

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYUŽITÍ RŮZNÝCH NUTRIČNÍCH ZDROJŮ VYBRANÝMI
KAROTENOGENNÍMI KVASINKAMI

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

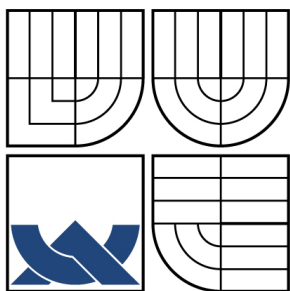
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

KATARÍNA ČAČKOVÁ

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYUŽITÍ RŮZNÝCH NUTRIČNÍCH ZDROJŮ VYBRANÝMI KAROTENOGENNÍMI KVASINKAMI

USE OF DIFFRENT NUTRITION SOURCE BY SELECTED CAROTENOGENIC YEASTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

KATARÍNA ČAČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0390/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Katarína Čačková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Využití různých nutričních zdrojů vybranými karotenogenními kvasinkami

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše - přehled nutričních požadavků karotenogenních kvasinek, možnosti využití různých zdrojů C a N včetně odpadních substrátů.
2. Kultivace kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* na různých nutričních zdrojích, sledování produkce biomasy.
3. Sledování produkce karotenoidů a ergosterolu kvasinkou *R.aurantiaca* kultivovanou na různých typech substrátu.

Termín odevzdání bakalářské práce: 28.5.2010

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Katarína Čačková
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Karotenoidy sú jedny z najbežnejšie rozšírených terpénových farbív v prírode. Vďaka ich významným biologickým účinkom, predstavujú dôležitú skupinu molekúl pre farmaceutický, chemický, potravinársky a krmivársky priemysel.

Cieľom práce poňatej ako zrovnávacia štúdia bolo využitie rôznych odpadových substrátov ako nutričných zdrojov pre kultiváciu kvasiniek rodu *Rhodotorula aurantiaca* ako producentov karotenoidových farbív. Kvasinky boli kultivované na živných médiách, ktoré obsahovali rôzne odpadové substráty – ovocná vláknina, srvátka, pšeničná kaša apod. Do niektorých médií boli taktiež pridávané hydrolytické enzýmy získané izoláciou z vybraných plesní. Väčšina odpadových substrátov sa ukázala ako použiteľné médium pre kultiváciu. Najväčšia produkcia biomasy *R. aurantiaca*, obohatenej o karotenoidné farbivá bola dosiahnutá v živnom médiu typu pšeničnej kaši alebo jablčnej vlákniny spracovanom zmesným preparátom extracelulárnych hydroláz získaných z plesne *Fusarium solani*.

ABSTRACT

Carotenoids are the most common naturally occurring terpenoid pigments. Because of their positive biological functions, carotenoids represent a group of important molecules for the pharmaceutical, chemical, food and feed industries.

This work was realized as a comparative study focused on use of some waste substrates as nutritional sources for production of carotenoid pigments by red yeast *Rhodotorula aurantiaca*. Yeast were cultivated in different media with selected waste substrates – apple fiber, whey, wheat etc. To some media hydrolytic enzymes prepared from some fungal strains were added. Most of waste substrates seems to be useful for *R. aurantiaca* cultivation. As the best nutritional sources for enriched biomass and carotenoid production apple fiber or wheat processed by mixed preparative of extracellular hydrolases from *Fusarium solani* were found.

KEÚČOVÉ SLOVÁ

Rhodotorula aurantiaca, karotenoidy, kvasinky, odpadné substráty, HPLC

KEYWORDS

Rhodotorula aurantiaca, carotenoids, yeasts, waste substrates, HPLC

ČAČKOVÁ, K. *Využití různých nutričních zdrojů vybranými karotenogenními kvasinkami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 52 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne, a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
Podpis studenta

Pod'akovanie:

Rada by som poďakovala doc. RNDr. Ivane Márovej, CSc. za odbornú pomoc a cenné rady počas celej práce a Bc. Andrey Háronikovej za pomoc a ochotu pri riešení experimentálnej časti práce.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1. Kvasinky.....	8
2.1.1. Taxonómia kvasiniek	8
2.1.2. Morfológia bunky.....	8
2.1.3. Bunka kvasiniek	8
2.1.4. Rozmnožovanie.....	10
2.1.5. Význam kvasiniek	11
2.2. Karotenoidy.....	11
2.2.1. Štruktúra a funkcia karotenoidov	11
2.2.2. Biosyntéza karotenoidov	12
2.2.3. Biotechnologická produkcia karotenoidov.....	13
2.2.3.1. Karotenogénne kvasinky	14
2.2.3.2. Surovinový základ.....	14
2.2.3.3. Zdroje uhlíku a dusíku.....	15
2.3. Kultivácia mikroorganizmov.....	16
2.3.1. Živné média.....	16
2.3.2. Rastová krivka.....	17
2.3.3. Faktory ovplyvňujúce rast mikroorganizmov	18
2.4. Metódy izolácie a analýzy karotenoidov.....	19
2.4.1. Extrakcia.....	19
2.4.2. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia - HPLC	19
2.4.3. Absorpčná spektrofotometria	20
3. CIEĽ PRÁCE	21
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	22
4.1. Použité chemikálie	22
4.1.1. Chemikálie použité na kultiváciu kvasiniek.....	22
4.1.2. Chemikálie použité na izoláciu karotenoidov	22
4.1.3. Chemikálie použité pre HPLC	22
4.1.4. Materiál	22
4.2. Prístroje a pomôcky.....	22
4.2.1. Pomôcky pre kultiváciu kvasiniek	22
4.2.2. Pomôcky pre izoláciu a analýzu karotenoidov.....	23
4.3. Použité kvasinkové kmene	23
4.4. Kultivácia mikroorganizmov.....	23
4.4.1. Podmienky kultivácie karotenoidov	23
4.4.2. Inokulum I.....	23
4.4.3. Inokulum II.....	24
4.4.4. Produkčné média	24
4.5. Stanovenie redukujúcich sacharidov metódou Somogyiho- Nelsona.....	26
4.6. Stanovenie biomasy.....	26
4.7. Izolácia a analýza karotenoidov	27
4.7.1. Zmýdelňovanie karotenoidov a extrakcia.....	27
4.7.2. Analýza karotenoidov metódou HPLC/UV-VIS.....	27

4.7.3.	Identifikácia a kvantifikácia karotenoidov	27
5.	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	28
5.1.	Morfologické zmeny kvasiniek ovplyvnené typom produkčného média	28
5.1.1.	Morfológia kvasiniek 1. série kultivácie	28
5.1.2.	Morfológia kvasiniek 2. série kultivácie	30
5.1.3.	Morfológia kvasiniek 3. série kultivácie	31
5.2.	Analýza redukujúcich sacharidov v hydrolyzovaných médiách	34
5.3.	Produkcia karotenoidov a ergosterolu na rôznych typoch substrátu	36
5.3.1.	Produkcia karotenoidov a ergosterolu -1. série kultivácie	36
5.3.2.	Produkcia karotenoidov a ergosterolu -2. série kultivácie	38
5.3.3.	Produkcia karotenoidov a ergosterolu -3. série kultivácie	39
6.	ZÁVERY.....	44
7.	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	45
8.	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	47
9.	ZOZNAM PRÍLOH	48
10.	PRÍLOHY	49

1. ÚVOD

Karotenoidy sú jednými z najrozšírenejších prirodzených pigmentov patriacich do skupiny tetraterpénov. Spôsobujú charakteristické žlté až červené sfarbenie a to predovšetkým v rastlinnej, mikrobiologickej ale taktiež aj v živočíšnej ríši. Produkujú ich najmä fotosyntetizujúce organizmy, ale môžu byť syntetizované aj nefotosyntetizujúcimi mikroorganizmami, ako napríklad niektorými baktériami, plesňami či kvasinkami. Živočíchy nie sú schopné si ich syntetizovať samostatne, no vedia si rastlinné karotenoidy premieňať na formy pre seba potrebné, preto ich prijímajú potravou.

Karotenoidy sú veľmi účinné antioxidanty, kedy u rastlín a fototrofných baktérií slúžia k ochrane bunky pred UV žiarením a tvoria neoddeliteľnú časť fotosyntetického aparátu. Umožňuje to predovšetkým ich schopnosť reagovať s kyslíkom, ktorá spočíva vo vrátení molekuly excitovaného kyslíku do základného energetického stavu. U ľudí sú karotenoidy zdrojom provitamínu A, ktorý je potrebný pre zdravý vzhľad pokožky, správne videnie a využíva sa k liečbe kardiovaskulárnych ochorení či rakoviny. Na základe sfarbenia i pozitívnych biologických vlastností našli karotenoidy uplatnenie predovšetkým v potravinárskom priemysle, taktiež v poľnohospodárstve ako doplnok do krmív pre zvieratá. Dôležité sú aj ako vitamínové preparáty vo farmaceutickom či kozmetickom priemysle.

Vďaka mnohým dôležitým funkciám karotenoidov a možnostiam ich využitia sa neustále študujú spôsoby ich produkcie a čo najefektívnejšej izolácie. Ich najväčšími zdrojmi sú predovšetkým rastlinné tkanivá ako mrkva, rajčiny a niektoré druhy ovocia. Aj napriek tomu, že sú stále vyrábané synteticky, v súčasnosti sa začínajú uprednostňovať nové postupy získavania karotenoidov z biotechnologickej produkcie pomocou mikroorganizmov. Cieľom je nájsť vhodné mikrobiálne producenty a také možnosti regulácie biosyntézy, ktoré by viedli ku nadprodukcii karotenoidových pigmentov.

Táto práca bola zameraná na porovnanie produkcie biomasy a karotenoidov kvasinkou *Rhodotorula aurantiaca* prostredníctvom modifikácie zloženia živných médií. Zameraním bakalárskej práce bolo testovať vybrané odpadové substráty z potravinárskych a poľnohospodárskych výrob s cieľom nájsť lacné médium, ktoré by poskytovalo kvasinkám potrebné živiny, prípadne by mohlo viesť k zvýšenej produkcii karotenoidov či obohatenej biomasy a zároveň by negatívne neovplyvnilo rast buniek.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1. Kvasinky

Kvasinky sú heterotrofné eukaryotné mikroorganizmy, ktoré patria medzi huby. Nie sú schopné fotosyntézy, majú pevnú bunkovú stenu a vyskytujú sa buď ako jednobunkové organizmy alebo vo forme vlákien. Ich názov je odvodený zo schopnosti väčšiny druhov skvasovať monosacharidy a niektoré disacharidy, prípadne i trisacharidy na ethanol a oxid uhličitý. Vďaka týmto sacharolytickým schopnostiam je ich výskyt viazaný s materiálmi obsahujúcimi cukry, predovšetkým bobuľové a kôstkové ovocie, cukrové plodiny, ale sú aj v pôde, vo vode a v črevnom trakte [1].

2.1.1. Taxonómia kvasiniek

Kvasinky patria do domény Eukarya, ríša Fungi- huby. Podľa spôsobu pohlavného rozmnožovania sa radia do oddelenia *Ascomycota* – vreckovýtrusné huby, *Basidiomycota* – stopkovýtrusné huby. Kvasinky, u ktorých nie je známe pohlavné rozmnožovanie patria do pomocnej skupiny *Deuteromycota* – imperfektné huby, ktorá patrí k oddeleniu *Ascomycota*. Názvoslovie i klasifikácia sa priebežne mení v súvislosti s objavovaním sexuálnych štádií, ktoré väčšinou bývajú zaradené medzi *Ascomycota* [2, 3].

2.1.2. Morfológia kvasiniek

Tvar buniek kvasiniek do značnej miery súvisí so spôsobom vegetatívneho rozmnožovania (pučanie, priečne delenie) a čiastočne je ovplyvnený aj vonkajšími podmienkami, napr. povrchové napätie či zloženie živného média atď. Za základný tvar sa považuje rotačný elipsoid s dvomi možnými odchýlkami, a to buď na tvary guľaté alebo vláknité. Kvasinkovité mikroorganizmy môžu meniť tvar aj počas vývojových štádií. Niektoré rody či kmene vytvárajú pretiahnuté bunky, ktoré pučia iba na póloch a ostávajú spojené v dlhé zaškrvcované vlákna – pseudomycelia. V určitých miestach pseudomycelia sa vytvárajú zväzky blastospór – krátke elipsoidné bunky [4]. U iných rodov sa môže vytvárať citrónovitý, trojuholníkovitý či valcovitý tvar [1, 5].

2.1.3. Bunka kvasiniek

Vegetatívna kvasinková bunka sa skladá zo silnej a pevnej bunkovej steny, jemnej cytoplazmatickej membrány, cytoplazmy, ktorá obsahuje radu membránových štruktúr a jadra.

Bunková stena kvasiniek má pevnú a silnú štruktúru, ktorá dáva bunke tvar a chráni ju pred mechanickými vplyvmi a pred osmotickým tlakom [1].

Cytoplazmatická membrána kvasiniek – plazmaléna, je pomerne tenká, zložená z lipidov a proteínov. Vytvára vychlípeniny vybiehajúce do cytoplazmy. Je sídlom transportných mechanizmov, umožňujúcich príjem látok bunkou a transport látky z bunky do prostredia. Neobsahuje dýchacie enzýmy ani systém oxidačnej fosforylácie.

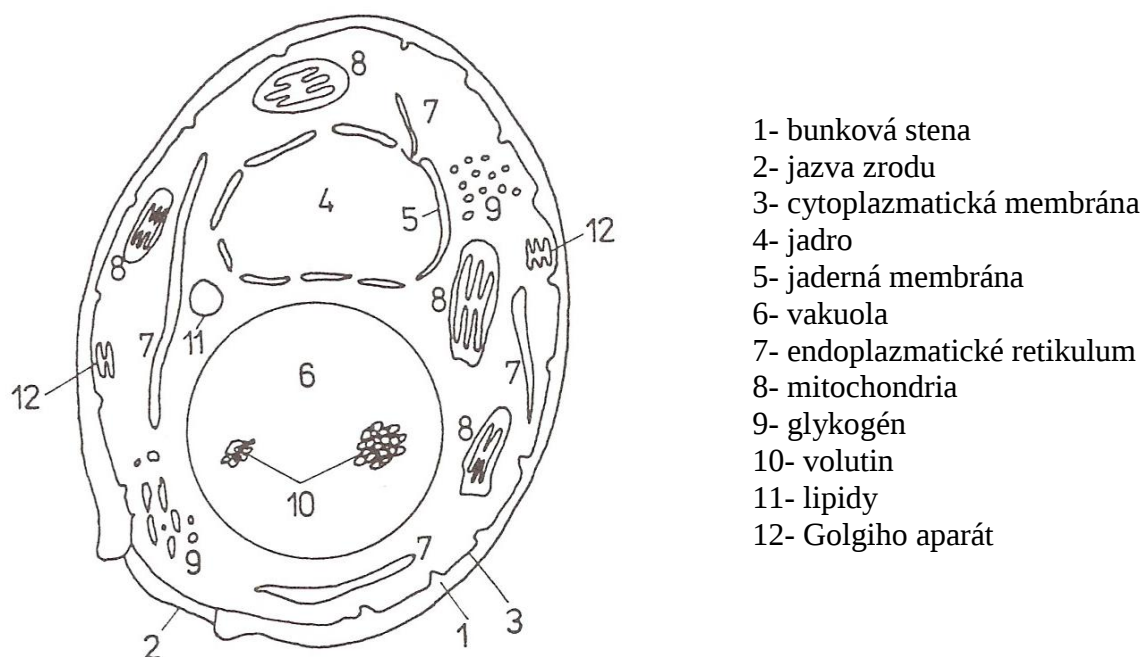
Cytoplazma je priehľadná, homogénna hmota, ktorá obsahuje systém dvojitéch membrán – endoplazmatické retikulum. Na vonkajšom povrchu oboch membrán sú zrníčka polyzómov, tj. agregátov ribozómov, v ktorých sa syntetizujú bielkoviny. Endoplazmatické retikulum obsahuje rôzne enzýmy a rezervné látky [1].

Ďalej sú v cytoplazme kvasiniek prítomné mitochondrie, čo sú štrukturálne útvary veľmi rozmanitého tvaru. Zložené sú z bielkovín, lipidov, fosfolipidov a sú sídlom dýchacích enzýmov a systému oxidačnej fosforylácie.

Vakuola je najnápadnejšou zložkou cytoplazmy kvasiniek, ktorá je väčšinou guľovitá, obklopená jednoduchou membránou. Vo vnútri vakuol sú uložené hydrolytické enzýmy, ako proteinázy, ribonukleáza a esteráza. Je miestom, v ktorom dochádza k rozpadu tých štruktúr bunky, ktoré sa neustále v bunke rozkladajú a obnovujú a majú krátky polčas rozpadu. Vakuola je taktiež rezervoárom látok, ktoré sa práve neúčastnia metabolizmu [1].

Ďalším membránovým útvarom v cytoplazme kvasiniek je Golgiho aparát, ktorý má tvar plochého mechúriku alebo niekoľkých prepojených plochých mechúrikov či cisterien uložených rovnobežne vedľa seba. Predpokladá sa, že funkciou tohto aparátu je transportovať prekursor (stavebné kamene) bunecnej steny z cytoplazmy cez cytoplazmatickú membránu.

Jadro kvasiniek je od cytoplazmy oddelené dvojitou jadrovou membránou s veľkými pórmí. Nachádza sa tu 16 chromozómov v haploidnom jadre. V jadre kvasiniek je taktiež jadierko srpkovitého tvaru, uložené tesne pod jadrovou membránou. Ďalej je tu pólóvé teliesko vretienka, ktoré má tvar disku a vychádzajú z neho vlákna nazývané mikrotubuly, zložené z bielkoviny tubulín a spolu s telieskom majú dôležitú úlohu pri delení jadra behom rozmnožovania buniek [1].

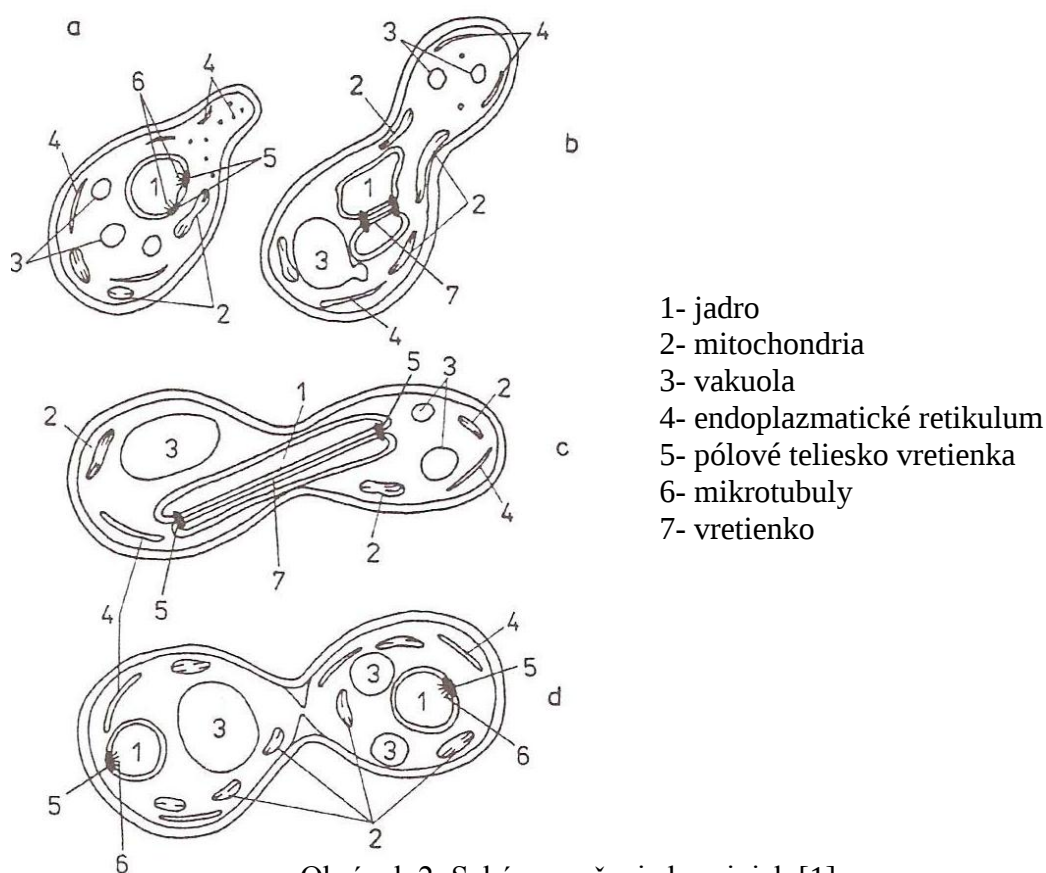


Obrázok č. 1: Schéma prierezu bunkou kvasiniek [1]

2.1.4. Rozmnožovanie

Väčšina rodov kvasiniek sa vegetatívne rozmnožuje pučaním alebo priečnym delením. Pri pučaní dochádza k splývaniu membrán endoplazmatického retikula, k jeho rozrastaniu, deleniu a taktiež k deleniu a predlžovaniu membránových útvarov. Zároveň prebieha mitotické delenie jadra a jeho migrácia do pupenu. Vzniká cytoplazmatická membrána medzi materskou a dcérskou bunkou, ktorá sa zvyčajne po dorastení oddelí, no niekedy to tak nemusí byť a vzniká tzv. pseudomycélium [1, 6]. Pri priečnom delení sa vytvára tzv. pravé mycélium. Prechodom medzi pučením a delením je tzv. pučenie na širokej základne, kedy dcérska bunka je spojená širokým krčkom s materskou. Niektoré druhy kvasiniek tvoria jednobunkové exospóry na tenkých stopkách nazývaných sterigmata. Zrelé spóry sú z týchto stopiek odmršťované pomocou zvláštneho kvapalinového mechanizmu a preto dostali názov balistospóry [1, 5, 6].

U kvasiniek je známy aj pohlavný spôsob rozmnožovania, podľa ktorého ich delíme do dvoch tried *Ascomycetes* a *Basidiomycetes*. Kvasinky, u ktorých nebolo dokázané pohlavné rozmnožovanie patria do pomocnej skupiny *Deuteromycetes* [1, 6].



Obrázok 2: Schéma pučania kvasiniek [1]

2.1.5. Význam kvasiniek

Kvasinky a kvasinkovité organizmy sú v prírode veľmi rozšírené. Vyskytujú sa predovšetkým na ovocí, cukrových plodinách, kvetných nektároch, výronoch stromov, v pôde, vo vzduchu či v črevnom trakte ľudí, zvierat a niektorého hmyzu.

Hlavný priemyselný význam kvasiniek spočíva v ich využívaní pre výrobu alkoholických nápojov, pekárskeho a krmného droždia. Vyššie alkoholy získané pri rafinácii kvasného liehu, sa používajú ako rozpúšťadlá lakov. Droždie sa pre svoj vysoký obsah vitamínov skupiny B používa pre výrobu liečebných výživných preparátov. Z tohoto istého dôvodu sú aj autolyzáty a extrakty droždia či pivovarských kvasníc využívané ako prísady do potravín (polievok, omáčok a polievkového korenia) a ako dôležitá zložka živných pôd v mikrobiológii [1, 7].

Pre komerčné účely sa z buniek kvasiniek izoluje taktiež mnoho chemikálií používaných v biochémií, ako napr. nukleotidy, nukleozidy, enzýmy, koenzýmy a pod. Špeciálne kmene niektorých kvasiniek sú používané pre výrobu ergosterolu, tj. provitamínu D, ktorý po ožiarení ultrafialovým svetlom poskytuje vitamín D alebo β – karotén, známeho aj ako provitamín A. Taktiež bolo dokázané, že niektoré kvasinky sú schopné produkovať aj koenzým Q₁₀, široko využívaný v medicíne a vo farmaceutickom či kozmetickom priemysle [1, 6, 8].

Na druhej strane kvasinky môžu negatívne pôsobiť pri kazení potravín. Kontaminácia cudzími kvasinkami má neblahý vplyv aj v droždiarstve, kde negatívne ovplyvňuje kvasné schopnosti a trvanlivosť pekárskeho droždia, čo potom nepriaznivo pôsobí v pivovarníctve a vinárstve. Taktiež patogénne kvasinky spôsobujú vážne ochorenia [1].

2.2. Karotenoidy

Karotenoidy sú široko zastúpené vo všetkých typoch živých organizmov ako žlté, oranžové a červené pigmenty. U vyšších rastlín sú asociované s chlorofylmi v chloroplastoch, predovšetkým v listoch, plodoch a kvetoch a spôsobujú tak sfarbenie. Taktiež sa vyskytujú a sú syntetizované v napr. cyanobaktériách, riasach, fototrófnych baktériách a nefotosyntetizujúcich kvasinkách či plesňach. Živočíchy nemajú schopnosť si ich samosyntetizovať, jedine pretvárať na látky inej štruktúry, alebo ukladať v tukových tkanivách [9, 10].

2.2.1. Štruktúra a funkcia karotenoidov

Karotenoidy sú mnohuhlíkové nenasýtené uhľovodíky, vytvorené zo štyroch izoprenoidných jednotiek, alebo kyslíkaté deriváty týchto uhľovodíkov. Čisté uhľovodíky nazývame karotény a sú to napr. lykopén, fytoén a karotén. Predstavujú najdôležitejšiu skupinu tetraterpénov [11].

Vo svojej štruktúre obsahujú reťazec 40 uhlíkových atómov v 8 izoprénových jednotkách. Na oboch koncoch reťazca môže byť pripojená deväťčlenná jednotka, ktorá je buď cyklická alebo acyklická a podľa toho delíme karotenoidy na:

- acyklické (lykopén, fytoén, neurosporén)
- monocyklické (γ - karotén, toluralodín)
- dicyklické (β - karotén, α - karotén) [11, 12]

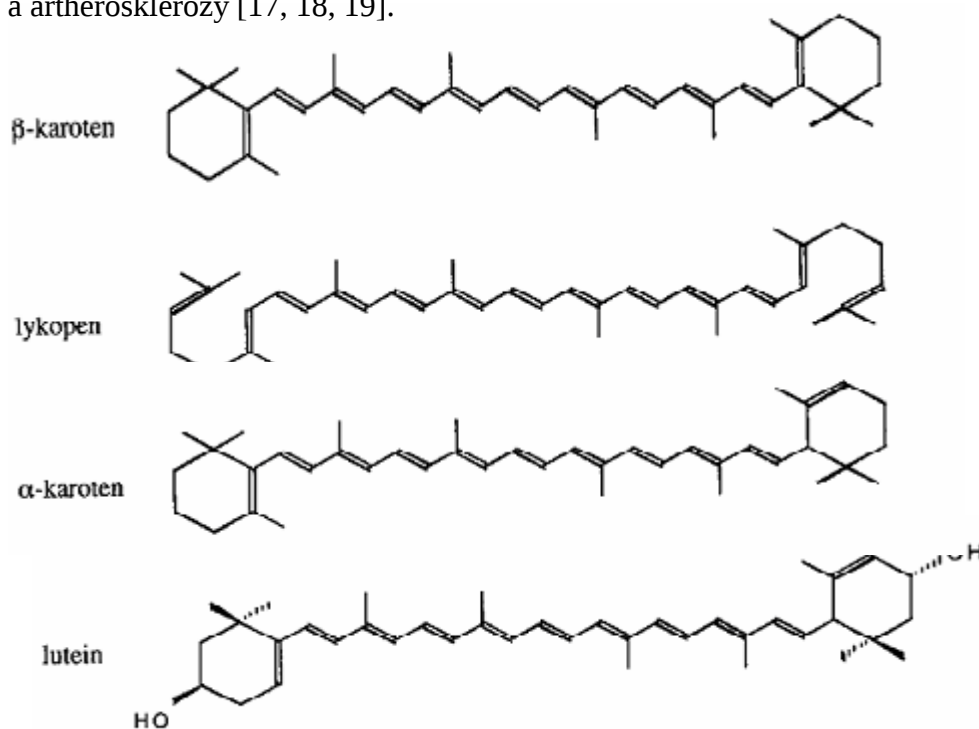
Taktiež karotenoidy pozostávajú z 2 štrukturálnych skupín – podľa obsahu kyslíka:

- uhľovodíkové karotenoidy – líšia sa polohou dvojitej väzby (β - karotén, α - karotén)
- oxidované karotenoidy – xantofyly, deriváty obsahujúce hydroxylovú, aldehydovú alebo keto skupinu (alkoholy, aldehydy, ketóny) [13]

Sfarbenie spôsobuje systém dvojitých konjugovaných väzieb s konfiguráciou „all trans“ kedy všetky dvojité väzby majú konfiguráciu trans [14].

Karotenoidy predstavujú skupinu lipofilných farbív, ktoré sú rozpustné iba v nepolárnych rozpúšťadlách. Pretože sú nerozpustné vo vode, nikdy neprechádzajú do vonkajšieho prostredia, ale ostávajú na vnútornej strane cytoplazmatickej membrány. Tieto pigmenty sú dôležité pre prenos energie pri fotosyntéze a tiež ako doplnkové fotoaktívne pigmenty. Sú to tiež významné antioxidanty, nakoľko sú schopné zhášať singletový kyslík a tak inhibovať peroxidáciu lipidov v membránach. Obsahujú totiž veľké množstvo dvojitých väzieb a tie sa ľahko oxidujú. Tento fakt súvisí s ich veľkou citlivosťou ku oxidácií no naopak sú pomerne odolné voči pôsobeniu oxidačných činidiel či zmene pH [1, 15, 16].

Niektoré karotenoidy sú provitamínom A, majú teda pozitívny vplyv na videnie a celý imunitný systém. Taktiež sa využívajú k liečbe rakoviny, rôznych kardiovaskulárnych ochorení a artherosklerózy [17, 18, 19].

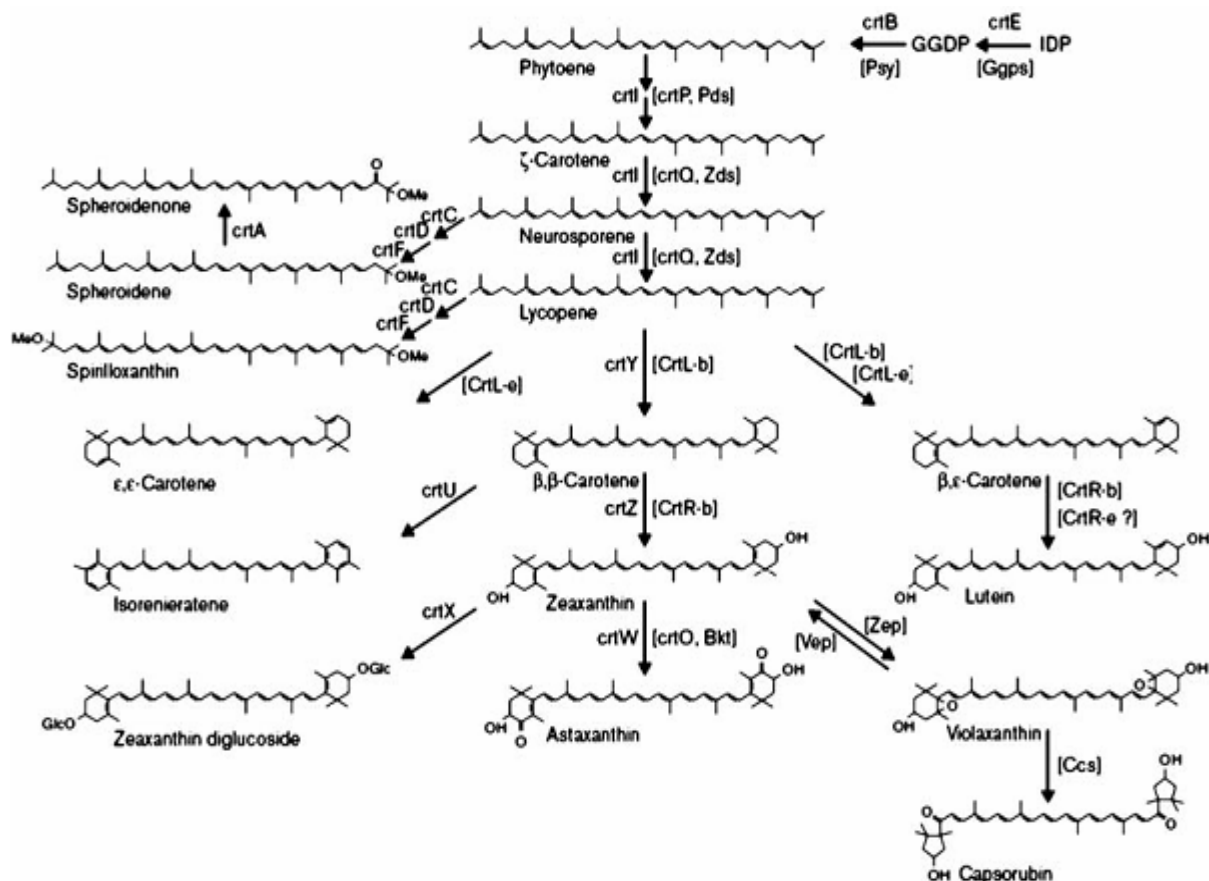


Obrázok 3: Štruktúra niektorých karotenoidov [20]

2.2.2. Biosyntéza karotenoidov

Karotenoidy sú zaradené do skupiny izoprenoidov, preto ich syntéza vychádza zo všeobecnej metabolickej dráhy izoprenoidov. Východnou látkou biosyntézy je acetyl-CoA, ktorý kondenzuje s medziproduktom syntézy mastných kyselín acetyl-CoA za tvorby β -hydroxy- β -methylglutaryl-CoA, ktorého redukciou vzniká kyselina mevalonová. Táto

kyselina je postupne fosforylovaná a dekarboxylovaná, kedy vzniká izopentenylidifosfát (tj. aktívny izoprén), ktorý sa za enzymovej analýzy prešmykne na dimethylallyldifosfát. Kondenzáciou jednotiek IPDP a DMADP vzniká geranyldifosfát, ktorého reťazec sa pripojovaním ďalších geranylových jednotiek predlžuje až do vzniku prvých bezfarebných prekursorov karotenoidov fytoénu a fytofluénu. Fytoén podlieha rade desaturačných a cyklizačných reakcií, pri ktorých vznikajú cyklické a acyklické farebné karotény a xantofyly. Východzím necyklickým karoténom pre tvorbu ďalších derivátov je lycopén [9, 11, 21].



Obrázok 4: Syntéza karotenoidov u mikroorganizmov a rastlín [20]

2.2.3. Biotechnologická produkcia karotenoidov

Karotenoidy sa uplatňujú v potravinárstve a krmivárstve ako pigmenty a tiež ako antioxidantne aktívne látky s pozitívnymi zdravotnými účinkami. Aj keď najčastejšími priemyslovo využívanými prirodzenými producentmi karotenoidov sú rastliny, v poslednej dobe sa výskum zameriava predovšetkým na produkciu karotenoidov pomocou mikroorganizmov, ktoré sú schopné tvoriť karotenoidné pigmenty, napr. fotosyntetické a nefotosyntetické baktérie, riasy, plesne a karotenogénne kvasinky. Mikrobiálna produkcia má veľkú výhodu okrem onoho aj v použití prírodných, lacných substrátov ako zdrojov uhlíku a energie.

Najdôležitejšími kvasinkovými producentmi - tzv. karotenogénnymi kmeňmi sú rody *Rhodotorula*, *Rhodospirium*, *Sporobolomyces*, *Cystofilobasidium*, *Sporidibolus* a

Xanthophyllomonas. Hlavné pigmenty, ktoré tieto kvasinky produkujú sú β -karotén, γ -karotén, torulén, torularhodín a astaxanthín. Kvasinky rodu *Rhodotorula patris* ku najvýznamnejším producentom karotenoidov. Rody *Cystofilobasidium* a *Dioszegia* podobne ako rod *Rhodotorula* prednostne produkujú farbivá β -karotén, torulén a torularhodín a ďalšie atypické deriváty [7, 22].

2.2.3.1. Karotenogénne kvasinky

Rod *Rhodotorula* sa vyznačuje malými guľatými bunkami ktoré môžu mať niekedy aj pretiahnutý tvar, nevytvárajú endospóry, ani iné spóry. Tento rod taktiež netvorí ani pseudomycélium a vyskytuje sa predovšetkým v prírode na rôznych organických látkach, vo vzduchu, vodách. No na druhej strane môže v extrémnych prípadoch spôsobiť ochorenie ľudí i zvierat. Kolónie môžu byť žltej, oranžovej až červenofialovej farby [6, 23].

Ich náter na agare býva zväčša pomarančový až lososový, je hladký, slizovitý, riedky no i cestovitý a okraje kolónie sú ucelené. Ich sfarbenie je závislé aj na zložení živného média. V kvapaline vytvárajú sediment a prstenec, ktorý je sfarbený krémovo až svetloružovo. Tieto kvasinky sú rozšírené po celom svete, nie sú náročné na životné podmienky, preto sa často rozmnožujú aj v pôdach bez zdroja dusíka a ich identita sa dobre dokazuje pre ich charakteristickú červenú karotenoidovú pigmentáciu. Možno ich izolovať zo vzduchu, pôdy, vody, z povrchu rastlín a rôznych častí živočíšneho tela. V bunkách hromadia tuk, niekedy až nadmerne, čo by po určitom usmernení mohlo viesť ku získavaniu lipidov s rovnakým obsahom mastných kyselín pre výživu živočíchov, a tiež aj s obsahom proteínov [1, 6].

Rod *Sporobolomyces* vytvára drsné, ploché kolónie, ktoré vytvárajú asymetrické balistokonídie. Tento rod sa vyznačuje silnou karotenogenezou a jeho nátery sú tmavočervenej farby s hladkým povrchom. Podobne ako predchádzajúci rod vytvára guľovité, elipsoidné a niekedy až pretiahnuté bunky. Na agare vytvárajú pomarančový až korálovočervený náter, ktorý môže byť jemne kučeravý. V kvapaline sedimentujú a vytvárajú hrubý prstenec. Druh *Sporobolomyces roseus* sa vyskytuje predovšetkým vo fylosfére a v atmosfére. Na jednoduchých sterigmách sa vytvárajú balistokonídie. Okolo náteru sa tvoria sekundárne kolónie z odstrelených balistokonídií [6, 7].

Kvasinky rodu *Xanthophyllomonas* sú elipsoidné bunky v pároch alebo v krátkych retiazkach, ktoré sú charakteristické náročnosťou na kultivačné prostredie. V kvapalnom prostredí vytvárajú sediment, rozmnožujú sa pučaním a vytvárajú veľa chlamydiospór, tj. veľkých guľovitých buniek s kvapôčkami svetlólámajúcich látok. Obsahujú astaxanthín a vďaka vysokému obsahu karotenoidov sú dôležité pre výživu lososov a hydiny. Pigment sa absorbuje v ich črevách a zabezpečuje lepšie sfarbenie lososového mäsa, alebo sfarbenie žltka u hydiny [6, 7].

2.2.3.2. Surovinový základ

Ako východziu surovinu využívajú biotechnológie súčasť tzv. biomasy, ktorú predstavujú organické látky kontinuálne tvorené živými systémami. Ďalšie dôležité zdroje surovín sú živočíšne a rastlinné odpady z poľnohospodárstva a priemyselnej sféry, mestské odpady i lacné chemické a petrochemické suroviny. Ako zdroj biomasy prichádzajú do úvahy predovšetkým rastlinné produkty z poľnohospodárstva, lesníctva a čiastočne aj vodného hospodárstva. Tie však slúžia predovšetkým pre výrobu potravín, krmív a ako surovina textilného a papierenského priemyslu. Vďaka rozvoju biotechnologických postupov však

všetky rastlinné suroviny budú môcť byť využívané omnoho efektívnejšie, predovšetkým spracovaním odpadov z uvedených oblastí použitia.

Hlavné súčaste fytohmoty tvoria sacharidy (celulóza, škroby, pektíny), lipidy, bielkoviny, nukleové kyseliny, lignin a ďalšie látky. Najdôležitejšiu úlohu však hrajú a v najväčšom množstve sú zastúpené sacharidy. Spolu s lipidami slúžia ako hlavný zdroj energie a uhlíku pre bioprosedy, zatiaľ čo bielkoviny a nukleové kyseliny sú používané ako zdroj dusíku, kedy nemôžu byť k týmto účelom využité anorganické zlúčeniny dusíku [24].

Voľba suroviny je taktiež podmienená cenou, dostupnosťou, produkčným mikroorganizmom, ako aj jeho vlastnosťami a enzymatickým vybavením, cenou produktu a jeho požadovanou čistotou aj technologickými vlastnosťami surovín. V súčasnosti je trendom predovšetkým hľadanie netradičných substrátov (ako sú rôzne odpady už zo spomínaných výrobní).

2.2.3.3. Zdroje uhlíku a dusíku

Už dlhú dobu sa mnohé štúdie zaoberajú výskumom efektivity premeny uhlíkových zdrojov na pigmenty a na optimálne zloženie živného média, s prihliadnutím na dostupnosť a cenu. V prípade, že zloženie média vyhovuje požiadavkám daného mikroorganizmu, môžeme dosiahnuť správny rast, nadprodukcii biomasy a aj metabolitov, ktoré sú produkované daným mikroorganizmom.

Zdroje uhlíku môžeme rozdeliť do 3. skupín:

1. **sacharidické zdroje** (sacharóza, glukóza, fruktóza, galaktóza, laktóza)
2. **prírodné zdroje** (škrob, melasa, srvátka, sulfitové výluhy, celulóza a odpadný papier)
3. **petrochemické zdroje** (alkoholy, uhľovodíky, organické kyseliny).

Ako zdroj uhlíku boli pre biotechnologickú produkciu karotenoidov testované rôzne zdroje, napr. hexózy, pentózy, rôzne disacharidy, glycerol, etanol, metanol, oleje ale taktiež rôzne odpady získané najmä z poľnohospodárstva (melasa, srvátka, škrobový odpad apod.). Pričom okrem sacharidov obsahujú aj iné zložky, ako napr. bielkoviny, tuky.

Príklady zdrojov uhlíku:

- **Škrob** – obilniny, hľúznaté rastliny, zemiaky, kukurica, ryža. Sú dobre skladovateľné a transportovateľné. Hoci sú v oveľa väčšej miere dostupnejšie ako sacharidy, na rozdiel od nich technologické využitie škrobu potrebuje predúpravu v podobe hydrolýzy škrobu. V obilí sa škrob vyskytuje vo forme škrobových zŕn, ktoré sa u jednotlivých druhoch líšia tvarom a veľkosťou [13, 24, 25].
- **Celulóza** – slama, drevný odpad. Suroviny, ktoré na jednej strane vykazujú najväčší globálny prírastok, no na druhej strane však celulózne materiály vyžadujú pomerne zložitú konverziu pred biotechnologickým spracovaním.
- **Srvátka** – vhodná biotechnologická surovina, odpad pri výrobe syru, alebo tvarohu, ktorý sa buď vyhadzuje alebo s vynaložením veľkého množstva energie zahusťuje. Jej nevýhodou je rýchla kazivosť. Používa sa na výrobu kyseliny mliečnej, propiónovej, octovej, lyzinu, antibiotík i etanolu. Využíva sa taktiež aj ako krmivo buď v sušenej, zhustenej forme alebo ako tekutá. Obsahuje bielkoviny, ktorých množstvo je závislé na tepelnom ošetrovaní mlieka pred zrážaním. Vzhľadom k pomerne konštantnému zloženiu a dobrej fermentovateľnosti sa očakáva veľké

biotechnologické využitie srvátky. Obsahuje laktózu v sušine, bielkoviny, zdroje dusíku a minerály [13, 24, 25].

- **Melasa** – príklad dobre využiteľného odpadu. Je to cenná surovina pre výrobu liehu, kyseliny citrónovej, niektorých aminokyselín, kvasníc i antibiotík. Jej zloženie tvorí z 50 % sacharóza, sušina, dusík (0,5 – 2 %). Nevýhodou je, že neobsahuje žiadny fosfor [13].

Chemické zloženie a koncentrácia zdroja dusíku v médiu, môže byť taktiež prostriedkom fyziologickej kontroly a regulácie metabolizmu pigmentov v mikroorganizmoch. Pre zlepšenie produkcie karotenoidov boli študované niektoré anorganické a organické dusikaté látky. Taktiež sa ukázali ako efektívne aj kombinácie anorganickej soli s kvasničným autolyzátom alebo hydrolyzátom, ktoré zvyšovali produkciu pigmentov. Zdá sa, že produkty katabolizmu dusíkatých zdrojov ovplyvňujú variabilitu obsahu karoténov v kvasinkách s ohľadom na dusikaté zdroje použité v médiu a rýchlosť produkcie pigmentov [25, 26].

Najznámejšie zdroje dusíku:

- **amoniak a amónne soli** – najdostupnejšie suroviny, lacné.
- **aminokyseliny, močovina** – sú dôležité aj ako zdroj uhlíku
- **kukuričný výluh** – obsahuje voľné aminokyseliny, rastové a stopové látky
- **kvasničný autolyzát** – dusík je vo forme aminokyselín
- **sójová a arašidová múka** – substráty, ktoré treba predúpraviť odstránením bielkovín

2.3. Kultivácia mikroorganizmov

2.3.1. Živné média

Mikroorganizmy sa v laboratóriách kultivujú na sterilných živných pôdach. Pripravované živné média musia byť izotonické, obsahovať zdroj energie, zdroj biogénnych prvkov v koncentráciách a forme optimálnych pre kultivovaný organizmus, potrebné rastové faktory a dostatok vody. Mikroorganizmy možno kultivovať v tekutých živných médiách (tzv. bujóny) alebo na pevných živných pôdach (tzv. agary) [27].

Ako zdroj uhlíku, a zároveň i vodíku a kyslíku väčšinou slúžia jednoduché cukry, di- tri- alebo polysacharidy. Následne zdrojom uhlíku môže byť i organické látky či prirodzené ingrediencie, ktoré sú zároveň aj zdrojom rastových faktorov, napr. pepton, rôzne extrakty, kaseinový hydrolyzát apod.

Ako zdroj dusíku môžu mikroorganizmy využívať atmosférický dusík, amónne soli a amoniak, dusitany, dusičnany a organicky viazaný dusík. Vhodným zdrojom síry sú minerálne soli kyseliny sírovej a fosforu hlavne soli kyseliny fosforečnej. Auxotrófne mikroorganizmy vyžadujú v kultivačnom médiu rastové faktory, pretože si ich nedokážu sami syntetizovať. Sú to napr. vitamíny, aminokyseliny, purínové a pyrimidinové bázy, vyššie mastné kyseliny, amíny apod.

Extrakty sa získavajú varom substrátu vo vode a úpravou do práškoveho stavu po následnom odstránení vody – kvasničný extrakt, mäsový a sladový extrakt, kukuričný výluh. Ako stužujúce komponenty sa do pevných živných pôd používajú podľa potreby agar, želatína alebo gel kyseliny kremičitej [27].

Základné typy živných médií rozdeľujeme podľa:

- a) zloženia
 - 1. **prirodené živné média** – prirodzené substráty (mlieko, zemiaky)
 - 2. **polosyntetické média** – nie sú chemicky presne definované
 - 3. **syntetické média** – chemicky presne definované
- b) rastu mikroorganizmu
 - 1. **univerzálne** – vyhovujú viacerým mikroorganizmom
 - 2. **selektívne** – pre jeden druh alebo skupinu mikroorganizmov
 - 3. **selektívne diagnostické** – veľmi malá skupina mikroorganizmov
- c) konzistenie
 - 1. **tekuté** – neobsahujú stužovacie látky
 - 2. **polotekuté** – majú krémovú konzistenciu a málo stužovacích látok
 - 3. **pevné** – obsahujú stužujúce látky [27].

2.3.2. Rastová krivka

Mikroorganizmy sa za optimálnych podmienok rozmnožujú obrovskou rýchlosťou. Je potrebné aby mali dostatočný zdroj živín a vhodné kultivačné podmienky. Na druhej strane však dochádza k limitácii v dôsledku nahromadenia metabolitov, ktoré sú bunkou vylučované do prostredia a tiež vyčerpaniu živného substrátu [7, 27].

Pri prenesení bunky z kultúry do optimálnych kultivačných podmienok, nedochádza hneď k jej maximálnej rýchlosti rastu. Rastová krivka má niekoľko úsekov a ide o grafické znázornenie nárastu počtu živých buniek tak, že na os x nanesieme čas a na osu y logaritmus počtu živých buniek v 1 ml.

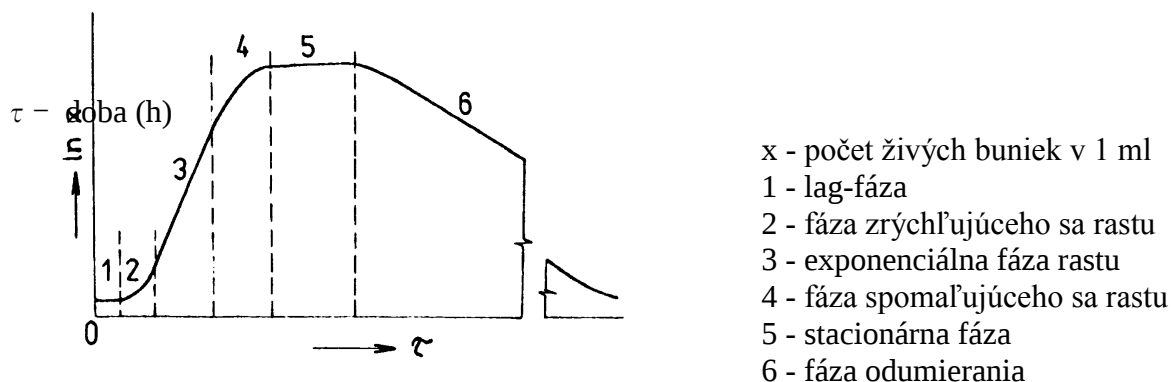
Prvému úseku, v ktorom sa bunka nerozmnožuje, ale zväčšuje sa jej objem a aktivuje jej enzýmový systém hovoríme **lag – fáza** alebo a tzv. fáza zdržania. Dĺžka fázy je závislá na druhu mikroorganizmu, fyziologickom stave bunky, veľkosti inokula (nepriama úmera) a na zložení nového rastového prostredia.

Ako druhá nasleduje **fáza zrýchľujúceho sa rastu** a po nej prichádza **exponenciálna fáza rastu**. V tomto čase majú bunky najkratšiu generačnú dobu, ktorá je konštantná v priebehu celej fázy. Keby sme bunky v tomto momente preniesli do nového kultivačného média o rovnakom zložení, pokračovali by v rozmnožovaní s rovnakou generačnou dobou.

Po exponenciálnej fázy rastu nastáva **spomalenie rastu** až jeho zastavenie. Zastavenie prírastku živých buniek je označované ako **stacionárna fáza** rastu a často pri ňom dochádza ešte k pomalému rozmnožovaniu, ktorým sa kompenzuje počet odumierajúcich buniek. Maximálna dĺžka stacionárnej fázy je rôzna a závisí na citlivosti mikroorganizmov k hladovaniu.

Poslednou fázou je **fáza postupného odumierania** buniek, ktorá môže trvať aj niekoľko týždňov či mesiacov [1].

Fyziologické vlastnosti buniek v rôznych fázach rastovej krivky sa značne odlišujú. Bunky stacionárnej fázy a lag – fázy na počiatku sú oveľa menej citlivejšie ku nepriaznivým podmienkam ako bunky neskoršej lag – fázy a rastových fáz. Vznikajúce splodiny metabolizmu, ktoré inhibujú rozmnožovanie či vyčerpanie živín môže viesť k spomaleniu rozmnožovania na konci exponenciálnej fázy rastu, prípadne i k jeho úplnému zastaveniu [1].



Obrázok 5: Rastová krivka [1]

2.3.3. Faktory ovplyvňujúce rast mikroorganizmov

Vonkajšie prostredie ako aj živiny musia pokrývať akékoľvek požiadavky mikroorganizmu na energiu a stavebné kamene pre syntézu bunkovej hmoty a ich správny vývoj. V prostredí musia byť vhodné fyzikálne, chemické a biologické podmienky. Nakoľko sú mikroorganizmy schopné sa prispôbovať vonkajším podmienkam nielen zmenou svojho enzýmového vybavenia buniek, ale taktiež do istej miery sú aj schopné ovplyvniť vonkajšie podmienky vo svojom najbližšom okolí, napr. zmenou pH, tieto ich schopnosti sú limitované, po čom dochádza ku zastaveniu rastu alebo ku usmrteniu bunky [1].

Okrem zdrojov energie musí živné prostredie obsahovať využiteľné, tj. asimilovateľné zdroje prvkov, ktoré sú súčasťou bunkovej hmoty mikroorganizmov. Najväčšie požiadavky sú kladené na C, H, O, N, P a S. Živné prostredie taktiež musí obsahovať dostatočné množstvo vody, pretože väčšina reakcií prebieha v živých organizmoch vyžadujúcich vodné prostredie a určitú vodnú aktivitu. Jedným z ďalších faktorov, ktoré ovplyvňujú rýchlosť rozmnožovania mikroorganizmov i možnosť ich života je teplota vonkajšieho prostredia. Podľa vzťahu ku teplote rozdeľujeme mikroorganizmy na **psychrofilné**, **mezofilné** a **termofilné**. Biochemická činnosť je silno ovplyvňovaná koncentráciou vodíkových iónov v prostredí. Každý mikrobiálny druh sa môže rozmnožovať iba v určitom rozmedzí pH. Kvasinky vyžadujú pre rast kyslé prostredie, ich optimálne pH sa pohybuje medzi 4,2 a 5,5. Dokonca už pri slabom alkalickom prostredí (7,5) sa zastavuje ich rast. Organizmy sa tiež odlišujú svojím vzťahom ku kyslíku, a preto tiež vyžadujú rôzny oxidačne redukčný potenciál, ktorý je daný prítomnosťou oxidačných alebo redukčných činidiel, ktoré sú pre každé prostredie iné. Taktiež elektromagnetické vlnenie rôznych vlnových dĺžok sa značne líši svojím fyziologickým účinkom na mikroorganizmy [1, 27].

Tieto faktory spolu so žiarením, ultrazvukom, elektrickým prúdom či s tlakom a mnohými inými patria medzi tzv. stresové faktory. Počas evolúcie si niektoré mikroorganizmy vyvinuli obranné mechanizmy voči týmto stresovým podmienkam. Ich správnym využitím možno doceliť mikrobiologickú produkciu obranných látok, ktoré sa dajú využiť v iných odvetviach priemyslu [1].

Okrem fyzikálnych a chemických vplyvov sa na rozvoji mikroorganizmov v prostredí uplatňuje výrazne ešte vplyv biologických činiteľov. Veľmi významné sú vzájomné vplyvy mikroorganizmov v prostredí a vplyv hostiteľského makroorganizmu, tj. živočícha alebo rastliny na parazitujúcom alebo symbiotickom mikroorganizme [1].

2.4. Metódy izolácie a analýzy karotenoidov

2.4.1. Extrakcia

Extrakcia je najčastejšou metódou izolácie karotenoidov biologického materiálu. Acetón sa najčastejšie používa ako extrakčné činidlo na izoláciu karotenoidov zo vzoriek s vysokým obsahom vody. Nakoľko sú však karotenoidy viazané v lipoproteínovej frakcii membrán, kvasiniek je potrebné ešte ku acetónu pridať alkoholický roztok KOH alebo NaOH aby došlo ku zmýdelňovaniu a tak ku uvoľneniu pigmentov. Následne sa potom karotenoidy niekoľkokrát extrahujú v nepolárnych organických rozpúšťadlách, ako je napr. petroléter a dietyléter [28].

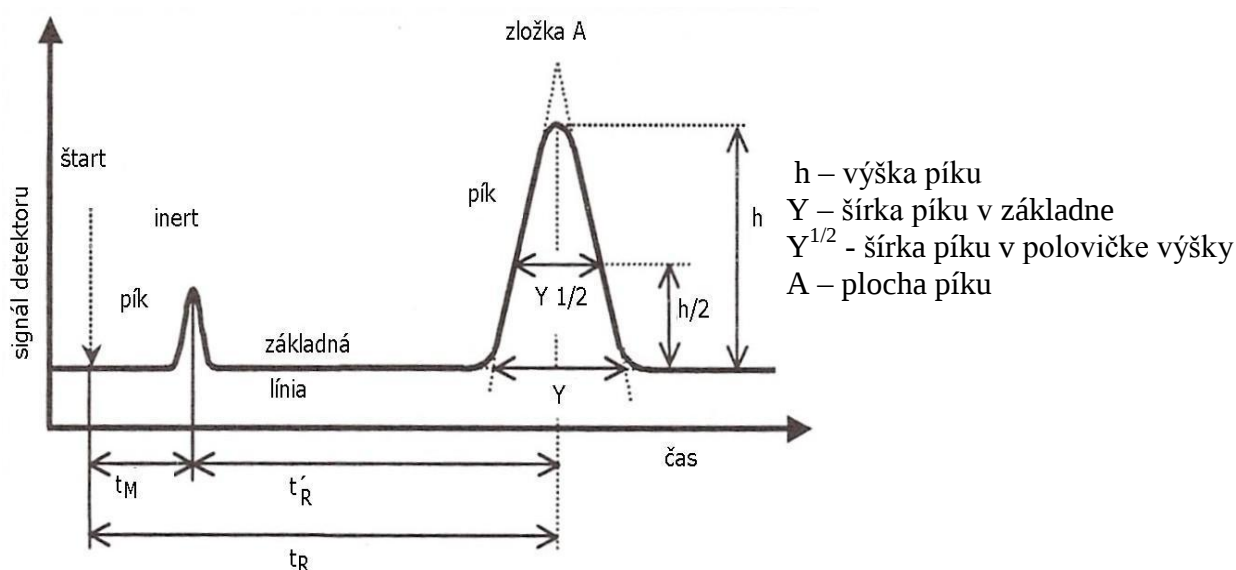
2.4.2. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia – HPLC

Chromatografia je separačná metóda, pri ktorej sa oddeľujú látky nachádzajúce sa vo vzorke. Metóda sa zakladá na opakovanom vytváraní rovnovážnych stavov zložiek medzi dvomi navzájom nemiešateľnými fázami – mobilnou a stacionárnou. Pri kvapalinovej chromatografii je mobilnou fázou kvapalina, ktorá preteká kolonou medzi časticami, ktoré tvoria stacionárnu fázou – sorbent. Vzorka sa umiestni na začiatok stacionárnej fázy a pohybom mobilnej fázy cez stacionárnu je potom unášaná. Zložky vzorky sú postupne zachycované alebo zdržované stacionárnou fázou a tým sa separujú, kedy na koniec stacionárnej fázy sa dostanú tie zložky, ktoré boli fázou zadržované najmenej. Zložky sa v stacionárnej fáze zdržia o to dlhšie, čím sú spomínanou fázou silnejšie pútané [29, 30, 31].

Klasické kolónové prevedenie sa stalo základom vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie – HPLC. Aby bola separácia účinná treba použiť dostatok malých zrníček sorbentu pre čo najväčší odpor ku kvapaline. Preto je aj potrebné pracovať pri vysokom tlaku. Výhodou metódy je práca s menším množstvom vzorky, kratšia doba separácie a možnosť pracovať aj s termolabilnými látkami plynného či kvapalného skupenstva [30].

Toto delenie medzi jednotlivými fázami prebieha v krátkych nerezových kolónach odolným aj pre vysoké tlaky. Vzorka sa dávkuje pomocou viaccestných dávkovacích kohútov alebo injekčnou striekačkou. Mobilná fáza je dopravovaná pomocou čerpadiel a tlaku 50 MPa do dávkovacieho zariadenia, kde je obohacovaná zmesou separovaných látok. Najčastejšie používané sú fotometrické detektory, ktoré stanovujú absorbanciu mobilnej fázy vychádzajúcej z kolóny [30, 32].

Chromatogram je grafický záznam závislosti signálu detektoru na čase. Jeho počiatok predstavuje okamih nástreku vzorky na kolonu a každé rozdelenie zložky odpovedá jednej elučnej vlne na chromatogramu, tzv. pík. Poloha jej vrcholu je retenčný čas t_R a ide o dobu, počas ktorej látka prejde celou kolonou. Táto doba sa delí medzi mobilnú fázou – tzv. mŕtvy retenčný čas t_m a stacionárnu fázou – tzv. redukovaný retenčný čas t'_R . Retenčný objem V_R nám udáva súčin retenčného času a objemového prietoku mobilnej fázy. Spomínané charakteristiky sa používajú ku kvalitatívnej analýze zložiek vo vzorke. Základom pre ich identifikáciu je zhoda retenčnej veličiny neznámej zložky vzorky a známeho štandardu [29].



Obrázok 6: Opis chromatogramu [1]

2.4.3. Absorpčná spektrofotometria

Podstatou absorpčnej spektrofotometrie (ultrafialovej a viditeľnej) je absorpcia ultrafialového a viditeľného žiarenia zriedenými roztokmi molekúl rozsahu 200 – 800 nm, načo následne prechádza molekula do excitovaného stavu. Látky obsahujúce vo svojej štruktúre chromofory, následne poskytujú charakteristické absorpčné pásy, ktoré slúžia pre ich identifikáciu. Táto metóda býva používaná ku identifikácii pigmentov, kvantitatívnej analýze anorganických a organických zlúčenín, stanoveniu množstva a čistoty DNA, či ku dôkazom chromofórnych skupín.

Dopadom monochromatického žiarenia na vzorku, v dôsledku absorpcie klesne pôvodný žiarivý tok dopadajúceho paprsku na nižšiu hodnotu. Dekadický logaritmus je prevrátená hodnota absorbancie a transmitácia je pomer týchto žiarivých tokov. Závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke žiarenia predstavuje absorpčné spektrum vzorky.

Pre kvantitatívne stanovenie absorbanie roztoku platí Lambert-Beerov zákon, ktorý hovorí, že absorbancia je priamoúmerná koncentrácií absorbujúcej látky c a hrúbke absorbujúcej vrstvy roztoku l : $A = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l$, kde ε_λ – molárny absorpčný koeficient (konštanta charakteristická pre danú látku v danom prostredí, $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), c – je látková koncentrácia látky ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a l – hrúbka absorbujúcej vrstvy (cm) [29].

3. CIEĽ PRÁCE

Cieľom predloženej bakalárskej práce zameranej na produkciu biomasy a karotenoidových pigmentov vybranou kvasinkou *Rhodotorula aurantiaca* je riešenie nasledujúcich dielčích úloh:

- Prehľad nutričných požiadaviek karotenogénnych kvasiniek, možnosti využitia rôznych zdrojov C a N vrátane odpadových substrátov.
- Kultivácia kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* na rôznych nutričných zdrojoch, sledovanie produkcie biomasy.
- Sledovanie produkcie karotenoidov a ergosterolu kvasinkou *R. aurantiaca* kultivovanou na rôznych typoch substrátu.

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. Použité chemikálie

4.1.1. Chemikálie použité na kultiváciu kvasiniek

D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner s r.o. (ČR)
Chlorid sodný p.a., Lachema (ČR)
Kvasničný autolyzát, Himedia (India)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema (ČR)
Síran amonný p.a., Lachema (ČR)
Síran horečnatý p.a., Chemapol (ČR)

4.1.2. Chemikálie použité na izoláciu karotenoidov

Acetón p.a., Lachema (ČR)
Diethyléter p.a., Lachema (ČR)
Ethanol pre UV-VIS, Lachema (ČR)
Hydroxid draselný p.a., Lachema (ČR)

4.1.3. Chemikálie použité pre HPLC

Methanol pre HPLC Gradient Grade, Sigma – Aldrich (SRN)

4.1.4. Materiál

Jablčná vlákna, Provita, Frýdek-Místek (ČR)
Kukurličné klíčky – jemné, Unibal Liberec (ČR)
Pšeničná celozrnná instantná kaša – Otesánek, Poex Velké Meziříčí (ČR)
Srvátka (odpad, mlékárna Pribina a.s., Přibyslav)
Vaječné cestoviny, Ideal Slovakia (SR)

4.2. Prístroje a pomôcky

4.2.1. Pomôcky pre kultiváciu kvasiniek

Analytické váhy Boeco (SRN)
Centrifuga Sigma Laborzentrifugen (SRN)
GKB Color Digital CCD kamera (Taiwan)
Lucia Image active 5.0, Laboratory Imaging spol. s r.o. (ČR)
Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)
Spektrofotometer VIS, Helios δ, Unicam (UK)
Trepačka IKA Yellow Line, (SRN)

4.2.2. Pomôcky pre izoláciu a analýzu karotenoidov

Filtre pre HPLC, PRE-CUT, Alltech (GB)

Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)

Vodná lázeň EL-20, Merci a.s. (ČR)

Zostava HPLC/UV-VIS od firmy ECOM spol. s r.o. (ČR):

Programátor gradientu GR 5

Vysokotlakové čerpadlo typ P 4020

Dávkovací ventil typ C

Termostat kolony typ LCO 101

UV-VIS detektor procesorový, typ LCD 2084

software Clarity – Chromatography SW, Data Apex 2006

Kolona Kinetex C18, 2,6 µm, 4,6 x 150 mm, Phenomenex

Predkolony - C₁₈, AJO- 4287, Phenomenex

Držák predkolony- KJO- 4287, ECOM (ČR)

4.3. Použité kvasinkové kmene

Pre kultiváciu bol použitý kvasinkový kmeň *Rhodotorula aurantiaca* CCY 20-9-7.

4.4. Kultivácia mikroorganizmov

4.4.1. Podmienky kultivácie kvasiniek

Karotenogénna kvasinka *Rhodotorula aurantiaca* patrí medzi aeróbne, mezofilné mikroorganizmy. Kvasinky boli kultivované v kvapalnom médiu pri teplote 28 °C a neustálom trepaní a osvetlení. Médiá sa sterilizovali v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom 30 minút.

4.4.2. Inokulum I

Pre každú sériu kultivácie bolo najskôr pripravené inokulum I (INO I) o vhodnom objeme tak, aby následný pomer inokulum I : inokulum II bol 1 : 5. Zloženie inokula I je uvedené v tabuľke 1. Po sterilizácii a vychladení inokula I boli sterilne naočkované 3 kličky vzorky kvasinky zo zásobnej kultúry na Petriho miskách. Kultivácia prebiehala 24 hodín.

Tabuľka 1: Zloženie inokulačného média – INO I

zložka	množstvo (g/l)
glukóza	40
KH ₂ PO ₄	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	5
MgSO ₄	0,34
kvasničný autolýzát	7
vodovodná voda	1000 ml

4.4.3. Inokulum II

Boli pripravené inokulá II tak aby sa zachoval pomer INO I : INO II = 1 : 5. Inokulum I bolo následne asepticky preliate do vysterilizovaného inokula II a to bolo kultivované 24 hodín. Inokulum II obsahovala rovnaké zloženie – základ, pre všetky série, ktoré je uvedené v tabuľke 2. Zmeny v zložení pre prvú, druhú a tretiu sériu INO II sú uvedené v tabuľke 3.

Tabuľka 2: Zloženie inokulačného média – INO II

zložka	množstvo (g/l)
glukóza	40
KH ₂ PO ₄	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	5
MgSO ₄	0,34
vodovodná voda	1000 ml

Tabuľka 3: Zmeny v zložení INO II

séria	zložka	množstvo (g/l)
1	A	kvasničný autolyzát
	B	jablčná vláknina
2		kvasničný autolyzát
3		kvasničný autolyzát

4.4.4. Produkčné médiá

Pre každú sériu kultivácií boli pripravené produkčné médiá (125 ml), ktorých spoločné zloženie je uvedené v tabuľke 4. Zložky, ktorými sa produkčné médiá líšia, sú uvedené v tabuľkách 5 - 7. Inokulačné médiá boli po častiach (25 ml) preliate do produkčných médií, tak aby sa zachoval pomer 1 : 5 a kultúry boli kultivované 80 hodín.

Tabuľka 4: Zloženie produkčného média

zložka	množstvo (g/l)
KH ₂ PO ₄	4
(NH ₄) ₂ SO ₄	4
MgSO ₄	0,34
vodovodná voda	1000 ml

Tabuľka 5: Zloženie produkčného média – 1. séria

označenie	zložka	množstvo (g/l)
hruškové šupky	A	hruškové šupky
	B	glukóza
kontrola	A	glukóza
	B	glukóza
vláknina	A	glukóza + jablčná vláknina
	B	glukóza + jablčná vláknina
jablčné šupky	A	jablčné šupky
	B	jablčné šupky

Kultúry pestované v prvej sérii mali odlišné zloženie inokula I a inokula II. Inokulom II, ktoré obsahovalo kvasničný autolýzát, boli očkované produkčné médiá s označením A a inokulom II, ktoré obsahovalo jablčnú vlákninu, boli očkované produkčné médiá s označením B. Ku médiám obsahujúcim odpad boli pripravené aj potrebné slepé vzorky na meranie absorpcie.

Tabuľka 6: Zloženie produkčného média – 2. séria

označenie	zložka	množstvo (g/l)
kontrola	glukóza	30
cestoviny	cestoviny	30
pšeničná kaša	pšeničná kaša	30
kukuričné klíčky	kukuričné klíčky	30
srvátka upravená	srvátka upravená	30
srvátka neupravená	srvátka neupravená	30

V prípade druhej série bolo zloženie INO I a INO II rovnaké. Opäť boli pripravené pre jednotlivé médiá s odpadom aj príslušné slepé vzorky s rovnakým množstvom vody a odpadného substrátu pre meranie absorpcie.

Tabuľka 7: Zloženie produkčného média – 3. séria

označenie	zložka	množstvo (g/l)
kontrola	glukóza	30
vláknina	jablčná vláknina	30
vláknina + E1	jablčná vláknina	30 + enzymatický preparát 1
vláknina + E2	jablčná vláknina	30 + enzymatický preparát 2
vláknina + E3	jablčná vláknina	30 + enzymatický preparát 3
vláknina + E4	jablčná vláknina	30 + enzymatický preparát 4
cestoviny	cestoviny	30
cestoviny + E1	cestoviny	30 + enzymatický preparát 1
cestoviny + E2	cestoviny	30 + enzymatický preparát 2
cestoviny + E3	cestoviny	30 + enzymatický preparát 3
cestoviny + E4	cestoviny	30 + enzymatický preparát 4
pšeničná kaša	pšeničná kaša	30
pšeničná kaša + E1	pšeničná kaša	30 + enzymatický preparát 1
pšeničná kaša + E2	pšeničná kaša	30 + enzymatický preparát 2
pšeničná kaša + E3	pšeničná kaša	30 + enzymatický preparát 3
pšeničná kaša + E4	pšeničná kaša	30 + enzymatický preparát 4
kukuričné klíčky	kukuričné klíčky	30
kukuričné klíčky + E1	kukuričné klíčky	30 + enzymatický preparát 1
kukuričné klíčky + E2	kukuričné klíčky	30 + enzymatický preparát 2
kukuričné klíčky + E3	kukuričné klíčky	30 + enzymatický preparát 3
kukuričné klíčky + E4	kukuričné klíčky	30 + enzymatický preparát 4

V tretej sérii mali INO I a INO II taktiež rovnaké zloženie a k jednotlivým médiám obsahujúcim rôzne enzýmy boli pripravené príslušné slepé vzorky pre meranie absorbancie. Experimentálne bolo zistené možné využitie plesní produkujúcich extracelulárny produkt – zmesný preparát hydrolytických enzýmov ku spracovaniu odpadových substrátov tak, aby rozložili polysacharidy na jednoduché cukry.

Po kultivácii plesní boli lyofilizované enzýmové preparáty rozpustené vo fosfátovom pufré a pridané do produkčného média (1,5 ml). Následne sa médiá hydrolyzovali po dobu 24 hodín. Po hydrolýze boli odobraté vzorky z každého média, ktoré bolo hydrolyzované a analyzované metódou Somogyiho-Nelsona na redukujúce cukry. Vzorky pre stanovenie redukujúcich sacharidov boli odobraté aj z nehydrolyzovaných produkčných médií pred sterilizáciou a i po sterilizácii a taktiež aj po sterilizácii zhydrolyzovaného média, aby bola kontrola na vplyv sterilizácie a prípadnú spontánnu hydrolýzu odpadov.

Použité plesne pre produkciu zmesných extracelulárnych enzýmov (zbierkové kmene):

- E1 - *Alternaria alternata*
- E2 - *Fusarium solani*
- E3 - *Aureobasidium pullulans*
- E4 - *Phanerochaete chrysosporium*

4.5. Stanovenie redukujúcich sacharidov metódou Somogyiho-Nelsona

Táto metóda je založená na schopnosti redukujúcich sacharidov vyredukovať z alkalického prostredia mednatých solí oxid medný, ktorý spolu s arzenomolybdenanovým činidlom vytvára farebný komplex, ktorého zafarbenie sa spektrofotometricky premeria.

Boli pripravené jednotlivé činidlá, kedy roztok 1 obsahoval 24 g bezvodého Na_2CO_3 , 16 g NaHCO_3 , 144 g bezvodého Na_2SO_4 , 12 g vinanu sodno-draselného a 800 ml destilovanej vody. Roztok 2 pozostával zo 4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 24 g bezvodého Na_2SO_4 a 200 ml destilovanej vody. Roztok 3 bol pripravený rozpustením 25 g molybdenanu amónneho v 450 ml destilovanej vody, z 21 ml koncentrovanej H_2SO_4 a 3 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ rozpustených v 25 ml destilovanej vody. Tento roztok sa ponechal stáť pri laboratórnej teplote a neprístupu svetla 48 hodín.

Pri stanovení sa k vzorke o objeme 1 ml pridalo 0,5 ml roztoku 1 a 0,5 ml roztoku 2. Skúmavky sa na umiestnili na vriaci vodný kúpeľ, po 10 minútach sa ochladili a pridalo sa 0,5 ml roztoku 3 a premiešalo, aby sa rozpustil vzniknutý Cu_2O . Vzorka bola doplnená na celkový objem 10 ml a bola zmeraná jej absorbancia pri vlnovej dĺžke 720 nm.

4.6. Stanovenie biomasy

Pri určení množstva sušiny v jednotlivých vzorkách bola kvôli časovej tiesni použitá kalibračná krivka z predchádzajúcej práce [33]. Kalibračná krivka vyjadruje závislosť medzi množstvom sušiny a zákalom rôzne koncentrovaných suspenzií kvasiniek.

Rhodotorula aurantiaca: $y = 0,2047x - 0,0184$,

kde y je nameraná absorbancia a x množstvo sušiny v g/l.

Z každej vzorky produkčného média bol pre stanovenie biomasy odobratý 1 ml kvasinkovej kultúry a nariadený destilovanou vodou tak, aby nebol prekročený rozsah spektrofotometra. Následne bola meraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 630 nm proti

destilovanej vode. Slepé vzorky boli zložené z príslušného odpadu a vody. Taktiež boli sterilizované a uchovávané s ostatnými médiami pri rovnakých podmienkach.

Morfologické znaky kvasiniek z každej vzorky boli pozorované pod mikroskopom pri zväčšení 640x a výsledky boli zaznamenané digitálnou kamerou a spracované pomocou počítačového programu Lucia. Taktiež sa pomocou mikroskopu vylúčila prípadná kontaminácia vzorky.

Následne sa biomasa karotenogénnych kvasiniek spracovala. Celý objem produkčného média bol scentrifugovaný pri 5000 otáčkach po dobu 10 minút. Bunky boli po odstredení premyté vodou a opäť zcentrifugované. Nakoniec bola biomasa rozsuspendovaná vo fyziologickom roztoku a uložená v mrazničke.

4.7. Izolácia a analýza karotenoidov

Karotenoidy aj ergosterol sú súčasťou lipidickej membrány, preto je možné ich izolovať niekoľkostupňovou extrakciou spojenou so zmýdelňovaním. Následne boli vzorky analyzované pomocou vysoko-účinnnej kvapalinovej chromatografie so spektrofotometrickou detekciou.

4.7.1. Zmýdelňovanie karotenoidov a extrakcia

Boli použité vzorky produkčných médií z mrazničky (100 ml), ktoré boli rozmrazené a zcentrifugované pri 5000 otáčkach 10 minút. Sediment s kvasinkovými bunkami bol dezintegrován v 50 ml acetónu v trecej miske a po pridaní 50 ml 10 % alkoholického roztoku KOH bol zmýdelňovaný na vodne lázni pri 90 °C po dobu 30 minút.

Zmýdelnený odparok bol extrahovaný dvakrát diethyléterom a obe éterové frakcie boli odparené na vákuovej odparke.

4.7.2. Analýza karotenoidov metódou HPLC/UV – VIS

Vysušený extrakt bol rozpustený v ethanole pre HPLC, prefiltrovaný cez jednorázový filter a ešte scentrifugovaný pred samotnou analýzou.

Analýza pigmentov metódou HPLC prebiehala za izokratických podmienok pri prietoku mobilnej fázy 1,0 ml/min, teplote 45 °C, na kolóne Kinetex C18 (150 x 4,6 mm; 2,6 µm; Phenomenex) s predkolónou C18 za fotometrickej detekcie pri vlnovej dĺžke 450 nm pre karotenoidy a 285 nm pre ergosterol. Vlnová dĺžka odpovedá maximu absorbancie príslušnej analyzovanej látky. Vzorka bola na kolonu dávkováná cez dávkovací ventil (10-20 µl). Ako mobilná fáza bol použitý methanol pre HPLC (Gradient Grade).

K chromatikej analýze karotenoidov bola použitá zostava HPLC/UV-VIS od firmy ECOM spol. s r.o. Analyzované dáta boli spracované chromatografickým softwérom Clarity – Chromatography SW, Data Apex 2006.

4.7.3. Identifikácia a kvantifikácia karotenoidov

Identifikácia a kvantifikácia jednotlivých karotenoidov bola prevedená na základe ich retenčných časov v porovnaní s retenčnými časmi štandardov. Určenie množstva vybraných karotenoidov bolo robené pomocou externej kalibrácie metódou kalibračnej krivky. Pre kvantitatívne vyhodnotenie bola použitá závislosť plochy pík na koncentrácií jednotlivých vzoriek.

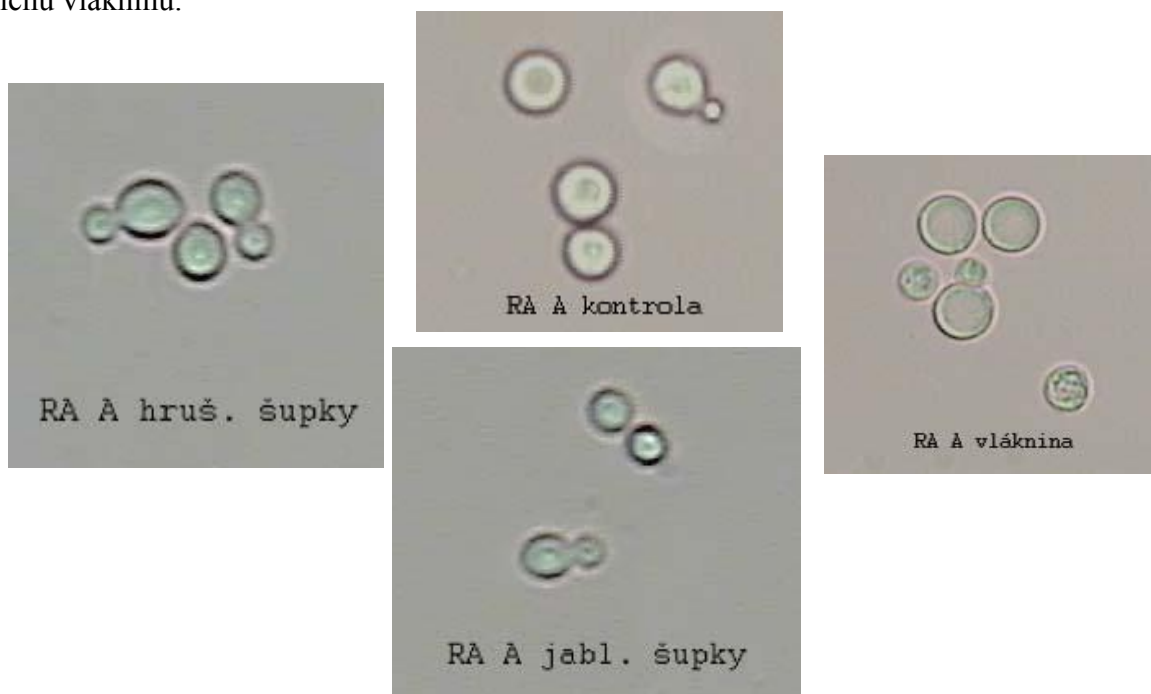
5. VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1. Morfológické zmeny kvasiniek ovplyvnené typom produkčného média

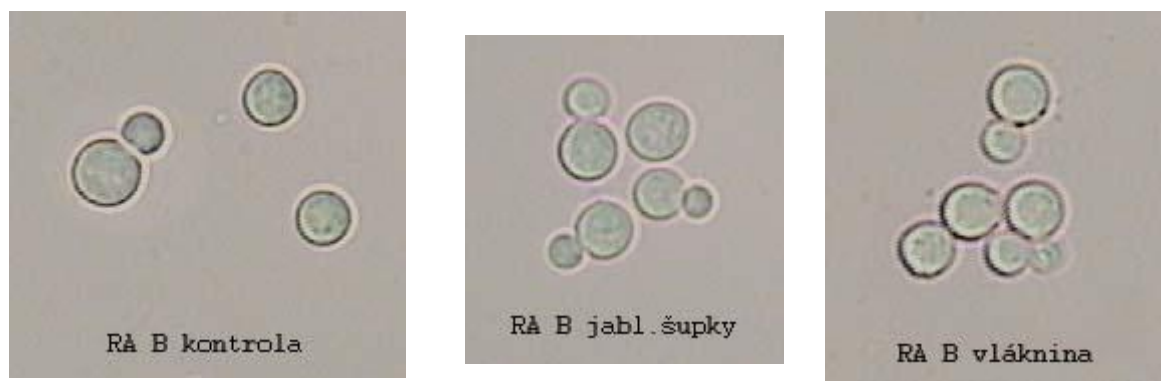
Boli pozorované morfológické znaky kvasinky *Rhodotorula aurantiaca*, ktorá bola kultivovaná na rôznych nutričných zdrojoch v živných médiách. Rozličné odpadové substráty boli charakteristické pre jednotlivé série kultivácie.

5.1.1. Morfológia kvasiniek 1. série kultivácie

Pri prvej sérii sme pozorovali charakteristiku morfológie kvasiniek v závislosti na odlišnom nutričnom zložení produkčných médií. INO I malo základné zloženie, INO II pre sériu s označením A obsahovalo kvasničný autolyzát a INO II s označením B obsahovalo jablčnú vlákninu.



Obrázok 7: Morfológia kvasiniek v produkčnom médiu 1. série (kvasničný autolyzát)

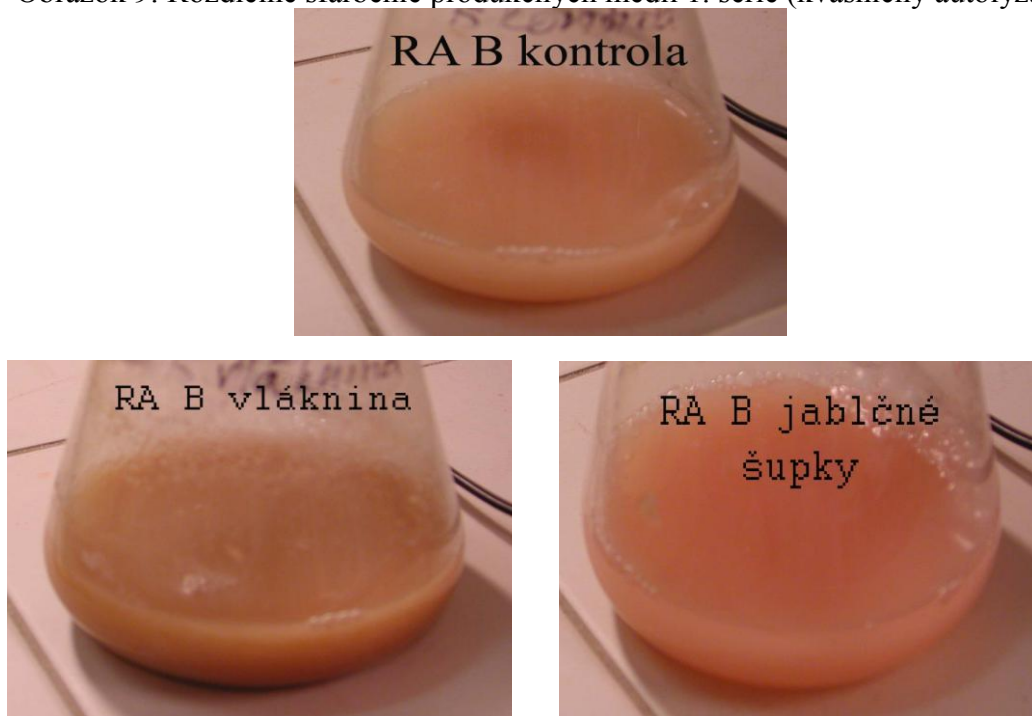


Obrázok 8: Morfológia kvasiniek v produkčnom médiu 1. série (jablčná vláknina)

Na základe pozorovania kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* pomocou mikroskopu môžeme konštantovať, že tvar bunky je oválny až guľatý. U buniek s označením obsahujúcim kvasničný autolyzát v médiu možno pozorovať viac valcovitý tvar ako u buniek s obsahom jablčnej vlákniny v médiu, kde je tvar guľatý. V prípade produkčného média, kde je kombinácia glukóza a jablčná vláknina môžeme vidieť bunky s neohraničeným obsahom v dôsledku narušenia bunečnej steny. Inak morfológia buniek nevykazuje neobvyklé zvláštnosti.



Obrázok 9: Rozdielne sfarbenie produkčných médií 1. série (kvasničný autolyzát)

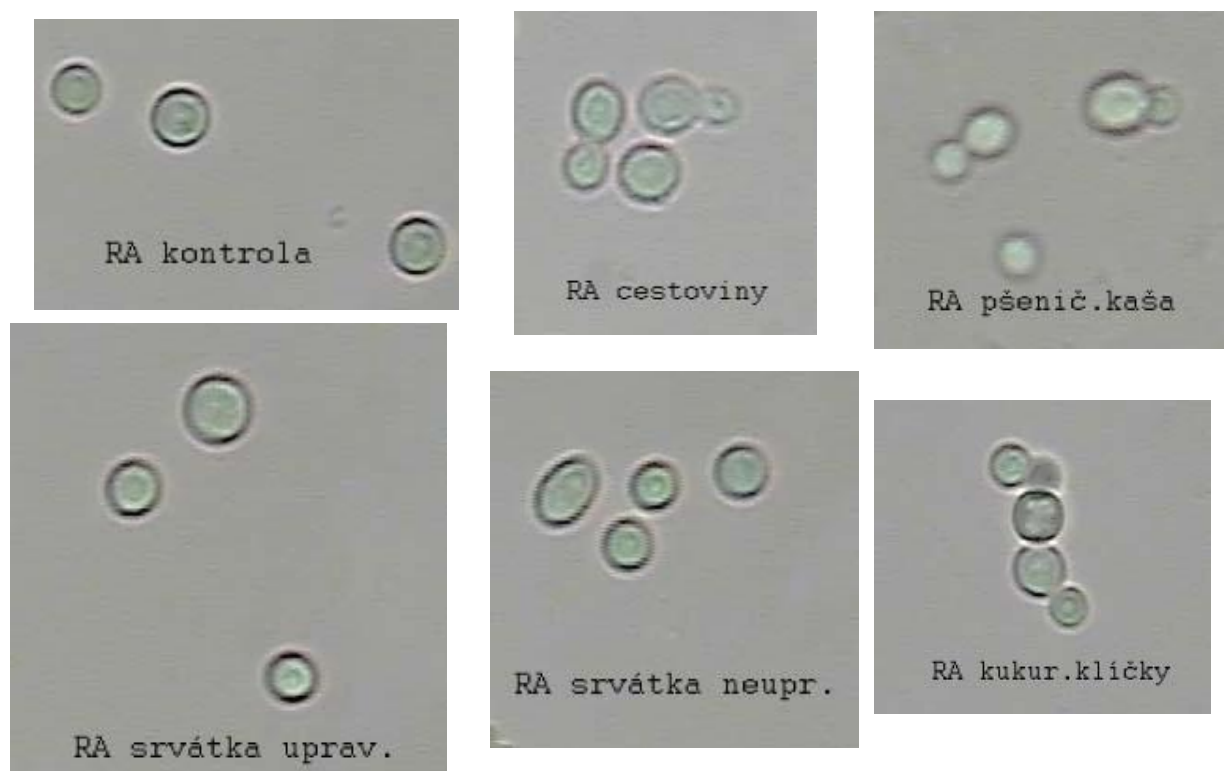


Obrázok 10: Rozdielne sfarbenie produkčných médií 1. série (jablčná vláknina)

Na obrázku 10 možno pozorovať rozličné sfarbenie produkčných médií prvej série. Je zrejmé, že prídavkom odpadových substrátov získali média ružové sfarbenie v prípade ovocných šupiek v porovnaní s kontrolou, ktorá bola len jemne oranžová. Jablčná vláknina v produkčnom médiu spôsobila tmavé, nahnedlé sfarbenie, čo je pravdepodobne spôsobené vlastným zafarbením vlákniny. Intenzívnejšie sfarbenie kultur pestovaných na ovocných odpadoch môže byť vyvolané zvýšenou produkciou pigmentov.

5.1.2. Morfológia kvasiniek 2. série kultivácie

V druhej sérii bolo zloženie INO I aj INO II rovnaké. Líšili sa len jednotlivé produkčné média s prídavkom odlišných odpadových substrátov ako nutričných zdrojov.



Obrázok 11: Morfológia kvasiniek v produkčnom médiu 2. série

Aj v tejto sérii je pre bunky charakteristický oválny, guľatý tvar. V porovnaní s prvou sériou môžeme u niektorých vzoriek opäť pozorovať charakteristický valcovitý tvar buniek v dôsledku prítomnosti kvasničného autolyzáta v médiu. V niektorých médiach (cestoviny, kukuričné klíčky) môžeme vidieť bunky s nedokonale ohraničeným bunkovým obsahom.



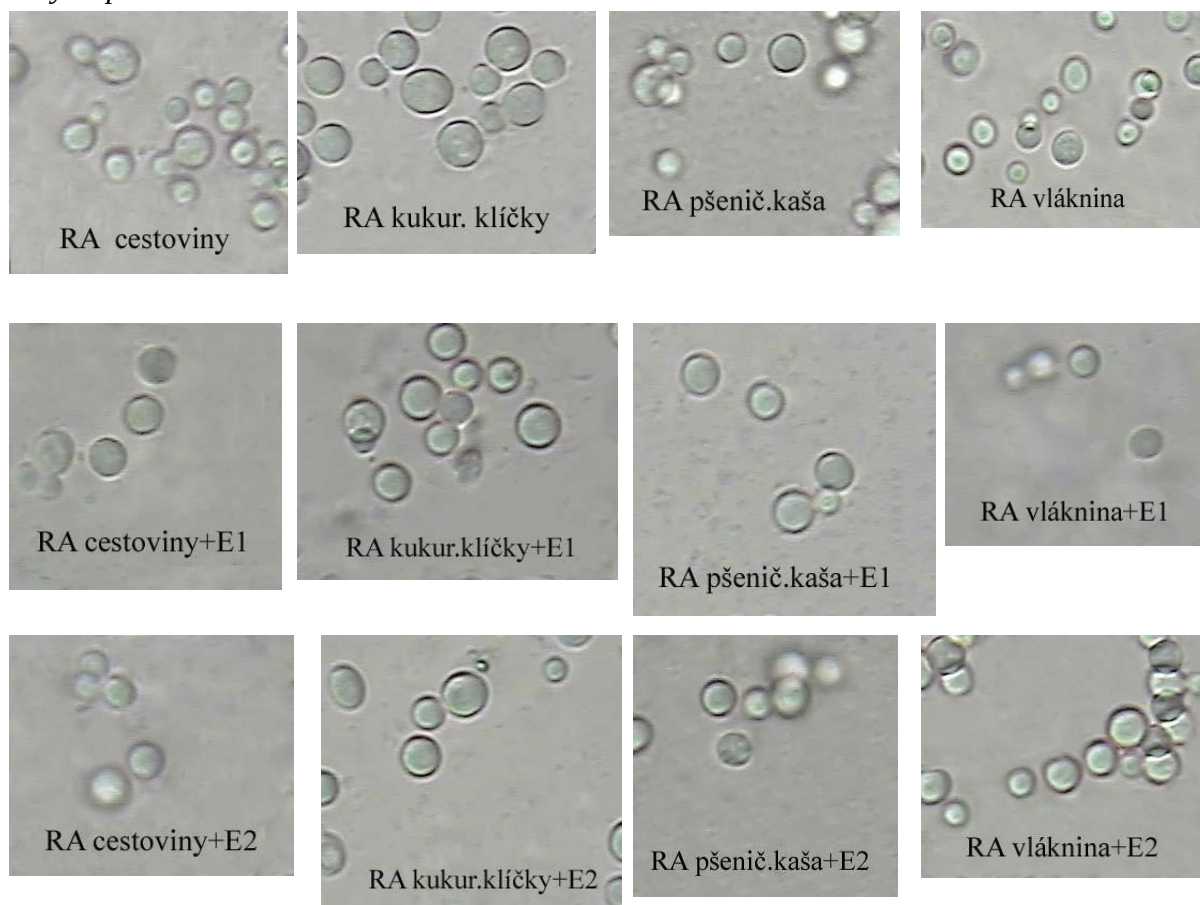


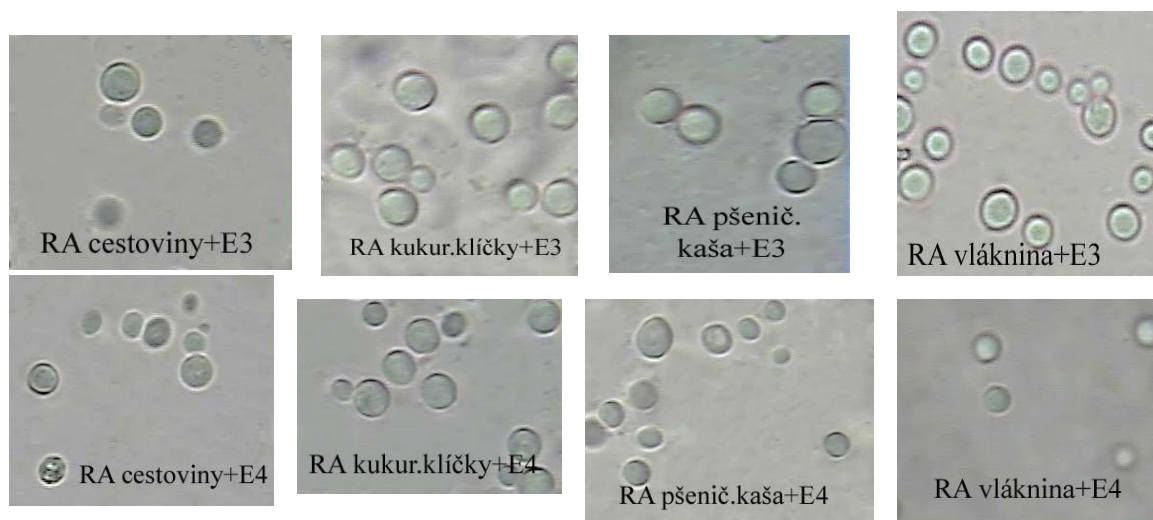
Obrázok 12: Rozdielne sfarbenie produkčných médií 2. série

Aj v druhej sérii bolo kontrolné médium charakteristickej oranžovej farby. S odpadových substrátov farebne k nemu najbližšie boli kukuričné klíčky a cestoviny. Ostatné média boli ružovo sfarbené, pričom v prípade upravenej srvátky išlo o najvýraznejšie ružové zafarbenie, čo by mohlo pravdepodobne naznačovať vyššiu produkciu aj odlišnú zostavu farbív v bunkách.

5.1.3. Morfológia kvasiniek 3. série kultivácie

Taktiež aj v tretej sérii bolo zloženie INO I a INO II rovnaké. Do produkčných médií boli okrem rozličných odpadových substrátov pridávané aj hydrolytické enzýmy s plesní *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Aureobasidium pullulans*, *Phanerochaete chrysosporium*.

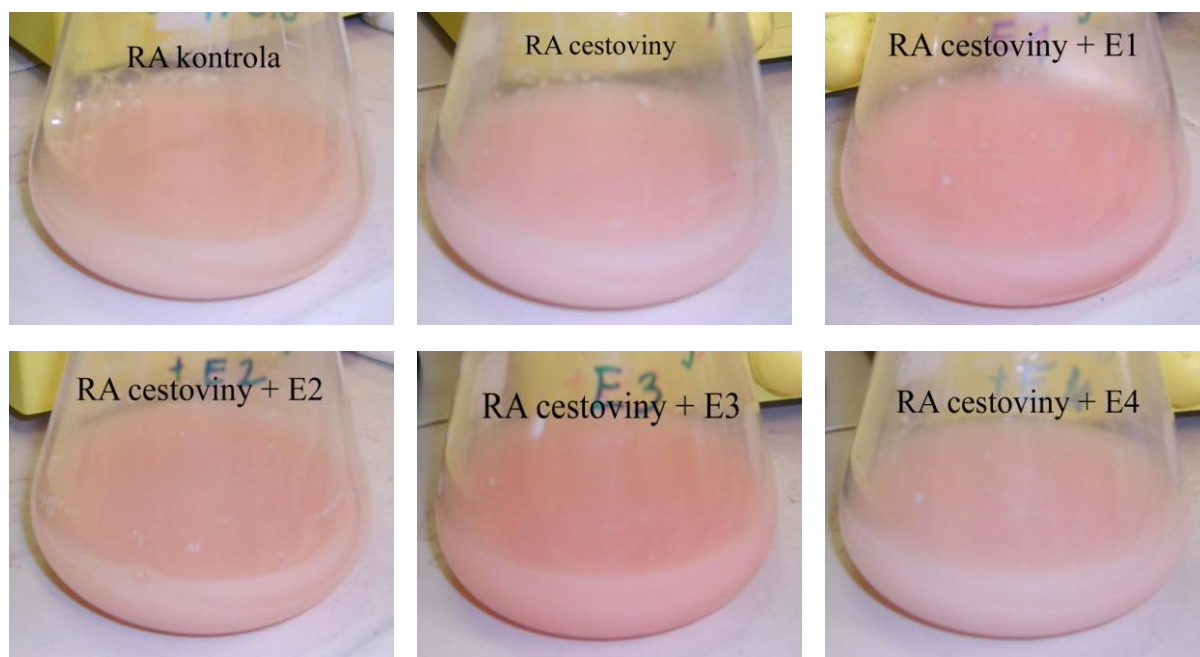


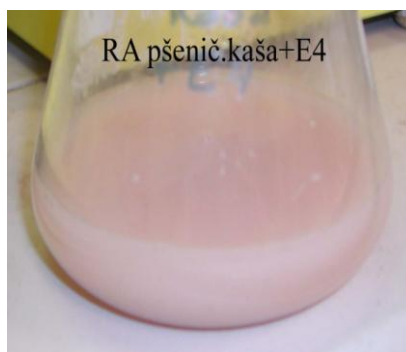
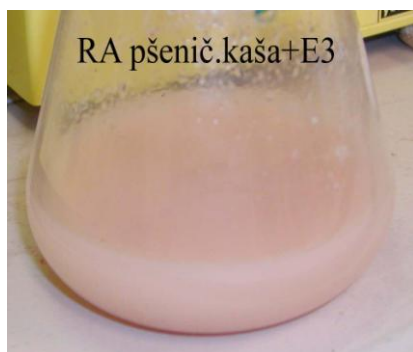
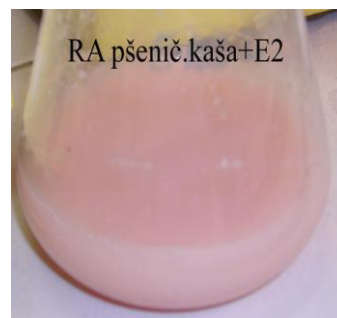
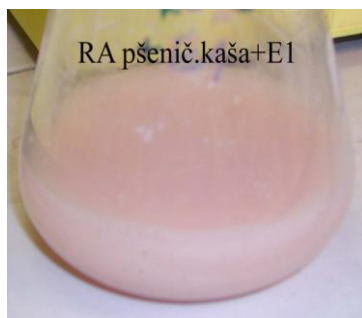
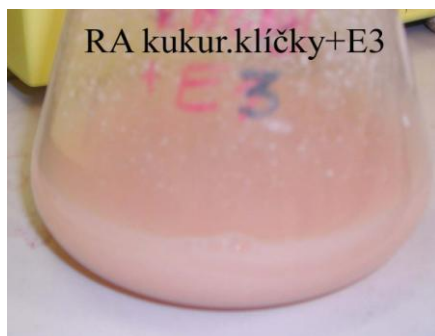


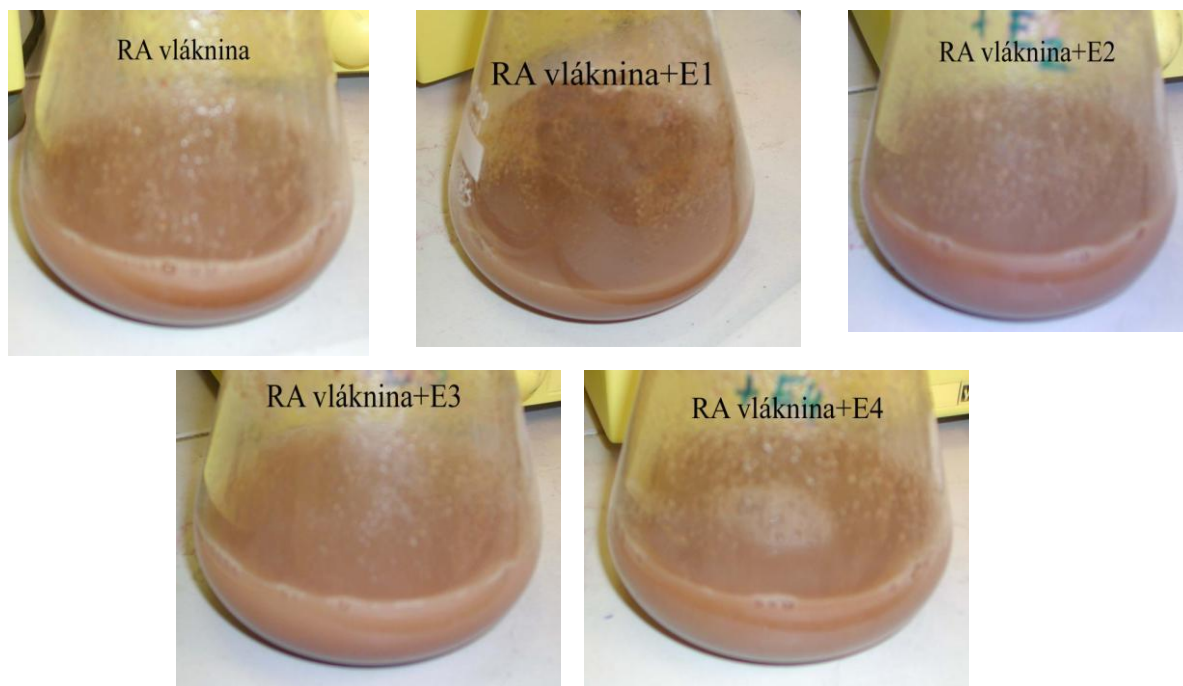
Obrázok 13: Morfológia kvasiniek v produkčnom médiu 3. série, s prídavkom hydrolytických enzýmov.

Na jednotlivých obrázkoch môžeme pozorovať odlišné morfológické znaky u buniek v závislosti na prídavkoch enzýmových preparátov do produkčných médií. Môžeme vidieť, že bunky, ktoré sa nachádzajú v nehydrolyzovaných médiách sú menšie, niektoré bledé a nevýrazné. Zachovávajú si svoj charakteristický oválny až guľatý tvar. V produkčných médiách s prídavkom E2 od plesne *Fusarium solani* možno pozorovať podobné stresové prostredie ako v nehydrolyzovaných médiách, hoci u živného média s kukuričnými klíčkami a vlákninou sú pozorovateľné mierne pozitívne zmeny v morfológii kvasiniek.

Oproti tomu v produkčných médiách s enzýmovým preparátom E3 od plesne *Aureobasidium pullulans* je vidieť viditeľné zlepšenie v tvare jednotlivých buniek pri porovnaní s nehydrolyzovaným médiom. Taktiež prídavok enzýmového preparátu E1 od plesne *Alternaria alternata* mal pozitívny vplyv na morfológiu buniek predovšetkým v produkčnom médiu obsahujúcom pšeničnú kašu, cestoviny i kukuričné klíčky, kedy bunky sú mierne zväčšené a viacej zaguľatené.







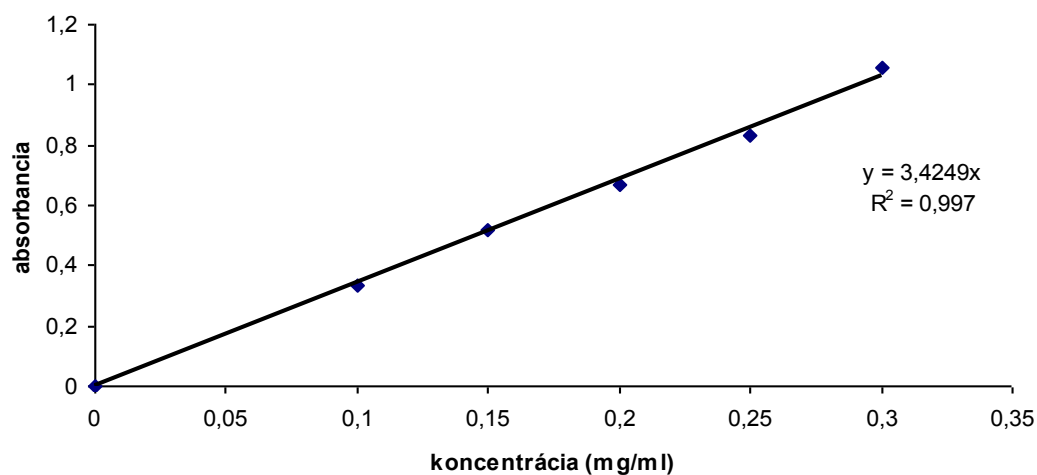
Obrázok 14: Rozličné sfarbenie produkčných médií v 3. sérii.

Na obrázku číslo 14 môžeme pozorovať vplyv jednotlivých odpadových substrátov na sfarbenie produkčného média. Pri porovnaní s kontrolou sú zmeny v zafarbení viditeľné takmer vo všetkých médiách s výnimkou vlákna, ktorej charakteristické hnedé sfarbenie prekrýva farbu média. Živné média rôznych odpadových substrátov, no bez prídania enzýmového preparátu majú charakteristické oranžové sfarbenie podobne ako kontrola. Najvýraznejšie ružové sfarbenie pozorujeme v preparátoch s obsahom cestovín a prídavkom E1 a E3. V týchto médiách bola pozorovaná aj lepšia morfológia buniek. U väčšiny hydrolyzovaných médií je pozorované tmavšie sfarbenie v porovnaní s nehydrolyzovanými, no výnimku v tomto prípade tvoria média pre všetky odpadové substráty s prídanim E4. Je treba poznamenať, že v tejto sérii bola neobvykle ružovo sfarbená aj kontrolná kultúra, takže výsledky môžu byť skreslené – k zmenám produkcie pigmentov môže viesť kolísanie prúdu (nestabilná teplota) či vypnutie v priebehu noci (znížená aerácia a osvetlenie).

5.2. Analýza redukujúcich sacharidov v hydrolyzovaných médiách

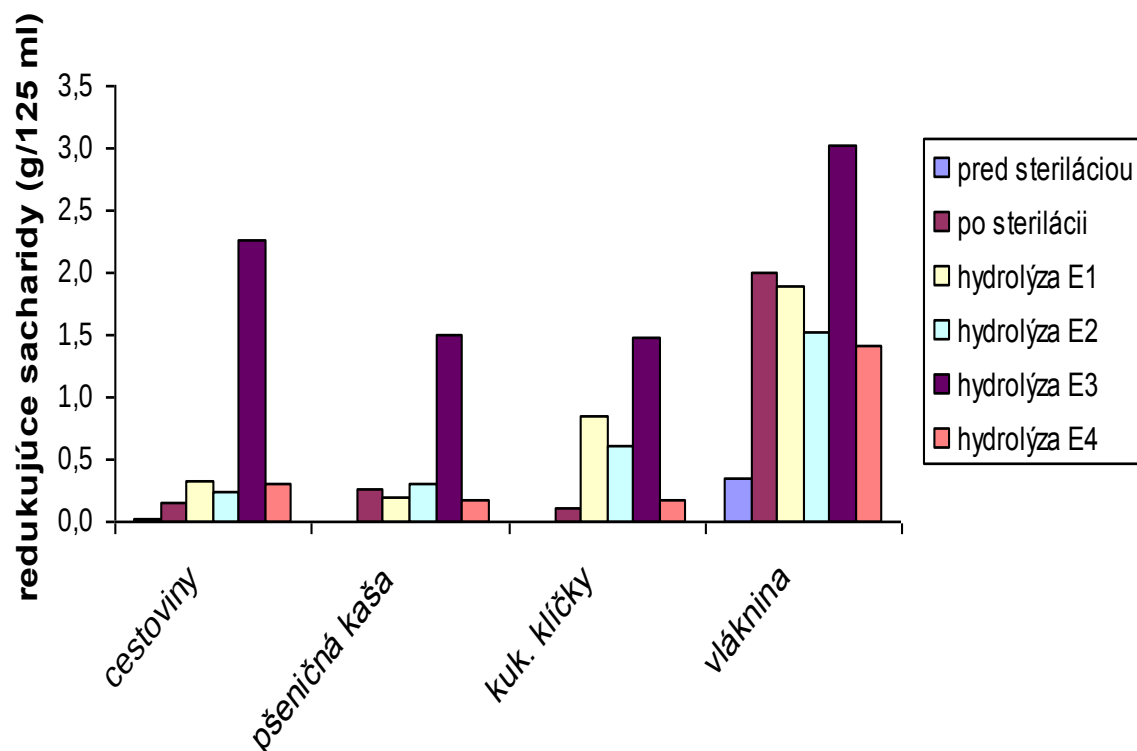
Metódou Somogyiho-Nelsona (kap. 4.5.) boli stanovené redukujúce sacharidy po odobratí vzorku z médií s obsahom odpadových substrátov pred a po sterilácii I, a taktiež aj po prídaní enzýmových preparátov a následnom vysterilovaní (sterilácia II). V paralelne vypracováanej diplomovej práci bola zostrojená kalibračná krivka závislosti koncentrácie na absorbancii pre výpočet množstva redukujúcich sacharidov v produkčnom médiu. Nakoniec, pre porovnanie, boli redukujúce sacharidy stanovené aj v enzymatických preparátoch.

Kalibračná krivka redukujúcich sacharidov



Graf 1: Kalibrační krivka závislosti [34].

Množství redukujících sacharidov v g/125 ml média



Graf 2: Obsah redukujúcich sacharidov v hydrolyzovaných médiách.

Tabuľka 8: Analýza obsahu redukujúcich sacharidov v médiách po enzýmovej hydrolýze.

odpadový substrát (g/125 ml)	pred steriláciou	po sterilácii	hydrolýza s E1	hydrolýza s E2	hydrolýza s E3	hydrolýza s E4
cestoviny	0,020	0,147	0,334	0,238	2,27	0,297
pšeničná kaša	0,002	0,268	0,198	0,305	1,493	0,166
kuk. klíčky	0,002	0,103	0,858	0,617	1,478	0,178
vláknina	0,353	2,007	1,887	1,526	3,026	1,42

Z grafu 2 a tabuľky 8 je na prvý pohľad jasné, že došlo ku nárastu hodnôt redukujúcich sacharidov po 24 hodinovej hydrolýze odpadu s enzýmovými preparátmi. Týmto bola dokázaná hydrolytická aktivita kmeňov húb voči sacharidom. Taktiež sterilácia v nemalej miere ovplyvňuje hodnotu redukujúcich sacharidov, čo môžeme pozorovať v tabuľke očividným zvýšením hodnôt redukujúcich cukrov.

Do jednotlivých produkčných médií bolo na ich hydrolýzu pridaných 1,5 ml z každého enzýmového preparátu. V tabuľke 9 môžeme vidieť, koľko redukujúcich sacharidov sme pridali do média spolu s enzýmovým preparátom.

Tabuľka 9: Množstvo redukujúcich cukrov v jednotlivých enzýmových preparátoch.

	1000x riedenie	redukujúce sacharidy (g/15 ml)	redukujúce sacharidy (g/1,5 ml)
E1 - <i>Alternaria alternata</i>	0,929	4,069	0,407
E2 - <i>Fusarium solani</i>	0,409	1,791	0,179
E3 - <i>Aureobasidium pullulans</i>	0,783	3,429	0,343
E4 - <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	0,236	1,034	0,103

Zrovnáním výsledkov štiepenia polysacharidových zložiek odpadových substrátov možno konštatovať, že najvyšší prírastok redukujúcich cukrov bol dosiahnutý na väčšine médií hydrolyzovaných zmesným enzýmom E3 z *Aureobasidium pullulans*. Vysoké stupne hydrolýzy boli pozorované aj pri aplikácii ostatných enzýmov na jablčnú vlákninu.

5.3. Produkcia karotenoidov a ergosterolu na rôznych typoch substrátu

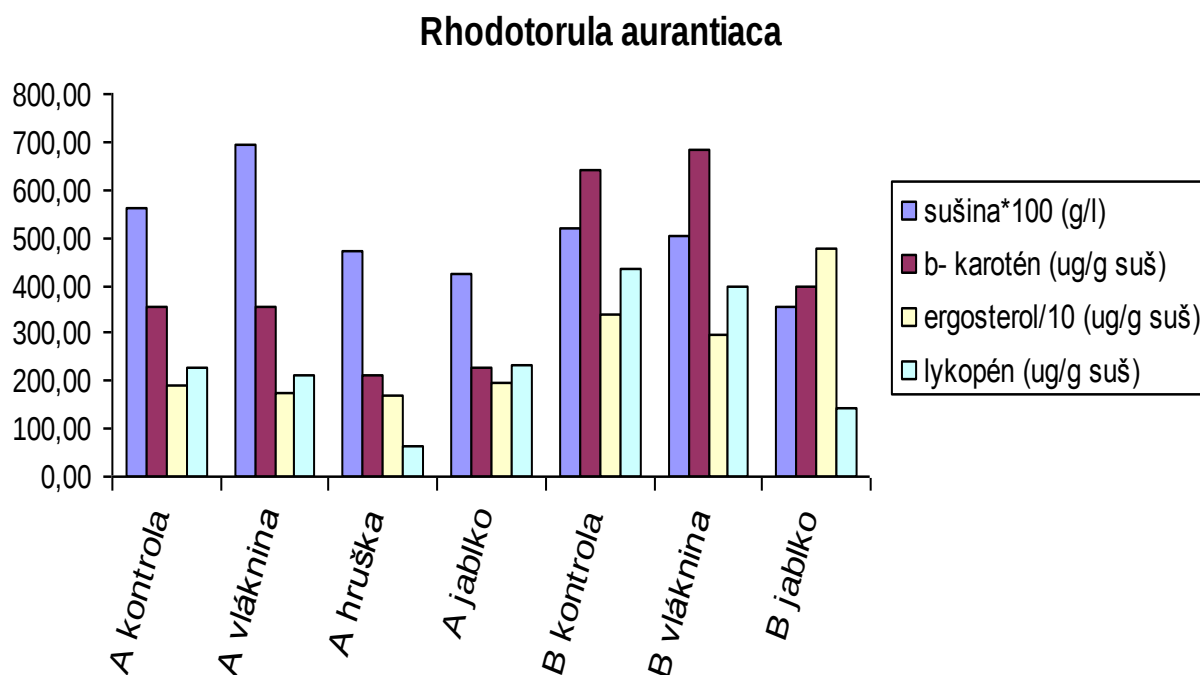
Experimentálna časť bola zameraná predovšetkým na zmeny produkcie karotenoidov a produkcie biomasy v závislosti na použitom type substrátu. Išlo konkrétne o karotenoidné farbivá β - karotén a lykopén, z ktorých má najväčší praktický význam práve β - karotén. Okrem týchto dvoch pigmentov bola v každej sérii kultivácie analyzovaná aj prítomnosť membránového sterolu kvasiniek – ergosterolu, ktorý slúži aj ako provitamín D.

Extrakciou pigmentov v acetóne a ich následným zmýdelnením boli farbivá izolované a ich obsah bol nameraný pomocou HPLC. Výsledky a grafy z jednotlivých kultivácií všetkých sérií sú uvedené na nasledujúcich stránkach práce.

5.3.1. Produkcia karotenoidov a ergosterolu - 1. séria kultivácie

Na grafe 3 môžeme pozorovať a porovnávať odlišnú produkciu biomasy i farbív v jednotlivých médiách, ktoré sa líšili odpadovým substrátom či zložením INO II pri kultivácií v rámci prvej série. Je zaujímavý fakt, že karotenoidové farbivá β - karotén i lykopén, ale taktiež aj ergosterol, mali zvýšenú produkciu v živných médiách, ktoré

obsahovali v INO II jablčnú vlákninu oproti médiám obsahujúcim kvasničný autolyzát. Najvyššia produkcia β - karoténu (683,197 $\mu\text{g/g}$ sušiny) bola v produkčnom médiu obsahujúcom zmes glukózy a jablčnej vlákniny a taktiež aj v médiu obsahujúcom iba glukózu. V tomto zložení produkčného média sa podarilo vyprodukovať aj najväčší podiel sušiny (6,949 g/l), ale s tým rozdielom, že INO II obsahovalo kvasničný autolyzát.



Graf 3: Produkcia biomasy a farbív v produkčných médiách 1. série.

Tabuľka 10: Nárast produkcie biomasy a farbív v 1. sérii kultivácie.

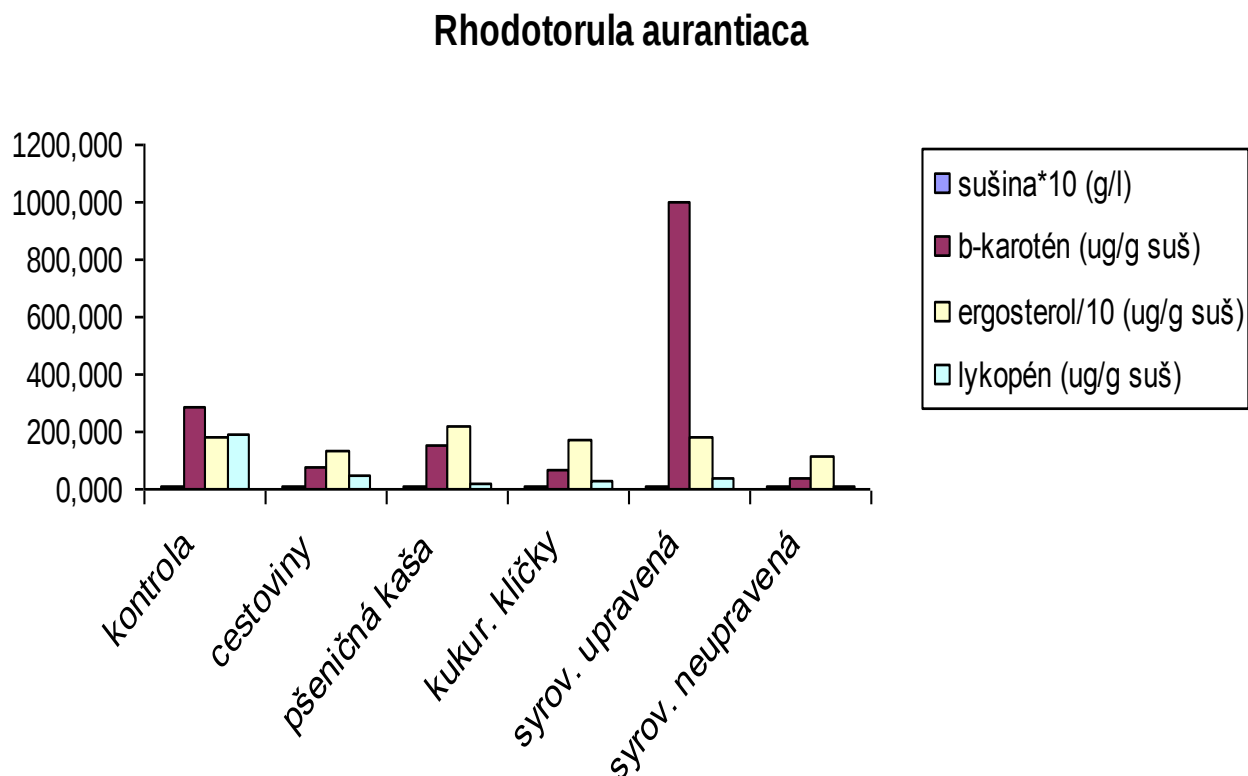
označenie	množstvo			
	sušina (g/l)	β - karotén ($\mu\text{g/g}$ sušiny)	ergosterol ($\mu\text{g/g}$ sušiny)	lykopén ($\mu\text{g/g}$ sušiny)
A kontrola	5,600	355,277	1 886,775	227,616
A vláknina	6,949	354,096	1 728,612	212,400
A hruška	4,692	211,246	1 700,665	62,921
A jablko	4,223	226,511	1 955,545	235,042
B kontrola	5,200	638,819	3 400,712	436,471
B vláknina	5,053	683,197	2 975,846	399,361
B jablko	3,558	398,186	4 757,839	142,471

Na druhej strane najmenej β - karoténu a zároveň aj sušiny bolo vyprodukovaných v médiách s hruškovými a jablčnými šupkami aj pre obe zloženia INO II.

Na základe tejto kultivácie možno povedať, že kvasinkové bunky sa najlepšie adaptujú na jablčnú vlákninu a glukózu, ktoré pre ne predstavujú vhodný nutričný zdroj. To napríklad dokazuje aj fakt, že β - karoténu sa darilo v tomto zložení média aj pri INO II, ktoré obsahovalo kvasničný autolyzát. Produkcia lykopénu bola súbežná s produkciou β - karoténu, no len v oveľa menšej miere. Naopak ergosterol sa najviac produkoval v médiu s jablčnými šupkami, kde ostatné pigmenty i sušina boli produkované pomenej.

Z merania možno pravdepodobne usúdiť, že jablčná vláknina pridaná do INO II viac produkuje nárast β - karoténu a pigmentov ako produkciu biomasy. Pre nárast biomasy je vhodnejšie skôr INO II obsahujúce kvasničný autolyzát.

5.3.2. Produkcia karotenoidov a ergosterolu - 2. séria kultivácie



Graf 4: Produkcia farbív a biomasy v produkčných médiách 2. série.

Tabuľka 11: Nárast produkcie biomasy a farbív v 2. sérii kultivácie.

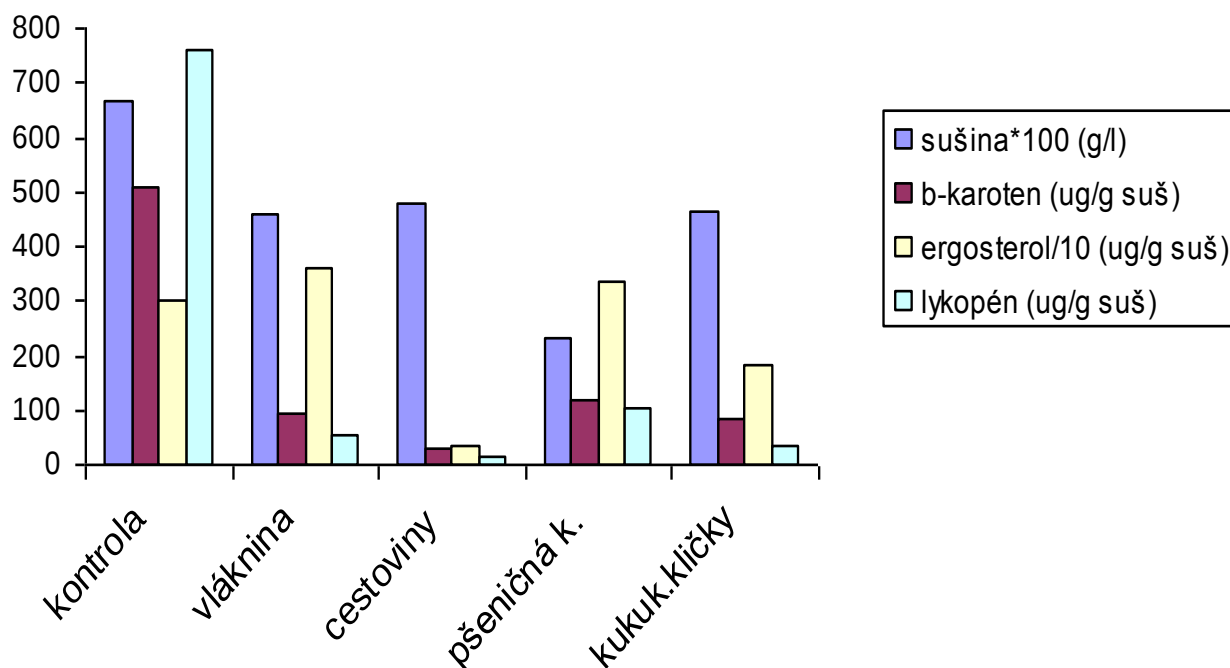
označenie	množstvo			
	sušina (g/l)	β -karotén (µg/g sušiny)	ergosterol (µg/g sušiny)	lykopén (µg/g sušiny)
kontrola	8,541	282,552	1 799,971	189,334
cestoviny	6,099	77,944	1 290,516	45,426
pšeničná kaša	5,425	148,915	2 162,379	18,739
kukur. klíčky	6,968	69,304	1 698,940	27,385
syrov. upr.	6,968	996,776	1 827,789	42,054
syrov. neupr.	8,356	40,212	1 140,633	14,160

V grafe 4 môžeme pozorovať produkciu farbív a sušiny v závislosti na rôznych odpadových substrátoch v produkčnom médiu pre 2. sériu. V tomto prípade ale INO II pre všetky vzorky obsahovalo kvasničný autolyzát. Viditeľnú nadprodukciu β -karoténu (996,776 µg/g sušiny), dokonca niekoľkonásobnú, môžeme pozorovať pri médiu s obsahom upravenej srvátky. Čo je dosť zaujímavé aj z toho dôvodu, že v neupravenej srvátke je jeho produkcia najnižšia v porovnaní s ostatnými substrátmi a zároveň je tu druhá najvyššia

produkcia sušiny (8,356 g/l). Vačšina médií (okrem kontroly a upravenej srvátky) je ale charakteristická najväčším nárastom ergosterolu, ku ktorého k produkcii viedla predovšetkým kultivácia na médiu so pšeničnou kašou.

5.3.3. Produkcia karotenoidov a ergosterolu - 3. séria kultivácie

Rhodotorula aurantiaca



Graf 5: Produkcia farbív a biomasy v produkčných médiách 3 série.

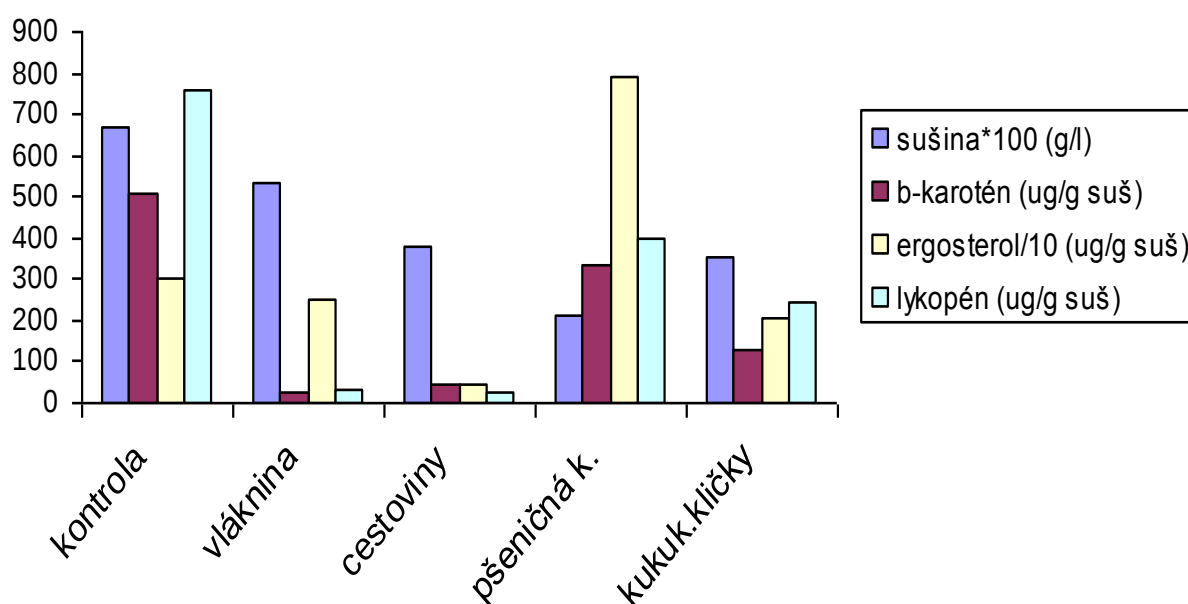
Tabuľka 12: Nárast produkcie farbív a biomasy v 3. sérii kultivácie.

označenie	množstvo			
	sušina (g/l)	β-karotén (µg/g sušiny)	ergosterol (µg/g sušiny)	lykopén (µg/g sušiny)
kontrola	6,675	508,232	3 005,407	759,777
vláknina	4,584	95,834	3 596,414	53,528
cestoviny	4,78	27,808	329,728	15,492
pšeničná k.	2,327	119,346	3 376,619	104,673
kukuk.klíčky	4,662	81,624	1 826,134	36,705

Na grafe 5 možno pozorovať nárast biomasy a produkciu farbív pri kultivácii 3 série produkčných médií s inými odpadovými substrátmi. Ako je z grafu zrejmé, na jednotlivých odpadoch došlo iba k výraznému nárastu biomasy, v niektorých prípadoch dokonca niekoľkonásobnému, v porovnaní so samotnými farbivami. Výnimkou je len ergosterol, ktorý ako jediný zaznamenal vyšší nárast ako biomasa v prípade odpadového substrátu pšeničnej kaše. Jeho najvyššia hodnota je ale na jablčnej vláknine (3 596 µg/g sušiny). Závislosti produkcie biomasy a farbív na vonkajších podmienkach kultivácie možno pozorovať na

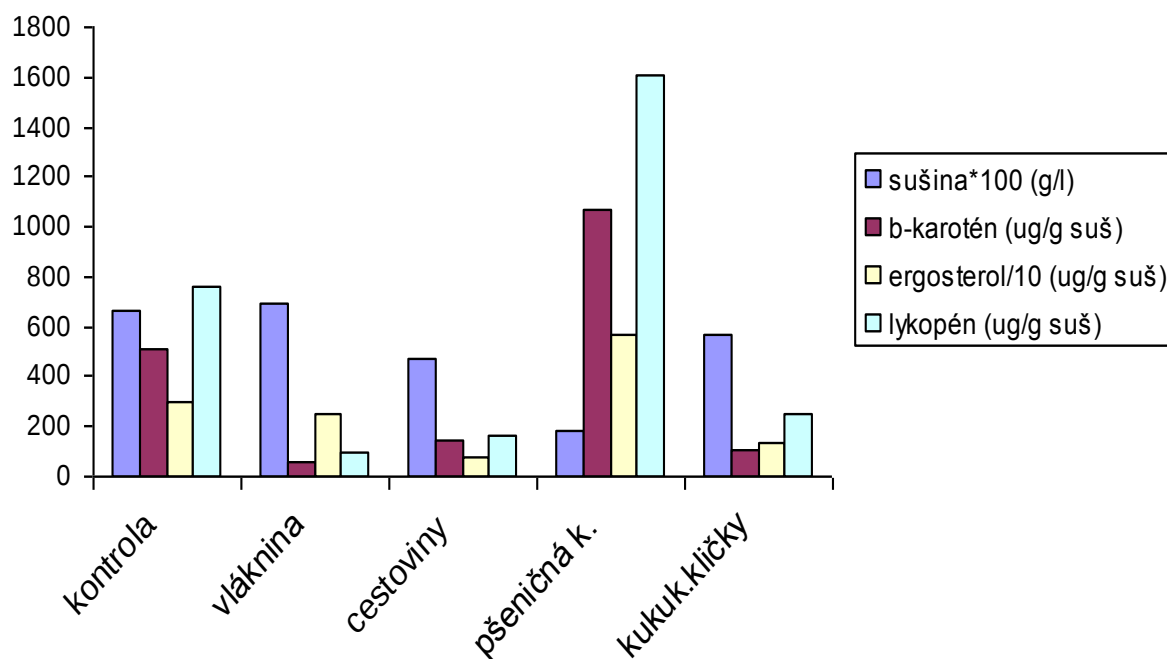
kontrole pre jednotlivé série. V porovnaní 3. série s predchádzajúcimi dvomi je dosť pravdepodobné, že napr. okolitá teplota, či prístup svetla môžu pozitívne ovplyvniť nárast jak biomasy, tak aj farbív. Všetky farbivá zaznamenali zvýšený nárast, konkrétne lykopén (759,777 $\mu\text{g/g}$ sušiny) je niekoľkonásobne väčší ako v prvej či v druhej sérii. To by mohlo znamenať aj fakt, že z nejakej príčiny neprebehla biosyntéza kaorotenoidov až do konca a akumuloval sa lykopén, ktorý je v biosyntetickej dráhe prvým farebným acyklickým prekursorom beta-karoténu.

Rhodotorula aurantiaca + E1



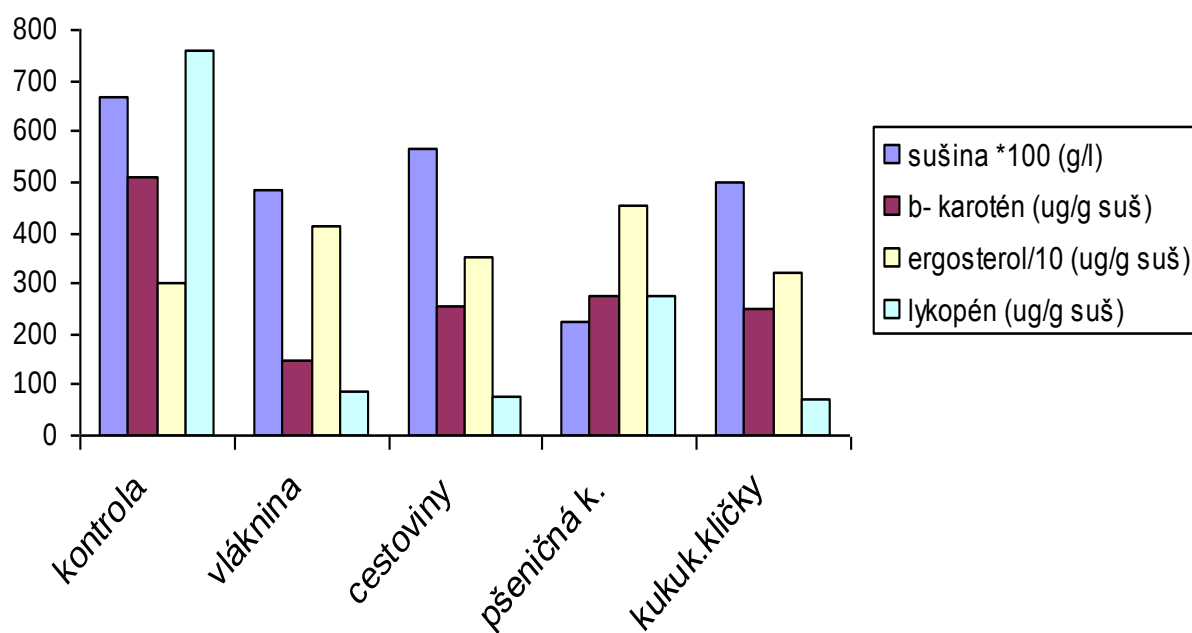
Graf 6: Produkcia farbív a biomasy v produkčných médiách 3. série s pridaním E1

Rhodotorula aurantiaca + E2



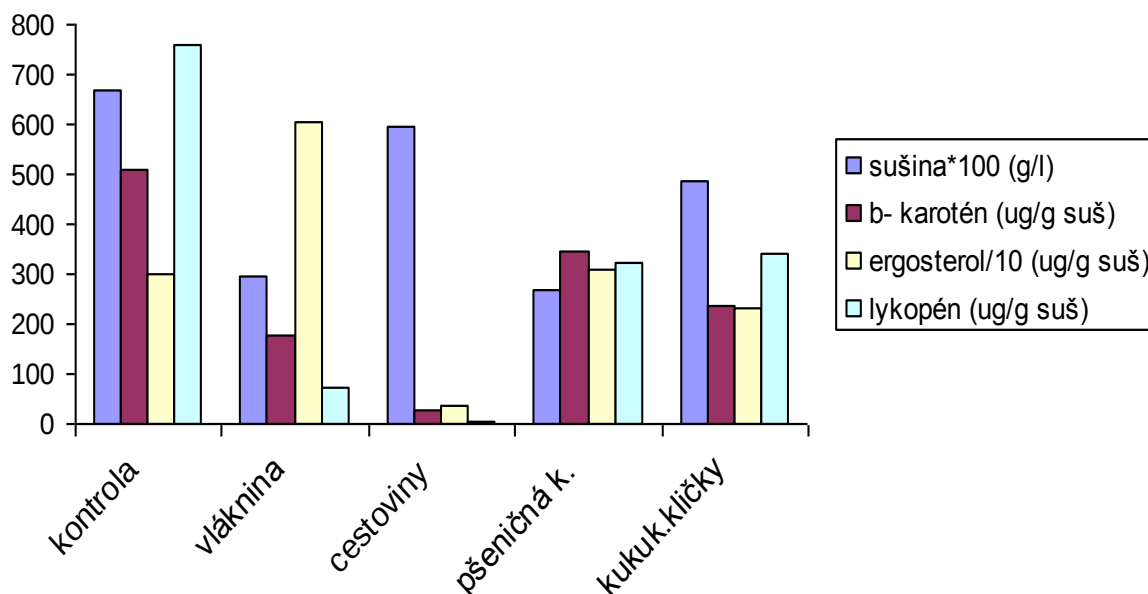
Graf 7: Produkcia farbív a biomasy v produkčných médiách 3. série s pridaním E2

Rhodotorula aurantiaca + E3



Graf 8: Produkcia farbív a biomasy v produkčnom médiu 3. série s pridaním E3

Rhodotorula aurantiaca + E4



Graf 9: Produkcia farbív a biomasy v produkčnom médiu 3. série s pridaním E4

Tabuľka 13: Nárast produkcie farbív a biomasy v 3. sérii kultivácie s pridaním enzýmov z plesní.

enzým	označenie	množstvo			
		sušina (g/l)	β-karotén (µg/g sušiny)	ergosterol (µg/g sušiny)	lykopén (µg/g sušiny)
E1	vláknina	5,366	24,276	2 478,858	31,09
	cestoviny	3,803	43,669	436,983	26,373
	pšeničná k.	2,122	332,43	7 938,7	398,004
	kukuk.klíčky	3,534	129,345	2 054,318	242,957
E2	vláknina	6,929	58,682	2 541,912	93,016
	cestoviny	4,682	147,502	802,856	164,559
	pšeničná k.	1,839	1 068,509	5675,822	1 609,551
	kukuk.klíčky	5,66	109,47	1374,855	245,485
E3	vláknina	4,858	147,711	4112,213	87,564
	cestoviny	5,659	256,95	3 501,116	75,664
	pšeničná k.	2,23	276,919	4 528,138	272,89
	kukuk.klíčky	4,985	249,803	3 193,972	72,952
E4	vláknina	2,943	179,406	6 050,536	72,421
	cestoviny	5,972	27,807	375,618	4,998
	pšeničná k.	2,689	344,152	3 082,823	323,82

V grafoch 6 - 9 môžeme pozorovať viditeľné zmeny v náraste biomasy a produkcii farbív po pridaní hydrolytických enzýmov do produkčných médií. Všeobecne je z grafov zrejmé, že pridanie spomínaných enzýmov do živných médií viedlo ku zvýšenej produkcii jednotlivých farbív, k zmene ich pomeru a v niektorých prípadoch aj ku zvýšenej produkcii biomasy. U ergosterolu môžeme dokonca hovoriť o nadprodukcii. Táto skutočnosť potvrdzuje fakt, že polysacharidy sú rozkladané hydrolytickými enzýmami v príslušných médiách, čo umožňuje kvasinkovým bunkám lepšie využiť substráty pre produkciu pigmentov a sterolov.

Najväčšie hodnoty produkovaných metabolitov sa dosahujú predovšetkým po pridaní zmesného enzýmu z plesne E2 - *Fusarium solani*, kvasinka *R.aurantiaca* produkuje relatívne vysoké množstvo biomasy na hydrolyzovaném vláknine (6,929 g/l) a tiež relatívne vysoké množstvo β -karoténu (1 068,509 $\mu\text{g/g}$ sušiny) i lykopénu (1 609,551 $\mu\text{g/g}$ sušiny) na hydrolyzovanej pšeničnej kaši. Naopak u ergosterolu bola zaznamenaná najväčšia produkcia po pridaní E1 – *Alternaria alternata* k pšeničnej kaši (7 938,7 $\mu\text{g/g}$ sušiny). V prípade karotenoidových pigmentov a ergosterolu bola teda najvhodnejším odpadovým substrátom pšeničná kaša, ktorá aj pri porovnaní s kontrolou vykazovala jedny z najvyšších hodnôt produkcie jednotlivých zložiek. U produkcie čistej biomasy bola najlepším nutričným zdrojom jablčná vlákna, ktorá sa pozitívne uplatnila aj v predchádzajúcich sériách merania. Napriek tomu je ale trvale vysoký nárast biomasy pozorovateľný u kontroly (cca 6,8 g/l).

Z jednotlivých sérií meraní a kultivácií vyplýva, že ako najlepšie kultivačné médium pre nárast biomasy sa uplatnilo médium s obsahom kvasničného autolýzátu v INO II. Najvyššie hodnoty dosahovala biomasa práve v prítomnosti glukózy a jablčnej vlákniny ako nutričných zdrojov. Naopak najnižšie hodnoty biomasy boli namerané v médiách s pridaním E2 a E3 a s obsahom pšeničnej kaše. Tu možno vidieť veľký rozdiel, pretože vysoká produkcia β -karoténu bola dosiahnutá práve v produkčných médiách obsahujúcich upravenú srvátku a pšeničnú kašu s pridaním E2, kde bola najvyššia hodnota beta-karoténu (1 068,509 $\mu\text{g/g}$ sušiny). Pšeničná kaša, tentokrát ale s pridaním E3 i E2, sa taktiež ukázala ako najvhodnejšie živné médium aj pre produkciu ergosterolu a lykopénu, ktorý veľmi dobre rástol aj na jablčnej vlákne, dokonca niekoľkonásobne vyššie v porovnaní s ostatnými médiami obsahujúcimi iné odpadové substráty. Bez pridaní enzýmov boli najlepšimi nutričnými zdrojmi pre ergosterol i lykopén predovšetkým jablčné šupky, jablčná vlákna a v neposlednom rade aj čistá glukóza.

Na druhej strane ako najmenej produktívny odpadový substrát sa ukázala srvátka neupravená a tiež kukuričné klíčky. V porovnaní s kontrolným médiom tieto vzorky vykazujú najmenšie hodnoty produkcie pigmentov, sterolov aj biomasy a tým pádom nie sú vhodné ako prídavok do inokulačného či produkčného média.

V konečnom dôsledku možno zhrnúť, že kvasinka *Rhodotorula aurantiaca* je za vhodných vonkajších podmienok s kombináciou so správnym využitím odpadových substrátov ako nutričných zdrojov nádejným mikroorganizmom do budúcnosti vykazujúcim relatívne dobré produkčné vlastnosti. Pokračovanie v štúdiu a výskume by mohlo viesť ku potenciálnemu využitiu kvasinky ako producenta biomasy obohatenej o β -karotén, ergosterol a iné biogénne prvky a ďalšie zložky, nachádzajúce sa v samotnej kvasinkovej biomase i odpadnom substráte.

6. ZÁVERY

- V predloženej práci bola študovaná karotenoidná kvasinka *Rhodotorula aurantiaca* CCY 20-9-7. Cieľom práce bola kultivácia kvasinky na rôznych odpadových substrátoch ako nutričných zdrojoch a sledovanie produkcie biomasy obohatenej o karotenoidné farbivá a ergosterol. Ako nutričné zdroje boli použité predovšetkým odpadové substráty z potravinárskeho či poľnohospodárskeho priemyslu, ako napr. ovocné šupky, jablčná vláknina, srvátka, kukuričné klíčky, pšeničná kaša. Sledoval sa taktiež vplyv a využitie plesní produkujúcich enzýmy ku predpríprave odpadových substrátov.
- V experimentálnej časti boli s kmeňom kvasinky *R. aurantiaca* prevedené 3 kultivácie, ktoré sa navzájom líšili zložením živných médií, kedy v 1. sérii kultivácie boli dve odlišné inokulá II, jedno obsahovalo kvasničný autolyzát a druhé jablčnú vlákninu. V ďalších sériách bol do druhého inokula pridávaný už len kvasničný autolyzát. Niektoré produkčné médiá obsahovali odpadové substráty nehydrolyzované, príp. hydrolyzované pomocou zmesných enzýmových preparátov. Vyprodukovaná biomasa bola analyzovaná turbidimetricky. V každej sérii boli taktiež izolované a následne analyzované tiež farbivá β -karotén, lykopén a ergosterol pomocou HPLC.
- Všeobecne bol najväčší nárast biomasy zaznamenaný na médiách obsahujúcich kvasničný autolyzát v druhom inokulu. Najlepším a dôležitým zdrojom pre produkciu biomasy bola glukóza v produkčnom médiu. Najväčší nárast biomasy bol dosiahnutý počas 3. série kultivácie (6,929 g/l) na produkčnom médiu obsahujúcom ako zdroj nutričov jablčnú vlákninu hydrolyzovanú enzýmovým komplexom získaným z média plesne *Fusarium solani*.
- Najväčšia produkcia β -karoténu (1 069 $\mu\text{g/g}$ sušiny) bola dosiahnutá opäť s enzýmami plesne *Fusarium solani* použitými k hydrolýze pšeničnej kaše. V tomto kultivačnom médiu sa darilo prednostne karotenoidovým farbivám, pretože bola zistená aj najväčšia produkcia β -karoténu (1 068,509 $\mu\text{g/g}$ sušiny) i lykopénu (1 609,551 $\mu\text{g/g}$ sušiny). Vysoká produkcia karoténu bola taktiež dosiahnutá aj počas 1. série kultivácie, kedy živné médium INO II obsahovalo jablčnú vlákninu a odpadovým substrátom bola srvátka upravená (produkované množstvo 997 $\mu\text{g/g}$ sušiny).
- V predloženej práci bolo potvrdené, že vhodnou kombináciou niektorých odpadov z potravinárskeho priemyslu, ktoré sú bohatým nutričným zdrojom, s vhodnými vonkajšími a stresovými podmienkami možno docieľiť pri kultivácii kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* zvýšenú produkciu karotenogénnych farbív ako je β -karotén či lykopén, ako aj ergosterolu. V dnešnej dobe ide o jedno z najpopulárnejších využití odpadov či už z ekologického alebo ekonomického hľadiska. Takto obohatená masa by mohla byť využiteľná v potravinárskom, farmaceutickom alebo kozmetickom priemysle, či ako prídavok do krmív.

7. ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. Praha : Victoria Publishing, 1995. 361 s. ISBN 80-85605-71-6.
- [2] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Yeasts and Yeast-like Organisms*. Weiheim : VCH Verlagsgesellschaft, 1990. 528 s.
- [3] KALINA, T; VÁŇA, J. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Praha : Karolinum, 2005. 606 s.
- [4] VÁZQUES- TSUJI, O, et al. Renal ultrasonography and detection of pseudomycelium in urine as means of diagnosis of renal fungus balls in neonates.. *Mycopathologia*. 2005, 159, s. 200. ISSN 331-337.
- [5] KOCKOVÁ - KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Kvasinky*. 1. Bratislava : Slovenské vydavateľstvo technickej literatúry, 1957. 344 s.
- [6] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1990. 704 s. ISBN 80-05-00644-6.
- [7] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1982. 483 s.
- [8] YURKOV, A. M., et al. Pigmented Basidiomycetous Yeasts Are a Promising Source of Carotenoids and Ubiquinone Q10. *Microbiology*. 2008, vol. 77, no. 1, s. 1-6. ISSN 0026-2617.
- [9] ARMSTRONG, G.A., HEARST, J.E.: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis, *FASEB J.*, 1996, 10, s. 228-237
- [10] ROSE, A. H, HARRISON, J.S. *The yeasts : Volume 2-Physiology and biochemistry of yeasts*. London: Academic Press London, 1971. 571 s. ISBN 12-596402-1.
- [11] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. Academia Praha, 1996.
- [12] KARRER, P., JUCKER, E. *Carotenoids*. Zurich, 1951. 384 s.
- [13] FENNEMA, Qwen R. *Food Chemistry*. 3. New York : Marcel Dekker, 1996. 1069 s. ISBN 0-8247-9346-3.
- [14] VELÍŠEK, J., *Chemie potravin 2*, OSSIS, 2002
- [15] BREIEROVÁ, E., MÁROVÁ, I., ČERTÍK, M. 2005. The role of the carotenoid pigments in yeast cells under stress conditions. *Chem. Listy* 99:109-111.
- [16] TAKÁCSOVÁ, M., PRÍBELA, A.: *Chémia potravin*, STU Bratislava, 1993
- [17] BRITTON, G., LIAAEN- JENSEN, S., PFANDER, H. P.: *Carotenoids: Biosynthesis and metabolism*. Vol. 3, Basel, Switzerland: Birkhäuser, 1998. 415p. ISBN 3-7643-5829-7
- [18] SCHMIDT-DANNERT, C. Engineering novel carotenoids in microorganisms, *Current Opinion in Biotechnology*. 2000, 11: s. 255-261 ISSN 0958-1669/00/\$
- [19] KVASNÍČKOVÁ, A.: *Vitaminy, vitamery, pseudovitaminy, kvazivitaminy*. In BENEŠOVÁ, L. et al. *Potravinářství 4*. 1.vyd.Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1997.s.29-56.ISBN 80-85120-56-9
- [20] VAVRYSOVÁ, Alena. *Produkce karotenoidu kvasinkami rodu Cystofilbasidium*. Brno, 2009. 97 s. Diplomová práce. VUT v Brne.
- [21] DAVOLI, P., MIERAU, V., WEBER, W.S.: Carotenoids and fatty acid in ree yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*, *Appl. Biochem. Microbiol.* 23 40(4) (2004) 392-397.

- [22] MÁROVÁ, I., ČARNECKÁ, M., HALIENOVÁ, A., KOČÍ, R., BREIEROVÁ, E.: Production of carotenoid/ergosterol-supplemented biomass by red yeasts *Rhodotorula glutinis* grown under external stress. *Food Technology and Biotechnology*, 48(1), 2010, p.56-61
- [23] MALISON, C., SUNTORNSUK, W.: Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM 28 in fermented radish brine, *Bioresour.Technol.* 99 (2007) 2281-2287
- [24] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biotechnologie*. Praha : [s.n.], 1991. 182 s. ISBN 80-7080-121 - 2.
- [25] AKSU, Y., EREN, A.T.: Carotenoids production by *Rhodotorula mucilagnosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source, *Process Biochem.* 40 (2005) 2985-8 2991
- [26] ČERTÍK, M., HANUSOVÁ, V., BREIEROVÁ, E., MÁROVÁ, I., RAPTA,P.: Biotechnological production and properties of carotenoid pigments. In:*Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (415 p.), Chapter 25, pp.358-373. Tailor and Francis Group LLt, 2009.
- [27] NĚMEC, M., HORÁKOVÁ, D.: *Základy mikrobiologie*, MU Brno, 1999
- [28] PRÍBELA, A.:*Analýza potravín*, STU Bratislava, 1991
- [29] KROFTA, J., et al.: *Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie II: Kapalinová chromatografie a absorpční UV- spektrofotometrie*. VŠCHT Praha, 2001, 19 s.
- [30] CARERI, M., MANGIA, A., MUSCI, M.: Overview of the applications of liquid chromatography-mass spectrometry interfacing system in food analysis: naturally occuring substances in food, *Journal of Chromatography A* 794, str. 263-297, 1998
- [31] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [32] JULÁK, J.:*Identifikace bakterií metodami instrumentální chemické analýzy*. 1 vyd. Praha: Karolinum, 1998, 196 s. ISBN 80-7184-415-9
- [33] HEZINOVÁ, V.: Diplomová práce, VUT v Brne, 2007
- [34] HÁRONIKOVÁ, Andrea. *Mikrobiální produkce karotenoidních pigmentů s využitím odpadních substrátů*. . Brno, 2010. 92 s. Diplomová práce. VUT v Brne.

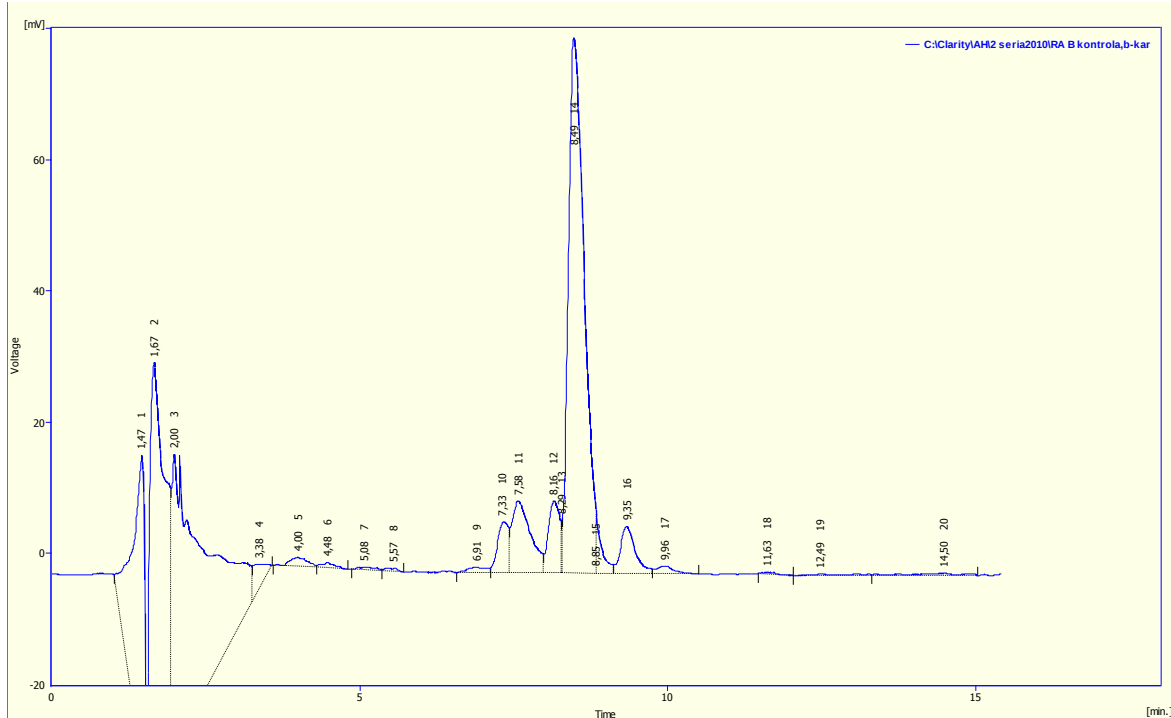
8. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

Acetyl-CoA	acetyl-koenzým A
DMADP	dimethylallyldifosfát
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
INO	inokulum
IPDP	aktívny izoprén
UV	ultrafialová svetlo (oblasť)
VIS	viditeľná svetlo (oblasť)

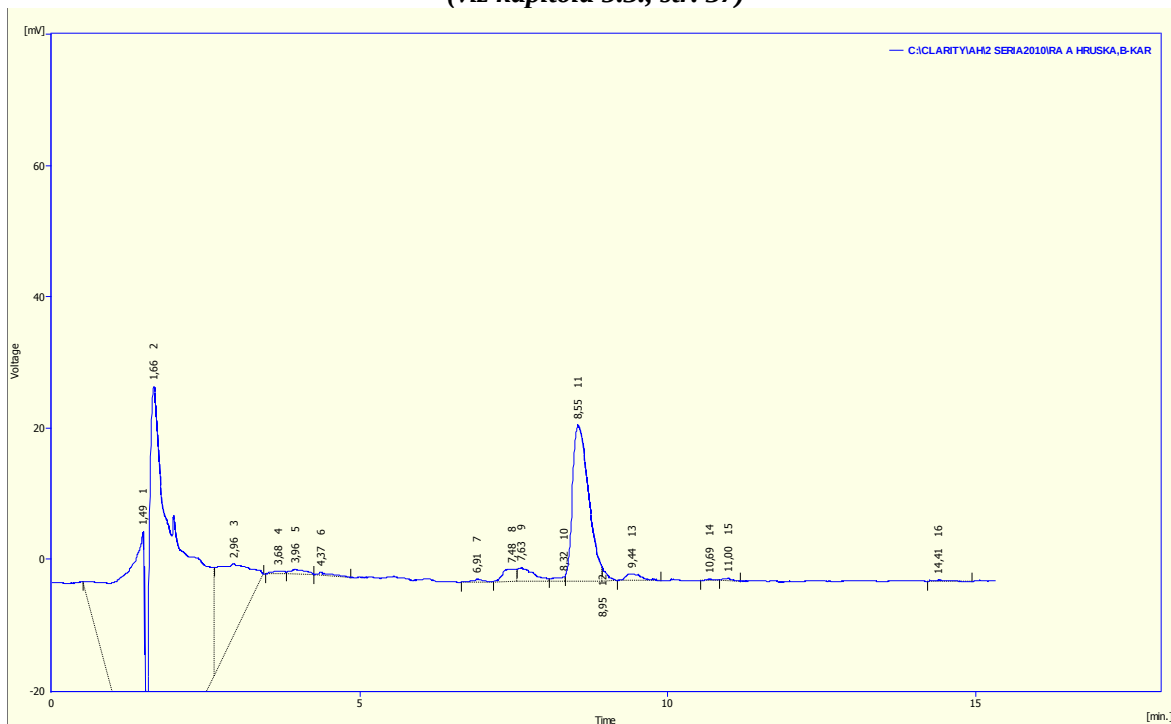
9. ZOZNAM PRÍLOH

- Príloha 1:** HPLC chromatogram – kultivácia na produkčnom médiu s glukózou, obsahujúcim jablčnú vlákninu v INO II
- Príloha 2:** HPLC chromatogram – kultivácia na produkčnom médiu s obsahom hruškových šupiek a s kvasničným autolyzátom v INO II
- Príloha 3:** HPLC chromatogram – kultivácia na produkčnom médiu obsahujúcom kombináciu glukózy a jablčnej vlákniny s kvasničným autolyzátom v INO II
- Príloha 4:** HPLC chromatogram – kultivácia na produkčnom médiu obsahujúcom upravenú srvátku
- Príloha 5:** HPLC chromatogram – kultivácia na produkčnom médiu obsahujúcom upravenú srvátku
- Príloha 6:** HPLC chromatogram – produkcia karotenoidov v produkčnom médiu obsahujúcom cestoviny a prídavkom hydrolytického enzýmu plesne *Fusarium solani*
- Príloha 7:** HPLC chromatogram – produkcia karotenoidov v produkčnom médiu s obsahom pšeničnej kaše a prídavkom enzýmu z plesne *Fusarium solani*

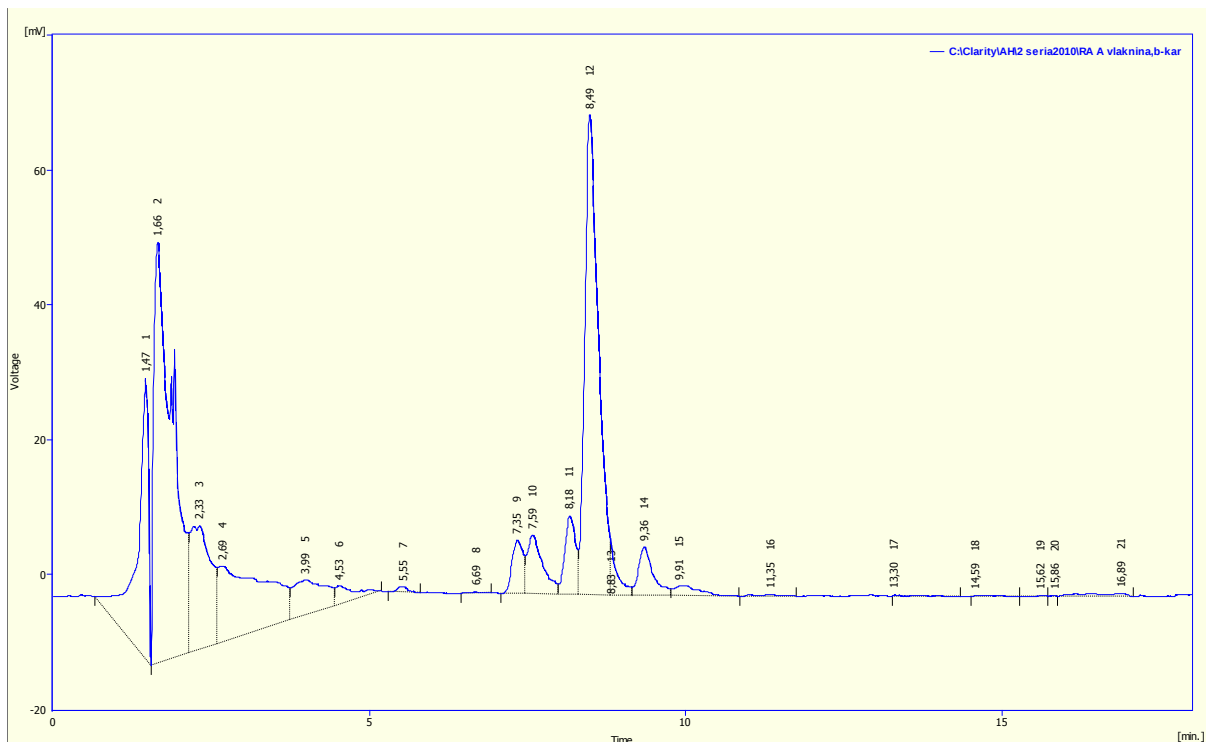
10. PRÍLOHY



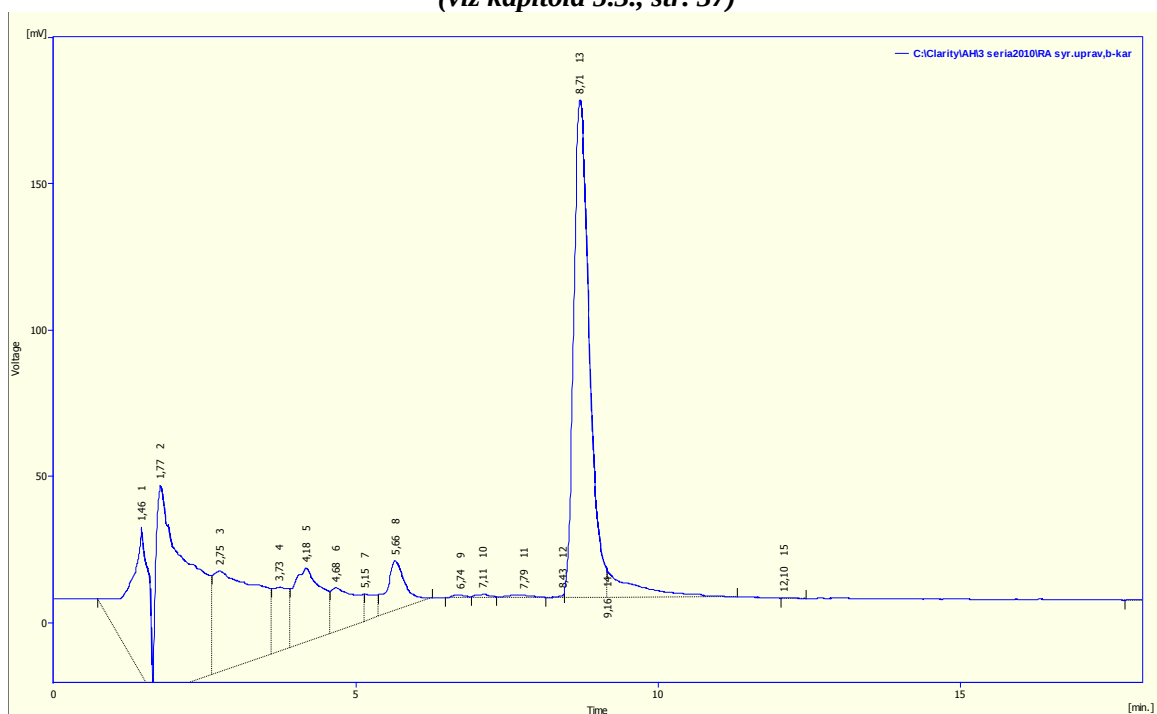
Príloha 1: HPLC chromatogram – kultivácia na produkčnom médiu s glukózou, obsahujúcim jablčnú vlákninu v INO II, hlavný produkovaný pigment β - karotén (8,49 min) (viz kapitola 5.3., str. 37)



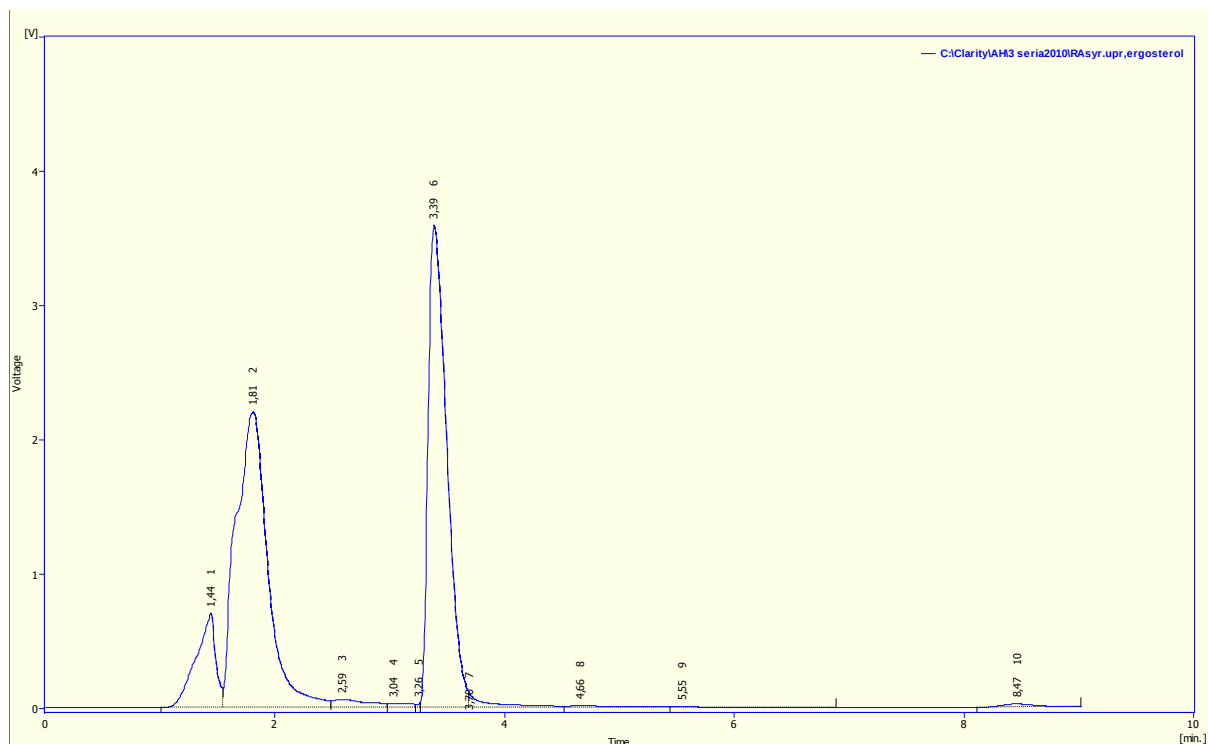
Príloha 2: HPLC chromatogram – kultivácia na produkčnom médiu s obsahom hruškových šupiek a s kvasničným autolýzátom v INO II, hlavný produkovaný pigment β - karotén (8,55 min) (viz kapitola 5.3 , str. 37)



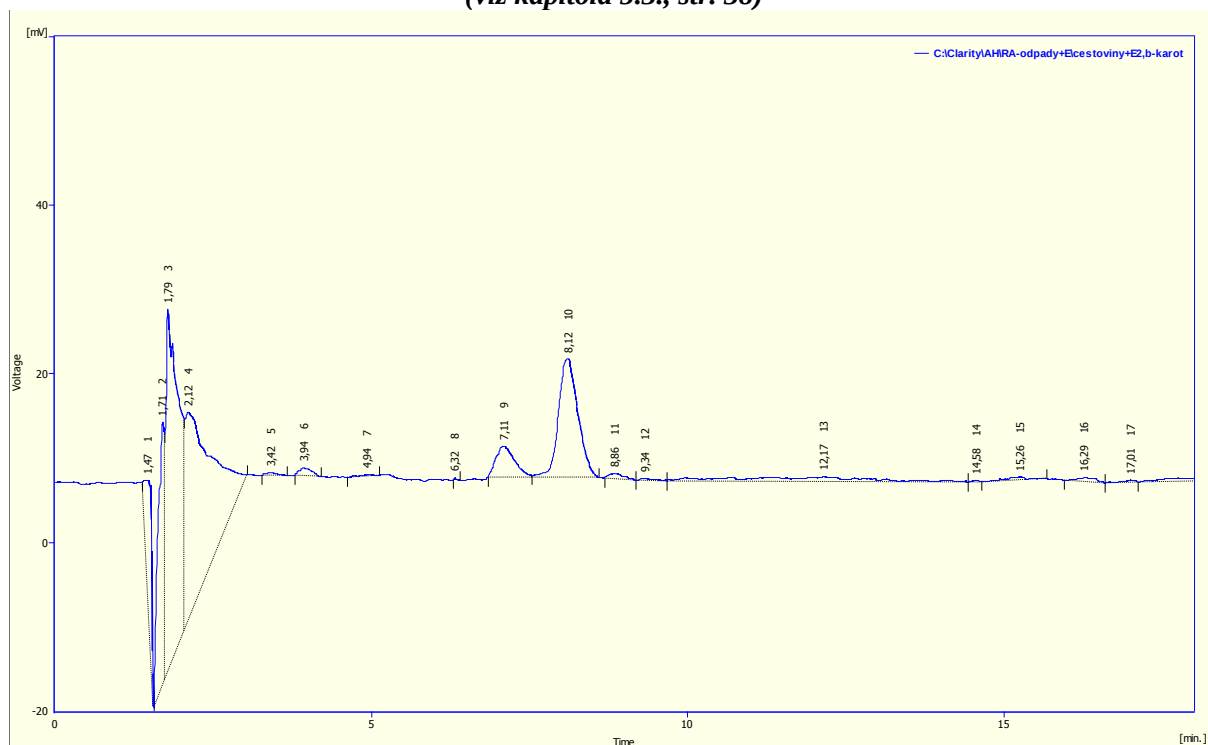
Príloha 3: HPLC chromatogram – kultivácia na produkčnom médiu obsahujúcom kombináciu glukózy a jablčnej vlákniny s kvasničným autolýzátom v INO II, hlavný produkovaný pigment β -karotén (8,49 min)
(viz kapitola 5.3., str. 37)



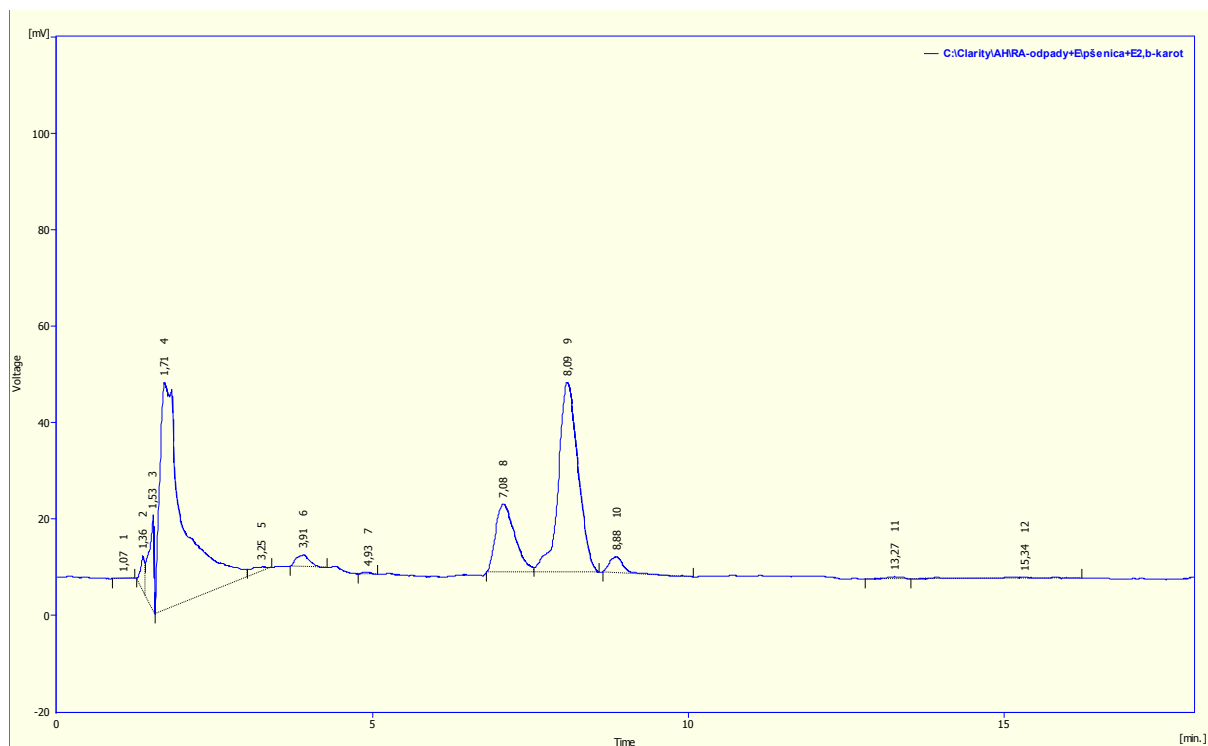
Príloha 4: HPLC chromatogram – kultivácia na produkčnom médiu obsahujúcom upravenú srvátku, hlavný produkovaný pigment β -karotén (8,71 min)
(viz kapitola 5.3., str. 38)



Príloha 5: HPLC chromatogram – kultivácia na produkčnom médiu obsahujúcom upravenú srvátku, produkcia ergosterolu (3,39 min)
(viz kapitola 5.3., str. 38)



Príloha 6: HPLC chromatogram – produkcia karotenoidov v produkčnom médiu obsahujúcom cestoviny a prídavkom hydrolytického enzýmu plesne *Fusarium solani*, hlavný produkovaný pigment β - karotén (8,12 min), lykopén (7,11 min)
(viz kapitola 5.3 , str. 41-42)



Príloha 7: HPLC chromatogram – produkcia karotenoidov v produkčnom médiu s obsahom pšeničnej kaše a prídavkom enzýmu z plesne *Fusarium solani*, hlavný produkovaný pigment β -karotén (8,09 min), lycopén (7,09 min) (viz kapitola 5.3., str. 41-42)