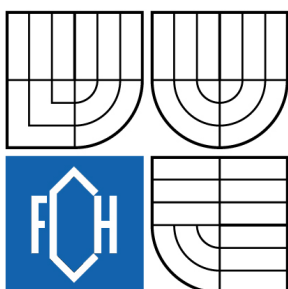




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PRODUKCE KAROTENOIDŮ KVASINKAMI S VYUŽITÍM ODPADNÍCH SUBSTRÁTŮ

PRODUCTION OF CAROTENOIDS BY RED YEASTS GROWN ON SOME WASTE SUBSTRATES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

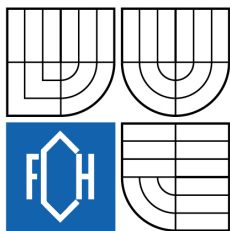
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

MARTINA KUBÁČKOVÁ

VEDOUcí PRÁCE
SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2009



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0355/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Martina Kubáčková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí bakalářské práce:	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti bakalářské práce:		

Název bakalářské práce:

Produkce karotenoidů kvasinkami s využitím odpadních substrátů

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše - přehled mikrobiálních producentů karotenoidů, struktura, funkce a průmyslové využití karotenoidních pigmentů.
2. Produkce karotenoidů vybranými kvasinkami rodu *Rhodotorula* a *Sporobolomyces* - růstové charakteristiky, analýza pigmentů metodou HPLC.
3. Využití vybraných typů odpadních substrátů ke kultivaci karotenogenních kvasinek.

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

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

Martina Kubáčková
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Karotenoidy představují jednu z nejrozšířenějších a nejpočetnějších tříd přírodních pigmentů s využitím v potravinářství, farmacii i kosmetice. Předložená bakalářská práce byla pojata jako srovnávací studie využití různých odpadních substrátů ke kultivaci kvasinek rodu *Rhodotorula glutinis* jako producentů karotenoidních barviv. Kvasinky byly kultivovány na různých živných médiích, kde se jako nutriční zdroje využívali různé druhy odpadních substrátů (např. bramborový odpad, jablečný odpad, obilniny, mláto, apod.). Do některých substrátů byly také přidány hydrolytické enzymy rozkládající polysacharidy. Tyto enzymy byly izolovány z plísně rodu *Fusarium*. Většina studovaných odpadních substrátů se prokázala jako použitelné médium ke kultivaci. Nejlepší podmínky pro produkci biomasy obohacené o karotenoidní barviva (6,4 g/l biomasy obohacené až 3,2 mg β -karotenu/g sušiny) měla živná média zpracovaná pomocí hydrolytických enzymů.

SUMMARY

Carotenoids belong to the most widespread and abundant classes of natural pigments with utilised in food industry, pharmacy and cosmetics. Presented work was realized as a comparative study of some substrates for cultivation of red yeast *Rhodotorula glutinis*, which produces carotenoid pigments. Yeasts were cultivated in different media with several waste substrates (for example potato fiber, apple waste, cereals, grains, etc.) as nutrition sources. To some substrates hydrolytic enzymes isolated from the fungi genus *Fusarium* were added. Majority of waste substrates were acceptable for cultivation. However, the best conditions for production of carotenoid enriched biomass (6,4 g/l of biomass enriched 3,2 mg /g of beta-carotene) exhibited media with hydrolytic fungal enzymes.

KLÍČOVÁ SLOVA

kvasinky, karotenoidy, odpadní substráty, *Rhodotorula glutinis*

KEYWORDS

yeasts, carotenoids, waste substrates, *Rhodotorula glutinis*

KUBÁČKOVÁ, M. *Produkce karotenoidů kvasinkami s využitím odpadních substrátů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 53 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za odborné vedení v průběhu práce a Ing. Terezii Dvořákové za ochotu a pomoc při řešení experimentální části práce.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1. Kvasinky	8
2.1.1. Struktura kvasinkové buňky	8
2.1.2. Rozmnožování kvasinek	9
2.1.3. Rozdělení kvasinek	10
2.1.4. Karotenogenní kvasinky	11
2.1.5. Výskyt kvasinek a jejich význam	12
2.2. Další mikroorganismy produkující karotenoidní barviva	13
2.3. Karotenoidy	14
2.3.1. Vlastnosti	14
2.3.2. Struktura	15
2.3.3. Význam	15
2.3.4. Biosyntéza karotenoidů	16
2.4. Kultivace a růst mikroorganismů	17
2.4.1. Živná média	17
2.4.2. Růstová křivka	19
2.4.3. Vliv různých vnějších faktorů na růst a rozmnožování mikroorganismů	21
2.5. Izolace a analýza karotenoidů	22
2.5.1. Absorpční spektrometrie v UV-VIS oblasti	22
2.5.2. Extrakce	23
2.5.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie - HPLC	23
3. CÍL PRÁCE	25
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1. Použité chemikálie	26
4.1.1. Chemikálie použité na kultivaci kvasinek	26
4.1.2. Chemikálie použité na izolaci karotenoidů	26
4.1.3. Chemikálie použité pro HPLC	26
4.2. Přístroje a pomůcky	26
4.2.1. Pomůcky pro kultivaci kvasinek	26
4.2.2. Pomůcky pro izolaci a analýzu karotenoidů	26
4.3. Použité kvasinkové kmeny	27
4.4. Kultivace mikroorganismů	27
4.4.1. Podmínky kultivace	27
4.4.2. Inokulum I	27
4.4.3. Inokulum II	27
4.4.4. Produkční média	28
4.5. Zpracování biomasy	30
4.6. Izolace a analýza karotenoidů	30
4.6.1. Izolace karotenoidů zmýdlením a následnou extrakcí	30
4.6.2. Příprava vzorku pro HPLC	31
4.6.3. Analýza karotenoidů metodou HPLC/UV-VIS	31
4.6.4. Identifikace a kvantifikace karotenoidů	31

5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	32
5.1.	Morfologické změny kvasinek v závislosti na typu produkčních médií.....	32
5.1.1.	Morfologické změny kvasinek 1. série kultivace.....	32
5.1.2.	Morfologické změny kvasinek 2. série kultivace.....	33
5.1.3.	Morfologické změny kvasinek 3. série kultivace.....	35
5.1.4.	Morfologické změny kvasinek 4. série kultivace.....	36
5.2.	Produkce karotenoidů na různých typech médií	38
6.	ZÁVĚR.....	45
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	46
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	49
9.	SEZNAM PŘÍLOH.....	50
10.	PŘÍLOHY.....	51

1. ÚVOD

Karotenoidy patří do skupiny tetraterpenů a jsou to jedny z nejrozšířenějších přírodních pigmentů. Vyskytují se v rostlinné, mikrobiologické i živočišné říši, kde způsobují charakteristické žluté až červené zbarvení způsobené přítomností konjugovaných dvojných vazeb. Jsou produkty především fotosyntetizujících organismů, ale mohou je produkovat i nefotosyntetizující organismy, jako jsou některé bakterie, kvasinky či plísně. Živočichové je neumí syntetizovat, pouze je přijímají z potravy jako rostlinné karotenoidy, které jsou pak schopny přeměnit na své potřebné formy. Hromadí se na vnitřní straně cytoplazmatické membrány buněk, často vázané na lipidy.

Karotenoidy jsou vysoce foto- a termolabilní a rozkládají se působením vzdušného kyslíku. Jsou velmi účinnými antioxidanty, slouží k ochraně buňky před účinkem UV záření a k přenosu energie ve fotosyntéze. Díky svému systému dvojných vazeb zachycují a neutralizují volné radikály. Podílejí se na otvírání mezibuněčných mezerových spojů, sloužících ke vzájemné komunikaci buněk řídící růst, vývoj a diferenciaci buněk. Díky těmto schopnostem se využívají k léčbě celé řady degenerativních onemocnění, jako např. rakoviny, či kardiovaskulárních a jiných vážných onemocnění. Jsou také prekurzory mnoha hormonů a některé karotenoidy jsou provitaminem A.

Díky svým vlastnostem nalezly karotenoidy uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích. V potravinářství k výrobě potravinářských barviv a potravinových doplňků, v zemědělství k výrobě krmiv, či kosmetickém a farmaceutickém průmyslu.

Vzhledem k významným vlastnostem karotenoidů a jejich širokému využití se neustále studují nové možnosti jejich vysoké produkce a nejefektivnější izolace. Stále se ještě vyrábí synteticky, ale v současné době se začíná upřednostňovat a více studovat jejich mikrobiální produkce oproti syntetické přípravě či izolaci z rostlinného materiálu. Je prováděna celá řada experimentů s cílem nalézt vhodné mikrobiální producenty karotenoidů a vhodné kultivační podmínky vedoucí k jejich nadprodukci. K tomuto účelu se také využívají metody genového inženýrství vedoucí k cílené nadprodukci pigmentů.

Předložená bakalářská práce byla zaměřena na srovnání produkce biomasy a karotenoidů kvasinkou rodu *Rhodotorula glutinis* s využitím různých odpadních substrátů přidaných do živných médií. Cílem bylo najít média o takovém složení, která by mohla vést ke zvýšené produkci karotenoidů a zároveň by negativně neovlivnila růst buněk.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Kvasinky

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní organismy, patřící do říše houby (Fungi). Buňky kvasinek tvoří rozmanité tvary i velikosti, související s jejich taxonomií, způsobem rozmnožování, prostředím ve kterém se nacházejí či stáří buněk. Nejčastější tvar je elipsoidní, vejčitý až kulovitý. Vyskytuje se však i tvar podobný citronu, trojúhelníkovitý či válcovitý [1, 2, 3].

2.1.1. Struktura kvasinkové buňky

Buňka kvasinky se skládá z pevné buněčné stěny, cytoplazmatické membrány, cytoplazmy, obsahující celou řadu buněčných struktur, a jádra.

Buněčná stěna kvasinek má silnou, ale zároveň elastickou strukturu, která dává buňce tvar a chrání ji před vnějšími mechanickými vlivy a osmotickým tlakem. Hlavní složkou jsou polysacharidy tvořící hustou pevnou síť. Některé druhy kvasinek, jako např. příslušníci rodu *Cryptococcus* či *Lipomyces*, tvoří na povrchu buněčné stěny polysacharidové obaly ve formě pouzder [1, 4].

Cytoplazmatická membrána je poměrně tenká, složená z lipidů a proteinů. Tvoří osmotické rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím a je sídlem transportních mechanismů. Neobsahuje však dýchací enzymy a systém oxidační fosforylace. Buňka ohraničená cytoplazmatickou membránou bez buněčné stěny či pouzder se nazývá protoplast [1, 3].

Cytoplazma je hlavně u mladých buněk kvasinek průhledná, homogenní hmota. Obsahuje systém dvojité membrány – tzv. endoplazmatické retikulum, obsahující různé enzymy, rezervní látky a zrníčka polyzomů, tj. agregátů ribozomů sloužících k syntéze bílkovin. Dále jsou v cytoplazmě kvasinek přítomny mitochondrie, které jsou sídlem dýchacích enzymů a systému oxidační fosforylace. Jejich hlavní stavební složkou jsou bílkoviny, lipidy a fosfolipidy. Obsahují také RNA a DNA zajišťující mimojadernou dědičnost kvasinek. Dalším membránovým útvarem v cytoplazmě kvasinek je Golgiho aparát ve formě plochých cisteren nebo-li diktyozomů s uvolňujícími se měchýřky, jejichž funkcí je transport prekurzorů buněčné stěny z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu [1, 3].

K nejnápadnější složce cytoplazmy kvasinek patří vakuola. Je většinou kulovitého tvaru a ohraničená jednoduchou membránou – tzv. tonoplastem. U mladých buněk kvasinek jsou většinou přítomny malé vakuoly, kdežto u starších jen jedna velká. Uvnitř vakuol se nacházejí hydrolytické enzymy sloužící k rozkladu vlastních struktur buňky. Kromě toho jsou vakuoly rezervoárem látek, jež se právě neúčastní metabolismu [1].

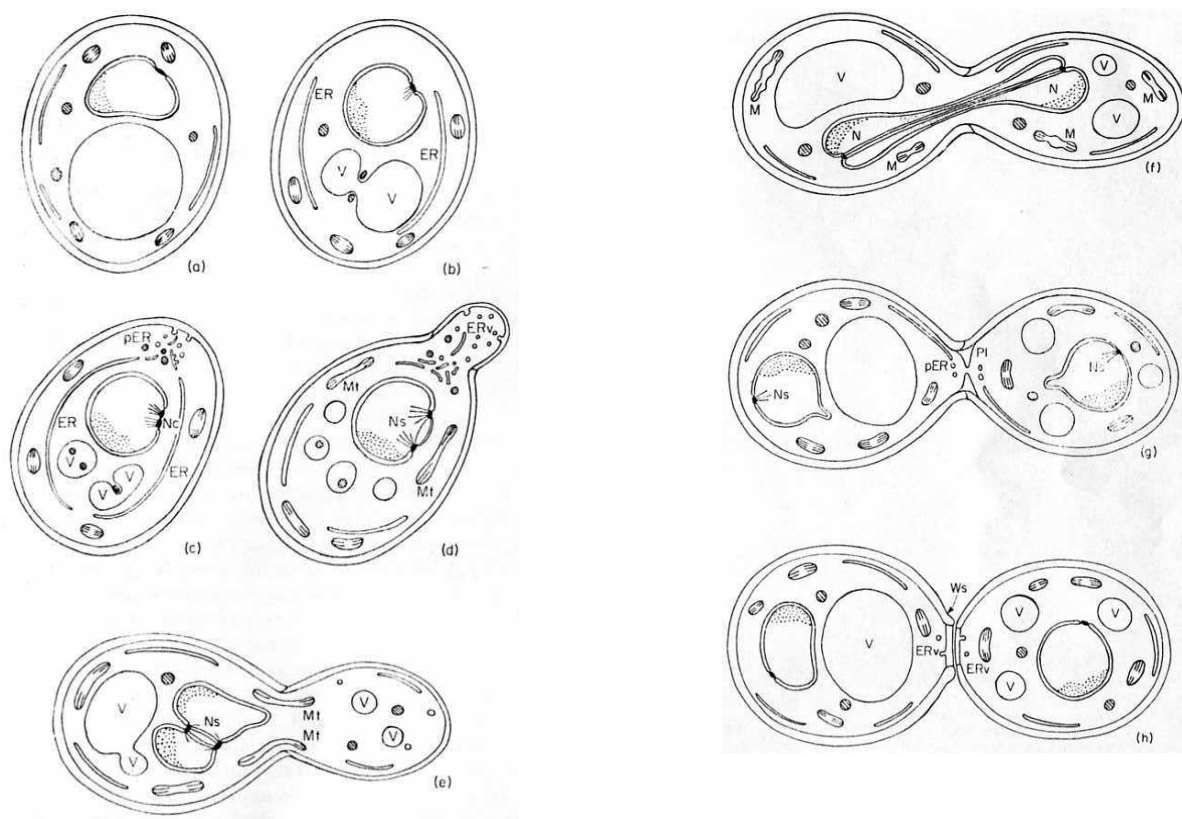
Jádro je od cytoplazmy odděleno dvojitou jadernou membránou a je uloženo přibližně ve středu buňky. Základní hmota jádra se nazývá chromatin, který se organizuje během dělení buňky do chromozomů. Těsně pod jadernou membránou je umístěno jadérko srpkovitého tvaru, kde se soustřeďuje přibližně jedna pětina RNA celého jádra. Dále se v jádře nachází pólové tělísko, z kterého vycházejí vlákna zvaná mikrotubuly. Mikrotubuly spolu s tělískem hrají důležitou roli při dělení jádra během rozmnožování buněk [1, 2, 3].

2.1.2. Rozmnožování kvasinek

U kvasinkových buněk existují v podstatě dva typy rozmnožování, a to vegetativně pučením či dělením nebo pohlavně vytvářením askospor či bazidiospor [5].

2.1.2.1. Vegetativní rozmnožování

Většina rodů kvasinek se vegetativně rozmnožuje pučením. Před pučením dochází ke splývání membrán endoplazmatického retikula, jeho rozrůstání a poté dělení a dále probíhá opětovné dělení vakuol a prodlužování mitochondrií. Do tvořícího se pupenu vstupují nejprve drobné vakuoly a mitochondrie. Současně probíhá mitotické dělení jádra a poté jeho migrace do pupenu. S jádrem přecházejí do pupenu i další složky cytoplazmy. Poté dojde k vytvoření cytoplazmatické membrány mezi mateřskou a dceřinou buňkou. V pupenu dojde k intenzivní syntéze a rozšiřování endoplazmatického retikula, vytvoření buněčné stěny a spojování drobných vakuol. Celý cyklus buněčného dělení trvá za optimálních růstových podmínek asi dvě hodiny a je znázorněn na obrázku 1 [1, 5].



Obrázek 1: Rozmnožování kvasinek pučením [4]

a = buňka v klidu, b = splnutí částí endoplazmatického retikula (ER), dělení vakuol, c = prodlužování ER, dělení polárního tělíska, d = dělení ER, vznik pupenu a dělicího vřeténka, e = migrace vakuol a mitochondrií do pupenu, mitotické dělení jádra, f = migrace jádra do pupenu, g = vytvoření cytoplazmatické membrány, h = dělení buněčných organel v pupenu, vytvoření buněčné stěny

Většinou se dorostlá dceřiná buňka ihned od mateřské buňky oddělí, ale v některých případech tomu tak nemusí být. Buňky zůstanou spojeny i po několikerém dělení a vznikne tzv. pseudomycelium. Pseudomycelium se často rozrůstá na okrajích kolonií, čímž obstarává novou výživu. K vytváření pseudomycelia dochází např. i u druhu *Rhodotorula glutinis* [1, 5].

Dalším způsobem vegetativního rozmnožování je příčné dělení a vytváření tzv. pravého mycelia. Pravé mycelium se skládá ze dvou nebo více jaderných článků, mezi nimiž se nachází přehrádky s velmi malými póry, kterými pulzuje cytoplasma bez buněčných struktur. Tento způsob rozmnožování se nazývá vegetativně fruktifikační a je typický hlavně pro rod *Candida* [5].

Existuje také zvláštní případ rozmnožování dělením bez tvorby mycelia, kdy se po rozdělení dceřiná buňka vždy od mateřské buňky oddělí. Tento způsob rozmnožování se vyskytuje u rodu *Schizosacharomyces*.

Přechodem mezi pučením a dělením je tzv. pučení na široké základně, přičemž je dceřiná buňka spojena širokým krčkem s mateřskou. Pučení na široké základně je typické např. pro rod *Sacharomycodes*.

Některé rody kvasinek třídy *Basidiomycetes* tvoří tzv. balistospor, což jsou jednobuněčné exospor na tenkých stopkách zvaných sterigmata. Zralé spory jsou z těchto stopek odmršťovány pomocí zvláštního kapalinového mechanismu. Odstřelování balistospor je typické např. pro rod *Sporobolomyces* [1, 5].

2.1.2.2. Pohlavní rozmnožování

Vedle vegetativního rozmnožování je u většiny kvasinek znám i pohlavní způsob rozmnožování. Podle způsobu pohlavního rozmnožování rozdělujeme kvasinky do dvou tříd, *Ascomycetes* a *Basidiomycetes*, lišících se nejen způsobem rozmnožování. Druhy kvasinek, u kterých nebylo dokázáno pohlavní rozmnožování, se zařazují do pomocné třídy *Deuteromycetes* a označují se jako tzv. imperfektní neboli anamorfní formy (tzn. existuje u nich jen jeden párovací typ) *Ascomycetes* nebo *Basidiomycetes* [1, 5].

Pohlavní rozmnožování je obecně charakterizováno konjugací dvou většinou pohlavně odlišných haploidních buněk a spojením jejich jader, čili karyogamií, za vzniku diploidního jádra. Poté se diploidní jádro dělí meiózou na čtyři haploidní jádra, která jsou buď základem pohlavních spor (u *Ascomycetes*), nebo se dělí dále mitózou a pak teprve vznikají spory (u *Basidiomycetes*) [1].

2.1.3. Rozdělení kvasinek

Ascomycetes vytvářejí askospor, což jsou endospor vznikající ve vřecku neboli asku. Další jejich typickou vlastností je zkvašování sacharidů, což ale nemusí být vždy pravidlem. Neprodukují ureasu, tvoří mycelium bez přezek, jsou fakultativně anaerobní, proto tedy nejsou pigmentované. Buněčná stěna je trojvrstvá a jejími hlavními složkami jsou glukán a manan. Biomasa se nebarví diazoniovou modrou na červeně. Zástupcem této třídy je např. rod *Saccharomyces* [5].

Basidiomycetes vytvářejí basidiospor, což jsou exospor na povrchu tzv. basidií. Oproti askomycetám vzniká spojením dvou haploidních buněk dikaryotické mycelium s přezkami, které slouží pro přechod jader do sousedních buněk. Na konci tohoto mycelia vyrůstá basidie,

v níž probíhá karyogamie i meióza, následována jednou či více mitózami. Další vlastností basidiomycet je neschopnost zkvašování sacharidů či produkce ureasy. Mají aerobní metabolismus, proto bývají často pigmentované. Buněčná stěna je lamelová, v povrchových vrstvách slizovitá a jejími hlavními složkami jsou chitin, manan a často i xylosa nebo fukosa. Biomasa se většinou barví diazoniovou modrou na karmínově červenou. Do třídy *Basidiomycetes* patří např. karotenoidní kvasinky rodu *Rhodotorula* a *Sporobolomyces* [1, 5].

2.1.4. Karotenogenní kvasinky

Mezi významné kvasinky produkující karotenoidní barviva patří hlavně rody *Rhodotorula*, *Phaffia*, *Sporobolomyces* a *Sporidiobolus*, patřící všechny do třídy *Basidiomycetes* [6].

Rod *Rhodotorula* je imperfektní forma rodu *Rhodosporidium*. Má malé kulaté či oválné buňky, tvoří spory a jen zřídka vytváří primitivní pseudomycelium. Výjimečně se mohou objevit vláknité buňky patřící dikaryonovému myceliu s přehrádkami. V tomto případě jde však o samosporotvorný druh rodu *Rhodosporidium*, perfektní formy *Rhodotorula*. V kapalném prostředí vytváří *Rhodotorula* sediment a prstenec krémové až světle růžové barvy. Nátěr na agaru je hladký, lesklý, slizovitý, zbarvením korálově červený, pomerančový či lososový (viz obrázek 2). Jejich barva a vzhled se však často mění s různým složením substrátu, na kterém se vyskytují [5, 7].

Druhy rodu *Rhodotorula* jsou rozšířené po celém světě. Lze je nalézt ve vzduchu, v půdě, sladké i slané vodě, na povrchu rostlin, ale i v různých orgánech živočišného těla. Lehko se pěstují, nejsou náročné na životní podmínky a vykazují schopnost se přizpůsobit širokému spektru uhlíkatých sloučenin. Vyžadují málo dusíkatých látek, a proto se často rozmnožují i v půdách bez zdroje dusíku. Jejich identita se dobře dokazuje už jen pro jejich zbarvení. V přírodě se nejčastěji vyskytuje *Rhodotorula glutinis*, bohatá hlavně na pigmenty torulen a torularhodin [5, 8, 9].

Všechny druhy *Rhodotorula* se vyznačují tím, že jsou lipidotvorné. Hromadí v buňkách tuk, a to v určitých podmínkách až nadměrně, takže bychom z biomasy mohli získat lipidy se stejným obsahem mastných kyselin jako pro výživu živočichů. Navíc biomasa po extrakci lipidů může být ještě zdrojem proteinu cenného pro obsah základních aminokyselin. Se schopností hromadit lipidy v buňkách souvisí např. schopnost produkce lipáz, využívat *n*-alkany, ATP-citrátlyázu, karotenoidy, steroly apod. [1, 5].



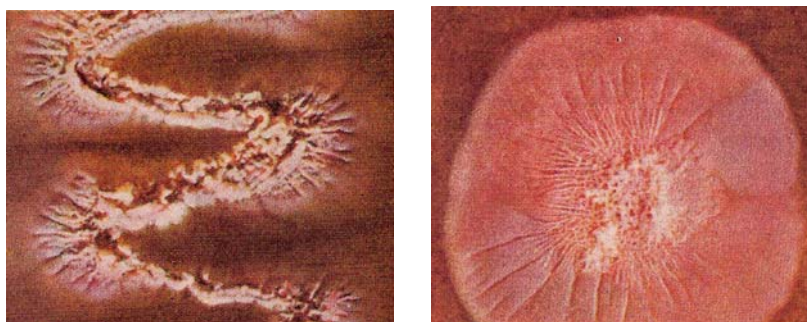
Obrázek 2: Nátěr a kolonie rodu *Rhodotorula* [10]

Rod *Phaffia* reprezentuje druh *Phaffia rhodozyma* nebo-li *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Vytváří elipsoidní buňky, jednotlivě, v párech či v krátkých řetězcích a její

buněčná stěna je lamelového charakteru. Rozmnožuje se pučením, nevytváří balistokonidie ani dikaryonové mycelium či promycelium. V kapalném prostředí vytváří sediment, prstenec i blanku. Na agaru lze pozorovat oranžovočervený hladký, trochu skládaný nátěr. Jednou z hlavních složek karotenoidů je astaxanthin (3,3'-dihydroxy-4,4'-diketo- β -karoten), komerčně využívaný hlavně na rybích farmách jako součást potravy k vybarvení masa lososovitých ryb. Od všech ostatních červených kvasinek se odlišuje schopností zkvašovat cukry, i když často jen velmi slabě, po dlouhém čase a při nízké teplotě [5, 11].

Rod *Sporobolomyces* je imperfektní forma rodu *Sporidiobolus*. Má kulaté, elipsoidní i protáhnuté buňky a vytváří asymetrické balistokonidie. Některé druhy vytvářejí pravé mycelium (např. *Sporobolomyces holsaticus*), jiné pseudomycelium (např. *Sporobolomyces foliicola*). Nátěr a kolonie na agaru můžeme vidět na obrázku 3. Jsou drsné, ploché, často jakoby pomoučené v důsledku odstřelených balistokonidií, které mnohdy spadnou zpět na kolonii. Bývají často kontaminanty různých potravin, rostlinného materiálu, vinařských zařízení apod.

Do tohoto rodu patří také často se vyskytující karotenoidní kvasinka *Sporobolomyces roseus*. Její buňky jsou kulaté, elipsoidní až protáhnuté, s rozměry (3-8) x (5-18) μm . V kapalných prostředích vytváří sediment a velmi hrubý prstenec. Nátěr na agaru je růžovo-oranžový až korálově červený, trochu drsný, jemně kučeravý. Okolo nátěru nebo kolonie se tvoří sekundární kolonie z odstřelených balistokonidií. [1, 5, 7].



Obrázek 3: Nátěr a kolonie rodu *Sporobolomyces* [10]

Rod *Sporidiobolus* se vyznačuje elipsoidními až protáhnutými buňkami, jednotlivými, v párech nebo krátkých řetězcích. Vytváří dikaryonové mycelium s přepážkami a tvoří také balistokonidie, které rostou na jednoduchých nebo větvených sterigmách. V kapalném prostředí tvoří růžovou, velmi kučeravou blanku a slabý sediment. Nátěr nebo kolonie na agaru je suchá, matná, jakoby pomoučená, broskvové barvy. *Sporidiobolus* je perfektní stadium rodu *Sporobolomyces* a nejznámějším zástupcem je *Sporidiobolus salmonicolor* [1, 5].

2.1.5. Výskyt kvasinek a jejich význam

Kvasinky jsou v přírodě velmi rozšířeny. Kvůli svým sacharolytickým schopnostem se vyskytují především na materiálech obsahující cukry, tj. na ovoci a cukernatých potravinách. Dále se nachází v květních nektarech, v půdě, ve vzduchu, ale mohou se objevit také ve střevním traktu lidí, zvířat i hmyzu. V květních nektarech bývají nejčastěji přítomny oxidační typy, jako jsou např. *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* a *Cryptococcus*. Na povrchu měkkého

ovoce převládají spíše kvasné typy, jako jsou rody *Saccharomyces* či *Saccharomycodes*. Jako vzdušná kontaminace se často vyskytuje *Rhodotorula*. Kvasinky nemají schopnost štěpit bílkoviny, proto se nemnoží ve větší míře na mase a jiném bílkovinném materiálu. Mohou být nežádoucími kontaminanty a některé patogenní kvasinky mohou způsobit vážná onemocnění. Výskyt kvasinek také ovlivňuje jejich nízká tepelná odolnost [1, 9].

Hlavní průmyslový význam kvasinek spočívá v jejich využití pro výrobu alkoholických nápojů a pekařského či krmného droždí. Nejdůležitější je druh *Saccharomyces cerevisiae*, který se uplatňuje jako pekařská, lihovarská, vinařská či pivovarská kvasinka.

Ethanol pro chemické účely se dnes vyrábí většinou synteticky, neboť je tento způsob výroby levnější než zkvašování hodnotných surovin. Stoupající cena ropy ale vedla k tomu, že se v některých státech, jako např. v Brazílii, vyrábí kvasný ethanol jako náhražka benzínu. Značné produkce ethanolu pro potravinářské a farmaceutické účely se dosahuje i při výrobě pekařského droždí. Vyšší jednosytné alkoholy (propanol, butanol, pentanol) se tvoří hlavně z aminokyselin odumřelých kvasinkových buněk a jsou získávány ve formě tzv. přiboudliny, využívající se k výrobě rozpouštědel laků [1].

Droždí se pro svůj vysoký obsah vitamínů skupiny B používá nejen v pekárenském průmyslu, ale také i pro výrobu léčebných výživných preparátů. Autolysáty a extrakty droždí nebo odhořčených pivovarských kvasinek se ze stejných důvodů používají jako přísady do potravin (hlavně polévek, omáček a polévkového koření) a jako důležitá složka živných půd v mikrobiologických laboratořích. Protože kvasinky obsahují mimo vitamínů a jiných látek především vysoký obsah bílkovin, vyrábí se pomocí nich i krmné droždí. Krmné droždí se připravuje nejčastěji z melasy či jiných odpadních materiálů pomocí kvasinky rodu *Candida*.

Z buněk kvasinek se izoluje také řada enzymů mající velký průmyslový význam. Např. extracelulární hydrolytický enzym invertasa, štěpící sacharosu na glukosu a fruktosu, se získává ze *Saccharomyces cerevisiae* a je používán v cukrovinkářském a pekárenském průmyslu. Jeho přídavek zabraňuje tvrdnutí pečiva či cukrovinek. Dalším příkladem je intracelulární laktasa, produkovaná kvasinkou *Kluyveromyces marxianus*. Tento enzym se používá při výrobě kondenzovaného mléka, neboť znemožňuje krystalizaci laktosy [1].

Druh *Kluyveromyces marxianus*, resp. jeho imperfektní forma *Candida kefir* se využívá k výrobě kefiru. Rod *Yarrowia* s jediným druhem *Yarrowia lipolytica* byl úspěšně použit pro produkci biomasy z *n*-alkanů ropy pro krmivářské účely a pro biotechnologické čištění ropy.

Ze speciálních kmenů *Saccharomyces cerevisiae* se izoluje ergosterol, provitamin vitamínu D a z karotenogenních kvasinek β -karoten, provitamin vitamínu A a ostatní karotenoidy [1].

Bylo dokázáno, že některé kvasinky třídy *Basidiomycetes* rodu *Cryptococcus*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* či *Sporobolomyces* mohou také kromě karotenoidů produkovat koenzym Q₁₀, široce využívaný v medicíně, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu [12].

2.2. Další mikroorganismy produkující karotenoidní barviva

Kromě kvasinek produkují karotenoidy i některé, převážně aerobní či dokonce striktně aerobní bakterie, plísně rodu *Blakeslea trispora*, sinice *Spirulina*, *Haematococcus* či červené sladkovodní řasy *Dunaliella* [13, 14, 15].

Například bakterie rodu *Micrococcus* tvoří žluté, oranžové až intenzivně růžové karotenoidní pigmenty. Je to grampozitivní, striktně aerobní bakterie kulatého tvaru. Je

schopna růstu v přítomnosti 5% NaCl, a proto se vyskytuje především na solených potravinách, ale i na kůži savců včetně člověka, kde jsou však považovány za nepatogeny. Nejznámější druh je *Micrococcus luteus*, což je žlutě pigmentující bakterie [1, 13].

Rod *Saprospira* produkuje růžové, žluté, oranžové, nebo cihlově červené karotenoidní pigmenty. Je to gramnegativní, striktně aerobní, organotrofní bakterie tvořící mnohobuněčná vlákna. Vyžaduje směs AMK, peptonů, nebo proteinů jako zdroje dusíku, uhlíku a energie.

Rod *Halobacterium* tvoří růžový, červený nebo červenooranžový pigment. Je to gramnegativní, striktně aerobní nebo anaerobní, extrémně halofilní bakterie [13].

Bakterie čeledi *Erythrobacteraceae* obsahují bakteriochlorofyl *a* a karotenoidy. Jedná se o gramnegativní, aerobní, chemoorganotrofní bakterie tyčkovitého tvaru. Rod *Erythrobacter* tvoří oranžově nebo růžově zbarvené kolonie vlivem karotenoidních pigmentů.

Bakterie čeledi *Heliobacteriaceae* obsahují nejen karotenoidy, ale i bakteriochlorofyl *g*. *Heliobacteriaceae* jsou gramnegativní, obligátně anaerobní, fotoheterotrofní bakterie tyčinkovitého až vláknitého tvaru, schopny fixovat dusík [13].

Čeď *Herpetosiphonaceae* s jediným rodem *Herpetosiphon*, produkuje žluté, oranžové nebo červené karotenoidní pigmenty. Buňky jsou protáhlého tyčkovitého tvaru nebo mají tvar vláken složených z jednotlivých buněk. Jedná se o gramnegativní, striktně aerobní, chemoorganotrofní bakterie, některé druhy vyžadující si mořskou vodu. Mohou degradovat celulosu a chitin a také lyzovat živé buňky bakterií a kvasinek [13].

Bakterie rodu *Brevundimonas* mohou produkovat žlutý nebo oranžový karotenoidní pigment. Jedná se o gramnegativní, striktně aerobní bakterie tyčinkovitého tvaru.

Rod *Spirochaeta* je také schopen produkovat karotenoidní barviva. Jsou to aerobní nebo fakultativně aerobní, chemoorganotrofní bakterie, využívající jako zdroj uhlíku a energie sacharidy [13].

Buňky rodu *Rhodospirillum* obsahují vnitřní fotosyntetické membrány produkující fotosyntetické pigmenty bakteriochlorofyl *a* a karotenoidní barviva skupiny spiriloxantinů. Lépe rostou fotoheterotrofně za anaerobních podmínek na světle, ale také za mikroaerobních až aerobních podmínek ve tmě. Jedná se o purpurové, nesírné, gramnegativní bakterie šroubovitého tvaru [1, 13].

V současné době se k produkci karotenoidů průmyslově využívají hlavně červená sladkovodní řasa *Dunaliella salina* jako producent β -karotenu, dále sinice *Haematococcus* jako producent astaxanthinu a kvasinka *Phaffia rhodozyma* (astaxanthin, β -karoten). Využití karotenogenních bakterií a kvasinek však neustále vzrůstá díky jejich snadné manipulaci [15].

2.3. Karotenoidy

2.3.1. Vlastnosti

Karotenoidy reprezentují skupinu pigmentů, žluté až červené barvy, které jsou široce obsaženy v rostlinné, mikrobiologické či živočišné říši. Přírodních karotenoidů bylo identifikováno více jak 700 [6, 16, 17].

Jsou to nepolární, nebo téměř nepolární lipofilní látky. Proto nejsou rozpustné ve vodě, nýbrž v tukách a příbuzných látkách a rovněž v nepolárních a slabě polárních organických rozpouštědlech. Nepolární charakter karotenoidů způsobuje, že nedifundují z buněk do vnějšího prostředí, ale hromadí se na vnitřní straně cytoplazmatické membrány, a to často

vázané na lipidy. Karotenoidy jsou vysoce foto- a termolabilní a rozkládají se působením vzdušného kyslíku [16, 18, 19].

2.3.2. Struktura

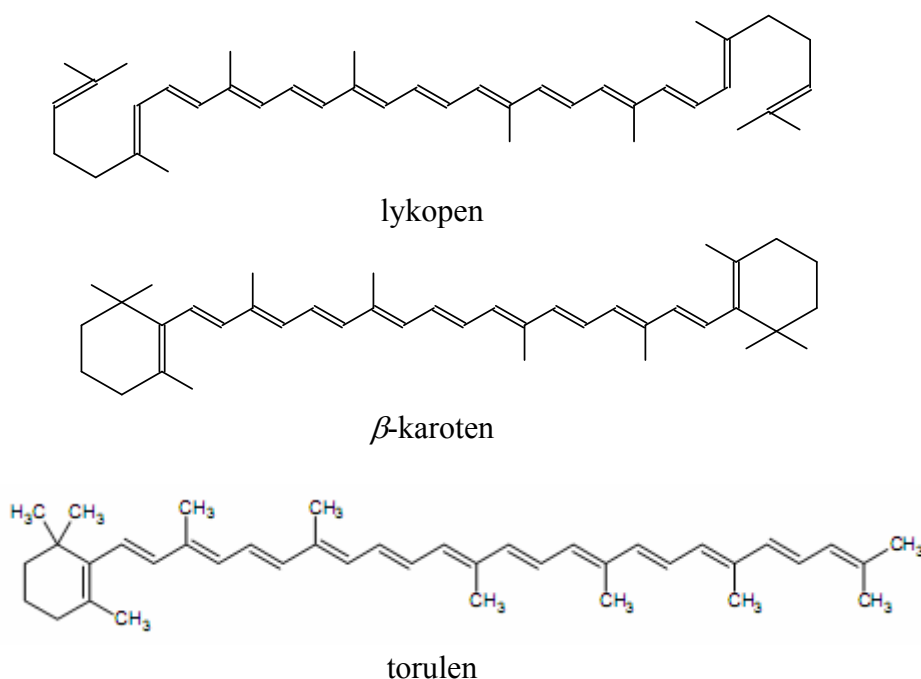
Většina přírodních karotenoidů se řadí mezi tetraterpeny, což znamená, že základem chemické stavby je 40-ti uhlíkatý řetězec s 8 isoprenovými jednotkami. Na obou koncích řetězce je připojena cyklická nebo acyklická 9-ti členná jednotka.

Podle toho se také karotenoidy dělí do třech skupin:

- acyklické (lykopen, fytoen, fytofluen)
- monocyklické (γ -karoten, torulen, torularodin)
- dicyklické (β -karoten, α -karoten)

Struktura některých karotenoidů je vyobrazena na obrázku 4.

Barevnost je způsobena přítomností konjugovaných dvojných vazeb, nejčastěji v konfiguraci „all trans“, což znamená, že všechny dvojné vazby v řetězci zaujímají konfiguraci trans. Avšak vlivem celé řady fyzikálních faktorů, zejména světla určitých vlnových délek a zvýšení teploty, dochází ke vzniku řady cis- isomerů. [6, 16, 18].



Obrázek 4: Struktura některých vybraných karotenoidů [19, 20]

2.3.3. Význam

Karotenoidní barviva slouží hlavně k ochraně buňky před účinkem ultrafialové složky slunečního záření a také k využití světla o vlnové délce 450 – 550 nm. Slouží k přenosu energie ve fotosyntéze a fungují jako doplňkové fotoaktivní pigmenty [1, 16].

Karotenoidní barviva jsou odolné vůči změně pH či redukčním činidlům, avšak velmi citlivé k oxidaci. Obsahují totiž velké množství dvojných vazeb, které se snadno oxidují a díky tomu se tedy chovají jako antioxidanty. Zhášejí singletový kyslík vznikající působením

světla (hlavně lykopen a β -karoten). Singletový kyslík totiž způsobuje peroxidaci či oxidaci řady funkčně významných látek, jako jsou např. nukleové kyseliny či kyselina linoleová [16, 18, 21].

Díky systému dvojných vazeb zachycují a neutralizují volné radikály a jsou také inhibitory podílející se na otvírání mezibuněčných mezerových spojů, sloužících ke vzájemné komunikaci buněk řídící růst, vývoj a diferenciaci buněk. Díky těmto schopnostem se využívají k léčbě rakoviny, artherosklerózy a různých kardiovaskulárních onemocnění [12, 21, 22]. Jsou také prekurzory mnoha hormonů a některé karotenoidy jsou provitaminem A [21].

Díky svým vlastnostem našly karotenoidy uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích. V potravinářství se využívají k výrobě potravinářských barviv a potravinových doplňků, v zemědělství k výrobě krmiv (např. pro slepice k obarvení vaječného žloutku) či kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Karotenoidy se také hojně využívají v genových technologiích ke genetickým modifikacím květin a hospodářských plodin, jako jsou např. brambory, či typickým příkladem je tzv. „zlatá rýže“ produkující β -karoten. Genetická modifikace v těchto případech slouží u hospodářských plodin ke zlepšení jejich výživové hodnoty s antioxidačními účinky a k lepší odolnosti vůči přírodním stresům, u květin k tvorbě barev a aroma [12, 17, 19, 22].

V současné době je průmyslově vyráběno pouze několik karotenoidů, upřednostňována je však jejich mikrobiální produkce oproti syntetické přípravě či izolaci z rostlinného materiálu [19].

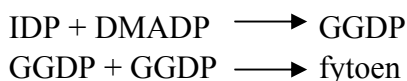
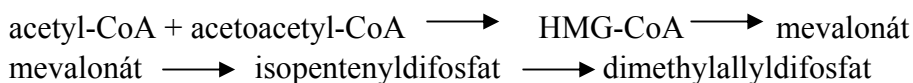
2.3.4. Biosyntéza karotenoidů

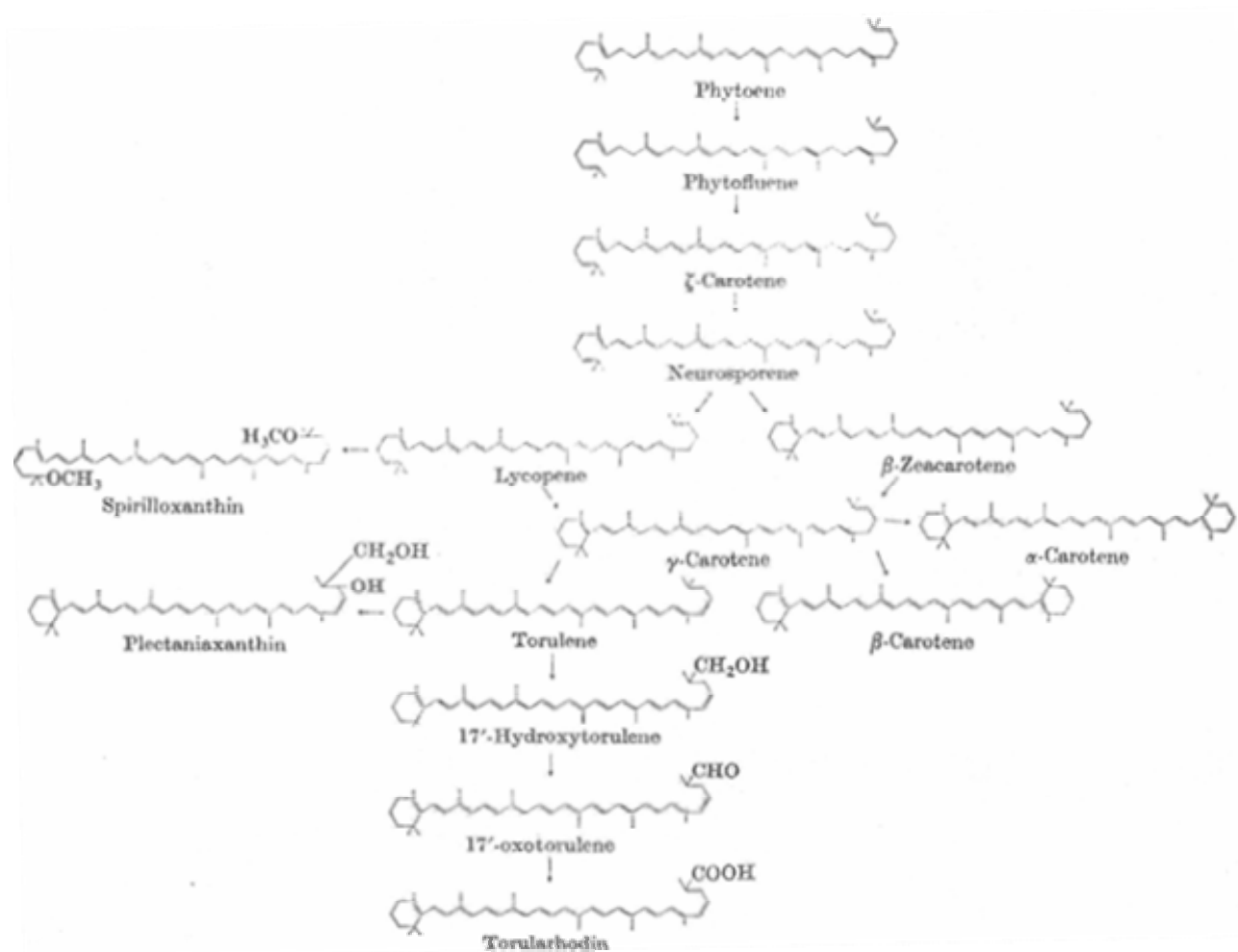
Biosyntéza všech karotenoidů vychází ze všeobecné metabolické dráhy isoprenoidů [22].

Výchozí sloučeninou pro biosyntézu karotenoidů je acetyl-CoA, který kondenzuje s meziproduktem biosyntézy mastných kyselin acetoacetyl-CoA za vzniku 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA). Redukcí vzniká mevalonát, který je poté třemi následnými fosforylacemi přeměněn na 3-fosfo-5-difosfomevalonát. Tento meziprodukt dále poskytuje dekarboxylací a defosforylací isopentenylidifosfat (IDP), tzv. aktivní isopren, který se poté přesmykuje na dimethylallyldifosfat (DMADP) [23].

Polykondenzací 3 molekul IDP a 1 molekuly DMADP vzniká C^{20} diterpen geranylgeranylidifosfat (GGDP), tvořící polovinu všech C^{40} karotenoidů. Kondenzací dvou GGDP se řetězec prodlouží a vznikne první ale bezbarvý C^{40} karotenoid fytoen [22].

Z fytoenu vzniká postupným vytvářením konjugovaných dvojných vazeb neurosporen, a poté lykopen. Lykopen je C^{40} barevný karotenoid z něhož se mohou dále syntetizovat ostatní acyklické či cyklické karotenoidy. Tato syntéza probíhá různými druhově specifickými reakcemi zahrnující např. hydrogenaci, dehydrogenaci, cyklizaci či oxidaci, příp. kombinaci těchto pochodů [18, 22, 23]. Průběh biosyntézy počínaje fytoenem je znázorněn na obrázku 5.





Obrázek 5: Biosyntéza karotenoidů [6]

2.4. Kultivace a růst mikroorganismů

2.4.1. Živná média

Na růst a rozmnožování potřebují mikroorganismy správnou výživu, kterou přijímají ze živného prostředí. Živné médium musí splňovat určité předpoklady a náročnost na jeho složení záleží na požadavcích daného mikroorganismu. Musí být tedy upravené tak, aby se co nejvíce svým složením blížilo jeho přirozeným podmínkám. Čím víc se bude složení média blížit přirozeným podmínkám, tím lépe bude mikroorganismus růst v laboratorních podmínkách [7, 24].

Základní složky výživy kvasinek jsou voda, zdroj uhlíku a dusíku, kyslík, vodík, fosfor a hořčík, dále stopové prvky, vitamíny a růstové látky.

Voda je nejdůležitější složkou živného média s kterou je spjat růst, vývoj a rozmnožování mikroorganismů. Živné prostředí musí mít tedy dostatek vody, pro kvasinkovité formy je to nejméně 30% [7].

Kyslík působí především jako akceptor elektronů při syntéze ATP, ale také výrazně zvyšuje redoxní potenciál prostředí, nutný k růstu aerobních mikroorganismů. Může být

přijímán jak volný ze vzduchu, tak i vázaný ve sloučeninách. Buňka kvasinek přijímá kyslík jen tehdy, pokud je rozpuštěný ve vodě. Tento kyslík přijímají buňky kvasinek na své oxidační procesy z tekutiny prostředí. Množství kyslíku, které takto z prostředí ubude, difunduje z atmosféry znovu do tekutiny [7, 8].

Rozpustnost kyslíku v kapalinách je poměrně nízká, a proto je nezbytnou pomůckou při laboratorních kultivacích aerobních organismů třepací stroj. Rychlost přenosu kyslíku do kapalného média závisí na množství tekutiny v baňce, na jejím tvaru a na typu třepacího stroje. Velmi důležitý je také uzávěr baňek, který ovlivňuje poměry plynů (O_2 ze vzduchu a CO_2 vytvořený při růstu) a především rychlost difuze kyslíku uzávěrem. V laboratořích jsou nejčastěji používány jako uzávěry vatové zátky [1, 8].

Nejpřístupnější zdroj uhlíku je ve formě jednoduchých sacharidů či polysacharidů, které karotenogenní kvasinky využívají oxidačním způsobem. Kromě uhlíku jsou také sacharidy zdrojem vodíku a kyslíku. Při sterilizaci je nutné dbát na to, aby se daný sacharid nerozkládal, či nereagoval s dalšími sloučeninami obsaženými v médiu. Vznikají totiž těžko využitelné nebo inhibiční látky [7, 24].

Jako zdroj dusíku mohou kvasinky využívat vzdušný dusík, dusičnany, dusitany, amonné soli či organický dusík vázaný v AMK, peptonech, peptidech či např. v kvasničném autolyzátu. Nejvhodnějším zdrojem dusíku jsou amonné soli či organický dusík [7, 24].

Při sestavování živných médií hraje také důležitou roli fosfor a hořčík. Hlavní úlohou fosforu je zajištění přenosu energie pomocí reakcí zprostředkovaných adenosintrifosfátem. Nedostatek fosforu způsobuje zpomalení růstu či fermentačních procesů mikroorganismů. Do živných prostředí se fosfor přidává ve formě draselných, amonných a někdy i sodných fosfátů. Hořčík je stimulatorem enzymových procesů a také podporuje aktivitu fosfatáz. Jako zdroj hořčíku slouží obvykle síran hořečnatý. Při kultivaci kvasinek se nejčastěji používá jako zdroj fosforu dihydrogenfosforečnan draselný a jako zdroj hořčíku síran hořečnatý [7, 24].

Další biogenní prvky jako vápník, draslík, železo, chlor, zinek, měď, kobalt, molybden, nikl, jod a bor se přidávají do živných médií jen ve velmi malých koncentracích zjištěných experimentálně. Přidáním těchto prvků se totiž ve správném vzájemném poměru podpoří rozmnožování kvasinek, ale ve větším množství nebo v nesprávném poměru mohou působit toxicky [7].

Auxotrofní mikroorganismy, které nejsou schopny samy syntetizovat růstové faktory, si vyžadují jejich přítomnost v živném médiu. Jako růstové faktory mohou využívat vitamíny, aminokyseliny, vyšší mastné kyseliny, aminy či purinové a pyrimidinové zásady [5, 7, 24].

2.4.1.1. Rozdělení živných médií

Živná média můžeme rozdělit dle různých charakteristik.

- Podle konzistence:
 - tekutá nebo-li kapalná (neobsahují žádné ztužující látky)
 - polotekutá (obsahují malé procento ztužujících látek)
 - pevná (obsahují ztužovací látky jako např. agar, želatinu)
- Podle původu a složení:
 - přirozená (přirozené substráty, jsou vhodné na krátkodobou kultivaci nebo izolaci MO z přírodních zdrojů)

- polysyntetická (jako zdroj uhlíku a dusíku obsahují proteiny a peptidy, přidávaných ve formě extraktů, autolyzátů či peptonů)
- syntetická (mají přesné chemické složení, zdroj uhlíku bývá obvykle glukosa, zdroj dusíku amonné soli)
- Podle použití:
 - univerzální (svým složením vyhovují širokému spektru mikroorganismů)
 - selektivní (svým složením podporují růst jen jednoho druhu nebo skupiny mikroorganismů, obsahují jednu nebo více inhibičních látek potlačujících růst ostatní mikroflóry)
 - selektivně diagnostická (na těchto médiích roste jen velmi malá skupina mikroorganismů, svým složením potlačují růst nežádoucích mikroorganismů) [24].

2.4.1.2. Přirozená média a využití odpadních substrátů

Jako přirozená média lze ke kultivaci mikroorganismů využít také nejrůznější odpadní substráty, nejčastěji z potravinářského průmyslu.

Co se týče přirozených médií v souvislosti s kultivací karotenogenních kvasinek, je v dnešní době stále častěji předmětem výzkumu využití odpadních substrátů k produkci β -karotenu a dalších karotenoidních barviv. Například v Thajsku se zabývají využitím různých solných nálevů jako odpadních produktů po fermentaci zeleniny, hlavně kvašeného zelí, salátu či ředkvičky. Fermentovaná zelenina je totiž nepostradatelnou stravou mnoha zemí Orientu a také důležitou surovinou pro export. Každoročně vzniká z výroby tohoto pokrmu spousta odpadu, a proto je třeba přemýšlet, jak ho dále využít. Nejčastěji se pro tento účel využívá kvasinky *Rhodotorula glutinis*, protože je schopna růstu v nenáročných podmínkách, tedy i na odpadních, finančně nenáročných substrátech [25].

2.4.2. Růstová křivka

Průběh růstu kultury se dá sledovat stanovením přírůstku buněk v pravidelných časových intervalech počínaje zaočkováním. Grafické vyjádření této závislosti se nazývá růstová křivka, kde na osu x je nanesen čas v hodinách a na osu y logaritmus počtu živých buněk v 1 ml kultury. Rychlost růstu a množení buněk se posuzuje podle množství buněk či podle hmotnosti vytvořené biomasy nebo podle obsahu jednotlivých buněčných složek. Růstová křivka ukazuje, že kvasinkové buňky po dobu kultivace procházejí různými fázemi buněčného cyklu, a proto lze v průběhu růstové křivky rozlišit několik fází (viz obrázek 6) [2, 7].

V první fázi, tzv. lag-fázi nebo-li přípravné fázi čerpají buňky energii a připravují se na rozmnožování. Zvětšují svůj objem, přičemž se většinou prodlužují a aktivují svůj enzymový systém, nutný např. k využití přítomných substrátů. Buňky se zvětšují úměrně době kultivace a na konci této fáze dosahují maximální velikosti. Délka fáze závisí na druhu mikroorganismu, stáří a počtu naočkovaných buněk, množství a složení nového růstového prostředí a jeho adaptabilitě. Čím vhodnější jsou podmínky pro růst kultury, tím je lag-fáze kratší [1, 2, 7].

Po lag-fázi následuje fáze zrychlujícího se růstu, kdy dochází k zrychlení všech buněčných syntéz a rychlosti růstu, zvýšení obsahu některých buněčných látek (např. RNA) a zvětšení buněk [1, 8].

Následující fází je exponenciální fáze růstu, pro kterou je charakteristický nejbujnější růst, rychlé rozmnožování buněk, které někdy nestačí dorůst do normální velikosti, a tak se stává, že průměrná velikost buněk kultury bývá na konci této fáze nejmenší. Rozmnožování buněk dosahuje maxima pouze v první polovině exponenciální fáze, v druhé polovině se snižuje a na konci této fáze se blíží k nule [7].

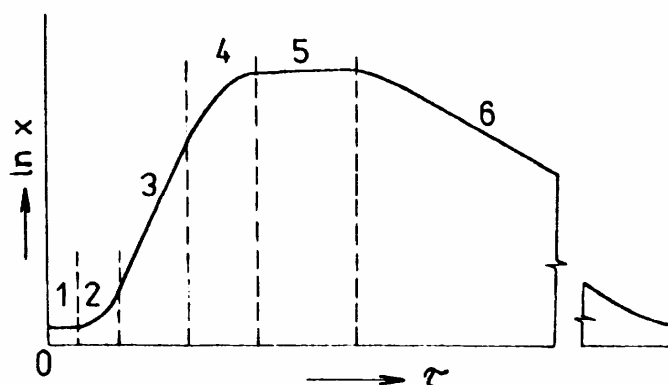
Specifická růstová rychlost mikrobiální populace závisí nejen na druhu mikroorganismu, ale i na vnějších podmínkách, tj. teplotě, pH prostředí a koncentraci živin. Dokud kultura roste exponenciálně, specifická růstová rychlost je konstantní a má maximální hodnotu nezávislou na koncentraci substrátu a nemění se také chemické složení buněk. Tento časový úsek, kdy buňky nemění své vlastnosti, bývá poměrně krátký. Koncentrace živin totiž klesá a zároveň v některých případech stoupá množství konečných produktů, až dojde k překročení mezní koncentrace živin a produktů [1, 8].

Exponenciální fáze je charakterizována také tím, že zde buňky mají nejkratší generační dobu, konstantní po celou dobu exponenciální fáze. Přeneseme-li tedy buňky z prostředí ve kterém se nacházely v exponenciální fázi růstu do nového kultivačního média o stejném složení, budou pokračovat v rozmnožování se stejnou generační dobou, tj. bez zřetelné lag-fáze [1].

Po exponenciální fázi růstu nastává fáze zpomalení růstu, kdy dochází ke snižování rychlosti všech syntéz buněčných látek a koncentrace látek v buňkách (hlavně RNA) [1, 8].

Zpomalení až zastavení přírůstku živých buněk je označováno jako stacionární fáze. V počátečním stádiu dochází ke zvětšování dceřiných buněk, aby se na konci fáze rovnaly velikostí původním buňkám. V počátečním stádiu je tedy tato fáze vhodná k posouzení možných odchylek rozměrů buněk způsobených nepříznivými podmínkami [1, 2, 7].

Po stacionární fázi následuje fáze odumírání buněk, kdy nastává jejich pomalá autolýza, ale zároveň hromadění metabolitu v prostředí. Čím víc v prostředí ubývá živin, tím víc se hromadí produkty metabolismu a čím rychlejší nastává rozklad buněk, tím strmější je křivka v této fázi. Tato fáze může u některých mikroorganismů trvat týdny až měsíce [1, 7].



Obrázek 6: Růstová křivka

τ = doba (h), x = počet živých buněk v 1 ml

1 = lag-fáze, 2 = fáze zrychlujícího se růstu, 3 = exponenciální fáze růstu,
4 = fáze zpomalujícího se růstu, 5 = stacionární fáze, 6 = fáze odumírání

2.4.3. Vliv různých vnějších faktorů na růst a rozmnožování mikroorganismů

Rozmnožování a růst mikroorganismů nezáleží jen na vnitřních podmínkách kultivace, ale i na vnějších fyzikálních, chemických či biologických podmínkách. Podmínky vedoucí k největší výtěžnosti biomasy či metabolitu se nazývají optimální podmínky kultivace. Existují však podmínky, které mohou mimořádně zvýšit výtěžek nebo urychlit růst a rozmnožování, tzv. stimulační podmínky. Podmínky snižující výtěžek či zpomalující růst a rozmnožování se nazývají inhibiční podmínky, nebo-li stresy, jimiž se může správným využitím docílit mikrobiologické produkce obraných látek využívající se v různých odvětvích průmyslu. Mikroorganismy jsou schopny se přizpůsobit vnějším podmínkám změnou enzymového vybavení svých buněk či do určité míry změnou složení a tvaru buněk [1, 7].

Teplota

Teplota vnějšího prostředí je jedním z hlavních faktorů pro rychlost růstu a rozmnožování mikroorganismů. U každého mikroorganismu se rozlišují tři základní body teploty: minimální teplota, což je nejnižší teplota, při níž se ještě daný druh rozmnožuje zjistitelnou rychlostí, dále optimální teplota, kdy probíhá rozmnožování největší rychlostí a maximální teplota, tj. nejvyšší teplota při které je schopen se ještě rozmnožovat. Při vyšších teplotách může dojít k denaturaci enzymů nezbytných k růstu, což způsobí jeho prudký pokles. Tato denaturace může být reverzibilní, avšak při maximálních teplotách se stává ireverzibilní a vede k usmrcení buňky [1].

Optimální teplota na rozmnožování nemusí být stejná s optimální teplotou pro ostatní životní procesy buňky včetně produkce metabolitů [1, 7].

Optimální teplota pro růst a rozmnožování kvasinek je 25 až 28 °C. Nejnižší teplota, při které kvasinky ještě rostou je 4-5 °C a nejvyšší 40°C [7].

pH prostředí

Činnost mikroorganismů je silně ovlivněna pH prostředí, jelikož každý druh vyžaduje pro svůj optimální růst a rozmnožování jeho jiné rozmezí. Pro optimální růst většiny bakterií a kvasinek je toto rozmezí poměrně úzké, zatímco u většiny plísní je podstatně širší.

Kvasinky vyžadují pro růst kyselé prostředí v rozmezí pH 4,2 - 5,5 a již slabě alkalické prostředí (pH kolem 7,5) zastavuje jejich růst. Jsou však schopny si toto pH velmi brzy upravit směrem ke své optimální hodnotě [1].

Vodní aktivita

Voda, která je nezbytnou složkou buněčné hmoty mikroorganismů, představuje 75 až 90% hmotnosti. Veškeré chemické reakce probíhají v živé buňce pouze ve vodném prostředí, a proto zde musí být voda přítomna v dostatečném množství. Potřeba vody může být u mikroorganismů vyjádřena rozmezím vodních aktivit prostředí, při nichž se mohou rozmnožovat. Vodní aktivita (a_{H_2O}) vody se rovná 1 a se stoupající koncentrací rozpuštěných látek postupně klesá.

Minimální aktivita vody kvasinek se pohybuje v rozmezí 0,91 až 0,88 a je nižší než u většiny bakterií. Osmotolerantní kvasinkové druhy jsou schopny rozmnožování i při vodní aktivitě 0,73, která je např. v medu. Tyto kvasinky mohou proto způsobovat jeho nežádoucí kvašení [1].

Redoxní potenciál

Každé prostředí vykazuje určitý oxidoredukční potenciál, který je dán přítomností oxidačních nebo redukčních činidel. Silně oxidační látky, ke kterým patří především kyslík, dále dusičnany, peroxidy, železité ionty aj., vytvářejí pozitivní redox potenciál. Silně redukující látky (železnaté ionty, vodík, sloučeniny s reaktivními dvojnými vazbami aj.) vedou k negativnímu potenciálu. Mikroorganismy se značně liší svým vztahem ke kyslíku, a proto také vyžadují různý redoxní potenciál [1].

Aerobní mikroorganismy, kam patří i karotenogenní kvasinky, vyžadují ve svém živném prostředí přítomnost rozpuštěného kyslíku, tedy pozitivní redox potenciál, proto je nutné provzdušňování [1, 8].

Záření

Elektromagnetické vlnění různých vlnových délek se značně liší svým fyziologickým účinkem na mikroorganismy. Viditelné světlo (380-760 nm) se uplatňuje především jako zdroj energie fototrofních mikroorganismů. Ovlivňuje jak pozitivně tak negativně aktivitu řady dalších mikroorganismů. Je jím indukována např. tvorba karotenoidů některých kvasinek a bakterií.

Ultrafialové záření má na mikroorganismy silné mutagenní a letální účinky. UV záření se používá ke sterilizaci, ale jeho pronikavost je velmi malá, proto se užívá jen k povrchové sterilizaci předmětů, pracovních ploch, provozního zařízení, vzduchu apod. [1].

2.5. Izolace a analýza karotenoidů

Pro stanovení a analýzu karotenoidů se používají spektrální a separační metody a pro jejich izolaci extrakční metody.

2.5.1. Absorpční spektrometrie v UV-VIS oblasti

Podstatou ultrafialové a viditelné spektrometrie je absorpce ultrafialového a viditelného monochromatického záření zředěnými roztoky molekul v rozsahu vlnových délek 200 až 800 nm. Pohlcením tohoto záření přechází molekula do excitovaného stavu [26].

Po dopadu monochromatického záření na vzorek poklesne v důsledku absorpce původní zářivý tok dopadajícího paprsku Φ_0 na nižší hodnotu Φ . Poměr těchto zářivých toků se nazývá transmittance a dekadický logaritmus její převrácené hodnoty absorbance. Závislost absorbance na vlnové délce záření představuje absorpční spektrum vzorku.

Pro stanovení absorbance roztoku absorbující látky platí Lambert-Beerův zákon. Vyjadřuje, že absorbance je přímo úměrná koncentraci absorbující látky a tloušťce absorbující vrstvy roztoku:

$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l$, přičemž ε_{λ} [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] je molární absorpční koeficient (veličina charakteristická pro danou látku v daném prostředí), c molární koncentrace látky [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$] a l tloušťka absorbující vrstvy [cm] [27].

2.5.2. Extrakce

K izolaci karotenoidů ze vzorků s vysokým obsahem vody se nejčastěji používá jako extrakční činidlo aceton. Vzhledem k tomu, že karotenoidy u kvasinek jsou vázány v lipoproteinové frakci membrán, je proto pro jejich uvolnění nutné ještě k acetonovému extraktu buněk přidat alkoholický roztok KOH, aby došlo ke zmýdelnění. Karotenoidy po zmýdelnění se pak dále několikrát extrahují nepolárními organickými rozpouštědly, jako jsou např. diethylether nebo petrolether [6, 8, 16].

2.5.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie - HPLC

Chromatografie je separační metoda, při které dochází k oddělení (separaci) jednotlivých složek obsažených ve vzorku. Je založena na mnohonásobném opakovaném vytváření rovnovážných stavů složek mezi dvěma fyzikálně odlišnými vzájemně nemísitelnými fázemi, stacionární a mobilní [28].

Vzorek se umístí na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je pak unášen touto soustavou a složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a tudíž zdržovány. Více se zdrží ty složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně od sebe separují a na konec stacionární fáze se nejdříve dostanou ty složky, které byly stacionární fází zdržovány nejméně [26].

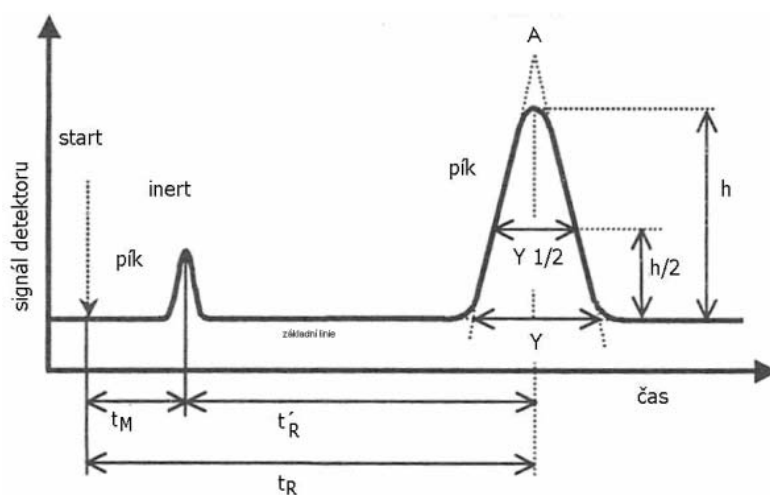
V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina protékající kolonou mezi částicemi stacionární fáze - sorbentu [26, 27].

Klasické kolonové provedení nemá potřebnou účinnost, ale stalo se základem vysoce účinné kapalinové chromatografie - HPLC. K účinné separaci je třeba použít dostatečně malých zrníček sorbentu, která však kladou prostupující kapalině značný odpor. Proto je nutné pracovat při vysokém tlaku. Výhodou této metody je práce s menším množstvím vzorku, kratší doba separace, možnost práce s termolabilními látkami apod. [26].

Kontinuální dělení složek mezi stacionární a mobilní fází probíhá v krátkých náplňových nerezových kolonách, nejčastěji o délce 10-30 cm. Mobilní fáze je pomocí čerpadel dopravována pod tlakem až 50 MPa, přes dávkovací zařízení, kde je obohacována směsí separovaných látek. K nejběžnějším detektorům patří fotometrické detektory, které měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony, dále refraktometrické detektory měřící rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze, fluorescenční detektory, elektrochemické detektory apod. Všechny detektory pro HPLC by měly být však selektivní pro analyty a málo citlivé na mobilní fázi [26, 29].

Grafický záznam závislosti signálu detektoru na čase se nazývá chromatogram (viz obrázek 7). Počátek chromatogramu představuje okamžik nástřiku vzorku na kolonu. Každé rozdělené složce odpovídá na chromatogramu jedna eluční vlna, tzv. pík, který má v ideálním případě tvar Gaussovy křivky. Poloha jejího vrcholu se nazývá retenční čas t_R a představuje dobu, během níž zóna látky projde celou kolonou. Tato doba se dělí na čas, který molekula zůstává v mobilní fázi - tzv. mrtvý retenční čas t_m a čas strávený ve stacionární fázi - redukovaný retenční čas t'_R . Inertní složka, která není v koloně zdržována, prochází kolonou stejně rychle jako mobilní fáze, a vychází z kolony jako první, má retenční čas totožný s mrtvým retenčním poměrem. Součin retenčního času a objemového průtoku mobilní fáze nám udává retenční objem V_R . Zastupuje objem mobilní fáze, který musí protéci kolonou, aby zóna dané látky prošla celou kolonou [27].

Uvedené retenční charakteristiky se používají ke kvalitativní analýze složek ve vzorku, protože nabývají v daném separačním systému hodnot, které jsou pro jednotlivé látky charakteristické. Základem pro jejich identifikaci je shoda retenční veličiny neznámé složky vzorku a známého standardu [27].



Obrázek 7: Chromatogram [26]

h = výška píku, Y = šířka píku v základně, A = plocha píku

3. CÍL PRÁCE

Cíl předložené bakalářské práce zaměřené na produkci karotenoidů kvasinkami s využitím odpadních substrátů spočívá v řešení následujících dílčích úloh:

- Přehled mikrobiálních producentů karotenoidů, struktura, funkce a průmyslové využití karotenoidních pigmentů.
- Produkce karotenoidů vybranými kvasinkami, jejich růstové charakteristiky a analýza pigmentů metodou HPLC.
- Využití vybraných odpadních substrátů ke kultivaci karotenogenních kvasinek.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité chemikálie

4.1.1. Chemikálie použité na kultivaci kvasinek

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)
Bramborový extrakt (Potato extract, India)

4.1.2. Chemikálie použité na izolaci karotenoidů

Aceton p.a., Lachema (ČR)
Hydroxid draselný p.a., Lachema (ČR)
Diethyléter p.a., Lachema (ČR)
Ethanol pro UV-VIS, Lachema (ČR)

4.1.3. Chemikálie použité pro HPLC

Methanol pro HPLC, Sigma – Aldrich (SRN)

4.2. Přístroje a pomůcky

4.2.1. Pomůcky pro kultivaci kvasinek

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

4.2.2. Pomůcky pro izolaci a analýzu karotenoidů

Filtry pro HPLC, PRE-CUT, Alltech (GB)
Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)
Vodní lázeň EL-20, Merci a.s. (ČR)
Mikrocentrifuga Cu-C, Sunon (Taiwan)

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

Programátor gradientu GR 5

Vysokotlaké čerpadlo typ P 4020

Dávkovací ventil typ C

Termostat kolony typ LCO 101

UV-VIS detektor procesorový, typ LCD 2084

software Clarity– Chromatography SW, Data Apex 2006

Kolona Biospher (4,6 x 150 nm); reverzní fáze PSI 200 C18 (7μm), Labicom (ČR)

Předkolona Biospher (4,6 x 150 nm); reverzní fáze PSI 200 C18 (7μm), Labicom (ČR)

4.3. Použité kvasinkové kmeny

Pro kultivaci byl použit kvasinkový kmen *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26 získaný na Sbírce kvasinek Chemického ústavu SAV v Bratislavě.

4.4. Kultivace mikroorganismů

4.4.1. Podmínky kultivace

Kvasinky rodu *Rhodotorula glutinis* patří mezi aerobní mezofilní mikroorganismy. Proto byly kultivovány v kapalném médiu při teplotě 28 °C za stálého třepání (90 rpm) a osvětlení pro produkci karotenoidů.

4.4.2. Inokulum I

Pro každou sérii kultivací bylo připravené inokulum I (INO I) o potřebném objemu tak, aby poměr INO I : INO II byl 1:5. Do každého vysterilovaného a ochlazeného INO I byly asepticky naočkovány 3 kličky ze zásobní kultury na Petriho miskách. Kultivace probíhala po dobu 24 hodin. Inokulum I bylo základem pro zaočkování příslušných sérií inokul II. Složení inokula I je uvedeno v tabulce 1 a bylo vždy pro všechny inokula II stejné.

Tabulka 1: Složení inokula I

Složka	Množství
kvasničný autolyzát	7 g
glukosa	40 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
KH ₂ PO ₄	5 g
MgSO ₄	0,34 g
odstátá vodovodní voda	1000 ml

4.4.3. Inokulum II

Ke každému inokulu I byly připraveny příslušné série inokul II o potřebném objemu tak, aby byl zachován očkovací poměr 1:5. Inokulum I bylo sterilně a za zachování očkovacího

poměru přelito do inokula II a to bylo poté kultivováno po dobu 24 hodin. Inokulum II každého typu bylo základem pro následující série produkčních médií. Všechna inokula II obsahovala stejný základ. Jeho složení je uvedeno v tabulce 2. Koncentrace ostatních složek, kterými se lišila jednotlivá inokula II, byla 7g/1000 ml a jejich obsah je uveden v tabulce 3.

Tabulka 2: Složení inokul II - základ

Složka	Množství
glukosa	40 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
KH ₂ PO ₄	5 g
MgSO ₄	0,34 g
odstátá vodovodní voda	1000 ml

Tabulka 3: Složení inokul II – ostatní složky

Č. série	Složka
1	1A kvasničný autolýzát
	1B bramborový extrakt
2	2A kvasničný autolýzát
	2B jablečná vláknina
3	kvasničný autolýzát
4	kvasničný autolýzát

4.4.4. Produkční média

Pro každou sérii kultivací byla připravena jiná produkční média o stejném základě uvedeném v tabulce 4. Koncentrace a složení ostatních složek, kterými se produkční média každé série lišila, je uvedena v tabulkách 5 - 8. Objem produkčních médií byl vždy 50 ml.

Inokula II byla po částech přelita do produkčních médií tak, aby poměr INO II : produkční médium bylo 1:5. Kultivace probíhala po dobu 80 hodin.

Tabulka 4: Složení produkčních médií - základ

Složka	Množství
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
KH ₂ PO ₄	5 g
MgSO ₄	0,34 g
odstátá vodovodní voda	1000 ml

Tabulka 5: Složení produkčních médií 1. série kultivace (bramborový odpad)

Označení	Složení
kontrola	glukosa 40g/l
glukosa + bramborový extrakt	glukosa 20g/l + bramborový extrakt 20g/l
bramborový extrakt	bramborový extrakt 40g/l
glukosa + bramborové slupky	glukosa 20g/l + bramborové slupky 40g/l
bramborové slupky	bramborové slupky 40g/l

Kultury kultivované v produkčních médiích 1. série měly jiné složení inokula I a inokul II. Každé produkční médium 1. série bylo připraveno dvakrát, jedna polovina byla zaočkována inokulem II 1A a druhá polovina inokulem II 1B (viz tabulka 3). K médiím s bramborovými slupkami byly také připraveny příslušné slepé vzorky k měření absorbance, obsahující stejné množství vody a odpadního substrátu jako příslušné médium.

Tabulka 6: Složení produkčních médií 2. série kultivace (jablečný odpad)

Označení	Složení
kontrola	glukosa 40g/l
glukosa + jablečná vláknina	glukosa 20g/l + jablečná vláknina 20g/l
jablečná vláknina	jablečná vláknina 40g/l
šťáva z jablečné drtě ze směsi 2 druhů jablek	šťáva z jablečné drtě 40g/l
jablečné slupky ze směsi 2 druhů jablek	jablečné slupky 40g/l

Kultury kultivované v produkčních médiích 2. série (viz tabulka 6) měly jiné složení inokula I a inokul II. Každé produkční médium 2. série bylo připraveno opět dvakrát a jedna polovina byla zaočkována inokulem II 2A a druhá polovina inokulem II 2B (viz tabulka 3). K médiím s jablečnou vlákninou a jablečnými slupkami byly také připraveny příslušné slepé vzorky k měření absorbance, obsahující stejné množství vody a odpadního substrátu jako příslušné médium.

Tabulka 7: Složení produkčních médií 3. série kultivace (směs odpadů)

Označení
kontrola – glukosa
pšeničná polohrubá mouka
vaječné těstoviny
jablečná vláknina
pšeničná kaše – celozrnná
mláto
pšeničné otruby – termizované

Kultury kultivované v produkčních médiích 3. série měly stejná složení INO I i INO II. Všechny složky produkčních médií 3. série odlišující se od základu (viz tabulka 7) měly koncentraci 40g/l. Ke všem zakaleným či zabarveným médiím byly připraveny příslušné slepé vzorky obsahující stejné množství vody a odpadního substrátu jako příslušné médium.

Tabulka 8: Složení produkčních médií 4. série kultivace (směs odpadů s přidanými enzymy z plísně *Fusarium solani*)

Označení	
kontrola - glukosa	
vaječné těstoviny bez enzymů	vaječné těstoviny + enzymy
mláto bez enzymů	mláto + enzymy
jablečná vláknina bez enzymů	jablečná vláknina + enzymy
pšeničné termizované otruby bez enzymů	pšeničné termizované otruby + enzymy
celozrnná pšeničná kaše bez enzymů	celozrnná pšeničná kaše + enzymy

Kultury kultivované v produkčních médiích 4. série měly stejná složení INO I i INO II. Všechny složky produkčních médií 4. série odlišující se od základu (viz tabulka 8) měly koncentraci 40g/l.

V této sérii bylo navázáno na paralelně zpracovávanou diplomovou práci [30]. V příslušné diplomové práci byla mimo jiné provedena kultivace plísň kmene *Fusarium solani* na různých odpadních substrátech a poté bylo experimentálně zjišťováno její využití k rozkladu polysacharidů v těchto substrátech. Tato plíseň produkuje jako extracelulární produkt hydrolytické enzymy rozkládající příslušné polysacharidy na jednoduché cukry. Tyto enzymy pak byly izolovány a v lyofilizované podobě přidány k příslušným médiím 4. série.

4.5. Zpracování biomasy

Odebrané vzorky z každého inokula i produkčních médií byly příslušně naředěny tak, aby nebyl přesážen rozsah spektrofotometru, a poté byla měřena absorbance zákalu při vlnové délce 630 nm. Dále byly pod mikroskopem pozorovány morfologické znaky přítomných kvasinek za účelem jejich popisu a případného vyloučení vzorků kvůli bakteriální kontaminaci. Mikroskopické preparáty byly pozorovány při zvětšení 640x a výsledky byly zachyceny digitální kamerou a zpracovány pomocí počítačového softwaru Lucia.

Absorbance byla měřena oproti destilované vodě a v případě obsahu některých odpadů oproti slepému vzorku (viz kapitola 4.4.4). Slepé vzorky byly složeny z příslušného odpadu a vodovodní vody. Byly vždy vysterilovány společně s ostatními médii a uchovány stejnou dobu jako byla doba kultivace příslušného média.

Pro určení množství sušiny v naměřených vzorcích produkčních médií byla kvůli časové tísní použita kalibrační závislost zjištěná z růstové křivky z předchozí práce [20]. Příslušná kalibrační křivka vyjadřuje závislost mezi množstvím sušiny a zákalem různě koncentrovaných suspenzí kvasinek. Pro rod *Rhodotorula glutinis* platí tato kalibrační křivka: $y = 0,1947x - 0,0234$, kde y je naměřená absorbance a x množství sušiny v g/l.

Po odebrání příslušného objemu kultury k měření absorbance a mikroskopickému pozorování byl objem produkčních médií centrifugován při 5000 otáčkách po dobu 10 minut. Poté byly odstředěné buňky promyty vodou a znovu centrifugovány. Nakonec byla buněčná biomasa suspendována ve fyziologickém roztoku a uložena v mrazničce.

4.6. Izolace a analýza karotenoidů

Protože jsou karotenoidy součástí lipidické frakce buňky, je možné k jejich izolaci použít několikanásobnou extrakci v kombinaci se zmýdlením vzorků. Analýza byla provedena pomocí vysoko-účinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí. K tomuto měření byly použity izolované vzorky produkčních médií o objemu 50 ml.

4.6.1. Izolace karotenoidů zmýdlením a následnou extrakcí

Vzorky z mrazničky byly rozmrazeny a poté centrifugovány při 5000 otáčkách po dobu 10 minut. Usazené buňky byly v třetí misce důkladně dezintegrovány v 25 ml acetonu

a po přidání 25 ml alkoholického roztoku KOH byly ponechány na vodní lázni při 90 °C po dobu 30 minut ke zmýdelnění.

Odparek po zmýdelnění byl třikrát extrahovaný diethyletherem a spojené etherové frakce byly odpařeny na vakuové odparce.

4.6.2. Příprava vzorku pro HPLC

Vysušený extrakt byl rozpuštěn v ethanolu pro HPLC, přefiltrován přes jednorázový filtr do mikrocentrifugační zkumavky a před samotnou analýzou centrifugován na mikrocentrifuze.

4.6.3. Analýza karotenoidů metodou HPLC/UV-VIS

K chromatografické analýze karotenoidů byla použita sestava HPLC/UV-VIS od firmy ECOM spol. s r.o. Ke zpracování dat a chromatogramů byl použit program Clarity .

Analýza karotenoidů metodou HPLC/UV-VIS probíhala za izokratických podmínek při průtoku mobilní fáze 1,1 ml/min, teplotě 45 °C, na nerezové koloně s předkolonou (RP-C18, detail viz kapitola 4.2.2, str. 27), za fotometrické detekce při vlnové délce 450 nm odpovídající maximu absorpce karotenoidů. Vzorek byl na kolonu dávkován přes dávkovací ventil se smyčkou. Objem nanášeného vzorku byl 10-20 µl podle typu vzorku. Jako mobilní fáze byl použit methanol pro HPLC.

4.6.4. Identifikace a kvantifikace karotenoidů

Identifikace jednotlivých karotenoidů byla provedena na základě jejich retenčních časů v porovnání s retenčními časy standardů karotenoidů. Stanovení množství vybraných karotenoidů bylo provedeno pomocí externí kalibrace metodou kalibrační křivky. Ke kvantitativnímu vyhodnocení byla použita závislost plochy píků na koncentraci jednotlivých vzorků.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

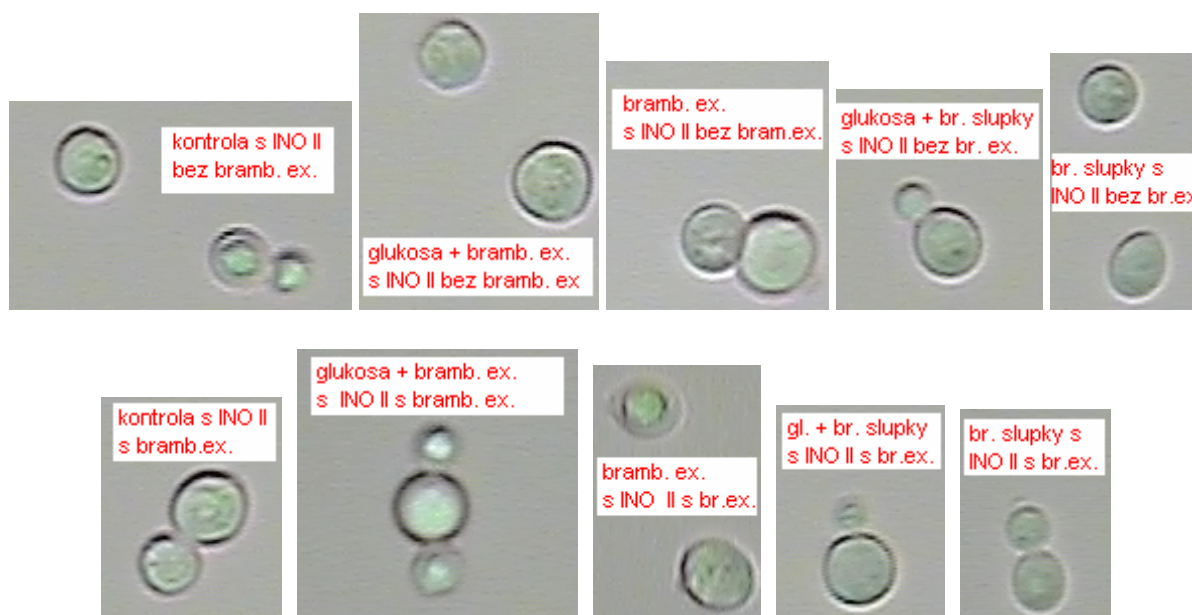
5.1. Morfologické změny kvasinek v závislosti na typu produkčních médií

U každé série kultivace byly pozorovány jednotlivé morfolologické znaky kvasinkového kmene *Rhodotorula glutinis* (RG) kultivovaného na různých odpadních substrátech přidaných do živných médií.

5.1.1. Morfologické změny kvasinek 1. série kultivace (bramborový odpad)



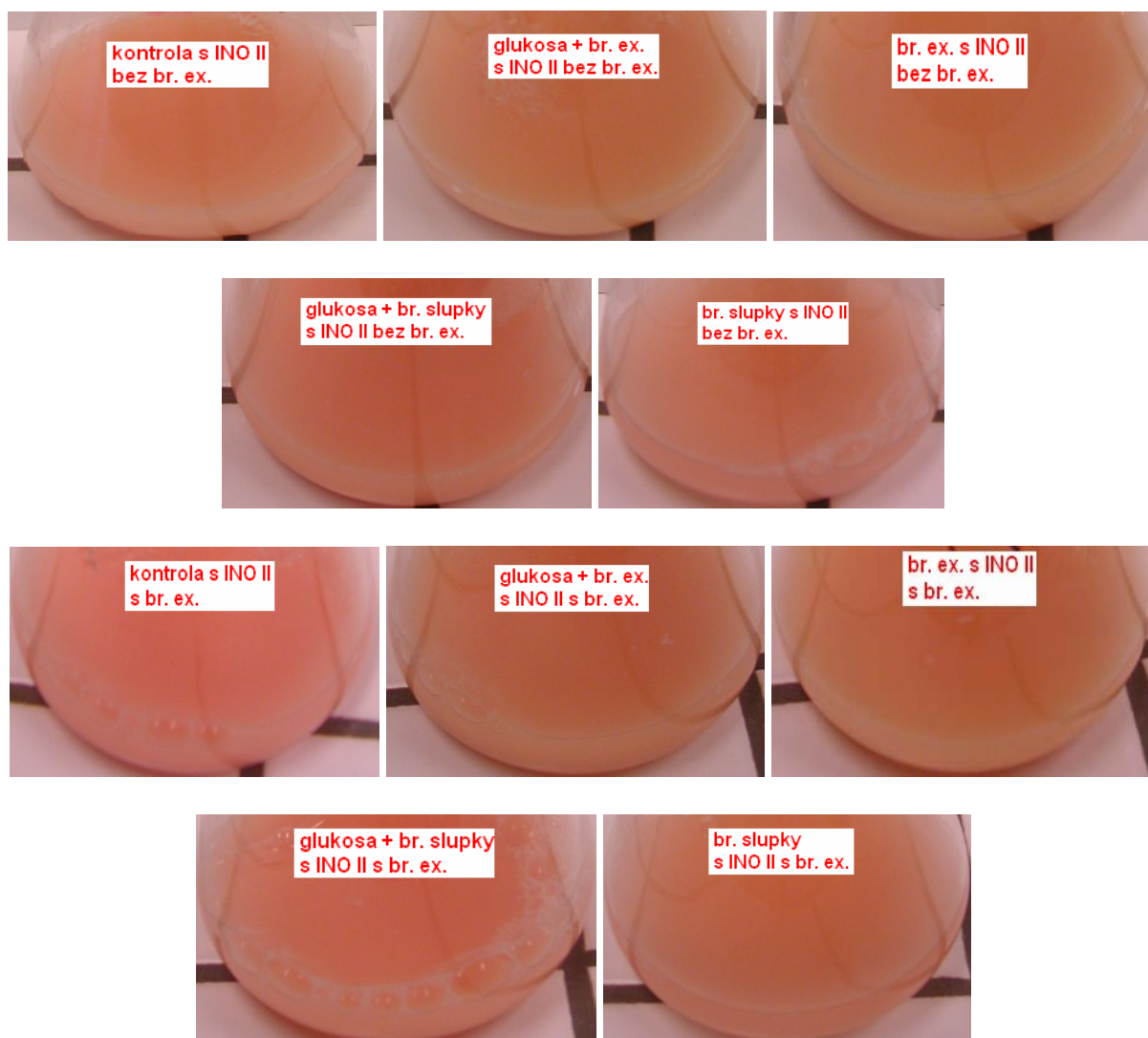
Obrázek 8: Morfologie RG - INO I a INO II 1. série (bramborový odpad)



Obrázek 9: Morfologie RG - produkční média 1. série (bramborový odpad)

Dle mikroskopického pozorování lze vidět, že buňky kmene *Rhodotorula glutinis* v 1. sérii kultivace (viz obrázek 8-9) měly z počátku svého růstu spíše oválný tvar, hlavně v případě pučících buněk, a poté se postupně zakulacovaly. Můžeme pozorovat plynulý růst buněk bez větších odlišností a změn v tvaru. Jen v některých médiích s přidaným bramborovým extraktem lze vidět nepravidelný tvar buněk s mírně narušenou buněčnou stěnou a neohrazenými obsahy buněk (viz snímky glukosa + bramb. ex. a br. ex. s INO II s br. ex.).

Podle kulatého tvaru buněk i podle akumulace pigmentů v povrchových vrstvách lze usoudit, že bramborový extrakt mohl indukovat mírný osmotický stres.



Obrázek 10: Zbarvení produkčních médií 1. série (bramborový odpad)

Na předchozích snímcích (viz obrázek 10) lze vidět převládající oranžové až narůžovělé zbarvení produkčních médií. Kontrola s INO II s přidaným bramborovým extraktem má výraznější růžové zbarvení oproti ostatním médiím.

5.1.2. Morfologické změny kvasinek 2. série kultivace (jablečný odpad)

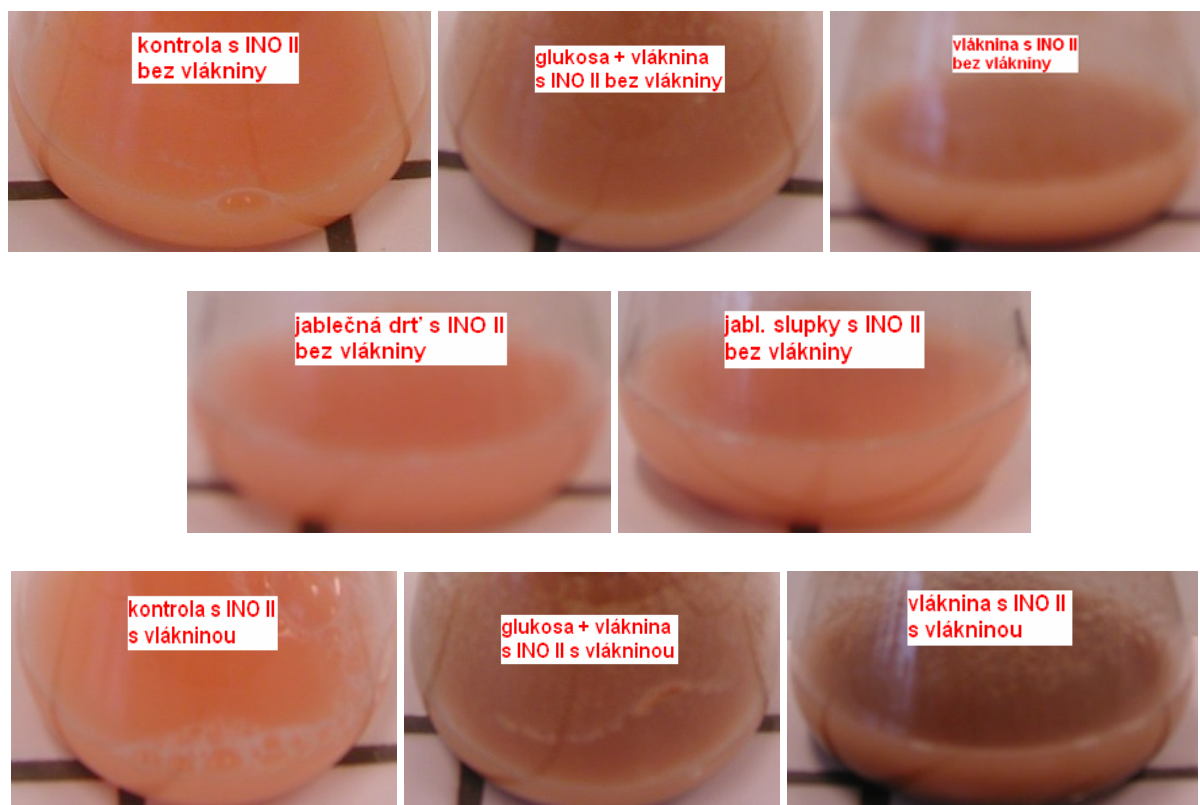


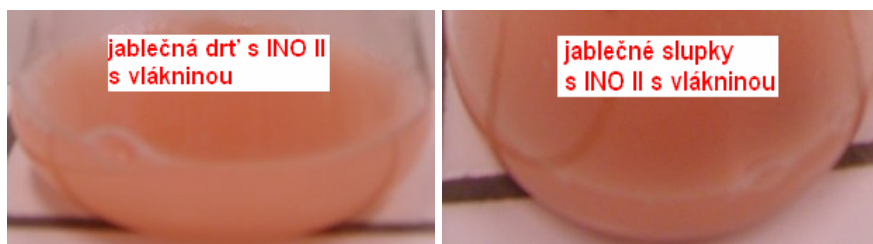
Obrázek 11: Morfologie RG - INO I a INO II 2. série (jablečný odpad)



Obrázek 12: Morfologie RG - produkční média 2. série (jablečný odpad)

Buňky 2. série (viz obrázek 11-12) jsou více oválné než v 1. sérii. Morfologií se v jednotlivých médiích příliš neliší. Zajímavý úkaz lze pozorovat na snímcích obou kontrol, kde lze uvnitř buněk zahlédnout buněčné orgány, nejspíše vakuoly. V některých médiích s přidanou jablečnou vlákninou je možné pozorovat buňky s neohrazenými obsahy buněk.





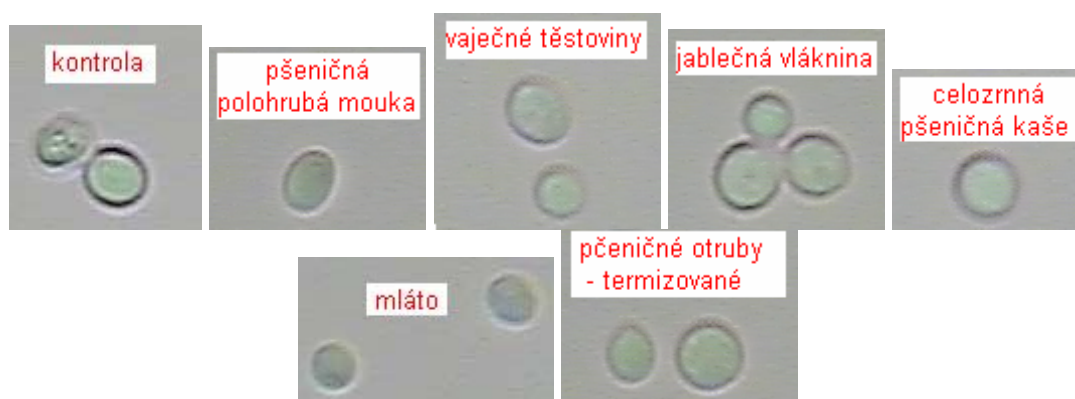
Obrázek 13: Zbarvení produkčních médií 2. série (jablečný odpad)

Pozn.: 1. část obrázku 13 je na str. 34

Tmavší až hnědé zbarvení některých médií na obrázku 13 je nejspíše způsobeno pouze hnědým zbarvením vlákniny. Čím větší množství vlákniny médium obsahuje, tím je tmavší. Tmavým zbarvením je tedy zakryto skutečné zbarvení média. Obě média s jablečnou drtí i jablečnými slupkami s INO II bez vlákniny mají růžovější odstín než kontrola.

5.1.3. Morfologické změny kvasinek 3. série kultivace (směs odpadů)

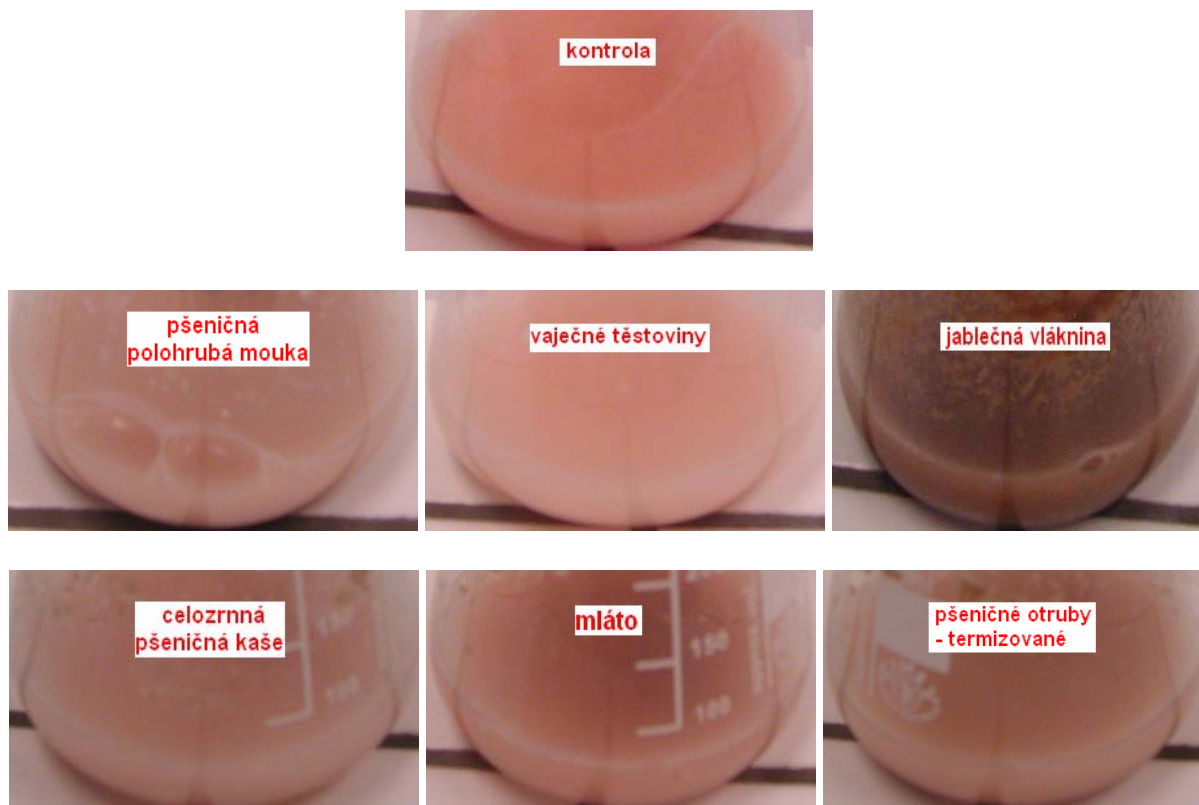
Obě inokula 3. série měla standardní složení s kvasničním autolyzátem (viz tabulka 1). Proto jsou na obrázku 14 vyobrazena jen média produkční.



Obrázek 14: Morfologie RG - produkční média 3. série (směs odpadů)

Buňky 3. série (viz obrázek 14) jsou oválné i kulaté, což poukazuje na skutečnost, že buňky kmene *Rhodotorula glutinis* mohou zaujímat různý tvar, od vejčitého až po kulatý. Jistý vliv může mít i příslušný odpadní substrát, jež může vyvolávat mírný osmotický stres, což způsobuje změny tvaru buněk. Morfologie se nijak výrazně neliší. Buňky této série mají světlejší okraje oproti předchozím sériím.

Tmavší až hnědé zbarvení většiny médií 3. série na obrázku 15 je způsobeno především vlastní barvou odpadního substrátu. Proto byly k těmto médiím připraveny příslušné slepé vzorky (viz kapitola 4.4.4 Produkční média, str. 29). Médium s vaječnými těstovinami má světlejší odstín růžové barvy než kontrola.



Obrázek 15: Zbarvení produkčních médií 3. série (směs odpadů)

5.1.4. Morfologické změny kvasinek 4. série kultivace (směs odpadů s enzymy z plísně)

Obě inokula 4. série měla opět standardní složení s kvasničným autolyzátem (viz tabulka 1, str. 27), proto jsou na obrázku 16 vyobrazena jen média produkční. Do poloviny produkčních médií kromě kontroly byly přidány hydrolytické enzymy z plísně rodu *Fusarium* (viz kapitola 4.4.4 Produkční média, str. 29-30). Zbytek médií sloužil jako kontrola k médiím s přidávanými enzymy.



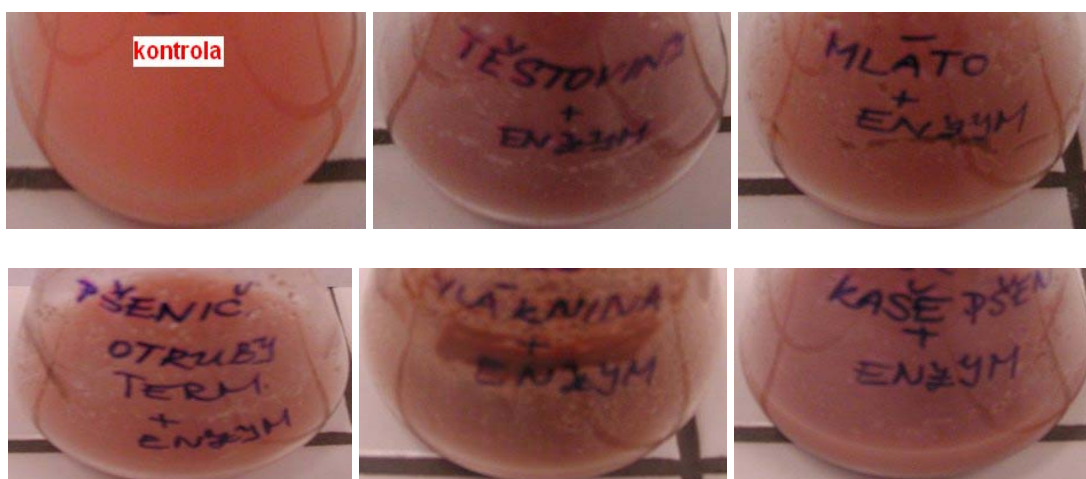
Obrázek 16: Morfologie RG - produkční média 4. série (směs odpadů s enzymy z plísně)

Buňky v médiích bez přidaných enzymů mají oválný i kulatý tvar, zatímco buňky médií s enzymy jsou spíše kulovitěho tvaru (viz obrázek 16). Je možné, že v médiích s enzymy mohly zůstat zbytky plísně, jelikož izolace čistých enzymů je velmi obtížná. Také zde mohlo dojít k mírnému osmotickému stresu vlivem přídavných složek přítomných v lyofilizovaném preparátu plísňových enzymů. Tato skutečnost mohla způsobit rozlišný tvar buněk a např. u média s vaječnými těstovinami s enzymy i nepravidelný tvar buněk a neohrazené obsahy buněk.



Obrázek 17: Rozdílné zbarvení produkčních médií 4. série
vlevo - média bez enzymů, vpravo - média s enzymy

Na obrázku 17 můžeme vidět zbarvení médií celé 4. série. Část médií 4. série, konkrétně média bez enzymů, je shodná kromě pšeničné polohrubé mouky s médii 3. série, která jsou vyobrazena na obrázku 15. Na následujících snímcích (viz obrázek 18) jsou pak zblízka vyobrazena média s přidanými hydrolytickými enzymy a srovnána zbarvení kultur s kontrolou.



Obrázek 18: Zbarvení médií 4. série (směs odpadů s enzymy z plísně)
shora zleva: kontrola, vaječné těstoviny + enzymy, mláto + enzymy, pšen. otruby - termizované + enzymy, vláknina + enzymy, celozrnná pšeničná kaše + enzymy

Média s přidávanými enzymy (viz obrázek 17-18) vykazují oproti příslušným kontrolám zvláštní fialovočervený nádech. Zvláště média s těstovinami a celozrnnou pšeničnou kaší mají výrazné fialovočervené zbarvení, což je patrné hlavně z obrázku č. 17 vpravo.

5.2. Produkce karotenoidů na různých typech médií

V této práci byly nejvíce sledovány změny produkce β -karotenu v závislosti na produkci biomasy, jelikož má z karotenoidů největší praktický význam. Z dalších karotenoidů byl u prvních dvou sérií analyzován také lykopen a torulen. U 3. a 4. série byl analyzován pouze β -karoten, jelikož na chromatogramech této série nebyl pík lykopenu a torulenu patrný (viz příloha 5, str. 53). K analýze všech karotenoidů byla použita metoda HPLC.

V následujících tabulkách a příslušných grafech jsou uvedeny výsledky produkce karotenoidů a biomasy na různých odpadních substrátech všech čtyř sérií.

Tabulka 9: Přehled nárůstu biomasy a obsahu karotenoidů v 1. sérii kultivace

BRAMBOROVÝ ODPAD				
	sušina	obsah karotenoidů		
označení	sušina (g/l kultury)	lykopen ($\mu\text{g/g}$ sušiny)	torulen ($\mu\text{g/g}$ sušiny)	β-karoten ($\mu\text{g/g}$ sušiny)
kontrola s INO II bez br.ex.	15,118	3,192	40,021	119,471
glukosa+br.ex.s INO II bez br.ex.	14,244	5,010	26,791	112,559
br.ex.s INO II bez br.ex.	15,220	2,186	7,035	107,829
glukosa+br.slupky s INO II bez br.ex.	12,652	10,909	39,364	154,620
br.slupky s INO II bez br.ex.	4,897	1,667	8,313	44,896
kontrola s INO II s br.ex.	15,837	6,872	12,833	467,946
glukosa+br.ex.s INO II s br.ex.	13,269	7,688	32,719	244,093
br.ex.s INO II s br.ex.	12,087	11,231	19,010	130,694
glukosa+br.slupky s INO II s br.ex.	5,564	5,087	5,883	337,566
br.slupky s INO II s br.ex.	4,537	1,245	5,247	42,861

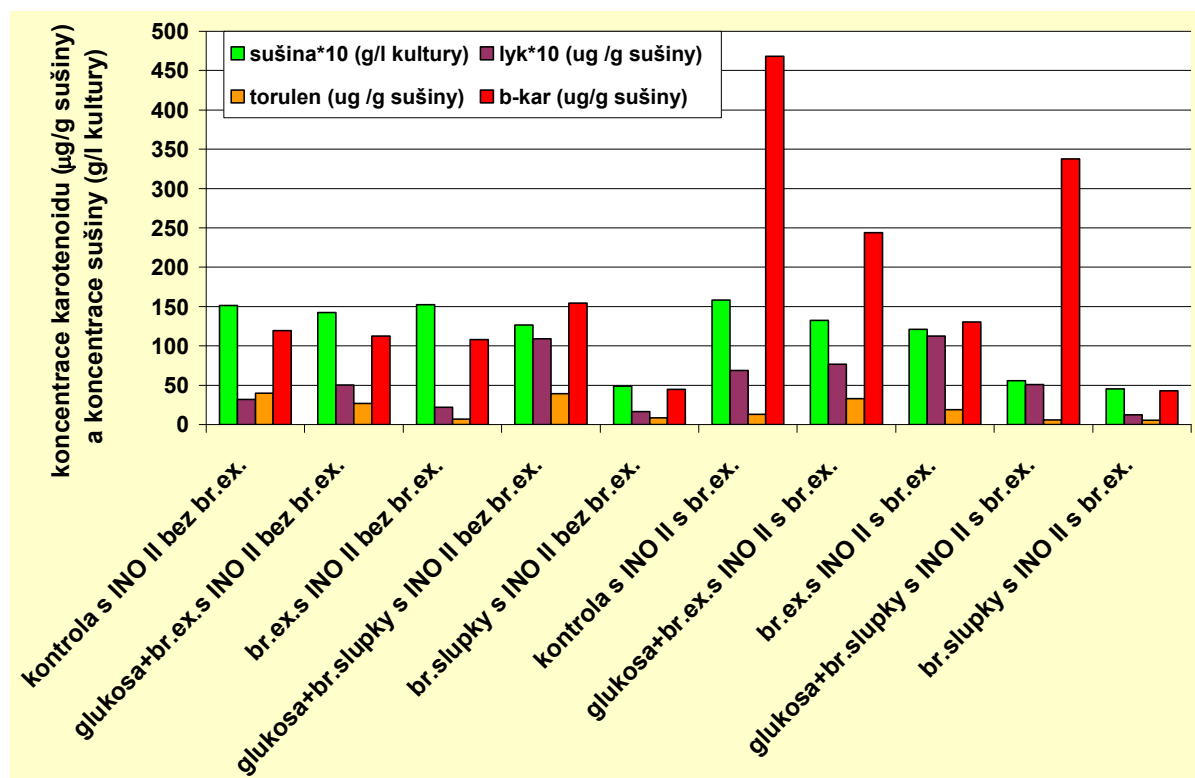
V grafu č. 1 jsou zajímavé výsledky kultivace z některých médií obsahujících INO II s bramborovým extraktem, kde můžeme vidět několikanásobné zvýšení produkce β -karotenu oproti kontrole s INO II bez bramborového extraktu. Nejvyšší produkce β -karotenu v druhé polovině 1. série je u kontroly s bramborovým extraktem (cca 468 $\mu\text{g/g}$ sušiny), kde je zároveň i nejvyšší nárůst biomasy (15,8 g/l), dále v médiích s kombinací glukosy a bramborových slupek, kde je ale poměrně malý nárůst biomasy a v médiích s kombinací glukosy a bramborového extraktu. Kdežto nejméně β -karotenu bylo produkováno v obou médiích s bramborovými slupkami.

Vyšší produkce β -karotenu v médiích s obsahem INO II s bramborovým extraktem je nejspíše způsobena lepší adaptací kvasinkových buněk na bramborový extrakt. To dokazuje i médium s přidáním bramborového extraktu s adaptací na INO II s bramborovým extraktem v porovnání s médiem se stejným složením, avšak bez INO II s přidáním bramborového extraktu, kde je nižší produkce jak β -karotenu, tak i lykopenu a torulenu.

Avšak nárůst biomasy v médiích s INO II bez bramborového extraktu je, kromě kontroly, vyšší oproti své druhé polovině. Celkově nízký nárůst biomasy oproti kontrole s INO II bez

extraktu je v obou médiích s bramborovými slupkami a v médiu s kombinací glukosy a bramborových slupek s INO II s extraktem, kde je však velký nárůst β -karotenu.

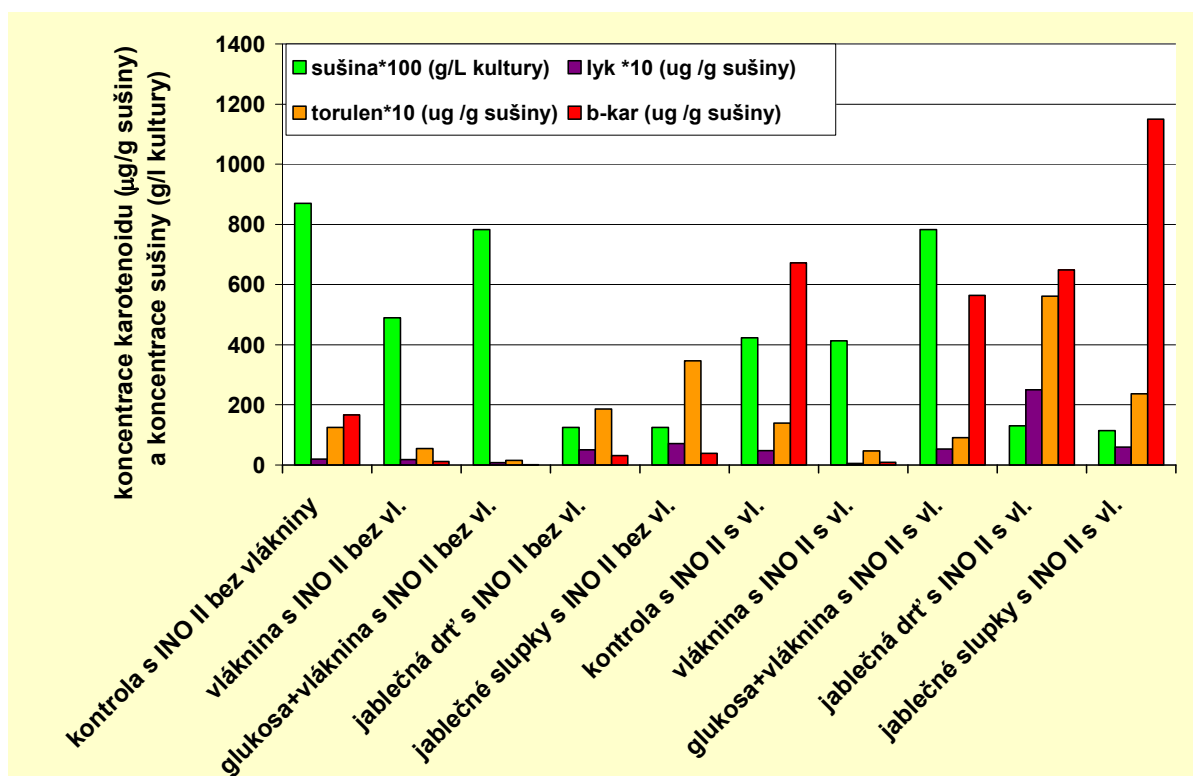
Přidaný bramborový extrakt do INO II tedy více podporuje produkci β -karotenu než růst biomasy. Nejvyšší nárůst biomasy je v médiích s přídáním glukosy a doplněným bramborovým extraktem.



Graf 1: Nárůst biomasy a produkce karotenoidů v 1. sérii (bramborový odpad)

Tabulka 10: Přehled nárůstu biomasy a obsahu karotenoidů v 2. sérii kultivace

JABLEČNÝ ODPAD				
	sušina	obsah karotenoidů		
označení	sušina (g/l kultury)	lykopen (µg /g sušiny)	torulen (µg /g sušiny)	β-karoten (µg /g sušiny)
kontrola s INO II bez vlákniny	8,697	2,005	12,475	167,311
vláknina s INO II bez vl.	4,897	1,807	5,420	11,496
glukosa+vláknina s INO II bez vl.	7,824	0,842	1,584	1,650
jablečná drť s INO II bez vl.	1,250	5,070	18,578	31,239
jablečné slupky s INO II bez vl.	1,250	7,226	34,588	39,377
kontrola s INO II s vl.	4,229	4,849	13,925	672,598
vláknina s INO II s vl.	4,126	0,475	4,633	8,935
glukosa+vláknina s INO II s vl.	7,824	5,291	9,060	564,050
jablečná drť s INO II s vl.	1,301	24,962	56,130	648,611
jablečné slupky s INO II s vl.	1,147	5,959	23,638	1149,696

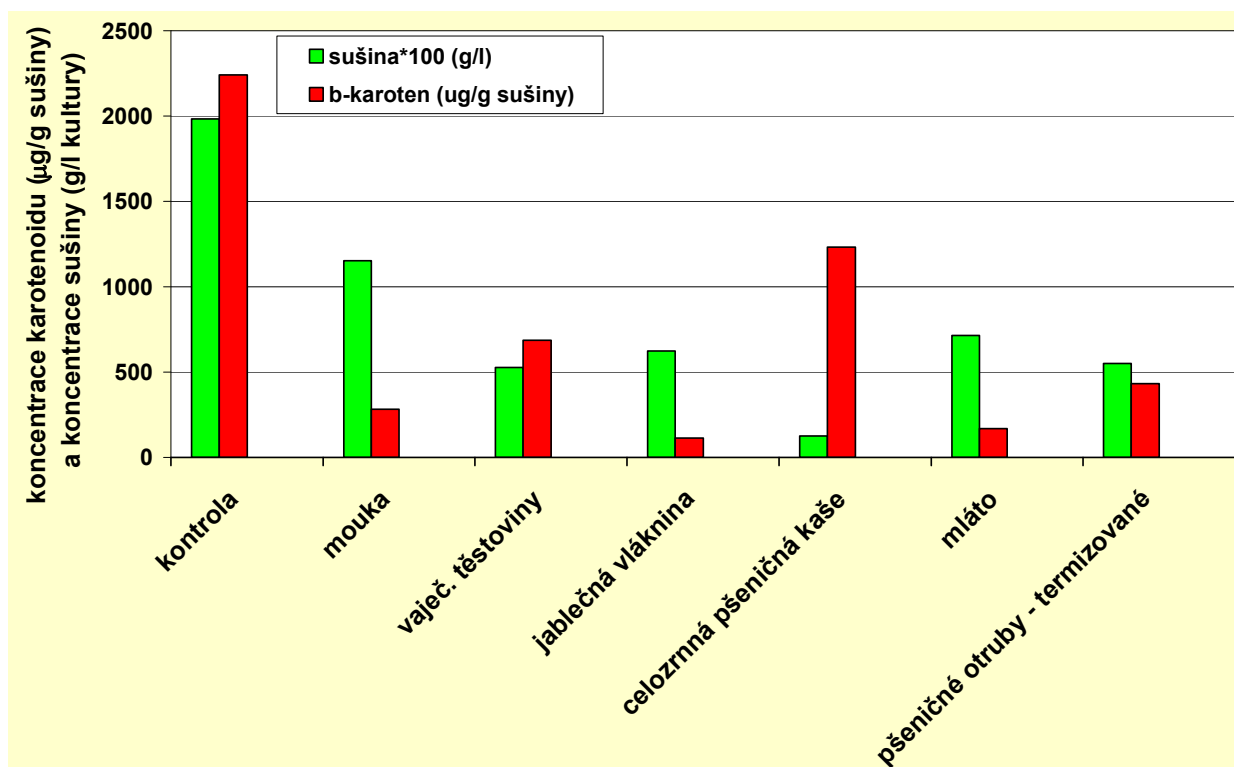


Graf 2: Nárůst biomasy a produkce karotenoidů v 2. sérii (jablečný odpad)

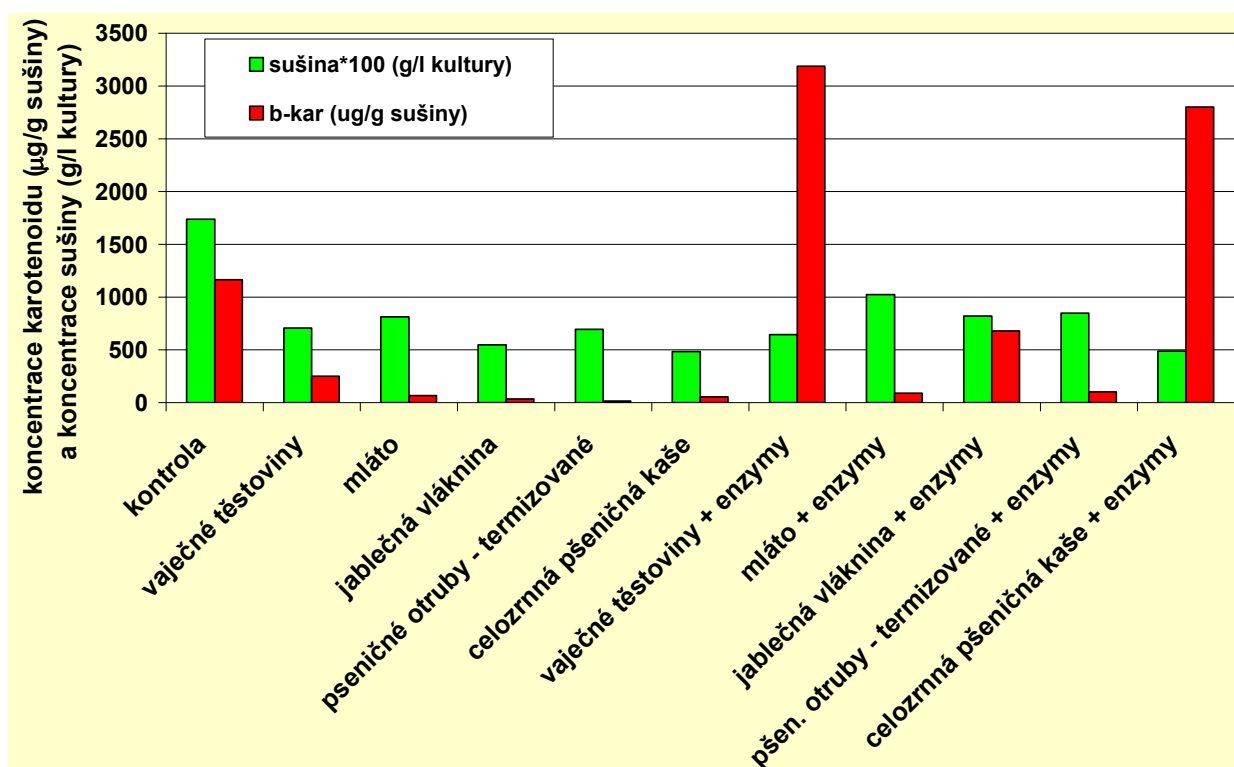
V grafu č. 2 je opět patrná nadprodukce β -karotenu v 2. polovině série v médiích s INO II s jablečnou vlákninou, kromě média se samotnou vlákninou. Ale v tomto médiu se stejným složením je malá produkce β -karotenu i v 1. polovině série. Nejvyšší produktivita β -karotenu je v médiu s jablečnými slupkami s INO II s vlákninou (1149,7 $\mu\text{g/g}$ sušiny), ale zde je třeba upozornit na malý nárůst biomasy (jen 1,15 g/l). Tento případ nastává i u použití jablečné drtě, kde je poměrně velký obsah karotenoidů, ale malý nárůst biomasy. Velký nárůst biomasy i celkem vysoká produkce β -karotenu je v médiu s kombinací glukosy a vlákniny doplněném kultivací v INO II s vlákninou. Oproti svému protějšku bez INO II s vlákninou, kde je stejný nárůst biomasy, ale zanedbatelná produkce β -karotenu, je to docela dobrý výsledek. Dále je potvrzena vyšší produkce karotenoidů u kontroly s INO II s vlákninou oproti standardní kontrole. Stejný případ byl i v sérii s bramborovým odpadem, kde přidaný bramborový extrakt do INO II v kontrole ovlivnil velmi pozitivně jak růst biomasy, tak zvýšil několikanásobně produkci β -karotenu.

Vysoký nárůst biomasy je v médiích s přidanou glukosou a jablečnou vlákninou a největší je opět u kontroly, ale tentokrát se standardním INO II. V kontrole s INO II s přidanou vlákninou je nárůst biomasy 2krát menší, ale zato produkce β -karotenu asi 4krát vyšší.

Z této části práce vyplývá, že přidaná vláknina do INO II opět spíše podporuje produkci karotenoidů než nárůst biomasy. Tato vyšší produktivita je nejspíše způsobena adaptací kvasinkových buněk na vlákninu. Ale média se samotnou vlákninou s INO II s přidanou vlákninou nepodporují ani vyšší nárůst biomasy ani větší produktivitu karotenoidů. Je to nejspíše způsobeno příliš vysokou koncentrací vlákniny v médiu nebo omezenou schopností kultury využívat vlákninu jako zdroj živin a energie.



Graf 3: Nárůst biomasy a produkce β -karotenu v 3. sérii (směs odpadů)



Graf 4: Nárůst biomasy a produkce β -karotenu v 4. sérii (směs odpadů s přidávanými enzymy z plísně)

Tabulka 11: Přehled nárůstu biomasy a obsahu β -karotenu v 3. sérii kultivace

SMĚS ODPADŮ		
označení	sušina (g/l kultury)	β-karoten (μg/g sušiny)
kontrola	19,843	2242,432
mouka	11,522	281,734
vaječ. těstoviny	5,256	685,814
jablečná vláknina	6,232	112,714
celozrnná pšeničná kaše	1,250	1232,512
mláto	7,157	169,623
pšeničné otruby - termizované	5,513	433,238

Tabulka 12: Přehled nárůstu biomasy a obsahu β -karotenu v 4. sérii kultivace

SMĚS ODPADŮ S PŘIDANÝMI ENZYMY Z PLÍSNĚ		
označení	sušina (g/l kultury)	β-karoten (μg/g sušiny)
kontrola	17,3775	1162,31
vaječné těstoviny	7,0539	251,62
mláto	8,1325	64,87
jablečná vláknina	5,4617	35,17
pšeničné otruby - termizované	6,9512	14,92
celozrnná pšeničná kaše	4,8454	53,28
vaječné těstoviny + enzymy	6,4376	3188,49
mláto + enzymy	10,2383	88,78
jablečná vláknina + enzymy	8,1839	679,31
pšeničné otruby - termizované + enzymy	8,4920	99,94
celozrnná pšeničná kaše + enzymy	4,8968	2799,16

Graf č. 4 a tabulka č. 12 srovnávají v 1. polovině výsledky kultivace na téměř stejném substrátu, kromě mouky a jablečné vlákniny, jako u 3. série (viz graf 3 a tabulka 11), ale v jiném čase. Z předchozích grafů vyplývá jak jsou důležité všechny vnější podmínky kultivace, jako např. aerace přes vatové zátky, okolní teplota, množství světla a další aspekty, které mohou ovlivňovat danou kultivaci jak pozitivně, tak negativně. Když srovnáme 3. sérii a 1. polovinu 4. série, můžeme u většiny médií 3. série vidět větší nárůst biomasy a u všech médií této série i větší produkci β -karotenu než u stejných médií v 4. sérii. Vše záleží na srovnání s kontrolními médii dané série. U kontroly 4. série je totiž výrazně nižší jak nárůst biomasy, tak především produkce β -karotenu. Proto není možné vzájemně srovnávat média obou sérií bez srovnání s kontrolou. Přesto však když porovnáme v obou sériích poměry produkce β -karotenu u kontroly vůči ostatním médiím dané série, vychází v tomto případě vyšší produkce karotenu ve 3. sérii.

V grafu č. 4 můžeme vidět účinek hydrolytických enzymů přidaných k daným médiím. Výrazná nadprodukce β -karotenu v případě těchto médií oproti příslušným médiím o stejném složení i oproti kontrole je u vaječných těstovin (3 188,5 μ g/g sušiny) a celozrnné pšeničné

kaše (2 799 $\mu\text{g/g}$ sušiny). Tuto skutečnost zřejmě vysvětluje i sytě fialovočervené zbarvení těchto dvou médií (viz obrázek 17). Ostatní média s přidávanými enzymy vykazují také nadprodukcí β -karotenu, ne však oproti kontrole se standardním složením, ale pouze oproti příslušným médiím bez enzymů. Také nárůst biomasy u médií s přidávanými enzymy, kromě vaječných těstovin, kde je však jen nepatrný rozdíl, je oproti příslušným samotným médiím vyšší. Největší nárůst biomasy je však opět u kontroly.

Tato studie na základě svých výsledků potvrzuje rozklad polysacharidů přítomných v příslušných odpadních substrátech hydrolytickými enzymy z plísně rodu *Fusarium*. Tím je zajištěna lepší využitelnost substrátů kvasinkovými buňkami doprovázená vyšší produkcí pigmentů.

Z uvedených dílčích závěrů vyplývá, že nejlepší médium pro nárůst biomasy je s obsahem glukosy, tudíž médium o standardním složení kontrolních médií bez přidávaných odpadních substrátů. Jediný případ, kde množství biomasy (cca 16 g/l) přesahovalo standardní kontrolu, byla kontrola zaočkovaná INO II s přidávaným bramborovým extraktem. Je možné, kdyby se tento pokus uskutečnil ve 3. sérii kultivace, kde byl celkově pozorován největší nárůst biomasy (téměř 20g sušiny/l kultury), tak by tato kontrola měla ještě větší nárůst biomasy než kontrola standardní 3. série. Médium s podobnou produkcí biomasy (cca 15 g/l) jako u kontroly bylo produkční živné médium s přidávaným bramborovým extraktem místo glukosy.

Naopak nejvyšší produkce β -karotenu byly dosaženy u odpadních substrátů 4. série s přidávanými hydrolytickými enzymy, kdy bylo dosaženo produkce např. u média s těstovinami až 3,2 mg/g sušiny, což je pro současnou produkci biomasy (cca 6,5 g/l) velmi dobrý výsledek.

Ale i u ostatních médií s přidávanými odpadními substráty a hlavně s přidanou hlavní složkou příslušných odpadních substrátů do INO II lze najít velmi dobré výsledky. Nejvyšší produkce β -karotenu (0,6 mg/g) ale zároveň i největší nárůst biomasy (15,8 g/l) byl zaznamenán v 1. sérii u kontroly s INO II s bramborovým extraktem. Nejvyšší produkce β -karotenu u jablečného odpadu byla detekována u jablečných slupek s INO s vlákninou (1,15 mg/g), ale zde byl velmi malý nárůst biomasy (1,15 g/l). Kdežto celkem dobrý růst biomasy (8 g/l) i přijatelná produkce β -karotenu (0,6 mg/g) byla prokázána u média s kombinací glukosy a vlákniny s INO II s vlákninou. Z toho tedy vyplývá, že nejlepší produkce β -karotenu kromě média s dodávanými plísňovými enzymy bylo dosaženo ve standardním produkčním médiu zaočkovaném inokulem II s přidávaným bramborovým extraktem.

Obecně vzato přidání bramborový extrakt nebo vláknina do INO II i do samotných produkčních médií spíše ve většině případů podporuje velmi pozitivně produkci karotenoidů než nárůst biomasy. Vyšší produkce β -karotenu ve většině médií s INO II s bramborovým extraktem nebo vlákninou je nejspíše způsobena aktivací adaptačních mechanismů kvasinkových buněk na příslušný odpadní substrát. Avšak v případě samotné vlákniny nebyla u INO II s vlákninou podpořena ani produkce karotenoidů, ani samotný nárůst biomasy, což bylo nejspíše způsobeno její příliš velkou koncentrací v médiu nebo omezenou schopností kultury využívat vlákninu. V případě bramborového extraktu v INO II i v produkčním médiu byla rovněž podpořena produkce β -karotenu jen nepatrně.

Vláknina zřejmě tedy není vhodným komplexním substrátem pro karotenogenní kvasinky, její přídavek do inokulačního nebo kultivačního média však může pozitivně ovlivnit produkci karotenoidních pigmentů. To stejné platí i v případě bramborového extraktu, kde je tento vliv ještě větší a navíc v případě kontroly zaočkované INO II s bramborovým extraktem mírně stoupá i nárůst biomasy.

Celkově lze shrnout, že za pozitivní výsledek předložené studie lze považovat zejména skutečnost, že kvasinka *Rhodotorula glutinis* je schopna využívat alespoň některé odpadní substráty k produkci biomasy obohacené karotenoidy. Nadějně je rovněž využití plísňových enzymů k předzpracování odpadních substrátů.

6. ZÁVĚR

- Cílem práce koncipované jako srovnávací studie na úrovni metabolomu bylo srovnání možnosti použití různých typů substrátů k produkci biomasy a karotenoidních barviv kvasinkovým kmenem *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26. Jako složky živného média byly analyzovány odpadní substráty z potravinářství a zemědělství, jako např. bramborový odpad, jablečný odpad, obilniny, otruby, mláto apod. Tyto substráty byly různě kombinovány a některé z nich byly předem hydrolyzovány směsným enzymovým preparátem izolovaným z plísně *Fusarium*.
- V experimentální části práce byly provedeny 4 série kultivací lišící se složením produkčních médií i složením druhého inokula. Růst biomasy byl analyzován turbidimetricky a analýza karotenoidních pigmentů byla provedena metodou HPLC/UV-VIS. V prvních dvou sériích byl analyzován lykopen, z něhož se v biosyntéze karotenoidů syntetizují ostatní karotenoidy, torulen a β -karoten. V dalších dvou sériích byl analyzován pouze β -karoten.
- Nejvyšší nárůst biomasy byl zaznamenán u kontrolního média 3. série kultivace s výtěžkem téměř 20 g sušiny/l kultury. Nejlepším médiem pro nárůst biomasy je s obsahem glukosy. Vyšší produkce biomasy bylo dosaženo pouze ve standardním produkčním médiu zaočkovaném inokulem II s přidaným bramborovým extraktem. Srovnatelný nárůst biomasy s kontrolním médiem byl zaznamenán v produkčním médiu s přidaným bramborovým extraktem namísto glukosy.
- Nejvyšší produkce β -karotenu bylo dosaženo u médií s odpadními substráty hydrolyzovanými plísňovými enzymy. Nejvyšší výtěžek β -karotenu (až 3,2 mg/g sušiny), se současnou produkcí biomasy 6,4 g/l byl dosažen v médiu s vaječnými těstovinami a enzymy. Podobné výsledky byly zaznamenány i v živném médiu s celozrnnou pšeničnou kaší a jablečnou vlákninou, v obou případech rovněž s přidanými enzymy z plísně.
- U médií s bramborovým a jablečným odpadem byla zjištěna největší produkce β -karotenu (cca 1,15 mg/g sušiny) dosažena opět s inokulem II s vlákninou, ale zde byl velmi malý nárůst biomasy (jen 1,15 g/l). Celkově vychází v této sérii nejlépe kultivace ve standardním produkčním médiu (0,5 mg β -karotenu/g sušiny vzhledem ke koncentraci biomasy 16 g/l) zaočkovaném inokulem II s přidaným bramborovým extraktem.
- V předložené práci bylo potvrzeno, že odpadní substráty mohou být v přiměřené koncentraci využity jako přídavek do inokulačních i produkčních médií ke kultivaci karotenogenní kvasinky *Rhodotorula glutinis* a možná i dalších kvasinek produkujících karotenoidní barviva. Vhodnou kombinací lze dosáhnout dostatečného množství biomasy obohacené karotenoidy a dalšími případnými pozitivními složkami pocházejícími z přidaného odpadního substrátu. Takto obohacená biomasa by mohla být využitelná například jako přídavek do krmiv, ve farmacii či kosmetice.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha: Akademie věd ČR, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [2] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Kvasinky*. 1. vyd. Bratislava : Slovenské vydavateľstvi technické literatury, 1957. 344 s.
- [3] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Yeasts and Yeast-like Organisms*. Weiheim : VCH Verlagsgesellschaft, 1990. 528 s.
- [4] ROSE, A. H., HARRISON, J.S. *The yeasts : Volume 1-Biology of yeasts*. London : Academic Press London, 1969.
- [5] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1990. 704 s. ISBN 80-05-00644-6.
- [6] ROSE, A. H, HARRISON, J.S. *The yeasts : Volume 2-Physiology and biochemistry of yeasts*. London: Academic Press London, 1971. 571 s. ISBN 12-596402-1.
- [7] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1982. 483 s.
- [8] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. et al. *Kvasinky ve výzkumu a praxi*. Dagmar Vráná. 1. vyd. Praha: Academia, 1986. 376 s.
- [9] KRASKE, E. M. *Kandidóza : přirozená léčba onemocnění způsobeného kvasinkami*. [překlad z němčiny]. 1. vyd. Praha : Informatorium, 1996. 93 s. ISBN 80-86073-00-9.
- [10] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Atlas kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*, Bratislava: Alfa, 1990.
- [11] PARAJÓ, J. C., SANTOS, V., VÁZQUEZ, M. Co-production of carotenoids and xylitol by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Biotechnology Letters*. 1997, s. 139-141.
- [12] YURKOV, A. M., et al. Pigmented Basidiomycetous Yeasts Are a Promising Source of Carotenoids and Ubiquinone Q10. *Microbiology*. 2008, vol. 77, no. 1, s. 1-6. ISSN 0026-2617.
- [13] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. MU Brno, 2007. ISBN 80-210-4207-9.
- [14] VUORI, A. *Effect of different propagation techniques on the total carotenoid contents in *Rhodotorula sanneii**. Helsinki, 1972.

- [15] LIBKIND, D., VAN BROOCK, M. Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeasts. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2006, s. 687-692.
- [16] KARRER, P., JUCKER, E. *Carotenoids*. Zurich, 1951. 384 s.
- [17] TANAKA, Y., OHMIYA, A. Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Current Opinion in Biotechnology*. 2008, 19: s. 190-197
- [18] KALAČ, P. *Karoteny v objemných krmivech a jejich úloha ve výživě skotu*. 1. vyd. Praha, Čs. red. VN MON. 72 s.
- [19] KRULIKOVSKÁ, T., PATÁKOVÁ, P., LUKČO, M.. Vývoj metody izolace karotenoidních barviv z kvasinek rodu *Rhodotorula*. *Chemické listy* 102. 2008, s. 1145-1149.
- [20] DVOŘÁKOVÁ, T. *Sledování metabolických změn karotenogenních kvasinek v závislosti na podmínkách kultivace*. Diplomová práce, FCH VUT v Brně, 2008
- [21] FOREJTÍKOVÁ, H., KUBÍNOVÁ, R. Přírodní látky ovlivňující mezibuněčnou komunikaci. *Chemické listy* 97. 2003, s. 1168-1175
- [22] SCHMIDT-DANNERT, C. Engineering novel carotenoids in microorganisms, *Current Opinion in Biotechnology*. 2000, 11: s. 255-261 ISSN 0958-1669/00/\$
- [23] VODRÁŽKA Z. *Biochemie*. Academia Praha, 1996
- [24] VESELÁ, M. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 3. vyd. VUT Bno, 2004, ISBN 80-214-2567-9
- [25] MALISORN, C., SUNTORNUSUK, W. Improved β -carotene production of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation. *Biochemical Engineering Journal*. 2009, vol. 43, s. 27-32. ISSN 1369-703X/\$.
- [26] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [27] KROFTA, J., et al. *Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie II: Kapalinová chromatografie a absorpční UV-spektrofotometrie*. VŠCHT Praha, 2001, 19 s.
- [28] SOMMER, L., et al. *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. VUT Brno, 2000, 347 s., ISBN 80-214-1742-0.

- [29] JULÁK, J. *Identifikace bakterií metodami instrumentální chemické analýzy*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998, 196 s. ISBN 80-7184-451-9.
- [30] SKUTEK, M. *Analýza vybraných aktivních látek v cereálních výrobcích*. Diplomová práce, FCH VUT v Brně, 2009

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

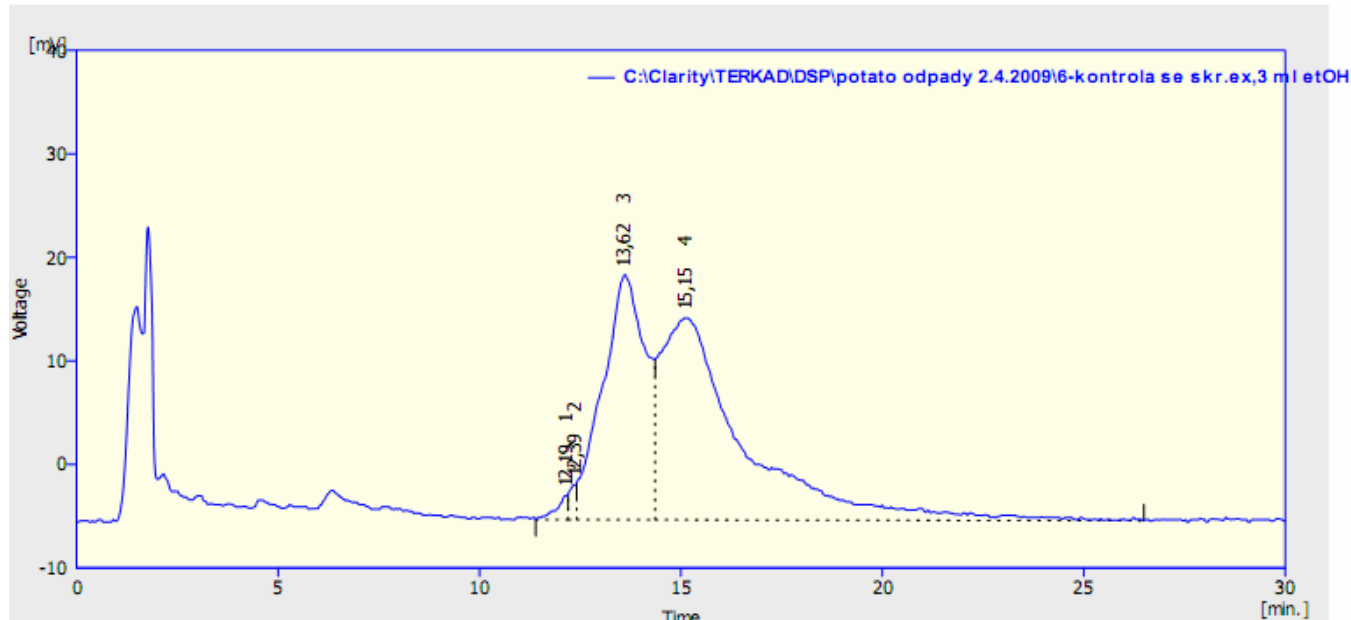
Acetyl-CoA	acetyl-koenzym A
HMG-CoA	β -hydroxy-methylglutaryl-CoA
IDP	isopentenylidifosfat
DMADP	dimethylallyldifosfat
GGDP	geranylgeranyldifosfat
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
RG	<i>Rhodotorula glutinis</i>
INO	inokulum

9. SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1:** HPLC chromatogram - kultivace ve standardním produkčním médiu zaočkovaném INO II s bramborovým extraktem
- Příloha 2:** HPLC chromatogram karotenoidů izolovaných z *R. glutinis* - kultivace v produkčním médiu obsahujícím glukosu a bramborové slupky, INO II bez bramborového extraktu
- Příloha 3:** HPLC chromatogram - kultivační médium s obsahem jablečných slupek zaočkované INO II s jablečnou vlákninou
- Příloha 4:** HPLC chromatogram - produkční médium obsahující glukosu a jablečnou vlákninu zaočkované INO II s jablečnou vlákninou
- Příloha 5:** HPLC chromatogram - kontrola 4. série kultivace s přidavkem hydrolytických enzymů z plísně *Fusarium solani*

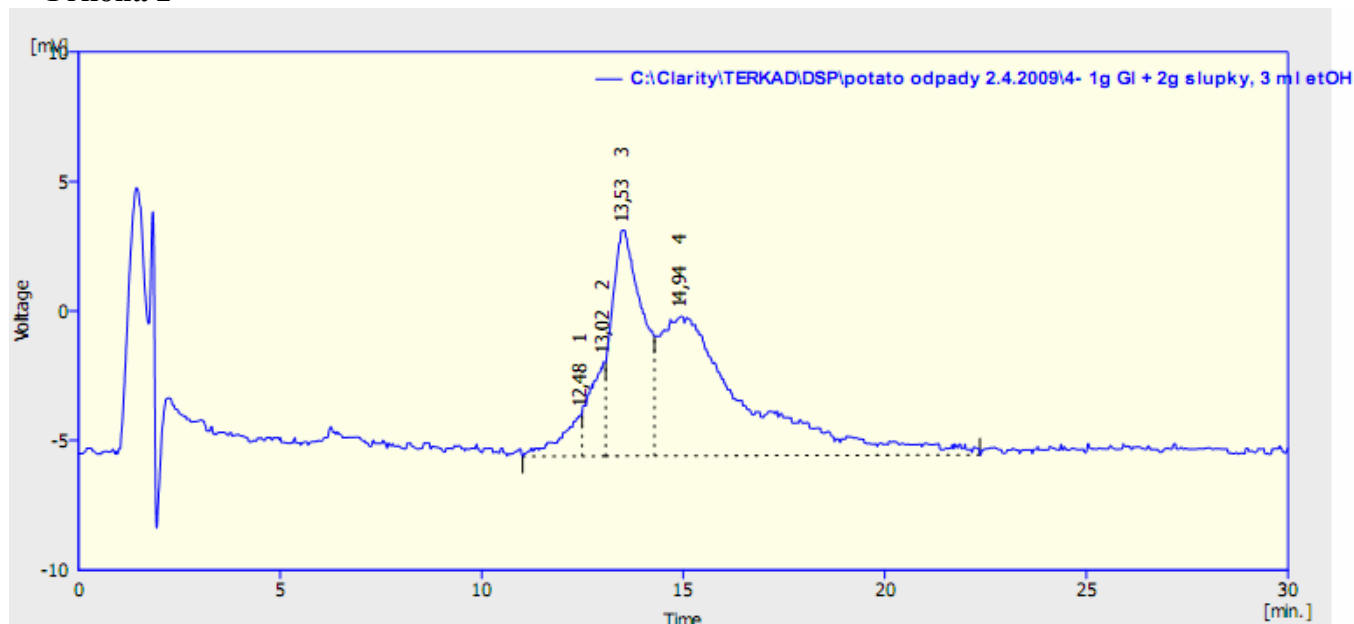
10. PŘÍLOHY

Příloha 1



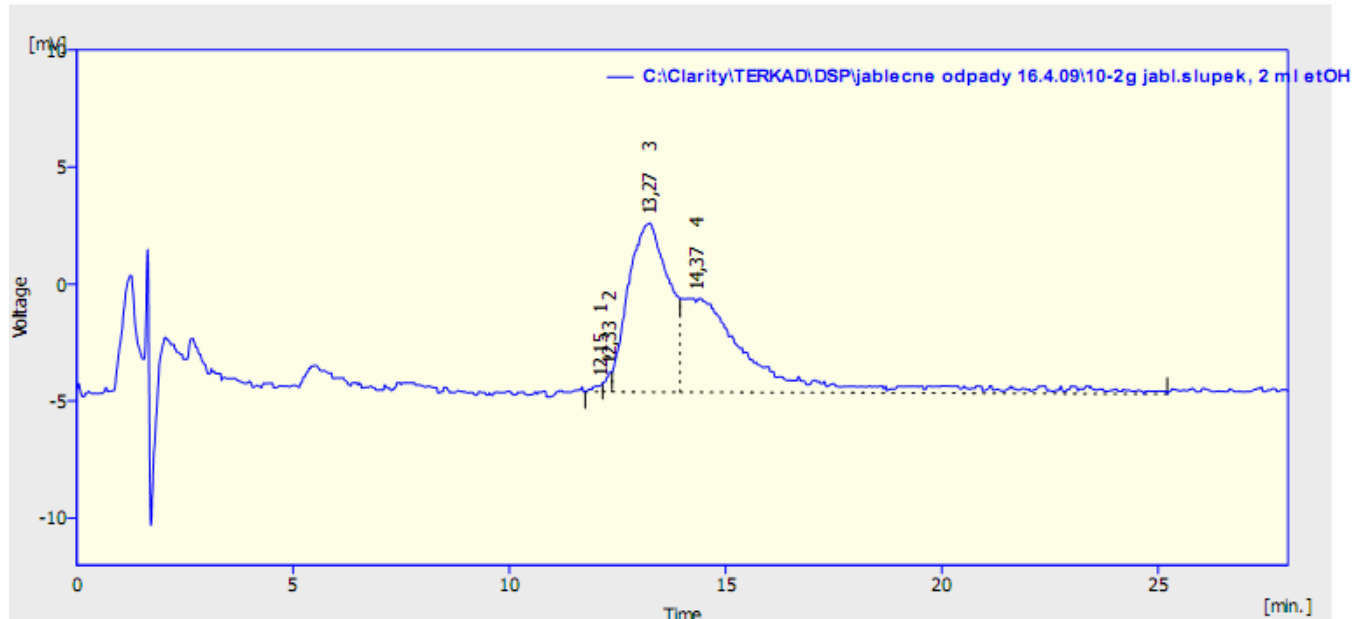
HPLC chromatogram – kultivace ve standardním produkčním médiu zaočkovaném INO II s bramborovým extraktem (viz kapitola 5.2, str. 38-39)

Příloha 2



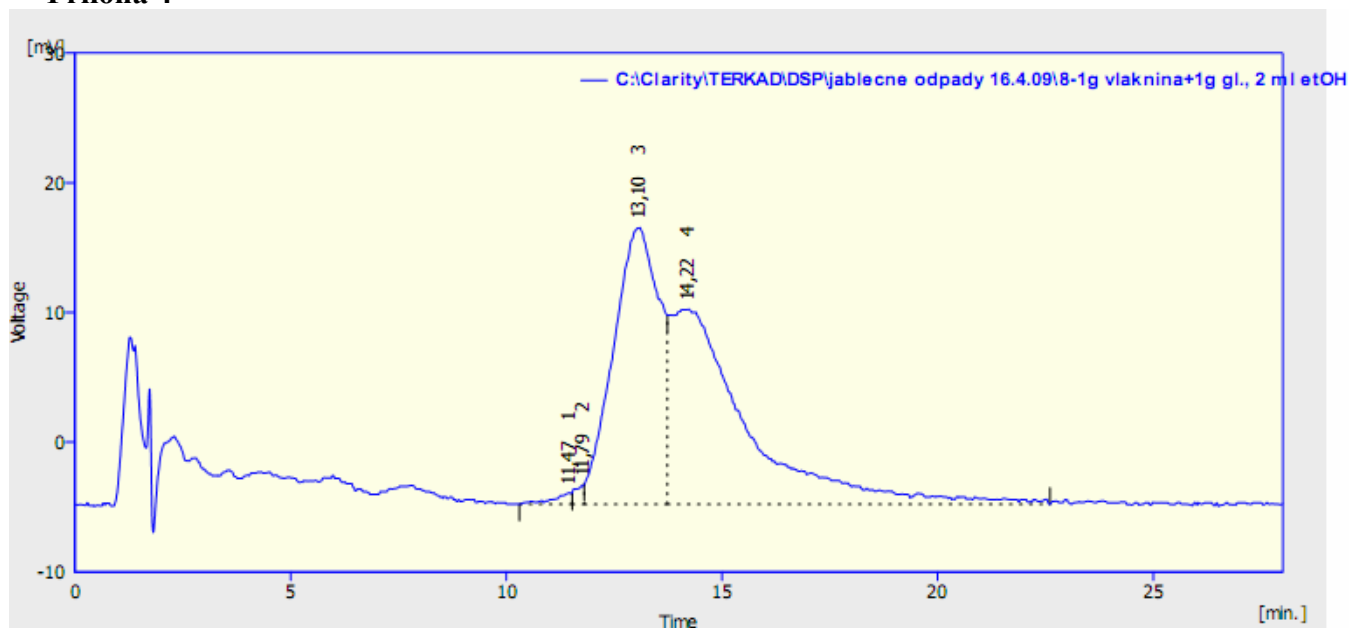
HPLC chromatogram karotenoidů izolovaných z R.glutinis – kultivace v produkčním médiu obsahujícím glukosu a bramborové slupky, INO II bez bramborového extraktu (viz kapitola 5.2, str. 38-39)

Příloha 3



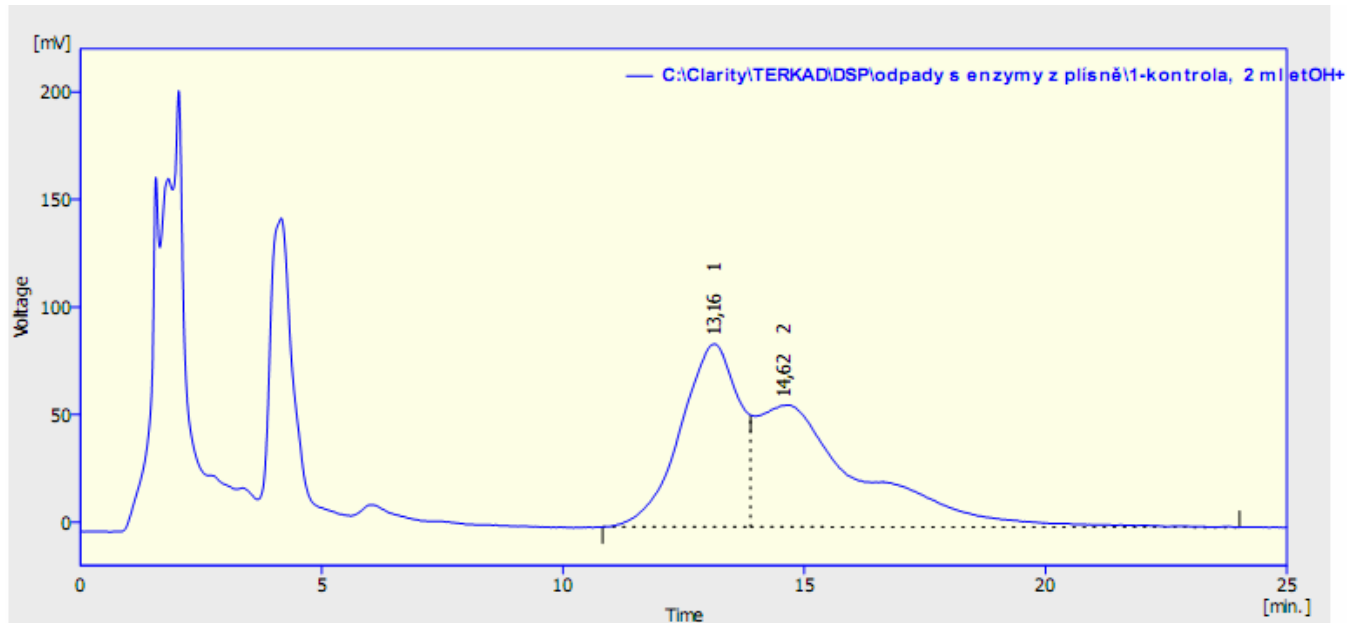
HPLC chromatogram – kultivační médium s obsahem jablečných slupek zaočkováné INO II s jablečnou vlákninou (viz kapitola 5.2, str. 39-40)

Příloha 4



HPLC chromatogram – produkční médium obsahující glukosu a jablečnou vlákninu zaočkováné INO II s jablečnou vlákninou (viz kapitola 5.2, str. 39-40)

Příloha 5



*HPLC chromatogram - kontrola 4. série kultivace s přidavkem hydrolytických enzymů z plísně *Fusarium solani* (viz kapitola 5.2, str. 41-43)*