



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

**VLIV STRESU A NUTRIČNÍCH PODMÍNEK NA
METABOLISMUS KAROTENOGENNÍCH KVASINEK A
MIKROŘAS**

INFLUENCE OF STRESS AND NUTRITIONAL CONDITIONS ON CAROTENOGENIC YEAST AND
MICROALGAL METABOLISM

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Pavλίna Sikorová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Martin Szotkowski

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1539/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Pavλίna Sikorová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Martin Szotkowski**

Název bakalářské práce:

Vliv stresu a nutričních podmínek na metabolismus karotenogenních kvasinek a mikrořas

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- Přehledná literární rešerše zaměřená na srovnání produkčních vlastností mikrořas a kvasinek
- Screening možností ko–kultivace vybraných kmenů karotenogenních kvasinek a mikrořas
- Srovnání produkce při klasické kultivaci a ko–kultivaci s využitím exogenních stresů
- Optimalizace produkčních médií a postupů ko–kultivace
- Srovnání produkce biomasy a její celkové zhodnocení
- 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 Sikorová
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

Tato bakalářská práce se zabývala především vlivem biologického stresu (kokultivací) na růst a metabolismus vybraných karotenogenních kvasinek a mikrořas. Metabolity těchto mikroorganismů jsou chlorofyly a karotenoidy, což jsou přírodní pigmenty sloužící jako antioxidanty. Kokultivace teoreticky spočívá v tom, že se mikroorganismy vzájemně podporují v růstu a v produkci metabolitů, což by mělo za následek zvýšenou produkci již zmíněných chlorofylů a karotenoidů. Teoretická část práce je zaměřená na popis vybraných druhů kvasinek a mikrořas a dále podrobněji rozebírá témata stresových faktorů v závislosti na růstu a metabolismu mikroorganismů. Experimentální část se poté zabývá různými druhy kultivací a snaží se optimalizovat produkční média a najít nejlepší symbiotické kvasinky a mikrořasy. Také se zde řeší otázka různých poměrů mikroorganismů v kokultivacích. Použité kvasinky byly *Rhodotorula kratochvilovae*, *Rhodosporidium toruloides* a *Phaffia rhodozyma*. Kultivovanými mikrořasami byly *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus quadricauda*, *Coccomyxa* sp., *Chlorella sorokiniana*, *Chlamydomonas reinhardtii* a *Scenedesmus obliquus*. Kultivovanou sinicí byl *Synechococcus nidulans*. Nejúspěšnějším kokultivačním experimentem ve všech směrech se ukázala být kokultivace *R. kratochvilovae* s řasou *Desm. quadricauda*. Tento experiment byl velmi úspěšný ve všech ohledech.

ABSTRACT

This bachelor thesis describes the influence of biological stress (co-cultivations) on the growth and metabolism of selected carotenogenic yeasts and microalgae. The metabolites of these microorganisms are chlorophyll and carotenoids, which are natural pigments and antioxidants. In theory, co-cultivation is a cultivation where microorganisms mutually support each other in the growth and production of metabolites. This would cause the increased production of previously mentioned chlorophyll and carotenoids. The theoretical part of the work is focused on the description of selected species of yeasts and microalgae and further discusses in more detail, the topics of stress factors depending on the growth and metabolism of microorganisms. The experimental part then deals with different types of cultivation and co-cultivation and tries to optimize the production media and find the best symbiotic yeasts and microalgae. Furthermore the issue of different ratios of microorganisms in co-cultivations is also addressed here. The cultivated yeasts strains were *Rhodotorula kratochvilovae*, *Rhodosporidium toruloides* and *Phaffia rhodozyma*. And microalgae strains were *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus quadricauda*, *Coccomyxa* sp., *Chlorella sorokiniana*, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Scenedesmus obliquus*. Cultivated cyanobacterium was *Synechococcus nidulans*. The most successful co-cultivation experiment was the one with *R. kratochvilovae* and yeast *Desm. quadricauda*. This experiment was very successful in all aspects.

KLÍČOVÁ SLOVA

Karotenogenní kvasinky, mikrořasy, stresové faktory, kokultivace, karotenoidy, chlorofyly, lipidy

KEYWORDS

Carotenogenic yeasts, microalgae, stress factors, co-cultivation, carotenoids, chlorophylls, lipids

SIKOROVÁ, Pavlína. *Vliv stresu a nutričních podmínek na metabolismus karotenogenních kvasinek a mikrořas* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-07-27]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123945>. 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 svému vedoucímu Ing. Martinu Szotkowskiému za cenné odborné rady, velkou ochotu a trpělivost, dále mé rodině, za to že mě po celou dobu studia nejen finančně podporovali a také svým skvělým kolegům z laboratoří, kteří mi vždy ochotně pomohli.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Kvasinky	10
2.1.1	Cytologie kvasinek.....	10
2.1.2	Rozmnožování kvasinek	11
2.1.2.1	Nepohlavní rozmnožování – pučení	11
2.1.2.2	Pohlavní rozmnožování.....	11
2.2	Karotenogenní kvasinky	11
2.2.1	Vybrané druhy červených kvasinek.....	11
2.2.1.1	Rod <i>Sporidiobolus</i>	11
2.2.1.2	Rod <i>Rhodotorula</i>	12
2.2.1.3	Rod <i>Phaffia</i>	13
2.2.1.4	Rod <i>Cystofilobasidium</i>	13
2.2.2	Vybrané druhy mikrořas	14
2.2.2.1	Rod <i>Desmodesmus</i>	14
2.2.2.2	Rod <i>Chlorella</i>	14
2.2.2.3	Rod <i>Chlamydomonas</i>	14
2.2.2.4	Rod <i>Coccomyxa</i>	15
2.3	Sinice	15
2.3.1	Rod <i>Synechococcus</i>	16
2.4	Metabolity produkované mikroorganismy	16
2.4.1	Karotenoidy.....	16
2.4.2	Karoteny.....	16
2.4.3	Astaxanthin	17
2.4.4	Lutein	17
2.4.5	Funkce karotenoidů.....	18
2.4.6	Biosyntéza karotenoidů.....	18
2.4.7	Xantofyly	19
2.4.8	Chlorofyly	19
2.4.8.1	Biosyntéza chlorofylů	19
2.4.9	Ergosterol.....	20

2.4.10	Lipidy	20
2.4.10.1	Mastné kyseliny	21
2.4.10.2	Biosyntéza a odbourávání mastných kyselin	21
2.5	Vliv prostředí na mikroorganismy	22
2.5.1	Stresové faktory	22
2.5.2	Biologické faktory	22
2.5.2.1	Kokultivace	22
2.5.1	Fyzikální faktory ovlivňující mikroorganismy	22
2.5.1.1	Teplota	22
2.5.1.2	Aktivita vody.....	22
2.5.1.3	Vliv ultrafialového záření	22
2.5.2	Chemické faktory	23
2.5.2.1	Hodnota pH	23
2.5.2.2	Antimikrobní látky	23
2.5.2.3	Oxidační stres.....	23
2.5.2.4	Osmotický stres.....	23
2.5.2.5	Výživa kvasinek	23
2.5.2.6	Výživa mikrořas	23
2.6	Analytické metody	24
2.6.1	Spektrofotometrie	24
2.6.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	24
2.6.3	Plynová chromatografie (GC).....	24
3	CÍL PRÁCE	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1	Použité chemikálie	26
4.1.1	Chemikálie pro kultivaci kvasinek, mikrořas a sinic	26
4.1.2	Chemikálie pro extrakce, transesterifikaci a analýzu pro GC a HPLC.....	26
4.2	Přístroje a pomůcky	26
4.2.1	Přístroje a pomůcky pro kultivace	26
4.2.2	Přístroje pro izolaci a analýzu vybraných analytů	27
4.3	Použité mikroorganismy	27
4.3.1	Kvasinky	27

4.3.2	Mikrořasy	27
4.3.3	Sinice.....	27
4.4	Kultivace mikroorganismů	27
4.4.1	Kultivace karotenogenních kvasinek	27
4.4.1.1	Inokulum I a II	27
4.4.1.2	Produkční média	28
4.4.2	Kultivace mikrořas a sinic	29
4.4.3	Kokultivace kvasinek a mikrořas (sinic).....	29
4.4.3.1	Kokultivace v Erlenmeyerových baňkách	30
4.4.3.2	Kokultivace mikrořas s kvasinkou <i>Rhodospiridium toruloides</i> v aerovaném prostředí	30
4.4.3.3	Kokultivace mikrořas s kvasinkou <i>Rhodotorula kratochvilovae</i> v aerovaném prostředí	31
4.4.4	Stanovení nárustu biomasy	31
4.4.5	Příprava vzorků pro analytickou metodu HPLC.....	32
4.4.5.1	Acetonová metoda.....	32
4.4.5.2	Extrakce dle Folsche	32
4.4.6	Transesterifikace vzorku mikrobiální biomasy.....	33
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	34
5.1	Kvasinky	34
5.1.1	Kmen <i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	34
	Kultivace po dobu 10 dní na BBM médiu	37
5.2	Kmen <i>Phaffia rhodozyma</i>	39
5.2.1	Kultivace 4 dny	39
5.2.2	Kultivace 4 dny na BBM médiu	41
5.2.3	Kultivace 10 dní na BBM médiu	43
5.3	Kmen <i>Rhodospiridium toruloides</i>	44
5.3.1	Kultivace 10 dní na BBM médiu	44
5.4	Řasy	46
5.5	Kokultivace.....	46
5.5.1	Kokultivace s kmenem <i>Phaffia rhodozyma</i>	47
5.5.2	Kokultivace s kmenem <i>Rhodospiridium toruloides</i>	50

5.5.3	Kokultivace s kmenem <i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	59
6	ZÁVĚR	71
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	73
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	76

1 ÚVOD

Důsledkem vyčerpávajících se zásob nerostných surovin, zhoršenému životnímu prostředí v důsledku průmyslové a technologické expanze stále více vzrůstá zájem o využití mikrobiální biomasy jako obnovitelného zdroje energie, ale také jako možné producenty potřebných chemických látek pro člověka. Možnost využít mikrobiální biomasu k různým účelům umožnil obrovský rozmach a rozvoj genových technik a biotechnologií. Biotechnologický průmysl využívá biologické pochody z mnoha odvětví, jako potravinářství, medicína, farmacie, odpadové a zemědělské hospodářství a jiné. Kvasinky jsou velmi užitečné v tom směru, že jsou schopny využívat odpadní substráty, a to z mnoha průmyslových odvětví např. potravinářského průmyslu. Karotenogenní kvasinky se řadí převážně do oddělení *Basidiomycota*. Jsou charakteristické jejich schopností akumulovat v povrchových strukturách buněk karotenoidní pigmenty jako je β -karoten, γ -karoten, astaxanthin, torulen a torularhodin. Další významnou vlastností červených kvasinek je jejich schopnost akumulovat lipidy, které by bylo možné využít jako potenciální zdroj pro produkci biopaliv. Další důležitou látkou, kterou jsou kvasinky schopny produkovat je koenzym Q, který slouží k tvorbě energie a jako antioxidant.

Mikrořasy a sinice jsou mikroskopické organismy schopné fotosyntézy. Vykazují se relativně nízkými náklady na kultivaci a mají velmi zajímavé složení. Jejich hlavní složkou jsou červená barviva karotenoidy, zelené barvivo chlorofyl a hlavně jsou schopny produkce vzácných polynenasycených mastných kyselin.

V dnešní době se stále více lidí zabývá myšlenkou kokultivace těchto mikroorganismů. Je to z toho důvodu, že by se vzájemně mohly podporovat v růstu. Kvasinky spotřebovávají kyslík a produkují oxid uhličitý, kdežto řasy potřebují oxid uhličitý a produkují kyslík. Produkty svých metabolismů by podporovaly mikroorganismy navzájem. Dále by výsledná biomasa byla obohacena jak o významné látky kvasinek, tak i mikrořas.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Kvasinky patří mezi eukaryotní chemoheterotrofní organismy. Jsou to jednobuněčné nižší houby (*Fungi*), nejsou schopny fotosyntézy. V přírodě jsou velmi rozšířeny, je známo více než 1500 druhů (předpokládá se, že tvoří asi 1% celé populace kvasinek na planetě) dělících se přibližně do 37 rodů. Velikost kvasinek závisí na druhu, životním prostředí a také nutričních podmínkách daného prostředí, ve kterém kvasinky žijí. Ve skutečnosti je průměrná velikost kvasinek v rozmezí 3 - 4 μm , jsou však známy i kvasinky o velikosti 40 μm . Kvasinky mohou mít mnoho rozličných tvarů. Svou roli v tom hraje stádium vývoje a druh živného média a její funkce. Kvasinky jsou schopny měnit svůj tvar dokonce i po dobu svého vývoje. Jako nejčastější tvar buňky je považován tvar rotačního elipsoidu, ale vyskytují se také kulaté, oválné, citrónovité nebo lahvovité kvasinky. Kvasinky mohou žít samostatně nebo spojené v koloniích, zde tvoří tzv. pseudomycelia nebo také falešná mycelia. Kvasinky se rozmnožují převážně nepohlavně a to buď pomocí mitosy nebo asymetrickým dělením – pučením. Rozlišují se dvě hlavní třídy kvasinek a kvasinkovitých organismů: *Ascomycetes* a *Basidiomycetes* [1][2][3]

2.1.1 Cytologie kvasinek

Buňka kvasinek se skládá z několika základních částí – buněčné stěny, cytoplazmatické membrány, cytoplazmy, organel a jadra. Buněčná stěna kvasinek udržuje a určuje tvar buňky a zároveň chrání buňku před mechanickými nebo chemickými okolními vlivy, před působením osmotického tlaku vnějšího prostředí. Hlavní složkou buněčné stěny jsou glukany (složeny z polysacharidů), dále u některých druhů jsou přítomny také mannany, glukosamin nebo chitin. Polysacharidy utváří 80% buněčné stěny jako souvislou spleť vláken, která je vyplněna bílkovinou. Vnitřní a střední vrstvu buněčné stěny vyplňují polymery glukózy – fibrilární -1,3- glukan a amorfní 1,6-glukan, které zodpovídají za udržování tvaru. Antigenní vlastnosti kvasinek způsobují glykosylované proteiny – mannanproteiny, které se primárně nachází ve vnější vrstvě buněčné stěny, ale zasahují i do střední vrstvy, kde se spojují s glukany.

Pod buněčnou stěnou se nachází cytoplazmatická membrána, někdy také nazývaná jako plazmalema. Její tloušťka je asi 7,5 až 8 nm. Skládá se převážně z fosfolipidů, proteinů a dalších molekul. Cytoplazmatická membrána obsahuje malé póry. Její nejvýznamnější vlastností je selektivní propustnost. Mohou jí volně procházet nízkomolekulární a elektricky neutrální látky. Lipidová složka membrány umožňuje transport látek, které jsou rozpustné v tucích. Ostatní látky se transportují do buňky složitěji, pomocí proteinových přenašečů speciálními transportními mechanismy.

Uvnitř buňky se nachází cytoplazma, u mladých buněk průhledná homogenní hmota u starších buněk se objevují malá zrníčka. Cytoplazma obsahuje vodný roztok enzymů, rezervních látek, vedlejší produkty metabolismů, endoplazmatické retikulum s ribozomy, které slouží k syntéze bílkovin. Vodné prostředí buňky je esenciální pro průběh mnoha chemických reakcí. Dalšími organelami přítomnými v cytoplasmě kvasinek jsou mitochondrie, které umožňují dýchání buňky. Jsou tvořeny proteiny, lipidy, fosfolipidy, RNA a DNA. Nacházejí se zde např. enzymy dýchacího řetězce a oxidativní fosforylace. Vakuola kvasinek je většinou kulovitého membránovitého tvaru. Mladé nebo pučící buňky mají více malých vakuol, starší buňky pak obsahují pouze jednu velkou. Uvnitř se nachází chemické látky jako například hydrolytické enzymy, polyfosfáty, draselné ionty, aminokyseliny, puriny a jiné. Golgiho aparát slouží jako transport prekurzorů buněčné stěny z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu a také řady dalších látek. Kvasinkové jádro má dvojitou membránu, uvnitř se vyskytuje malé srpkovité jádérko. [4]

2.1.2 Rozmnožování kvasinek

Kvasinky jsou mikroorganismy schopné jak nepohlavního, tak pohlavního způsobu rozmnožování. V případě nepohlavního rozmnožování se kvasinky rozmnožují tzv. pučením.

2.1.2.1 Nepohlavní rozmnožování – pučení

Charakteristickým znakem pučení je nejen vznik nové buňky, ale také jizev, které zůstanou na buněčné stěně po celou dobu existence buňky. Jizvy nikdy nevznikají na stejném místě a jsou pojmenovány jako jizva zrodu, která se utváří na povrchu dceřiné buňky po odpojení od buňky mateřské a mateřská jizva, která vznikne na mateřské buňce oddělením buňky dceřiné. Počet jizev, které se vyskytují v buněčné stěně je kritérium stáří buňky. Pučení je proces, kdy na mateřské buňce vznikne malý pupenec nebo výrostek, ze kterého se postupně stane buňka dceřinná. Nejprve se v pupenci shromažďují a dělí organely, které postupně přecházejí do pupence. V této fázi vývoje buňky probíhá i mitotické dělení jádra. Pučení je ukončeno vznikem samostatné cytoplazmatické membrány dceřiné buňky a ta se následně oddělí. [5]

2.1.2.2 Pohlavní rozmnožování

Kvasinky jsou schopné se rozmnožovat také pohlavně. Používají k tomu spóry, díky tomu jsou kvasinky řazeny do kategorie vřeckovýtrusných hub. Pohlavní rozmnožování u kvasinek představuje spájení dvou buněk s haploidním charakterem, tj. že obsahují jednu sadu chromozomů. Jinak se tomuto procesu může říkat také kopulace nebo konjugace. Dochází ke karyogamii, což je spojení dvou jader dohromady, za vzniku jednoho diploidního jádra, které je následně meiózou (redukčním dělením) rozděleno na čtyři nová jádra, kdy poté každé jádro obsahuje polární tělísko s mikrotubuly a jednu sadu chromozomů. [6]

2.2 Karotenogenní kvasinky

Je to skupina nepříbuzných mikroorganismů, řadících se převážně do rodu *Basidiomycota*, díky skutečnosti, že se většina z nich vyznačuje tvorbou bazidiospor, produkují ureázu a jejich buněčná stěna je složena z chitinu, mananu a obsahuje pigmenty. V kvasinkách se nachází enzymatický aparát, který je schopný produkovat karotenoidní pigmenty. Mohou být produkovány i v nepovrchových částech buňky (převážně se vyskytují v lipidových dropletách – lipid bodies). Díky nim získávají kvasinky svou charakteristickou barvu, která se svým zbarvením pohybuje od žluté až po různé odstíny červené barvy. K syntéze potřebují světlo a kyslík, proto světelné záření indukuje zvýšenou tvorbu karotenoidů. Dále jsou kvasinky schopné akumulovat ergosterol, nenasycené mastné kyseliny, koenzymy Q10 i Q9 a další. Nejhojněji produkovány karotenoidy kvasinek jsou astaxanthin, torularhodin, torulen, γ -karoten a β -karoten. Jedná se o všudypřítomné kvasinky, mohou být nalezeny jak ve sladké, tak i ve slané vodě, na rostlinách, bývají asociované s živočichy a často se nacházejí také v potravinách. [1][2][3][4][7][8]

2.2.1 Vybrané druhy červených kvasinek

2.2.1.1 Rod *Sporidiobolus*

Do rodu *Sporobolomyces* se řadí asi 20 druhů červených kvasinek. Jejich kolonie se vyznačují charakteristickou lososově růžovou, oranžovou, červenou i žlutohnědou barvou. Mají elipsoidní nebo vřetenovitý tvar. Nejsou schopny zkvašovat cukry. Vyznačují se silnou karotenogenezí. Vyskytují se v atmosféře, kde jsou hlavním zdrojem výživy dusíkaté sloučeniny a jejich redukované formy. Řadí se zde například *S. roseus*, *S. salicinus*, *S. shibatanus* a *S. salmonicolor*.

Tyto druhy se charakterizují tvorbou balistokonidií. Druh *S. roseus* je kulovitě až elipsoidního tvaru. V kapalném prostředí produkuje sediment a na agaru tvoří pomerančový až korálově červený hladký povrch. Vyskytuje se především ve fylosféře a atmosféře. Zdrojem výživy jsou nitráty nebo redukované formy dusíkatých sloučenin. Druh *S. shibatanus* tvoří elipsoidní buňky různých tvarů a na agaru tvoří lososový nebo broskvově zbarvený povrch. Pro výživu tohoto rodu se využívá především jako zdroj uhlíku glycerol nebo ribóza. Druh *S. salmonicolor* má elipsoidní až protáhlé buňky, které se vyskytují buď jednotlivě nebo v párech. Nátěr na agarech má lososovo-růžovou nebo broskvovou barvu. [1][2][4]



Obrázek č. 1. *Sporobolomyces pararoseus*

2.2.1.2 Rod *Rhodotorula*

Kvasinky tohoto druhu mají kulovitý až vejcovitý tvar. Tento rod je charakteristický produkcí kombinace karotenoidů torularhodinu, torulenu a β -karotenu. Je také schopná akumulovat velké množství lipidů s poměrně vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin. Některé kmeny jsou schopny syntetizovat červené nebo žluté pigmenty na sladidinových agarech. V kapalném prostředí jsou kvasinky schopny produkovat prstence a sedimenty světle krémové až světle růžové barvy. Jejich barva a vzhled se mění především podle složení substrátu.

Tento rod je rozšířen po celém světě, protože není náročný na kultivaci, izolovat se může ze vzduchu, vody, půdy a z povrchu rostlin a živočichů. Většina druhů postrádá schopnost asimilovat inositol. Druhy, které asimilovat inositol schopny jsou, nejsou na druhou stranu schopny asimilovat D-glukuronát. Nekvasí sacharidy. Vytvářejí koenzymy Q-10 a Q-9. Do kmene *Rhodotorula* můžeme zařadit druhy *R. diffluens*, *R. glutinis*, *R. mucilaginosa*, a *R. rubra*.

R. kratochvilovae je druhem kvasinky běžně se vyskytujícím v přírodě. Je charakteristická produkcí torulenu, torularhodinu a β -karotenu. Je také schopná kumulovat lipidy, tvořících až 20% sušiny. Využívají se jako zdroje triacylglycerolů nebo nenasycených mastných kyselin. [1][10]

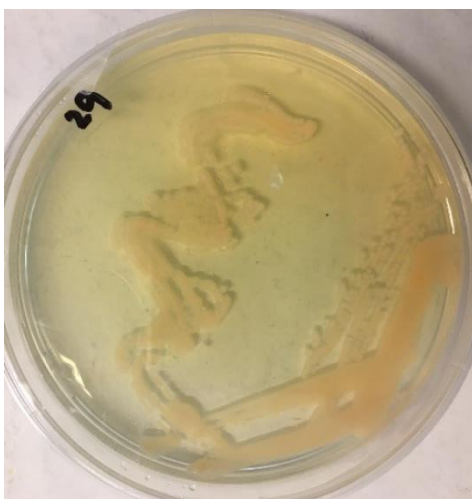
Do tohoto rodu se také zahrnují kvasinky *Rhodosporidium*, kdy jediný rozdíl mezi nimi je ten, že kvasinky rodu *Rhodotorula* se rozmnožují nepohlavně pučením nebo dělením, zatímco kvasinky rodu *Rhodosporidium* se rozmnožují pohlavně. Zástupci tohoto rodu jsou *Rhodosporidium azoricum*, *Rhodosporidium diobovatum*, *Rhodosporidium kratochvilovae*, a *Rhodosporidium toruloides*. Využívají se v potravinářském průmyslu a při výrobě vitamínů. Výzkumy ukazují, že tyto kvasinky mohou sehrát velkou roli při vývoji nových typů biopaliv. [9][10]



Obrázek č. 2. *Rhodotorula kratochvilovae*

2.2.1.3 Rod *Phaffia*

Kvasinky rodu *Phaffia* se vyznačují oválným tvarem a charakteristickou lososovou až červenou barvou svých kolonií. Mohou se vyskytovat jak jednotlivě, tak v párech a v některých případech jsou dokonce schopny vytvářet krátké řetězce. Do tohoto rodu se řadí jediný zástupce, a to *Phaffia rhodozyma*. Díky její schopnosti produkovat velké množství astaxanthinu se používá v potravinářském průmyslu, kdy se tento karotenoid používá k barvení různých potravin. [11]



Obrázek č. 3. *Phaffia rhodozyma*

2.2.1.4 Rod *Cystofilobasidium*

Tento druh kvasinek má kulovitý až vejcovitě protáhlý tvar s hladkým, lesklým povrchem. Tvoří oranžové, lososové nebo skořicově zbarvené kolonie s hladkým lesklým povrchem. Kvasinková generace je schopná se rozrůst až po několika týdnech. Do tohoto rodu se řadí *C. capitatum*, *C. bisporidii* a *C. infirmominiatum*. Celý rod se řadí do čeledi *Rhodotorulaceae*, je příbuzný rodu *Rhodotorula*. Tyto druhy nejsou schopny zkvašovat cukry a mají přísně aerobní metabolismus. Vytvářejí koenzymy Q 9 a Q 10, obsahují xylulósu.

Druh *Cystofilobasidium capitatum* se kultivuje hlavně pro svou schopnost vysoké produkce koenzymu Q10, β -karotenu, torulenu a torular-hodinu. Je červeně až skořicově zbarvený. [1][4]



Obrázek č. 4. *Cystofilobasidium infirmominiatum*

2.2.2 Vybrané druhy mikrořas

2.2.2.1 Rod *Desmodesmus*

Rodem *Desmodesmus* se označují nepohyblivé zelené mikrořasy rostoucí jednotlivě či v koloniích. Kolonie tvoří cenobia o 4, 8 či 16 jedincích, uspořádaných v řadě za sebou uvnitř ochranného pouzdra. V případě, že nejsou vystaveny stresu a mají vhodné nutriční podmínky rostou jednotlivé buňky samostatně. V případě stresové situace, nevyvážených nutričních podmínkách nebo v přítomnosti predátorů (např. hrotnatka) tvoří již zmíněná cenobia. V případě ohrožení se rod také vyznačuje schopností tvořit silné buněčné stěny a slizový obal, díky kterému se stávají pro predátory nestrávitelnými. Rod *Desmodesmus* se stal běžnou součástí sladkovodního planktonu. Zástupci tohoto rodu jdou *Desmodesmus acutus*, *Desm. quadricauda* a *Desm. subspicatus*. [15][16]

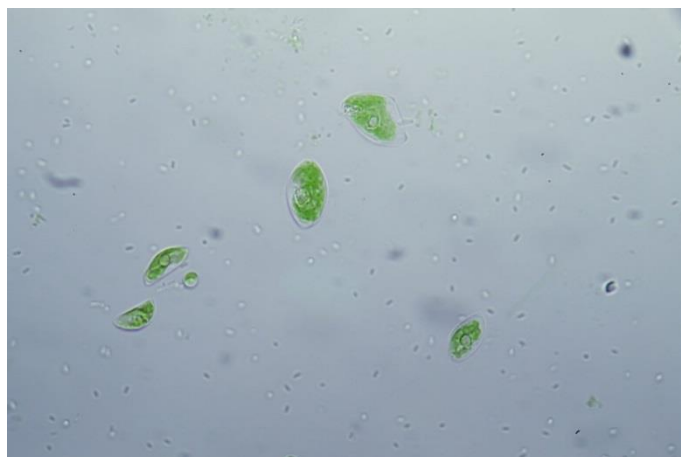
2.2.2.2 Rod *Chlorella*

Tento rod je specifický především díky své schopnosti vysoké produkce nenasycených mastných kyselin, luteinu a v neposlední řadě se ukazuje být vhodným mikroorganismem pro produkci bionafty. Jsou to jednobuněčné zelené řasy vyskytující se ve sladkých vodách. Tvar buněk je kulovitý bez pohybového ústrojí. Tento rod se rozmnožuje především nepohlavně, a to dělením. Oproti ostatním řasám mají I relativně nízké nároky na obsah živin v prostředí a na jejich růst. Jako zástupce zde lze uvést *Chlorella Vulgaris*, *Ch. Sorokiniana* a *Ch. Sacharophila*. [15][17]

2.2.2.3 Rod *Chlamydomonas*

Tyto jednobuněčné řasy dosahujících rozměrů v řádu od 5-100 µm. Vyskytují se ve vodě, v půdě, a dokonce i ve sněhu. Poměrně velkou část buňky zaujímá chloroplast, další specifikou tohoto rodu jsou dva bičíky, sloužící k pohybu a přítomnost rodopsinových iontových kanálů citlivých na světlo. Tyto kanálky slouží jako kontrola toku iontů přecházejících přes membránu do buňky. Jedná se o fakultativně heterotrofní řasu, protože v případě nepřítomnosti slunečního záření je schopna použít jako zdroj uhlíku organické sloučeniny. Díky této vlastnosti se poměrně snadno kultivují. [17]

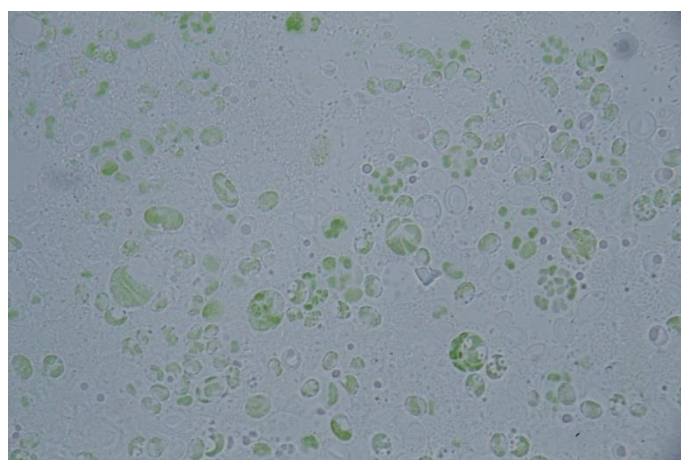
Využívají se ve výzkumu molekulární biologie, kde se zkoumá například pohyblivost bičíků nebo dynamika chloroplastů. Díky haploidním vlastnostem a jednoduchému životnímu cyklu nachází uplatnění ve studiu genetiky. Zástupci jsou *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chl. nivalis* a *Chl. bacillus*. [15][18][19]



Obrázek č. 5. *Mikrořasa Chlamydomonas Reinhardtii*

2.2.2.4 Rod *Coccomyxa*

Tento druh mikrořasy má sférický až oválný hladký tvar bez přítomnosti bičíků. Buňka je velká 40-100 μm . Přibližně polovinu velikosti buňky zabírá chloroplast. Buňky jsou charakteristické tím, že obsahují velké množství lipidických látek. *Coccomyxa* je eukaryotní autotrofní organismus, energii získává z fotosyntézy. Může žít sama nebo v koloniích. Může se vyskytovat jak ve slaných, tak i ve sladkých vodách, v pobřežních oblastech a některé druhy *Coccomyxa* jsou parazité, kteří se vyskytují v mnoha mořských organismech, v plynových měchýřích ryb a dalších orgánech mořských živočichů. Mezi zástupce se řadí *Coccomyxa hydrodictyon*, *C. parasitica* a *Coccomyxa* sp.. [20] [21]



Obrázek č. 6. *Coccomyxa* sp.

2.3 Sinice

Sinice (*Cyanobacteria*) se mohou označit jako jedna z nejstarších forem života na Zemi. Jedná se o skupinu oxygenních fotosyntetických gram-negativních bakterií. Jsou jedinou skupinou prokaryot schopnou využívat sluneční světlo jako zdroj energie, vodu jako donor elektronů a vzduch jako zdroj uhlíku. Srovnáním s mikrořasami se sinice mnohem snadněji kultivují v laboratorním prostředí. Mají schopnost žít prakticky ve všech biotopech. Vyskytují se ve vodě. Mají velmi malé rozměry a většinou se vyskytují unicelulárně, ale jsou schopné růst i v koloniích, které jsou potom schopny dosáhnout rozměrů viditelných lidským okem. [22]

Sinice jsou schopny syntetizovat velké množství sekundárních metabolitů, například biologicky aktivní látky s antibakteriálními vlastnostmi. Dalšími významnými metabolity mohou být enzymy, toxiny, alkoholy, isoprenoidy, biopolymery, proteiny a pigmenty schopné absorpce UV záření. Také produkce biopaliv sinicemi je dnes jednou z nejslibnějších oblastí využití sinic. *Cyanobakterie* mají specifickou charakteristiku, a to větší množství kopií chromozomů, vysoký obsah fotosynteticky aktivních proteinů v thylakoidech, přítomnost exopolysacharidů a extracelulárních glykolipidů. [22]

2.3.1 Rod *Synechococcus*

Synechococcus je důležitá fotosyntetická sinice o rozměrech od 0,2 μm do 2 μm . Řadí se do třídy *Cyanophyta*. Je nejdůležitější složkou pikoplanktonu. Může se vyskytovat v oceánech mírných a tropických pásů, ale lze ho nalézt i ve sladkých vodách. Jako fotosyntetická bakterie má výbornou schopnost přizpůsobit se ve změnách slanosti prostředí a světelné intenzity. Některé kmeny jsou dokonce i velmi rezistentní proti vysokým teplotám a můžeme je najít v horkých pramenech. Buňky jsou oválného až protáhlého tvaru a vyskytují se jednotlivě. Jsou výbornými producenty polyhydroxybutyrátů. Dále se využívají k akumulaci pesticidů, organických fosforových a chlorných sloučenin z vod. Nejznámějšími zástupci jsou *Synechococcus nidulans* a *Synechococcus elongatus*. [23][24]

2.4 Metabolity produkované mikroorganismy

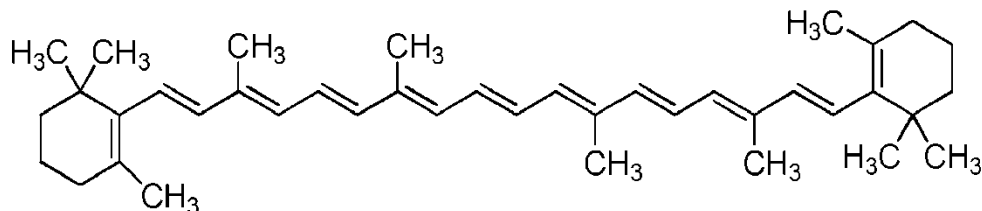
2.4.1 Karotenoidy

Karotenoidy se řadí mezi terpenoidy, konkrétně do skupiny tetraterpenů, skládají se z osmi pět-uhlíkatých zbytků isoprenu. Základní strukturou je čtyřicet uhlíkových atomů s lineárním charakterem. Jedná se o sekundární produkty metabolismu rostlin a některých mikroorganismů. Jsou to přírodní žluté a oranžové pigmenty. Jejich charakteristické zbarvení je způsobeno systémem konjugovaných vazeb v chemické struktuře. Jedná se o extrémně hydrofobní molekuly s velmi malou nebo žádnou rozpustností ve vodě. V tucích ale rozpustné jsou. Mohou se využívat i v různých průmyslových odvětvích např. v chemickém, farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu. Produkce karotenoidů chemickou syntézou nebo extrakcí z organismů není moc výhodná. Je velmi omezena nízkými výtěžky a vysokými náklady na produkci. Naopak produkce pomocí mikroorganismů je výhodná v tom směru, že mikroorganismy jsou schopné syntetizovat potřebné látky ze zemědělských nebo dokonce i průmyslových odpadních produktů. Tyto produkty obsahují nezbytné prostředí a látky, ve kterém jsou mikroorganismy schopné přežít a růst. Navíc se využíváním těchto produktů zamezí znečištění životního prostředí. Karotenoidy jsou důležitými doplňky stravy, hrají důležitou roli v prevenci, a dokonce léčbě nemocí, jako je roztroušená skleróza, rakovina, šedý zákal, anebo ateroskleróza. Karotenoidy se dělí na dvě hlavní skupiny, a to uhlovodíky, kterým se říká karoteny a kyslíkaté sloučeniny, které se nazývají xantofyly. [12][13]

2.4.2 Karoteny

Z chemického hlediska se dají karoteny popsat jako uhlovodíkové řetězce s nejméně 40 atomy uhlíku. Obecně karoteny vycházejí z nejjednoduššího karotenu lykopenu s lineárním polynenasyceným uhlovodíkovým řetězcem. Další karoteny poté mohou vznikat enzymatickou úpravou (hlavně cyklizací acyklických Ψ -karotenů enzymově katalyzovanou reakcí). Pokud se řetězec zacyklí na obou koncích řetězce tak vznikají struktury β -karotenu a α -karotenu. V případě zacyklení na jednom konci vzniká γ -karoten. Acyklické karoteny se s výjimkou lykopenu nacházejí v potravinářských materiálech jen v malém množství, doprovázejí zde acyklické karoteny a xantofyly.

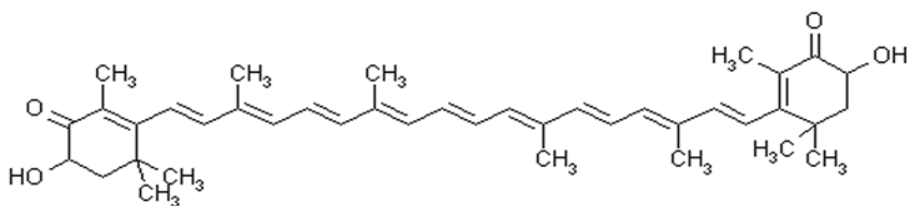
Jako nejvýznamnějšího zástupce provitaminu A se může uvést β -karoten, který se většinou vyskytuje v přítomnosti α -karotenu, γ -karotenu, a dalších provitaminů. Nachází se především v pigmentu mrkve, meruněk a světlých třešních. Mezi karoteny se dále řadí torulen a torulahodin, majíce podobnou funkci jako provitaminy A. [12][13][14]



Obrázek č. 7. *Struktura β -karotenu*[25]

2.4.3 Astaxanthin

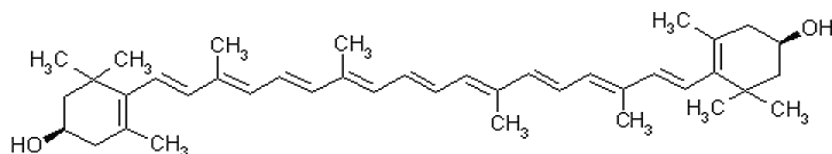
Sloučenina řadící se mezi karotenoidy. Z chemického hlediska jde o karotenoid se dvěma asymetrickými atomy uhlíku v poloze 3. Unikátní vlastnosti astaxantinu, jako například jeho schopnost esterifikace mastnými kyselinami, vysokou antioxidační aktivitu a mnohem polárnější charakter, než mají ostatní karotenoidy, se vysvětlují přítomností hydroxylových a ketoskupin na každém iononovém kruhu v jeho molekule. [25][26]



Obrázek č. 8. *Struktura astaxantinu* [27]

2.4.4 Lutein

Karotenoid, chemicky náležící mezi xanthofyly s polyenovým řetězcem, který je stejný jako řetězec β -karotenu a se dvěma hydroxyly na koncových řetězcích. Právě díky těmto volným hydroxylovým skupinám je zapříčiněna vyšší polarita molekuly a skutečnost, že v řasách se vyskytuje jako ester jedné nebo dvou mastných kyselin. Lutein se používá v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. V potravinářství se jedná o přidávání luteinu do krmiv hospodářských zvířat, u kterých je nutné získat příslušně zbarvené produkty, hlavně se jedná o rybí maso a vaječné žloutky. Ve farmacii se používá k výrobě prostředků k prevenci zhoršování zraku, oddalování chronických onemocnění, jako stimulant imunity. Má schopnosti bránící rozvoji katarakty a aterosklerózy, zlepšuje vlastnosti pokožky.[28]



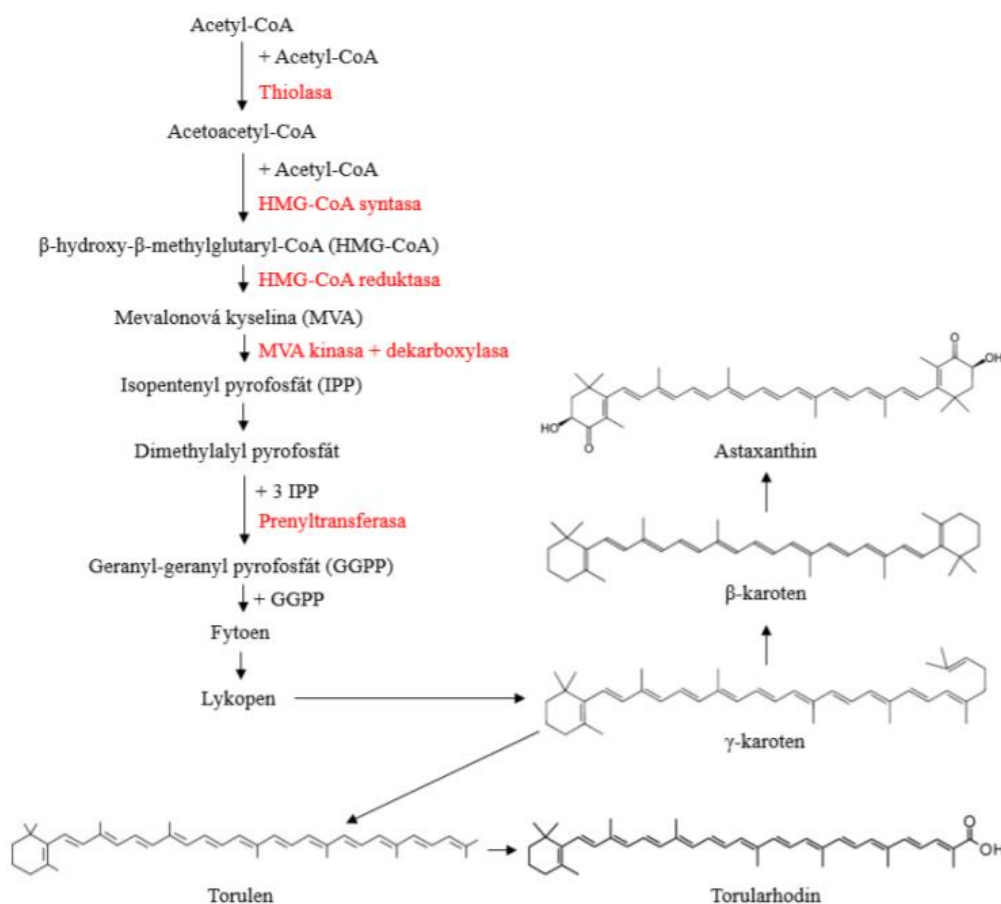
Obrázek č. 9. *Struktura luteinu* [29]

2.4.5 Funkce karotenoidů

Karotenoidy zastávají v metabolismu rostlin a živočichů mnoho funkcí. Jsou to velmi účinné antioxidanty, které v organismu slouží k vychytávání radikálů a dalších reaktivních dusíkatých a kyslíkatých forem. Volné radikály totiž v organismu působí na biologicky významné sloučeniny jako jsou proteiny, nukleové kyseliny a tím pozměňují strukturu a funkci těchto látek a toto působení může vést až k pozměnění struktury, poškození tkání a v nejhorším případě až k vzniku nádorového bujení. V rostlinách jsou karotenoidy součástí fotosyntetického systému, kde působí jako anténová barviva a přenášejí excitované elektrony do reakčních center a tím zvyšují účinnost celého procesu. V živých organismech fungují karotenoidy převážně jako antioxidanty a nejvýznamnějšími zástupci jsou lykopen a β -karoten. Velká část karotenoidů je prekurzorem vitamínu A, který je naprosto nezbytný pro správnou funkci zrakového ústrojí. [14][15][16]

2.4.6 Biosyntéza karotenoidů

Karotenoidy vznikají jako produkty specifické isoprenoidní dráhy. Výchozí látkou pro biosyntézu isoprenoidů je acetyl-CoA. Biosyntéza probíhá ve dvou krocích. Prvním krokem je syntéza aktivované formy isoprenu-isopentenylpyrofosfátu (IPP). V druhé fázi poté aktivované izoprenové jednotky kondenzují. Mikrobiální produkce karotenoidů v průmyslu musí splňovat podmínky nízkého nákladu procesů, vysokého výnosu produktů a neškodnost pro životní prostředí.[3] [17]



Obrázek č. 10. Biosyntéza karotenoidů. Červeně jsou značeny enzymy katalyzující reakce [30]

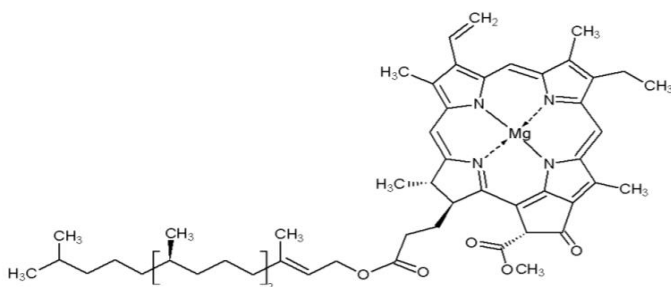
2.4.7 Xantofyly

Xantofyly vznikají jako produkty biochemické oxidace karotenů. Řadí se mezi kyslíkaté deriváty odvozené od acyklických karotenů, které se v malém množství vyskytují v potravinách. Jako nejběžnější zástupce mohou být označeny monohydroxyderiváty acyklických karotenů (kryptoxantiny), např. rhodopin, které se vyskytují mnohem častěji než xantofyly. Tyto deriváty se mohou nalézt v rostlinných pletivech. Existují také dihydroxysubstituované pigmenty, např. zeaxanthin, lutein a astaxanthin. [12][13][14]

2.4.8 Chlorofyly

Chlorofyly jsou fotosyntetické zelené pigmenty, nacházející se v organelách zvaných chloroplasty. Chlorofylů existuje více druhů, lze je rozdělit do skupin A, B, C, D, E a F. Chlorofyly lze najít u mikrořas, řas, vyšších rostlin a sinic. Nejdůležitějšími chlorofyly jsou chlorofyl A a chlorofyl B. Tyto chlorofyly jsou z chemického hlediska deriváty dihydropofyrinu, kde je atom hořčíku chelátově vázán uprostřed kruhu. Jednotlivé typy chlorofylů potom určují postranní řetězce základní molekuly. Postranní řetězce vytváří i změny v absorbním spektru slunečního záření.

Chlorofyl A se nachází ve všech rostlinách a bakteriích schopných fotosyntézy. Je schopen absorbce červeného světla v rozmezí vlnových délek od 480 nm do 670 nm. Naproti tomu Chlorofyl B se vyskytuje pouze v zelených řasách a vyšších rostlinách. Je schopen absorbce modrého záření v rozmezí vlnových délek od 480 nm do 650 nm. Chlorofyl C je v přírodě podstatně méně přítomný, je to minoritní složka v hnědých mořských řasách. Chlorofyl D je v přírodě také relativně vzácný a vyskytuje se v červených řasách. Je odlišný od ostatních chlorofylů tím, že jeho absorbní maximum se nachází v blízké infračervené oblasti. Chlorofyl E je velmi vzácný a nachází se pouze ve žlutých řasách. Chlorofylem nacházejícím se v sinicích je Chlorofyl F. Je ale pouze považován za doplňkový pigment Chlorofylu A. [31][32][33]



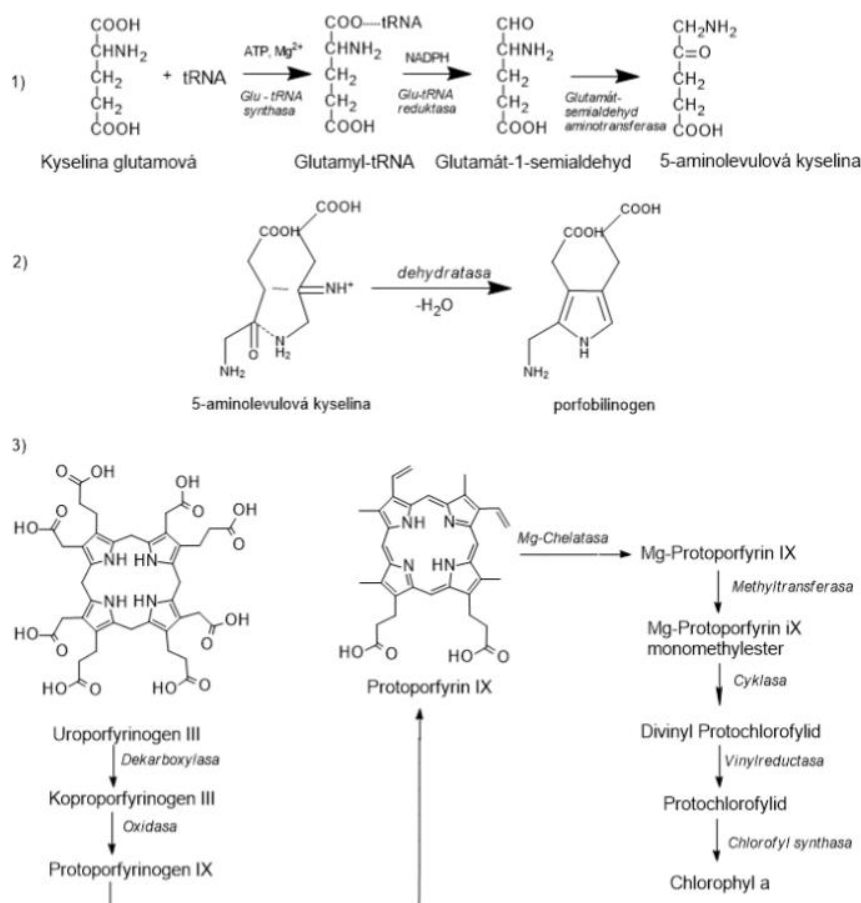
Obrázek č. 11. *Struktura Chlorofylu A* [34]

2.4.8.1 Biosyntéza chlorofylů

Biosyntéza chlorofylů začíná připojením molekuly glutamátu na tRNA, čímž vznikne glutamyl-tRNA. Tato nově vzniklá molekula se dále metabolizuje na glutamyl-1-semialdehyd, až se nakonec za pomoci enzymu 5-aminolevulátsythasy přemění na 5-aminolevulovou kyselinu (ALA). V následující reakci kondenzují dvě molekuly této kyseliny, za vzniku porfobilenu, kdy je celá reakce katalyzována ALA-dehydratasou. Molekula porfobilinogenu je cyklická, a obsahuje pyrolové jádro. Další fází biosyntézy je vznik protoporfyrinu IX. Tato molekula vzniká reakcí čtyř molekul porfobilinogenu. Další syntéza je katalyzována uroporfyrinogensynthasou, pracující s kofaktorem uroporfyrinogenkosynthasou za vzniku uroporfyrinogenu III. Dále dochází k dekarboxylaci uroporfyrinogenu III pomocí uroporfyrinogensynthasou na koproporfyrinogen III. Díky oxidaci propionylových iontů na vinylové následně vzniká protoporfyrin IX. [35]

Inkorporací Mg^{2+} iontu do molekuly protoporphyrinu IX, za katalýzy Mg- chelatasy, vzniká Mg, Mg-protoporphyrin IX. Ten se poté esterifikuje propionovým postranním řetězcem.

Proces je katalyzován methyltransferazou. Následuje cyklizace, kdy vzniká divinyl protochlorofylid. Následuje redukční reakce, kde vzniká protochlorofylid. Poslední krok syntézy katalyzuje chlorofylsyntáza, kdy esterifikuje propionový kyselý postranní řetězec kruhu s fytopyrofosfátem. Výsledná molekula biosyntézy je chlorofyl A. [35]



Obrázek č. 12. Biosyntéza chlorofylu A [35]

2.4.9 Ergosterol

Ergosterol je organická sloučenina, skládající se z ergostanu mající dvojné vazby na pozicích 5,6-, 7,8- a 22,23 a také na 3β -hydroxy skupině. Je produktem metabolismu hub a kvasinek. Ergosterol je schopný regulovat permeabilitu a tekutost buněčné membrány. Je také prekurzorem vitamínu D₂, což je steroidní hormon, jinak řečeno ergokalciferol. Vitamin D₂ je důležitý v metabolismu esenciálních minerálů vápníku, hořčíku a fosforu. Vzniká z ergosterolu působením UV zářením, přeměna ale neprobíhá přímo, ale přes mnoho meziproduktů, např. tachysterol a lumisterol.[1][2]

2.4.10 Lipidy

Lipidy jsou organické chemické sloučeniny, které se vyskytují přírodně. Díky svému hydrofóbnímu charakteru jsou rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Obecně se řadí do dvou kategorií. Jedna z nich je jednoduché (neutrální) lipidy, kam se řadí triacylglyceroly (TAG), a na komplexní (polární) lipidy. Jednoduché lipidy se z pohledu výživy uplatňují pouze jako zdroje energie. Hydrolyzou poskytují maximálně dva typy primárních produktů.

Komplexní lipidy poskytují tři a více produktů a patří mezi ně glycerofosfolipidy, glykolipidy, fosfoglykolipidy, sfingofosfolipidy a eterlipidy.[36]

Lipidy v organismu plní důležité funkce. Lipidy s polární a nepolární strukturou a navázanou fosfátovou skupinou, tzv. fosfolipidy jsou hlavní strukturou biomembrán, kde umožňují spontánní průnik malých částic. Nejdůležitějšími zástupci jsou fosfatidylcholin, fosfatidylglycerol a fosfatidylethanolamin. Obrovská chemická rozmanitost fosfolipidů v biomase je dána nejen druhem biomembrány, ale i podmínkami kultivace. Další funkce lipidů v organismech jsou hlavně zdroj a zásoba energie, slouží jako izolační a mechanická ochrana a transportní forma lipidů, tzv. Lipoproteiny slouží k transport látek. [37]

2.4.10.1 Mastné kyseliny

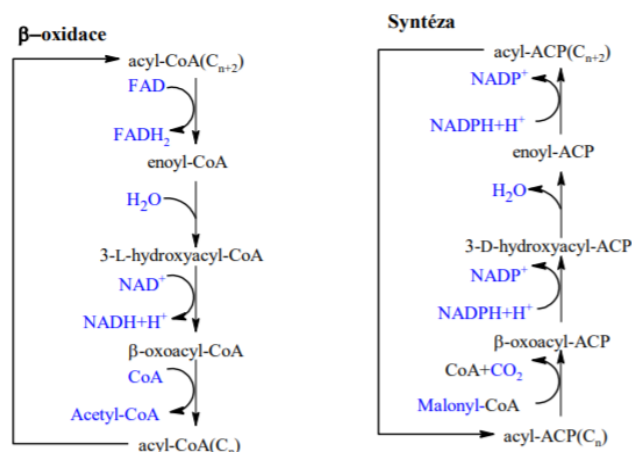
Skupina alifatických monokarboxylových kyselin ve formě esterů nacházejících se v přírodních lipidech. Velké množství zástupců, bylo jich identifikováno více než 1 000. Jsou stavební jednotkou lipidů. V organismu je najdeme především v jejich esterifikované formě právě v lipidech jako triacylglycerolu, cholesterol a fosfolipidy. Nejčastěji mají sudý počet uhlíků. [3]

V závislosti na přítomnosti a počtu dvojných vazeb se dělí na nenasycené a nasycené. Nasycené mají ve své struktuře pouze jednoduché vazby mezi jednotlivými uhlíkatými atomy. U nenasycených je naopak charakteristická přítomnost jedné (v takovém případě se označují jako MUFA), ale zpravidla více dvojných vazeb (PUFA). Nenasycené mastné kyseliny jsou esenciální pro vyšší organismy. [3][37][38]

2.4.10.2 Biosyntéza a odbourávání mastných kyselin

K syntéze mastných kyselin dochází v buněčné cytoplazmě sledem kondenzačních reakcí z původní molekuly malonyl-CoA vzniklého z acetyl-CoA. Tento děj je složen z více cyklů, kdy výstupní produkt je vždy o dva atomy uhlíku delší než vstupní molekula. První molekula je převedena za pomoci enzymu acetyl-CoA-transacetasy na acetyl-ACP. Na cysteinový zbytek je poté navázán zbytek enzymatického komplexu syntézy mastných kyselin (FAS). Tím se uvolní ACP. Nově vznikající poly- β -oxo řetězec je vždy před přijetím nové acetyl-CoA molekuly zredukován. To je důvod, proč se v lipidech vyskytují častěji molekuly se sudým počtem uhlíků.[3] [39]

Odbourávání mastných kyselin (neboli β -oxidace) je situována v mitochondriích, kde se postupně hydrolyticky zkracuje řetězec mastné kyseliny. Řetězec je přerušován mezi α a β uhlíkovým atomem. Jednotlivé molekuly acetyl-CoA jsou během odbourávání štěpeny od karboxy konce, čímž se uvolňuje C_2 acetylového zbytku připojeného na nosič CoA. [3] [39]



Obrázek č. 13. β -oxidace a syntéza mastných kyselin [40]

2.5 Vliv prostředí na mikroorganismy

2.5.1 Stresové faktory

Stresové faktory jsou v podstatě soubor faktorů, které nepříznivě ovlivňují růst, vývoj a chování kvasinek. Působení těchto faktorů může vést k poškození kvasinkových buněk a jejich úhynu. Kvasinky mají proti různým druhům stresu vyvinuty různé obranné mechanismy. [3]

2.5.2 Biologické faktory

2.5.2.1 Kokultivace

Kokultivací se rozumí interakce nebo soužití dvou nebo více různých mikroorganismů. Tato bakalářská práce je zaměřena na kokultivace karotenogenních kvasinek a mikrořas. Řadí se mezi biologické stresové faktory, protože jednotlivé mikroorganismy se mohou vzájemně ovlivňovat, čerpat si potřebné živiny apod. Esenciální pro kokultivace je volba správného produkčního média, které by vyhovovalo oběma mikroorganismům. Tyto kultivace by se mohly ukázat být velmi důležité při čištění odpadních vod, syntéze bioaktivních látek a v neposlední řadě rovněž při degradaci halogenů a uhlovodíků. V ideálním případě, pokud by se kokultivace povedly, dojde ke zlepšení procesu výměny plynů a také k úpravě pH média. Teoreticky se vychází z předpokladu, že kvasinky by mikrořasám poskytovaly oxid uhličitý, kdežto zelené fotoautotrofní řasy by pro změnu poskytovaly kyslík kvasinkám. V důsledku by se zvýšila rychlost růstu mikroorganismů a tím tedy také množství vzniklé biomasy. Také řasové sekundární metabolity by mohly pozitivně ovlivňovat růst kvasinek. [41][42][43]

2.5.1 Fyzikální faktory ovlivňující mikroorganismy

2.5.1.1 Teplota

Teplota ovlivňuje v podstatě všechny mikroorganismy. Za teplotní stres se může považovat jak zvýšení, tak snížení teploty. Zvýšením teploty dochází především k urychlení syntetických i degračních procesů, inaktivaci enzymů a buňky začínají produkovat specifické bílkoviny, kterým se říká HSPs – heat-shock proteins, které kvasinkám pomáhají zvýšit jejich odolnost vůči teplotním změnám. Významnější pro praktické využití je chladový šok. Pro správnou funkci buněk je esenciální prostupnost buněčných membrán, závisující převážně na obsahu sterolů a poměru nasycených a nenasycených aminokyselin.

V důsledku významného snížení teploty získává membrána vlastnost gelu, což vážně poškozuje kvasinkovou buněčnou stěnu. Minimální teplota znamená nejnížší možnou teplotu, kdy se mikroorganismy mohou rozmnožovat. Maximální teplota je vyšší teplota, při které jsou mikroorganismy ještě schopné se rozmnožovat. Nejvyšší rychlosti rozmnožování dosahují MO při optimální teplotě a jsou usmrceny při letální teplotě. [3]

2.5.1.2 Aktivita vody

Veškerý kvasinkový, řasový a sinicový metabolismus probíhá ve vodném prostředí. Musí se zajistit dostatek vody, na které nejsou vázány žádné rozpuštěné látky. Aktivita vody se vyjádří pomocí poměru počtu molů vody k součtu počtu molů vody a molů rozpuštěné látky. Minimální aktivita nutná pro kvasinky je 0,6-0,73, pro mikrořasy a sinice se poté pohybuje v rozmezí 0,79-0,99. [3]

2.5.1.3 Vliv ultrafialového záření

UV záření je také důležitým stresovým faktorem pro mikroorganismy. UV záření o kratších vlnových délkách má pro buňky smrtící účinky. V případě vyšší dávky záření je kvasinky pohlcují. Karotenoidní buňky jsou vůči UV záření relativně odolné. [3]

2.5.2 Chemické faktory

2.5.2.1 Hodnota pH

Důsledkem mikrobiálního metabolismu dochází ke změně hodnoty pH, jak vlivem vzrůstající koncentrace CO₂, tak především produkcí organických kyselin kvasinek. Velký vliv na vitalitu kvasinek má také vliv vnitrobuněčného pH. Ideální hodnota pH se nachází v rozmezí 4,8-5,5, ale většina organismů je schopna si pH sama regulovat. Ideální rozmezí pH pro řasy je 7-9. Při vyšších výkyvech pH může v důsledku dojít ke zničení celé kultury. [3]

2.5.2.2 Antimikrobní látky

Jako antimikrobní látky se mohou uvést antibiotika, silná oxidační a redoxní činidla, formaldehyd atd. Tyto látky mají nepříznivý účinek na mikroorganismy a to tak, že buď zastavují jejich rozmnožování nebo je dokonce usmrcují. [3]

2.5.2.3 Oxidační stres

Oxidační stres vzniká v důsledku přítomnosti reakcí s volnými kyslíkovými radikály i reaktivními druhy kyslíku, např. peroxidem vodíku. Tyto látky vznikají při oxidačním metabolismu kvasinek a vážně poškozují důležité části buněk. [3]

2.5.2.4 Osmotický stres

Osmotický stres závisí na koncentračních rozdílech uvnitř i vně buňky. Může být zapříčiněn zvyšující koncentrací solí a z toho vyplývající snížené aktivity vody. Látky, chránící buňky proti osmotickému stresu jsou trehalosa, která musí být přítomna uvnitř buňky a glycerol a aminokyseliny vně buňky. [3]

2.5.2.5 Výživa kvasinek

Kvasinky pro svůj správný vývoj a růst potřebují jak organické sloučeniny, které fungují jako zdroje uhlíku a dusíku, tak anorganické sloučeniny a některé růstové látky, které si nejsou schopny samy syntetizovat. Důležitá je také přítomnost prvků, které jsou součástí buněčné hmoty. Nejdůležitějšími prvky jsou C, O, H, N, S a P, z iontů poté Ca²⁺, K⁺, Mg⁺, Na⁺. Zdroje uhlíku se můžou rozdělit do tří skupin - sacharidové zdroje (sacharóza, glukóza, fruktóza, galaktóza, laktóza), přírodní zdroje (škrob, melasa, syrovátka, sulfítové výluhy, celulóza a odpadní papír) a petrochemické zdroje (alkoholy, uhlovodíky, organické kyseliny). Sacharidy se používají jako nejvhodnější zdroj energie a uhlíků. Zdrojem dusíku bývají amonné soli. Chvíli před případným úplným vyčerpáním živin je buňka schopna adaptovat svůj metabolismus na období deficitu živin. Kvasinka degraduje a poté recykluje nepotřebné buněčné komponenty, lipidy a proteiny. Buňka si v klidovém režimu postupně tvoří lipidická tělíska, tvořené molekulami triacylglycerolu a esterů sterolu, obalené vrstvou fosfolipidů.

V případě dlouhodobého hladovění buňky je možnost získat energii právě z těchto tělísek β-oxidací mastných kyselin uvnitř mitochondrií. Jakmile se buňka dostane do nutričně bohatého prostředí tak se tělíska úplně odbourají za vzniku membránových lipidů. Nejvýhodnějším zdrojem živin jsou odpadní substráty, díky své nízké ceně a nevhodnosti dalšího zpracování v průmyslu. Může se jednat o peří, syrovátku, glycerol, vinařské odpady, pivovarnické odpady a další. [4]

2.5.2.6 Výživa mikrořas

Pro průběh fotosyntézy je esenciální přítomnost světelného záření. To může být přírodní nebo i umělé. Fotosyntéza je pro autotrofní organismy zdrojem uhlíku. Podstatnou roli hraje také složení živného média. Je nutná přítomnost všech minerálních látek a solí, které potom slouží jako zdroje jednotlivých látek, například dusíku. [44]

2.6 Analytické metody

Analytické metody jsou definovány jako skupina technik, které umožňují získávání kvalitativních a kvantitativních informací o složení vzorku. Metody se dělí do tří skupin, a to spektroskopie, chromatografie a povrchová analýza. Spektroskopie je založená na interakci částic se zářením. Chromatografie se zabývá separací rozdílných složek ve vzorku na základě různých chemických interakcí jednotlivých zkoumaných složek. Povrchová analýza se poté zabývá zkoumáním a kvantifikací všech prvků a sloučenin nacházejících se na povrchu zkoumaného vzorku. [45]

2.6.1 Spektrofotometrie

Je to optická metoda patřící mezi fyzikálně-chemické analytické metody. Je založena na interakci elektromagnetického záření s hmotou. Řadí se mezi molekulovou absorbní spektrometrii. Tato metoda pracuje s rozsahem vlnových délek v rozmezí 200-800 nm. Tato metoda pracuje na principu měření energie, která je pohlcena vzorkem při průchodu záření. Absorbací elektromagnetického záření molekulou dochází ke změně elektronového stavu dané látky- dochází k elektronovým přechodům. Výstupem jsou poté absorbní spektra vyjádřena jako závislost absorbance na vlnové délce. Dalším možným výstupem jsou spektra závislosti absorbance na koncentraci vzorku. Díky poslednímu zmíněnému spektru se takto tedy mohou získávat informace o koncentraci vzorku za pomoci známé hodnoty absorbance. [46][47]

2.6.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapalinová chromatografie je separační metodou, kdy vzorek interaguje jak se stacionární tak i s mobilní fází, kdy je mobilní fáze kapalná látka. V průběhu separace se tedy analyt mezi tyto dvě fáze dělí. Doba, kterou analyt stráví v koloně, je závislá na rozdílné afinitě jednotlivých složek k oběma fázím. Velkou výhodou kapalinové chromatografie je fakt, že se vzorek nemusí převádět na těkavé sloučeniny a rovněž nedochází k tepelné degradaci vzorku. [48][49]

Separace a následná eluce jednotlivých složek analytu závisí jak na povaze mobilní, tak i stacionární fáze. Existují různé typy eluce. Pokud by se jednalo o izokratickou eluci, tak se složení mobilní fáze nemění a je konstantní. Tato eluce se používá pro dělení látek s rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. U gradientové eluce se naopak složení mobilní fáze mění. Tento druh eluce je vhodný pro dělení látek, mající stejné nebo podobné fyzikálně-chemické vlastnosti. Výstupem této metody je chromatogram, kdy je znázorněna časová závislost na intenzitě signálu.[48][49]

2.6.3 Plynová chromatografie (GC)

Separční metoda používaná k oddělování látek s realitně nízkými body varu. Mobilní fází je zde plyn, nijak neinteragující se vzorkem. Nosnými plyny bývají vodík, dusík nebo helium. V této chromatografické metodě je separace založena pouze na interakci analytů se stacionární fází. Kolony, které se používají bývají kapilární nebo náplňové. Kapilární kolony jsou tvořeny dutou křemennou kapilárou, která je potažena polyamidem. Stacionární fáze pokrývá vnitřní stěny kapiláry. Kapilární kolony dosahují vysokých separačních účinností, v důsledku k velkému poměru mezi délkou kolony, která se pohybuje v rozmezí 10 až 100 metrů a vnitřním průměrem kolony, kde se rozměry pohybují v řadech stovek mikrometrů. Díky tomuto poměru se vytváří obrovská separační plocha. Náplňové kolony se funkčně i konstrukčně dají srovnat s těmi, určenými pro HPLC. Výstupem GC je stejně jako u HPLC chromatogram. [50]

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je srovnání produkčních vlastností vybraných karotenogenních kvasinek, mikrořas a možnosti jejich kokultivace. V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- Přehledná literární rešerše zaměřená na srovnání produkčních vlastností mikrořas a kvasinek
- Screening možností kokultivace vybraných kmenů karotenogenních kvasinek a mikrořas
- Srovnání produkce při klasické kultivaci a kokultivaci s využitím exogenních stresů
- Optimalizace produkčních médií a postupů kokultivace
- Srovnání produkce biomasy a její celkové zhodnocení
- Vyhodnocení výsledků

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie pro kultivaci kvasinek, mikrořas a sinic

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

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

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

4.2 Přístroje a pomůcky

4.2.1 Přístroje a pomůcky pro kultivace

Box Aura mini iBopTech (ČR)
Třepačka Yellow line, (SRN)
Třepaný inkubátor, ZWYR-D2401 – Labwit, BioTech (ČR)
Centrifuga Hermle Z36 HK, (ČR)
Analytické váhy Boeco (CRN)
Termoblok VWR, (ČR)
Vortex/homogenizátor disruptor Genie, Scientific Industries, Inc. (USA)

4.2.2 Přístroje pro izolaci a analýzu vybraných analytů

Spektrofotometr VIS, Helios δ, Unicam (GB)

Lyofilizátor Labconco FreeZone 4.5 Freeze Dryer (USA)

Termoblok VWR, (ČR)

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

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

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

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

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

4.3 Použité mikroorganismy

4.3.1 Kvasinky

Rhodotorula kratochvilovae CCY 20-2-26

Phaffia rhodozyma CCY 77-1

Rhodospiridium toruloides CCY 062-002-004

4.3.2 Mikrořasy

Desmodesmus acutus CCALA 439

Desmodesmus quadricauda CCALA 463

Coccomyxa sp. CCALA 912

Chlorella sorokiniana CCALA 260

Chlamydomonas reinhardtii CCALA 928

4.3.3 Sinice

Synechococcus nidulans CCALA 188

4.4 Kultivace mikroorganismů

4.4.1 Kultivace karotenogenních kvasinek

Karotenogenní kvasinky rodu *Rhodotorula kratochvilovae*, *Rhodospiridium Toruloides* a *Phaffia rhodozyma* byly kultivovány v prostředí BBM média, s různými zdroji uhlíku a dusíku.

4.4.1.1 Inokulum I a II

První fázi kultivace je příprava univerzálního živného média pro mikroorganismy. Kultivace byla prováděna doufázovou inokulací, kdy do vysterilovaného inokula I o objemu živného média 40 ml, byly zaočkovány čtyři kličky vybraného druhu kvasinek ze zásobních Petriho misek. V inokulu I byly kvasinky ponechány po dobu jednoho dne.

Druhý den se část objemu inokula I přeočkovalo do inokula II v poměru 1:5, kdy inokulum II mělo objem 100 ml. Složení inokula I a II je totožné (viz Tabulka č. 1), inokula se liší pouze v objemu.

Tabulka č. 1. Složení YPD média

Složení inokulačního média	
Složka	Množství
Destilovaná voda	1000 ml
Kvasničný autolyzát	10 g
Bakteriologický pepton	20 g
Glukóza	20 g

4.4.1.2 Produkční média

Poslední fází kultivace bylo přenesení kvasinek z inokula II do připravených produkčních médií. Média obsahovala místo destilované vody BBM medium (složení viz Tabulka č. 2 a Tabulka č. 3), jedna sada médií měla jako zdroj uhlíku glukózu a různé zdroje dusíku (viz Tabulka č. 4), druhá glycerol a také různé zdroje dusíku (viz Tabulka č. 5).

Tabulka č. 2. Složení BBM média

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

Tabulka č. 3. Složení jednotlivých složek BBM média

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

Tabulka č. 4. Složení glukozového média

Složení glukozového média	
Složka	Koncentrace
Glukóza	30 g/l
Různé zdroje dusíku	
Složka	Koncentrace
Močovina	1,84 g/l
Síran amonný	4 g/l
Kvasničný autolyzát	7,85 g/l

Tabulka č. 5. Složení glycerolového média

Složení glukozového média	
Složka	Koncentrace
Glycerol	30 g/l
Různé zdroje dusíku	
Složka	Koncentrace
Močovina	1,84 g/l
Síran amonný	4 g/l
Kvasničný autolyzát	7,85 g/l

4.4.2 Kultivace mikrořas a sinic

Pro kultivaci mikrořas a sinic bylo použito produkční BBM medium, kde jako zdroje stresu byly použity různé zdroje uhlíku a jako zdroj dusíku byla použita močovina (viz Tabulka č. 6). Použité mikrořasy byly *Scenedesmus obliquus*, *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus quadricauda*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlamydomonas reinhardtii*. Použité sinice byly *Synechococcus nidulans*. Mikroorganismy byly očkovány do 40 ml produkčních médií, ze zásobních roztoků v poměru 1:5. Experiment byl proveden třikrát, kdy u dvou experimentů byly mikroorganismy kultivovány za přístupu světla a v posledním experimentu byly kultivovány ve tmě.

Tabulka č. 6. Složení řasového a siničného média

Složení řasového a siničného média	
Močovina	1,84 g/l
Různé zdroje uhlíku	
Glukóza	30 g/l
Glycerol	30 g/l

4.4.3 Kokultivace kvasinek a mikrořas (sinic)

Experiment kokultivace mikroorganismů probíhal více způsoby. Ze začátku se kultivovalo v malých objemech v Erlenmeyerových baňkách, kdy nás zajímalo, zda bude kokultivace vůbec možno provádět, jestli jsou mikroorganismy spolu symbiotické. Na základě nárustu biomasy jsme vyhodnotili, které kvasinky a řasy spolu byly nejkompatibilnější a s kokultivací jsme dále pokračovali ve větších objemech v provzdušňovacích lahvích.

4.4.3.1 Kokultivace v Erlenmeyerových baňkách

Pro kokultivaci kvasinek a řas byly připraveny produkční media sestávající se ze 40 ml BBM media, zdrojem uhlíku byl v jedné řadě experimentů glycerol a v druhé glukóza, zdrojem dusíku poté byla pokaždé močovina (shodné s médií pro kultivaci řas, viz Tabulka č. 6). Vybrané druhy kvasinek byly *Rhodotorula kratochvilovae*, *Phaffia rhodozyma* a *Rhodospiridium toruloides*. Tyto kvasinky byly to produkčních médií zaočkovány z Inokula II, v množství 8 ml. Poté bylo přidáno tolik mililitrů vybraných řas, aby optická hustota činila 0,15 (*Coccomyxa* sp., *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus quadricauda*, *Synechococcus nidulans*), které byly kultivovány v provzdušňovacích lahvích a byly probublávány CO₂. Celý process kokultivace probíhal 10 dní.

4.4.3.2 Kokultivace mikrořas s kvasinkou *Rhodospiridium toruloides* v aerovaném prostředí

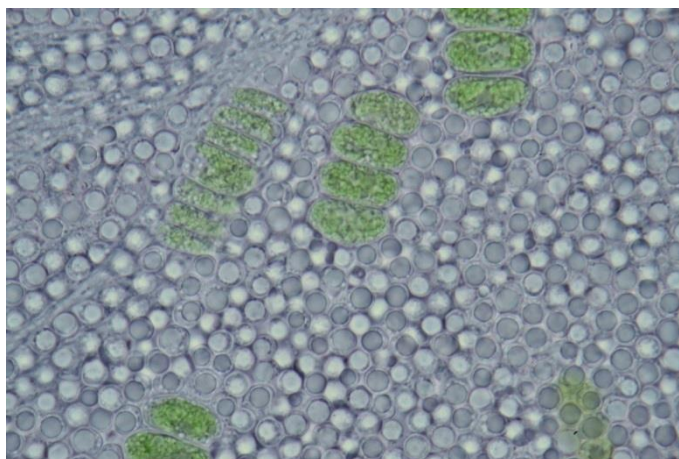
Pro kokultivace v Pyrexových lahvích byly vybrány kvasinky rodu *Rhodospiridium toruloides* a probíhaly celkem čtyři kokultivace, kdy vybrané druhy řas byly *Desmodesmus Acutus*, *Coccomyxa* sp., *Chlamydomonas reinhardtii* a *Chlorella sorokiniana*. Kokultivace s řasou *Coccomyxa* probíhaly v 5 Pyrexových lahvích o objemu 400 ml, kdy zdrojem uhlíku byl glycerol (30 g/l) a zdrojem dusíku močovina (1,84 g/l). V jedné lahvi bylo zaočkováno pouze 10 ml *R. toruloides*, v druhé bylo zaočkováno jenom 20 ml *Coccomyxa* a ve zbylých byly jednotlivé mikroorganismy zaočkovány v poměru 1:1, 1:2 a 1:4. Řasy zastupovaly větší objemové procento. Při očkování řas se do provzdušňovací lahve naočkovalo tolik zásobního roztoku, aby při poměru 1:1 byla absorbance řasy při 680 nm 0,15, při poměru 1:2 0,30 a při poměru 1:4 0,60. Při zaočkování kvasinkového média pak byla absorbance 0,1. Zbylé tři kokultivace probíhaly úplně stejně, pouze s tím rozdílem, že čistá řasa byla zaočkována do dvou lahví, z kterých jedna obsahovala BBM médium, glycerol jako zdroj uhlíku a močovinu jako zdroj dusíku a druhá obsahovala pouze BBM médium a močovinu (1,84 g/l). Pro tento krok jsme se rozhodli proto, že prostředí s glycerolem bylo mnohem náchylnější na kontaminaci bakteriemi a plísněmi, které v konečném důsledku byly schopné přerůst řasu. U všech kokultivací s touto kvasinkou byl jako zdroj uhlíku použit glycerol. Kokultivace trvaly 14 dní.



Obrázek č. 14. Kokultivace *R. Kratoch.* a *Desm. quadr.* v provzdušňovacích lahvích

4.4.3 Kokultivace mikrořas s kvasinkou *Rhodotorula kratochvilovae* v aerovaném prostředí

Pro kokultivace s kvasinkou *R. kratochvilovae* byly vybrány řasy *Coccomyxa* sp., *Desmodesmus quadricauda*, *Desmodesmus acutus* a *Scenedesmus obliquus*. Kokultivace s jednotlivými řasami probíhaly v 6 Pyrexových lahvích. Ve dvou lahvích byla čistá řasa, kdy jedna láhev obsahovala BBM medium, zdroj uhlíku (30 g/l) a zdroj dusíku (1,84 g/l). Zdroj dusíku byla vždy močovina, zdroj uhlíku byla buď glukóza, nebo glycerol. A druhá láhev obsahovala pouze BBM medium a močovinu (1,84 g/l). Pro tento krok jsme se rozhodli se stejného důvodu jako u předešlých kokultivací. V třetí lahvi bylo zaočkováno pouze 10 ml *R. kratochvilovae* a ve zbylých byly jednotlivé mikroorganismy zaočkovány v poměru 1:1, 1:2 a 1:4 ml. Řasy opět zastupovaly větší objemové procento. Stejně jako v předchozím případě bylo při očkovaní řas do provzdušňovací lahve naočkováno tolik zásobního roztoku, aby při poměru 1:1 byla absorbance řasy při 680 nm 0,15, při poměru 1:2 0,30 a při poměru 1:4 0,60. Při zaočkování kvasinkového média pak byla absorbance 0,1. U těchto experimentů se do provzdušňovacích lahví prvně naočkovaly řasy, nebyl přidán žádný zdroj uhlíku a nechaly se den narůstat samy, bez přítomnosti kvasinek. Ty byly spolu se zdroji uhlíku přidány až po dni. V případě kokultivací u řas *D. quadricauda*, *D. acutus* a *Scen.obliquus* byla jako zdroj uhlíku pokaždé glukosa. V případě *Coccomyxa* to byl glycerol. Kokultivace trvaly 14 dní.



Obrázek č. 15. Snímek z optického mikroskopu, kokultivace *D.quad.* a *R. kratoch.*

4.4.4 Stanovení nárůstu biomasy

Ke stanovení nárůstu se používala zlyofilizovaná forma biomasy. V případě experimentů v Erlenmeyerových zkumavkách bylo odebráno 30 ml roztoku vzorku a následně se vzorek zcentrifugoval při 7000 rpm po dobu 6 minut. Po centrifugaci byl odlit supernatant, usazený vzorek byl promytý destilovanou vodou a znovu zcentrifugován. Po opětovné centrifugaci byl opět odlit supernatant a vzorek byl opět prolit destilovanou vodou a převeden do předem zvážené zkumavky typu Eppendorf.

V případě experimentů v Pyrexových lahvích bylo odebráno 200 ml vzorku. Postup centrifugace byl stejný, lišil se pouze v posledním kroku. Biomasa nebyla převedena do mikrozkušavky typu Eppendorf, ale ponechala se ve stávající centrifugační zkumavce objemu 50 ml. Takto zcentrifugované vzorky byly připraveny na lyofilizaci.

Po zlyofilizování se v případě zkumavek Eppendorf vážily celé zkumavky a váha biomasy byla vypočítána odečtem plné a prázdné Eppendorfovy zkumavky. V případě vzorků v centrifugačních zkumavkách byl vzorek přenesen na vážící misky a zvážen na analytických váhách.

4.4.5 Příprava vzorků pro analytickou metodu HPLC

4.4.5.1 Acetonová metoda

Acetonová metoda byla použita v případě zpracování biomas mikrořas, které produkují chlorofyly a polárnější karotenoidy. Lyofilizovaný vzorek byl odvážen do mikrozkušavky typu Eppendorf se závitem. V případě kvasinek se odvážené množství pohybovalo v rozmezí 30 mg, u mikrořas a sinic to bylo 10 mg. Vzorek byl následně rehydratován asi 1 ml vody a vložen do mrazicího boxu, aby došlo k poškození struktury buněk. V mrazicím boxu byl ponechán minimálně 30 minut. Po vyndání z mrazicího boxu byl k vzorku pipetován 1 ml acetonu a přidány mikro skleněné kuličky, minimálně ve dvojnásobném množství než biomasa. Mikrozkušavka byla umístěna na vortex a třepána po dobu 15-30 minut. Po vytřepání byl obsah mikrozkušavky přelit do 15 ml centrifugační zkumavky, mikrozkušavka se vypláchla ještě 1 ml acetonu, který byl posléze také vlit do 15 ml centrifugační zkumavky a přidalo se do ní ještě 2 ml acetonu, aby finální objem v centrifugační zkumavce činil 4 ml. Z tohoto množství byly odpipetovány 2 ml a ty následně byly odpařeny na dusíkové odparce. Vysušená biomasa byla rozpuštěna ve 2 ml směsi ethylacetátu a acetonitrilu HPLC kvality v poměru 1:2. Poslední krok extrakce spočíval v přefiltrování vzorku do vialky o objemu 1,8 ml a uložení do mrazicího boxu před samotnou HPLC analýzou. Parametry HPLC sestavy jsou uvedeny v tabulce (Tabulka č. 7).

4.4.5.2 Extrakce dle Folsche

Tento typ extrakce byl použit pro zpracování kvasinkových vzorků, protože kvasinky produkují více nepolárních karotenoidů. Bylo odváženo 5-15 mg biomasy do mikrozkušavky typu Eppendorf se závitem a těsněním. Vzorek se následně hydratoval 1 ml destilované vody. Pro lepší narušení struktury buněk biomasy se vzorek na 20-30 min vložil do -80°C). Poté byly vzorky vytaženy, rozmrazeny a na centrifuze stočeny. Supernatant byl vylit. Přidaly se skleněné kuličky (glass pearls) a 1 ml methanolu p.a. Vzorky se pak daly na 15-30 minut třepat na vortex. Poté se vzorek převedl do 15 ml centrifugační zkumavky a přidaly se k němu ještě 2 ml chloroform laboratorní kvality. Zkumavky se daly na 10 min třepat na vortex. Přidal se 1 ml destilované vody a vzorky se stáčely na centrifuze při 1500-2000 rpm po dobu 1 minuty. Po stáčení se odpipetovala spodní chloroformová fáze a ta se následně odpařila v termobloku, kde inertní atmosféru zajišťoval N_2 . Po odpaření se ke vzorku přidal 1 ml směsi ethylacetátu a acetonitrilu HPLC kvality v poměru 1:2. Posledním krokem bylo přefiltrování vzorku přes 0,4 μm filtr PTFE do vialky o objemu 1,8 ml. Parametry HPLC sestavy jsou uvedeny v tabulce (Tabulka č. 7).

Tabulka č. 7. Gradientový program a složení mobilních fází pro HPLC analýzu karotenoidů

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

4.4.6 Transesterifikace vzorku mikrobiální biomasy

Do kryptoplovacích vialek se odvážílo přibližně 10 mg zlyofilizované biomasy. Přidalo se 1,8 ml transesterifikační směsi.

Ta obsahuje 15% H_2SO_4 v methanolu HPLC kvality a interní standard kyseliny heptadekanové v koncentraci 0,5 mg/ml. Takto připravené vzorky byly zakryptovány a nechaly inkubovat v termobloku po dobu 2 hodin při teplotě 85°C. Po uplynutí této doby jsou transesterifikované vzorky volně ponechány, aby se vychladily na pokojovou teplotu.

Do vialek o objemu 5 ml se napipetuje 0,5 ml 0,05 mol/l NaOH a kvantitativně se do ní převede obsah vialky se vzorkem. V dalším kroku se přidá 1 ml hexan HPLC kvality, vialka se uzavře a nechá se na vortexu třepat po dobu 5 minut. Po oddělení fází se z organické hexanové fáze odebere 0,1 ml a převede do čisté 1,8 ml vialky spolu s 0,9 ml hexane HPLC kvality. Takto připravený vzorek je analyzován pomocí GC. Parametry GC sestavy jsou uvedeny v tabulce (Tabulka č. 8).

Tabulka č. 8. Parametry GC/FID

Kapilární kolona	Zebron ZB-FAME, o rozměrech 30 m × 0,25 mm × 0,20 μm
Dávkování	Autosampler Thermo Scientific AI 1310
Objem nástřiku vzorku	1 μl
Poměr nástřiku děliče toku	10
Konstantní průtok nosného plynu H_2	1 ml/min
Detektor	Plamenově ionizační
Teplota	250 °C
Průtok	Vzduch 350 ml/min, make-up N_2 30 ml/min, H_2 35 ml/min

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Kvasinky

V těchto experimentech byly pro kultivaci použity kmeny kvasinek *Rhodotorula kratochvilovae*, *Phaffia rhodozyma* a *Rhodospiridium toruloides*. První kultivace probíhaly po dobu 4 dnů, poté po dobu 10 dnů. Byla použita různá média, u kterých se měnily zdroje uhlíku a dusíku. Dále bylo důležité zjistit, jak dobře kvasinky porostou na BBM médiu, které je esenciální pro řasy. Bez BBM média by nebylo možné zkoušet kokultivace, protože mikrořasy by bez něj nepřežily.

5.1.1 Kmen *Rhodotorula kratochvilovae*

Kultivace po dobu 4 dní

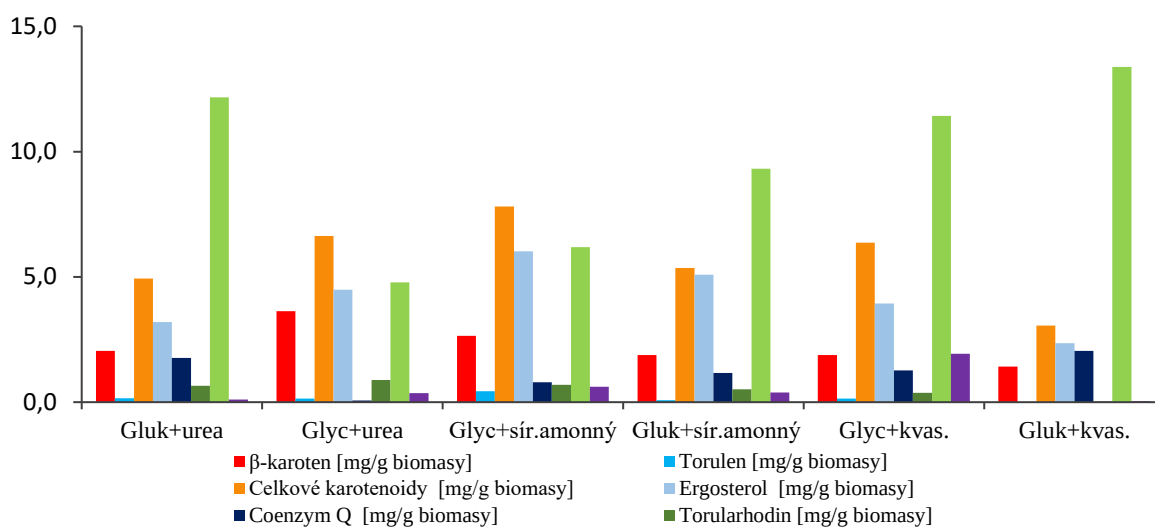
V tomto experimentu, kdy byl kmen *R. kratochvilovae* kultivován po dobu 4 dní v Erlenmeyerových baňkách na médiu v objemu 40 ml s různými zdroji uhlíku a dusíku byl sledován nárůst biomasy a jednotlivých metabolitů. Z tabulky (Tabulka č. 9) lze vidět, že největší nárůst biomasy byl na médiu, které obsahovalo glukózu a kvasničný autolyzát, poté na médiu s glukózou a ureou a glycerolem a kvasničným autolyzátem. Nejmenší nárůst biomasy byl na médiu, které obsahovalo glycerol a ureu.

Celkovou produkci metabolitů v závislosti na složení média lze vidět v grafickém znázornění (Obrázek č. 16). Největší produkci karotenoidů vykazují kvasinky v médiu s glycerolem a síranem amonným. V ostatních médiích byla jejich produkce podobná. Největší zastoupení ergosterolu bylo u kultivace na glycerolovém médiu se síranem amonným (6,02 mg/g biomasy) a na glukózovém médiu se síranem amonným (5,09 mg/g biomasy). Nejvíce β -karotenu bylo zaznamenáno u média s glycerolem a ureou (3,63 mg/g biomasy). MO ve všech médiích s výjimkou toho s glukózou a kvasničným autolyzátem byly schopné produkce torularhodinu a lykopenu. Jako produkt ve všech médiích byl také zaznamenán koenzym Q. Procentuální složení akumulovaných lipidů ukazuje grafické znázornění (Obrázek č. 17). Na všech médiích jsou procentuálně nejvíce zastoupeny MUFA. Produkce PUFA a SFA jak v rámci jednotlivých médií, tak i celkově, je podobná. Největší procentuální zastoupení MUFA mají média glukóza a urea a glukóza s kvasničným autolyzátem. Největší produkci SFA mělo medium glycerol a urea a největší zastoupení PUFA bylo v médiu glycerol a kvasničný autolyzát.

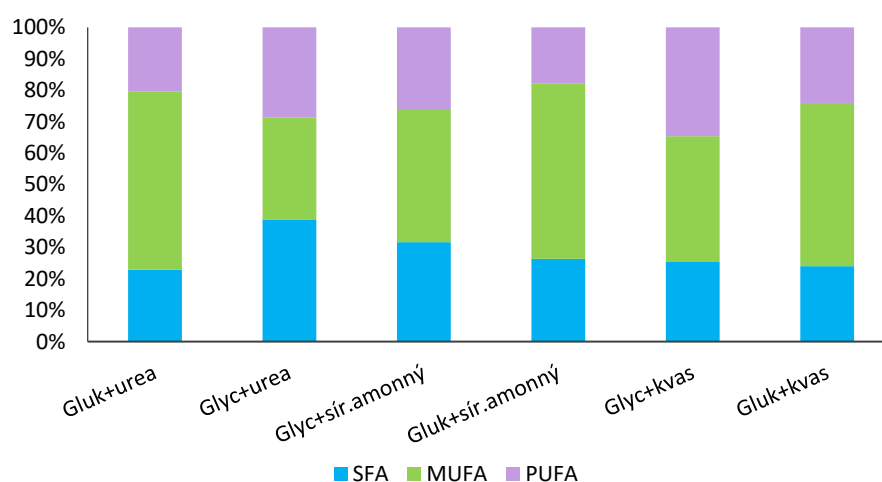
Celková produkce lipidů na množství biomasy je znázorněna v grafickém znázornění (Obrázek č. 18). Největší procentuální zastoupení lipidů v poměru k biomase vykazovaly kvasinky na médiu s glycerolem a ureou. Největší množství vyprodukovaných lipidů bylo zaznamenáno u mikroorganismů kultivovaných v médiích glukóza s ureou a glukóza s kvasničným autolyzátem. Největší procentuální zastoupení lipidů bylo zaznamenáno u kvasinek rostoucích na glycerolovém médiu s ureou.

Tabulka č. 9. Nárůst biomasy *R. kratochvilovae* v různých produkčních médiích

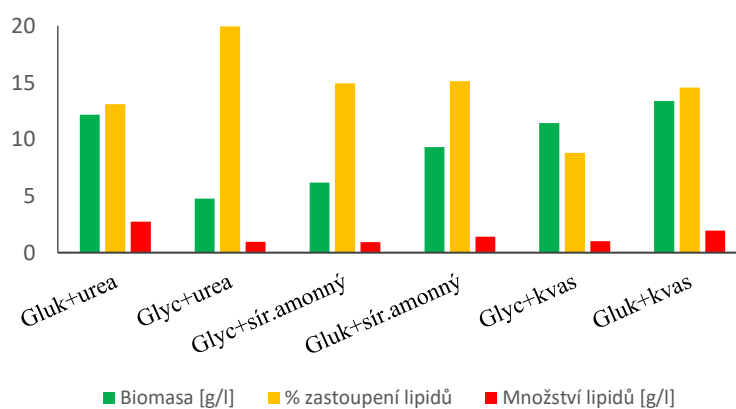
Glukóza urea	Glycerol urea	Glycerol (NH ₄) ₂ SO ₄	Glukóza (NH ₄) ₂ SO ₄	Glycerol kvas.	Glukóza kvas.
12,17 g/l	4,78 g/l	6,19 g/l	9,32 g/l	11,42 g/l	13,38 g/l



Obrázek č. 16. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *R. kratochvilovae* na různých produkčních médiích



Obrázek č. 17. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *R. kratochvilovae* v různých produkčních médiích po 4 dnech



Obrázek č. 18. Grafické znázornění produkce lipidů s kmenem *R. kratochvilovae* v různých produkčních médiích po 4 dnech

Kultivace po dobu 4 dnů na BBM médiu

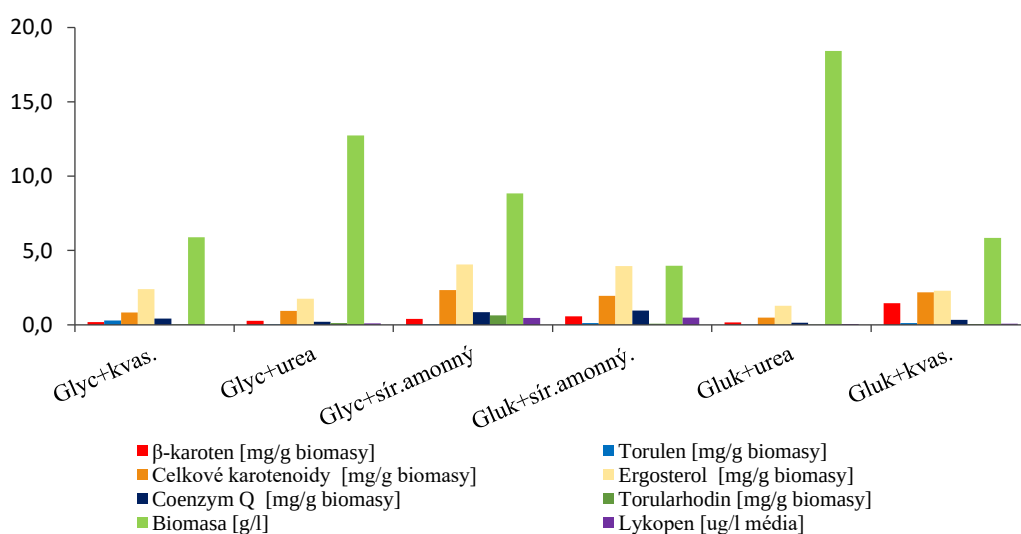
V tomto experimentu, byl kmen *R. kratochvilovae* kultivován po dobu 4 dní stejně jako v předchozím experimentu. Rozdíl byl ten, že se již kultivovalo v Erlenmeyerových baňkách ve 40 ml BBM média s různými zdroji uhlíku a dusíku. Tabulka č. 10 ukazuje, že největší nárůst biomasy byl pozorován na BBM médiu s glukózou a ureou. Z tabulky lze také vidět, že v tomto experimentu byly výrazné rozdíly v produkci v závislosti na složení média. Nejmenší nárůst biomasy byl zaznamenán na médiu s glukózou a síranem amonným.

Celková produkce metabolitů v závislosti na složení média je zobrazena v grafickém znázornění (Obrázek č. 19). Největší produkce byla zaznamenána u produkčního média glukóza a glycerol se síranem amonným a v médiu s glukózou a kvasničným autolyzátem. Produkce ergosterolu byla nejvyšší u médií s glycerolem a síranem amonným (4,07 mg/g sušiny). Největší produkce β -karotenu je u média s glukózou a kvasničným autolyzátem (1,46 mg/g biomasy). Produkce koenzymu Q je nejvyšší u médií glycerol a síran amonný a glukóza se síranem amonným. Procentuální složení akumulovaných lipidů ukazuje grafické znázornění (Obrázek č. 20). Na všech médiích jsou procentuálně opět nejvíce zastoupeny MUFA, jejich množství v závislosti na produkčním médiu bylo ve všech srovnatelné. Produkce PUFA a SFA jak v rámci jednotlivých médií, tak i celkově, je podobná, až na média glycerol, glukóza, oba s kvasničným autolyzátem. Největší procentuální zastoupení MUFA mají kvasinky v médiu s glukózou a síranem amonným. Největší produkci SFA měla *R. kratochvilovae* na BBM médiu s glycerolem a ureou. Největší zastoupení PUFA měly kvasinky z média glukóza s kvasničným autolyzátem.

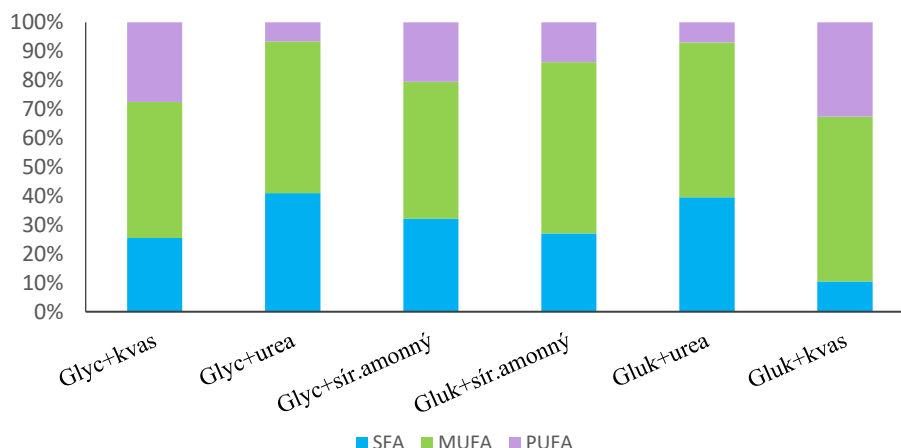
Celková produkce lipidů na množství biomasy je znázorněna v grafickém znázornění (Obrázek č. 21). Největší zastoupení lipidů vykazovaly kvasinky z média glycerol a síran amonný. Ostatní hodnoty zastoupení lipidů a produkce množství lipidů v g/l jsou ve zbylých médiích přibližně stejné. Největší procentuální zastoupení lipidů bylo zaznamenáno u média s glycerolem a síranem amonným.

Tabulka č. 10. Nárůst biomasy *R. kratochvilovae* v různých produkčních BBM médiích

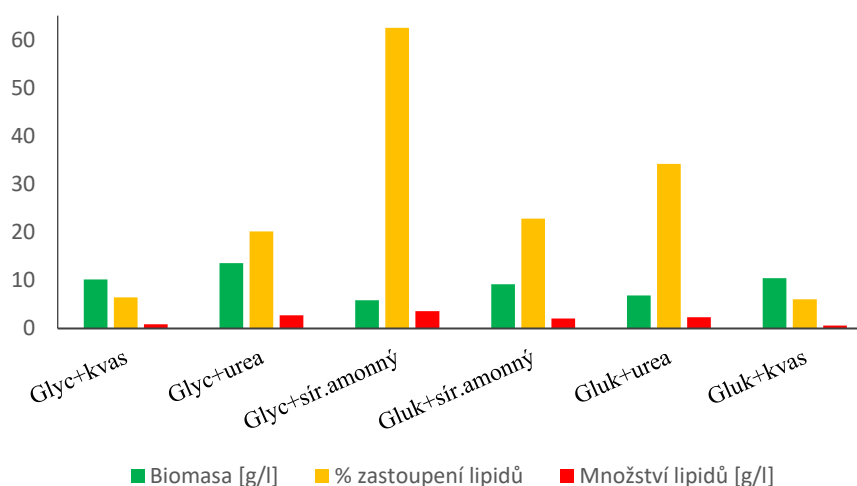
Glycerol kvas.	Glycerol urea	Glycerol (NH ₄) ₂ SO ₄	Glukóza (NH ₄) ₂ SO ₄	Glukóza urea	Glukóza kvas.
5,89 g/l	12,74 g/l	8,85 g/l	3,98 g/l	18,42 g/l	5,85 g/l



Obrázek č. 19. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *R. kratochvilovae* na různých produkčních BBM médiích po 4 dnech



Obrázek č. 20. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *R. kratochvilovae* v různých produkčních BBM médiích po 4 dnech



Obrázek č. 21. Grafické znázornění produkce lipidů s kmenem *R. kratochvilovae* v různých produkčních BBM médiích po 4 dnech

Kultivace po dobu 10 dní na BBM médiu

Pro tento experiment byl použit stejný objem média a stejné médium jako v přechodném případě, jediným rozdílem je tentokrát délka kultivace, MO se nechaly v médiu po dobu 10 dní. Z tabulky nárustu biomasy (Tabulka č. 11) lze vidět, že po 10 dnech se už kvasinky pravděpodobně dostaly do fáze odumírání MO, protože celková produkce biomasy je nižší než v předchozím experimentu. Nejvyšší produkci měly kvasinky v médiu glukóza, kvasničný atolyzát, nejmenší potom v médiu glycerol, kvasničný autolyzát.

Produkce metabolitů je znázorněna v grafickém zobrazení (Obrázek č. 22). Největší produkce karotenoidů probíhala v médiu s glukózou a ureou. Největší produkce ergosterolu byla na médiu s glycerolem a ureou (4,02 mg/g biomasy), β -karoten měl produkci přibližně stejnou u všech médií, ale nejmenší byl u média s glukózou a síranem amonným a nejvyšší u glycerolu s ureou (0,84 mg/g sušiny).

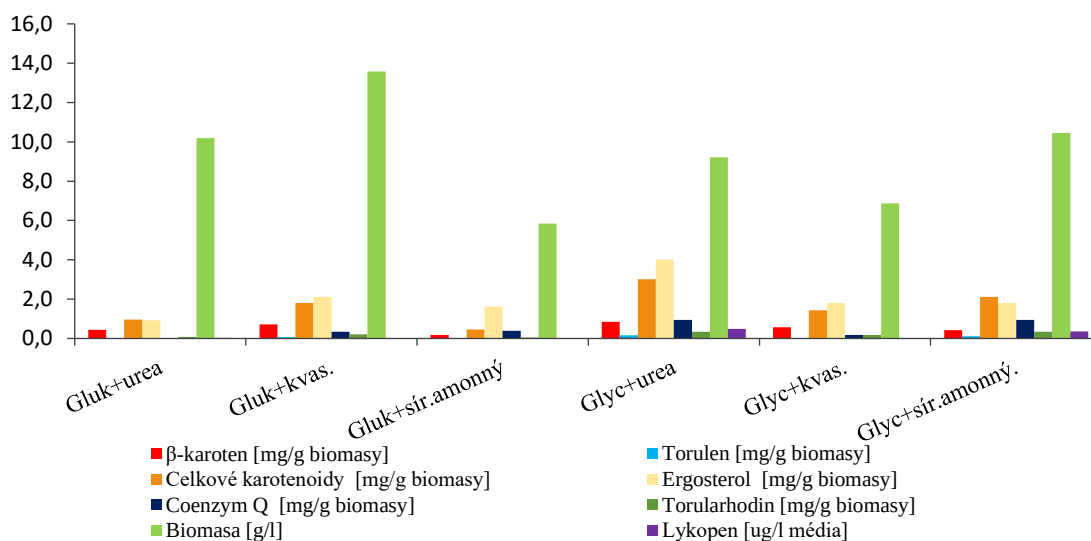
Nejvíce torularhodinu se vyprodukovalo na médiu s glycerolem a síranem amonným.

Procentuální složení akumulovaných lipidů je znázorněno v grafu (Obrázek č. 23). Produkce MUFA, PUFA i SFA je srovnatelná ve všech médiích, až na médium s glycerolem a kvas. autolyzátem, tam je produkce menší. Zároveň je v tomto médiu nejnižší produkce SFA a nejvyšší produkce PUFA ze všech médií.

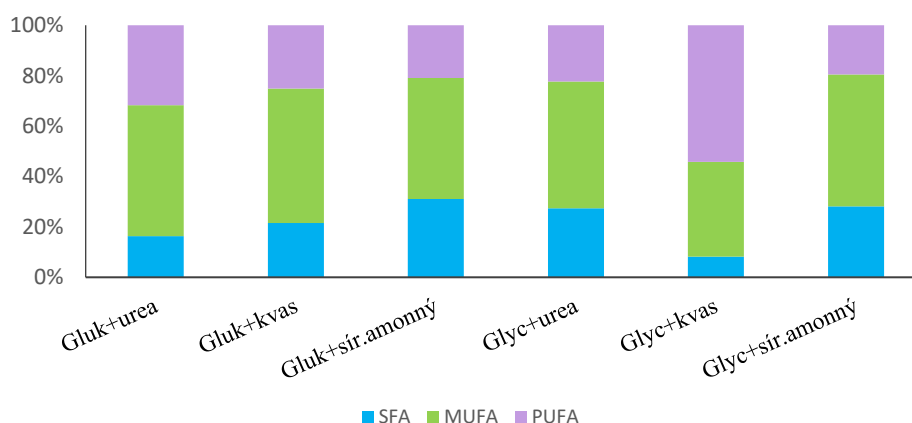
Produkce lipidů v závislosti na médiu je uvedena v grafu (Obrázek č. 24). Množství vyprodukovaných lipidů ve všech médiích je podobné, až na médium glycerol, kvas. autolyzát. Největší procentuální zastoupení lipidů vyprodukovaly MO v médiu s glycerolem a ureou.

Tabulka č. 11. Nárůst biomasy *R. kratochvilovae* v produkčních BBM médiích s různými zdroji C a N

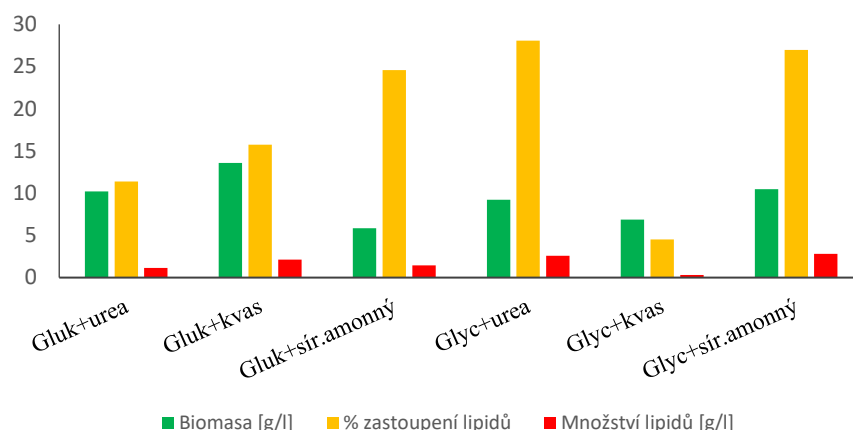
Glukóza urea	Glukóza kvas.	Glukóza (NH ₄) ₂ SO ₄	Glycerol urea	Glycerol kvas.	Glycerol (NH ₄) ₂ SO ₄
10,19 g/l	13,57 g/l	5,84 g/l	9,21 g/l	6,83 g/l	10,46 g/l



Obrázek č. 22. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *R. kratochvilovae* na různých produkčních BBM médiích po 10 dnech



Obrázek č. 23. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *R. kratochvilovae* v různých produkčních BBM médiích po 10 dnech



Obrázek č. 24. Grafické znázornění produkce lipidů s kmenem *R. kratochvilovae* v různých produkčních BBM médiích po 10 dnech

5.2 Kmen *Phaffia rhodozyma*

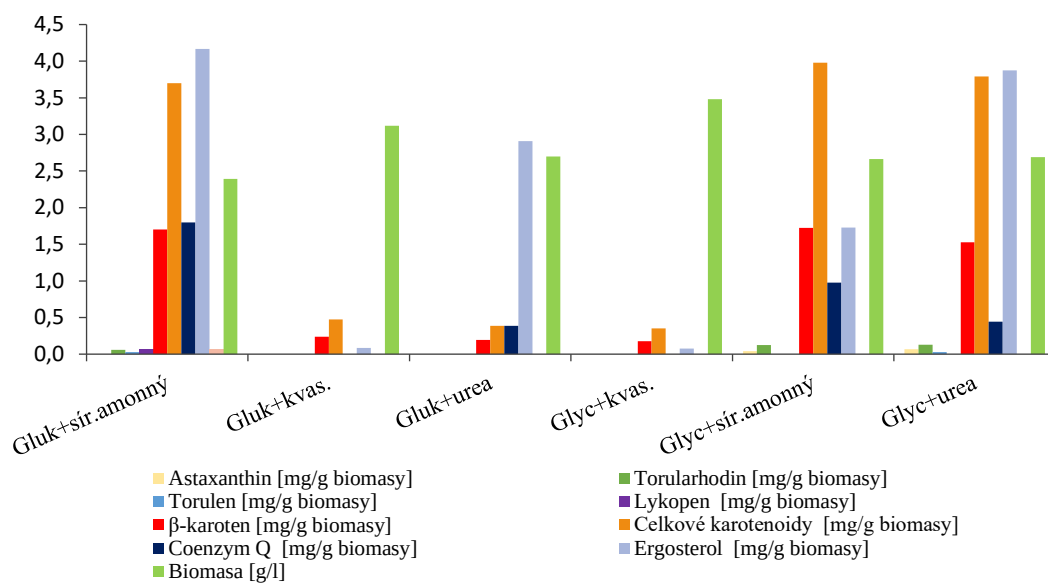
5.2.1 Kultivace 4 dny

Cílem této kultivace bylo porovnat produkci biomasy v závislosti na různých zdrojích dusíku a uhlíku v médiu. Z produkční tabulky (Tabulka č. 12) lze vidět, že největší nárůst biomasy byl v médiu s glycerolem a kvasničným autolyzátem, druhá největší je potom v médiu s glukózou a kvasničným autolyzátem. Ostatní produkce biomasy v médiích jsou srovnatelné. Uvedené produkce karotenoidů (Obrázek č. 25) ukazují, že největší a srovnatelné produkce byly v médiích glycerol se síranem amonným a ureou a v médiu glukóza s kvasničným autolyzátem. Ostatní produkce celkových karotenoidů jsou v porovnání s těmito třemi hodně malé. Největšími producenty ergosterolu pak byly MO na médiu s glycerolem a ureou (3,87 mg/g biomasy) a glukózou a síranem amonným (4,17 mg/g biomasy). Produkce β -karotenu byla nejvyšší u médií s glukózou a síranem amonným (1,71 mg/g biomasy), glycerolem a síranem amonným (1,73 mg/g biomasy) a glycerolem a ureou (1,53 mg/g biomasy). Koenzym Q byl také nejvyšší u těchto třech kokultivací, nejvyšší hodnotu měl u média s glukózou a síranem amonným (1,79 mg/g biomasy). Procentuální produkci MK v akumulovaných lipidech ukazuje graf (Obrázek č. 26). Produkce SFA byla u všech MO ve všech médiích srovnatelná a byly to minorní produkty. V případě kvasinek kultivovaných v médiích s glycerolem a ureou, glukózou a ureou a glycerolem a síranem amonným jsou majoritním produktem MUFA, s tím, že médium s glycerolem a ureou mělo nejvyšší produkci MUFA ze všech.

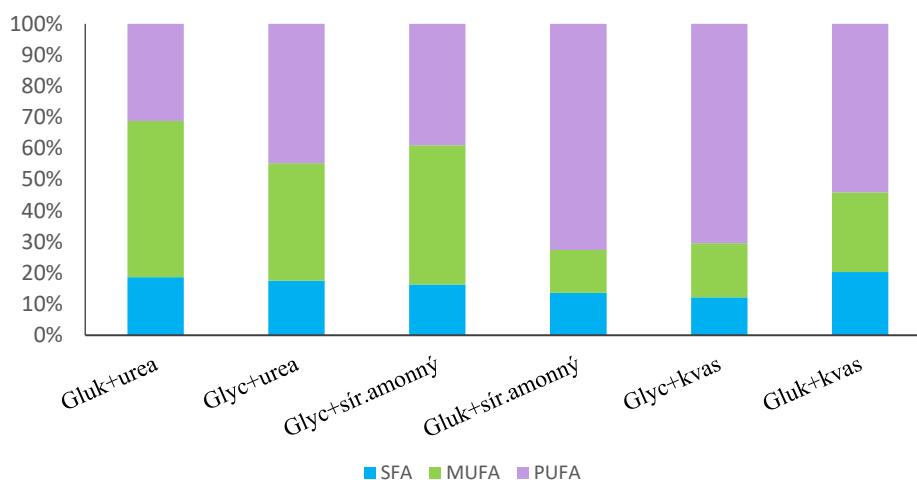
U médií s glukózou a síranem amonným, a glukózou a glycerolem s kvasničným autolyzátem jsou majoritními produkty PUFA. Největší produkce PUFA by schopny kvasinky rostoucí na médiu s glukózou a síranem amonným. Celková produkce lipidů (Obrázek č. 27) je přibližně srovnatelná u všech médií, až na média glukóza a síran amonný a glycerol s kvasničným autolyzátem. Největší procentuální zastoupení lipidů bylo u média s glukózou a ureou.

Tabulka č. 12. Nárůst biomasy *P. rhodozyma* v různých produkčních médiích

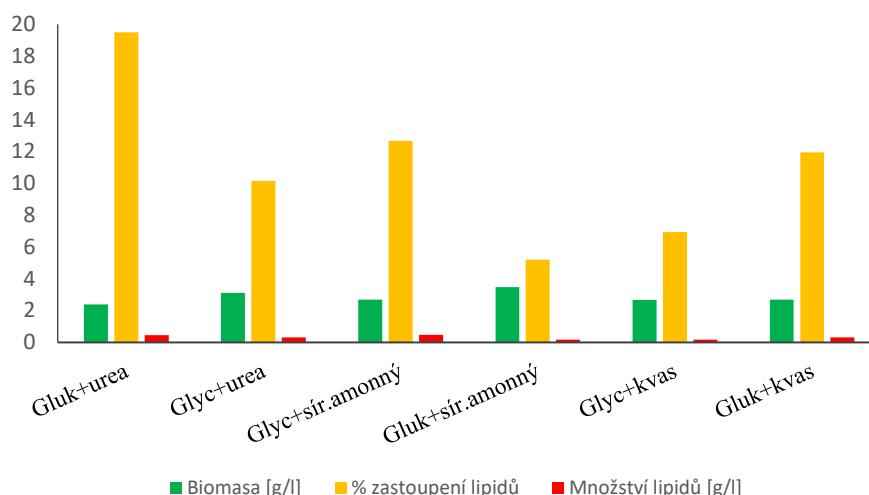
Glukóza (NH ₄) ₂ SO ₄	Glukóza kvas.	Glukóza urea	Glycerol kvas.	Glycerol (NH ₄) ₂ SO ₄	Glycerol urea
2,39 g/l	3,11 g/l	2,69 g/l	3,48 g/l	2,66 g/l	2,69 g/l



Obrázek č. 25. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *P. rhodozyma* na různých produkčních médiích



Obrázek č. 26. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *P. rhodozyma* v různých produkčních médiích po 4 dnech



Obrázek č. 27. Grafické znázornění produkce lipidů s kmenem *P. rhodozyma* v různých produkčních médiích po 4 dnech

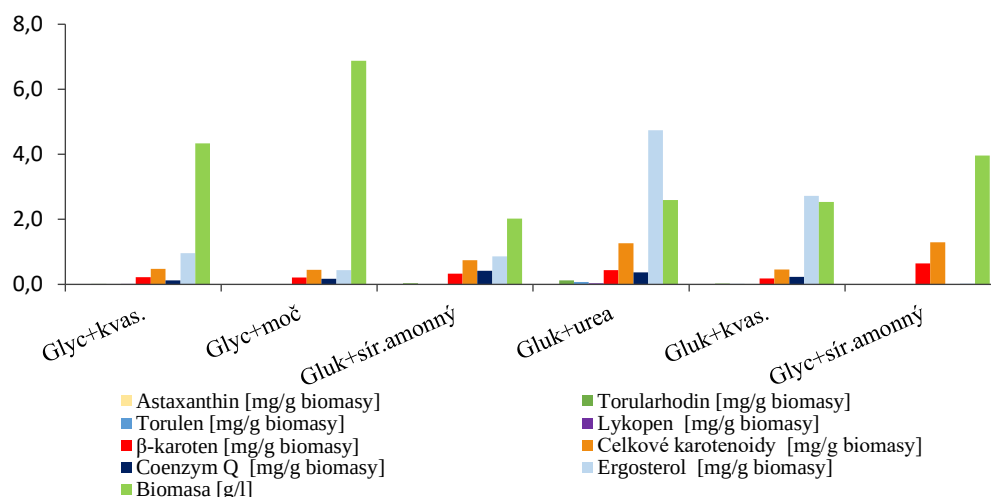
5.2.2 Kultivace 4 dny na BBM médiu

V tomto experimentu bylo základem produkčního média BBM medium s různými zdroji uhlíku a dusíku. Z produkční tabulky (Tabulka č. 13) je zřejmé, že nejvyšší produkci zaznamenaly kvasinky z produkčního média BBM, glycerol a urea. Nejmenší produkce byla zjištěna na médiu BBM, glycerol a síran amonný. Produkce celkových karotenoidů (Obrázek č. 28) je ve všech médiích srovnatelná, pouze na médiích glukóza s ureou a glycerolem se síranem amonným je mírně vyšší. Nejvíce ergosterolu bylo zaznamenáno u média s glukózou a ureou (4,74 mg/g sušiny). Nejvíce β -karotenu vyprodukovaly MO na médiu glycerol se síranem amonným (1,29 mg/g biomasy). U všech ostatních médií je jeho produkce přibližně srovnatelná. Procentuální zastoupení MK v biomase (Obrázek č. 29) je specifické pro každé produkční médium. U média s glycerolem a kvas. autolyzátem byly kvasinky schopny produkovat pouze SFA a PUFA.

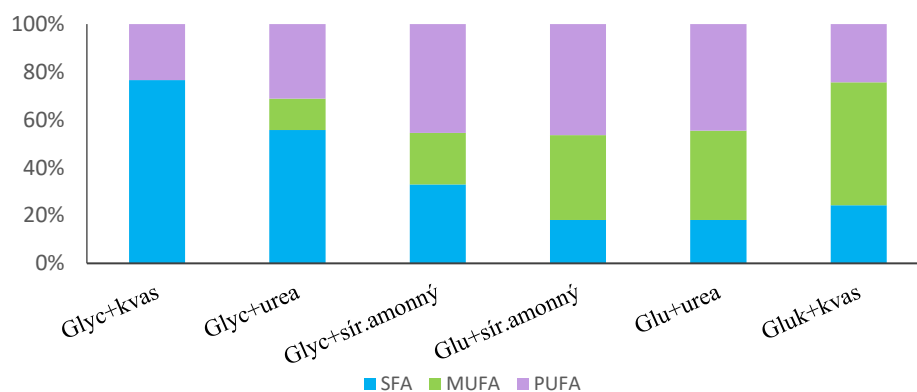
Zde byla produkce SFA největší ze všech vzorků. Největší produkce MUFA byla ze vzorku v médiu s glukózou a kvasničným autolyzátem a největší produkce PUFA měl vzorek s média glukóza se síranem amonným. Největší produkce lipidů (Obrázek č. 30) byla zaznamenána u médií, kde byla v obou případech jako zdroj uhlíku glukóza, jednou se síranem amonným a podruhé s kvasničným autolyzátem. Produkce lipidů v médiu glycerol, kvasničný autolyzát byla minimální.

Tabulka č. 13. Nárůst biomasy *P. rhodozyma* v produkčních médiích s různými zdroji C a N

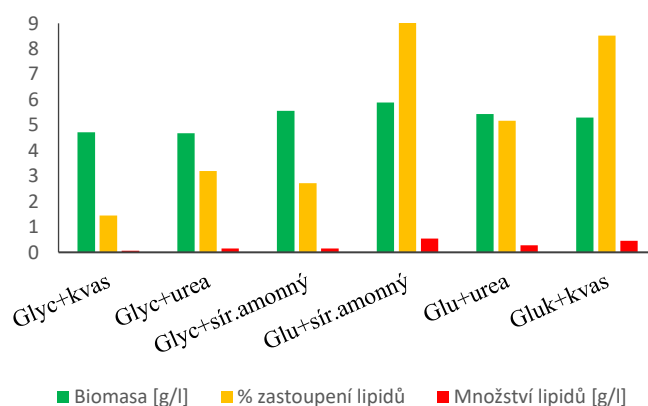
Glycerol kvas.	Glycerol urea	Glycerol (NH ₄) ₂ SO ₄	Glukóza (NH ₄) ₂ SO ₄	Glukóza urea	Glukóza kvas.
4,34 g/l	6,88 g/l	2,02 g/l	2,59 g/l	2,53 g/l	3,96 g/l



Obrázek č. 28. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *P. rhodozyma* na různých produkčních BBM médiích po 4 dnech



Obrázek č. 29. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *P. rhodozyma* v různých produkčních BBM médiích po 4 dnech



Obrázek č. 30. Grafické znázornění produkce lipidů s kmenem *P. rhodozyma* v různých produkčních BBM médiích po 4 dnech

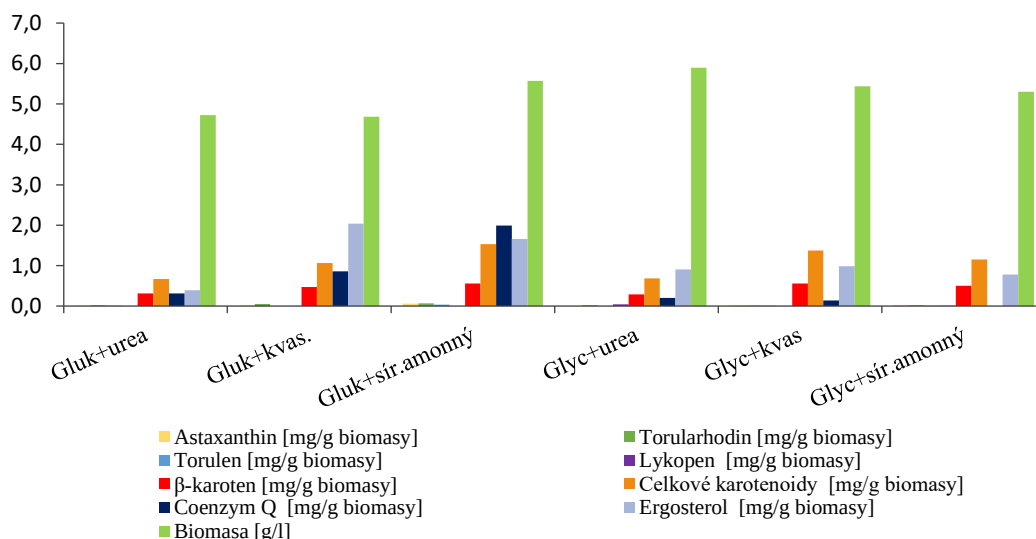
5.2.3 Kultivace 10 dní na BBM médiu

Experiment probíhal ve stejném produkčním BBM médiu s různými zdroji uhlíku a dusíku jako v předchozím experimentu, rozdílem je délka trvání kultivace. Produkce biomasy (Tabulka č. 14) je v této kultivaci přibližně srovnatelná ve všech médiích. Nejvyšší produkci umožnilo médium s glycerolem a ureou, nejmenší produkci vykazovalo médium s glukózou a ureou. Graf produkce karotenoidních barviv (Obrázek č. 31) ukazuje, že produkce celkových karotenoidů je ve všech médiích také srovnatelná, s tím že ale nejvyšší je v médiu s glukózou a síranem amonným. Nejvyšší produkce koenzymu Q byla zaznamenána u média s glukózou a síranem amonným (1,98 mg/g biomasy). Ergosterol byl nejvyšší u glukózy s kvasničným autolyzátem (2,04 mg/g sušiny). β -karoten byl nejvíce zastoupený u média s glukózou a síranem amonným.

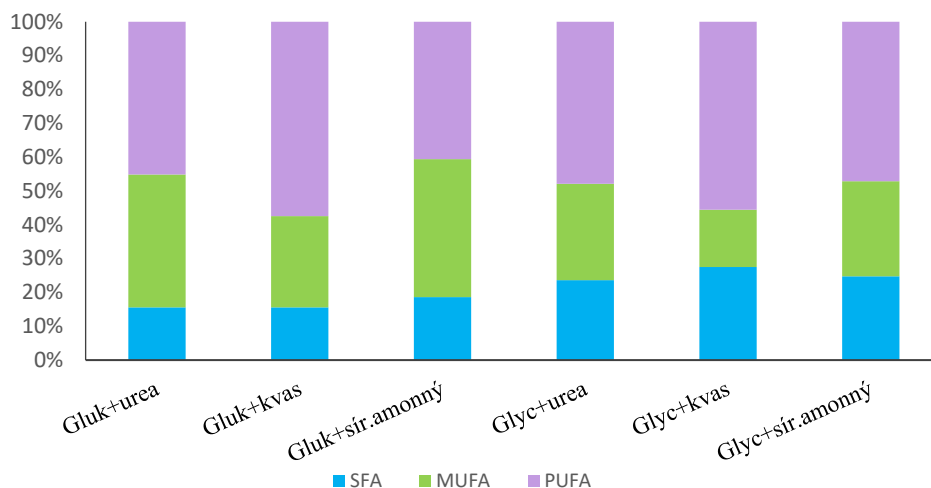
Co se týče procentuálního zastoupení lipidů (Obrázek č. 32), také je ve všech typech médií přibližně podobné. Největší zastoupení MUFA má médium s glukózou a síranem amonným, PUFA má největší podíl ve vzorku z média glukóza s kvasničným autolyzátem a SFA má největší hodnotu produkce z média s glycerolem a kvasničným autolyzátem. Množství akumulovaných lipidů (Obrázek č. 33) je také u všech vzorků srovnatelné, viditelně nejnižší produkce lipidů nastala v médiu s glukózou a kvasničným autolyzátem. Procentuálně nejvíce lipidů v biomase bylo na glycerolovém a glukózovém médiu se síranem amonným.

Tabulka č. 14. Nárůst biomasy *P. rhodozyma* v produkčních BBM médiích s různými zdroji C a N

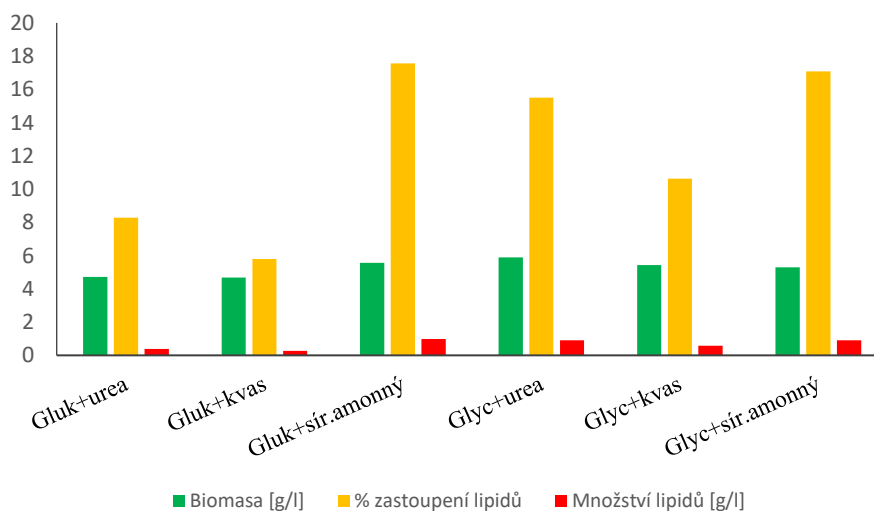
Glukóza urea	Glukóza kvas.	Glukóza (NH ₄) ₂ SO ₄	Glycerol urea	Glycerol kvas.	Glycerol (NH ₄) ₂ SO ₄
4,72 g/l	4,68 g/l	5,57 g/l	5,89 g/l	5,44 g/l	5,3 g/l



Obrázek č. 31. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *P. rhodozyma* na různých produkčních BBM médiích po 10 dnech



Obrázek č. 32. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *P. rhodozyma* v různých produkčních BBM médiích po 10 dnech



Obrázek č. 33. Grafické znázornění produkce lipidů s kmenem *P. rhodozyma* v různých produkčních BBM médiích po 10 dnech

5.3 Kmen *Rhodospiridium toruloides*

V případě kmene *R. toruloides* byla v rámci této práce provedena pouze kultivace na BBM médiu, protože ostatní kultivace za srovnatelných podmínek byly obsahem druhé simultánně prováděné bakalářské práce. [51]

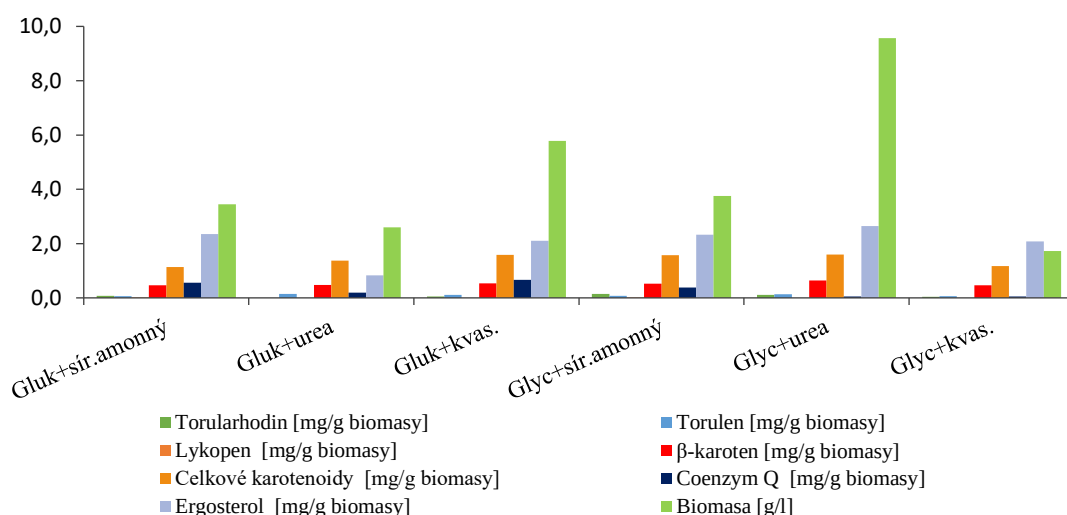
5.3.1 Kultivace 10 dní na BBM médiu

Tato kultivace probíhala, aby se zjistilo, zda je vybraný kvasinkový kmen schopný růst a přežít v BBM médiu, důležitém pro kokultivace. V médiích byly různé zdroje uhlíku a dusíku. Z produkční tabulky (Tabulka č. 15) vyplývá, že největší produkci měly kvasinky v médiu s glycerolem a ureou. Nejmenší produkci vykazovalo produkční médium s glycerolem a kvas. autolýzát. Z grafu celkové produkce metabolitů (Obrázek č. 34) můžeme vidět, že celková produkce karotenoidů je potom ve všech médiích velmi podobná. Produkce ergosterolu na všech médiích je přibližně stejná, pouze u glukózy s ureou je menší. Nejvyšší je u média s glycerolem a ureou (2,78 mg/g biomasy).

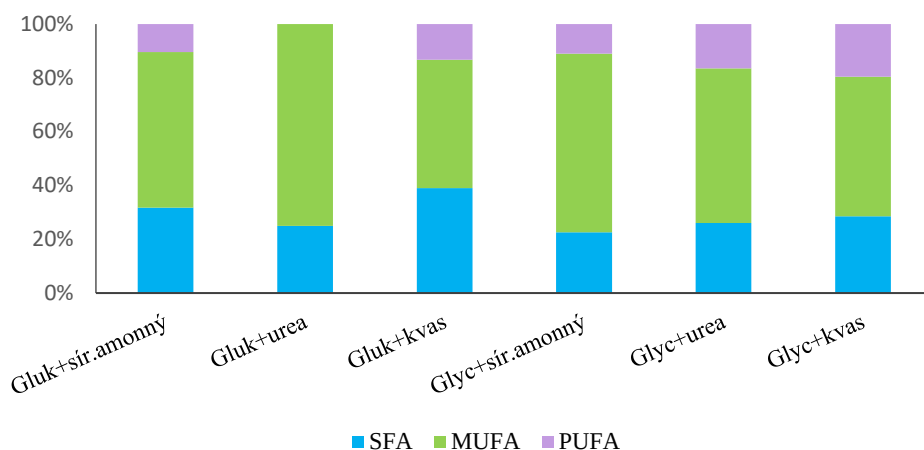
Produkce β -karotenu je také u všech médií srovnatelná, ale nejvyšší je u média s glycerolem a ureou (0,84 mg/g biomasy). Co se týče procentuálního zastoupení lipidů ve vzorku (Obrázek č. 35), tak ve všech médiích je srovnatelné množství MUFA i PUFA, až na vzorek z média glukóza + urea. Kvasinky z tohoto média produkovaly pouze MUFA a SFA, s tím že mají největší procentuální zastoupení MUFA ze všech vzorků. Největší zastoupení SFA má vzorek z média glukóza a kvas. autolyzát. Největší zastoupení PUFA má medium se zdrojem uhlíku glycerolem a s kvas. autolyzátem. Největší celkovou produkci lipidů (Obrázek č. 36) měly MO kultivované na glukózou a kvasničním autolyzátem. Ostatní produkce jsou srovnatelné, až na média s glukózou a ureou a glycerolem a kvasničním autolyzátem, kde je produkce menší. Největší procentuální zastoupení lipidů v biomase bylo zaznamenáno u kvasinky na glukózovém médiu se síranem amonným.

Tabulka č. 15. Nárůst biomasy *R. toruloides* v produkčních médiích s různými zdroji C a N

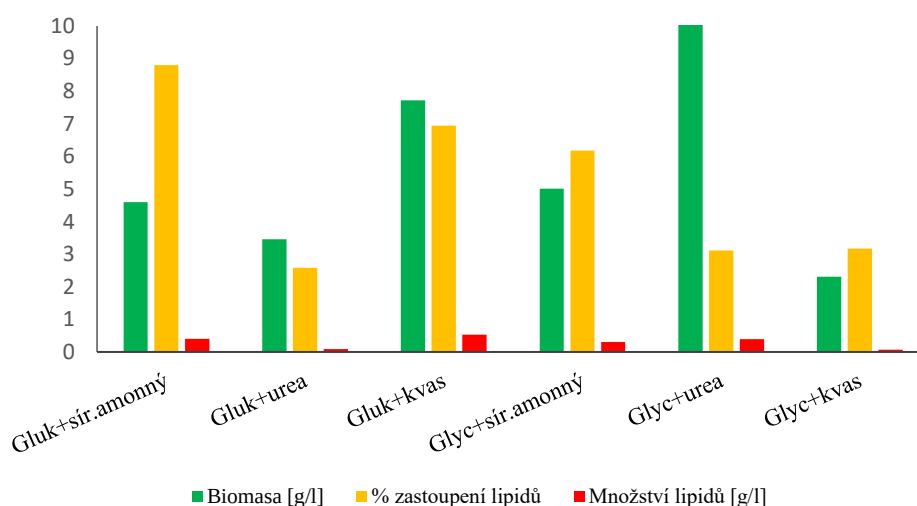
Glukóza (NH ₄) ₂ SO ₄	Glukóza urea	Glukóza kvas.	Glycerol (NH ₄) ₂ SO ₄	Glycerol urea	Glycerol kvas.
4,6 g/l	3,46 g/l	7,72 g/l	5,01 g/l	12,76 g/l	2,31 g/l



Obrázek č. 34. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *R. toruloides* na různých produkčních BBM médiích po 4 dnech



Obrázek č. 35. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *R. toruloides* v různých produkčních BBM médiích



Obrázek č. 36. Grafické znázornění produkce lipidů s kmenem *R. toruloides* v různých produkčních BBM médiích po 10 dnech

5.4 Řasy

V případě čistých řasových experimentů byly prováděny kultivace v BBM médiích s různými zdroji uhlíku a dusíku (Tab. 6). Kultivovanými mikrořasami byly *Scenedesmus obliquus*, *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus quadricauda*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlamydomonas reinhardtii*. Použité sinice byly *Synechococcus nidulans*. Cílem experimentu bylo zjistit, zda jsou vybrané kmeny řas schopny mixotrofního způsobu růstu, tedy přijímání organického zdroje uhlíku. V prvních dvou sadách experimentů, kdy byly kultury v osvětlených Erlenmeyerových zkumavkách bylo zjištěno, že řasy v médiu v přítomnosti uhlíku nebyly schopny přežít i přes přítomnost světla. Ve třetím experimentu se složení médií nezměnilo, pouze se Erlenmeyerovy baňky zabalily do alobalu, aby k mikroorganismům nemělo vůbec přístup světlo. Ani tento experiment žádná kultura řas nepřežila. Zjistilo se, že zkoumané kmeny řas jsou skutečně striktně fotoautotrofní.

5.5 Kokultivace

V kokultivační části výsledků se porovnávaly produkce kvasinek a řas jak samotných, tak v kokultivacích. Média měla stejné složení, základem bylo BBM médium se zdrojem dusíku ureou, jediný rozdíl byl ve zdroji uhlíku, kdy to byla glukóza nebo glycerol.

Porovnávaly se produkce MK, karotenoidních barviv, ergosterolu a koenzymu Q. Do HPLC grafů byly zahrnuty pouze nejdůležitější barviva, MO produkovaly také astaxantin, neoxantin, violaxantin, torulen a torulahodin, ale v porovnání s ostatními barvivy bylo jejich množství zanedbatelné, proto se pro přehlednost v grafech nenacházejí. Výjimkou jsou pouze produkty, jejichž množství bylo srovnatelné s ostatními barvivy.

5.5.1 Kokultivace s kmenem *Phaffia rhodozyma*

Kokultivace *P. rhodozyma* na BBM médiu s glycerolem a ureou

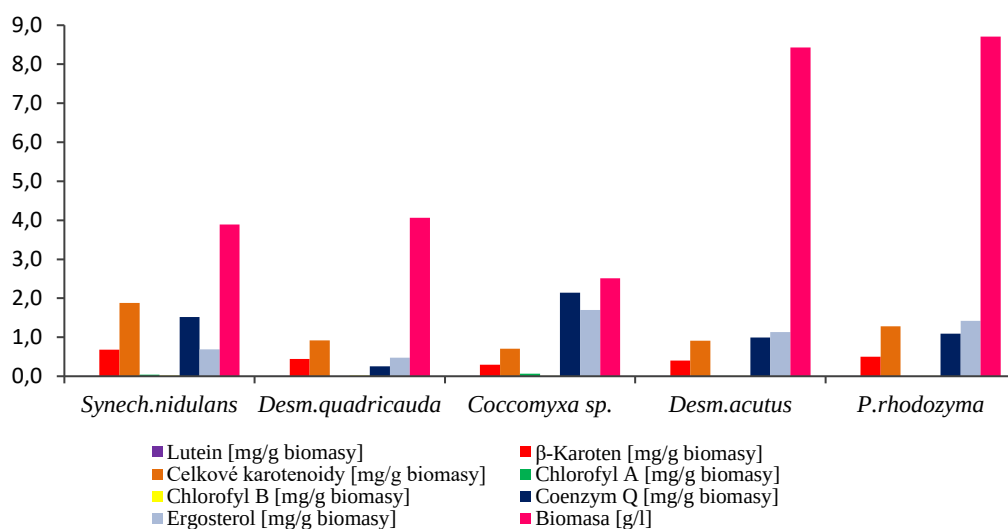
V tomto experimentu probíhala kokultivace *P. rhodozyma* s různými řasami v produkčním médiu se zdrojem uhlíku glycerolem. Při vyhodnocení produkce biomasy (Tabulka č. 16) bylo zjištěno, že sice největší nárůst biomasy má čistá kvasinka, ale kokultivace s řasou *D. acutus* má produkci biomasy přibližně srovnatelnou. Nejmenší nárůst biomasy se projevil u vzorku kokultivace s *Coccomyxa* sp.. V grafickém znázornění produkce metabolitů (Obrázek č. 37) lze vidět, že kokultivace se *Synech. nidulans* má největší množství vyprodukovaných celkových karotenoidů (1,88 mg/g biomasy).

Druhé největší množství má samotná kvasinka (1,28 mg/g biomasy) a mezi ostatním kokultivacemi je množství vyprodukovaných karotenoidů přibližně stejné. Největší množství ergosterolu (1,69 mg/g biomasy) a koenzymu Q (2,15 mg/g biomasy) byla schopna vyprodukovat kokultivace s řasou *Coccomyxa* sp..

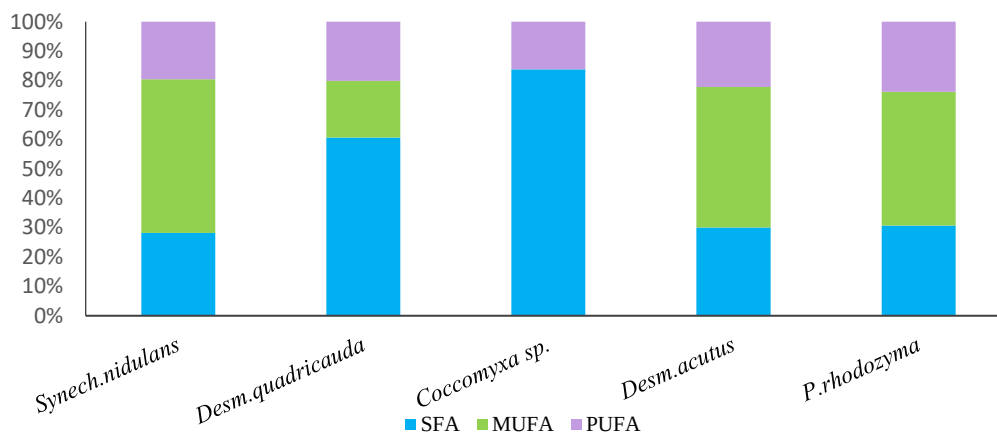
Největší množství β -karotenu vyprodukovala sinice *Synech. nidulans* (0,68 mg/g biomasy). Při porovnání procentuálního zastoupení lipidů ve vzorcích (Obrázek č. 38) lze vidět, že největší produkci MUFA má kokultivace s *Coccomyxa* sp.. Tato kokultivace také vyprodukovala pouze MUFA a SFA. U ostatních vzorků, krom kokultivace s *D. quadricauda*, je procentuální produkce lipidů srovnatelná. Graf porovnání produkce množství lipidů (Obrázek č. 39) ukazuje, že produkce i procentuální zastoupení lipidů je nejvyšší u samotné *P. rhodozyma* a v kokultivaci s řasou *D. acutus*.

Tabulka č. 16. Nárůst biomasy *P. rhodozyma* a mikořas v kokultivacích s glycerolem a ureou

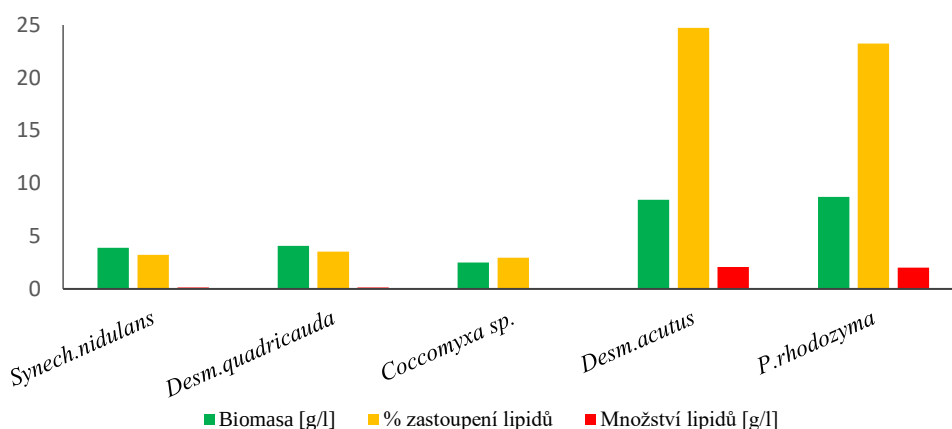
<i>Synechoc. nidulans</i>	<i>Desmos. quadricauda</i>	<i>Coccomyxa</i> sp.	<i>Desmod. acutus</i>	<i>P. Rhodozyma</i>
3,89 g/l	4,07 g/l	2,51 g/l	8,43 g/l	8,71 g/l



Obrázek č. 37. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *P. rhodozyma* v kokultivacích na glycerolovém médiu



Obrázek č. 38. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kokultivace s *P. rhodozyma* s různými mikrořasami na glycerolovém médiu



Obrázek č. 39. Grafické znázornění produkce lipidů v kokultivacích s kmenem *P. rhodozyma* s různými mikrořasami na glycerolovém médiu

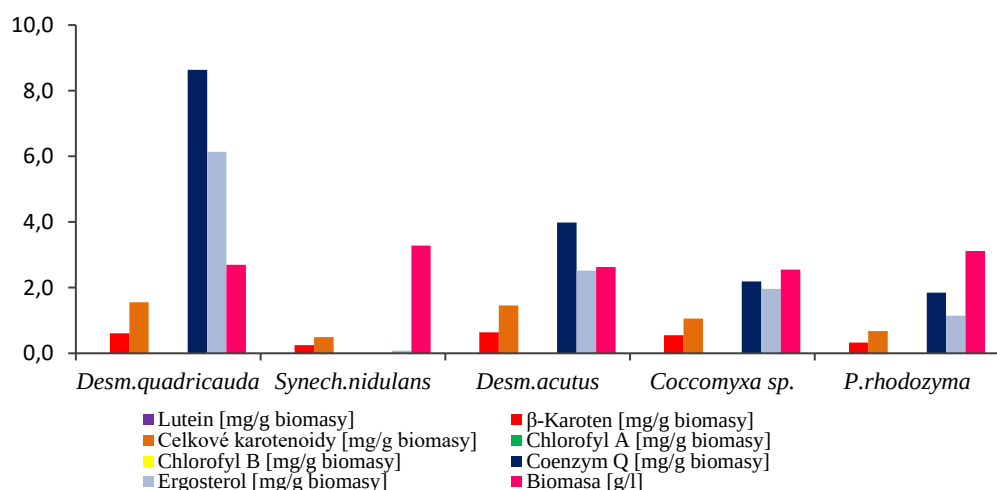
Kokultivace *P. rhodozyma* na BBM médiu s glukózou a ureou

Experiment je shodný s předchozím, s rozdílem ve zdroji uhlíku, v tomto případě jím byla glukóza. Z tabulky produkce biomas (Tabulka č. 17) lze vidět, že v případě kokultivace kvasinky se sinicí *Synech. nidulans* je nárůst biomasy větší než u samotné kvasinky a ostatních kokultivací. Zbylé kokultivace mají srovnatelnou produkci a ta je nižší než biomasa samotné *P. rhodozyma*. Co se týče ale produkce karotenoidů a barviv (Obrázek č. 40), je zde jednoznačně největším producentem metabolitů kokultivace *P. rhodozyma* a *Desm. quadricauda*. Tato kokultivace vyprodukovala největší množství koenzymu Q (8,64 mg/g sušiny), ergosterolu (6,14 mg/g biomasy), β -karotenu (0,61mg/g sušiny) i celkových karotenoidů (1,55 mg/g sušiny). Druhým nejlepším producentem je pak kokultivace s řasou *Desm. acutus*. Nejmenším producentem všech metabolitů byla sinice *Synech. nidulans*.

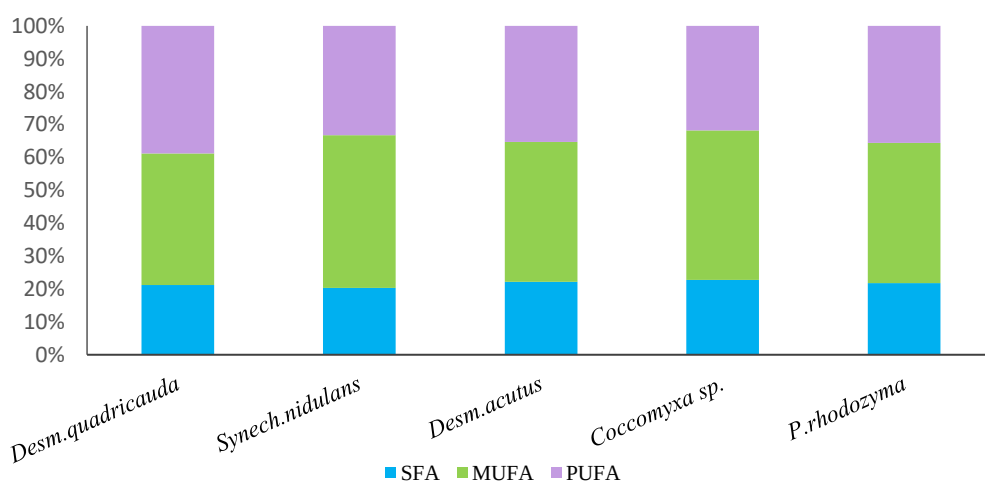
Procentuální zastoupení MK v akumulovaných lipidech (Obrázek č. 41) a celkově vyprodukované množství lipidů (Obrázek č. 42) je ve všech případech (jak v kokultivacích, tak i u samotné kvasinky) naprosto srovnatelné. Největší procentuální zastoupení lipidů v biomase poté měly kokultivace s řasou *Desm. acutus* a sinicí *Synechococcus nidulans*.

Tabulka č. 17. Nárůst biomasy *P. rhodozyma* a mikrořas v kokultivacích s glukózou a ureou

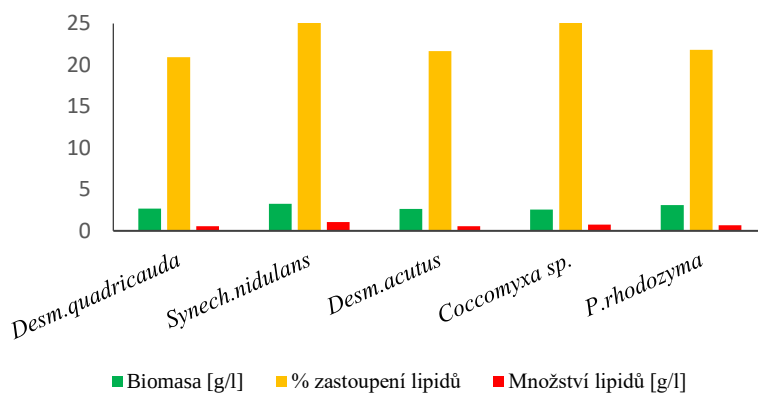
<i>Desmos. quadricauda</i>	<i>Synechoc. nidulans</i>	<i>Desmod. acutus</i>	<i>Coccomyxa sp.</i>	Čistá kvasinka
2,69 g/l	3,28 g/l	2,63 g/l	2,55 g/l	3,12 g/l



Obrázek č. 40. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *P. rhodozyma* v kokultivacích na glukózovém médiu



Obrázek č. 41. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kokultivace s *P. rhodozyma* s různými mikrořasami na glukózovém médiu



Obrázek č. 42. Grafické znázornění produkce lipidů v kokultivacích s kmenem *P. rhodozyma* s různými mikrořasami na glukózovém médiu

5.5.2 Kokultivace s kmenem *Rhodosporidium toruloides*

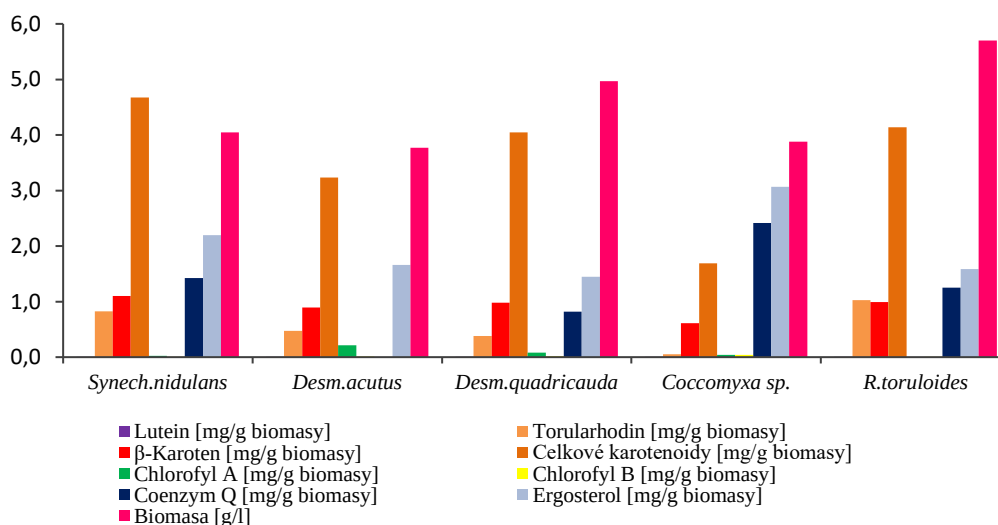
Kokultivace *R. toruloides* na BBM médiu s glycerolem a ureou

Z tabulky (Tabulka č. 18) můžeme pozorovat, že nejvyšší produkci má v tomto případě samotná kvasinka. Produkce celkových karotenoidů (Obrázek č. 43) je u všech vzorků srovnatelná, s výjimkou kokultivace s *Coccomyxa* sp., kdy je menší. Nejvyšší produkce karotenoidů se ukázala být v kokultivaci se sinicí *Synechococcus nidulans* (4,67 mg/g biomasy). Největším producentem ergosterolu a koenzymu Q pak byla kokultivace s *Coccomyxa* sp (3,07 mg/g biomasy a 2,42 mg/g biomasy). Produkce β -karotenu je u všech kokultivací srovnatelná, jen *Coccomyxa* měla produkci menší.

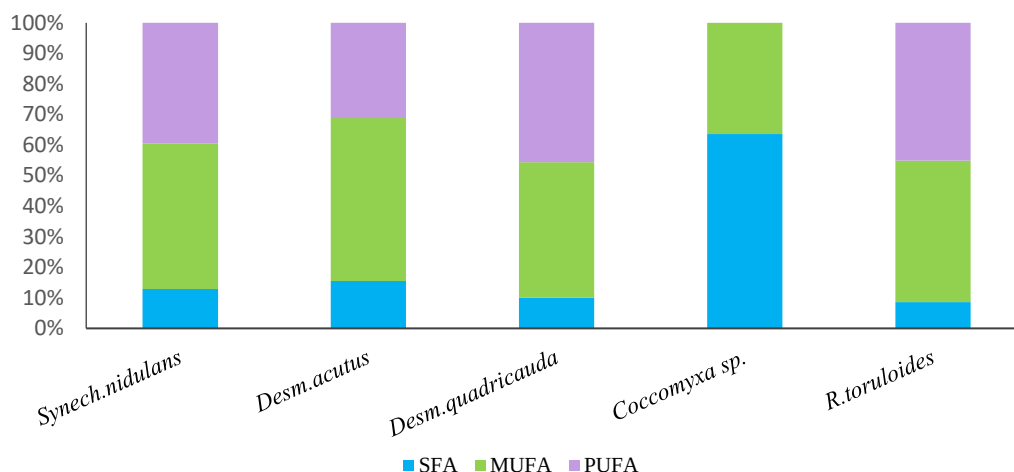
Procentuální zastoupení lipidů (Obrázek č. 44) ve všech vzorcích je také srovnatelné, výjimku tvoří opět *Coccomyxa*, která vyprodukovala pouze SFA a MUFA. Graf produkce lipidů (Obrázek č. 45) ukazuje, že v případě kokultivací je produkce a procentuální zastoupení lipidů přibližně stejné, ale největší produkci má samostatná kvasinka.

Tabulka č. 18. Produkce biomasy *Rhodosporidia toruloides* v kokultivacích s glycerolem

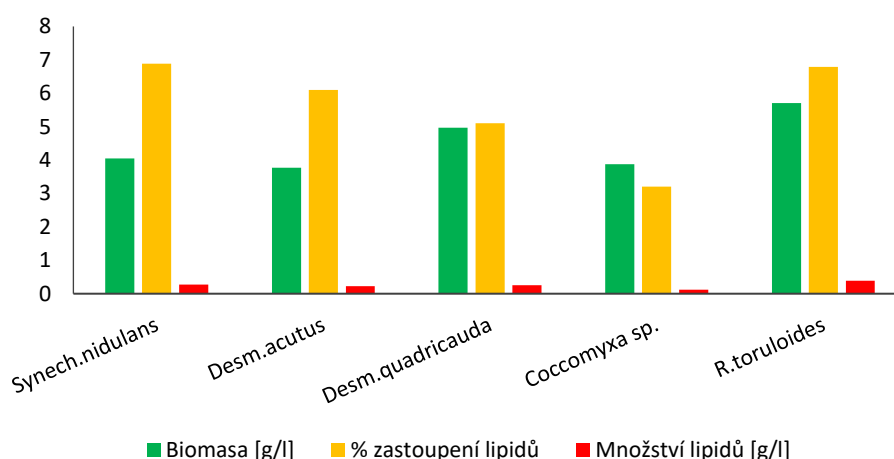
<i>Synechoc. nidulans</i>	<i>Desmod. acutus</i>	<i>Desmos. quadricauda</i>	<i>Coccomyxa</i> sp.	Čistá kvasinka
4,05 g/l	3,77 g/l	4,97 g/l	3,88 g/l	5,70 g/l



Obrázek č. 43. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *R. toruloides* v kokultivacích na glycerolovém médiu



Obrázek č. 44. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kokultivace s *R. toruloides* s různými mikrořasami na glycerolovém médiu



Obrázek č. 45. Grafické znázornění produkce lipidů v kokultivacích s kmenem *R. toruloides* s různými mikrořasami na glycerolovém médiu

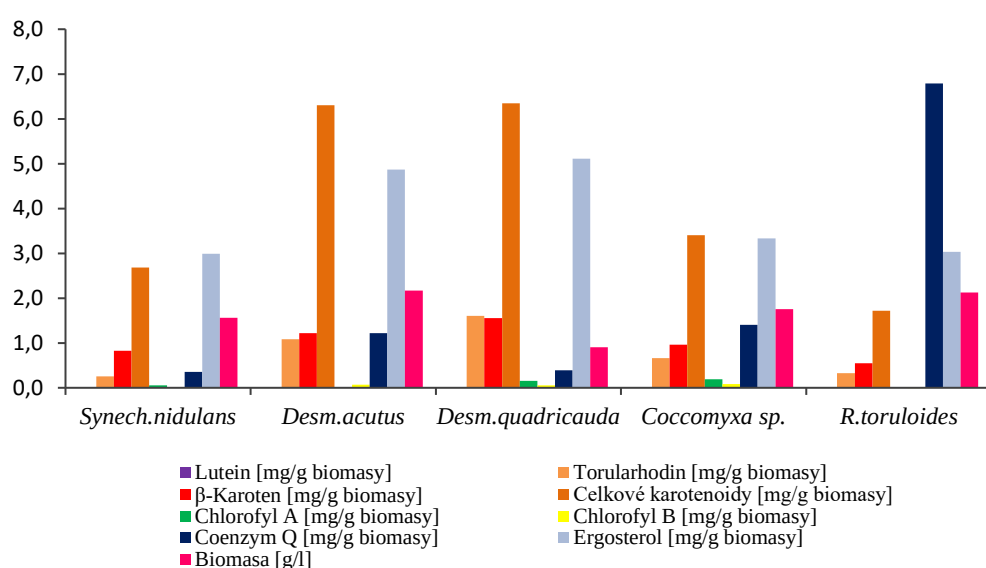
Kokultivace *R. toruloides* na BBM médiu s glukózou a ureou

Tento experiment byl stejný jako předchozí. Jediným rozdílem byl jiný zdroj uhlíku, v tomto případě glukóza. Z tabulky produkce (Tabulka č. 19) je zřejmé, že v tomto případě vykazuje kokultivace s *D. acutus* větší množství biomasy, než má samotná kvasinka. Rozdíl ale není nijak závratný. V tomto médiu se produkce metabolitů (Obrázek č. 46) mezi kokultivacemi a čistou kvasinkou liší. Kokultivace mají větší produkci celkových karotenoidů, a β -karotenu. Oproti tomu samotná *R. toruloides* má malou produkci β -karotenu a celkových karotenoidů, měla ale obrovskou produkci koenzymu Q (6,79 mg/g sušiny). Nejvíce celkových karotenoidů měly kokultivace s *Desm. quadricauda* (6,35 mg/g biomasy) a *Desm. acutus* (6,30 mg/g biomasy). Dále měly tyto dvě kokultivace velkou produkci ergosterolu – *Desm. quadr.* 5,11 mg/g biomasy, *Desm. acutus* 4,87 mg/g biomasy. *Desm. quadricauda* byl tak největším producentem torularhodinu.

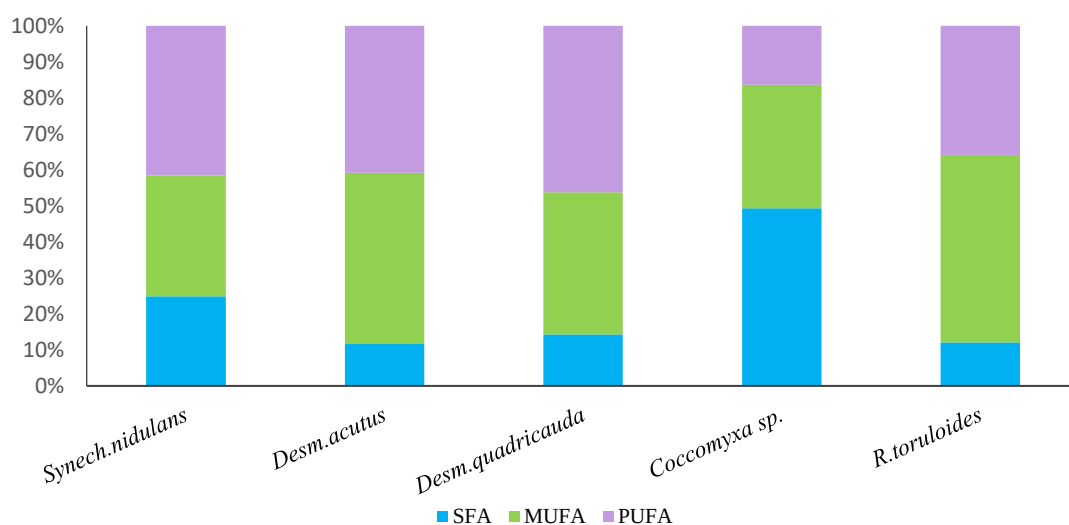
Procentuální zastoupení lipidů ve vzorcích (Obrázek č. 47) se v jednotlivých vzorcích liší. Kokultivace s *Coccomyxa* sp. má největší produkci SFA a nejmenší produkci PUFA. Největší produkci MUFA měl vzorek, který obsahoval čistou kvasinku. V kokultivacích má největší procentuální zastoupení MUFA ve vzorku s *Desm.acutus*. Co se týče celkové produkce lipidů (Obrázek č. 48), tak největší množství vyprodukovaných lipidů bylo ve vzorku kokultivace s *Desm. acutus*, kde je také největší procentuální zastoupení. Ve všech ostatních vzorcích je produkce množství lipidů podobná.

Tabulka č. 19. Produkce biomasy *Rhodosporidium toruloides* v kokultivacích s glukózou

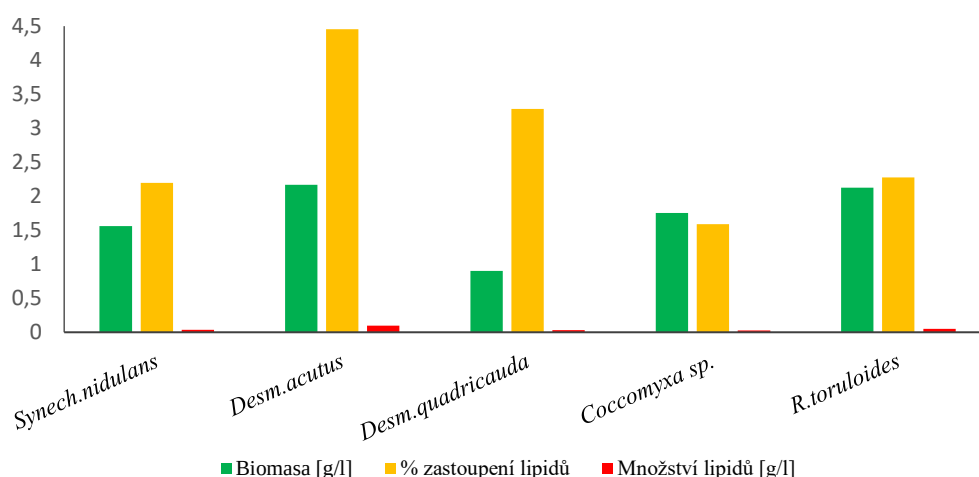
<i>Synechoc. nidulans</i>	<i>Desmod. acutus</i>	<i>Desmos. quadricauda</i>	<i>Coccomyxa</i> sp.	Čistá kvasinka
1,56 g/l	2,17 g/l	0,9 g/l	1,75 g/l	2,12 g/l



Obrázek č. 46. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *R. toruloides* v kokultivacích na glukózovém médiu



Obrázek č. 47. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kokultivace s *R. toruloides* s různými mikrořasami na glukózovém médiu



Obrázek č. 48. Grafické znázornění produkce lipidů v kokultivacích s kmenem *R. toruloides* s různými mikrořasami na glukózovém médiu

Kokultivace *R. toruloides* s *Coccomyxa* sp. a *Chlorella sorokiniana* na BBM médiu s glycerolem a ureou v různých poměrech

Tento experiment probíhal současně s oběma řasami a cílem bylo srovnat celkovou produkci biomasy, metabolitů a lipidů v kokultivacích, čistých řasových a kvasinkových médiích. V čistých řasových médiích nebyl přítomen žádný zdroj uhlíku, protože bylo zjištěno, že v takovém médiu není možné zabránit kontaminaci bakteriemi, které ve výsledku přerostou a zahubí řasy.

Kokultivace *R. toruloides* a *Coccomyxa* sp. nebyla dle nárůstu biomasy moc úspěšná (Tabulka č. 20). Samotná kvasinka byla schopna vyprodukovat větší množství biomasy, než nejúspěšnější kokultivace kvasinka : řasa 1:4. V produkci metabolitů (Obrázek č. 49) u kokultivace s *Coccomyxa* sp. se jako nejlepší producenti ukázaly být právě kultivace samotné kvasinky a mikrořasy. Kokultivace nebyly schopné vyprodukovat velké množství produktů. Z kokultivačních poměrů se ukázal být nejlepší 1:4, ale i u něj byly produkce malé. Nejvíce celkových karotenoidů vyprodukovala *Coccomyxa* sp. (2,15 mg/g sušiny), *R. toruloides* (1,65 mg/g sušiny) a poté kokultivační poměr 1:4 (0,92 mg/g sušiny). Co se týče metabolitů *R. toruloides* tak to byly torulen, koenzym Q, ergosterol a β -karoten. Metabolity *Coccomyxa* sp. byly ergosterol, koenzym Q, chlorofyl A, chlorofyl, β -karoten a lutein. Oproti tomu kokultivace vyprodukovaly pouze β -karoten a ergosterol.

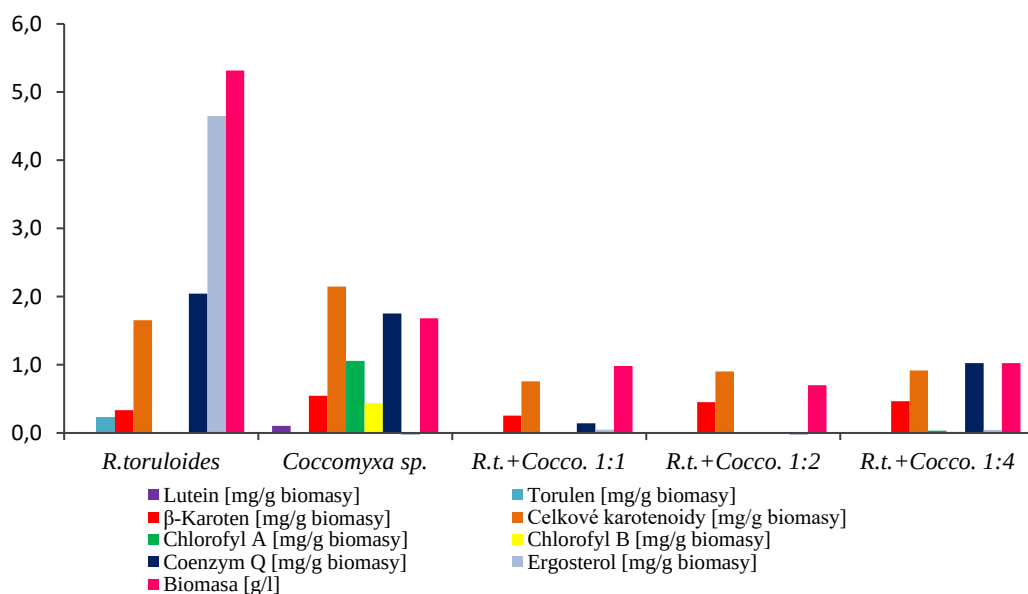
Procentuální zastoupení MK v lipidech (Obrázek č. 51) je velmi podobné u kultivace opět samotné řasy a kvasinky, kde vyprodukovaly nejvíce PUFA. U kokultivací jsou nejvíce zastoupenými MK SFA, z toho, že v případě *R. toruloides* a *Coccomyxa* sp. je to až 100% v poměru 1:4 (nicméně hodnota může být způsobena chybným naměřením vzorku). Co se týče celkové produkce lipidů (Obrázek č. 52), tak i zde byly samotné MO schopny mnohem lepší produkce než MO v kokultivacích.

Kokultivace *R. toruloides* a *Chl. sorokiniana* se dle nárůstu biomasy (Tabulka č. 20) dá považovat za úspěšnější. Kokultivace ve všech poměrech byly schopny vyprodukovat více biomasy než čistá kvasinka. Nejlepším kokultivačním poměrem se ukázal být poměr kvasinka : řasa 1:1. V produkci metabolitů (Obrázek č. 50) se ale jako nejlepší producenti ukázaly být právě kultivace samotných MO. Kokultivace bohužel nebyly schopné vyprodukovat takové množství produktů. *Chl. sorokiniana* vyprodukovala koenzym Q, chlorofyl A, chlorofyl, β -karoten a lutein.

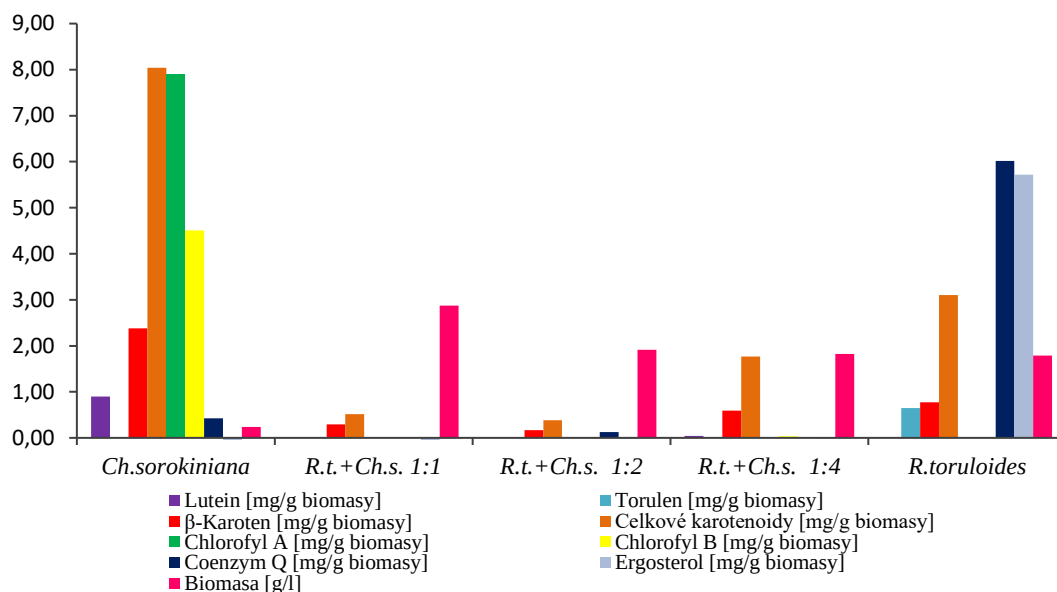
Metabolity *R. toruloides* byly torulen, koenzym Q, ergosterol a β -karoten. V případě kokultivací byly jedinými produkty β -karoten a koenzym Q. Nejvíce β -karotenu bylo u kokultivace v poměru 1:4 (0,59 mg/g sušiny), nejvíce ergosterolu vyprodukovala kokultivace v poměru 1:2 (0,13 mg/g sušiny). U procentuálního zastoupení MK v akumulovaných lipidech (Obrázek č. 51) je zajímavé, že naprostým majortním produktem u kokultivací jsou SFA. MUFA a PUFA jsou minimální a v případě kokultivace v poměru kvasinka : řasa 1:4 PUFA chybí úplně. U MO kultivovaných samostatně jsou majoritním produktem MUFA. Co se ale týče celkové produkce (Obrázek č. 52), tak více lipidů vyprodukovaly MO kultivované samostatně. Největší procentuální zastoupení lipidů bylo zaznamenáno u čisté kvasinky a řasy *Coccomyxa* sp..

Tabulka č. 20. Produkce biomasy *Rhodosporidium toruloides* s *Chl. Sorokiniana* a *Coccomyxa* sp. v kokultivacích v různých poměrech

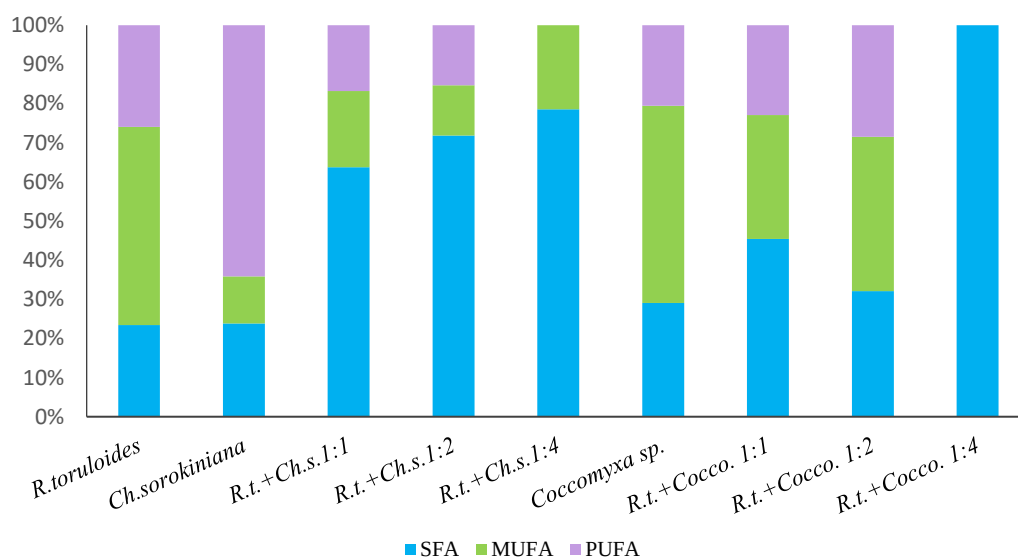
<i>R. toruloides</i>	<i>Cocco. sp.</i>	<i>R.t.+Cocco. sp. 1:1</i>	<i>R.t.+Cocco. sp. 1:2</i>	<i>R.t.+Cocco. sp. 1:4</i>
1,79 g/l	0,68 g/l	0,98 g/l	0,69 g/l	1,03 g/l
	<i>Chl. S.</i>	<i>R.t.+Ch.s. 1:1</i>	<i>R.t.+Ch.s. 1:2</i>	<i>R.t.+Ch.s. 1:4</i>
	0,24 g/l	2,87 g/l	1,91 g/l	1,82 g/l



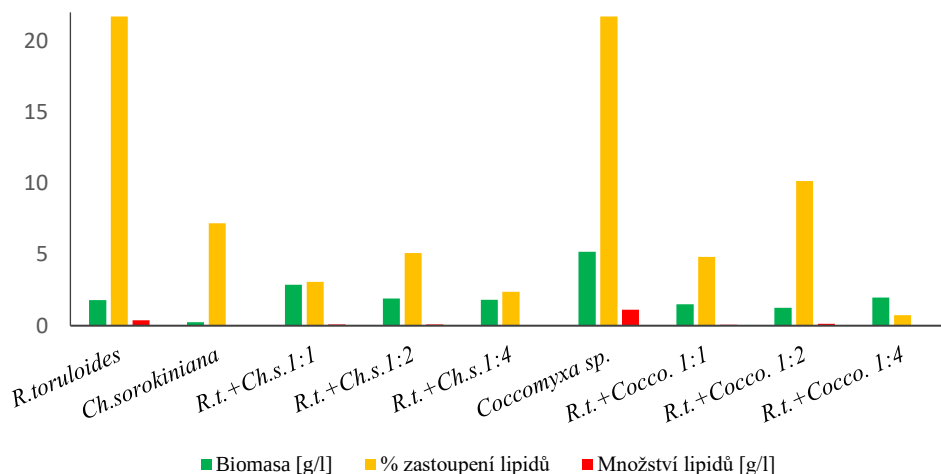
Obrázek č. 49. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *R. toruloides* v kokultivacích s *Coccomyxa* sp. v různých poměrech



Obrázek č. 50. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *R. toruloides* v kokultivacích s *Chlorella sorokiniana* a *Coccomyxa sp.* v různých poměrech



Obrázek č. 51. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kokultivace s *R. toruloides* s *Chlorella sorokiniana* a *Coccomyxa sp.*



Obrázek č. 52. Grafické znázornění produkce lipidů v kokultivacích s kmenem *R. toruloides* s *Chlorella sorokiniana* a *Coccomyxa sp.* v různých poměrech

Kokultivace *R. toruloides* s *Desm. Acutus* a *Chlamydomonas Reinhardtii* na BBM médiu s glycerolem a ureou v různých poměrech

Dalším pokusem byla kokultivace *R. toruloides* s *Desm. acutus* a *Chlamydomonas reinhardtii*. První den byly do všech produkčních médií zaočkovány pouze řasy bez zdroje uhlíku. Ten se spolu s kvasinkami přidal až druhý den, aby měly řasy nějaký čas přizpůsobit se novému prostředí. Pro čistě řasová média byly připraveny dva druhy produkčních médií, jedno s přítomností uhlíkového zdroje a druhé bez.

Z tabulek produkce biomasy (Tabulka č. 21) je bohužel jasné, že kokultivace s žádnou řasou v žádném poměru nebyly z hlediska nárůstu biomasy tak úspěšné jako u čistých MO. U obou kokultivací se ukázala být nejvýhodnější poměr kvasinka : řasa 1:2.

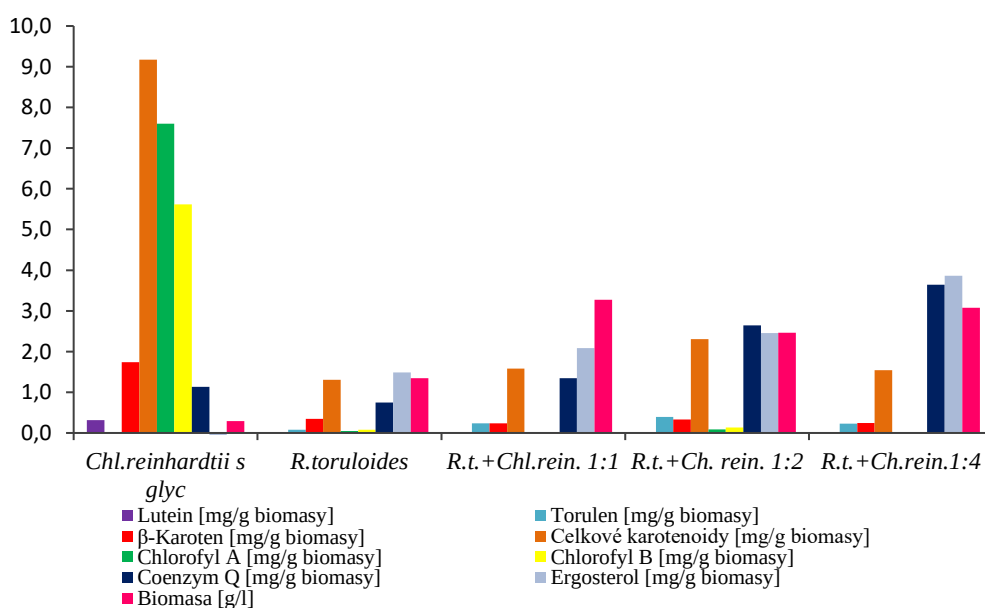
Z prvního grafu produkce karotenoidních barviv (Obrázek č. 53) se nejlepším producentem metabolitů ukázala být *Chl. Reinh.* v produkčním médiu s glycerolem, médium bylo však silně kontaminované bakteriemi, není tedy možné naměřené hodnoty považovat za úplně průkazné. Nejlepším producentem celkových karotenoidů se stala kokultivace v poměru kvasinka : řasa 1:4. Produkce β -karotenů je srovnatelná u všech poměrů kokultivace, ale nejvyšší byla u poměru 1:2 0,82 mg/g biomasy. Nejvyšší produkce ergosterolu a koenzymu Q ze všech kultivací se ukázala být u kokultivačního poměru 1:4, a to 3,87 mg/g biomasy a 3,65 mg/g biomasy. Procentuální zastoupení (Obrázek č. 55) MK mezi kokultivacemi je srovnatelné mezi poměry kvasinka : řasa 1:1 a 1:4. V poměru kvasinka : řasa 1:2 jsou majortiním produktem SFA, kde je jejich množství největší ze všech kultivací. Nejvíce MUFA vyprodukovala čistá kvasinka, nejvíce PUFA *Chl. reinhardtii* v médiu bez glycerolu. V otázce celkového množství akumulovaných lipidů (Obrázek č. 56) je taky na prvním místě čistá kvasinka, dále pak kokultivace v poměr kvasinka : řasa 1:4 a 1:2.

U produkce celkových karotenoidů s *Desm. acutus* (Obrázek č. 54) u kokultivací produkce klesá se zvyšujícím se poměrem přítomnosti řas v médiu. Produkce karotenoidů u čisté kvasinky a řasy v médiu bez glycerolu je srovnatelná. Produkce β -karotenu je nejvyšší u kultivace samotné kvasinky a řasy, u kokultivací je téměř totožná. Nejvíce ergosterolu a koenzymu Q vyprodukovala samotná kvasinka (7,21 mg/g biomasy a 3,96 mg/g biomasy) a kokultivace v poměru 1:1 (4,29 mg/g biomasy a 3,64 mg/g biomasy). Nejvýznamnějším producentem chlorofylu A pak byla samotná řasa v médiu bez glycerolu, v kokultivacích produkce klesá se zvyšujícím se poměrem řas.

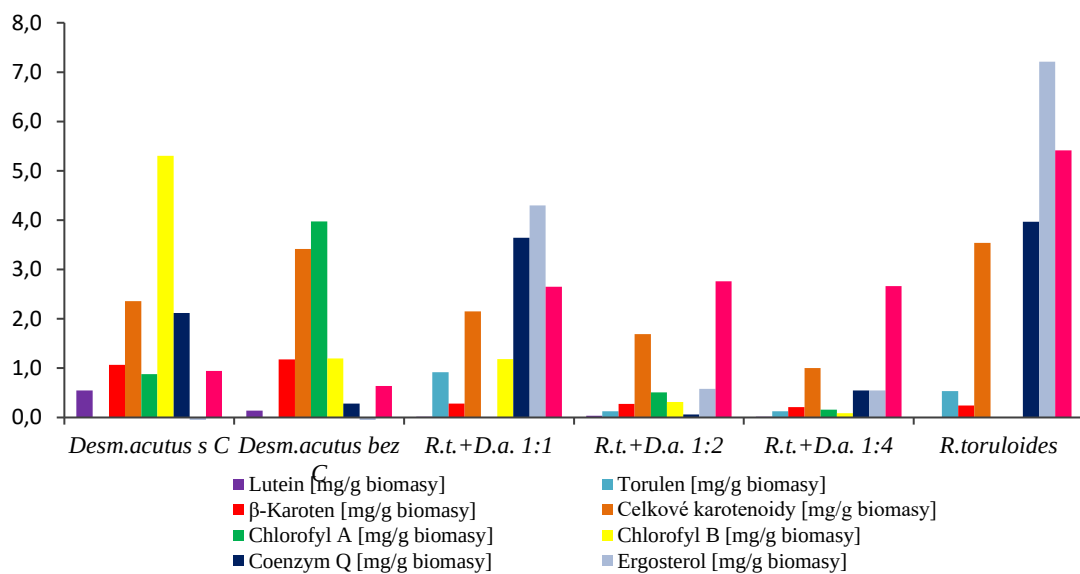
V případě tohoto experimentu je procentuální zastoupení MK (Obrázek č. 55) u kokultivací a kultivace samotné kvasinky velmi podobné, MUFA jsou majoritním produktem. U kultivace samotné řasy v médiu s glycerolem byly vyprodukovány jenom MUFA a PUFA, nicméně bylo médium kontaminováno bakteriemi. *Desm. acutus* v médiu bez glycerolu mělo majoritní produkt SFA. Množství vyprodukovaných lipidů (Obrázek č. 56) je největší u kultivace samotného *R. toruloides*. U kokultivací opět klesá se zvyšujícím se množstvím řas v médiu. Největší procentuální zastoupení lipidů pak bylo zaznamenáno u vzorku s čistkou kvasinkou, u kultivace s řasou *Desm. acutus* v poměru 1:1 a u kokultivace s *Chl. reinhardtii* v poměru 1:4.

Tabulka č. 21. Produkce biomasy *Rhodosporidium toruloides* s *Desm. acutus* a *Chl. Reinhardtii* v kokultivacích v různých poměrech

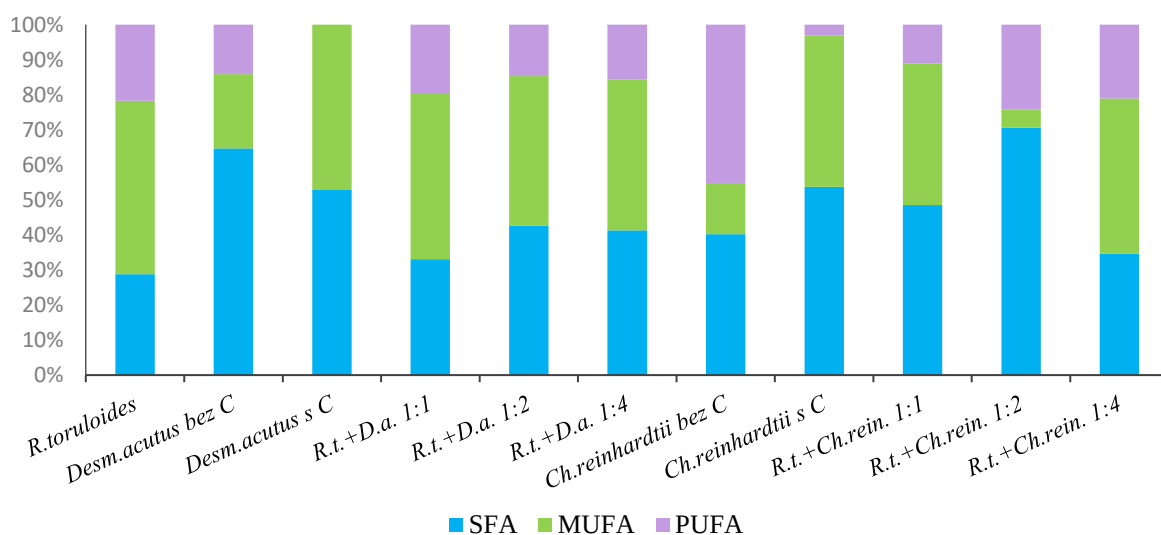
<i>R. toruloides</i>	<i>D.a. + glycerol</i>	<i>D.a. bez glycerolu</i>	<i>R.t.+D.a. 1:1</i>	<i>R.t.+D.a. 1:2</i>	<i>R.t.+D.a. 1:4</i>
3,15 g/l	0,91 g/l	1,20 g/l	0,87 g/l	1,56 g/l	1,38 g/l
	<i>Chl. Reinh. + glycerol</i>	<i>Chl. Reinh. Bez glyc</i>	<i>R.t.+Ch.r. 1:1</i>	<i>R.t.+Ch.r. 1:2</i>	<i>R.t.+Ch.r. 1:4</i>
	1,60 g/l	0,94 g/l	0,53 g/l	1,25 g/l	0,58 g/l



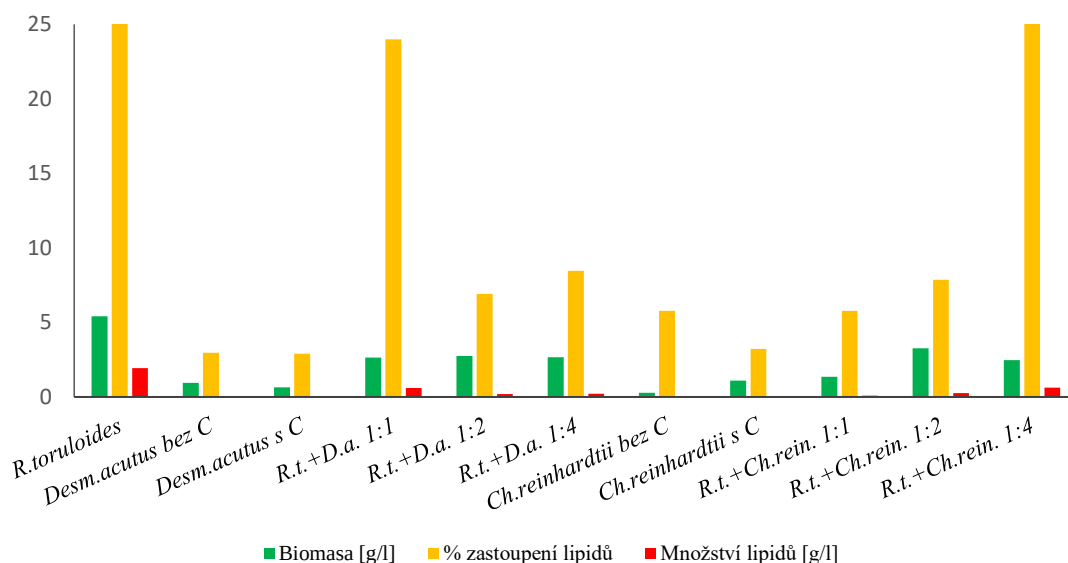
Obrázek č. 53. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *R. toruloides* v kokultivacích s *Chlamydomonas reinhardtii* v různých poměrech



Obrázek č. 54. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *R. toruloides* v kokultivacích s *Desm. acutus* v různých poměrech



Obrázek č. 55. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kokultivace s *R. toruloides* s *Desm. acutus* a *Chlamydomonas reinhardtii*



Obrázek č. 56. Grafické znázornění produkce lipidů v kokultivacích s kmenem *R. toruloides* s *Desm. acutus* a *Chlamydomonas reinhardtii* v různých poměrech

5.5.3 Kokultivace s kmenem *Rhodotorula kratochvilovae*

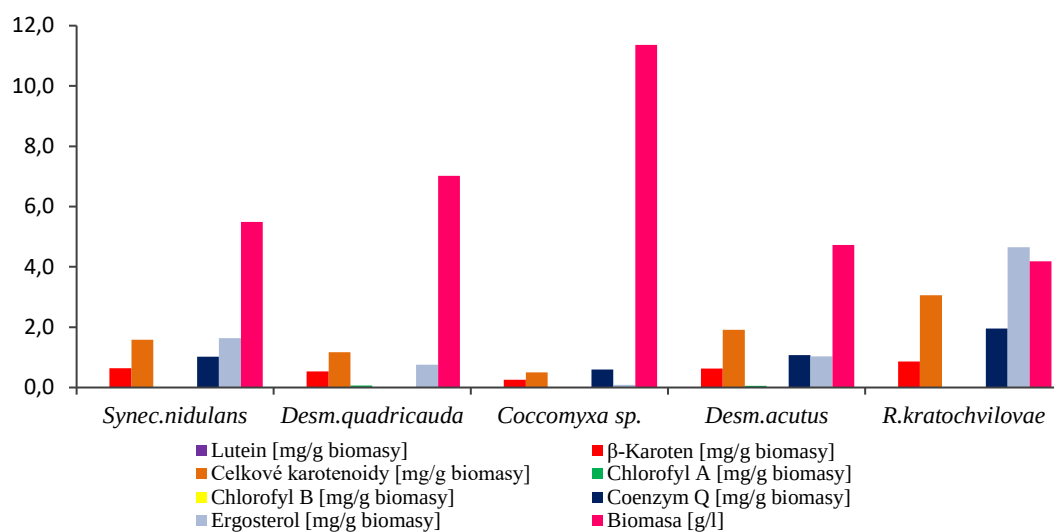
Kokultivace *R. kratochvilovae* na BBM médiu s glycerolem a ureou

Z tabulky produkce (Tabulka č. 22) je zřejmé, že v tomto případě vykazují všechny typy kokultivací produkci většího množství biomasy, než má samotná kvasinka. Největší nárůst biomasy, byl zaznamenán u kokultivace s *Coccomyxa* sp.. V tomto experimentu se produkce metabolitů (Obrázek č. 57) mezi kokultivacemi a čistou kvasinkou liší. Samotná *R. kratochvilovae* vykazuje větší produkci celkových karotenoidů než kokultivace. Vyprodukovala také velké množství ergosterolu. Nejmenší produkce celkových karotenoidů byla paradoxně u kokultivace s *Coccomyxa* (0,51 mg/g sušiny). Co se týče produkce mezi samotnými kokultivacemi tak v případě celkových karotenoidů z toho vychází nejlépe *Desm. acutus* 1,912 mg/g biomasy. Největší produkci ergosterolu měla kokultivace se *Synech. nidulans* (1,64 mg/g biomasy). Jediným producentem chlorofylu A byl *Desm. quadricauda*.

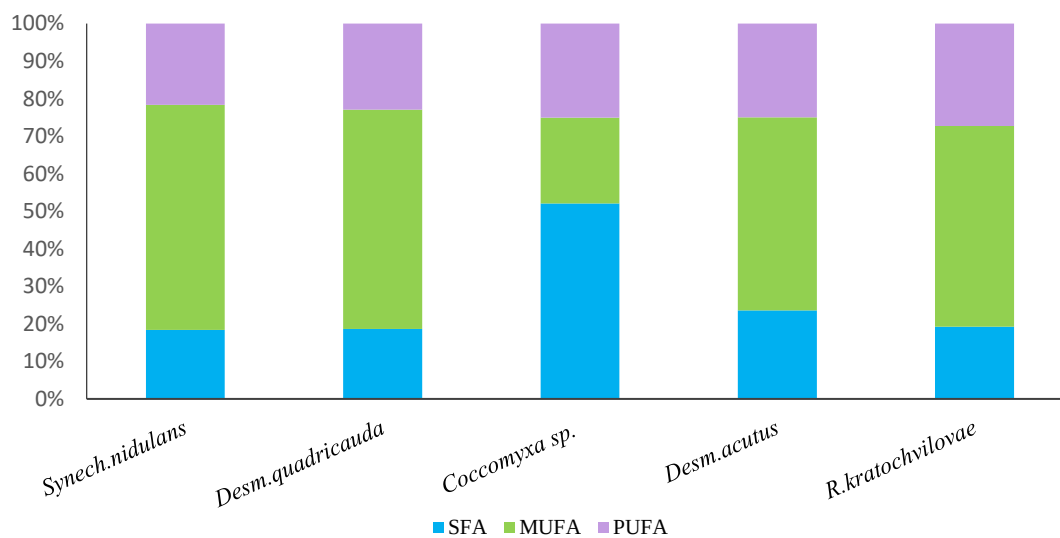
Procentuální zastoupení lipidů ve vzorcích (Obrázek č. 58) se v jednotlivých vzorcích liší. Kokultivace s *Coccomyxa* sp. má největší produkci SFA a nejmenší produkci PUFA. Největší produkci MUFA měl vzorek, který obsahoval čistou kvasinku. V kokultivacích má největší procentuální zastoupení MUFA ve vzorku s *Desm. acutus*. Co se týče celkové produkce lipidů (Obrázek č. 59), největší množství vyprodukovaných lipidů bylo ve vzorku kokultivace s *Desm. acutus*, kde je také největší procentuální zastoupení. Ve všech ostatních vzorcích je produkce množství lipidů podobná. Největší procentuální zastoupení lipidů bylo ve vzorku kultivace čisté kvasinky.

Tabulka č. 22. Produkce biomasy *R. kratochvilovae* v kokultivacích s glycerolem

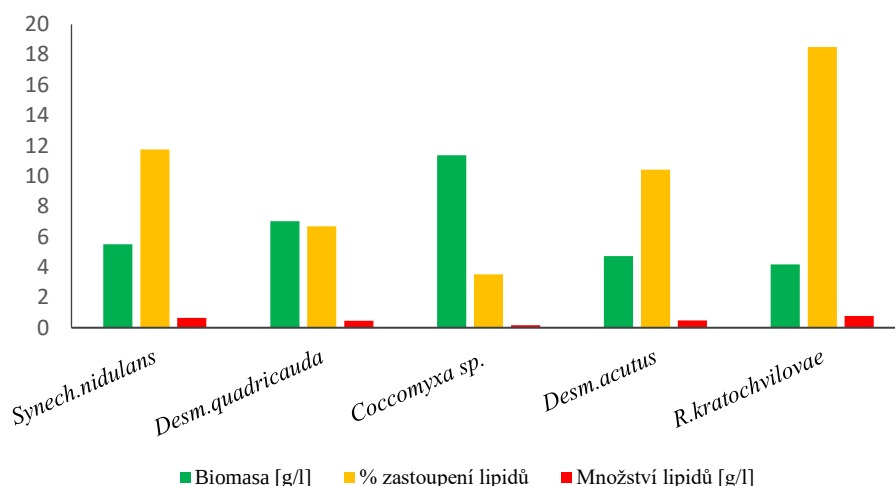
<i>Synechoc. nidulans</i>	<i>Desmos. quadricauda</i>	<i>Coccomyxa</i>	<i>Desmod. acutus</i>	<i>R. kratochvilovae</i>
5,49 g/l	7,02 g/l	11,37 g/l	4,72 g/l	4,18 g/l



Obrázek č. 57. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *R. kratochvilovae* v kokultivacích na glycerolovém médiu



Obrázek č. 58. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kokultivace s *R. kratochvilovae* a různými mikrořasami na glycerolovém médiu



Obrázek č. 59. Grafické znázornění produkce lipidů v kokultivacích s kmenem *R. kratochvilovae* a různými mikrořasami na glycerolovém médiu

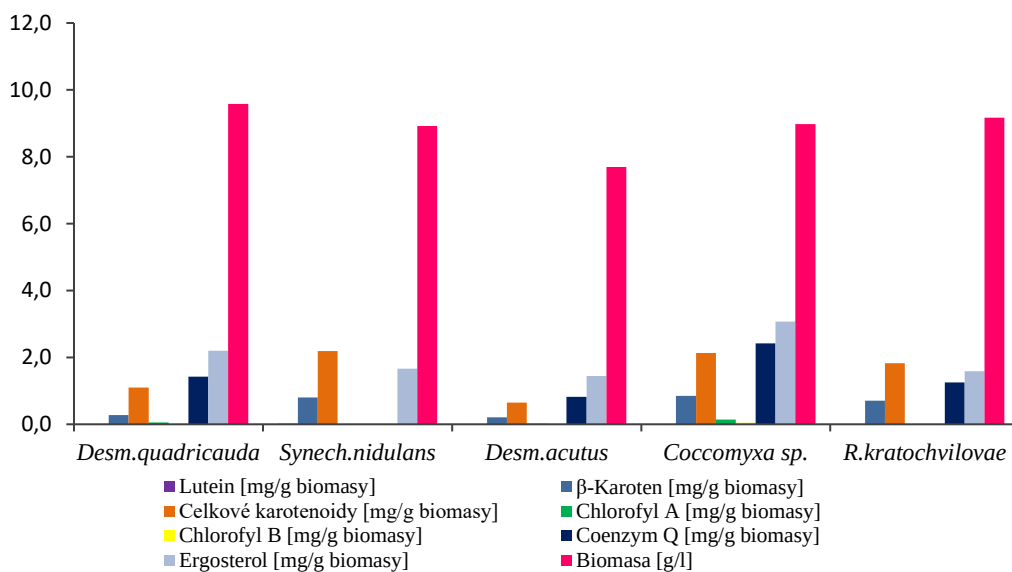
Kokultivace *R. kratochvilovae* na BBM médiu s glukózou a ureou

Tento experiment byl stejný jako předchozí. Jediným rozdílem byl jiný zdroj uhlíku, v tomto případě glukóza. Z tabulky produkce (Tabulka č. 23) lze vidět zřejmé, že v tomto případě vykazuje kokultivace s *Desm. quadr.* jako jediná kokultivace větší množství biomasy, než má samotná kvasinka. Celková produkce metabolitů (Obrázek č. 60) mezi kokultivacemi a čistou kvasinkou se dá srovnat. Výjimku tvoří kokultivace s řasami *Desm. acutus* a *D. quadricauda*, kde je produkce celkových karotenoidů menší. Kokultivace s *Coccomyxa. sp* je největším producentem koenzymu Q (2,42 mg/g sušiny) a ergosterolu (3,37 mg/g sušiny). Poté následuje kokultivace s *Desm. quadric.*, kdy množství koenzymu Q činilo 1,42 mg/g sušiny a ergosterolu bylo 2,19 mg/g sušiny. *Coccomyxa sp.* a *Desm. quadricauda* v kokultivacích jsou jedinými producenty chlorofylu A.

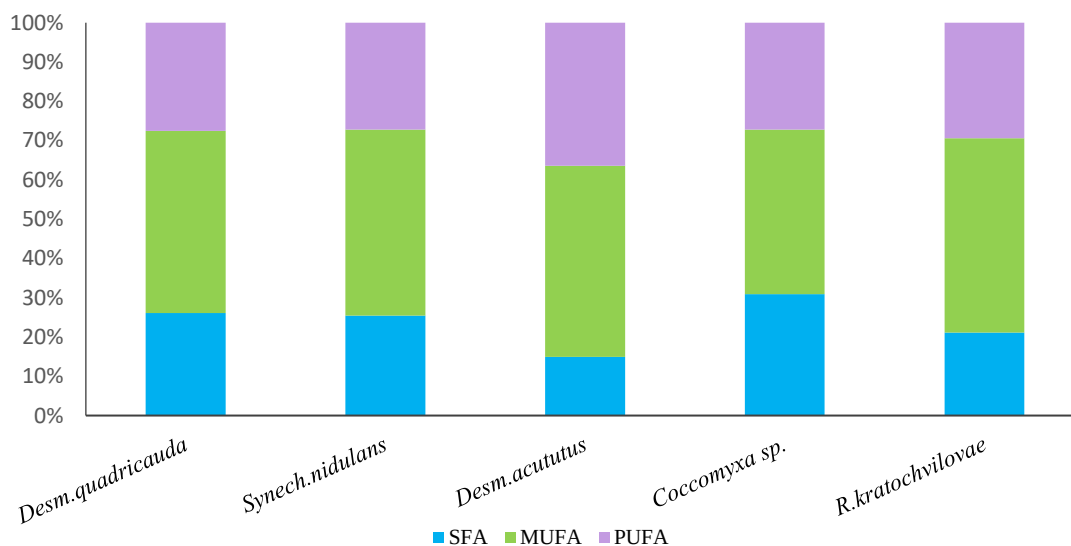
Procentuální zastoupení lipidů ve vzorcích (Obrázek č. 61) je také srovnatelná až na kokultivaci s *Coccomyxa*. Kokultivace s *Coccomyxa* má největší produkci SFA a PUFA ze všech kultivací. Největší produkci MUFA měl vzorek, obsahující čistou kvasinku. Co se týče celkové produkce a procentuálního zastoupení lipidů (Obrázek č. 62), tak je produkce opět srovnatelná mezi všemi vzorky, Výjimku tvoří kokultivace s *Desm. acutus*, kde je produkce i procentuální zastoupení menší.

Tabulka č. 23. Produkce biomasy *R. kratochvilovae* v kokultivacích

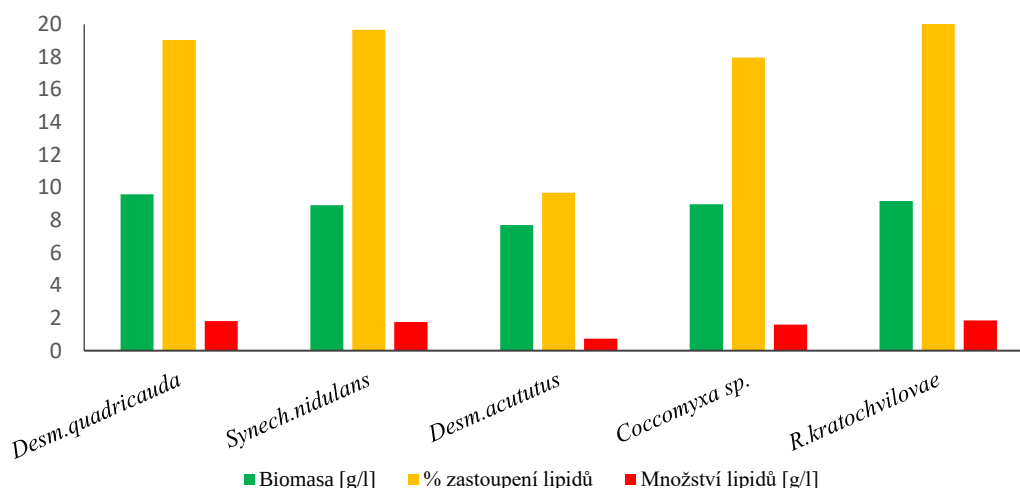
<i>Desmos. quadricauda</i>	<i>Synechoc. nidulans</i>	<i>Desmod. acutus</i>	<i>Coccomyxa sp.</i>	Čistá kvasinka
9,58 g/l	8,92 g/l	7,69 g/l	8,97 g/l	9,17 g/l



Obrázek č. 60. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *R. kratochvilovae* v kokultivacích na glukózovém médiu



Obrázek č. 61. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kokultivace s *R. kratochvilovae* a různými mikrořasami na glukózovém médiu



Obrázek č. 62. Grafické znázornění produkce lipidů v kokultivacích s kmenem *R. kratochvilovae* a různými mikrořasami na glukózovém médiu

Kokultivace *R. kratochvilovae* se *Scen. obliquus* a *Desm. acutus* na BBM médiu s glukózou a ureou v různých poměrech

Dalšími v sérii experimentů byly kokultivace kvasinky *R. kratochvilovae* s řasami *Scen. Obliquus* a *Desm. acutus*. Pro řasy byly opět připraveny dva druhy produkčních médií, jedno s přítomností uhlíkového zdroje a druhé bez. Bohužel médium se zdrojem uhlíku bylo kontaminované jinými mikroorganismy.

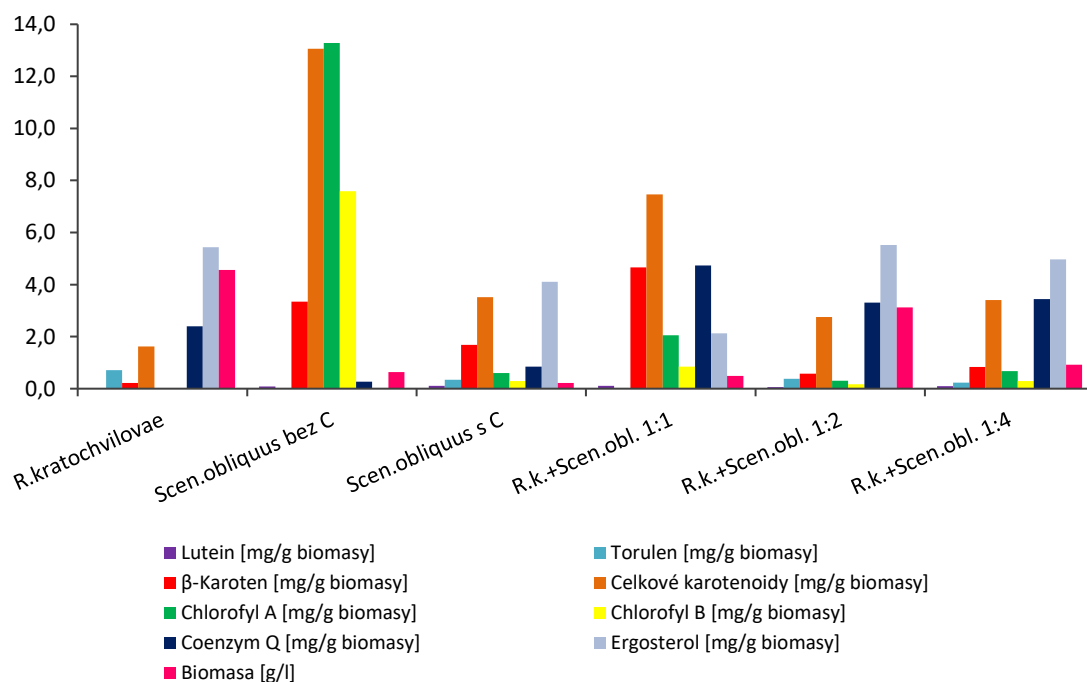
Z tabulky produkce kokultivace se *Scen. Obliquus* (Tabulka č. 24) je patrné, že ani jedna kokultivace nebyla, co se týče nárůstu biomasy, tak úspěšná jako kultivace samotné kvasinky. Mezi kokultivacemi se ukázal být nejlepší poměr kvasinka : řasa 1:2. V otázce produkce metabolitů (Obrázek č. 63) se ukázal být nejlepším *Scen. Obliquus* v médiu bez glukózy. Všechny poměry kokultivací pak měly produkci celkových karotenoidů vyšší než kvasinka samotná. Největším producentem ergosterolu je kokultivace v poměru 1:2 (5,52 mg/g sušiny), za ní následuje čistá kvasinka (5,44 mg/g sušiny). Co se týče produkce koenzymu Q, nejlépe vychází kokultivační poměr 1:1 s produkcí 4,73 mg/g sušiny. Procentuální zastoupení lipidů (Obrázek č. 65) u kokultivací a kultivace *R. kratochvilovae* je srovnatelné, s výjimkou kokultivace v poměru kvasinka : řasa 1:1, kde je větší obsah SFA než u zbylých dvou. V případě kultivace *Scen. Obliquus* na médiu s glukózou výsledky nejsou moc směrodatné z důvodu kontaminace média. *Scen. Obliquus* v médiu bez glukózy vyprodukoval největší množství PUFA a nejmenší množství SFA a MUFA ze všech kultivací. Co se týče celkového množství akumulovaných lipidů (Obrázek č. 66) nejlépe z toho opět vychází kultivace samotné kvasinky.

Tabulka kultivací kvasinky s *Desm. acutus* (Tabulka č. 24) nám říká, že tento experiment nepřežily samotné řasy v produkčních médiích. Srovnávat můžeme tedy jen kokultivace a kultivaci samotné *R. kratochvilovae*. Ani v tomto případě nebyly kokultivace schopné přerůst biomasou samotnou kvasinku. Rozdíl mezi nejúspěšnějším poměrem kvasinka : řasa 1:4 a kultivací kvasinky již ale není tak veliký jako v případě se *Scen. Obliquus*. Co se ale týče produkce metabolitů (Obrázek č. 64) tak tam z toho jednoznačně vycházejí nejlépe kokultivace, které svou produkcí metabolitů výrazně předčily produkci čisté *R. kratochvilovae*. Množství vyprodukovaných celkových karotenoidů je srovnatelné, ale nejlepším poměrem se v tomto směru ukázal být poměr kvasinka : řasa 1:2. Všechny kokultivace byly schopny vyprodukovat velké množství ergosterolu. Nejlepším poměrem byl poměr 1:1, který vyprodukoval 4,64 mg/g sušiny.

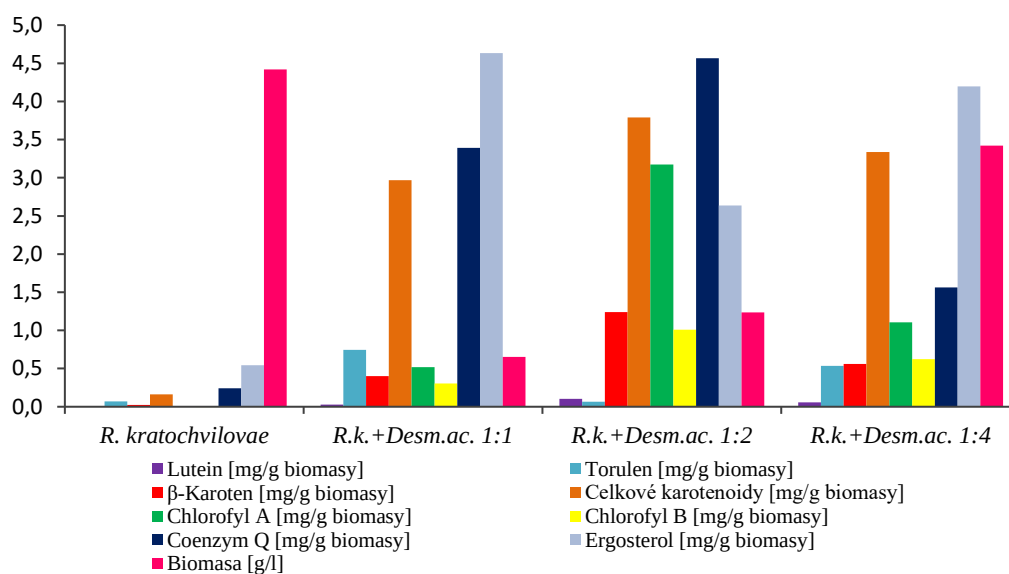
Největším producentem koenzymu Q byla kokultivace v poměru 1:2 – 4,57 mg/g sušiny. Chlorofyl B byl nejvíce přítomen u kokultivačního poměru 1:2. V procentuálním zastoupení lipidů (Obrázek č. 65) jsou ve všech kultivacích majoritním produktem MUFA. Minoritním produktem jsou potom PUFA, kromě kokultivace v poměru kvasinka : řasa 1:2, kde jsou minoritním produktem SFA a PUFA jsou zde zastoupena nejvíce ze všech kultivací. MUFA jsou nejvíce zastoupeny u čisté *R. kratochvilovae*. V lipidické produkci (Obrázek č. 66) je největším producentem lipidů kultivace samotné *R. kratochvilovae* a poté kokultivace v poměru kvasinka : řasa 1:4.

Tabulka č. 24. Produkce biomasy *R. Kratochvilovae* se *Scen. Obliquus* a *Desm. acutus* v kokultivacích v různých poměrech

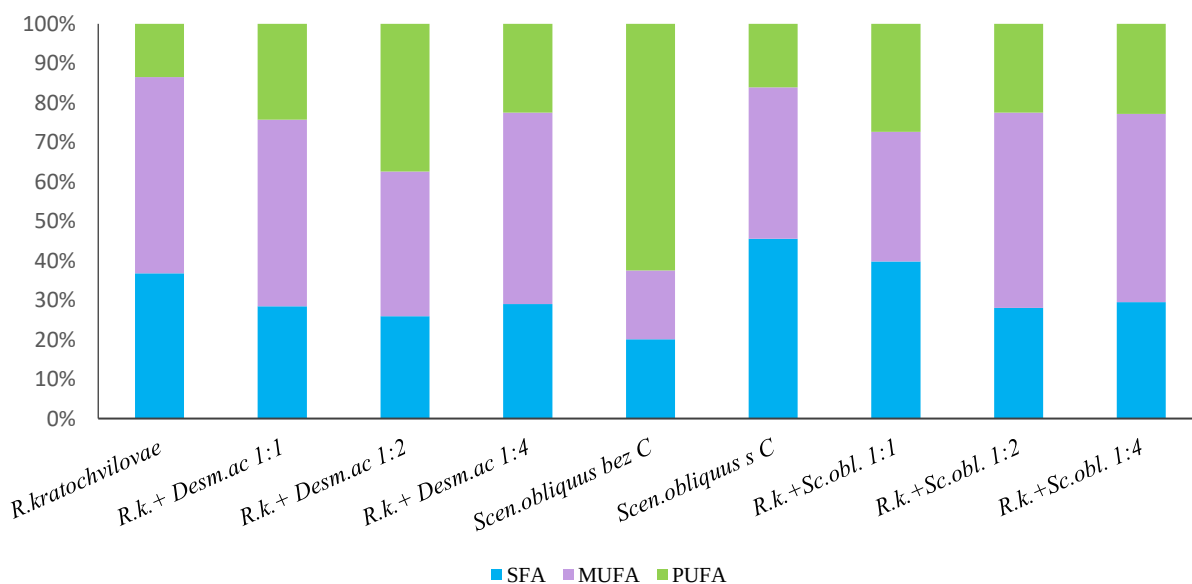
<i>R. kratochvilovae</i>	<i>Scen.obl.</i> bez glukózy	<i>Scen.obl.</i> + glukóza	<i>R.k. +S.o.</i> 1:1	<i>R.k. +S.o.</i> 1:2	<i>R.k.</i> + <i>S.o.</i> 1:4
4,32 g/l	0,63 g/l	0,22 g/l	0,49 g/l	3,12 g/l	0,92 g/l
	<i>Desm.ac.</i> bez glukózy	<i>Desm.ac.</i> + glukóza	<i>R.k.+D.a.</i> 1:1	<i>R.k.+D.a.</i> 1:2	<i>R.k.+D.a.</i> . 1:4.
	Nepřežil	Nepřežil	0,65 g/l	1,24 g/l	3,42 g/l



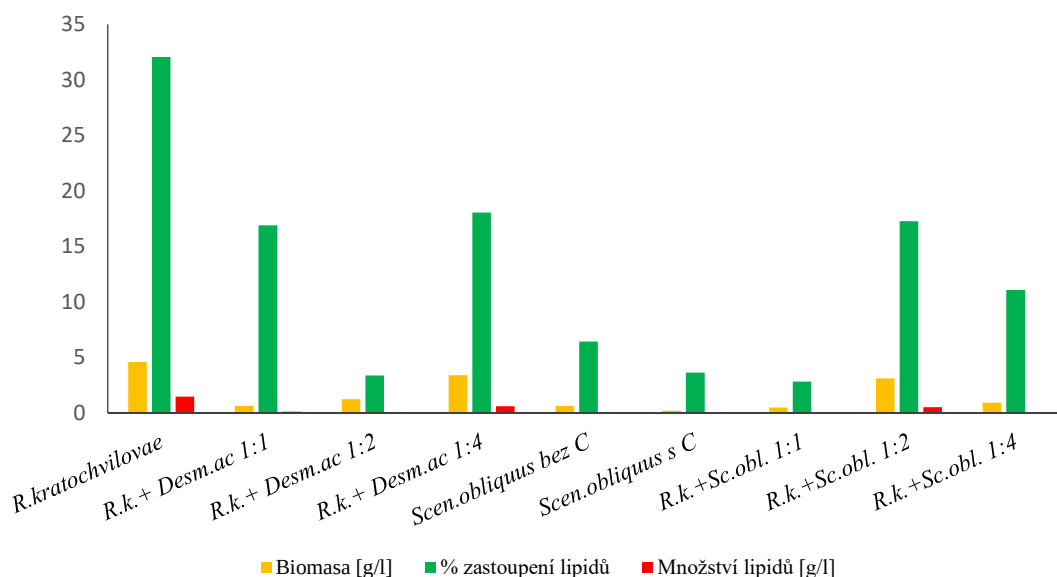
Obrázek č. 63. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *R. kratochvilovae* v kokultivacích se *Scen. obliquus* v různých poměrech



Obrázek č. 64. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *R. kratochvilovae* v kokultivacích s *Desm. acutus* v různých poměrech



Obrázek č. 65. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kokultivace s *R. kratochvilovae* a *Scen. Obliquus* a *Desm. acutus*



Obrázek č. 66. Grafické znázornění produkce lipidů v kokultivacích s kmenem *R. kratochvilovae* s *Desm. acutus* a *Scen. obliquus* v různých poměrech

Kokultivace *R. kratochvilovae* s *Desm. Quadricauda* na BBM médiu s glukózou a ureou v různých poměrech

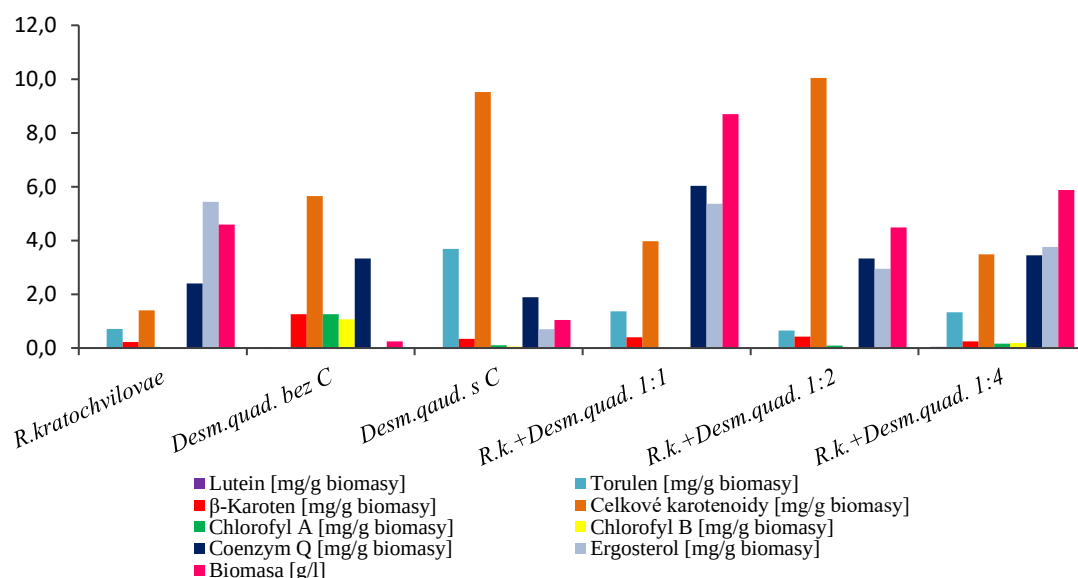
Při tomto experimentu byly do provzdušňovacích lahví zaočkovány řasa *Desmodesmus quadricauda* a kvasinka *Rhodotorula kratochvilovae*. Nejprve se zaočkovala řasa, pouze do BBM média s ureou, nechala se den růst a až po dni se přidala glukóza jako zdroj uhlíku a kvasinka. Ve výsledcích je také uveden *D. quad.* v médiu s glukózou, ale médium bylo silně kontaminováno bakteriemi. Z tabulky biomas (Tabulka č. 25) lze vidět, že jakákoli kokultivace měla vyšší produkci biomasy než kultivace samotné kvasinky. Největší nárůst potom měla kokultivace s poměrem kvasinka : řasa 1:2. I z grafu celkové produkce metabolitů (Obrázek č. 67) je zřejmé, že jakákoli kokultivace byla schopna vyprodukovat větší množství produktů než samotná kultivace kvasinky a řasy.

Největší produkci celkových karotenoidů mají MO, které byly kultivovány v poměru kvasinka: řasa 1:2 (10,04 mg/g sušiny). Produkce ergosterolu je nejvyšší u kokultivačního poměru kvasinka : řasa 1:1 (5,37 mg/ g sušiny). Poté je v produkci na druhém místě čistá kvasinka a poté kokultivační poměry 1:4 a 1:2. U všech kokultivací je také vyprodukováno více β -karotenu než u samotné kvasinky. Kokultivační poměr 1:4 měl také větší produkci luteinu (0,24 mg/l) než samotný *Desm. quadricauda* (0,01 mg/g sušiny). Největší produkce koenzymu Q byla u kokultivačního poměru 1:1 a to 6,04 mg/g sušiny.

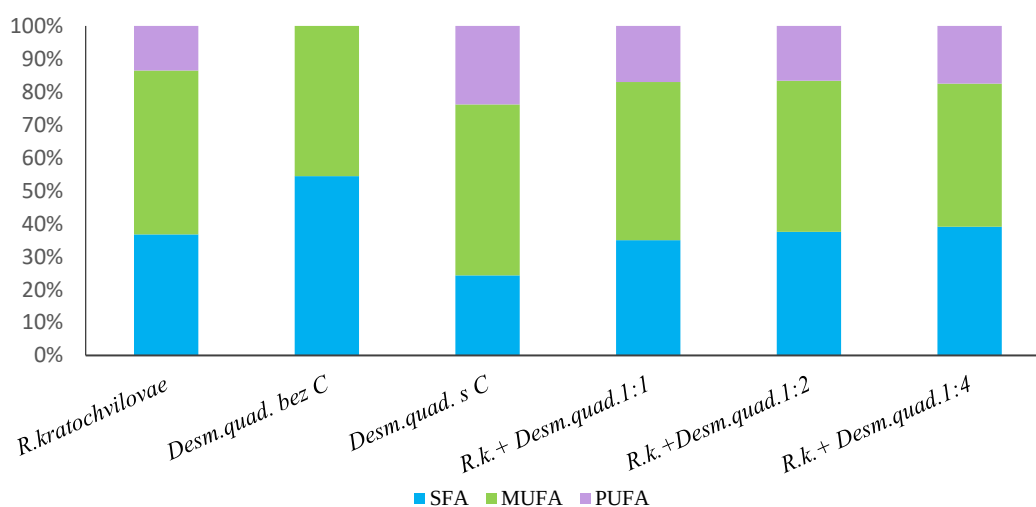
Co se týče uvedeného procentuálního zastoupení lipidů (Obrázek č. 68), je produkce MUFA a PUFA ve všech vzorcích srovnatelná, až na médium s *D. quad.* bez glukózy, kdy řasa vyprodukovala pouze SFA a MUFA. Graf množství lipidů (Obrázek č. 69) říká, že kokultivace měly větší množství vyprodukovaných lipidů než samotná kvasinka a řasa. Nejvíce jich vyprodukovaly kokultivace v poměrech kvasinka : řasa 1:1 a 1:4. Procentuální zastoupení lipidů v kokultivacích je taky vysoké.

Tabulka č. 25. Produkce biomasy *R. Kratochvilovae* s *Desm. quadricauda* v kokultivacích v různých poměrech

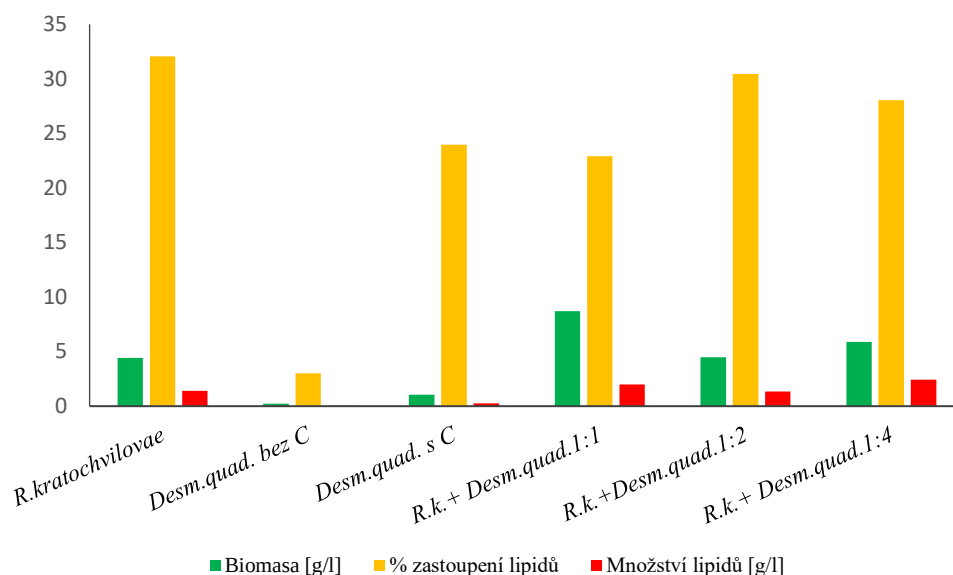
<i>R. kratochvilovae</i>	<i>Desm.q.</i> bez glukózy	<i>Desm.q.</i> + glukóza	<i>R.k.+D.q.</i> 1:1	<i>R.k.+D.q.</i> 1:2	<i>R.k.+D.q.</i> . 1:4
4,48 g/l	0,23 g/l	2,75 g/l	4,61 g/l	7,21 g/l	4,59 g/l



Obrázek č. 67. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *R. kratochvilovae* v kokultivacích s *Desm. quadricauda* v různých poměrech



Obrázek č. 68. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kokultivace s *R. kratochvilovae* a *Desm. quadricauda*



Obrázek č. 69. Grafické znázornění produkce lipidů v kokultivacích s kmenem *R. kratochvilovae* s *Desm. quadricauda* v různých poměrech

Kokultivace *R. kratochvilovae* s *Coccomyxa* sp. na BBM médiu s glycerolem a ureou v různých poměrech

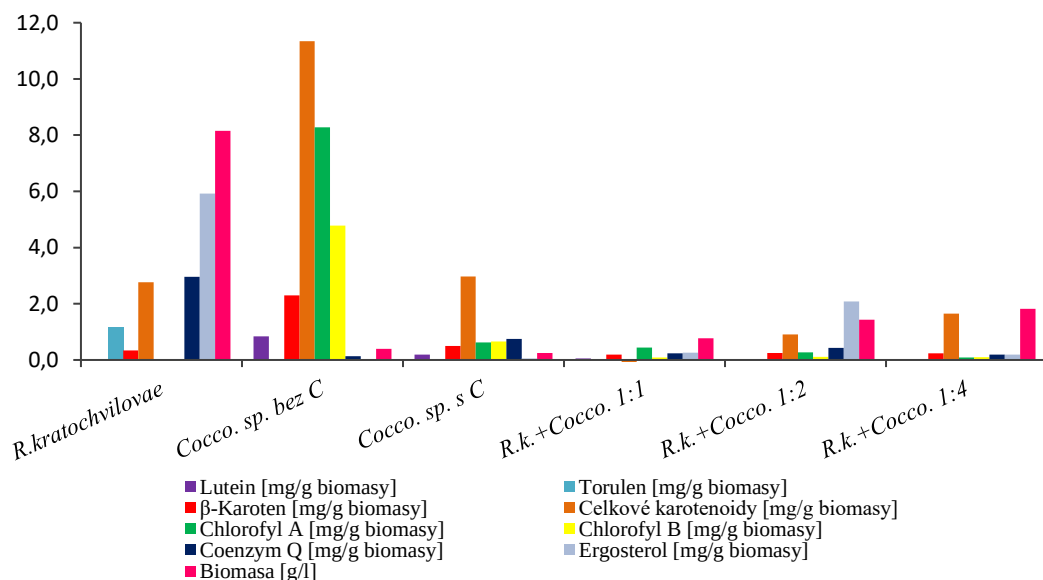
Posledním experimentem byla kokultivace kvasinky *R. kratochvilovae* a mikrořasy *Coccomyxa* sp.. První den se do všech médií zaočkowały pouze řasy, druhý den byly do kokultivačních lahví přidány zdroje uhlíku a kvasinky. Byly připraveny dva média pro řasy, jedno s přítomností uhlíkového zdroje a druhé bez. Bohužel bylo médium s uhlíkem kontaminované jinými mikroorganismy. Z tabulky výtěžnosti (Tabulka č. 26) je patrné, že žádná kokultivace nebyla, co se produkce biomasy týče úspěšnější než kultivace samotné kvasinky. Nejlepším poměrem se potom ukázal být poměr kvasinka : řasa 1:4.

Co se týče celkové produkce karotenoidních barviv (Obrázek č. 70) i tady se mnohem lepšími ukázaly kultivace čistých řas a kvasinek, nejlepším producentem karotenoidů byla *Coccomyxa* sp. v médiu bez zdroje uhlíku. Tato *Coccomyxa* byla také nejlepším producentem všech karotenogenních barviv torulenu i β -karotenu a také chlorofylů. V případě produkce ergosterolu je nejlepším producentem čistá kvasinka, z kokultivací v jeho produkci vychází nejlépe poměr kvasinka : řasa 1:2. Ostatní poměry jsou v produkci srovnatelné. U všech poměrů kokultivací jsou produkce chlorofylů nízké. Největší produkce chlorofylu A je u kokultivačního poměru kvasinka : řasa 1:1.

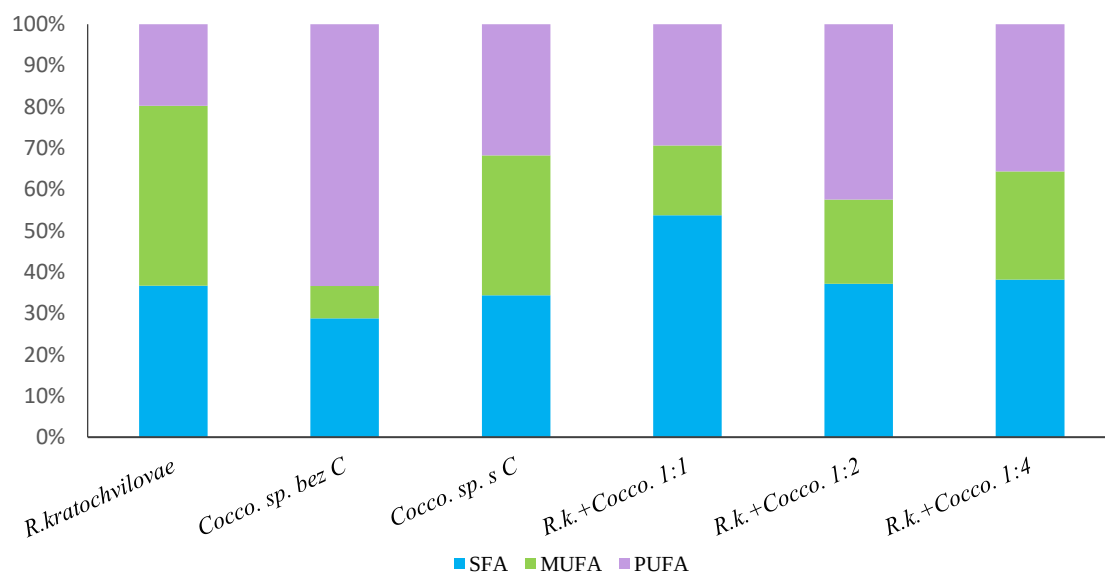
Procentuální zastoupení MK v lipidech (Obrázek č. 71) je v případě MUFA přibližně podobné u všech kokultivací. U samotné kvasinky je to majoritní produkt (a největší zastoupení ze všech kultivací), u *Coccomyxa* sp. v médiu bez uhlíku je to minoritní produkt. *Coccomyxa* sp. s glycerolem má procentuální zastoupení kyselin téměř shodné. Největším producentem PUFA je *Coccomyxa* sp. v médiu bez uhlíku. Největším producentem SFA je *Coccomyxa* sp. v kokultivaci v poměru kvasinka : řasa 1:1. Co se týče celkové produkce a procentuálního zastoupení lipidů (Obrázek č. 72), tak je největším producentem akumulovaných lipidů samotná *R. kratochvilovae*.

Tabulka č. 26. Produkce biomasy *R. Kratochvilovae* s *Coccomyxa* sp. v kokultivacích v různých poměrech

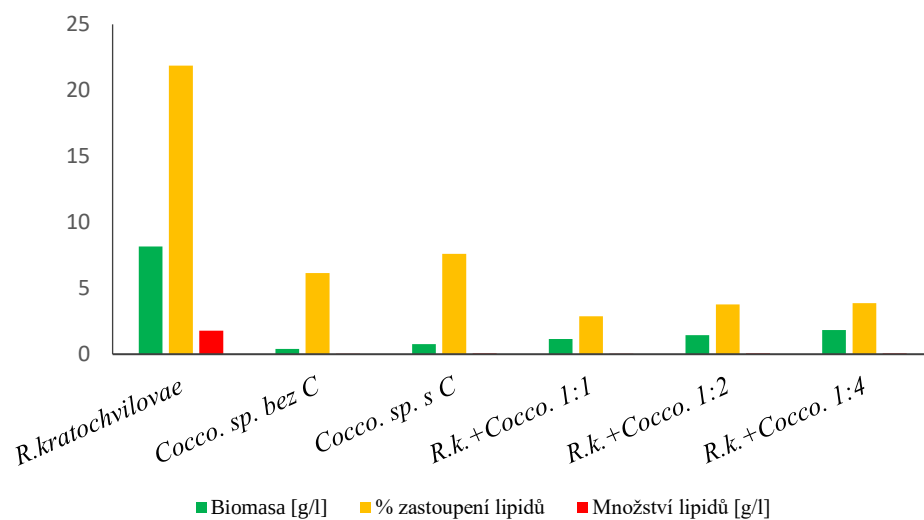
<i>R. kratochvilovae</i>	<i>Cocco. sp.</i> bez glycerolu	<i>Cocco. sp.</i> s glycerolem	<i>R.k.+ Cocco.</i> sp. 1:1	<i>R.k.+Cocco.</i> sp. 1:2	<i>R.k.+Cocco.</i> sp. 1:4
8,16 g/l	0,08 g/l	2,09 g/l	0,93 g/l	1,04 g/l	1,65 g/l



Obrázek č. 70. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů *R. kratochvilovae* v kokultivacích s *Coccomyxa* sp. v různých poměrech



Obrázek č. 71. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kokultivace s *R. kratochvilovae* a *Coccomyxa* sp



Obrázek č. 72. Grafické znázornění produkce lipidů v kokultivacích s kmenem *R. kratochvilovae* a *Coccomyxa sp.* v různých poměrech

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřená na stresové faktory ovlivňující růst a metabolismus kvasinek a mikrořas. Konkrétně to byly převážně biologické faktory – kokultivace. Kultivovanými kmeny kvasinek byly *Rhodotorula kratochvilovae*, *Phaffia rhodozyma* a *Rhodospiridium toruloides*. Vybranými druhy mikrořas poté byly *Desmodesmus acutus*, *Desmodesmus quadricauda*, *Coccomyxa* sp., *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus obliquus* a *Chlamydomonas reinhardtii*. Jako zástupce sinic byl vybrán *Synechococcus nidulans*.

V prvních sériích kultivačních experimentů byly vybrané druhy kvasinek kultivovány na médiích s různými zdroji uhlíku a dusíku, aby bylo zjištěno, které médium je neoptimálnější pro růst. V druhé fázi byly mikroorganismy kultivovány na BBM médiu s různými zdroji uhlíku a dusíku. U kmene *R. kratochvilovae* to bylo po čtyř denní kultivaci médium s glukózou a kvasničným autolyzátem. Největší produkce celkových karotenoidů byla u glukózového média s ureou a u glycerolového a glukózového média s kvasničným autolyzátem. Největší množství akumulovaných lipidů vzniklo v médiu glukózou a ureou a kvasničným autolyzátem. Po čtyř denní kultivaci na BBM médiu se jako nejlepší zdroj uhlíku pro růst biomasy ukázala být glukóza a zdroj dusíku urea. Největší produkce akumulovaných lipidů byla u média s glycerolem a síranem amonným. Po deseti denní kultivaci na BBM médiu byla nejlepším zdrojem uhlíku v nárůstu biomasy i celkových karotenoidů glukóza a dusíku kvasničný autolyzát. Největší množství vyprodukovaných lipidů bylo zaznamenáno u média glycerolem a ureou a glycerolem a síranem amonným.

U kmene *P. rhodozyma* se u čtyř denní kultivace ukázalo být nejlepší glycerolové médium s kvasničným autolyzátem. Produkce karotenoidů byla nejvyšší u média s glycerolem a kvasničným autolyzátem, ale u všech médií byla poměrně vysoká. Akumulované množství lipidů bylo u všech médií přibližně srovnatelné. Po čtyř a deseti denní kultivaci na BBM médiu bylo nejlepším produkčním médiem to s glycerolem a ureou. Kmen *R. toruloides* byl v této práci kultivován pouze na BBM médiu, kde byl jako nejlepší zdroj uhlíku glukóza a dusíku kvasničný autolyzát. Produkce karotenoidů po čtyřech dnech byla nejvyšší na BBM médiu s glycerolem a ureou, po deseti dnech byla produkce karotenoidů vysoká u všech médií. Akumulované lipidy byly nejvyšší u produkčního média s glukózou a kvasničným autolyzátem.

Dále následovaly kokultivační experimenty v Erlenmeyerových baňkách, kdy byl jako zdroj uhlíku použit glycerol a glukóza. Jako zdroj dusíku byla v obou případech použita urea. Kmen *R. kratochvilovae* byl kultivován se čtyřmi vybranými druhy mikrořas a sinic (*Desm. acutus*, *Desm. quadricauda*, *Coccomyxa* sp., *Synech. nidulans*), v páté baňce byla kultivována čistá kvasinka. V experimentu s glycerolovým uhlíkatým zdrojem se v otázce produkce biomasy ukázala být nejúspěšnější kokultivace s *Coccomyxa* sp., ale všechny kokultivace měly vyšší produkci biomasy než kultivace samotné kvasinky. Co se ale týče samotné produkce metabolitů, nejlepší se ukázala být kultivace samotné kvasinky. Nejvíce akumulovaných lipidů vyprodukovalo médium se samotnou kvasinkou. U glukózového média měla největší produkci biomasy kultivace s řasou *Desm. quadricauda*. Co se týče produkce metabolitů, nejúspěšnějšími se ukázaly být kokultivace s řasami *Coccomyxa* sp. a *Desm. quadricauda*. Množství vyprodukovaných lipidů bylo u tohoto experimentu srovnatelné mezi všemi kultivacemi, u kokultivace s *Desm. acutus* bylo menší.

Kmen *P. rhodozyma* byl kultivován se čtyřmi vybranými druhy mikrořas a sinic (*Desm. acutus*, *Desm. quadricauda*, *Coccomyxa* sp., *Synech. nidulans*) a v páté baňce byla kultivována opět čistá kvasinka. Opět byly dva druhy produkčních médií, jedno s glycerolem a druhé s glukózou. Zdrojem dusíku byla urea. V případě glycerolového média měla největší produkci biomasy samotná kvasinka. Nejlepším producentem metabolitů pak byla kokultivace s řasou *Coccomyxa* sp. a sinicí *Synechococcus nidulans*. Nejvíce lipidů vyprodukovala kokultivace se *Syn. nidulans*.

U média s glukózou byla největší produkce biomasy v kokultivaci se sinicí *Syn. nidulans*. Nejlepším producentem metabolitů byla kokultivace s řasou *Desm. quadricauda*. Produkce lipidů byla v tomto případě naprosto srovnatelná mezi všemi kultivacemi.

Kmen *R. toruloides* byl také kultivován se čtyřmi vybranými druhy mikrořas a sinic (*Desm. acutus*, *Desm. quadricauda*, *Coccomyxa* sp., *Synech. nidulans*), v páté baňce byla samotná *R. toruloides*. V glycerolovém médiu měla největší nárůst biomasy kultivace samotné kvasinky. Produkce metabolitů je v této sadě experimentů vyrovnanější, nejvíce jich vyprodukovala kokultivace se *Synech. nidulans*, poté následuje samotná kvasinka, poté *Desm. quadricauda* a *Desm. acutus*. Nejmenší produkce metabolitů byla u kokultivace s řasou *Coccomyxa* sp.. Nejvíce lipidů naakumulovala kokultivace se *Syn. nidulans*. U glukózového média byl největší nárůst biomasy u kokultivace s *Desm. acutus*, ale v porovnání s biomasou u čisté kvasinky je rozdíl minimální. Největší produkci karotenoidů pak měly kokultivace s řasami *Desm. quadricauda* a *Desm. acutus*. V tomto případě bylo nejvíce vyprodukovaných lipidů v kokultivačním médiu s *Desm. acutus*.

Následovaly experimenty s mikrořasami, kde byl do média přidán zdroj uhlíku. Cílem bylo zjistit, zda jsou řasy schopny mixotrofního metabolismu. Řasy experimenty nepřežily, zjistilo se tedy, že jsou striktně autotrofní.

V následující sadě byly mikroorganismy kultivovány v aerovaném prostředí a kokultivace byly v různých poměrech. Použité kvasinkové kmeny byly *R. toruloides* a *R. kratochvilovae*. U kmene *R. toruloides* byly provedeny experimenty s řasami *Desm. acutus*, *Desm. quadricauda*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella sorokiniana* a *Coccomyxa* sp.. Nejúspěšnějším kokultivačním experimentem v otázce produkce biomasy se ukázala být kokultivace s řasou *Chlorella sorokiniana*. V tomto případě byla zaznamenána větší biomasa u všech kokultivačních poměrů než u samotné kultivace kvasinky. V metabolické produkci ale kokultivace tak úspěšná nebyla, měla mnohem méně produktů než kultivace samotné řasy a kvasinky. Nejúspěšnější metabolickou kokultivací byla ta s *Cocco. Sp.*, ale i v tomto případě vyprodukovaly samotná řasa a kvasinka více metabolitů.

U kmene *R. kratochvilovae* byly provedeny experimenty s řasami *Desm. quadricauda*, *Desm. acutus*, *Coccomyxa* sp. a *Scenedesmus obliquus*. Poměry kvasinek a řas byly 1:1, 1:2 a 1:4, kdy byla u vyššího poměru řasa vždy v nadbytku. Z těchto experimentů vychází jednoznačně nejlépe kokultivace s řasou *Desm. quadricauda*. Tento experiment byl nejúspěšnější ze všech kokultivačních experimentů vůbec. Všechny kokultivační poměry měly větší nárůst biomasy i produkci karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q než kultivace samotné kvasinky. Nejlepším kokultivačním poměrem se ukázal být 1:2, u ostatních byla produkce metabolitů i biomasy srovnatelná. Nejméně úspěšnou kultivací jak z hlediska produkce metabolitů tak i biomasy se ukázala být kokultivace s *Coccomyxa* sp..

Nejúspěšnější kokultivací tedy byla kokultivace s *R. kratochvilovae* s *Desm. quadricauda* ve všech poměrech. Tato kokultivace byla úspěšná jak v produkci biomasy, produkci karotenoidů tak i v produkci lipidů. Úspěšnou kokultivací s hlediska nárůstu biomasy byla také kokultivace s *R. toruloides* a *Chlorella sorokiniana*. V produkci celkových karotenoidů byly ještě úspěšné kokultivace *R. kratochvilovae* s *Desm. acutus* ve všech poměrech.

Všechny kokultivační experimenty byly pouze pilotní, do budoucna by bylo potřeba provést optimalizaci produkčních médií, najít nejsymbiotičtější mikroorganismy, nalézt vhodné poměry kokultivací, zvážit použití a vliv antibiotik a celkově provést více experimentů v této oblasti. To bude předmětem dalších prací.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1982, 483 s.
- [2] KOCKOVÁ - KRATOCHVÍLOVÁ, A. Kvasinky. Bratislava: Slov. vydav. techn. lit., 1957.
- [3] VODRÁŽKA, Zdeněk. Biochemie. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [4] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [5] BENDOVÁ, Olga a Blanka JANDEROVÁ, 1985. Základy biologie kvasinek. 1. vydání. Praha: Univerzita Karlova
- [6] KURTZMAN, Cletus. 2011. The yeasts: a taxonomic study. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, xxii, 289, 48, 178 s. ISBN 978-012-3847-089.
- [7] GADANHO, M a J SAMPAIO. 2002. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus: sensu stricto and comb. nov. FEMS Yeast Research [online]. Roč. 2, č. 1, s. 47-58 [cit. 2019-04-06]. DOI 10.1016/S15671356(01)00062-9.
- [8] ROSA, Carlos a GÁBOR PÉTER (EDS.). Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Berlin: Springer, 2006. ISBN 9783540309857.
- [9] SAMPAIO, José Paulo. Rhodosporidium. *The Yeasts* [online]. Elsevier, 2011, 2011, s. 1523-1539 [cit. 2020-01-21]. DOI: 10.1016/B978-0-444-52149-1.00127-0. ISBN 9780444521491.
- [10] LYMAN, Mathew, Salustra URBIN, Cheryl STROUT a Bonnee RUBINFELD. The Oleaginous Red Yeast Rhodotorula/Rhodosporidium: A Factory for Industrial Bioproducts. PEIXOTO BASSO, Thalita, ed. *Yeasts in Biotechnology* [online]. IntechOpen, 2019, 2019-8-7 [cit. 2020-01-21]. DOI: 10.5772/intechopen.84129. ISBN 978-1-78923-927-0.
- [11] MILLER, M.W. a H.J. PHAFF. Phaffia M.W. Miller, Yoneyama & Soneda. *The Yeasts* [online]. Elsevier, 1998, 1998, s. 789 [cit. 2020-01-21]. DOI: 10.1016/B978-044481312-1/50107-6. ISBN 9780444813121.
- [12] MIMOUNI, V.; ULMANN, L.; PASQUET, V.; MATHIEU, M.; PICOT, L.; BOUGARAN, G.; CADORET, J.P.; MORANT-MANCEAU, A.; SCHOEFS, B. The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2012, 13, 2733–2750.
- [13] BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2010, 14, 557–577.
- [14] KHAN, M.I.; SHIN, J.H.; KIM, J.D. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb. Cell Fact.* 2018, 17, 36.
- [15] BARSANTI, L. a P.. GUALTIERI. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Second edition. Boca Raton, [Florida]: CRC Press/Taylor, 2014.
- [16] Integrated Taxonomic Information System [online]. [cit. 2020-02-21].
- [17] CAMPENNI, L., B. NOBRE, C. SANTOS, A. OLIVEIRA, M. AIRES-BARROS, A. PALAVRA a L. GOUVEIA. Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2013, 97(3), 1383-1393 [cit. 2020-02-21]. DOI: 10.1007/s00253-012-4570-6. ISSN 01
- [18] Integrated Taxonomic Information System. Integrated Taxonomic Information System [online]. b.r. [cit. 2018-05-29].

- [19] KALINA, Tomáš. Systém a vývoj sinic a řas. 2 vyd. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 8071846112.
- [20] 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
- [21] 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
- [22] SAAD, A. a A. ATIA. Review on Freshwater Blue-Green Algae (Cyanobacteria): Occurrence, Classification and Toxicology. *Biosciences Biotechnology Research Asia.* 2014, 11(3), 1319-1325. DOI: 10.13005/bbra/1522. ISSN 0973-1245.
- [23] KIM, Y., J. JEON, M. S. 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.* 2018, 13(1). DOI: 10.1371/journal.pone.0190266. ISSN 1932-6203.
- [24] SAHOO, D. a J. SECKBACH, ed. *The Algae World.* 2015. DOI: 10.1007/978-94-017-73218.
- [25] XU, Xinde, Mingquing JIAO, Dong SHAO, Bin SHAO a Leiming YU, 2011. Method for producing natural-carotene by fermentation and use thereof. In: *European Patent Office* [online]. United States [cit. 2020-07-11].
- [26] ANDREWES, A. G. a M. P. STARR. (3R,3'R)-astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Phytochemistry.* 1976, 15(6), 1009-1011. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)84391-5. ISSN 00319422.
- [27] ECHAVARRIERASUN, C. a E. JOHNSON. Stimulation of astaxanthin formation in the yeast by the fungus. *FEMS Yeast Research.* 2004, 4(4-5), 511-519. DOI: 10.1016/S15671356(03)00177-6. ISSN 15671356.
- [28] Astaxanthin Molecule, 2016. *World of molecules* [online]. [cit. 2020-05-25].
- [29] Lutein Molecule, 2016. In: *World of molecules* [online]. World of Molecules [cit. 2020-07-11].
- [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), 12- [cit. 2020-01-03]. DOI: 10.1186/1475-2859-13-12. ISSN 14752859.
- [31] YAHIA, E. M. Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry and human health. 2nd edition. Hoboken, NJ, 2018. ISBN 978-111-9157-977.
- [32] 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>
- [33] LARKUM, A. W.D. a M. KÜHL. Chlorophyll d: the puzzle resolved. *Trends in Plant Science.* 2005, 10(8), 355-357. DOI: 10.1016/j.tplants.2005.06.005. ISSN 13601385.
- [34] Chlorofyl A (vyčištěná molekula), 2011. In: *Kromaton* [online]. Germany: ROUSSELET-ROBATEL [cit. 2020-07-11].
- [35] VON WETTSTEIN, D. Chlorophyll Biosynthesis. *THE PLANT CELL ONLINE.* 7(7), 1039- 1057. DOI: 10.1105/tpc.7.7.1039. ISSN 10404651.

- [36] SABA, A. a A. OWAIS. Biochemistry, Lipids[online]. Binghamton University: StatPearls Publishing, 2019 [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525952/>
- [37] SHIELDS-MENARD, S. A., M. AMIRSADEGHI, W. Todd FRENCH a R. BOOPATHY. A review on microbial lipids as a potential biofuel. Bioresource Technology. 2018, 259, 451- 460. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.03.080. ISSN 09608524.
- [38] HOLEČEK, M. Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1562-7.
- [39] VOET D., J. G. VOETOVÁ. Biochemie. 1. české vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995, 1325 s. ISBN 80-85605-44-9.
- [40] MURRAY, Robert K., 2002. Harperova Biochemie. 23. vyd., (4. české vyd.), v H. Jinočany: H. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- [41] MAGDOULI, S., S.K. BRAR a et al. Co-culture for lipid production. Biomass and Bioenergy. 2016, 92, 20-30. DOI: 10.1016/j.biombioe.2016.06.003. ISSN 09619534.
- [42] GOERS, L., P. FREEMONT a K. M. POLIZZI. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. Journal of The Royal Society Interface. 2014, 2001, 11(96), 20140065-20140065. DOI: 10.1098/rsif.2014.0065. ISSN 1742-5689.
- [43] WANG, R., Y. TIAN a et al. Enhanced microalgal biomass and lipid production via coculture of Scenedesmus obliquus and Candida tropicalis in an autotrophic system. 2016, 91(5), 1387-1396. DOI: 10.1002/jctb.4735. ISSN 02682575.
- [44] MUNIR, N., A. IMITIAZ, N. SHARIF a S. NAZ. Optimization of growth conditions of different algal strains and determination of their lipid contents. Journal of Animal and Plant Sciences [online]. Pakistan Agricultural Scientists Forum, 2015, (252, 546-553 [cit. 2018-05-29]. ISSN 1018-7081.
- [45] LAPPAS, Nicholas T. a Courtney M. LAPPAS. Methods of Detection, Identification, and Quantitation. *Forensic Toxicology* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 161-181 [cit. 2020-07-21]. DOI: 10.1016/B978-0-12-799967-8.00010-4. ISBN 9780127999678.
- [46] NĚMCOVÁ, I. ČERMÁKOVÁ, L. a RYCHLOVSKÝ, P. Spektrometrické analytické metody. Praha : Karolinum, 1997. ISBN 80-7184-365-2
- [47] MILATA, V. a SEGĽA, P. Spektrálne metódy v chémii. Bratislava : Slovenská technická univerzita, 2004. ISBN 80-227-2049-6
- [48] NOVÁKOVÁ, Lucie. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 299 s. . ISBN 978-80-260-4243-3.
- [49] LUNDANES, Elsa, Léon REUBSAET a Tyge GREIBROKK. Chromatography: basic principles, sample preparations and related methods. ISBN 978-3-527-33620-3.
- [50] SOMMER, L.. Základy analytické chemie. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000, 347 s.
- [51] PONÍŽIL, David. Produkce lipidů pomocí různých druhů kvasinek [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-07-22]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123944>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martin Szotkowski,

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ACN – acetonitril

DAD - detektor diodového pole

FID - plamenově ionizační detektor

GC - plynová chromatografie

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

MeOH - methanol

MF A – mobilní fáze A

MF B – mobilní fáze B

MO - mikroorganismy

MUFA – mononenasycené mastné kyseliny

PTFE – polytetrafluorethylen

PUFA – polynenasycené mastné kyseliny

SFA – nasycené mastné kyseliny

TrisHCl – pufr kyseliny chlorovodíkové

YPD - yeast extract-pepton-dextrose