

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

KULTIVACE KAROTENOGENNÍCH KVASINEK NA ODPADNÍCH
SUBSTRÁTECH V PODMÍNKÁCH SSF (SOLID STATE
FERMENTATION)

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

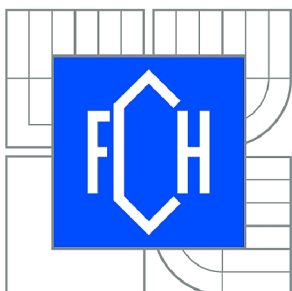
MAREK RAPTA

BRNO 2013



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

KULTIVACE KAROTENOGENNÍCH KVASINEK NA ODPADNÍCH SUBSTRÁTECH V PODMÍNKÁCH SSF (SOLID STATE FERMENTATION)

CULTIVATION OF CAROTENOGENIC YEASTS ON WASTE SUBSTRATES USING SOLID STATE
FERMENTATION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

MAREK RAPTA

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2013



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

Zadání bakalářské práce

| | | |
|-------------------------|--|----------------------------------|
| Číslo bakalářské práce: | FCH-BAK0739/2012 | Akademický rok: 2012/2013 |
| Ústav: | Ústav chemie potravin a biotechnologií | |
| Student(ka): | Marek Rapta | |
| Studijní program: | Chemie a technologie potravin (B2901) | |
| Studijní obor: | Biotechnologie (2810R001) | |
| Vedoucí práce | doc. RNDr. Ivana Márová, CSc. | |
| Konzultanti: | Ing. Andrea Hároniková | |

Název bakalářské práce:

Kultivace karotenogenních kvasinek na odpadních substrátech v podmínkách SSF (solid state fermentation)

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše - princip kultivace mikroorganismů v uspořádání SSF, možnosti kultivace kvasinek na pevné fázi.
2. Optimalizace kultivačních podmínek pro SSF kultivaci karotenogenních kvasinek s využitím odpadních substrátů.
3. Srovnání výtěžku vybraných metabolitů pomocí kultivace v kapalném médiu a s využitím SSF kultivace.

Termín odevzdání bakalářské práce: 10.5.2013

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

Marek Rapta
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

„Semi-solid fermentation“ je čoraz viac využívanou technikou k produkcii významných metabolitov, či obohatenej biomasy za nízkych finančných nákladov, nízkej spotreby kultivačnej vody a zároveň s malou záťažou na životné prostredie. Problémom tejto techniky ale môže byť voľba vhodného mikroorganizmu, ktorý je schopný rásť a produkovať pri nízkej aktivite vody.

Predložená práca je poňatá ako pilotná štúdia troch kvasinkových kmeňov *Rhodotorula glutinis*, *Cystofilobasidium capitatum* a *Sporobomomyces roseus* kultivovaných technikou „semi-solid state fermentation“ (semi-SSF). Kvasinky boli kultivované v sériách produkčných médií s postupným znižovaním obsahu kultivačnej vody. Ako uhlíkatý zdroj sacharidov boli použité cestoviny a hydrolyzované cestoviny, v kontrolných médiách glukóza.

Všetky študované kmene boli schopné rásť a produkovať sledované lipidické metabolity i pri nízkych obsahoch vody. Produkcie karotenoidov a sterolových látok boli vyššie práve v médiách s nízkou aktivitou vody. Bunky sa tak pravdepodobne chránili pred väčším osmotickým tlakom. Ako najlepší producent karotenoidov i biomasy sa ukázal kmeň *Cystofilobasidium capitatum*, kultivovaný na médiu s hydrolyzovanými cestovinami a obsahom vody 40%.

Semi-SSF sa javí ako dobrá technika pre selekciu kmeňov s nadprodukčnými vlastnosťami. Výberom vhodného produkčného média a koncentrácie vody sa dá optimalizovať stimulácia produkcie sledovaných metabolitov v kvasinkových bunkách.

Kľúčové slová: karotenoidy, *Rhodotorula glutinis*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Sporobomomycesroseus*, solid-state fermentation, fyziologický stres

SUMMARY

Semi-solid fermentation is an eco - friendly technique more and more used for production of significant metabolites or enriched biomass at low entrance cost and low consumption of water. The problem of this technique might be the right choice of microorganism able to grow and produce at low water activity.

This work is a pilot study of three red yeast strains – *Rhodotorula glutinis*, *Cystofilobasidium capitatum* and *Sporobomomyces roseus* cultivated by semi-solid state fermentation (semi-SSF). Yeasts were cultivated in series of production media with gradual reduction of cultivation water content.

Pasta and hydrolyzed pasta were used as source of sacharides, glucose served as the carbon source in control media. All studied strains were able to grow and produce observed lipidic metabolites also at low water contents. Production of carotenoids and sterols was higher in semi-solid media.

Cystofilobasidium capitatum strain was identified as the best producer of carotenoids and biomass. This strain was cultivated on hydrolyzed pasta

media with 40% water content. Semi-SSF seems to be an adequate technique for selection of strains having over-productive properties. Observed metabolites production in yeast cells can be optimized by choosing the appropriate production media and water activity.

Keywords: carotenoids, *Rhodotorula glutinis*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Sporobomomycesroseus*, solid-state fermentation, physiological stress

RAPTA, M. Kultivace karotenogenních kvasinek na odpadních substrátech v podmínkách SSF (*solid state fermentation*). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 60 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc..

PREHLÁSENIE

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

.....
podpis študenta

PodĎakovanie:

Ďakujem doc. RNDr. Ivane Márovej, CSc. za odborné vedenie a cenné rady počas celej práce a Ing. Andrei Háronikovej za veľkú ochotu a pomoc pri riešení experimentálnej časti práce.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| 1 Úvod | 7 |
| 2 Teoretická časť | 8 |
| 2.1 Kvasinky | 8 |
| 2.1.1 Cytológia kvasiniek | 8 |
| 2.1.2 Rozmnožovanie | 9 |
| 2.2 Kvasinky v priemysle..... | 11 |
| 2.3 Karotenoidné kvasinky..... | 11 |
| 2.3.1 Rod <i>Sporobolomyces</i> | 11 |
| 2.3.2 Rod <i>Rhodotorula</i> | 12 |
| 2.3.3 Rod <i>Cystofilobasidium</i> | 13 |
| 2.4 Rast mikroorganizmov | 13 |
| 2.4.1 Živné médiá | 13 |
| 2.4.2 Rastová krivka | 14 |
| 2.5 Stresové faktory vplývajúce na rast mikroorganizmov..... | 15 |
| 2.5.1 Teplota | 16 |
| 2.5.2 pH | 16 |
| 2.5.3 Vodná aktivita | 16 |
| 2.5.4 Oxidoredukčný potenciál | 16 |
| 2.5.5 Solný stres | 17 |
| 2.5.6 Žiarenie | 17 |
| 2.6 Karotenoidy | 17 |
| 2.6.1 Charakteristika..... | 17 |
| 2.6.2 Význam karotenoidov..... | 19 |
| 2.6.3 Biosyntéza..... | 19 |
| 2.7 Kultivácie na tuhých povrchoch; polosuché kultivácie (SSF)..... | 21 |
| 2.7.1 Princíp..... | 21 |
| 2.7.2 Využitie SSF | 21 |
| 2.8 Metodické postupy | 22 |
| 2.8.1 Absorpčnáspektrofotometria..... | 22 |
| 2.8.2 Extrakcia | 22 |
| 2.8.3 Vysokoučinná kvapalinová chromatografia – HPLC | 23 |
| 3 Cieľ práce | 25 |
| 4 Experimentálna časť | 26 |
| 4.1 Materiál a chemikálie..... | 26 |
| 4.2 Prístroje a pomôcky..... | 26 |
| 4.3 Použité kmene mikroorganizmov..... | 27 |
| 4.4 Metódy kultivácie mikroorganizmov | 27 |
| 4.4.1 Inokulum I | 27 |

| | | |
|---------|--|-----------|
| 4.4.2 | Inokulum II | 27 |
| 4.4.3 | Produkčné média | 27 |
| 4.4.4 | Stanovenie množstva biomasy | 29 |
| 4.4.5 | Spracovanie biomasy | 29 |
| 4.4.6 | Mikroskopické pozorovanie buniek | 29 |
| 4.5 | Analýza sledovaných metabolitov | 29 |
| 4.5.1 | Izolácia karotenoidov a ergosterolu | 29 |
| 4.5.2 | Extrakcia a úprava vzorku | 30 |
| 4.5.3 | Analýza karotenoidov HPLC | 30 |
| 4.5.4 | Identifikácia a kvantifikácia karotenoidov | 30 |
| 4.6 | Stanovenie zloženia média – analýza obsahu redukujúcich sacharidov metódou Somogyiho–Nelsona | 30 |
| | 5 Výsledky a diskusia | 32 |
| 5.1 | Výsledné rastové, morfológické a produkčné charakteristiky použitých kvasiniek .. | 32 |
| 5.1.1 | Druh <i>Cystofilobasidium capitatum</i> | 32 |
| 5.1.1.1 | Morfologické zmeny kvasiniek v rôznych produkčných médiách | 32 |
| 5.1.1.2 | Produkčné vlastnosti na rôznych typoch použitých médií | 37 |
| 5.1.2 | Rod <i>Rhodotorula glutinis</i> | 40 |
| 5.1.2.1 | Morfologické zmeny kvasiniek v rôznych produkčných médiách | 40 |
| 5.1.2.2 | Produkčné vlastnosti na rôznych typoch použitých médií | 45 |
| 5.1.3 | Rod <i>Sporobolomyces roseus</i> | 48 |
| 5.1.3.1 | Morfologické zmeny kvasiniek v rôznych produkčných médiách | 48 |
| 5.1.3.2 | Produkčné vlastnosti na rôznych typoch použitých médií | 53 |
| 5.2 | Analýza obsahu redukujúcich cukrov v použitých cestovinových médiách | 55 |
| 5.3 | „Semisolid fermentation“ -Polosuché kultivácie na Petriho miskách s cestovinovým substrátom | 57 |
| | 6 Záver | 58 |
| | 7 Literatúra | 59 |
| | 8 Zoznam použitých skratiek | 61 |

1 ÚVOD

Karotenoidy tvoria významnú skupinu prírodných pigmentov s dôležitými biologickými vlastnosťami. Voľne sa vyskytujú u väčšiny rastlín ako súčasť fotosyntetického aparátu. Ich prítomnosť bola dokázaná aj u niektorých druhov kvasiniek. Ich prítomnosť je zreteľná aj v ovocí a zelenine a najčastejšie je signalizovaná žltým, oranžovým, až červeným zafarbením. Tam sú súčasťou bunkovej membrány a plnia tu fotoprotekčnú funkciu. Karotenoidy sa vyskytujú aj v ľudskom organizme, kde plnia funkciu biologických antioxidantov a ovplyvňujú imunitný systém. Sú zdrojom provitamínu A, dôležité pre dobrý zrak, ako prevencia proti kardiovaskulárnym ochoreniam a znižujú riziko vzniku rakoviny. Pre ich široké uplatnenie sa využívajú vo farmaceutickom, potravinárskom a poľnohospodárskom priemysle.

Hlavný význam karotenoidov ako veľmi účinných antioxidantov vychádza z ich štruktúry, ktorá podmieňuje ich schopnosť reagovať s kyslíkom. To znamená, že môžu vracieť excitované molekuly kyslíka do ich základného energetického stavu.

V súčasnej dobe je získavanie karotenoidov extrakciou z rastlinných materiálov náročná a drahá záležitosť. Preto je dôvod skúmať nové možnosti mikrobiologickej produkcie karotenoidov na rôznych odpadných substrátoch.

V súčasnosti sa väčšina fermentácií robí submerzným spôsobom. Ďalšou variantou je menej využívaný druh fermentácie – tzv. „solid-state fermentation“. Tento druh kultivácie je známy už dlho, ale od vynálezu penicilínu sa rozvoj kultivácii sústredil na submerznú metódu. v dnešnej dobe sa opäť objavujú výhody SSF a je záujem o jej rozvoj. Pomocou SSF je možné produkovať enzýmy, antibiotiká a rôzne ďalšie sekundárne metabolity slúžiace ako biologicky aktívne látky.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Kvasinky

Kvasinky sú heterotrofné eukaryotné mikroorganizmy, radiace sa do ríše húb (fungi). Názov dostali pre fermentačnú schopnosť väčšiny druhov skvasovať monosacharidy, niektoré disacharidy, prípadne aj trisacharidy na ethanol a oxid uhličitý. Tvar buniek kvasiniek súvisí so spôsobom vegetatívneho rozmnožovania, vlastnou funkciou bunky a mení sa aj v závislosti na vonkajších podmienkach. Kvasinky majú najčastejšie elipsoidný, poprípade vajcovitý až guľovitý tvar [1, 2, 3].

2.1.1 Cytológia kvasiniek

Základnými časťami vegetatívnej kvasinkovej bunky sú bunková stena, cytoplazmatická membrána, cytoplazma, ktorá obsahuje radu ďalších membránových štruktúr, a jadro, ktoré je od cytoplazmy oddelená dvojitoú jadrovou membránou. Bičik, ako pohybový orgán, sa u kvasiniek nevyskytuje. Niektoré druhy kvasiniek tvoria spóry, ktoré však majú fyziologické vlastnosti odlišné od vlastností endospór u baktérií [1, 3].

Na povrchu bunky sa nachádza silná a pevná **bunková stena**. Jej úlohou je chrániť bunku pred mechanickými vplyvmi a osmotickým šokom a zároveň dáva bunke tvar. Jej hlavnou zložkou sú polysacharidy (80 %), prevažne glukany. Majú štruktúru vlákien tvoriacich hustú pevnú spleť. Ostatnými zložkami sú bielkoviny, lipidy a fosfolipidy a ďalej fosforečnany, viazané esterovými väzbami na polysacharidové zvyšky. Tieto fosfátové zvyšky spolu so skupinami $-COOH$ na bielkovinách udávajú bunkám kvasiniek negatívny náboj. Tento náboj ovplyvňuje adsorpciu látok z prostredia [1, 3].

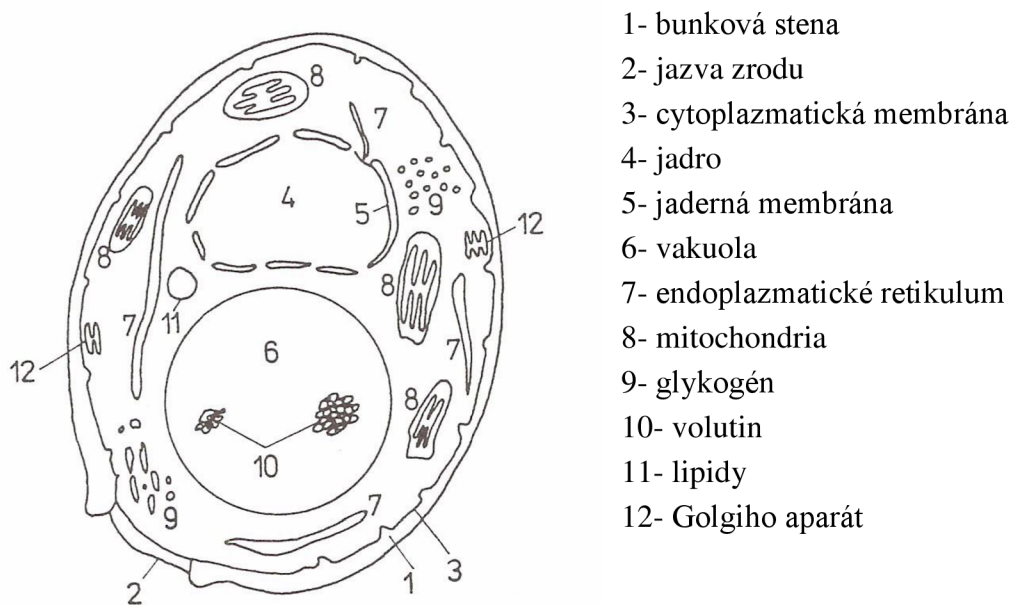
Cytoplazmatická membrána (často nazývaná plazmalema) je pomerne tenká. Je zložená z lipidov a proteínov, voľne priepustná len pre malé molekuly bez náboja a tvorí teda osmotické rozhranie medzi bunkou a vonkajším prostredím. v nej sa nachádzajú transportné mechanizmy zabezpečujúce príjem určitých látok bunkou a transport látok z bunky do prostredia. Na rozdiel od baktérií sa v cytoplazmatická membrána neobsahuje dýchacie enzýmy a systém oxidačnej fosforilácie. Bunka ohraničená len cytoplazmatickou membránou bez bunkovej steny či puzdra sa nazýva protoplast [1].

Cytoplazma sa u mladých buniek javí ako priehľadná homogénna hmota, u starších buniek sa objavujú zrníčka a jemná alebo väčšia vakuolizácia. v nej sa nachádza **endoplazmatické retikulum**, viditeľné pod elektrónovým mikroskopom ako systém dvojitoých membrán. Obsahuje rôzne enzýmy a rezervné látky. Medzi ďalšie útvary nachádzajúce sa v cytoplazme patria **mitochondrie**. Sú zložené hlavne z bielkovín, lipidov a fosfolipidov. Majú rozmanitý tvar (guľovitý, valcovitý až vláknitý, alebo laločnatý), ktorý sa líši aj v rámci jednej bunky. Sú obklopené dvomi membránami. Vonkajšia má bradavčitý povrch a vnútorná tvorí hlboké vychlípeniny smerom dnu (kristy). Mitochondrie sú sídlom dýchacích enzýmov a systému oxidačnej fosforylácie [1].

Medzi najnápadnejšie orgány v cytoplazme patrí **vakuola**. Je to väčšinou guľovitý útvar obklopený jednoduchou membránou. Vnútri sú uložené hydrolytické enzýmy, ako proteínázy, ribonukleázy a esterázy a teda dochádza tu k rozpadu tých štruktúr bunky, ktoré sa neustále obnovujú a majú krátky polčas rozpadu (mRNA, enzýmy a pod.). Okrem toho obsahujú fosfatázy, veľkú zásobu draselných iónov, aminokyselín a purínov, takže sú rezervoárom tých látok, ktoré sa práve nezúčastňujú metabolizmu [1].

Ďalším membránovým útvarom v cytoplazme kvasiniek je **Golgyho aparát**, ktorý má tvar jedného alebo viacerých plochých mechúrikov alebo cisterien uložených tesne vedľa seba. Úlohou tohto aparátu je transport prekurzorov bunkovej steny z cytoplazmy cez cytoplazmatickú membránu [1].

Jadro je umiestnené približne v strede bunky. U kvasiniek ho od cytoplazmy ho oddeľuje dvojitá jadrová membrána s veľkými pórmí. v haploidnom jadre kvasiniek bolo zistených 16 chromozómov, u diploidných buniek je tento počet potom dvojnásobný. v jadre sa ďalej nachádza jadierko srbkovitého tvaru (uložené tesne pod jadrovou membránou), pólóvé teliesko vretienka diskovitého tvaru s vystupujúcimi vláknami mikrotubúl. Mikrotubuly s vetienkovitým telieskom hrajú dôležitú rolu behom rozmnožovania buniek [1].



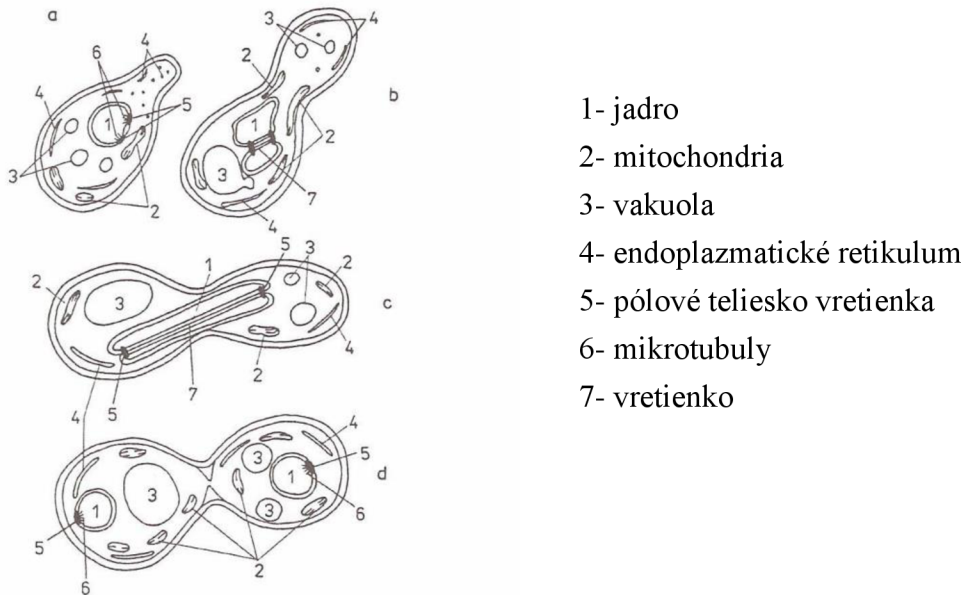
Obrázok 1: Prierez bunky kvasinky [1]

2.1.2 Rozmnožovanie

Kvasinky sa môžu rozmnožovať vegetatívne a pohlavne. Pri **vegetatívnom rozmnožovaní** sa väčšina rodov kvasiniek rozmnožuje pučaním. Pred samotným pučaním dôjde k splynutiu membrán endoplazmatického retikula a jeho následnému deleniu, znásobeniu počtu vakuol, počiatku tvorby pupenu a zmene tvaru mitochondrií na dlhý pretiahnutý tvar. Po začiatku tvorby pupenu sa do neho presúvajú novo vzniknuté drobné vakuoly a mitochondrie. Súčasne začne prebiehať mitotické delenie jadra a jeho presun k pupenu. Spolu s jadrom do vytvoreného pupenu migrujú aj ďalšie zložky cytoplazmy. Po migrácii všetkých organel cytoplazmatická membrána uzatvorí kanálik medzi materskou a dcérskou bunkou. v pupene sa intenzívne syntetizuje a rozširuje endoplazmatické retikulum. Pučanie je ukončené po vytvorení bunkovej steny, náraste veľkosti pupenu a spojení malých vakuol v jednu veľkú. Celý cyklus bunecného delenia od vzniku malého pupenu až po oddelenie bunky trvá u kvasiniek za optimálnych podmienok približne dve hodiny.

U niektorých rodov alebo kmeňov kvasiniek dochádza k tvorbe buniek pretiahnutého tvaru, ktoré pučia len na póloch a aj po niekoľkonásobnom delení ostávajú spojené. Tak dochádza k tvorbe dlhých zaškrvcovaných vlákien, tzv. pseudomycéliu. v určitých miestach pseudomycelia vznikajú zväzky kratších elipsoidných buniek blastospór. U niektorých rodov

sa vytvára tzv. pravé mycélium, to je vlákno vznikajúce priečnym delením pretiahnutých buniek. Rozmnožovanie delením, avšak bez tvorby mycélia, sa vyskytuje u rodu *Schizosaccharomyces*.

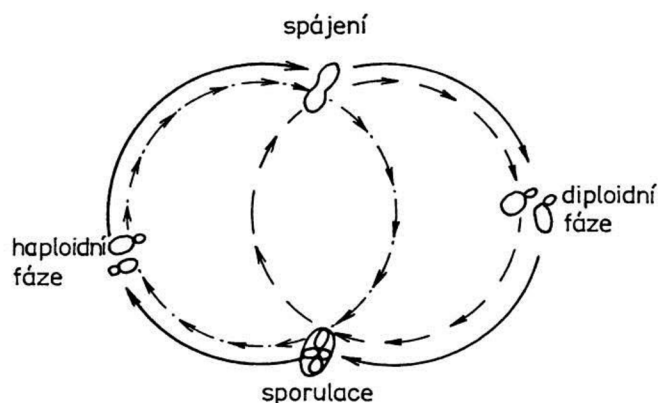


- 1- jadro
- 2- mitochondria
- 3- vakuola
- 4- endoplazmatické retikulum
- 5- pólové teliesko vretienka
- 6- mikrotubuly
- 7- vretienko

Obrázok 2: Schéma pučania kvasiniek [1]

Mimo vegetatívneho rozmnožovania je u mnohých druhov kvasiniek známa schopnosť pohlavného rozmnožovania. Výsledkom pohlavného rozmnožovania sú pohlavné spóry. Väčšina kvasiniek tvorí ako pohlavné spóry askospóry, čo sú endospóry, umiestnené vo vaku alebo asku. Tieto kvasinky sa preto radia medzi *Ascomycotina*. Iné rody kvasiniek tvoria spóry, ktoré sú umiestnené na vonkajšej strane sporotvorných buniek. Takéto spóry sa nazývajú exospóry a tieto rody kvasiniek radíme medzi *Basidiomycotina*.

Pri pohlavnom rozmnožovaní dochádza ku konjugácii dvoch haploidných buniek (kopulácii) a karyogamiou (spájaniu jadier) za vzniku diploidného jadra. Diploidné jadro sa ďalej delí meiózou, tj. redukčným delením, na štyri haploidné jadrá, ktoré sú potom základom pohlavných spór alebo sa delia ďalšou mitózou a až potom vznikajú spóry (sporulácia). V životnom cykle bunky kvasinky sa tak pravidelne strieda haploidná a diploidná fáza bunky [1].



Obrazok 3: Striedanie haploidnej a diploidnej fáze rastu u kvasiniek [1]

2.2 Kvasinky v priemysle

Technologicky najvýznamnejším rodom kvasiniek je rod *Saccharomyces*, i keď obsahuje len sedem druhov. Tieto druhy sú schopné skvasovať niekoľko druhov cukrov, nikdy nevyužívajú ako zdroj uhlíka laktózu a dusičnany ako zdroj dusíka. Najvýznamnejším z tohto rodu je druh *Saccharomyces cerevisiae*, ktorý sa využíva ako pivovarská, liehovarnícka, vinárska a pekárnska kvasinka. Tento rod je charakteristický vyrovnanosťou tvaru a veľkosti buniek a stálosťou jeho technologických vlastností. *S. cerevisiae* slúži aj ako modelový mikroorganizmus pre biochemické a genetické práce a je preto najštudovanejšou kvasinkou [1].

Z ďalších druhov priemyselne využívaných kvasiniek je možné menovať druhy *Yarrowia* a *Pichia* (produkcia biomasy z n-alkánov), *Saccharomycodes* (silné kvasné schopnosti), *Schizosaccharomyces* (výroba alkoholického nápoja „pombe“ a odkysľovanie vína). Pre výrobu kýmneho droždia z melasy a rôznych odpadových materiálov sa používa najčastejšie rod *Candida*. Druh *Candida boidinii* využíva ako zdroj uhlíka metanol, ktorý sa získava chemickou oxidáciou zemného plynu alebo bioplynu [1].

2.3 Karotenoidné kvasinky

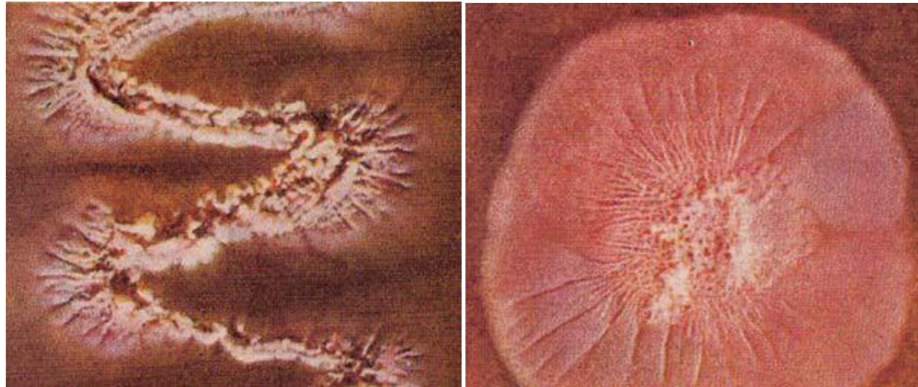
Niektoré kvasinky sú známe schopnosťou akumulovať karotenoidné pigmenty ako sekundárne metabolity. Rast týchto mikroorganizmov je spojený s ich produkciou karotenoidov. Maximálna akumulácia karotenoidov bola pozorovaná v stacionárnej fáze ich rastu v súvislosti so starnutím buniek. Ich produkcia je hlavným mechanizmom ochrany proti oxidatívne mu stresu. Medzi významných producentov karotenoidov patria rody *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* a *Cystofylobasidium* [1].

2.3.1 Rod *Sporobolomyces*

Rod *Sporobolomyces* je imperfektná forma rodu *Sporidiobolus*. Patria do čeľade *Basidiomycetes* a vytvárajú asymetrické balistokonídie. Rozmnožujú sa teda vegetatívne. Niektoré druhy vytvárajú mycélium alebo pseudomycélium. Rod *Sporobolomyces* nemá fermentačné vlastnosti ale vyznačujú sa silnou karotenogé zou [1, 2, 4].

Do tohto rodu patrí druh *Sporobolomyces roseus*. Majú guľaté, elipsoidné až pretiahnuté bunky o veľkosti 3 až 8 x 5 až 13 μm. Kolónie na agare sú slab o drsné, hladké a okolo náteru sa vytvárajú sekundárne kolónie vznikajúce z odstreľovaných balistokonídií. Farba náteru je ružová, pomarančová až korálovočervená. v kvapalnom prostredí vytvára sediment a veľmi

hrubý prstenec. *Sporobolomyces roseus* produkuje β -karotén, torulén a torularhodin. Zvýšená produkcia torularhodinu bola pozorovaná pri vystavení tejto kvasinky stresovým faktorom. vyskytuje vo fyto sfére a atmosfére kde je častým zdrojom výživy dusíkom nitrát alebo redukované formy dusíkatých zlúčenín. Často sa vyskytujú aj ako kontaminanty rôznych potravín rastlinného materiálu, vinárenských zariadení a pod [3, 4, 8].



Obrázok 4: Náter a kolónia rodu *Sporobolomyces* [7]

2.3.2 Rod *Rhodotorula*

Rod *Rhodotorula* je imperfektná forma rodu *Rhodosporidium*. Má malé guľaté až oválne bunky, ktoré netvoria spóry a len zriedka vytvárajú primitívne mycélium. v kvapalnom prostredí vytvára *Rhodotorula* sediment a prstenec krémovej až svetlooranžovej farby. Náter na agare je hladký, lesklý, slizovitý, riedky aj cestovitý a sfarbenie býva koraločervené, pomarančové alebo lososové. Ich farba a vzhľad sa často mení s rôznym zložením substrátu, na ktorom sú kultivované [3, 4].

Výskyt druhov kvasiniek rodu *Rhodotorula* je rozšírený po celom svete. Nachádzajú sa vo vzduchu, v pôde, slanej aj sladkej vode, na povrchu rastlín ale aj v rôznych orgánoch živočíchov, kde spôsobuje rôzne ochorenia. Tento rod je nenáročný na životné podmienky a prispôsobuje sa širokému spektru uhlíkatých zlúčenín. Na svoje rozmnožovanie vyžadujú málo dusíkatých látok a môžu tak rásť aj v pôdach bez zdroja dusíka. Ich prítomnosť je ľahko dokázateľná vďaka ich sfarbeniu [3].

Všetky druhy tohto rodu sa vyznačujú tým, že za určitých životných podmienok vytvárajú nadmerné množstvo lipidických látok, ktoré sa hromadia v bunkách. Akumulácia intracelulárnych lipidov karotenogénnymi kvasinkami môže vychádzať z rôznych zdrojov uhlíka. Avšak pomer koncentrácie zdrojov uhlíka k dusíku má významný vplyv na túto syntézu. Bunky výrazne produkujú lipidy v médiách chudobných na dusík, kde obsah lipidov môže dosiahnuť až okolo 80% bunečnej sušiny. Hlavné zastúpenie mastných kyselín v akumulovaných lipidoch majú kyselina palmitová, kyselina stearová, kyselina olejová, kyselina linolenová a kyselina gama-linolenová. Tieto kyseliny majú veľký význam z viacerých dôvodov, medzi inými i vo využití v krmnom priemysle ako alternatívne prírodné zdroje na výživu živočíchov. Po extrakcii lipidov môže byť biomasa použitá i ako zdroj proteínov dôležitých na výživu vďaka obsahu základných aminokyselín. Najčastejšie vyskytujúcim sa druhom v prírode je *Rhodotorula glutinis*, bohatá hlavne na karotenogénne pigmenty torulén a torularhodin [4, 5, 6].



Obrázok 5: Náter a kolónia rodu *Rhodotorula* [7]

2.3.3 Rod *Cystofilobasidium*

Tento rod sa vyznačuje tvorbou filobazídií, čo sú holobazídia s úzkou centrálnou oblasťou a zväčšeným vrcholom. v súčasnej dobe zahŕňa rod *Cystofilobasidium* štyri kvasinkové druhy, z toho tri majú oranžovú farbu (*C. bisporidi*, *C. capitatum*, *C. informominiatum*) a jeden krémovú (*C. ferigulai*). Všetky tieto štyri druhy obsahujú v bunkovej stene xylózu, dokážu utilizovať glukuronát a produkujú škrobu podobné látky [2, 9].

Kolónie rodu *C. capitatum* majú hladký lesklý povrch a ich oranžovočervené až škoricové sfarbenie je spôsobené prítomnosťou karotenoidov. Tvar buniek je vajcovito pretiahnutý. v kvapalných médiách vytvárajú tenkú kožu a sediment. Tento druh je homotalický, vytvárajúci jednojadrové mycélium. v hýfach sa produkujú endokonídie. Teliospóry po napučaní klíčia na bezpriehradkové metabazídiu. Sporídie sú jednotlivo alebo v pároch s jednou alebo dvoma bazídiospórami. Tento druh vytvára aj teliospóry, ktoré klíčia na metabazídiu s maximálnou dĺžkou 17 μm . Niekedy sa z bazídií vytvárajú drsné, suché kolónie, v ktorých prevládajú teliospóry. Kvasinková kultúra sa vyvinie až po niekoľkých týždňoch. Všetky generácie sa pokladajú za diploidné [3, 4].



Obrázok 6: Krížový rozter druhu *Cystofilobasidium capitatum*

2.4 Rast mikroorganizmov

2.4.1 Živné média

V laboratóriu sú mikroorganizmy kultivované na sterilných živných médiách a v sterilných

zariadeniach. Správne zloženie média závisí na požiadavkách daného mikroorganizmu a musí byť volené tak, aby čo najviac odpovedalo jeho prirodzeným podmienkam [13].

Zloženie živných médií sa u rôznych mikroorganizmov veľmi líši. Správne porozumenie nutričných požiadaviek mikroorganizmov je zárukou úspešných kultivácií alebo veľkoobjemových fermentácií. U väčšiny heterotrofných mikroorganizmov musí kultivačné médium okrem biogénnych prvkov a rastových faktorov obsahovať vhodný zdroj uhlíku, väčšinou vo forme jednoduchých cukrov alebo polysacharidov. Tie sú zároveň zdrojom vodíku a kyslíku. Pri zostavovaní média je nutné dbať na to, aby jednotlivé komponenty média spolu nereagovali alebo sa procesom sterilizácie nerozkladali. Vznikali by tak ťažko využiteľné alebo inhibičné látky. Najvhodnejším zdrojom dusíku pre mikroorganizmy sú amónne soli. Ako ďalšie zdroje môžu využívať vzdušný dusík, dusitaný, dusičnaný alebo organický dusík viazaný v aminokyselinách, peptidoch, peptonoch až v natívnych bielkovinách. Ďalšou zložkou živných médií sú rastové faktory. Môžu to byť vitamíny, aminokyseliny, purínové a pyrimidínové zásady, vyššie mastné kyseliny alebo amíny. Vyžadujú ich hlavne auxotrofné mikroorganizmy, ktoré nie sú schopné si ich syntetizovať. Dôležitými zložkami živného média sú fosfor a horčík, ktoré sa zúčastňujú prenosu energie pomocou reakcií sprostredkovaných adenosíntrifosfátom (ATP). Ako zdroj fosforu sa používajú soli kyseliny fosforečnej. Ich nedostatok spôsobuje spomalenie rastu, prípadne fermentačných procesov mikroorganizmov. Medzi ďalšie biogénne prvky patria draslík, vápnik, železo, chlór, molybdén, zinok, meď, kobalt, bór a nikel sa pridávajú do živného média vo forme solí v malých koncentráciách [13].

Nami využívané kvasinky sú chemoorganotrofné organizmy, ktoré využívajú organické zlúčeniny ako hlavné zdroje uhlíka. Znížením dostupnosti jedného substrátu môže byť rast často kompenzovaný utilizáciou iného substrátu, pretože kvasinky dokážu využívať širokú škálu látok ako zdroje živín [14].

Najdôležitejšou zložkou média pre rast, vývoj a prežitie mikroorganizmov je voda. Dodržiavať vysoký stupeň akosti použitej vody je veľmi dôležité. Pri príprave polosyntetických médií sa do nich pridávajú peptóny, rôzne extrakty a hydrolyzáty, ktoré zabezpečujú optimálnu výživu mikroorganizmov [13].

2.4.2 Rastová krivka

Mikroorganizmy môžu v danom prostredí rásť a rozmnožovať sa, pokiaľ majú dostatočný zdroj živín, vhodný parciálny tlak kyslíku, odpovedajúce hodnoty pH a teploty. Rast a množenie sú tiež limitované koncentráciou metabolitov, ktoré bunka vylúčila do prostredia. Normálne sa rast mikroorganizmov spomaľuje so spotrebou živín, zvyšovaním koncentrácie toxických produktov alebo kombináciou oboch faktorov [10].

Rast jednobunkovej mikrobiálnej populácie prebieha postupne v niekoľkých fázach. Grafickým znázornením nameraných hodnôt tak, že na os x sa nanesie čas a na os y sa nanesie logaritmus počtu živých buniek v 1 ml. Výsledkom je tzv. **rastová krivka**, ktorá má niekoľko úsekov [13, 15].

Lag – fáza nastáva po naočkovaní média. Bunky sa dostávajú do odlišného prostredia v porovnaní s tým, z ktorého boli odobrané, nerozmnožujú sa, ale zväčšujú svoj objem, aktivuje sa enzýmový systém. Dĺžka lag – fázy závisí na druhu mikroorganizmu, fyziologickom stave buniek, veľkosti inokula a na zložení rastového prostredia.

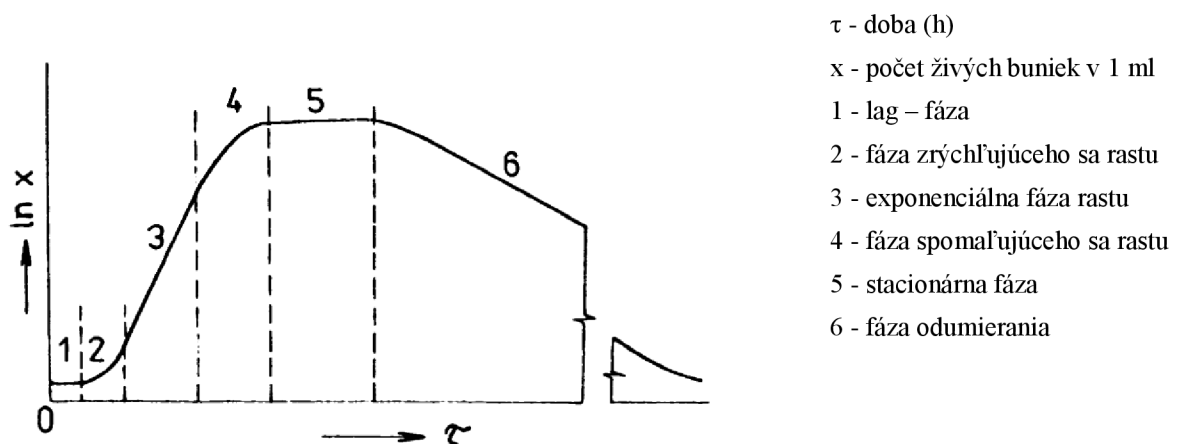
Fáza zrýchleného rastu tvorí prechodnú fázu medzi lag-fázou a **exponenciálnou fázou**.

Exponenciálna fáza je charakteristická najkratšou generačnou dobou buniek, ktorá je behom celej tejto fázy konštantná. Konštantnú veľkosť nadobúda aj špecifická rýchlosť rastu. Rýchle rozmnožovanie buniek má niekedy za následok, že priemerná veľkosť buniek kultúry býva na konci tejto fázy najmenšia. v tejto fáze sú všetky bunky živé, ich počet exponenciálne narastá a teda aj množstvo biomasy. Bunky, ktoré sú v exponenciálnej fáze môžeme preniesť do nového média o rovnakom zložení a budú sa rozmnožovať s rovnakou generačnou dobou bez zreteľnej lag-fáze.

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

Keď sa jeden zo základných esenciálnych prvkov stane v médiu limitujúcim, až nakoniec úplne chýba, bunky spomalia svoj metabolizmus a prepnú sa do fázy prežívania, stacionárnej fáze. Prítomnosť nízkeho obsahu uhlíka a nedostatok dusíka vyvolá v bunkách sporuláciu.

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



Obrázok 7: Rastová krivka [1].

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

2.5 Stresové faktory vplyvajúce na rast mikroorganizmov

Životná činnosť mikroorganizmov a ich vývoj sú závislé na vonkajšom prostredí. Aby sa mikroorganizmy mohli rozmnožovať, musia byť v prostredí s dostatočným množstvom surovín pre syntézu bunkovej hmoty, musia mať využiteľný zdroj energie, vhodné fyzikálne, chemické a biologické podmienky. Mikroorganizmy tiež disponujú schopnosťou prispôbiť sa vonkajším podmienkam a to zmenou enzýmového vybavenia, zloženia a tvaru bunky aby boli voči nepriaznivým podmienkam odolné. Všetky tieto schopnosti sú však obmedzené určitým limitom, za ktorým dochádza k zastaveniu rastu alebo usmrteniu bunky [1].

Karotenogénne kvasinky sú tzv. všadeprítomne kvasinky, pretože dokážu kolonizovať rôzne substráty. Sú schopné rásť v širokom rozmedzí počiatkových pH podmienok i v širokom rozmedzí teplôt. Významnejšie dôsledky environmentálneho stresu u červených kvasiniek sú často využívané ako stimulácia nadprodukčných schopností sekundárnych metabolitov – karotenoidov.[1].

2.5.1 Teplota

Prvým z rady faktorov výrazne ovplyvňujúcich rýchlosť rozmnožovania mikroorganizmov a možnosť ich života je teplota vonkajšieho prostredia. U každého mikroorganizmu rozoznávame tri základné druhy teploty:

- **minimálna teplota**, tj. najnižšia teplota, pri ktorej sa daný druh rozmnožuje ešte zistiteľnou rýchlosťou,
- **optimálna teplota**, pri ktorej sa rozmnožuje najvyššou rýchlosťou,
- **maximálna teplota**, tj. najvyššia teplota, pri ktorej je schopný sa ešte rozmnožovať.

Krátkodobé zvýšenie teploty nad maximálnu teplotu vyvoláva u mikroorganizmu tepelný šok, ktorý vedie k rôznym výkyvom metabolizmu. Pre tvorbu niektorých produktov metabolizmu je optimálna teplota iná ako pre tvorbu bunkovej hmoty, rovnako tak aj optimálna teplota pre rozmnožovanie sa nemusí vždy zhodovať s optimálnou teplotou pre ostatné životné procesy [1].

2.5.2 pH

Činnosť mikroorganizmov je silno ovplyvňovaná pH prostredia, keďže každý druh vyžaduje pre svoj optimálny rast a rozmnožovanie jeho iné rozmedzie. Pre optimálny rast u väčšiny baktérií a kvasiniek tento rozsah pomerne malý, zatiaľ čo u väčšiny plesní je podstatne širší. Kvasinky vyžadujú pre svoj optimálny rast pH z kyslej oblasti 4,2 – 5,5 [1].

2.5.3 Vodná aktivita

Voda tvorí 75 až 90 % hmotnosti mikrobiálnej bunky. Všetky chemické reakcie v živej bunke prebiehajú výhradne vo vodnom prostredí a teda voda tu musí byť prítomná v dostatočnom množstve a v kvapalnom stave.

Potreba vody môže byť u mikroorganizmov kvantitatívne vyjadrená rozmedzím vodných aktivít prostredia, pri ktorých sa dané mikroorganizmy môžu rozmnožovať. Vodná aktivita (a_{H_2O} alebo a_w) určitého roztoku sa rovná pomeru tlaku vodných pár nad týmto roztokom k tlaku vodných pár nad destilovanou vodou za rovnakých podmienok. Vzťah vodnej aktivity ku koncentrácii rozpustenej látky je vo veľmi zriedených roztokoch približne daný vzorcom

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

Kde N_w je počet molov vody a N_s je počet molov rozpustenej látky. Minimálna a_w u kvasiniek je 0,91 až 0,88. Kvasinky schopné rozmnožovať sa pri vodnej aktivite nižšej ako 0,73 radíme medzi osmotolerantné druhy [1, 10].

2.5.4 Oxidoredukčný potenciál

Každé prostredie vykazuje určitý redoxný potenciál daný prítomnosťou oxidačných alebo redukčných činidiel. Silno oxidačné látky (kyslík, peroxidy) vytvárajú pozitívny oxidoredukčný potenciál a silno redukujúce látky (železnaté ióny, vodík) spôsobujú jeho

negatívnu hodnotu. Vďaka rôznemu vzťahu mikroorganizmov ku kyslíku ich primárne delíme na aeróbne mikroorganizmy, ktoré pre správne fungovanie metabolizmu potrebujú kyslík a teda pozitívny redoxpotenciál, a anaeróbne, na ktoré prítomnosť kyslíku a pozitívny redoxný potenciál pôsobia škodlivo až letálne [1, 11].

2.5.5 Solný stres

Zvýšená salinita prostredia vedie k produkcii dvoch typov stresových faktorov vyvolaných rastom intracelulárnej koncentrácie sodných katiónov. Jednak sú to osmotické komponenty zvyšujúce turgor bunky a ďalej toxické látky inhibujúce radu bunkových funkcií. Adaptácia kvasinkových buniek na tieto stresové podmienky je obvykle sprevádzaná akumuláciou osmoticky aktívnych látok, ktoré slúžia k vyrovnaniu rastúceho externého osmotického tlaku a menia membránový transportný systém, tak aby došlo k vylúčeniu Na^+ z bunky do prostredia [12].

2.5.6 Žiarenie

Fyziologický účinok elektromagnetického vlnenia na mikroorganizmy sa pri rôznych vlnových dĺžkach značne líši. Viditeľná časť svetelného spektra (380 – 760 nm) sa uplatňuje predovšetkým ako zdroj energie u fototrofných organizmov. U ďalších mikroorganizmov má radu ako pozitívnych tak aj negatívnych účinkov na ich aktivitu. U karotenogénnych mikroorganizmov je ním indukovaná tvorba karotenoidov.

Naopak žiarenie z ultrafialovej oblasti spektra má na mikroorganizmy silno mutagénne a letálne účinky. Tento efekt sa využíva pri sterilizácii UV žiarením. Jeho prenikavosť je však veľmi malá a používa sa len k povrchovej sterilizácii predmetov, pracovných plôch, prevádzkových zariadení, vzduchu a pod [1].

2.6 Karotenoidy

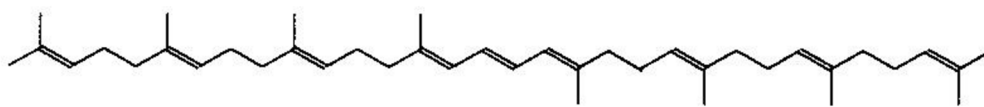
2.6.1 Charakteristika

Karotenoidy predstavujú jednu z najrozšírenejších a najpočetnejších tried prirodzených pigmentov s významnými biologickými účinkami a radou priemyselných aplikácií. Sú produkované fotosyntetizujúcimi mikroorganizmami počínajúc anaeróbnymi fotosyntetickými baktériami, cyanobaktériami, hubami až po vyššie organizmy ale aj nefotosyntetizujúcimi baktériami, kvasinkami a plesňami. v bunkách majú účinok membránovo–ochranných antioxidantov, ktoré účinne zhašajú singletový kyslík a pôsobia inhibične voči peroxidácii v lipidických membránach. Účinnosť týchto antioxidantov je závislá na ich štruktúre. Karotenoidné pigmenty sa všeobecne vyskytujú vo fotosyntetickom systéme u vyšších rastlín, rias a fototrofných baktérií. v nefotosyntetizujúcich mikroorganizmoch sú karotenoidy dôležitou ochranou proti poškodeniu svetelným žiarením, obzvlášť pri ich raste na svetle a za prístupu vzduchu [16, 17, 19].

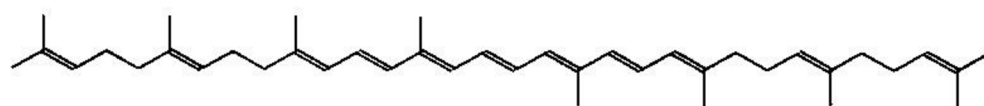
Až na niekoľko výnimiek patria karotenoidy medzi lipofilné pigmenty rozpustné v organických rozpúšťadlách (acetón, diethylether a pod.). Ich kryštalické formy sa dobre rozpúšťajú v benzéne a dichlórmetáne. Zvyčajne sú to 40–ulíkaté tetraterpény poskladané z päťuhlíkatých izoprenových jednotiek. Základná lineárna a symetrická kostra ich molekúl, ktorá môže byť cyklické buď na jednom alebo oboch koncoch. Podľa cyklickej alebo acyklickej štruktúry na koncoch molekuly môžeme rozdeliť karotenoidy do troch skupín:

- acyklické (fytoén, fytofluén, δ -karotén, neurosporén, lykopén)

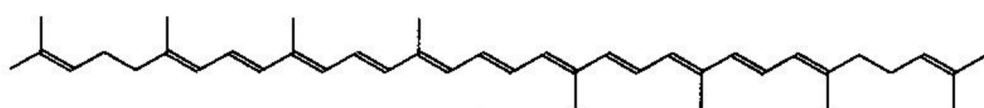
- monocyklické (γ -karotén, torulén, torularodín)
- dicyklické (β -karotén) [18].



Fytoén

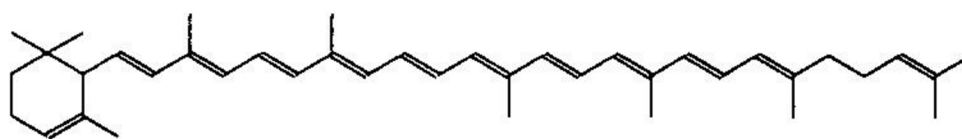


ζ -karotén

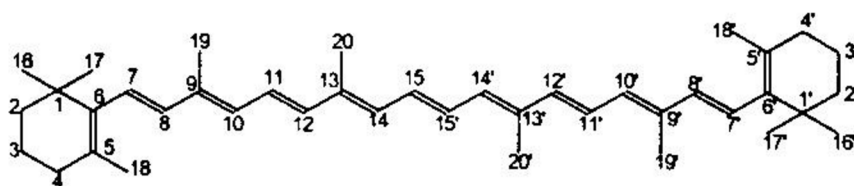


Lykopén

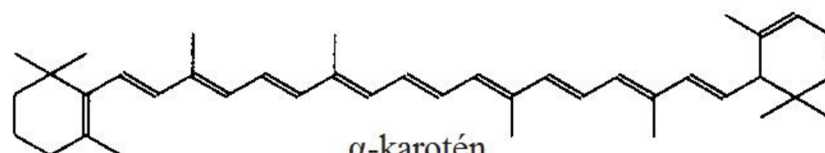
Obrázok 8: Štruktúra niektorých necyklických karotenoidov [19]



δ -karotén



β -karotén



α -karotén

Obrázok 9: Štruktúra niektorých cyklických karotenoidov [20]

Kombináciou cyklizácie a ďalších modifikácií ako hydrogenácia, dehydrogenácia, presúvanie dvojitych väzieb, skracovanie alebo predlžovanie reťazca, môžeme dostať veľké množstvo rôznych štruktúr. Systém dvojitych väzieb v karotenoidoch umožňuje absorbovať

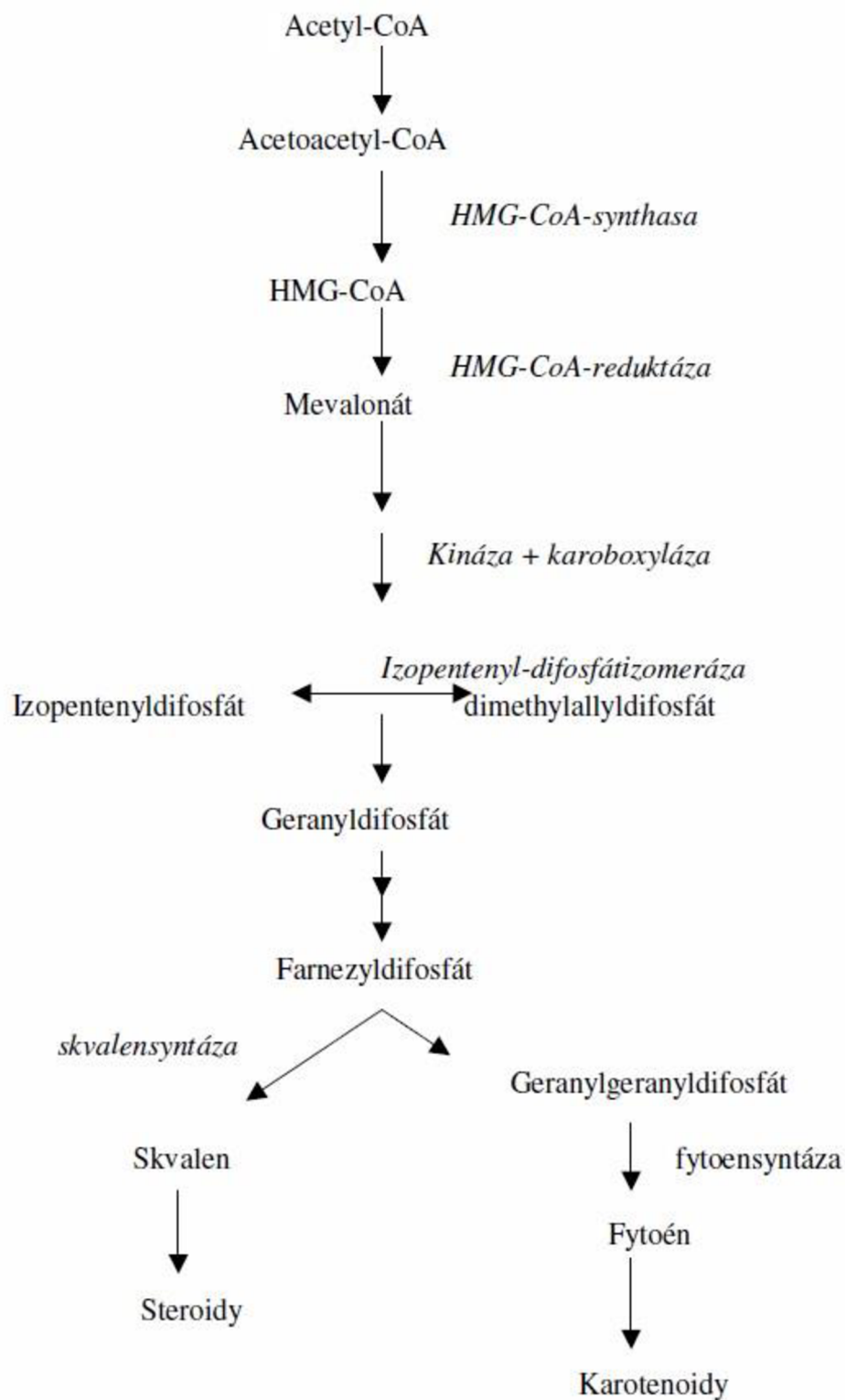
svetlo vo viditeľnej oblasti svetelného spektra, čo umožňuje aj ich identifikáciu a kvantifikáciu. Spektrálne vlastnosti jednotlivých karotenoidov sú determinované hlavne počtom dvojitých väzieb. Vlnová dĺžka, v ktorej karotenoidy majú absorpčné maximum, sa pohybuje v rozmedzí 400 – 500 nm [19, 20].

2.6.2 Význam karotenoidov

Hlavný význam karotenoidov spočíva v ich príspevku k prenosu energie vo fotosyntéze, fungujú ako doplnkové fotoaktívne pigmenty, a v ochrane prokaryot proti zhubným účinkom svetla. U cicavcov sú niektoré karotenoidy provitamínom A [21].

2.6.3 Biosyntéza

Biosyntéza karotenoidov vychádza z acetyl-CoA, ktorý kondenzuje s medziproduktom biosyntézy mastných kyselín acetoacetyl-CoA za tvorby β -hydroxy- β -methylglutarylkoenzymu A (HMG-CoA), ktorého redukciou vzniká mevalonová kyselina. Tato kyselina je postupne fosforylovaná a dekarboxylovaná za vzniku isopentenylidifosfátu (IPDP = tzv. aktívny izoprén, čo je stavebný materiál terpénova steroidov), z ktorého následnou izomeráciou vzniká dimetylallyldifosfát (DMADP). Kondenzáciou hlava - päta jednotiek IPDP a DMADP vzniká geranylidifosfát (GDP – prekursor monoterpénov), ktorý potom podlieha ďalšej kondenzácii hlava - päta s jednotkou IPDP za vzniku farnesyldifosfátu (FDP). Tu sa oddeľuje bočná dráha, ktorá vedie k tvorbe steroidov. Pri následnej kondenzácii hlava - päta jednotiek FDP a IPDP vzniká geranylgeranylidifosfát (GGDP). Nakoniec dôjde ku kondenzácii hlava - päta dvoch molekúl GGDP, pri ktorej vzniká fytoén, bezfarebný prekursor karotenoidov [18, 19, 22].



Obrázok 10: Schéma syntézy izoprenoidov [23]

Fytoén je priamym prekursorom pre syntézu karotenoidov. Podlieha rade desaturačných a cyklizačných reakcií, pri ktorých dochádza k vzniku cyklických a acyklických foriem karoténov a xantofylov. Počiatočným necyklickým karoténom pre tvorbu ďalších acyklických, mono– aj bicyklických derivátov je lycopén [18, 19].

2.7 Kultivácie na tuhých povrchoch; polosuché kultivácie (SSF)

2.7.1 Princíp

Produkcia niektorých významných látok mikrobiologickou cestou je neustále sa rozvíjajúca oblasť biotechnológií. Väčšina takýchto látok je dnes produkovaná technikou submerznej fermentácie. v posledných desaťročiach však bol zaznamenaný zvyšujúci sa záujem o využívanie kultivácií na tuhých povrchoch alebo tzv. polosuchých kultivácií (Solid-state fermentation; SSF) [24, 25].

Princíp SSF je známy už od antických čias v ázijských krajinách, ale bol takmer úplne ignorovaný západnými krajinami od roku 1940 vďaka veľkému rozvoju submerznej fermentácie pre produkciu penicilínu. Typickými príkladmi využitia SSF je tradičná fermentácia japonského „koji“, indonézskeho „tempeh“ a francúzskeho „bluecheese“.

Technika SSF zahŕňa rast a metabolizmus mikroorganizmov na vlhkých látkach bez akejkoľvek voľne prúdiacej vody. Substrát však musí mať dostatočnú vlhkosť, aby podporoval rast a metabolizmus mikroorganizmov. Pevné látky tu fungujú ako nosiče, na ktorých mikroorganizmy rastú a využité môže byť pevné živné médium alebo inertný nosič. Úspech fermentácie závisí na voľbe vhodného nosiča, veľkosti jeho častíc, porozite a chemickom zložení. Toto usporiadanie má množstvo výhod pre fermentácie, špeciálne v oblastiach s nedostatkom vody. Medzi ďalšie výhody patria nízke kapitálové investície, menšia spotreba energie, menšie prevádzkové náklady a rovnako tak menej tekutého odpadu, ktorý sa musí zlikvidovať, teda nižšie znečistenie prostredia. SSF má však aj množstvo obmedzení. Medzi hlavné patrí obmedzený výber mikroorganizmov, ktoré sú schopné rásť za znížených vlhkosťných podmienok, zhoršenie monitorovanie parametrov ako je teplota, pH, vlhkosť a prietok vzduchu [24, 25, 31].

Tuhé substrátové materiály používané pri SSF sa rozdeľujú do dvoch hlavných kategórií: **inertné materiály**, na ktorých sa proces fermentácie uskutočňuje, a **neinertné materiály**, ktoré mikroorganizmom dodávajú niektoré živiny. Takýmito neinertnými materiálmi môžu byť škrobnaté alebo lignocelulóзовые poľnohospodárske produkty alebo obilniny a vedľajšie obilné produkty. Výhodou využívania takýchto typov substrátov je efektívne riešenie ekonomických a environmentálnych problémov spôsobených ich likvidáciou [24, 25].

Proces SSF často zahŕňa využívanie mikroorganizmov rýchlo rastúcich v podmienkach nízkeho obsahu vody. Ak je inokulum takejto kultúry pridané do pripraveného substrátu, tak rast kontaminujúcich mikroorganizmov bude kompetitívne potlačený. To znamená, že nie je nutné dodržiavať striktné aseptické podmienky bioreaktorového systému, avšak fermentácia by mala prebiehať v čo najčistejších podmienkach.

Pri voľbe medzi submerznou fermentáciou a SSF rozhoduje niekoľko faktorov. Výhodou submerznej fermentácie oproti SSF je homogenita média a prenos tepla. Na druhú stranu SSF volíme, keď žiadaný produkt vzniká len za týchto podmienok, alebo vzniká vo vyššej miere (napr. produkcia niektorých biopesticídov) [25, 26].

2.7.2 Využitie SSF

V priemyselných aplikáciách môže byť SSF použitá ako kontrolovaný spôsob produkcie požadovaných látok. SSF doteraz zaznamenal zaujímavé výsledky napr. v oblastiach biokonverzie biomasy, biotransformácie rastlinných odpadov na obohatenie živinami, produkcie enzýmov, antibiotík, biologicky aktívnych sekundárnych metabolitov, organických

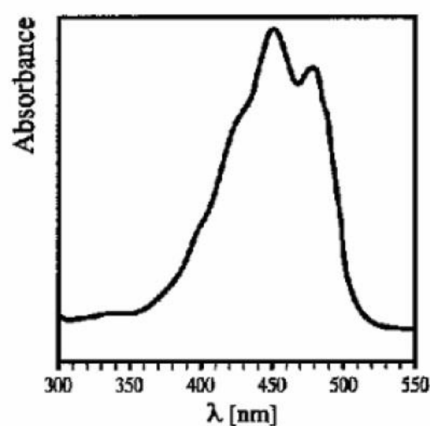
kyselín, biopesticídov, biopalív a pod.

SSF sa veľmi často využíva na produkciu bioethanolu pomocou termotolerantných kvasiniek. Ako hlavný nosič a zároveň fermentačný substrát sa používajú rôzne druhy potravinárskych a poľnohospodárskych odpadných materiálov (hydrolyzované múky, zemiakové a ovocné šupy a iné).[24, 26].

2.8 Metodické postupy

2.8.1 Absorpčná spektrofotometria

Podstatou absorpčnej spektrofotometrie je absorpcia ultrafialového a viditeľného žiarenia zriedenými roztokmi molekúl v rozsahu vlnových dĺžok 200 až 800 nm, načo molekuly prechádzajú do excitovaného stavu. Táto metóda býva používaná ku identifikácii pigmentov, kvantitatívnej analýze anorganických a organických zlúčenín, stanoveniu množstva a čistoty DNA, dôkaz chromofórnych skupín, ale aj stanoveniu počtu mikroorganizmov vo vzorke alebo ich sušinu.



Obrázok 11: Absorpčné spektrum β -karoténu [20]

Zdrojom spojitého žiarenia v spektrofotometroch bývajú vodíkové a deutériové výbojky pre ultrafialovú oblasť a volfrámové alebo halogénové žiarovky pre viditeľnú časť spektra. Meranie v ultrafialovej oblasti sa musí robiť v kvetách zhotovených z UV-transparentného materiálu. Ako analyzátory slúžia potom fotoelektrické detektory.

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

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

kde ε_{λ} je molárny absorpčný koeficient (konštanta pre danú látku za daných podmienok pri určitej vlnovej dĺžke, $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), c je látková koncentrácia ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a l je hrúbka absorbujúcej vrstvy (cm) [1, 27].

2.8.2 Extrakcia

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

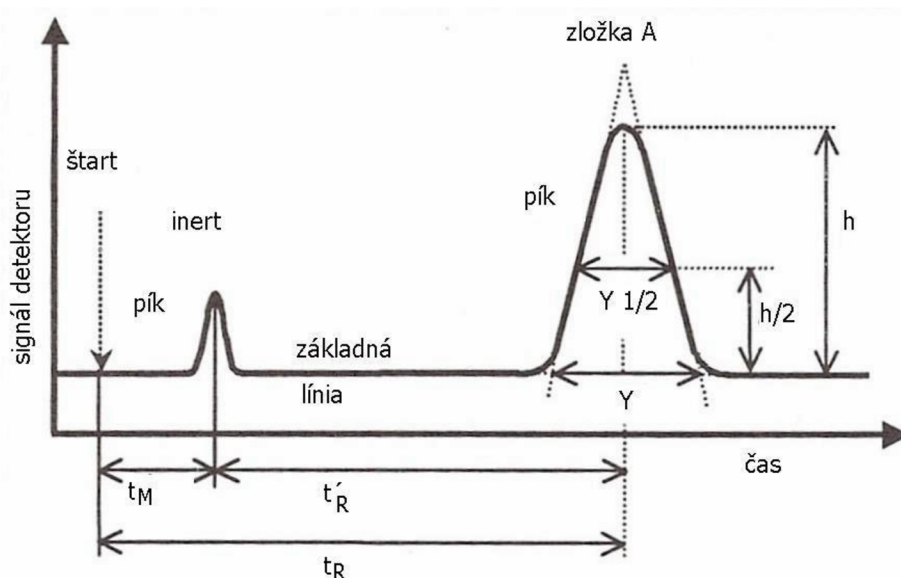
extrahujú v nepolárnych organických rozpúšťadlách, ako je napr. petroléter a dietyléter [28].

2.8.3 Vysokoučinná kvapalinová chromatografia – HPLC

Chromatografia je separačná metóda, pri ktorej sa oddeľujú látky nachádzajúce sa vo vzorke a používa sa na kvalitatívnu aj kvantitatívnu analýzu.

Metóda je založená na opakovanom vytváraní rovnovážnych stavov zložiek medzi dvomi navzájom nemiešateľnými fázami – mobilnou a stacionárnou. Pri kvapalinovej chromatografii je mobilnou fázou kvapalina, ktorá preteká kolónou medzi časticami, ktoré tvoria stacionárnu fázu – sorbent. Vzorka sa umiestňuje na začiatok stacionárnej fázy. Pohybom mobilnej fázy cez stacionárnu je potom unášaná a jednotlivé zložky vzorky sú postupne zachycované alebo zdržované stacionárnou fázou, čím nastáva ich separácia. Ako prvé sa na koniec stacionárnej fázy sa dostanú tie zložky, ktoré boli fázou zdržované najmenej. Zdržanie sa jednotlivých zložiek v stacionárnej fáze je tým dlhšie, čím silnejšie sú danou fázou pútané [27, 29].

Klasické kolónové prevedenie síce nemá potrebnú účinnosť, ale sa stalo základom vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie – HPLC. Pre účinnú separáciu je treba použiť dostatočne malých zrníčok sorbentu. Tie kladú prestupujúcej kvapaline značný odpor a je teda nutné pracovať pri vysokom tlaku (až 50 MPa). Delenie prebieha v krátkych náplňových nerezových kolónach o dĺžke 15 – 30 cm, odolným voči vysokým tlakom. Vzorka sa do kolóny dávkuje pomocou viacestných dávkovacích kohútov, do ktorých sa vpravuje pomocou injekčnej striekačky. Na detekciu separovaných zložiek sú najčastejšie používané fotometrické detektory stanovujúce absorbanciu mobilnej fázy vychádzajúcej z kolóny [1, 30].



Obrázok 12: Popis chromatogramu [1].

Chromatogram je grafický záznam závislosti signálu detektoru na čase. Počiatok predstavuje okamih nástreku vzorky na kolónu a každá vlna, tzv. píka, odpovedá jednej oddelenej zložke. Jednotlivé píky sú charakterizované svojou polohou a plochou. Poloha vrcholu udáva retenčný čas t_R a ide o dobu za ktorú látka prejde celou kolónou. Táto doba sa delí medzi mobilnú fázu – tzv. mŕtvy retenčný čas t_m a stacionárnu fázu – tzv. redukovaný retenčný čas t'_R . Súčin retenčného času a objemového prietoku mobilnej fázy V_R udáva retenčný objem. Spomínané charakteristiky sa používajú ku kvalitatívnej analýze zložiek vo

vzorke. Základom pre ich identifikáciu je zhoda retenčnej veličiny neznámej zložky vzorku a známeho štandardu. Kvantitatívnu charakteristiku separovaných zložiek udáva plocha píku [27, 29].

Medzi výhody tejto metódy patria práca s menším množstvom analyzovanej vzorky, kratšia doba separácie, možnosť práce s termolabilnými látkami pevného aj kvapalného skupenstva [29, 30].

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom predloženej bakalárskej práce zameranej na sledovanie produkcie biomasy a vybraných lipidických látok vybranými kmeňmi karotenogénnych kvasiniek je riešenie nasledujúcich dielčích úloh:

- Posúdiť možnosti využitia kultivácie na pevnej fáze (SSF) k pestovaniu karotenogénnych kvasiniek na odpadných substrátoch.
- Optimalizácia kultivačných podmienok pre SSF kultiváciu karotenogénnych kvasiniek s využitím vybraných druhov odpadných substrátov.
- Úprava odpadového substrátu vedúca k lepšej využitiu sacharidových zdrojov uhlíka kvasinkami.
- Porovnanie výťažkov vybraných metabolitov pomocou kultivácie v kvapalnom médiu a s využitím SSF kultivácie.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Materiál a chemikálie

Vaječné cestoviny Ideal
Kvasničný autolyzát, Himedia (India)
D-glukózamonohydrát 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)
Acetón p.a., Lachema (ČR)
Hydroxid draselný p.a., Lachema (ČR)
Diethyléter p.a., Lachema (ČR)
Ethanol pre UV-VIS, Lachema (ČR)
Methanol pre HPLC, Sigma – Aldrich (SRN)
Ethanol pre HPLC, Sigma – Aldrich (SRN)

Ostatné použité chemikálie boli čistoty p.a. a boli získané od bežných dodávateľov.

4.2 Prístroje a pomôcky

Spektrofotometer VIS, Helios δ , Unicam (UK)
Mikroskop L II ooA, IntracoMicro (SRN)
GKB ColorDigital CCD kamera (Taiwan)
Lucia Imageactive 5.0, Laboratory Imaging spol. s r.o. (ČR)
Trepáčka Yellowline, (SRN)
Centrifuga Sigma Laborzentrifugen (SRN)
Analytické váhy Boeco (SRN)
laminárny box Aura mini
Filtry pre HPLC, PRE-CUT, Alltech (GB)
Vákuová odparka RV 06, IKA (SRN)
Vodná lázeň TW2, Julabo Labortechnik (SRN)

Sústava na HPLC/PDA:

Sústava HPLC/MS (Thermo Fisher Scientific, USA)
Termostat – LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)
Pumpa – MS Pump plus, Finnigan SURVEYOR
Detektor PDA – PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR
Vhodnocovací systém Xcalibur

Chromatografická kolóna Kinetex C18, 2,6 µm, 4,6 x 150 mm, Phenomex

4.3 Použité kmene mikroorganizmov

Kvasinkové kmene používané pri kultiváciach boli získané zo zbierky kultúr kvasiniek Yeast Culture Collection (Chemický ústav SAV Bratislava, SR).

Použité kultúry: *Cystofilobasidium capitatum* CCY 10-1-1, *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-33, *Sporobolomyces roseus* CCY 19-6-4

4.4 Metódy kultivácie mikroorganizmov

Použité kvasinkové kmene *Cystofilobasidium capitatum*, *Rhodotorula glutinis* a *Sporobolomyces roseus* sa zaraďujú medzi mezofilné aeróbne mikroorganizmy s navzájom podobnými nárokmi na kultiváciu vo väčšine prípadov.

Kvasinkové kmene boli kultivované pri teplote 28 °C za neustáleho pretrepávania a osvetlenia z dôvodu produkcie karotenoidov. Všetky média boli sterilizované v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 30 minút pri bode varu.

4.4.1 Inokulum I

Pre jednotlivé druhy kvasiniek bolo pripravené jedno inokulum I so zložením uvedeným v tabuľke 1. Ako rozpúšťadlo bola použitá vodovodná voda. Inokulá o objeme 50 ml boli vysterilizované a následne zaočkované tromi kličkami jednotlivých kultúr uchovávaných v Petriho miskách. Kultivácia inokula I prebiehala 24 hodín.

Tabuľka 1: Zloženie inokula I

| Inokulum I | |
|---|--------------------|
| zložka | Koncentrácia (g/l) |
| Glukóza | 40 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 5 |
| KH ₂ PO ₄ | 5 |
| MgSO ₄ | 0,34 |
| Kvasničný autolyzát | 7 |

4.4.2 Inokulum II

Pre jednotlivé druhy kvasiniek pripravené inokulum II o rovnakom zložení ako inokulum I, uvedenom v tabuľke 1. Takto pripravené inokulum II bolo vysterilizované rovnakým spôsobom ako inokulum I a následne za aseptických podmienok zaočkované inokulum I tak aby pomer objemov ino I : ino II bol 1 : 5 a kultivácia prebiehala 24 hodín. Toto inokulum bolo základom pre následné kultivácie produkčných médií.

4.4.3 Produkčné média

Pre každé inokulum II bola pripravená prvá séria troch základných produkčných médií na základe glukózy, cestovín a hydrolyzovaných cestovín o zložení uvedenom v tabuľke 2.

Tabuľka 2: Zloženie základného produkčného média

| Produkčné médium | Základná séria 100 % vody | | |
|---|---------------------------|--------------|-------------------------|
| | glukóza | cestoviny | Hydrolyzované cestoviny |
| Zložky | Hmotnosť (g) | Hmotnosť (g) | Hmotnosť (g) |
| Glukóza | 30 | – | – |
| Cestoviny | – | 30 | 30 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 4 | 4 | 4 |
| KH ₂ PO ₄ | 4 | 4 | 4 |
| MgSO ₄ | 0,34 | 0,34 | 0,34 |
| Vodovodná voda | 1000 (ml) | 1000 (ml) | 1000 (ml) |

Základné produkčné média boli pripravované tak, aby ich výsledný objem po zaočkovaní bol 100 ml a zároveň pomer INO II : produkčné médium bol 1 : 5. Tzn., že objem jedného produkčného média bol 83,3 ml a po zaočkovaní s INO II 16,7 ml sa získal výsledný objem 100 ml.

Ďalšie série produkčných médií obsahovali rovnaké zloženie komponent ako je uvedené v Tab.2, znižoval sa však postupne objem vodovodnej vody vždy o 10%. Objem INO II potrebného na zaočkovanie zostával rovnaký 16,7 ml. (Tab. 3)

Tabuľka 3: Objemy vody použitých v jednotlivých sériách produkčných médií

| Semi-SSF | |
|--|------------|
| Podiel množstva vody na 100 ml produkčného média | Objem (ml) |
| 100 % | 83,3 |
| 90 % | 75,0 |
| 80 % | 66,7 |
| 70 % | 58,3 |
| 60 % | 50,0 |
| 50 % | 41,7 |
| 40 % | 33,3 |
| 30 % | 25,0 |
| 20 % | 16,7 |
| 10 % | 8,3 |

Súčasťou každej série produkčných médií boli aj hydrolyzované cestoviny ako hlavný zdroj uhlíka. Cestoviny boli podrobené kyslej hydrolýze za účelom rozštiepenia komplexných sacharidov na jednoduché monosacharidy, lepšie prístupné k využitiu kvasinkami. K navážke cestovín bola pridaná 1,2 M kyselina chlorovodíková. Celá kyslá hydrolýza prebiehala na vodnej lázni pri 100°C. Po dokončení reakcie bolo upravené pH na hodnotu pH = 5 pomocou NaHCO₃, boli pridané ostatné nutričné komponenty média podľa Tab. 2 a voda podľa

príslušnej série (Tab. 3).

Všetky produkčné médiá boli sterilizované v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 30 minút.

4.4.4 Stanovenie množstva biomasy

Množstvo narastenej biomasy jednotlivých kultivovaných kvasinkových kmeňov bolo stanovené pomocou rovníc kalibračných kriviek, vyjadrujúcich závislosť množstva sušiny a zákalu (absorbancie) rôzne koncentrovaných suspenzií kvasiniek:

$$\text{CC:} \quad y = 0,1669 \cdot x + 0,1884$$

$$\text{RG:} \quad y = 0,1974 \cdot x - 0,0234$$

$$\text{SR:} \quad y = 0,2421 \cdot x - 0,0488$$

Kde x predstavuje koncentráciu sušiny v $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Jednotlivé vzorky boli nariadené tak, aby nepresahovali hodnotu absorbancie 1. Absorbancia bola meraná pri vlnovej dĺžke 630 nm proti destilovanej vode. v prípade médií obsahujúcich cestoviny alebo hydrolyzované cestoviny bolo ako blank použité toto médium bez buniek.

U produkčných médií s nižším obsahom vody ako je 100% (Tab. 3), bolo množstvo vody doplnené na 100 ml, následne odobratý 1 ml vzorky, nariadený destilovanou vodou podľa možnosti spektrofotometra a zmeraná absorbancia pri 630 nm

4.4.5 Spracovanie biomasy

Celý objem produkčného média bol scentrifugovaný pri 5 000 otáčkach za minútu po dobu 10 minút. Supernatant obsahujúci zvyšky produkčného média bol odliaty a usadená biomasa bola premytá destilovanou vodou a opäť scentrifugovaná. Na záver bola biomasa rozsuspendovaná vo fyziologickom roztoku a do ďalšieho spracovania uskladnená v mrazničke.

4.4.6 Mikroskopické pozorovanie buniek

Kvapka vhodne nariadenej suspenzie buniek bola prenesená na podložné sklíčko, prikrytá krycím sklom a pozorovaná pod mikroskopom pri 640-násobnom zväčšení. Takto boli sledované zmeny v morfológii buniek spôsobené osmotickým či nutričným stresom vo všetkých sériách produkčných médií. Jednotlivé obrázky vyfotografované cez kameru boli uložené a spracované v počítači pomocou softwaru Lucia Imageactive 5.0 (Laboratory Imaging s r. o., ČR).

4.5 Analýza sledovaných metabolitov

4.5.1 Izolácia karotenoidov a ergosterolu

Súčasťou bunkovej membrány sú ergosterol a karotenoidy, tvoriace podiel v lipidickej frakcii kvasinkových buniek. Ich izolácia je možná pomocou viacstupňovej extrakcie spojenej so zmydlením. Uskladnené vzorky boli rozmrazené v studenej vode bez prístupu svetla a scentrifugované pri 5 000 otáčkach za minútu po dobu 10 minút. Supernatant bol vyliaty a sediment kvasiniek bol v tretej miske dezintegrovaný s 50 ml acetonu. Homogénna suspenzia bola kvantitatívne prevedená na odparovaciu misku, bolo pridaných 50 ml 10% alkoholického roztoku KOH a celá zmes bola zmydelňovaná na vodnej lázni pri teplote 90 °C po dobu 30 minút.

4.5.2 Extrakcia a úprava vzorku

Zo zvyšku zmydelnenej suspenzie boli karotenoidy a ergosterol trikrát extrahované dietyléterom. Spojené éterové frakcie boli následne odparené na vákuovej odparke.

Odparky vzoriek po extrakcii boli rozpustené v 1 ml etanolu pre HPLC a prefiltrované cez jednorazové filtre do mikrocentrifugačných skúmaviek. Tesne pred samotnou analýzou boli vzorky ešte 3 minúty stočené v mikrocentrifuge pri 15 000 otáčkach za minútu.

4.5.3 Analýza karotenoidov HPLC

Analýza karotenogénnych pigmentov metódou HPLC prebiehala za izokratických podmienok pri prietoku mobilnej fáze 1 000 $\mu\text{l}/\text{min}$ a teplote 45 °C. Na separáciu bola použitá nerezová kolóna Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm; 2,6 μm ; Phenomenex) s predkolónou C18 za fotometrickej detekcie pri vlnovej dĺžke 450 nm pre karotenoidy a 285 nm pre ergosterol a koenzým Q. Vlnová dĺžka odpovedá maximu absorpcie príslušnej analyzovanej látky. Vzorka bola na kolónu dávkovaná cez dávkovací ventil (20 μl). Ako mobilná fáza bol použitý methanol pre HPLC. K chromatologickej analýze karotenoidov bola použitá zostava HPLC/PDA firmy Termo Fisher Scientific, USA. Výhodou PDA detektoru je, že sníma niekoľko nastavených vlnových dĺžok a zároveň celé absorpčné vlnové spektrum. Analyzované dáta boli spracované chromatografickým softwérom X-Calibur.

4.5.4 Identifikácia a kvantifikácia karotenoidov

Identifikácia a kvantifikácia jednotlivých karotenoidov a ergosterolu bola určená na základe ich retenčných časov, ktoré boli porovnávané s retenčnými časmi štandardov pri daných vlnových dĺžkach. Kvantifikácia vybraných látok bola určená pomocou externej kalibrácie metódou kalibračnej krivky. Pre kvantitatívne vyhodnotenie bola použitá závislosť plochy pík na koncentrácií jednotlivých vzoriek. Celkové karotenoidy, identifikované ako suma plochy pík ostatných karotenoidov snímaných po dobu 14 minút, boli vyhodnotené pomocou kalibračnej krivky β -karoténu [16].

Tabuľka 4: Rovnice kalibračných kriviek sledovaných látok

| Analyzovaná látka | Rovnica kalibračnej krivky |
|-------------------|----------------------------|
| β -karoten | $y = 17\,480 \cdot x$ |
| Ergosterol | $y = 76\,993 \cdot x$ |
| Koenzým Q | $y = 33\,313 \cdot x$ |

4.6 Stanovenie zloženia média – analýza obsahu redukujúcich sacharidov metódou Somogyiho–Nelsona

Redukujúce sacharidy v produkčných médiách hydrolyzovaných kyslou hydrolyzou, ako aj v médiách s odpadovým substrátom bez hydrolyzy, boli stanovené spektrofotometricky metódou Somogyiho-Nelsona.

Táto metóda je založená na schopnosti redukujúcich sacharidov redukovať z alkalického prostredia meďnatých solí oxid meďný, ktorý spolu s arzenomolybdenanovým činidlom vytvára farebný komplex. Zafarbenie roztoku týmto komplexom sa stanoví spektrofotometricky.

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

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

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Výsledné rastové, morfológické a produkčné charakteristiky použitých kvasiniek

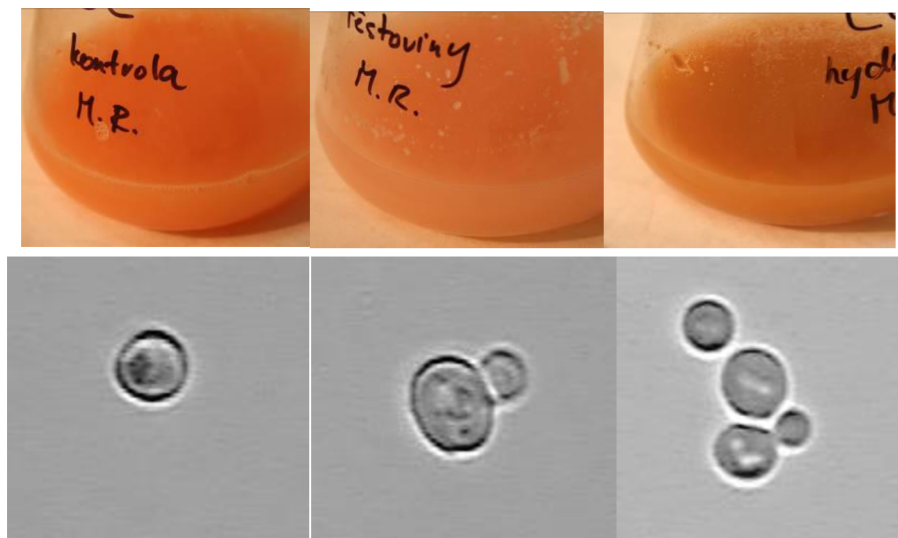
Pre sledovanie vplyvu obsahu vody v „semi-solid state fermentation“ (semi-SSF; tiež polosuché kultivácie) experimente boli použité kvasinkové kmene *Cystofilobasidium capitatum* CCY 10-1-1, *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-33 a *Sporobolomyces roseus* CCY 19-6-4. Jednotlivé kultivácie prebiehali v sériách glukóza (resp. kontrola)–cestoviny–hydrolyzované cestoviny. Tieto série sa líšili podľa daného objemu vody použité pre prípravu produkčného média.

Všetky narastené kultúry použitých kvasinkových kmeňov boli následne analyzované na produkciu biomasy (viď. kapitola 4.4.4) a vyhodnotená produkcia celkových karotenoidov, ergosterolu a ubichinónu metódou HPLC (viď. kapitola 2.8.3). Získané hodnoty sú znázornené v grafoch a tabuľkách.

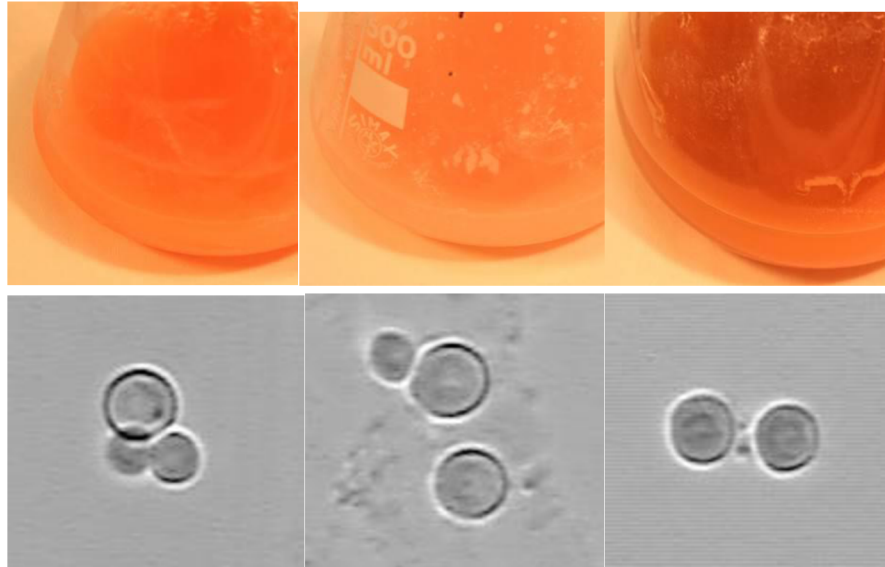
5.1.1 Druh *Cystofilobasidium capitatum*

5.1.1.1 Morfológické zmeny kvasiniek v rôznych produkčných médiách

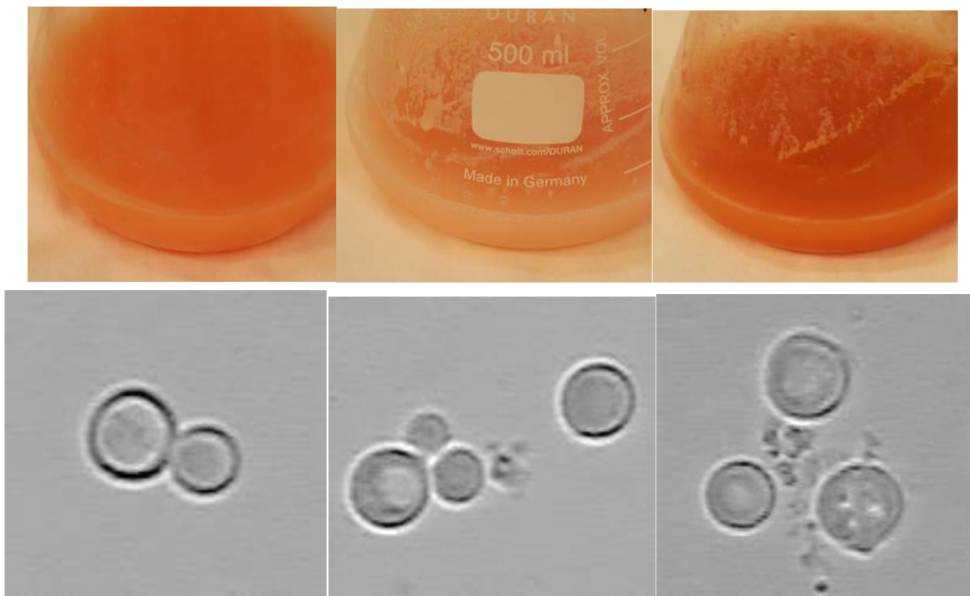
V jednotlivých sériách kultivácií, zoradených podľa množstva vody použitej pre prípravu produkčného média, boli pozorované morfológické charakteristiky kmeňa *Cystofilobasidium capitatum*. Jednotlivé série boli kultivované za rovnakých podmienok, líšilo sa zloženie média (viď. kapitola 4.4.3).



Obrázok 13: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 100 % vody

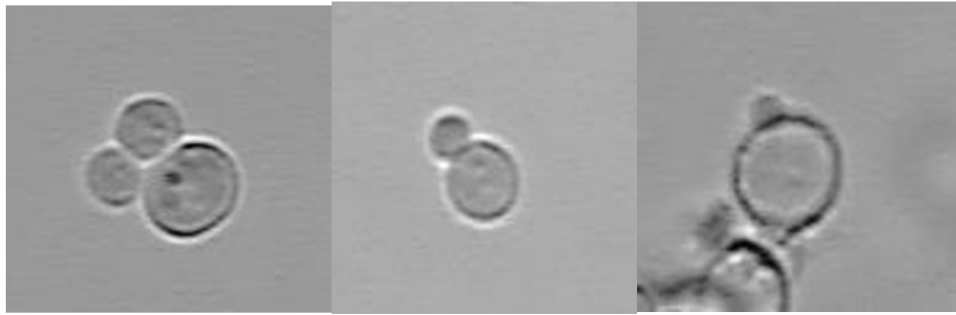


Obrázok 14: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 90 % vody

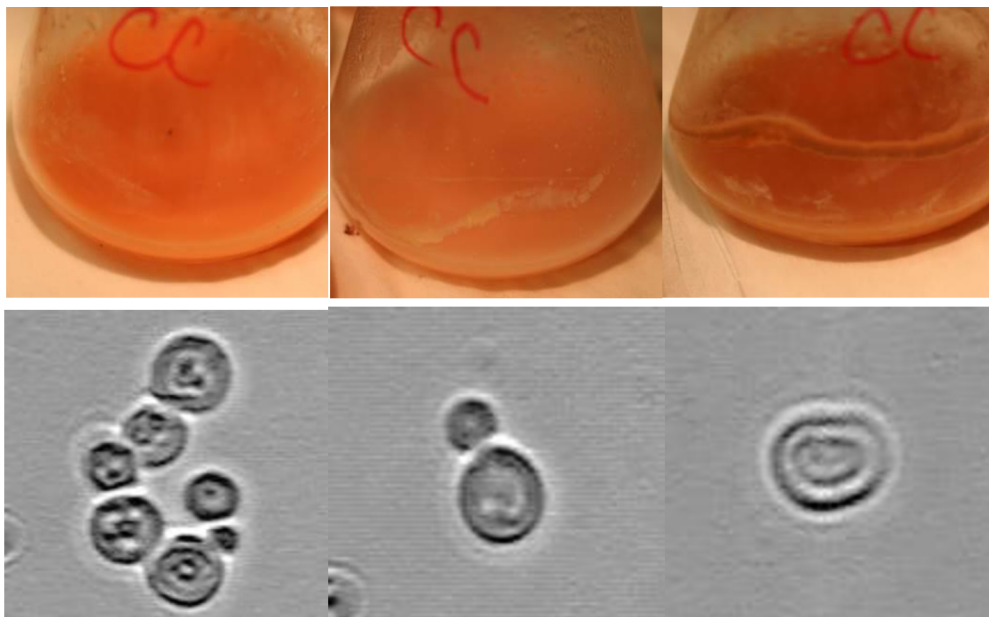


Obrázok 15: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 80 % vody

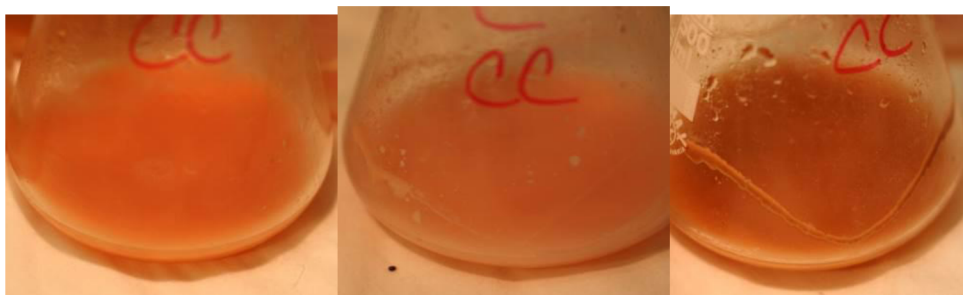


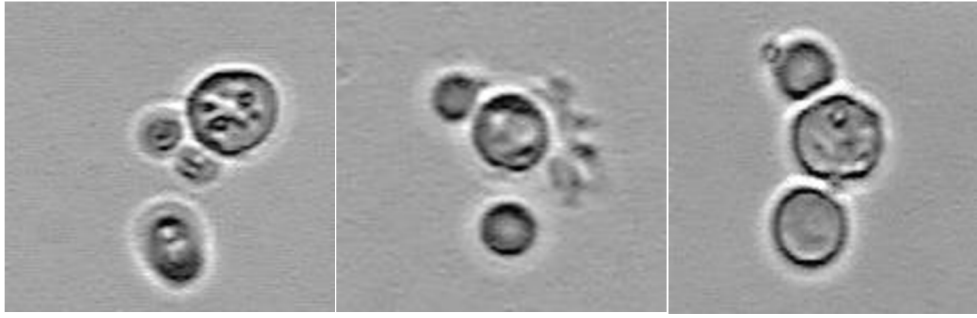


Obrázok 16: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 70 % vody

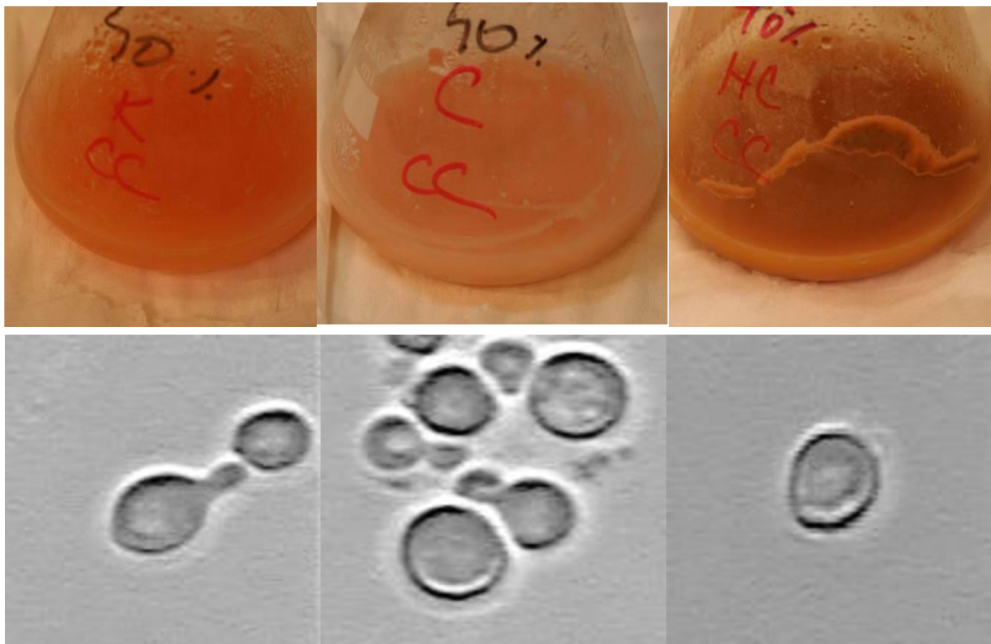


Obrázok 17: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 60 % vody





Obrázok 18: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 50 % vody

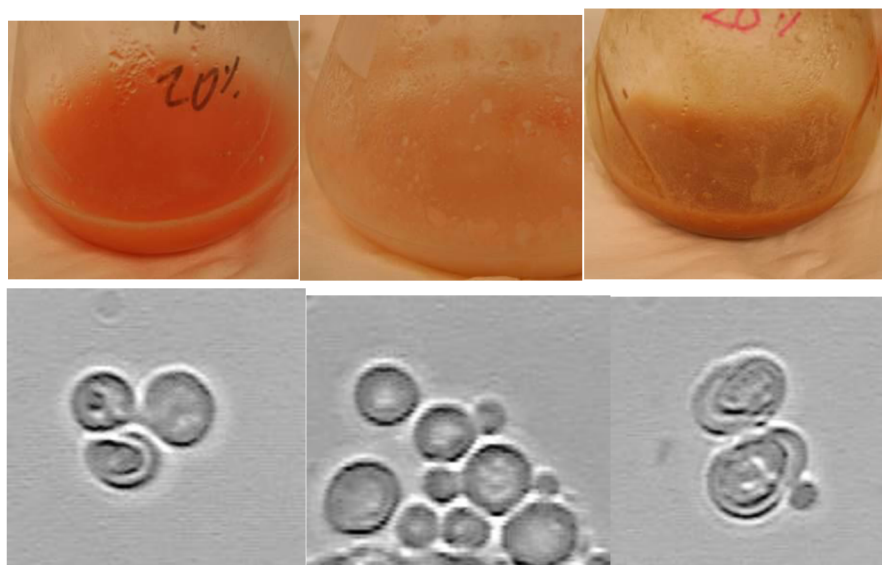


Obrázok 19: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 40 % vody

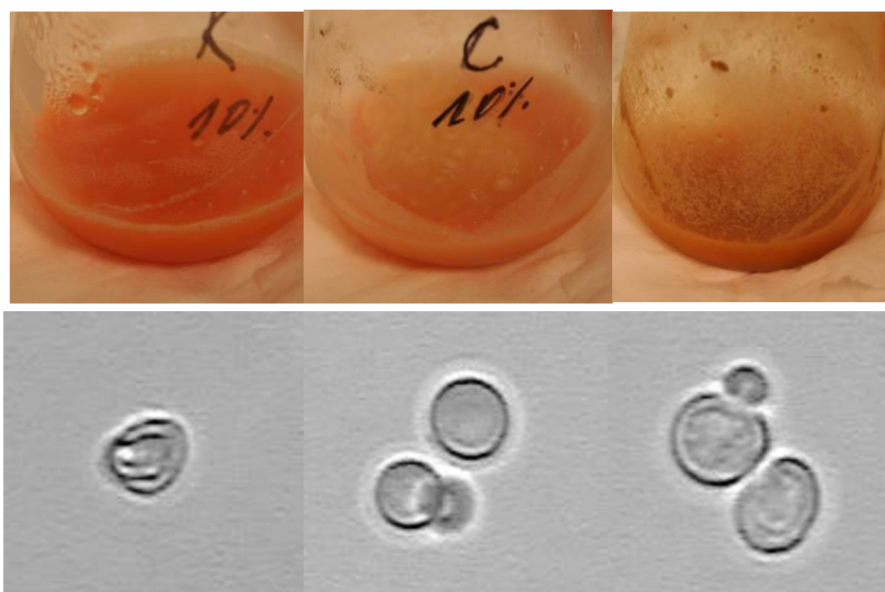




Obrázok 20: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 30 % vody



Obrázok 21: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 20 % vody



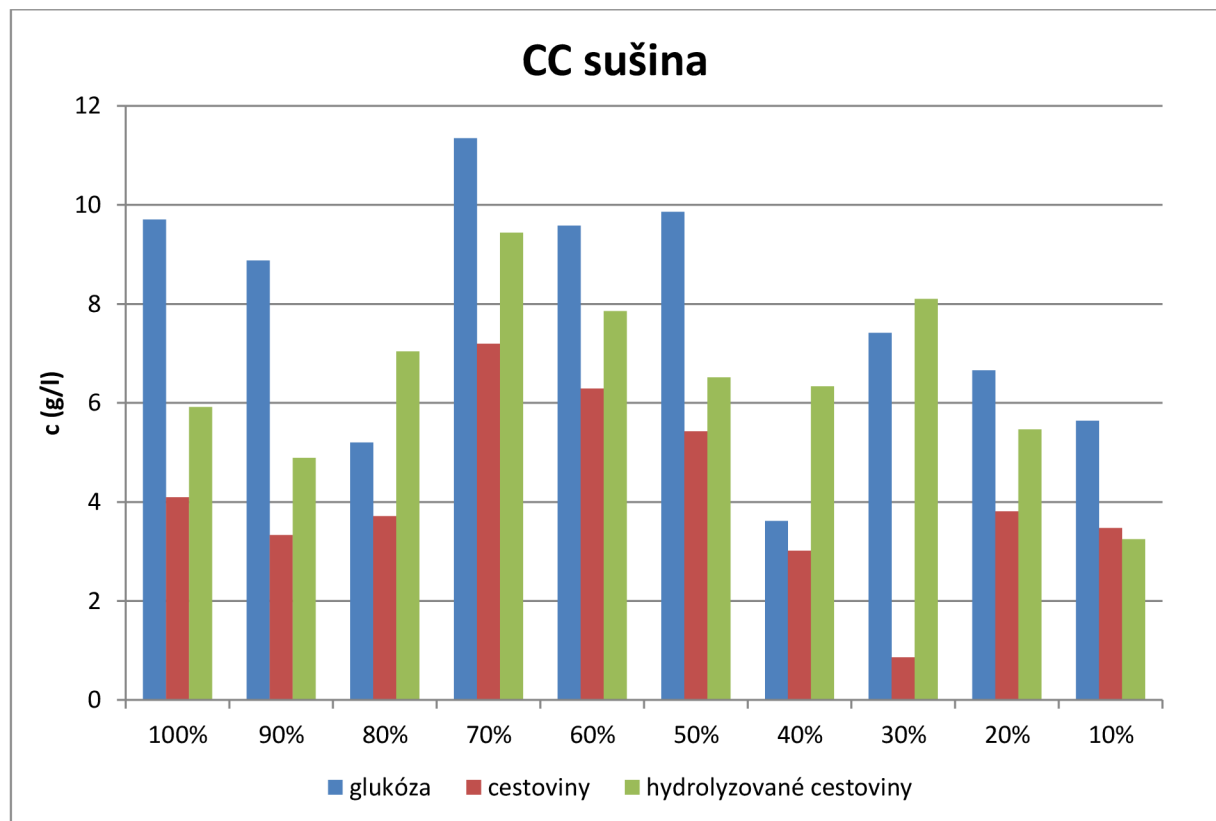
Obrázok 22: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 10 % vody

Reakciu buniek na jednotlivé druhy médií a obsah vody v nich je možné vidieť pri ich mikroskopickom a morfológickom pozorovaní. v základnom glukózovom médiu majú bunky guľatý až oválny tvar a nevyznačujú sa akýmikoľvek morfológickými abnormalitami. Rovnaké výsledky sú viditeľné aj na glukózových médiách pri obsahu vody 90 % až 70%. Pri nižších obsahoch vody bolo na pozorovaných bunkách viditeľné zhrubnutie bunkovej steny a zmena tvaru na pretiahnutý až nepravidelný. To môže byť spôsobené stupňujúcim sa osmotickým stresom pri nižších objemoch vody v médiách.

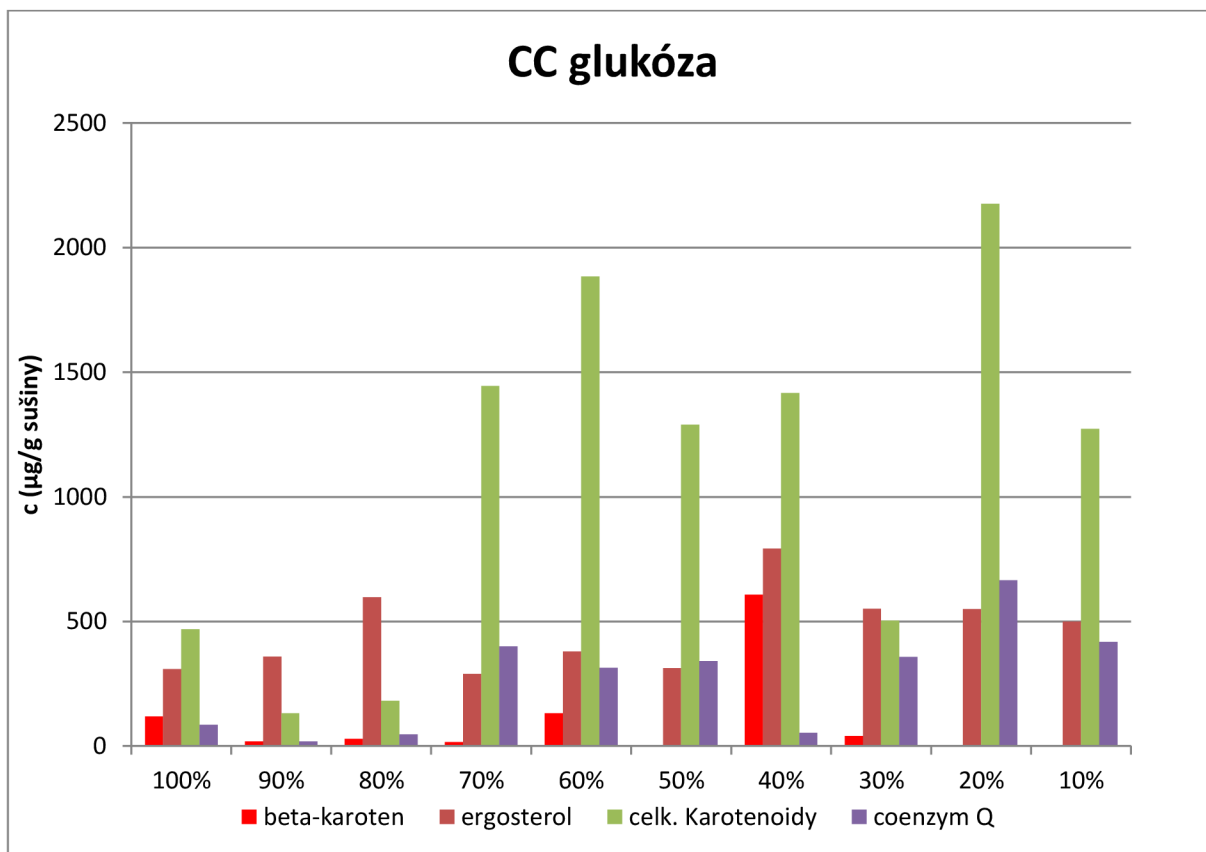
Pri médiách s cestovinami a hydrolyzovanými cestovinami je pri obsahoch vody 60 % a 50 % pozorovaná mierne výraznejšia bunková stena, v médiách s nižším obsahom vody sú bunky deformované, zhlukujú sa.

Zafarbenie médií sa výraznejšie menilo len vzhľadom k použitému substrátu. Glukózové média mali oranžovú farbu, médiá s cestovinami bledo oranžovú až ružovú (nízka produkcia pigmentov) a médiá s hydrolyzovanými cestovinami boli oranžovo hnedej farby, ktorá zrejme súvisela s hydrolyzou substrátu.

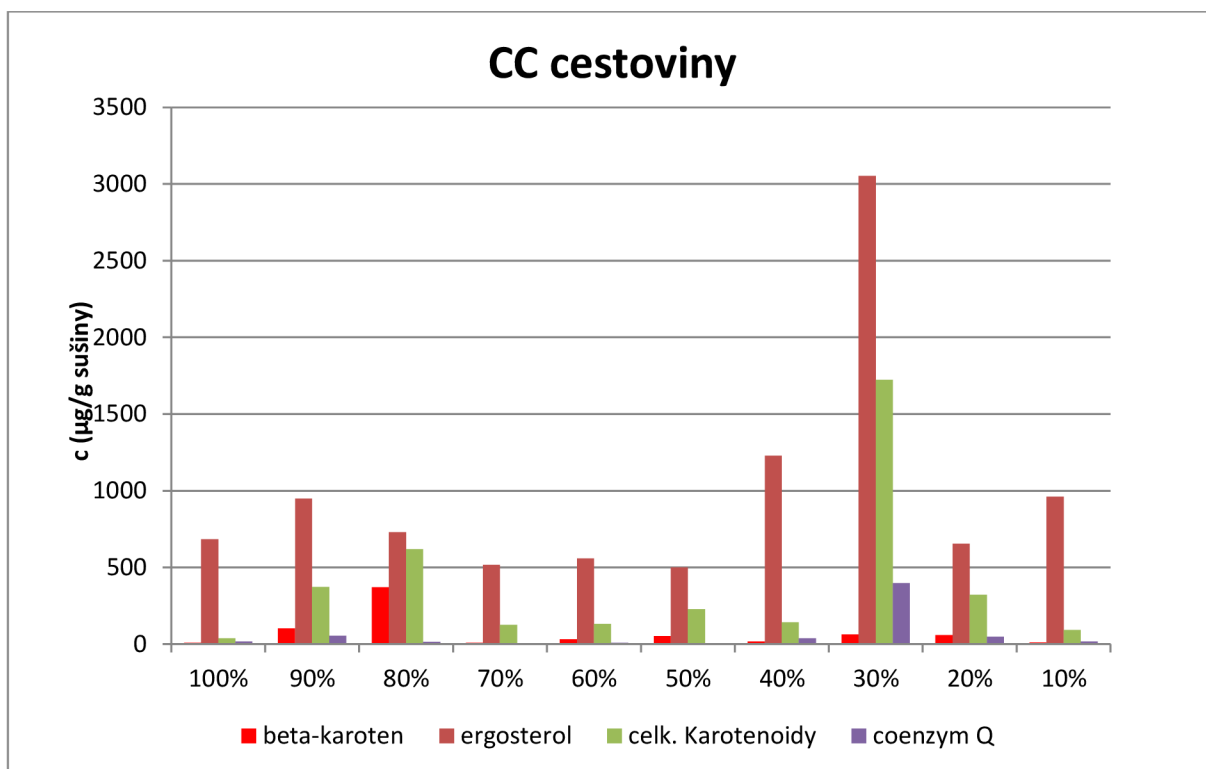
5.1.1.2 Produkčné vlastnosti na rôznych typoch použitých médií



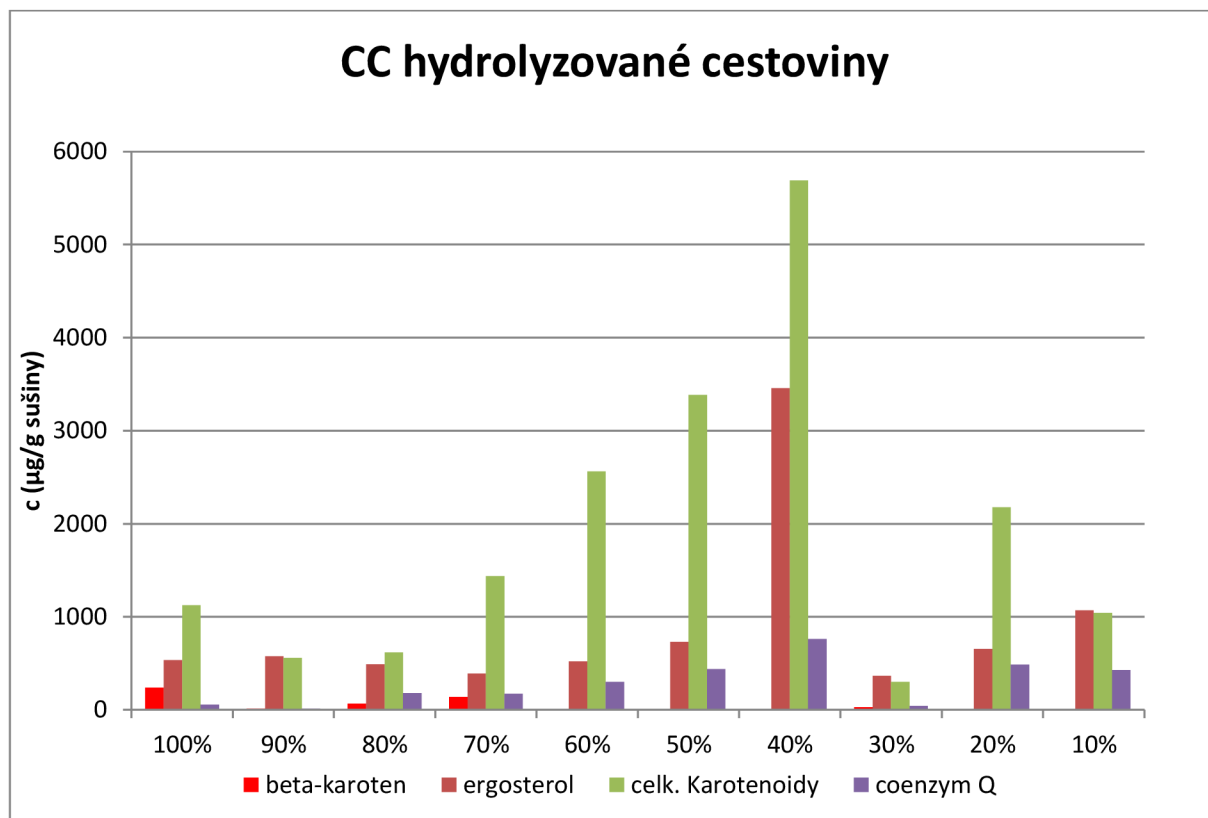
Obrázok 23: Graf množstva sušiny pri jednotlivých médiách



Obrázok 24: Graf znázorňujúci množstvo ergosterolu, karotenoidov, koenzýmu Q v bunkách kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* pre jednotlivé glukózové médiá s rôznym obsahom vody.



Obrázok 25: Graf znázorňujúci množstvo ergosterolu, karotenoidov, koenzýmu Q v bunkách kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* pre jednotlivé cestovinové médiá s rôznym obsahom vody.



Obrázok 26: Graf znázorňujúci množstvo ergosterolu, karotenoidov, koenzýmu Q v bunkách kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* pre jednotlivé médiá s hydrolyzovanými cestovinami pri rôznych obsahoch vody

Zo všetkých kultivovaných médií pre rod *Cystofilobasidium capitatum* neboli pozorované výrazné nárasty hodnôt sušiny. Väčšina hodnôt bola v porovnaní so základným glukózovým médiom (9,704 g/l) buď mierne alebo výrazne nižšia. Jediný pozorovaný nárast bol pri glukózovom médiu so 70% obsahom vody, a to o 17 % oproti základnému glukózovému médiu. Vyššie hodnoty sušiny ako v glukózových médiách neboli pozorované v žiadnom z cestovinových médií.

Produkcia ergosterolu v jednotlivých glukózových médiách sa mierne zvyšovala, či znižovala v porovnaní s kontrolným médiom so 100 % vody, nijak významne sa však nemenila. Avšak značné nadprodukčné schopnosti sa prejavili v cestovinových médiách. Koncentrácia ergosterolu dosahovala pri kultivácii na cestovinovom médiu pri 30% obsahu vody a na médiu s hydrolyzovanými cestovinami s obsahom vody 40 % najvyššie hodnoty. Produkcia ergosterolu bola v porovnaní so základným glukózovým médiom 11-krát vyššia. Pri ďalších médiách s nižším obsahom vody jeho koncentrácia klesala až na hodnoty porovnateľné s koncentraciami na základnom médiu.

Analýza karotenoidov ukázala významnejší nárast produkcie β -karoténu v médiách s použitím hydrolyzovaných cestovín a cestovín pri vyšších obsahoch vody. Najvyšší nárast bol pozorovaný pri cestovinovom médiu s 80% obsahom vody. Hodnoty jeho koncentrácie sa pri väčšine ostatných médií výrazne od základného média nelíšili alebo boli výrazne nižšie a v niektorých médiách sa β -karotén vôbec nevyskytoval. Mimo produkcie β -karoténu bolo analyzované aj celkové množstvo karotenoidov. K ich najväčšej produkcii dochádzalo v médiách, kde sa β -karotén nenachádzal alebo nachádzal v podstatne nižšej koncentrácii. V médiu s odpadným substrátom zrejme dochádza k zmene distribúcie pigmentov, možno aj

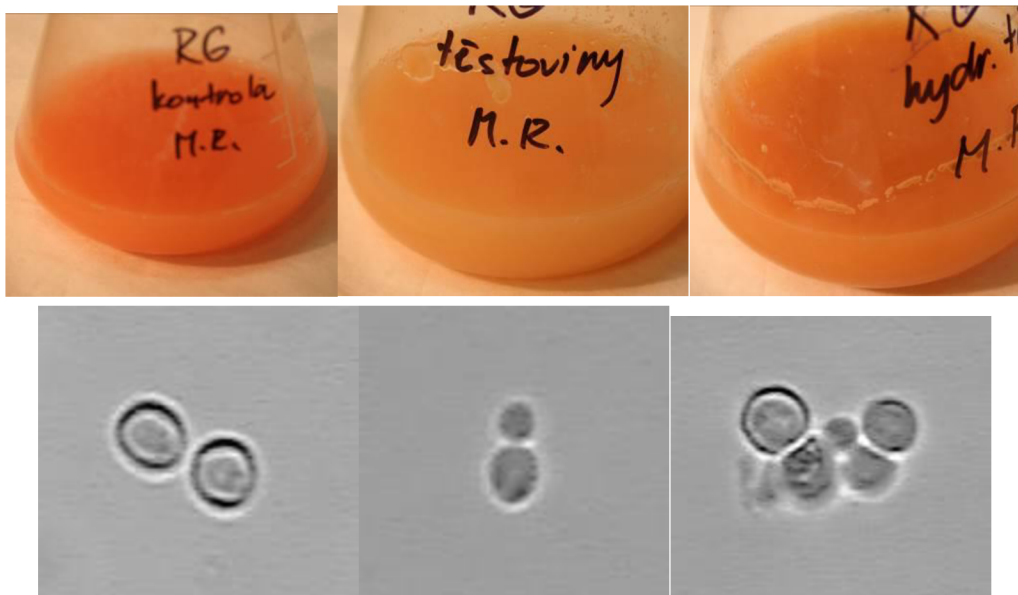
v závislosti na dostupnosti kyslíka, dusíka a ďalších faktorov. Najviac celkových karotenoidov bolo nameraných pri médiu s hydrolyzovanými cestovinami a obsahom vody 40 % a v médiu s cestovinami s 30% obsahom vody. v porovnaní so základným glukózovým médiom je ich koncentrácia 12-krát vyššia. V týchto médiách bola okrem najvyššej produkcie karotenových pigmentov a ergosterolu, i najvyššia produkcia koenzýmu Q.

Výsledky poukazujú na schopnosť kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* využívať aj odpadové substráty ako zdroj uhlíka a prežívať a produkovať v podmienkach zníženej vodnej aktivity. K lepšej využitiu sacharidov z cestovín, a zároveň k lepším produkciám sledovaných metabolitov, výrazne dopomohla kyslá hydrolýza.

5.1.2 Rod *Rhodotorula glutinis*

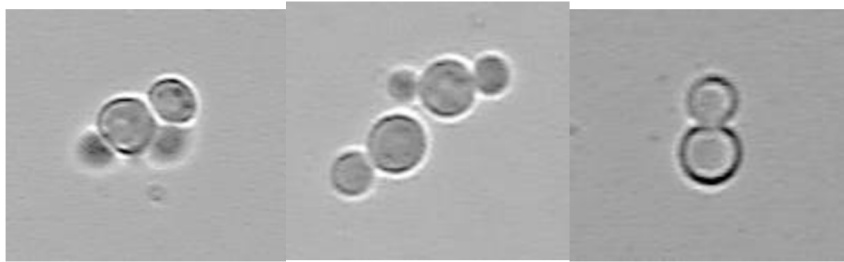
5.1.2.1 Morfológické zmeny kvasiniek v rôznych produkčných médiách

V jednotlivých sériách kultivácií, zoradených podľa množstva vody použitej pre prípravu produkčného média, boli pozorované morfológické charakteristiky kmeňa *Rhodotorula glutinis*. Jednotlivé série boli kultivované za rovnakých podmienok.

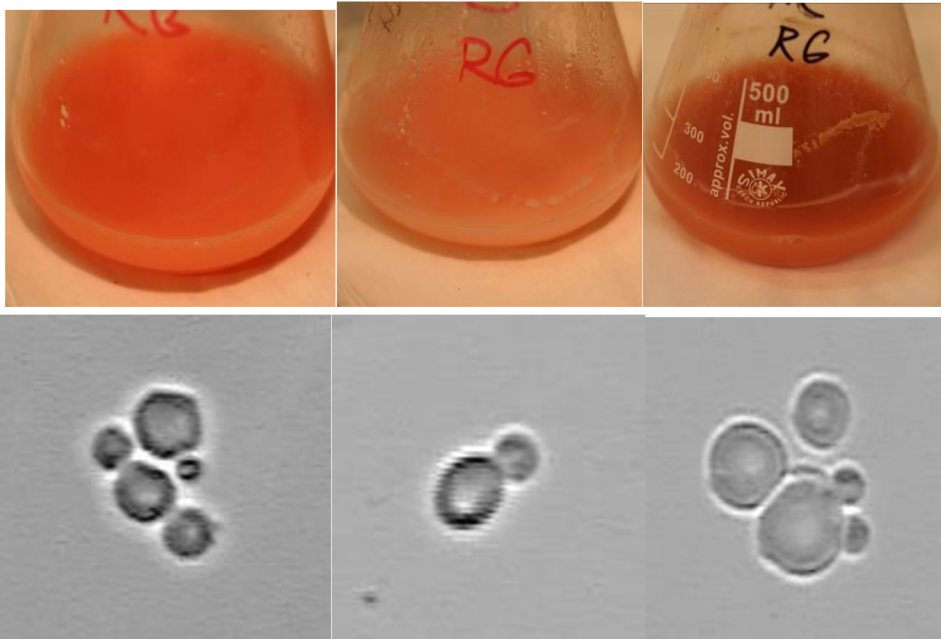


Obrázok 27: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Rhodotorula glutinis* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 100 % vody

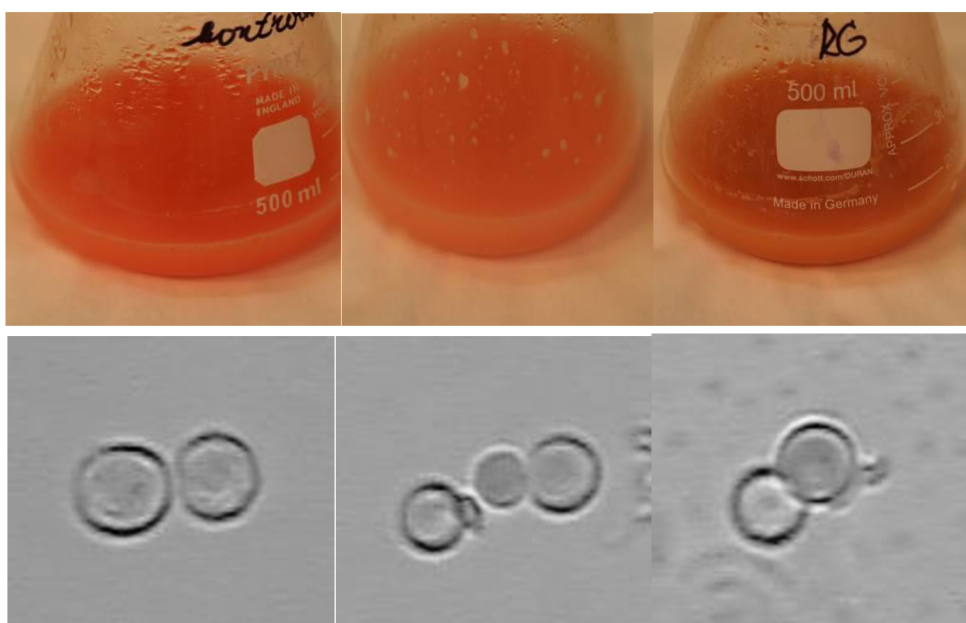




Obrázok 28: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Rhodotorula glutinis* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 90 % vody

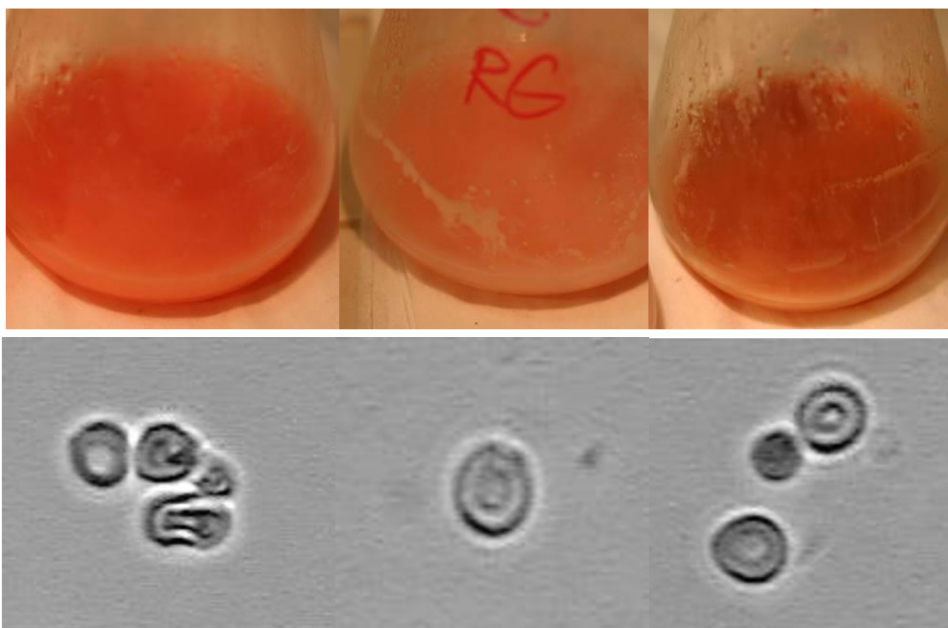


Obrázok 29: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Rhodotorula glutinis* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 80 % vody

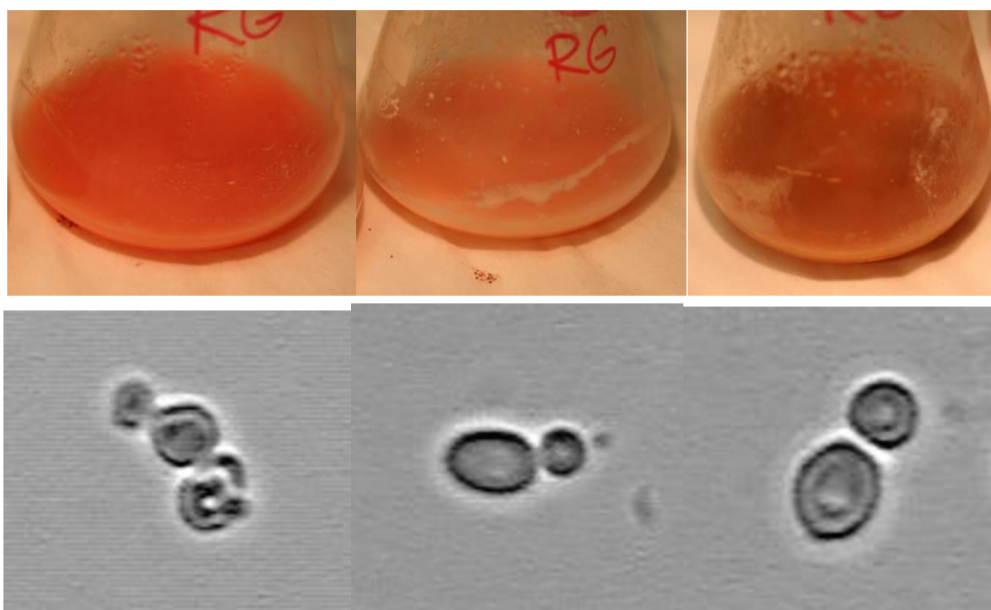


Obrázok 30: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Rhodotorula glutinis* kultivovaného na glukóze (vľavo),

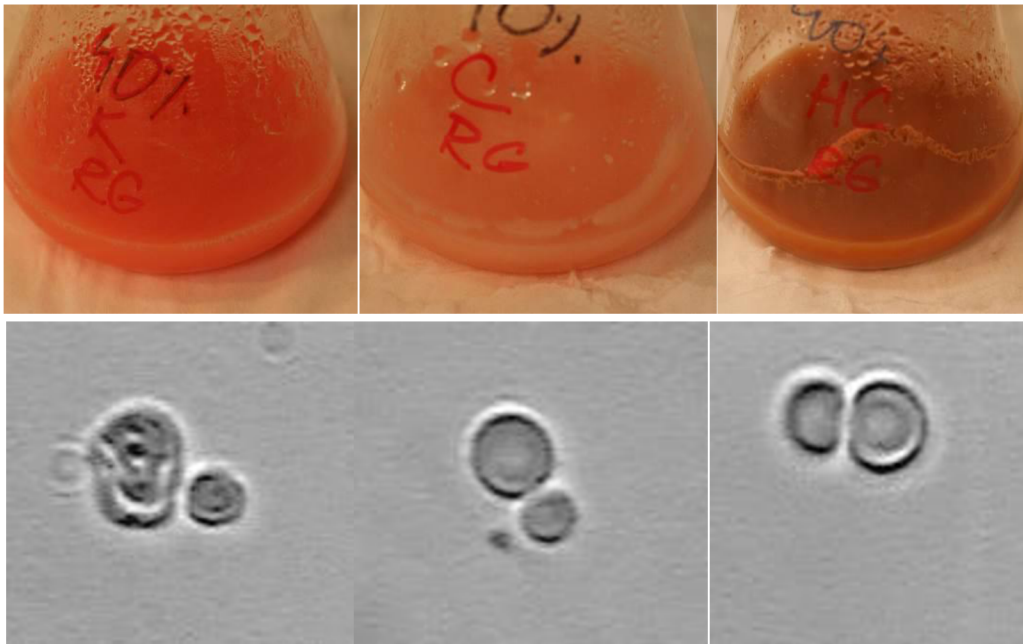
cestovínách (stred) a hydrolyzovaných cestovínách (vpravo) pri 70 % vody



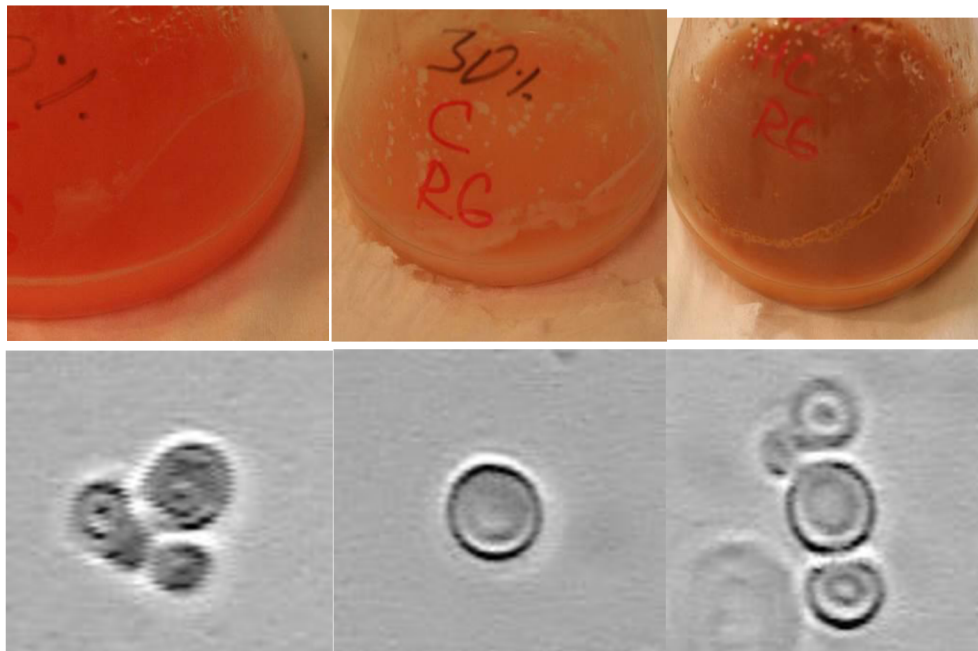
Obrázok 31: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Rhodotorula glutinis* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovínách (stred) a hydrolyzovaných cestovínách (vpravo) pri 60 % vody



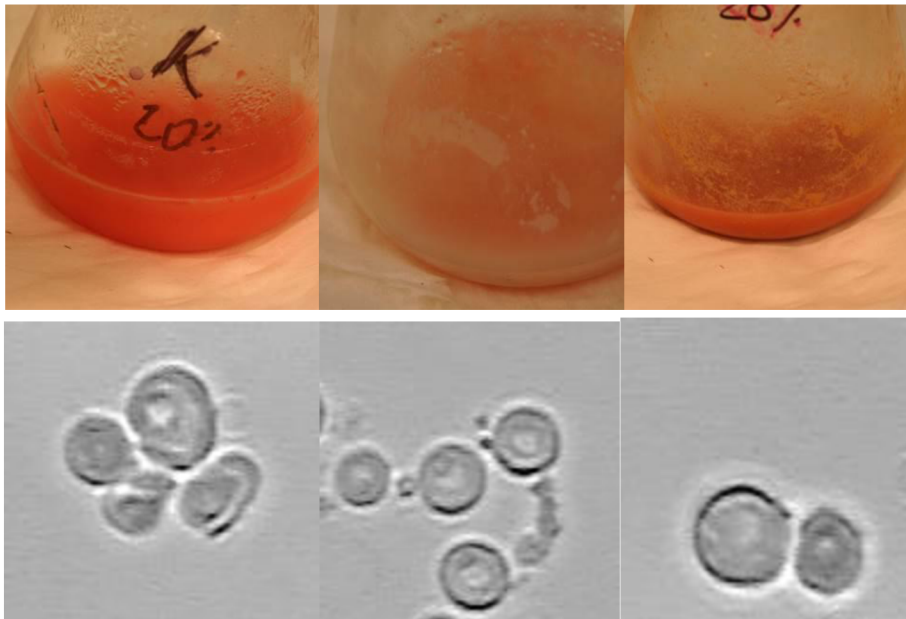
Obrázok 32: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Rhodotorula glutinis* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovínách (stred) a hydrolyzovaných cestovínách (vpravo) pri 50 % vody



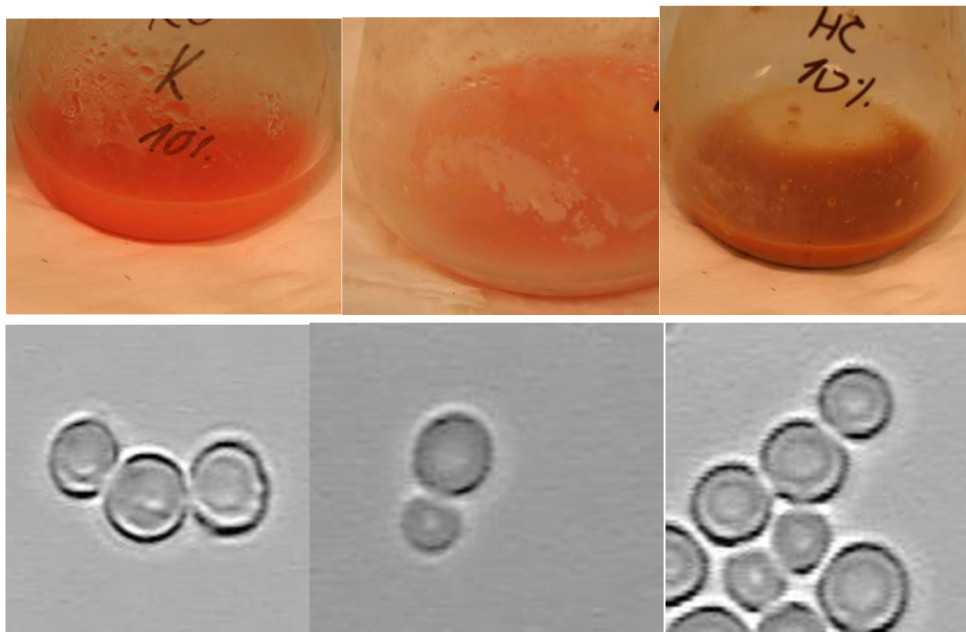
Obrázok 33: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Rhodotorula glutinis* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 40 % vody



Obrázok 34: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Rhodotorula glutinis* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 30 % vody



Obrázok 35: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Rhodotorula glutinis* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 20 % vody



Obrázok 36: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Rhodotorula glutinis* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 10 % vody

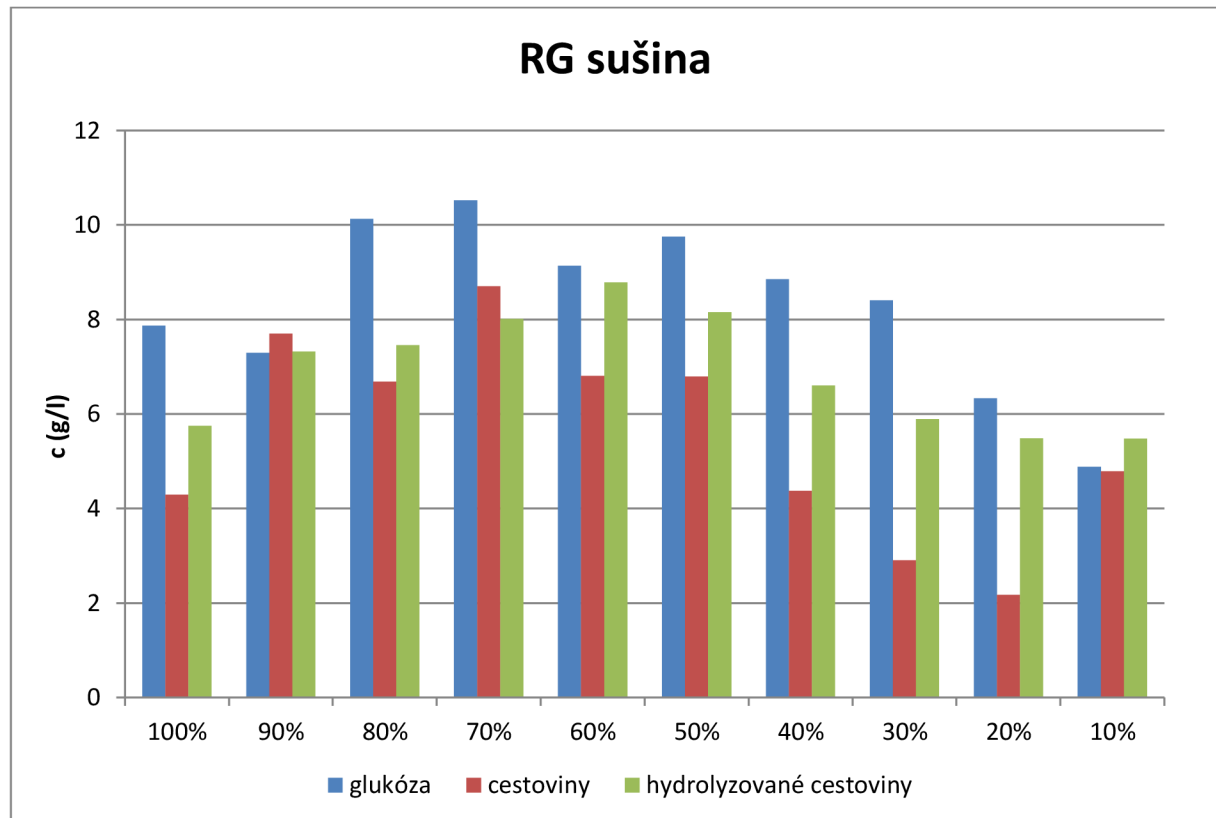
Bunky RG mali v základnom glukózovom médiu guľatý až mierne vajcovitý tvar bez iných atypických znakov. Bez zmeny boli aj bunky v glukózových médiách pri obsahoch vody 90 % až 70 %. Od 60 % boli bunky výrazne deformované, zmenšené a s výrazne hrubou bunkovou stenou ako následok pôsobenia zvýšeného osmotického tlaku.

Pri cestovinových médiách boli zmeny oproti základnému médiu pozorované iba pri obsahoch vody 60 % a 50 %, a to zhrubnutou bunkovou stenou a pretiahnutým tvarom. v médiách s nižším obsahom vody sa začínajú objavovať zväčšené vakuoly.

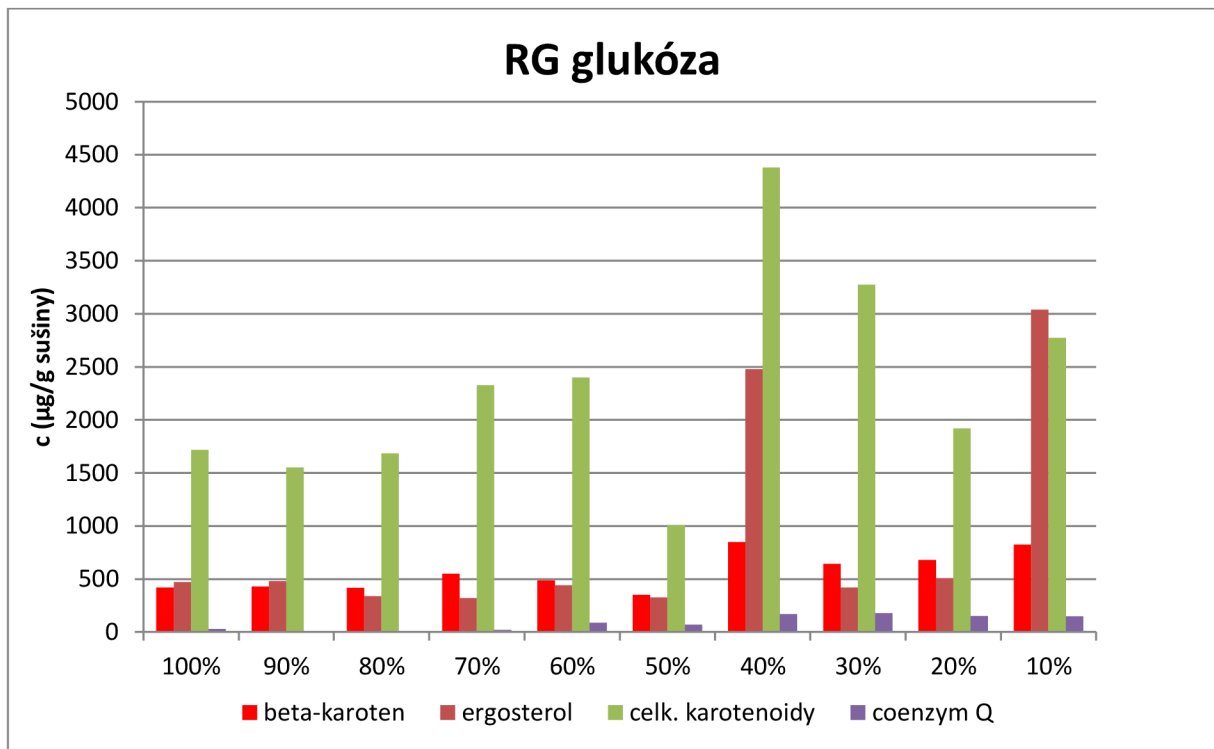
Pri použití hydrolyzovaných cestovín ako substrátu mali pri obsahoch vody 60 až 30 % pozorované bunky mierne zhrubnutú bunkovú stenu, nepravidelný tvar a začali sa zhlukovať. Prejavovali teda typický vzhľad buniek v stresovom prostredí.

Zafarbenie médií sa mierne menilo len pri hydrolyzovaných cestovinách, a to od bledohnedej (pri 100% obsahu vody) až to tmavohnedej (pri 10% obsahu vody). Glukózové médium malo výrazne oranžovú farbu, ktorá bola sýtejšia v médiách s nižším obsahom vody. Tu môžeme predpokladať vysoké výtťažky produkcie karotenoidov. Cestovinové médium bolo bledoružové, až mierne oranžové a ich farba sa s obsahom vody výraznejšie nemenila.

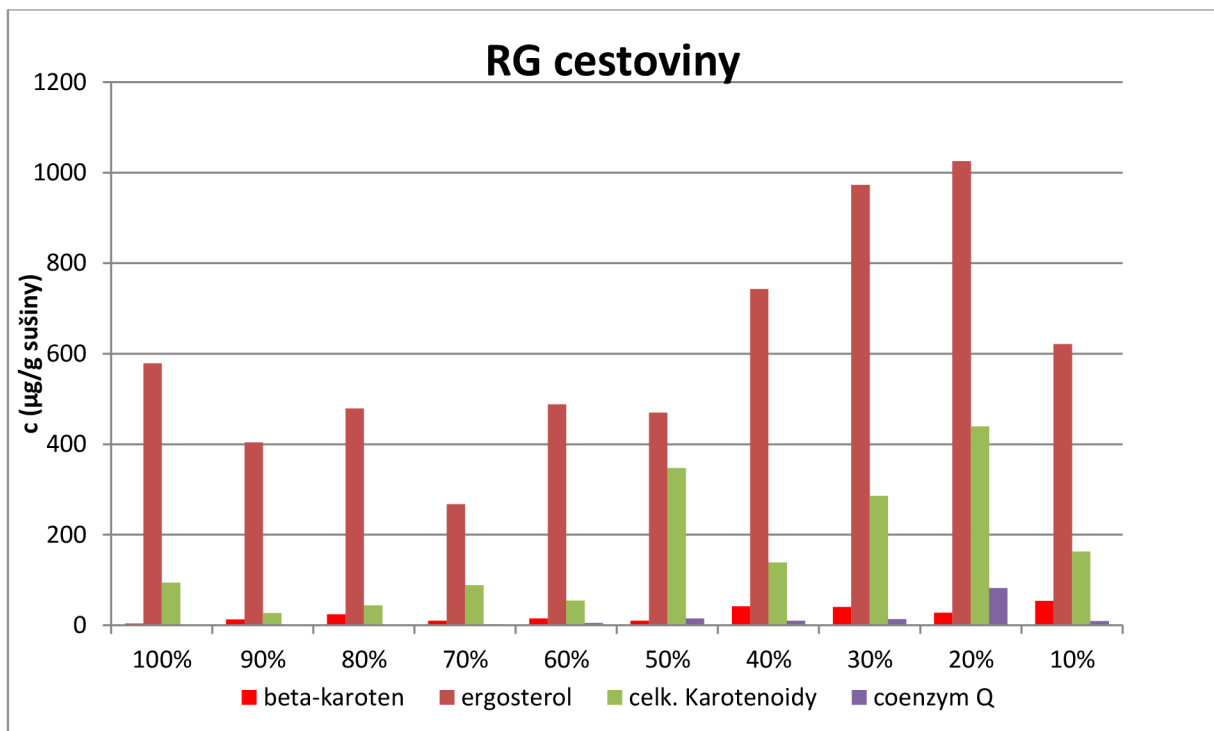
5.1.2.2 Produkčné vlastnosti na rôznych typoch použitých médií



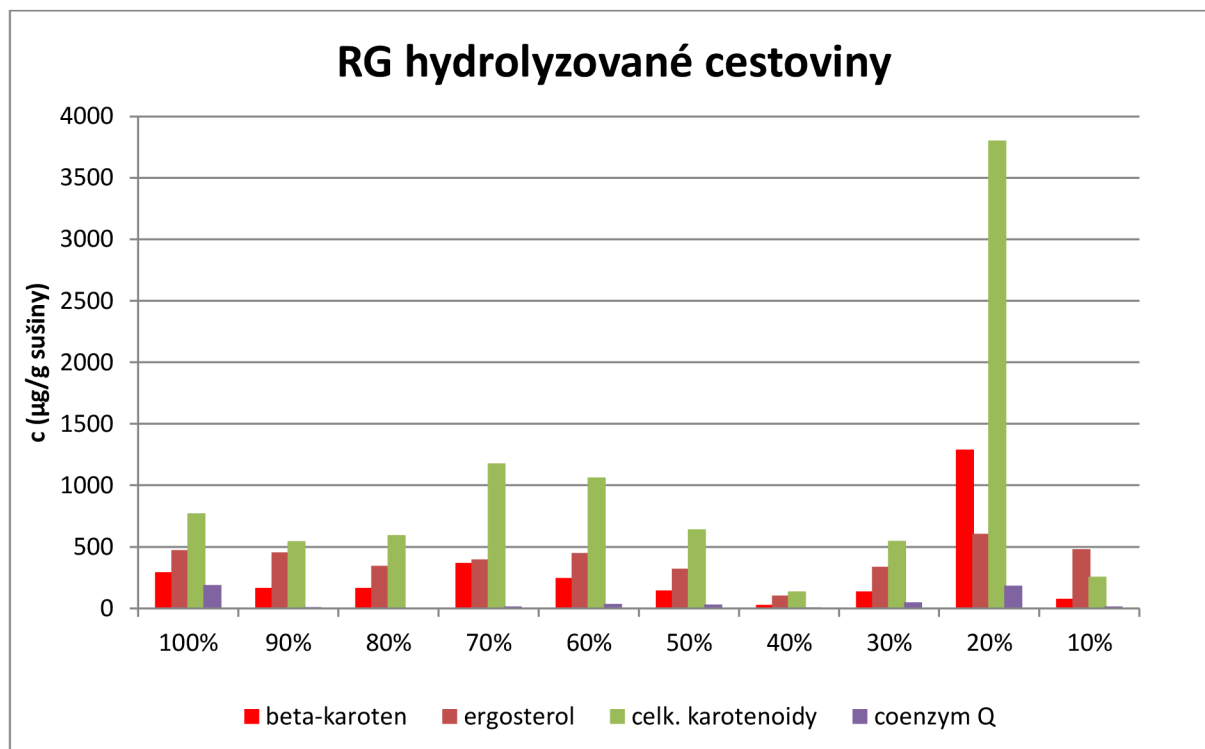
Obrázok 37: Graf množstva sušiny pri jednotlivých médiách



Obrázok 38: Graf znázorňujúci množstvo ergosterolu, karotenoidov, koenzýmu Q v bunkách kmeňa *Rhodotorula glutinis* pre jednotlivé glukózové médiá s rôznym obsahom vody.



Obrázok 39: Graf znázorňujúci množstvo ergosterolu, karotenoidov, koenzýmu Q v bunkách kmeňa *Rhodotorula glutinis* pre jednotlivé médiá s cestovinami s rôznym obsahom vody



Obrázok 40: Graf znázorňujúci množstvo ergosterolu, karotenoidov, koenzýmu v bunkách kmeňa *Rhodotorula glutinis* pre jednotlivé glukózové médiá s hydrolyzovanými cestovinami s rôznym obsahom vody.

Pri kultivácii rodu *Rhodotorula glutinis* vykazoval nárast biomasy len mierne zvýšenie v porovnaní so základným glukózovým médiom. Tento postupný nárast dosahoval maximum pri všetkých typoch použitého substrátu s obsahom vody 70 % pri glukóze a cestovinách a 60 % pri hydrolyzovaných cestovinách. Maximálny nárast bol pri glukózovom médiu s 70 % vody a to o 30 % v porovnaní so základným médiom.

Vo všetkých použitých médiách daný kmeň produkoval ergosterol. Jeho koncentrácia sa výraznejšie menila pri použití médií s glukózou a cestovinami. Najvyššia hodnota koncentrácie bola zaznamenaná pri glukózovom médiu s obsahom vody 10 % (3,4 mg/g sušiny). Pri médiách s cestovinami a hydrolyzovanými cestovinami je viditeľné zvyšovanie koncentrácie ergosterolu s klesajúcim obsahom vody. Výrazné maximum dosahuje pri 20% obsahu vody. Aj napriek tomu je však maximálna produkcia ergosterolu v týchto médiách v porovnaní s glukózovým médiom s 10% obsahom vody len tretinová.

Produkcia koenzýmu Q dosahuje najvyššie hodnoty len v glukózových médiách, a to najmä v médiách s nižším obsahom vody (okolo 180 $\mu\text{g/g}$ sušiny). Rovnako je to i v médiách s odpadovým substrátom. Vyššie výťažky koenzýmu Q boli namerané v cestovinových médiách a v médiách s hydrolyzovanými cestovinami pri 20% obsahu vody.

Ďalšou analyzovanou zložkou sú karotenogénne látky. v niektorých médiách bola zaznamenaná zvýšená produkcia β -karoténu oproti základnému médiu, najmä v médiách s glukózou a cestovinami pri obsahoch vody 10 až 40 %. Najvýraznejšie zlepšenie v jeho produkcii však bolo namerané pri produkčnom médiu s hydrolyzovanými cestovinami pri 20% obsahu vody. v tomto prípade bola hodnota jeho koncentrácie až 1,29 mg/g sušiny (základné médium– 0,42 mg/g sušiny). v rovnakom médiu bola tiež nameraná maximálna koncentrácia celkových karotenových pigmentov. Výťažok z tohto média bol vysoký aj vďaka

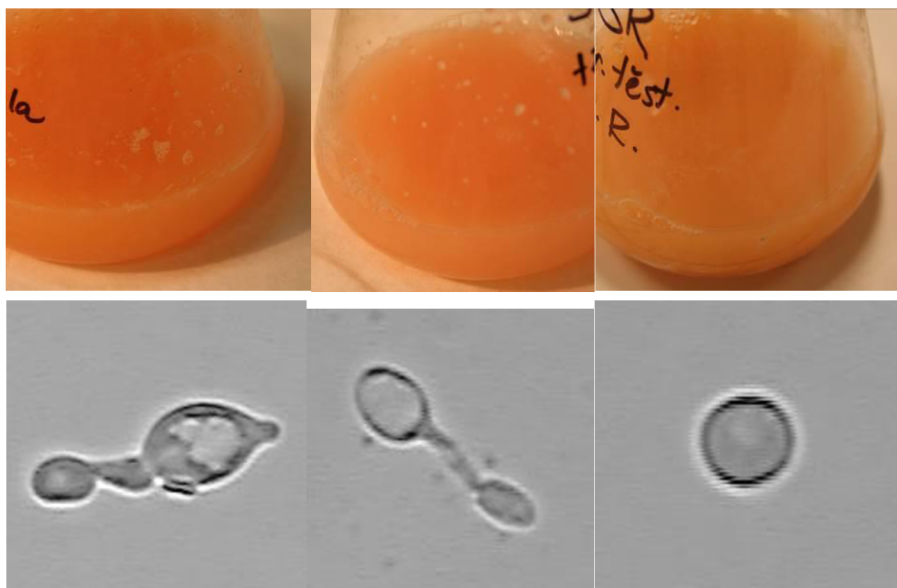
získanej biomase, ktorej koncentrácia bola porovnateľná so základným glukózovým médiom. To je ďalší dôkaz, že hydrolýza odpadových materiálov napomáha lepšej využitiu daných uhlíkatých zdrojov kvasinkami.

Získané výsledky sú dokladom, že polosuché kultivácie karotenogénnych kvasiniek sú použiteľné a optimalizácia ich podmienok zasluhuje ďalšie štúdium.

5.1.3 Rod *Sporobolomyces roseus*

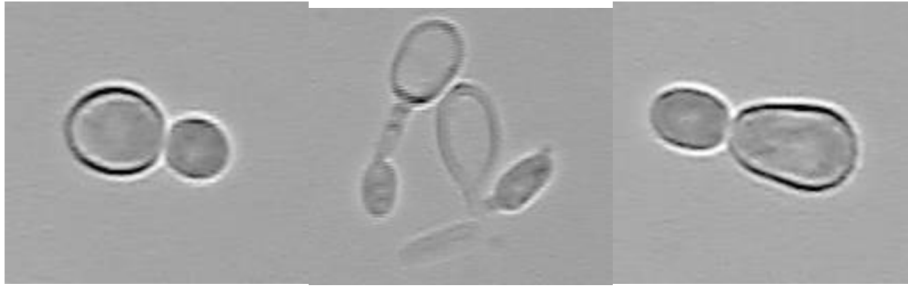
5.1.3.1 Morfológické zmeny kvasiniek v rôznych produkčných médiách

V jednotlivých sériách kultivácií, zoradených podľa množstva vody použitej pre prípravu produkčného média, boli pozorované morfológické charakteristiky kmeňa *Sporobolomyces roseus*. Jednotlivé série boli kultivované za rovnakých podmienok.

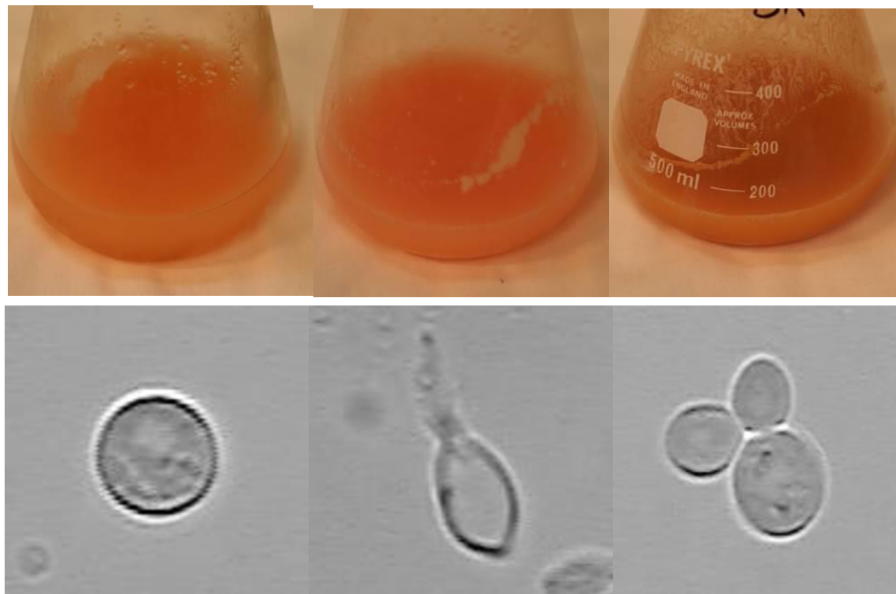


Obrázok 41: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Sporobolomyces roseus* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 100 % vody

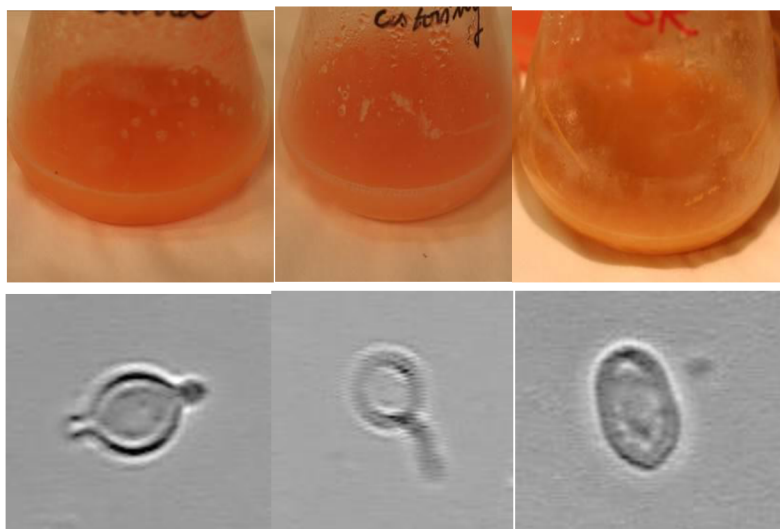




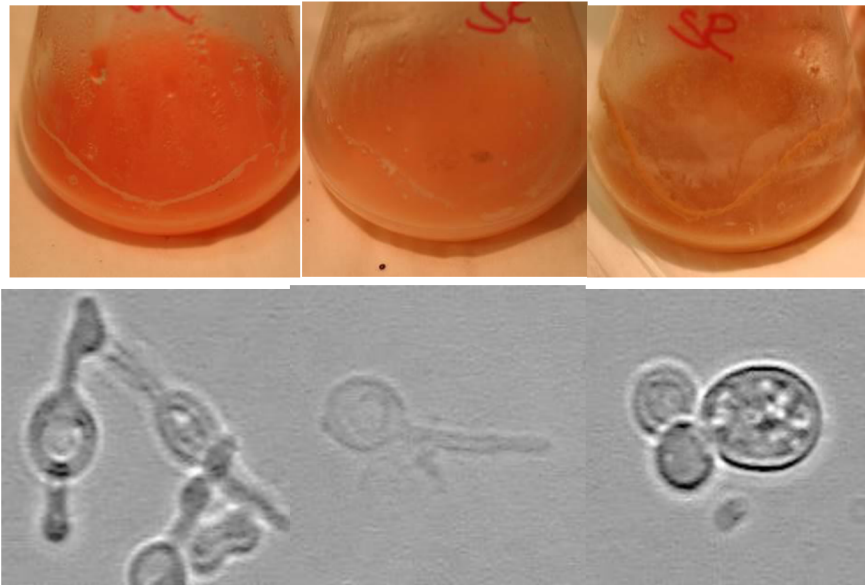
Obrázok 42: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Sporobolomyces roseus* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 90 % vody



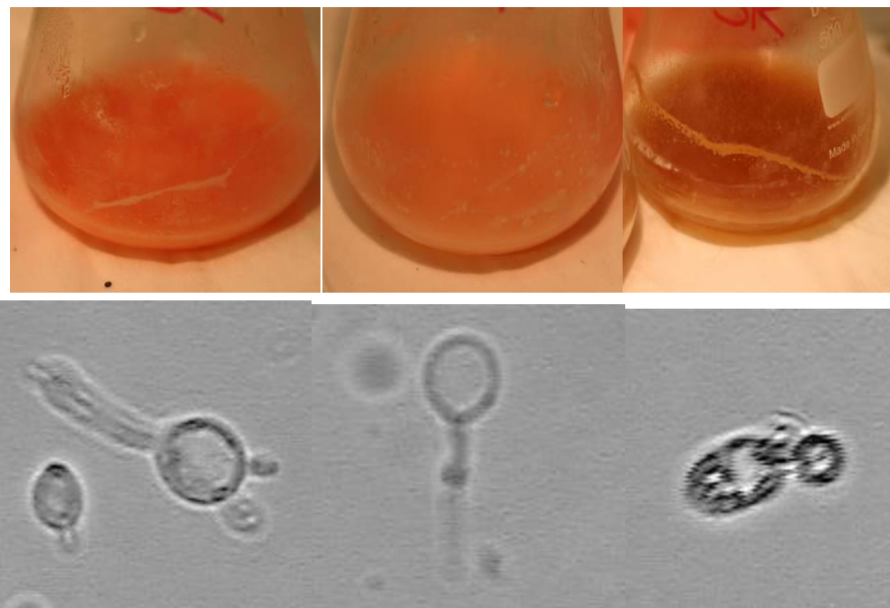
Obrázok 43: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Sporobolomyces roseus* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 80 % vody



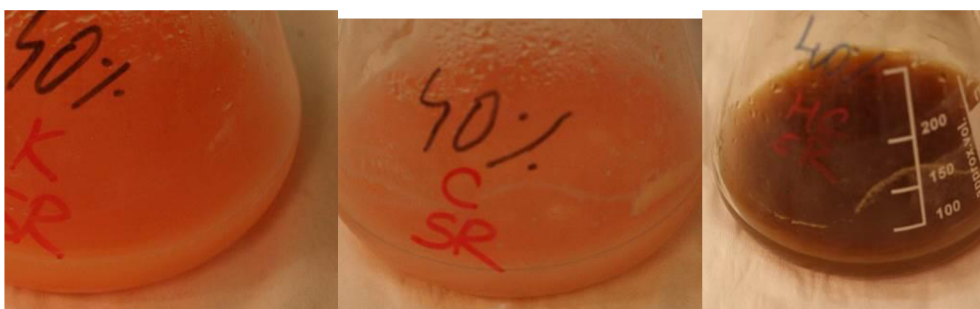
Obrázok 44: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Sporobolomyces roseus* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 70 % vody

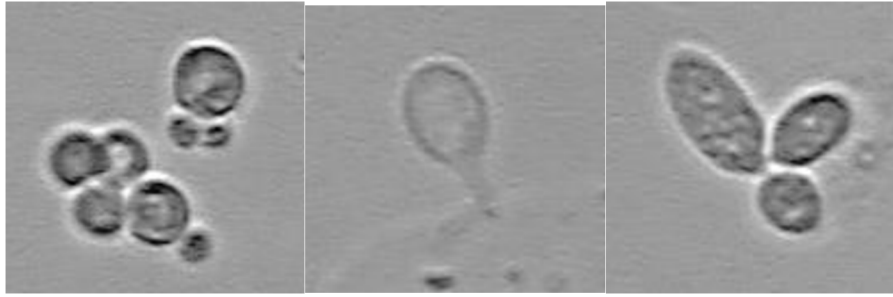


Obrázok 45: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Sporobolomyces roseus* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 60 % vody

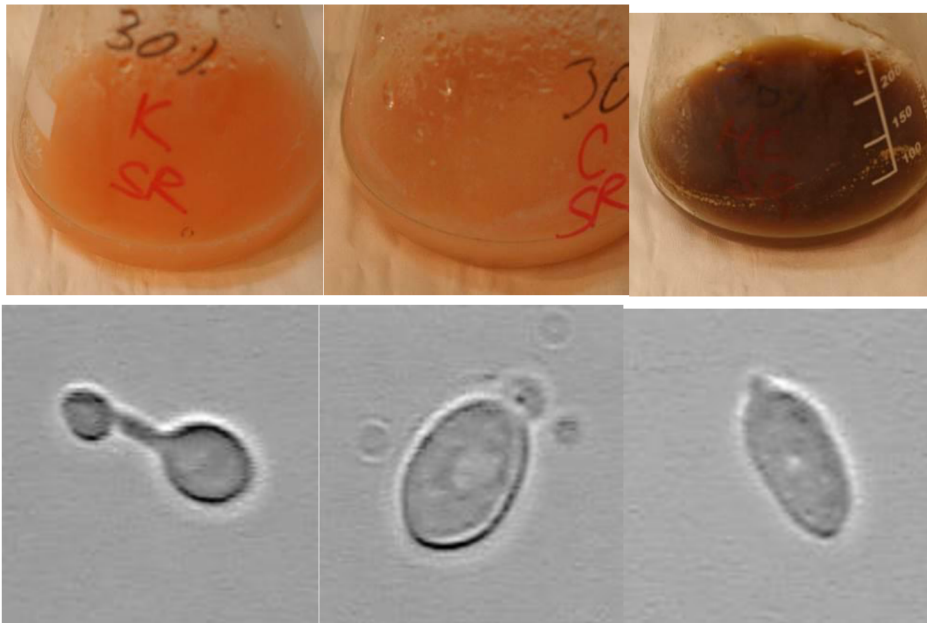


Obrázok 46: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Sporobolomyces roseus* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 50 % vody

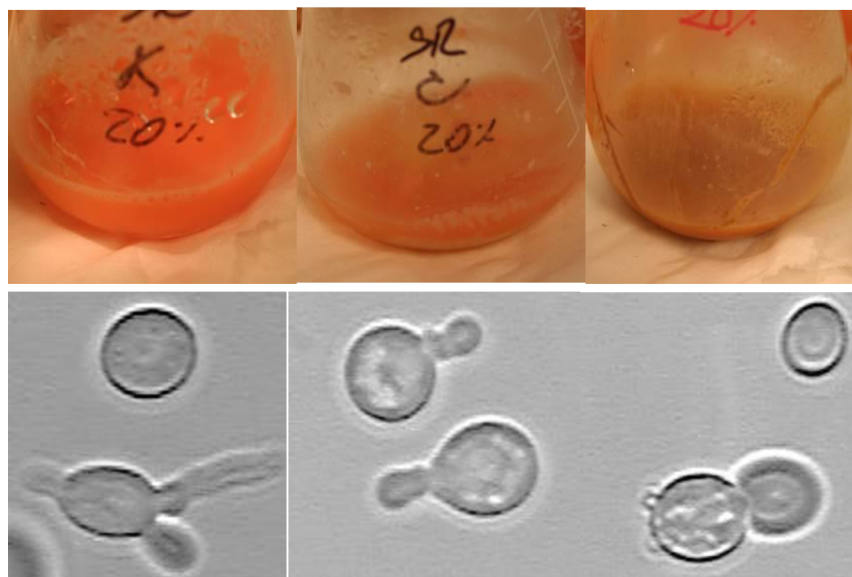




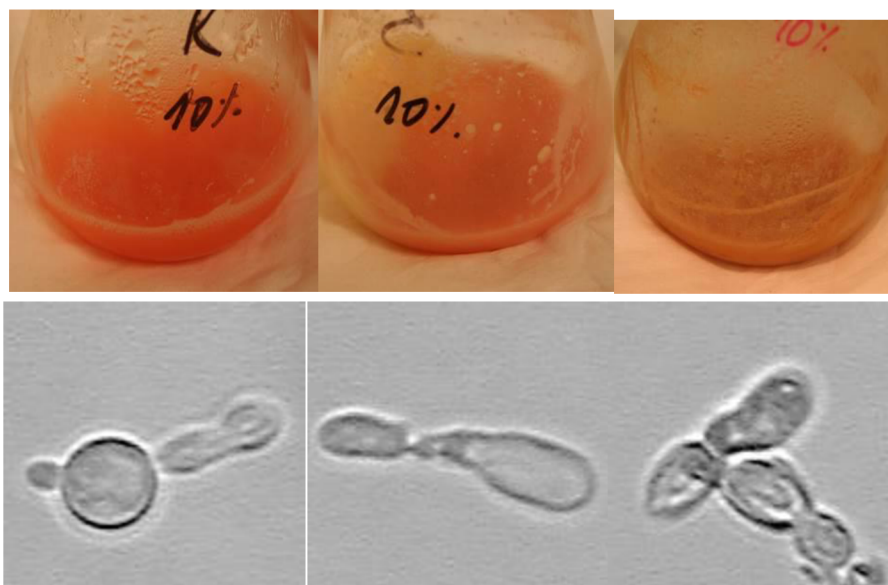
Obrázok 47: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Sporobolomyces roseus* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 40 % vody



Obrázok 48: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Sporobolomyces roseus* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 30 % vody



Obrázok 49: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Sporobolomyces roseus* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 20 % vody



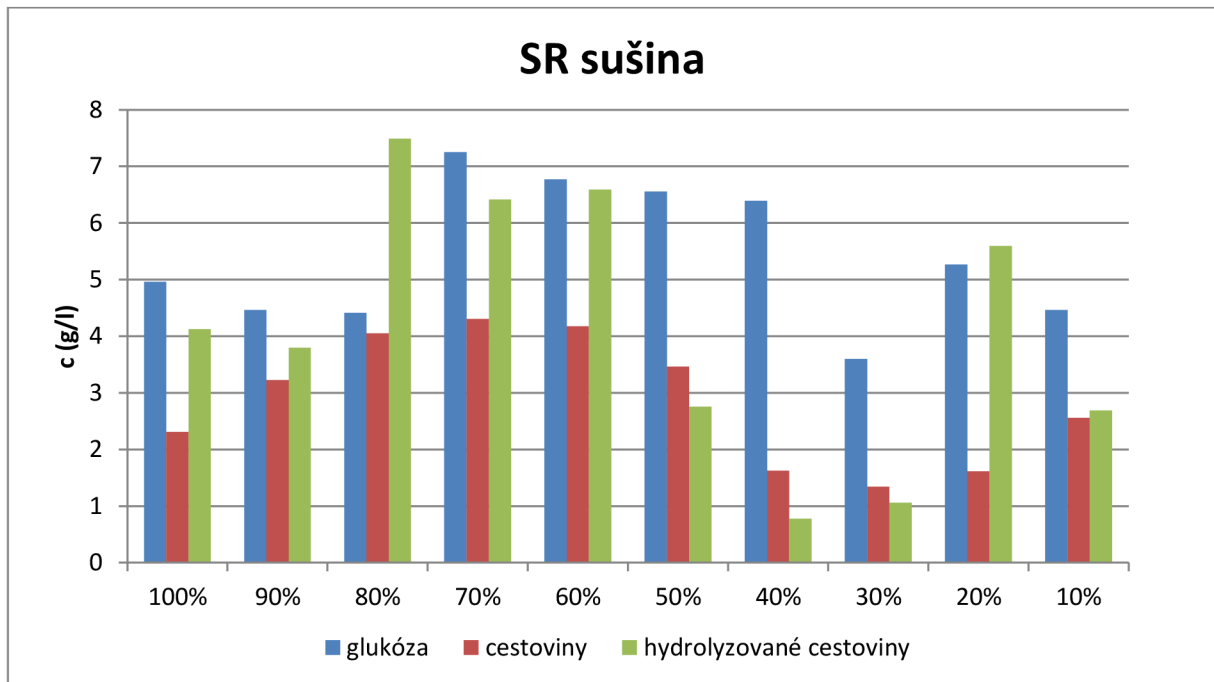
Obrázok 50: Vzhľad médií a morfológia kmeňa *Sporobolomyces roseus* kultivovaného na glukóze (vľavo), cestovinách (stred) a hydrolyzovaných cestovinách (vpravo) pri 10 % vody

Bunky kmeňa SR mali ako v základnom glukózovom médiu tak aj pri ostatných glukózových médiách výrazne citrónový tvar s výraznejšou bunkovou stenou. Odchýlka bola pozorovaná len pri médiu so 40% obsahom vody.

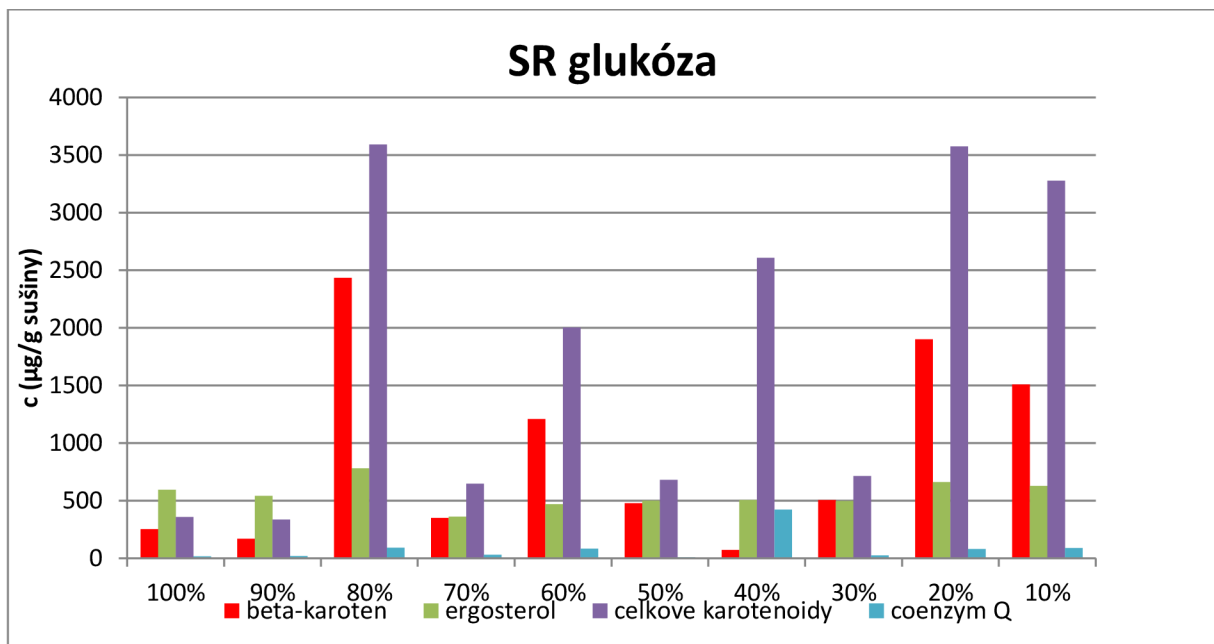
Kvasinky tohto rodu sú výrazne citlivejšie na nutričné zmeny či stres v porovnaní s ostatnými dvoma študovanými kmeňmi. Je to vidieť hlavne na tvare buniek z cestovinových médií, kde majú bunky výrazne pretiahnutý tvar a tvoria retiazky. v médiách s hydrolyzovanými cestovinami sa bunky rýchlejšie adaptovali na stresové podmienky, môže to byť aj vďaka uvoľnenému množstvu monosacharidov po kyslej hydrolyze.

Zafarbenie médií sa pri použití glukózy a cestovín s obsahom vody výrazne nemenilo. Pri glukóze boli fermentované médiá výrazne oranžovej farby a cestovinové ružové až mierne oranžové, čo poukazuje na pravdepodobne odlišné produkcie pigmentov. Média s hydrolyzovanými cestovinami ako substrátom sa so znižujúcim obsahom vody menili len mierne z bledohnej na mierne tmavšie odtiene.

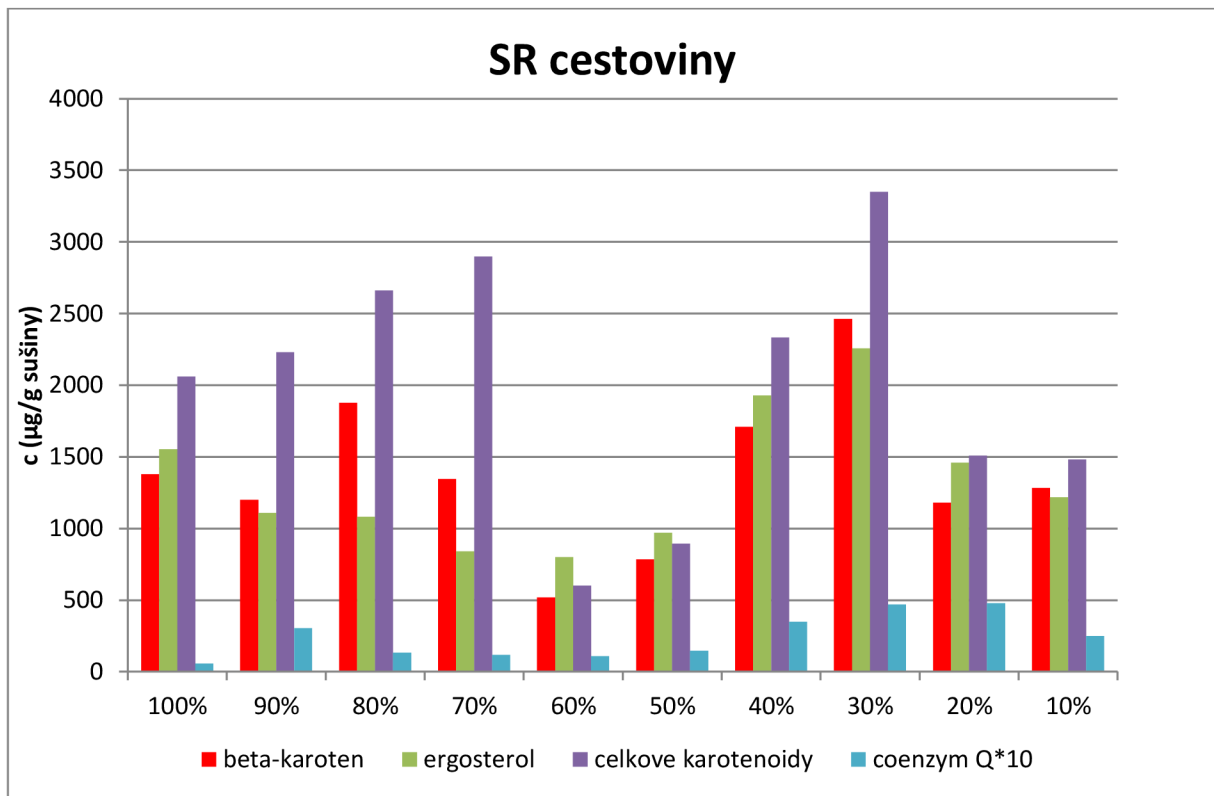
5.1.3.2 Produkčné vlastnosti na rôznych typoch použitých médií



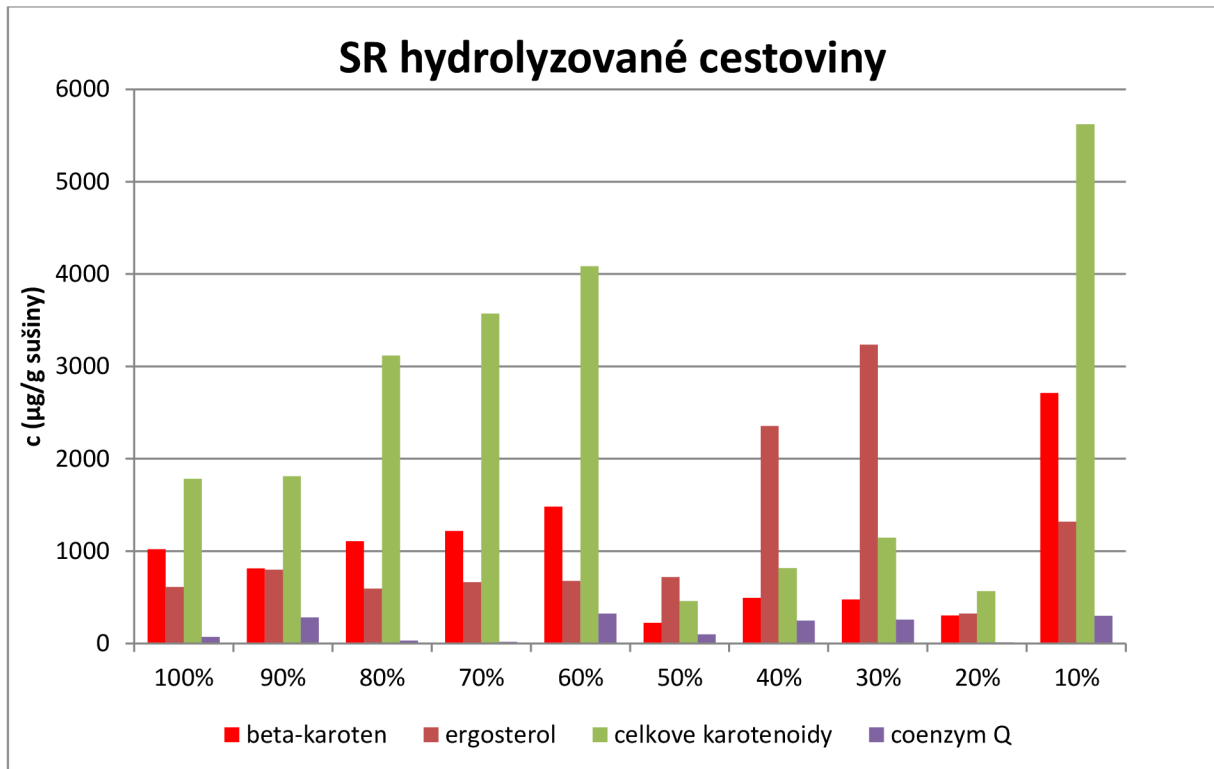
Obrázok 51: Graf množstva sušiny pri jednotlivých médiách



Obrázok 52: Graf znázorňujúci množstvo ergosterolu, karotenoidov, koenzýmu Q v bunkách kmeňa *Sporobolomyces roseus* pre jednotlivé glukózové médiá s rôznym obsahom vody.



Obrázok 53: Graf znázorňujúci množstvo ergosterolu, karotenoidov, koenzýmu Q v bunkách kmeňa *Sporobolomyces roseus* pre jednotlivé cestovinové médiá s rôznym obsahom vody.



Obrázok 54: Graf znázorňujúci množstvo ergosterolu, karotenoidov, koenzýmu Q v bunkách kmeňa *Sporobolomyces roseus* pre jednotlivé médiá s hydrolyzovanými cestovinami s rôznym obsahom vody.

Sporobolomyces roseus je kmeň karotenogénnych kvasiniek, ktorý má oproti ostatným študovaným kmeňom najnižšie produkcie biomasy, je najcitlivejší k stresovým faktorom v médiách, avšak dosahuje najvyššie produkcie karotenoidov.

Produkcia biomasy dosahovala svoje maximálne výťažky v médiách vo všetkých typoch uhlíkatého zdroja vždy pri 80–60% obsahu vody (7,48 g/l – hydrolyzované cestoviny, 70% vody). v médiách s obsahom cestovín bola však produkcia biomasy najnižšia. Je to zapríčinené pravdepodobne malým obsahom potrebných jednoduchých sacharidov v komplexnom substráte.

Všeobecne možno konštatovať, že produkcie ergosterolu a koenzýmu Q dosahovali svoje maximá v médiách s nižším obsahom vody, približne od 40%. Najvyššia produkcia ergosterolu bola dosiahnutá v médiu s cestovinami a hydrolyzovanými cestovinami s obsahom vody 30%, a to 2,2 a 3,2 mg/g sušiny. v glukózových médiách boli výťažky nižšie, najvyššia dosiahnutá koncentrácia bola 0,78 mg ergosterolu/g sušiny v glukózovom médiu s 80% obsahom vody. Rovnako to bolo aj s koenzýmom Q, kde najvyššie produkcie boli namerané v hydrolyzovaných médiách s nízkym obsahom vody (0,25 -0,30 mg/g sušiny). Zvýšené produkcie týchto lipidových metabolitov v médiách s nízkym obsahom vody naznačujú zmeny v metabolizme biosyntézy sterolových látok v membránach kvasiniek ako ochrana proti vonkajšiemu osmotickému stresu.

V produkcii β -karoténu boli dosiahnuté najvyššie výťažky v médiu s hydrolyzovanými cestovinami s 10% obsahom vody (2,9 mg/g sušiny) a cestovinami s 30% obsahom vody (2,4 mg/g sušiny). U glukózových médií boli výťažky β -karoténu nižšie. Pozoruhodné obsahy celkových karotenoidov boli namerané v médiách s odpadovým substrátom, ako aj v glukózových médiách. Najvyšší dosiahnutý výťažok predstavoval 5,6 mg karotenoidov/g sušiny v médiu s hydrolyzovanými cestovinami s 10% obsahom vody.

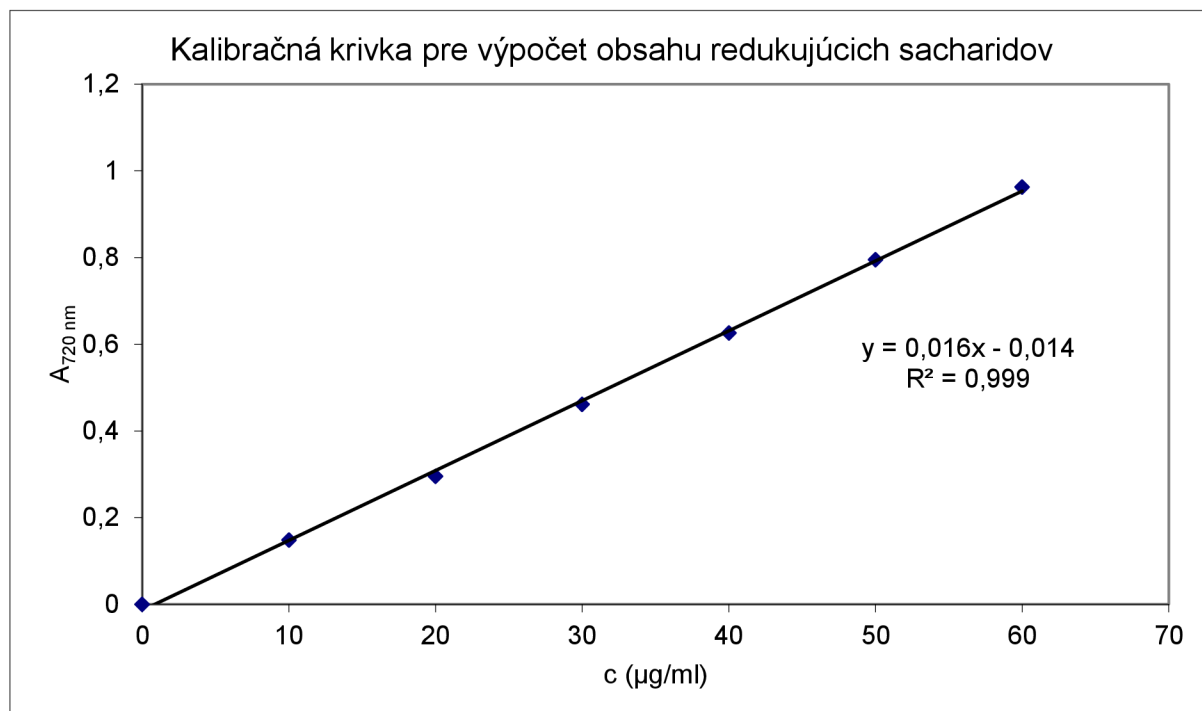
Z uvedených výsledkov môžeme konštatovať, že nami študované karotenogénne kvasinky sú schopné využitia odpadového materiálu ako zdroju uhlíka. Hydrolyza daného materiálu ešte umožnila lepšie využitie sacharidov pre rast a produkciu pigmentov.

Postupné znižovanie obsahu vody v jednotlivých sériách produkčných médií spôsobovalo vyšší osmotický tlak na membrány buniek. Kvasinky sa snažili vyrovnáť so stresovými podmienkami vyššími produkciami ochranných metabolitov, čo sú nami sledované lipidické látky, viazané práve na membránu.

Využívanie odpadovej suroviny a nízkeho množstva kultivačnej vody v režime polosuchých kultivácií je z hľadiska priemyselnej produkcie významných metabolitov určite veľmi perspektívne a efektívne.

5.2 Analýza obsahu redukujúcich cukrov v použitých cestovinových médiách

V nezaočkovaných médiách obsahujúcich odpadné substráty (cestoviny) bolo stanovené množstvo prítomných redukujúcich sacharidov metódou Somogyiho–Nelsona (viď. kapitola **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Ich koncentrácia bola stanovená v médiu s cestovinami pred sterilizáciou, po sterilizácii a po kyslej hydrolyze (viď. kapitola 4.4.3). Pre výpočet koncentrácie bola zostrojená kalibračná krivka závislosti absorbcie na koncentrácii. Namerané hodnoty a výsledky sú uvedené v grafe a tabuľke.

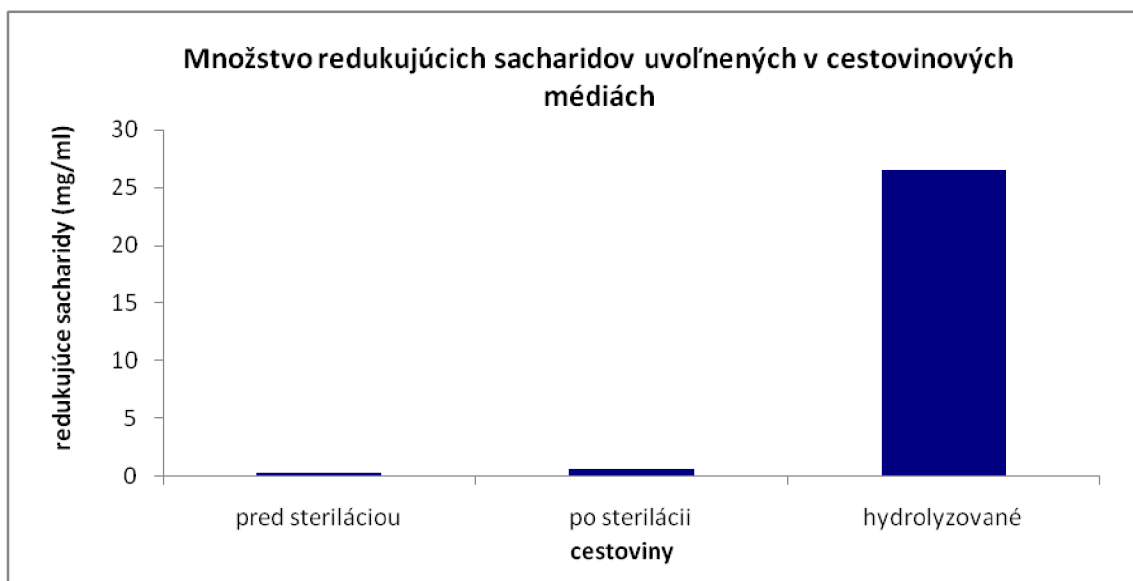


Obrázok 55: Graf závislosti absorbancie na koncentrácii redukujúcich sacharidov

Tabuľka 5: Množstvo redukujúcich sacharidov v jednotlivých médiách

| Médium | Absorbancia | Riedenie | Koncentrácia (mg/ml) |
|------------------------------|-------------|----------|----------------------|
| Cestoviny pred sterilizáciou | 0,302 | 10x | 0,196 |
| Cestoviny po sterilizácii | 0,871 | 10x | 0,493 |
| Hydrolyzované cestoviny | 0,414 | 1000x | 26,544 |

Na prípravu jednotlivých médií boli použité 3 g cestovín v 100 ml vody. Podľa výsledkov uvedených v tabuľke 5 sa pred sterilizáciou a po nej uvoľnilo len malé množstvo redukujúcich sacharidov. Sterilizácia pravdepodobne nemá významný vplyv na rozklad komplexných sacharidov a teda na hodnoty redukujúcich sacharidov v médiách. Naproti tomu po kyslej hydrolyze sa z 3 g cestovín uvoľnilo 2,65 g redukujúcich sacharidov, čo je 88,5 hm %. Zloženie na obale od výrobcu týchto cestovín uvádza, že obsahujú 85 % pšeničnej múky a 2 % pasterizovanej vaječnej zmesi. Kyslá hydrolyza dokáže značne rozštiepiť komplexné sacharidy z odpadového materiálu, a tým umožniť využitie jednoduchých monosacharidov kvasinkami ako hlavný uhlíkatý zdroj energie. Tomu odpovedá aj produkcia biomasy a metabolitov u kvasiniek kultivovaných na cestovinách, ktorá je oveľa nižšia než na hydrolyzovaných cestovinách.



Obrázok 56: Množstvo redukujúcich sacharidov uvoľnených v cestovinových médiách

5.3 „Semisolid fermentation“ -Polosuché kultivácie na Petriho miskách s cestovinovým substrátom

Po úspešne dosiahnutých výsledkoch kultivácií v produkčných médiách s postupne sa znižujúcim obsahom vody – tzv. semi-SSF (polosuché kultivácie), bol prevedený ešte kultivačný experiment na Petriho miskách obsahujúcich cestoviny a ostatné zložky média s 10% obsahom vody bez neustáleho trepania na trepačke. Hlavným cieľom tohto experimentu bolo zistiť, ako bude povrch odpadového substrátu porastený kvasinkami, či sa kvasinky budú dať ľahko oddeliť od tuhého materiálu a v neposlednej rade i produkcia karotenoidov.

„Solid state fermentation“ experiment bol zahájený prípravou sterilného produkčného substrátu na Petriho miske a následným zaočkovaním INO II. Tekutá časť z inokula sa z prevažnej časti vsiakla do cestovinového substrátu. Kultivácia prebiehala 80 hodín za neustáleho osvetlenia a teploty 28°C. Po skončení kultivácie bol substrát preplachovaný cez niekoľkokrát zloženú gázu destilovanou vodou na oddelenie buniek od cestovín. Časť kvasiniek prechádzala s destilovanou vodou do zbernej kadičky, ale časť ostala zachytená na povrchu substrátu. Pri mikroskopickom pozorovaní buniek však bola zistená bakteriálna kontaminácia u všetkých troch sledovaných karotenogénnych kmeňov. Následná analýza karotenoidov tak nebola uskutočnená.

Do ďalších experimentov by bolo vhodné zaradiť optimalizáciu kultivácie na cestovinovom substráte, poprípade voľbu vhodnejšieho substrátu, a optimalizáciu sterilizácie tuhého substrátu na Petriho miskách alebo v iných kultivačných nádobách. Z časových dôvodov to však ostáva predmetom štúdie nasledujúcich prác. Kultivácie na tuhých substrátoch sa zdajú byť efektívnym nástrojom priemyselnej biotechnologickej produkcie aktívnych látok a požadovaných metabolitov pri nízkych kapitálových nákladoch a zároveň vysokých výťažkoch alebo pri produkcii obohatenej biomasy na tuhých substrátoch využívaných v krmivárskom priemysle.

6 ZÁVER

Práca bola koncipovaná ako screeningová porovnávacia štúdia. Jej cieľom bolo testovanie možností a prípadná optimalizácia kultivačných podmienok vybraných karotenogénnych kvasiniek v podmienkach polosuchej kultivácie (SSF) s využitím odpadných substrátov. Cieľom takýchto kultivácií by mohla byť produkcia biomasy bohatej na lipidické látky, obzvlášť karotenogénne pigmenty. Takto získaná biomasa môže byť využitá vo farmaceutickom, potravinárskom či poľnohospodárskom priemysle (krmovina). Podobné štúdie sa zaoberali rôznymi spôsobmi zvýšenia produkcie žiadaných metabolitov cieľným pôsobením rôznych exogénnych stresových faktorov, zmenami zloženia médií či genetickými manipuláciami.

V tejto práci boli pre štúdium vybrané tri kmene karotenogénnych kvasiniek: *Cystofilobasidium capitatum* CCY 10-1-1, *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-33 a *Sporobolomyces roseus* CCY 19-6-4. Tieto kmene boli následne kultivované na troch rôznych druhoch médií líšiacich sa od seba druhom použitého substrátu (glukóza, cestoviny, hydrolyzované cestoviny) a obsahom vody. Po ukončení kultivácie bola získaná biomasa analyzovaná. Jej nárast bol sledovaný turbidimetricky a obsah sledovaných sekundárnych metabolitov (β -karotén, ergosterol, koenzým Q, celkové karotenoidy) bol analyzovaný metódou HPLC.

Pri kmeni *Cystofilobasidium capitatum* bol zaznamenaný najväčší pozorovaný nárast biomasy na glukózovom médiu s 70% obsahom vody, a to 11,3 g/l. Pri ostatných kvasinkách to bolo 10,5 g/l pri kmeni *Rhodotorula glutinis* (glukózové médium 70 %) a 7,5 g/l pri kmeni *Sporobolomyces roseus* (hydrolyzované cestoviny 80 %). Zvýšenie produkcie bolo pravdepodobne spôsobené následkom nutričného stresu, ale aj slabého indukčného efektu koncentrácie solí. Z celkového pohľadu bola produkcia biomasy najnižšia pri kmeni *Sporobolomyces roseus*.

V produkcii karotenoidov bola ich najvyššia koncentrácia zistená pri kmeňoch *Sporobolomyces roseus* (hydrolyzované cestoviny 10 %) a *Cystofilobasidium capitatum* (hydrolyzované cestoviny 40%). Koncentrácia karotenoidov bola u oboch kmeňov 5,6 až 5,7 mg/gram sušiny. Rozdiel bol v type produkovaných pigmentov. Zatiaľ čo v kmeni *Sporobolomyces roseus* bola koncentrácia β -karoténu 2,7 mg/g sušiny, u *Cystofilobasidium capitatum* prevažovala produkcia celkových karotenoidov, produkcia β -karoténu bola minimálna a v niektorých prípadoch nulová. Rozdiel v týchto kultúrach bol ešte v produkcii biomasy, kde jednoznačne vyššiu hodnotu dosiahol kmeň *Cystofilobasidium capitatum*.

Všetky sledované kmene tvorili pri všetkých použitých médiách ergosterol a koenzým Q. Najvyššia koncentrácia oboch metabolitov bola zaznamenaná pri kmeni *Cystofilobasidium capitatum* (hydrolyzované cestoviny 40 %) a to 3,5 mg/g sušiny pre ergosterol a 0,7 mg/g sušiny pre koenzým Q. v porovnaní so základným glukózovým médiom je koncentrácia týchto metabolitov značne vyššia ale produkcia biomasy je o 35 % nižšia.

Polosuché (SSF) kultivácie sa do budúcnosti javia ako výhodný spôsob produkcie niektorých sekundárnych metabolitov kvasiniek. Kultivácie môžu prebiehať na širokom spektre odpadných materiálov, avšak nie pre všetky druhy mikroorganizmov je tento typ fermentácie vhodný. Využitie SSF kultivácie u karotenogénnych kvasiniek vyžaduje ďalšie štúdiá v nadväzujúcich prácach.

7 LITERATÚRA

- [1]. ŠILHÁNKOVÁ L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [2]. KURTZMAN C. *The yeasts: a taxonomic study*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, xxii, 289, 48, 178 s. 2011 ISBN 978-012-3847-089
- [3]. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ A. *Kvasinky a kvasinkovité organizmy*. Weihen : VCH Verlagsgesellschaft, 1990. 528 s.
- [4]. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ A. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1990. 704 s. ISBN 80-05-00644-6.
- [5]. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ A. et al.: *Kvasinky ve výzkumu a praxi*. Dagmar Vrná. 1. vyd. Praha: Academia, 1986. 376 s.
- [6]. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ A.: *Kvasinky*, SNTL Bratislava, 1957
- [7]. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ A. *Atlas kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*, Bratislava: Alfa, 1990.
- [8]. DAVOLI P., WEBER R. *Carotenoid pigments from the red mirror yeast, Sporobolomyces roseus*. *Mycologist*, 2002, vol. 16, no. 3, p. 102-108. ISSN:0269-915X.
- [9]. FELL W. J., ROEIJMANS H., BOEKHOUT T. *Cystofilobasidiales, a new order of basidiomycetous yeasts*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, vol. 49, no. 3, p. 907-913. ISSN 0020-7713
- [10]. NĚMEC M., HORÁKOVÁ D.: *Základy mikrobiologie*, MU Brno, 1999
- [11]. ADAMS M.R., MOSS M.O.: *Food Microbiology*, The Royal Society of Chemistry Cambridge, 2000.
- [12]. ANDREISHCHEVA, E.N., ZVYAGLISKAYA, R.A.: Adaptation of yeasts to salt stress, *Appl. Biochem. Microbiol.* 35 (3), str. 217-228, 1999.
- [13]. VESELÁ M., DRDÁK M.: *Praktikum z obecné mikrobiologie*, VUT Brno, 1999.
- [14]. XIAO W. *Yeast protocols*. 2nd ed. Totowa, N.J.: Humana Press, c2006, xi, 392 p. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 313. ISBN 15-882-9437-4.
- [15]. BETINA V., *Mikrobiológia 1*, STU Bratislava, 1995
- [16]. MAROVA I., CARNECKA M., HARONIKOVA A. Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journal of Environmental Management* [online]. 2012, č. 95, s. 338-342 [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479711002155>
- [17]. SLOVÁK B., MÁROVÁ I., DRDÁK M.: Vliv vybraných metabolických aktivátorů na produkci karotenoidů kvasinkou *Rhodotorula glutinis*, *Chem. Listy* 94 (9), str.692-698, 2000.
- [18]. VODRÁŽKA Z.: *Biochemie*, Academia Praha, 1996
- [19]. KOYAMA T., STEINBÜCHEL A. *Biopolymers: Polyisoprenoids*. 2. vyd. Weinheim: Wiley-VCH, 2001, 425 s. ISBN 3-527-30221-2
- [20]. RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. *A guide to carotenoid analysis in food*. Washington, D.C: ILSI Press, 2001. ISSN 1-57881-072-8. Dostupné z: http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNACQ929.pdf

- [21]. BREIEROVÁ E., MÁROVÁ I., ČERTÍK M. 2005. The role of the carotenoid pigments in yeast cells under stress conditions. *Chem. Listy* 99:109-111.
- [22]. SCHMIDT-DANNERT C: Engeneering novel carotenoids in microorganisms, *Current Opinion in Biotechnology* 2000, 11:255-261
- [23]. HEINZOVÁ V. *Využití moderních separačních a analytických technik k charakterizaci vybraných metabolitů karotenogenních kvasinek*. Diplomová práce, FCH VUT, Brno 2007
- [24]. RODRIGUEZ, S. SANROMAN A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical engineering journal*. 2004, č. 22.
- [25]. PANDLEY A., SOCCOL C., MITCHELL, D. New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*. 2000, č. 35.
- [26]. SINGHANIA, ReetaRani, Anil Kumar PATEL a Carlos SOCCOL. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2009, č. 44.
- [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]. PRÍBELA A.: *Analýza potravin*, STU Bratislava, 1991
- [29]. KLOUDA P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [30]. SOMMER L.: *Teoretické základy analytické chemie III*, VUT Brno, 1995
- [31]. YU J., TAN T, XUZHANG. Ethanol production by solid-state fermentation of sweet sorghum using the thermotolerant yeast strain. *Fuel Processing Technology*. 2008, č. 11. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378382008000842>

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

| | |
|------|---|
| HPLC | Vysokóúčinná kvapalinová chromatografia |
| CC | <i>Cystofilobasidium capitatum</i> |
| RG | <i>Rhodotorula glutinis</i> |
| SR | <i>Sporobolomyces roseus</i> |
| SSF | „Solid-state fermentation“ |
| INO | inokulum |