou sadách, kdy druhá byla kultivována za absence osvětlení. U kmene *Sporidiobolus salmonicolor* už nízké koncentrace chloridu sodného vyvolávaly letální účinky jak v přítomnosti světla, tak v jeho absenci. Vlivem vysokého osmotického tlaku tak došlo k inhibici růstu biomasy.

5.1.2.1 Kmen *Rhodosporidium toruloides*

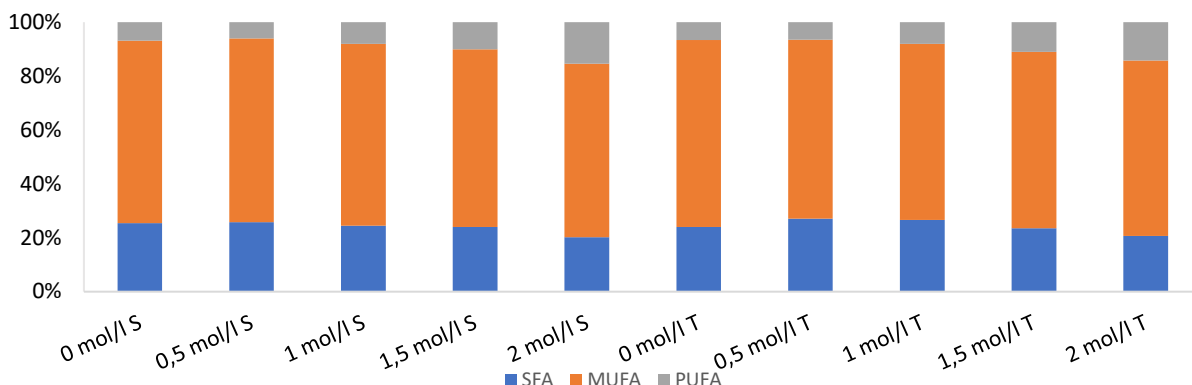
V tomto experimentu sledovány nárůsty biomasy a jednotlivých metabolitů v závislosti na koncentraci NaCl a osvětlení či jeho absence. Ačkoliv byla produkovaná biomasa u všech koncentrací téměř stejná z grafu lze jasně vidět trend snižování procentuálního zastoupení lipidů se zvyšující se koncentrací NaCl. Pokud bychom srovnávali vzorky kultivované na světle a ve tmě, neviděli bychom žádný znatelný rozdíl, z čehož vyplývá, že světelné záření na produkci biomasy a lipidů nemělo významný vliv. Co se týče složení mastných kyselin lipidické složky, lze pozorovat mírný nárůst PUFA mastných kyselin v neprospěch MUFA mastných kyselin se zvyšující se koncentrací NaCl.

Podobně také u karotenoidů nemá osvětlení či jeho nepřítomnost vliv na jejich produkci. Sada kultivovaná v absenci světla vykazuje mírný trend snižování obsahu karotenoidů v závislosti na zvyšující se koncentraci NaCl. Pro vzorky kultivované na světle však tento trend neplatí. Dále si můžeme na obrázku (Obrázek č. 26) pozorovat, že vzorek kultivován na světle s koncentrací 0,5 mol/l NaCl produkoval nejvíce karotenoidů (5,86 mg/g).

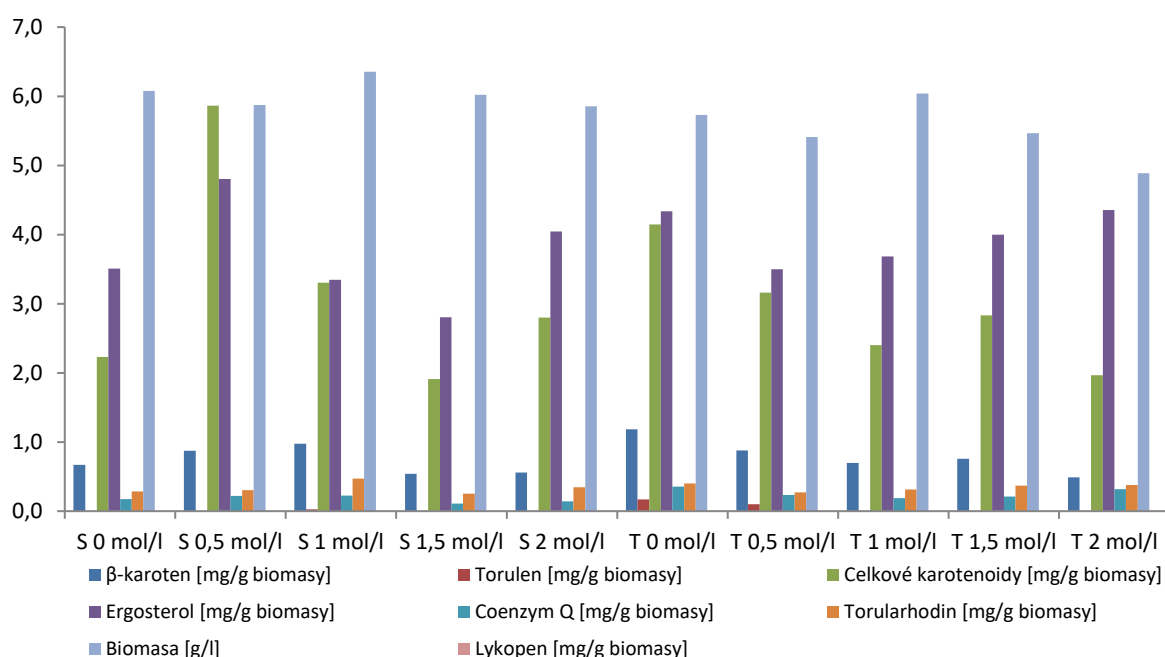
Pro vzorky kultivované v absenci osvětlení můžeme pozorovat klesající trend akumulace karotenoidů. U druhé skupiny vzorků ovšem nelze žádný přímý trend pozorovat.



Obrázek č. 25 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodospiridium toruloides*



Obrázek č. 26 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech



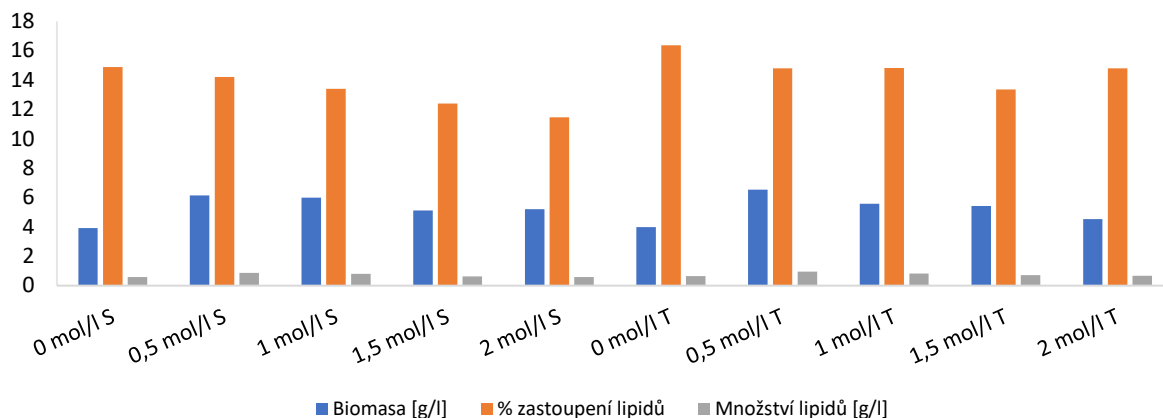
Obrázek č. 27 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodosporidium toruloides*

5.1.2.2 Kmen *Cystofilobasidium infirmominiatum*

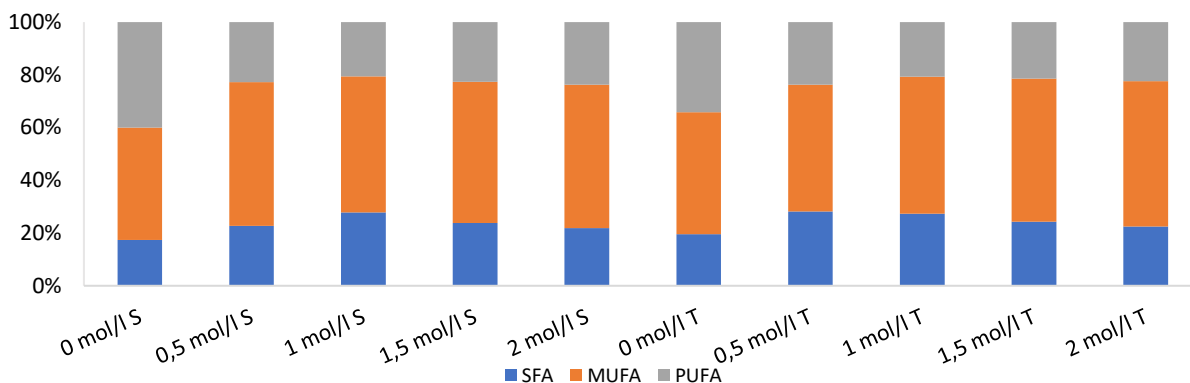
V případě experimentu u kmene *Cystofilobasidium infirmominiatum* můžeme vidět, že v kontrolním vzorku bez přidaného NaCl došlo k nižší produkci biomasy. Procentuální zastoupení lipidů zde také vykazovalo snižující se trend se zvyšující se koncentrací NaCl. Osvětlení či jeho absence neměla na produkovanou biomasu ani zastoupení lipidů vliv. Vzorky v přítomnosti NaCl projevují vyšší zastoupení SFA a MUFA mastných kyselin.

Při pohledu na karotenoidy lze vidět, že na koncentraci 0,5 mol/l NaCl není patrný ergosterol. Dále si můžeme všimnout, že se zvyšující se koncentrací NaCl se zvyšuje produkce koenzymu Q. Co se celkových karotenoidů týče, byla maximální hodnota naměřena u obou sad na jiné koncentraci. Pro osvětlené vzorky byly karotenoidy nejvyšší při koncentraci 0,5 mol/l NaCl (2,26 mg/g), při absenci světla při koncentraci 1 mol/l NaCl. V případě kmene *C. infirmominiatum* můžeme pozorovat nejvyšší produkci karotenoidů u vzorku kultivovaném na světle s koncentrací 0,5 mol/l NaCl, kde také došlo k nejvyšší akumulaci β-krotenu a torulenu. Vyšší koncentrace karotenoidů se vyskytovaly také u vzorků s koncentrací 1,5 a 2 mol/l NaCl.

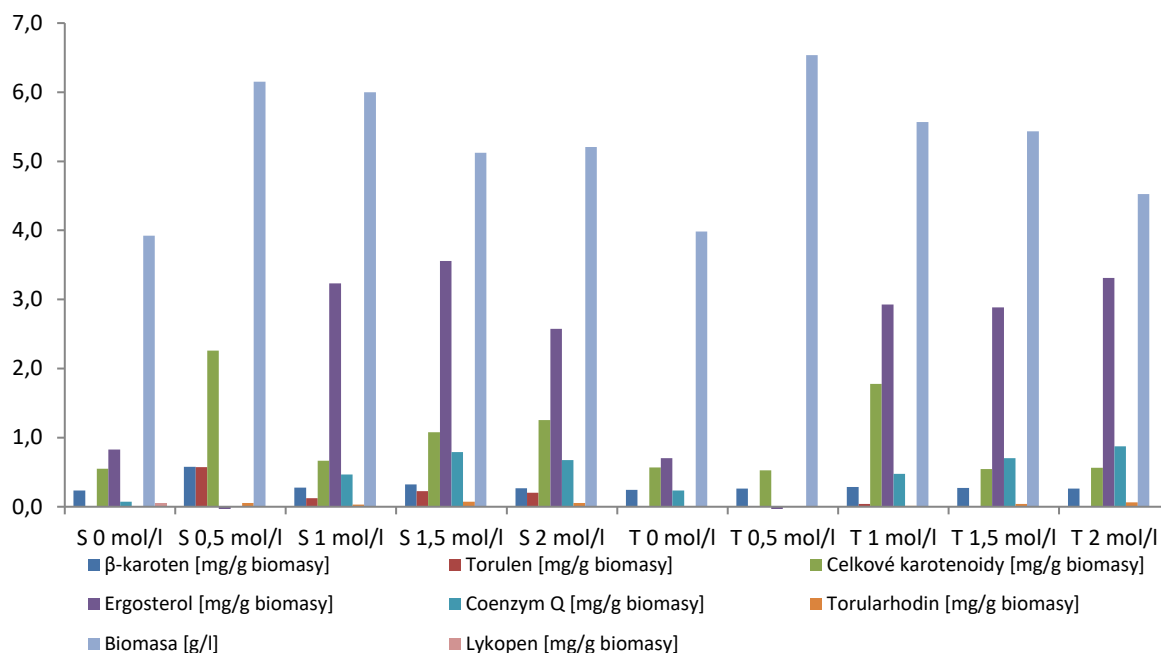
U nich také pozorujeme nejvyšší hodnoty pro koenzym Q. Při nižších koncentracích NaCl si můžeme všimnout výrazně nižší produkce ergosterolu. Pro vzorky kultivované při absenci světelného záření platí stejné trendy, pouze maximální produkce karotenoidů zde nastala pro vzorek s 1 mol/l koncentrací NaCl.



Obrázek č. 28 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Cystofilobasidium infirmominiatum*



Obrázek č. 29 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech

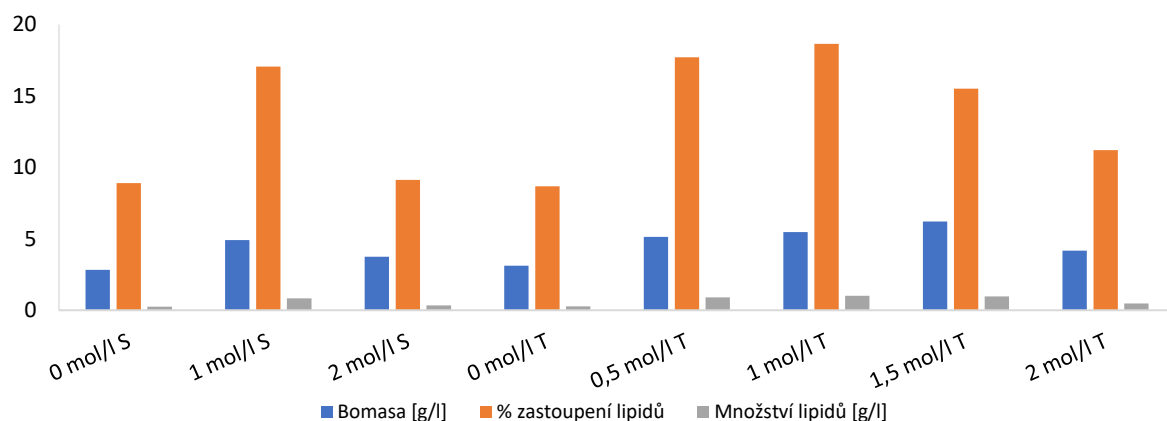


Obrázek č. 30 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Cystofilobasidium infirmominiatum*

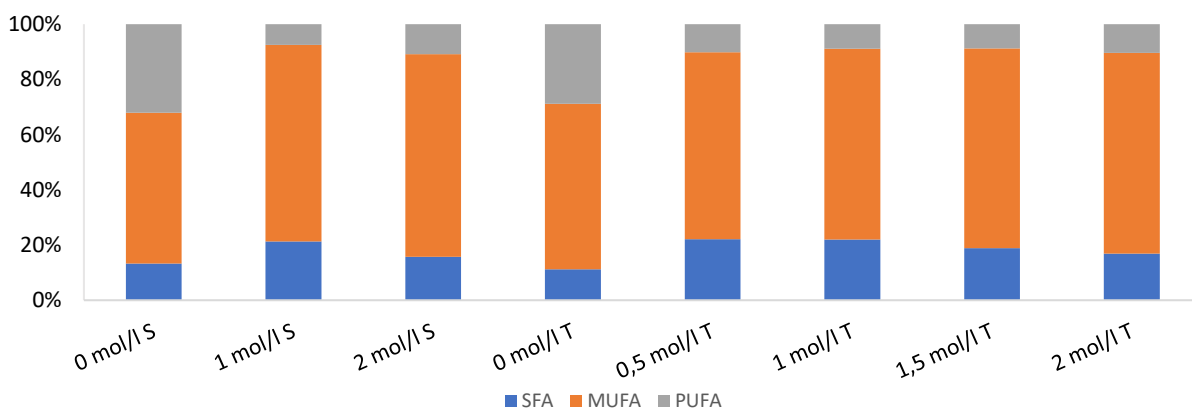
5.1.2.3 Kmen *Sporidiobolus metaroseus*

V experimentu pro kmen *S. metaroseus* došlo k mírné kontaminaci vzorků 0,5 a 1,5 mol/l NaCl kultivovaných na světle a došlo k inhibici růstu kultury. I přes chybějící vzorky můžeme z grafů vyvodit, že by se vzorky v sadě kultivované na světle shodovaly se sadou v absenci osvětlení. Zvýšená koncentrace vedla k vyšší produkci biomasy, která se zvyšující se koncentrací stoupala až na vzorek o koncentraci 2 mol/l. Z pohledu profilu mastných kyselin vyplývá, že se zvýšenou koncentrací NaCl se také zvýšilo procentuální zastoupení MUFA mastných kyselin na úkor PUFA.

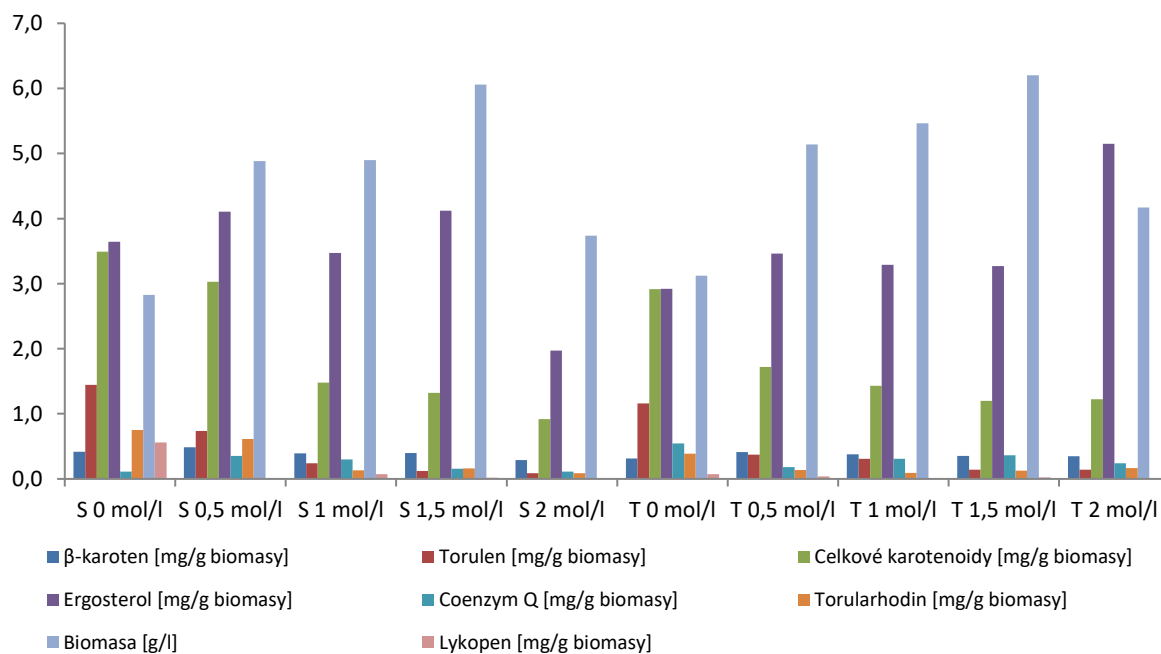
Na rozdíl od akumulace lipidů, mělo zastoupení celkových karotenoidů se se zvyšující se koncentrací klesající charakter. U sady kultivované při osvětlení se však tento trend nacházet nemusel, jelikož kontrolní vzorek bez přidání NaCl vykazuje nižší koncentraci karotenoidů než vzorek s koncentrací 1 mol/l NaCl. Také produkce ergosterolu měla na světle spíše tendenci se snižovat oproti sadě ve tmě, kde při koncentraci 2 mol/l dosahuje maximální hodnoty. Pro produkci celkových karotenoidů u kmene *S. metaroseus* v obou řadách platí, že se zvyšující se koncentrací NaCl dochází k nižší produkci. Výjimku tvoří kontrolní vzorek při kultivaci v přítomnosti osvětlení. U vzorků kultivovaných ve tmě je také patrná zvyšující se produkce ergosterolu se zvyšující se koncentrací NaCl. Nejvyšší celkovou koncentrací karotenoidů měly v obou řadách vzorky s 0,5 mol/l koncentrací NaCl.



Obrázek č. 31 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Sporidiobolus metaroseus*



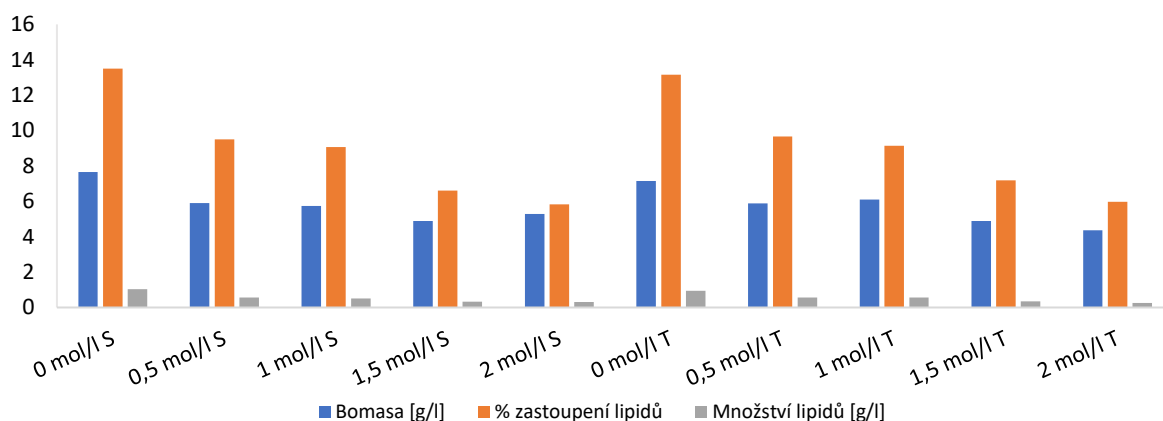
Obrázek č. 32 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech



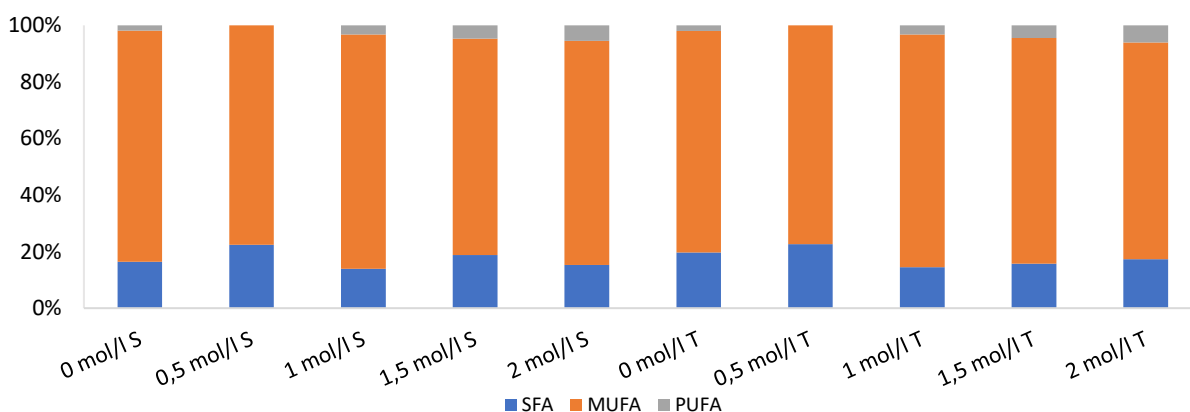
Obrázek č. 33 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Sporidiobolus metaroseus*

5.1.2.4 Kmen *Rhodotorula mucilaginosa* (28)

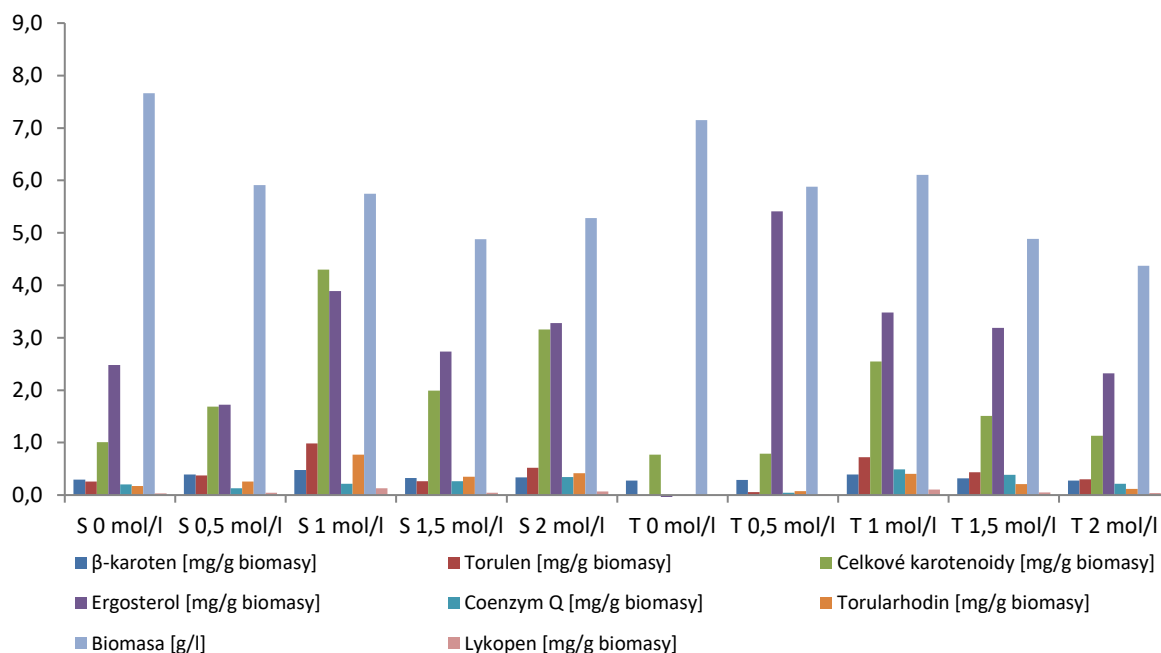
Již na první pohled je patrné, že se světelné záření nemělo na kultivaci kmene *R. mucilaginosa* žádný vliv. Se zvyšující se koncentrací NaCl v tomto případě docházelo ke snížení produkce biomasy a snížené akumulaci lipidů. Profily mastných kyselin jsou u všech vzorků téměř srovnatelné, kdy více než 75 % tvoří MUFA mastné kyseliny. V případě karotenoidů, však koncentrace NaCl již hraje znatelnou roli. Při vyšších koncentracích docházelo k větší produkci karotenoidů jak na světle, tak ve tmě, osvětlení však mělo více pozitivní dopad. Při pohledu na produkci ergosterolu vidíme, že vyšší koncentrace NaCl měla pozitivní účinky na produkci pro vzorky kultivované při osvětlení, Při absenci světla byla produkce naopak klesající, s výjimkou kontrolního vzorku, kde byla produkce ergosterolu téměř nulová. Při pohledu na celkové karotenoidy je patrná nejvyšší akumulace pro vzorek s 1 mol/l koncentrací NaCl v obou řadách, v případě řady kultivované ve světle můžeme pozorovat výrazně vyšší zastoupení karotenoidů také u vzorku o koncentraci 2 mmol/l. poměrové zastoupení vybraných karotenoidů je u všech osvětlených vzorků obdobné. Dále si můžeme všimnout klesající produkce ergosterolu se zvyšující se koncentrací NaCl, pro vzorky v absenci osvětlení, s výjimkou kontrolního vzorku.



Obrázek č. 34 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodotorula mucilaginosa*



Obrázek č. 35 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech



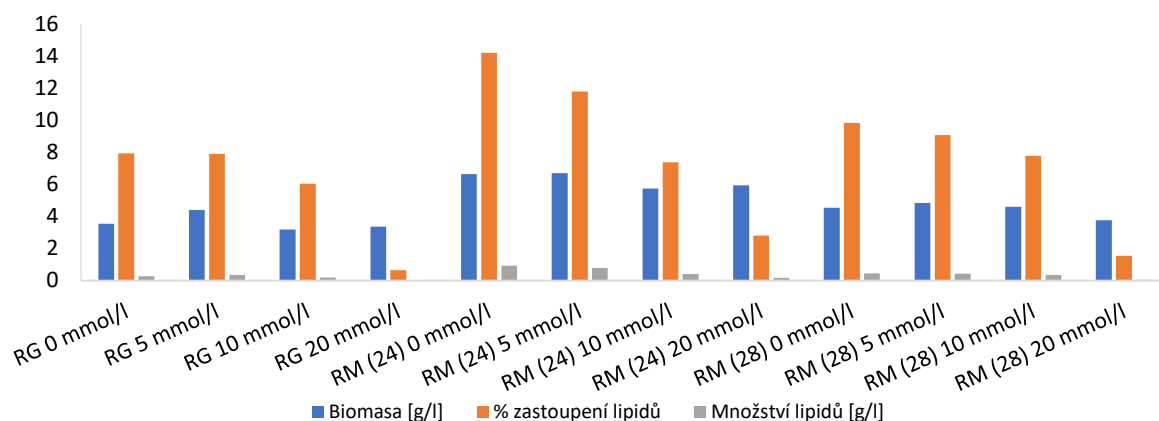
Obrázek č. 36 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodotorula mucilaginosa*

5.1.3 Kultivace v přítomnosti chloridu železitého

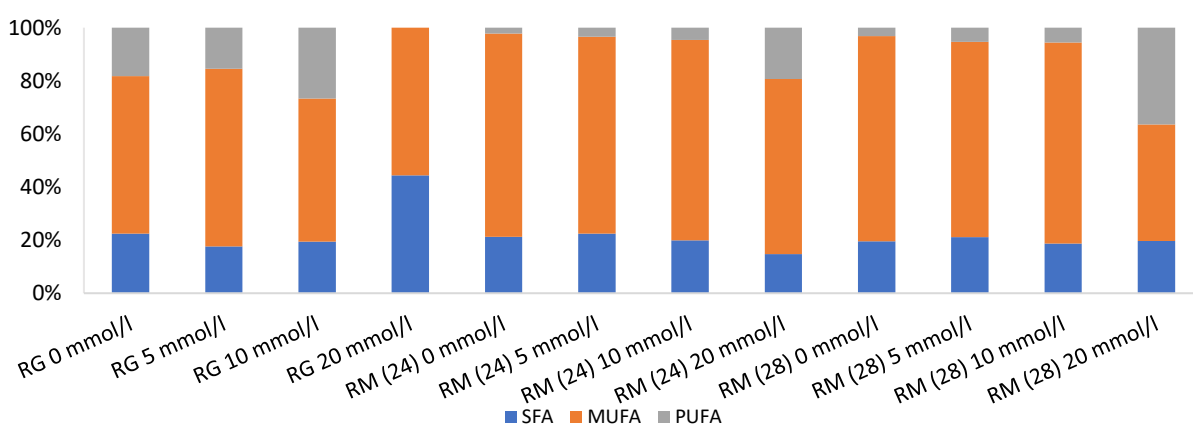
5.1.3.1 Kmen *Rhodotorula kratochvilovae*, *Rhodotorula mucilaginosa* (24) a (28)

Při kultivaci těchto kmenů v přítomnosti FeCl_3 můžeme u všech kmenů pozorovat, že produkce biomasy byla při všech koncentracích srovnatelná, pouze u vyšších koncentrací docházelo k mírně nižšímu nárůstu. Na procentuální zastoupení lipidů však měla zvyšující se koncentrace nepříznivý charakter. U koncentrace 20 mmol/l FeCl_3 byla akumulace lipidů výrazně menší. Procentuální zastoupení mastných kyselin se pro kmeny nijak zvlášť nelišilo pouze u koncentrace 20 mmol/l FeCl_3 můžeme pozorovat výraznější změnu. U kmene *R. kratochvilovae* byla výraznější produkce SFA na úkor PUFA mastných kyselin. Pro oba kmeny *R. mucilaginosa* byla pro tuto koncentraci pouze zvýšená produkce PUFA mastných kyselin zejména pro kmen 28.

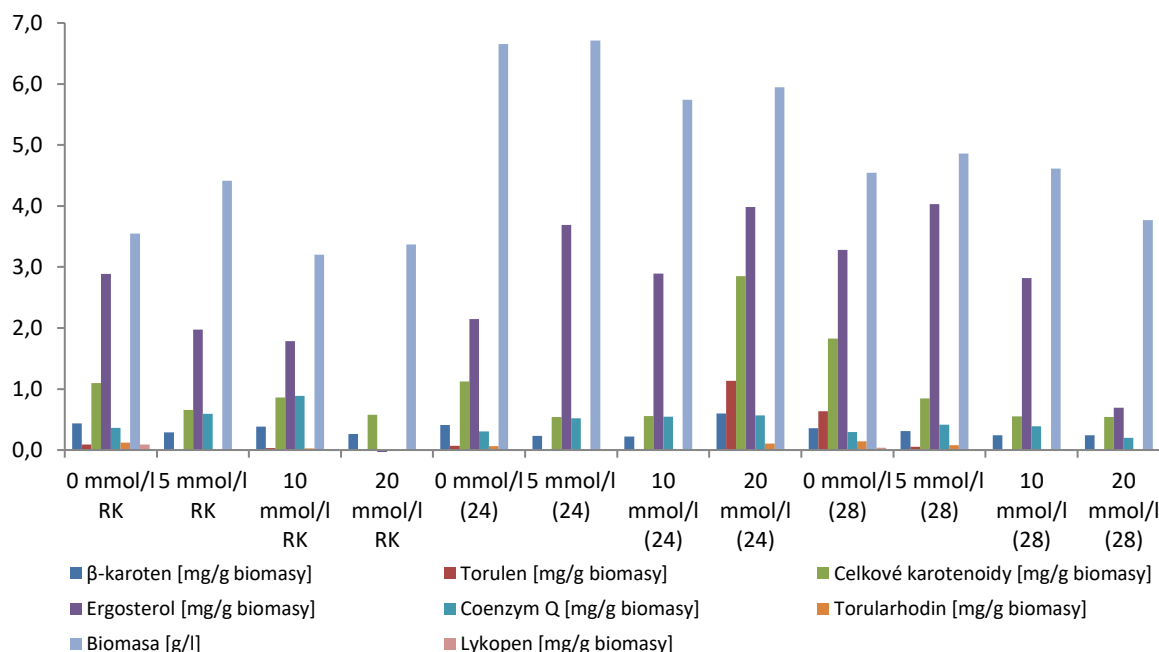
Pokud se zaměříme na celkové karotenoidy, nelze mezi jednotlivými kmeny pozorovat podobnost. U kmene *R. kratochvilovae* není zaznamenáno zvýšení či snížení produkce celkových karotenoidů v závislosti na koncentraci, nejvyšší zastoupení (1,10 mg/g) pozorujeme u kontrolního vzorku. Pro zvyšující se koncentraci však vidíme pokles akumulace ergosterolu a zvýšení produkce koenzymu Q s výjimkou vzorku s koncentrací 20 mmol/l FeCl_3 . Produkce karotenoidů u kmene *R. mucilaginosa* (24) nejvyšší (2,85 mg/g) pro vzorek s nejvyšší koncentrací. K vysoké akumulaci došlo také u kontrolního vzorku. Se zvyšující se koncentrací můžeme pozorovat pokles produkce karotenoidů u kmene *R. mucilaginosa* (28), kontrolní vzorek tedy obsahoval nejvíce karotenoidů (1,83 mg/g).



Obrázek č. 37 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různých koncentracích $FeCl_3$ u kmenů *Rhodotorula kratochvilovae*, *Rhodotorula mucilaginosa* (24) a (28)



Obrázek č. 38 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech



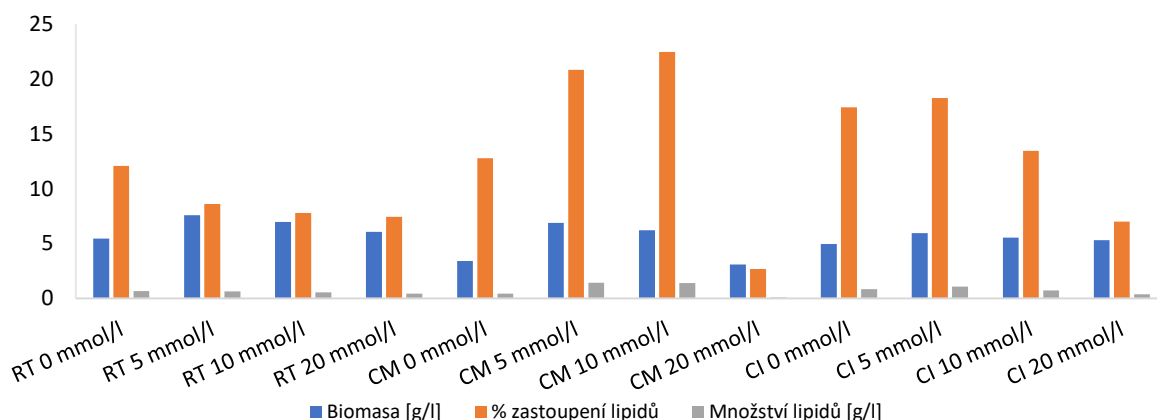
Obrázek č. 39 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různých koncentracích $FeCl_3$ u kmenů *Rhodotorula kratochvilovae*, *Rhodotorula mucilaginosa* (24) a (28)

5.1.3.2 Kmen *Rhodosporidium toruloides*, *Cystofilobasidium macerans* a *Cystofilobasidium infirmominiatum*

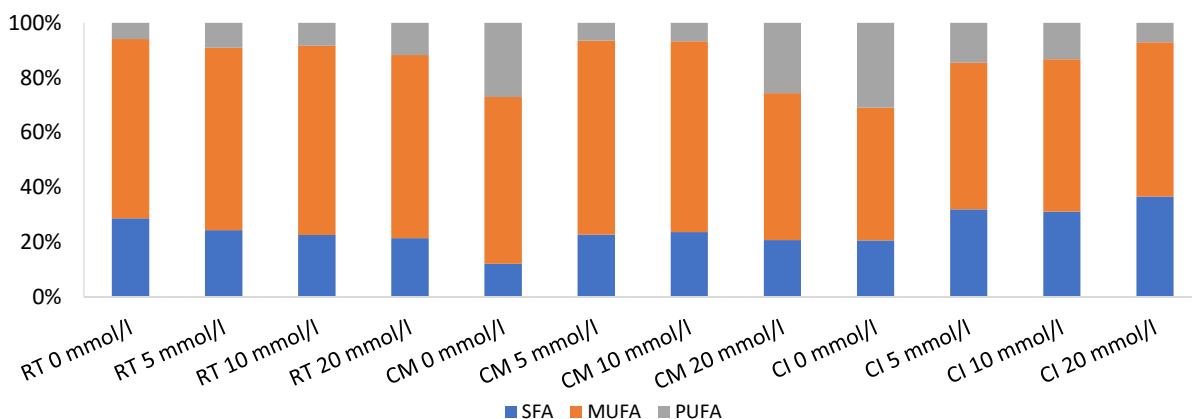
V případě kmene *R. toruloides* si můžeme všimnout zvýšené produkce biomasy ve srovnání s kontrolním vzorkem bez přítomnosti FeCl_3 , se zvyšující se koncentrací má však klesající charakter. Zvýšená koncentrace také zapříčinila snížení produkce lipidického podílu biomasy. Profil zastoupení mastných kyselin je v tomto případě u všech vzorků srovnatelný a převažuje zejména tvorba MUFA mastných kyselin. Se zvyšující koncentrací však docházelo k poklesu produkce karotenoidů. U kontrolního vzorku byla zaznamenána výrazně vyšší produkce karotenoidů (3,70 mg/g) a lykopenu v porovnání s ostatními vzorky.

Pro kmen *C. macerans* byla produkce biomasy zvýšená při koncentracích 5 a 10 mmol/l FeCl_3 . Zastoupení lipidů se zvyšující koncentrací stoupala s výjimkou koncentrace 20 mmol/l. U prvního a posledního vzorku koncentrační řady také můžeme pozorovat mírně zvýšenou produkci PUFA mastných kyselin, ve všech případech však převažují PUFA. Nejvyšší zastoupení karotenoidů pozorujeme u vzorku s koncentrací 5 (1,65 mg/g) a 10 mmol/l FeCl_3 , kde pozorujeme i zvýšenou produkci koenzymu Q.

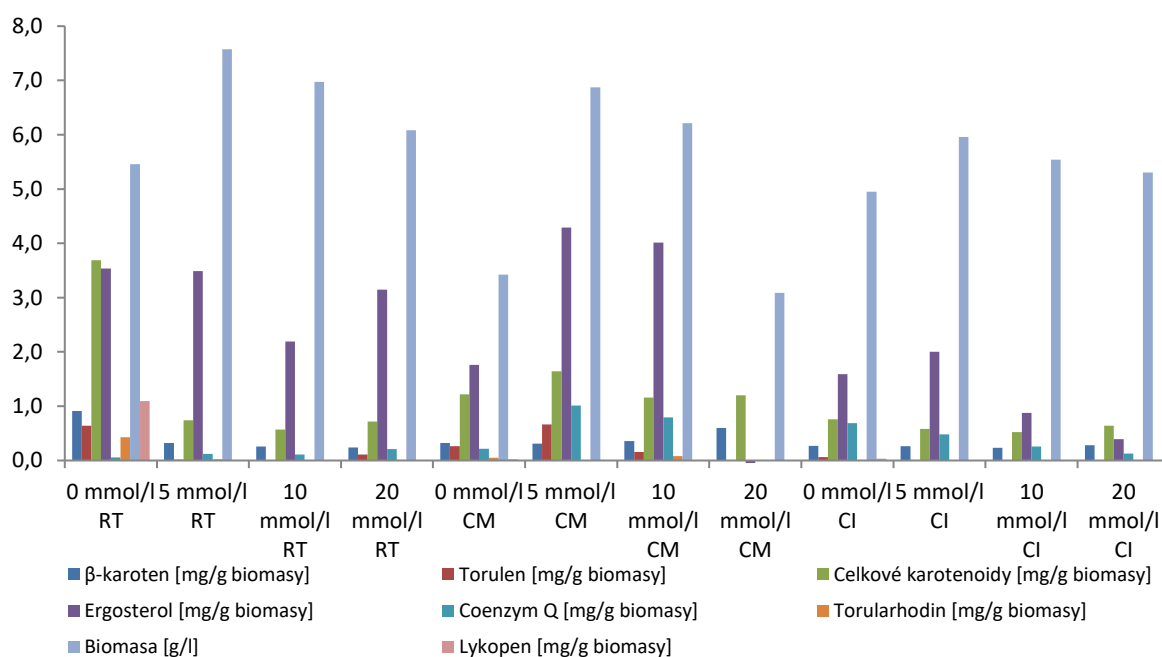
V případě kmene *C. infirmominiatum* byla produkce biomasy u všech vzorků srovnatelná, lipidický podíl však se zvyšující se koncentrací klesal. U procentuálního zastoupení mastných kyselin můžeme pozorovat klesající produkci PUFA ve prospěch SFA mastných kyselin. Podobně jako biomasa, i produkce karotenoidů je u všech vzorků obdobná. Všimnout si však můžeme poklesu v produkci koenzymu Q se zvyšující se koncentrací. Nejvyšší zastoupení karotenoidů (0,76 mg/g) nalezneme u kontrolního vzorku.



Obrázek č. 40 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různých koncentracích FeCl_3 u kmenů *Rhodosporidium toruloides*, *Cystofilobasidium macerans* a *Cystofilobasidium infirmominiatum*



Obrázek č. 41 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech

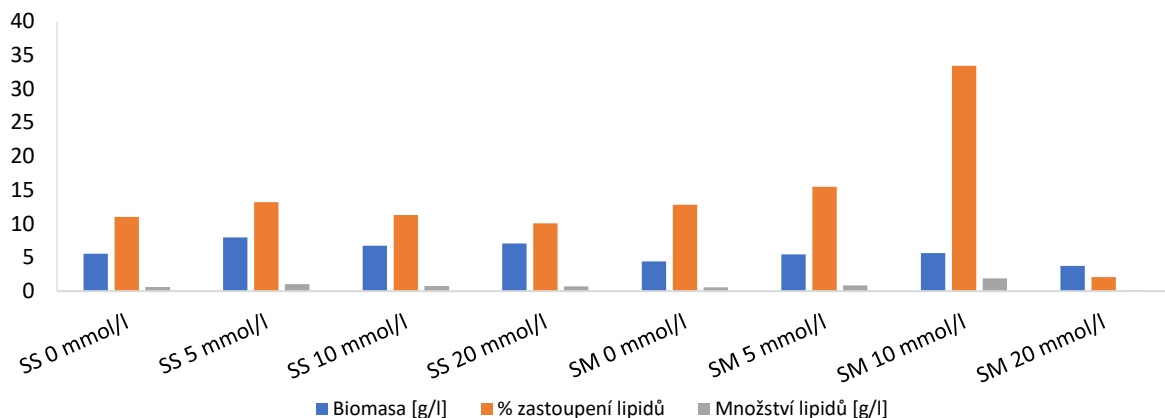


Obrázek č. 42 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různých koncentracích FeCl₃ u kmenů *Rhodosporidium toruloides*, *Cystofilobasidium macerans* a *Cystofilobasidium infirmominium*

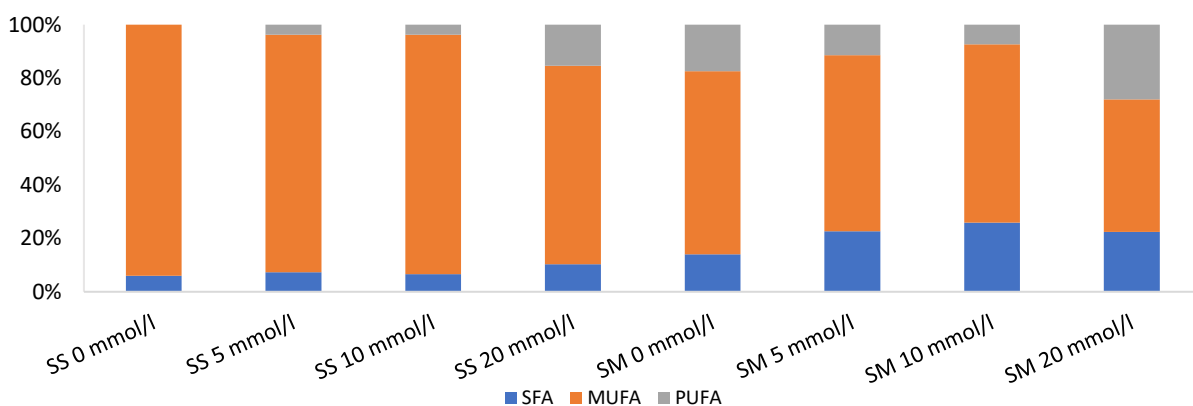
5.1.3.3 Kmen *Sporidiobolus salmonicolor* a *Sporidiobolus metaroseus*

U kmene *S. salmonicolor* měl FeCl₃ mírně pozitivní vliv na produkci biomasy. Akumulace lipidů však byla zvýšená pouze pro koncentraci 5 mmol/l. Při zvyšující se koncentraci docházelo ke zvýšené produkci jak SFA, tak PUFA mastných kyselin. Ačkoliv při zvyšující se koncentraci dochází ke snížení produkce celkových karotenoidů, lze pozorovat významné akumulace ve vzorku s koncentrací 20 mmol/l FeCl₃. Kontrolní vzorek má ve srovnání s ostatními nižší produkci koenzymu Q.

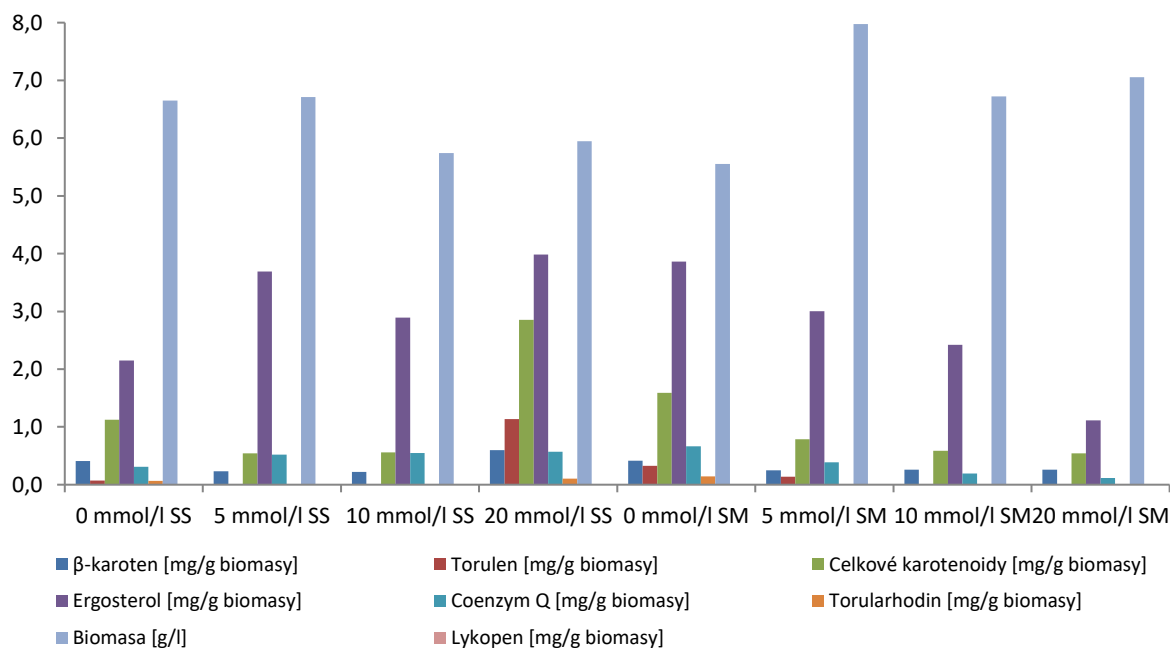
V experimentu pro kmen *S. metaroseus* opět nebyla produkce biomasy zvyšující se koncentrací nijak zvlášť ovlivněna. Co se procentuálního zastoupení týče, můžeme na obrázku č. vidět rostoucí trend v závislosti na zvyšující se koncentraci FeCl₃. V případě koncentrace 20 mmol/l byla však produkce lipidů velmi nízká. Se zvyšující se koncentrací byla zvýšená produkce SFA mastných kyselin. V případě produkce karotenoidů pozorujeme pokles zastoupení v závislosti na zvyšující se koncentraci.



Obrázek č. 43 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různých koncentracích $FeCl_3$ u kmenů *Sporidiobolus salmonicolor* a *Sporidiobolus metaroseus*



Obrázek č. 44 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech



Obrázek č. 45 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různých koncentracích $FeCl_3$ u kmenů *Sporidiobolus salmonicolor* a *Sporidiobolus metaroseus*

5.2 Mikrořasy a sinice

V těchto experimentech byly kmeny mikrořasy a sinice *Synechococcus nidulans*, *Coccomyxa* sp., *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus acutus*, *Desmodesmus quadricauda* a *Desmodesmus obliquus*. Stresovými faktory byly různé zdroje a koncentrace dusíku, koncentrace fosforu a koncentrace chloridu železitého. Při kultivaci mikrořas na různých zdrojích a koncentracích dusíku byly rovněž aplikovány cykly světla a tmy. Doba trvání těchto experimentů se pohybovala v rozmezí od 10 do 40 dní.

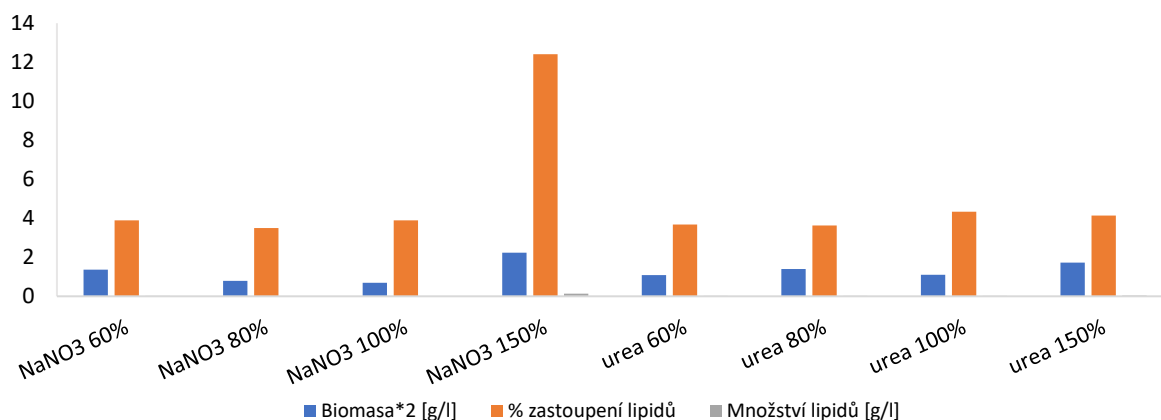
5.2.1 Kultivace v závislosti na zdroji a koncentraci dusíku

Pro tento experiment byly jako zdroj dusíku použity dusičnan sodný a močovina. Koncentrace dusíku činila 60, 80, 100 a 150 % původního BBM média.

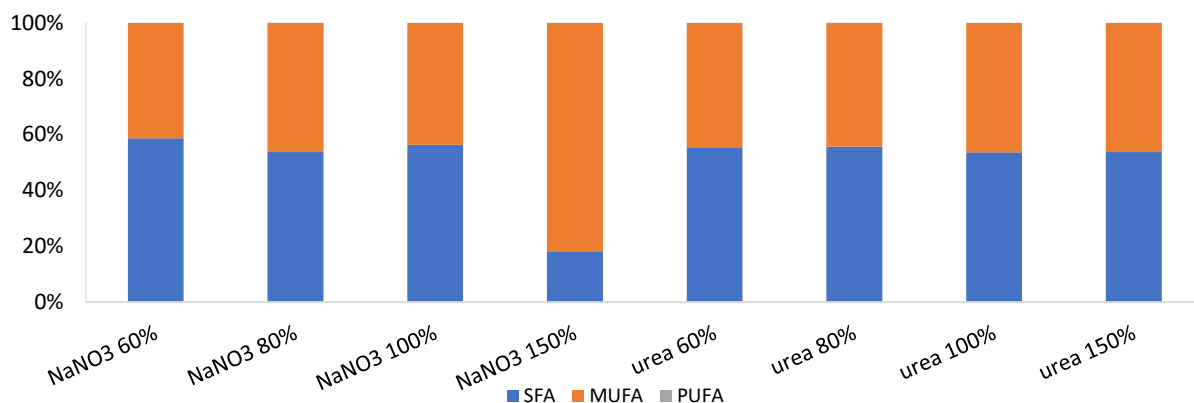
5.2.1.1 Kmen *Synechococcus nidulans*

Co se produkce biomasy týče, nelze v obrázku č. pozorovat jasný trend. V případě močoviny jsou hodnoty biomasy pro všechny koncentrace srovnatelné. Při pohledu na dusičnan vidíme klesající biomasu se zvyšující se koncentrací dusičnanu, pro 150 % koncentraci však vidíme razantní nárůst biomasy. Také procentuální zastoupení lipidů je při této koncentraci znatelně vyšší v porovnání s ostatními vzorky, které se pohybují kolem stejné hodnoty. Dále složení mastných kyselin lipidického podílu je u všech vzorků obdobné s mírnou převahou SFA mastných kyselin nad MUFA. V případě 150 % koncentrace NaNO_3 největší část tvoří MUFA mastné kyseliny.

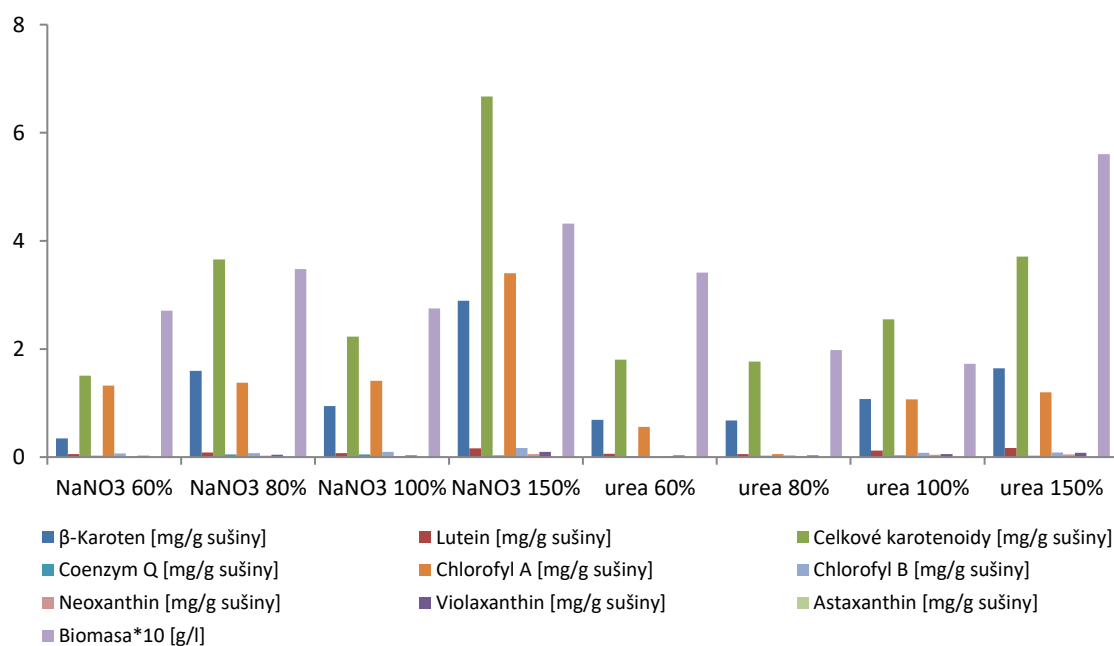
U vzorků kultivovaných na močovině pozorujeme nárůst produkce karotenoidů se zvyšující se koncentrací. Tento nárůst je patrný pro všechny zastoupené karotenoidy s výjimkou chlorofylu A, který má u vzorku o koncentraci 80 % téměř nulovou hodnotu. Produkce chlorofylu B byla ve všech vzorcích velice nízká. Podobně jako v případě biomasy, pozorujeme nejvyšší zastoupení karotenoidů (6,67 mg/g) u vzorku kultivovaného na 150 % NaNO_3 .



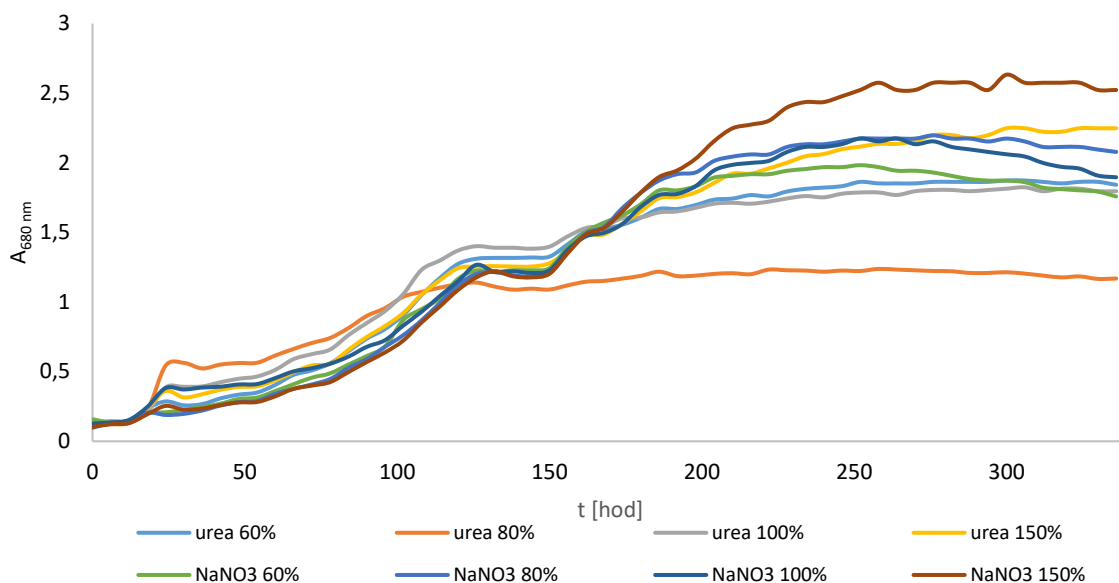
Obrázek č. 46 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různém zdroji a různé koncentraci dusíku u kmene *Synechococcus nidulans*



Obrázek č. 47 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech



Obrázek č. 48 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různém zdroji a různé koncentraci dusíku u kmene *Synechococcus nidulans*

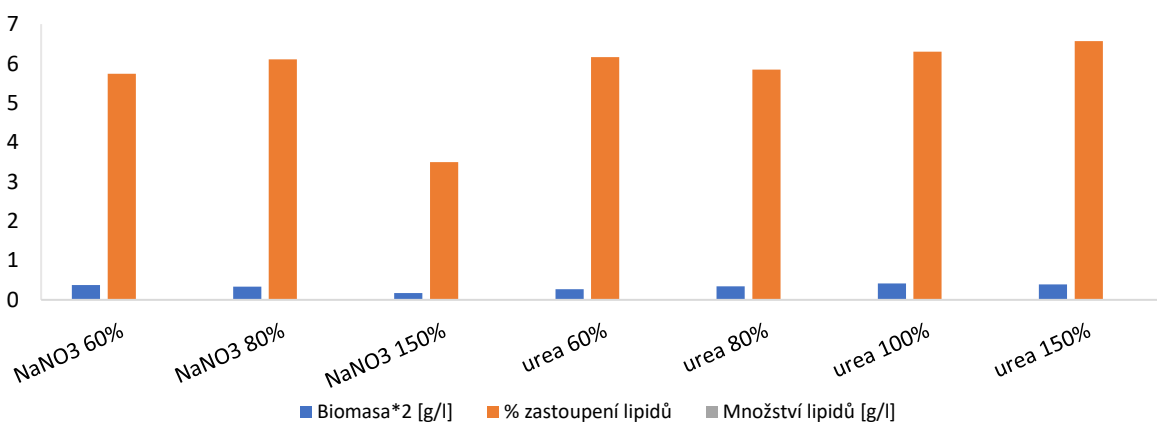


Obrázek č. 49 Grafické znázornění závislosti absorpance (680) nm na různém zdroji a různé koncentraci dusíku u kmene *Synechococcus nidulans*

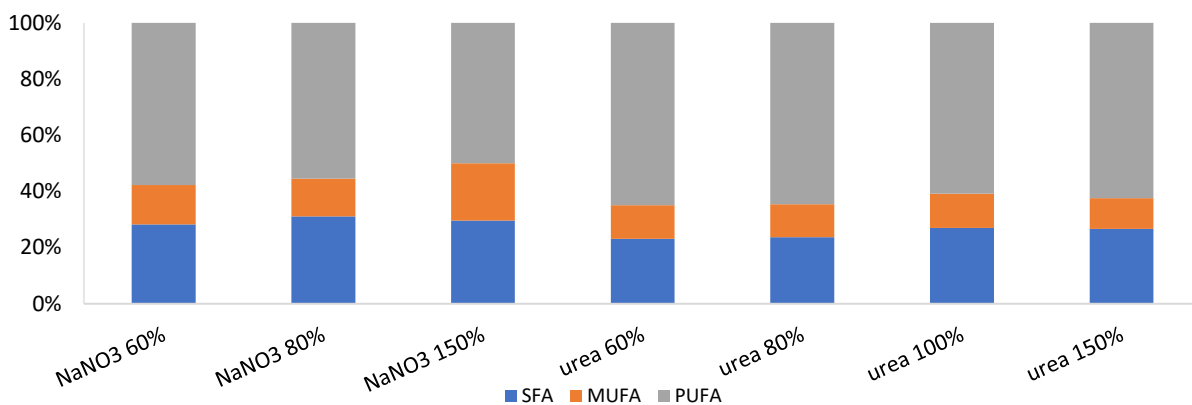
5.2.1.2 Kmen *Chlorella vulgaris*

V tomto experimentu došlo ke kontaminaci vzorku kultivovaném na 100 % NaNO_3 , jejímž následkem došlo k úhynu kultury. V případě kmene *C. vulgaris* vidíme rozdíl v nárůstu biomasy v závislosti na použitém zdroji dusíku. Při použití dusičnanu sodného došlo k poklesu produkce biomasy se zvyšující se koncentrací, pro močovinu platí opačný trend. Podobně i akumulace biomasy podléhá stejnému trendu jako biomasa, s výjimkou 60 % koncentrace NaNO_3 i močoviny. Ve srovnání s předchozím případem tvoří profil mastných kyselin i PUFA mastné kyseliny, které tvoří nadpoloviční většinu. Poměrové zastoupení mastných kyselin ve všech vzorcích je vzájemně podobné.

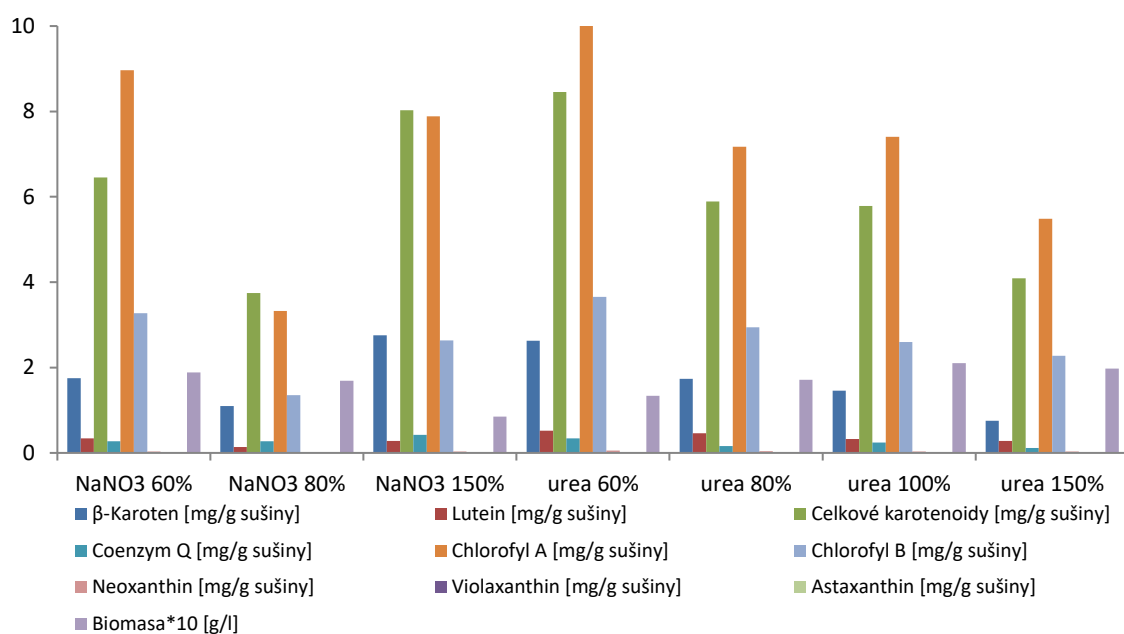
Pokud se zaměříme na karotenoidy, pozorujeme v případě močoviny pokles jejich zastoupení při zvyšující se koncentraci. Vzorky kultivované na dusičnanu sodném nevykazují žádnou přímou závislost a nejvyšší zastoupení (8,03 mg/g) pozorujeme u vzorku s koncentrací 150 % NaNO_3 . Vzorek kultivován na močovine o koncentraci 60 % dosahuje nejvyšší produkce chlorofylu A. Ve všech případech je poměrové zastoupení karotenoidů srovnatelné.



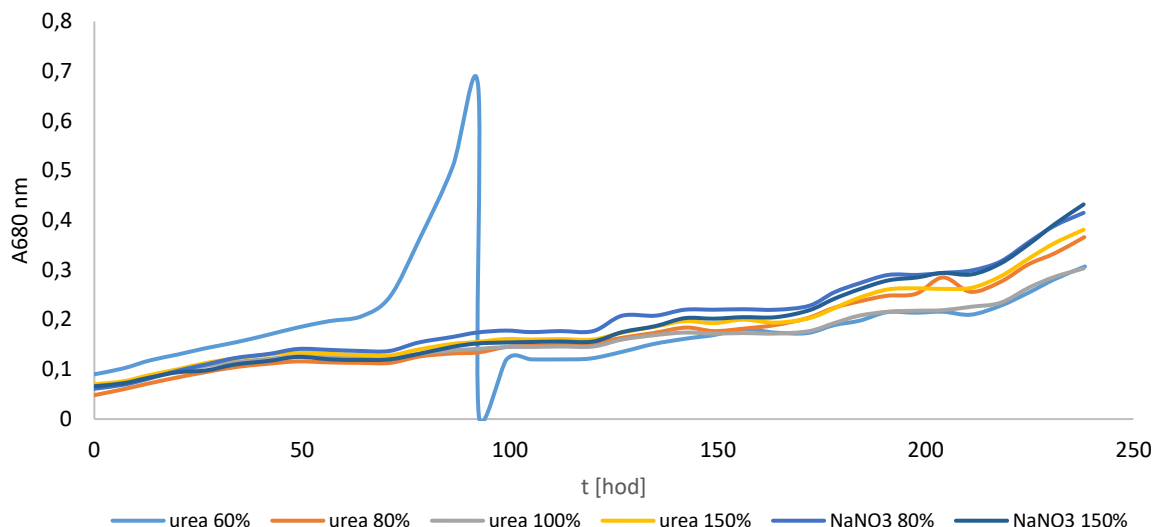
Obrázek č. 50 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různém zdroji a různé koncentraci dusíku u kmene *Chlorella vulgaris*



Obrázek č. 51 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech



Obrázek č. 52 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různém zdroji a různé koncentraci dusíku u kmene *Chlorella vulgaris*

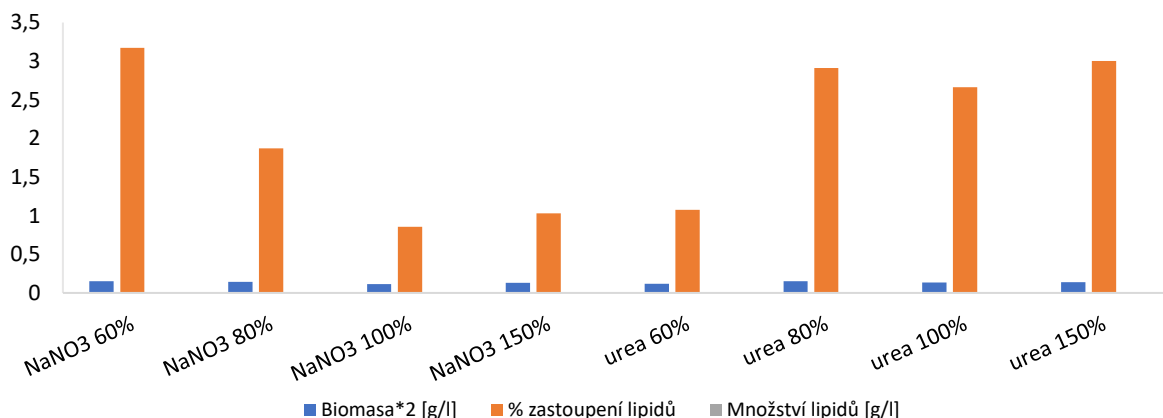


Obrázek č. 53 Grafické znázornění závislosti absorbance (680) nm na různém zdroji a různé koncentraci dusíku u kmene *Chlorella vulgaris*

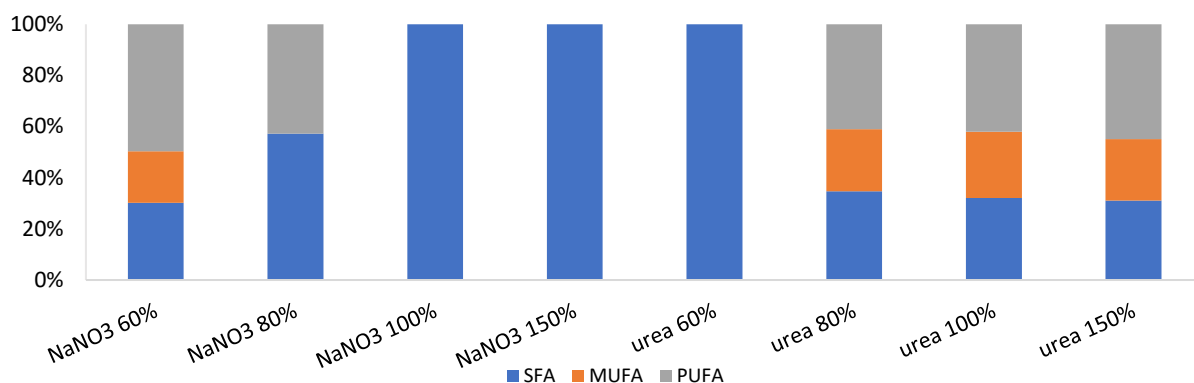
5.2.1.3 Kmen *Chlorella sorokiniana*

V experimentu pro kmen *C. sorokiniana* došlo během kultivace ke kontaminaci vzorku kultivovaném na 150% NaNO_3 a tento vzorek byl v průběhu experimentu znovu zaočkován. Při pohledu na obrázky nelze pozorovat výrazný nárůst či pokles nárůstu biomasy v závislosti na koncentraci či použitém zdroji dusíku. Při zvyšující se koncentraci NaNO_3 můžeme na obrázku č. vidět pokles akumulace lipidů. Močovina jako zdroj dusíku vykazovala zvýšený podíl lipidické složky s výjimkou 60% koncentrace. V případě vzorků 100 a 150% NaNO_3 a 60% močoviny můžeme pozorovat sníženou produkci lipidů ve srovnání s ostatními vzorky.

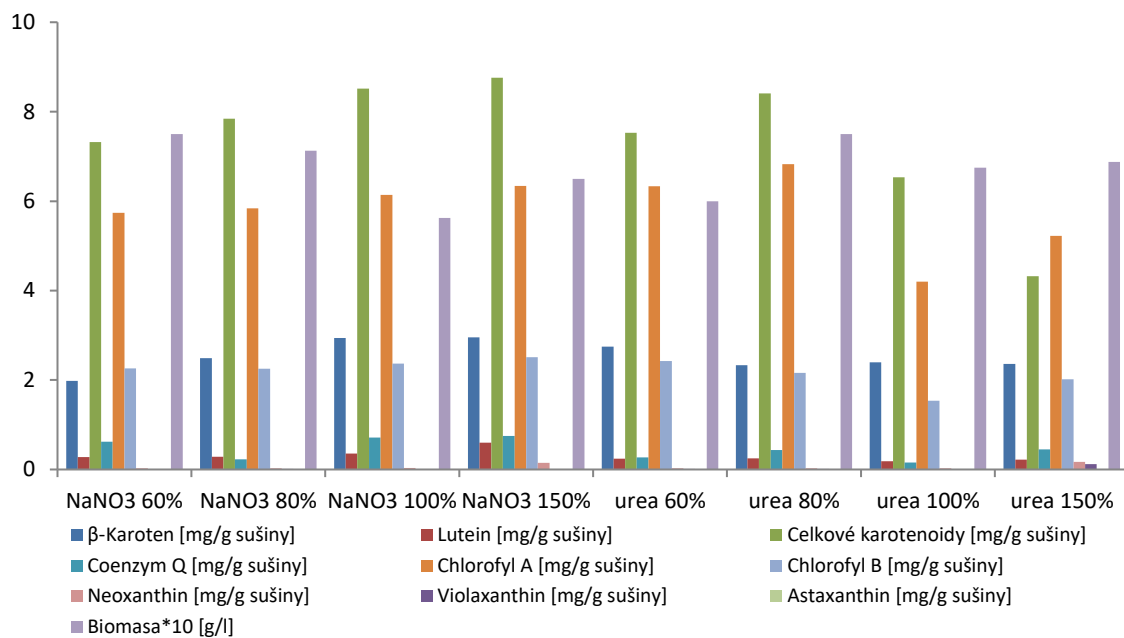
U vzorků kultivovaných na NaNO_3 pozorujeme zvýšení produkce karotenoidů v závislosti na rostoucí koncentraci, nejvyšší hodnoty (8,76 mg/g) tak dosahoval vzorek kultivován na 150% NaNO_3 . Poměrové zastoupení metabolitů bylo na tomto zdroji dusíku pro všechny vzorky shodné. Vzorky kultivované na močovině naopak vykazují pokles produkce s výjimkou 60% koncentrace a celkově dosahují nižších hodnot. Nejvyšší akumulace karotenoidů byla tedy na 80% koncentraci. Ačkoliv na této koncentraci zaznamenáváme také nejvyšší zastoupení chlorofylu A, chlorofyl B dosahoval nejvyšší produkce na vzorku s 60% koncentrací.



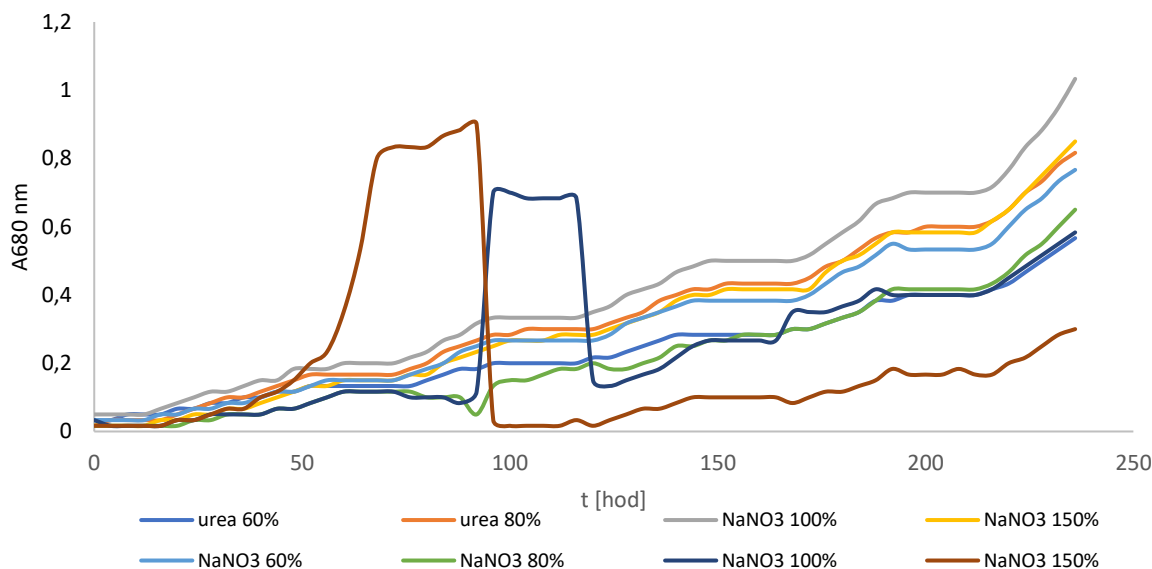
Obrázek č. 54 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různém zdroji a různé koncentraci dusíku u kmene *Chlorella sorokiniana*



Obrázek č. 55 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech



Obrázek č. 56 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různém zdroji a různé koncentraci dusíku u kmene *Chlorella sorokiniana*

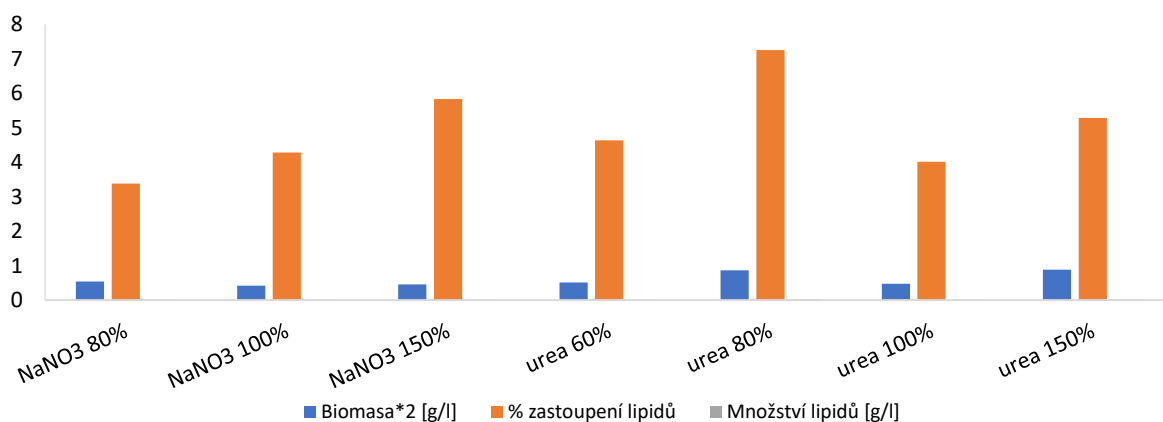


Obrázek č. 57 Grafické znázornění závislosti absorpance (680) nm na různém zdroji a různé koncentraci dusíku u kmene *Chlorella sorokiniana*

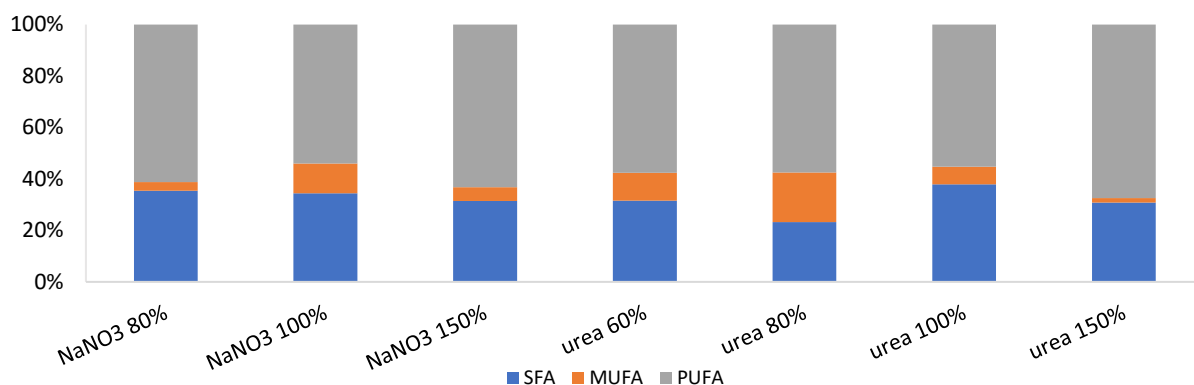
5.2.1.4 Kmen *Coccomyxa* sp.

V experimentu pro kmen *Coccomyxa* sp. Došlo ke kontaminaci vzorku s 60 % koncentrací NaNO_3 a došlo k úmrtí kultury. Z hlediska biomasy nelze u NaNO_3 pozorovat změnu v produkci v závislosti na koncentraci. U vzorků kultivovaných na močovíně můžeme pozorovat vyšší nárůst při koncentraci 80 a 150 %. Také akumulace lipidů je v těchto koncentracích vyšší. U vzorků kultivovaných na NaNO_3 lze pozorovat trend rostoucího zastoupení lipidické složky biomasy se zvyšující se koncentrací dusíku. Pokud se zaměříme na profil mastných kyselin, Největší zastoupení mají PUFA mastné kyseliny a nejmenší podíl tvoří PUFA.

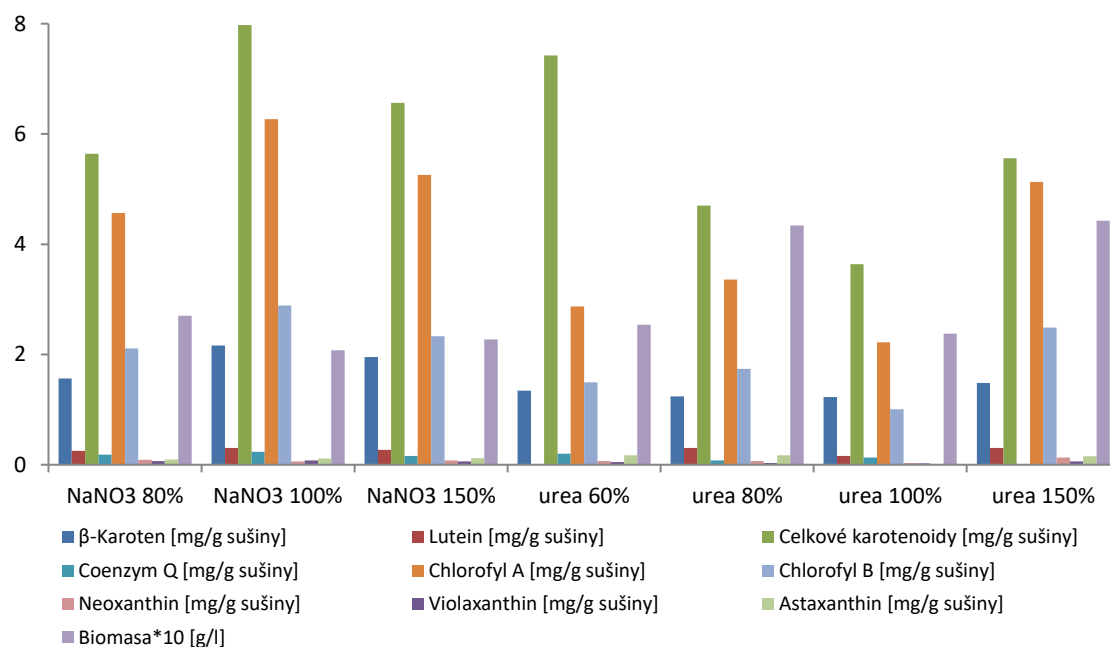
Celkově vyšší akumulace lipidů u tohoto kmene docházelo na NaNO_3 , nejvyšší zastoupení však pozorujeme u vzorku s 60 % močoviny. V tomto vzorku v porovnání s ostatními ovšem došlo k téměř nulové produkci luteinu. V rámci karotenoidů pozorujeme vyšší produkci na NaNO_3 médiu a nejvyšší nárůst (5,64 mg/g) měl vzorek o koncentraci 100 %. U vzorků kultivovaných na močovíně pozorujeme nejvyšší nárůst pro vzorek o 60% koncentraci, má však nižší produkci chlorofylu A. V ostatních případech je poměrové zastoupení metabolitů obdobné.



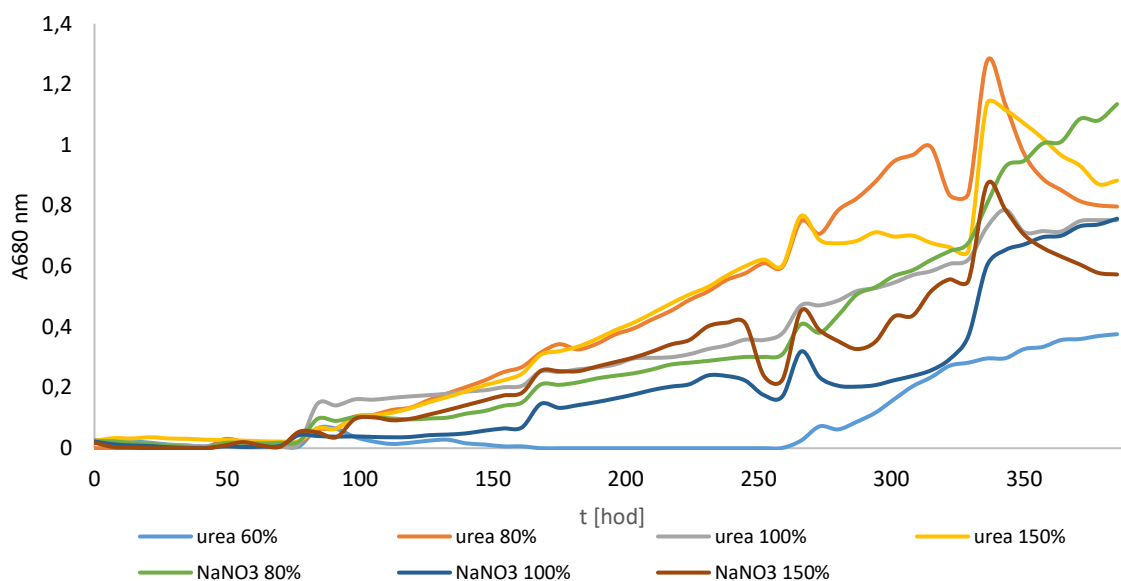
Obrázek č. 58 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různém zdroji a různé koncentraci dusíku u kmene *Coccomyxa* sp.



Obrázek č. 59 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech



Obrázek č. 60 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různém zdroji a různé koncentraci dusíku u kmene *Coccomyxa* sp.



Obrázek č. 61 Grafické znázornění závislosti absorbance (680) nm na různém zdroji a různé koncentraci dusíku u kmene *Coccomyxa* sp.

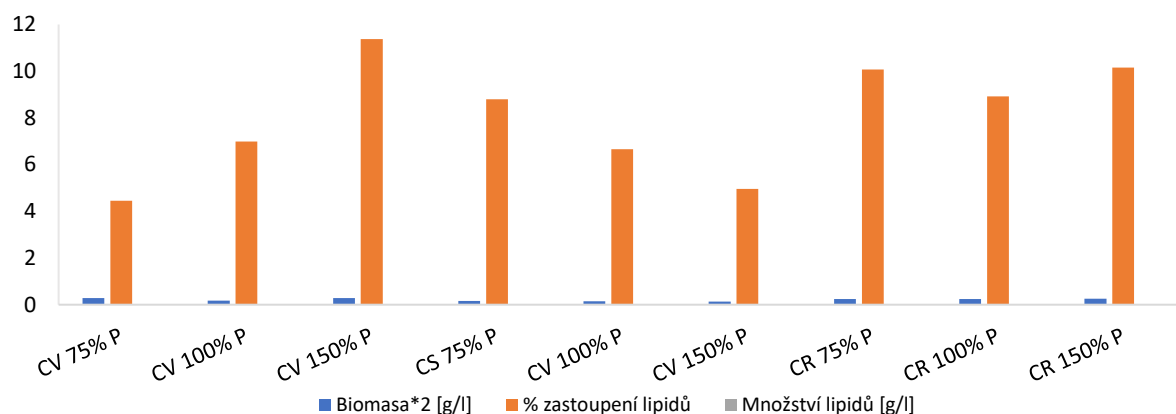
5.2.2 Kultivace v závislosti na koncentraci fosforu

Pro tyto experimenty byly zvoleny koncentrace 75, 100 a 150 % původní koncentrace fosforu v BBM médiu. Pro kmeny *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* a *Chlamydomonas reinhardtii* trval experiment po dobu 10 dní, v případě ostatních kmenů byla zvolena delší doba trvání experimentu 40 dní. U dlouhodobých kultivací byly také dělány postupné odběry pro sledování nárůstu biomasy a karotenoidů. První odběr byl proveden po 36 a druhý po 38 dnech.

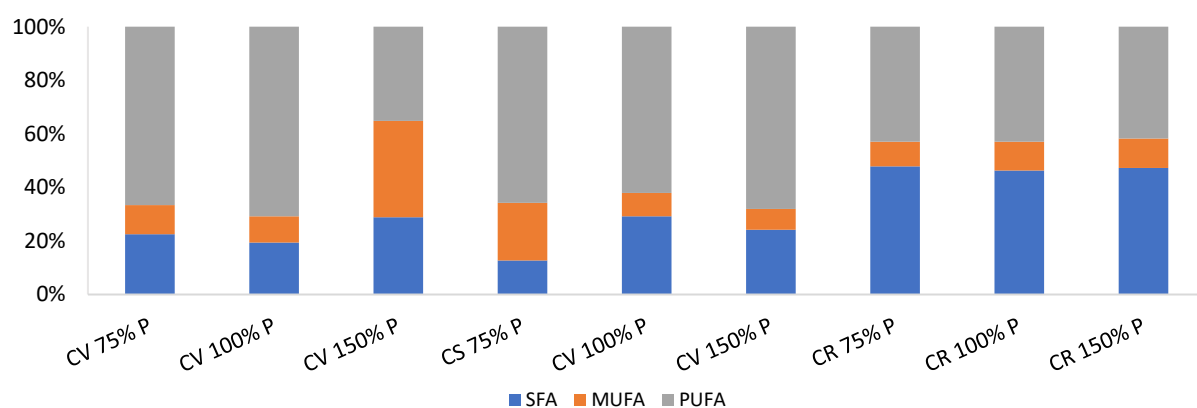
5.2.2.1 Kmeny *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* a *Chlamydomonas reinhardtii*

Produkce biomasy na různých koncentracích fosforu v případě těchto kmenů nevykazuje žádnou výraznou změnu produkce, biomasa na vyšších koncentracích však dosahuje nižších nárůstů. Co se produkce lipidů týče, můžeme u každého kmene pozorovat jinou závislost. U kmene *C. vulgaris* pozorujeme rostoucí zastoupení v závislosti na zvyšující se koncentraci fosforu. U všech vzorků mají největší zastoupení PUFA mastné kyseliny pouze v případě 150 % koncentrace fosforu mají všechny druhy mastných kyselin přibližně stejné zastoupení. Přesně opačný trend můžeme pozorovat u kmene *C. sorokiniana*. Také zastoupení mastných kyselin je zde srovnatelnější pouze pro 75 % koncentraci pozorujeme zvýšenou produkci MUFA. V případě kmene *C. reinhardtii* dosahují vyšší koncentrace lipidů vzorky kultivované na 75 a 150 % fosforu. Poměr mastných kyselin je pro všechny vzorky obdobný.

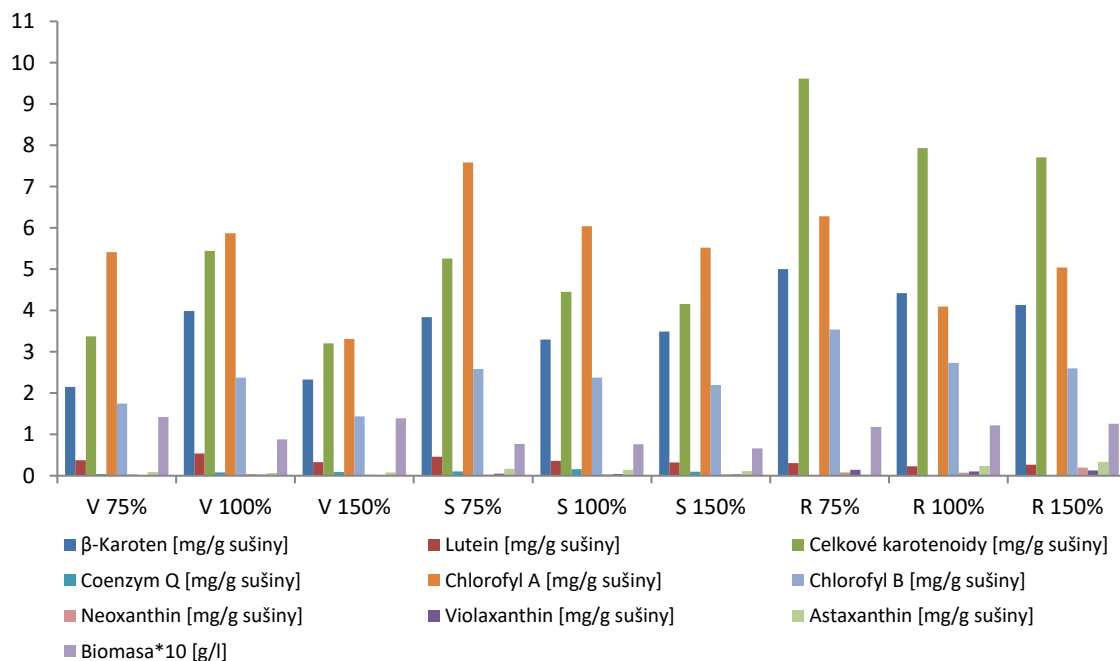
S výjimkou kmene *C. vulgaris*, kde měl největší zastoupení karotenoidů vzorek kultivován na 100 % fosforu, pozorujeme pokles produkce se zvyšující se koncentrací fosforu. Pokud porovnáme produkci karotenoidů u kmenů *Chlorella*, vidíme, že kmen *C. sorokiniana* dosahuje průměrně vyšší akumulace. Ačkoliv tento kmen dosahuje v porovnání nejnižšího nárůstu biomasy, zastoupení chlorofylu A je však nejvyšší. Poměrové zastoupení metabolitů je v rámci kmenů obdobné. Nejvyšší zastoupení (9,62 mg/g) pozorujeme u kmene *C. reinhardtii* na 75% koncentraci fosforu.



Obrázek č. 62 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různých koncentracích fosforu u kmenů *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* a *Chlamydomonas reinhardtii*



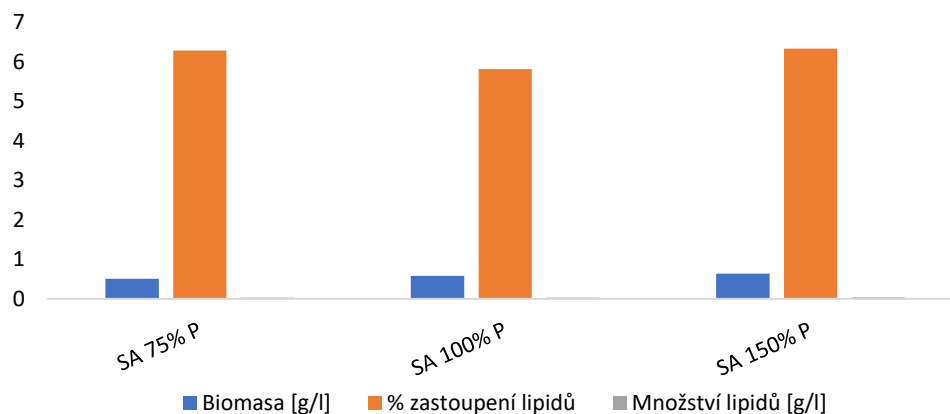
Obrázek č. 63 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech



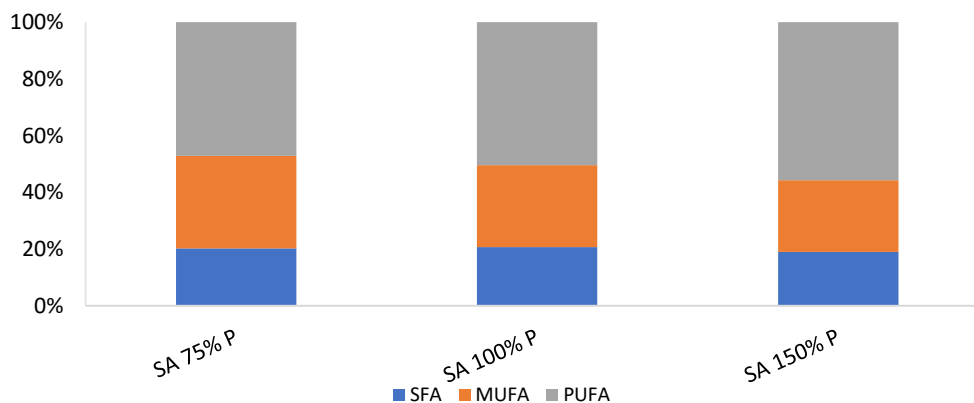
Obrázek č. 64 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různých koncentracích fosforu u kmenů *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* a *Chlamydomonas reinhardtii*

5.2.2.2 Kmen *Scenedesmus acutus*

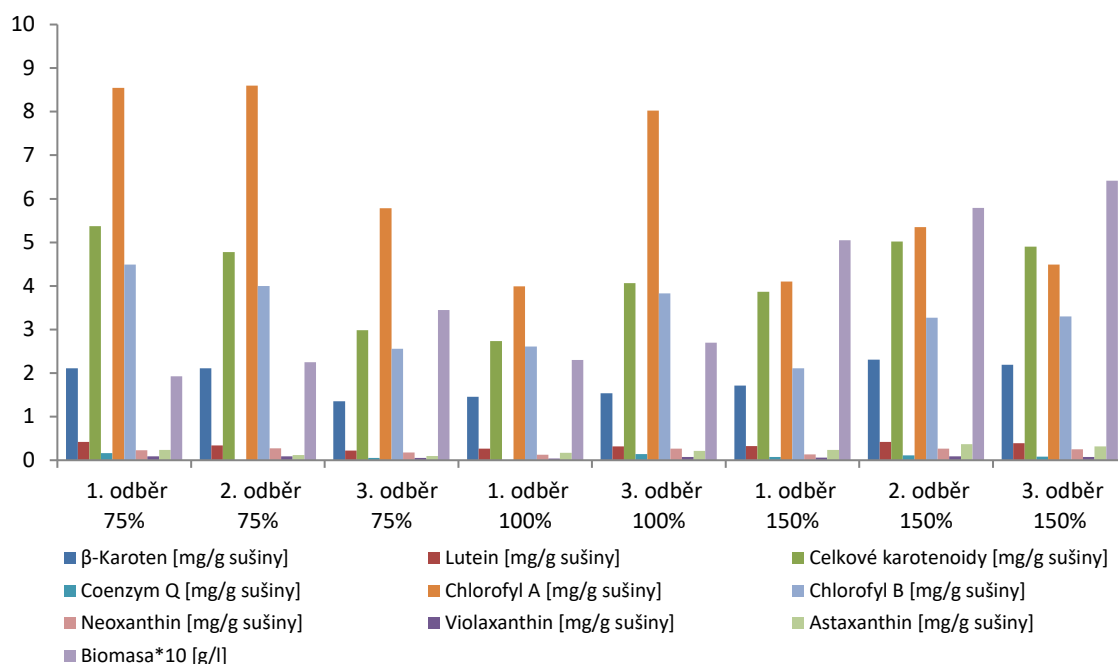
V případě dlouhodobého experimentu u kmene *S. acutus* můžeme pozorovat pouze mírný nárůst biomasy se zvyšující se koncentrací fosforu. V případě druhého odběru koncentrace 100 % došlo ke špatnému zpracování vzorku, na další již však nezbyla biomasa. Zvýšená produkce lipidů byla zaznamenána na 75 a 150 % koncentraci. Profil mastných kyselin se dále u všech vzorků shoduje a většinu tvoří PUFA mastné kyseliny. Při pohledu na produkci karotenoidů, pozorujeme pro koncentraci fosforu 75 % sníženou produkci s postupujícím časem kultivace. Pro ostatní koncentrace však pozorujeme nárůst. Při pohledu na finální odběry, pozorujeme nejvyšší zastoupení (4,90 mg/g) karotenoidů ve vzorku se 150 % koncentrací fosforu



Obrázek č. 65 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různé koncentraci fosforu u kmene *Scenedesmus acutus*



Obrázek č. 66 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech

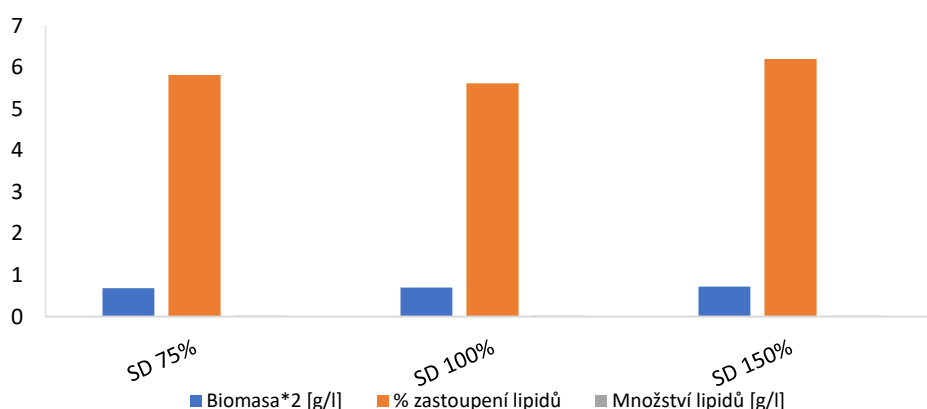


Obrázek č. 67 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různé koncentraci fosforu u kmene *Scenedesmus acutus*

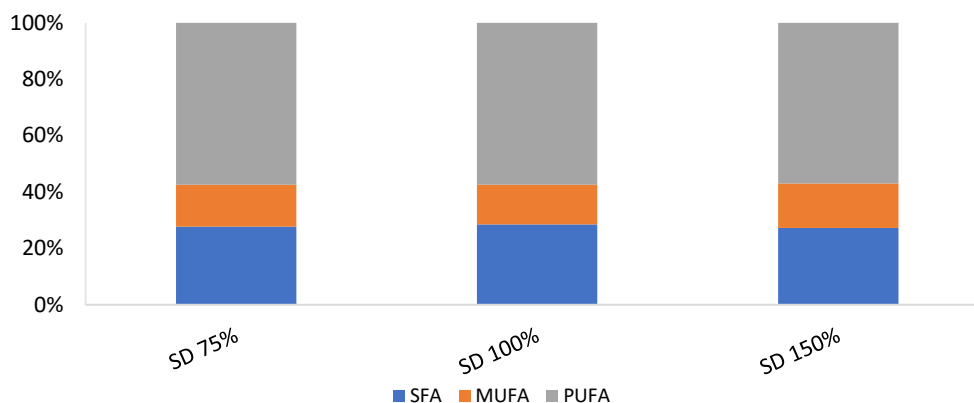
5.2.2.3 Kmen *Scenedesmus dimorphus*

V experimentu pro kmen *S. dimorphus* neměla koncentrace fosforu žádný vliv na nárůst biomasy. Zastoupení lipidů bylo nejvyšší pro koncentraci 150 %. Koncentrace fosforu při kultivaci však neměla vliv na zastoupení mastných kyselin ve vzorku. V případě 2. odběru o koncentraci 100 % došlo k chybné přípravě vzorku, biomasa však už byla spotřebována celá.

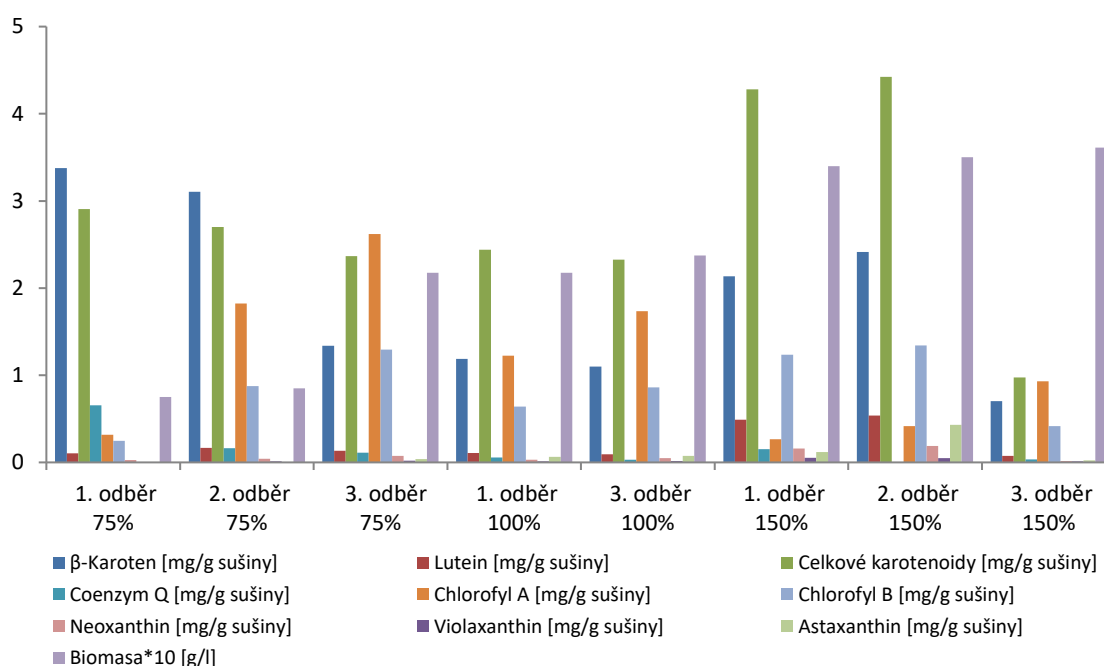
Při pohledu na celkové karotenoidy zaznamenáváme u koncentrací 75 a 100 % mírný pokles v závislosti na době kultivace, u finálního odběru 150 % koncentrace fosforu však pozorujeme výrazný pokles akumulace v porovnání s předchozími dvěma odběry. Značný pokles produkce koenzymu Q také nastal u vzorku s koncentrací 75 %, naopak došlo k nárůstu produkce chlorofylu A. Celkově nejvyšší zastoupení karotenoidů pozorujeme u vzorku se 150 % koncentrací. Ve finálních odběrech měl největší zastoupení (2,37 mg/g) vzorek na koncentraci 75 %.



Obrázek č. 68 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různé koncentraci fosforu u kmene *Scenedesmus dimorphus*



Obrázek č. 69 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech

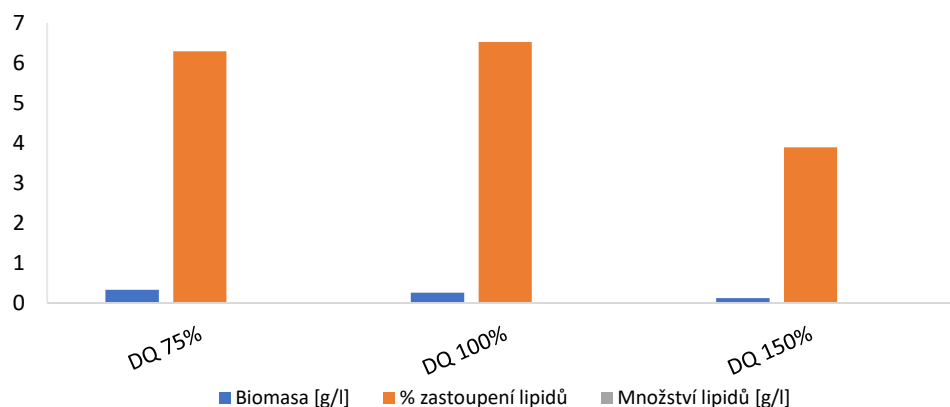


Obrázek č. 70 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různé koncentraci fosforu u kmene *Scenedesmus dimorphus*

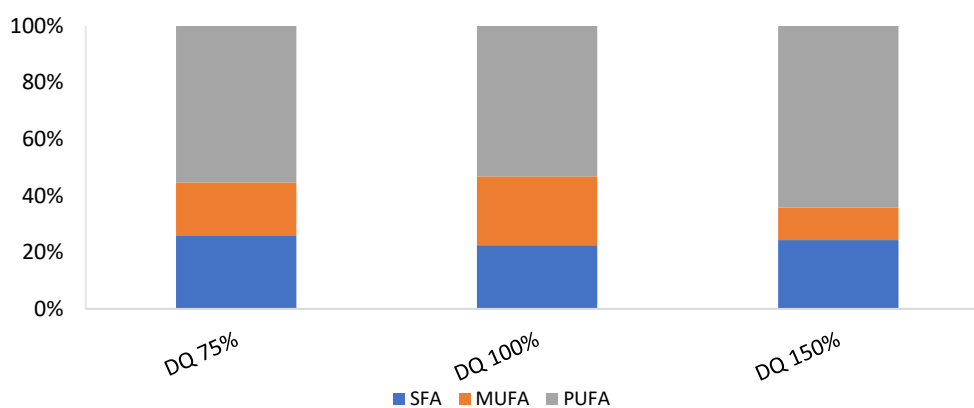
5.2.2.4 Kmen *Desmodesmus quadricauda*

Na rozdíl od předchozího případu byl u kmene *D. quadricauda* zaznamenán trend snížené produkce biomasy se zvyšující se koncentrací fosforu. Podíl lipidické složky nevykazoval jasnou závislost, nejnižší hodnoty však nabýval u vzorku při 150 % koncentraci fosforu. Podobně jako u ostatních kmenů bylo procentuální zastoupení mastných kyselin u všech vzorků obdobné s největším podílem PUFA mastných kyselin.

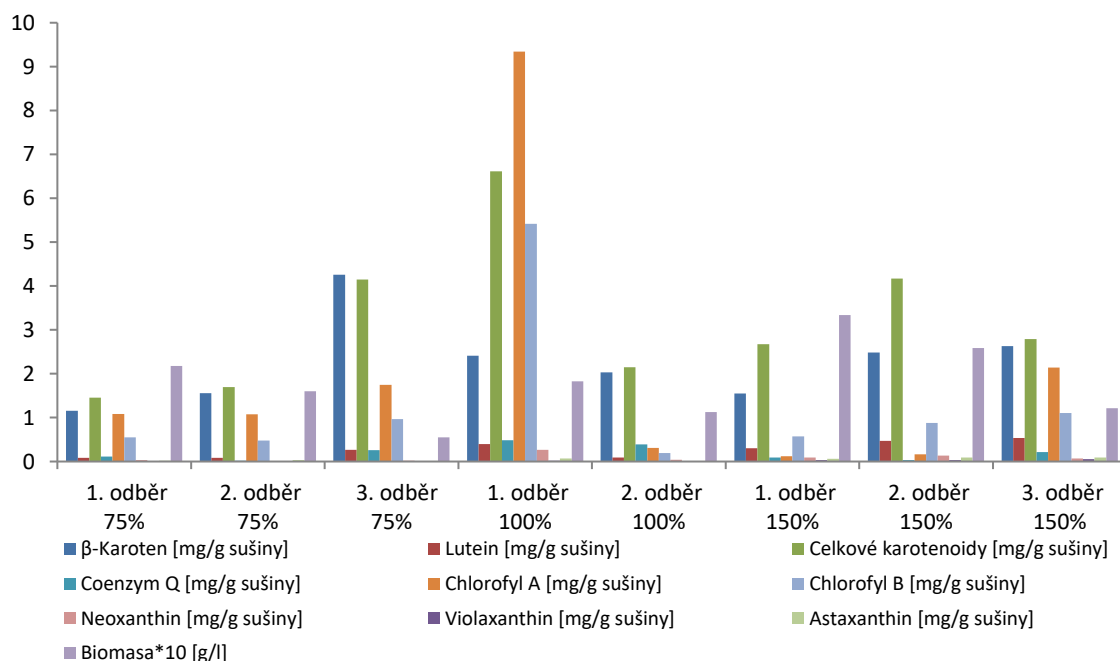
Produkce celkových karotenoidů byla v případě tohoto kmene u všech koncentrací s postupujícím časem odlišná. U finálního vzorku o koncentraci 100 % došlo k chybnému zhotovení vzorku pro analýzu, biomasa však byla spotřebována při předchozích analýzách. U 75 % koncentrace docházelo k nárůstu akumulace, u 100 % koncentrace produkce karotenoidů s časem naopak prudce klesla. V druhém odběru také pozorujeme výrazný pokles akumulace celkových chlorofylů v porovnání s prvním. U 150 % koncentrace zastoupení karotenoidů nejprve stoupl a pak kleslo, ve finálním vzorku však pozorujeme například nejvyšší koncentrace luteinu a chlorofylu A ve srovnání s dřívějšími odběry. Ve finálních odběrech měl nejvyšší zastoupení (4,15 mg/g) vzorek na 75% koncentraci.



Obrázek č. 71 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různé koncentraci fosforu u kmene *Desmodesmus quadricauda*



Obrázek č. 72 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech

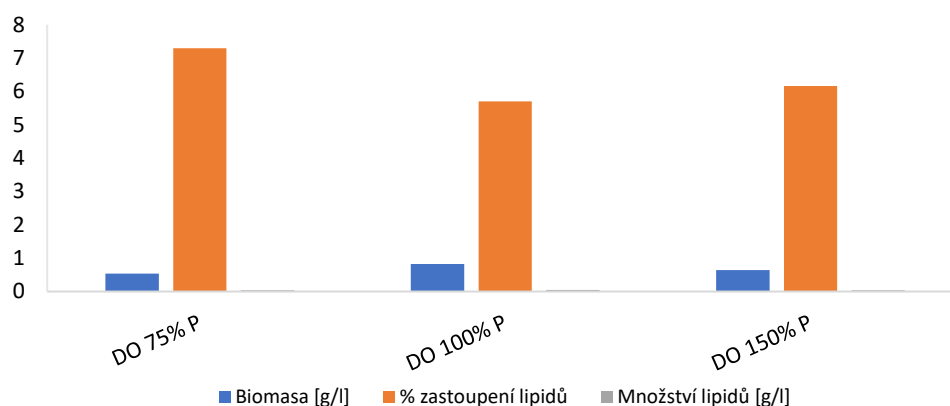


Obrázek č. 73 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různé koncentraci fosforu u kmene *Desmodesmus quadricauda*

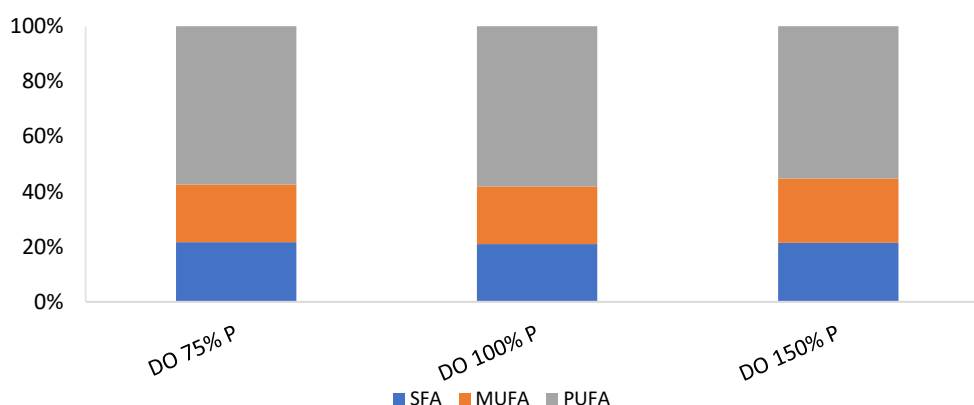
5.2.2.5 Kmen *Desmodesmus obliquus*

Ve srovnání s kmenem *D. quadricauda* nedošlo v tomto případě k úbytku nárůstu biomasy se zvyšující se koncentrací fosforu. U vzorku kultivovaném při nejnižší koncentraci byla naměřena největší akumulace lipidů. U všech vzorků lze pozorovat stejný profil zastoupení mastných kyselin s největším zastoupením PUFA mastných kyselin.

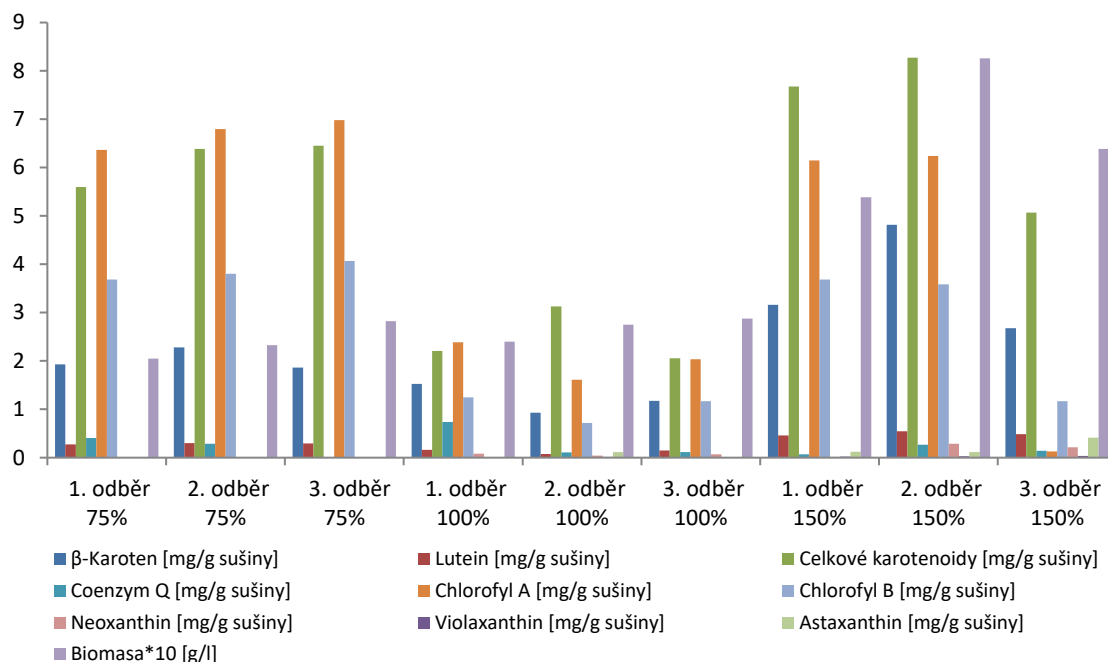
S výjimkou vzorku o koncentraci 75 % fosforu, pozorujeme u finálních odběrů nejnižší zastoupení karotenoidů ze všech odběrů. V případě 150 % koncentrace také pozorujeme téměř nulovou koncentraci chlorofylu A, a výrazný pokles zastoupení chlorofylu B. Celkově nejnižší produkci karotenoidů pozorujeme u vzorku se 100 % koncentrací fosforu. Ve všech vzorcích také pozorujeme nižší zastoupení β -karotenu ve finálním vzorku než ve vzorku z 1. odběru. Z posledních odběrů dosáhl nejvyššího zastoupení karotenoidů (6,45 mg/g) vzorek na koncentraci 75 % fosforu.



Obrázek č. 74 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různé koncentraci fosforu u kmene *Desmodesmus obliquus*



Obrázek č. 75 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech

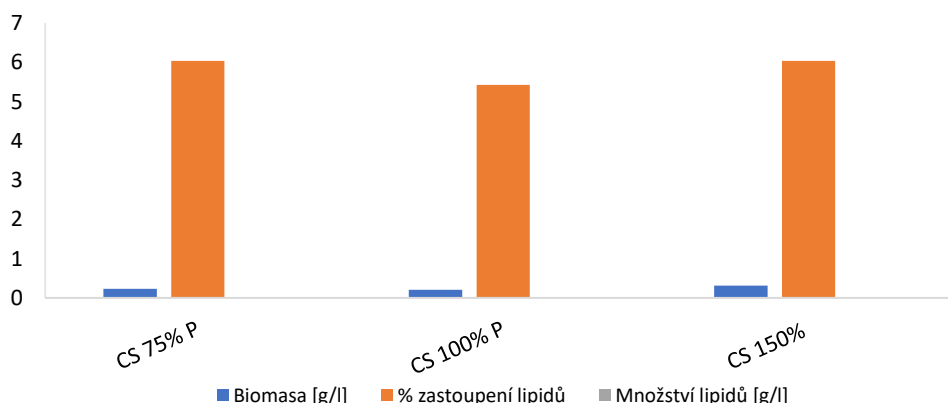


Obrázek č. 76 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různé koncentraci fosforu u kmene *Desmodesmus obliquus*

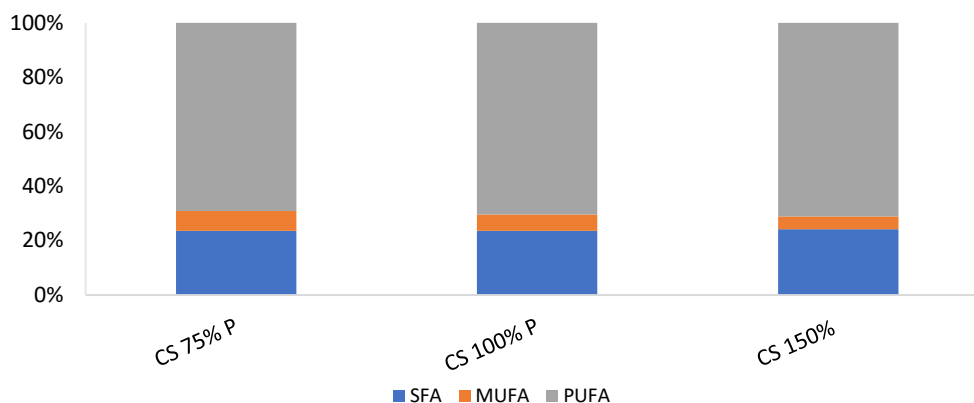
5.2.2.6 Kmen *Coccomyxa* sp.

U kmene *Coccomyxa* sp. Byla nejnižší biomasa zaznamenána u vzorku se 100 % koncentrací fosforu. Obdobně také procentuální zastoupení lipidů bylo u tohoto vzorku nejnižší. V porovnání s předchozími dlouhodobými experimenty měly nejmenší procentuální zastoupení lipidů MUFA mastné kyseliny, celkový profil byl však u všech případů stejný.

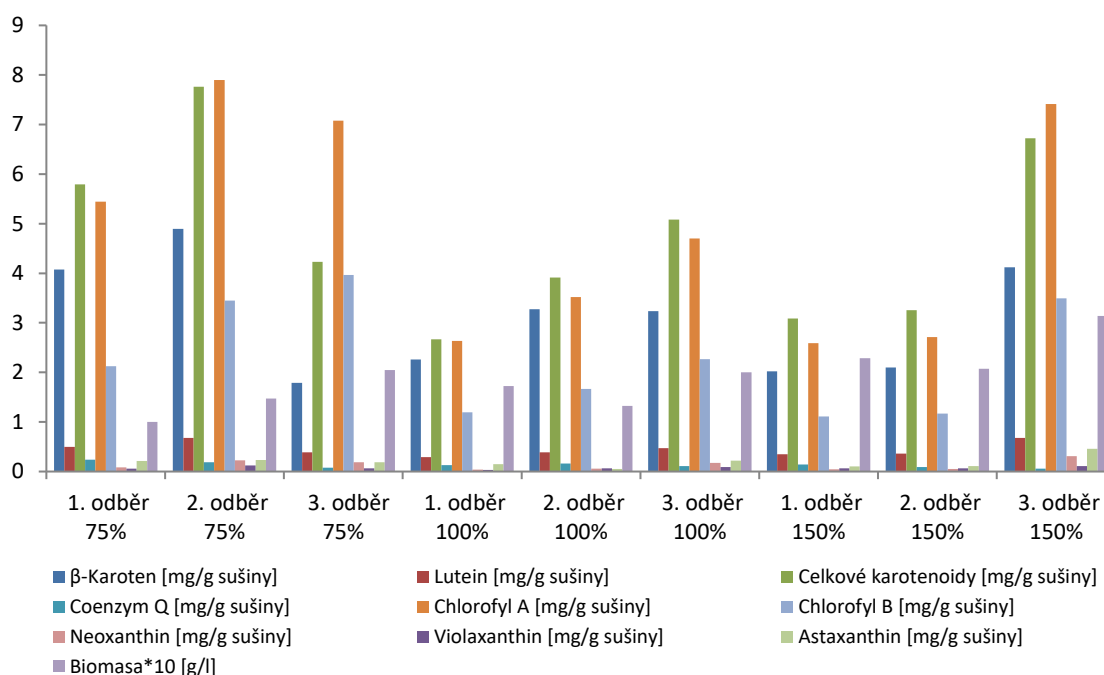
S výjimkou finálního odběru u vzorku se 75 % koncentrací fosforu lze pozorovat nárůst akumulace karotenoidů s postupujícím časem. U 75 % koncentrace však pozorujeme celkově jejich nejvyšší koncentraci. Pokud se zaměříme na finální odběry, lze zaznamenat nárůst produkce celkových karotenoidů se zvyšující se koncentrací, tedy nejvyšší zastoupení (6,72 mg/g) pozorujeme u vzorku o 150% koncentraci. Poměrové zastoupení karotenoidů je v rámci kmenů srovnatelné.



Obrázek č. 77 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různé koncentraci fosforu u kmene *Coccomyxa* sp.



Obrázek č. 78 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech



Obrázek č. 79 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různé koncentraci fosforu u kmene *Coccomyxa* sp.

5.2.3 Kultivace v přítomnosti chloridu železitého

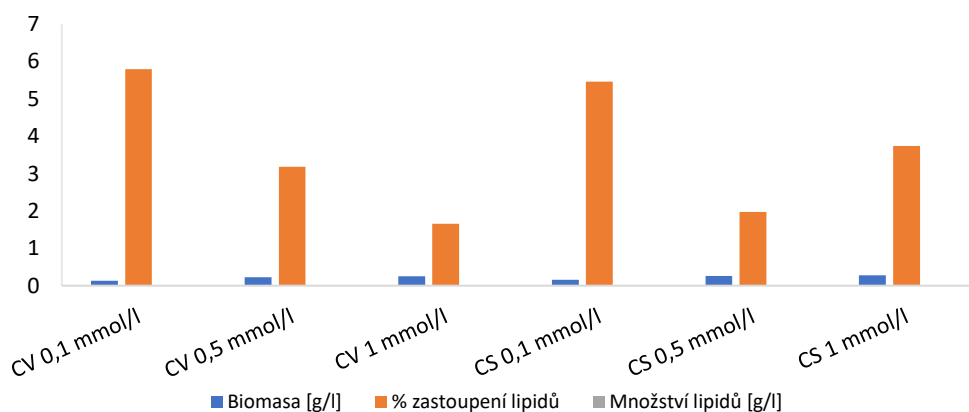
Experimenty s koncentracemi FeCl_3 jako stresovým faktorem měly trvání 14 dní. K jeho přidavku došlo po prvním týdnu kultivace a po dvou dnech po přidání (celkově 9. den) byl proveden odběr pro sledování nárůstu biomasy a karotenoidů.

5.2.3.1 Kmeny *Chlorella vulgaris* a *Chlorella sorokiniana*

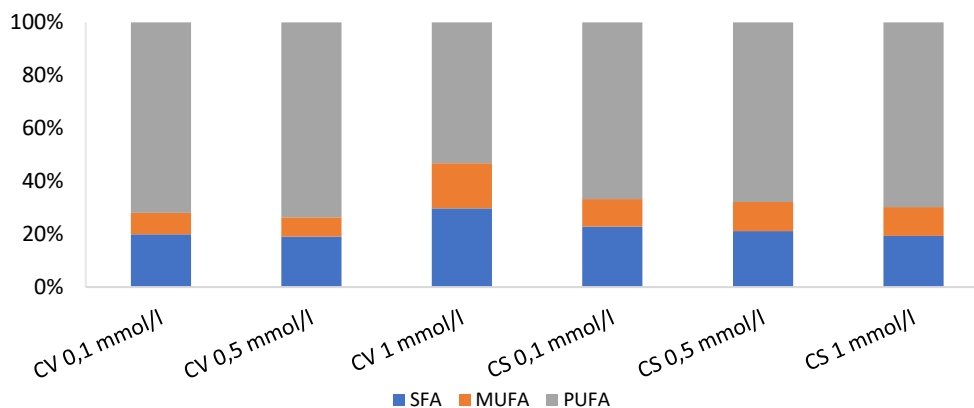
Na obrázku č. lze pozorovat nárůst biomasy se zvyšující se koncentrací FeCl_3 pro oba kmeny. V případě kmenu *C. vulgaris* došlo ke klesající produkci lipidického podílu biomasy. Celkové zastoupení karotenoidů v průběhu času kleslo u vzorku s 0,1 a 1 mmol/l koncentrací FeCl_3 . Nejvyšší akumulaci karotenoidů ve finálních odběrech (9,79 mg/g) obsahoval vzorek s 0,5 mmol/l koncentrací. V tomto vzorku pozorujeme nejvyšší zastoupení také jednotlivých metabolitů.

Ve srovnání kmen *C. sorokiniana* měla produkce lipidů nelineární klesající charakter. Procentuální zastoupení mastných kyselin je pro oba kmeny srovnatelný. Výjimku tvoří pouze vzorek kmene *C. vulgaris* kultivovaný při koncentraci 1 mmol/l FeCl_3 , kde došlo k větší produkci SFA a MUFA mastných kyselin.

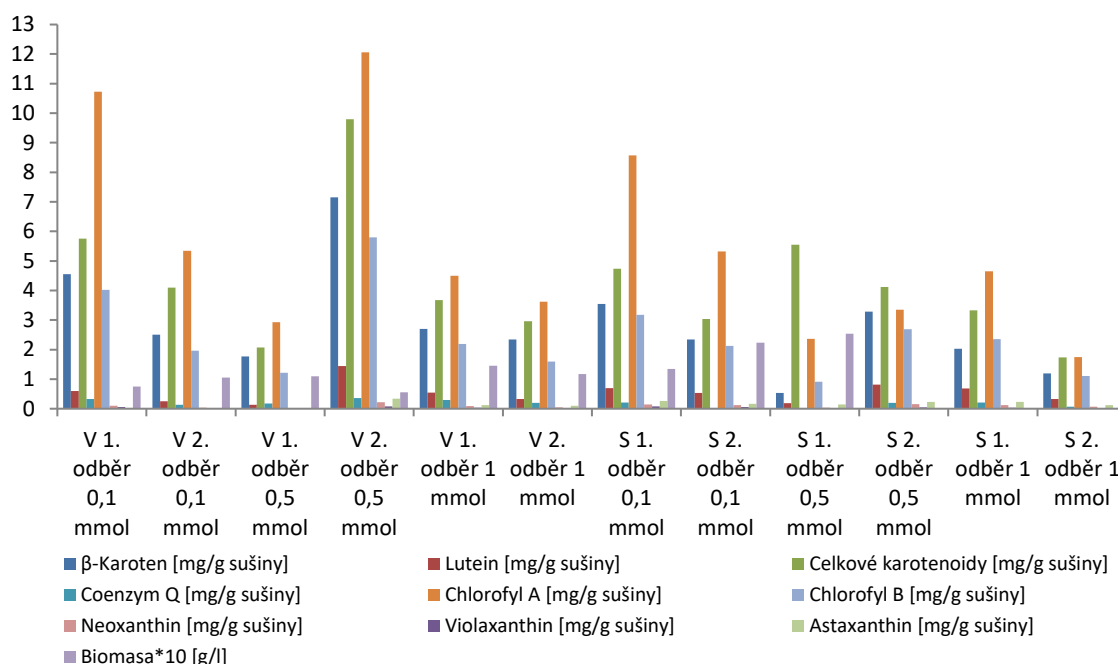
Pro tento kmen můžeme pozorovat pokles produkce karotenoidů s postupujícím časem. Nejvyšší produkce u finálních odběrů (4,12 mg/g) dosahuje vzorek o koncentraci 0,5 mmol/l FeCl_3 . Tam také pozorujeme největší akumulaci chlorofylu B. K největší akumulaci chlorofylu A však u finálních odběrů došlo u vzorku 0,1 mmol/l. Ve srovnání s kmenem *C. vulgaris* pozorujeme nižší produkci celkových karotenoidů.



Obrázek č. 80 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různé koncentraci fosforu u kmenů *Chlorella vulgaris* a *Chlorella sorokiniana*



Obrázek č. 81 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech

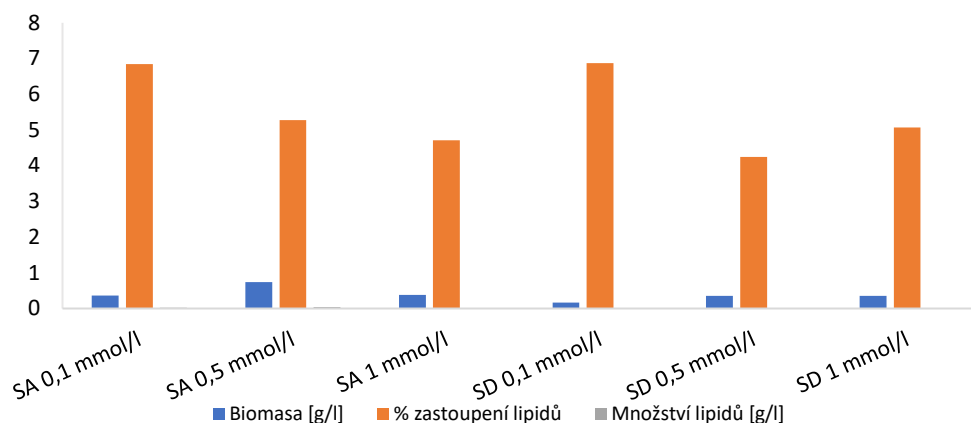


Obrázek č. 82 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různé koncentraci fosforu u kmenů *Chlorella vulgaris* a *Chlorella sorokiniana*

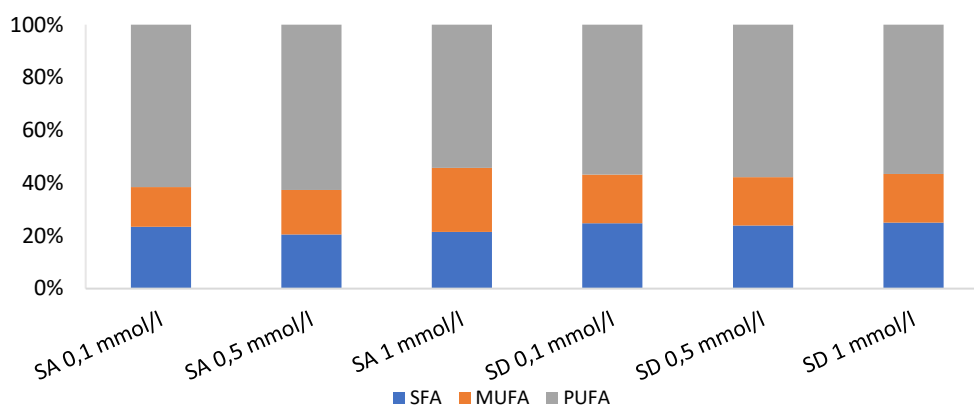
5.2.3.2 Kmeny *Scenedesmus acutus* a *Scenedesmus dimorphus*

Největší nárůst biomasy u kmene *S. acutus* pozorujeme u vzorku kultivovaném při koncentraci 0,5 mmol/l. Pro procentuální zastoupení lipidů v tomto případě platí trend snížení jejich produkce se zvyšující se koncentrací FeCl_3 . Celkové karotenoidy u finálních odběrů měly nejvyšší koncentraci (6,55 mg/g) ve vzorku s 0,1 mmol/l, pro vyšší koncentrace jejich zastoupení klesalo a nejnižší bylo u vzorku o 0,5 mmol/l koncentraci FeCl_3 . Nejnižší produkci chlorofylu B však pozorujeme u koncentrace 1 mmol/l.

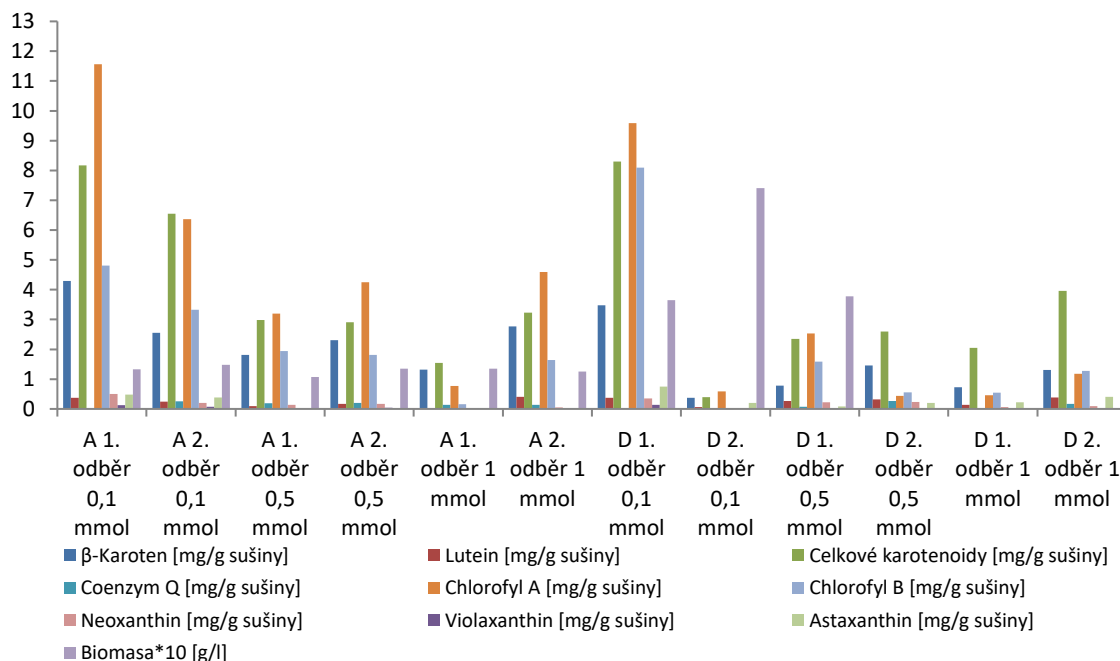
Kmen *S. dimorphus* vykazuje nárůst biomasy na vyšších koncentracích FeCl_3 , množství lipidů však naopak klesá. Jako v předchozí případě je procentuální zastoupení mastných kyselin u všech vzorků obdobné s největším podílem PUFA mastných kyselin. V tomto případě pozorujeme nárůst produkce karotenoidů v závislosti na čase. Výjimku tvoří vzorek s koncentrací 0,1 mmol/l, kde můžeme při prvním odběru pozorovat celkově nejvyšší nárůst, ve finálním odběru však jejich zastoupení značně kleslo. Nejvyšší akumulace ve finálních odběrech (3,96 mg/g) dosahoval vzorek o koncentraci 1 mmol/l. Produkce celkových karotenoidů také stoupala s vyššími koncentracemi. V porovnání s kmenem *S. acutus* pozorujeme sníženou produkci karotenoidů, značný pokles měla produkce chlorofylů a β-karotenu.



Obrázek č. 83 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různé koncentraci fosforu u kmenů *Scenedesmus acutus* a *Scenedesmus dimorphus*



Obrázek č. 84 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech

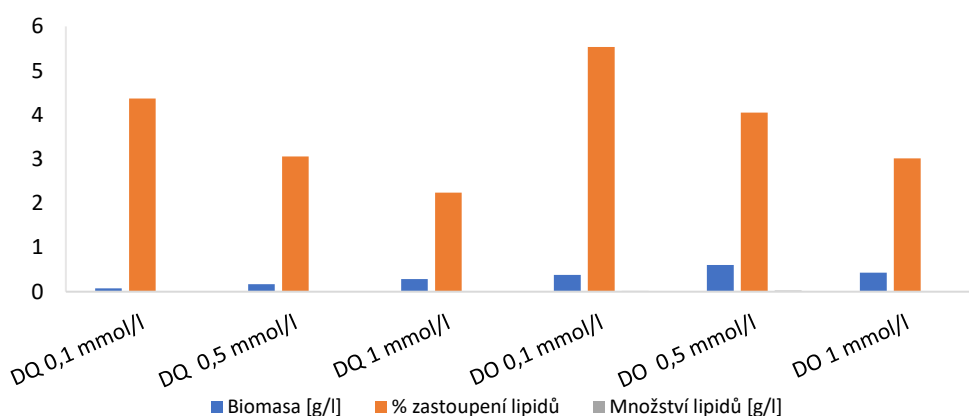


Obrázek č. 85 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různé koncentraci fosforu u kmenů *Scenedesmus acutus* a *Scenedesmus dimorphus*

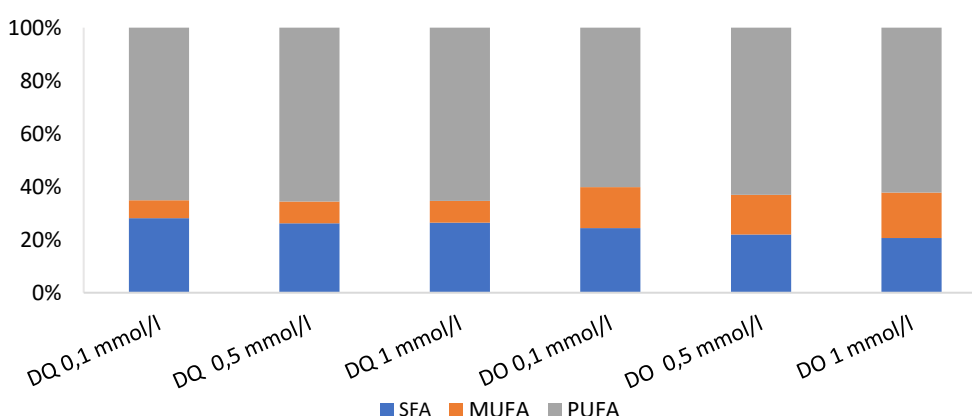
5.2.3.3 Kmeny *Desmodesmus quadricauda* a *Desmodesmus obliquus*

U kmene *D. quadricauda* vidíme nárůst biomasy se zvyšující se koncentrací FeCl_3 , z pohledu zastoupení lipidů však pozorujeme opačný trend. V experimentu pro kmen *D. obliquus* došlo k vyšší produkci biomasy při koncentraci 0,5 mmol/l FeCl_3 , podíl lipidů má podobně jako u kmene *D. quadricauda* klesající charakter. Profil mastných kyselin je u obou kmenů shodný, kmen *D. obliquus* má však větší zastoupení MUFA mastných kyselin.

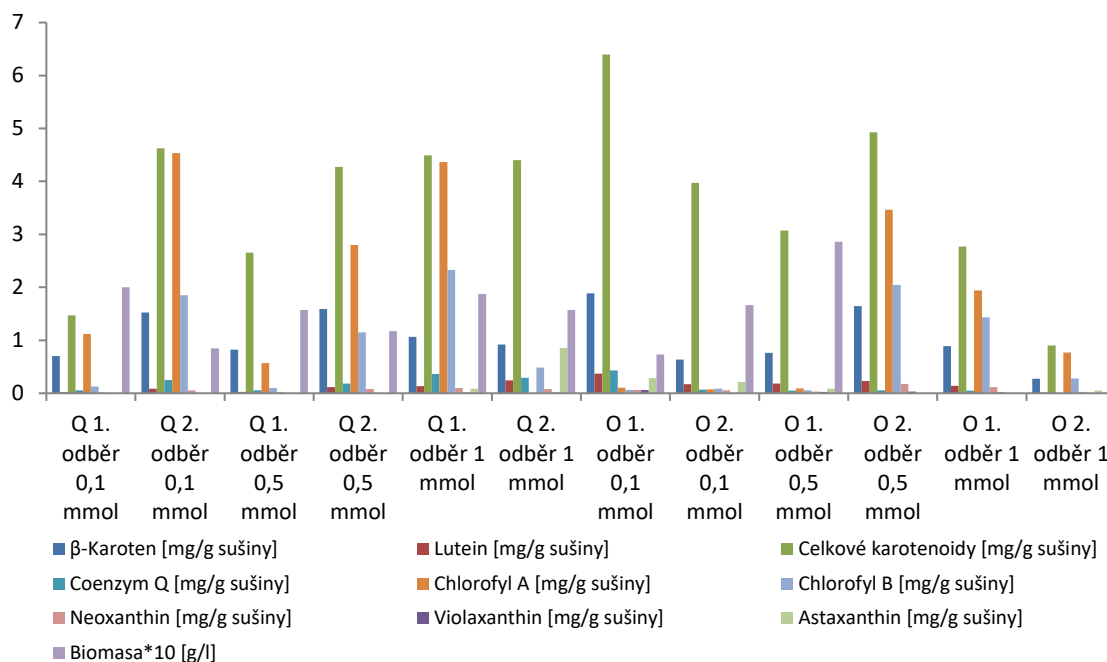
Pro oba kmeny má produkce karotenoidů v závislosti na čase buď klesající, či stoupající charakter. Při pohledu na finální odběry pozorujeme u kmene *D. quadricauda* nejvyšší koncentraci (4,62 mg/g) ve vzorku o koncentraci 0,1 mmol/l. V porovnání jsou však produkované celkové karotenoidy u všech koncentrací srovnatelné. Se zvyšující se koncentrací je patrný úbytek zastoupení chlorofylu A a B. U vzorku 1 mmol/l také pozorujeme zvýšenou produkci astaxantinu. U kmene *D. obliquus* maximální hodnoty (4,93 mg/g) nabývá vzorek s koncentrací 0,5 mmol/l FeCl_3 . Ačkoliv zastoupení karotenoidů u vzorku 0,1 mmol/l není nejnižší, lze pozorovat téměř nulovou produkci chlorofylů. Ve srovnání s kmenem *D. quadricauda* má tento kmen celkově nižší produkci celkových karotenoidů.



Obrázek č. 86 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různé koncentraci fosforu u kmenů *Desmodesmus quadricauda* a *Desmodesmus obliquus*



Obrázek č. 87 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech

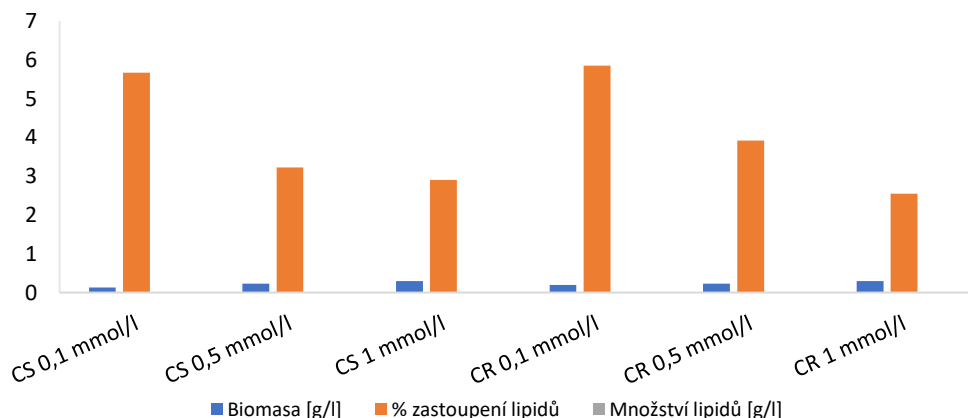


Obrázek č. 88 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různé koncentraci fosforu u kmenů *Desmodesmus quadricauda* a *Desmodesmus obliquus*

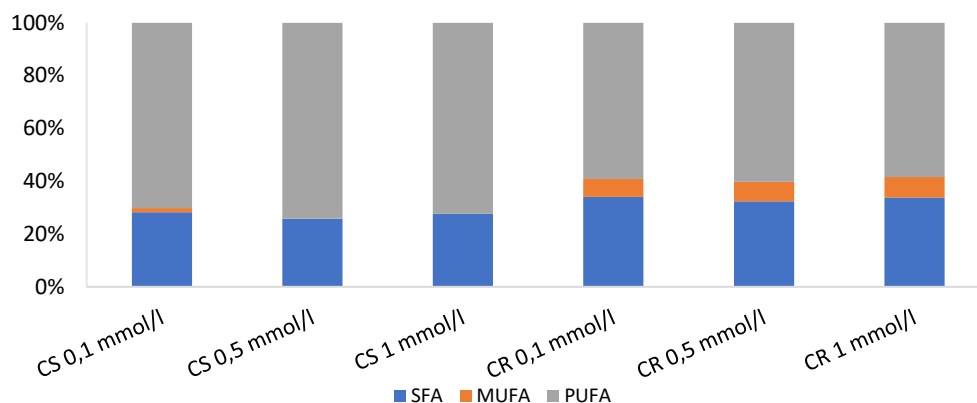
5.2.3.4 Kmeny *Coccomyxa* sp. A *Chlamydomonas reinhardtii*

V případě obou těchto kmenů došlo k nárůstu biomasy se zvyšující se koncentrací FeCl_3 , naopak došlo k poklesu produkce lipidické složky. Podobně i podílové zastoupení mastných kyselin je pro oba kmeny podobné, u kmene *Coccomyxa* sp. pozorujeme produkci MUFA mastných kyselin pouze pro koncentraci 0,1 mmol/l FeCl_3 .

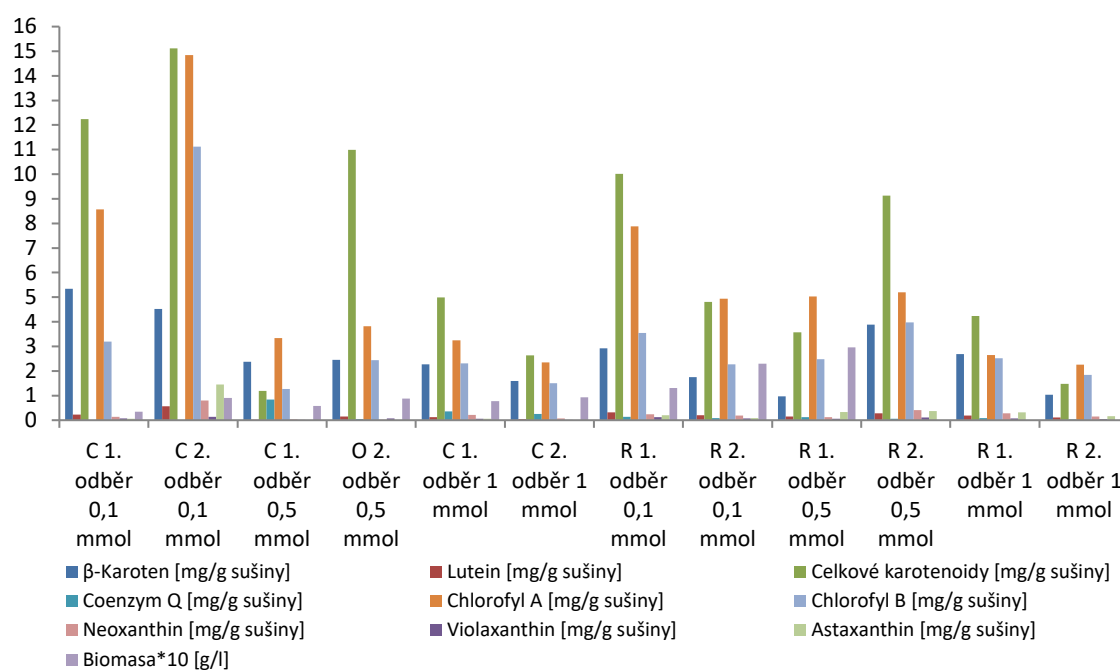
Jako v předchozím případě u obou kmenů celkové zastoupení karotenoidů v čase u všech vzorků klesá či stoupá bez závislosti na koncentraci FeCl_3 . U kmene *Coccomyxa* sp. U finálních odběrů pozorujeme pokles produkce karotenoidů se zvyšující se koncentrací. Nejvyšší zastoupení karotenoidů ve finálních odběrech (15,12 mg/g) tedy nalezneme u vzorku 0,1 mmol/l, kde také můžeme pozorovat vyšší produkci astaxantinu. U vzorku 0,5 mmol/l také pozorujeme poměrově nižší produkci chlorofylů než u ostatních vzorků. Kmen *C. reinhardtii* produkoval nejvíce karotenoidů (9,13 mg/g) při koncentraci 0,5 mmol/l FeCl_3 . Poměrově však pozorujeme sníženou produkci chlorofylů. V porovnání s kmenem *Coccomyxa* sp. také zaznamenáváme nižší celkovou produkci karotenoidů.



Obrázek č. 89 Grafické znázornění produkce lipidů v závislosti na různé koncentraci fosforu u kmenů *Coccomyxa* sp. A *Chlamydomonas reinhardtii*



Obrázek č. 90 Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech



Obrázek č. 91 Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů v závislosti na různé koncentraci fosforu u kmenů *Coccomyxa* sp. A *Chlamydomonas reinhardtii*

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo studium produkčních vlastností vybraných mikroorganismů ve stresových podmínkách. Sledovanými kmeny kvasinek byly *Rhodotorula kratochvilovae*, *Rhodotorula mucilaginosa* (24) a *Rhodotorula mucilaginosa* (28), *Rhodosporidium toruloides*, *Cystofilobasidium macerans*, *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Sporidiobolus salmonicolor* a *Sporidiobolus metaroseus*. Byla sledována produkce metabolitů, jako jsou lipidy, karotenoidy, ergosterol a koenzym Q. Zvolenými stresovými faktory byly různé zdroje uhlíku z odpadních produktů, vliv salinity v kombinaci s osvětlením či jeho absencí, a přítomnost různých koncentrací FeCl_3 . Použité řasové kmeny byly *Synechococcus nidulans*, *Coccomyxa* sp., *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus acutus*, *Desmodesmus quadricauda* a *Desmodesmus obliquus*. Pro jejich kultivaci byly zvolenými stresovými faktory různé zdroje a koncentrace dusíku, různé koncentrace fosforu a přítomnost koncentrace FeCl_3 .

V experimentech na různých zdrojích uhlíku byly jednotlivé kmeny kultivovány paralelně na 6 zdrojích uhlíku. Jako zdroje byly zvoleny průmyslové odpady, jako je například syrovátka. Zkoumána byla možnost valorizace těchto odpadních produktů, které by mohly být využívány pro levnější kultivace a zvýšenou produkci metabolitů. Bez ohledu na kmen byly celkové výtěžky biomasy vyšší na médiích obsahujících syrovátku. U kmene *Rhodotorula kratochvilovae* je zaznamenána nejvyšší produkce karotenoidů (3,01 mg/g) na syrovátce v kombinaci s glycerolem, z pohledu lipidů je jejich zastoupení nejvyšší (12,15 %) na syrovátkovém médiu. Kmen *Cystofilobasidium infirmominiatum* pozorujeme zvýšenou produkci karotenoidů na médiu s glukózou a syrovátkou v kombinaci s melasou, na glukóze také došlo k největší akumulaci lipidů. V porovnání kmen *Cystofilobasidium macerans* projevuje zvýšenou produkci karotenoidů na glycerolu melase v kombinaci se syrovátkou. Na melase a glukóze také byla také zaznamenána zvýšená akumulace lipidických látek. U kmene *Rhodotorula mucilaginosa* (24) došlo ke snížené produkci karotenoidů stejně tak jako lipidů na syrovátkových médiích. Největší zastoupení karotenoidů (1,73 mg/g) pozorujeme na médiu z melasy, kde pozorujeme vyšší produkci také lipidů. Jejich největší akumulace však byla na glukóze. V porovnání s kmenem (24) pozorujeme výrazně vyšší produkci biomasy a metabolitů. Na glycerolovém médiu byla produkce karotenoidů (5,02 mg/g) více než dvojnásobná v porovnání s glukózou a melasou, na syrovátkových médiích byla produkce inhibována. Největší procentuální zastoupení lipidů lze zaznamenat na glukózovém médiu.

Dalšími použitými stresy byla přítomnost NaCl a světelného záření či jeho absence. Již na první pohled že osvětlení či jeho absence neměla na produkci biomasy a metabolitů znatelný vliv. U kmene *Rhodosporidium toruloides* pozorujeme nejvyšší produkci karotenoidů (5,86 mg/g) u 0,5 mol/l NaCl pro osvětlené vzorky a u kontrolního vzorku pro neosvětlenou sadu. Kmen *Cystofilobasidium infirmominiatum* vykazuje nejvyšší produkci karotenoidů (2,26 mg/g) u vzorků s 0,5 mol/l NaCl v přítomnosti osvětlení. U vyšších koncentrací také pozorujeme zvýšenou produkci koenzymu Q. V případě kmene *Sporidiobolus metaroseus* docházelo ke snížení produkce karotenoidů se zvyšující se koncentrací NaCl . Naopak kmen *Rhodotorula mucilaginosa* (28) vykazuje zvýšenou produkci těchto látek při vyšších koncentracích než 0,5 mol/l. V případě procentuálního zastoupení lipidů platí pro všechny kmeny, že dochází k stagnaci produkce lipidických v závislosti na zvyšujícím se osmotickým tlaku.

Při použití FeCl_3 můžeme v produkci lipidů pozorovat pokles procentuálního zastoupení se zvyšující se koncentrací FeCl_3 . Výjimku tvoří pouze kmeny *Cystofilobasidium macerans* a *Sporidiobolus metaroseus*, kde zastoupení naopak roste a při koncentraci 20 mmol/l FeCl_3 pozorujeme výrazný pokles produkce lipidických látek. Z pohledu produkce karotenoidů pozorujeme u každého kmene jiný trend. Produkce karotenoidů u kmene *Rhodotorula kratochvilovae* je nejvyšší (1,10 mg/g) u kontrolního vzorku a na koncentraci 10 mmol/l FeCl_3 , kde pozorujeme i vyšší produkci koenzymu Q. Kmen *Rhodotorula mucilaginosa* (24) vykazuje výrazně vyšší zastoupení karotenoidů (3,99 mg/g) u vzorku s koncentrací 20 mmol/l. V porovnání s kmenem (24) u kmene (28) pozorujeme pokles produkce karotenoidů se zvyšující se koncentrací FeCl_3 . Nejvyšší produkci karotenoidů (3,69 mg/g) u kmene *Rhodospiridium toruloides* pozorujeme u kontrolního vzorku. V případě kmene *Cystofilobasidium macerans* byla produkce karotenoidů u všech vzorků srovnatelná, pouze u vzorku 5 mmol/l FeCl_3 byla produkce mírně zvýšená. Ve srovnání s tímto kmenem byla produkce u kmene *Cystofilobasidium infirmominiatum* nižší a nelišila se v závislosti na koncentraci. Kmen *Sporidiobolus salmonicolor* měl nejvyšší produkci (1,59 mg/g) u vzorku 20 mmol/l. Oproti tomu kmen *Sporidiobolus metaroseus* dosahoval nejvyšší produkce (3,86 mg/g) na kontrolním vzorku.

Jako zdroje dusíku pro kultivaci mikrořas a sinic byl použit dusičnan sodný a močovina ke kultivaci byl využit multikultivátor. Pro všechny kmeny platilo, že nárůst biomasy byl vyšší na močovině, než na NaNO_3 v případě celkových karotenoidů tomu bylo naopak. V případě kmene *Synechococcus nidulans* pozorujeme nejvyšší (6,67 mg/g) akumulaci karotenoidů a lipidů na koncentraci 150 % NaNO_3 v porovnání s ostatními vzorky. Na močovině byla produkce karotenoidů v porovnání nižší než na NaNO_3 a rostla se zvyšující se koncentrací. Kmen *Chlorella sorokiniana* dosahoval vyššího zastoupení lipidů na močovině, celkové karotenoidy však mají větší zastoupení na NaNO_3 . U kmene *Coccomyxa* sp. pozorujeme nejvyšší (7,26 %) procentuální zastoupení lipidů u vzorku s 80 % koncentrací močoviny. V případě karotenoidů byla produkce vyšší na NaNO_3 a při 100 % koncentraci dosáhla nejvyšší hodnoty (7,98 mg/g). Kmen *Chlorella vulgaris* dosahuje vyšší produkce lipidů na močovině a karotenoidy na její 60 % koncentraci mají největší zastoupení (8,45 mg/g).

U krátkodobých kultivací na různých koncentracích pozorujeme pokles produkce biomasy a karotenoidů s nárůstem koncentrace fosforu. Výjimku tvoří kmen *Chlorella vulgaris*, kde byla produkce karotenoidů nejvyšší (5,44 mg/g) na 100 % koncentraci fosforu, nejvyšší zastoupení lipidů (11,37 %) však bylo ve vzorku o 150 % koncentraci. Naopak u kmene *Chlorella sorokiniana* lze pozorovat nejvyšší zastoupení lipidů (8,80 %) na koncentraci 75 %. V případě kmene *Chlamydomonas reinhardtii* byly rozdíly v produkci zanedbatelné. U dlouhodobých experimentů bylo procentuální zastoupení lipidů u všech vzorků srovnatelné pro každou koncentraci, v případě kmene *Desmodesmus quadricauda* byl pozorován pokles akumulace při koncentraci 150 % a u kmene *Desmodesmus obliquus* nárůst při koncentraci 75 %. Zastoupení celkových karotenoidů s postupujícím časem pro různé kmeny buď stoupalo či klesalo bez zjevné závislosti. U kmene *Scenedesmus acutus* pozorujeme nejvyšší produkci karotenoidů (4,90 mg/g) na 150 % koncentraci fosforu. Při srovnání kmen *Scenedesmus dimorphus* dosáhl nejvyššího zastoupení (2,37 mg/g) na koncentraci 75 %. U kmene *Coccomyxa* sp. nejvyšší produkce (6,72 mg/g) dosáhl vzorek při koncentraci 150 %.

Poslední kultivace řas probíhaly za přítomnosti různých koncentrací FeCl_3 . Ve většině případů nárůst biomasy se zvyšující se koncentrací rostl, zastoupení lipidů však naopak klesalo. Podobně jako u experimentů s fosforem, i zde zastoupení karotenoidů s postupujícím časem nevykazovalo jednotný trend. U kmene *Chlorella vulgaris* došlo k nejvyšší produkci karotenoidů (9,79 mg/g) u vzorku o koncentraci 0,5 mmol/l FeCl_3 . Stejně na tom byl také kmen *Chlorella sorokiniana*. V případě kmene *Desmodesmus quadricauda* bylo konečné zastoupení karotenoidů ve všech vzorcích srovnatelné.

Oproti tomu u kmene *Desmodesmus obliquus* můžeme zaznamenat nejvyšší zastoupení (4,93 mg/g) ve vzorku o koncentraci 0,5 mmol/l. Kmen *Scenedesmus acutus* vykazuje nejvyšší produkci karotenoidů (6,55 mg/g) při koncentraci 0,1 mmol/l, naopak kmen *Scenedesmus dimorphus* při koncentraci 1 mmol/l. V případě kmene *Coccomyxa* sp. pozorujeme výrazný nárůst karotenoidů (15,12 mg/g) ve vzorku o koncentraci 0,1 mmol/l. U kmene *Chlamydomonas reinhardtii* je to pak vzorek o koncentraci 0,5 mmol/l.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BARSANTI, L. a P.. GUALTIERI. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Second edition. Boca Raton, [Florida]: CRC Press/Taylor, 2014.
- [2] MASOJÍDEK, Jiří. *Mikrořasy – solární továrna v jedné buňce*. Praha: Academia, 2016. Věda kolem nás.
- [3] VOET, Donald, Judith G. VOET a Charlotte W. PRATT, c2008. *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*. 3rd ed. Hoboken, NJ: Wiley. ISBN 978-0470129302.
- [4] KOPECKÝ, Jiří, Richard LHOTSKÝ a Jindřiška PAICHLOVÁ. *Aktivní látky mikrořas ve výživě*. Praha: Academia, 2017. Věda kolem nás.
- [5] VAN'T RIET, Klaas a Johannes TRAMPER. *Basic Bioreactor Design* [online]. CRC Press, 1991 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1201/9781482293333. ISBN 9780429182365.
- [6] GUSCHINA, Irina A. a John L. HARWOOD. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* [online]. 2006, **45**(2), 160-186 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.plipres.2006.01.001. ISSN 01637827. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782706000026>
- [7] HARWOOD, John L. a Irina A. GUSCHINA. The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie* [online]. 2009, **91**(6), 679-684 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.biochi.2008.11.004. ISSN 03009084. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908408003131>
- [8] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6. SAHA, Sushanta Kumar, Edward MCHUGH, Jeremiah HAYES, Siobhan MOANE, Daniel WALSH a Patrick MURRAY. Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology* [online]. 2013, **128**, 118-124 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.10.049. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852412015519>
- [9] SAHA, Sushanta Kumar, Edward MCHUGH, Jeremiah HAYES, Siobhan MOANE, Daniel WALSH a Patrick MURRAY. Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology* [online]. 2013, **128**, 118-124 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.10.049. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852412015519>
- [10] ŘEZANKA, Tomáš, Jaromír LUKAVSKÝ, Linda NEDBALOVÁ, Irena KOLOUCHOVÁ a Karel SIGLER. Effect of starvation on the distribution of positional isomers and enantiomers of triacylglycerol in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry* [online]. 2012, **80**, 17-27 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.05.021. ISSN 00319422. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942212002427>
- [11] CERÓN, M. C., M. C. GARCÍA-MALEA, J. RIVAS, F. G. ACIEN, J. M. FERNANDEZ, E. DEL RÍO, M. G. GUERRERO a E. MOLINA. Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2007, **74**(5), 1112-1119 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1007/s00253-006-0743-5. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0743-5>
- [12] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [13] SCHNURR, Peter J. a D. Grant ALLEN. Factors affecting algae biofilm growth and lipid production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2015, **52**, 418-429 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.rser.2015.07.090. ISSN 13640321. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032115007376>
- [14] ZIENKIEWICZ, Krzysztof, Zhi-Yan DU, Wei MA, Katharina VOLLHEYDE a Christoph BENNING. Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae — Molecular, cellular and

- physiological insights. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* [online]. 2016, **1861**(9), 1269-1281 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.bbalip.2016.02.008. ISSN 13881981. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198116300294>
- [15] LINSKENS, H. F., J. F. JACKSON a G. W. M. BARENDSE, c1987. *High performance liquid chromatography in plant sciences*. New York: Springer-Verlag. ISBN 0387172432.
- [16] LINSKENS, Hans-Ferdinand a John F. JACKSON, ed. *High Performance Liquid Chromatography in Plant Sciences* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1987 [cit. 2020-07-28]. Modern Methods of Plant Analysis. DOI: 10.1007/978-3-642-82951-2. ISBN 978-3-642-82953-6.
- [17] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1982, 483 s.
- [18] ROBERTSON, J. B., C. R. DAVIS a C. H. JOHNSON. Visible light alters yeast metabolic rhythms by inhibiting respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2013, **110**(52), 21130-21135 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1073/pnas.1313369110. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1313369110>
- [19] VON WETTSTEIN, D., S. GOUGH a C. G. KANNANGARA. Chlorophyll Biosynthesis. *The Plant Cell* [online]. , 1039-1057 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1105/tpc.7.7.1039. ISSN 1040-4651. Dostupné z: <http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.7.7.1039>
- [20] VON WETTSTEIN, D. Chlorophyll Biosynthesis. THE PLANT CELL ONLINE. 7(7), 10391057. DOI: 10.1105/tpc.7.7.1039. ISSN 10404651. Dostupné také z: <http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.7.7.1039>
- [21] H. Morais, A. Abram, F. Ferreira. Carotenoids Biosynthesis –a review. *Revista Lusófona de Humanidades e Tecnologias*. 2010; 1 (10); 22-42. Disponíble en: <http://revistas.ulusofofona.pt/index.php/rhumanidades/article/view/1270b>
- [22] SUZUKI, Jon Y., David W. BOLLIVAR a Carl E. BAUER. GENETIC ANALYSIS OF CHLOROPHYLL BIOSYNTHESIS. *Annual Review of Genetics* [online]. 1997, **31**(1), 61-89 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1146/annurev.genet.31.1.61. ISSN 0066-4197. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.genet.31.1.61>
- [23] SAMPAIO, J P, M GADANHO, S SANTOS, F L DUARTE, C PAIS, A FONSECA a J W FELL. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporeidium*: *Rhodosporeidium kratochvilovae* and related anamorphic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2001, **51**(2), 687-697 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1099/00207713-51-2-687. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-51-2-687>
- [24] SAMPAIO, J P, M GADANHO a R BAUER. Taxonomic studies on the genus *Cystofilobasidium*: description of *Cystofilobasidium ferigula* sp. nov. and clarification of the status of *Cystofilobasidium lari-marini*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2001, **51**(1), 221-229 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1099/00207713-51-1-221. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-51-1-221>
- [25] RAO, A a L RAO. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research* [online]. 2007, **55**(3), 207-216 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.phrs.2007.01.012. ISSN 10436618. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661807000357>
- [26] OSTOJIC, S., M. PAVLOVIC, M. ŽIVIC, Z. FILIPOVIC, S. GORJANOVIC, S. HRANISAVLJEVIC a M. DOJČINOVIĆ. Processing of whey from dairy industry waste. *Environmental Chemistry Letters* [online]. 2005, **3**(1), 29-32 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1007/s10311-005-0108-9. ISSN 1610-3653. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10311-005-0108-9>

- [27] ROWLES, Joe L. a John W. ERDMAN. Carotenoids and their role in cancer prevention. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* [online]. 2020 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.bbailip.2020.158613. ISSN 13881981. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198120300056>
- [28] [online]. [cit. 2020-07-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [29] WILLAERT, Ronnie. Yeast Biotechnology. *Fermentation* [online]. 2017, 3(1) [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.3390/fermentation3010006. ISSN 2311-5637. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2311-5637/3/1/6>
- [30] MATA-GÓMEZ, Luis, Julio MONTAÑEZ, Alejandro MÉNDEZ-ZAVALA a Cristóbal AGUILAR. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories* [online]. 2014, 13(1) [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1186/1475-2859-13-12. ISSN 1475-2859. Dostupné z: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-13-12>
- [31] TASKIN, Mesut, Serkan ORTUCU, Mehmet Nuri AYDOGAN a Nazli Pinar ARSLAN. Lipid production from sugar beet molasses under non-aseptic culture conditions using the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* TR29. *Renewable Energy* [online]. 2016, 99, 198-204 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.renene.2016.06.060. ISSN 09601481. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960148116305912>
- [32] YAHIA, E. M. Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry and human health. 2nd edition. Hoboken, NJ, 2018. ISBN 978-111-9157-977.
- [33] MIZOGUCHI, T., Y. KIMURA, T. YOSHITOMI a H. TAMIYAKI. 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. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272811001745>
- [34] COMBS, G. F. a J. P. MCCLUNG. The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. Fifth edition. Boston: Elsevier/AP, [2017]. ISBN 978-012-8029-657.
- [35] KIM, Yihwan, Jehyun JEON, Min Seok KWAK, Gwang Hoon KIM, InSong KOH, Mina RHO a Qunfeng DONG. Photosynthetic functions of *Synechococcus* in the ocean microbiomes of diverse salinity and seasons. *PLOS ONE* [online]. 2018, 13(1) [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1371/journal.pone.0190266. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0190266>
- [36] HERRERO, A. a E. FLORES (eds.). The cyanobacteria: molecular biology, genomics, and evolution. Second edition. Norfolk, UK: Caister Academic Press, c2008.
- [37] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. Taxonómia kvasinek a kvasinkovitých mikroorganizmov. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo Alfa, 1990. Edícia potravinárskej literatúry. ISBN 80-0500644-6.
- [38] Occurrence of genus *Scenedesmus* Mayen (Chlorophyceae) from East Nepal. *Nepalese Journal of Biosciences*, 2013, 2013(3).
- [39] KALINA, Tomáš. Systém a vývoj sinic a řas. 2 vyd. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 8071846112.
- [40] Crespo C, Rodríguez H, Segade P, Iglesias R, García-Estévez JM. *Coccomyxa* sp. (chlorophyta: chlorococcales), a new pathogen in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) of Vigo estuary (Galicia, NW Spain). *J Invertebr Pathol*. 2009;102(3):214-219. doi:10.1016/j.jip.2009.08.010
- [41] Diamant A, Lipshitz A, Ucko M. Phylogeny of *Coccomyxa* (Myxosporea: Myxidiidae) spp. with the description of a new species from *Bathygobius cyclopterus* (Gobiidae) in the northern Red Sea. *Folia Parasitol (Praha)*. 2007;54(2):109-116. doi:10.14411/fp.2007.016
- [42] SOMMER, L.. Základy analytické chemie. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000, 347 s.
- [43] [online]. [cit. 2020-07-28]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/>
- [44] [online]. [cit. 2020-07-28]. Dostupné z: <https://ccala.butbn.cas.cz/>

- [45] VOET D., J. G. VOETOVÁ. Biochemie. 1. české vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995, 1325 s. ISBN 80-85605-44-9.
- [46] SAFI, Carl, Bachar ZEBIB, Othmane MERAH, Pierre-Yves PONTALIER a Carlos VACA-GARCIA. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2014, **35**, 265-278 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.rser.2014.04.007. ISSN 13640321.
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032114002342>

8 SEZNAM ZKRATEK

PUFA – polynenasycené mastné kyseliny

MUFA – mononenasycené mastné kyseliny

SFA – nasycené mastné kyseliny

YPD – yeast extract-pepton-dextrose

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

PDA – detector diodového pole

GC- plynová chromatografie

FID – plamenově ionizační detektor