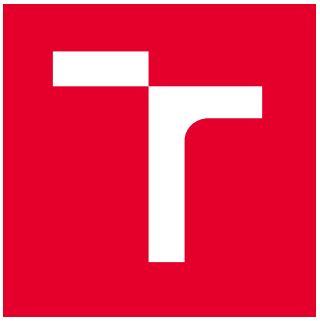


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

OPTIMALIZACE KOKULTIVACE KVASINKY PHAFFIA RHODOZYMA S VYBRANÝMI KMENY AUTOTROFNÍCH MIKROORGANISMŮ

OPTIMIZATION OF THE CO-CULTIVATION OF THE YEAST PHAFFIA RHODOZYMA WITH SELECTED STRAINS OF AUTOTROPHIC MICROORGANISMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE — **Olga Shelekhova**

AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — **Ing. Pavlína Sikorová**

SUPERVISOR

BRNO 2024

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání bakalářské práce

Číslo práce:	FCH-BAK1820/2022	Akademický rok: 2023/24
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Studentka:	**Olga Shelekhova**	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin	
Studijní obor:	Biochemická technologie	
Vedoucí práce:	**Ing. Pavlína Sikorová**	

Název bakalářské práce:

Optimalizace kokultivace kvasinky Phaffia rhodozyma s vybranými kmeny autotrofních mikroorganismů

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše zaměřená na biotechnologii vybrané karotenogenní kvasinky a mikrořas
2. Kultivace kvasinky Phaffia rhodozyma na různých zdrojích uhlíku
3. Nalezení nejvhodnějších zdrojů a optimalizace kultivačních podmínek na médiích s těmito zdroji uhlíku
4. Provedení screeningových kultivací s využitím biologického stresu
5. Analýza získané biomasy a vyhodnocení výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2024:

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

Olga Shelekhova studentka	Ing. Pavlína Sikorová vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

Tato bakalářská práce byla zaměřena na kultivace kvasinky *Phaffia rhodozyma* na různých zdrojích uhlíku v laboratorních podmínkách a na optimalizace kokultivačních podmínek kmene kvasinky *Phaffia rhodozyma* s vybranými kmeny autotrofních mikroorganismů na médiích s nejvhodnějšími zdroji uhlíku. Sledovanými kmeny kvasinek mikroorganismů byly kvasinka *Phaffia rhodozyma* (CCY 77-1) a mikrořasa *Desmodesmus communis* (CCALA 464). Kultivace probíhaly na médiích s obsahem glukózy, glycerolu, kávového oleje, fritovacího oleje, ethanolu, isopropanolu, methanolu, melasy, lihového odpadu.
Práce je rozdělena na dvě hlavní části, teoretickou část, a praktickou část. Teoretická část zahrnuje informace o využitém rodu kvasinek a mikrořas, popis odpadních substrátů, sledovaných metabolitů a metody analýzy těchto látek. Experimentální část je zaměřena na kultivaci, kokultivaci a na optimalizaci produkčních médiích. Byly popsány podmínky kultivace, zpracování biomasy, analýza metabolitů a získané výsledky.

Klíčová slova: karotenogenní kvasinky, mikrořasy, kokultivace, ubichinon, mastné kyseliny, chlorofyl

Abstract

This bachelor thesis was focused on the cultivation of Phaffia rhodozyma yeast on different carbon sources in laboratory conditions and on the optimization of co-cultivation conditions of Phaffia rhodozyma yeast strain with selected strains of autotrophic microorganisms on media with the most suitable carbon sources. The yeast strains of microorganisms under study were the yeast Phaffia rhodozyma (CCY 77-1) and the microalgae Desmodesmus communis (CCALA 464). Cultures were carried out on media containing glucose, glycerol, coffee oil, frying oil, ethanol, isopropanol, methanol, molasses, and waste alcohol.
The work is divided into two main parts, theoretical part, and practical part. The theoretical part includes information about the yeast and microalgae genus used, description of waste substrates, metabolites monitored and methods of analysis of these substances. The experimental part focuses on cultivation, co-cultivation and optimization of production media. Cultivation conditions, biomass processing, metabolite analysis and the results obtained have been described

Keywords: carotenogenic yeasts, microalgae, co-cultivation, ubiquinone, fatty acids, chlorophyll

SHELEKHOVA, Olga. *Optimalizace kokultivace kvasinky Phaffia rhodozyma s vybranými kmeny autotrofních mikroorganismů.* Brno, 2024. Dostupné také z: https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149101. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Pavlína Sikorová.

Prohlášení

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

……
podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce paní inženýrce Pavlíně Sikorové a odbornému konzultantovi panu inženýrovi Samueli Šimanskému za vedení, pomoc a cenné rady při řešení problematiky. Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia na vysoké škole podporovali.

OBSAH

1 ÚVOD 8

2 TEORETICKÁ ČÁST 9

2.1 Kvasinky 9
2.1.1 Rozmnožování kvasinek 9
2.1.2 Stavba buňky kvasinek 9
2.1.3 Karotenogenní kvasinky 11

2.2 Řasy 12
2.2.1 Klasifikace řas 12
2.2.2 Stavba buňky řas 12
2.2.3 Rozmnožování mikrořas 13
2.2.4 *Desmodesmus communis* 13

2.3 Významné metabolity produkované použitými mikroorganizmy 14
2.3.1 Karotenoidy 14
2.3.2 Lipidy 15
2.3.3 Ergosterol 17
2.3.4 Ubichinon 18
2.3.5 Chlorofyl 18

2.4 Odpadní substráty 19
2.4.1 Fritovací olej 19
2.4.2 Kávový olej 19
2.4.3 Lihový odpad 20
2.4.4 Alkoholy 20
2.4.5 Glukosa 20
2.4.6 Melasa 20
2.4.7 Glycerol 20

2.5 Kultivace mikroogranismů 20

2.6 Kokultivace mikroogranismů 21

2.7 Metody analýzy buněčných složek 21
2.7.1 Chromatografie 21
2.7.2 Plynová chromatografie 21
2.7.3 HPLC (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie) 22

3 CÍL PRÁCE 23

4 EXPEREMENTALNI ČÁST 24

4.1 Použité chemikálie 24
4.1.1 Chemikálie použité ke kultivaci mikroorganismů 24
4.1.2 Chemikálie pro extrakce, transesterifikaci a analýzu pro GC a HPLC 24

4.2 Použité přístroje a pomůcky 24
4.2.1 Přístrojová technika a pomůcky pro kultivaci mikroorganismů 24
4.2.2 Přístroje a pomůcky použité pro izolaci a analýzu metabolitů 25

4.3 Použité kmeny řas a mikrořas 25

4.4 Kultivace mikroorganismů 25
4.4.1 Vnější podmínky 25
4.4.2 Inokulum I a Inokulum II kvasinkových kultur 25
4.4.3 Produkční média 26
4.4.4 Kokultivace kvasinek a mikrořas 28

4.5 Zpracování biomasy 29
4.5.1 Zpracování vzorků po kultivaci 29
4.5.2 Stanovení biomasy 29
4.5.3 Extrakce pro HPLC analýzu 29
4.5.4 Analýza vzorků metodou HPLC 29
4.5.5 Transesterifikace a extrakce mastných kyselin pro GC 30
4.5.6 Analýza vzorků na GC 30

5 VÝSLEDKY A DISKUZE 32

5.1 Kvasinky 32
5.1.1 Primární kultivace kmenu *Phaffia rhodozyma* na nejnižších testovaných koncentracích odpadních substrátů 32
5.1.2 Kultivace kmena *Phaffia rhodozyma na dvounásobných koncentracích odpadních substrátů* 34
5.1.3 Kultivace kmena *Phaffia rhodozyma na nejvyšších koncentracích* 36

5.2 Kokultivace 38
5.2.1 Kokultivace kmena *Phaffia Rhodozyma* a *Desmodesmus communis* při testování vlivu médií s kávovým olejem 38
5.2.2 Kokultivace kmena *Phaffia Rhodozyma* a *Desmodesmus communis* při testování vlivu médií s isopropanolem 40
5.2.3 Kokultivace kmena *Phaffia Rhodozyma* a *Desmodesmus communis* při testování vlivu médií s fritovacím olejem 42

6 ZÁVĚR 45

7 LITERATURA 46

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 50

1 ÚVOD

V dnešní době se v biotechnologickém výzkumu zaměřujeme na hledání nových způsobů, jak zvýšit produkci biomasy a bioproduktů. Jednou z potenciálně revolučních metod je kokultivace kvasinek s mikrořasami, která nabízí možnosti využití jejich schopností pro efektivní výrobu cenných látek. Tato nová strategie vyvolává zájem vědecké komunity díky své schopnosti maximalizovat výtěžnost biomasy a současně optimalizovat produkci bioproduktů.
Kvasinky a mikrořasy jsou oba jednobuněčné mikroorganismy s potenciálem k výrobě různých druhů bioproduktů, jako jsou biopaliva, bioplasty, enzymy, vitamíny a další. Zatímco kvasinky excelují ve fermentaci a tvorbě ethanolu a jiných organických sloučenin, mikrořasy se specializují na fotosyntézu a tvorbu polysacharidů, lipidů a dalších hodnotných látek. Spojení těchto dvou mikroorganismů umožňuje využít jejich specifické schopnosti a synergické interakce k maximalizaci produkce.
Klíčovými faktory ovlivňujícími efektivitu kokultivace kvasinek s mikrořasami jsou selekce vhodných kmenů, optimalizace podmínek kultivace (jako je teplota, pH, osvětlení a živiny) a porozumění interakcím mezi jednotlivými druhy. Tyto faktory mohou ovlivnit produkci biomasy, poměr mezi produkovanými látkami a celkovou výtěžnost.
Perspektivy budoucího rozvoje v této oblasti zahrnují možnost využití kokultivace jako udržitelného a efektivního způsobu produkce biomasy a bioproduktů s nižšími náklady a menším vlivem na životní prostředí. Tento nový přístup může otevřít dveře pro inovace v bioenergetice, biotechnologii a obnovitelných zdrojích, což by mohlo mít dalekosáhlé dopady na ekonomiku a životní prostředí.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou eukaryotické heterotrofní mikroorganismy patřící do říše hub. V přírodě se vyskytuji buď jako jednobuněčné organismy anebo ve formě větvených vláken – kolonií. Na rozdíl od většiny ostatních eukaryot mají kvasinky silnou a pevnou buněčnou stěnu. Tvar kvasinkové buňky, což je rodově specifická vlastnost, je do značné míry dán způsobem vegetativního rozmnožování a může být do jisté míry ovlivněna podmínkami prostředí, např. povrchovým napětím, složením živného média, redoxním potenciálem atd. Velikost buněk se pohybuje mezi 3-15 μm v závislosti na rodu a kultivačních podmínkách. Základním tvarem kvasinkové buňky je rotační elipsoid se dvěma možnými variantami-blíže ke kulatému tvaru nebo k protáhlému až vláknitému tvaru. Pro zdroj uhlíku a energie mohou kvasinky rozkládat cukry pomocí dvou metabolických cest: aerobní respirace a fermentace [1].

V současné době mají kvasinky mimořádný význam mezi ostatními průmyslovými mikroorganismy, zejména v potravinářském průmyslu při výrobě chleba, alkoholických nápojů a potravinářské a krmné biomasy [1].

2.1.1 Rozmnožování kvasinek

Na rozdíl od bakterií se kvasinky mohou rozmnožovat vegetativně (nepohlavně) i sexuálně (pohlavně). Některé tzv. asporogenní kvasinky se množí pouze vegetativně. Vegetativní rozmnožovaní může probíhat buď pomoci dělení nebo pomoci pučení, pohlavní pak pomocí spájení dvou mateřských buněk za vzniku spor [2].

2.1.1.1 Vegetativní rozmnožování

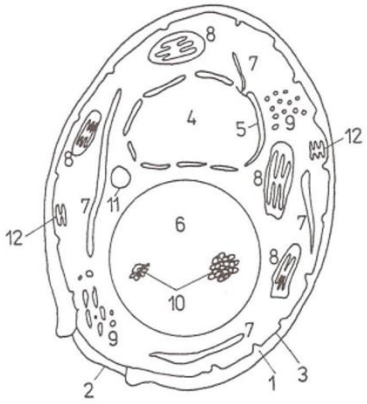
Většina kvasinek se vegetativně rozmnožuje pučením, rody tvořící pravé mycelium potom příčným dělením. Při rozmnožování pomoci pučení na mateřské buňce se vytvoří pupen, který se postupně zvětšuje. Po dosažení dostatečné velikosti se pupen oddělí od mateřské buňky a vytvoří jizvy. Celý cyklus buněčného dělení trvá za optimálních podmínek asi dvě hodiny a je regulován velkým počtem genů [2].

2.1.1.2 Pohlavní rozmnožování

Protože buňky kvasinek patří mezi eukaryota, mohou se rozmnožovat i pohlavně. Při tomto typu rozmnožování se vytváří pohlavní spory. Nejprve proběhne spájení dvou gamet, které jsou haploidní. Po spájení vznikne buňka diploidní (zygota), v níž se jádro rozdělí procesem meiózy za vzniku čtyř identických buněk, znovu haploidních. Z těch se později vytváří pohlavní spory. Pohlavní rozmnožování je typické pro *Saccharomyces cerevisiae* a některé zástupce rodu *Candida* [3].

2.1.2 Stavba buňky kvasinek

Z hlediska buněčné struktury patří kvasinky mezi eukaryota. Kvasinková buňka má buněčnou stěnu, cytoplazmatickou membránu, cytoplazmu, jádro, mitochondrie, ribozomy, lyzozomy, vakuoly, inkluze uložených živin a jiné membránové struktury (*Obrázek 1*) [4], [5].



Obrázek 1: Struktura kvasinkové buňky [5]

2.1.2.1 Buněčná stěna kvasinky

Buněčná stěna hraje důležitou roli při řízení osmotických a permeabilních vlastností buňky. Zajišťuje také transport živin do buňky a odstraňování buněčných odpadních produktů. Buněčná stěna kvasinek je poměrně silná struktura, která tvoří 15-25 % celkové suché hmotnosti buňky. Hlavními strukturními složkami buněčné stěny kvasinek jsou polysacharidy, které tvoří 80-90 % stěny. Jedná se především o glukany a manany s malým podílem chitinu [4].

2.1.2.2 Cytoplazmatická membrána

Plazmatickou membránu lze popsat jako lipidovou dvojvrstvu s částicemi globulárních proteinů. Lipidové složky se skládají z fosfolipidů a sterolů. Fosfolipidy dodávají membráně tekutost a steroly její tuhost. Její hlavní funkcí je regulovat vstup živin do buňky a vylučovat metabolické produkty do extracelulárního prostoru [4].

2.1.2.3 Cytoplazma a organely

Cytoplazma mladých buněk kvasinek má homogenní a průhledný vzhled, zatímco ve starších buňkách se začínají objevovat inkluze a větší vakuoly. Cytoplazma obsahuje systém dvojitých membrán nazývaný endoplazmatické retikulum, kde probíhá proteosyntéza. V cytoplazmě kvasinek se dále nacházejí mitochondrie, které jsou složeny z bílkovin, lipidů a fosfolipidů. Tyto struktury obsahují také RNA a malé množství DNA, která představuje nosič mimojaderné dědičnosti kvasinek. Mitochondrie slouží jako místo pro dýchací enzymy a systém oxidační fosforylace, a také jako místo syntézy některých mitochondriálních bílkovin, včetně tRNA, mRNA a ribozomů. Vakuoly jsou výraznou součástí cytoplazmy kvasinek a obsahují hydrolytické enzymy. Tyto struktury slouží jako místo, kde probíhá rozklad buněčných struktur s krátkým životním cyklem, které se neustále obnovují a rozkládají v buňce. Golgiho aparát má funkci transportovat prekurzory buněčné stěny z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu. Kromě strukturních útvarů se v cytoplazmě kvasinek nacházejí zřetelná zrníčka rezervních látek. Mezi ostatní složky cytoplazmy patří ribozomy, ribonukleové kyseliny, enzymy, nukleosidy, meziprodukty metabolismu včetně některých vitaminů zásoby aminokyselin, některé anorganické ionty atd [6].

2.1.2.4 Jádro

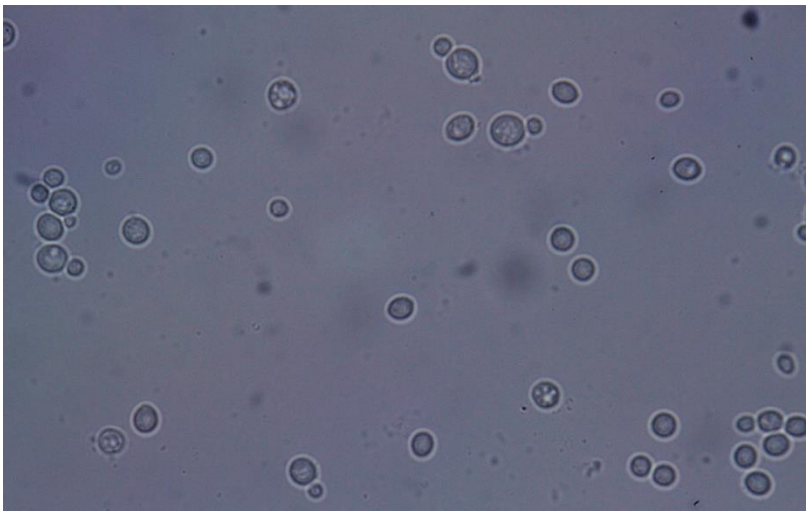
Jádro kvasinky je od cytoplazmy odděleno dvojitou jadernou membránou s velkými póry a nachází se zhruba uprostřed buňky. Jádro kvasinky, stejně jako jádra ostatních eukaryotických buněk, obsahuje genetický materiál v podobě DNA, která nese dědičnou informaci a řídí biologické procesy. V jádře jsou chromozomy, které nesou geny kódující proteiny a regulující buněčné funkce. Jádro obsahuje také nukleoly, kde probíhá syntéza ribozomální RNA (rRNA), která je nezbytná pro sestavení ribozomů a proces translace bílkovin. Důležitou funkcí jádra je regulace genové exprese a udržování integrity genomu [6].

2.1.3 Karotenogenní kvasinky

Karotenogenní kvasinky jsou nesourodou skupinou mikroskopických hub schopných produkovat velké množství karotenoidních pigmentů, což je příčinou jejich charakteristického červeného zbarvení. Hlavními pigmenty kvasinek jsou β-karoten, γ-karoten, torulen, torularhodin, astaxantin. Uvádí se, že za stresových podmínek dochází k akumulaci těchto karotenoidů. Syntéza karotenoidů je ovlivněna přístupem světla, kyslíku a teplotou kultivace. Nejdůležitějšími rody karotenogenních kvasinek jsou *Cystophilobasidium, Rhodotorula, Rhodosporidium* nebo *Sporidiobolus* [5].

2.1.3.1 Phaffia rhodozyma

Phaffia rhodozyma je bazidiomycetní růžová kvasinka, která se donedávna vyskytovala výhradně ve slizových tocích některých listnáčů na severní polokouli. Jedná se o vegetativní buňky, které mají elipsoidní tvar, vyskytují se jednotlivě, v párech a někdy v krátkých řetězcích a rozmnožují se enteroblastickým pučením. Syntetizují karotenoidní pigmenty, které dodávají buňkám červenou nebo lososově červenou barvu. *P. rhodozyma* patří do čeledi *Cryptococcaceae*. Literatura uvádí, že její biomasa obsahuje astaxantin v koncentraci přibližně 3 mg/g produktu. Díky vysokému obsahu astaxanthinu se *Phaffia rhodozyma může* používat jako zdroj barviva, které dodává obvykle bílému masu lososovitých ryb a korýšů chovaných v ohradě požadovanou oranžově červenou barvu (Obrázek 2) [7], [8].



Obrázek 2: Phaffia rhodozyma

2.2 Řasy

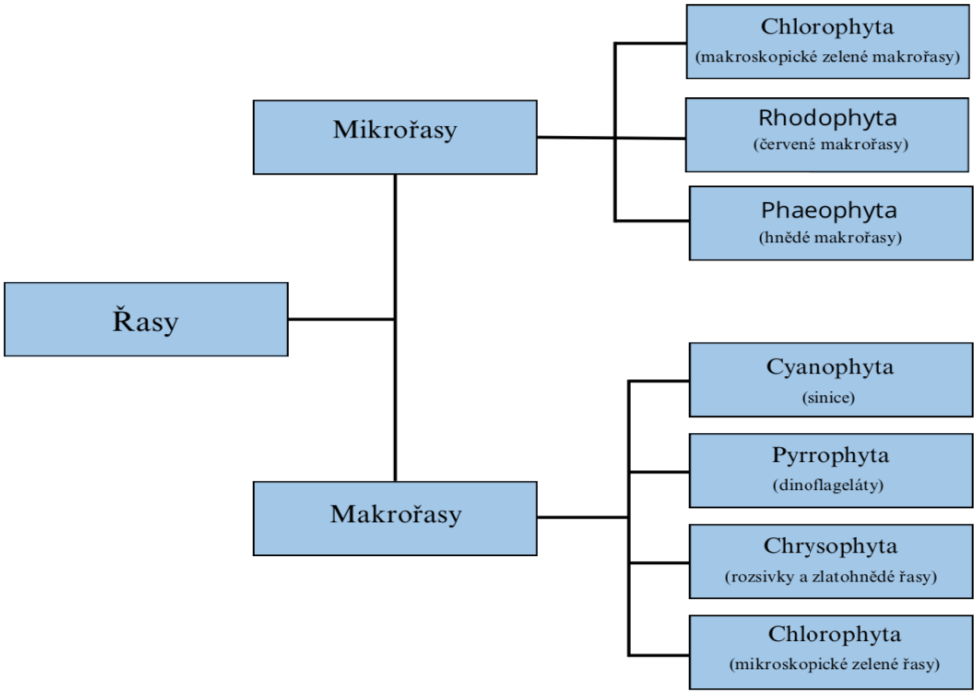
Řasy jsou skupinou převážně vodních, fotosyntetických a eukaryotických organismů (s výjimkou prokaryotických sinic), které nemají pravé kořeny, stonky, listy a specializované mnohobuněčné rozmnožovací struktury cévnatých rostlin. Jejich fotosyntetické pigmenty jsou také rozmanitější než u rostlin a jejich buňky mají vlastnosti, které se u rostlin a živočichů nevyskytují. Kromě toho, že řasy plní ekologickou úlohu producenta kyslíku a jsou potravní základnou téměř všech vodních živočichů, jsou hospodářsky významné jako zdroj ropy a jako zdroj potravin a některých farmaceutických a průmyslových výrobků pro člověka [9].

2.2.1 Klasifikace řas

Systémová klasifikace řas je od poloviny 19. století založena na složení jejich pigmentů. Do říše řas patří dvě hlavní podskupiny: makrořasy a mikrořasy (Obrázek 3) [9].

Makrořasy jsou makroskopické a skládají se ze tří hlavních skupin: *Chlorophyta* (makroskopické zelené makrořasy), *Rhodophyta* (červené makrořasy) a *Phaeophyta* (hnědé makrořasy). Jsou to necévnaté rostliny [9].

Mikrořasy jsou mikroskopické a řadíme je do skupin: *Cyanophyta*, *Pyrrophyta* (dinoflageláty), *Chrysophyta* (rozsivky a zlatohnědé řasy) a *Chlorophyta* (mikroskopické zelené řasy) [9].



Obrázek 3: Schéma systematické klasifikace řas

2.2.2 Stavba buňky řas

Řasová buňka má stavbu eukaryotické buňky, obsahuje jádro, cytoplazmu, membrány a organely. Jedním z hlavních rozdílů je přítomnost chloroplastů oproti buňkám kvasinek.

Tyto organely jsou specializované na proces fotosyntézy v buňkách zelených rostlin a řas. Obsahují pigment chlorofyl, který pohlcuje světlo a využívá ho ve fotosyntéze, kdy se světlo přeměňuje na chemickou energii. Buňka řas má jednoduchou morfologii, která se může u jednotlivých druhů lišit. Obecně se jedná o jednobuněčné nebo mnohobuněčné organismy. Mohou mít různé tvary a velikosti, od mikroskopických až po mnohobuněčné makroskopické formy. Buněčná stěna řas se skládá z celulózy, která obklopuje buňku a poskytuje jí tvar a ochranu. Buňka obsahuje také vakuoly, které slouží jako zásobárny látek. Jádro buňky řas obsahuje genetický materiál (DNA) potřebný k řízení buněčných funkcí a přenosu genetické informace. Některé řasy mají také pohyblivé struktury, jako jsou stopky nebo řasinky, které jim pomáhají pohybovat se ve vodě [10], [11], [12], [13].

2.2.3 Rozmnožování mikrořas

Řasy se mohou rozmnožovat vegetativně dělením jedné buňky, nepohlavně tvorbou pohyblivých spor nebo pohlavně spojením gamet. Vegetativní a nepohlavní způsoby rozmnožování umožňují stabilitu přizpůsobeného genotypu v rámci druhu z generace na generaci. Oba způsoby poskytují rychlý a výhodný způsob zvyšování počtu jedinců při současném omezení genetické variability. Pohlavní způsob zahrnuje plazmogamii (spojení buněk), karyogamii (spojení jader), spojení chromozomů/genů a meiózu, což vede ke genetické rekombinaci. Pohlavní rozmnožování umožňuje variabilitu, je ale nevýhodné potencionálním plýtváním nespářených gamet [14].

2.2.4 *Desmodesmus communis*

Desmodesmus je rod zelených řas patřící do skupiny *Chlorophyta*. Buňky rodu *Desmodesmus* mají charakteristický tvar, často připomínající písmena "W" nebo "M", který je výsledkem rozdělení buňky do dvou symetrických částí spojených střední částí. Tento tvar umožňuje buňkám spojovat se do řetězců nebo kolonií, které mohou tvořit zelené povlaky na hladině vody. *Desmodesmus* je součástí fytoplanktonu a hraje důležitou roli ve vodních ekosystémech jako zdroj potravy pro vodní organismy, anebo jako producent kyslíku (Obrázek 4) [12], [15]

Obrázek 4: Desmodesmus communis[16]

2.3 Významné metabolity produkované použitými mikroorganizmy

2.3.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou jednou z nejzajímavějších, nejhojnějších a nejrozšířenějších skupin lipofilních přírodních pigmentů, které jsou zodpovědné za červenou, oranžovou a žlutou barvu. Vyskytují se v rostlinách, řasách, houbách, mikroorganismech a živočiších [17].

Karotenoidy jsou přítomny ve všech fotosyntetických rostlinných tkáních jako fotochemicky aktivní složky plastidů zvaných chromoplasty. V současné době je známo asi 700 různých karotenoidních pigmentů, které se vyskytují v přírodě [18].

2.3.1.1 Chemická struktura karotenoidů

Většina karotenoidních látek patří mezi tetraterpenoidy. Jejich struktura obsahuje osm izoprenových jednotek. Většina karotenoidů obsahuje lineární uhlovodíkovou páteř C40 obsahující 3 až 15 konjugovaných dvojných vazeb. Počet dvojných vazeb do značné míry určuje spektrální vlastnosti daného karotenoidu, který obvykle absorbuje světlo v oblasti 400 až 500 nm [17], [18].

Karotenoidy lze rozdělit podle jejich chemické struktury na 2 základní skupiny:

Podle obsahu kyslíku:

- Karoteny – uhlovodíky tvořené lineárním uhlovodíkovým řetězcem (např. lykopen).
- Xantofyly – kyslíkaté sloučeniny odvozené jako biochemické oxidace karotenů. Jsou hlavními karotenoidy rostlin (např. lutein, kantaxantin).

Podle struktury řetězce:

- Acyklické – řetězec obsahuje lineární zakončení (lykopen).
- Monocyklické – řetězec obsahuje jeden konec zakončený pětičlenným či šestičlenným cyklem.
- Dicyklické – řetězec obsahuje 2 cykly (β-karoten) [18].

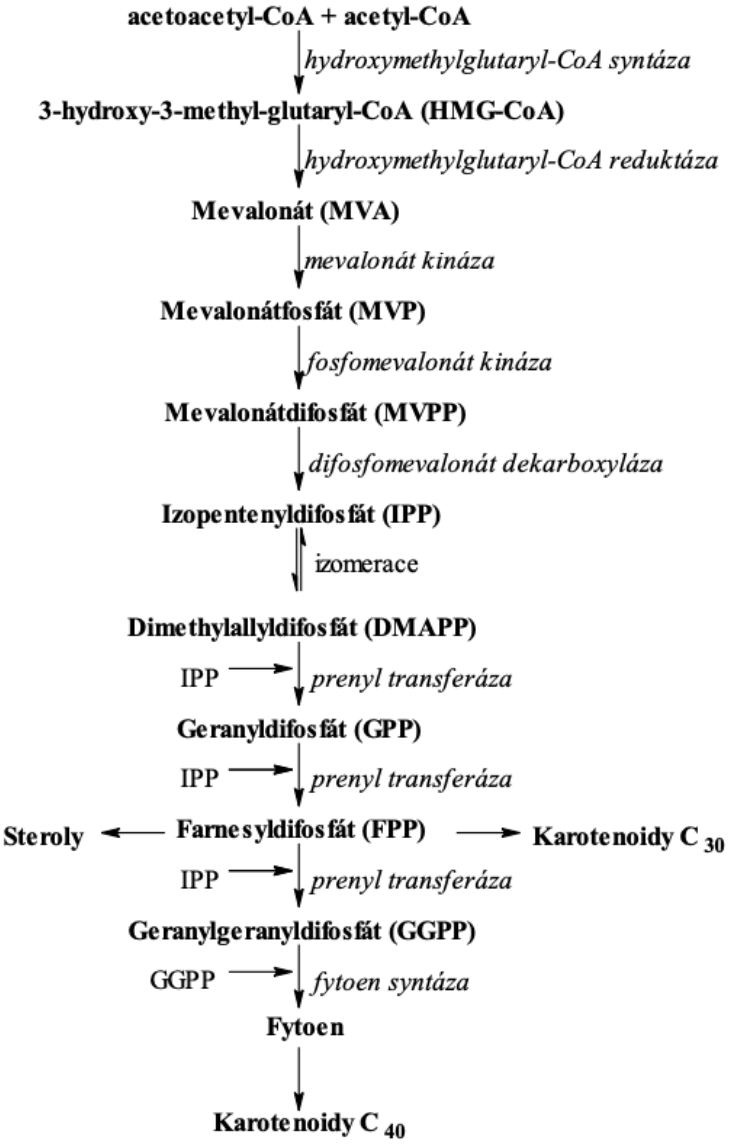
2.3.1.2 Biosyntéza karotenoidů

Biosyntéza karotenoidů obvykle zahrnuje tři hlavní fáze:

Začíná přeměnou acetyl-CoA na 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA), kterou katalyzuje HMG-CoA syntáza. Poté se z HMG-CoA tvoří kyselina mevalonová (MVA), což je první krok v biosyntetické dráze terpenoidů [19].

Poté se MVA přeměňuje na isopentenylpyrofosfát (IPP) v důsledku série reakcí, které zahrnují dvojitou fosforylaci kinázou s následnou dekarboxylaci na IPP. IPP se následně isom erizuje na dimethylallylpyrofosfát (DMAPP) a tři molekuly IPP se postupně připojují k DMAPP. Tyto reakce katalyzuje prenyltransferáza, čímž vzniká spojení C20-geranylgeranylpyrofosfát (GGPP). Kondenzace dvou molekul GGPP vede k fytoenu, který je následně desaturován na lykopén. Jelikož lykopen je zcela trans-vazebný, isomerizace první nebo druhé dvojné vazby fytoénu musí probíhat ve stejném procesu desaturace. [19].

Lykopen, hlavní produkt, podléhá dalším metabolickým reakcím, jako je cyklizace, hydroxylace a oxidace, jejichž výsledkem je tvorba β-karotenu, γ-karotenu, torulenu, torularhodinu a astaxanthinu. Tyto reakce určují konečnou strukturu a vlastnosti karotenoidů [19].
Biosyntéza karotenoidů tedy zahrnuje složité metabolické dráhy, jejichž výsledkem je tvorba různých typů karotenoidů (Obrázek 5) [19].



Obrázek 5: Schéma syntézy karotenoidů [20]

2.3.2 Lipidy

Lipidy jsou heterogenní skupina organických látek, které vykazují nízkou rozpustnost ve vodě, zatímco jsou snadno rozpustné v organických rozpouštědlech. Zahrnují látky, jako jsou tuky, oleje, vosky a steroidy [21].

Podle funkce je lze rozdělit na:

a. Zásobní lipidy jsou jednou z hlavních zásobáren chemické energie.
b. Stavební lipidy mají v organismech funkci strukturní. Složené polární lipidy jsou součástí biologických membrán.
c. Ochranná tuková tkáň tepelně a, mechanicky izoluje.
d. Regulační steroidní hormony, eikosanoidy, vitaminy A, D, E a K [21].

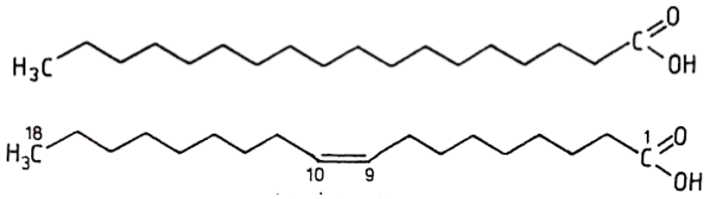
Podle chemického složení se lipidy dělí do tří hlavních skupin:

a. Homolipidy, což jsou sloučeniny mastných kyselin a alkoholů.
b. Heterolipidy, což jsou lipidy obsahující kromě mastných kyselin a alkoholu také další kovalentně vázané sloučeniny.
c. V komplexních lipidech jsou přítomny jak homolipidy, tak heterolipidy, ale kromě kovalentních vazeb jsou některé složky vázány různými fyzikálními interakcemi, jako jsou vodíkové vazby nebo hydrofobní interakce [22].

2.3.2.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny, jsou alifatické monokarboxylové kyseliny s dlouhými, až na výjimky nerozvětvenými, řetězci o 4 až 26 atomech uhlíku a jsou hlavní složkou molekul lipidů [22].
V přírodě se vyskytuje více než 50 různých mastných kyselin, ale kyseliny s více než 10-12 atomy uhlíku se obvykle ve volné formě v buňkách nevyskytují. Většina molekul přírodních mastných kyselin obsahuje sudý počet atomů uhlíku [23].

Mastné kyseliny mohou být nasycené nebo nenasycené.
Nasycenémastné kyseliny jsou převážně tuhé a nejběžnějšími zástupci jsou palmitová kyselina a stearová kyselina. Nenasycené mastné kyseliny jsou olejovité látky. Obsahují jednu nebo více dvojných vazeb přibližně v polovině molekuly. Dvojné vazby jsou vždy v konfiguraci cis [23].

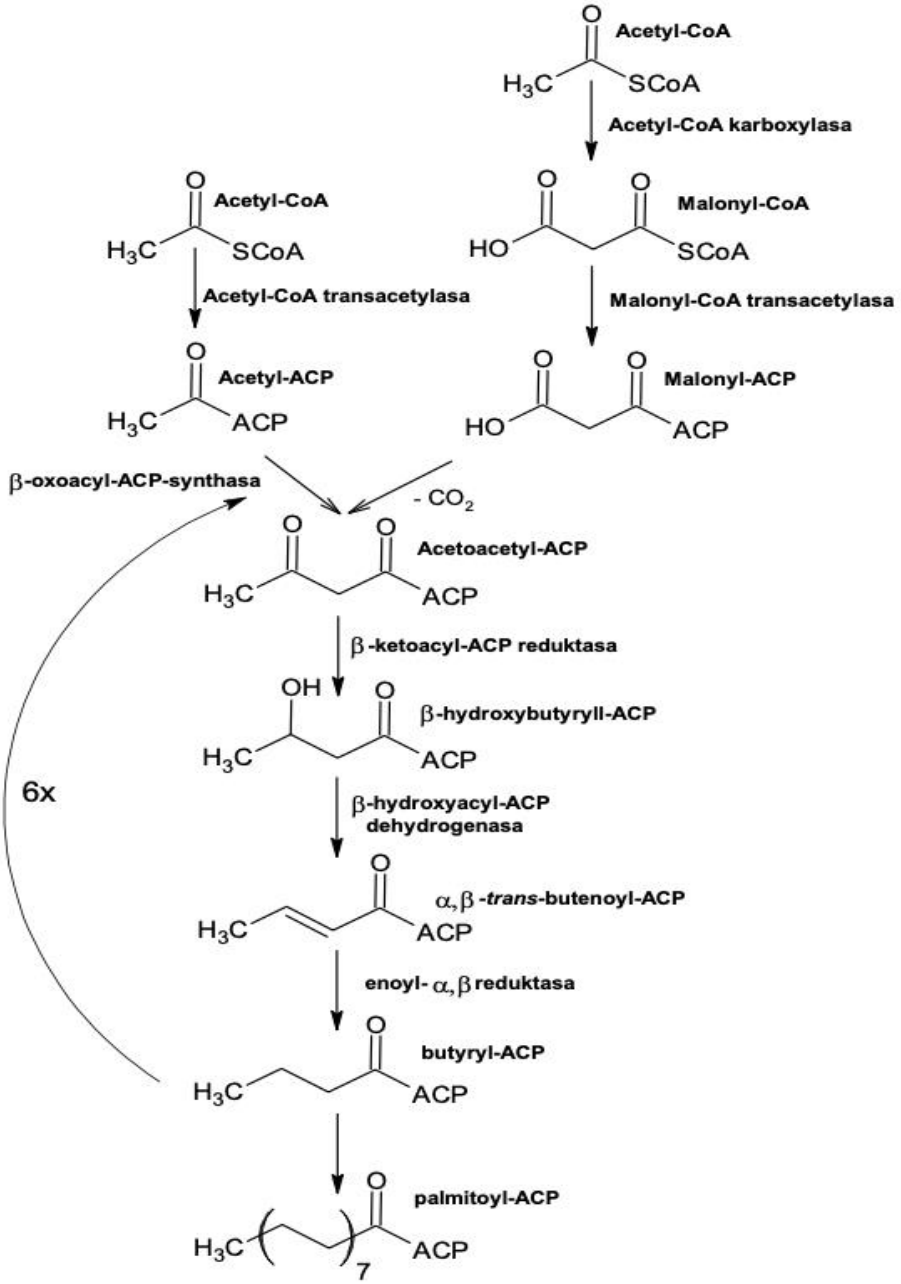


Obrázek 6: Strukturní vzorec palmitové kyseliny a kyseliny olejové [23]

2.3.2.2 Biosyntéza mastných kyselin

Biosyntéza mastných kyselin je lokalizována v cytosolu. Proces biosyntézy mastných kyselin začíná s acetyl-CoA jako výchozí látkou. Při pohledu na princip výroby mastných kyselin je zřejmé, že jde o redukci acetylu na $-CH_2-CH_2-$ zbytky.
Prvním krokem v cestě syntézy mastných kyselin je modifikace první molekuly acetyl-CoA na acetyl-ACP, která je katalyzována enzymem acetyl-CoA-transacetylázou.
Dalším krokem je karboxylace acetyl-CoA a prodloužení jeho řetězce o jeden uhlík na energeticky bohatší malonyl-CoA probíhá na enzymatickém komplexu ligázy acetyl-CoA karboxylázy.
Sled reakcí, jejichž výsledkem je syntéza malonyl-ACP z malonyl-CoA. Malonyl-ACP slouží

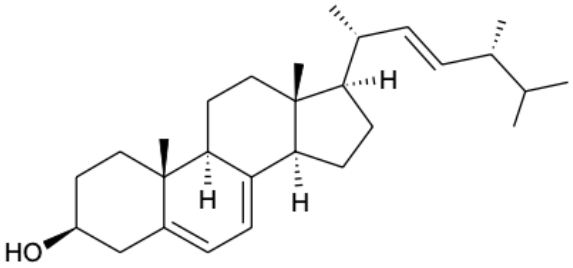
jako nosič substrátů a meziproduktů vzniklý v důsledku činnosti jednotlivých enzymů syntetázového komplexu.
Tento prodloužený acyl se přenese z cSH raménka ACP na thiolovou skupinu zbytku cysteinu jednoho z enzymů komplexu, b - oxoacylsynthetasy. Na uvolňená cSH raménka ACP se přípo jí další malonylová skupina a proběhne nový sled reakcí. Tyto cykly se opakují, až vznikne pa lmitolový zbytek, který se pak uvolní jako palmytoyl-CoA [23].



Obrázek 7: Biosyntéza mastných kyselin [24]

2.3.3 Ergosterol

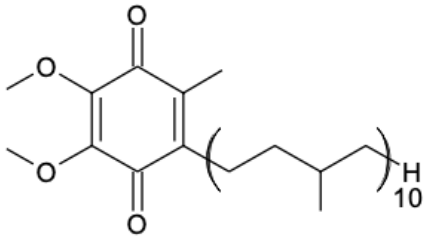
Jedná se o sterol, který se nachází v houbách, plísních a některých mikroorganismech.
Nachází se v buněčných stěnách a hraje klíčovou roli v udržování funkce lipidické membrány. Jeho přítomnost ovlivňuje permeabilitu buněčné membrány a aktivitu membránových enzymů. Také je přítomen v cytosolu, kde má klíčovou úlohu v metabolických procesech.
Ergosterol má fyziologickou roli u kvasinek, protože se účastní regulace proteinkinázy, která je nezbytná pro spuštění procesu růstu kvasinek. V čistém stavu se ergosterol vyskytuje jako bílá krystalická látka. Je silně rozpustný v tucích, zatímco téměř nerozpustný ve vodě. Při hydrolýze v alkalickém prostředí nevytváří vodný produkt, což jej odlišuje od lipidů, které podléhají zmýdelnění.
Ergosterol jako hlavní steroid hub a některých mikroorganismů lze využít k jejich detekci. Mezi jinými vlastnostmi má ergosterol pozitivní dopad na lidské zdraví tím, že se po ozářením přeměňuje na vitamin D2 [25].



Obrázek 8: Strukturní vzorec ergosterolu [24]

2.3.4 Ubichinon

Ubichinon, také známý jako koenzym Q10 nebo jen Q10, je tukem rozpustná vitaminu-podobná látka, která hraje klíčovou roli v procesu oxidační fosforylace v buňkách těla. Skládá se z izoprenoidních bloků spojených s chinonovou hlavní skupinou, která obsahuje dvě funkční skupiny: karbonylovou a hydroxylovou.
Ubichinon chrání buněčné membrány a nízko-lipidové lipoproteiny séra před oxidací lipidů a také chrání mitochondriální membránové proteiny a DNA před poškozením způsobeným oxidačním působením volných radikálů. Taky účinkuje jako součást mitochondriálního dýchacího řetězce a jako antioxidant ve své zredukované formě - ubichinol.
Ubichinon může regenerovat vitamin E z jeho oxidované formy, což zvyšuje jeho antioxidační vlastnosti [23], [26].

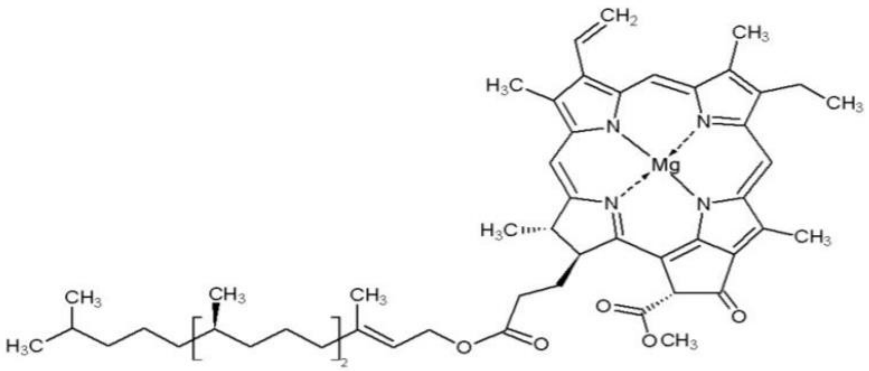


Obrázek 9: Strukturní vzorec ubichinonu [24]

2.3.5 Chlorofyl

Chloroplasty obsahují různé fotosyntetické pigmenty, z nichž nejdůležitější je chlorofyl, Chlorofyl existuje ve čtyřech různých formách: chlorofyl a, chlorofyl b, chlorofyl c a

chlorofyl d. Tyto zelené pigmenty jsou umístěny v tylakoidech, a jejich molekuly obsahují porfyrinový kruh s centrálním atomem hořčíku. Chlorofyl a je hlavním fotosyntetickým pigmentem ve všech skupinách řas [27].



Obrázek 10*: Strukturní vzorec chlorofylu α [27]*

2.3.5.1 Biosyntéza chlorofylu

Biosyntéza chlorofylu je složitý proces, který probíhá v chloroplastech.
Hlavní kroky biosyntézy chlorofylu:

Syntéza aminokyselin: Proces začíná syntézou aminokyselin, jako je glycin, aspartát a glutamát, které se následně spojují a vytvářejí další molekuly.
Přeměna na kyselinu δ-aminolevulinovou (δ-ALA): Aminokyseliny se spojují za vzniku kyseliny delta-aminolevulové (δ-ALA), prvního stabilního prekurzoru chlorofylu.
Syntéza porfyrinů: Několik molekul δ-ALA se spojí a projde cyklickými reakcemi za vzniku porfyrinu, jako je protoporfyrin IX.
Přidání hořčíku a postranních řetězců fytolu: Protoporfyrin IX se spojí s hořčíkem za vzniku hořečnatého protoporfyrinu IX. Poté se přidají postranní řetězce fytolu a kondenzují s protoporfyrinem za vzniku chlorofylu nebo bakteriochlorofylu.
Chlorofyl nebo bakteriochlorofyl procházejí řadou strukturních a funkčních změn, jako je přidání fytolových a hydroxylových skupin.
Chlorofyl se integruje do tylakoidů a vytváří strukturu zvanou chlorosom, v níž probíhá fotosyntéza [28].

2.4 Odpadní substráty

2.4.1 Fritovací olej

Fritovací olej je nejčastěji používaný k přípravě pokrmů ve fritéze nebo ke smažení. Jako fritovací olej se běžně používají rostlinné oleje, například slunečnicový, kukuřičný, sójový, řepkový a palmový. Během spalování dochází k ztrátě mnoha cenných látek, které nelze využít v potravinářském průmyslu. Tyto odpadní látky mohou být však využívány v biotechnologickém průmyslu jako zdroj uhlíku pro kvasinkovou kultivaci [29].

2.4.2 Kávový olej

Káva je jedním z nejoblíbenějších nápojů na světě a každoročně se vyprodukuje obrovské množství odpadu, které dosahuje 6 milionů tun. Proces výroby instantních kávových nápojů zahrnuje extrakci, při níž vzniká pevná frakce známá jako kávová sedlina. Ta se obvykle

používá jako palivo pro průmyslová topidla, ale nyní se začíná využívat i v biotechnologiích, protože obsahuje cenný kávový olej.
Tento olej se z kávové sedliny získává pomocí nepolárních rozpouštědel. Vyznačuje se vysokým obsahem triacylglycerolů, včetně mono- a polynenasycených mastných kyselin, a je také významným zdrojem vitaminu E [30], [31].

2.4.3 Lihový odpad

Lihový odpad je vedlejším produktem průmyslové výroby lihu, jako je výroba tvrdého lihu, bioetanolu nebo průmyslového lihu. Obsahuje organické zbytky a příměsi z fermentovaných surovin, jako jsou obiloviny, cukrová třtina nebo brambory. Tento odpadní materiál obsahuje velké množství organických látek, převážně bílkovin a lipidů, a je bohatý na vápník, dusík, draslík a fosfor [32].

2.4.4 Alkoholy

Alkohol může sloužit jako zdroj energie pro mikroorganismy během procesu kvašení nebo aerobní respirace. Mikroorganismy, jako jsou kvasinky nebo bakterie, mohou využívat alkohol, jako substrát pro produkci energie. V důsledku tohoto procesu se alkohol rozkládá na jednodušší uhlíkaté molekuly, což je doprovázeno uvolněním energie ve formě ATP, což je hlavní zdroj energie pro buněčné procesy [18], [21], [22].

2.4.5 Glukosa

Glukosa je jednoduchý cukr, který slouží jako hlavní zdroj energie pro živé organismy. Tento sacharidový monomer hraje důležitou roli v buněčném metabolismu. Glukóza se nachází v mnoha potravinách, jako je ovoce, zelenina a med, a tvoří důležitou součást lidské stravy. Využívá se také v biochemických procesech k syntéze dalších důležitých molekul, včetně aminokyselin a nukleových kyselin [23].

2.4.6 Melasa

Kapalný produkt s vysokým obsahem sacharózy přibližně 50 %, získaný při výrobě sacharózy z cukrové řepy nebo cukrové třtiny. Tento produkt je bohatým zdrojem živin pro mikroorganismy, ale má nedostatečný obsah dusíku a fosforu, které jsou nezbytné pro jejich růst. Proto je nutné tyto minerální látky přidat do média v jiné formě [33].

2.4.7 Glycerol

Odpadní glycerol je produkt, který vzniká při výrobě bionafty nebo jiných produktů obsahujících triglyceridy. Některé alternativní způsoby využití glycerolu jsou substráty pro fermentační procesy nebo pro výrobu biosurfaktantů. Další alternativní využití glycerolu je jako substrát pro kultivaci oleogenních kvasinek. Oleogenní kvasinky mají schopnost vytvářet a hromadit lipidy. Pokud jsou pěstovány na glycerolu mají krátkou generační dobu. Glycerol z výroby bionafty obsahuje makroživiny, jako je vápník, draslík, hořčík, síra a sodík [34].

2.5 Kultivace mikroogranismů

Růst mikroorganismů v laboratorních podmínkách vyžaduje optimalizaci prostředí pro maximální růst kultury a produkci biomasy a dalších metabolitů.

Rychlost růstu mikroorganismů a jejich vlastností fyziologických se ovlivňuje podmínkami kultivace, především množstvím živin, charakterem živin a podmínkami fyzikálními. Laboratorní kultury se pěstují v speciálně připravených kapalných médiích, která poskytují potřebné organické a anorganické živiny pro buněčný růst. Kultivace kvasinek může býtprováděna také v bioreaktorech, které umožňují pěstování kvasinkových buněk ve velkém měřítku [35].

2.6 Kokultivace mikroogranismů

Kokultivace dvou mikroorganismů může vést k vyšší koncentraci biomasy a produkci lipidů ve srovnání s čistými kulturami.

Možné kombinace společné kultivace mohou zahrnovat následující dvojice mikroorganismů:

- dva různé heterotrofy
- dva různé autotrofy
- heterotrofy a autotrofy

Nejperspektivnější je kokultivace heterotrofních a autotrofních organismů. Společná kultivace červených kvasinek a mikrořas má využít přirozené výměny plynů mezi těmito mikroorganismy k udržení jejich životní aktivity. Mikrořasy produkují kyslík, který podporuje růst kvasinek, zatímco kvasinky uvolňují CO2, který podporuje růst řas. Navíc při lýze buněk vznikají stopové prvky, které mohou oba mikroorganismy využít pro svůj růst. Tento symbiotický efekt kokultivace umožňuje maximální růst biomasy a vysoké výtěžky lipidů ve srovnání s jinými kultivačními metodami [36], [37], [38].

2.7 Metody analýzy buněčných složek

2.7.1 Chromatografie

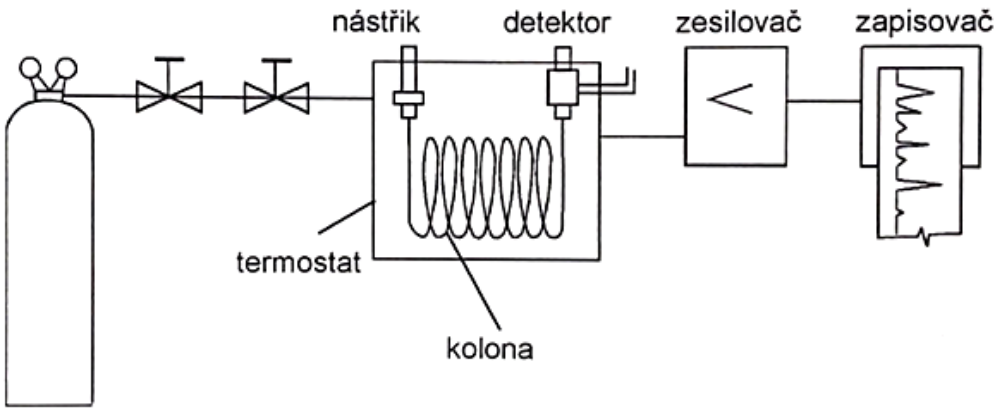
Chromatografie představuje jednu z hlavních analytických separačních technik, která umožňuje rozdělování, identifikaci a kvantifikaci širokého spektra organických i anorganických látek [39].

V této bakalářské práci byly využity metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a plynové chromatografie (GC).

2.7.2 Plynová chromatografie

Metoda plynové chromatografie se využívá k oddělování plynů a par těkavých látek pomocí chromatografické kolony, kde jako mobilní fáze slouží inertní plyn. Vzorek v plynné fázi projde kolonou obsahující stacionární fázi, která odděluje složky vzorku, a za kolonou je detektor, který registruje jednotlivé eluční zóny. Metoda využívá rozdělení koncentrace analytu mezi stacionární a mobilní fází na základě adsorpce a rozpouštění, přičemž se předpokládá, že toto rozdělení je rovnovážné. Plynová chromatografie využívá tlakový spád pro pohyb mobilní fáze, zatímco stacionární fáze je umístěna v koloně. Tato technika je účinná pro analýzu těkavých látek a patří mezi nejčastěji používané metody kvantitativní a kvalitativní analýzy, při kterých

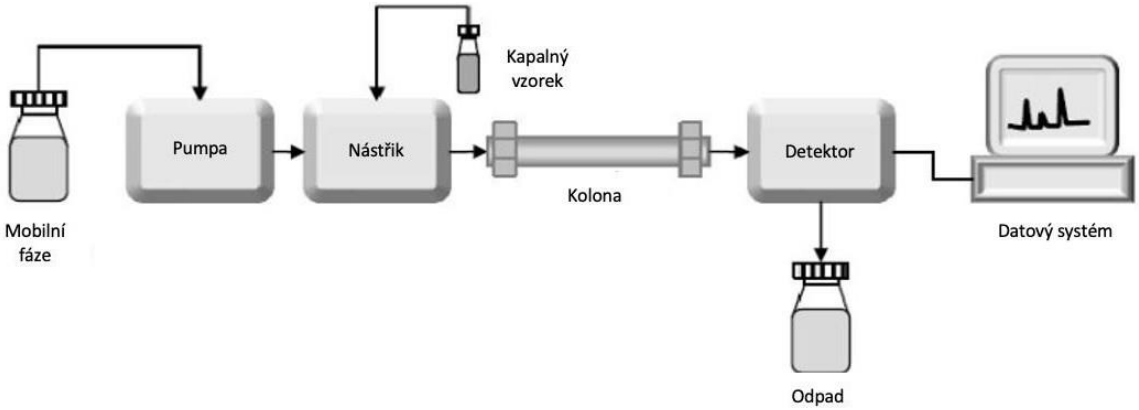
se složky vzorku oddělují na základě jejich distribuce mezi plynnou mobilní a kapalnou nebo pevnou stacionární fází [39], [40], [41], [42], [43].



Obrázek 11: Schéma plynového chromatografu [39]

2.7.3 HPLC (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

Kapalinová chromatografie je analytická metoda využívající kapalnou mobilní fázi k separaci složek vzorku unášených chromatografickou kolonou. Hlavní výhodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) je její široké spektrum použití, umožňující analýzu iontů, polárních i nepolárních látek, včetně těžkých, tepelně nestabilních a vysokomolekulárních sloučenin. Oproti plynné chromatografii může HPLC ovlivňovat separaci složením mobilní fáze, která je aktivní a má významný podíl na procesu oddělování. V HPLC je stacionární fází kapalina nebo tuhá látka zakotvená na tuhém nosiči, umístěná v chromatografické koloně. Vysoká účinnost separace je dosahována díky použití kolon s malou a dobře definovanou velikostí částic stacionární fáze, což zajišťuje vysokou hustotu a homogenitu náplně, a tedy i velký hydrodynamický odpor [40], [41], [42], [44].



Obrázek 12: Schéma HPLC [45]

3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem práce je optimalizace kokultivace kvasinky *Phaffia rhodozyma* s vybranými kmeny autotrofních mikroorganismů. Dosažení cíle bylo řízeno následujícími body:

- Přehledná literární rešerše zaměřená na biotechnologii vybrané karotenogenní kvasinky a mikrořas.
- Kultivace kvasinky *Phaffia rhodozyma* na různých zdrojích uhlíku.
- Nalezení nejvhodnějších zdrojů a optimalizace kultivačních podmínek na médiích s těmito zdroji uhlíku.
- Provedení screeningových kultivací s využitím biologického stresu.
- Analýza získané biomasy.
- Vyhodnocení výsledků.

4 EXPEREMENTALNI ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité ke kultivaci mikroorganismů

Kvasničný autolyzát, Himedia (Indie)
Pepton z kaseinu, Roth (SRN)
Agar-Agar, Roth (SRN)
D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner, S.r.o. (ČR)
Glycerol 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 p.a., Lach-ner (Česká Republika)
Hydrogenfosforečnan draselný, Sigma-Aldrich (SRN)
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

Methanol pro HPLC, Penta (ČR)
Kyselina heptadekanová pro GC, Sigma-Aldrich (SRN)
Hexan pro GC, Penta (ČR)
Acetonitril pro HPLC, Penta (ČR)
Ethylacetát pro HPLC, Penta (ČR)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Penta (Česká republika)
Chlorofom p.a. Penta (Česká Republika)
Heptadekanová kyselina, Sigma-Aldrich (SRN)
Kyselina sírová 96 %, Lach-ner (Česká Republika)
Hydroxid sodný, Lach-ner (Česká Republika)
HCl, Penta (Česká republika)

4.2 Použité přístroje a pomůcky

4.2.1 Přístrojová technika a pomůcky pro kultivaci mikroorganismů

Předvážky Scout, Ohaus
Analytické váhy Boeco
Autokláv Systec
Laminární box Air Stream ESCO Class II BSC
Skříňová třepačka ZWYR-D2401, Labwirt

Třepačka WiseShake SHR-2D, Witeg
Mikroskop L II ooA, Intraco Micro
GKB Color Digital CCD kamera
Lucia Image active 5.0, Laboratory Imaging spol. s r.o.
Centrifuga Z 36 HK, Hermle
Centrifuga MIKRO 120, Hettich
Lyofilizátor FreeZone 4.5 l Freeze Dry Systém, Labconco
Vakuová pumpa k lyofilizátoru Vakuumbrand
Homogenizátor BeadBug, Benchmark Scientific
Vortex Fixed Speed Vortex Mixer, VXMNFS, Ohaus
Vortex Genie 2, P-Lab
Termoblok Dry Block Heater, Ohaus

4.2.2 Přístroje a pomůcky použité pro izolaci a analýzu metabolitů

Stuart Block Heater SBH200D (UK)

HPLC/PDA sestava:

- Sestava Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fischer, USA)
- DAD detektorem řady Vanquish (Thermo Fischer, USA)
- Kolona Kinetex C18 EVO 150 mm, 4,6 mm, 2,6 μm (Phenomenex)
- Držák předkolony - KJ0 - 4282, ECOM (ČR)
- Předkolona - C18, AJ0 - 4287, Phenomenex

GC/FID sestava:

- TRACE 1300 TM (Thermo Fischer, USA)
- Kapilární kolona LION GC FAME, 30m, 0,25 mm, 0,20 μm (Phenomenex)

Vyhodnocovací software Chromeleon 7.2

4.3 Použité kmeny řas a mikrořas

Phaffia rhodozyma CCY 77-1
Desmodesmus communis CCALA 464

4.4 Kultivace mikroorganismů

4.4.1 Vnější podmínky

Použitá kvasinka je zařazena mezi mikroorganismy, které vyžadují kyslík pro svůj růst. Kultivační proces probíhal při laboratorní teplotě, za přítomnosti denního světla a míchání na reciprokých třepačkách, aby byl zajištěn přístup kyslíku. Karotenogenní kvasinky rodu *Phaffia rhodozyma* byly kultivovány v BBM médiu, které obsahovalo různé zdroje uhlíku a dusíku.

4.4.2 Inokulum I a Inokulum II kvasinkových kultur

Kmen kvasinky byl kultivovány metodou dvojité inokulace. Před začátkem každé kultivace bylo připraveno univerzální živné médium, v tomto případě YPD.

Médium YPD bylo připraveno a sterilizováno po dobu 40 minut v Erlenmeyerových baňkách ve vysokotlakých hrncích s otevřeným ventilem na vařiči nastaveném na 140 °C. Kultivace byla vždy dvoufázová pomocí inokula I a inokula II. Inokulum I bylo připraveno do 250 ml Erlenmayerových baňek o objemu 50 ml, zatímco objem inokula II činil 100 ml a byl připraven do 500 ml Ernelmeyerových baněk. Kultura z agarové misky byla přenesena do baněk sterilní kličkou. Inokulace byla provedena v poměru jedna klička kultury na 10 ml inokulačního média. Inokulum I bylo kultivováno při laboratorní teplotě za stálého osvětlení na reciproční třepačce. Po 24 hodinách bylo Inokulum I přeneseno do Inokula II v objemovém poměru 1:5 kvasinkové kultury: čerstvé médium. Složení inokulačního média YPD je uvedeno v následující tabulce 1.

Tabulka 1: Složení YPD media

Složka	**Množství**
Glycerol	20 g
Kvasničný autolyzát	10 g
Pepton	20 g
Voda (vodovodní)	1000 ml

4.4.3 Produkční média

Dalším krokem v procesu kultivace bylo přemístění kvasinek z inokula II do připravených produkčních médií. Pro kultivace kvasinek byl použit hlavní typ média, a to BBM médium. Tento typ média byl zvolen, aby bylo zjištěno, jak efektivně v tomto médiu rostou kvasinky, aby bylo možné na tomto médiu provést kokultivace kvasinek a mikrořas. Pro přípravu BBM média byly využity složky podle Tabulky 3 a Tabulky 4. Kultivace produkčního média o objemu 50 ml probíhala v 250ml Erlenmeyerových baňkách. *Phaffia rhodozyma* z inokula II byla přeočkována do produkčních médií v objemovém poměru 1:5 ve sterilním prostředí očkovacího boxu. Produkční média byly obohacené složkami odpadních substrátu. Kultivace produkčního média probíhala 120 hod.

Tabulka 2 Použité odpadní substráty

Množství [ml]			
Použité zdroje uhlíku	**1. experement**	**2.experiment**	**3.experiment**
Glukóza	2,3 g	2,3 g	2,3 g
Glycerol	2,3 g	2,3 g	2,3 g
Kávový olej	1 ml	2 ml	10 ml
Fritovací olej	1 ml	2 ml	10 ml
Isopropanol	5 ml	10 ml	10 ml
Ethanol	5 ml	10 ml	10 ml
Methanol	5 ml	10 ml	10 ml
Melasa	5 ml	10 ml	10 ml
Lihový odpad	5 ml	10 ml	10 ml

Tabulka 3: Složení BBM média

Složka	**Zásobní roztok (g/l dH2O)**	**Množství na 1 l**
$NaNO_3$	25,00	10
$CaCl_2 \cdot 2H2O$	2,50	10
$MgSO_4 \cdot 7H2O$	7,50	10
K_2HPO_4	7,50	10
KH_2PO_4	17,50	10
NaCl	2,50	10
EDTA	-	1
Acidified iron	-	1
H_3BO_3	11,42	1
Trace metals	-	1

Tabulka 4: Složené částí BBM média

Roztok	Složka	Množství (g/l)
EDTA	EDTA	50,00
	KOH	31,00
Acidified iron	$FeSO_4 \cdot 7H2O$	4,98
	H_2SO_4 (96 %)	1 ml
Trace metals	$ZnSO_4 \cdot 7H2O$	8,82
	$MnCl_2 \cdot 4H2O$	1,44
	MoO_3	0,71
	$CuSO_4 \cdot 5H2O$	1,57
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H2O$	0,49

4.4.4 Kokultivace kvasinek a mikrořas

Jako produkční médium pro kokultivaci kvasinek a mikrořas bylo zvolené BBM médium. Pro kokultivace byly připraveny produkční média o objemu 50 ml v 250 Erlenmeyerových baňkách. Mikrořasa Desmodesmus communis byla do kultivačních médií zaočkována při dostatečné optické hustotě při 680 nm (0,15). Phaffia rhodozyma z inokula II byla přeočkována do produkčních médií v objemovém poměru 1:5 ve sterilním prostředí očkovacího boxu. Produkční média byly obohacené složkami odpadních substrátů. V experimentu byly jako složky odpadního substrátu použity isopropanol, kávový olej, fritovací olej. Množství použitých odpadníchsubstrátu je uvedeno v tabulce 5. Kontrolní baňka s mikrořasami byla kultivována na čistém BBM médiu bez přidané C složky. Kultivace produkčního média probíhala 120 hod. Schéma kokultivačních experimentů je uvedena v tabulce 6.

Tabulka 5: Množství použitých odpadních substrátu

Použité odpadní substráty	**Množství g/l**
Kávový olej	0,04
Isopropanol 50%	0,04
Fritovací olej	0,04

Tabulka 6: Schéma kokultivačních experimentů

Mikroorganismy	**Použité zdroje uhlíku**
Kvasinka	Glycerol
Kvasinka	Odpadní substrát
Řasa	-
Řasa	Odpadní substrát
Kokultivace	Glycerol
Kokultivace	Odpadní substrát

4.5 Zpracování biomasy

4.5.1 Zpracování vzorků po kultivaci

Po uplynutí pětidenního období kultivace, byla z média odebrána kultura o objemu 40 ml, která byla následně přenesena do 50 ml plastové zkumavky. Tato kultura byla poté centrifugována při 7000 ot/min po dobu 4 minut, a supernatant byl následně odstraněn. K biomase bylo přidáno 15 ml destilované vody, obsah zkumavky byl rozsuspenderován na vortexu, a kultura byla přesunuta do 15 ml plastových zkumavek. Vzorky byly opět centrifugovány, tentokrát při 4500 otáčkách za minutu po dobu 4 minut. Poté byl supernatant odstraněn a plastové zkumavky s biomasou byly umístěny do mrazáku při teplotě -80 °C. Zkumavky se zmraženou biomasou byly vloženy do lyofilizátoru a lyofilizovány po dobu 24 hodin.

4.5.2 Stanovení biomasy

Pro gravimetrické stanovení biomasy z narostlých produkčních médii bylo odpipetovano 1 ml kultury do 2 ml Eppendorf zkumavky. Zkumavky s takto odebranými vzorky byly odstředěny při 1400 ot/min po dobu 3 min. Supernatant byl odlit a obsah zkumavky byl promyt 1 ml destilované vody, rozsuspendován na vortexu a znovu odstředěn při stejném nasatavení, supernatant byl znovu odlit. Zkumavky s biomasou byly zmražené při teplotě -80 °C. Vzorky se zmraženou biomasou byly vloženy do lyofilizátoru po dobu 24 hodin. Takto přiravená biomasa byla zvážena na analytických vahách a a přepočítána na hodnotu biomasy g/l.

4.5.3 Extrakce pro HPLC analýzu

Po lyofilizaci byla lyofilizovaná biomasa připravena k analýze na kapalinové chromatografii (HPLC). Do 2 ml závitových plastových zkumavek bylo naváženo 15-20 mg biomasy za použití analytických vah. K odměřené biomase se bylo přidáno 1 ml destilované vody a vzorek byl 30 minut rehydratován, poté byl vzorek zcentrifugován při 14000 ot/min po dobu 2 minut a voda odlita do odpadu. Ke stočené biomase se přidaly skleněné kuličky a 1 ml p.a. methanolu HPLC kvality. Poté byly vzorky umístěny na dezintegrátor po dobu 1 min, kde bylo díky třepání a skleněným kuličkám dosaženo rozbití stěn buněčné biomasy a následné rozpuštění barviv v methanolu. Následně byl vzorek kvantitativně převeden do 15 ml centrifugační zkumavky za přídavku 2 ml chloroformu p.a. a na 15 min umístěn na multipoziční vortex. K protřepanému vzorku se přidaly 1 ml destilované vody a vzorek se byl zrentrifugovan při 3000 ot/min po dobu 1 minuty. Do 15 ml skleněné zkumavky byla odpipetována spodní chloroformová fáze. Chloroform byl odpařen za přívodu dusíku na termobloku při teplotě 45°C. Pevný zbytek po odpařování byl rozpuštěn v 1 ml směsi rozpouštědel HPLC kvality ethylacetát:acetonitril 2:1. Rozpuštěný vzorek byl přefiltrován přes PTFE filtr do 2 ml šroubovací vialky. Připravený vzorek byl umístěn na kapalinový chromatograf.

4.5.4 Analýza vzorků metodou HPLC

Analýza lipofilních pigmentů probíhala na sestavě Dionex UltiMate 3000 s DAD detektorem řady Vanquish od firmy Thermo Fisher. K separaci látek se využila kolona Kinetex C18 EVO o rozměrech 150 mm, 4,6 mm a 2,6 μm. Průtok byl zvolen na 1,2 ml/min při teplotě separace 25°C. Byla využita gradientová eluce s mobilními fázemi A a B. Mobilní fáze A obsahovala acetonitril, TrisHCl o ph 8 a methanol v poměru 84:14:2. Mobilní fáze B byla složena z methanolu a ethylacetátu v poměru 60:40.

Tabulka 7: Gradientová rampa pro analýzu barviv při HPLC

	Retenční čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
1	0,0	100	0
2	13,0	0	100
3	19,0	0	100
4	20,0	100	0
5	25,0	100	0

4.5.5 Transesterifikace a extrakce mastných kyselin pro GC

Po lyofilizaci byla vysušená biomasa připravena k analýze plynové chromatografie (GC). Do krympovacích vialek bylo odváženo na analytických vahách 8-18 mg lyofilizované biomasy a přidáno 1,8 ml transesterifikační směsi. Vzorek byl umístěn na termoblok vyhřátý na 85 °C po dobu 2 hodin. V tomto časovém úseku probíhala transesterifikace mastných kyselin. Obsah zkumavky se po vychladnutí byl kvantitativně převeden do 5 ml šroubovací vialky. Ke vzorku bylo přidáno 0,5 ml 0,05 M NaOH a 1 ml hexan GC kvality. Vialka byla umístěna na vortex, kde došlo k extrakci mastných kyselin do hexanu. Po dotřepání bylo z horní hexanové fáze do 2 ml šroubovací vialky odpipetovano 0,1 ml a následně bylo přidano 0,9 ml hexanu GC kvality. Připravený vzorek byl umístěn na plynový chromatogram.

Tabulka 8: Složení transesterifikační směsi

Složka	Kyselina sírová	Kyselina heptadekanová
Koncentrace	15 %	0,5 mg/ml
Rozpouštědlo	Methanol	

4.5.6 Analýza vzorků na GC

Plynová chromatografie byla použita k zjištění obsahu a složení mastných kyselin a tím i lipidů v biomase. Byl použit plynový chromatograf TRACE 1300 TM s automatickým dávkovačem a spliterem s nastaveným split poměrem 10. K detekci byl využit plamenový ionizační detektor. Separace probíhala na koloně LION GC FAME o rozměrech 30 m 0,25 mm a 0,2 µm. Objem dávkovaného vzorku byl 0,1 µl. Jako nosný plyn byl využit vodík o průtoku 0,5 ml/min. Vyhodnocení probíhalo pomocí metody inertního standartu a externí kalibrace pomocí standardů Supleco FAME 37 mix. Data získána pomocí programu Chromeleon byla převedena do programu Excel a vyhodnocena.

Tabulka 9: Teplotní program pro analýzu mastných kyselin a lipidů na GC

	Retenční čas (min)	Gradient (°C/min)	Teplota (°C)	Zadržení (min)
1	0,000	Start	-	-
2	1,000	0,0	80,0	1,0
3	5,000	15,0	140,0	0,0
4	21,667	3,0	190,0	0,0
5	25,667	25,0	260,0	1,0
6	25,467	Stop	-	-

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Kvasinky

Hlavním úkolem baňkových kultivací bylo nalezení nejvhodnějších zdrojů uhlíku pro kultivaci a optimalizace kultivačních podmínek na médiích s těmito zdroji uhlíku. V rámci této práce byl zvolen kmen kvasinky *Phaffia rhodozyma*. Kultivace kvasinky *Phaffia rhodozyma* probíhala po dobu 5 dnů a byla použita různá média, s různými zdroji uhlíku. Bylo rozhodující zjistit, jak efektivně kvasinky rostou na BBM médiu, které je nezbytné pro růst řas. Bez řasového média by nebylo možné provádět kokultivace kvasinek a řas, protože pro mikrořasy je esenciální.
Zpracování biomasy bylo provedeno podle postupu uvedeného v experimentální části. Dále byly analyzovány specifické metabolity pomocí techniky HPLC a GC. Celkové karotenoidy, ergosterol, ubichinon a lipidické pigmenty jako β-karoten, lykopen, torulen a torularhodin byly identifikovány a kvantifikovány pomocí HPLC. Pomocí GC bylo hodnoceno zastoupení a složení mastných kyselin ve vzorcích.

Tabulka 10: Zkratka použitých odpadních substrátů

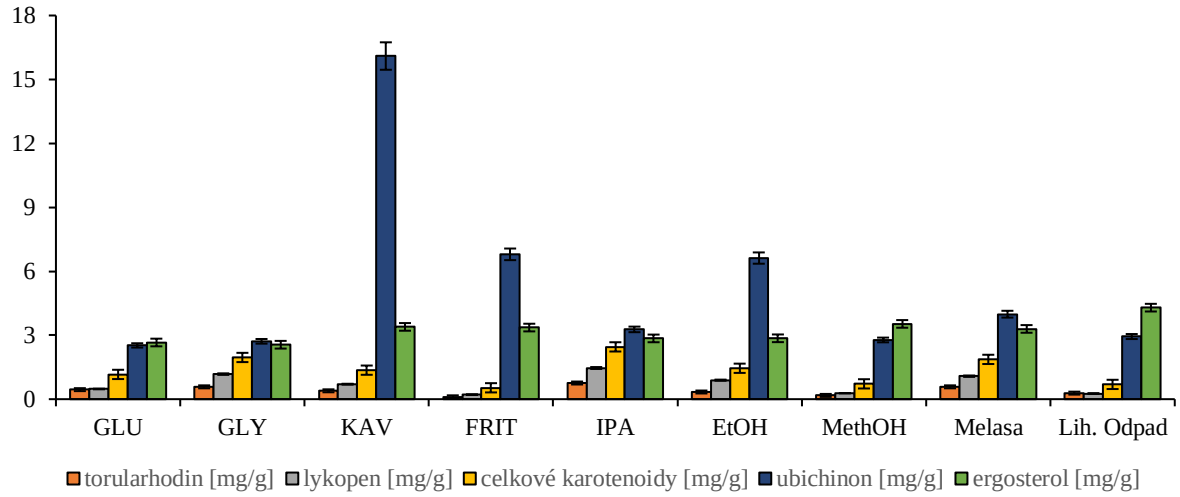
Použité odpadní substráty	Zkratka
Glukóza	GLU
Glycerol	GLY
Kávový olej	KAV
Fritovací olej	FRIT
Isopropanol	IPA
Ethanol	EtOH
Methanol	MethOH
Malasa	Melasa
Lihový odpad	Lih.Odpad

5.1.1 Primarní kultivace kmenu *Phaffia rhodozyma* na nejnižších testovaných koncentracích odpadních substrátů

Tabulka 11: Produkce biomasy kmena Phaffia rhodozyma na nejnižších testovaných koncentracích odpadních substrátů

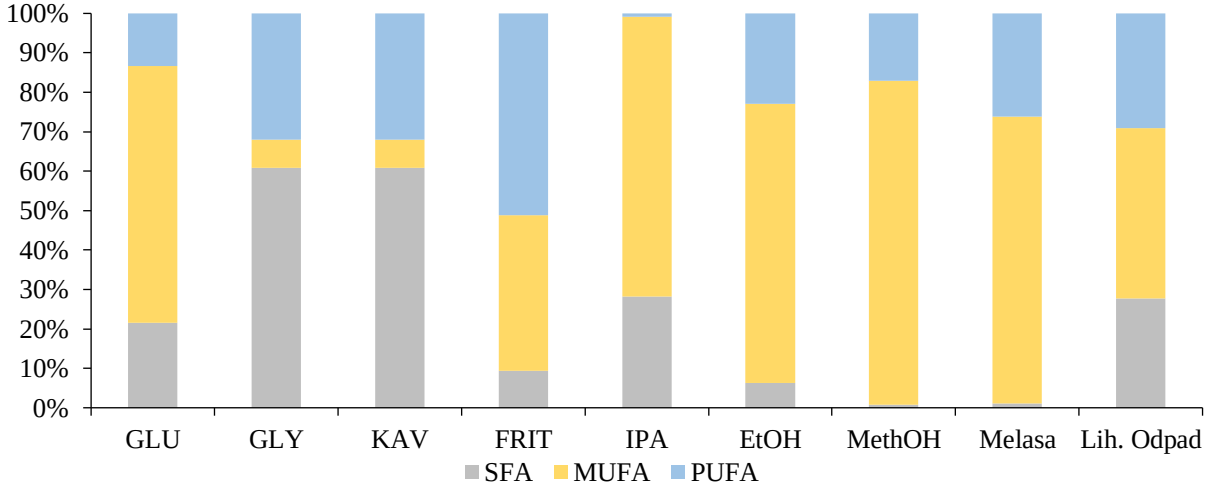
Použitý odpadní substrát	Produkce biomasy [g/l]
Glukóza	20,80 ± 1,04
Glycerol	20,50 ± 1,02
Kávový olej	15,30 ± 0,76
Fritovací olej	15,30 ± 0,76
Isopropanol	11,20 ± 0,56
Ethanol	8,90 ± 0,44
Methanol	9,70 ± 0,48
Malasa	10,20 ± 0,51
Lihový odpad	11,80 ± 0,59

V tomto experimentu probíhala kultivace kvasinky kmene *Phaffia rhodozyma* na nejnižších testovaných koncentracích odpadních substrátu, které jsou znázorněny v tabulce 2. Na základě dat uvedených na obrázku 13 lze posoudit, že v médiu s přídavkem kávového oleje došlo k nejvyšší produkci ubichinonu (16,1 ± 0,64 mg/g). Hodnota ergosterolu ve všech vzorcích je přibližně stejná, ale nejvyšší produkce ergosterolu (4,3 ± 0,21 mg/g) byla zaznamenána v médiu s lihovým odpadem. V médiu s přídavkem isopropanolu lze pozorovat nejvyšší hodnotu zastoupení celkových karotenoidů (2,5 ± 0,12 mg/g) a lykopenu (1,5 ± 0,07 mg/g).



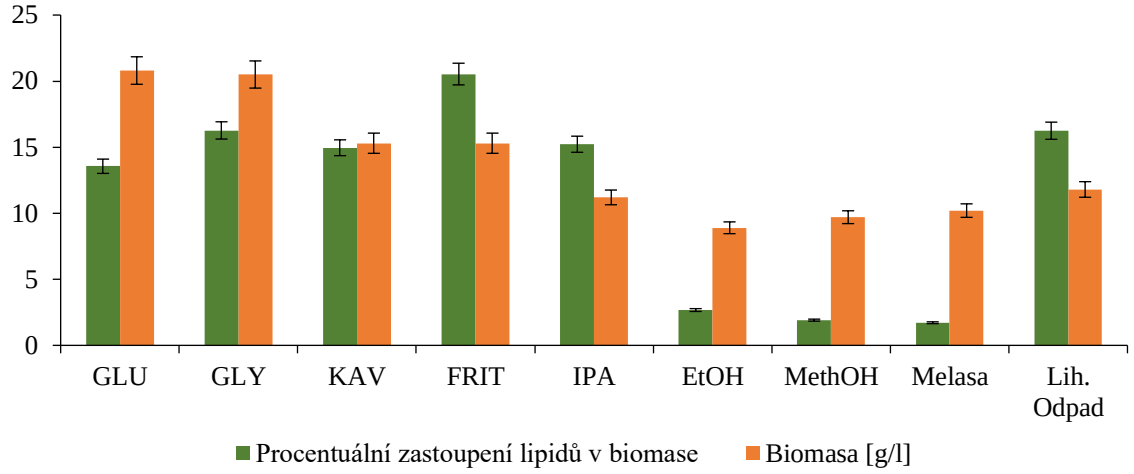
Obrázek 13: Produkce vybraných metabolitů pro kmen Phaffia rhodozyma na nejnižších testovaných koncentracích odpadních substrátů

Na obrázku 14 lze sledovat zastoupení jednotlivých typů mastných kyselin v biomase. Nejvyšší produkci SFA (nasycené mastné kyseliny) lze vidět v kontrolním glycerolovém médiu (60,89 %) a médiu s přídavkem kávového oleje (60,89 ±3,04 %). Naopak nejmenší produkci SFA vykazoval daný kmen kvasinek v médiu s methanolem (0,89 ± 0,04 %), který zároveň měl nejvyšší zastoupení MUFA (mononenasycené mastné kyseliny) (82,09 ± 4,01 %). Nejnižší hodnota zastoupení PUFA (polynenasycené mastné kyseliny) byla pozorována v médiu s ethanolem (0,84 ± 0,04 %), naopak nejvyšší zastoupení PUFA lze pozorovat v médiu s fritovacím olejem (51,19 ± 2,56 %).



Obrázek 14: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase kmene Phaffia rhodozyma

Obrázek 15 ukazuje procentuální zastoupení lipidů v biomase. Z grafu plyne, že největší produkci biomasy (20,8 ± 1,04 g/l) měl daný kmen v kontrolním glukózovém médiu. Zatímco nejmenší produkci biomasy (8,9 ± 0,44 g/l) měl v médiu s isopropanolem. Největší zastoupení lipidů (20,53 ± 1,02 %) měl tento kmen v médiu s přídavkem fritovacího oleje. Naopak nejmenší hodnoty vykazoval kmen v médiu s melasou.



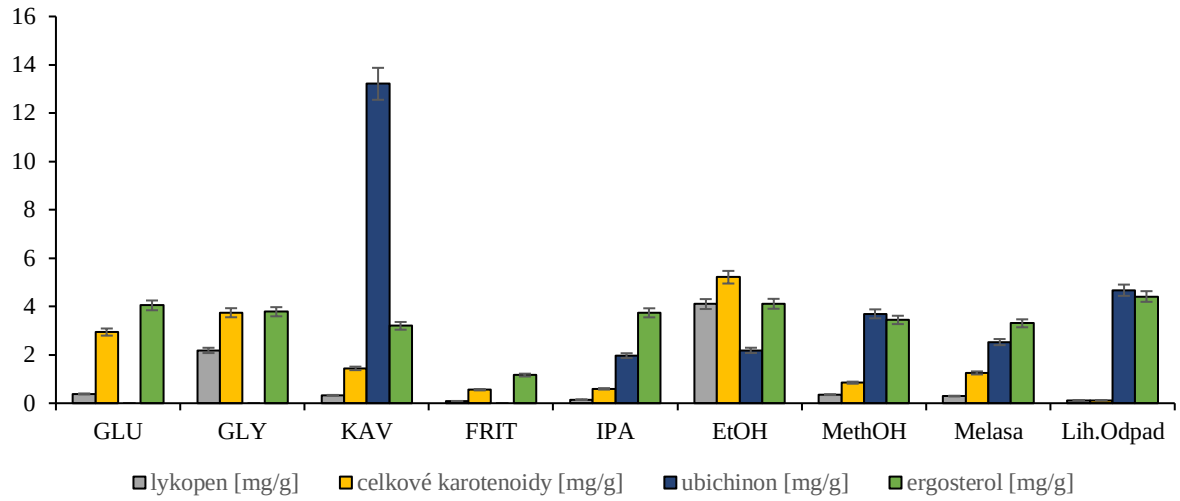
Obrázek 15: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů kmene Phaffia rhodozyma s biomasou

5.1.2 Kultivace kmena *Phaffia rhodozyma na dvounásobných koncentracích odpadních substrátů*

Tabulka 12: Produkce biomasy kmena Phaffia rhodozyma na zvýšených koncentracích odpadních substrátů

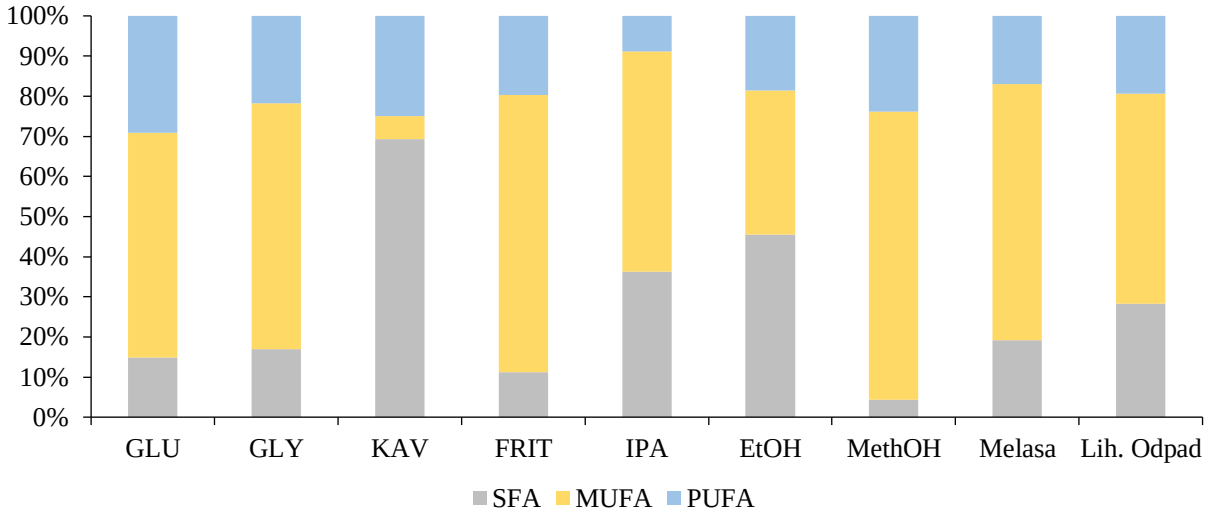
Použitý odpadní substrát	Produkce biomasy [g/l]
Glukóza	22,40 ± 1,12
Glycerol	21,30 ± 1,06
Kávový olej	16,30 ± 0,81
Fritovací olej	15,40 ± 0,77
Isopropanol	12,50 ± 0,62
Ethanol	11,40 ± 0,57
Methanol	10,70 ± 0,53
Malasa	11,20 ± 0,56
Lihový odpad	12,40 ± 0,62

V druhé sadě kultivace byla zdvojnásobena koncentrace odpadních substrátu, které jsou znázorněny v tabulce 2. Na základě dat zobrazených na obrázku 16 lze vidět, že aplikace kávového oleje měla pozitivní vliv na produkci ubichinonu. V tomto typu média byla dosažena největší produkce ubichinonu (13,2 ± 0,66 mg/g biomasy). Daný kmen vykazoval největší produkci celkových karotenoidů (5,2 ± 0,26 mg/g biomasy) a lykopenu (4,1 ± 0,21 mg/g) v médiu s ethanolem. Hodnota ergosterolu ve všech vzorcích je přibližně stejná.



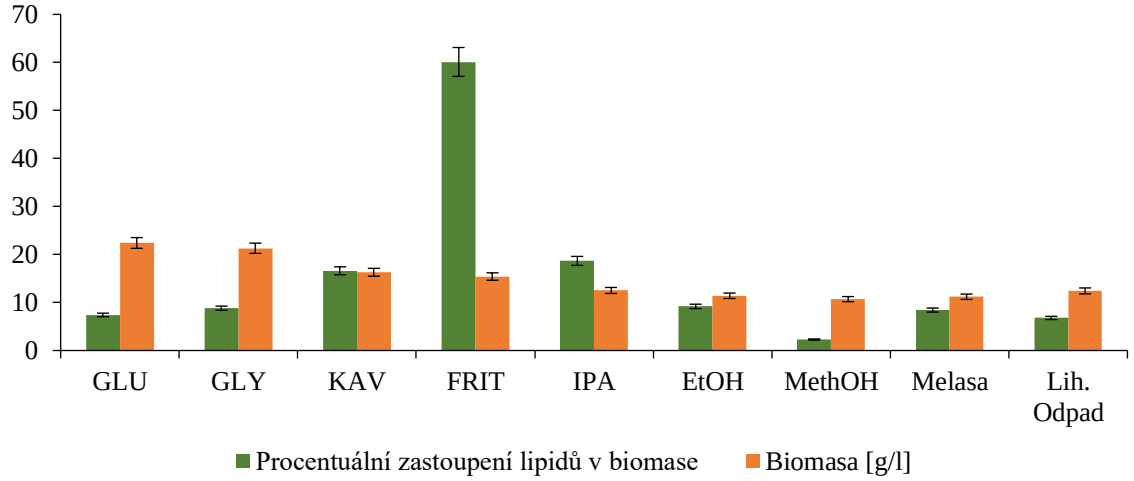
Obrázek 16: Produkce vybraných metabolitů pro kmen Phaffia rhodozyma na zvýšených koncentracích

Na základě výsledků uvedených na obrázku 17 lze vidět, že nejvyšší produkci SFA lze pozorovat v médiu s přídavkem kávového oleje (69,22 ± 3,46 %). Aplikace methanolu měla negativní vliv na produkci SFA (4,27 ± 0,21 %), který zároveň měl nejvyšší zastoupení MUFA (71,82 ±3,59 %). Nejvyšší zastoupení PUFA lze pozorovat v médiu s kávovým olejem (24,97 ± 1,24 %), naopak nejnižší hodnota zastoupení PUFA byla pozorována v médiu s isopropanolem (8,79 ± 0,44 %).



Obrázek 17: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase kmene Phaffia rhodozyma

Z obrázku 18 plyne, že největší procentuální zastoupení celkových lipidů v biomase měl tento kmen v médiu s fritovacín olejem (60,1 ± 3,00 %). Naopak nejměnší hodnoty vykazoval kmen v médiu s methanolem. Z obrázku 18 plyne, že největší produkci biomasy (22,4 ± 1,12 g/l) měl daný kmen v kontrolním glukózovém médiu. Zatímco nejmenší produkci biomasy (10,7 ± 0,53 g/l) měl v médiu s methanolem.



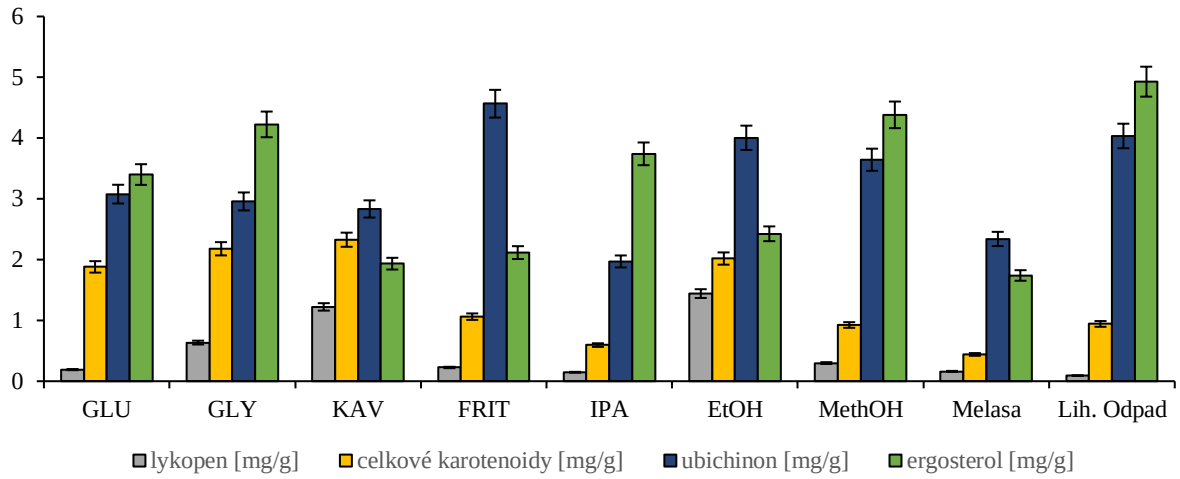
Obrázek 18: Porovnání procentuálního zastoupení lipidů kmene Phaffia rhodozyma s biomasou

5.1.3 Kultivace kmena *Phaffia rhodozyma na nejvyšších koncentracích*

Tabulka 13: Produkce biomasy kmena Phaffia rhodozyma na nejvyšších koncentracích odpadních substrátů

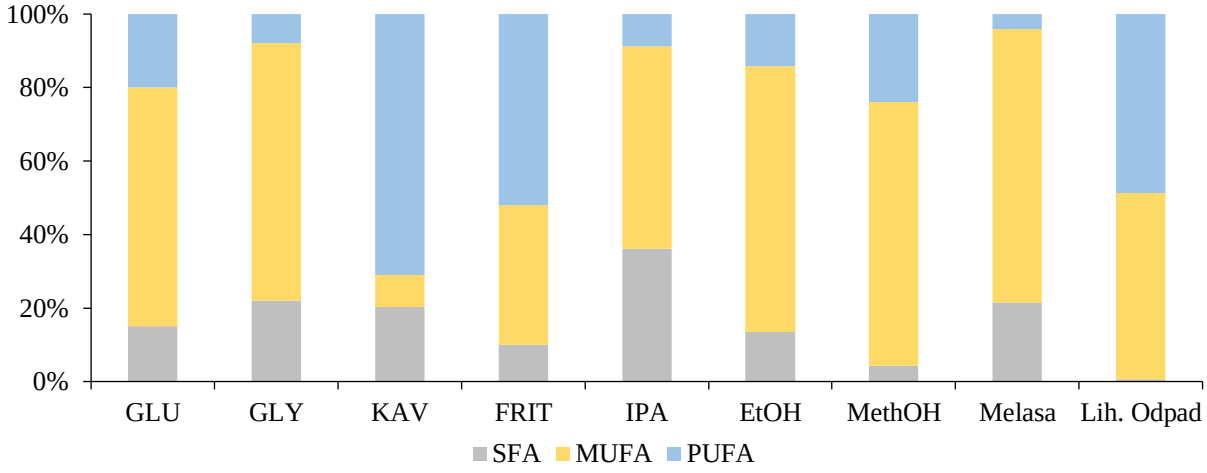
Použitý odpadní substrát	Produkce biomasy [g/l]
Glukóza	19,20 ± 0,96
Glycerol	18,90 ± 0,94
Kávový olej	13,20 ± 0,66
Fritovací olej	11,70 ± 0,58
Isopropanol	13,20 ± 0,66
Ethanol	12,90 ± 0,64
Methanol	11,60 ± 0,58
Malasa	13,50 ± 0,67
Lihový odpad	13,70 ± 0,68

Tento experiment byl stejný jako předchozí. Jediným rozdílem bylo zvýšení koncentrace některých odpadních substrátů, které jsou znázorněny v tabulce 2, aby všechny vzorky měly stejnou koncentraci, abychom je mohli relevantně porovnat dohromady, v tomto případě kávový a fritovací olej. Z obrázku 19 můžeme posoudit, že daný kmen na všech typech médií vykazoval značnou produkci biomasy. Nejvyšší produkci biomasy lze vidět v kontrolním glukozóvém médiu (19,2 ± 0,96 g/l) a na kontrolním glycerolovém médiu (18,9 ± 0,94 g/l). Zároveň s rostoucí koncentrací odpadních substrátů můžeme vidět, že produkce ubichinonu je nyní přítomna ve všech vzorcích, nejvyšší hodnota ubichinonu lze pozorovat v médiu s fritovacím olejem (4,6 ± 0,23 mg/g).



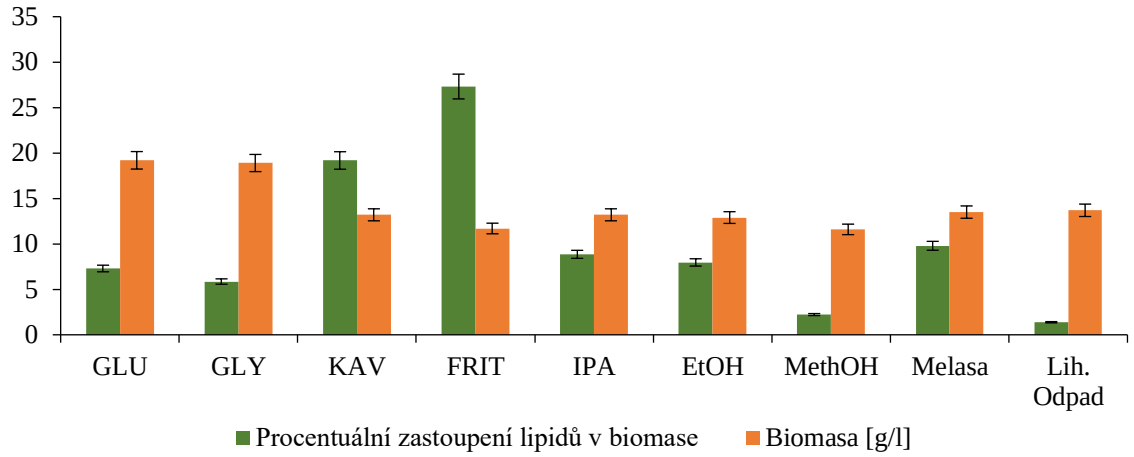
Obrázek 19: Produkce vybraných metabolitů pro kmen Phaffia rhodozyma na nejvyšších koncentracích

Na obrázku 20 lze sledovat zastoupení jednotlivých typů mastných kyselin v biomase. Nejvyšší produkci SFA lze vidět v médiu s isopropanolem (13,52 ± 0,67 %). Naopak nejnižší hodnota SFA byla v médiu s lihovým odpadem (0,67 ± 0,03 %) a v médiu s methanolem (4,27 ± 0,21 %). Prítomnost melasy měla negativní vliv na produkci PUFA (4,01 ± 0,20 %), který zároveň měl nejvyšší zastoupení MUFA (74,44 ± 3,72 %).



Obrázek 20: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase kmene Phaffia rhodozyma

Na základě dat uvedených na obrázku 21 lze vidět trend, že aplikace fritovacího oleje vede k vyššímu procentuálnímu zastoupení celkových lipidů v biomase (27,3 ± 1,36 g/l). Naopak nejměnší hodnoty vykazoval kmen v médiu s lihovým odpadem. Maximální hodnota produkce biomasy byla v kontrolním glukozóvém médiu (19,2 ± 0,96 g/l) a v kontrolním glycerolovém médiu (18,9 ± 0,94 g/l).



Obrázek 21 Porovnání procentuálního zastoupení lipidů kmene Phaffia rhodozyma s nárůstem biomasy

5.2 Kokultivace

V rámci kokultivace byly zvoleny kmeny kvasinky *Phaffia rhodozyma* a mikrořasy *Desmodesmus communis*. V části výsledků zaměřené na kokultivaci byly porovnávány produkce kvasinek a řas jak samostatně, tak ve společných kulturách. Kokultivace probíhala na BBM médiu, které byly obohacené složkami odpadních substrátu.

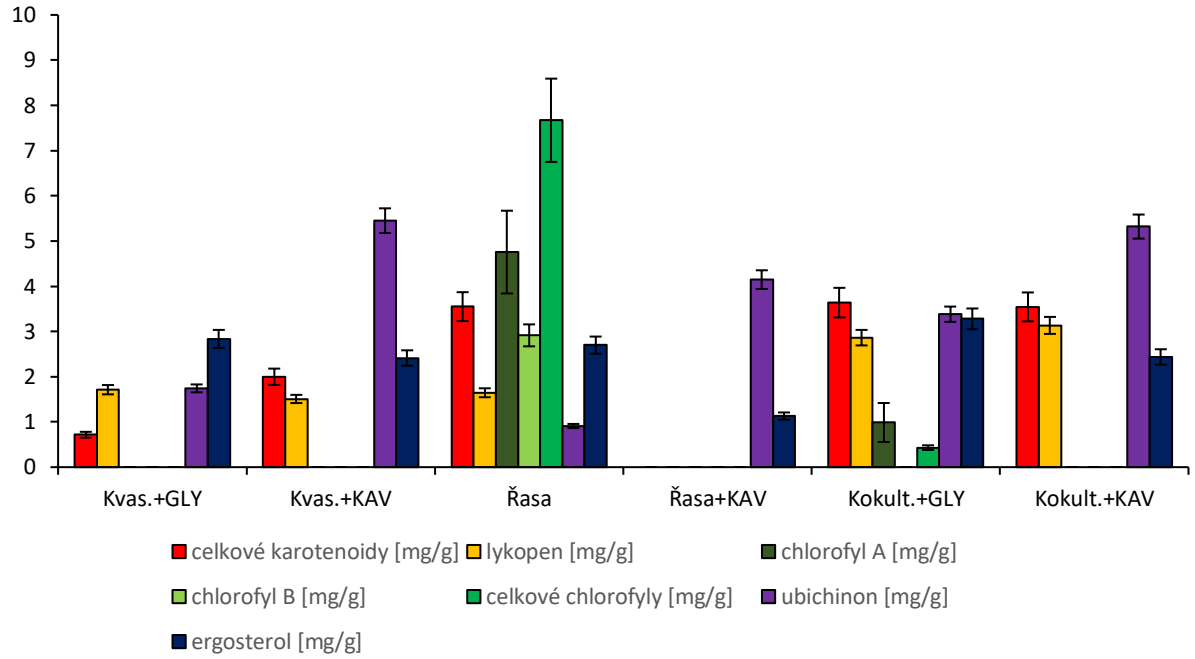
5.2.1 Kokultivace kmena *Phaffia Rhodozyma* a *Desmodesmus communis* při testování vlivu médií s kávovým olejem

Tabulka 14: Produkce biomasy při kokultivaci při testování vlivu médií s kávovým olejem

Použitý odpadní substrát	Produkce biomasy [g/l]
Kvasinka+GLY	12,90 ± 0,60
Kvasinka+KAV	16,60 ± 0,45
Řasa	1,70 ± 0,15
Řasa+KAV	8,10 ± 0,75
Kokultivace+GLY	17,90 ± 1,15
Kokultivace+KAV	16,90 ± 0,20

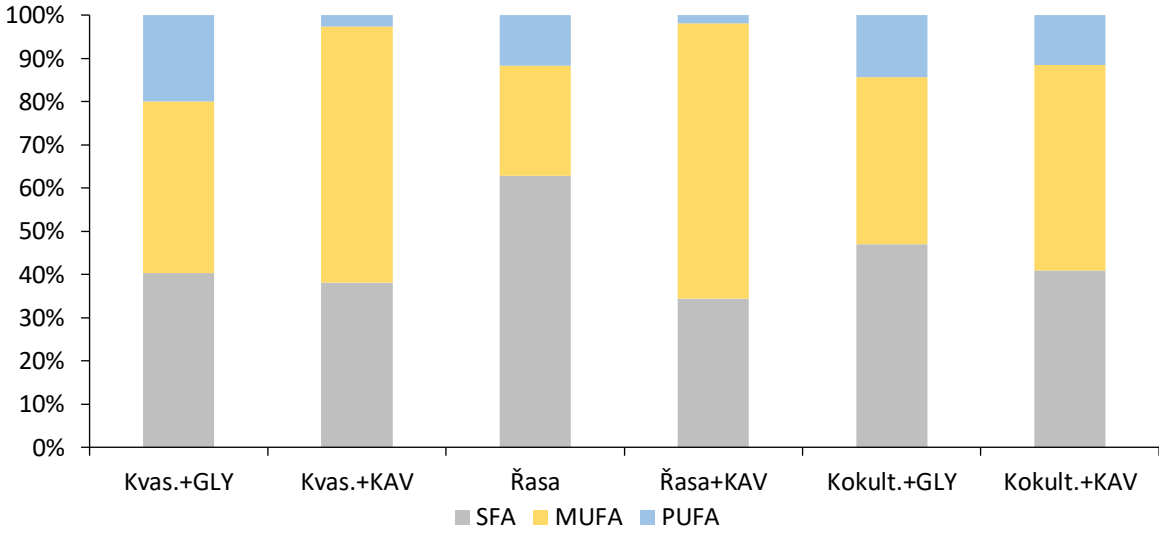
V tomto experimentu byla prováděna kokultivace kvasinky *Phaffia Rhodozyma* s řasou *Desmodesmus communis* v médiu s přídavkem kávového oleje. Na základě dat zobrazených na obrázku 22 lze vidět, že aplikace kávového oleje při kultivaci kmene kvasinky *Phaffia Rhodozyma* měla pozitivní vliv na produkci ubichinonu (5,45 ± 0,27 mg/g), biomasy (16,65 ± 0,83 g/l) a celkových karotenoidů (1,99 ± 0,09 mg/g). Naopak aplikace kávového oleje při kultivaci kmene mikrořasy *Desmodesmus communis* měla negativní vliv na produkci celkových karotenoidů, lykopenu a celkových chlorofylů. Obrázek 22 ukazuje, že toto prostředí se ukázalo jako poměrně nevhodné pro samotnou řasu, avšak lze pozorovat mírný nárůst hodnoty lykopenu (3,14 ± 0,15 mg/l). Nejlepší výsledky produkce biomasy (17,92 ± 0,89 g/l) a ergosterolu (3,27 ± 0,16 mg/g biomasy) byly zaznamenány v kontrolním glycerolovém médiu, ale i v případě kokultivace na kávovém oleji, je vidět mírně zvýšená produkce biomasy oproti kvasince na kávovém oleji. Aplikace kávového oleje měla pozitivní vliv na produkci

ubichinonu (5,31 ± 0,26 mg/g) a lykopenu (3,13 ± 0,15 mg/g). Využití kokultivace v daném případě mělo pozitivní vliv na produkci již zmíněných metabolitů oproti samotným kultivacím kvasinky *Phaffia rhodozyma* a mikrořasy *Desmodesmus communis*.



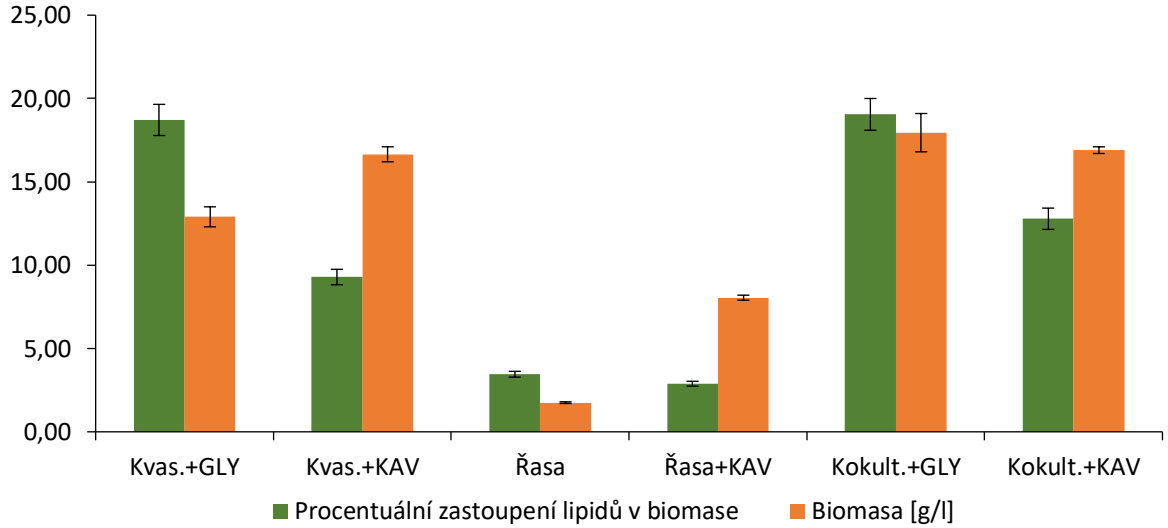
Obrázek 22: Produkce vybraných metabolitů při kokultivaci kmene Phaffia rhodozyma a Desmodesmus communis při testování vlivu médií s kávovým olejem

Z výsledku analýzy vložených na obrázku 23 lze pozorovat, že aplikace kávového oleje při kultivaci kmene kvasinky *Phaffia rhodozyma* vedla ke zvětšení celkového zastoupení MUFA (59,17 ± 2,95 %) a zmenšení zastoupení PUFA (2,68 ± 0,13 %). Zvětšení celkového zastoupení MUFA (63,70 ± 3,18 %) lze také pozorovat v médiu s přídavkem kávového oleje při kultivaci kmene mikrořasy *Desmodesmus communis*. Naopak došlo k zmenšení zastoupení PUFA (1,86 ± 0,09 %) a SFA (34,44 %) v kávovém médiu při kultivaci mikrořasy. Kokultivace v daném případě neměla vliv na produkci SFA, MUFA, PUFA ve srovnání s oddělenou kultivací kvasinky Phaffia rhodozyma a mikrořasy *Desmodesmus communis*.



Obrázek 23: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase při kokultivaci kmene Phaffia rhodozyma a Desmodesmus communis při testování vlivu médií s kávovým olejem

Z obrázku 24 plyne, že při kultivaci kvasinky procentuální zastoupení celkových lipidů v biomase stoupalo v médiu s přídavkem kávového oleje, naopak produkce biomasy se zvýšila (16,65 ± 0,83 g/l) oproti kontrolnímu glycerolovému médiu. Kmen mikrořasy vykazoval velkou produkci biomasy (8,05 ± 0,40 g/l) na médiu s kávovým olejem. Z obrázku 24 lze také posoudit, že zastoupení celkových lipidů (19,05 ± 0,99 %) a biomasy (17,95 ± 0,89 g/l) bylo větší na kokultivačním médiu s přídavkem glycerolu oproti samostatným kultivacím kvasinky a mikrořasy.



Obrázek 24: Porovnání procentuálního zastoupení při kokultivaci kmene Phaffia rhodozyma a Desmodesmus communis při testování vlivu médií s kávovým olejem

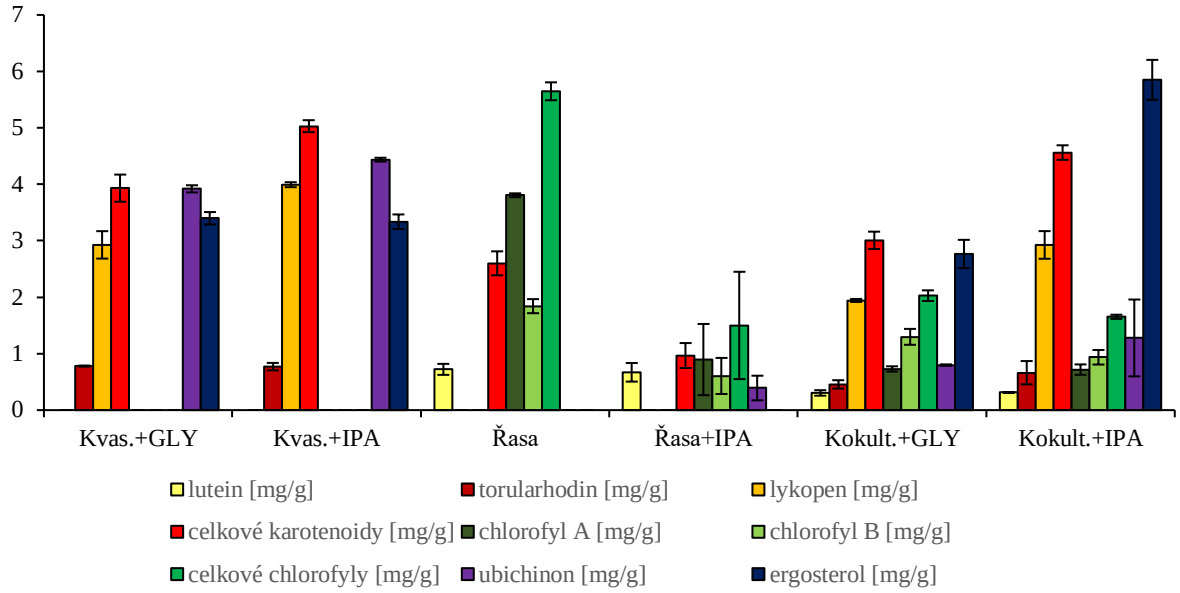
5.2.2 Kokultivace kmena *Phaffia Rhodozyma* a *Desmodesmus communis* při testování vlivu médií s isopropanolem

Tabulka 15: Produkce biomasy při kokultivaci při testování vlivu médií s isopropanolem

Použitý odpadní substrát	Produkce biomasy [g/l]
Kvasinka+GLY	16,30 ± 0,50
Kvasinka+IPA	14,75 ± 0,55
Řasa	5,45 ± 0,15
Řasa+IPA	2,90 ± 0,20
Kokultivace+GLY	18,80 ± 0,10
Kokultivace+IPA	9,60 ± 0,70

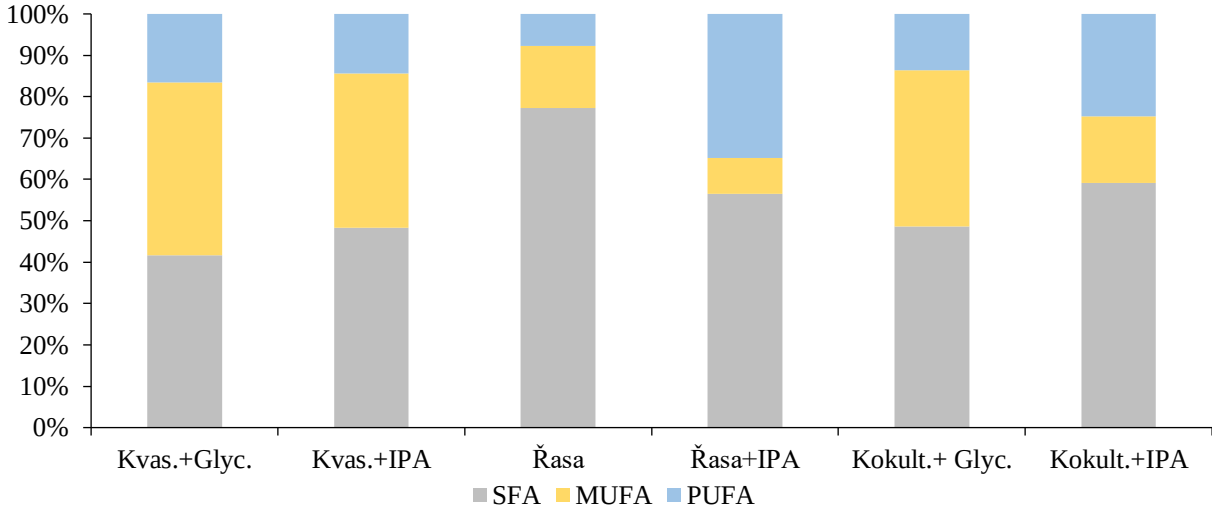
Experiment je téměř shodný s předchozím, ale v tomto případě byl isopropanol použit jako zdroj uhlíku. Z obrázku 25 lze vidět, že v případě kultivace kvasinky s přidáním isopropanolu došlo k větší produkci lykopenu (3,99 ± 0,04 mg/g), celkových karotenoidů (5,02 ± 0,10 mg/g) a ubichinonu (4,43 ± 0,03 mg/g) oproti kultivaci kvasinky na kontrolním glycerolovém médiu. Naopak aplikace isopropanolu měla negativní vliv na produkci celkových karotenoidů (0,96 ± 0,22 mg/g) a celkových chlorofylů (1,5 ±0,95 mg/g) při kultivaci řasy. Hodnoty luteinu v kontrolním médiu řasy (0,72 ± 0,09 mg/g) a médiu s přídavkem isopropanolu (0,66 ± 0,16 mg/g) byly téměř stejné. Kokultivace kvasinky a řasy na kontrolním glycerolovém médiu měla vysoké zastoupení metabolitů a pigmentů, což naznačuje, že kokultivace byla

úspěšná. Nejvíce produkovaných metabolitů lze vidět v případě kokultivace kvasinky a řasy na médiu s isopropanolem. Daná kokultivace vykazovala největší produkci ergosterolu (5,85 ± 0,35 mg/g) a celkových karotenoidů (4,56 ± 0,12 mg/g biomasy)



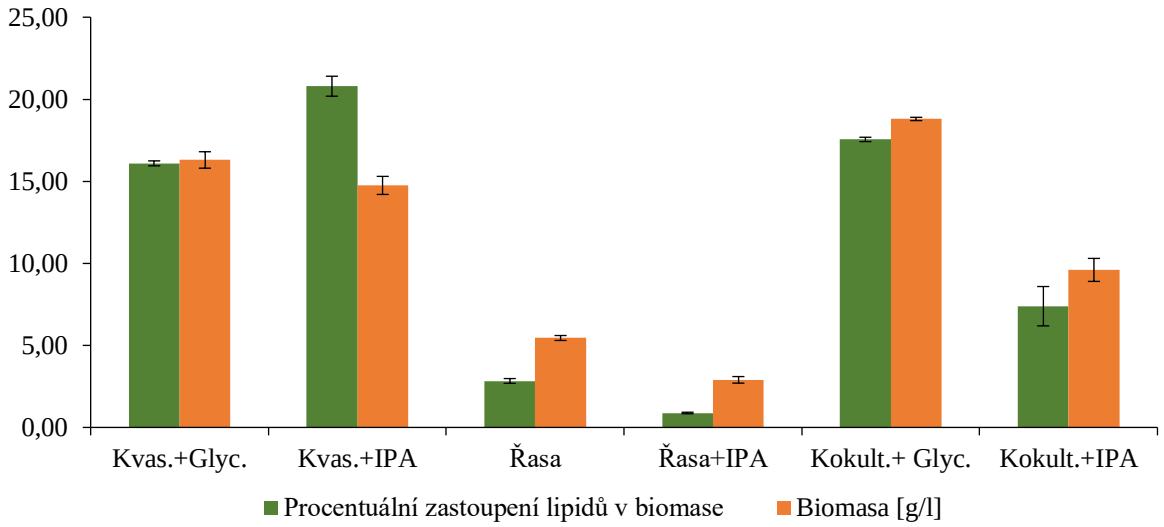
Obrázek 25: Produkce vybraných metabolitů při kokultivaci kmene Phaffia rhodozyma a Desmodesmus communis při testování vlivu médií s isopropanolem

Z obrázku 26 lze posoudit, že zastoupení jednotlivých typů mastných kyselin je téměř stejné při kultivaci kvasinky na kontrolním glycerolovém médiu a při kultivaci kvasinky s přídavkem isopropanolu. Aplikace isopropanolu při kultivaci kmene řasy *Desmodesmus communis* vedla ke zvýšení celkového zastoupení PUFA (34,82 ± 1,74 %) a snížení zastoupení SFA (56,52 ± 2,82 %) a MUFA (8,67 ± 0,43 %). Při kokultivaci bylo největší zastoupení SFA (59,11 ± 2,95 %) a PUFA (24,75 ± 1,23 %) dosaženo na médiu s isopropanolem. Zastoupení jednotlivých typů mastných kyselin je téměř stejné při kultivaci kvasinky a kokultivaci na kontrolním glycerolovém médiu.



Obrázek 26: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase při kokultivaci kmene Phaffia rhodozyma a Desmodesmus communis při testování vlivu médií s isopropanolem

Obrázek 27 naznačuje, že celkové lipidy (16,09 ± 0,15 %) byly více zastoupeny při kultivaci kvasinek na médiu s přídavkem isopropanolu. Při kultivaci kmene řasy *Desmodesmus communis* na médiu s přídavkem isopropanolu lze pozorovat, že produkce biomasy (2,9 ± 0,2 g/l) a procentuální zastoupení lipidů v biomase (0,88 ± 0,05 %) klesá. Největší produkce biomasy (18,8 ± 0,1 g/l) byla zaznamenána při kokultivaci na kontrolním glycerolovém médiu, kde procentuální zastoupení lipidů v biomase (17,55 ± 0,13 %) je vyšší než u kvasinky na stejném médiu a u čisté řasy. Procentuální zastoupení lipidů v biomase (7,39 ± 1,20 %) při kokultivaci s přídavkem isopropanolu je nižší než u kvasinky na stejném médiu (20,80 ± 0,61 %).



Obrázek 27: Porovnání procentuálního zastoupení při kokultivaci kmene Phaffia rhodozyma a Desmodesmus communis při testování vlivu médií s isopropanolem

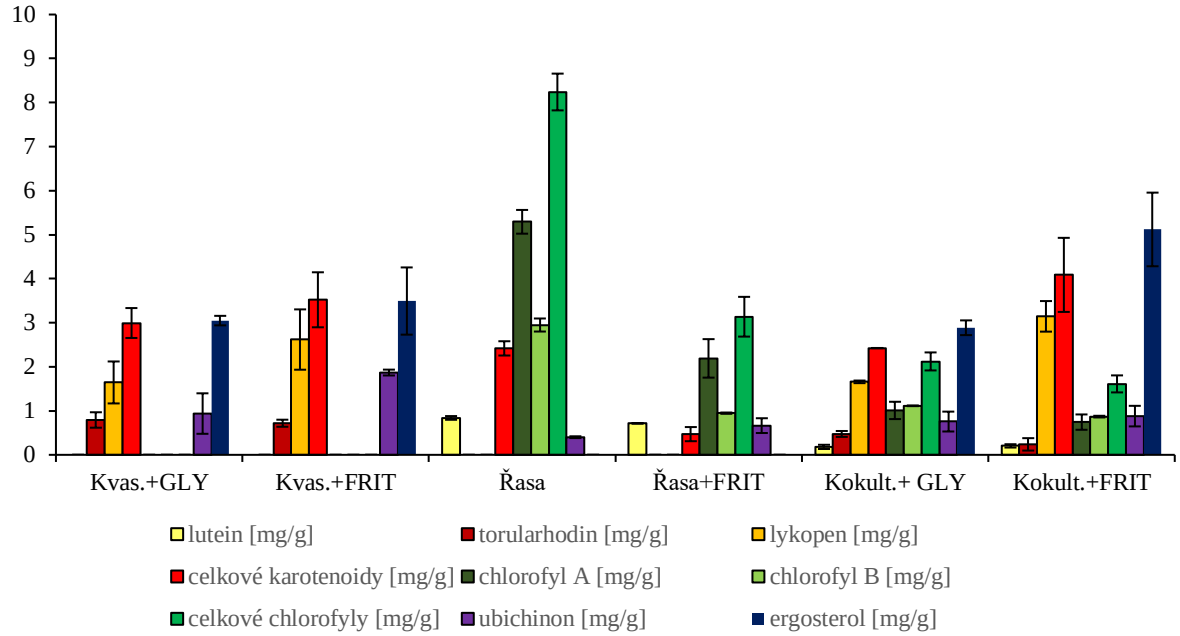
5.2.3 Kokultivace kmena *Phaffia Rhodozyma* a *Desmodesmus communis* při testování vlivu médií s fritovacím olejem

Tabulka 16: Produkce biomasy při kokultivaci při testování vlivu médií s fritovacím olejem

Použitý odpadní substrát	Produkce biomasy [g/l]
Kvasinka+GLY	18,45 ± 0,15
Kvasinka+FRIT	16,95 ± 1,25
Řasa	7,55 ± 1,65
Řasa+FRIT	12,20 ± 0,10
Kokultivace+GLY	18,35 ± 0,25
Kokultivace+FRIT	7,40 ± 0,01

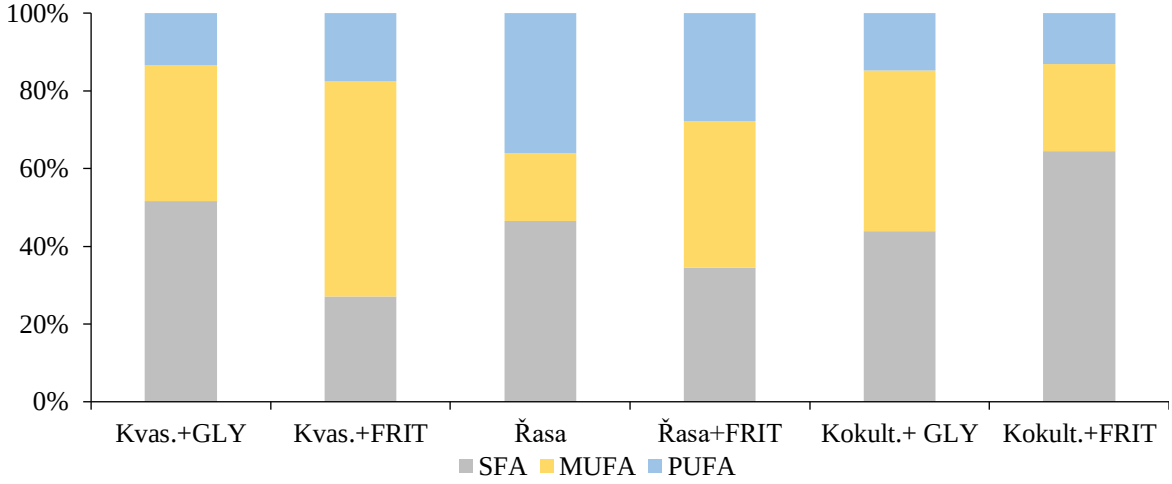
Posledním experimentem byla kokultivace kvasinky *Phaffia rhodozyma* a mikrořasy *Desmodesmus communis* na médiu s přídavkem fritovacího oleje. Z výsledku analýzy uvedených na obrázku 28 lze pozorovat, že aplikace fritovacího oleje při kultivaci kmene kvasinky *Phaffia rhodozyma* vedla ke zvětšení produkci lykopenu (2,61 ± 0,68 mg/g), celkových karatenoidů (3,52 ± 0,62 mg/g), ubichinonu (1,86 ± 0,06 mg/g) a ergosterolu (3,49 ± 0,76 mg/g). Naopak aplikace fritovacího oleje měla negativní vliv na produkci celkových chlorofylů (3,13 ± 0,45 mg/g) a celkových karotenoidů (0,46 ± 0,16 mg/g) při

kultivaci řasy. Na obrázku 28 lze vidět, že kokultivace na médiu s fritovacím olejem byla úspěšná. Daná kokultivace vykazovala největší produkci ergosterolu (5,11 ± 0,83 mg/l), celkových karotenoidů (4,08 ± 0,84 mg/g biomasy) a lykopenu (3,14 ± 0,34 mg/g), takže lze pozorovat vysokou produkci pigmentů a metabolitů.



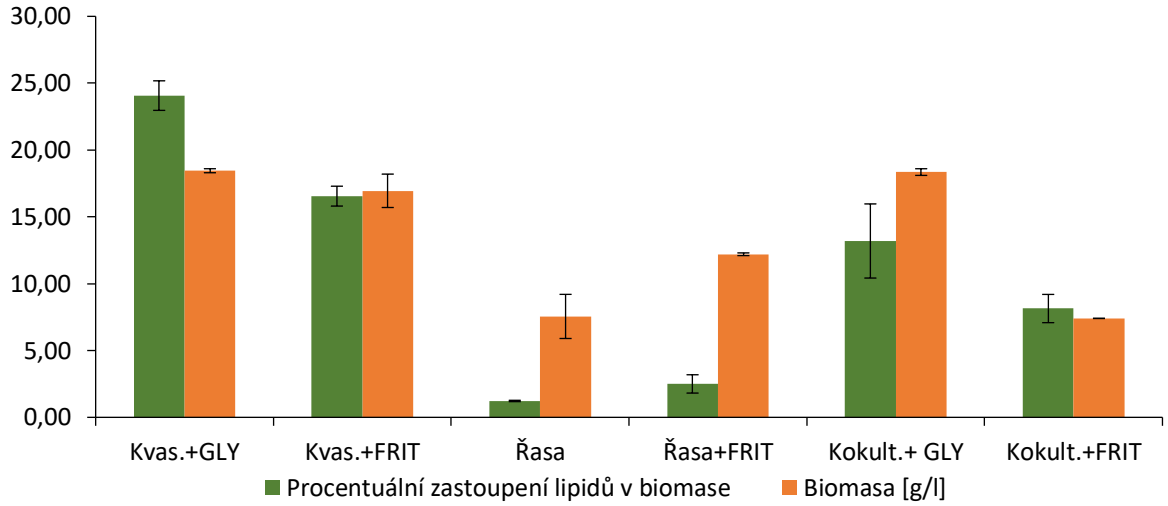
Obrázek 28: Produkce vybraných metabolitů při kokultivaci kmene Phaffia rhodozyma a Desmodesmus communis při testování vlivu médií s fritovacím olejem

Na obrázku 29 lze sledovat zastoupení jednotlivých typů mastných kyselin v biomase. Aplikace fritovacího oleje při kultivaci kvasinky (55,36 ± 2,76 %) a mikrořasy (37,65 ± 1,88 %) vedla ke zvýšení celkového zastoupení MUFA. Kokultivace na kontrolním glycerolovém médiu v daném případě neměla vliv na produkci SFA (43,89 ± 2,19 %), MUFA (41,31 ± 2,06 %), PUFA (14,80 ± 0,74 %) ve srovnání s oddělenou kultivací kvasinky Phaffia rhodozyma. Přídavek fritovacího oleje při kokultivaci měla pozitivní vliv na produkci SFA (64,50 ± 3,22 %). Produkce MUFA (22,40 ± 1,12 %) při kokultivaci na médiu s fritovacím olejem je nižší než u kvasinky (55,36 ± 2,76 %) na stejném médiu.



Obrázek 29: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase při kokultivaci kmene Phaffia rhodozyma a Desmodesmus communis při testování vlivu médií s fritovacím olejem

Na základě dat uvedených na obrázku 30 lze pozorovat, že při kultivaci kvasinky procentuální zastoupení celkových lipidů v biomase (16,55 ± 0,74 %) stoupalo v médiu s přídavkem fritovacího oleje. Aplikace fritovacího oleje při kultivaci kmene mikrořasy vede ke zvětšení produkce biomasy (12,2 ± 0,1 g/l) a procentuálního zastoupení lipidů (2,50 ± 0,68 %). Kokultivace v médiu s přídavkem fritovacího oleje měla negativní vliv na produkci biomasy (7,4 ± 0,1 g/l) a procentuálního zastoupení lipidů (8,14 ± 1,06 %) ve srovnání s kokultivací kvasinky *Phaffia rhodozyma* a mikrořasy *Desmodesmus communis* v kontrolním glycerolovém médiu.



Obrázek 30: Porovnání procentuálního zastoupení při kokultivaci kmene Phaffia rhodozyma a Desmodesmus communis při testování vlivu médií s fritovacím olejem

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na kultivace kvasinky *Phaffia rhodozyma* na různých zdrojích uhlíku v laboratorních podmínkách a na optimalizování kokultivačních podmínek kmene kvasinky *Phaffia rhodozyma* s vybraným kmenem autotrofních mikroorganismů. Sledovanými kmeny kvasinek mikroorganismů byly kvasinka *Phaffia rhodozyma* (CCY 77-1) a mikrořasa *Desmodesmus communis* (CCALA 464). Kultivace probíhaly na médiích s obsahem glukózy, glycerolu, kávového oleje, fritovacího oleje, ethanolu, isopropanolu, methanolu, melasy, lihového odpadu.

V rámci kultivačního experimentu s kvasinkou *Phaffia rhodozyma* byly zvoleny různé zdroje a koncentrace uhlíku pro zjištění nejoptimálnějšího média z hlediska produkce biomasy a vybraných metabolitů. Kultivace kvasinky probíhala na BBM médiu, nezbytném pro růst řas, protože mimo něj by mikrořasy nemusely přežít a kokultivace s kvasinkami by nebyly úspěšné. U kmene kvasinky *Phaffia rhodozyma* byly zaznamenány nejlepší výsledky na médiích s přídavkem kávového oleje, isopropanolu a fritovacího oleje. Největší produkce biomasy (16,30 ± 0,81 g/l) a ubichinonu (16,1 ± 0,64 mg/g) vznikla na médiu s kávovým olejem. Nejvyšší procentuální zastoupení lipidů v biomase (60,1 ± 3,00 %) bylo u média s přídavkem fritovacího oleje.

Další série experimentů se týkala kokultivace kmene kvasinky *Phaffia rhodozyma* a kmene mikrořasy *Desmodesmus communis* na nejlepších médiích vybraných z kultivačních experimentů kvasinek. Nejúspěšnějším kokultivačním experimentem z hlediska produkce biomasy (16,90 ± 0,20 g/l) byla kokultivace na médiu s přídavkem kávového oleje. Na médiu s přídavkem isopropanolu bylo dosaženo největších hodnot produkce ergosterolu (5,85 ± 0,35 mg/g) a celkových karotenoidů (4,56 ± 0,12 mg/g). Produkce ubichinonu (5,31 ± 0,26 mg/g) byla lepší na médiu s přídavkem kávového oleje. Zastoupení celkových lipidů a jednotlivých druhů mastných kyselin (12,75 ± 0,63 %) bylo větší při kokultivaci na médiu s přídavkem kávového oleje. Zatímco produkce torularhodinu, luteinu, chlorofylu A a chlorofylu B nebyla ovlivněna použitím kávového oleje.

Kokultivace měla pozitivní vliv na produkci biomasy oproti samostatným kultivacím kvasinky *Phaffia rhodozyma* a mikrořasy *Desmodesmus communis*. Zároveň se to dá tvrdit i o produkci některých metabolitů; produkce celkových karotenoidů (4,08 ± 0,84 mg/g) byla výrazně vyšší při kokultivaci na médiu s přídavkem fritovacího oleje. Při kokultivaci na kontrolním glycerolovém médiu byla zvýšená akumulace lipidů v biomase vyšší než u kokultivace s přídavkem odpadních substrátů.

Prostřednictvím série experimentů v laboratorním měřítku bylo dokázáno, že testovaný kmen kvasinky *Phaffia rhodozyma* vykazoval lepší výsledky při kokultivaci s kmenem mikrořasy *Desmodesmus communis* na médiích s přídavkem vybraných odpadních substrátů. Pro důkladnější prozkoumání této problematiky by bylo potřeba provést další sérii experimentů a najít nejsymbiotičtější mikroorganismy pro kmen kvasinky *Phaffia rhodozyma*. Dále by bylo vhodné optimalizovat kultivaci pro produkci biomasy a metabolitů.

7 LITERATURA

[1] KOPECKÁ, Jana, Dagmar MATOULKOVÁ a Miroslav NĚMEC. Yeast and its uses. Kvasný průmysl (On-line) [online]. Research Institute of Brewing and Malting, 2012, **58**(11-12), 326-335 [cit. 2023-01-30]. ISSN 0023-5830. Dostupné z: doi:10.18832/kp2012029

[2] JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVÁ. *Úvod do biologie kvasinek*. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-990-1.

[3] Sherwood, R. K. & Bennett, R. J. Fungal meiosis and parasexual reproduction — lessons from pathogenic yeast. Curr. Opin. Microbiol. 12, 599–607 (2009).

[4] WALKER, Graeme M. *Yeast physiology and biotechnology*. New York: J. Wiley, c1998. ISBN 0471964468.

[5] MAROVA, Ivana, *Milan CERTIK a Emilia BREIEROV*. Biomass - Detection, Production and Usage: Production of Enriched Biomass *by Carotenogenic Yeasts - Application of Whole-Cell Yeast Biomass to Production of Pigments and Other Lipid Compounds* [online]. InTech, 2011. ISBN 978-953-307-492-4. Dostupné z: doi:10.5772/19235

[6] 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.

[7] KHEIRABADI, Esmaeil Pirali, Pezhman Hosseini SHEKARABI, Foroud YADOLLAHI, et al. *Red yeast (Phaffia rhodozyma) and its effect on growth, antioxidant activity and color pigmentation of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. 2022. Dostupné z: doi:10.1016/j.aqrep.2022.101082.

[8] 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.

[9] WERTZ, Jean-Luc a PEREZ, Serge. *Algae in the Bioeconomy*. Boca Raton: CRC Press, 2024. ISBN 978-1-003-45930-9.

[10] BOROWITZKA, Michael.The physiology of microalgae. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2016. ISBN 978-3-319-24943-8.

[11] PEREIRA, Leonel a Joao MAGALHAES NETO. Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology. CRC Press, 2014. ISBN 9781466581678.

[12] BARSANTI, L. a Paolo. GUALTIERI.Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology. Second edition. Boca Raton, [Florida]: CRC Press/Taylor & Francis Group, [2014]. ISBN 978-1-4398-6732-7

[13] RICHMOND, Amos. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Ames, Iowa, USA: Blackwell Science, 2004. ISBN 06-320-5953-2

[14] BARSANTI, L. a Paolo. GUALTIERI.Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology. Second edition. Boca Raton, [Florida]: CRC Press/Taylor & Francis Group, [2014]. ISBN 978-1-4398-6732-7

[15] WESTBLADE, Lars F., Sangeetha RANGANATH, William Michael DUNNE, Carey-Ann D. BURNHAM, Robert FADER a Bradley A. FORD. Infection with a

Chlorophyllic Eukaryote after a Traumatic Freshwater Injury. New England Journal of Medicine [online]. 2015, 372(10), 982-984 [cit. 2021-5-6]. ISSN 0028-4793

[16] Desmodesmus communis. Culture Collection of Autotrophic Organisms (CCALA) [online]. Třeboň, Czech republic [cit. 2021-5-6].

[17] Armstrong, G.A. and Hearst, J.E. (1996), Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. The FASEB Journal, 10: 228 237. https://doi.org/10.1096/fasebj.10.2.8641556

[18] VELÍŠEK, Jan a HAJŠLOVÁ, Jana. *CHEMIE POTRAVIN 2*. OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.

[19] FRENGOVA, Ginka a *Dora BESHKOVA. Carotenoids from* Rhodotorula and Phaffia: yeasts of biotechnological importance. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology [online]. 2009, 163-180 [cit. 2023-04-16]. ISSN *1367-5435.*

[20] KOT, Anna M*., Stanisław BłAżEJAK, Agnieszka* KURCZ, Iwona GIENTKA a Marek KIELISZEK. Rhodotorula glutinis—potential source of lipids, carotenoids, and enzymesfor use in industries. Applied Microbiology *and Biotechnology* [online]. 2016, **100**(14), 6103-6117 [cit. 2023-04-22]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-016-7611-8

[21] VELÍŠEK, Jan a HAJŠLOVÁ, Jana. *Chemie potravin 1*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.

[22] KODÍČEK, Milan; VALENTOVÁ, Olga a HYNEK, Radovan. *BIOCHEMIE chemický pohled na biologický svět*. Praha: VŠCHT Praha, 2015. ISBN 978-80-7980-927-3.

[23] VODRÁŽKA, Zdeněk. Biochemie. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.

[24] SZOTKOWSKI, Martin. *Srovnání metabolické aktivity a potenciálního* využití mikrořas a pigmentotvorných kvasinek [online]. 2016 [cit. 3.4.2023]. Dostupné z: https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/88249. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

[25] DOHNAL, Vlastimil, *Alena JEŽKOVÁ a Jiří SKLÁDANKA*. Ergosterol: Klíčový steroid hub. Kontakt [online]. 2009, 10(2), 449-454 [cit. 2023-04-16]. ISSN 12124117. Dostupné z: doi:10.32725/kont.2008.066

[26] ERNSTER, Lars a Gustav DALLNER. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 1995, 1271(1), 195-204. DOI: 10.1016/0925-4439(95)00028-3. ISSN 09254439.Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0925443995000283

[27] KALINA, Tomáš a VÁŇA, Jiří. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 978-80-246-1036-8.

[28] VON WETTSTEIN, D. Chlorophyll Biosynthesis. THE PLANT CELL ONLINE. 7(7), 1039- 1057. DOI: 10.1105/tpc.7.7.1039. ISSN 10404651.

[29] LOPES, Marlene; MIRANDA, Sílvia M. a BELO, Isabel. Microbial valorization of waste cooking oils for valuable compounds production - a review. Online. *Critical reviews in environmental science and technology*. 2020, roč. 50, č. 24, s. 2583-2616.

ISSN 1064-3389. Dostupné z: https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1704602. [cit. 2024-05-12].

[30] Getachew, A. T., Cho, Y. J., and Chun, B. S. (2018). Effect of pretreatments on isolation of bioactive polysaccharides from spent coffee grounds using subcritical water. Int. J. Biol. Macromol.109, 711-719

[31] OBRUCA, Stanislav, Pavla BENESOVA, Dan KUCERA, Sinisa PETRIK a Ivana MAROVA. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. New Biotechnology. 2015, 32(6), 569-574. DOI: 10.1016/j.nbt.2015.02.008. ISSN 18716784. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678415000333

[32] Santos OS, Mendonça AG, Santos JC, Silva AP, Costa SS, Oliveira LC, Carmo JB, Botero WG. The use of sugar and alcohol industry waste in the adsorption of potentially toxic metals. Environ Technol. 2016;37(2):279- 91. doi: 10.1080/09593330 .2015.1068380

[33] OBRUČA Stanislav, doc. Ing., Ph.D. Co jsou to biotechnologie?. Vysoké učení technické Brno, Fakulta chemická, 2019.

[34] EASTERLING, E., W. FRENCH, R. HERNANDEZ a M. LICHA. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of Rhodotorula glutinis. Bioresource Technology [online]. 2009, 100(1), 356-361 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.05.030. ISSN 09608524. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852408004768

[35] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna, VRANÁ, Dagmar, ed. Kvasinky ve výzkumu a praxi. Praha: Academia, 1986.

[36] Yen, H.-W.; Chen, P.-W.; Chen, L.-J. The synergistic effects for the co-cultivation of oleaginous yeast-Rhodotorula glutinis and microalgae-Scenedesmus obliquus on the biomass and total lipids accumulation. *Bioresour. Technol.* **2015**, *184*, 148–152.

[37] XUE, F., J. MIAO, X. ZHANG a T. TAN. A New Strategy for Lipid Production by Mix Cultivation of Spirulina platensis and Rhodotorula glutinis. Applied Biochemistry and 76 Biotechnology. 2010, 160(2), 498-503. ISSN 0273-2289. Dostupné z: doi:10.1007/s12010-008-8376-z

[38] SZOTKOWSKI, M., J. HOLUB, S. ŠIMANSKÝ, K. HUBAČOVÁ, P. SIKOROVÁ, V. MARINIČOVÁ, A. NĚMCOVÁ a I. MÁROVÁ. Bioreactor Co-Cultivation of High Lipid and Carotenoid Producing Yeast Rhodotorula kratochvilovae and Several Microalgae under Stress. Microorganisms. 2021, 9(6), 23. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9061160

[39] KŘÍŽEK, Martin a ŠÍMA, Jan. *Analytická chemie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2015. ISBN 978-80-7394-486-5.

[40] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.

[41] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Dotisk 1. vyd. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. Praha: Univerzita Karlova, 2005. ISBN 80-246-0852-9.

[42] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická*

chemie není hlavním studijním oborem. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0553-8.

[43] SKOOG, Douglas A.; WEST, Donald M.; HOLLER, F. James a CROUCH, Stanley R. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0.

[44] NOVÁKOVÁ, Lucie a DOUŠA, Michal. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.

[45] CZAPLICKI, Sylwester. *Chromatography in Bioactivity Analysis of* Compounds. In: MARTIN, Dean, ed. Column Chromatography [online]. InTech, 2013 [cit. 2023-04-04]. ISBN 978-953-51-1074-3. Dostupné z: doi:10.5772/55620

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACP	Acyl Carrier Protein
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
SFA	nasycené mastné kyseliny