

# Využití biotechnologických postupů pro výrobu potravinářských barviv

Pavλίna Dudová

---

Bakalářská práce  
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická  
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

|                   |  |
|-------------------|--|
| Jméno a příjmení: | Pavčina Dudová   |
| Osobní číslo:     | T19098   |
| Studijní program: | B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin                        |
| Specializace:     | Technologie potravin   |
| Forma studia:     | Prezenční  |
| Téma práce:       | Využití biotechnologických postupů pro výrobu potravinářských barviv |

## Zásady pro vypracování

### I. Teoretická část

1. Charakteristika potravinářských barviv.
2. Význam použití barviv v potravinářství.
3. Organismy používané pro biotechnologickou výrobu barviv.
4. Přínosy použití biotechnologií.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

**Seznam doporučené literatury:**

- [1] SUN, Lichao, Fengjiao XIN a Hal S. ALPER. Bio-synthesis of food additives and colorants-a growing trend in future food. *Biotechnology Advances* [online]. 2021, 47 [cit. 2021-7-22]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107694
- [2] ZHA, Jian, Xia WU a Mattheos AG KOFFAS. Making brilliant colors by microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2020, 61, 135-141 [cit. 2021-7-22]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2019.12.020
- [3] RODRIGUEZ-CONCEPCION, Manuel, Javier AVALOS, M. Luisa BONET, et al. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in Lipid Research* [online]. 2018, 70, 62-93 [cit. 2021-7-22]. ISSN 01637827. Dostupné z: doi:10.1016/j.plipres.2018.04.004

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Martina Bučková, Ph.D.**  
Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2021**

Termín odevzdání bakalářské práce: **20. května 2022**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Robert Gál, Ph.D.**  
ředitel ústavu

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce se zaměřuje na potravinářská barviva a jejich výrobu pomocí biotechnologických postupů. V práci jsou charakterizovány hlavní skupiny přírodních barviv a jejich využití v jednotlivých odvětvích potravinářského průmyslu. Pozornost je věnována organismům, které se používají pro průmyslovou produkci potravinářských barviv. Mezi nejdůležitější producenty patří plísně, sinice a mikrořasy. Některé druhy bakterií a mikrořas jsou dnes ve stádiu výzkumu a vývoje. Dále jsou v práci obsaženy přínosy použití biotechnologií a porovnání s tradičním způsobem získávání přírodních pigmentů z rostlin. Hlavní výhody jsou rychlejší růst organismů a nezávislost na ročním období.

Klíčová slova: biotechnologie, biotechnologické postupy, mikroorganismy, mikrořasy, potravinářská barviva, přírodní barviva

## **ABSTRACT**

The bachelor thesis focuses on food colorants and their production using biotechnological processes. The main groups of natural colorants and their use in individual branches of the food industry are characterized in the work. Attention is paid to organisms that are used for the industrial production of food colorants. The most important producers include fungi, cyanobacteria and microalgae. Some species of bacteria and microalgae are in the research and development stage today. Furthermore, the work contains the benefits of the use of biotechnology and comparison with the traditional method of obtaining natural pigments from plants. The main advantages are faster growth of organisms and independence of the season.

Keywords: biotechnology, biotechnological approaches, microalgae, microorganisms, food colorants, natural colorants

Mé poděkování patří Mgr. Martině Bučkové, PhD. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

Poděkování patří i mé rodině a přátelům, kteří mě po celé studium podporovali a věřili mi.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

|  |           |
|--|-----------|
| ÚVOD .....   | 9         |
| <b>1 CHARAKTERISTIKA POTRAVINÁŘSKÝCH BARVIV .....</b>                      | <b>10</b> |
| 1.1 LEGISLATIVA .....  | 10        |
| 1.2 KAROTENOIDY .....  | 13        |
| 1.2.1 Hlavní zástupci karotenoidů.....                                     | 13        |
| 1.3 CHLOROFYLY.....  | 15        |
| 1.4 ANTOKYANY.....   | 16        |
| 1.5 FYKOBILIPROTEINY .....   | 17        |
| 1.6 BETALAINY .....  | 17        |
| 1.7 RIBOFLAVIN.....  | 18        |
| <b>2 VÝZNAM POUŽITÍ BARVIV V POTRAVINÁŘSTVÍ .....</b>                      | <b>20</b> |
| 2.1 MLÉKÁRENSKÝ PRŮMYSL.....   | 20        |
| 2.2 PEKAŘSKÝ PRŮMYSL .....   | 21        |
| 2.3 NÁPOJOVÝ PRŮMYSL .....   | 22        |
| 2.4 CUKROVINKY.....  | 24        |
| 2.5 MASO A KRMIVÁŘSKÝ PRŮMYSL.....   | 25        |
| <b>3 ORGANISMY POUŽÍVANÉ PRO BIOTECHNOLOGICKOU VÝROBU<br/>BARVIV .....</b> | <b>26</b> |
| 3.1 BAKTERIE .....   | 26        |
| 3.1.1 <i>Escherichia coli</i> .....  | 26        |
| 3.1.2 <i>Zymomonas mobilis</i> .....                                       | 28        |
| 3.2 PLÍSNĚ.....  | 29        |
| 3.2.1 <i>Blakeslea trispora</i> .....                                      | 29        |
| 3.2.2 <i>Monascus</i> .....  | 30        |
| 3.2.3 <i>Ahbya gossypii</i> .....  | 32        |
| 3.3 SINICE.....  | 32        |
| 3.3.1 <i>Arthrospira platensis</i> .....                                   | 32        |
| 3.4 MIKROŘASY.....   | 33        |
| 3.4.1 <i>Dunaliella</i> .....  | 34        |
| 3.4.2 <i>Haematococcus pluvialis</i> .....                                 | 34        |
| 3.4.3 Produkce luteinu z mikrořas.....                                     | 36        |
| <b>4 PŘÍNOSY POUŽITÍ BIOTECHNOLOGIÍ.....</b>                               | <b>38</b> |
| <b>ZÁVĚR .....</b>   | <b>40</b> |
| <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>                                     | <b>42</b> |
| <b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>                             | <b>49</b> |

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| <b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> ..... | <b>50</b> |
| <b>SEZNAM TABULEK</b> ..... | <b>51</b> |



## ÚVOD

Barva potravin je pro spotřebitele důležitým faktorem, protože utváří první dojem při výběru. Potravinářská barviva patří mezi látky, které se do potravin přidávají za účelem zvýraznění přirozeně přítomného barevného odstínu, pro cílené obarvení potravin nebo proto, aby se potravině navrátila barva, která byla změněna v důsledku technologického zpracování.

Barviva se dělí na dvě hlavní skupiny: přírodní a syntetická. Syntetická barviva se získávají chemickou syntézou a jsou ve světě stále více na ústupu z důvodu potenciálních negativních účinků na lidské zdraví. To znamená vyšší poptávku po přírodních barvivech, kterou nemusí výroba z rostlinných zdrojů v budoucnu být schopna uspokojit. Tento problém může řešit biotechnologická výroba potravinářských barviv.

Biotechnologie využívají živé systémy a organismy k vývoji a výrobě produktů nebo jakékoli technologické aplikace, které využívají biologické systémy, živé organismy nebo jejich deriváty k výrobě nebo úpravě produktů. Barevné produkty z těchto organismů jsou tedy přírodního původu a mohou být přidávány do potravin jako barviva. Nejznámější producenti pigmentů jsou plísně, sinice a mikrořasy. Někteří zástupci se pro výrobu pigmentů využívají již po mnoho let až století a jiní jsou momentálně ve fázi vývoje pro budoucí využití. Moderní biotechnologie se primárně zaměřují na navýšení produkce již známých producentů pomocí různých biotechnologických postupů. Pozornost je ale také věnována novým organismům, které se upravují pomocí genetického a metabolického inženýrství a poté jsou schopny produkovat nové produkty.

Cílem bakalářské práce je uvedení do problematiky biotechnologické výroby potravinářských barviv a přehled používaných organismů.

# 1 CHARAKTERISTIKA POTRAVINÁŘSKÝCH BARVIV

Potravinářská barviva jsou látky, které se přidávají do potravin za účelem zlepšení jejich barvy. Nahrazují barvu, která se ztratila během zpracování a zajišťují shodu s původním vzhledem. Obecně se rozdělují na přírodní a syntetická, podle toho, jestli jsou substance extrahovány z přírodních zdrojů nebo byly vyrobeny. [1]

## 1.1 Legislativa

Přidatné látky jsou podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách definovány:

*„potravinářskou přídatnou látkou“ látka, která není obvykle určena ke spotřebě jakožto potravina a ani není obvykle používána jako charakteristická složka potraviny, ať má či nemá výživovou hodnotu, a jejíž záměrné přidání do potraviny z technologického důvodu při výrobě, zpracování, přípravě, úpravě, balení, dopravě nebo skladování má nebo pravděpodobně bude mít za následek, že se tato látka nebo její vedlejší produkty stanou přímo či nepřímo složkou této potraviny.*

Nařízení definuje užití přídatných látek jako ingrediencí při výrobě či přípravě potravin. Rozděluje aditiva do více než 20 tříd podle jejich funkce. Jednou z nich jsou také potravinářská barviva. [2, 3]

Podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách jsou potravinářská barviva definována:

*„Barvivy“ se rozumějí látky, které potravině dodávají barvu nebo barvu obnovují a zahrnují přírodní složky potravin a přírodních zdrojů, jež jako takové nejsou obvykle požívány jako potraviny a nejsou obvykle používány jako charakteristické složky potravin. Ve smyslu tohoto nařízení jsou barvivy přípravky získané z potravin a dalších jedlých materiálů z přírodních zdrojů extrakcí fyzikální nebo chemické povahy, která má za následek selektivní oddělení pigmentů vzhledem k výživovým nebo aromatickým složkám.*

V příloze II tohoto dokumentu je uveden seznam potravinářských přídatných látek schválených pro použití v potravinách a podmínky užití v rámci Evropské unie. Povolena barviva jsou uvedena v části B. Jejich přehled je zobrazen níže v tabulce 1.

Tabulka 1 Seznam schválených potravinářských barviv [3]

|        |  |
|--------|--|
| E 100  | Kurkumin                                   |
| E 101  | Riboflavin/Riboflavin-5'-fosfát            |
| E 102  | Tartrazin                                  |
| E 104  | Chinolinová žlut'                          |
| E 110  | Žlut' SY (Sunset Yellow FCF, Gelborange S) |
| E 120  | Košenila, kyselina karmínová, karmíny      |
| E 122  | Azorubin (Carmoisin)                       |
| E 123  | Amarant                                    |
| E 124  | Ponceau 4R (košenilová červeň A)           |
| E 127  | Erythrosin                                 |
| E 129  | Allura Red AC / Červeň AC                  |
| E 131  | Patentní modř V                            |
| E 132  | Indigotin (Indigocarmine)                  |
| E 133  | Brilantní modř FCF                         |
| E 140  | Chlorofyly a chlorofyliny                  |
| E 141  | Měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů |
| E 142  | Zeleň S                                    |
| E 150a | Karamel                                    |
| E 150b | Kaustický sulfitový karamel                |
| E 150c | Amoniakový karamel                         |
| E 150d | Amoniak-sulfitový karamel                  |
| E 151  | Čerň BN (čerň PN)                          |
| E 153  | Rostlinná uhlíková čerň                    |
| E 155  | Hněď HT                                    |

|        |   |
|--------|---|
| E 160a | Karoteny                                  |
| E 160b | Annatto bixin, norbixin                   |
| E 160c | Paprikový extrakt, kapsanthin, kapsorubin |
| E 160d | Lykopen                                   |
| E 160e | $\beta$ -apo-8'-karotenal (C30)           |
| E 161b | Lutein                                    |
| E 161g | Kanthaxanthin                             |
| E 162  | Betalainová červeň, betanin               |
| E 163  | Antokyany                                 |
| E 170  | Uhličitan vápenatý                        |
| E 171  | Oxid titaničitý                           |
| E 172  | Oxidy a hydroxidy železa                  |
| E 173  | Hliník                                    |
| E 174  | Stříbro                                   |
| E 175  | Zlato                                     |
| E 180  | Litholrubin BK                            |

Přidatné látky se také rozdělují do skupin podle povoleného množství použití v daných kategoriích.

Podle článku 8 uvedeného Nařízení lze potravinářská barviva na seznam zařadit kromě obecných podmínek podle čl. 6 odst. 2, pokud slouží jednomu nebo více z těchto účelů:

- a) dojde k obnovení vzhledu potravin, pokud byla jejich barva narušena přes mez přijatelnosti z důvodu zpracování, skladování, balení a distribuci;
- b) zvýšená vizuální atraktivita potravin;
- c) obarvení jinak bezbarvé potravin. [3]

Přidatné látky, které obsahují GMO, sestávají z nich nebo jsou z nich vyrobeny se řídí také podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1829/2003 o geneticky modifikovaných potravinách a krmivech a podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách. Pokud potravinářská přídatná látka obsahuje GMO, její bezpečnost se hodnotí podle Nařízení č. 1829/2003 a konečné povolení je udělováno podle Nařízení č. 1333/2008. [3, 4]

## 1.2 Karotenoidy

Karotenoidy jsou v tucích rozpustné, žluté, oranžové nebo červené pigmenty. Vyskytují se ve všech vyšších rostlinách a některých zvířatech. Přesto zvířata nemohou karotenoidy syntetizovat, tudíž jejich přítomnost je dána druhem přijímané potravy (růžová barva lososovitých ryb). Ve fotosyntetizujících organismech se karotenoidy podílí na sběru světla a jsou nezbytné pro fotoprotekci rostlinných pletiv. [7]

Všechny karotenoidy jsou tetraterpenoidy, což jsou terpeny skládající se z osmi isoprenových jednotek. Jejich struktury se pak liší různými substituenty, druhy vazeb a cyklickými formami. Tato skupina látek má přes 700 struktur, které se mohou dělit do dvou skupin: karoteny, které ve svých strukturách obsahují pouze vodík a uhlík a xantofyly, které ve svých strukturách obsahují kromě vodíku a uhlíku také kyslík. [6]

V rostlinách se karotenoidy syntetizují kondenzací univerzálního isoprenoidového prekurzoru isopentenylu difosfátu a dimethylallyl difosfátu. Tyto prekurzory jsou produkovány dvěma nezávislými dráhami v rostlinách: mevalonátová (MVA) dráha a methylerythritolfosfátová (MEP) dráha. Prokaryota tyto dráhy využívají také, zatímco u archeí se využívá MVA dráha, u bakterií funguje převážně MEP dráha. [9]

### 1.2.1 Hlavní zástupci karotenoidů

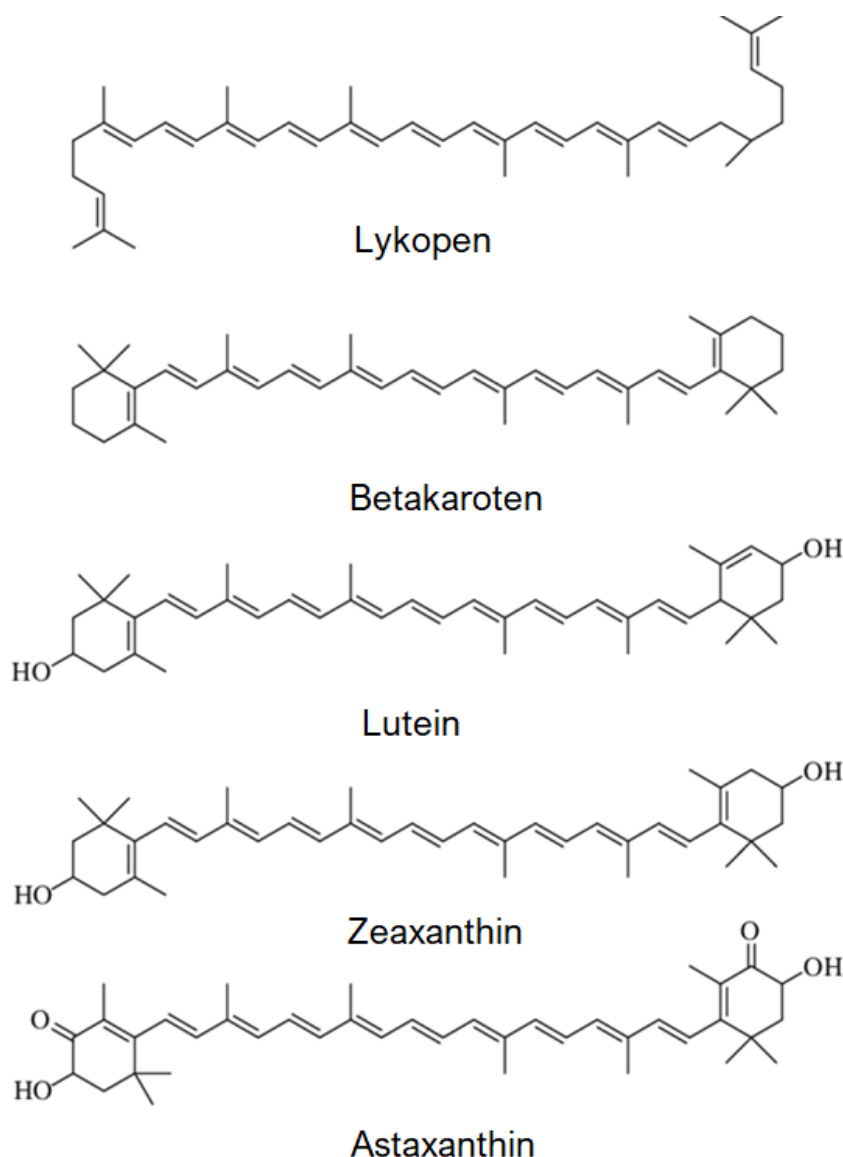
Mezi nejdůležitější zástupce karotenoidů patří  $\beta$ -karoten, který hraje důležitou roli pro lidské zdraví, protože je hlavním zdrojem pro zajištění dostatečného množství vitamínu A. Tato látka se běžně vyskytuje v přírodě a samotná i její chemicky blízké pigmenty se jako potravinářské barvivo používají již mnoho let. [18]

Xantofyl astaxanthin je běžně využíván v akvakulturách lososovitých ryb jako přídavek do krmiv a je jeden z nejdražších a nejdůležitějších průmyslových pigmentů. Je odpovědný za růžovou a červenou barvu lososovitých ryb a krevet. Díky svým silným antioxidačním vlastnostem se využívá také v kosmetice, nutraceuticích a v některých státech jako přídatná

látka do potravin a nápojů. Syntetický astaxantin se v potravinářském průmyslu příliš nepoužívá. Důvodem jsou zatím dostatečně neprověřené účinky dlouhodobé konzumace na lidské zdraví a také jeho vysoká cena. [40]

Důležitou složkou mnoha rostlin je také lutein, dominantní xantofyl se strukturou podobnou  $\beta$ -karotenu. Tento žlutý pigment se vyskytuje ve vyšších rostlinách a řasách. Lutein je přidáván do krmiv pro zvýraznění barvy peří ptáků a pro standardizaci barvy žloutků a brojlerů. [6]

Na obrázku 1 jsou zobrazeny struktury nejznámějších karotenoidů.



Obrázek 1 Vzorce vybraných karotenoidů [20]

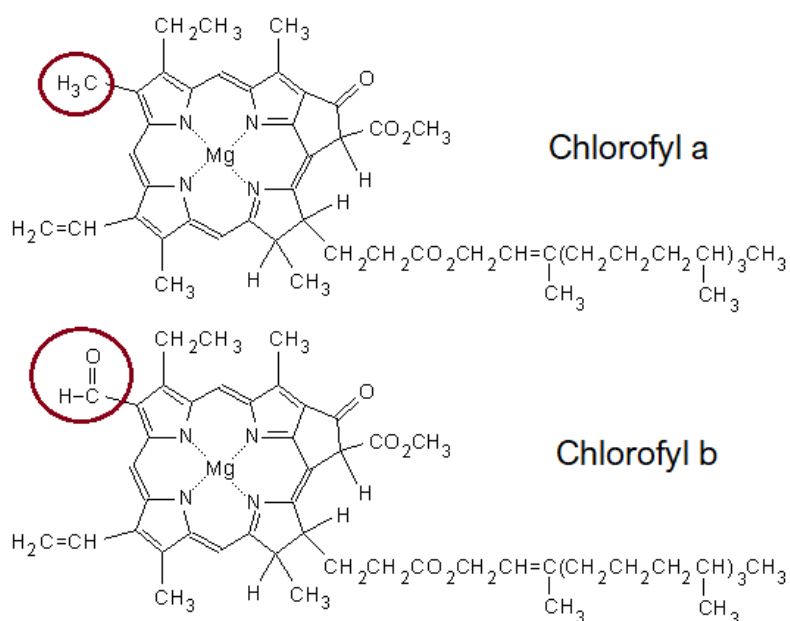
### 1.3 Chlorofyly

Tyto nejhojněji zastoupené přírodní pigmenty jsou zdrojem zelené barvy ve všech rostlinách, řasách nebo některých bakteriích, které jsou schopné fotosyntézy. Chlorofyl je hlavní pigment odpovědný za absorpci světla v sinicích a jiných fotoautotrofních organismech. Chlorofyly a jejich výzkum získávají pozornost nejen díky jejich významu jako barviv, ale také jejich důležitosti v žijících systémech. [8, 18]

Chlorofyly jsou cyklické tetrapyrroly s chelatovaným iontem hořčíku ve středu. V rostlinách se vyskytují ve dvou formách a a b, které se liší pouze substitucí na jednom uhlíku tetrapyrrolového kruhu. V sinicích se přirozeně vyskytuje šest různých forem chlorofylu a, b, d, f a divinyl-chlorofyl a a b. [7, 8]

Celá syntéza chlorofylů probíhá v plastidech a skládá se z několika enzymaticky katalyzovaných kroků. Klíčovým prekurzorem pro syntézu porfyrinů je kyselina 5-aminolevulinová (ALA), která může vznikat dvěma způsoby: C-4 dráhou (z  $\alpha$ -ketoglutarátu nebo glutamátu) nebo C-5 dráhou (kondenzací sukcinyl-CoA s glycinem). Z osmi molekul ALA pak vznikne protoporfyrin IX, na který se naváže hořčík a fytyl difosfát a vznikne chlorofyl a. [18]

Na obrázku 2 jsou zobrazeny chemické vzorce chlorofylu a a b. Rozdílný substituent je barevně vyznačen.



Obrázek 2 Chemické vzorce chlorofylu a a b [65]

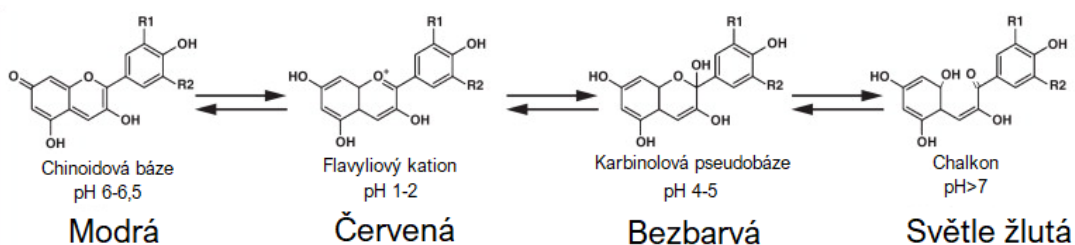
## 1.4 Antokyany

Antokyany jsou ve vodě rozpustné pigmenty, které patří k flavonoidům odpovídajícím za různé barvy v rostlinách a jejich plodech. Jejich barevné variace mohou být modré, fialové, červené nebo oranžové. [5, 7]

V přírodě se přirozeně vyskytují ve formě glykosidů, ve kterých je molekula antokyanidinu spojena s nějakým sacharidem. Antokyany mohou být rozděleny do skupin podle substituentů na B-kruhu, podle počtu konjugovaných molekul sacharidů nebo přítomnosti acylové skupiny. [10]

Rozdíly v hydroxylaci B-kruhu způsobují změny v barevných variacích antokyanů. Pelargonidiny jsou oranžové až červené, cyanidiny červené až červenofialové a delphinidin červeno-fialový až modrý. Další v přírodě se často vyskytující látky, které řadíme také do skupiny antokyanových barviv, jsou peonidin, petunidin a malvidin.

Antokyany mění barvu v závislosti na pH a vyskytují se ve čtyřech možných formách. Tato nestabilita barvy (hlavně při neutrálním a vysokém pH) způsobuje velké problémy při použití antokyanů jako přírodních potravinářských barviv. Formy závislé na pH jsou zobrazeny na obrázku 3. [11]



Obrázek 3 Změna forem antokyanů v závislosti na pH [11]

Antokyany jsou v rostlinách syntetizovány flavonoidovou dráhou. Tři molekuly malonyl-CoA a jedna molekula 4-kumaroyl-CoA (vznikající z fenylalaninu nebo tyrosinu) jsou sloučeny a tvoří chalkony. Pomocí chalkon izomerázy je katalyzována izomerace a chalkony se přemění na flavanony. Pomocí flavanon 3-hydroxylázy se flavanony hydroxylují na dihydroflavonoly a tyto molekuly jsou redukovány dihydroflavonol 4-reduktázou na leukoantokyanidiny. Ty pak mohou být přeměněny přes katechin nebo přímo pomocí antokyanidin syntázy na antokyanidiny. [12]

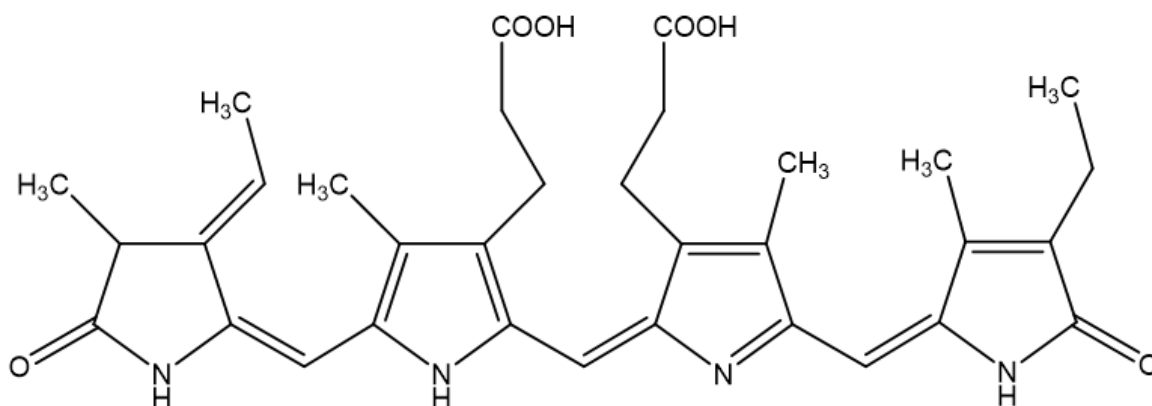


## 1.5 Fykobiliproteiny

Fykobiliproteiny jsou barevné tetrapyrrolové biliproteiny, které absorbují sluneční záření v rozsahu vlnových délek, kde chlorofyl vykazuje nízkou absorpci. Jsou specificky uspořádány v tzv. fykobilizomech, což jsou supramolekulární proteinové komplexy. Tyto proteiny se obecně rozdělují do skupin podle jejich absorpčního spektra, jmenovitě fykoerythrin (červený), fykocyanin a allofykocyanin (modré). [8]

Fykocyanin je rozpustný ve vodě a obsahuje chromofor fykocyanobilin, což je lineární tetrapyrrol. Tento pigment je znám jako spirulina, což je také doplněk stravy bohatý na proteiny ze sinic. Tato jedlá sinice rodu *Arthrospira* je kvůli svému názvu často zaměňována s druhem *Spirulina maxima* a *S. platensis*. V Evropské unii je použití modrého extraktu ze spiruliny omezeno na použití v určitých potravinách. [7, 13] Více informací je uvedeno v kapitolách 2.1 a 2.4.

Na obrázku 4 je uveden vzorec fykocyanobilinu.



Obrázek 4 Chemický vzorec fykocyanobilinu [61]

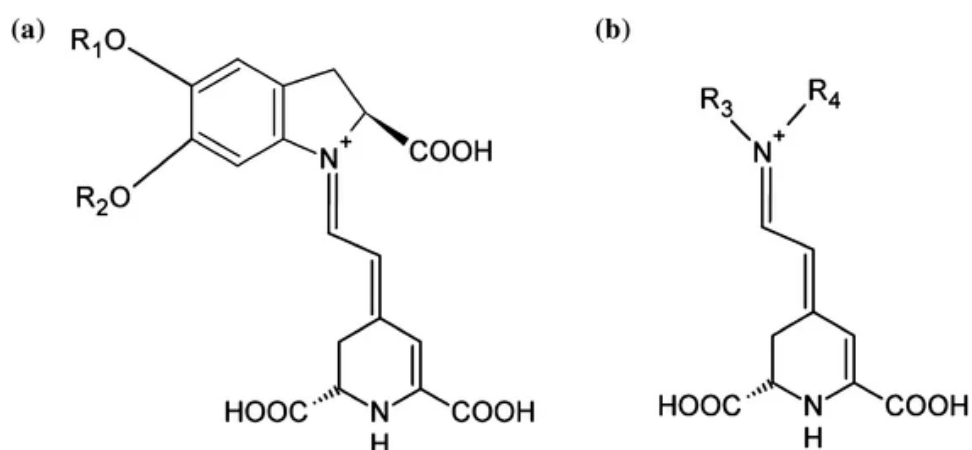
## 1.6 Betalainy

Betalainy jsou ve vodě rozpustné a dusík obsahující pigmenty, které se dělí na červené betakyaniny a žluté betaxanthiny. Vyskytují se pouze v 17 známých čeledích řádu hvozdíkotvaré (*Caryophyllales*). Vzhledem k tomu, že nejsou toxické ani alergenní a vykazují stabilitu ve velkém rozsahu hodnot pH, mají velký potenciál jako náhrada syntetických barviv. Není znám případ výskytu betalainů a široce vyskytujících se antokyanů souběžně ve stejném druhu.

V přírodě je známo přibližně 60 betakyanů a 33 betaxanthinů. Betakyaniny jsou glykosidy nebo aglykosidy betanidinu, zatímco betaxanthiny jsou kondenzované produkty kyseliny betalamové s aminy nebo aminokyselinami.

Biosyntéza betalainů začíná L-tyrosinem, který je hydroxylován tyrosinázou na 3,4-dihydroxy-L-fenylalanin (L-DOPA). DOPA je stejným enzymem oxidován na dopachinon a dopa 4,5-dioxygenáza přemění L-DOPA na 4,5-seco-L-DOPA. Dopachinon spontánně tvoří cyclo-DOPA, zatímco spontánní cyklizace 4,5-seco-DOPA tvoří betalamovou kyselinu, hlavní meziproduct při tvorbě všech betalainů. Reakcí betalamové kyseliny s cyclo-DOPA vzniká betanidin a při reakci s aminokyselinou nebo aminem vzniká betaxanthin. [2, 6]

Na obrázku 5 jsou uvedeny obecné chemické vzorce betakyanů a betaxanthinů. Substituenty R jsou většinou vodík, acylové a cukerné skupiny nebo aminy. [63]



Obrázek 5 Obecné chemické vzorce betakyanů (a) a betaxanthinů (b) [63]

## 1.7 Riboflavin

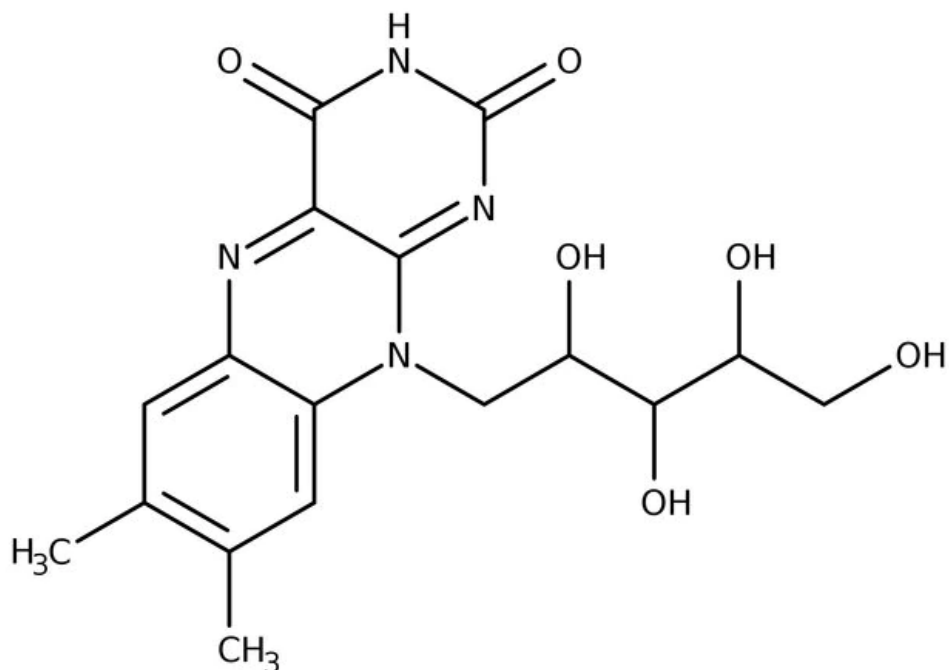
Riboflavin, také znám jako vitamin B<sub>2</sub>, je syntetizován rostlinami, houbami a mikroorganismy. Syntéza riboflavinu v živočišných tkáních není možná z důvodu absence endogenní biosyntetické dráhy, a proto jej živočichové musí získávat z potravy. Má strukturu isoalloxanového kruhu s ribitolovým postranním řetězcem. Je to prekurzor riboflavin-5'-monofosfátu a flavinadenindinukleotidu, což jsou koenzymy mnoha enzymů, které se podílí na oxidačních reakcích při buněčném dýchání.

Pro svou žlutozelenou barvu je riboflavin používán jako potravinářské barvivo, ale mezi jeho další důležité role patří přínosy pro lidské zdraví. Podporuje např. raný vývoj mozku po

narození, potlačení migrény, je důležitý v prevenci rakovinného bujení nebo kožních chorob. Známé jsou také problémy způsobené nedostatkem riboflavinu jako anémie, poškození ledvin nebo degenerativní změny nervového systému.

Syntéza riboflavinu probíhá za účasti řady enzymů v sedmi krocích z guanosintrifosfátu (GTP) a ribulózy-5-fosfátu. Prvním krokem je hydrolýza GTP pomocí GTP cyklohydrolázy II na 2,5-diamino-6-ribozylamin-4(3H)-pyrimidindion-5'-fosfát. Ribulóza-5-fosfát je přeměněna DHBP syntázou na 3,4-dihydroxy-2-butanon-4-fosfát (DHBP). Následně probíhá deaminace a redukce pyrimidinu z intermediátu 2,5-diamino-6-ribozylamino-4(3H)-pyrimidindionu na 5-amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-fosfát (ArPP). Další reakcí je defosforylace, která je katalyzována hydrolázou, která přeměňuje ArPP na 5-amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (ArP). Meziprodukty DHBP a ArP se účastní kondenzace a tvoří prekurzor riboflavinu 6,7-dimethyl-8-ribitylluminazin. Ten je katalyzován riboflavin syntázou a mění se na konečný produkt riboflavin. [14, 15]

Na obrázku 6 je uveden chemický vzorec riboflavinu.



Obrázek 6 Chemický vzorec riboflavinu [64]

## 2 VÝZNAM POUŽITÍ BARVIV V POTRAVINÁŘSTVÍ

Podle potravinářských technologů se jídlo nejdříve „jí“ očima. Barva potraviny dokáže ovlivnit názor konzumenta a potlačit nebo zvýšit jeho chuť. Je známo, že si konzumenti rádi vybírají výrazně zbarvené potraviny. Současně také očekávají specifickou barvu od určitého produktu, například oranžovou u pomerančového džusu, růžovou u jahodového a světle žlutou u ananasového. Nevhodná barva může připadat spotřebiteli neuspokojující a ovlivňovat jeho názor na kvalitu potraviny. Na druhou stranu, některá jídla mají přirozeně bílou barvu, jako mléko a rýže. Pokud jsou výrazně obarveny, není to pro spotřebitele atraktivní.

Část pigmentu se může ztratit během zpracování a skladování surovin nebo výrobků. Neadekvátní barvu může mít také ovoce, které je sklízeno mimo sezónu. Některé z těchto ztrát přirozené barvy je možné řešit přidávkem barviva pro dosažení přijatelného produktu. Obzvláště významnou roli hraje barva ve výrobcích pro děti, což se týká např. cukrovinek, zmrzliny, obilných výrobků atd. Některá syntetická barviva jsou dnes spojována se snižováním pozornosti dětí a výrobci se je snaží nahradit bezpečnými alternativami. [2, 16]

Z důvodu možných negativních dopadů konzumace syntetických barviv na lidské zdraví se výrobci potravin obracejí k přírodním barvivům, což reflektuje průmyslová produkce tzv. biopigmentů. Mezi významná potravinářská barviva řadíme mikrobiální pigmenty. Mikrobiální fermentace je nejpoužívanější technika výroby pigmentů, jelikož nabízí mnoho výhod jako je poměrně nenáročné podmínky kultivace, nízké nároky na downstream procesy, vyšší výtěžek ve srovnání se získáváním z jiných zdrojů, jednoduché získávání kmenů a eliminace vlivu ročního období na kultivaci mikrobiální biomasy. Uvedení průmyslově vyráběných barviv pomocí mikrobiální fermentace na trh závisí na mnoha faktorech. Je nutné povolení organizací jako FDA/WHO, kapitál pro uvedení na trh a přijetí trhem. [39, 43]

### 2.1 Mlékárenský průmysl

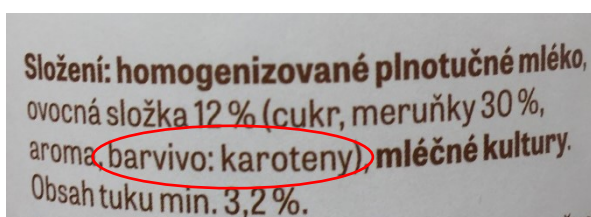
Vzhledem k řadě pozitivních vlivů konzumace mléčných výrobků na lidské zdraví jsou přírodní barviva vhodnou přídatnou látkou. Mezi běžně používaná barviva v mlékárenství patří karotenoidy a antokyany. Karotenoidy jako annatto, paprikový extrakt a beta-karoten zajišťují různé odstíny žluté a oranžové při výrobě sýrů. Antokyany extrahované z ovocných a zeleninových zdrojů dodávají barvu kysaným výrobkům jako jsou jogurty a fermentované mléčné nápoje.

Často používaným způsobem barvení mléčných produktů je také přidání tzv. „barvicích potravin“, což jsou koncentrované šťávy z ovoce nebo zeleniny. Tyto složky jsou získávány bez chemických rozpouštědel, využívá se fyzikálních metod jako pokrájení a vaření. Tyto šťávy ovšem neobsahují pouze pigment, ale také další látky rozpustné ve vodě.

Některá barviva mohou být nevhodná při výrobě jogurtů. Špatně zvolený pigment v ovocné složce na dně kelímku může migrovat do mléčné složky během skladování. Tento vliv řeší barviva na bázi lykopenu, který v ovocné části zůstává. Lykopen je také stabilní při UHT pasteraci. Problémem při použití antokyanů v mléčných výrobcích je jejich nestabilita v závislosti na změnách pH. Mohou měnit svou barvu na modrou nebo rychle vyblednout. [11, 30]

Přírodní barviva a barvicí potraviny jsou často používány v mražených krémech pro zvýraznění a standardizaci barvy. Stabilita barvy závisí na různých parametrech, které jsou důležité při výběru správného pigmentu. Během produkce a skladování musí být pigment stabilní proti oxidaci, teplu a jiným degradačním reakcím. Některé pigmenty jsou stabilní pouze v určitém rozmezí pH, např. již zmíněné antokyaniny. Některé emulze barvicích směsí mohou ovlivnit stabilitu zmrzliny. Kromě výše uvedených technologických požadavků musí použítá barviva také odpovídat legislativním předpisům, které se mohou na různých trzích měnit. [2]

Na obrázku 7 je uvedeno složení meruňkového zákysu, který obsahuje karoteny jako barvivo.



Obrázek 7 Mléčný výrobek obsahující karoteny jako barvivo

## 2.2 Pekařský průmysl

Obilné výrobky se vyrábí z různých obilných zdrojů jako pšenice, ječmen, oves, kukuřice, rýže a žito. Existuje velké množství obilných výrobků zahrnující chléb, snídaně cereálie, těstoviny, jemné pečivo a slané snacky.

Trendem ve výrobě snídaňových cereálií je vývoj produktů se zvýšeným obsahem vlákniny, proteinu a sníženým obsahem cukru. Celozrnné produkty jsou žádané díky jejich potenciálním zdravotním přínosům. S rostoucími požadavky spotřebitelů na zdravou výživu ovlivňuje trend použití přírodních zdrojů také výběr potravinářských barviv do těchto výrobků. Extrudované cereálie jsou obzvláště atraktivní pro děti, a proto jsou vyráběny barevné produkty různých tvarů jako kuličky, kolečka a lupínky. [2]

Podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1333/2008 se obilné produkty rozdělují do kategorií. Snídaňové cereálie spadají do kategorie 6.3, pro které se povoluje užití potravinářských barviv E 120, E 150c, E 160a, E 160b, E 160c, E 162, E 163. Toto povolení platí pouze pro cereálie s ovocnou příchutí (E 150c, E 160a, E 160b, E 160c také pro extrudované pufované snídaňové cereálie). [3]

Mezi pekárenské výrobky patří také sladké a jemné pečivo jako dorty, sušenky a muffiny. Ingredience používané pro výrobu těchto produktů většinou zahrnují pšeničnou mouku, vejce, cukr, máslo nebo rostlinný olej, mléko, kypřící látku, aroma a barvivo. Nejvíce jsou používána barviva rozpustná ve vodě. Při procesu výroby prochází produkt tepelnou úpravou při vysokých teplotách. To je pro přírodní barviva kritický proces, a tudíž by vybraná barviva měla být odolná, aby vydržela proces pečení. Pokud výrobce použije průhledný obal, je také nezbytná odolnost použitého barviva vůči světlu. [2, 31]

### 2.3 Nápojový průmysl

Významné množství prodaných potravinářských barviv představuje průmysl nealkoholických nápojů. Je faktem, že barevné nápoje jsou pro konzumenta přitažlivější a podporují jeho vnímání chuti, vytvoření si názoru na obsah ovocné složky a celkové hodnocené kvality nápoje. Nápoje lze rozdělit do hlavních kategorií: ready-to-drink, dilute-to-taste, posilující, nápoje v prášku a alkoholické nápoje.

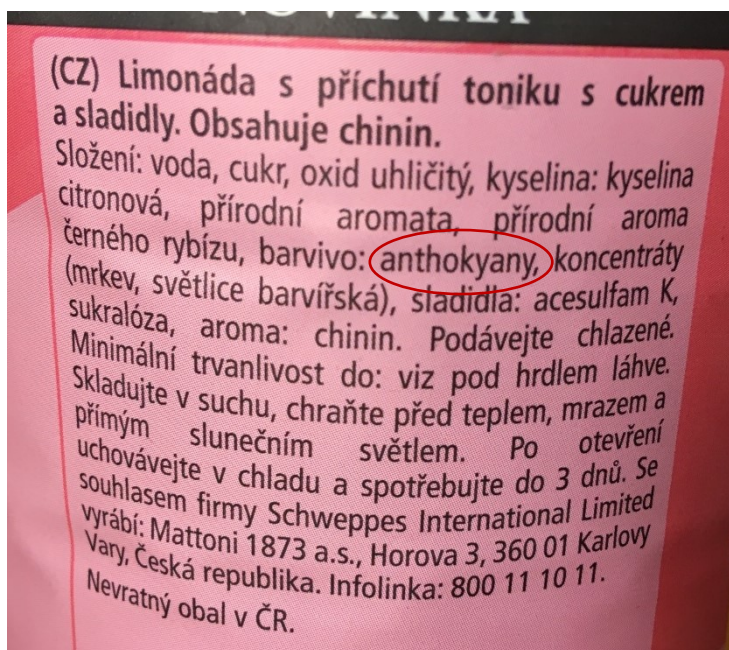
Mezi nejčastěji používanými pigmenty při výrobě nápojů jsou karoteny, antokyany, karmín, karamely a měďnaté komplexy chlorofylinů. Problémy s použitím pigmentů v nápojářství mohou být různé, mezi hlavní patří:

- Ztráta barvy/hnědnutí po přidání kyseliny askorbové (vitamin C). Tento efekt nastává se syntetickými barvivy jako ponceau 4R a přírodními pigmenty na bázi antokyanů.
- Blednutí při výskytu SO<sub>2</sub>

- Špatná stabilita karmínu a měďnatého chlorofylinu v kyselém prostředí, která vede ke srážení pigmentu.
- Nevzhledný oranžový až hnědý mastný kruh na hladině oranžových dilute-to-taste nápojů. Tento jev je připisován hlavně  $\beta$ -karotenu při rozpadu suspenze/emulze a postupné migraci zabarvené olejové složky na hladinu nápoje. To může vést až ke krystalizaci pigmentu.

Tyto problémy se stabilitou barviv při výrobě nápojů pomáhají překonat různé techniky. Použití antokyanů z alternativních zdrojů, které mohou být méně náchylné k degradaci v přítomnosti kyseliny askorbové. Přídavek malého množství  $\text{SO}_2$ , který bude přednostně reagovat s degradačními produkty kyseliny askorbové (peroxidem). Pro předcházení ztráty barvy karotenoidů je doporučeno přidání kyseliny askorbové do produktu a pro jejich nejlepší stabilitu v nápoji karotenoidy přidávat jako roztok. [16, 17]

Na obrázcích 8 a 9 lze vidět složení různých nápojů, ve kterých jsou použita přírodní barviva.



Obrázek 8 Limonáda obsahující antokyany jako barvivo



Obrázek 9 Energetický nápoj obsahující riboflavin jako barvivo

## 2.4 Cukrovinky

Výroba cukrovinek a želatinových produktů je charakterizována nízkou vodní aktivitou díky vysokému obsahu sušiny nebo přidavku hydrokoloidů, které navazují přítomnou vodu do gelové matrice. Mezi hlavní kategorie cukrovinek patří želé, kandytová hmota, pěnové výrobky, žvýkačky a dražé. Obecně má většina těchto výrobků nízké pH, jelikož obsahují ovocnou složku nebo mají ovocné aroma, které je spojované s kyselou chutí.

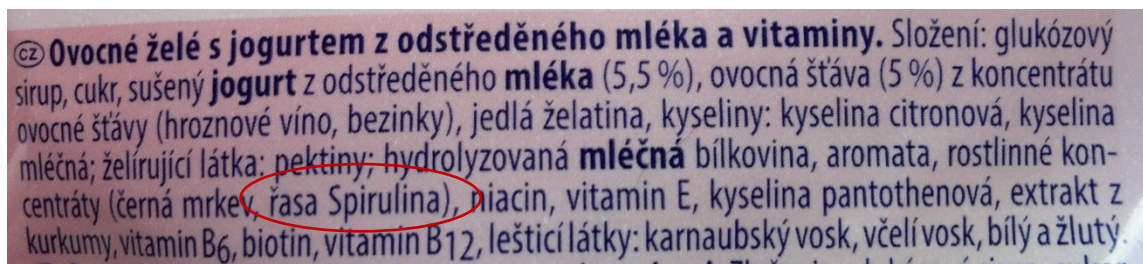
Kvůli různému složení cukrovinek je nutné zvážit několik faktorů důležitých pro výběr vhodného přírodního barviva. Použité suroviny a postup výroby mají za následek různé odstíny výrobků, např. průhledná bezbarvá kandytová hmota oproti nažloutlému želé nebo bílý fondán proti hnědým karamelám. Přítomnost ovocné složky ve výrobcích může také ovlivnit výslednou barvu výrobku. Dalším faktorem je odolnost vůči vysoké teplotě, nízkému pH, stabilita při dlouhodobém skladování a tendence oxidace v aerovaných produktech. Možné jsou nežádoucí reakce pigmentů s ostatními složkami, jako destabilizace antokyanů s kyselinou askorbovou nebo interakce pigmentů s aromaty. Je tak nutné využívat takové pigmenty, které jsou odolné vůči kyselému prostředí, nebo využít tzv. zapouzdření, které ochrání barvivo před nepříznivým prostředím. [2, 29]

Při výrobě cukrovinek také velmi stoupá popularita barvicích potravin. Jelikož jsou to více ingredience než přídatné látky, nepotřebují E kód a na obalech jsou většinou označeny jako „extrakt z...“. Extrakt může pocházet například z černé mrkve, červené řepy nebo také ze spiruliny. Extrakt ze spiruliny je momentálně jediný legislativně povolený způsob použití modrého fykocyaninu jako potravinářského barviva. Pro spotřebitele může být označení extraktu příjemnější než označení E kódem, protože si pod jeho názvem dokážou lépe představit, o co se jedná a je zřejmé, že látka je přírodního původu. [32]

Problémy jako stabilita barviva při skladování a světelné expozici nebo migrace mezi vrstvami produktu mohou být díky dnešním technologiím překonány. I přesto je pro výrobce správný výběr pigmentu zdlouhavým, náročným a drahým procesem. [6]

Na obrázku 10 je uvedeno složení ovocného želé, které jako jedno z barviv obsahuje koncentrát ze spiruliny.





Obrázek 10 Ovocné želé obsahující koncentrát ze spiruliny jako barvivo

## 2.5 Maso a krmivářský průmysl

Přirozeným svalovým barvivem masa jatečných zvířat je myoglobin, který má v redukované formě červenou barvu. Při výrobě masných výrobků jako šunka se využívá dusitanové soli. Dusitan se v prostředí masa redukuje na oxid dusnatý. NO se váže na myoglobin a vzniká nitroxymyoglobin, který se působením teploty mění na růžově zbarvený nitroxymyochrom. Pokud se dusitanová sůl nepřidá, hemoglobin se mění na šedý metmyoglobin. Taková barva je typická pro vařené maso nebo světlou tlačenkou. [66]

Barva vaječných žloutků, drůbežího tuku a kůže jsou závislé na množství karotenoidů ve stravě ptáků. Ve většině zemí konzumenti preferují sytě barevný žloutek, ale nažloutlá barva masa není příliš žádaná. [2]

Konzumenti obecně preferují červeně zbarvené produkty lososovitých ryb. Znamená pro ně znaky kvality jako čerstvost a chuť. Tato barva je u divokých ryb způsobena karotenoidy, které získávají z potravy, hlavně korýšů. Je tedy v zájmu výrobce modifikovat barvu ryb přidávkou karotenoidů do krmiv, které se v barvě masa projeví.

Astaxanthin, jeden z nejdůležitějších karotenoidů, je dostupný z přírodních zdrojů (korýši, řasy, kvasinky), syntetické výroby a metabolického inženýrství. V květnu 1995 Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) povolil použití syntetického astaxanthinu jako pigmentu v krmivu pro zvířata a ryby. V Evropské unii je použití syntetického astaxanthinu omezeno limitem 100 mg/kg směsi krmiva. Kromě toho, Evropská komise obnovila v červenci 2020 povolení použití astaxanthinu dimethyldisukcinátu jako krmivářské přídatné látky pro ryby a korýše. Použití syntetického astaxanthinu jako přídatné látky v potravinách je zakázáno. [2, 40, 41]

### 3 ORGANISMY POUŽÍVANÉ PRO BIOTECHNOLOGICKOU VÝROBU BARVIV

Přidatné látky a barviva jsou v potravinářském průmyslu používána pro zvýšení bezpečnosti a kvality potravin během výroby, balení a skladování. Tyto látky pochází převážně z těchto tří zdrojů: extrakce z přírodních zdrojů, chemická syntéza a bioprodukce, z čehož se nejvíce využívají první dvě. S rostoucí poptávkou po produktech, které jsou přírodní, bezpečné a z udržitelných zdrojů se však pozornost obrací také na biotechnologickou produkci. Ta může mít oproti ostatním metodám výhody jako jsou nižší náklady, kontrolovatelný kultivační proces, vyšší výtěžnost a jednodušší složení produktu. [19]

Různorodost, produktivita a koncentrace produktů získaných biotechnologickými procesy může být zvýšena metabolicky a geneticky upravenými kmeny mikroorganismů. Výsledná úprava mění biokatalytickou dráhu buňky, která produkuje jiný protein a novou látku. [8]

Akumulace pigmentů v buňce je obecně spojena s růstem buňky a je ovlivněna nutričními faktory (dostupnost uhlíku, dusíku a jejich poměr), mikrobiologickými parametry (stáří spor, zárodku a inokula) a podmínkami prostředí. Ty zahrnují vlhkost média, fyzikální a strukturní vlastnosti substrátů, teplotu, pH a způsob míchání média. Pro fotosyntetické mikroorganismy jsou dalšími důležitými faktory, které ovlivňují tvorbu pigmentů také zdroj světla, intenzita a fotoperioda. [36, 37]

#### 3.1 Bakterie

Bakterie jsou jednobuněčné prokaryotické mikroorganismy, které jsou považovány za nejstarší na Zemi. Díky jejich jednoduché stavbě jsou vysoce adaptabilní na podmínky prostředí. Život na Zemi by bez bakterií nemohl existovat, protože bakterie hrají velmi důležitou roli v ekosystému. Dokáží vázat dusík z atmosféry, rozkládají organický materiál a některé druhy jsou schopné fotosyntézy. Výzkum bakterií umožňuje významný náhled do pochopení genetiky, ekologie a nemocí. [21]

##### 3.1.1 *Escherichia coli*

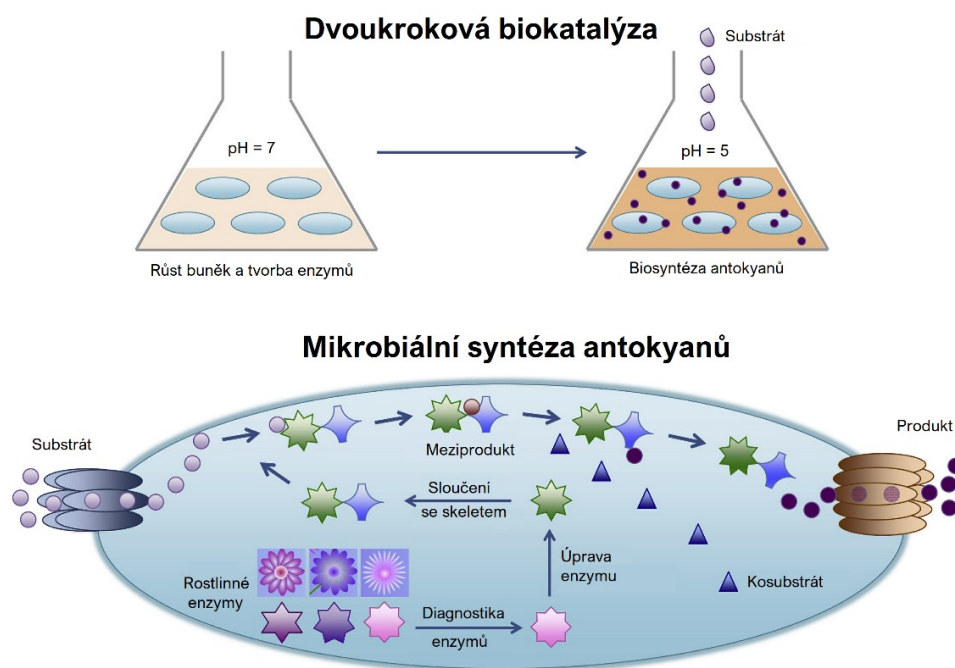
*Escherichia coli* je bakterie patřící do čeledi Enterobacteriaceae, což jsou gram negativní fakultativně anaerobní tyčinky (mají fermentativní i respiratorní metabolismus) a neprodukují enzym oxidázu. [53]

V moderních biotechnologiích je *E. coli* nesmírně důležitá. Genom této bakterie je znám již od roku 1997. Vzhledem k její důležitosti ve výzkumu genetiky a v biotechnologiích to byl jeden z prvních dokončených genomů vůbec. Byla první bakterií, která byla v roce 1973 použita k molekulárnímu klonování. Vědci ji dodnes využívají pro ukládání DNA sekvencí z jiných organismů, produkci proteinů a testování funkcí proteinů. [54]

Mezi pigmenty, které *E. coli* dokáže syntetizovat, patří antokyany. První pokus o jejich produkci byl zaznamenán v roce 2005, kdy rekombinantní *E. coli* vyprodukovala při přidavku katechinu do kultivačního média (prekurzor antokyanů) 439 mg/l kyanidinu 3-O-glukosidu. Tato výtěžnost však stále není dostatečná pro industriální produkci. [12]

Pro zvýšení produkce antokyanů v mikrobiálních buňkách byly vyvinuty různé metody, např. vytvoření úplně nového kmene pomocí koexprese různých rostlinných genů a enzymů. Problém spočívá v genové expresi v bakteriích, která se nemusí projevit stejně jako v rostlině. Pro *E. coli* byl pro zvýšení produkce kyanidinu nejvýhodnější enzym ANS z petúnie zahradní. Pro navýšení produkce prekurzoru naringeninů pomocí kyseliny kumarové byly využity enzymy 4CL, CHS a CHI z petúnie zahradní, tykve velkoplodé a huseníčka rolního. [12, 68] Schéma pro koexpresi je vyobrazeno na obrázku 11 dole.

Další metodou je dvoukroková biokatalýza. Antokyany jsou v neutrálním pH nestabilní, ale ve vnitřním prostředí buňky je pH neutrální. Prvním krokem je tedy kultivace při pH~7, ve kterém se tvoří enzymy a kosubstrát. Následuje převedení biomasy do čistého média o pH~5, při kterém probíhá syntéza stabilnější antokyanů. Do média je také přidán glutamát jako stabilizátor, který brání lyzi buněk při nízkém pH. Tato metoda zajišťuje zvýšení produkce u *E. coli* až 15x. [12, 55, 68] Schéma této kultivace je vyobrazeno na obrázku 11 nahoře.



Obrázek 11 Schéma dvoukrokové biokatalýzy a koexprese cizího enzymu v mikrobiální buňce [68]

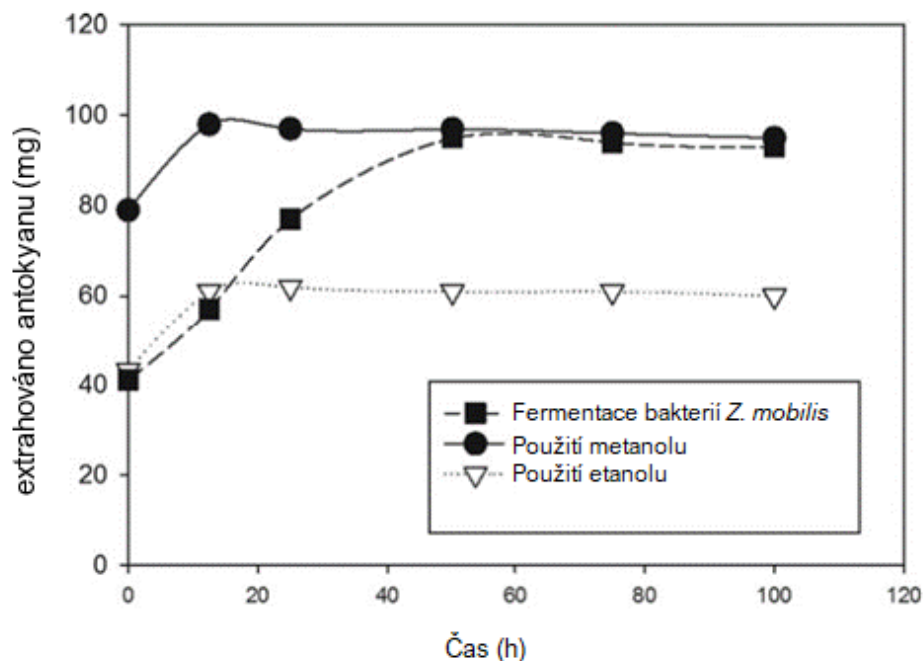
### 3.1.2 *Zymomonas mobilis*

*Zymomonas mobilis* je gramnegativní bakterie tyčinkového tvaru, která se může nacházet v rostlinách s mizou bohatou na cukry. [33]

Vysoké nároky na složení média omezují použití *Z. mobilis* v industriálním měřítku. Přesto má jeho využití mnoho výhod. Tento mikroorganismus dokáže odolat nízkému pH, vysoké koncentraci cukrů a etanolu. Těchto vlastností bylo využito při pokusu biologické extrakce antokyanů z hroznového vína (*Vitis vinifera*). Extrakci za nízkého pH (pomocí alkoholů nebo organických kyselin) se získávají stabilní flavyliové kationty. Antokyaniny získávané z rostlin snadno podléhají oxidaci a kondenzují v hnědé pigmenty, což je problém např. v nápojovém průmyslu (viz kap. 2.3).

Biologická extrakce antokyanů z hroznového vína využívá *Z. mobilis* jako producenta etanolu. Bakterie je schopna vyprodukovat dvakrát více etanolu a při nižším objemu biomasy než kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, která se tradičně pro produkci etanolu využívá. Při pokusu byla porovnávána výtěžnost antokyanů třemi způsoby: při použití 98% metanolu, 98% etanolu s 2% HCl a s využitím fermentace bakterií *Z. mobilis* jako producenta etanolu. Na obrázku 12 je vyobrazen graf porovnávající tyto tři metody. Výtěžnost fermentace s *Z.*

*mobilis* se vyrovnává té s metanolem za dvakrát delší dobu. Její produkty jsou ovšem stabilnější. [11]



Obrázek 12 Porovnání výtěžnosti tří způsobů extrakce antokyanů z hroznového vína [11]

## 3.2 Plísně

Vláknité mikroskopické houby patří mezi eukaryotní organismy s heterotrofní výživou, které získávají živiny absorpcí z okolí. Jejich morfologie a fyziologie má velkou rozmanitost a dokážou se přizpůsobit různým biotopům. V přírodě fungují jako dekompozitoři organické hmoty. Nejčastěji jsou saprofyty, ale je možný i parazitismus. [42]

### 3.2.1 *Blakeslea trispora*

*Blakeslea trispora*, plíseň patřící do oddělení zygomycety, je průmyslovým zdrojem  $\beta$ -karotenu. Organismus je saprofyt, který je v laboratorních podmínkách kultivován na chemicky definovaných půdách. Jeho vegetativní cyklus zahrnuje stadium spor, vláknitého myselia, plodnic a opět spor. Genetická analýza tohoto organismu se zaměřuje na izolaci mutantů a vychází z jeho fenotypů. [44]

Zajímavé je, že mycelia opačného pohlaví, která rostou společně, zvyšují akumulaci  $\beta$ -karotenu. Tento typ kultivace se také používá v průmyslové produkci. Nejvyšší výtěžek

39 mg/g  $\beta$ -karotenu byl získán při kultivaci mutantů s mezipohlavními heterokaryony, tzn. s buňkami obsahujícími jádra obou pohlaví. [44, 45]

Na obrázku 13 se nachází dvě různé kultivace plísně *Blakeslea trispora*. Na levé straně jde o společný růst dvou divokých kmenů opačného pohlavní (F921 typ - a F986, typ +). Lze zde dobře vidět navýšená produkce  $\beta$ -karotenu, což je výsledek pohlavních interakcí. Na pravé straně interaguje kmen (SB64, typ -), který vykazuje nadměrnou produkci  $\beta$ -karotenu s kmenem z levé strany. Na rozhraní kolonií je dobře vidět tmavší barva, která značí vyšší produkci při interakcích těchto dvou kmenů. [50]



Obrázek 13 Produkce  $\beta$ -karotenu pomocí interakcí kmenů *B. trispora* [50]

Stejně kmeny mohou být použity také pro výrobu lykopenu, kdy se aplikuje enzym lykopen cykláza inhibitor. Produkce  $\beta$ -karotenu plísní *B. trispora* je momentálně jedinou velkopřmyslovou výrobou fungálních karotenoidů. Tento karotenoid se dodává v krystalické podobě jako barvivo nebo provitamin A. [44]

### 3.2.2 *Monascus*

Plísně rodu *Monascus* produkují pigmenty jako užitečné sekundární metabolity. Tyto pigmenty jsou polyketidové povahy a mezi nejznámější patří oranžový monascorubrin, červený monascorubramin a žlutý ankaflavin a monascin.



Tradičně se pigment z plísně *Monascus* vyrábí pomocí červené fermentované rýže. Klasická rýže se nechá fermentovat dvěma mikroorganismy: *Monascus purpureus* a kvasinkami. Plíseň je schopna rozkladu škrobu na jednoduché cukry a kvasinky je poté fermentují na alkohol. V praxi plíseň roste na rýži a pigment produkovaný plísní se dostává do zrna, které pak získává svou charakteristickou červenou barvu. Celá hmota se poté rozdrťí na prášek a je dále používána jako potravinářské barvivo.

Moderní produkce využívá submerzní fermentaci, ve které se jednoduše ovládá prostředí kultivace. Fermentace na pevném médiu má ovšem obecně vyšší výtěžnost a produktivitu než submerzní fermentace. Při kultivaci plísně je nutné použít komplexní kultivační médium pro zajištění všech nezbytných růstových faktorů. Při porovnání těchto dvou metod byla výtěžnost pigmentu třikrát vyšší u fermentace na pevném médiu než u submerzní. [56]

Na obrázku 14 jsou kolonie *M. purpureus* kultivované na YM agaru. Pigment, který mycelium produkuje, je uvolňován do vnějšího prostředí. [59]



Obrázek 14 Kolonie plísně *Monascus purpureus* [59]

### 3.2.3 *Ashbya gossypii*

Plíseň *Ashbya gossypii* byla původně izolována z napadeného bavlníku (*Gossypium* sp.) a až později byla objevena její schopnost nadprodukce riboflavinu. Při nedostatku živin se mycelium této plísně přemění na sporangium, které tvoří riboflavin. Jeho funkcí je nejspíš chránit UV sensitivní spory.

Tato plíseň se pro produkci riboflavinu používá už více než 20 let. V minulosti se udávala výtěžnost riboflavinu více než 15 g/L riboflavinu. S dnešními objevy metabolického inženýrství by však měla být výtěžnost mnohem vyšší. Jako jeden z hlavních postupů pro zvýšení produkce se využívá nadměrné exprese genů pro riboflavin. Preferovaným médiem pro produkci riboflavinu jsou oleje. V průmyslu se využívají rostlinné oleje. [14, 57, 58]

## 3.3 Sinice

Sinice jsou oxygenní fototrofové, kteří se vyskytují skoro na všech osvětlených místech na Zemi. Během své dlouhé evoluce se tyto organismy adaptovaly na širokou škálu abiotických podmínek. Díky tomu jsou schopny fotosyntézy a fixace dusíku. Pro svůj růst vyžadují tato gramnegativní prokaryota primárně sluneční energii, vodu, prvky jako uhlík, dusík, draslík, fosfor, síru a železo. [8, 25]

Sinice jsou skvělým zdrojem peptidů, aminokyselin, vitaminů a pigmentů. Fykobiliproteiny získávané ze sinic se používají jako potravinářská barviva a získávají celosvětovou pozornost díky své bezpečnosti v porovnání se syntetickými barvivy. Podobně i karotenoidy, které jsou esenciální pro zvířata, jsou získávány z rostlin a mikroorganismů (sinice a mikrořasy). [8, 26]

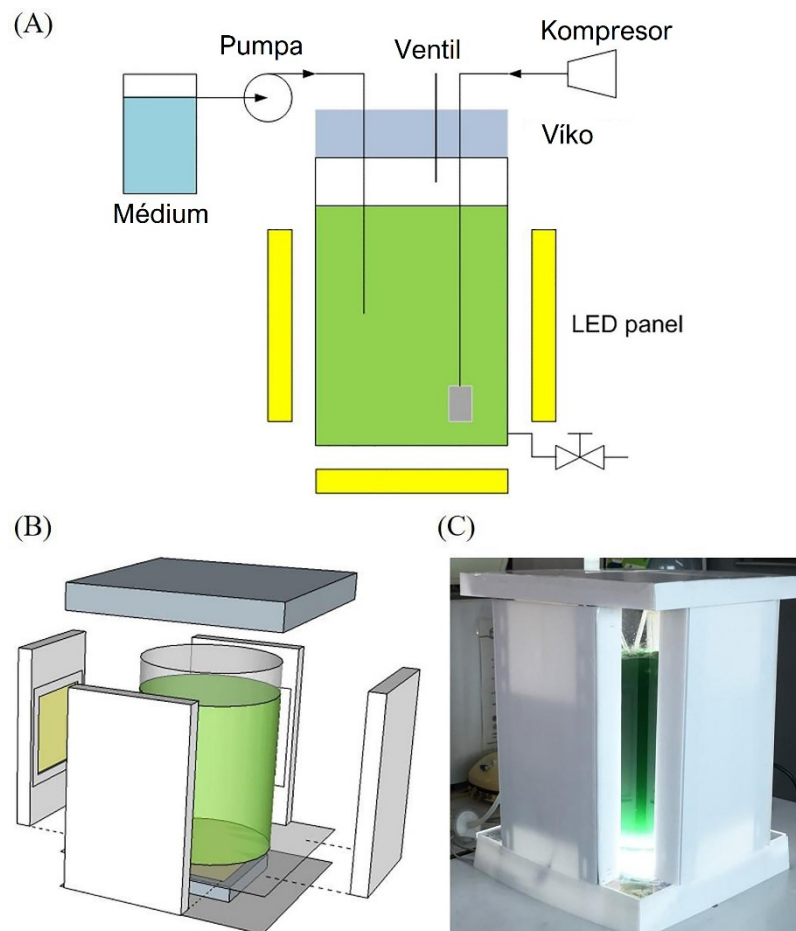
### 3.3.1 *Arthrospira platensis*

Tato vláknitá sinice roste v subtropických zásaditých jezerech s optimální teplotou 35 °C. Díky jejímu potenciálnímu přínosu pro lidské zdraví byla používána jako doplněk stravy už ve starověku. Je to bohatý zdroj proteinů (50-70 % sušiny), sacharidů, lipidů a fykocyaninu. *Arthrospira* obsahuje dva fykobiliproteiny: allofykocyanin a c-fykocyanin, které jsou obsaženy až ve 20 % sušiny. [28]

V produkčních kulturách je *Arthrospira* kultivována v mělkých nádržích nebo polouzavřených tubulárních bioreaktorech. Živné medium obsahuje anorganické soli s vysokým obsahem hydrogenuhličitanu, který udržuje hodnotu pH mezi 9-10. Venkovní podmínky při kultivaci ve vodních nádržích však mohou ovlivňovat zastoupení pigmentu a



je náročné udržovat stejný výnos po celý rok. Tuto limitaci řeší fotobioreaktor, který udržuje stálé podmínky světla, teploty a obsahu živin. V takovém prostředí může obsah fykocyaninu tvořit až 24 % sušiny. Na obrázku 15 je vyobrazeno schéma fotobioreaktoru (A), náčrtek fotobioreaktoru (B) a fotobioreaktor s kulturou *Arthrospira*. [27, 28]



Obrázek 15 Schéma (A), náčrtek (B) a fotografie fotobioreaktoru (C) [28]

### 3.4 Mikrořasy

Mikrořasy jsou velká skupina jednobuněčných eukaryotických fotosyntetizujících mikroorganismů, které jsou považovány za slibnou platformu pro udržitelnou produkci bioproduktů díky jejich schopnosti měnit sluneční energii a CO<sub>2</sub> na komerčně zajímavé organické složky. Jejich role při sekvestraci uhlíku a schopnost růstu ve sladké, mořské i odpadní vodě a poměrně vysokou rychlostí růstu představuje možnosti řešení enviromentálních problémů a snížení emise skleníkových plynů. [22]

### 3.4.1 *Dunaliella*

Rod *Dunaliella* zahrnuje halotolerantní, jednobuněčné, pohyblivé zelené řasy s významnými morfologickými a fyziologickými vlastnostmi patřící do čeledi zelenivek. Buňka postrádá silnou buněčnou stěnu a obsahuje jeden velký chloroplast.

*Dunaliella* si dokáže hromadit obrovské množství  $\beta$ -karotenu, primárně jako odpověď na zvýšenou intenzitu světla. Její kultivace je jednoduchá a rychlejší oproti rostlinám. Pro karotogenezi je důležitý dostatek živin, soli a nízký stresový faktor. Sklizeň biomasy je prováděna vyvločkováním, filtrací a produkt může být použit přímo jako krmivo nebo pro extrakci pigmentu. Ta se může provádět extrakcí v jedlém oleji nebo organických rozpouštědlech potravinářské kvality. Při ideálních podmínkách dokáže *Dunaliella salina* vyprodukovat 400 mg  $\beta$ -karotenu na m<sup>3</sup> kultivační plochy. [18]

Na obrázku 16 je vyobrazena biorafinérie ve španělském Monzónu. Při této produkci se využívá mořské vody a spalínového CO<sub>2</sub>, což ve výsledku znamená nižší emise a možnost kultivace po celý rok. [51]



Obrázek 16 Nádrž s *Dunaliella salina* [51]

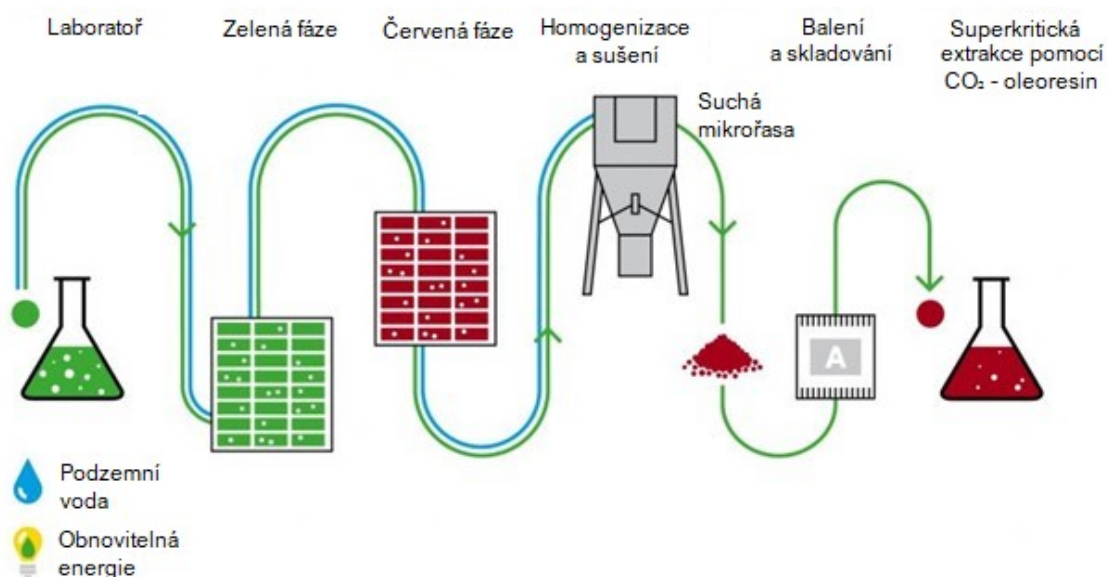
### 3.4.2 *Haematococcus pluvialis*

Zelená sladkovodní mikrořasa *Haematococcus pluvialis* patří do třídy zelenivky, je skvělým zdrojem astaxanthinu, silného antioxidantu využívaného v kosmetice, jako součást krmiva pro akvakultury, jako součást doplňků stravy a ve farmaceutickém průmyslu. Jeho tržní cena se pohybuje mezi 6 000 - 7 500 dolarů za kg a předpokládá se, že bude stoupat.

Obsah karotenoidů v sušině dospělé buňky odpovídá přibližně 2-5 %, z toho přes 80 % zastává astaxanthin. Při tvorbě astaxanthinu za stresových podmínek vytváří *H. pluvialis*

tuhou stěnu, která komplikuje extrakci astaxanthinu z vnitřního prostředí buňky. Proto je potřeba buněčnou stěnu narušit. Nejčastěji se využívá mechanických metod, jako vysokotlaká homogenizace, mletí zirkonovými kuličkami nebo superkritická extrakce pomocí CO<sub>2</sub> (dnes nejčastěji používaná metoda). Přestože jsou tyto metody účinné, jsou také velmi nákladné. Chemické metody (organická rozpouštědla, kyseliny, iontové kapaliny, nanomateriály) jsou levné a účinné, ale chemikálie mohou být škodlivé pro životní prostředí. Biologická metoda, která využívá nepohlavní rozmnožování sinic pomocí fragmentace, při které je přirozeně narušena stěna buňky, je šetrná, ale ne příliš efektivní. Nejslibněji dnes vypadá synergická kombinace homogenizace s mletím kuličkami v bezpečném rozpouštědle, která by mohla být využita pro průmyslové účely. [23, 24]

V České republice se astaxathin vyrábí ve firmě Algamo. Výroba má dvě hlavní fáze: zelenou a červenou. Během zelené fáze se řasa kultivuje a rozmnožuje v mikromodulech. Při vystavení UV záření začne *H. pluvialis* produkovat astaxanthin jako obranný mechanismus a začne červenat. Tím přechází produkce do červené fáze. Poté se biomasa vysuší a ze sušiny se pomocí superkritické extrakce pomocí CO<sub>2</sub> získává oleoresin bohatý na astaxanthin. Firma pro svou výrobu využívá podzemní vodu a obnovitelné zdroje. Schéma výroby je vyobrazeno na obrázku 17. [52, 62]



Obrázek 17 Schéma výroby astaxanthinu z *H. pluvialis* [52]

Podle prováděcího nařízení komise (EU) 2021/1377 byla povolena změna podmínek použití nové potraviny „oleoresin bohatý na astaxanthin z řas *Haematococcus pluvialis*“ podle

nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283. Tato nová potravinu byla povolena pro použití v doplňcích stravy, které jsou určeny pro běžnou populaci. Maximální povolené množství konzumace oleoresinu z *H. phuvialis* je 40-80 mg denně, což odpovídá  $\leq 8,0$  mg astaxanthinu denně. Tento limit je dán pro populaci starší 14 let. [38]

### 3.4.3 Produkce luteinu z mikrořas

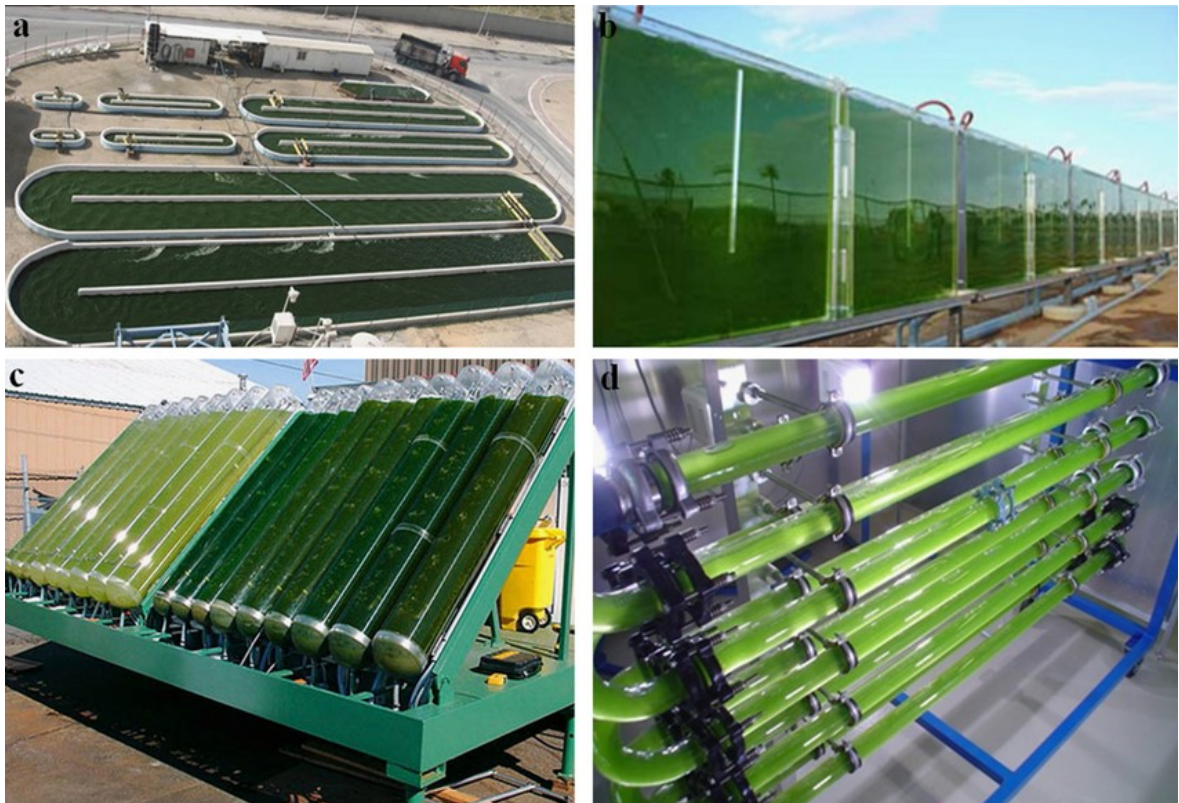
Hlavní přírodní zdroj luteinu rostlina aksamitník (*Tagetes erecta L.*) musí být sklizena periodicky a extrakce luteinu z tohoto tradičního zdroje představuje sezónní a na práci náročný proces. Biotechnologická produkce s využitím mikrořas se v tomto kontextu jeví jako vhodný alternativní zdroj luteinu, protože obsahují vysoký podíl luteinu v buňce (0,5–1,2 % sušiny). [2]

Mikrořasy, které jsou schopné produkovat lutein patří do oddělení *Chlorophyta* (zelené řasy) a *Rhodophyta* (červené řasy). Technologicky významný obsah luteinu v biomase je nejméně 5 g/kg biomasy. [49] Zástupci s nejvyšším obsahem luteinu v biomase jsou uvedeni v tabulce 2.

Tabulka 2 Mikrořasy s vysokou produkcí luteinu [49]

| Druh                                | g luteinu/kg biomasy |
|-------------------------------------|----------------------|
| <i>Chlorococcum citroforme</i>      | 7,4                  |
| <i>Chlorella fusca</i>              | 4,2–4,7              |
| <i>Tetracysis aplanosporum</i>      | 5,9                  |
| <i>Coelastrum proboscideum</i>      | 3,4–5,0              |
| <i>Neospondiococcum gelatinosum</i> | 4,4                  |

Kultivace mikrořas probíhá ve fotobioreaktorech. Suspenze po kultivaci obsahuje velké množství vody, kterou je pro následnou extrakci luteinu nutné odstranit. Technika centrifugace je efektivní, ale drahá. Sedimentace je levná, ale zdoluhavá, a to může vést k degradaci luteinu. Separaci může pomoci i srážení, ale přítomné srážedlo může snížit výtěžnost luteinu. Ideální možností je kombinace těchto metod, která zajistí vysoký výtěžek luteinu a nízkou cenu produkce. [35, 49] Na obrázku 18 jsou vyobrazeny různé typy fotobioreaktorů, které se používají pro kultivaci mikrořas.



Obrázek 18 Typy fotobioreaktorů, které se používají ke kultivaci mikrořas [67]

Lutein z mikrořas se v současné době nevyrábí v průmyslovém měřítku. Je to z důvodu nedostatečného obsahu luteinu v buňkách mikrořas, vysoké výrobní ceny a energetické náročnosti narušení buněčné stěny a extrakce luteinu z buňky. Obsah luteinu v aksamitníku je přibližně 20 g/kg suchého materiálu. Rychlost růstu této rostliny je ale násobně pomalejší než rychlost růstu mikrořas. Pro výhodnou produkci luteinu mikrořasami by byl dostatečný nový kmen, který by obsahoval >10 g volného luteinu na kg biomasy. [49]



## 4 PŘÍNOSY POUŽITÍ BIOTECHNOLOGIÍ

Hodnota přírodních barviv na světovém trhu neustále roste. Současný marketingový trend se zaměřuje na výměnu syntetických pigmentů za bezpečnější a ekologičtější přírodní pigmenty. Podle průzkumu společnosti Grand View Research, světový trh pro přírodní barviva v potravinářském průmyslu má mít v roce 2025 hodnotu 2,5 miliardy amerických dolarů. Je to hlavně díky současnému zvýšenému zájmu spotřebitelů o možné nežádoucí zdravotní účinky syntetických aditiv. [36, 46]

Tradiční produkce přírodních barviv je závislá na rostlinných zdrojích, které obvykle obsahují nízký podíl barevných komponent. Pro navýšení produkce a výtěžnosti těchto přírodních producentů bylo vynaloženo mnoho sil, např. vývoj *in vitro* kultivace rostlinných buněk a optimalizace mikrobiální kultivace. Mikrobiální pigmenty rychle nahrazují syntetická barviva (některá mohou mít teratogenní a karcinogenní vlastnosti), protože jsou šetrné k životnímu prostředí a bezpečné pro člověka, pokud jsou používány jako přídatná látka v potravinách. Tento trend není limitován pro mikrobiální pigmenty pouze jako potravinářská barviva. Například, pigmenty s antioxidačními vlastnostmi saproxanthin a zeaxanthin jsou preferovány před syntetickými butylhydroxykyselinami a butylhydroxytoluenem. Použití některých mikrobiálních pigmentů také přináší zdravotní výhody jako prevence rakoviny, antimikrobní a antioxidační vlastnosti a další. [36, 39]

Světový trh s luteinem byl v roce 2019 hodnocen na 292,3 milionů dolarů a je očekáván růst na 473,5 milionů dolarů do roku 2027. Jak již bylo zmíněno v kap. 3.4.3, tradiční produkce luteinu z aksamitníku nemusí být v budoucnu dostačující. Produkce luteinu z mikrořas by mohla tento problém vyřešit. Mezi hlavní výhody produkce barviv z mikrořas patří:

1. Mikrořasy jsou levným a efektivním bio zdrojem, který může být použit k výrobě také jiných látek jako vitaminy, karotenoidy nebo polysacharidy a tím zvýšit hodnotu produkce.
2. Rychlost růstu mikrořas je 5–10krát vyšší než rychlost růstu vyšších rostlin.
3. Mikrořasy, které mohou být kultivovány v mořské nebo brakické vodě a na neprovzdušněné půdě, nesoutěží o úrodnou půdu s konvenčními zemědělskými plodinami.
4. Biomasa mikrořas může být sklízena po celý rok v různých částech světa. [2, 48]

Výroba přírodních pigmentů pomocí biotechnologií má také několik limitací. Mezi ně patří nízká stabilita některých produktů, někdy vysoká cena downstream procesů, technické komplikace, nízká výtěžnost a produkce toxinů během produkce. Příkladem současné produkce toxinů je např. oranžový mykotoxin citrinin, který může být tvořen souběžně s požadovaným pigmentem a poté je nutné tyto dvě látky od sebe rozlišit a bezpečně oddělit. Extrakce a purifikace barviv může být také velmi nákladná. Jako organická rozpouštědla se musí používat látky, které jsou přírodního původu. To limituje výběr na etanol a vodu. Jako nové rozpouštědlo se nyní testuje neionická adsorpční pryskyřice, která byla efektivně použita k purifikaci organických kyselin, nukleových kyselin a peptidů. [39]

Vysoká cena kultivace se dá snížit použitím odpadu ze zemědělské a průmyslové produkce jako náhrady za některé složky kultivačního média. Rostoucí množství odpadu z potravinářských výroby může celosvětově vést k velkým ekonomickým, environmentálním a sociálním problémům. Odpady z potravinářského průmyslu ovšem obsahují velké množství důležitých antioxidačních látek (např. polyfenoly), které mohou být extrahovány pomocí biotechnologií. Takové využití vedlejších produktů pomáhá snížení plýtvání surovinami a zvýšení ekonomického zisku biotechnologické produkce a produkce potravin. [39, 60]

Ingredience získané z mikrobiální fermentace nebo extrahované z řas se stále více uplatňují v potravinářském průmyslu. Mezi hlavní látky, které se vyrábí pomocí biotechnologií, kromě již zmíněných barviv patří např. zahušťovadla a želírující látky (např. polysacharidy jako xantan nebo gellan), zvýrazňovače chuti (lahůdkové droždí, glutamát sodný), vitaminy a esenciální aminokyseliny. Xantan byl poprvé na trh uveden americkou firmou CP Kelco Company, která pro výrobu použila přírodního producenta xantanu bakterii *Xanthomonas campestris*. Tato metoda se dodnes využívá a nízká cena produkce se udržuje využitím levných substrátů jako glycerol a syrovátka. L-glutamát se dnes průmyslově vyrábí fermentací bakterie *Corynebacterium glutamicum*, které musela být kvůli nízké produktivitě výrazně změněna metabolická dráha. Přesto je cena produkce L-glutamátu vysoká z důvodu komplexního složení média a vysoké spotřeby energie při kultivaci. [2, 19, 47]

## ZÁVĚR

Potravinářská barviva patří mezi přídatné látky, které žádoucím způsobem upravují barvu potravin. Přírodní barviva se dnes získávají extrakcí z rostlin nebo pomocí biotechnologické produkce. Tyto látky se liší ve struktuře, mohou mít lipofilní nebo hydrofilní povahu a jejich stabilita může záviset na faktorech jako např. pH. Nejčastěji používaná přírodní barviva jsou karotenoidy, antokyany, chlorofyly a fykobiliproteiny. Mezi další se řadí riboflavin, betalainy nebo pigmenty monascorubin, monascin a ankaflavin produkované plísní *Monascus*.

Přírodní barviva se dnes využívají v různých odvětvích potravinářského průmyslu. Výběr barviva do produktu závisí na použitých surovinách, technologickém zpracování, typu obalu a cílové skupině spotřebitelů. Pokud je ve výrobku obsažena ovocná složka, může se pro zachování její původní barvy přidat barvivo. V některých potravinách mohou být barviva nestabilní a svou barvu ztrácí. Tento jev se projevuje zejména u výrobků s nízkým pH jako kysané mléčné výrobky nebo limonády. Pro udržení stability barviv ve výrobcích se využívá tzv. zapouzďení, které barvivo chrání před vnějším prostředím. Jednou ze skupin spotřebitelů, které významně ovlivňuje barva potravin, jsou děti. Proto se barviva hojně využívají v průmyslové výrobě cukrovinek. Některá syntetická barviva prokazatelně ovlivňují pozornost dětí a je tedy nutné tyto látky nahradit přírodními barvivy. Takovou alternativou je např. modrý fykocyanin, který se získává ze sinic. Má přírodní původ a je bezpečný pro konzumaci.

S rostoucí poptávkou po přírodních barvivech se pozornost obrací právě na biotechnologickou produkci. Některé organismy se dnes již běžně využívají pro průmyslovou produkci pigmentů. Jde převážně o přírodní producenty těchto pigmentů, kterým jsou upraveny kultivační podmínky pro navýšení produkce. Například u sinic se využívá fotobioreaktorů, které simulují sluneční svit 24 hodin denně a zajišťují ideální podmínky pro růst, který není limitován denním cyklem.

Mezi významné producenty karotenoidů patří mikrořasy. Výrobci jsou schopni získávat  $\beta$ -karoten produkovaný *D. salina* rychleji a levněji než u konkurenční extrakce z rostlin. Astaxanthin získávaný kultivací *H. pluvialis* se využívá jako doplněk stravy a přidává se do krmiva lososovitých ryb.  $\beta$ -karoten je také produkován plísní *B. trispora*, která akumuluje větší množství  $\beta$ -karotenu za specifických podmínek interakcí s jedincem opačného pohlaví. Plíseň *M. purpurea* produkuje vlastní pigmenty jako monascorubin a ankaflavin. Její



pigment se využívá převážně v Asii. Biotechnologové se také pokouší o průmyslovou produkci luteinu pomocí mikrořas. Ta je zatím ekonomicky nevýhodná, ale se zvyšující poptávkou trhu po tomto žlutém pigmentu se výrobci pokouší o optimalizaci výroby.

Biotechnologický výzkum se věnuje také organismům, které přirozeně neprodukují velké množství pigmentů nebo barevné produkty neprodukují vůbec. Bakterie *E. coli* je schopna syntézy antokyanů a jejich produkci je možné navýšit různými způsoby, např. dvoukrokovou biokatalýzou nebo koexpresí cizího genu v buňce *E. coli*. Antokyaniny nemusí pocházet z mikrobiální buňky, ale jejich extrakce z rostlinných zdrojů může být navýšena např. pomocí etanolu produkovaného bakterií *Z. mobilis*.

Výroba přírodních pigmentů pomocí biotechnologií má jisté výhody oproti klasické extrakci z rostlin. Při kultivaci v reaktorech nezávisí na ročním období nebo pracovnících, kteří plodiny sklízí. Mikrořasy rostou násobně rychleji než vyšší rostliny a růst ve vodních plochách šetří úrodnou půdu, která může být využita k pěstování zemědělských plodin. Odpady z průmyslové a zemědělské produkce mohou sloužit jako náhrady za některé složky kultivačního média a pomáhat tak snížení odpadů z potravin. Na druhou stranu mají biotechnologie také řadu nevýhod. Mezi hlavní patří vysoké výrobní náklady, produkce toxinů nebo nízká stabilita a výtěžnost některých produktů. Přesto je produkce potravinářských barviv pomocí biotechnologií důležitým způsobem získávání těchto látek a jejich produkci bude nutné v budoucnosti zdokonalovat a navyšovat.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] International Food Information Service. Dictionary of Food Science and Technology, 2nd Edition. Wiley-Blackwell, 2009. ISBN 978-1-405-18740-4.
- [2] CARLE, Reinhold a Ralf M. SCHWEIGGERT. Handbook on natural pigments in food and beverages: industrial applications for improving food color. Duxford, UK: Woodhead Publishing is an imprint of Elsevier, [2016]. Woodhead Publishing in food science, technology, and nutrition, no. 295. ISBN 00-810-0371-4.
- [3] EVROPSKÝ PARLAMENT A RADA EVROPY. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333 ze dne 16. prosince 2008, o potravinářských přídatných látkách. In: Úřední věstník L 354/16, 13. 12. 2008. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2008/1333/oj>
- [4] EVROPSKÝ PARLAMENT A RADA EVROPY. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1329 ze dne 22. září 2003, o geneticky modifikovaných potravinách a krmivech. In: Úřední věstník L 268, 18. 10. 2003, s. 0001-0023. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=celex:32003R1829>
- [5] ROY, A, RP MUKHERJEE, L HOWARD a R BEITLE. Bio-based extraction and stabilization of anthocyanins. Biotechnology progress. 2016, 32(3), 601-605. ISSN 8756-7938. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/btpr.2260>
- [6] VELÍŠEK, Jan a Karel CEJPEK. Biosynthesis of Food Components. Tábor: Osis, 2008. ISBN 978-80-86659-12-1.
- [7] MORTENSEN, Alan. Carotenoids and other pigments as natural colorants. Pure and Applied Chemistry. 2006, 78(8), pp. 1477-1491. Dostupné z: <https://doi.org/10.1351/pac200678081477>
- [8] DINESH, Kumar Saini, Pabbi SUNIL a Shukla PRATYOOSH. Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. Food and Chemical Toxicology. 2018, 2018(120), 616-624. ISSN 0278-6915. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.002>
- [9] RODRIGUEZ-CONCEPTION, Manuel, Javier AVALOS a M. Luisa BONET. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and

health. *Progress in Lipid Research*. 2018, (70), 62-93. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.004>

[10] TSUDA, Takanori. Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Molecular Nutrition Food Research*. 2012, 57(1), 159-170. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100526>

[11] ZHANG, Yang, Eugenio BUTELLI a Cathie MARTIN. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 2014, (19), 81-90. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.05.011>

[12] ZHA, Jian, Xia WHU a Mattheos AG KOFFAS. Making brilliant colors by microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*. 61n. 1., 2020 (74), 135-141. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.020>

[13] LEHTO, Sari, Maria BUCHWEITZ, Alexandra KLIMM a Raphaela STRASSBURGER. Comparison of food colour regulations in the EU and the US – a review of current provisions. *Food Additives and Contaminants – Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 2016, 34(3), 335-355. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1274431>

[14] YOU, Jiajia, Xuewei PAN a Chen YANG. Microbial production of riboflavin: Biotechnological advances and perspectives. *Metabolic Engineering*. 2021, (58), 46-58. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.08.009>

[15] ZHANG, Jia-Rong, Ying-Ying GE a Pin-He LIU. Biotechnological Strategies of Riboflavin Biosynthesis in Microbes. *Engineering*. 2021. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.03.018>

[16] ATTOKARAN, Mathew. *Natural food flavors and colorants*. Second edition. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2017. IFT Press series. ISBN 978-111-9114-765.

[17] DOWNHAM, Allison a Paul COLLINS. Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science & Technology*. 2000, 35(1), 5-22. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00373.x>

[18] SOCACIU, Carmen. *Food Colorants*. Boca Raton: CRC Press, 2007. ISBN 9780429129759.

- [19] SUN, L, F XIN a H. S. ALPER. Bio-synthesis of food additives and colorants-a growing trend in future food. *Biotechnology Advances*. 2021, 47. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107694>
- [20] GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*. 2011, 86(3), 345-391. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-011-0774-2
- [21] BLABER, M. The Bacteria - An Introduction. *Biology Library* [online]. Florida State University, 2021 [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Biochemistry\)/2%3A\\_Bacteria/2.1%3A\\_The\\_Bacteria\\_-\\_An\\_Introduction](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Supplemental_Modules_(Biochemistry)/2%3A_Bacteria/2.1%3A_The_Bacteria_-_An_Introduction)
- [22] MUÑOZ, Camilo F., Christian SÜDFELD a Mihris I. S. NADUTHODI. Genetic engineering of microalgae for enhanced lipid production. *Biotechnology Advances*. 2021, 52. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107836>
- [23] HAN, D a Y LI. *Biology and Commercial Aspects of Haematococcus pluvialis*. RICHMOND, A a E QIANG HU. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. 1. Oxford: John Wiley, 2013, s. 388-405. ISBN 9781118567166.
- [24] KIM, B, S. Y. LEE a A. L. NARASHIMAN. Cell disruption and astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis*: Recent advances. *Bioresource Technology*. 2022, (343). Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126124>
- [25] HUDSON, P. Introduction – The Need for a Carbon-Concentrating Mechanism. *Cyanobacteria Biotechnology*. Weinham, Germany: John Wiley, 2021, s. 3-4. ISBN 978-3-527-82492-2.
- [26] DASGUPTA C.N. Algae as a Source of Phycocyanin and Other Industrially Important Pigments. Das D. *Algal Biorefinery: An Integrated Approach*. Springer, Cham., 2015 [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22813-6\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22813-6_12)
- [27] MASOJÍDEK, J. a G. TORZILLO. *Mass Cultivation of Freshwater Microalgae*. JØRGENSEN, S. E. a B. D. FATH. *Encyclopedia of Ecology*. Elsevier, 2008, s. 2226-2235. ISBN 978-0-08-045405-4.
- [28] CHAIKLAHAN, R., N. CHIRASUWAN a T. SRINORASING. Enhanced biomass and phycocyanin production of *Arthrospira (Spirulina) platensis* by a cultivation management strategy: Light intensity and cell concentration. *Bioresource Technology*. 2022, (343). Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126077>

- [29] SADILOVA, E., F. C. STINTZING a D. R. KAMMERER. . Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. *Food Research International*. 2009, (42), 1023–1033.
- [30] CANNING, K. Colors for dairy products are going natural. *Dairy Foods* [online]. September 16 2020 [cit. 2022-01-27]. Dostupné z: <https://www.dairyfoods.com/articles/94550-colors-for-dairy-products-are-going-natural>
- [31] EDWARDS, W. P. *The Science of Bakery Products*. 1 vydání. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. ISBN 978-0-85404-486-3.
- [32] SCOTT-THOMAS, Caroline. When 'natural' is not enough: Colouring foodstuffs in the spotlight. *Food* [online]. [cit. 2022-01-31]. Dostupné z: <HTTPS://WWW.FOODNAVIGATOR.COM/ARTICLE/2013/12/06/COLOURING-FOODSTUFFS-IN-THE-SPOTLIGHT>
- [33] *Zymomonas mobilis*. *Microbe wiki* [online]. [cit. 2022-04-16]. Dostupné z: [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Zymomonas\\_mobilis](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Zymomonas_mobilis)
- [34] RAAB, R. M. a K. TYO. *Metabolic Engineering*. NIELSEN, J. *Biotechnology for the Future*. Berlin: Springer, 2005, s. 1-17. ISBN 978-3-540-31554-4.
- [35] UTOMO, R. P., Y. CHANG a D. LEE. Lutein recovery from *Chlorella* sp. ESP-6 with coagulants. *Bioresource Technology*. 2013, (139), 176-180. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.025>
- [36] LYU, X., Y. LYU a H. YU. Biotechnological advances for improving natural pigment production: a state-of-the-art review. *Bioresources and Bioprocessing*. 2022, (9). Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00497-4>
- [37] DE CASTRO, R. J. S. a H. H. SATO. Enzyme Production by Solid State Fermentation: General Aspects and an Analysis of the Physicochemical Characteristics of Substrates for Agro-industrial Wastes Valorization. *Waste and Biomass Valorization*. 2015, (6), 1085-1093. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1007/s12649-015-9396-x>
- [38] EVROPSKÁ KOMISE. PROVÁDĚCÍ NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2021/1377 ze dne 19. srpna 2021, kterým se povoluje změna podmínek použití nové potraviny „oleoresin bohatý na astaxanthin z řas *Haematococcus pluvialis*“ podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283 a kterým se mění prováděcí nařízení Komise (EU)

2017/2470. In: Úř. věst. L 297, 20.8.2021, s. 20—23 Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32021R1377&from=EN>

[39] MOHAMMADI, M. A., H. AHANGARI a S. MOUSAZADEH. Microbial pigments as an alternative to synthetic dyes and food additives: a brief review of recent studies. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2022, (45), 1-22. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02621-8>

[40] STACHOWIAK, B. a P. SCHULZ. Astaxanthin for the Food Industry. *Molecules*. 2021, 26(9). Dostupné z: doi: 10.3390/molecules26092666

[41] VILLALOBOS, F. a P. C. MEZQUITA. Production and stability of water-dispersible astaxanthin oleoresin from *Phaffia rhodozyma*. *International Journal of Food Science & Technology*. 2013, 48(6). Dostupné z: doi:10.1111/ijfs.12083

[42] MALÍŘ F., OSTRÝ V., BÁRTA I., BUCHTA V., DVOŘÁČKOVÁ I., PAŘÍKOVÁ J., SEVERA J., ŠKARKOVÁ J. Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003, vol. 1, 349s, ISBN 80-7013-395-3.

[43] DUFFOSÉ L. Microbial production of food grade pigments. *Food Technology and Biotechnology*. 2006, 44(3), 313–323.

[44] MEHTA, B. J. a I. N. OBRASZTOVA. Mutants and Intersexual Heterokaryons of *Blakeslea trispora* for Production of  $\beta$ -Carotene and Lycopene. *Applied Environmental Microbiology*. 2003, 69(7). Dostupné z: doi: 10.1128/AEM.69.7.4043-4048.2003

[45] SANDMANN, G. Carotenoids and Their Biosynthesis in Fungi. *Molecules*. 2022, 27(4), 1431. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27041431>

[46] AMALRAJ, A., A. PIUS a S. GOPI. Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives - A review. *Journal of traditional and complementary medicine*. 2016, 15(7), 205-233. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jtcme.2016.05.005

[47] DUFOSSÉ, L., GALAUP, P., YARON, A., ARAD, S.M., BLANC, P., CHIDAMBARA MURTHY, K.N., RAVISHANKAR, G.A., Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology*. 2005, 16, 389–406.

- [48] Global Lutein Market Size, Share, Demand & Forecast Report 2020-2027: Growing Aquaculture Industry Driving Market Growth - ResearchAndMarkets.com. Business Wire [online]. Dublin, 2020 [cit. 2022-03-15]. Dostupné z: <https://www.businesswire.com/news/home/20201218005577/en/Global-Lutein-Market-Size-Share-Demand-Forecast-Report-2020-2027-Growing-Aquaculture-Industry-Driving-Market-Growth---ResearchAndMarkets.com>
- [49] LIN, J. H., LEE, D. J., CHANG, J. S., 2014. Lutein production from biomass: marigold flowers versus microalgae. *Bioresource Technology*. 2014, 184, 421–428.
- [50] *Blakeslea trispora* F921 v1.0. Mycocosm Portal [online]. 2022 [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: [https://mycocosm.jgi.doe.gov/Blatri\\_F921\\_1/Blatri\\_F921\\_1.home.html](https://mycocosm.jgi.doe.gov/Blatri_F921_1/Blatri_F921_1.home.html)
- [51] A colourful story about a sensitive microalga. Maritime Forum [online]. 19. 9. 2018 [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: <https://webgate.ec.europa.eu/maritimeforum/en/node/4208>
- [52] Algamo [online]. ©2019 [cit. 2022-05-04]. Dostupné z: <https://www.algamo.cz/index.php/en/homepageen>
- [53] DESMARCHELIER, P. a N. FEGAN. *ESCHERICHIA COLI*. Encyclopedia of Dairy Sciences. Academic Press, 2002, s. 948-954. ISBN 978-0-12-227235-6.
- [54] *E. coli* – the biotech bacterium. Science Learning Hub – Pokapū Akoranga Pūtaiao [online]. 2014 [cit. 2022-03-30]. Dostupné z: [https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1899-e-coli-the-biotech-bacterium#:~:text=The%20bacterium%20Escherichia%20coli%20\(E,and%20to%20test%20protein%20function.](https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1899-e-coli-the-biotech-bacterium#:~:text=The%20bacterium%20Escherichia%20coli%20(E,and%20to%20test%20protein%20function.)
- [55] YAN, Y., Z. LI a M. A. G. KOFFAS. High-Yield Anthocyanin Biosynthesis in Engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2008, 100(1), 126-140. Dostupné z: doi: DOI: 10.1002/bit.21721
- [56] MOHANAN, M. A. a R. MOHAMED. *Monascus* spp.: A source of Natural Microbial Color through Fungal Biofermentation. *Microbiology & Experimentation*. 2017, 5(3). Dostupné z: doi: 10.15406/jmen.2017.05.00148
- [57] REVUELTA, J. L. a R. LEDESMA-AMARO. Bioproduction of riboflavin: a bright yellow history. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2017, 44(5), 569-665. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1842-7>

- [58] Vitamin B2 Essential micronutrient for livestock & companion animals. BASF SE [online]. [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: <https://nutrition.basf.com/global/en/animal-nutrition/product-groups/vitamins/vitamin-b2.html>
- [59] CARVALHO, J. C. D. a L. CARDOSO. Microbial pigments. Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals. 2014, s. 73-97. ISBN 978-1-4614-8005-1.
- [60] GOMEZ-GARCIA, R a A. A. VILAS-BOAS. Management of fruit industrial by-products—A case study on circular economy approach. *Molecules*. 2020, 25(2), 320
- [61] KIM, S., J. Y. LEE a S. CHAE. Phycocyanin Protects Against UVB-induced Apoptosis Through the PKC  $\alpha/\beta$ II-Nrf-2/HO-1 Dependent Pathway in Human Primary Skin Cells. *Molecules*. 2018, 23(2), 478. Dostupné z: doi: 10.3390/molecules23020478
- [62] OSLAN, S., N. F. SHOPARWE a A. H. YUSOF. A Review on *Haematococcus pluvialis* Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin. *Biomolecules*. 2021, 11(2), 256. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3390/biom11020256>
- [63] TANABTABZADEH, M. S., V. JAVANBAKHT a A. H. GOLSHIRAZI. Extraction of Betacyanin and Betaxanthin Pigments from Red Beetroots by Chitosan Extracted from Shrimp Wastes. *Waste and Biomass Valorization*. 2017, 10, 641-653.
- [64] Thermo Scientific™ Riboflavin, 98%. Fisher scientific [online]. 2022 [cit. 2022-05-04]. Dostupné z: <https://www.fishersci.pt/shop/products/riboflavin-98/p-3737334>
- [65] Chlorophyll. Food Info [online]. 2021 [cit. 2022-05-04]. Dostupné z: <http://www.food-info.net/uk/colour/chlorophyll.htm>
- [66] Dusitany v masných výrobcích. Český svaz zpracování masa [online]. 2003 [cit. 2022-05-04]. Dostupné z: <https://cszm.cz/aktualni-deni/odborne-clanky/289-dusitany-v-masnych-vyrobcich>
- [67] BITOG, J. P. P., I. B. LEE a K. KIM. Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: A review. *Computers and Electronics in Agriculture*. 2011, 74(2), 131-147. Dostupné z: doi: 10.1016/j.compag.2011.01.015
- [68] KOFFAS, M. A. G. a J. ZHA. Production of anthocyanins in metabolically engineered microorganisms: Current status and perspectives. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2017, 2(4), 259-266. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.10.005>



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

|              |   |
|--------------|---|
| 4CL          | 4-kumaroyl-CoA ligáza   |
| Acetyl-CoA   | Acetylkoenzym A   |
| ALA          | Kyselina 5-aminolevulinová                                      |
| ANS          | antocyanidin syntáza  |
| ArP          | 5-amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion                 |
| CHI          | chalkon isomeráza   |
| CHS          | chalkon syntáza   |
| DHBP         | 3,4-dihydroxy-2-butanon-4-fosfát                                |
| DOPA         | 3,4-dihydroxy-L-fenylalanin                                     |
| ES           | Evropské společenství   |
| EU           | Evropská unie   |
| FDA          | Úřad pro kontrolu potravin a léčiv/Food and Drug Administration |
| GMO          | Geneticky modifikované organismy                                |
| MEP          | methylerythritolfosfát  |
| MVA          | mevalonát   |
| Sukcynyl-CoA | Sukcynylkoenzym A   |
| UV           | Ultra fialový   |
| WHO          | Světová zdravotnická organizace/World Health Organization       |
| YM agar      | Agar s kvasničným extraktem a maltózou                          |

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

|  |    |
|--|----|
| Obrázek 1 Vzorce vybraných karotenoidů [20].....   | 14 |
| Obrázek 2 Chemické vzorce chlorofylu a a b [65] .....  | 15 |
| Obrázek 3 Změna forem antokyanů v závislosti na pH [11].....                                       | 16 |
| Obrázek 4 Chemický vzorec fykocyanobilinu [61] .....   | 17 |
| Obrázek 5 Obecné chemické vzorce betakyanů (a) a betaxanthinů (b) [63].....                        | 18 |
| Obrázek 6 Chemický vzorec riboflavinu [64] .....   | 19 |
| Obrázek 7 Mléčný výrobek obsahující karoteny jako barvivo .....                                    | 21 |
| Obrázek 8 Limonáda obsahující antokyany jako barvivo .....   | 23 |
| Obrázek 9 Energetický nápoj obsahující riboflavin jako barvivo.....                                | 23 |
| Obrázek 10 Ovocné želé obsahující koncentrát ze spiruliny jako barvivo.....                        | 25 |
| Obrázek 11 Schéma dvoukrokové biokatalýzy a koexprese cizího enzymu v mikrobiální buňce [12] ..... | 28 |
| Obrázek 12 Porovnání výtěžnosti tří způsobů extrakce antokyanů z hroznového vína [11] .....        | 29 |
| Obrázek 13 Produkce $\beta$ -karotenu pomocí interakcí kmenů <i>B. trispora</i> [50] .....         | 30 |
| Obrázek 14 Kolonie plísně <i>Monascus purpureus</i> [59].....                                      | 31 |
| Obrázek 15 Schéma (A), nákres (B) a fotografie fotobioreaktoru (C) [28] .....                      | 33 |
| Obrázek 16 Nádrž s <i>Dunaliella salina</i> [51] .....   | 34 |
| Obrázek 17 Schéma výroby astaxanthinu z <i>H. pluvialis</i> [52].....                              | 35 |
| Obrázek 18 Typy fotobioreaktorů, které se používají ke kultivaci mikrořas [67].....                | 37 |

**SEZNAM TABULEK**

|   |    |
|---|----|
| Tabulka 1 Seznam schválených potravinářských barviv [3] ..... | 11 |
| Tabulka 2 Mikrořasy s vysokou produkcí luteinu [49] .....     | 36 |

