

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLÓGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MIKROBIÁLNÍ PRODUKCE KAROTENOIDNÍCH PIGMENTŮ S VYUŽITÍM ODPADNÍCH SUBSTRÁTŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

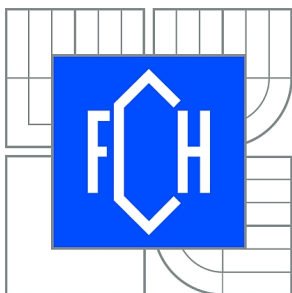
AUTHOR

Bc. ANDREA HÁRONIKOVÁ

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

MIKROBIÁLNÍ PRODUKCE KAROTENOIDNÍCH PIGMENTŮ S VYUŽITÍM ODPADNÍCH SUBSTRÁTŮ

MICROBIAL PRODUCTION OF CAROTENOID PIGMENTS USING WASTE SUBSTRATES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. ANDREA HÁRONIKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2010



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0362/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Andrea Hároniková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Mikrobiální produkce karotenoidních pigmentů s využitím odpadních substrátů

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše - přehled mikrobiálních producentů karotenoidů, možnosti řízení produkce pigmentů.
2. Optimalizace podmínek extrakce a chromatografické analýzy karotenoidů
3. Produkce karotenoidů vybranými kvasinkami rodu *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* a *Cystofilobasidium* s využitím modifikace složení kultivačního média.
3. Využití vybraných typů odpadních substrátů ke kultivaci karotenogenních kvasinek.

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Andrea Hároniková
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 prirodzene vyskytujúce sa pigmenty produkované baktériami, kvasinkami, vláknitými hubami i rastlinami. Majú významné biologické účinky s využitím v potravinárskom priemysle, farmácii i kozmetike. Cieľom diplomovej práce poňatej ako zrovnávacia štúdia bola regulácia produkcie karotenoidov a ergosterolu kvasinkami s využitím odpadových substrátov ako srvátka, kukuričné klíčky, pšeničná kaša, jablčná vláknina, cestoviny. Do vybraných produkčných médií boli pridané aj extracelulárne hydrolytické enzýmy rozkladajúce polysacharidy. Tieto enzýmy boli získané experimentálne z kultivácii štyroch kmeňov plesní.

V predloženej štúdii boli použité tri kmene karotenogénnych kvasiniek: *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces roseus* a *Cystofilobasidium capitatum*. Kultivácia prebiehala súčasne so všetkými tromi kmeňmi a sledovali sa zmeny v produkcii sušiny a karotenoidov v jednotlivých produkčných médiách, ktoré sa navzájom porovnávali. Z hydrolyzovaných substrátov bola najlepšie využívaná vláknina, najmä u *Rhodotorula glutinis*, kde bolo dosiahnuté hlavne zvýšenie produkcie biomasy. U *Sporobolomyces roseus* boli zaznamenané zvýšené produkcie biomasy aj karotenoidov v médiách s hydrolyzovanou vlákninou a cestovinami (až 4776,38 ug/g sušiny). Kvasinka *Cystofilobasidium capitatum* sa v priebehu kultivácie na modifikovaných odpadových substrátoch vyznačovala poklesom biomasy, ale zvýšenou produkciou karotenoidov. Vysoká produkcia β -karoténu bola dosiahnutá u tejto kvasinky v médiách na báze pšeničnej kaše a cestovín hydrolyzovaných enzýmovým preparátom pripraveným z *Aureobasidium pullulans*.

Hydrolyzované odpadové substráty majú teda veľké predpoklady k využitiu na produkciu sušiny a karotenoidov kvasinkovými kmeňmi, ich prípadná úprava však vyžaduje ďalšie dôkladné štúdium.

Kľúčové slová:

karotenoidy, *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces roseus*, *Cystofilobasidium capitatum*, extracelulárne hydrolázy húb, odpadové substráty

ABSTRACT

Carotenoids are naturally occurring pigments produced by bacteria, yeasts, filamentous fungi and plants. They exhibit significant biological effects and are widely used in the food industry, pharmacy and cosmetics. The aim of this diploma thesis proposed as a comparative study was regulation of carotenoid and ergosterol production in red yeasts using several waste substrates as whey, corn germs, wheat, apple fiber and pasta. To selected production media extracellular hydrolytic enzymes degrading polysaccharide were added. These enzymes were obtained from the cultivation media of four fungal strains.

In this study three carotenogenic yeast strains were used: *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces roseus* and *Cystofilobasidium capitatum*. All strains were cultivated simultaneously and changes in biomass and carotenoid production in different production media were monitored and compared. As the best waste substrate apple fiber was utilized, particularly in *Rhodotorula glutinis*, which exhibited mainly biomass production increase. In *Sporobolomyces roseus* increased production of biomass and carotenoids have been reported in media with hydrolyzed fiber and pasta as well. Beta-carotene production in this strain reached 4776,38 mg/g of dry weight. The strain *Cystofilobasidium capitatum* exhibited in waste media a decrease of biomass production accompanied with increased production of carotenoids, especially in wheat mush and pasta medium hydrolyzed by enzyme preparative from *Aureobasidium pullulan*.

It can be concluded that hydrolyzed waste substrates are very hopeful as cheap nutrient sources for yeast strains producing carotenoids and ergosterol. Nevertheless, further study of substrate processing for individual strains is needed.

Keywords:

carotenoids, *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces roseus*, *Cystofilobasidium capitatum*, fungal extracellular hydrolases, waste substrates

HÁRONIKOVÁ, A. *Mikrobiální produkce karotenoidních pigmentů s využitím odpadních substrátů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 92 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PREHLÁSENIE

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

.....
podpis študenta

Pod'akovanie:

Na tomto mieste by som chcela poďakovať hlavne doc. RNDr. Ivane Márovej, CSc. za odborné vedenie a cenné rady počas vypracovávania celej práce. V neposlednej rade patrí moje poďakovanie aj rodičom za finančnú a psychickú podporu počas celého štúdia.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Teoretická časť	9
2.1	Karotenoidy	9
2.1.1	Štruktúra	9
2.1.2	Vlastnosti karotenoidov	11
2.1.3	Použitie	11
2.2	Metabolizmus karotenoidov	11
2.2.1	Biosyntéza izoprenoidov	11
2.2.2	Biosyntéza karotenoidov	13
2.3	Mikrobiálni producenti karotenoidov	13
2.3.1	Vybraní producenti karotenoidov z kvasinkových rodov	13
2.3.2	Rod <i>Rhodotorula</i>	14
2.3.3	Rod <i>Sporobolomyces</i>	14
2.3.4	Rod <i>Cystofylobasidium</i>	15
2.3.5	Rod <i>Xanthophyllomonas</i>	16
2.4	Extracelulárne metabolity plesní	16
2.5	Kultivácia a rast mikroorganizmov	18
2.5.1	Živné médiá	18
2.5.2	Rozdelenie živných médií	18
2.5.3	Rastová krivka	19
2.6	Vybrané možnosti regulácie produkcie mikrobiálnych metabolitov	20
2.6.1	Vplyv zloženia kultivačných médií na mikroorganizmy	20
2.6.2	Vplyv vonkajších faktorov na mikroorganizmy	21
2.7	Metódy spracovania mikrobiálnej biomasy a izolácia vybraných metabolitov	23
2.7.1	Stanovenie narastenej biomasy	23
2.7.2	Absorpčná spektrofotometria	24
2.7.3	Izolačné postupy	24
2.8	Separáčne metódy	25
2.8.1	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia – HPLC	25
2.8.2	Hmotnostná spektrometria	28
2.8.3	Využitie inštrumentálnych metód pri analýze karotenoidov produkovaných mikroorganizmami	30
3	Cieľ práce	32
4	Experimentálna časť	33
4.1	Materiál a chemikálie	33
4.1.1	Štandartné a špeciálne chemikálie	33
4.1.2	Kultivačné médiá a ich zložky	33
4.1.3	Chemikálie použité na izoláciu karotenoidov	33
4.1.4	Materiál	33
4.2	Prístroje a pomôcky	33
4.2.1	Kultivácia kvasiniek	33
4.2.2	Izolácia a analýza karotenoidov	34
4.3	Mikroorganizmy	34
4.4	Kultivácia mikroorganizmov	35
4.4.1	Kultivácia karotenogénnych kmeňov	35
4.4.2	Inokulum I	35
4.4.3	Inokulum II	35
4.4.4	Produkčné médiá	36
4.4.5	Hydrolyza odpadov v produkčných médiách	38

4.4.6	Stanovenie redukujúcich sacharidov metódou Somogyiho-Nelsona	39
4.4.7	Stanovenie zákalu turbidimetricky	39
4.4.8	Spracovanie biomasy	39
4.4.9	Rastová krivka	39
4.4.10	Stanovenie sušiny gravimetricky	40
4.5	Izolácia a analýza karotenoidov	40
4.5.1	Izolácia karotenoidov zmydlením	40
4.5.2	Extrakcia	40
4.5.3	Analýza karotenoidov metódou HPLC/UV-VIS	40
4.5.4	Podmienky separácie	40
4.5.5	Identifikácia a kvantifikácia karotenoidov	41
4.5.6	Optimalizácia chromatografickej analýzy vybraných pigmentov – výber vhodnej chromatografickej kolóny	41
4.5.7	Testovanie metódy LC/MS	41
5	Výsledky	43
5.1	Rastová charakteristika	43
5.1.1	Kalibračné závislosti narastenej biomasy a zákalu	43
5.1.2	Produkcia karotenoidov v priebehu rastu kvasinky <i>Cystofilobasidium capitatum</i>	45
5.2	Optimalizácia podmienok analýzy karotenoidov - výber vhodnej chromatografickej kolóny	46
5.2.1	Kalibračné krivky karotenoidov a ergosterolu	48
5.3	Morfologické a rastové charakteristiky študovaných kvasiniek	50
5.3.1	Pozorovanie morfologických zmien používaných kmeňov v kultivačných sériách 1-4 na rôznych produkčných médiách	50
5.4	Charakterizácia produkčných médií s prídavkom odpadných substrátov	62
5.4.1	Analýza redukujúcich sacharidov	62
5.4.2	Orientačné zastúpenie extracelulárnych hydroláz v enzýmových preparátoch	63
5.5	Produkcia karotenoidov na rôznych typoch kultivačných médií	64
5.5.1	Produkcia karotenoidov používaných kmeňov v kultivačných sériách 1–4 na rôznych produkčných médiách	64
5.6	Testovanie metódy LC/MS pre analýzu karotenoidov	75
5.6.1	Separácia karotenoidov metódou HPLC/PDA	76
5.6.2	Analýza karotenoidov pomocou on-line LC/MS	77
6	Diskusia	81
7	Záver	84
8	Použitá literatúra	85
9	Zoznam použitých skratiek	88
10	Prílohy	89

1 ÚVOD

Karotenoidy patria k najrozšírenejším prirodzeným pigmentom, doteraz je známych viac než 600 druhov. Vyskytujú sa prevažne v rastlinnej ríši, obzvlášť v ovocí a zelenine, ale nájdeme ich aj u živočíchov. Sú syntetizované v množstvom mikroorganizmov od baktérií, rias, kvasiniek až po plesne. Spôsobujú charakteristické žlté, oranžové až červené zafarbenie. Vlastnosti a zafarbenie súvisí s ich chemickou štruktúrou.

Karotenoidy slúžia ako metabolické prekurzory vitamínov a hormónov. Plnia funkciu aktívnych zložiek fotosyntetického aparátu a fungujú ako veľmi účinné antioxidanty. Bol dokázaný ich ochranný účinok v celej rade degeneratívnych chorôb, ako je napríklad rakovina. Využívajú sa vo farmaceutickom, potravinárskom i poľnohospodárskom priemysle. Vyrába sa z nich množstvo vitamínových preparátov, potravinových doplnkov a farbív, zvieratám sa pridávajú do krmív.

Karotenogénne kvasinky z rodov *Rhodotorula* a *Sporobolomyces* patria k mikroorganizmom, ktoré sú schopné produkovať karotenoidy vo svojich bunkách. V súčasnej dobe, keď je izolácia karotenoidov z rastlinných materiálov pomerne náročná a drahá, a chemická syntéza je zložitá a spojená s viacerými problémami technologického i legislatívneho charakteru, sú študované rôzne možnosti cielej regulácie produkcie karotenoidov mikroorganizmami, či už modifikáciou kultivačných podmienok a pôsobením vonkajších faktorov, alebo pomocou génového inžinierstva.

Predložená diplomová práca sa zaoberá rovnako reguláciou produkcie karotenoidov s možnosťami modifikácie zloženia jednotlivých produkčných médií tak, aby prispela svojimi výsledkami k poznatkom o fyziológii vybraných kvasinkových kmeňov a mechanizmoch aktivácie obranných mechanizmov v podmienkach nutričného a fyziologického stresu. Ako nutričné zdroje boli použité niektoré odpadové substráty a vybrané z nich boli podrobené enzýmovej hydrolýze, aby polysacharidy obsiahnuté v odpadoch sa rozložili na jednoduchšie cukry, lepšie prístupné kvasinkovým bunkám. Hľadali sa médiá o takom zložení, ktoré by mohli viesť k zvýšenej produkcii karotenoidov a zároveň by negatívne neovplyvnili rast biomasy. V štúdiu boli použité tri kmene kvasiniek kultivované súčasne v štyroch kultivačných sériách, v ktorých boli navzájom porovnávané.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Karotenoidy

2.1.1 Štruktúra

Karotenoidy sa na základe štruktúry radia do skupiny tetraterpénov, teda medzi terpenoidy obsahujúce osem izoprénových jednotiek. Sú to silne nenasýtené alifatické a alicyklické uhľovodíky a ich oxidačné produkty. Čisté uhľovodíky nazývame karotény a ich najznámejšími reprezentantami sú lykopén, karotén a fytoén. Väčšina známych prírodných karotenoidov sú oxidačné produkty týchto uhľovodíkov [1, 2].

Molekuly väčšiny karotenoidov sú tvorené 40 uhlíkovými atómami a pozostávajú všeobecne z nenasýteného reťazca o 22 atómoch uhlíka s metylovým vetvením, typickým pre izoprenoidy. Delia sa do dvoch hlavných skupín:

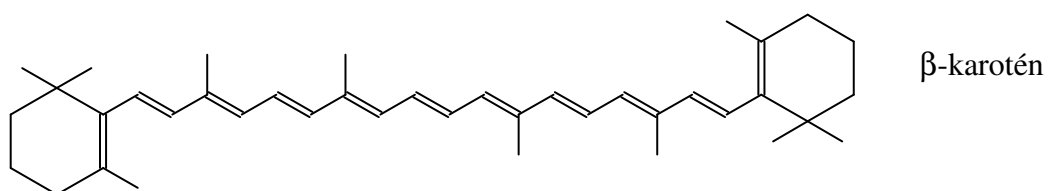
- anoxygénne zlúčeniny (uhľovodíky-karotény)
- oxygénne zlúčeniny (epoxidy, xantofyly, ketóny, kyseliny)

Medzi oxygénne zlúčeniny patrí väčšina prírodných karotenoidov, ktoré vznikajú ako oxidačné produkty anoxygénnych tetraterpénov (karoténov).

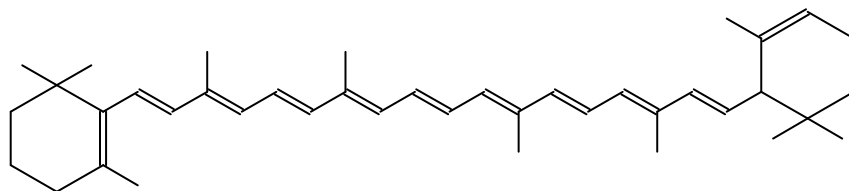
Pri biosyntéze karotenoidov sa na jeden alebo oba konce reťazca pripojuje deväťčlenná jednotka, ktorá môže byť cyklická alebo acyklická. Podľa toho môžeme rozdeliť karotenoidy do troch ďalších skupín:

- a) acyklické (fytoén, fytofluén, δ -karotén, neurosporén, lykopén)
- b) monocyklické (γ -karotén, torulén, torularodín)
- c) dicyklické (β -karotén) [1, 3].

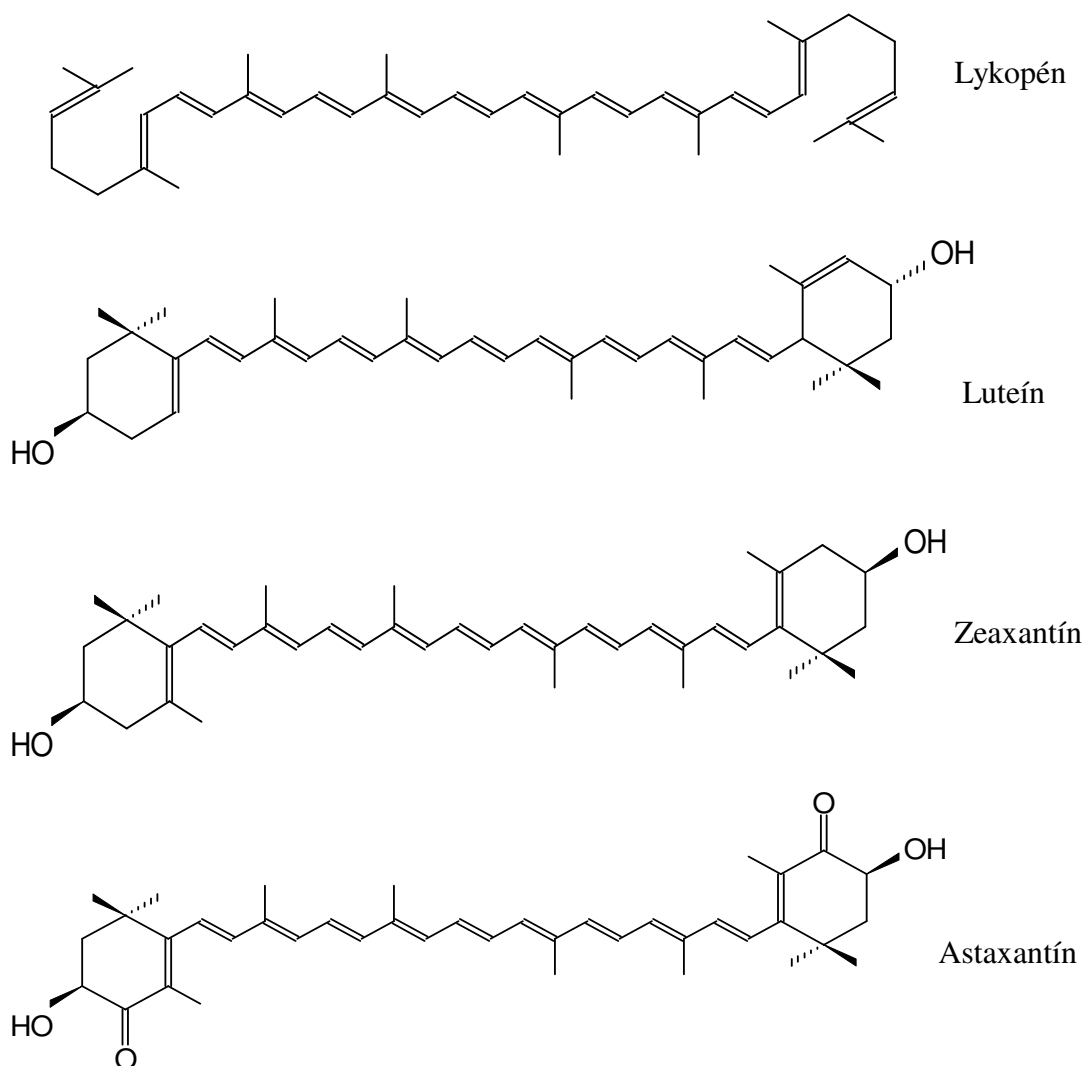
Zafarbenie karotenoidov od žltej po rôzne odtiene červenej je spôsobené polyenovou štruktúrou molekúl, ktorá sa využíva pri spektrálnej analýze karotenoidov v rozmedzí vlnových dĺžok 430-480 nm [4].



β -karotén



α -karotén



Obrázok 1: Štruktúra niektorých karotenoidov

Karotény

Najjednoduchším prototypom karoténov je acyklický polonenasýtený uhl'ovodík lykopén. Ďalšie karotény vznikajú enzýmovo katalyzovanou cyklizáciou z acyklických ψ -karoténov, kedy sa tvoria β - alebo α -jononové štruktúry.

Štruktúra s β -jononovým cyklom sa nazýva β -karotén, štruktúra s α -jononovým cyklom je ϵ -karotén. Príkladom uhl'ovodíkov s β -jononovým cyklom len na jednom konci molekuly je γ -karotén, taktiež β,ψ -karotén. Cyklizáciou na oboch koncoch molekuly vznikajú štruktúry prítomné napríklad v β -karoténe alebo v α -karoténe. Zlúčenina β -karotén sa teda nazýva inak β,β -karotén, α -karotén je potom β,ϵ -karotén [2].

Xantofyly

Xantofyly vznikajú primárne ako produkty biochemickej oxidácie karoténov. V potravinách sa vyskytujú v malom množstve. Najbežnejšími látkami sú monohydroxysubstituované deriváty alicyklických karoénov nazývané kryptoxanthiny. Väčšina rastlinných pletív obsahuje malé množstvá α - a β -kryptoxanthinu, ktoré sú

prekurzormi xantofylov obsahujúcich dve hydroxylové skupiny v molekule. Príkladom dihydroxysubstituovaných pigmentov je zeaxantín a luteín [2].

2.1.2 Vlastnosti karotenoidov

Sú to lipofilné pigmenty nerozpustné vo vode, preto nikdy nedifundujú do vonkajšieho prostredia, ale zostávajú lokalizované na vnútornej strane cytoplazmatickej membrány. Okrem citlivosti voči oxidácii vykazujú taktiež citlivosť voči svetlu. Pri vystavení účinkom intenzívnejšieho svetelného žiarenia sa rozkladajú [1, 3, 5].

Z celkového množstva 600 derivátov karotenoidov má približne 10 % schopnosť meniť sa na retinol - vitamín A. Z celkového počtu karotenoidov v plazme tvorí asi 90 % β -karotén, lykopén, zeín, zeaxantín, kryptoxantín a luteín.

Hlavná antioxidačná funkcia β -karoténu a ďalších karotenoidov spočíva v jeho schopnosti reagovať s kyslíkom a vrátiť molekulu excitovaného kyslíka do základného energetického stavu. Táto vlastnosť radí β -karotén medzi antioxidanty. Antioxidanty s takouto schopnosťou sa označujú ako zhášače. Pôsobia inhibične voči peroxidácii v lipidických membránach [1, 5, 6].

Karotenoidy môžu vychytávať voľné radikály aj priamo. Obsahujú totiž veľké množstvo dvojitého väzieb, ktoré sa ľahko oxidujú. Z uvedených derivátov karotenoidov má najväčšiu zhášaciu schopnosť lykopén, ktorý sa vyskytuje v paradajkách [7].

2.1.3 Použitie

Niektoré karotenoidné pigmenty sa používajú k farbeniu potravín od nepamäti. Môže to byť napríklad farbenie margarínov, syrov, jogurtov, zmrzlín džúsov a iných výrobkov. Syntetické karotenoidy našli použitie ako lipofilné hydrofilné potravinárske farbivá a taktiež ako antioxidanty. Karotenoidy sa taktiež pridávajú do krmiva dojníc a hydiny pre zaistenie žiadanej pigmentácie mlieka, mliečnych výrobkov, vajec a mäsa [2].

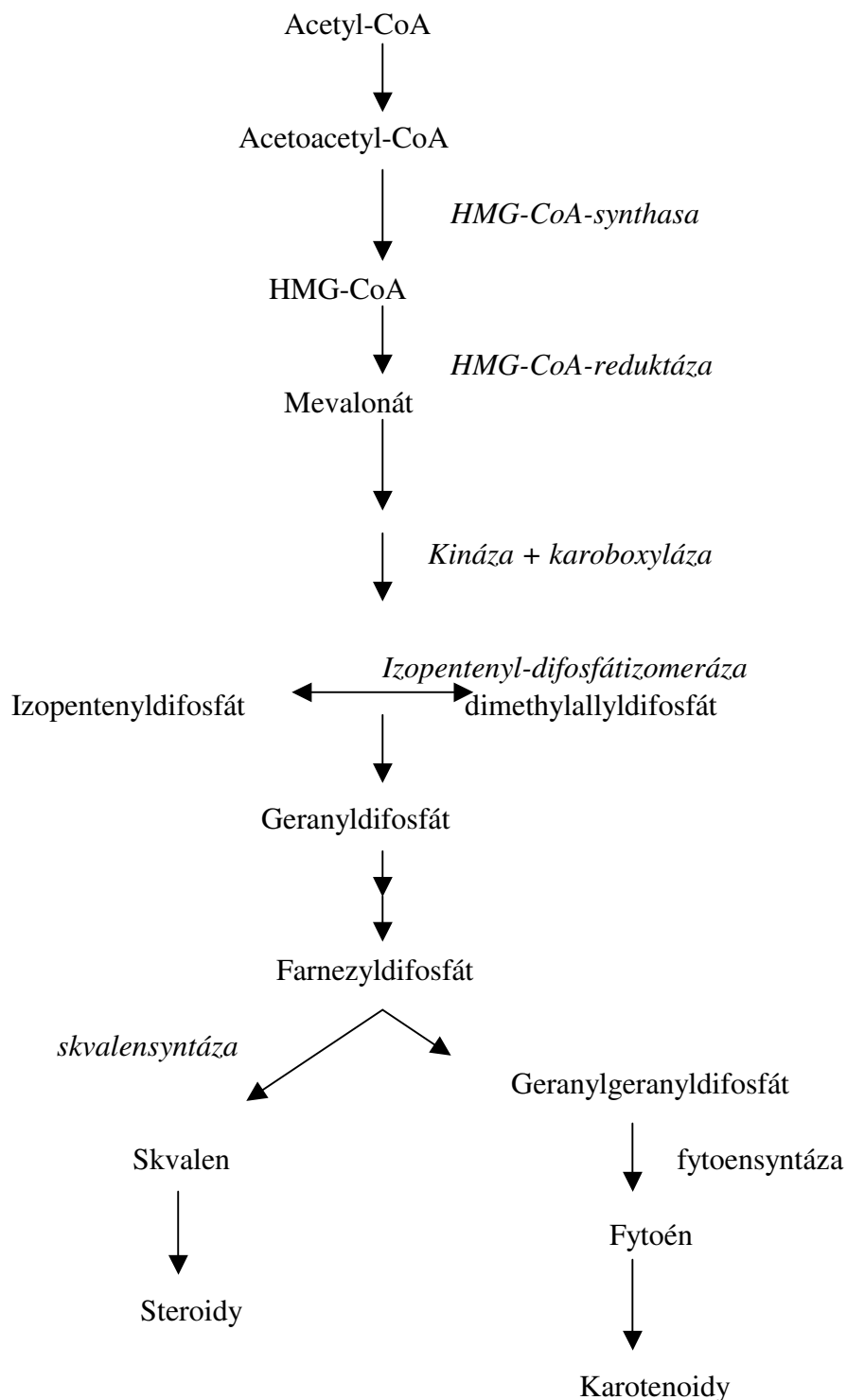
2.2 Metabolizmus karotenoidov

Karotenoidné kvasinky sú lipidotvorné. Hromadia v bunkách tuk. S touto schopnosťou hromadiť v bunkách tuk, súvisia aj niektoré iné vlastnosti, ako napríklad produkcia lipáz, akumulácia karotenoidov a sterolov a iné. S procesom tvorby lipidov je spojená aj tvorba biotínu. Purifikované lipidy sa skladajú z neutrálnych lipidov, glykolipidov a fosfolipidov [3, 8].

2.2.1 Biosyntéza izoprenoidov

Karotenoidné kvasinky sa pestujú v kultivačných médiách s nízkym obsahom dusíka a bohatých na uhlík, preto ich zloženie zaistuje značnú produkciu buncného tuku a karotenoidov. Karotenoidy sú v bunke kvasinky akumulované v lipoproteínovej frakcii. Biosyntéza vychádza zo spoločnej dráhy biosyntézy izoprenoidov. Východnou látkou pre biosyntézu izoprenoidov je acetyl-CoA, ktorý sa kondenzuje s medziproduktom biosyntézy mastných kyselín acetoacetyl-CoA za tvorby β -hydroxy-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA), ktorého redukciou vzniká mevalonová kyselina. Kyselina mevalonová je postupne fosforylovaná a dekarboxylovaná. Výsledným produktom je izopentenylidifosfát (IPDP), tzv. aktívny izoprén, ktorý sa za enzýmovej katalýzy prešmykuje na dimethylallyldifosfát. Kondenzáciou posledných dvoch medziproduktov vzniká geranylidifosfát (GDP). Ten podlieha ďalšej kondenzácii s jednotkou izopentenylidifosfát za vzniku farnezyldifosfátu

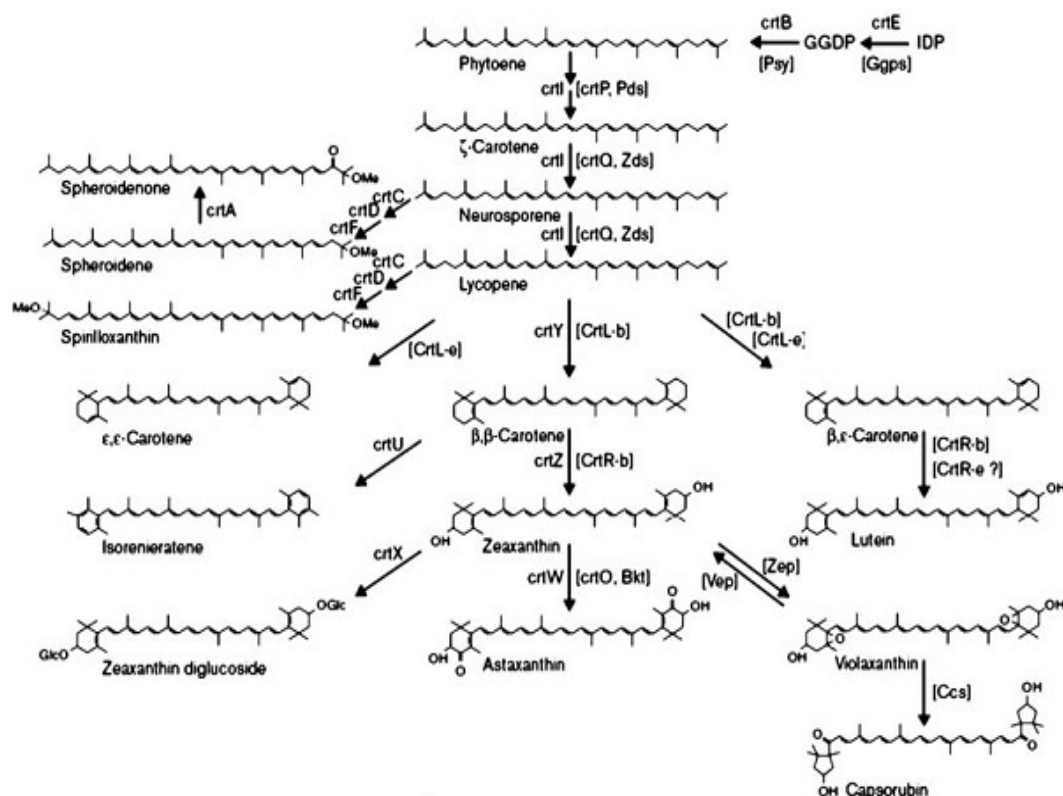
(FDP). Tu sa oddeľuje bočná dráha, ktorá vedie k tvorbe steroidov. Následne prebehne kondenzácia jednotiek farnezyldifosfátu a izopenténdifosfátu a vzniká geranylgeranyldifosfát (GGDP). Nakoniec dojde ku kondenzácii dvoch molekúl GGDP za vzniku fytoénu, bezfarebného prekursoru karotenoidov [1, 5, 9].



Obrázok 2: Schéma biosyntézy izoprenoidov [10]

2.2.2 Biosyntéza karotenoidov

Priamym prekursorom karotenoidov je bezfarebný fytoén, ktorý podlieha rade desaturačných a cyklizačných reakcií, pri ktorých dochádza ku vzniku cyklických aj acyklických farebných karotenov a xantofylov. Východiskovým necyklickým karotenom, pre tvorbu acyklických, mono- i bicyklických derivátov je lycopén [11, 12].



Obrázok 3: Schéma biosyntézy karotenoidov [13]

2.3 Mikrobiálni producenti karotenoidov

Karotenoidy sú pigmenty prirodzene tvorenými množstvom mikroorganizmov. Medzi najvýznamnejších producentov patria baktérie a kvasinky. Medzi bakteriálnych producentov patria fotosyntetizujúce i nefotosyntetizujúce druhy, napríklad *Brevibacterium*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium*, *Erwinia* a ďalšie [12].

Významnými producentami karotenoidov sú taktiež plesne, napríklad *Neurospora crassa*, *Blakeslea trispora*, *Mucor hiemalis*, *Mucor circenelloides* a *Phycomyces blakesleeanus*. Zastúpenie pigmentov v plesniach je pomerne jednoduché, prevláda β-karotén. Mutanty *Mucor circenelloides* a *Blakeslea trispora* je možné využiť k veľkokapacitnej produkcii karotenoidov vo fermentoroch. *Phycomyces* vykazuje plný karotenogénny potenciál na tuhých i v tekutých substrátoch [12].

2.3.1 Vybraní producenti karotenoidov z kvasinkových rodov

Akumuláciou karotenoidov sa vyznačujú červené kvasinky patriace do triedy *Basidiomycetes*. Patria sem napríklad rody ako *Rhodotorula*, *Xanthophyllomonas*, *Sporobolomyces*. Majú striktne aeróbný metabolizmus. Hlavné pigmenty, ktoré tvoria sú β-karotén, γ-karotén, torulén, astaxantín. Tie spôsobujú charakteristické zafarbenie kultúr na

žlto, oranžovo až tmavo červeno. Chránia bunky najmä pred ultrafialovou zložkou slnečného žiarenia [15].

2.3.2 Rod *Rhodotorula*

Druhy rodu *Rhodotorula* sa často používajú na rozličné výskumy. Predovšetkým sú to ubikvitné kvasinky rozšírené po celom svete. Vyskytujú sa veľmi hojne v prírode na rôznych organických látkach, vo vzduchu, vo vodách, ale môže taktiež spôsobiť i ochorenia u ľudí a zvierat. Možno ich izolovať zo vzduchu, z pôdy, sladkej i slanej vody, z vinárskych prevádzok, z povrchu rastlín, ale aj rôznych orgánov živočísného tela. Ľahko sa pestujú, nie sú náročné na životné podmienky, rozmnožujú sa často aj v pôdach bez zdroja dusíka a ich identita sa dobre dokazuje už pre ich červenú karotenoidovú pigmentáciu. Všetky druhy tohto rodu sa vyznačujú tým, že sú lipidotvorné, hromadia v bunkách tuk, to v určitých podmienkach až nadmerne. Produkcia lipidov v červených kvasinkách má význam z viacerých dôvodov, najmä však preto, že usmernením kultivácie by sa mohli získať lipidy s rovnakým obsahom mastných kyselín na výživu živočíchov. Okrem toho biomasa po extrakcii lipidov môže byť ešte zdrojom proteínu cenného pre výživu a obsah základných aminokyselín [3, 12].

Rod *Rhodotorula* nezvasuje žiadne cukry a má silne vyvinutý pentózový cyklus využívania glukózy. Má malé guľaté bunky alebo bunky oválne, niekedy taktiež pretiahnuté, endospóry ani iné druhy spór nevytvárajú a taktiež netvorí pseudomycelium. Sú rôznych farieb, od žltej cez oranžovú do červenofialovej. Farbivo je karoténovej povahy. V kvapalnom prostredí vytvárajú sediment a prstenec spravidla svetlej, krémovej až svetloružovej farby. Náter na agare je korálovočervený, pomarančový, lososový, čo závisí od zloženia živnej pôdy. Je hladký, lesklý, slizovitý, riedky aj cestovitý, na povrchu môže byť niekedy aj kučeravý. Okraj kolónie je ucelený [3, 12].



Obrázok 4: Krížový rozter druhu *Rhodotorula glutinis*

2.3.3 Rod *Sporobolomyces*

Do tohto rodu patria druhy *Sporobolomyces roseus*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Sporobolomyces shibatanus*. Patria do čelade *Basidiomyces* a vytvárajú balistokonídie, ktoré majú asymetrické. *Sporobolomyces roseus* je mikroorganizmus, ktorý sa vyskytuje vo fylosfére a v atmosfére, kde je častým zdrojom výživy dusíkom nitrát alebo redukované formy dusíkatých zlúčenín [3, 12].

Rod *Sporobolomyces* sa na prvý pohľad odlišuje od rodu *Rhodotorula* tým, že kultúry u *Sporobolomyces* sú drsné, ploché, často pomúčené. Rovnako ako *Rhodotorula*, aj rod *Sporobolomyces* nemá kvasné schopnosti. Vyznačuje sa silnou karotenogenezou, jeho nátery sú tmavočervené hladké. Bunky sú guľovité, elipsoidné až pretiahnuté, s rozmermi 3 až 8 x 5 až 18 µm. V kvapalných prostrediach vytvára sediment a veľmi hrubý prstenec. Náter na agare je pomarančový až korálovočervený, ružový, hladký, slabodrsný, alebo jemne kučeravý. Balistokonídie sa vytvárajú na jednoduchých sterigmách. Okolo náteru sa tvoria sekundárne kolónie z odstrelených balistokonídií [3, 12].



Obrázok 5: Krížový rozter druhu *Sporobolomyces roseus*

2.3.4 Rod *Cystofilobasidium*

Medzi zástupcov tohto rodu patria druhy *Cystofilobasidium bisporidii*, *Cystofilobasidium capitatum* a *Cystofilobasidium infirmominiatum*. Tento rod sa odlišuje od rodu *Rhodotorula* typom basídia. Jeho charakter je jednobunkový, neseptovaný, tzv. holobasídium. Druhy boli izolované z planktónu oceánov [3, 16].

Druhy v rode *Cystofilobasidium* sa podobajú vegetatívnym bunkám s rozmermi 1 až 5 x 2 až 14 µm. Tvorí kolónie s hladkým lesklým povrchom, tvar buniek je guľatý až pretiahnutý. V kvapalných médiách vytvárajú tenkú kožu a sediment. Odlišujú sa farbou náteru, pričom druh *Cystofilobasidium capitatum* má červený až škoricový odtieň, taktiež sa odlišujú aj životným cyklom. Druh *Cystofilobasidium capitatum* je homotalický druh, ktorý vytvára jednojadrové mycélium. V hýfách produkuje endokonídie. Teliospóry po napučaní klíčia na metabazídium, ktoré nemá priehradky. Sporídie sú jednotlivo alebo v pároch s jednou alebo dvoma bazídiospórami. Primárne sporídie nemusia pučať na bazídiospóry, ale na septované mycélium. Po vypučaní na bazídiospóry, primárne sporídie degenerujú a zostávajú spojené s metabazídiom. Tento druh vytvára aj teliospóry, ktoré klíčia na metabazídium s maximálnou dĺžkou 17 µm. Niekedy sa z bazídií vytvárajú drsné, suché kolónie, v ktorých prevládajú teliospóry. Kvasinková kultúra sa vyvinie až po niekoľkých týždňoch. Všetky generácie sa pokladajú za diploidné [3, 16].



Obrázok 6: Krížový rozter druhu *Cystofilobasidium capitatum*

2.3.5 Rod *Xanthophyllomonas*

Predstaviteľom rodu *Xanthophyllomonas* je druh *Phaffia rhodozyma*. Jednou z hlavných pigmentových zložiek, ktoré obsahuje je astaxantín. Vďaka vysokému obsahu karotenoidov patrí medzi diétne doplnky pre výživu lososov a hydiny. V ich črevách dojde k absorpcii pigmentu, a tým i ku lepšiemu zafarbeniu lososového mäsa na oranžovú alebo ku zafarbeniu žltka a mäsa u hydiny. Tento druh kvasinky sa vyznačuje väčšou náročnosťou na kultivačné prostredie [3,12, 17].

Rod *Xanthophyllomonas* vytvára elipsoidné bunky s rozmermi 2,8 až 7,5 x 5,5 až 10,5 μm v pároch alebo krátkych retiazkach. Rozmnožuje sa pučaním a vytvára aj veľa chlamydiospór, veľkých guľovitých buniek s kvapôčkami svetlólámajúcich látok. V kvapalnom prostredí vytvára sediment, prstenec aj kožku. Náter na agare je pomarančovočervený, hladký. Od ostatných rodov červených kvasiniek sa odlišuje schopnosťou skvasovať sacharidy, aj keď veľmi slabou a po dlhšom čase a nízkej teplote. Balistokonídie nevytvára [3, 17, 18].



Obrázok 7: Krížový rozter druhu *Phaffia rhodozyma*

2.4 Extracelulárne metabolity plesní

Ako plesne označujeme mikroskopické vláknité eukaryotické mikroorganizmy patriace do ríše húb (Fungi). Technicky dôležité plesne sa podľa prítomnosti a typu pohlavného rozmnožovania zaraďujú do príslušných taxonomických jednotiek. Taxonómia húb sa v posledných rokoch postupne upresňovala, v súčasnej dobe sa ríša Fungi delí na 5 oddelení – kmeňov: *Chytridiomycota*, *Microsporidiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* a *Basidiomycota*.

Bežné technicky využívané plesne patria najmä do kmeňa *Zygomycota*, ktoré má jednobunečné nepriehradkové mycélium, rozmnožuje sa pohlavne s tvorbu zygospór, nepohlavne s endospórami, a ďalej do podkmeňov *Ascomycotina*, s priehradkovým mycéliom, pohlavným rozmnožovaním askospórami, nepohlavným exospórami, a *Deuteromycotina*, ktoré nie sú doteraz úplne preskúmané, majú priehradkové mycélium a výhradne nepohlavné rozmnožovanie pomocou exospór [19, 20].

Plesne patria medzi striktne aerobné organizmy, takže sa často rozmnožujú na povrchu napadnutého materiálu. Sú značne nenáročné na živiny, najmä na zdroje uhlíku, pretože sú schopné ich využívať veľmi efektívne. Prísne aerobný charakter spolu so širokým enzýmovým vybavením umožňuje plesniam rozkladať najrôznejší organický materiál vrátane koží, tkanív, papiera, syntetických farieb, niektorých plastov a iných. Plesne majú navyše schopnosť využívať vzdušnú vlhkosť a okludovanú vodu a celkovo sú schopné rozmnožovať sa za pomerne nízkej vodnej aktivity prostredia (do 15%). Plesne môžu rásť i za veľmi nízkeho pH, za nízkej teploty a v rôznych extrémnych vonkajších prostrediach. Tieto schopnosti prežitia i za nepriaznivých podmienok sa široko využíva v oblasti biodegradability, bioremediácie a biokatalýzy. Posledná menovaná aplikácia súvisí hlavne s množstvom exogénne produkovaných hydrolytických enzýmov s celou radou účinkov. Plesne produkujú proteolytické, lipolytické i sacharolytické enzýmy štiepiace lignín a lignocelulózy [20, 21].

Vysoká produkcia enzýmov umožňuje priemyslové využitie k biotechnologickej výrobe priemyslových enzýmových preparátov, hlavne proteáz, amyláz, celuláz, lipáz a pektolytických enzýmov. Výhodou plesňových producentov je ich adaptabilita, ľahký spôsob izolácie enzýmov a v neposlednej rade pomerne nízka produkčná cena. Nízka cena súvisí aj so schopnosťou plesne prežiť v extrémnych podmienkach práve vďaka produkovaným enzýmom, ktoré majú často veľmi neobvyklé aktivity. Plesne potom dokážu konvertovať napríklad drevo, plast, farbivá a palivá na využiteľné formy živín. Niektoré z plesňových enzýmov sa používajú v papierenskom priemysle (lignínperoxidázy, celulózy, lakázy, pektinázy, xylanázy, manázy, esterázy, lipázy) a pri spracovaní uhlia (peroxidázy, lakázy, esterázy). Široké použitie majú plesňové enzýmy pri biologickom čistení odpadných vôd (peroxidázy, esterázy, lipázy), kde sa využíva ich špecifika pri biodegradácii organických polutantov typu chloranilínu, lindanu, dioxínov, chlorovaných uhlíkovodíkov a ďalších látok vrátane ropných produktov. V ekotoxikologických aplikáciách sa využívajú niektoré plesňové oxidázy a peroxidázy ako špecifické biosenzory a biomarkery. Okrem aplikácií vo forme priemyslových enzýmov v pracích prostriedkoch, sa plesňové enzýmy rovnako využívajú v potravinárskom priemysle (proteázy, pektinázy, amylázy, xylanázy) k číreniu ovocných štiav, pri spracovaní mäsa, cukru, pri modifikácii laktózy, produkcii alkoholu, detoxikácii výživy a podobne. Ďalšie uplatnenie nachádzajú enzýmy pri výrobe bioethanolu, v pekárstve, vinárstve, pivovarníctve, pri výrobe krmív a v mnohých ďalších oblastiach [21, 22, 23].

Produkcia extracelulárnych enzýmov a hlavne ich zostava významne závisí na kultivačných podmienkach a dostupnosti živín. Najkomplexnejšie je tento proces preštudovaný zrejme v spojitosti s degradáciou lignocelulóзовých materiálov. Vďaka produkcii zostavy enzýmov zahrňujúcich lakázy, peroxidázy, oxidázy a hydrolázy môžu plesne prežívať v rôznych typoch prostredí ako je pôda, drevná hmota, rovnako ako aj organické odpadové materiály. Ak sú plesne schopné degradovať komplexné prírodné materiály alebo odpady, môžu rovnako utilizovať i vlastné nutričné zdroje. Uvoľnenie jednoduchých cukrov z komplexných sacharidov a súčasne sprístupnenie zdrojov dusíka z komplexných potravinárskych odpadov spojené s činnosťou proteáz však môže umožniť

využitie odpadových substrátov i ku kultivácii takých mikroorganizmov, ktoré neprodukujú extracelulárne hydrolázy alebo len v obmedzenom množstve a so špecifickou aktivitou. Adaptačné mechanizmy môžu byť využité k produkcii vhodnej zostavy enzýmov cielene prispôsobenej k degradácii konkrétneho typu substrátu [19, 21, 23].

2.5 Kultivácia a rast mikroorganizmov

2.5.1 Živné médiá

V laboratóriu sú mikroorganizmy kultivované na sterilných živných médiách. Správna voľba média záleží na požiadavkách daného mikroorganizmu. Musíme poznať nároky a požiadavky na rast mikroorganizmov a zvoliť ich tak, aby čo najviac odpovedali prirodzeným podmienkam. Čím viac sa bude zloženie média blížiť prirodzeným podmienkam, tým lepšie bude daný mikroorganizmus rásť v laboratórnych podmienkach [24, 25].

2.4.1.1 Zdroje jednotlivých prvkov

Uhlík: Zdroj uhlíku je väčšinou vo forme jednoduchých cukrov, polysacharidov alebo organických kyselín. Okrem uhlíku je to zdroj zároveň aj vodíku a kyslíku. Pri zostavovaní média je nutné dbať na to, aby sa príslušný sacharid behom sterilizácie nerozkladal alebo nereagoval s ostatnými komponentmi. Vznikajú tak ťažko využiteľné alebo inhibičné látky.

Dusík: Ako zdroj dusíku môžu mikroorganizmy využívať vzdušný dusík, dusitany, dusičnany, amónne soli alebo organický dusík viazaný v aminokyselinách, peptidoch, peptonoch až v nativných bielkovinách. Najvhodnejším zdrojom dusíku sú však amónne soli. Auxotrofné mikroorganizmy, ktoré nie sú schopné syntetizovať rastové faktory, si vyžadujú ich prítomnosť v kultivačnom médiu.

Fosfor, horčík: Zdrojom fosforu sú soli kyseliny fosforečnej. Jeho nedostatok spôsobuje spomalenie rastu, prípadne fermentačných procesov mikroorganizmov. Fosfor a horčík sa zúčastňujú prenosu energie pomocou reakcií sprostredkovaných adenosíntrifosfátom.

Síra: Ako zdroj síry slúžia väčšinou sírany pridávané ako síran amonný. Mikroorganizmy taktiež využívajú sírne aminokyseliny ako je metionín, cystin a cysteín hlavne pri syntéze bielkovín.

Ostatné prvky: Ďalšie biogénne prvky draslík, vápnik, železo, chlór, molybdén, zinok, meď, kobalt, bór a nikel sa pridávajú do živného média vo forme solí v malých koncentráciách, ktoré sa zistili pokusne.

Rastové faktory: Rastovými faktormi môžu byť vitamíny, aminokyseliny, purínové a pyrimidínové zásady, vyššie mastné kyseliny alebo amíny.

Voda: Voda je najdôležitejšia zložka, s ktorou je úzko spätý vývoj, rast a rozmnožovanie mikroorganizmov. Dodržiavať vysoký stupeň akosti použitej vody je veľmi dôležité. Pri príprave polosyntetických médií do nich pridávame peptony, rôzne extrakty, hydrolyzáty, ktoré zabezpečujú optimálnu výživu mikroorganizmov [24, 25, 26].

2.5.2 Rozdelenie živných médií

Podľa pôvodu a prípravy môžeme média rozdeliť na [24]:

- Prirodzené (sú vhodné na krátkodobú kultiváciu alebo izoláciu z prírodných zdrojov)
- Synteticko-komplexné (okrem chemicky definovaných zlúčenín obsahujú i odvary, maceráty, výluhy alebo hydrolyzáty prírodných materiálov)

- Syntetické (chemicky presne definované ako zmes organických a anorganických zlúčenín).

Podľa použitia rozdeľujeme živné média na [24]:

- Univerzálne (rastú na nich veľké skupiny fyziologicky odlišných mikroorganizmov)
- Selektívne (svojím zložením podporujú rast iba určitej skupiny mikroorganizmov, obsahujú jednu alebo viac inhibičných látok, ktoré potláčajú rast ostatných mikroorganizmov)
- Selektívne-diagnostické (svojím zložením potlačujú rast nežiadúcich mikroorganizmov, rastie na nich len malá skupina mikroorganizmov).

Podľa konzistencie rozdeľujeme živné média na [24]:

- tekuté (neobsahujú žiadne stužovacie látky)
- polotekuté (majú krémovú konzistenciu, pretože obsahujú nízku koncentráciu stužujúcich látok)
- pevné (obsahujú stužujúce látky ako napríklad agar, želatína alebo gél kyseliny kremičitej).

2.5.3 Rastová krivka

Mikroorganizmy v danom prostredí môžu rásť a rozmnožovať sa tak dlho, pokiaľ majú dostatočný zdroj živín, vhodný parciálny tlak kyslíku, odpovedajúcu hodnotu pH a teplotu. Rast mikrobiálnych populácií sa normálne spomaľuje buď spotrebou živín, alebo tvorbou toxických produktov, prípadne kombinovaným účinkom jedného aj druhého faktora. [24, 25]

Ak prenesieme bunky z kultúry, kde sa už nemôžu rozmnožovať, do optimálnych kultivačných podmienok, nedochádza ihneď k ich maximálnej rastovej rýchlosti. Rast jednobunkovej mikrobiálnej populácie prebieha postupne v niekoľkých fázach. Grafickým znázornením nameraných hodnôt tak, že na os x sa nanesie čas a na os y sa nanesie logaritmus počtu živých buniek v 1 ml, dostaneme tzv. *rastovú krivku*, ktorá má niekoľko úsekov [24, 25].

Lag-fáza: po naočkovaní média sa bunky dostávajú do odlišného prostredia v porovnaní s tým, z ktorého boli odobrané. Bunky sa nerozmnožujú, ale zväčšuje sa ich objem a aktivuje sa ich enzýmový systém. Dĺžka lag-fázy závisí na druhu mikroorganizmu, fyziologickom stave buniek, veľkosti inokula a na zložení rastového prostredia. Ak rastové prostredie obsahuje živiny vyhovujúce len určitému typu mutantov, trvá lag-fáza mimoriadne dlho, pretože zahŕňa tiež selekciu týchto mutantov a odumieranie ostatných buniek inokula.

Fáza zrýchľujúceho sa rastu a exponenciálna fáza: Fáza zrýchľujúceho sa rastu je prechodná fáza medzi lag-fázou a exponenciálnou fázou. Exponenciálna fáza je charakteristická tým, že tu majú bunky najkratšiu generačnú dobu, ktorá je behom celej exponenciálnej fázy konštantná. Špecifická rýchlosť rastu nadobúda konštantnú veľkosť. Počas tejto fázy sú takmer všetky bunky živé, exponenciálne narastá ich počet a tým pádom aj množstvo biomasy. Ak prenesieme bunky z exponenciálnej fázy rastu do nového kultivačného prostredia o rovnakom zložení, pokračujú v rozmnožovaní s rovnakou generačnou dobou, to je bez zreteľnej lag-fázy.

Fáza spomaleného rastu: Je to obyčajne krátky prechod medzi exponenciálnou fázou a stacionárnou fázou.

Stacionárna fáza: Zastavenie prírastku živých buniek je označované ako stacionárna fáza rastu a často pri nej dochádza ešte k veľmi pomalému rozmnožovaniu, ktorým sa kompenzuje počet odumierajúcich buniek. Maximálna dĺžka stacionárnej fázy rôznych mikroorganizmov je rôzna a závisí na ich citlivosti k hladovaniu.

Fáza postupného odumierania: nastupuje po stacionárnej fáze, môže u niektorých mikroorganizmov trvať týždne, niekedy aj mesiace.

Fyziologické vlastnosti buniek rôznych fáz rastovej krivky sú značne odlišné. Bunky neskoršej lag-fázy a rastových fáz sú omnoho citlivejšie k nepriaznivým podmienkam než bunky stacionárnej fázy a na počiatku lag-fázy. Spomalenie rozmnožovania na konci exponenciálnej fázy rastu, prípadne jeho úplné zastavenie môže byť spôsobené jednak vznikom splodín metabolizmu, ktoré inhibujú rozmnožovanie, jednak vyčerpaním živín. Najčastejšie ide o vyčerpanie živiny, ktorá je prítomná v relatívne najnižšej koncentrácii [4, 8, 25].

2.6 Vybrané možnosti regulácie produkcie mikrobiálnych metabolitov

O nadprodukcii určitého mikrobiálneho metabolitu sa jedná vtedy, ak mikroorganizmus tvorí v určitom úseku alebo po celú dobu svojho života danú látku v množstve, ktoré prevyšuje koncentráciu potrebnú pre svoj rast alebo reprodukciu. Tento jav môžeme dosiahnuť postupnou fyziologickou adaptáciou, ktorá najčastejšie prebieha súčasne so samotným technologickým postupom, pri ktorom je taktiež dôležitý vplyv vonkajších faktorov.

Medzi druhy fyziologickej adaptácie patrí:

- optimalizácia zloženia médií
- optimalizácia podmienok vonkajšieho prostredia
- identifikácia stresových faktorov, ktoré vedú k nadprodukcii metabolitu
- opakovaná selekcia kmeňov v daných podmienkach kultivácie [8].

2.6.1 Vplyv zloženia kultivačných médií na mikroorganizmy

Zloženie živného média u rôznych mikroorganizmov je veľmi rozdielne. Pre väčšinu heterotrofných mikroorganizmov musí kultivačné médium okrem biogénnych prvkov a rastových faktorov obsahovať vhodný zdroj uhlíku a energie. Vhodným zložením média, ktoré vyhovuje danému mikroorganizmu, môžeme doceliť správny rast, či dokonca nadprodukcii biomasy a metabolitov, ktoré mikroorganizmus produkuje.

Efektivita premeny uhlíkových zdrojov na pigmenty a optimalizácia zloženia kultivačného média s ohľadom na dostupnosť a cenu boli objektami mnohých štúdií. Optimalizácia zloženia média sa často prevádza zmenami v koncentráciách jednotlivých prvkov a rastových faktorov alebo testovaním rôznych zdrojov uhlíka vrátane pentózy a hexózy, disacharidov, glycerolu. Do médií sa pridávajú ako samotné sacharidy alebo ako súčasť potravinových výrobkov či rôznych odpadov získaných z poľnohospodárstva ako je melasa, škrobový odpad, srvátka a iné. Okrem sacharidov obsahujú aj bielkoviny, tuky a iné zložky [26].

Zdroje sacharidického uhlíka:

- *Obilniny:* najväčší podiel obilného zrna tvoria práve sacharidy. Nájdeme tu veľkú škálu rôznych sacharidov od najjednoduchších cukrov až po vysokomolekulárne polysacharidy. Monosacharidy a nižšie oligosacharidy vznikajú degradáciou škrobu,

pôvodne majú v zrne nízke zastúpenie. V cereálnych výrobkoch je množstvo monosacharidov premenlivé a závisí na stupni hydrolýzy škrobu. Škrob tvorí podstatnú časť obilného zrna. Vyskytuje sa vo forme škrobových zŕn, ktoré sa u jednotlivých druhov líšia tvarom a veľkosťou. Z neškrobových polysacharidov sa v zrne vyskytujú prevažne hemicelulózy a celulózy [26, 27, 28].

- *Melasa*: obsahuje asi 50% cukru, je významnou surovinou pre kvasné a a biochemické technológie, pre výrobu droždia, etanolu, kyseliny mliečnej, citrónovej, aminokyselín, niektorých organických rozpúšťadiel a taktiež je významnou zložkou kŕmnych zmesí [29].
- *Srvátka*: obsah srvátkových bielkovín závisí na tepelnom ošetrovaní mlieka pred zrážaním. V súčasnej dobe sa najväčšia časť srvátky využíva ako krmivo buď v tekutej alebo zahustenej sušenej forme. Neupravená srvátka alebo len s minimálnou suplementáciou môže slúžiť ako fermentačné médium pre výrobu kyseliny mliečnej, etanolu alebo biomasy. Obsahuje značné množstvo laktózy (3,8 – 5,0 %) v sušine, ďalej bielkoviny, zdroje dusíku, minerály, predovšetkým vápnik [28, 30].

Chemické zloženie a koncentrácia zdrojov dusíka v médiu môže byť tiež prostriedkom fyziologickej kontroly a regulácie metabolizmu pigmentov v mikroorganizmoch. Niekoľko anorganických a organických dusíkatých zdrojov, ako je extrakt z múky a proteinové hydrolyzáty, boli študované pre zlepšenie produkcie karotenoidov. Zdá sa, že variabilita obsahu karotenov v kvasinkách s ohľadom na dusíkaté zdroje použité v médiu a rýchlosť produkcie pigmentov sú ovplyvnené produktami katabolizmu dusíkatých zdrojov [31].

2.6.2 Vplyv vonkajších faktorov na mikroorganizmy

Životná činnosť mikroorganizmov a ich vývoj sú závislé na vonkajšom prostredí. Aby sa mohli mikroorganizmy rozmnožovať, musí byť v prostredí dostatočné množstvo surovín pre syntézu bunecnej hmoty a dostatočné množstvo zdroja využiteľnej energie. Mikroorganizmy sú však schopné sa prispôbiť vonkajším podmienkam nie len zmenou enzýmového vybavenia, ale môžu do určitej miery meniť i zloženie a tvar buniek, aby boli voči existujúcim vonkajším podmienkam odolnejšie. Všetky tieto schopnosti mikroorganizmov sú však obmedzené určitým limitom. Za jeho prekročením dochádza k zastaveniu rastu alebo k usmrteniu bunky [8].

Ďalšími faktormi, ktoré ovplyvňujú mikroorganizmy, sú stresové faktory. Patrí sem teplota, solný stres, vodná aktivita, pH prostredie, žiarenie a iné. Niektoré mikroorganizmy si počas evolúcie vyvinuli obranné mechanizmy voči týmto stresovým podmienkam. Správnym využitím týchto stresov môžeme doceliť mikrobiologickú produkciu obranných látok, ktoré sa potom využívajú v rôznych odvetviach priemyslu [8, 24, 31].

Teplota: teplota vonkajšieho prostredia je jedným z hlavných faktorov, ktoré ovplyvňujú rýchlosť rozmnožovania mikroorganizmov i možnosť ich života. Dolnú hranicu určuje teplota mrazu vody, ktorá závisí od koncentrácie rozpustených látok. Hornú teplotnú hranicu udáva termolabilita bunkových bielkovín. U každého mikroorganizmu rozoznávame tri základné body teploty:

- minimálnu teplotu, t.j. najnižšiu teplotu, pri ktorej sa daný druh rozmnožuje ešte zistiteľnou rýchlosťou.
- optimálnu teplotu, pri ktorej sa rozmnožuje najväčšou rýchlosťou
- maximálnu teplotu, t.j. najvyššiu teplotu, pri ktorej je schopný sa ešte rozmnožovať.

Optimálna teplota nebýva aritmetickým priemerom minimálnej a maximálnej teploty, ale je zvyčajne bližšia k maximálnej teplote. Je to dané tým, že metabolické reakcie sa v určitom rozsahu teplôt zrýchľujú so vzrastajúcou teplotou. Toto zrýchľovanie je pri ďalšom zvyšovaní teploty spomalené tým, že enzýmy katalyzujúce príslušné reakcie sú termolabilné. Prudký pokles rastu pri vyšších teplotách je spôsobený denaturáciou enzýmov, ktoré sú potrebné pre rast. Táto denaturácia je najskôr reverzibilná, avšak pri vyšších teplotách sa stáva ireverzibilnou a vedie k usmrteniu bunky.

Krátkodobé zvýšenie teploty nad maximálnu teplotu vyvoláva teplotný šok, ktorý vedie k rôznym výkyvom metabolizmu. Pritom sa syntetizujú tzv. teplotné šokové proteíny (heat shock proteins, HSP), ktoré patria medzi tzv. stresové proteíny. Týmto proteínmi sa rozoznávajú anomálne proteíny tvorené pri strese a zaist'uje sa ich rýchle odbúravanie [8, 24].

pH prostredie: koncentrácia vodíkových iónov v prostredí sa vyjadruje v stupnici pH od 0 do 14, pH je záporný dekadický logaritmus molárnej koncentrácie vodíkových iónov.

Rast mikroorganizmov a ich biochemická činnosť sú silne ovplyvnené koncentráciou týchto iónov v prostredí. Niektoré bunky vylučujú do prostredia extracelulárne enzýmy, ktoré priamo ovplyvňujú vonkajšie pH. Vtedy sa do kultivačných médií pridávajú zložky, ktoré pôsobia ako tlmivé roztoky a pomáhajú udržiavať pH prostredie v optimálnych medziach. Najčastejšie sú to draselné soli kyseliny fosforečnej – K_2HPO_4 je mierne alkalický, zatiaľ čo KH_2PO_4 je mierne kyslý. Pre optimálny rast väčšiny baktérií a kvasiniek je toto rozmedzie úzke, zatiaľ čo u väčšiny plesní je podstatne širší. Kvasinky vyžadujú pre rast kyslé prostredie, ich optimálne pH sa pohybuje medzi 4,2 a 5,5, a už slabé alkalické prostredie, okolo pH 7,5, zastavuje ich rast [8, 24].

Vodná aktivita: voda, ktorá je nezbytná zložka bunkovej hmoty, predstavuje 75 až 90% hmotnosti mikrobiálnych tiel. Všetky chemické reakcie v živej bunke prebiehajú len vo vodnom prostredí, a preto voda tu musí byť prítomná v dostatočnom množstve v kvapalnom stave. Pretože nedisociované molekuly vody môžu voľne difundovať cytoplazmatickou membránou mikroorganizmov, musí byť dostatočné množstvo vody obsiahnuté taktiež vo vonkajšom prostredí, aby bunka nestratila vnútrobunečnú vodu a možnosť metabolizmu.

Potreba vody môže byť u mikroorganizmov kvantitatívne vyjadrená rozmedzím vodných aktivít prostredia, pri ktorých sa dané mikroorganizmy môžu rozmnožovať. Vodná aktivita (a_w) určitého roztoku sa rovná pomeru tlaku vodných pár nad týmto roztokom k tlaku vodných pár nad destilovanou vodou za rovnakých podmienok. Vzťah vodnej aktivity ku koncentrácii rozpustenej látky je vo veľmi zriedených roztokoch približne daný vzorcom

$$a_w = \frac{N_w}{(N_w + N_s)},$$

kde N_w je počet molov vody a N_s je počet molov rozpustenej látky.

Mikroorganizmy rastú v rozmedziach a_w 0,63 až 0,99. Minimálna a_w kvasiniek sa pohybuje v rozmedzí 0,88 až 0,91, a je nižšia než u väčšiny baktérií. Osmotolerantné kvasinkové druhy sú schopné rozmnožovania i pri vodnej aktivite $a_w = 0,73$, ktorá je napríklad v mede alebo v 60% roztoku sacharózy. Tieto kvasinky preto môžu spôsobovať nežiadúce kvasenie medzi [8, 31].

Oxidoredukčný potenciál: každé prostredie vykazuje určitý oxidačne redukčný potenciál, ktorý je daný prítomnosťou oxidačných alebo redukčných činidiel. K najdôležitejším

oxidačným činidlám patrí kyslík, dusičnany, železité ióny, peroxidy, k najčastejšie sa vyskytujúcim redukujúcim činidlám patria železnaté ióny, vodík, zlúčeniny so sulfhydrylovou skupinou alebo s reaktívnymi dvojíťmi väzbami. Oxidoredukčný potenciál je charakterizovaný ako rozdiel potenciálu medzi platínovou elektródou umiestnenou do daného prostredia a normálnou vodíkovou elektródou. Mikroorganizmy sa líšia vzťahom ku kyslíku, preto vyžadujú rôzny oxidoredukčný potenciál. Aeróbne mikroorganizmy vyžadujú kyslík pre správne fungovanie svojho metabolizmu, naopak pre anaeróbne mikroorganizmy môže byť prítomnosť kyslíku až smrteľná [8].

Žiarenie: elektromagnetické vlnenie rôznych vlnových dĺžok sa značne líši svojím fyziologickým účinkom na mikroorganizmy. Vlnenie o najdlhších vlnových dĺžkach, t.j. infračervené žiarenie a Hertzové vlny, samy o sebe pravdepodobne vlastné smrtiace účinky na mikroorganizmy nemajú a pôsobia len svojimi tepelnými účinkami.

Nebezpečné UV žiarenie má na mikroorganizmy silne mutagénne až smrtiace účinky. Najsilnejšie pôsobí v oblasti vlnovej dĺžky 256 nm, nakoľko dochádza k jeho pohlcovaniu najmä nukleovými kyselinami.

Röntgenové žiarenie v krátkych vlnových dĺžkach je taktiež radené medzi silné mutagény, ktoré môžu byť aj smrteľné. Tieto účinky sú spôsobené interakciami žiarenia s citlivými bunkami alebo pôsobením voľných radikálov [4, 8].

Soľný stres, osmotický tlak: mikrobiálne bunky majú väčšiu vnútornú koncentráciu rozpustených látok než okolité vodné prostredie a majú preto väčší osmotický tlak. Vnútorný osmotický tlak sa dá zredukovať tým, že nízkomolekulové látky, ktoré nie sú momentálne potrebné v metabolizme, sa zabudujú do nerozpustných rezervných zložiek (lipidy, polysacharidy).

Zvýšená salinita prostredia vedie ku vzniku dvoch stresových faktorov vyvolaných rastom intercelulárnej koncentrácie Na^+ . Sú to jednak osmotické komponenty zvyšujúce turgor bunky a ďalej toxické látky inhibujúce radu bunčných funkcií. Adaptácie kvasinkových buniek na tieto stresové podmienky sú obvykle doprevádzané akumuláciou osmoticky aktívnych zlúčenín, a to najmä glycerolu, ktoré slúžia k vyrovnaní rastúceho externého osmotického tlaku a premieňajú membránový transportný systém tak, aby došlo k vylúčeniu Na^+ z bunky do prostredia [16, 32, 33].

2.7 Metódy spracovania mikrobiálnej biomasy a izolácia vybraných metabolitov

2.7.1 Stanovenie narastenej biomasy

V základnom i aplikovanom výskume je často dôležité stanoviť počet mikroorganizmov vo vzorke alebo ich sušinu. Tieto hodnoty slúžia k posúdeniu kinetiky rastu, k stanoveniu špecifickej rýchlosti rastu, udávajú predstavu o mikrobiálnom znečistení surovín a výrobkov.

2.6.1.1 Stanovenie sušiny turbidimetricky

Stanovenie sušiny mikroorganizmov sa používa v mikrobiológii hlavne pri biochemických prácach a pri zostavovaní rastových kriviek. Spoľahlivé výsledky môžeme dosiahnuť vtedy, ak kultúry rastú v čistých pôdach.

Na stanovenie sušiny turbidimetrickou metódou používame kalibračnú krivku, ktorú si pripravíme nariadením suspenzie kvasiniek destilovanou vodou v určitých pomeroch. U takto

získaných vzoriek jednak zmeriame absorbanciu pri 630 nm, taktiež stanovíme obsah buniek napr. vážkovou metódou [34, 35].

2.6.1.2 Stanovenie sušiny gravimetricky

Do vopred zvážených misiek napipetujeme dané vzorky a sušíme pri 105°C. Z rozdielu hmotnosti prázdnej misky a misky so vzorkou ochladenej v exikátore zistíme sušinu kvasiniek. Spoľahlivé výsledky môžeme dosiahnuť použitím čírych kultivačných pôd. U pôd s pevnými časticami alebo zrazeninami je nutné odčítať hmotnosť pevných častíc nezaočkovanej pôdy od hodnoty suchej suchej hmotnosti vzorku s mikroorganizmami [34].

2.6.1.3 Stanovenie počtu buniek

Pomocou priamej metódy sa stanovuje celkový počet buniek v jednotke objemu. Bunky sa počítajú pod mikroskopom pomocou špeciálnych počítacích komôrok – Bürkerova. Táto komôrka má tvar masívneho podložného sklíčka. V jeho strednej časti sú vyryté dve mriežky, ktoré po prikrytí krycím sklíčkom tvoria komôrku o presnej hĺbke.

Počet buniek v 1 ml sa vypočíta podľa vzťahu:

$$x = \frac{c.z.4000.1000}{P},$$

kde x je počet mikroorganizmov v 1 ml, c je celkový počet buniek vo všetkých počítaných políčkach, z je číslo zriedenia a P je počet políčok [24].

2.7.2 Absorpčná spektrofotometria

Túto metódu využívame pri stanovení sušiny turbidimetricky. Jej podstatou je absorpcia ultrafialového a viditeľného žiarenia zriedenými roztokmi molekúl v rozsahu vlnových dĺžok 200 až 800 nm. Pri absorpcii dochádza k excitácii valenčných elektrónov, ktoré sú súčasťou molekulových orbitálov. Absorbujúce prostredie je realizované kyvetami vyrobenými zo skla alebo kremeňa. Hodnotenie veľkosti absorpcie sa prevádza použitím fotoelektrických detektorov.

Pre kvantitatívne stanovenie platí Lambert-Beerov zákon. Vyjadruje, že absorbanca je priamoúmerná koncentrácii c absorbujúcej látky a hrúbke absorbujúcej vrstvy l :

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l,$$

kde ε_{λ} je molárny absorpčný koeficient (konštanta pre danú látku za daných podmienok pri určitej vlnovej dĺžke, $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), c je látková koncentrácia ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a l je hrúbka absorbujúcej vrstvy (cm) [6].

2.7.3 Izolačné postupy

Karotenoidy sa vyskytujú v rôznych množstvách v potravinárskych surovinách alebo v produkujúcich mikroorganizmoch. Spôsoby och izolácie sú závislé na rade činiteľov, ako sú napríklad množstvá tuku, vody a iné.

Extrakcia organickými rozpúšťadlami

Na izoláciu karotenoidov zo vzoriek s vysokým obsahom vody sa používa najčastejši acetón ako extrahovadlo. Karotenoidy u mikroorganizmov sú viazané prevažne v lipoproteínovej frakcii membrán, preto je na ich uvoľnenie nutné vzorku zmydľňovať s alkoholickým roztokom KOH alebo NaOH. Karotenoidy sa po zmydlení niekoľkokrát

extrahujú nepochybnými organickými rozpúšťadlami, ako je napríklad dietyléter, hexan alebo petroléter [36].

Extrakcia na pevnú fázu

Ďalšou možnosťou extrakcie karotenoidov je extrakcie na pevnú fázu – SPE. Pri tejto metóde dochádza k zachyteniu molekúl látky na tuhom sorbente, cez ktorý preteká vzorka. Molekuly ostávajú na povrchu v dôsledku medzimolekulových interakcií. Po elúcii vhodnými rozpúšťadlami môžeme žiadané molekuly zo sorbentu izolovať [6].

2.8 Separačné metódy

2.8.1 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia – HPLC

Chromatografia je separačná metóda, pri ktorej sa oddeľujú – separujú zložky obsiahnuté vo vzorke. Svojím určením je to predovšetkým metóda kvalitatívnej a kvantitatívnej analýzy vzorky.

V chromatografii sa vzorka vnáša medzi dve vzájomne nemiesiteľné fázy. Stacionárna fáza je nepohyblivá a mobilná fáza je pohyblivá. Vzorku umiestnime na začiatok stacionárnej fázy. Pohybom mobilnej fázy cez stacionárnu fázu je vzorka touto sústavou unášaná. Zložky vzorky môžu byť stacionárnou fázou zachytávané, a preto sa pri pohybe zdržujú. Viac sa zdržia zložky, ktoré sú stacionárnou fázou pútané silnejšie. Tým sa postupne zložky od seba separujú a na koniec stacionárnej fázy sa dostávajú zložky menej zadržované. Toto zadržovanie je spôsobené rozdielnou afinitou látok k stacionárnej fáze, ktoré spôsobuje, že látka migruje kolónou menšou rýchlosťou než je priemerná rýchlosť mobilnej fázy.

V kvapalinovej chromatografii je mobilnou fázou kvapalina. Na rozdiel od plynovej chromatografie rozhodujú o separácii zložiek vzorky nie len interakcie so stacionárnou fázou, ale veľmi výrazne i použitá mobilná fáza [37, 38].

2.7.1.1 Jednotlivé časti systému HPLC

Zásobníky mobilných fáz: sú to najčastejšie sklenené nádoby s objemom 1,0-2,5 l s uzáverom s prevrtnanými otvormi pre hadičky. Mobilná fáza sa čerpá cez filtre odstraňujúce mechanické nečistoty. Veľkosť pórov je 2-20 µm.

Odplyňovacie zariadenia: poznáme tri druhy odplyňovania

- odplyňovanie pomocou ultrazvuku
- odplyňovanie pomocou membránových vakuových odplyňovačov, kde mobilná fáza preteká hadičkou v umiestnenej vo vákuu
- odplyňovanie pomocou héliových odplyňovačov, kde sa mobilná fáza prebubláva héliom, ktorý vytesní rozpustené plyny. Rozpustnosť hélia v rozpúšťadlách je minimálna.

Čerpadlá mobilnej fázy: HPLC čerpadlá čerpajú mobilnú fázu do systému. Umožňujú programovať zloženie mobilnej fázy pri gradientovej elúcii. Pracujú pri vysokých tlakoch.

- Piestové čerpadlá: pomocou rôznych technických riešení prevádzajú pulzný tok na bezpulzný
- Striekačkové čerpadlá: sú založené na báze injekčnej striekačky. Majú dokonalé bezpulzný tok mobilnej fázy.

Dávkovacie ventily: do chromatografického systému môžeme dávkovať vzorku ručne alebo pomocou automatického dávkovacieho systému, tzv. autosampleru. U manuálnych

dávkovacích vetilov rozlišujeme dve polohy. V polohe load sa nastrekuje vzorka. V polohe inject sa vzorka vyplachuje do systému.

HPLC predkolóny: sú to krátke kolóny zaraďované pred samotnú kolónu, ktorú chránia tým, že zachytávajú mechanické nečistoty a látky, ktoré sa ireverzibilne viažu na kolónu. Obsahujú rovnakú stacionárnu fázu ako samotná kolóna.

HPLC kolóny: kontinuálne delenie látok medzi stacionárnou a mobilnou fázou prebieha v krátkych náplňových kolónach o dĺžke 15-30 cm. Sú vyrobené z nerezovej oceli pre vysoké tlaky okolo 50 MPa.

Špecifikácie kolóny: C18 (typ fázy)

4,6 x 250 mm (rozmery kolóny)

5 μm (veľkosť častíc)

100 Å (veľkosť pórov)

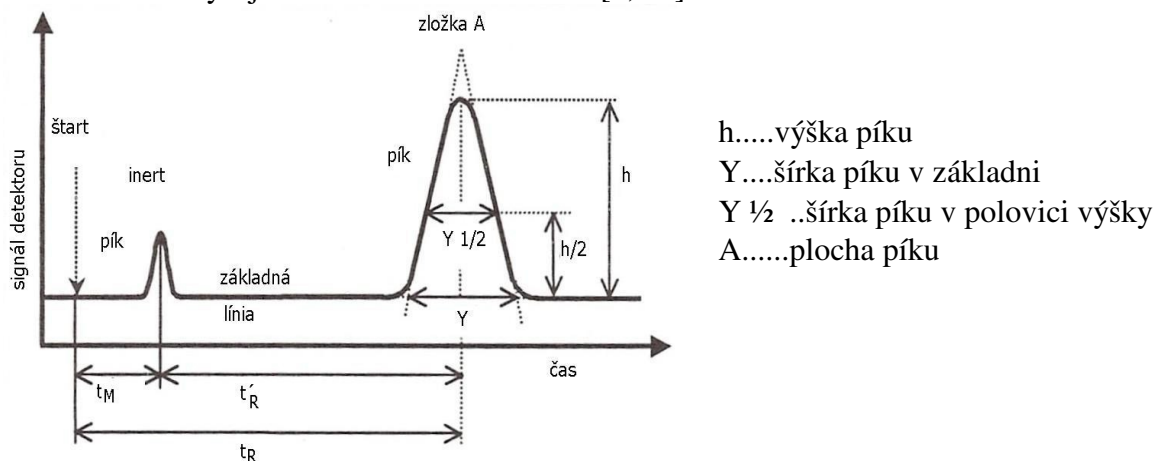
Kolónové termostaty: teplota kolóny ovplyvňuje separáciu analytov. Vyššia teplota zvyčajne urychlí analýzu, dosahuje sa vyššej účinnosti, ale môže sa znížiť rozlíšenie. Kontrolou teploty sa zlepšuje reprodukovateľnosť retenčných časov.

Detektory: sú to zariadenia, ktoré sledujú zmeny zloženia mobilnej fázy meraním fyzikálnych alebo chemických veličín. Poznáme viac druhov detektorov. Ich základnou požadovanou vlastnosťou je najmä maximálna citlivosť detektoru. Potom je možné detekovať i veľmi nízke koncentrácie analytu vo vzorke. Medzi ďalšie požiadavky na detektory patrí stabilný a reprodukovateľný signál, okamžitá lineárna koncentračná odozva, najnižší šum signálu a iné.

- *UV/VIS spektrofotometrický detektor* meria absorbanciu eluátu v oblasti vlnových dĺžok 190 až 800 nm. Je to najčastejší typ detektoru.
- *Fluorescenčný detektor* meria sekundárne emisné žiarenie, ktoré látka vyžaruje po absorpcii primárneho elektromagnetického žiarenia. Absorpciou elektromagnetického žiarenia sa látky dostávajú zo základného stavu do tzv. excitovaného stavu. Absorbovanú energiu analyt vyžiari ako fluorescenciu.
- *Refraktometrický detektor* je založený na meraní zmien indexu lomu eluátu v meracej cele. Odozva je závislá na teplote, preto je nutné detekčnú celu temperovať. Je to univerzálny detektor, nevhodný pre gradientovú elúciu. Je vhodný pre látky, ktoré neabsorbujú, nefluoreskujú, ako sú napríklad cukry, lipidy alebo polymery.
- *Elektrochemický detektor* meria prúd, ktorý vzniká pri prechode oxidovateľnej alebo redukovateľnej látky meriacou celou. Využíva sa tu trielektrodové zapojenie s pracovnou, pomocnou a referenčnou elektródou. Výhodou tohto detektoru je vysoká odozva a citlivosť. Detektory pracujú buď amperometricky alebo coulometricky.
- *Vodivostný detektor* meria vodivosť mobilnej fázy medzi dvoma elektródami v prietokovej cele obvykle válcového tvaru. Mobilná fáza musí byť nevodivá, to je bez prídavkov pufrov.
- *Hmotnostný detektor* detekuje ióny, ktoré vznikajú ionizáciou analytu. Prvým krokom je prevod analytov rozpustených v mobilnej fáze na ióny v plynnej fáze. V ďalšom kroku sa ióny analyzujú. Určuje sa pomer hmotnosti ku náboju. Iónové zdroje pracujú za atmosférického tlaku, analyzátory za vákua. Je to univerzálny a zároveň vysoko selektívny, citlivý detektor. Umožňuje identifikáciu analytov na základe ich hmotnostných spektier [38, 39, 40].

2.7.1.2 Veličiny používané k popisu chromatografickej analýzy

Chromatografická separácia je dynamický systém, v ktorom nie je možné dosiahnuť rovnováhy v určitej fáze transportu látky kolónou. Je možné sledovať len dobu, ktorú analyt ostáva v stacionárnej alebo mobilnej fáze behom transportu chromatografickým systémom. Táto doba je závislá na interakcii zložky analytu v stacionárnej a mobilnej fáze. Príčinou rôzne dlhej doby pobytu analyzovanej zložky v chromatografickom systéme sú rôzne veľké interakcie zložky s jednou alebo druhou fázou [6, 39].



Obrázok 8: Popis chromatogramu[6]

Y a Y 1/2 súvisia s účinnosťou separácie, A a h s kvantitatívnym zastúpením zložky.

Retenčné charakteristiky: sa používajú ku kvalitatívnej analýze, pretože v daných podmienkach môžeme konkrétnu zložku charakterizovať jej retenčným alebo redukovaným retenčným časom.

Retenčný objem V_R : je objem mobilnej fázy, ktorý musí prejsť kolónou, aby sa príslušný analyt dostal od začiatku až na koniec separačnej kolóny.

Retenčný čas t_R : je celkový čas, ktorý analyt strávi v separačnej kolóne.

Mŕtvy objem kolóny V_M : je objem eluentu, ktorý musí prejsť kolónou, aby sa nezadržovaný analyt dostal od začiatku až na koniec kolóny.

Redukovaný retenčný objem V'_R : je daný rozdielom retenčného a mŕtveho objemu.

Mŕtvy čas kolóny t_M : je retenčný čas analytu, ktorý nie je v kolóne zadržovaný, to znamená, že sa pohybuje rovnakou rýchlosťou ako mobilná fáza.

Redukovaný retenčný čas t'_R : je čas, ktorý analyt strávi zadržovaný v stacionárnej fáze.

Tieto časy splňujú retenčnú rovnicu: $t_R = t_M + t'_R$

Retenčný pomer k: jedna z najužívanejších retenčných charakteristík, udáva, koľkokrát viac času strávi analyt v stacionárnej fáze než vo fáze mobilnej. Je to i pomer látkového množstva analytu v stacionárnej a mobilnej fáze za rovnovážnych podmienok.

Rozlíšenie R: veličina kvantifikujúca schopnosť chromatografického systému vzájomne oddeliť dva analyty.

Platí, že:
$$R_{1,2} = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{0,5(Y_{b,2} - Y_{b,1})},$$

kde Y_b je šírka píku v základni, t_R je retenčný čas analytu.

Prietok mobilnej fázy:

Lineárna rýchlosť mobilnej fázy u: sa udáva jednotkou v cm/min

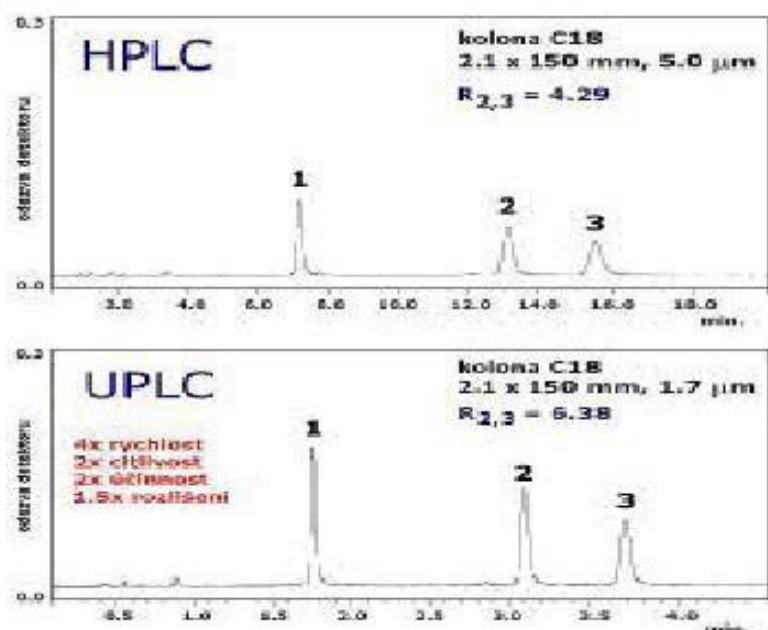
Objemová prietoková rýchlosť mobilnej fázy F_m : sa udáva jednotkou v ml/min

Platí, že: $u = \frac{L}{t_M}$,

kde L je dĺžka kolóny [39, 40].

2.7.1.3 UHPLC – ultra high performance liquid chromatography

UHPLC alebo UPLC je vysoko-účinná kvapalinová chromatografia s časticami menšími než 2 μm a veľmi vysokým provozným tlakom. Dosahuje sa vyššej účinnosti separácie a veľmi krátkych retenčných časov oproti klasickej HPLC [40].



Obrázok 9: Rozdiel medzi analýzou analytov metódou HPLC a UPLC [40]

2.8.2 Hmotnostná spektrometria

Základnou charakteristikou, ktorá definuje nízkomolekulárne látky, ale aj makromolekuly, je ich molekulová hmotnosť. Na jej meranie bolo vypracovaných množstvo metód ako napríklad gelová a kapilárna elektroforéza, meranie rozptylu svetla, ale aj hmotnostná spektrometria. Tá vyniká medzi ostatnými metódami presnosťou stanovenia, ako aj rýchlosťou stanovenia a vysokou citlivosťou [41].

Hmotnostná spektrometria je fyzikálne-chemická metóda slúžiaca k určovaniu hmotností atómov, molekúl a ich častí po prevedení na kladné alebo záporné ióny. Nabité častice sú potom separované v analyzátore podľa pomeru hmotnosti k náboju (m/z) a nakoniec sú zaznamenané v detektore. Častice bez náboja nie sú spracované a zaznamenané. Kvantitatívna analýza spočíva v meraní počtu určitých iónov (plochy alebo výšky ich pík). Záznam četnosti výskytu jednotlivých iónov sa potom nazýva hmotnostné spektrum. Hmotnostná spektrometria je považovaná za deštruktívnu analytickú metódu [42].

Základnými časťami hmotnostného spektrometru sú: iónový zdroj, v ktorom dochádza k ionizácii, analyzátor, kde sú ióny separované v závislosti na pomere m/z , detektor, dátový systém pre zber dát a riadenie analýzy, vákuový systém zabezpečujúci udržanie vysokého

vákua potrebného pre hmotnostnú spektrometriu, čerpací systém, ktorý je väčšinou dvojstupňový. Primárny systém zabezpečujú mechanické rotačné pumpy, sekundárne dočerpanie na pracovný tlak zaisťujú difúzne alebo turbomolekulárne pumpy [41, 42].

Hlavným analytickým využitím hmotnostnej spektrometrie je predovšetkým stopová analýza organických látok s dôrazom na zistenie či potvrdenie ich štruktúry [43].

2.7.2.1 Iónový zdroj a najbežnejšie ionizačné techniky

Významným prvkom hmotnostného spektrometru je iónový zdroj, ktorý prevádza analyzované látky do iónového stavu. Proces ionizácie zásadne ovplyvňuje citlivosť metódy a dosažiteľnú hranicu detekcie. Ak energia dodaná molekule v priebehu ionizácie výrazne prevyšuje jej prvú ionizačnú energiu, môže dôjsť k spotrebovaniu nadbytočnej energie a parentálny ión sa rozštepí [43].

Niektoré ionizačné techniky sú mierne a produkujú len ionizované molekuly analyzovanej látky (mäkké ionizačné techniky). Avšak iné sú účinnejšie a produkujú priamo fragmenty molekúl (tvrdé ionizačné techniky). Ionizačné techniky môžeme deliť aj podľa skupenstva, v ktorom sa látka nachádza pri ionizácii. Ionizácia v plynnej fáze sa vyznačuje odparením analyzovanej látky do vákua za predpokladu dostatočnej tekavosti látky. Pre netekavé látky je vhodná ionizácia v kondenzovanej fáze, kde dochádza k tvorbe iónov priamo vo fáze kvapalnej alebo tuhej [41, 43].

V zásade sa používajú nasledujúce typy ionizácie: ionizácia elektrónom (electron ionization EI), chemická ionizácia (chemical ionization CI), sprejové techniky, sekundárna iónová hmotnostná spektrometria (SIMS), fast atom bombardment (FAB), ionizácia laserom za účasti matrice (matrix assisted laser desorption MALDI). Elektrónová a chemická ionizácia sú metódy vhodné pre ionizáciu len plyného analytu a ostatné techniky môžu byť využívané i pre kvapalné typy vzoriek [44].

2.7.2.2 Spojenie hmotnostnej spektrometrie s kvapalinovou chromatografiou

Spojenie kvapalinovej chromatografie, metódou s vysokou separačnou schopnosťou, a hmotnostnej spektrometrie, vysokocitlivej identifikačnej metódy, prináša dôležité výhody pre analýzu organických látok.

Táto technika je intenzívne používaná až v posledných rokoch, kedy bol vyriešený základný problém s tlakom a objemom mobilnej fázy v mieste ich spojenia. Iónové zdroje pracujú za vysokého tlaku a tlak na výstupe z kolóny je približne atmosférický. Táto nekompatibilita oboch zariadení bola vyriešená vďaka ionizačným technikám, ktoré transformujú kvapalnú mobilnú fázu do aerosolu za atmosférického tlaku [45, 46].

Primárnym požiadavkom pre spojenie kvapalinového chromatografu a hmotnostného spektrometru je odstránenie zložiek mobilnej fázy pred samotnou ionizáciou. Dnes sa výhradne používajú sprejové ionizačné techniky, ktoré sú konštrukčne vybavené tak, aby boli schopné odviesť čo najväčšie množstvo prchavých zložiek kvapalnej mobilnej fázy ešte skôr, než sa dostanú do hmotnostného analyzátoru. V spojení LC/MS je veľmi rozšíreným analyzátorom iónová pašť. Tento typ analyzátoru je vhodný predovšetkým pre stopovú analýzu. Výber chromatografickej kolóny sa riadi najmä požiadavkami na danú separáciu látok. Najčastejšie sa používa reverzná chromatografia s kolónami typu C8 a C18. V praxi sú najviac používané kratšie kolóny s menším vnútorným priemerom a drobnou stacionárnou fázou, kde je aplikovaný prietok mobilnej fázy v radoch desiatín ml/min. Vďaka tomu je možné celý objem mobilnej fázy privádzať priamo do iónového zdroja [41, 47].



Obrázok 10: LC/MS systém

2.8.3 Využitie inštrumentálnych metód pri analýze karotenoidov produkovaných mikroorganizmami

V doterajších experimentoch prevádzaných v rámci bakalárskej práce bola už čiastočne študovaná regulácia produkcie lipofilných pigmentov – karotenoidov u niektorých typov karotenogénnych kvasiniek s využitím vybraných odpadov. Ďalej boli tiež testované možnosti HPLC stanovenia karotenoidov a aplikované na analýzu pigmentov produkovaných niektorými prirodzenými producentami. Intenzívnejšie boli študované hlavne kvasinky rodu *Rhodotorula*, ktoré sú schopné poskytovať vysoké výťažky biomasy (cca 14 g/l na trepačkách, až 35 g/l vo fermentore), a to i v médiu čiastočne limitovanom zdrojom dusíka a zloženom z relatívne ekonomicky nenáročných surovín. Zmeny zloženia média a rastových podmienok však majú svoje obmedzenia a je možné s nimi dosiahnuť len určitého konečného zvýšenia produkcia karotenoidov [48, 49].

Istým riešením je špeciálne u karotenogénnych kvasiniek aplikácia určitého typu vonkajšieho stresu včetně nutričného, čo môže byť spojené i s potencionálnym využitím odpadových substrátov. Karotenogénne kvasinky však nedisponujú extracelulárnymi enzýmami schopnými hydrolyzovať komplexné odpady, využitie alternatívnych nutričných zdrojov je teda obmedzené. Jednou z aktuálnych študovaných možností je glycerol včetně odpadného glycerolu získaného pri výrobe biopalív. Stresové podmienky môžu mať za následok dokonca zvýšenie produkcie metabolitov, ktoré sa zúčastňujú adaptácie kvasiniek na stresový podnet. Často však takáto stratégia vedie k nižšej produkcii biomasy, aj cez to, že produkcia pigmentov môže byť niekoľkonásobne vyššia. Karotenoidy sú považované za súčasť komplexnej stresovej odozvy kvasiniek a stresové podmienky v dobre regulovaných medziach môžu viesť k niekoľkonásobne vyššej produkcii pigmentov bez významnejších strát biomasy. Využitie odpadov z potravinárskych a poľnohospodárskych výrobní k indukcii nutričného stresu predstavuje tak efektívnu kombinovanú stratégiu s významným ekonomickým a ekologickým faktorom [50, 51].

Pokiaľ chceme kvalitne monitorovať priebeh biotechnologického procesu a zistiť prebiehajúce metabolické zmeny i priebeh vyčerpania substrátu, je treba mať k dispozícii sofistikované a optimalizované analytické metódy, ktoré môžu poskytnúť reprodukovateľné výsledky s dostatočnou presnosťou a citlivosťou. Screeningová a zrovnávací analyza

karotenidov metódou RP-HPLC s UV/VIS detekciou nepredstavuje v súčasnej dobe významný problém, stále však je riešená otázka identifikácie produkovaných derivátov u jednotlivých producentov a zmeny množstva a zostavy pigmentov produkovaných v zmenených podmienkach. Súbežne s karotenoidmi je v paralelnej časti vetvovej biosyntetickej dráhy produkovaný i ergosterol, ktorý je považovaný rovnako za priemyslovo významný metabolit a je vhodné mať k dispozícii metódu pre jeho spoľahlivú kvantifikáciu [44, 46].

K orientačnej analýze karotenoidov je možné použiť spektrofotometrické metódy, k separácii, identifikácii a kvantifikácii sa však používajú výhradne metódy chromatografické, a to kvapalinová chromatografia na reverznej fáze so spektrofotometrickou detekciou alebo detekciou diódovým poľom. Pre detailnejšiu identifikáciu je možné použiť HPLC v spojení s hmotnostnou detekciou, optimálnou formou ionizácie je APCI (chemická ionizácia za atmosférického tlaku), ale je reprezentovaných i množstvo prác využívajúcich elektrosprej. Rôzne skupiny karotenoidov sa môžu líšiť v polarite, čoho je možné využiť pri predseparácii vzoriek extrakciou na pevnej fáze, prípadne v priebehu vlastného procesu chromatografickej analýzy úpravou elučného režimu. Karotenoidy sú z kvasinkových buniek izolované najčastejšie postupom zahrňujúcim mechanickú dezintegráciu s morským pieskom v prostredí acetónu, zmydelnenie a organickú extrakciu do hexanu alebo ethyléteru. Súbežne s karotenoidmi je týmto postupom extrahovaný aj ergosterol, ktorý je ďalším významným metabolitom produkovaným kvasinkou *R. glutinis* a môže byť s výhodou stanovený metódou HPLC s UV detekciou [51, 52].

Cieľom predloženej práce je štúdium rastových charakteristík a metabolických zmien doprevádzajúcich biotechnologický proces produkcie karotenoidov kvasinkami. K tomuto štúdiu boli využité vybrané kmene kvasiniek kultivované za optimálnych podmienok, na vybraných typoch odpadových substrátov a na vybraných odpadoch predom upravených pomocou plesňových hydrolytických enzýmov.

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom predloženej diplomovej práce zameranej na produkciu karotenoidných pigmentov s využitím odpadných substrátov vybranými kmeňmi karotenogénnych kvasiniek je riešenie nasledujúcich dielčích úloh:

- prehľad mikrobiálnych producentov karotenoidov a lipidových látok
- možnosti riadenia produkcie pigmentov
- optimalizácia podmienok analýzy karotenoidov
- produkcia obohatenej biomasy, karotenoidov a lipidických látok vybranými kmeňmi karotenogénnych kvasiniek s využitím modifikácie zloženia kultivačného média
- sledovanie zmien v raste a produkcii karotenoidov a lipidických látok na vybraných typoch odpadných substrátov.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Materiál a chemikálie

4.1.1 Štandardné a špeciálne chemikálie

Methanol pre HPLC Gradient Grade, Sigma – Aldrich (SRN)
Ethanol pre HPLC Gradient Grade, Sigma – Aldrich (SRN)
Methanol pre LC-MS, Sigma – Aldrich (SRN)
Beta, beta-karotén, Sigma (SRN)
Lykopén, Sigma (SRN)
Ergosterol, Sigma (SRN)

4.1.2 Kultivačné médiá a ich zložky

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

4.1.3 Chemikálie použité na izoláciu karotenoidov

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

4.1.4 Materiál

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

4.2 Prístroje a pomôcky

4.2.1 Kultivácia kvasiniek

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

Analytické váhy Boeco (SRN)

4.2.2 Izolácia a analýza karotenoidov

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

Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)

Vodná lázeň EL-20, Merci a.s. (ČR)

Zostava na HPLC/PDA/ESI-MS

Soustava HPLC/MS (Thermo Fischer Scientific, USA)

Termostat - LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)

Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR

Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR

Hmotnostní spektrometr - LCQ Advantage MAX, Thermo Finnigan

Vyhodnocovací systém Xcalibur

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

Programátor gradientu GR 5

Vysokotlaké čerpadlo typ P 4020

Dávkovací ventyl typ C

Termostat kolóny typ LCO 101

UV-VIS detektor procesorový, typ LCD 2084

Software Clarity – chromatography SW, Data apex 2006

Chromatografické kolóny:

Kolóna Biospher, 4,6 x 150 mm, reverzná fáza PSI 200 C18, 7 µm, Labicom (ČR)

Kolóna Nucleosil 100-C18, 4,6 x 150 mm, C18, 7 µm (ECOM)

Kolóna Zorbax Elipse Plus, XDB C18, 5 µm, 4,6 x 150 mm, (Agilent)

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

Držák předkolony - KJO - 4282, ECOM (ČR)

Předkolony - C₁₈, AJO - 4287, Phenomenex

4.3 Mikroorganismy

Ku kultivácii boli použité kvasinkové kmene: *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-33

Cystofilobasidium capitatum CCY 10-1-1

Sporobolomyces roseus CCY 19-6-4

Enzymy na hydrolýzu odpadov boli pripravené z húb:

Alternaria alternata (CCM 8326)

Aureobasidium pullulans (CCM F-148)

Fusarium solani (CCM F-552)

Phanerochaete chrysosporium (CCM 8074)

4.4 Kultivácia mikroorganizmov

4.4.1 Kultivácia karotenogénnych kmeňov

Kvasinky *Rhodotorula glutinis*, *Cystofilobasidium capitatum* a *Sporobolomyces roseus* patria medzi mezofilné, aeróbne mikroorganizmy s podobnými nárokmi na podmienky rastu. Kvasinky boli kultivované v tekutom médiu pri teplote 28°C za neustáleho trepania a osvetlenia kvôli produkcii karotenoidov. Sterilizácie médií prebiehali v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom vždy po dobu 30 minút.

4.4.2 Inokulum I

Pre každú sériu kultivácie bolo najprv pripravené inokulum I o potrebnom objeme tak, aby následný objem pre inokulum II v pomere ino I : ino II bol 1:5. Zloženie inokula I, ktoré bolo používané pri kultivácii je uvedené v tabuľke 1. Do každého vysterylizovaného inokula I boli sterilne naočkované 3 kličky zásobnej kultúry na Petriho miskách. Kultivácia prebiehala 24 hodín.

Tabuľka 1: Zloženie inokula I

Zložka	Množstvo
glukóza	40 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
KH ₂ PO ₄	5 g
MgSO ₄	0,34 g
Kvasničný autolyzát	7 g
Vodovodná voda	1000 ml

4.4.3 Inokulum II

Pre každé inokulum I bolo pripravené príslušné inokulum II podľa príslušnej kultivačnej série tak, aby pomer ino I : ino II bol 1:5. Kultúry z inokula I boli sterilne preliate do inokula II a kultivované 24 hodín. Inokulum II bolo základom pre nasledujúce série kukltivácií v produkčných médiách. Všetky inokulá II obsahovali rovnaký základ uvedený v tabuľke 2. Zložky, ktorými sa jednotlivé inokula II od seba líšili, sú uvedené v tabuľke 3. Ich koncentrácia bola vždy 7 g/l.

Tabuľka 2: Zloženie inokúl II - základ

Zložka	Množstvo
glukóza	40 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
KH ₂ PO ₄	5 g
MgSO ₄	0,34 g
Vodovodná voda	1000 ml

Tabuľka 3: Zloženie inokúl II – zložky, ktorými sa inokulá líšili

Číslo série		Zložka
1	A	Kvasničný autolyzát
1	B	Jablčná vláknina
2		Kvasničný autolyzát
3		Kvasničný autolyzát
4		Kvasničný autolyzát

4.4.4 Produkčné médiá

Pre každú sériu inokul II boli pripravené rôzne produkčné médiá o potrebnom objeme. Produkčné médiá obsahovali rovnaký základ, ktorý je uvedený v tabuľke 4. Odlišnosti, ktorými sa jednotlivé médiá líšili, sú uvedené v tabuľkách 5 - 7. Inokula II boli sterilne rozliate do produkčných médií tak, aby pomer ino II : produkčné médium bol 1:5. Kultúry boli kultivované 80 hodín.

Tabuľka 4: Zloženie produkčného média - základ

Zložka	Množstvo
(NH ₄) ₂ SO ₄	4 g
KH ₂ PO ₄	4 g
MgSO ₄	0,34 g
Vodovodná voda	1000 ml

Tabuľka 5: Zloženie produkčných médií série 1 – ovocné odpady

Označenie	Zloženie
A kontrola	základ + glukóza 30 g/l
B kontrola	základ + glukóza 30 g/l
A hruškové šupky	základ + hruškové šupky 30 g/l
A vláknina	základ + glukóza 15 g/l + jablčná vláknina 15 g/l
B vláknina	základ + glukóza 15 g/l + jablčná vláknina 15 g/l
A jablčné šupky	základ + jablčné šupky 30 g/l
B jablčné šupky	základ + jablčné šupky 30 g/l

Kultúry kultivované v produkčných médiách série 1 mali zmenu v zložení inokula II B oproti inokulu I a inokulu II A. Inokulum II B obsahovalo jablčnú vlákninu namiesto kvasničného autolyzáta. K médiám s jablčnou vlákninou, jablčnými šupkami a hruškovými šupkami boli pripravené príslušné slepé vzorky k meraniu absorbancie. Obsahovali rovnaké množstvo vody a odpadného substrátu ako príslušné médium.

Tabuľka 6: Zloženie produkčných médií série 2 – cereálne odpady

Označenie	Zloženie
kontrola	základ + glukóza 30 g/l
cestoviny	základ + vaječné cestoviny 30 g/l
kukuričné klíčky	základ + kukuričné klíčky 30 g/l
pšeničná kaša	základ + pšeničná kaša 30 g/l
upravená srvátka	základ + lyofil. upravená syrovátka 30g/l
neupravená srvátka	základ + lyofil. neupravená syrovátka 30g/l

Kultúry kultivované v sérii 2 mali rovnaké zloženie inokula I aj inokula II. Obe obsahovali kvasničný autolyzát. Ku všetkým médiám okrem kontrolného média, boli pripravené príslušné slepé vzorky k meraniu absorbancie s obsahom rovnakého množstva vody a odpadu ako malo príslušné médium.

Lyofilizovaná upravená srvátka používaná do produkčných médií bola upravovaná odstránením bielkovín. Najskôr sa upravilo pH prostredie na približnú hodnotu 4,6 pomocou 0,1 M H₂SO₄. 20 minútovým zahrievaním vo vodnom kúpeli sa vyzrážali bielkoviny, ktoré boli následne stočené pri 5000 otáčkach po dobu 10 minút. Zloženie pôvodnej, neupravenej syrovátky je uvedené v tabuľke 7.

Tabuľka 7: Zloženie srvátky poskytnuté dodávateľom

Zložka	Sladká srvátka (g/l)	Kyslá srvátka (g/l)
Sušina	63,0 – 70,0	63,0 – 70,0
Laktóza	46,0 – 52,0	44,0 – 46,0
Bielkoviny	6,0 – 10,0	6,0 – 8,0
Vápnik	0,4 – 0,6	1,2 – 1,6
Fosforečnany	1,0 – 3,0	2,0 – 4,5
Laktát	2,0	6,4
Chloridy	1,1	1,1
Hodnota pH	6,1	4,6

Tabuľka 8: Zloženie produkčných médií série 3 – odpady + enzýmy 1.časť

Označenie	Zloženie
kontrola	základ + glukóza 30 g/l
vláknina	základ + jablčná vláknina 30 g/l
vláknina + E1	základ + jablčná vláknina 30 g/l + enzym. preparát 1
vláknina + E2	základ + jablčná vláknina 30 g/l + enzym. preparát 2
pšeničná kaša	základ + pšeničná kaša 30 g/l

pšeničná kaša + E1	základ + pšeničná kaša 30 g/l + enzym. preparát 1
pšeničná kaša + E2	základ + pšeničná kaša 30 g/l + enzym. preparát 2
cestoviny	základ + vaj. cestoviny 30 g/l
cestoviny +E1	základ + vaj. cestoviny 30 g/l + enzym. preparát 1
cestoviny +E2	základ + vaj. cestoviny 30 g/l + enzym. preparát 2

Tabuľka 9: Zloženie produkčných médií série 4 - odpady +enzýmy 2.časť

načenie	Zloženie
kontrola	základ + glukóza 30 g/l
vláknina	základ + jablčná vláknina 30 g/l
vláknina + E1	základ + jablčná vláknina 30 g/l + enzym. preparát 3
vláknina + E2	základ + jablčná vláknina 30 g/l + enzym. preparát 4
pšeničná kaša	základ + pšeničná kaša 30 g/l
pšeničná kaša + E1	základ + pšeničná kaša 30 g/l + enzym. preparát 3
pšeničná kaša + E2	základ + pšeničná kaša 30 g/l + enzym. preparát 4
cestoviny	základ + vaj. cestoviny 30 g/l
cestoviny +E1	základ + vaj. cestoviny 30 g/l + enzym. preparát 3
cestoviny +E2	základ + vaj. cestoviny 30 g/l + enzym. preparát 4

Kultúry pestované v produkčných médiách série 3 a 4 mali rovnaké zloženie inokula I a inokula II s obsahom kvasničného autolyzátu. V týchto sériách boli do vybraných produkčných médií pridané hydrolytické enzýmy rozkladajúce príslušné polysacharidy na jednoduché cukry.

4.4.5 Hydrolýza odpadov v produkčných médiách

Produkčné médiá v sériách 3 a 4 s obsahom príslušného odpadu boli podrobené 24 hodinovej enzymatickej hydrolýze pomocou štyroch rôznych enzýmových preparátov. Enzýmový preparát 1 (E1) obsahoval zmes extracelulárnych hydrolytických enzýmov vyprodukovaných do média od plesne kmeňa *Alternaria alternata*, enzýmový preparát 2 (E2) obsahoval enzýmy od plesne kmeňa *Fusarium solani*. Enzýmový preparát 3 (E3) od plesne *Aureobasidium pullulans* a enzýmový preparát 4 (E4) obsahoval enzýmy od plesne kmeňa *Phanerochaete chrysosporium*. Extracelulárne vyprodukované enzýmy v produkčných médiách od všetkých plesňových kmeňov boli najskôr zlyofilizované, následne rozpustené v 15 ml fosfátového pufru a pridané do príslušného média v množstve 1,5 ml. Takto boli média ponechané 24 hodín za laboratórnych podmienok hydrolyzovať. Po 24 hodinovej hydrolýze boli odobraté 1 ml vzorky z každého hydrolyzovaného média a analyzované metódou Somogyiho-Nelsona na redukujúce sacharidy. Redukujúce sacharidy boli stanovené ešte aj v nehydrolyzovaných produkčných médiách, a to pred steriláciou týchto médií, po sterilácii, a nakoniec aj po sterilácii už zhydrolyzovaného média, rovnako ako aj v samotnom enzýmovom preparáte.

4.4.6 Stanovenie redukujúcich sacharidov metódou Somogyiho-Nelsona

Redukujúce sacharidy v produkčných médiách hydrolyzovaných pomocou enzýmov, ako aj v samotných enzýmových preparátoch, boli stanovené spektrofotometricky metódou Somogyiho-Nelsona. Táto metóda využíva schopnosti redukujúcich sacharidov vyredukovať z alkalického prostredia meďnatých solí oxid meďný, ktorý s arzenomolybdenanovým činidlom poskytuje farebný komplex, ktorého zafarbenie sa premeria spektrofotometricky. Najprv sa pripravili jednotlivé činidlá:

Roztok I pozostával z 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 II 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 III pozostával z 25 g molybdenanu amonného rozpusteného v 450 ml destilovanej vody, 21 ml koncentrovanej H_2SO_4 a 3 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ rozpusteného v 25 ml destilovanej vody. Tento roztok sa musel nechať 48 hodín stáť pri laboratórnej teplote za neprístupu svetla. V samotnom stanovení sa k 1 ml vzorku pridalo 0,5 ml roztoku I a 0,5 ml roztoku II. Skúmavky sa umiestnili na vriaci vodný kúpeľ na 10 minút. Potom sa skúmavky ochladili vodou, pridalo sa 0,5 ml roztoku III, dobre premiešalo, aby sa vzniknutý Cu_2O rozpustil a doplnilo sa destilovanou vodou na celkový objem 10 ml. Zmerala sa absorbancia pri 720 nm.

4.4.7 Stanovenie zákalu turbidimetricky

1 ml vzorky bol nariadený destilovanou vodou tak, aby sa neprekročil rozsah spektrofotometra. Bola zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 630 nm proti destilovanej vode. V prípade živných médií obsahujúcich prídavok odpadného substrátu sa ako blank používalo toto médium.

4.4.8 Spracovanie biomasy

Celý objem produkčného média bol scentrifugovaný pri 5000 otáčkach po dobu 10 minút. Potom boli bunky premyté destilovanou vodou a opäť stočené. Nakoniec bola biomasa rozsuspendovaná vo fyziologickom roztoku a uložená v mrazničke.

Biomasa kultivovaná v produkčných médiách s obsahom odpadného substrátu bola pred centrifugáciou ešte prefiltrovaná cez niekoľkokrát zloženú gázu, aby sa bunky oddelili od pridaného nerozpusteného odpadu.

4.4.9 Rastová krivka

Rastová charakteristika bola prevedená len u kvasinky *Cystofilobasidium capitatum*, pretože rastové krivky s ostatnými používanými kvasinkami boli prevedené už v predchádzajúcich prácach.

Rastová krivka u kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* bola stanovovaná v predom určených časových intervaloch vždy rovnakým spôsobom. Pre každý plánovaný odber bola z rovnakého inokula II zaočkovaná jedna produkčná Erlenmayerova banka o objeme 500 ml so 150 ml produkčného média. 1 ml suspenzie bol použitý k stanoveniu zákalu a mikroskopickému pozorovaniu na vylúčenie kontaminácie, 10 ml na stanovenie hmotnosti sušiny a 100 ml k stanoveniu karotenoidov a ergosterolu metódou HPLC. Získané údaje boli potom spracované v programe Excel 2003.

Závislosť medzi množstvom sušiny a zákalom rôzne koncentrovaných suspenzií kvasiniek z predchádzajúcich prác pre:

RG: $y = 0,1947x - 0,0234$

SR: $y = 0,2421x - 0,0488$,

kde y je nameraná absorbanca a x množstvo sušiny v g/l [10, 53].

4.4.10 Stanovenie sušiny gravimetricky

10 ml kultúry z rastovej krivky, ktoré boli určené pre stanovenie sušiny, bolo sцентрифugovaných pri 5000 otáčkach po dobu 10 minút. Bunky boli následne premyté destilovanou vodou a opäť stočené. Vzorka bola rozsuspendedovaná v 1 ml destilovanej vody, naliata do predom vysušenej a zvaženej váženky a vysušená do konštantnej hmotnosti pri teplote 105°C. Po ochladení na laboratórnu teplotu v exikátore a zvažení na analytických váhach, bola z rozdielu hmotnosti prázdnej váženky a váženky s vysušenou vzorkou stanovená hmotnosť sušiny v každej vzorke.

4.5 Izolácia a analýza karotenoidov

Karotenoidy aj ergosterol sú súčasťou lipidickej frakcie kvasinkových buniek, preto je možné ich izolovať niekoľkostupňovou extrakciou spojenou so zmydlením. K analýze boli použité vzorky z produkčných médií o obsahu 100 ml. Identifikácia bola prevedená pomocou vysoko-účinnnej kvapalinovej chromatografie so spektrofotometrickou detekciou.

4.5.1 Izolácia karotenoidov zmydlením

Uložené vzorky z mrazničky boli rozmrazené v tme a stočené pri 5000 otáčkach po dobu 10 minút. Následne boli premyté destilovanou vodou a opäť stočené. Sediment, ktorý obsahoval kvasinkové bunky, bol v trecej miske dezintegrovaný s 50 ml acetónu, kvantitatívne prevedený na odparovaciu miskú a po prídavku 50 ml 10% alkoholického roztoku KOH bol zmydelňovaný na vodnej lázni pri 90°C po dobu 30 minút.

4.5.2 Extrakcia

Zmydelnený odparok bol trikrát extrahovaný pomocou diethyléru. Spojené éterové frakcie boli odparené na vákuovej odparke.

4.5.3 Analýza karotenoidov metódou HPLC/UV-VIS

Vysušený extrakt bol rozpustený v ethanole pre HPLC, prefiltrovaný cez jednorázový filter a prevedený do mikrocetriфugačnej skúmavky. Pred samotnou analýzou boli vzorky ešte krátko stočené pri 5000 ot/min.

K chromatografickej analýze karotenoidov bola použitá zostava HPLC od firmy ECOM spol. s r.o. K spracovaniu analytických dát a chromatogramov bol použitý chromatografický software Clarity.

4.5.4 Podmienky separácie

Analýza karotenoidov a ergosterolu metódou HPLC prebiehala za izokratických podmienok pri prietoku mobilnej fázy 1,0 ml/min a teplote 45°C na nerezovej kolóne s predradenou predkolónou, s fotometrickou detekciou pri vlnovej dĺžke odpovedajúcej maximu absorbancie príslušnej analyzovanej látky (450 nm pre karotenoidy a 285 nm pre

ergosterol). Vzorka bola na kolónu dávkovaná ventilom s dávkovacou smyčkou o objeme 20 µl. Ako mobilná fáza bol použitý methanol pre HPLC.

4.5.5 Identifikácia a kvantifikácia karotenoidov

Analýza bola prevedená na základe chromatografickej analýzy štandardov karotenoidov a ergosterolu pri daných vlnových dĺžkach. Stanovenie množstva vybraných karotenoidov a ergosterolu bolo robené pomocou kalibrácie metódou kalibračnej krivky. Ku kvantitatívnemu vyhodnoteniu bola použitá závislosť plochy píkov jednotlivých štandardov na koncentrácii. Boli použité štandarty v koncentračnom rozmedzí β-karotén 10-100 µl/ml, lykopén 10-100 µl/ml a ergosterol 0,1-1mg/ml. K spracovaniu analytických dát a chromatogramov bol použitý chromatografický software Clarity (DataApex).

4.5.6 Optimalizácia chromatografickej analýzy vybraných pigmentov – výber vhodnej chromatografickej kolóny

Výber vhodnej chromatografickej kolóny je dôležitý jednak z hľadiska účinnosti separácie, dostatočnej kvantitatívnej odozvy signálu, jednak z hľadiska urýchlenia analýzy. Kolóna musí obsahovať stacionárnu fázu kompatibilnú so sledovanými analytmi. V súčasnosti sa objavujú mechanicky i chemicky stabilné kolóny so zrnitosťou až pod 2 µm. Tieto však vyžadujú vysoké pracovné tlaky. Analýzy sú potom ale podstatne rýchlejšie a zvyšuje sa aj separačná účinnosť. Zároveň klesajú aj náklady na prevádzku.

V práci boli testované 3 rôzne kolóny:

Kolóna 1, s parametrami: Nucleosil 100-C18, 4,6 x 150 mm, C18, 7 µm (ECOM)

Kolóna 2, s parametrami: Zorbax Eclipse Plus C18, 4,6 x 150 mm, C18, 5 µm (Agilent)

Kolóna 3, s parametrami: Kinetex C18, 4,6 x 150 mm, C18, 2,6 µm, 100 Å (Phenomenex)

Na každú kolónu bola nadávkovaná vzorka štandardu β-karoténu o koncentrácii 100 µl/ml a bola sledovaná kvantitatívna odozva signálu a rýchlosť analýzy. Rovnaké parametre boli sledované aj u reálnej vzorky vyizolovanej od kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* a *Rhodotorula aurantiaca* kultivovaných na kontrolnom glukózovom médiu.

4.5.7 Testovanie metódy LC/MS

Štandarty β-karotén, lykopén a ergosterol boli podrobené analýze na MS detektore (LCQ Advantage Max, Thermo Scientific) v režime MS full scan. Boli pripravené roztoky látok o koncentrácii 100 µg/ml (lykopén, ergosterol) a 250 µg/ml (β-karotén). Hmotnostný detektor bol pripojený on-line ku kvapalinovému chromatografu s detektorom diodového poľa (HPLC/PDA, Thermo Scientific) a príslušný štandard o objeme 20 µl bol separovaný na HPLC kolóne (kap.4.5.6). Ako mobilná fáza bol použitý methanol pre LC/MS.

Analýze boli taktiež podrobené vzorky karotenoidov izolované zo 100 ml kontrolných produkčných médií od kvasiniek *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces roseus* a *Cystofilobasidium capitatum*. Izolácia a extrakcia karotenoidov z týchto vzoriek je popísaná v kapitách 4.5.1 a 4.5.2. Vysušený extrakt bol rozpustený v ethanole pre HPLC, prefiltrovaný cez jednorázový filter a prevedený do mikrocentrifugačnej skúmavky. Pred samotnou analýzou boli vzorky ešte krátko stočené pri otáčkach 5000 ot/min.

Vybrané karotenoidy boli analyzované metódou on-line RP-HPLC/PDA/ESI-MS (Detektor PDA Finnigan Surveyor, Ms detektor LCQ Advantage Max, Termo Finnigan, SW SW Xcalibur). Použitá kolóna, mobilná fáza a chromatografické podmienky sú opísane vyššie. Analýza prebiehala pri prietoku mobilnej fázy 0,8 ml/min, hmotnostné spektrum bolo analyzované ESI ionizáciou v negatívnom móde [50].

5 VÝSLEDKY

5.1 Rastová charakteristika

Stanovenie rastových charakteristík daných mikroorganizmov je dôležité pre analýzu vybraných metabolitov i pre pochopenie fyziológie skúmaných kmeňov kvasiniek. Rastová krivka vyjadrujúca závislosť nárastu biomasy v čase bola prevedená len u kvasinky *Cystofilobasidium capitatum*. Pre jednoduchšie stanovenie množstva sušiny v jednotlivých vzorkách, bola najskôr zostavená kalibračná krivka vyjadrujúca závislosť medzi množstvom sušiny a zákalom rôzne koncentrovaných suspenzií kvasiniek. Rastové charakteristiky ostatných používaných kmeňov kvasiniek boli prevzaté z už prevedených prác.

5.1.1 Kalibračné závislosti narastenej biomasy a zákalu

Kultivácia kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* i postup stanovenia kalibračných závislostí už boli popísané v kapitole 4.4.9. Kalibračná krivka včetně regresnej rovnice je uvedená v grafe 1. Regresné rovnice ostatných používaných kmeňov sú pre porovnanie uvedené v kapitole 4.4.9. Pomocou týchto regresných rovníc boli vyjadrené množstvo vyprodukovanej sušiny jednotlivých kmeňov.

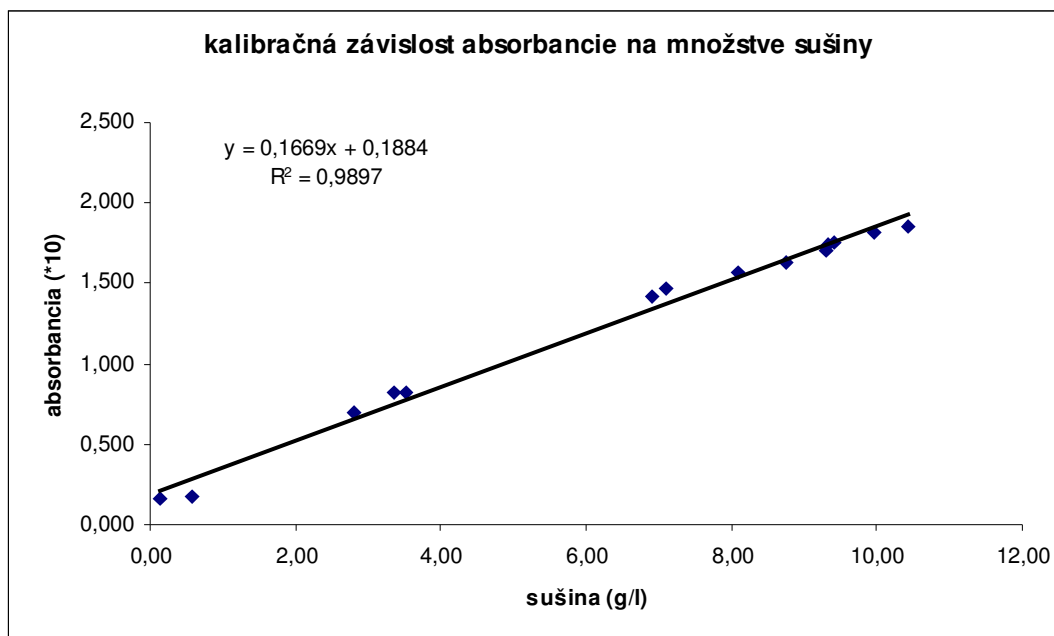
5.1.1.1 Rastová krivka kvasinky *Cystofilobasidium capitatum*

Tabuľka 10: Hodnoty absorbancie a sušiny v závislosti na dobe kultivácie u *C. capitatum*

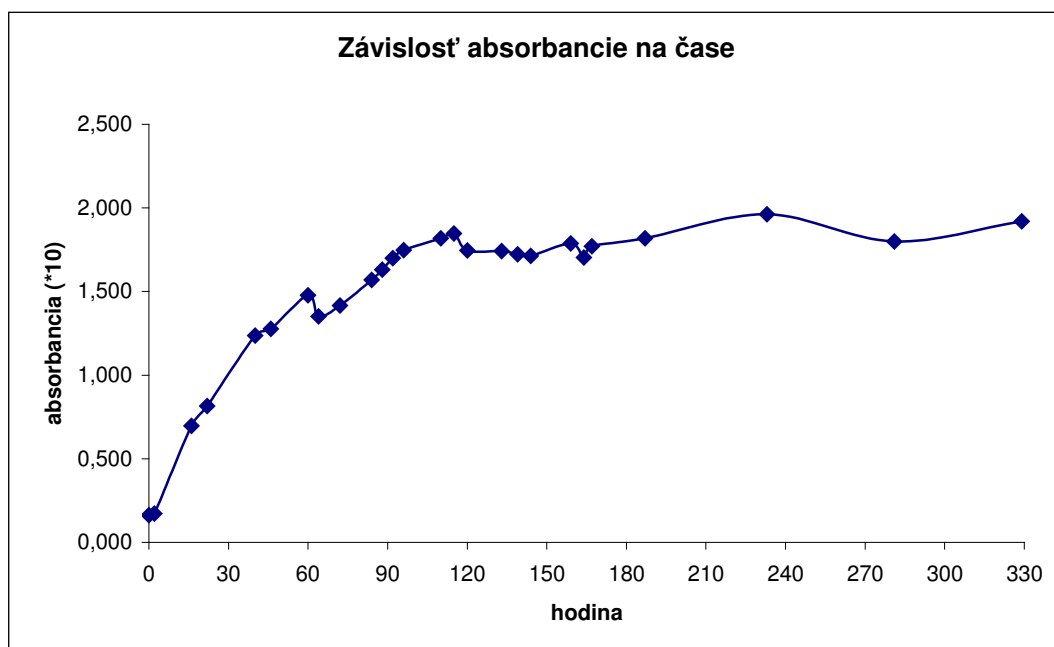
hod	A (*10)	sušina (g/l)
0	0,162	0,130
2	0,172	0,570
16	0,697	2,820
22	0,815	3,370
40	1,236	5,090
46	1,276	5,250
60	1,478	6,900
64	1,352	5,840
72	1,416	6,900
84	1,570	8,100
88	1,630	8,740
92	1,700	9,310
96	1,748	9,400
110	1,818	9,950
115	1,848	10,440
120	1,746	8,720
133	1,742	9,330
139	1,722	9,710
144	1,714	11,130
159	1,788	8,390
164	1,704	—
167	1,770	—
187	1,818	—
233	1,962	—

281	1,800	—
329	1,920	—

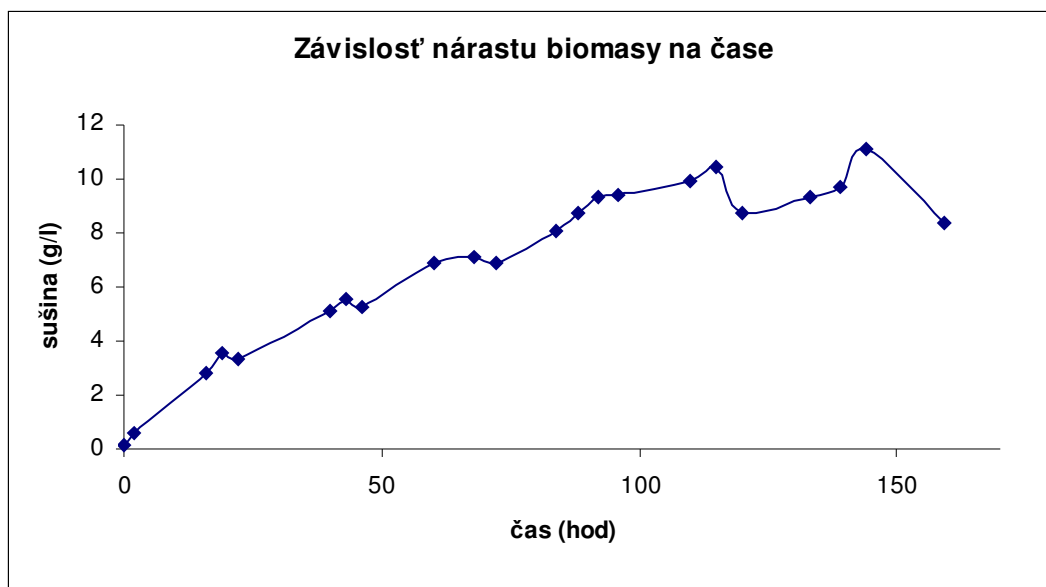
Od 164 hodiny sa už neodoberalo 10 ml na stanovenie sušiny, ani 100 ml na stanovenie karotenoidov, len 1 ml na stanovenie zákalu.



Graf 1: Kalibračná krivka kvasinky *Cystofilobasidium capitatum*



Graf 2: Závislosť absorbancie na dobe kultivácie kvasinky *C. capitatum*



Graf 3: Závislosť nárastu biomasy na dobe kultivácie

Z grafov 2 a 3 vidieť, že rastová krivka *Cystofilobasidium capitatum* vykazuje dvojestupňový nárast, ako je to typické pre karotenogénne kvasinky [10, 54]

Prvé mierne maximum sa nachádza okolo 60. hodiny, kde karotenogénne kvasinky plynule prechádzajú do stacionárnej fázy, avšak u *Cystofilobasidium capitatum* rast pokračuje exponenciálne ďalej. Druhé maximum dosahuje okolo 110. hodiny, následne rast prechádza do stacionárnej fázy. Z grafu je vidieť, že *C. capitatum* má dlhší rast než iné karotenogénne kvasinky študované v predchádzajúcich prácach [10, 53, 54].

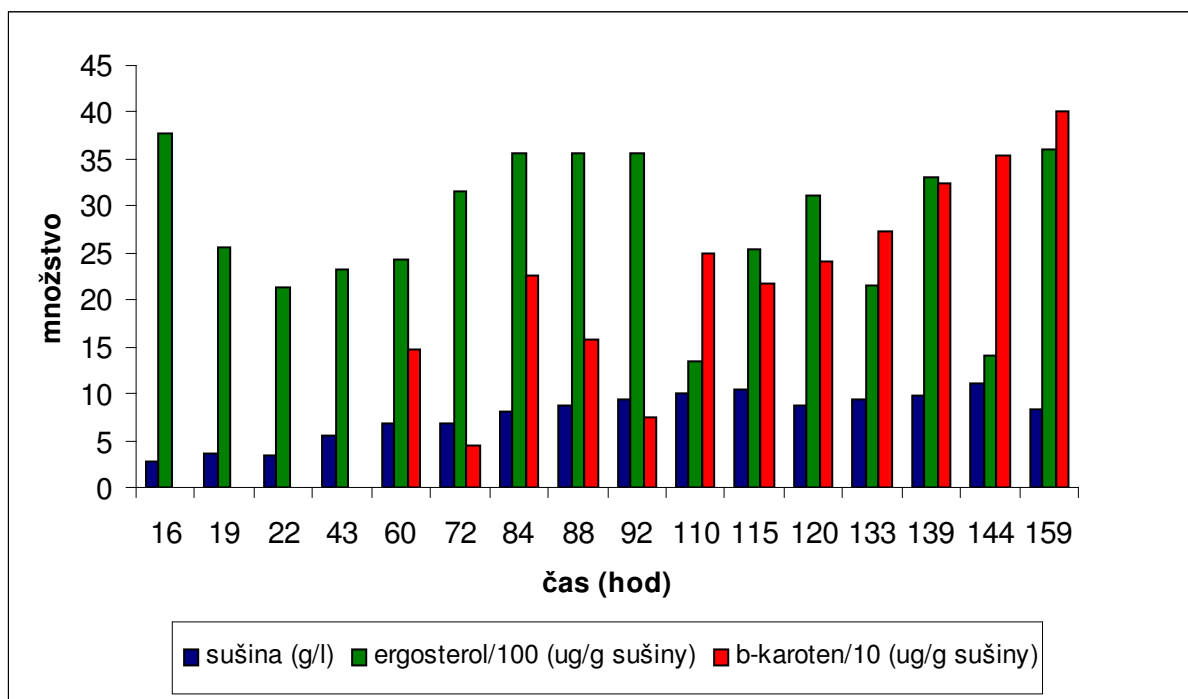
5.1.2 Produkcia karotenoidov v priebehu rastu kvasinky *Cystofilobasidium capitatum*.

V priebehu rastu kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* bol okrem nárastu sušiny a zákalu sledovaný aj obsah β -karoténu a ergosterolu. Produkcie týchto metabolitov sú uvedené v tabuľke 11 a grafe 4. Analýza prebiehala metódou HPLC s UV/VIS detekciou (kap. 4.5.3) so separáciou analytov na kolóne Biospher C18 (4,6 x 150 nm, C18, 7 μ m).

Tabuľka 11: Množstvá vyprodukovaných metabolitov v čase u *C. capitatum*

hod	sušina (g/l)	β -karotén (ug/g suš.)	ergosterol (ug/g suš.)
16	2,82	—	3770,142
19	3,52	—	2549,181
22	3,37	—	2128,130
43	5,57	—	2320,648
60	6,90	146,870	2422,061
72	6,90	45,771	3149,394
84	8,10	225,054	3569,283
88	8,74	158,792	3565,602
92	9,31	75,653	3560,568
110	9,95	248,824	1346,797

115	10,44	216,712	2547,687
120	8,72	241,440	3103,956
133	9,33	272,641	2149,793
139	9,71	323,988	3306,030
144	11,13	354,605	1411,059
159	8,39	400,509	3596,887

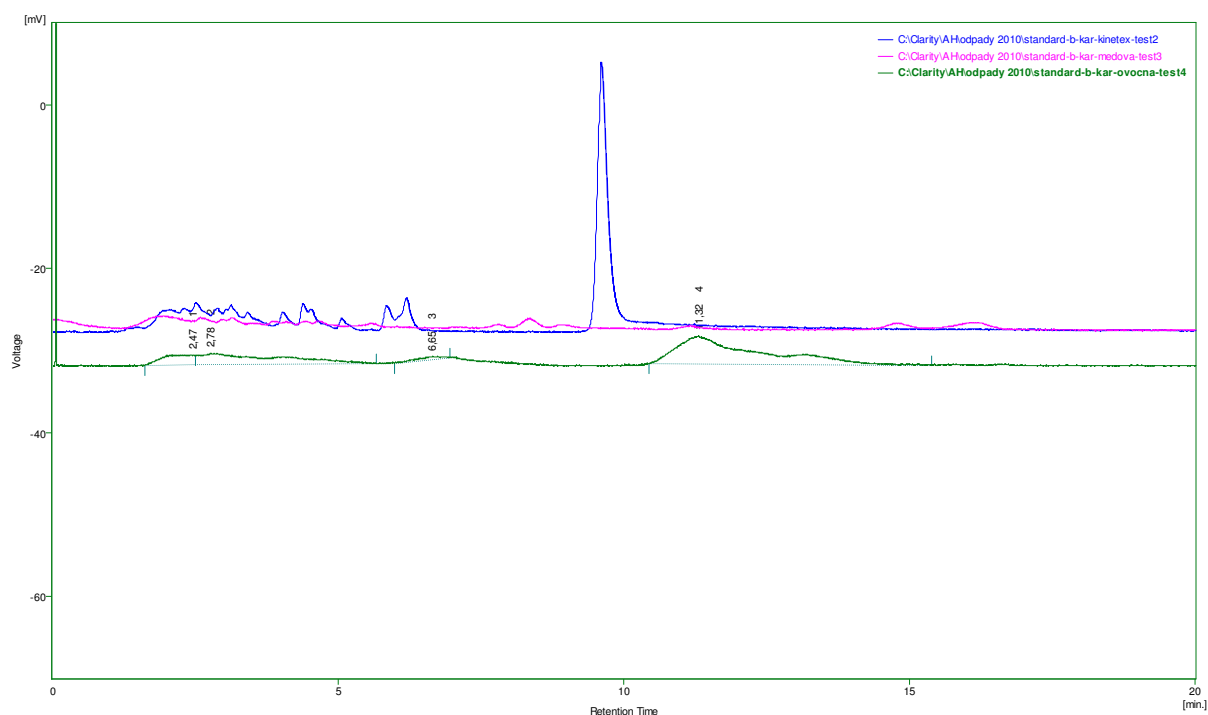


Graf 4: Produkcia β -karoténu a ergosterolu v závislosti na čase u *C. capitatum*

Hlavným sledovaným pigmentom je β -karotén s prvým maximom v 60. hodine kultivácie. Jeho množstvo výrazne narastá i v 84. a neskôr v 110. hodine kultivácie, teda v druhom maxime sledovaného rastu. Zvýšené množstvá β -karoténu môžeme tiež pozorovať najmä v stacionárnej fáze rastu. Maximá produkcie pigmentov sa prakticky prekrývajú s maximami produkcie biomasy. U ergosterolu vidíme nárast produkcie hlavne od 72. do 92. hodiny, teda v druhej časti exponenciálnej fázy. Občasné maximá je možné vidieť aj počas stacionárnej fázy rastu.

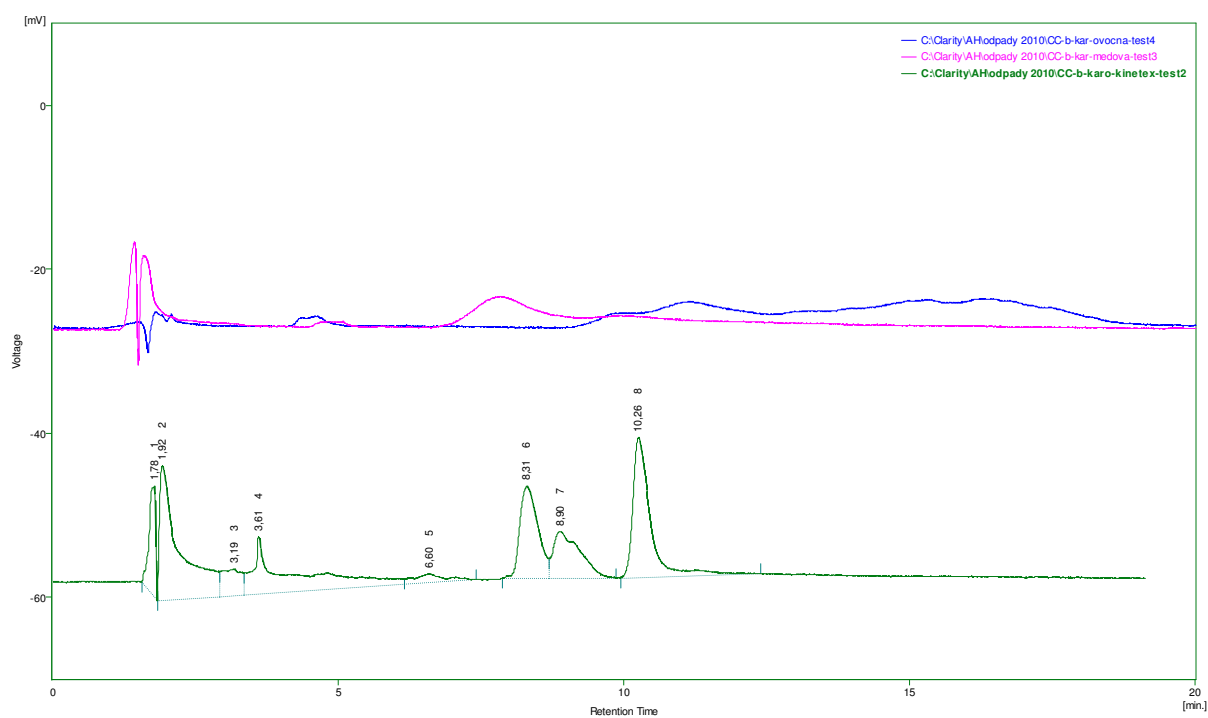
5.2 Optimalizácia podmienok analýzy karotenoidov - výber vhodnej chromatografickej kolóny

V rámci optimalizačných experimentov boli testované tri rôzne kolóny Nucleosil, Zorbax a Kinetex pri chromatografických podmienkach popísaných v kapitole 4.5.6. Na každú z nich bol nadávkovaný štandard β -karoténu a reálna vzorka izolovaná z produkčného média kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* a *Rhodotorula aurantiaca*.

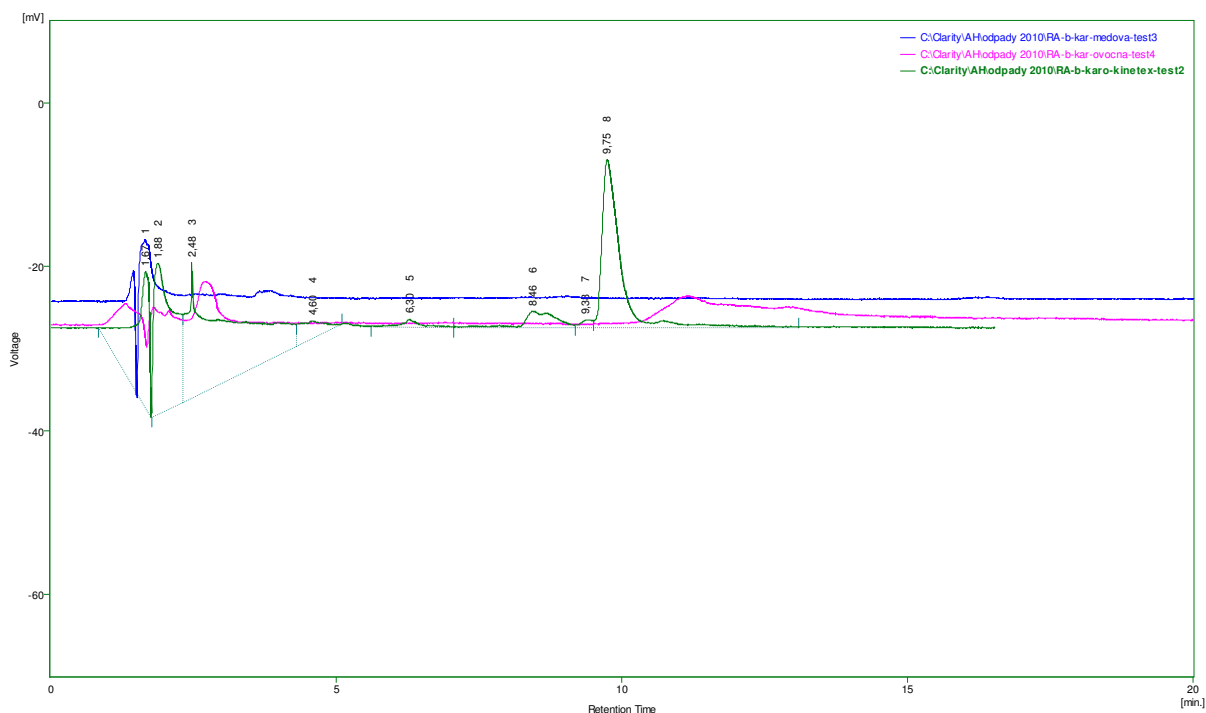


Graf 5: Chromatogramy 100 µl/ml β -karoténu nameraných na troch testovaných kolónach

Z grafu vidíme, že štandard β -karoténu nameraný na kolóne 2 (ružový chromatogram, kolóna Zorbax) má najdlhší retenčný čas a minimálnu kvantitatívnu odozvu signálu. Naproti tomu štandard nameraný na kolóne 3 (modrý chromatogram, kolóna Kinetex) má najkratší retenčný čas a odozva signálu je výrazne vyššia v porovnaní s ostatnými odozvami z testovaných chromatografických kolôn.



Graf 6: Chromatogramy vzorky extraktu karotenoidov od *C. capitatum* nameraných na troch testovaných kolónach



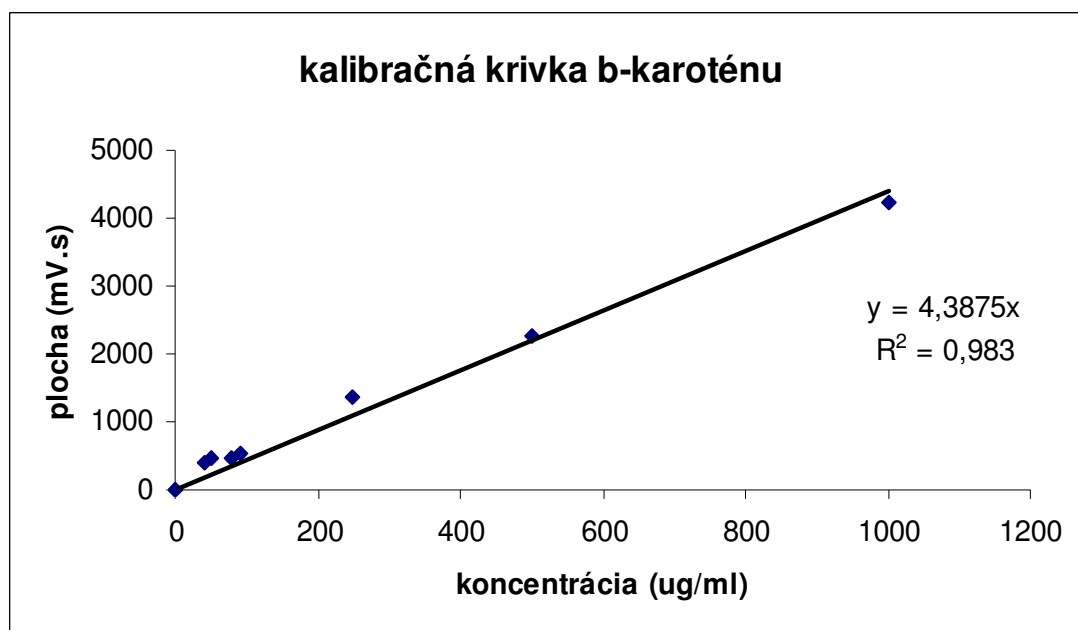
Graf 7: Chromatogramy extraktu karotenoidov od *R. aurantiaca* nameraných na troch testovaných kolónach

Z grafu číslo 6 a 7 vidíme, že β -karotén vyizolovaný z reálnej vzorky kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* a *Rhodotorula aurantiaca* kultivovaných na glukózovom médiu mal najväčšiu odozvu signálu a najkratší retenčný čas opäť na tretej testovanej kolóne – Kinetex C18 (zelený chromatogram). Táto kolóna bola teda vyhodnotená ako najlepšia z testovaných a použitá pri všetkých ďalších analýzach β -karoténu, lykopénu a ergosterolu z prevedených následných kultivačných sérií.

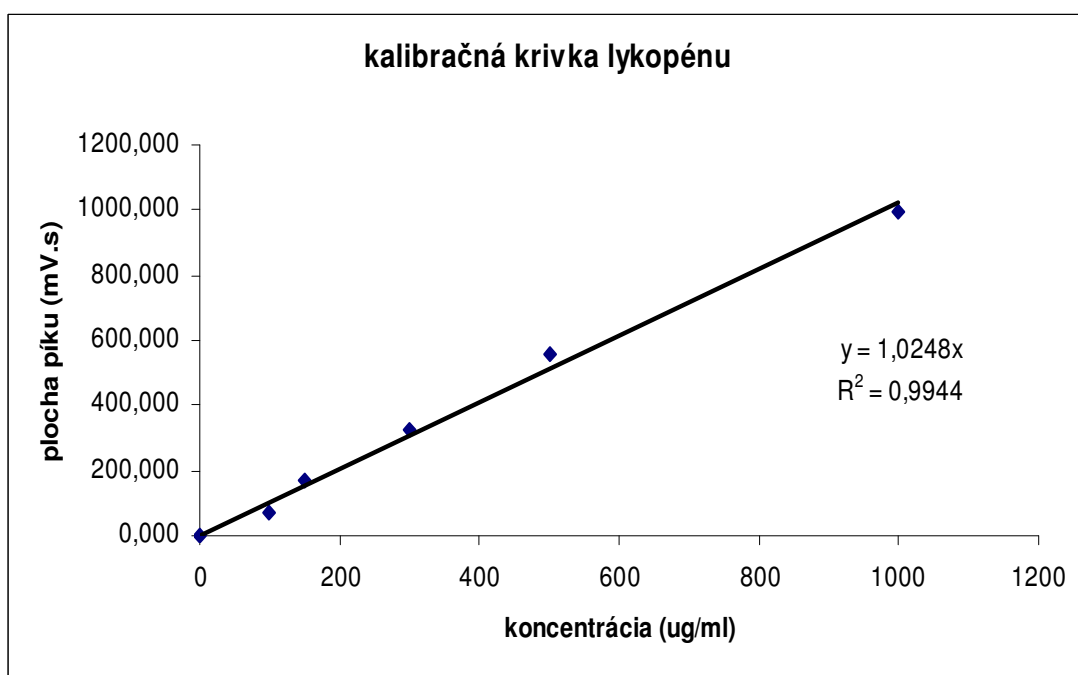
Kolóna Kinetex C18 (Phenomenex) patrí k najnovším typom chromatografických kolón a podľa parametrov výrobcu predstavuje prechod medzi klasickou HPLC a UHPLC. Od klasických HPLC kolón sa líši najmä zrnitím ($2,6\ \mu\text{m}$) a kvalitou stacionárnej fázy. Separačné podmienky a identifikácie jednotlivých pigmentov boli v poslednej časti práce verifikované vo vybraných vzorkách aj metódou on-line LC-MS (kap.5.6).

5.2.1 Kalibračné krivky karotenoidov a ergosterolu

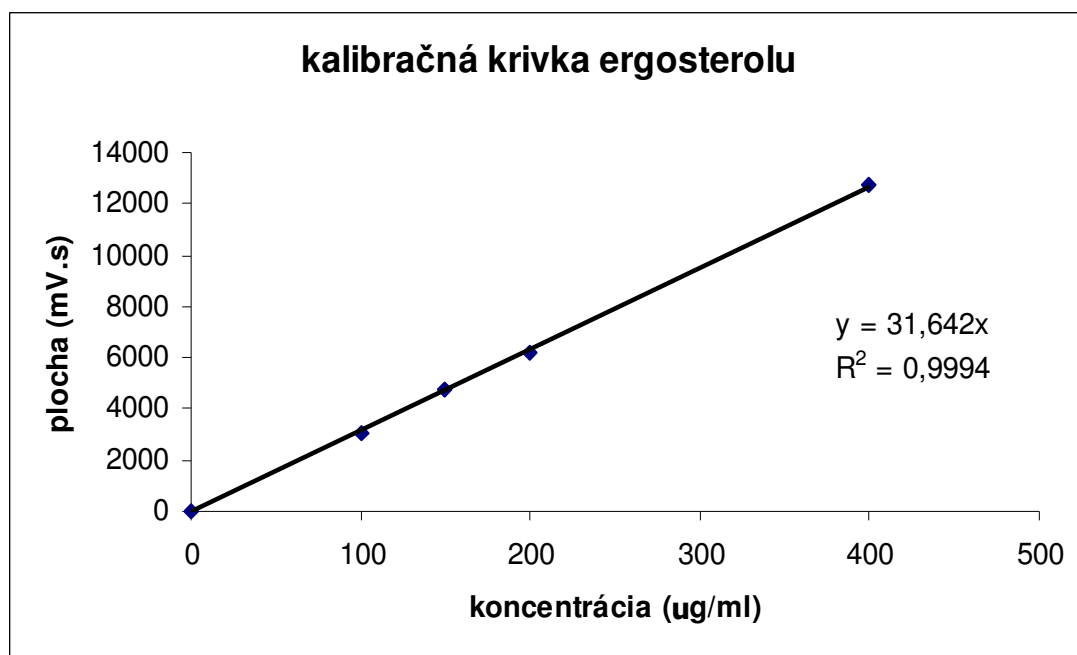
Pred samotnou analýzou β -karoténu, lykopénu a ergosterolu boli na kolóne Kinetex C18 najskôr namerané kalibračné krivky. Príslušný štandard (1 mg) bol rozpustený v 1 ml metanolu. Z tohto zásobného roztoku bola následne pripravená koncentračná rada a premeraná metódou HPLC pri podmienkach opísaných v kapitole 4.5.4. Zo získaných plôch pík bola zostavená kalibračná krivka použitá pri výpočte obsahu daného karotenoidu alebo ergosterolu v analyzovaných vzorkách.



Graf 8: Kalibračná krivka β -karoténu



Graf 9: Kalibračná krivka lykopénu



Graf 10: Kalibračná krivka ergosterolu

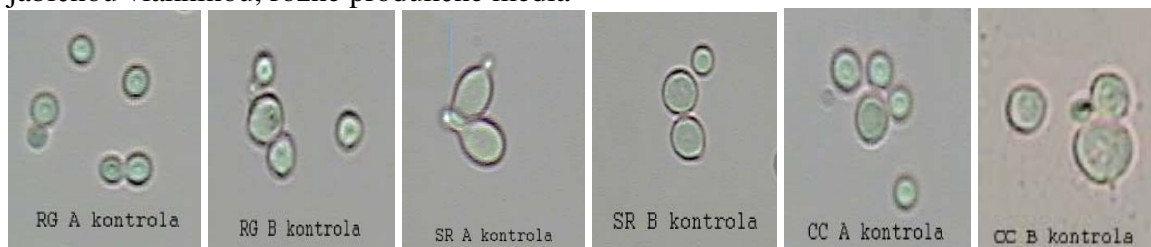
5.3 Morfologické a rastové charakteristiky študovaných kvasiniek

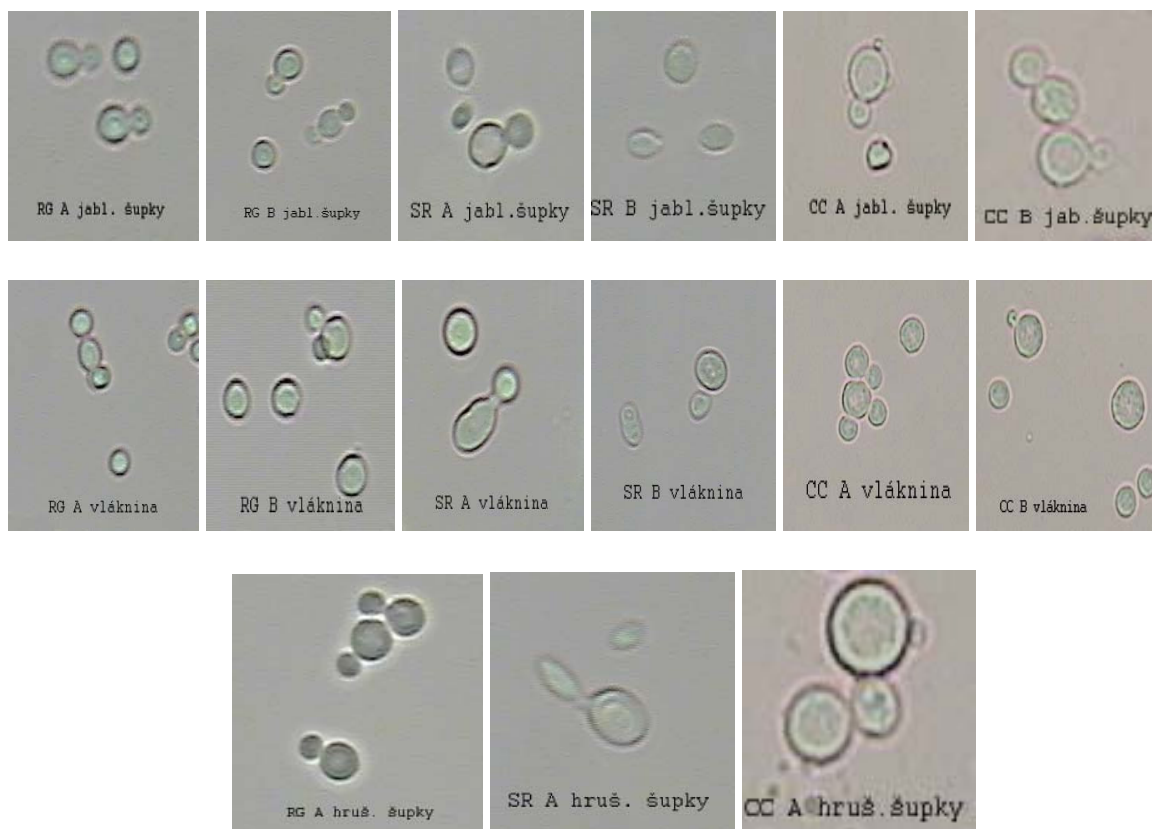
Pre túto prácu boli použité kmene kvasiniek: *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-33, *Cystofilobasidium capitatum* CCY 10-1-1 a *Sporobolomyces roseus* CCY 19-6-4.

5.3.1 Pozorovanie morfologických zmien používaných kmeňov v kultivačných sériách 1-4 na rôznych produkčných médiách

V danej kultivácii boli pozorované morfologické charakteristiky kmeňov *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces roseus* a *Cystofilobasidium capitatum* kultivovaných v rovnakých podmienkach a na rovnakých substrátoch používaných ako živné médiá. Kultivácia prebehla súčasne so všetkými tromi kmeňmi a boli testované produkčné médiá, ktoré obsahovali rôzne odpadové materiály.

⇒ (séria 1) Inokulum I základné, inokulum II A s kvasničným autolyzátom, inokulum II B s jablčnou vlákninou, rôzne produkčné médiá





Obrázok 11: Morfológia buniek z prvej série rôznych produkčných médií

Podľa mikroskopického pozorovania môžeme vidieť, ako sa správali jednotlivé študované kvasinkové kmene na rovnakých produkčných médiách. Tvary buniek v kontrolných médiách A nevykazujú žiadne zvláštnosti vo svojich morfológických tvaroch. Avšak už v kontrolných médiách B, kde inokulum II obsahovalo jablčnú vlákninu, môžeme pozorovať u kvasinky *Sporobolomyces roseus* guľatý tvar namiesto obvyklého oválneho tvaru, taktiež u kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* je zrejmá určitá deformácia buniek, čo bude pravdepodobne zapríčinené vplyvom niektorej zložky z vlákniny, ktorá pôsobí ako stresový faktor. Stresové prostredie môžeme pozorovať takmer vo všetkých médiách okrem kontroly (jablčné šupky, hruškové šupky, jablčná vláknina) u kvasinky *Sporobolomyces roseus*. Bunky sú tu malé až zakrpatené, v médiu s hruškovými šupkami vyzerajú ako stlačený elipsoid. Kvasinka *Rhodotorula glutinis* nevykazuje výrazné odlišnosti v jednotlivých médiách, zdá sa že rástla skoro bezproblémovo v každom produkčnom médiu s prídavkom odpadu. U *Cystofilobasidium capitatum* je to podobné, avšak mierne zvrásnenia buniek pozorujeme v produkčných médiách s prídavkom jablčnej vlákniny a v médiách, kde inokulum II obsahovalo taktiež prídavok jablčnej vlákniny.



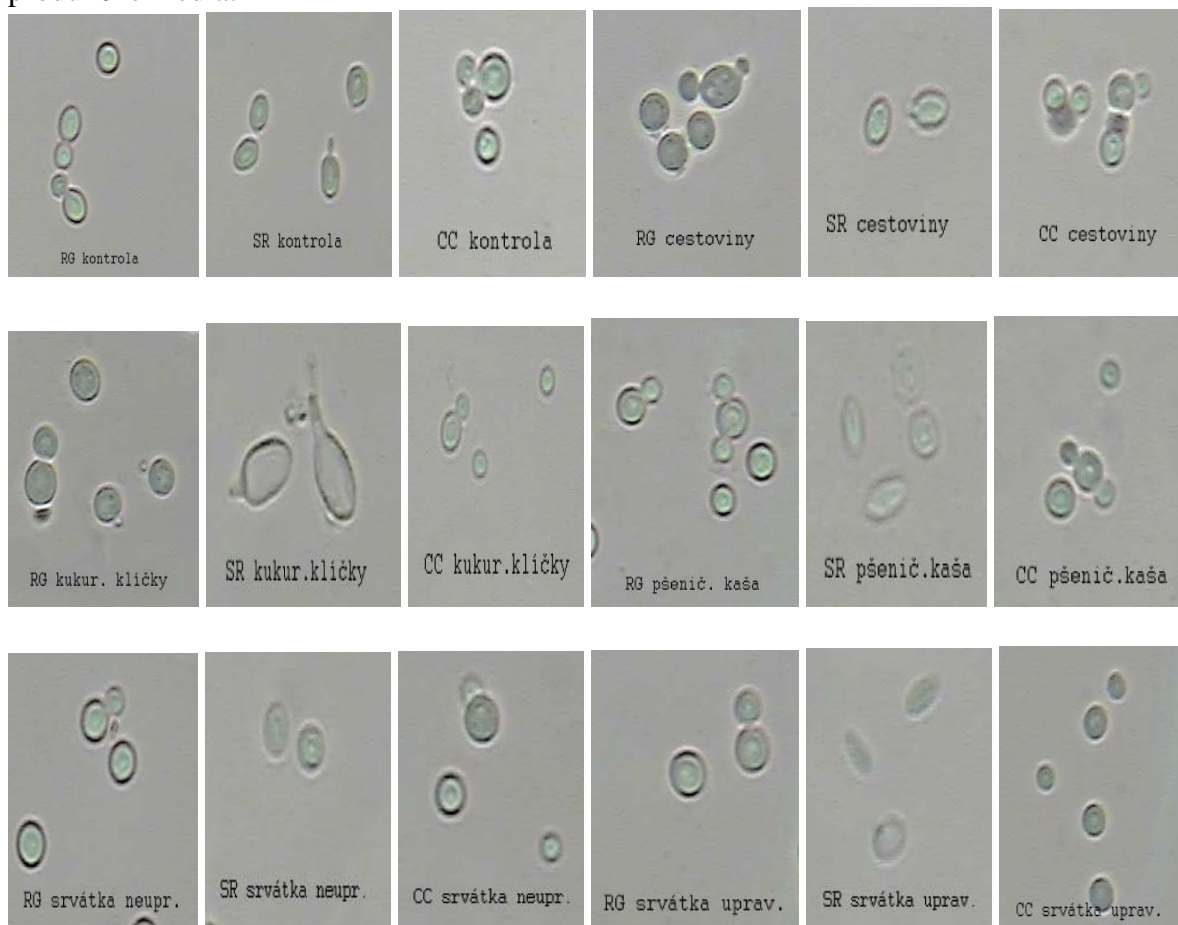




Obrázok 12: Zmeny v zafarbení rôznych produkčných médií série 1

Na daných obrázkoch je vidieť odlišné zafarbenie pridukčných médií. Prevláda tu oranžovo-ružové zafarbenie. Produkčné média s odpadným substrátom sú výrazne bledšie oproti kontrolnému médiu najmä u kvasinky *Cystofilobasidium capitatum*. Média s prídavkom jablčnej vlákniny sú často zafarbené dohneda. Táto tmavá farba zakrýva skutočné zafarbenie médií u všetkých troch študovaných kmeňov kvasiniek. U *Rhodotorula glutinis* a najmä u kvasinky *Sporobolomyces roseus* sú média s obsahom jablčných šupiek jemne naružovelé. Farby odpovedajú zrejme prípadným zmenám v štruktúre a distribúcii pigmentov.

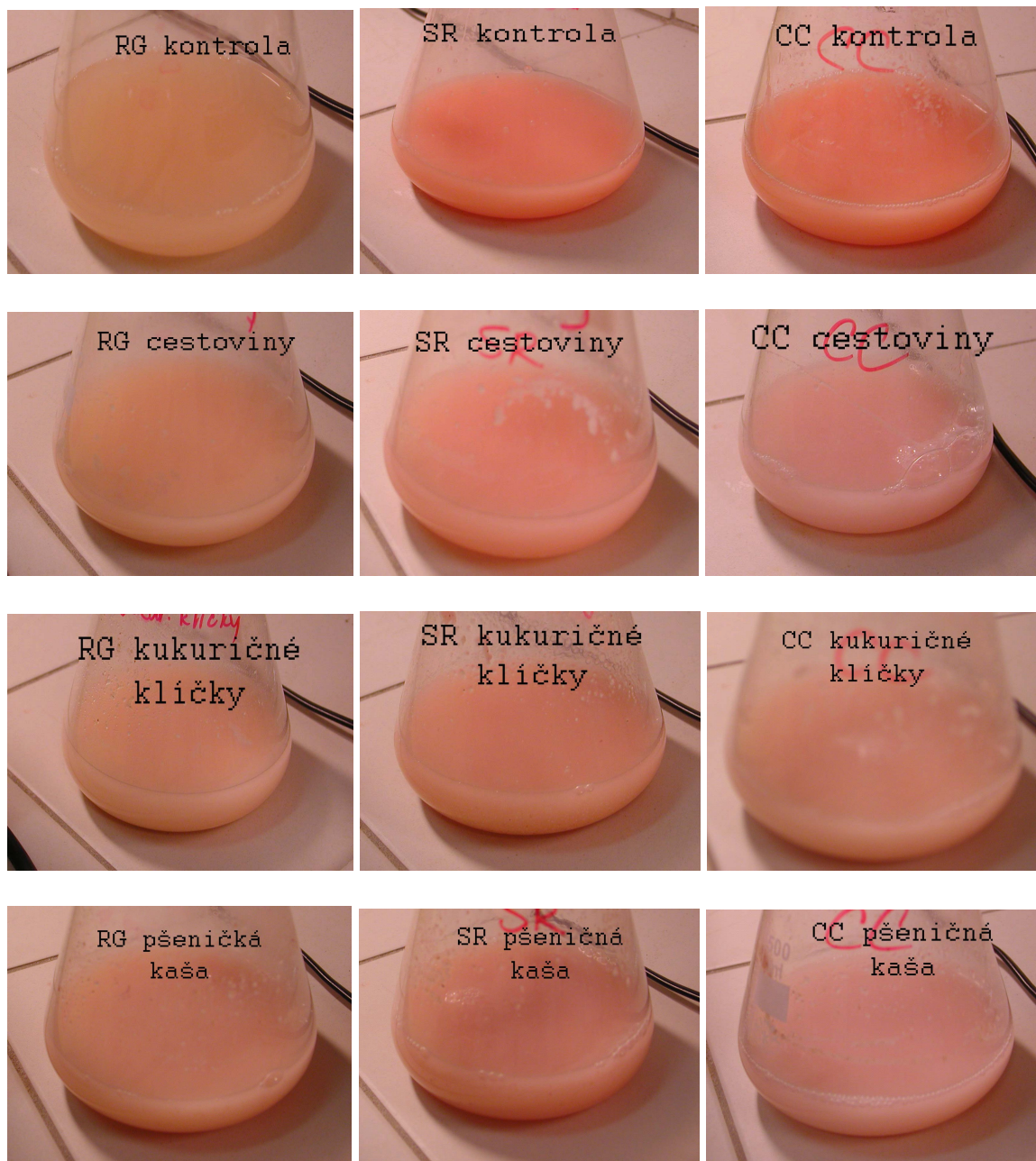
⇒ (séria 2) Inokulum I základné, inokulum II základné s kvasničným autolýzátom, rôzne produkčné médiá:



Obrázok 13: Morfológia buniek z druhej série produkčných médií

Najvýraznejšie zmeny v tvaroch buniek môžeme pozorovať u kvasinky *Sporobolomyces roseus*, kde u všetkých produkčných médií s prídavkom odpadného substrátu sú bunky

výrazne stresované. V médiu s upravenou srvátkou a pšeničnou kašou sú bunky úzke, zmenšené a bledé. V médiu s kukuričnými klíčkami dokonca chýba aj charakteristické zafarbenie obsahu bunky pozorované pod mikroskopom. U kvasinky *Rhodotorula glutinis* v médiu s obsahom srvátky vidíme okrúhly tvar buniek namiesto mierne oválneho pozorovaného v kontrolnom médiu, čo môže nasvedčovať určitému stresovému prostrediu. V ostatných médiách s prídavkom odpadného substrátu nepozorujeme zrejmé odlišnosti, rovnako ako ani v médiách u kvasinky *Cystofilobasidium capitatum*.

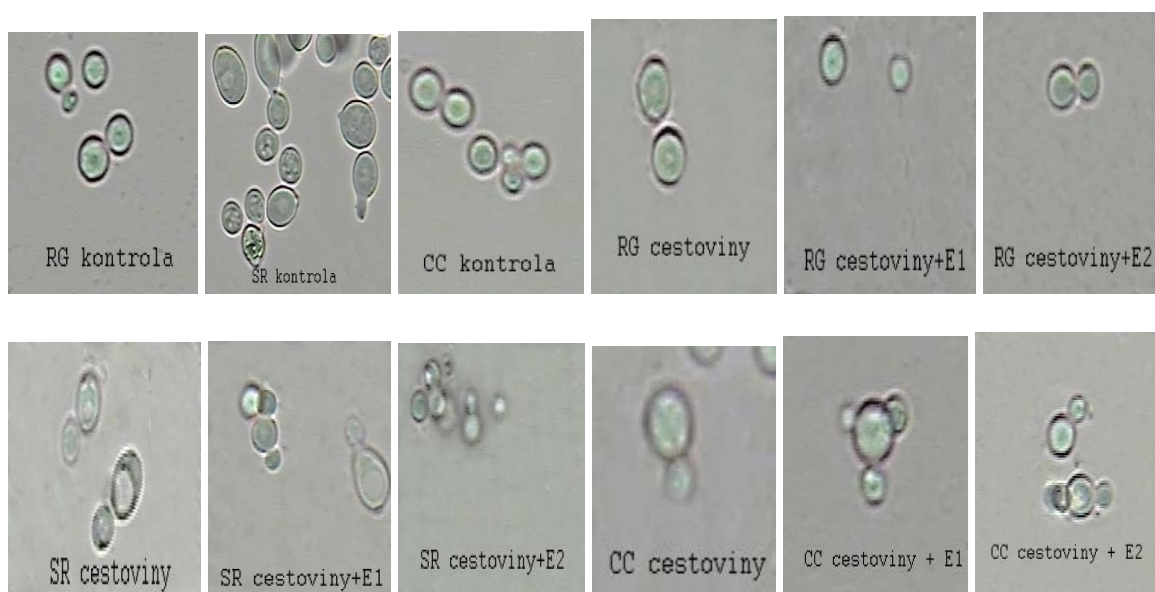


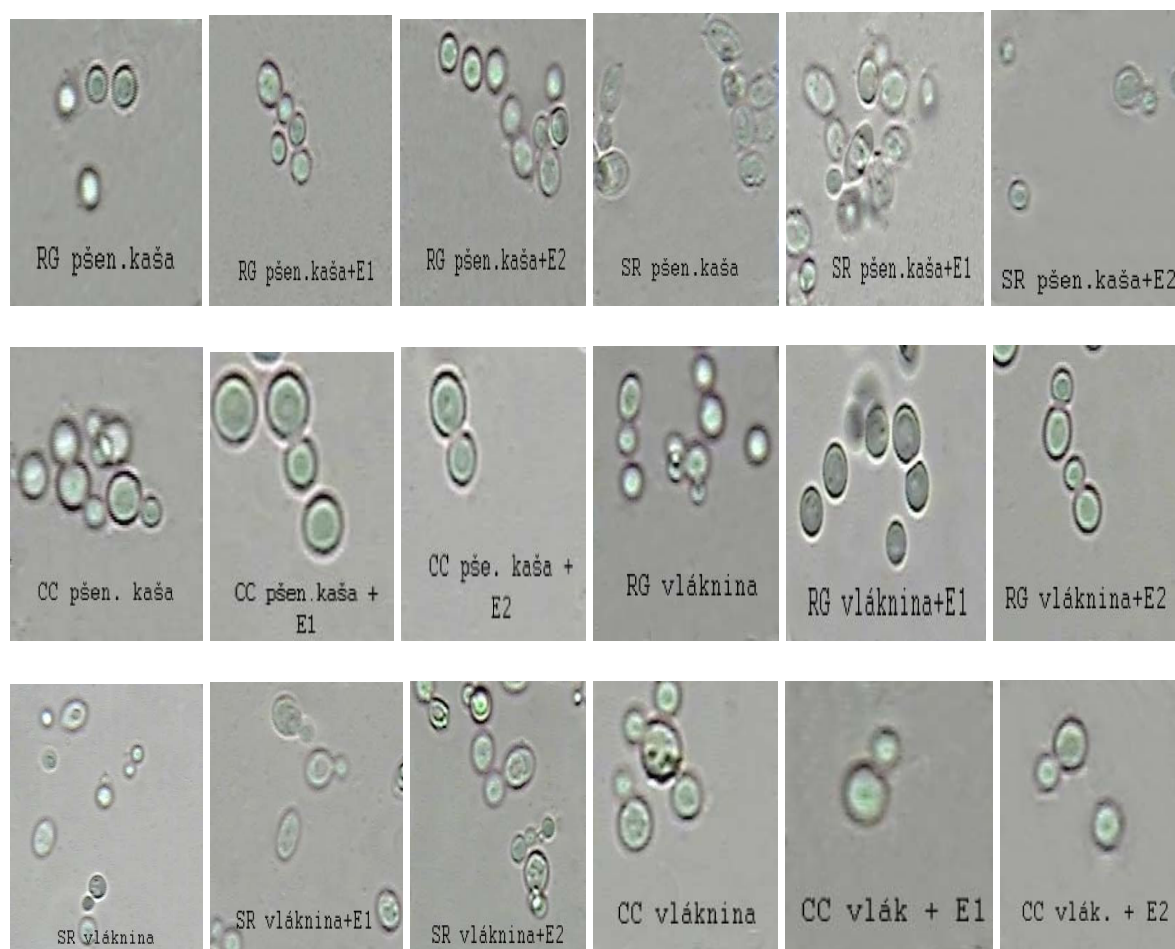


Obrázok 14: Zmeny v zafarbení rôznych produkčných médií série 2

V zafarbení produkčných médií s prídavkom odpadného substrátu prevláda slabé ružové zafarbenie, ktoré je však bledšie než v ružovo-oranžovom kontrolnom médiu. V médiách s prídavkom srvátky je vidieť zaujímavú výraznú ružovú farbu. Srvátka zrejme pôsobí ako zložka média, ktorá je schopná indukovať produkciu pigmentov v kvasinkových bunkách. V médiách kvasinky *Rhodotorula glutinis* vidíme bledé oranžové zafarbenie u všetkých produkčných médií odlišujúce sa od ostatných médií so študovanými kvasinkami. Táto odlišnosť je spôsobená neplánovaným výpadkom osvetlenia v neznámej dobe počas 80-hodinovej kultivácie v produkčných médiách práve tohto kmeňa. Z týchto obrázkov vyplýva, aké sú dôležité vonkajšie podmienky kultivácie, a že akákoľvek zmena môže danú kultiváciu zmeniť buď negatívne alebo pozitívne.

⇒ (séria 3) Inokulum I základné, inokulum II základné s kvasničným autolyzátom, rôzne produkčné médiá, niektoré s prídavkom enzýmového preparátu 1 alebo 2:

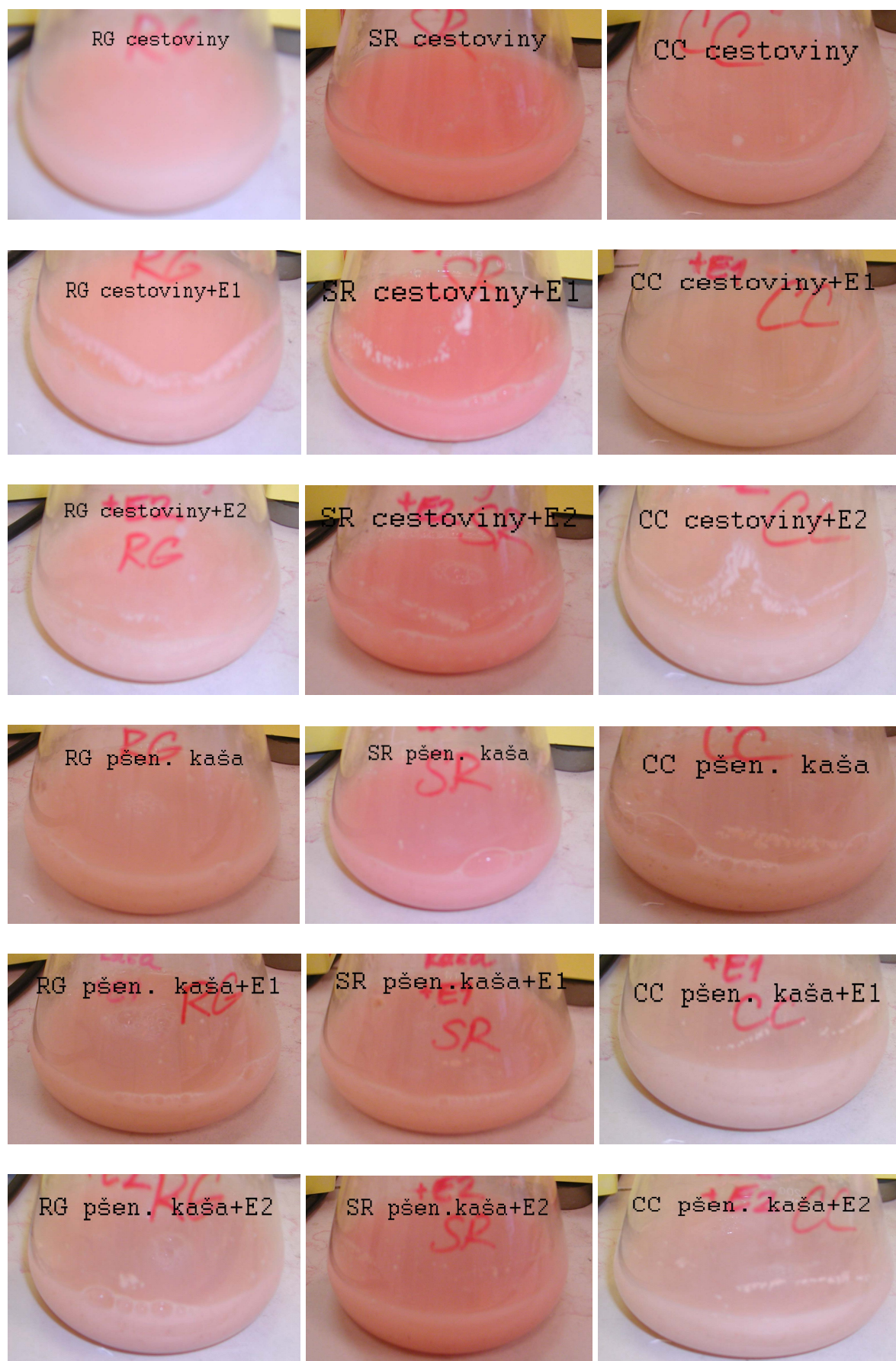


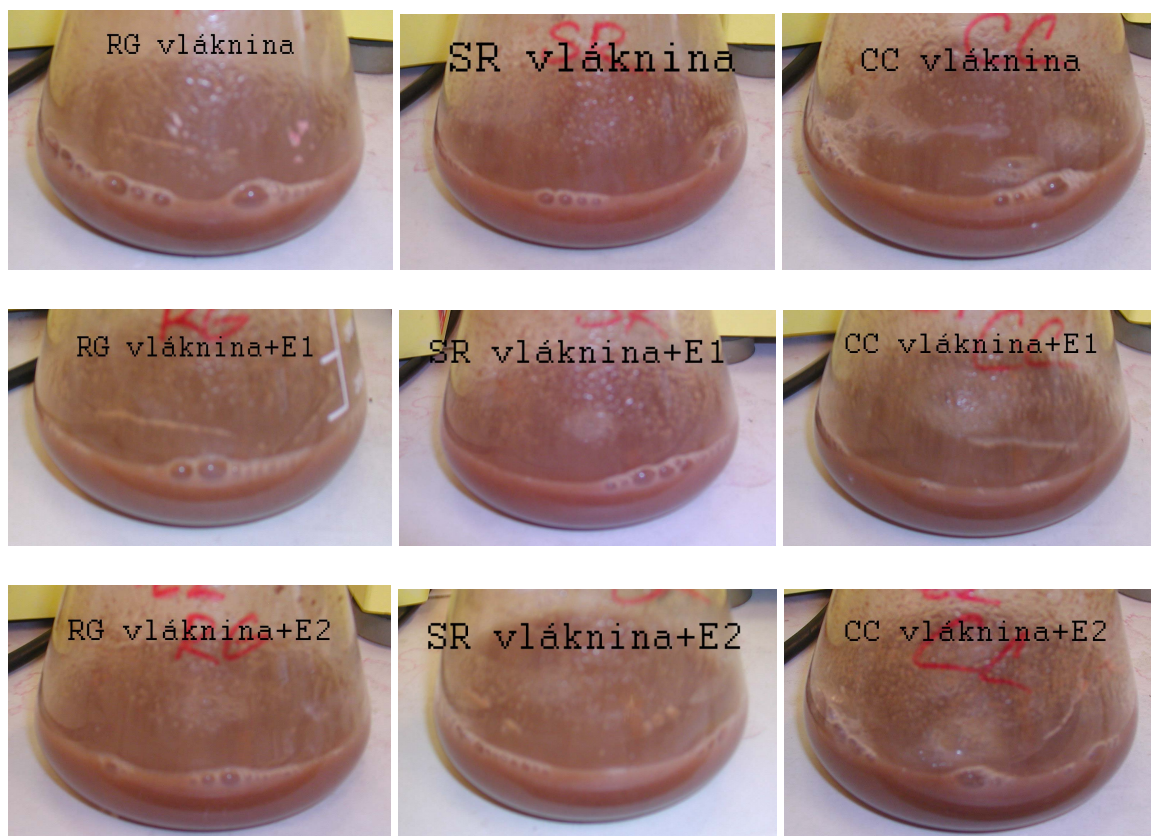


Obrázok 15: Morfológia buniek z tretej série produkčných médií

Rovnako ako aj v druhej sérii, najväčšie stresové prostredie je zrejmé u kvasinky *Sporobolomyces roseus*. Bunky v nehydrolyzovaných médiách sú malé, úzke, niektoré veľmi bledé bez charakteristického zafarbenia pod mikroskopom. Avšak v produkčných médiách s prídavkom enzýmového preparátu 2 od plesne *Fusarium solani*, môžeme pozorovať určité zlepšenie v tvaroch buniek oproti nehydrolyzovanému médiu. V médiách s enzýmovým preparátom 1 od plesne *Alternaria alternata* sú bunky podobne stresované ako v nehydrolyzovaných médiách, I keď v médiách s cestovinami a pšeničnou kašou je vidieť mierne zlepšenie v morfológii buniek. U kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* nie sú pozorované až také výrazné zmeny v morfológii buniek ako u *Sporobolomyces roseus*, bunky sú guľaté a pučiace vo všetkých médiách. V produkčnom médiu s cestovinami sú najvýraznejšie bunky v médiu s prídavkom enzýmového preparátu 2 oproti nehydrolyzovanému médiu, kde sú bunky bledé, oválnejšie, akoby bez správneho vnútorného turgoru.





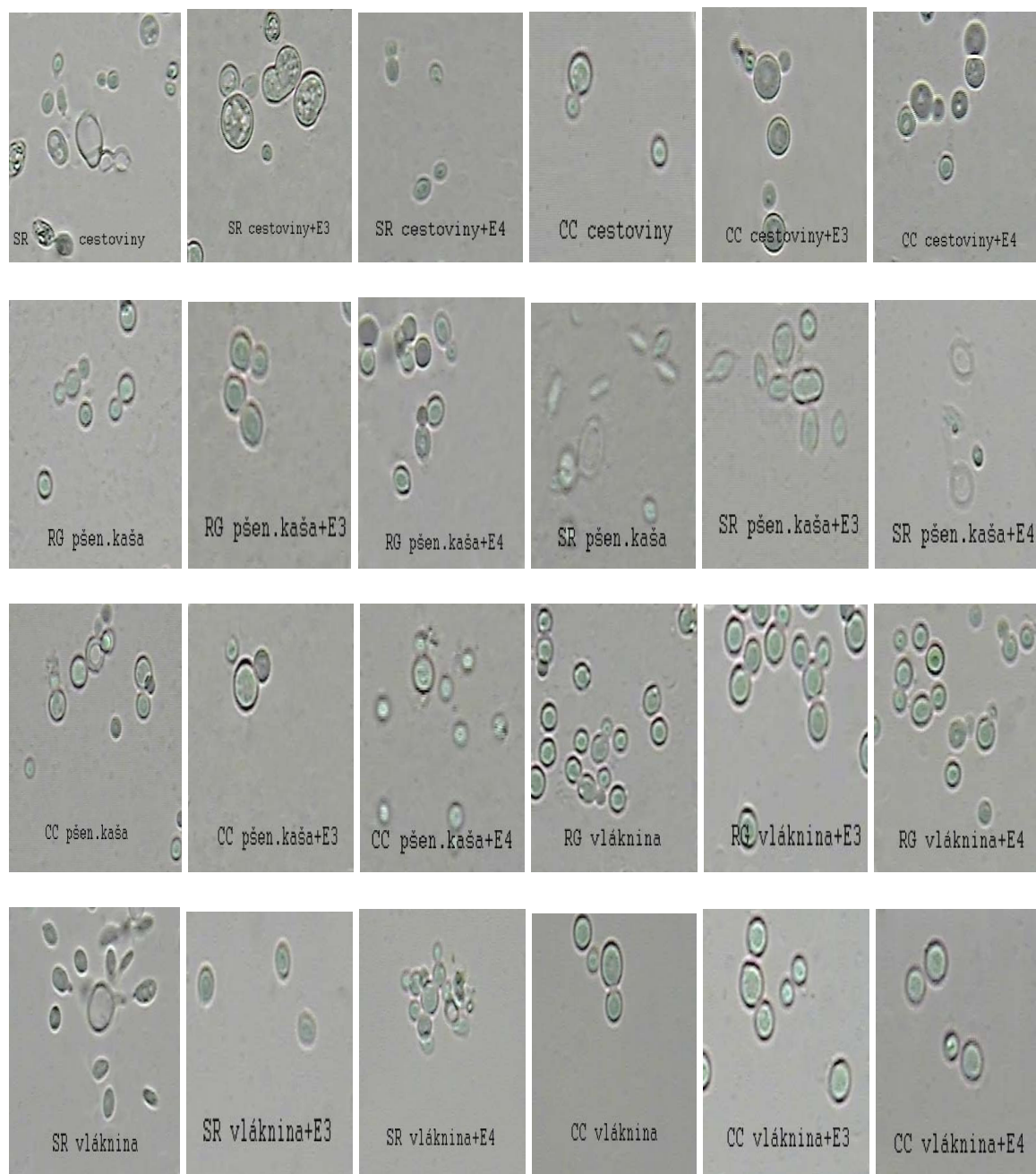


Obrázok 16: Zmeny v zafarbení rôznych produkčných médií série 3

Zmeny v zafarbení sú viditeľné takmer v každom produkčnom médiu, okrem médií s prídavkom vlákniny, kde hnedé sfarbenie opäť pokrýva pôvodnú farbu média. Kontrolné média u všetkých troch študovaných kmeňov majú oranžové zafarbenie. V médiách s prídavkom cestovín a pšeničnej kaše môžeme pozorovať naozaj rôznorodé sfarbenie. U kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* sú nehydrolyzované média vždy o niečo tmavšie než média s prídavkom enzýmového preparátu. U kvasinky *Sporobolomyces roseus* je to však iné. Tu je tmavšie sfarbenie pozorovateľné v médiách hydrolyzovaných pomocou enzýmového preparátu 2, v ktorých bola pozorovaná aj lepšia morfológia buniek. V médiách s prídavkom cestovín, či už v nehydrolyzovanom alebo v hydrolyzovaných, mala kvasinka *Rhodotorula glutinis* bledé ružové zafarbenie, ako aj v médiu s pšeničnou kašou hydrolyzovanou enzýmovým preparátom 2. V médiu s pšeničnou kašou a kašou hydrolyzovanou enzýmovým preparátom 1 pozorujeme najtmavšie zafarbenie oproti ostatným médiám s prídavkom odpadných substrátov u *Rhodotorula glutinis*, vynímajúc médiá s vlákninou.

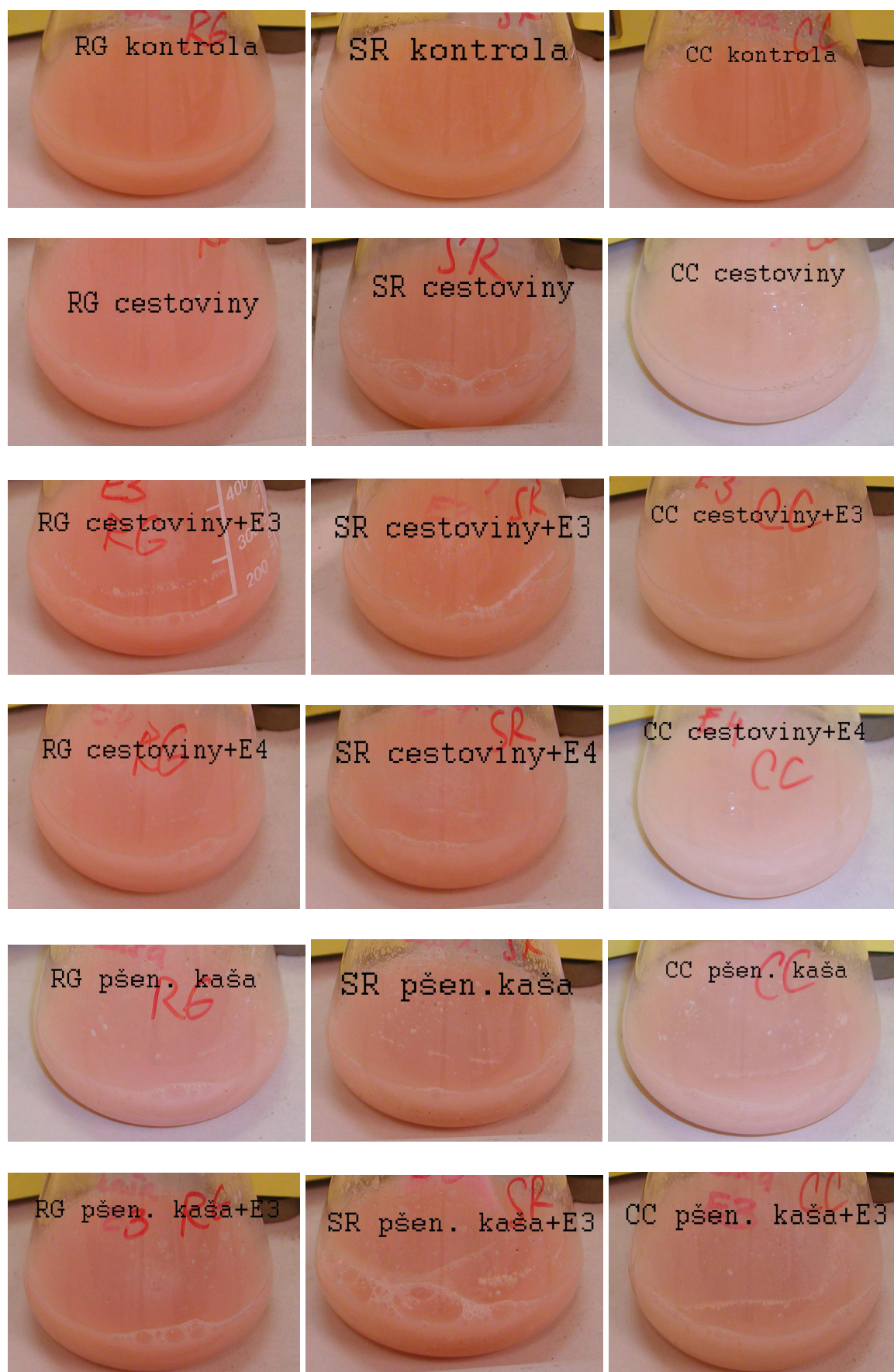
⇒ (séria 4) Inokulum I základné, inokulum II základné s kvasničným autolýzátom, rôzne produkčné médiá, niektoré s prídavkom enzýmového preparátu 3 alebo 4:

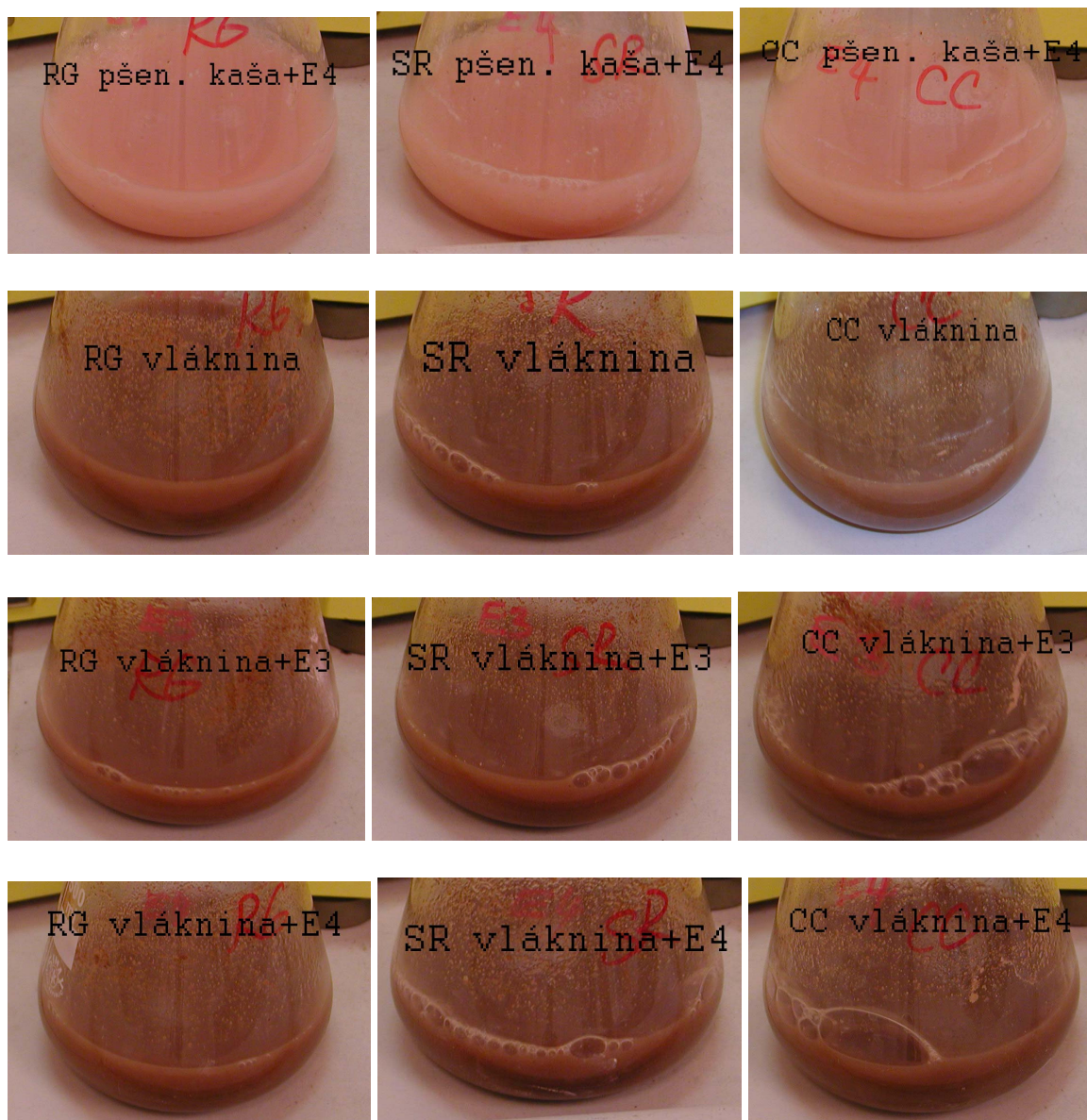




Obrázok 17: Morfológia buniek zo štvrtej série produkčných médií

V hydrolyzovaných médiách pomocou enzýmového preparátu 3 od kvasinkového mikroorganismu *Aureobasidium pullulans* môžeme pozorovať morfológiu buniek najviac podobnú kontrolnému médiu u kvasinky *Sporobolomyces roseus*, a to najmä v hydrolyzovaných médiách s prídavkom cestovín a pšeničnej kaše. Takáto podobnosť s bunkami kontrolného média nebola pozorovaná v žiadných hydrolyzovaných médiách pomocou ostatných používaných enzýmových preparátov. Úspešnosť enzýmového preparátu 3 je pozorovateľná aj na bunkách *Cystofilobasidium capitatum* v médiu s hydrolyzovanou pšeničnou kašou. U kvasinky *Rhodotorula glutinis* nepozorujeme výrazné odlišnosti v morfológii buniek v jednotlivých médiách.





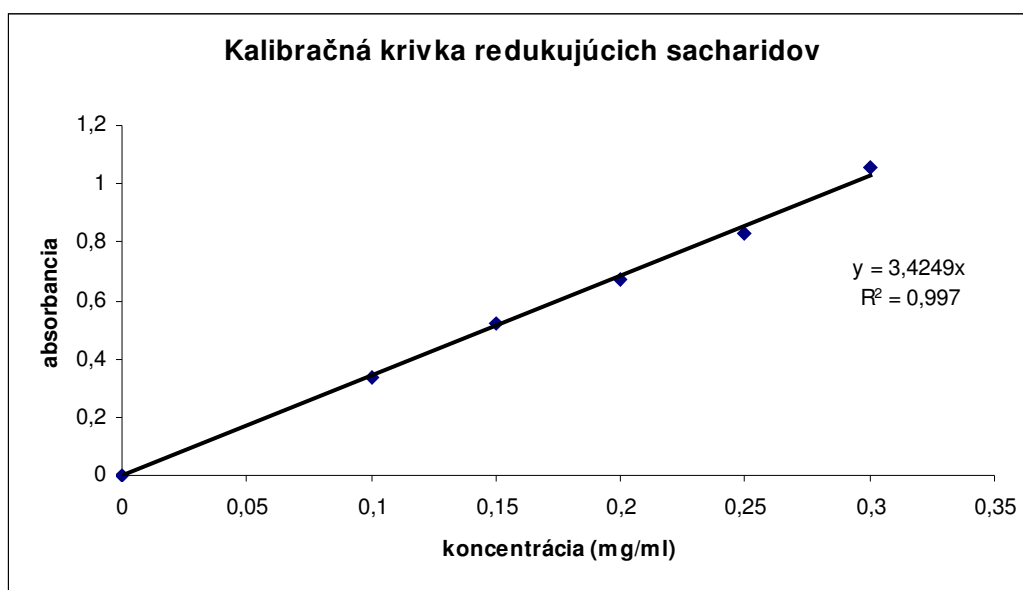
Obrázok 18: Zmeny v zafarbení produkčných médií série 4

U všetkých študovaných kvasinkových kmeňov v hydrolyzovaných médiách s prídavkom cestovín a pšeničnej kaše enzymatickým preparátom 3 je jednoznačné tmavšie zafarbenie média v porovnaní s nehydrolyzovaným médiom, ktoré je o poznanie bledšie alebo s hydrolyzovaným médiom enzymatickým preparátom 4 s rovnakými prídavkami odpadných substrátov. U médií s prídavkom vlákniny sa opäť nedá určiť zmena v zafarbení v dôsledku prekrytia pôvodnej farby hnedým sfarbením vlákniny. Môžeme povedať, že enzymatický preparát 3 získaný od plesne *Aureobasidium pullulans* sa z morfológického hľadiska javí ako najvhodnejší na hydrolýzu odpadných substrátov a následnú produkciu karotenoidov kvasinkovými kmeňmi.

5.4 Charakterizácia produkčných médií s prídavkom odpadných substrátov

5.4.1 Analýza redukujúcich sacharidov

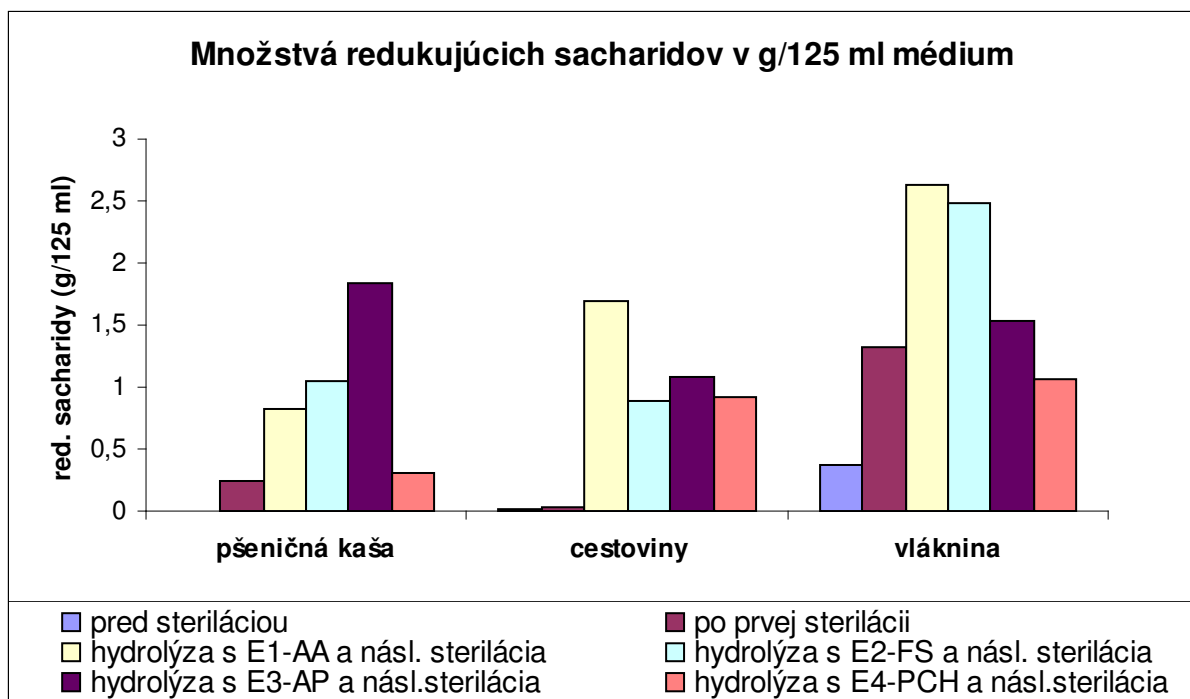
V ešte nezaočkovaných produkčných médiách s prídavkom odpadných substrátov boli pred steriláciou, po sterilácii, po 24 hodinovej hydrolýze a po druhej sterilácii stanovené redukujúce sacharidy metódou Somogyiho-Nelsona odpísanej v kapitole 4.4.6. Redukujúce sacharidy boli pre porovnanie stanovené aj v samotných enzymatických preparátoch (v 15 ml). Pre výpočet množstva redukujúcich sacharidov v médiu bola zostrojená kalibračná krivka závislosti koncentrácie na absorbancii. Výsledky sú uvedené v nasledovnom grafe č.11 a 12 a v tabuľkách 12 a 13.



Graf 11: Kalibračná krivka závislosti koncentrácie redukujúcich sacharidov na absorbancii

Tabuľka 12: Množstvo redukujúcich sacharidov v gramoch v 125 ml médiu

red. sacharidy (g/125 ml)	pšeničná kaša	cestoviny	vláknina
pred steriláciou	0,002	0,024	0,364
po prvej sterilácii	0,245	0,026	1,321
po hydrolýze s E1 - AA a následnej sterilácii 2	0,821	1,686	2,635
po hydrolýze s E2 - FS a následnej sterilácii 2	1,047	0,891	2,478
po hydrolýze s E3 - AP a následnej sterilácii 2	1,839	1,077	1,529
po hydrolýze s E4 - PCH a následnej sterilácii 2	0,303	0,920	1,066



Graf 12: Množstvá redukujúcich sacharidov pred steriláciou, po sterilácii a po hydrolyzách s následnou steriláciou v jednotlivých odpadových substrátoch

Z výsledkov uvedených v tab.12 a grafe 12 je zrejmé, že enzýmové preparáty zo všetkých 4 použitých kmeňov húb vykazovali hydrolytickú aktivitu voči sacharidom, čo sa prejavilo vzostupom hodnôt redukujúcich cukrov po inkubácii odpadu s enzýmovými preparátmi. Nezanedbateľný vplyv na hodnotu redukujúcich sacharidov má v prípade komplexných odpadných substrátov aj samotná sterilizácia.

Tabuľka 13: Množstvo redukujúcich sacharidov v enzýmových preparátoch

riedenie	1000x	red.sacharidy (g/15ml)	red.sacharidy (g/1,5ml)
E1 - AA	0,929	4,069	0,407
E2 - FS	0,409	1,791	0,179
E3 - AP	0,783	3,429	0,343
E4 - PCH	0,236	1,034	0,103

Na hydrolyzu média s odpadným substrátom bol pridaný enzýmový preparát v množstve 1,5 ml. V tabuľke 13 tiež vidíme, koľko redukujúcich sacharidov sme pridali do média spolu s týmto preparátom, teda nie všetky redukujúce cukry vznikli hydrolyzou odpadných substrátov.

5.4.2 Orientačné zastúpenie extracelulárnych hydroláz v enzýmových preparátoch

Analýza obsahu hydrolytických enzýmov bola prevedená v paralelnej diplomovej práci a v súčasnej dobe sú k dispozícii len orientačné údaje o aktivite proteázy, alfa-amylázy a celulózy. Údaje v semikvantitatívnej forme sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Tabuľka 14: *Orientačné zastúpenie jednotlivých hydroláz v enzýmových preparátoch*

preparát	proteáza	Alfa-amyláza	celuláza
E1 - AA	+	+++	++(+)
E2 - FS	+++	+(+)	+++
E3 - AP	++(+)	+	++(+)
E4 - PCH	++	++(+)	++

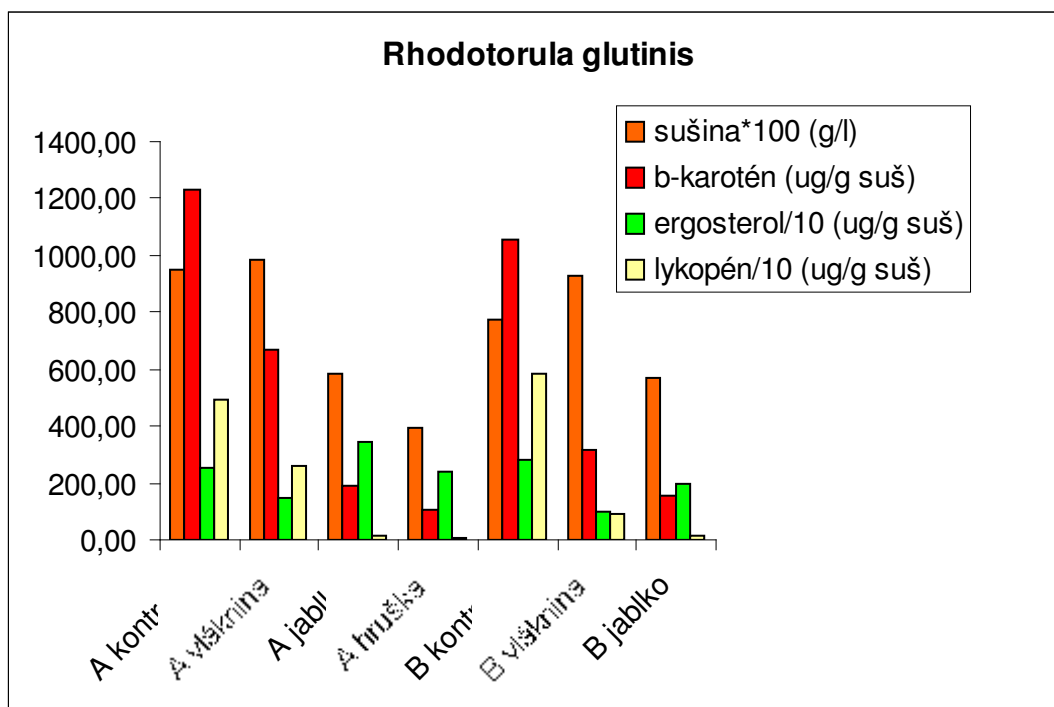
5.5 Produkcia karotenoidov na rôznych typoch kultivačných médií

Práca bola zameraná predovšetkým na sledovanie zmien produkcie β -karoténu, pretože tento derivát je majoritným pigmentom u väčšiny karotenogénnych kvasiniek a má z karotenoidov tiež najväčší praktický význam. Z ďalších metabolitov sa stanovoval lykopén a ergosterol, doprovodný metabolit karotenoidov s aktivitou provitamínu D. Analýza karotenoidov bola prevedená na chromatografickej kolóne Kinetex metódou HPLC s UV/VIS detekciou (kap. 4.5.3). V nasledujúcich grafoch sú uvedené výsledky kultivácii zo všetkých štyroch sérií produkčných médií.

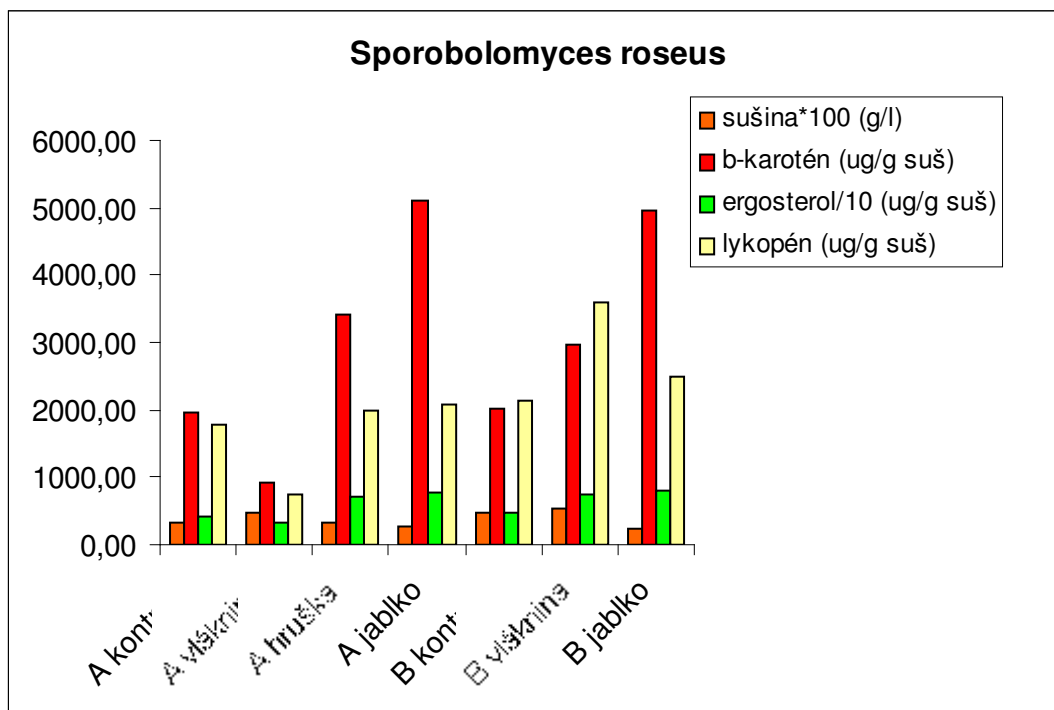
5.5.1 Produkcia karotenoidov používaných kmeňov v kultivačných sériách 1–4 na rôznych produkčných médiách

Tabuľka 15: Prehľad nárastu biomasy a obsahu karotenoidov v 1. sérii kultivačných médií

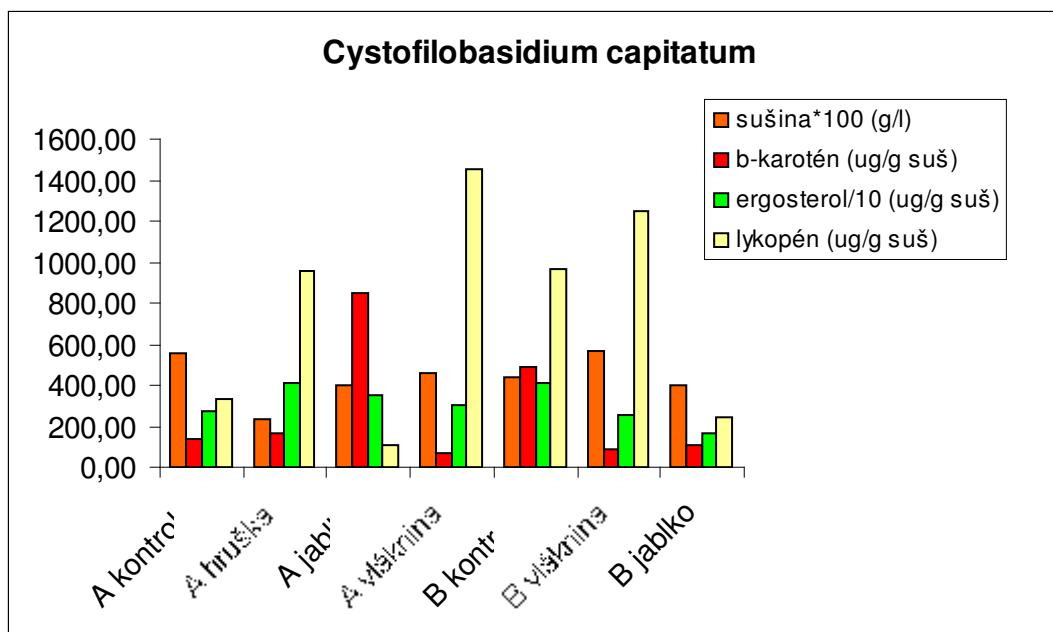
označ.	kultúry	sušina (g/l)	β -karotén konc. (ug/g sušiny)	ergosterol konc.(ug/g sušiny)	lykopén konc. (ug/g sušiny)
RG	A kontrola	9,531	1232,357	2553,423	4945,488
	A vláknina	9,815	668,010	1446,863	2607,669
	A jablko	5,873	186,633	3457,393	121,754
	A hruška	3,928	104,652	2411,006	93,738
	B kontrola	7,748	1053,053	2788,229	5868,029
	B vláknina	9,308	319,311	974,119	882,463
	B jablko	5,671	157,434	1938,715	143,185
SR	A kontrola	3,349	1966,491	4056,228	1779,143
	A vláknina	4,778	919,605	3280,831	735,934
	A hruška	3,143	3419,298	7222,806	1993,149
	A jablko	2,622	5110,590	7650,722	2075,986
	B kontrola	4,613	2034,619	4849,422	2151,001
	B vláknina	5,200	2975,259	7328,530	3586,259
	B jablko	2,349	4954,315	8149,101	2492,345
CC	A kontrola	5,570	133,314	2749,826	328,618
	A hruška	2,334	168,504	4089,002	955,086
	A jablko	4,048	847,548	3486,795	103,965
	A vláknina	4,611	72,920	3000,287	1454,523
	B kontrola	4,383	488,375	4136,525	961,501
	B vláknina	5,702	84,275	2516,918	1249,392
	B jablko	4,048	108,586	1697,932	244,029



Graf 13: Produkcia karotenoidov 1. série produkčných médií kvasinkou *Rhodotorula glutinis*



Graf 14: Produkcia karotenoidov 1. série produkčných médií kvasinkou *Sporobolomyces roseus*



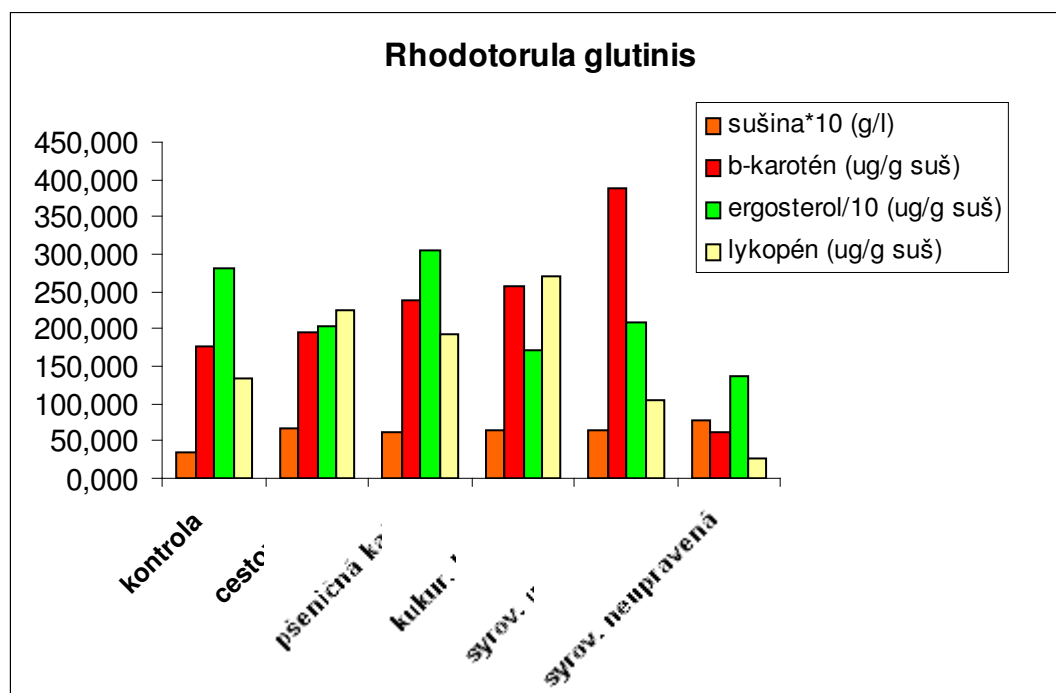
Graf 15: Produkcia karotenoidov 1. série produkčných médií kvasinkou *Cystofilobasidium capitatum*

Ako môžeme vidieť z grafov 13-15, vyšší nárast biomasy u kvasinky *Sporobolomyces roseus* bol pozorovaný v médiách s jablčnou vlákninou, a to v médiu A a ešte viac v médiu B, kde inokulum II obsahovalo namiesto kvasničného autolyzátu taktiež jablčnú vlákninu. V týchto médiách môžeme vidieť aj niekoľkonásobne zvýšenú produkciu karotenoidov a ergosterolu oproti kontrolnému médiu. Zvýšené produkcie karotenoidov (β -karotén až 5110,6 $\mu\text{g/g}$ suš) pozorujeme aj v médiu s obsahom jablčných a hruškových šupiek s predchádzajúcou kultiváciou na ino II A s kvasničným autolyzátom aj B s jablčnou vlákninou. U kvasinky *Rhodotorula glutinis* vyšší nárast biomasy oproti kontrolnému médiu nie je. Tu však môžeme pozorovať zvýšenú produkciu lykopénu (5868 $\mu\text{g/g}$ suš) v kontrolnom médiu, kde predchádzajúca kultivácia bola na ino II B s obsahom jablčnej vlákniny, a taktiež v médiu s obsahom jablčnej vlákniny (2607,7 $\mu\text{g/g}$ suš). Ani u kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* nie je pozorovaný nárast biomasy oproti kontrole, s výnimkou produkčného média B s vlákninou. Zvýšené produkcie β -karoténu vidíme v médiách A s obsahom jablčných (847,5 $\mu\text{g/g}$ suš) a hruškových šupiek, a v B kontrolnom médiu, kde ino II obsahovalo jablčnú vlákninu. Vyšší nárast lykopénu vidieť v médiách A aj B s prídavkom vlákniny (A: 1454,5 a B 1249,4 $\mu\text{g/g}$ suš) a produkcia ergosterolu je výrazná najmä v B kontrolnom médiu (4136 $\mu\text{g/g}$ suš) a v produkčnom médiu A s obsahom jablčných šupiek. Výťažky β -karoténu na ovocných odpadoch dosahujú aj pri kultiváciách na trepačkách niekoľko mg/g sušiny, tieto hodnoty sú mimoriadne perspektívne.

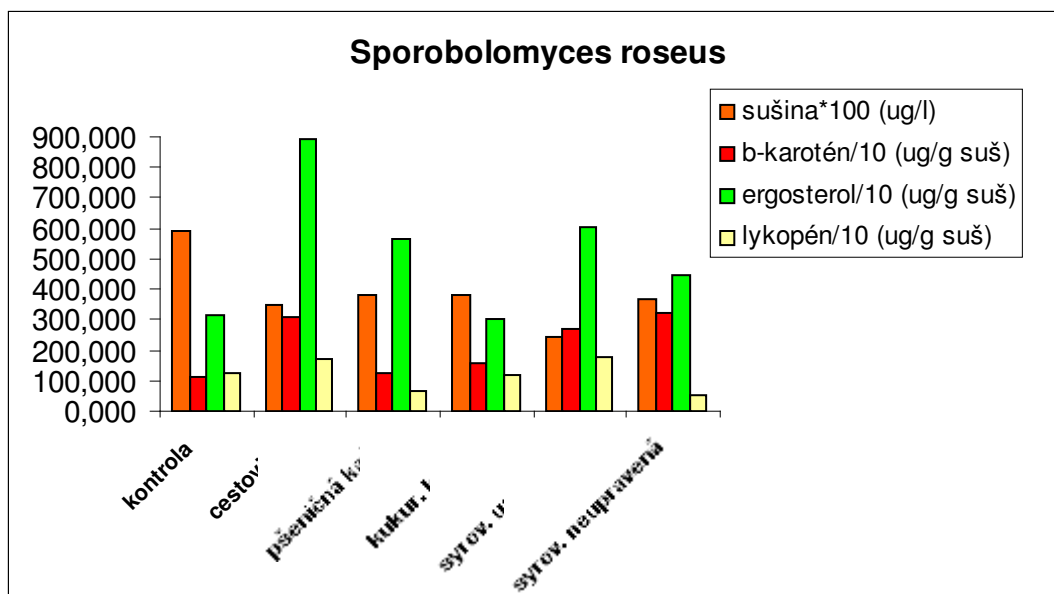
Tabuľka 16: Prehľad nárastu biomasy a obsahu karotenoidov v 2. sérii produkčných médií

označ.	kultúry	sušina (g/l)	β -karotén konc. (ug/g suš)	ergosterol konc. (ug/g suš)	lykopén konc. (ug/g suš)
RG	kontrola	3,584	176,971	2817,693	134,901
	cestoviny	6,603	194,330	2042,224	225,972
	pšeničná kaša	6,198	237,648	3054,597	193,571
	kukur. klíčky	6,552	257,917	1706,150	269,690
	syrov. upravená	6,502	389,361	2086,312	104,670
	syrov. neupravená	7,778	61,768	1373,557	26,039

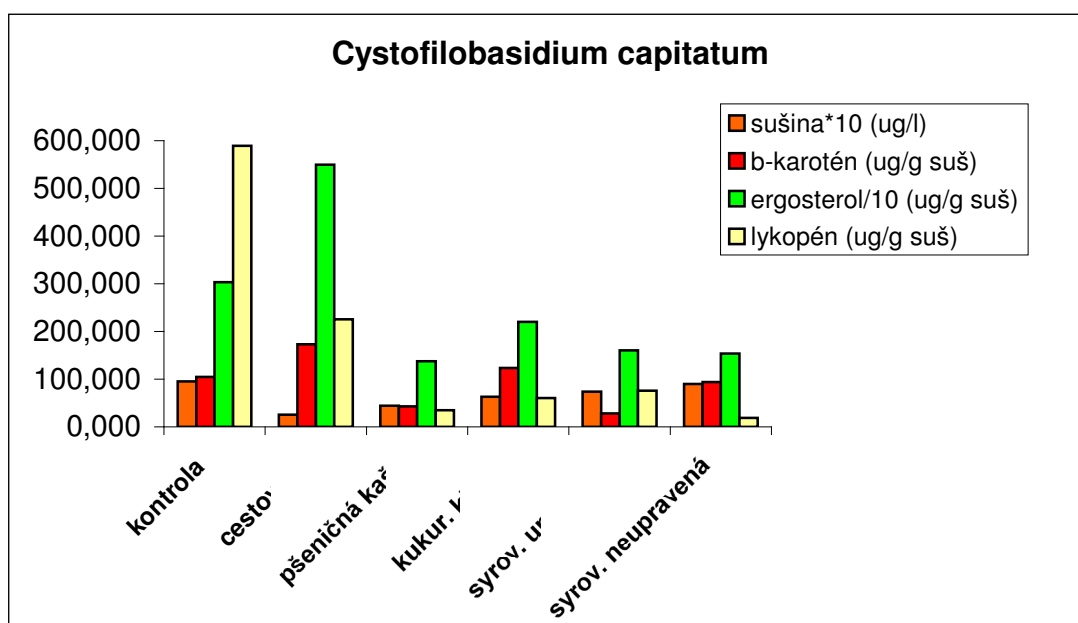
SR	kontrola	5,935	1139,129	3151,014	1277,557
	cestoviny	3,498	3067,110	8907,628	1697,793
	pšeničná kaša	3,803	1244,773	5654,334	677,300
	kukur. klíčky	3,803	1585,094	3029,578	1194,286
	syrov. upravená	2,424	2691,297	6065,045	1800,699
	syrov. neupravená	3,704	3191,235	4494,340	501,889
CC	kontrola	9,536	104,724	3030,681	589,115
	cestoviny	2,550	172,927	5496,021	225,369
	pšeničná kaša	4,443	43,272	1378,061	34,918
	kukur. klíčky	6,313	123,405	2198,878	60,187
	syrov. upravená	7,403	28,521	1601,473	75,597
	syrov. neupravená	8,961	94,274	1536,549	18,975



Graf 16: Produkcia karotenoidov 2. série produkčných médií kvasinkou *Rhodotorula glutinis*



Graf 17: Produkcia karotenoidov 2. série produkčných médií kvasinkou *Sporobolomyces roseus*



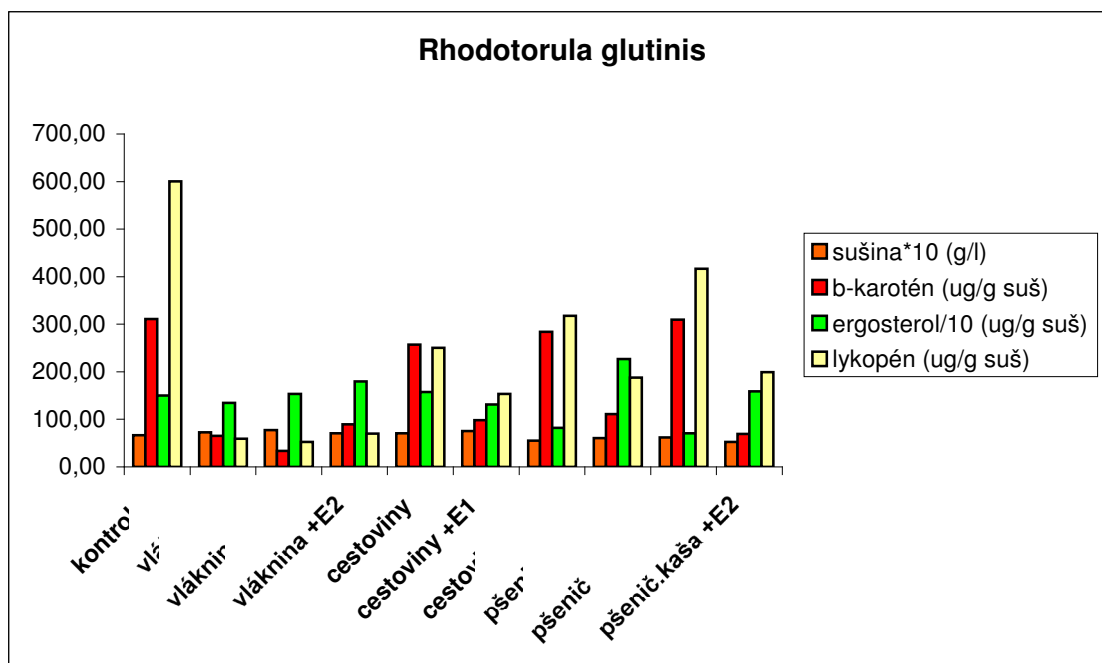
Graf 18: Produkcia karotenoidov 2. série produkčných médií kvasinkou *Cystofilobasidium capitatum*

V druhej sérii kultivačných médií boli testované odpadné substráty – cestoviny, kukuričné klíčky, pšeničná kaša, upravená a neupravená srvátka. U kvasinky *Rhodotorula glutinis* môžeme pozorovať nárast biomasy vo všetkých médiách s odpadným substrátom oproti kontrolnému médiu. Rovnako tu pozorujeme aj zvýšené produkcie β -karoténu, a to najmä v médiu s upravenou srvátkou (389,4 $\mu\text{g/g}$ suš). Nárast produkcie β -karoténu však v prípade druhej série médií nebol tak vysoký ako u ovocných odpadov, cereálne substráty sú pre karotenogénne kvasinky zrejme obtiažnejšie využiteľné. Zvýšenú produkciu ergosterolu môžeme nájsť v médiu s obsahom pšeničnej kaše. Kvasinka *Sporobolomyces roseus* nemala zvýšené produkcie biomasy, pozorujeme tu skôr jej pokles. Produkcia β -karoténu bola však zvýšená vo všetkých produkčných médiách, najviac s prídavkom cestovín a neupravenej srvátky. V rovnakých médiách pozorujeme aj zvýšené produkcie ergosterolu (cestoviny 8907

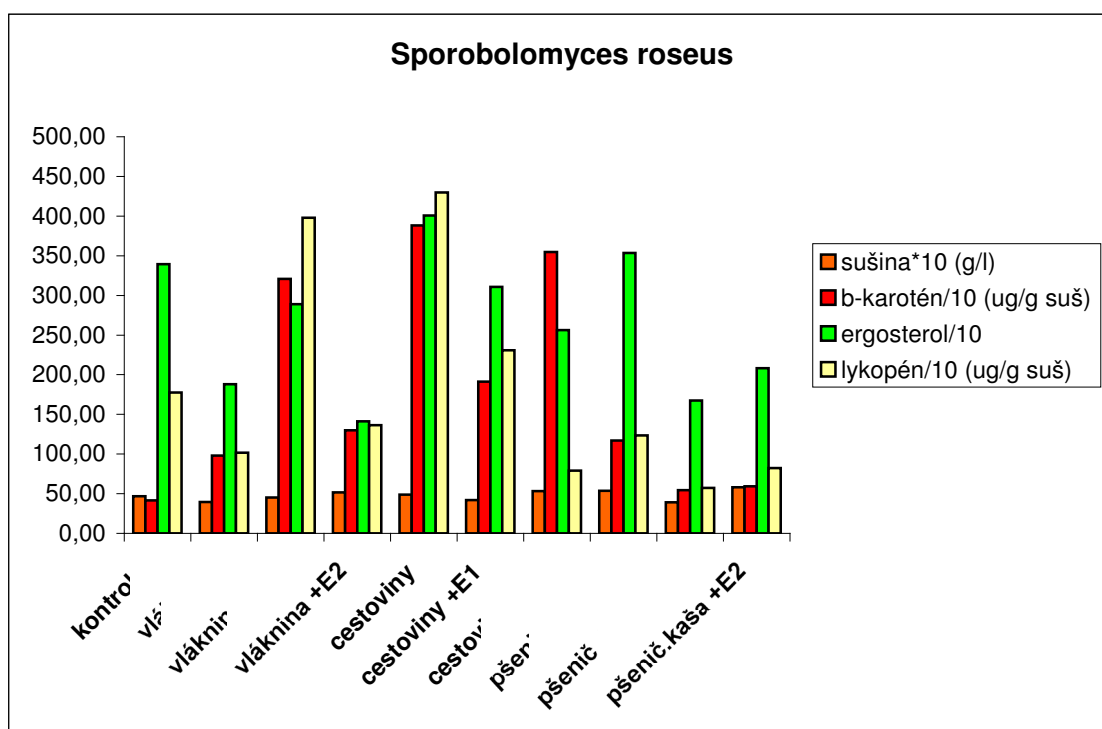
μg/g suš). V produkčných médiách s obsahom odpadných substrátov bol pozorovaný pokles biomasy aj karotenoidov a v niektorých médiách aj ergosterolu u kvasinky *Cystofilobasidium capitatum*. Jediný nárast produkcie β-karoténu môžeme vidieť v médiu s obsahom cestovín (172,9 μg/g suš). V tomto médiu bol aj jediná zvýšená produkcia ergosterolu 5496 (μg/g suš).

Tabuľka 17: Prehľad produkcie karotenoidov 3. série produkčných médií

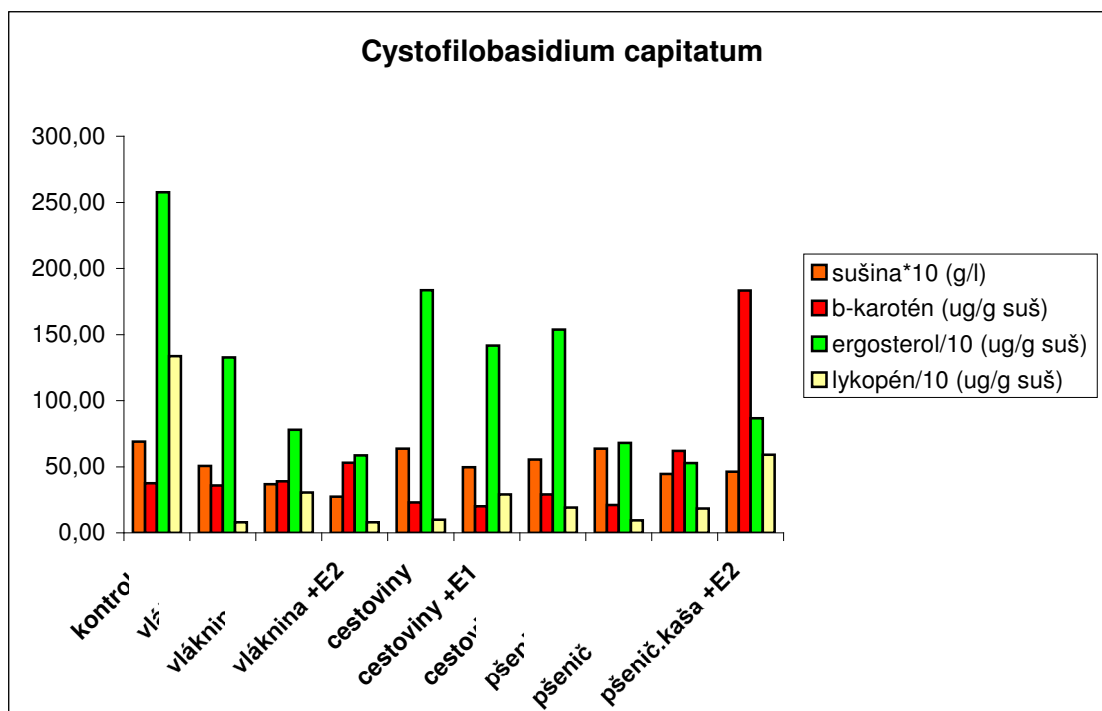
			β-karotén	ergosterol	lykopén
označ.	kultúry	sušina (g/l)	konc. (ug/g suš)	konc. (ug/g suš)	konc. (ug/g suš)
RG	kontrola	6,643	310,785	1502,558	600,094
	vláknina	7,251	64,979	1349,423	59,256
	vláknina +E1	7,738	33,977	1537,254	52,607
	vláknina +E2	7,099	89,426	1798,950	70,129
	cestoviny	7,039	256,960	1575,227	250,535
	cestoviny +E1	7,515	98,281	1313,684	153,180
	cestoviny +E2	5,509	284,013	823,634	317,761
	pšeničná kaša	6,056	110,856	2269,671	187,463
	pšenič. kaša+E1	6,218	309,708	707,599	416,336
	pšenič.kaša +E2	5,235	69,159	1589,574	199,395
SR	kontrola	4,679	414,869	3395,450	1776,189
	vláknina	3,944	981,812	1882,002	1018,744
	vláknina +E1	4,514	3209,031	2890,642	3978,704
	vláknina +E2	5,158	1300,704	1412,561	1362,201
	cestoviny	4,877	3881,464	4007,618	4295,959
	cestoviny +E1	4,208	1914,503	3106,162	2309,845
	cestoviny +E2	5,340	3545,198	2562,455	789,826
	pšeničná kaša	5,348	1169,061	3533,750	1234,143
	pšenič. kaša+E1	3,927	546,716	1676,184	573,012
	pšenič.kaša +E2	5,819	594,424	2084,237	824,279
CC	kontrola	6,900	37,592	2576,436	1336,006
	vláknina	5,055	35,763	1326,412	79,131
	vláknina +E1	3,688	38,890	780,493	304,354
	vláknina +E2	2,730	52,914	586,099	80,076
	cestoviny	6,373	22,910	1834,223	99,093
	cestoviny +E1	4,959	20,198	1416,771	290,371
	cestoviny +E2	5,534	29,111	1538,678	192,441
	pšeničná kaša	6,373	21,058	679,209	95,161
	pšenič. kaša+E1	4,443	61,924	528,118	185,072
	pšenič.kaša +E2	4,623	183,199	866,249	591,148



Graf 19: Produkcia karotenoidov 3. série produkčných médií kvasinkou *Rhodotorula glutinis*



Graf 20: Produkcia karotenoidov 3. série produkčných médií kvasinkou *Sporobolomyces roseus*



Graf 21: Produkcia karotenoidov 3. série produkčných médií kvasinkou *Cystofilobasidium capitatum*

Produkčné média v tretej sérii obsahovali okrem kontrolného glukózového média a kontrolných médií s vybraným odpadným substrátom aj média s prídavkom vybraných hydrolyzovaných odpadných substrátov. Hydrolyzované média mali dobré využitie v produkcii biomasy najmä u kvasinky *Rhodotorula glutinis*. Zvýšená produkcia bola hlavne v médiách hydrolyzovaných enzýmovým preparátom 1, čiže získanom z plesne *Alternaria alternata*. Produkcia β -karoténu a lykopénu sa mierne zvyšovala alebo znižovala v závislosti od daného produkčného média, no vždy bola nižšia než v kontrolnom glukózovom médiu (β -karotén 310,8 $\mu\text{g/suš.}$, lykopén 600,1 $\mu\text{g/suš.}$). V produkcii ergosterolu nie je vidieť veľké odlišnosti, najvyššia produkcia bola zaznamenaná v nahydrolyzovanom médiu s pšeničnou kašou.

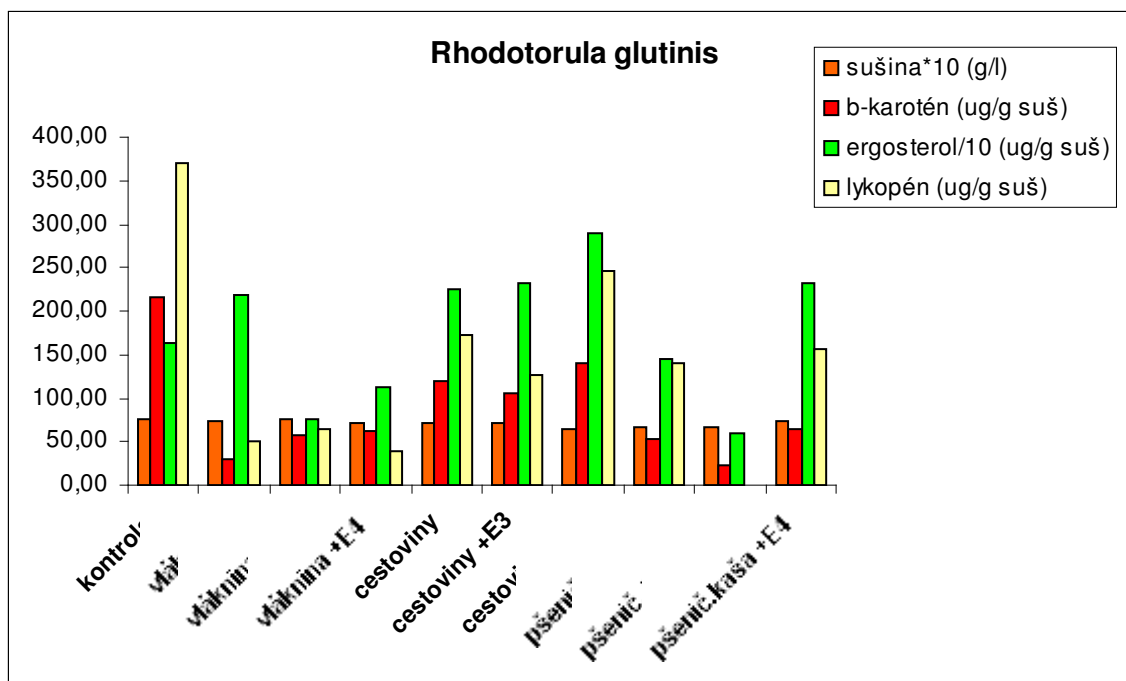
V produkcii biomasy u kvasinky *Sporobolomyces roseus* je to opačné. Najvyššie produkcie sú zreteľné v médiách hydrolyzovaných enzýmovým preparátom 2 od plesne *Fusarium solani*. Ako najlepšie média pre produkciu karotenoidov sa osvedčili média s vlákninou hydrolyzovanou enzýmovým preparátom 1 (β -karotén 3209 $\mu\text{g/suš.}$), cestoviny hydrolyzované enzýmovým preparátom 2 (β -karotén 3545,2 $\mu\text{g/suš.}$) a médium s nehydrolyzovanými cestovinami (β -karotén 3881,5 $\mu\text{g/suš.}$). Zmeny v produkcii β -karoténu prbiehajú rovnakým smerom ako zmeny v produkcii lykopénu. Produkcie ergosterolu sú vo všetkých médiách pomerne vysoké, najnižšie sú však v médiu s vlákninou hydrolyzovanou enzýmovým preparátom 2 a v hydrolyzovaných médiách s pšeničnou kašou.

U kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* sa v zvýšenej produkcii biomasy neosvedčilo žiadne z hydrolyzovaných médií. V produkcii β -karoténu však výrazne vystupuje médium s pšeničnou kašou hydrolyzované enzýmovým preparátom 2 od *Fusarium solani* (183,2 $\mu\text{g/suš.}$). V tomto médiu je aj zvýšená produkcia lykopénu, najvyššia je však v kontrolnom glukózovom médiu (1336 $\mu\text{g/suš.}$). Najvyššia produkcia ergosterolu je rovnako v kontrolnom glukózovom médiu.

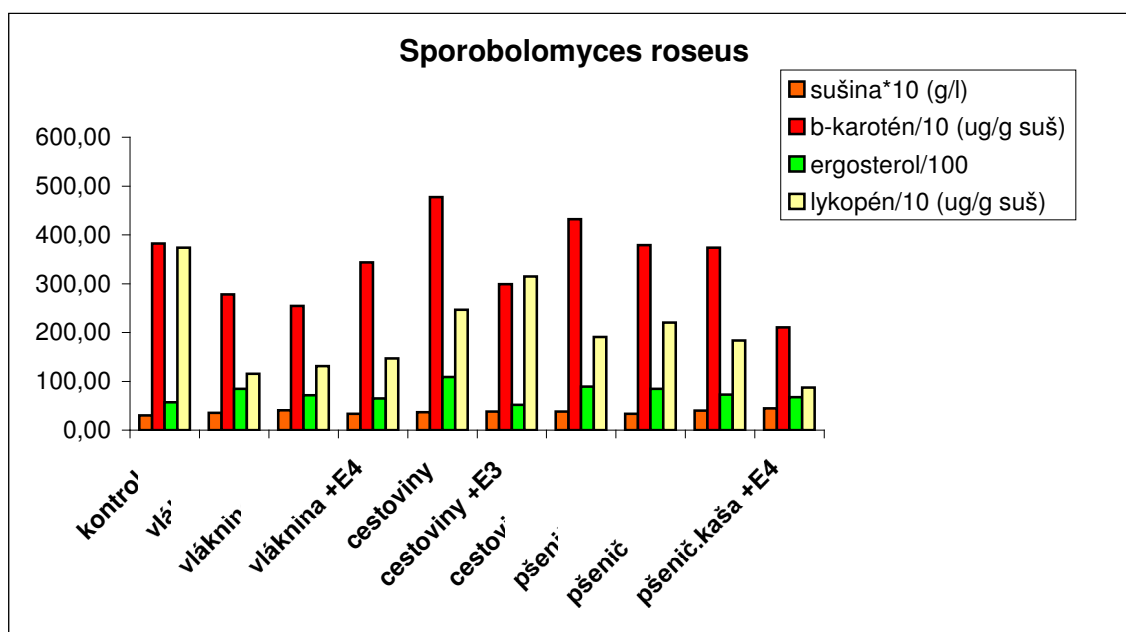
Výsledky kultivácií s hydrolyzovanými odpadmi potvrdzujú selektivitu pôsobenia enzýmov voči jednotlivým typom odpadov aj špecifiká metabolizmu individuálnych druhov kvasiniek.

Tabuľka 18: *Prehľad produkcie karotenoidov 4. série kultivačných médií*

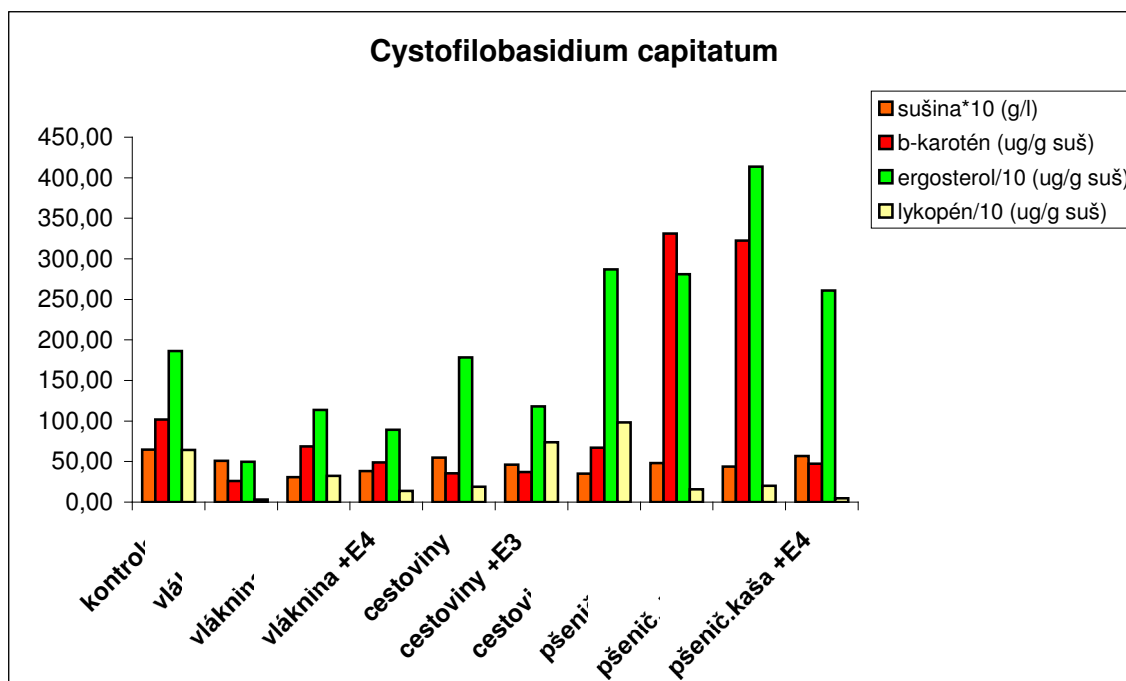
			β-karotén	ergosterol	lykopén
označ.	kultúry	sušina (g/l)	konc. (ug/g suš)	konc. (ug/g suš)	konc. (ug/g suš)
RG	kontrola	7,677	215,862	1640,918	369,717
	vláknina	7,383	29,201	2180,454	51,341
	vláknina +E3	7,545	57,093	757,769	64,553
	vláknina +E4	7,160	60,938	1120,287	38,188
	cestoviny	7,150	119,320	2255,688	172,280
	cestoviny +E3	7,120	106,204	2321,681	127,213
	cestoviny +E4	6,350	139,808	2889,856	246,635
	pšeničná kaša	6,643	52,841	1456,076	139,528
	pšenič. kaša+E3	6,745	23,057	606,749	0,966
	pšenič.kaša +E4	7,454	64,843	2315,782	155,218
SR	kontrola	3,010	3824,846	5673,551	3738,884
	vláknina	3,514	2782,523	8434,249	1152,079
	vláknina +E3	4,043	2544,866	7128,239	1313,393
	vláknina +E4	3,357	3438,451	6494,754	1466,666
	cestoviny	3,704	4776,381	10891,605	2465,362
	cestoviny +E3	3,820	2988,287	5188,206	3148,239
	cestoviny +E4	3,803	4319,160	8890,786	1905,603
	pšeničná kaša	3,349	3787,805	8445,594	2203,920
	pšenič. kaša+E3	3,969	3736,739	7290,179	1834,071
	pšenič.kaša +E4	4,456	2103,394	6721,833	874,027
CC	kontrola	6,493	101,709	1862,765	645,258
	vláknina	5,090	26,153	496,002	33,540
	vláknina +E3	3,077	68,811	1136,572	322,075
	vláknina +E4	3,820	48,866	891,510	138,391
	cestoviny	5,474	35,602	1785,812	190,756
	cestoviny +E3	4,635	37,088	1179,139	738,005
	cestoviny +E4	3,533	67,068	2868,727	982,718
	pšeničná kaša	4,815	331,038	2809,319	158,923
	pšenič. kaša+E3	4,395	322,579	4138,698	200,992
	pšenič.kaša +E4	5,678	47,370	2607,893	46,096



Graf 22: Produkcia karotenoidov 4. série produkčných médií kvasinkou *Rhodotorula glutinis*



Graf 23: Produkcia karotenoidov 4. série produkčných médií kvasinkou *Sporobolomyces roseus*



Graf 24: Produkcia karotenoidov 4. série produkčných médií kvasinkou *Cystofilobasidium capitatum*

Kultivačná séria 4 obsahovala rovnaké produkčné médiá s odpadnými substrátmi ako séria 3. Hydrolyzácia substrátov však bola prevedená s inými enzýmovými preparátmi. Produkcia biomasy kvasinky *Rhodotorula glutinis* sa v jednotlivých médiách nijak výrazne nelíšila. Najvyššia dosiahnutá produkcia β -karoténu a lykopénu bola v kontrolnom glukózovom médiu (215,9 $\mu\text{g/g}$ suš.). Určité zvýšené produkcie karotenoidov i ergosterolu však môžeme vidieť v produkčných médiách s prídavkom cestovín (β -karotén 139,8 $\mu\text{g/g}$ suš., lykopén 246,6 $\mu\text{g/g}$ suš. a ergosterol 2889,9 $\mu\text{g/g}$ suš.). Ani u kvasinky *Sporobolomyces roseus* sa produkcia biomasy výrazne nezvýšila, či neznížila. Mierny nárast oproti kontrolným médiám s prídavkom odpadného substrátu je vidieť v ich hydrolyzovaných médiách enzýmovým preparátom 3 od plesne *Aureobasidium pullulans*. Zvýšené produkcie β -karoténu sú výrazné v médiách s obsahom cestovín (4776 $\mu\text{g/suš.}$), cestovín hydrolyzovaných enzýmovým preparátom 4 (4319,2 $\mu\text{g/suš.}$) a pšeničnej kaše (3787 $\mu\text{g/suš.}$). U kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* opäť nemôžeme pozorovať výrazný nárast biomasy v niektorom z kultivačných médií. V produkcii β -karoténu však môžeme v médiu s pšeničnou kašou a v hydrolyzovanom médiu s pšeničnou kašou enzýmovým preparátom 3 vidieť najväčší nárast v porovnaní produkcie v ostatných produkčných médiách. Produkcia tu dosahuje hodnoty 331 a 322,6 μg β -karoténu/g sušiny. V týchto médiách je aj navyššia produkcia ergosterolu (4138,7 $\mu\text{g/g}$ suš.). Zvýšené produkcie lykopénu nájdeme v produkčných médiách s cestovinami hydrolyzovanými enzýmovým preparátom 3 a 4 od plesne *Aureobasidium pullulans* a *Phanerochaete chrysosporium* (738 a 982,7 μg lykopénu/g sušiny).

Aj výsledky ďalších kultivácií s hydrolyzovanými odpadmi potvrdzujú selektivitu pôsobenia enzýmov voči jednotlivým typom odpadov aj špecifiká metabolizmu individuálnych druhov kvasiniek. Pokiaľ ide o produkciu biomasy, nevykazujú študované kvasinky zásadné rozdiely, líšia sa však významne v zmenách produkcie pigmentov podľa zloženia média, typu odpadného substrátu a spôsobu jeho spracovania. Dosiahnuté výťažky

pigmentov predstavujú veľmi perspektívnu stratégiu pre prípadnú priemyselnú produkciu pigmentov pomocou karotenogénnych kvasiniek.

V nasledujúcej tabuľke je zhrnutý prehľad najlepších dosiahnutých produkcií biomasy, β -karoténu a celkových karotenoidov (suma karoténu + lykopénu) u študovaných kmeňov a zvýšenie v porovnaní s kontrolnou kultiváciou daného kmeňa..

Tabuľka 19: Porovnanie produkcie karoténov na odpadoch

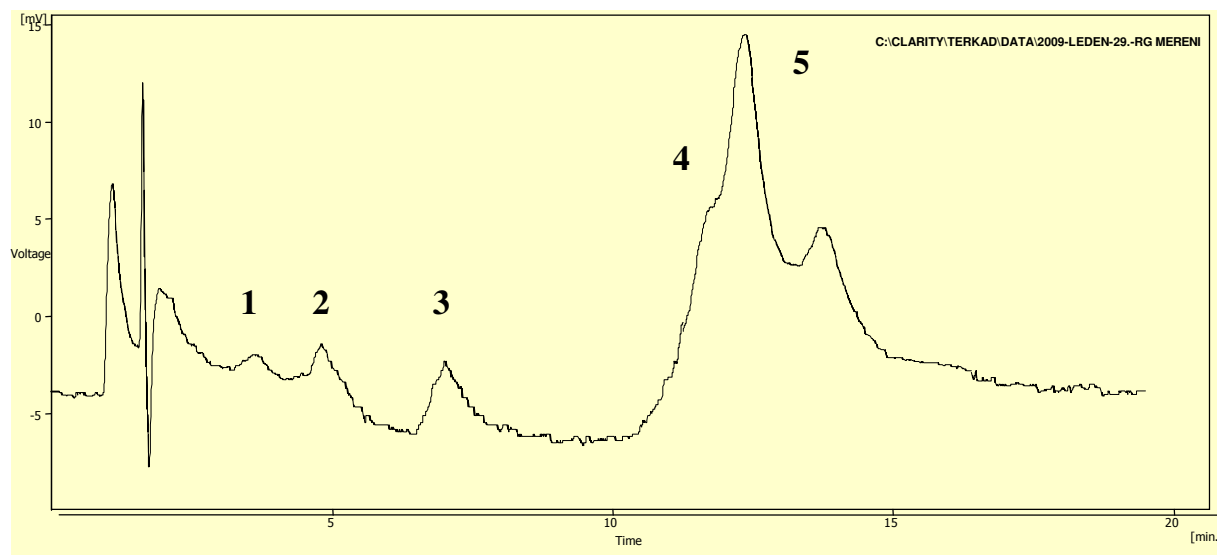
kmeň	Zdroj C	enzým	biomasa (g/l)	β -karotén (mg/g suš)	β -karotén + lykopén (mg/g suš)	Priemerný násobok – zvýšenie produkcie karoténov
<i>R. glutinis</i>	kontrola	-	7,70	0,21	0,58	-
<i>R. glutinis</i>	jablčná vláknina	-	9,80	0,67	3,25	5,6 x
<i>R. glutinis</i>	pšeničná kaša	AA	6,20	0,31	0,72	1,2 x
<i>S. roseus</i>	kontrola	-	3,34	1,97	3,70	-
<i>S. roseus</i>	jablčná vláknina	-	5,20	2,98	6,50	2 x
<i>S. roseus</i>	cestoviny	-	3,70	4,77	7,23	2 x
<i>S. roseus</i>	srvátka	-	2,42	2,70	4,54	2 x
<i>S. roseus</i>	jablčné šupky	-	2,60	5,10	7,25	3 x
<i>S. roseus</i>	jablčná vláknina	PCH	3,36	3,43	4,89	1,8 x
<i>S. roseus</i>	cestoviny	PCH	3,80	4,31	6,45	2 x
<i>S. roseus</i>	cestoviny	AP	3,82	2,99	6,14	1,7 x
<i>S. roseus</i>	pšeničná kaša	AP	3,97	3,74	5,60	2 x
<i>S. roseus</i>	cestoviny	FS	5,30	3,60	4,20	1,3 x
<i>S. roseus</i>	jablčná vláknina	AP	4,02	2,54	3,90	1,2 x
<i>S. roseus</i>	pšeničná kaša	PCH	4,46	2,10	2,95	1,1 x
<i>S. roseus</i>	jablčná vláknina	AA	4,50	3,21	7,70	2,2 x
<i>C. capitatum</i>	kontrola	-	5,50	0,13	0,48	-
<i>C. capitatum</i>	pšeničná kaša	FS	4,62	0,18	0,77	1,6 x
<i>C. capitatum</i>	cestoviny	PCH	3,50	0,67	1,05	2,2 x

5.6 Testovanie metódy LC/MS pre analýzu karotenoidov

Analýza β -karoténu, lykopénu, ergosterolu a vzoriek vyizolovaných z produkčných médií kvasiniek *R. glutinis*, *S. roseus* a *C. capitatum* bola prevedená v spojení LC/MS na chromatografickej kolóne Kinetex C18 za izokratických podmienok s prietokom mobilnej fázy 0,8 ml/min (kapitola 4.5.7). Zrovnávacie chromatogramy všetkých kmeňov a štandardov sú uvedené v prílohách 1-4. Typický chromatogram karotenoidov z kvasinky *Rhodotorula glutinis* spoločne s identifikvanými píkmi je uvedený na obr. 19.

Hlavné pigmenty zastúpené v chromatogramoch sa dajú identifikovať čiastočne podľa zhody retenčných časov s dostupnými štandardmi (β -karotén, lykopen, ergosterol) a ďalej pomocou kombinácie dát z absorpčných spektier a hmotnostných spektier. Hmotnostné spektrá vzoriek študovaných kvasiniek sú uvedené v ďalšom texte (kap.5.6.2).

5.6.1 Separácia karotenoidov metódou HPLC/PDA

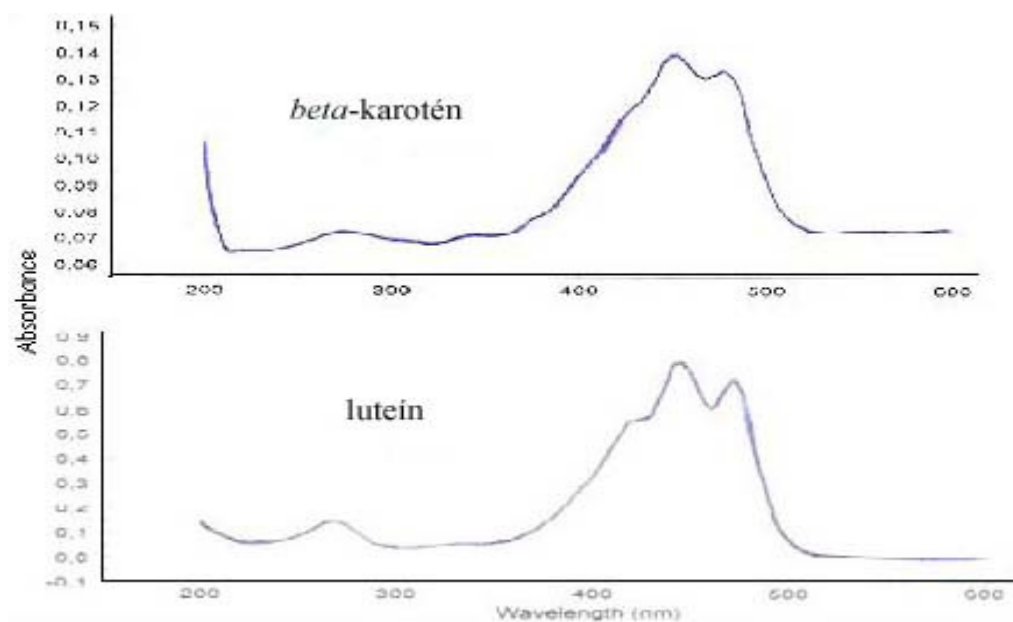


Obrázok 19: Typický HPLC chromatogram karotenoidov prítomných v extrakte *Rhodotorula glutinis* po 80-hodinovej kultivácii v produkčnom médiu [31]

Pomocou HPLC/PDA/ESI-MS boli identifikované nasledujúce látky: pík 1 (3.81 min) – torularhodin alkohol (absorpčné maximá 419, 452, 496 nm; m/z 552.9 ; pík 2 (4.96 min) – torularhodin (absorpčné maximá 425, 453, 486 nm; m/z 565.97); pík 3 (7.25 min) – torulen (absorpčné maximá 453, 489, 518 nm; m/z 534.38); pík 4 (12.79 min) – lykopen (absorpčné maximá 438, 469, 518 nm; m/z 536.63) a pík 5 – β,β -karoten (absorpčné maximá 425, 450, 483 nm; m/z 536.46). Kolona Restek C18, prietok 0,5 ml/min.

Chromatogramy ostatných analyzovaných kvasiniek uvedené v prílohách vykazujú vcelku podobné profily ako kvasinka *Rhodotorula glutinis* a vzniknuté pigmenty odpovedajú príslušným vetvám biosyntetickej dráhy uvedenej v kap. 2.2.2.

Chromatografická analýza zmesi prírodných karotenoidov predstavuje pomerne zložitý problém, najmä pokiaľ ide o identifikáciu jednotlivých zástupcov a ich derivátov. HPLC je preferovaná metóda, avšak často neumožňuje dostatočnú separáciu hlavne polohových izomérov. Pokiaľ se použije kombinácia detektorov umožňujúca súbežnú detekciu absorpčných spektier (obr. 20) a hmotnostných spektier, je možné dosiahnuť pomerne uspokojujúce identifikácie aspoň hlavných zástupcov karotenoidov aj cez to, že rovnako absorpčné spektrá karotenoidov vykazujú značnú podobnosť.



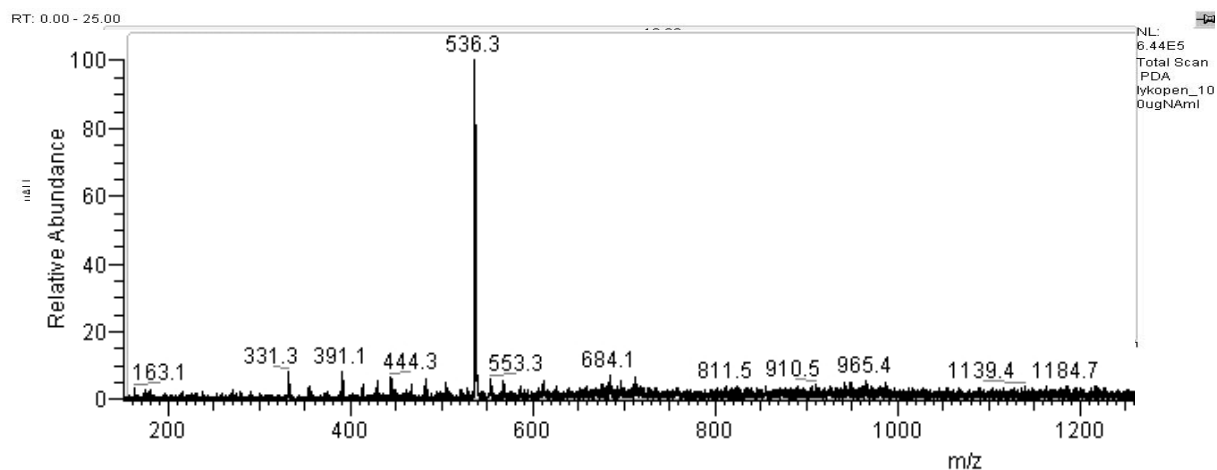
Obrázok 20: Absorpčné spektrá štandardov karotenoidov (Helios Alfa, Unicam)

5.6.2 Analýza karotenoidov pomocou on-line LC/MS

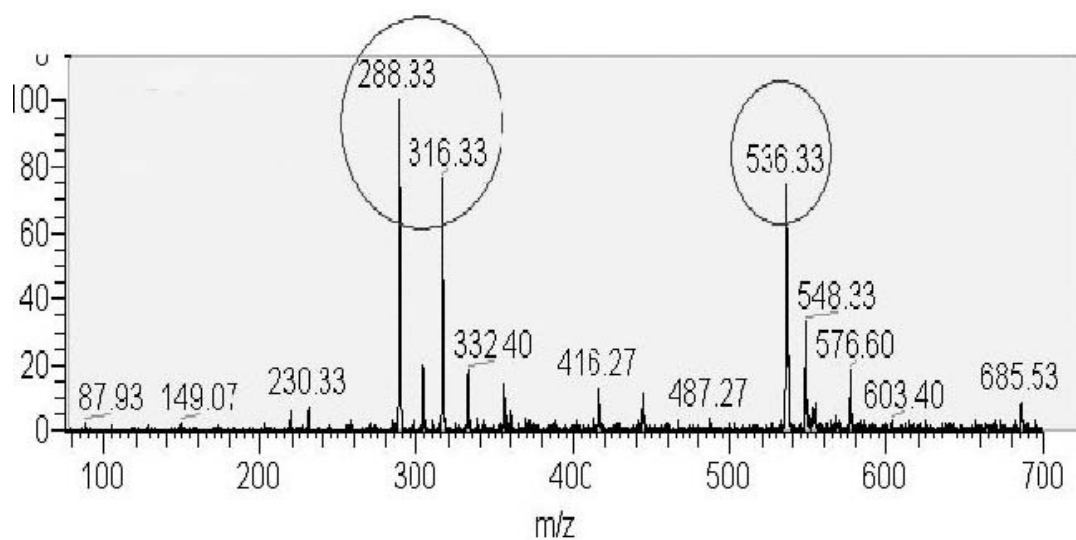
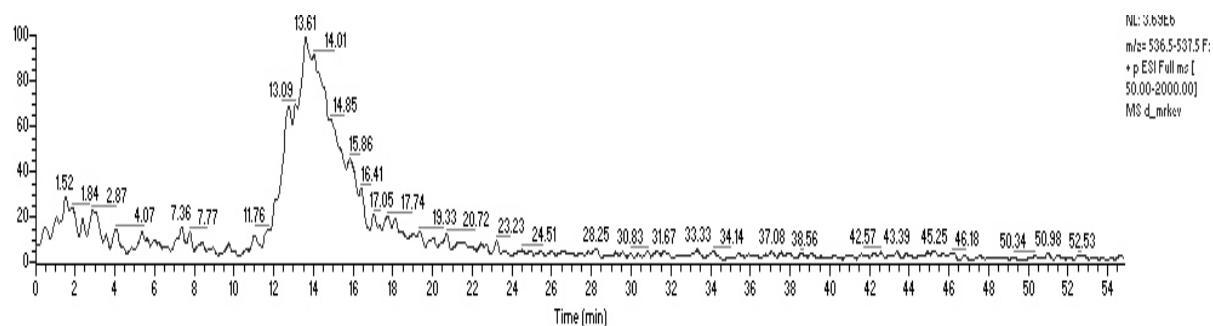
Hmotnostná spektrometria opísaná v kap.2.8.2 je absolútna metóda a umožňuje kvalitatívnu analýzu i takých látok, ku ktorým nie sú dostupné štandarty. Látky sú identifikované pomocou molekulovej hmotnosti (m/z). Pokiaľ je tento údaj porovnaný s polohou píku a absorpčným spektrom, je možné aspoň niektorým derivátom priradiť pík len na základe ich m/z , u týchto látok však nie je možné previesť kvalitatívnu analýzu.

V predloženej práci bol k dispozícii ako ionizačný zdroj len elektrosprej. I keď existuje viacero prac využívajúcich tento spôsob ionizácie pri analýze karotenoidov [46], optimálnou formou ionizácie pre nepolárne karotenoidy je skôr chemická ionizácia za atmosferického tlaku (APCI). V ESI-MS usporiadaní sa karotenoidy analyzujú skôr v pozitívnom móde, ale pokiaľ neobsahujú heteroatóm (napríklad kyslík), nemožno ionizácie v elektrospreji dosiahnuť. Určitú možnosť predstavuje prídavok halogenovaného rozpúšťadla (chloroform). Táto varianta bola použitá pri získaní hmotnostných spektier štandardov lykopénu (obr. 21) a β -karoténu, ktorých HPLC/PDA chromatogramy boli tiež namerané. Priamym nástrekom extraktu kvasiniek do MS detektoru bolo získané hmotnostné spektrum karotenoidov z kvasinky *Rhodotorula glutinis* (obr.22, 23) [55].

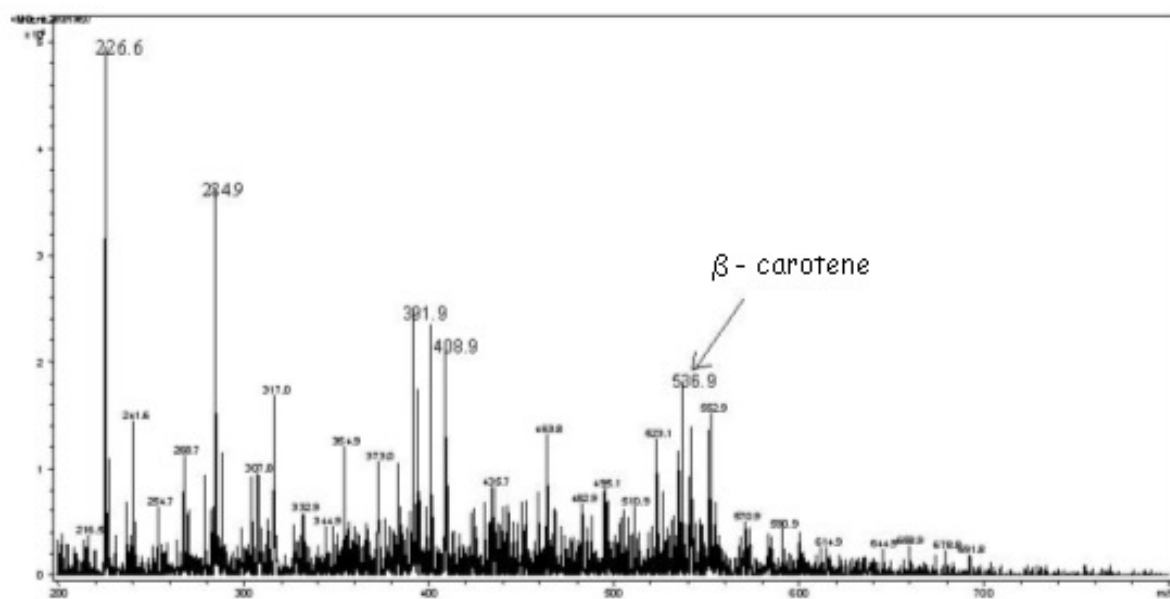
Molekulárny ión lykopénu i β -karoténu, M^+ , je viditeľný pri hodnote $m/z = 536$. Čiary o hodnote $m/z = 288$ a 316 v MS spektre štandardu β -karoténu boli identifikované ako ftaláty a pochádzajú zrejme z laboratórnych plastov.



Obrázok 21: Chromatogram HPLC/PDA a hmotnostné spektrum štandardu lykopénu

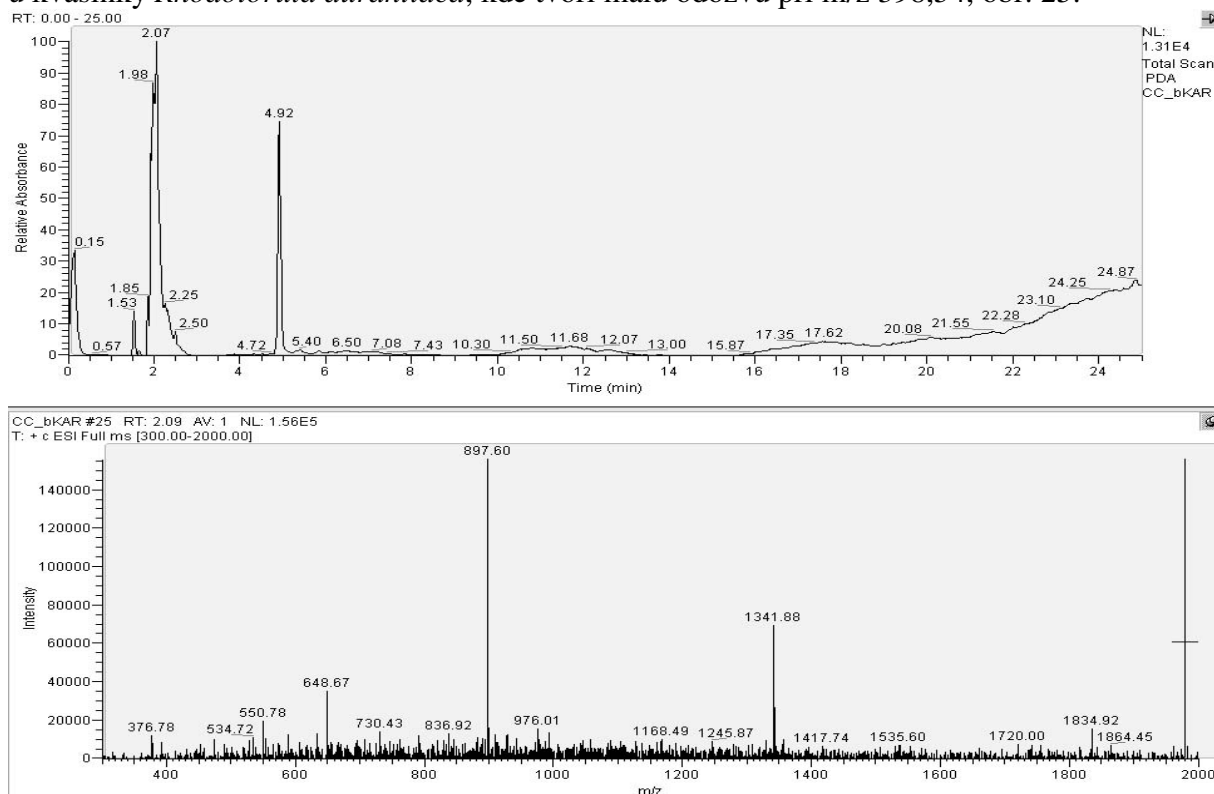


Obrázok 22: Hmotnostné spektrum štandardu β -karoténu v rôznej forme záznamu

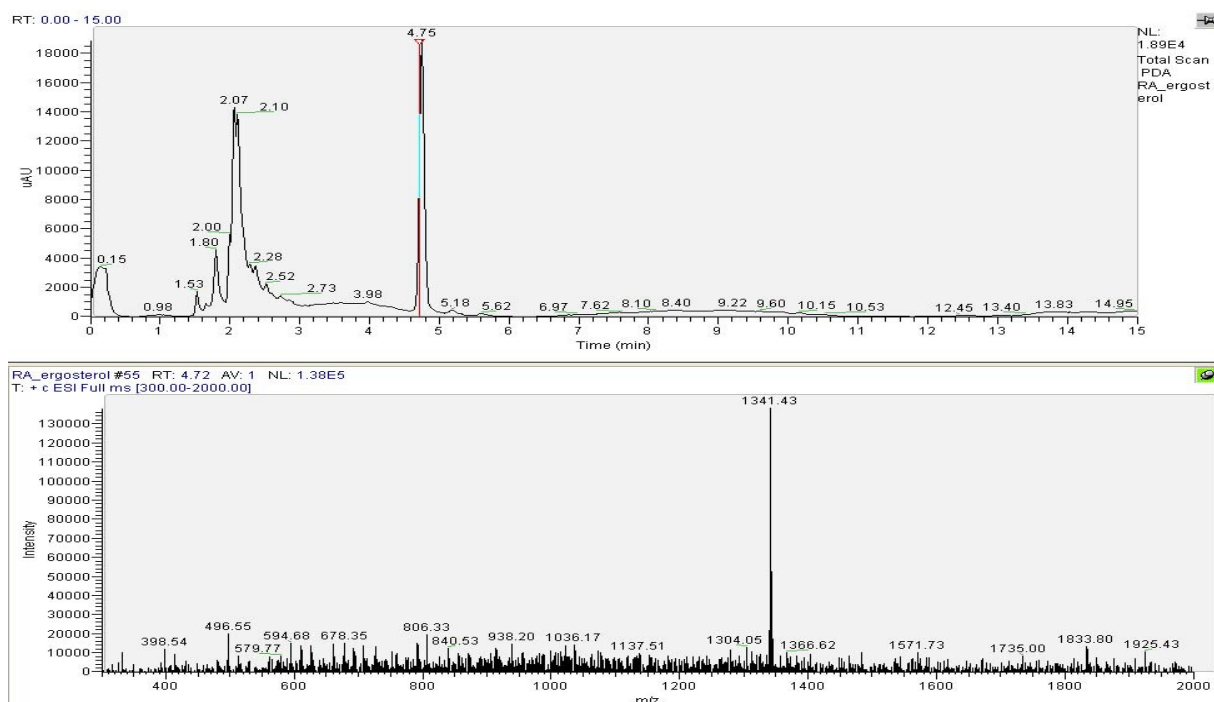


Obrázok 23: Hmotnostné spektrum extraktu *R. glutinis* [55]

V predloženej práci boli prevedené analýzy metódou LC/MS okrem štandardov aj u extraktov kvasiniek *Cystofilobasidium capitatum*, *Rhodotorula glutinis* a *Sporobolomyces roseus*. Ionizácia a následná detekcia pigmentov i ergosterolu neboli u všetkých kmeňov porovnateľne úspešné, najlepšie výsledky boli dosiahnuté u kvasinky *Cystofilobasidium capitatum*. Ako vyplýva z hmotnostného spektra uvedeného na obr. 24 a príslušného chromatogramu, je možné v hmotnostnom spektre nájsť čiary odpovedajúce torularhodinaldehydu (m/z 550,78) a torulenu (m/z 534,72). Podobne ergosterol je patrný len u kvasinky *Rhodotorula aurantiaca*, kde tvorí malú odozvu pri m/z 398,54, obr. 25.



Obrázok 24: Hmotnostné spektrum karotenoidov kvasinky *C. capitatum* (m/z 534,72 torulen, m/z 550,70 torularhodinaldehyd)



Obrázok 25: Hmotnostné spektrum ergosterolu od kvasinky *R. aurantiaca* (m/z 396,54 ergosterol)

Celkovo môžeme zhrnúť, že kombinovaná technika HPLC/PDA/MS-ESI predstavuje zlepšenie analýzy, je možné dosiahnuť nižších limitov detekcie, identifikovať molekulárne ióny karoténov a xantofylov. Na základe kombinácie dát boli určené semikvantitatívne zastúpené pigmenty u analyzovaných druhov kvasiniek, tab. 20.

Tabuľka 20: Orientačné zastúpenie jednotlivých pigmentov v extraktoch kvasiniek získané pomocou LC/PDA/MS (uvedené aj retenčné časy, kolóna Kinetex C18)

kvasinka	β -karotén	lykopén	torulén	torularhodin aldehyd	torularhodin
<i>C.capitatum</i>	-	+ 8,11	+++ 7,8	++ 7,05	++ 4.38
<i>R.aurantiaca</i>	++ 8,5	+ 8,16	+ 7,5	+/-	+ 4,5
<i>R.glutinis</i>	+++ 8,29	-	+ 7,40	-	+ 4,05
<i>S.roseus</i>	+++ 8,57	-	+ 7,68	-	+ 4,14

6 DISKUSIA

Karotenoidy sú jedny z najrošširenejších prirodzených pigmentov, ktoré sú prítomné vo všetkých typoch živých organizmov. Spôsobujú charakteristické žlté, oranžové až červené zafarbenie buniek. Sú schopné reagovať s kyslíkom, čím sa ľahko oxidujú a tým chránia živé organizmy pred pôsobením voľných radikálov.

V posledných rokoch sa intenzívne študuje mikrobiologická produkcia karotenoidov a jej možné využitie pred syntetickou výrobou. Rieši sa výber vhodných producentov a možnosti regulácie kultivácií za účelom maximálnej produkcie pigmentov, ktorá by nebola na úkor produkcie samotnej biomasy.

Táto práca bola zameraná na porovnanie možností regulácie produkcie karotenoidov u vybraných kmeňov karotenoidných kvasiniek. Študované kmene boli kultivované v štyroch kultivačných sériách na rôznych produkčných médiách s využitím odpadných substrátov. V tretej a štvrtej sérii boli vybrané druhy odpadov hydrolyzované pomocou enzýmových preparátov od štyroch kmeňov plesní. A to *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Aureobasidium pullulans* a *Phanerochaete chrysosporium*. Tieto enzýmové preparáty rozložili polysacharidy obsiahnuté v použitých odpadných substrátoch na jednoduchšie cukry, lepšie využiteľné kvasinkovými bunkami.

K štúdiu zmien v produkcii karotenoidov a biomasy boli použité tri kvasinkové kmene. Jednalo sa o kmene *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces roseus* a *Cystofilobasidium capitatum*. Keďže v minulých prácach už boli stanovené rastové charakteristiky *R. glutinis* a *S. roseus*, v tejto práci bola premeraná rastová charakteristika len kvasinky *C. capitatum*. Rastová krivka vykazovala dvojstupňový nárast typický pre karotenogénne kvasinky. Prvé mierne maximum sa nachádzalo okolo 60. hodiny rastu, druhé okolo 110. hodiny, kde následne rast prechádzal plynule do stacionárnej fázy. Okrem nárastu biomasy sa sledovali aj zmeny v produkcii β -karoténu a ergosterolu. Maximá produkcie pigmentov sa prakticky prekrývajú s maximami produkcie biomasy. U ergosterolu vidíme nárast produkcie hlavne v druhej časti exponenciálnej fázy. Občasné maximá je možné vidieť aj počas stacionárnej fázy rastu.

K analýze pigmentov bola použitá metóda HPLC s UV/VIS detekciou na vybranej chromatografickej kolóne Kinetex C18. Stanovenie množstva karotenoidov a ergosterolu bolo prevedené pomocou externej kalibrácie metódou kalibračnej krivky. Ku kvantitatívnemu vyhodnoteniu bola použitá závislosť plochy píkovej jednotlivých štandardov na koncentrácii.

Analyzované kmene kvasiniek kultivované v rovnakých produkčných médiách s prídavkom odpadných substrátov reagovali na tieto podmienky odlišne.

Kvasinka *Rhodotorula glutinis* vyprodukovala najviac biomasy zo všetkých skúmaných produkčných médií okrem kontrolného glukózového média v médiu s jablčnou vlákninou, či už hydrolyzovanou (najmä enzýmovým preparátom 1 a 3) alebo nehydrolyzovanou. V hydrolyzovaných médiách série 3 a 4 mala zvýšené produkcie biomasy oproti kontrole, a to najmä v médiu s hydrolyzovanou vlákninou enzýmovým preparátom 1 (7,738 g/l) a enzýmovým preparátom 3 (7,545 g/l). U kvasinky *Sporobolomyces roseus* boli najvyššie dosiahnuté produkcie biomasy v hydrolyzovaných médiách s enzýmovým preparátom 2 od

plesne *Fusarium solani*. Biomasa tu dosahovala hodnoty 5,819 g/l v médiu s hydrolyzovanou pšeničnou kašou. V médiu s hydrolyzovanou vlákninou produkcia dosahovala 5,158 g/l a s hydrolyzovanými cestovinami 5,340 g sušiny/l média. Kvasinka *Cystofilobasidium capitatum* mala najvyššie produkcie biomasy v kontrolných glukózových médiách (9,536 g/l). Zvýšené produkcie však nájdeme aj v médiách s prídavkom lyofilizovanej srvátky (8,961 g/l).

Najvyššie produkcie β -karoténu spomedzi študovaných kvasiniek nájdeme u kvasinky *Sporobolomyces roseus*. Súčasne však táto kvasinka produkuje najmenšie množstvo biomasy, čo je problematické pre jej potenciálne priemyselné využitie. V médiách s jablčnými šupkami, ktorým predchádzali ino II s kvasničným autolyzátom i s prídavkom jablčnej vlákniny miesto kvasničného autolyzátu, mali najvyššie dosiahnuté produkcie β -karoténu v porovnaní s ostatnými produkčnými médiami 5110,6 a 4954,3 $\mu\text{g/g}$ suš. Zvýšené produkcie oproti kontrolným médiám sa pozorujeme aj v hydrolyzovaných médiách s prídavkom cestovín (4319,16 $\mu\text{g/g}$ suš.) i v nehydrolyzovaných médiách s prídavkom cestovín (4776,38 $\mu\text{g/g}$ suš.). Kvasinka *Rhodotorula glutinis* mala najvyššiu produkciu β -karoténu v kontrolnom glukózovom médiu (1232,4 $\mu\text{g/g}$ suš.). V ostatných produkčných médiách bola produkcia vždy nižšia než v kontrolných médiách. U *Cystofilobasidium capitatum* nájdeme najvyššiu produkciu β -karoténu v médiu s obsahom jablčných šupiek, ktorému predchádzalo ino II s kvasničným autolyzátom. Z produkčných médií s obsahom odpadných subtrátov sa najlepšie javilo médium s pšeničnou kašou a s hydrolyzovanou pšeničnou kašou enzýmovým preparátom 3 od plesne *Aureobasidium pullulans*, kde produkcia dosiahla 322,58 μg β -karoténu/g suš. oproti kontrolnému médiu s produkciou 101,7 μg β -karoténu/g suš.

V produkcii lykopénu sa najviac darilo opäť kvasinke *Sporobolomyces roseus*. Najvyššiu dosiahnutú produkciu nájdeme v médiu s cestovinami (4295,96 $\mu\text{g/g}$ suš.), v médiách s obsahom hydrolyzovanej vlákniny nájdeme tiež zvýšené produkcie. U *Rhodotorula glutinis* je najvyššia produkcia lykopénu v kontrolných médiách, ktorým predchádzali ino II s kvasničným autolyzátom (4945,9 $\mu\text{g/g}$ suš.) aj s jablčnou vlákninou (5868 $\mu\text{g/g}$ suš.). Zvýšené produkcie nájdeme aj v médiu s obsahom vlákniny (2607,7 $\mu\text{g/g}$ suš.). Rovnako aj u kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* nájdeme najvyššie produkcie lykopénu v kontrolných médiách (1336 $\mu\text{g/g}$ suš.) a v médiách s obsahom vlákniny (1454,5 $\mu\text{g/g}$ suš.). Zvýšené produkcie nájdeme aj v hydrolyzovaných médiách s obsahom cestovín enzýmovými preparátmi 3 (738 $\mu\text{g/g}$ suš.) a 4 (982,7 $\mu\text{g/g}$ suš.)

Taktiež v produkcii ergosterolu bol zaznamenaný najvyšší nárast u kvasinky *Sporobolomyces roseus*. Môžeme teda usudzovať, že ako karotenoidy, tak aj ergosterol je vytváraný kvasinkou rovnako regulovanou metabolickou dráhou. Kvasinka vykazovala zvýšené hodnoty vo všetkých produkčných médiách. Najvyššiu produkciu však nájdeme v produkčnom médiu s obsahom vaječných cestovín (10891,6 $\mu\text{g/g}$ suš.). Kvasinka *Rhodotorula glutinis* produkovala v priemere podobné množstvá ergosterolu vo všetkých produkčných médiách, rovnako ako aj kvasinka *Cystofilobasidium capitatum*. Tu však občasné zvýšené produkcie nájdeme v médiách s obsahom vaječných cestovín (5496 $\mu\text{g/g}$ suš.).

Celkovo môžeme zhrnúť, že k najvýraznejšej indukcii produkcie pigmentov dochádza u kvasinky *Sporobolomyces roseus*, niekedy však na úkor produkcie biomasy. V niektorých

hydrolyzovaných produkčných médiách môžeme pozorovať, že nárast biomasy sa neznížil, dokonca sa mierne zvýšil (s enzýmovým preparátom 2 od *Fusarium solani* a 3 od *Aureobasidium pullulans*) a produkcia karotenoidov bola taktiež zvýšená. Naopak reagovala na produkčné médiá s obsahom odpadných substrátov kvasinka *Cystofilobasidium capitatum*. Produkcia biomasy sa oproti kontrolým médiám vždy znížila, produkcia karotenoidov bola zvýšená len v médiu s obsahom pšeničnej kaše. Kvasinka *Rhodotorula glutinis* najlepšie reagovala v produkcii biomasy na médium s obsahom vlákniny, hydrolyzovanej i nehydrolyzovanej.

Vhodnými kombináciami nutričných zdrojov a stresových podmienok môžeme doceliť niekoľkonásobné zvýšenie produkcie karotenoidov bez výrazného poklesu produkcie biomasy. Využívanie odpadových substrátov je ekonomicky významné i ekologicky prospešné. Takto obohatená biomasa by mohla byť využiteľná napríklad v krmivárskom priemysle, získané pigmenty na výrobu rôznych farmaceutických alebo potravinárskych preparátov.

7 ZÁVER

Cieľom práce koncipovanej ako porovnávacia štúdia bola regulácia produkcie karotenoidov a ergosterolu s využitím odpadných substrátov. Vybrané odpadné substráty boli hydrolyzované pomocou hydrolytických enzýmov produkovaných extracelulárne vybranými kmeňmi plesní. Sledovali sa rozdiely v produkcii biomasy, karotenoidov a ergosterolu v jednotlivých produkčných médiách u troch používaných kvasinkových kmeňov kultivovaných súčasne v štyroch kultivačných sériách.

U kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* bola prevedená kompletná rastová charakteristika pozostávajúca zo zostrojenia rastovej krivky, premerania množstva vyprodukovanej biomasy i zákalu. Ďalej bola analyzovaná produkcia β -karoténu a ergosterolu behom kultivácie. Bolo zistené, že rast biomasy aj produkcia sledovaných metabolitov sú charakteristické dvojfázovým prebehom s dvoma lokálnymi maximami.

Všetky používané kvasinkové kmene boli kultivované na produkčných médiách s obsahom odpadných substrátov nehydrolyzovaných alebo hydrolyzovaných pomocou enzýmových preparátov. Reakcia na tieto médiá bola druhovo špecifická. Zatiaľ čo kvasinka *Rhodotorula glutinis* mala najvyššie produkcie biomasy a pigmentov v kontrolných médiách, občas v médiách s prídavkom hydrolyzovanej i nehydrolyzovanej vlákniny, kvasinka *Sporobolomyces roseus* mala zvýšené produkcie biomasy aj karotenoidov v médiách hydrolyzovaných enzýmovými preparátmi, najviac od *Fusarium solani* a *Aureobasidium pullulans*. Hydrolyzované produkčné média najviac nevyhovovali v produkcii biomasy kvasinke *Cystofilobasidium capitatum*. Tu však bola zaznamenané zvýšené produkcie karotenoidov v hydrolyzovaných médiách enzýmovým preparátom 3 s prídavkom pšeničnej kaše, v hydrolyzovanom médiu s prídavkom vaječných cestovín enzýmovým preparátom od *Aureobasidium pullulans* a *Phanerochaete chrysosporium* boli vyprodukované zvýšené množstvá ergosterolu. Všetky použité enzýmové preparáty vykázali aktivitu proteázy, alfa-amylázy aj celulózy.

V práci bola prevedená optimalizácia chromatografickej analýzy karotenoidov výberom najvhodnejšej chromatografickej kolóny. Z pomedzi troch testovaných kolôn s odlišnými parametrami sa ako najlepšie javila kolóna Kinetex C18, ktorá dosahovala najnižšie retenčné časy testovaných štandardov a reálnych vzoriek z kultivácie kvasinky *C. capitatum*, ako aj najväčšiu kvantitatívnu odozvu signálu. Táto kolóna bola vybraná ako najvhodnejšia z testovaných a boli na nej prevedené kalibrácie sledovaných metabolitov pomocou štandardov.

Nakoniec bola testovaná nová metóda chromatografickej analýzy s hmotnostným detektorom LC/MS. Na kolónu boli aplikované vzorky vybraných štandardov aj reálne vzorky z kultivácii na kontrolných médiách. Hmotnostné spektrá štandardov β -karoténu a lykopénu boli namerané pomocou ionizácie v elektrospreji. Ionizácia a následná detekcia pigmentov i ergosterolu v extraktoch vybraných kvasiniek neboli u všetkých kmeňov porovnateľne úspešné, najlepšie výsledky boli dosiahnuté u kvasinky *Cystofilobasidium capitatum*. Testovaná kombinovaná technika HPLC/PDA/MS-ESI predstavuje zlepšenie analýzy, umožňuje dosiahnuť nižšie limity detekcie a identifikovať molekulárne ióny karoténov a xantofylov.

8 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] Vodrážka Z.: Biochemie, Academia Praha, 1996
- [2] Velíšek J.: Chemie potravin 3. 1. vyd. Tábor: Osis, 1999.
- [3] Kocková-Kratochvílová A.: Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov, Alfa Bratislava, 1990
- [4] Richtera M., Páca J.: Bioinženýrství kvasných procesů, 1985
- [5] Owen R. F.: Food chemistry, Marcel Decker. Inc. New York, 1996
- [6] Klouda P.: Moderní analytické metody, Pavel Klouda Ostrava, 1996
- [7] Zachar D., Humánná výživa II. Živiny, TU Zvolen, 2004
- [8] Šilhánková L.: Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology, Victoria Publishing Praha, 1995
- [9] Masák J., Pelechová J., Plachý J.: Speciální mikrobiální technologie, VŠCHT Praha, 1992
- [10] Hezinová V., Diplomová práce, FCH VUT, Brno 2007
- [11] Armstrong, G.A., Hearst, J.E.: Genetics and molecular biology of karotenoid pigment biosynthesis, FASEB J., 1996, 10, s. 228-237
- [12] Kocková-Kratochvílová A.: Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy, Alfa Bratislava, 1982
- [13] Sandmann G., Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants, European Journal Biochemistry, 2005, p. 7-24
- [14] Park P. K., Kim E. Y., Chu K. H.: Chemical disruption of trast cell for the isolation of karotenoid pigments, Separation and Purification Technology, 53 (2007), 148-152
- [15] Kocková-Kratochvílová A.: Kvasinky, SNTL Bratislava, 1957
- [16] Sampaio J. P., Gadanho M. Bauer R.: Taxonomic studies on the genus *Cystofilobasidium*: description of *C. ferigula* sp. nov. and clarification of the status of *C. lari-marini*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 221-229
- [17] E.A. Johnson: *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey, Int. Microbiol. 6 (2003) 169– 174
- [18] Walker G.M.: Yeast: Physiology and biotechnology. John Wiley and Sons Ltd., 1998. 350 pp.
- [19] Chi Z.M., Wang F., Chi Z., Yue L., Liu G., Zhang T.: Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. Appl. Microbiol. Biotechnol. 82, pp.793-804, 2009.
- [20] Solarska S., May T., Roddick F.A., Lawrie A.C.: Isolation and screening of natural organic matter-degrading fungi. Chemosphere 75, pp. 751-758, 2009.
- [21] Kudryavtseva O.A., Dunaevsky Y.E., Kamzolkin O.V., Belozersky M.A.: Fungal Proteolytic Enzymes: Features of the Extracellular Proteases of Xylotrophic Basidiomycetes Microbiology, 77, No. 6, pp. 643–653, 2008.
- [22] Bouws H., Wattenberg A., Zorn H.: Fungal secretomes – nature’s toolbox for white biotechnology. Appl. Microbiol. Biotechnol. 80, pp.381-388, 2008.
- [23] Tanaka H., Koike K., Itakura S., Enoki A.: Degradation of wood and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora*. Enzyme and Microbial Technology 45, pp.384-390, 2009.
- [24] Veselá M., Drdák M.: Praktikum z obecné mikrobiologie, VUT Brno, 1999
- [25] Betina V., Mikrobiológia 1, STU Bratislava, 1995
- [26] D. Somashekar, R. Joseph: Inverse relationship between carotenoid and lipid formation

- in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium, World J. Microbiol. Biotechnol. 16 (2000) 491–493.
- [27] Čopíková J., Chemie a analytika sacharidů, VŠCHT Praha, 1997
 - [28] Velíšek, J.: Chemie potravin 1, 1. vyd. Tábor: Ossis, 1999
 - [29] Příhoda, J., Skřivan, P., Hrušková M.: Cereální chemie a technologie 1, VŠCHT, Praha, 2003
 - [30] Kadlec P., Technologie potravin II, VŠCHT Praha, 2002
 - [31] 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. Taylor and Francis Group LLt, 2009.
 - [32] Němec M., Horáková D.: Základy mikrobiologie, MU Brno, 1999
 - [33] Andreishcheva E.N., Zvyagilskaya R.A.: Adaptation of yeasts to salt stress, Appl. Biochem. Microbiol. 35 (3), str. 217-228, 1999
 - [34] Rozsypal S.: Úvod do molekulární biologie III, Stanislav Rozsypal Brno, 1997
 - [35] Kocková-Kratochvílová A. a kol.: Kvasinky ve výzkumu a praxi, Academia Praha, 1986
 - [36] Příbela A.: Analýza potravin, STU Bratislava, 1991
 - [37] Davídek J. a kol.: Laboratorní příručka analýzy potravin, SNTL Praha, 1977
 - [38] Churáček J., Jandera P., Separace látek – kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie, VŠCHT Pardubice, 1986
 - [39] Pacáková V., Štulík P., High performance liquid chromatography, SPN Praha, 1990
 - [40] Oficiální výukové stránky Ústavu informačních studií a knihovnictví FF UK
<http://www.cuni.cz/~brt/bibref/bibref.html>
 - [41] Zdráhal, Z., Plocek, J., Konečný, P., Chmelík, J.: Charakterizace biopolymerů hmotnostní spektrometrií, *Chemické listy* 91, 1997, s. 811-818
 - [42] Barker, J.: *Mass Spectrometry*, Wiley-VCH, 2000
 - [43] Štulík K.: *Analytické separační metody*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2004.
 - [44] Jelínek, I.: *Hmotnostní spektrometrie ve spojení se separačními technikami*, Praha, VŠCHT, [online]. 2009 [cit. 2009-04-16]. Dostupné z [www: http://www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/Jelinek.pdf](http://www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/Jelinek.pdf)
 - [45] Bramer S. E. V.: *An Introduction to Mass Spectrometry*. Chester: Widener University, 1997
 - [46] Careri, M., Mangia, A., Musci, M.: Overview of the applications of liquid chromatography-mass spectrometry interfacing systems in food analysis: naturally occurring substances in food, *Journal of Chromatography A* 794, str. 263-297, 1998.
 - [47] Abian, J.: The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry, *Journal of mass spectrometry* 34, str. 157-168, 1999
 - [48] Hároníková A., Bakalářská práce, FCH VUT, Brno 2008
 - [49] Z. Aksu, A.T. Eren: Carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source, *Process Biochem.* 40 (2005) 2985–8 2991
 - [50] Márová I., Čarnecká M., Halienová A., Kočí R., Breierová E.: Production of carotenoid/ergosterol-supplemented biomass by red yeast *Rhodotorula glutinis* grown under external stress. *Food Technology and Biotechnology*, 48(1), 2010, p.56-61
 - [51] C. Malisorn, W. Suntornsuk: Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM 28 in fermented radish brine, *Bioresour. Technol.* 99 (2007) 2281–2287.

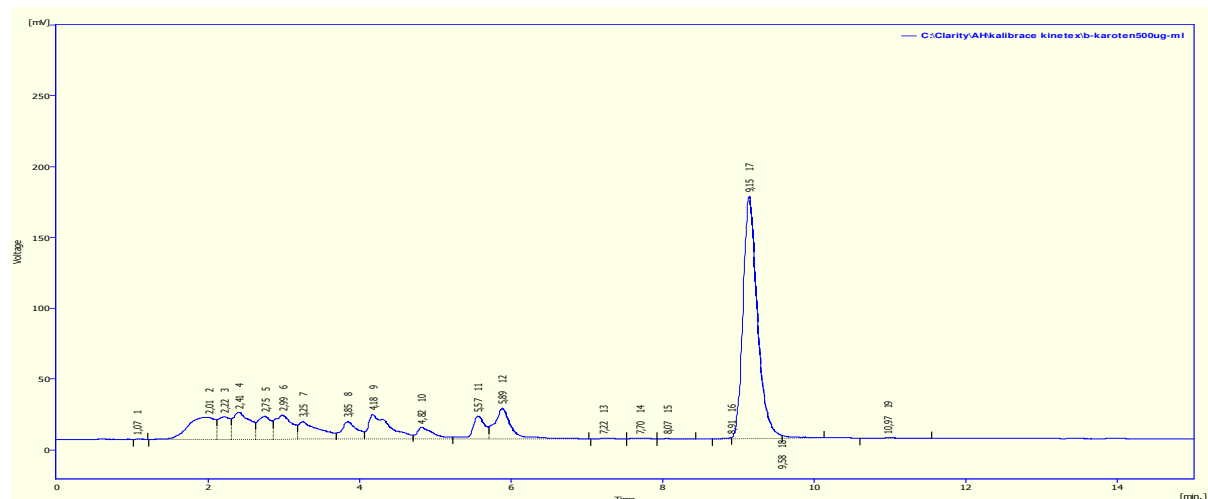
- [52] P. Davoli, V. Mierau, W.S. Weber: Carotenoids and fatty acid in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*, Appl. Biochem. Microbiol. 23 40(4) (2004) 392-397.
- [53] Kočí R., Dizertační práce, FCH VUT, Brno 2006
- [54] Dvořáková T.: Diplomová práce, FCH VUT Brno, 2008
- [55] Čarnecká M., Dizertační práce, FCH VUT, Brno 2009

9 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

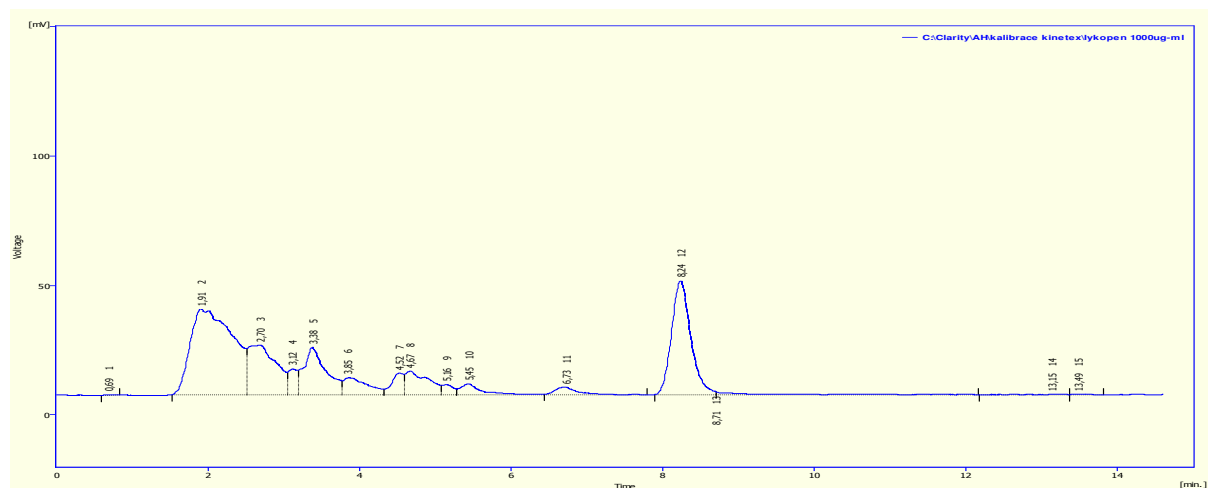
UV	Ultra-violet = ultrafialové svetlo
MS	Hmotnostná spektrometria
PDA	„Photo-diode array“ (detektor diodového poľa)
APCI	Chemická ionizácia v atmosférickom tlaku
ESI	Ionizácia elektrosprejom
LC	Kvapalinová chromatografia
HPLC	Vysoko-účinná kvapalinová chromatografia
UPLC	Ultra vysoko-tlaká kvapalinová chromatografia
HMG-CoA	β -hydroxy-methylglutaryl-CoA
RG	<i>Rhodotorula glutinis</i>
CC	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>
SR	<i>Sporobolomyces roseus</i>
AA	<i>Alternaria alternata</i>
FS	<i>Fusarium solani</i>
AP	<i>Aureobasidium pullulans</i>
PCH	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>

10 PRÍLOHY

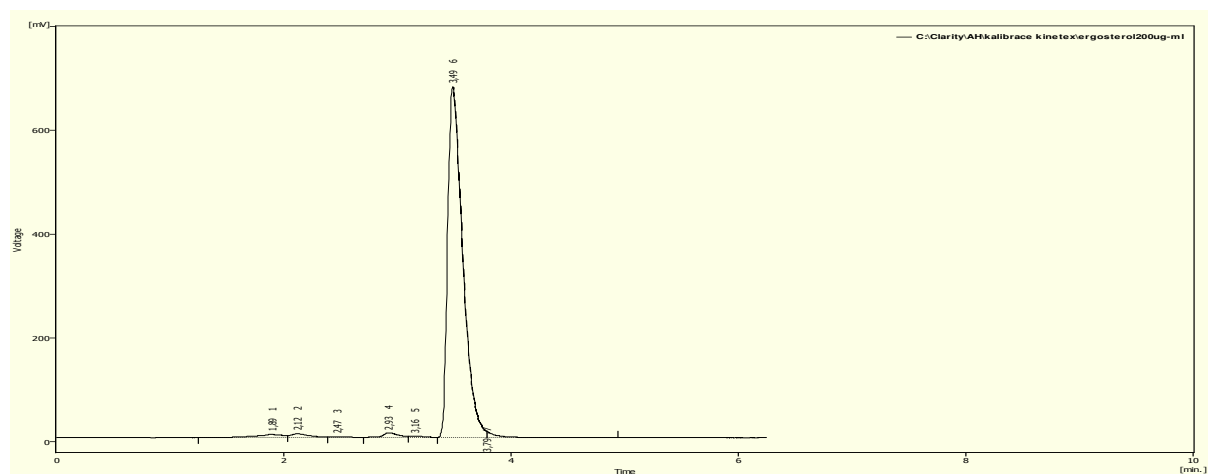
Príloha 1: štandardy namerané metódou RP-HPLC s UV/VIS detekciou, izokratickou elúciou, mobilná fáza metanol, pri prietoku 1,0 ml/min



A: Štandard β -karoténu – kolóna Kinetex C18

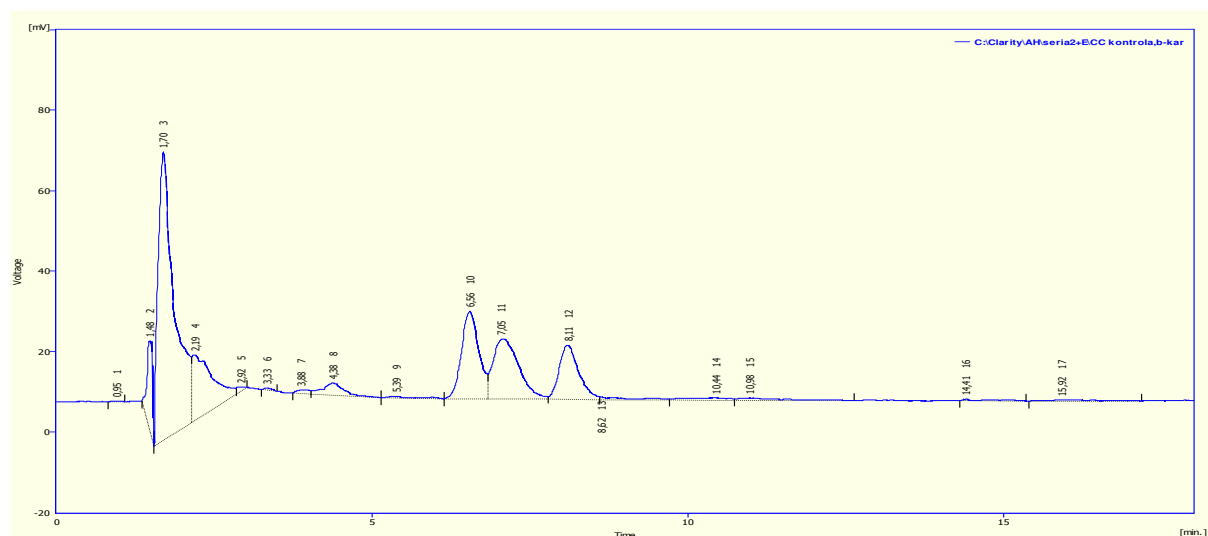


B: Štandard lykopénu – kolóna Kinetex C18

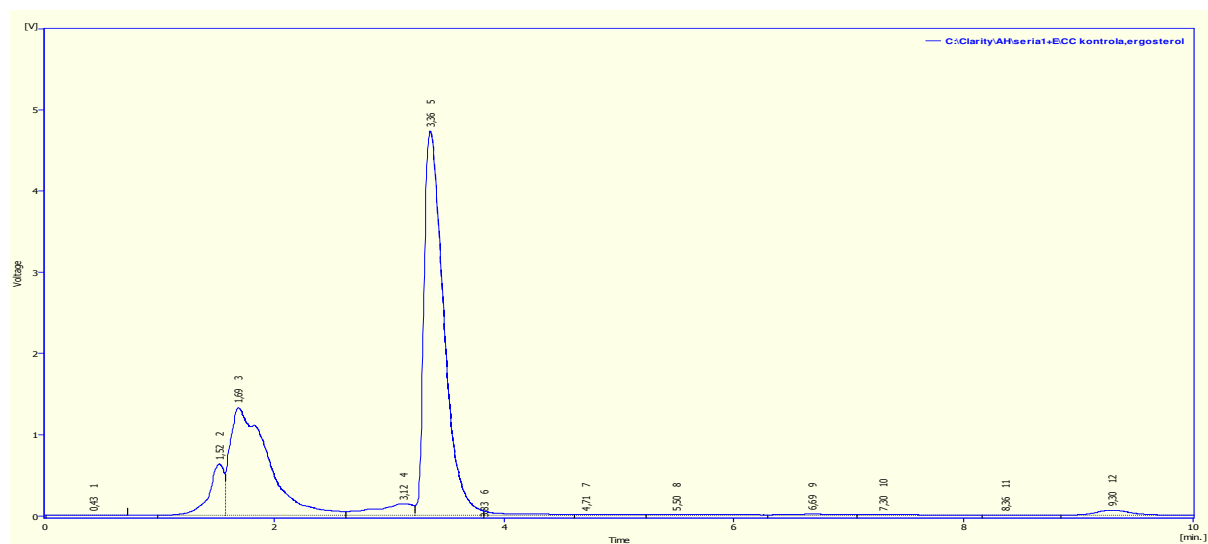


C: Štandard ergosterolu – kolóna Kinetex C18

Príloha 2: Chromatogramy extraktu kvasinky *C. capitatum* namerané metódou RP-HPLC s UV/VIS detekciou, izokratickou elúciou, mobilná fáza methanol, pri prietoku 1,0 ml/min

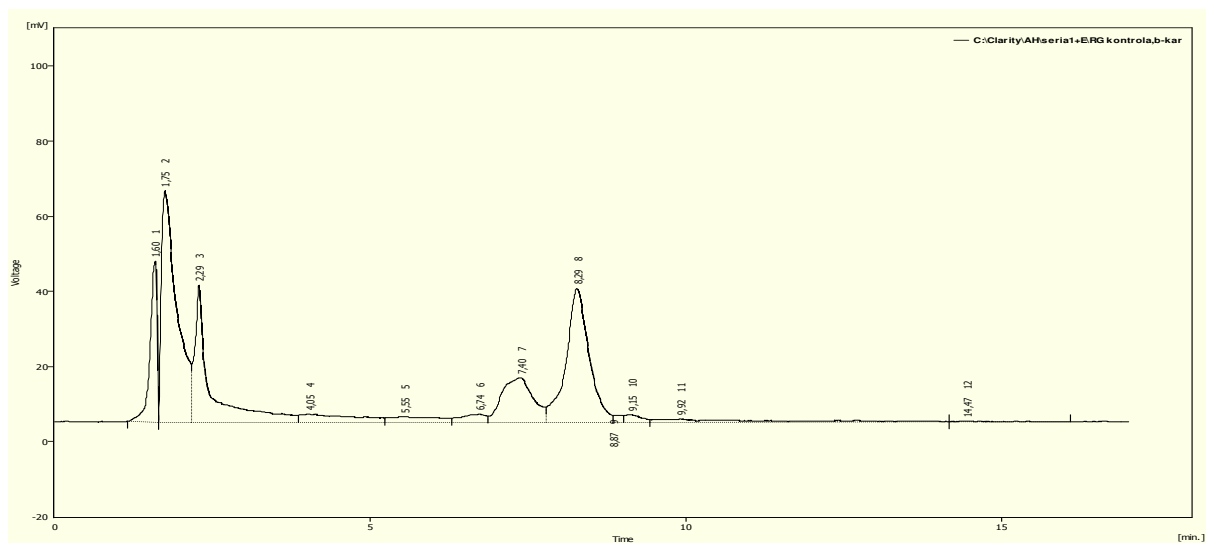


A: Chromatogram β -karoténu extraktu kvasinky *C. capitatum* – kolóna Kinetex C18

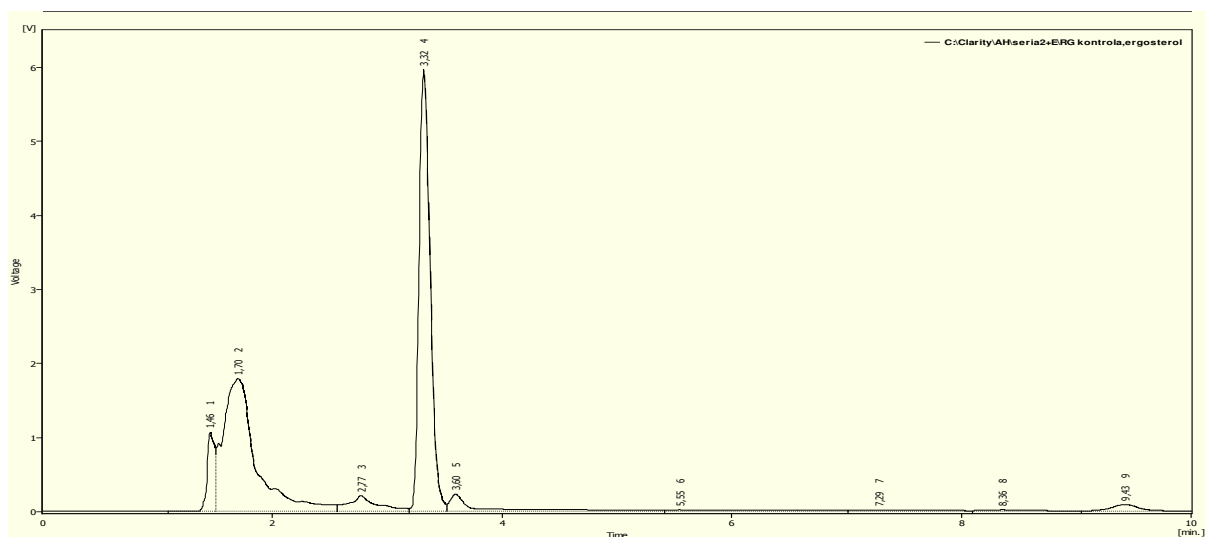


B: Chromatogram ergosterolu extraktu kvasinky *C. capitatum* – kolóna Kinetex C18

Príloha 3: Chromatogramy extraktu kvasinky *R. glutinis* namerané metódou RP-HPLC s UV/VIS detekciou, izokratickou elúciou, mobilná fáza methanol, pri prietoku 1,0 ml/min

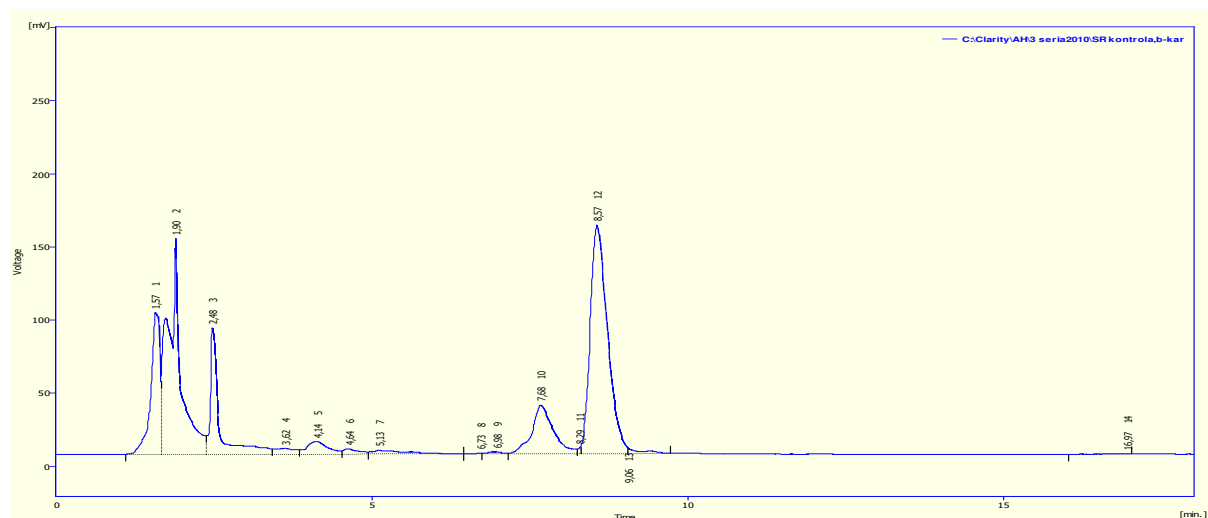


A: Chromatogram β -karoténu extraktu kvasinky *R. glutinis* – kolóna Kinetex C18

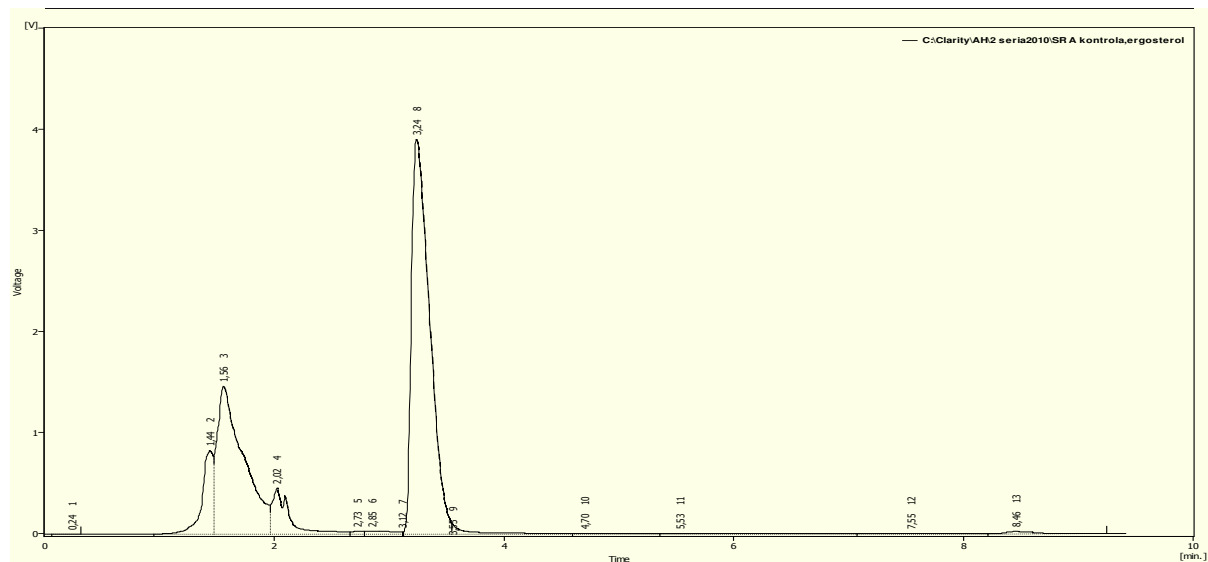


B: Chromatogram ergosterolu extraktu kvasinky *R. glutinis* – kolóna Kinetex C18

Príloha 4: Chromatogramy extraktu kvasinky *S. roseus* namerané metódou RP-HPLC s UV/VIS detekciou, izokratickou elúciou, mobilná fáza methanol, pri prietoku 1,0 ml/min



A: Chromatogram β -karoténu extraktu kvasinky *S. roseus* – kolóna Kinetex C18



B: Chromatogram ergosterolu extraktu kvasinky *S. roseus* – kolóna Kinetex C18