



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PRODUKCE VYBRANÝCH METABOLITŮ KAROTENOGENNÍMI KVASINKAMI KULTIVOVANÝMI NA POTRAVINÁŘSKÝCH ODPADECH

PRODUCTION OF SELECTED METABOLITES BY CAROTENOGENIC YEAST CULTIVATED ON
FOOD WASTES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

LUCIE TURKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2015



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0911/2014** Akademický rok: **2014/2015**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Lucie Turková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**
Konzultanti: Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.

Název bakalářské práce:

Produkcce vybraných metabolitů karotenogenními kvasinkami kultivovanými na potravinářských odpadech

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše zaměřená na charakterizaci karotenogenních kvasinek a možnosti jejich kultivace na odpadech.
2. Zavedení a optimalizace metod - kultivace mikroorganismu, růstové a metabolické charakteristiky.
3. Experimentální studie - kultivace vybraných druhů kvasinek na odpadních substrátech, srovnání růstu a produkce pigmentu.
4. Vyhodnocení výsledku a diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: **22.5.2015**

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

Lucie Turková

Student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1. 2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.

Děkan fakulty

ABSTRAKT

U použitých kmenů kvasinek (*Cystofilobasidium capitatum*, *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces shibatanus* a *Sporobolomyces roseus*) byla sledována produkce vybraných metabolitů - zejména karotenoidů, dále pak i ergosterolu a koenzymu Q. Kvasinky byly kultivovány na odpadních substrátech z vinařství - výliscích (slupkách) a třapínách. Odpadní substráty byly podrobeny analýze obsahu sacharidů, tuků, tříslovin, polyfenolů a dalších látek. Kultivace probíhaly též na chemicky a enzymově hydrolyzovaných substrátech. K enzymové hydrolyze byly využity extracelulární hydrolázy plísní *Phanerochaete chrysosporium* a *Penicillium lilacinum*.

Nejvyšší produkce sledovaných metabolitů bylo dosaženo při kultivaci na třapínách hydrolyzovaných enzymy *P. chrysosporium* u kvasinky *S. roseus*. Výtěžek β -karotenu činil 616,1 $\mu\text{g/g}$ suš., celkových karotenoidů 753,6 $\mu\text{g/g}$ suš., ergosterolu 415,5 $\mu\text{g/g}$ suš. a koenzymu Q 77,9 $\mu\text{g/g}$ suš. Kvasinka *S. roseus* dosahovala některých nejvyšších hodnot i u dalších sérií kultivací. Nejmenší produkce byly zaznamenány u *S. shibatanus*. Na základě spotřeby redukujících cukrů jednotlivými kmeny byly vypočteny také výtěžnostní koeficienty biomasy a β -karotenu ze substrátu.

Klíčová slova

odpadní substráty, karotenogenní kvasinky, karotenoidy

ABSTRACT

The production of selected metabolites, especially carotenoids, ergosterol and coenzyme Q was observed in four red yeast strains (*Cystofilobasidium capitatum*, *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces shibatanus* a *Sporobolomyces roseus*) cultivated on viticulture waste substrates such as skins and stem. In these substrates the content of carbohydrates, fat, tannins and polyphenols was analysed. Cultivations were done also on chemically and enzymatically hydrolysed substrates. For enzyme hydrolysis the extracellular enzyme cocktails of the fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Penicillium lilacinum* were used.

The highest production of metabolites was observed in *S. roseus* cultivated on stem hydrolysed by enzymes from *P. chrysosporium*. The yield of β -carotene reached 616,1 $\mu\text{g/g}$ dry mass, carotenoids 753,6 $\mu\text{g/g}$ dry mass, ergosterol 415,5 $\mu\text{g/g}$ dry mass and coenzym Q 77,9 $\mu\text{g/g}$ dry mass. *S. roseus* reached very high yields also in the other series of cultivation. The lowest production of metabolites was observed in *S. shibatanus*. The yield coefficients of biomass and β -carotene were calculated based on consumption of reducing sugars.

Key words

waste substrates, red yeast strains, carotenoids

TURKOVÁ, L. *Produkce vybraných metabolitů karotenogenními kvasinkami kultivovanými na potravinářských odpadech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 58 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování patří paní prof. RNDr. Ivaně Márové, Csc. za odborné vedení, cenné věcné rady, vstřícnost a profesionální přístup při vypracování bakalářské práce.

Ing. Andrei Háronikové, PhD. vděčím za odborné vedení a pomoc v laboratoři, trpělivost a neuvěřitelně pozitivní přístup.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Teoretická část	9
2.1	Obecná charakteristika kvasinek	9
2.1.1	Morfologie buněk	9
2.1.2	Rozmnožování	9
2.1.3	Stavba buňky	10
2.2	Využití kvasinek podle syntézy metabolitů	11
2.2.1	Primární metabolity	12
2.2.2	Sekundární metabolity	12
2.3	Charakteristika vybraných druhů kvasinek	13
2.3.1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	13
2.3.2	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	13
2.3.3	<i>Sporobolomyces roseus</i>	13
2.3.4	<i>Sporobolomyces shibatanus</i>	13
2.4	Kultivace kvasinek	14
2.4.1	Fyzikálně-chemické nároky	14
2.4.2	Nutriční nároky	14
2.5	Odpadní substráty	15
2.5.1	Kultivace karotenogenních kvasinek na odpadních substrátech	15
2.5.2	Odpady z vinařství	18
2.6	Karotenoidy	18
2.6.1	Výskyt	18
2.6.2	Struktura	19
2.6.3	Biosyntéza karotenoidů kvasinkami	19
3	Cíl práce	21
4	Experimentální část	22
4.1	Materiál a chemikálie	22
4.2	Přístroje a pomůcky	22
4.3	Použité mikroorganismy	23
4.4	Odpadní substráty	23
4.5	Kultivace kvasinek	23
4.5.1	Inokulum I	23

4.5.2	Inokulum II	23
4.5.3	Produkční média	23
4.5.4	Chemická hydrolýza odpadů	24
4.5.5	Hydrolýza extracelulárními enzymy plísní	24
4.6	Kultivace plísní	24
4.6.1	Izolace a lyofilizace enzymů	25
4.7	Izolace a stanovení biomasy kvasinek	25
4.7.1	Stanovení zákalu turbidimetricky	25
4.7.2	Izolace biomasy	25
4.8	Izolace a analýza karotenoidů	25
4.8.1	Izolace karotenoidů	25
4.8.2	Analýza karotenoidů pomocí RP-HPLC/PDA	26
4.9	Stanovení obsahu redukujících sacharidů v médiích metodou Somogyi-Nelsona	26
4.10	Stanovení enzymových aktivit	27
4.10.1	Stanovení aktivity celuláz, amyláz a xylanáz	27
4.10.2	Stanovení aktivity manáz	27
4.10.3	Stanovení aktivity proteáz	27
5	Výsledky	28
5.1	Charakteristika odpadního materiálu	28
5.1.1	Obsah redukujících sacharidů v produkčních médiích	28
5.2	Stanovení aktivity enzymů	29
5.3	Kultivace na nehydrolyzovaném hroznovém odpadu	29
5.4	Kultivace na chemicky hydrolyzovaném hroznovém odpadu	34
5.5	Kultivace na enzymově hydrolyzovaném hroznovém odpadu (PCH)	38
5.6	Kultivace na enzymově hydrolyzovaném hroznovém odpadu (PL)	43
5.7	Stanovení výtěžnostních koeficientů	47
5.8	Morfologické změny kvasinek	49
5.9	Vizuální odhad produkce	53
5.10	Závěrečné shrnutí výsledků kultivací	54
6	Závěr	55
7	Zdroje	56
8	Seznam použitých zkratk	58

1 ÚVOD

Biotechnologický průmysl v dnešním světě zasahuje do mnoha odvětví lidské činnosti. Průmyslová odvětví jako je potravinářství, výroba a syntéza léčiv, medicína, produkce biopaliv, vodohospodářství, nakládání s odpady a další oblasti by se bez bakterií, kvasinek a plísní jen těžko obešly. Nároky na energie se celosvětově neustále zvyšují a roste i produkce odpadů nejrůznějších podob. Pozornost biotechnologických pracovníků a vědecké společnosti se tak začíná ubírat také směrem k využití mikroorganismů, které by mohly tyto odpady rozkládat, a to nejlépe za současné syntézy takových látek, které by byly člověku užitečné.

Jednu takovou možnost otevírá zpracování odpadů z potravinářských výrob. Tyto odpady většinou rostlinného, někdy ale i živočišného původu mohou být vhodnými mikroorganismy zcela nebo částečně zpracovány a využity. U kvasinek rodu *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* a *Cystofilobasidium* využitých pro tuto práci byla sledována produkce karotenoidů a tvorba biomasy na produkčních médiích obsahujících odpadní materiál z vinařství - slupky a třapiny. Karotenoidy jakožto rostlinná i živočišná barviva mají pro člověka význam především jako prekurzory vitamínu A. Nejčastějším zdrojem příjmu karotenoidů pro lidský organismus je ovoce a zelenina. Tyto zdroje jsou však sezónní nebo často závislé na importu z jiných zemí. Produkce kvasinkami by tento faktor eliminovala, produkované karotenoidy by pak mohly být podávány v doplňcích stravy jako zdroj přírodně syntetizovaných provitaminů.

Použité karotenogenní kvasinky produkují karotenoidy jako reakci na světlo. Nejnáročnějším a zároveň nejnákladnějším krokem celého procesu je izolace karotenoidů z buněk mikroorganismů. Proto je cílem dosáhnout co největší produkce karotenoidů, aby výtěžek izolace z buněk byl co nejvyšší.

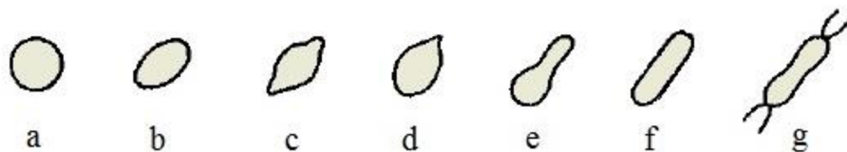
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Obecná charakteristika kvasinek

Kvasinky jsou chemoheterotrofní jednobuněčné eukaryotické organismy patřící mezi nižší houby (Fungi). Většina druhů má schopnost fermentativně využít jednoduché cukry za vzniku etanolu a oxidu uhličitého. Podle této schopnosti, která je hojně využívána v potravinářském průmyslu, vznikl jejich český název kvasinky. Vyskytují se v půdě, atmosféře i ve vodě. Protože zdrojem energie pro kvasinky jsou u většiny druhů monosacharidy, u některých di nebo trisacharidy, kolonizují především materiál obsahující tyto cukry [1].

2.1.1 Morfologie buněk

Velikost buněk kvasinek se pohybuje v rozmezí 3-15 μm . Velikost a tvar buněk se může lišit podle rodu, podmínek kultivace, stáří buněk či působením stresových faktorů. Všechny tvary jsou však odvozeny od kulatého až oválného tvaru viz obrázek 1. Některé rody jsou schopny vytvářet protáhlé buňky pučící pouze na pólech. Vlákna zůstávají spojena a tvoří tzv. pseudomycelium. Některé rody pak vytvářejí i pravá mycelia tj. dlouhá vlákna vznikající příčným dělením protáhlých buněk. Tvorba pseudomycelia a pravého mycelia je typická pro aerobní druhy kvasinek, mezi které patří například rod *Sporobolomyces* [1,2].



Obrázek 1 - Tvary buněk kvasinek
(a - kulatý, b - oválný, c - citronovitý, d - ogivální, e - lahvovitý, f - protáhlý, g - vláknitý) [1]

2.1.2 Rozmnožování

Kvasinky se rozmnožují nepohlavně (vegetativně) nebo pohlavně (sexuálně). Nepohlavně se kvasinky rozmnožují třemi způsoby:

- pučením - mateřská buňka je s pupenem spojena kanálkem, kterým do pupenu přechází nově vzniklé jádro a buněčné organely [3]
- dělením - v buňce se z cytoplazmatické membrány tvoří prstencová vychlípenina, buněčný materiál mateřské buňky se zdvojnásobí, vychlípena prorůstá do středu buňky, až nakonec dojde k rozdělení na buňku mateřskou a dceřinou [2]
- pučením na široké základně - jedná se o přechod mezi pučením a dělením, mateřská buňka je s pupenem spojena širokým krčkem, který je po ukončení pučení uzavřen přepážkou [2].

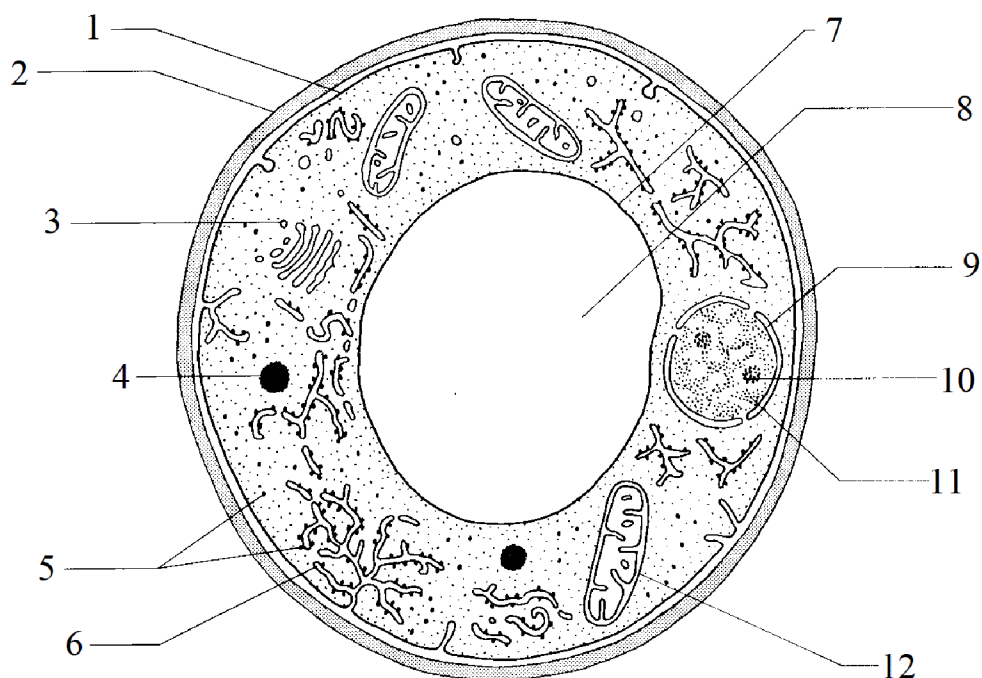
Sexuálně se kvasinky rozmnožují tvorbou pohlavních spor. Nově vzniklá spora není spojena s plodnicí (mateřskou buňkou). Podle typu sexuálního rozmnožování rozdělujeme kvasinky do třech skupin [4,2]:

- Ascomycotina - tvoří endospory, které jsou umístěny ve vřecku (asku)
- Basidiomycotina - tvoří exospory umístěné vně sporotvorných buněk

– Deuteromycetes - u těchto kvasinek tvorba pohlavních spor nebyla pozorována [2]

Při pohlavním rozmnožování dochází ke splynutí dvou pohlavních buněk a vzniká zygota. Tohoto jevu se využívá při umělém křížení kvasinek pro získání druhů s lepšími biotechnologickými vlastnostmi [3].

2.1.3 Stavba buňky



Obrázek 2 - Stavba buňky kvasinky (1 - cytoplazmatická membrána, 2 - buněčná stěna, 3 - Golgiho aparát, 4 - zrníčko glykogenu, 5 - ribozomy, 6 - endoplazmatické retikulum, 7 - membrána vakuoly, 8 - vakuola, 9 - jaderná membrána, 10 - jádro, 11 - chromatin, 12 - mitochondrie) [4]

Buněčná stěna

Kvasinky patří mezi eukaryotní organismy, takže i stavba buněk je podobná ostatním eukaryotickým buňkám. Avšak buněčnou stěnou mají kvasinky blíže k prokaryotickým organismům - bakteriím. Buňky jsou obaleny pevnou buněčnou stěnou, která buňce dává její charakteristický tvar a zároveň ji chrání před nepříznivými vlivy zvenčí [3].

Šířka buněčné stěny se v závislosti na druhu kvasinky pohybuje v rozmezí 100-200 nm a tvoří 15-25 % sušiny buňky. Hlavní složkou tvořící stěnu jsou polysacharidy glukán a mannan spolu s malým množstvím chitinu (pouze u některých druhů). Dalšími komponenty obsaženými ve stěně jsou proteiny, lipidy a fosfáty [5].

Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána tvoří rozhraní mezi vnitřním prostředím buňky a jejím okolím. Plní funkci bariéry, přes kterou do buňky nemohou volně přecházet hydrofilní látky. Volně procházejí jen malé molekuly bez náboje. Tloušťka membrány se pohybuje kolem 7,5-8 nm a může vytvářet vychlípeniny směrem dovnitř cytoplazmy [5,2].

Podobně jako jiné buněčné membrány je tvořena lipidovou dvojvrstvou (převážně tvořenou fosfolipidy), mezi které jsou vnořeny molekuly proteinů. Proteiny zajišťují specifické funkce membrány jako je transport živin, metabolitů nebo iontů přes membránu, plní funkci receptorů umožňující buňce reagovat na podněty z okolí, spojovníky umožňují buňce pohyb a v neposlední řadě jsou zde přítomny také proteiny plnící funkci membránových enzymů [5,6].

Cytoplazma

Eukaryotní buňka vykazuje na rozdíl od prokaryotické buňky kompartmentaci, to znamená, že je buňka rozdělena ještě na vnitřní oddíly, ve kterých jsou obsaženy různé soubory molekul. Tyto kompartmenty se nazývají membránové organely a jsou obklopeny cytosolem. Cytosol kvasinky jako vodný koloidní roztok vykazuje kyselou reakci (pH okolo 5,5) [5,6].

Pod mikroskopem pozorujeme cytoplasmu mladých kvasinek jako průhlednou homogenní hmotu, starší kvasinky vykazují různý stupeň vakuolizace. Vakuola obsahuje hydrolytické enzymy a rozkládají se v ní ty látky, které buňka potřebuje jen krátkou dobu a syntetizuje si je dle potřeby znovu. Dále se vakuole nacházejí zásoby polyfosfátů, draselných iontů, aminokyselin a purinů. Vnější jaderná membrána plynule přechází v endoplazmatické retikulum, jehož funkcí je syntéza a přenos nových součástí membrán. Skládá se z váčků a cisteren seřazených za sebou. Na vnějším povrchu směrem do cytosolu jsou k endoplazmatickému retikulu přilehlé ribozomy. Ribozomy se skládají z rRNA a probíhá na nich syntéza bílkovin. Golgiho aparát přijímá molekuly proteinů a lipidů z endoplazmatického retikula a distribuuje je dál po buňce [2,6].

Kromě membránových organel se v cytosolu nacházejí také zrníčka různých rezervních látek nejčastěji volutinu nebo polysacharidu glykogenu. Z dalších látek jsou volně přítomny enzymy, nukleosidy, meziprodukty metabolismů i některé prekurzory vitamínů či samotné vitamíny. Některé kvasinky (např. rod *Rhodotorula*) obsahují jako rezervní látku také tuky ve formě kapiček [2].

Jádro

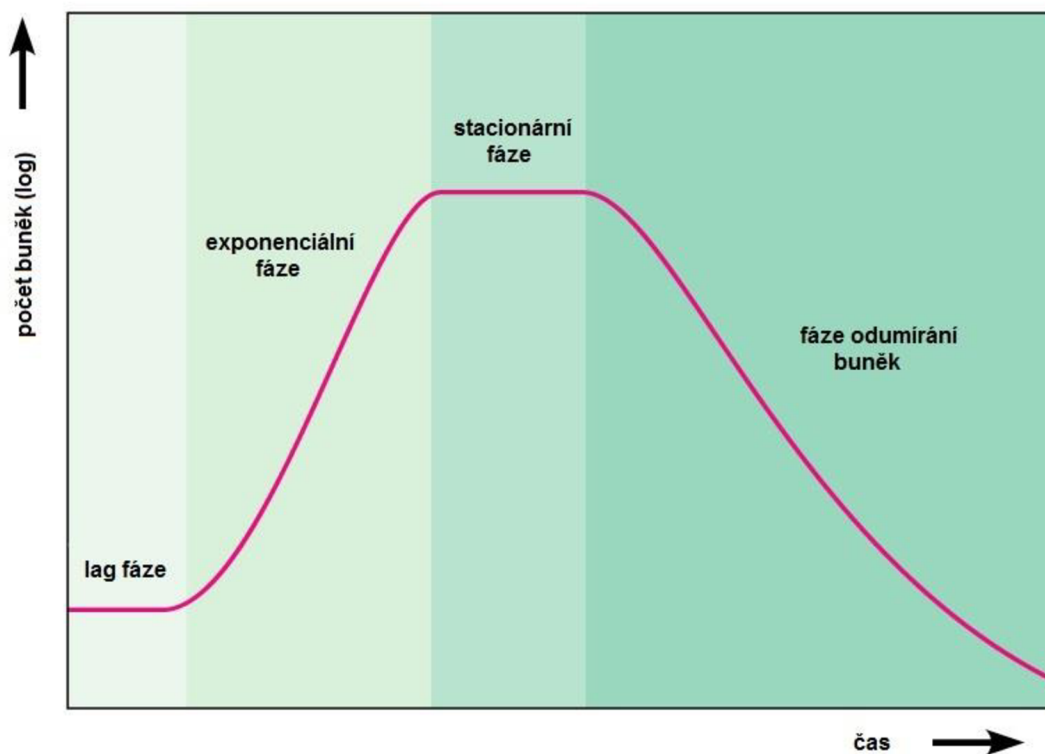
Jádro kvasinek má víceméně kulatý tvar, je v průměru 1,5 μm velké a může být soustředěno ve středu buňky ale i mimo něj. Od cytoplazmy je odděleno dvojitou membránou, ve které jsou póry o velikosti 50-100 nm. Jádro obsahuje DNA, RNA, bazické proteiny (histony a protaminy) a jiné nebazické proteiny. Může obsahovat také kruhovou nízkomolekulární DNA, která je obdobou plazmidů u bakterií. Kondenzované komplexy bazických proteinů a histonů a DNA šroubovice se nazývají chromatiny a jsou organizovány v útvarech zvaných chromozomy. Velikost genomu je u všech rodů kvasinek relativně podobná a obecně se pohybuje kolem 10 - 15 Mb, které kódují pět až deset tisíc genů. Počet chromozomů se však liší a pohybuje se v rozmezí dvou až šestnácti [5,2].

2.2 Využití kvasinek podle syntézy metabolitů

Kvasinky patří mezi průmyslově hojně využívané mikroorganismy. Využívají se pro produkci metabolitů nebo biomasy.

Produkce žádaných metabolitů všech mikroorganismů je vázána na jejich fázi růstu. Růst mikroorganismů je charakterizován růstovou křivkou (obrázek 3), která zobrazuje závislost počtu buněk v mikrobiální kultuře na čase. Produkce primárních metabolitů je nejvyšší

v exponenciální fázi růstu mikrobiální kultury. Z hlediska sekundárních metabolitů je pak významná stacionární fáze. Adaptační fáze nebo také lag fáze je v průmyslové výrobě nežádoucí - mikroorganismus neroste, ani se nerozmnožuje, pouze se přizpůsobuje novým podmínkám. Snahou je tuto fázi co nejvíce zkrátit.



Obrázek 3 - Růstová křivka [7]

2.2.1 Primární metabolity

Mezi primární nebo také obecný metabolismus řadíme metabolismus sacharidů, lipidů, proteinů, nukleových kyselin a metabolismus kofaktorů. Za primární metabolity jsou pak označovány produkty nebo intermediáty těchto biochemických reakcí. V tabulce 1 jsou shrnuty nejčastěji průmyslově využívané kvasinky a jejich primární metabolity [8].

Tabulka 1 - Primární metabolity kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

kmen	žádaný metabolit	využití
lihovarský	ethanol	líh
pivovarský	ethanol, CO ₂	pivo
vinařský	ethanol, CO ₂	víno, sekt
pekařský	CO ₂	kynuté pečivo

2.2.2 Sekundární metabolity

Produkty sekundárního metabolismu jsou velice rozmanité a často charakteristické pro určitý organismus. Biosyntetické dráhy vedoucí k sekundárním metabolitům jsou obecně delší a mohou zahrnovat relativně komplexní enzymatický aparát. Sekundární metabolity na rozdíl od primárních nebývají nezbytně nutné pro přežití buňky, ale poskytují danému organismu

jistou konkurenční výhodou. Často jsou syntetizovány jako reakce na vnější prostředí. Jako prekurzory pro syntézu sekundárních metabolitů slouží produkty primárního metabolismu.

Sekundárním metabolitem červených kvasinek jsou karotenoidní pigmenty. Prekurzorem karotenoidů je acetyl CoA pocházející z primárního metabolismu [8].

2.3 Charakteristika vybraných druhů kvasinek

Všechny níže popsané druhy kvasinek řadíme mezi karotenogenní kvasinky. Jejich metabolismus je aerobní a žádná z těchto kvasinek nefermentuje. Všechny řadíme do třídy *Basidiomycetes*. Z karotenoidů produkují hlavně β -karoten, γ -karoten, astaxantin a torulen [5,7].

2.3.1 *Rhodotorula glutinis*

Kvasinky mají kulatý až vejčitý tvar s velikostí 2-4,5 x 3-8 μm nebo cylindrický tvar s rozměry 4-5,5 x 9-18 μm . Kultury mají syté červeno-růžovou barvu, jejich povrch je hladký, lesklý někdy i trošku zvrásněný. Jen výjimečně vytvářejí pseudohyfy. Typickým znakem je produkce červených a růžových barviv a nepřítomnost balistokonidií.

Byly izolovány ze vzduchu, ovoce i z mořské vody [9].

2.3.2 *Cystofilobasidium capitatum*

Kvasinky mají kulatý až vejčitý tvar o velikosti 2,5-4 x 5-13 μm . Buňky se vyskytují samostatně nebo v párech a pučí převážně na pólech. Kolonie mají oranžovou až mírně narůžovělou barvu, jsou částečně matné a mají hladký povrch. Zbarvení se se zvyšujícím se stářím kolonií zvyrazňuje.

Tento druh se přirozeně vyskytuje převážně na rostlinách a řasách. Ideální růstová teplota je o něco nižší než u jiných kvasinek, pohybuje se okolo 23-24 °C.

Cystofilobasidium capitatum kromě produkce karotenoidů disponuje také pektinolytickou aktivitou, která by se dala biotechnologicky taktéž využít [9].

2.3.3 *Sporobolomyces roseus*

Kvasinky mají elipsoidní tvar o velikosti 9-24 x 3-8,5 μm a vyskytují se samostatně. Pučí obvykle na pólech. Tento druh může vytvářet hyfy i pseudohyfy. Kolonie jsou zbarveny růžově až červeně, mohou být lesklé i matné a jejich povrch je hladký. Okraje mohou být zvrásněné i celistvé. V tekutém médiu vytváří prstenec, film a sediment. Tento druh se vyskytuje na hlavně rostlinách, z jejichž listů byl také izolován.

V roce 2005 byla popsána také jejich schopnost degradovat netěkavé a mírně těkavé aromatické sloučeniny. *Sporobolomyces roseus* izolovaný z listů byl také schopen modifikovat lignin z bukových štěpků. Této schopnosti by se dalo využít k předčišťování lignocelulózových materiálů a biotransformaci technického ligninu [9].

2.3.4 *Sporobolomyces shibatanus*

Buňky mají vejčitý tvar velikosti 2-4 x 7-12 μm a vyskytují se samostatně, v párech nebo krátkých řetízích. Pučení probíhá převážně na pólech. Kolonie jsou hedvábné, mají korálově červenou barvu, jsou polomatné nebo lesklé s hladkým, výjimečně zvrásněným povrchem a celistvým okrajem. Vytváří pravé hyfy i pseudohyfy.

Vyskytuje se převážně na rostlinách, ale i ve vzduchu a mořské vodě [9].

2.4 Kultivace kvasinek

Při kultivaci kvasinek na umělých substrátech je třeba zajistit buňkám zdroj energie, stavební kameny pro syntézu buněčné hmoty a také vhodné fyzikálně-chemické prostředí. Mikroorganismy se sice umí obecně lépe přizpůsobit okolnímu prostředí (např. změnou produkovaných enzymů) než vyšší organismy, tyto jejich možnosti však nejsou neomezené [2].

2.4.1 Fyzikálně-chemické nároky

Aktivita vody

Cytoplazmatickou membránou mohou nedisociované molekuly vody volně procházet, proto je nutné, aby koncentrace solí v okolí buňky nebyla příliš velká, což by mělo za následek difúzi molekul z buňky. Hodnota aktivity vody se pohybuje v rozmezí 0-1, přičemž hodnota 1 přísluší čisté vodě. Minimální hodnota aktivity vody pro růst kvasinek je 0,88-0,91 [2].

Teplota

Teplota má vliv především na rychlost nebo vůbec na možnost rozmnožování, ale také na samotný život kvasinek. Optimální teplotou pro růst a rozmnožování kvasinek je 26-30 °C. Při nižších teplotách se postupně zpomaluje, až zastavuje rozmnožování a růst, při vyšších teplotách překračujících maximální teplotu pro kultivaci dochází k denaturaci enzymů a smrti buněk [2].

Hodnota pH

Hodnota pH neboli koncentrace vodíkových iontů v roztoku je pro kvasinky ideální v kyselé oblasti v rozmezí 4,2 až 5,5. Při zvyšování pH se zpomaluje jejich růst, který se při překročení hodnoty 7,5 zastavuje [2].

Koncentrace kyslíku

Při kultivaci karotenogenních kvasinek je nutný přístup kyslíku, neboť tyto kvasinky patří mezi aerobní mikroorganismy.

Světelné záření

Záření v oblasti viditelného spektra nemá významný vliv na samotný růst a rozmnožování kvasinek jakožto chemoorganotrofních organismů. Působení světla je však důležitým faktorem při kultivaci červených kvasinek, které produkují karotenoidní pigmenty právě jako reakci na okolní světelné záření.

2.4.2 Nutriční nároky

Kvasinky patří mezi chemoorganotrofní organismy, to znamená, že uhlík a energii získávají z organických sloučenin. Výživa kvasinek je úzce spojena s tím, jak jsou buňky schopny transportovat vodu a živiny z prostředí přes buněčnou stěnu a cytoplazmatickou membránu do cytoplazmy. Cytoplazmatická membrána je klíčová při selekci přijímaných živin a představuje základní komunikační a interakční prostředek buňky s jejím okolím.

Základem každého živného média je přítomnost dostatečného množství vody. Voda je nezbytná pro všechny biochemické děje uvnitř buňky.

Dále je buňkám třeba zajistit přísun makrobiogenních prvků (uhlík, vodík, kyslík, dusík, fosfor, síra) v koncentraci zhruba 10^{-3} M. Mikrobiogenní prvky (hořčík, draslík) se přidávají v nižších koncentracích a stopové prvky v koncentracích okolo 10^{-6} M [3,5].

Jako zdroj uhlíku slouží nejčastěji sacharidické zdroje, možná je však využití i nesacharidických zdrojů, kterými mohou být nižší alifatické alkoholy (methanol, ethanol), glycerol, organické kyseliny, mastné kyseliny nebo alkany. Některé kvasinky dokáží využít jako zdroj energie i aromatické uhlovodíky (fenol, kresol, resorcinol aj.), čehož se využívá při výzkumu odstraňování polutantů z životního prostředí.

Zdrojem dusíku jsou především jednoduché anorganické sloučeniny nebo pak v menší míře aminokyseliny. Nejčastěji užívanou solí je síran amonný, který je zároveň i zdrojem síry. Některé druhy umí využít dusík z dusičnanů a dokonce i dusitanů.

Podobně jako dusík jsou i další potřebné prvky přidávány do živného média ve formě anorganických solí. Stopové prvky a ostatní látky, které buňky potřebují jen v malém množství (vitamíny, báze nukleových kyselin apod.) se do živného média přidávají ve formě kvasničných autolyzátů obsahujících širokou škálu růstových faktorů [5].

Složení živného média můžeme měnit v závislosti na tom, jaké růstové podmínky chceme kvasinkám připravit a jaké produkty od nich očekáváme.

2.5 Odpadní substráty

Odpadní substráty jako zdroj energie pro mikroorganismy jsou často testovány zejména kvůli své nízké ceně. Druhým důvodem je velké množství odpadů vznikajících při zpracování surovin zejména v potravinovém průmyslu a s tím související problém s jejich likvidací. Ačkoli tyto odpady již nejsou vhodné k dalšímu zpracování na potraviny, stále obsahují zdroj uhlíku, dusíku a dalších látek využitelných při kultivaci mikroorganismů.

2.5.1 Kultivace karotenogenních kvasinek na odpadních substrátech

Kultivace kmenů červených kvasinek za účelem produkce biomasy obohacené o karotenoidy je vědci prováděna na různých typech odpadních substrátů. Zastoupení jednotlivých karotenoidů a jejich množství produkované kvasinkami se liší v závislosti na složení kultivačního média, teplotě, pH či intenzitě osvětlení. Snahou je nalézt takový substrát, aby se co nevíce snížily náklady na produkci a zároveň byly zachovány vysoké výnosy vedoucí k vysoké produkci karotenoidů. Níže je uvedený přehled zkoumaných odpadních substrátů potenciálně vhodných ke kultivaci karotenogenních kvasinek [10].

Kukuřičný výluh, surový glycerol, rýžový vývar

Kukuřičný výluh je vedlejším produktem první fáze při mokřém mletí kukuřice. Jeho složení je charakterizováno v tabulce 2. Kukuřičný výluh má velice nízký obsah tuků a vlákniny. Popel obsahuje především hořčík, fosfor, draslík, vápník, chlor, sodík a síru. Kukuřičný výluh je také dobrým zdrojem aminokyselin, vitamínů i stopových prvků. Chemické složení tedy odpovídá nutričním požadavkům kvasinek [11].

Surový glycerol je vedlejším produktem například při výrobě esterů mastných kyselin z rostlinných olejů. V médiu slouží jako hlavní zdroj organického uhlíku. Je ale také nezanedbatelným zdrojem vápníku, sodíku a draslíku. Obsah jednotlivých složek surového glycerolu závisí na jeho kvalitě. Průměrně je ale složení následující 80 % glycerolu, 9 % popela, 4-15 % vody, max. 0,5 % metanolu a max. 1,5 % netěkavých organických látek [10, 12].

Tabulka 2 - Chemické složení jednotlivých složek média ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) [10]

složka	surový glycerol	kukuřičný výluh	rýžový vývar
organický uhlík	434,67	33,99	743,17
dusík	261,41	3 643,91	124,85
sodík	210,15	2 849,10	372,81
hořčík	33,38	639,83	211,83
vápník	255,74	296,58	452,38
zinek	6,76	18,97	12,59
železo	2,43	10,11	8,28
měď	0,86	1,38	1,13

Kvasinka druhu *Sporidiobolus pararoseus* byla kultivována v médiu složeného z těchto tří odpadních materiálů a to bez přídavku solí, pouze s úpravou pH na hodnotu 5,5. Tyto tři složky byly míchány v různém poměru a v řadě takto smíchaných médií pak byla sledována produkce karotenoidů. Z výsledků vyplývá, že s rostoucím podílem glycerolu (ve zkoumaném rozsahu) ve směsi roste také produkce karotenoidů. Naopak příliš velký podíl kukuřičného výluhu a rýžového vývaru měl na produkci negativní vliv. Důvodem je relativně komplexní nutriční složení všech tří substrátů, které by samostatně mohly mít pozitivní vliv na produkci, ve větší koncentraci ale působí inhibičně na růst mikroorganismů nebo na produkci enzymů účastnících se syntézy karotenoidů. Nejvyšších výtěžků karotenoidů $843 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (z toho β -karoten $396 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) bylo nakonec dosaženo v médiu obsahujícím kukuřičný výluh v koncentraci $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, glycerol $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a vývar z rýže $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, přičemž kultivace probíhala při $25 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 96 h [10].

Odpadní voda z pivovarnictví

Voda z pivovarnictví za účelem kultivace kvasinek byla odebrána během fáze zvané scezování, při které je nutno oddělit sladinku od mláta. Mláto se pro zajištění co největší extrakce cukrů ještě promývá vodou a dochází při tom k produkci určitého množství nadbytečné vody sice obohacené o složky extrahované z mláta, ale již ne v takovém množství, aby byla při výrobě piva dále použita. Scezování následuje po fázi zvané rmutování (štěpení polysacharidů), jsou zde již tedy obsaženy i jednoduché cukry [13].

Tabulka 3 - Složení odpadní vody z pivovarnictví [13]

sacharóza ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	maltóza ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	glukóza ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	fruktóza ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	celkový dusík ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	NH_4^+ ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)
3,36	22,62	5,50	0,56	244	21

Na médiu tvořeném odpadní vodou po výrobě piva byly kultivovány kvasinky druhu *Rhodotorula glutinis*. V médiu bylo upraveno pH z původní hodnoty 7 na 5,5. Po zaočkování byly z média průběžně odebírány vzorky na stanovení jednotlivých sacharidů. Výsledkem jejich stanovení bylo, že kvasinky jako zdroj využily pouze glukózu a fruktózu. Úbytek maltózy nebyl zaznamenán vůbec a úbytek sacharózy jen ve velmi malém množství. Glukózu a fruktózu kvasinky spotřebovaly během 24 h kultivace, dále tedy kultivace probíhala při

uhlíkem limitovaných podmínkách. Kvůli této limitaci se dále růst a rozmnožování kvasinek zpomalovalo, až po 168 h kultivace množství biomasy zůstalo konstantní na hodnotě $5,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. V následujícím experimentu byly kvasinky kultivovány 264 h, aby se zjistilo, zda k přechodu na využívání maltózy jako zdroje uhlíku nepotřebují delší dobu. Ale ani po této době nebyl úbytek maltózy nijak výrazný a k nárůstu obsahu sledovaných metabolitů také nedošlo. Celkový nejvyšší dosažený obsah celkových karotenoidů se tedy zastavil na $600 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ z čehož $310 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ připadlo na β -karoten [13].

Káвовá sedlina

Spotřeba kávy je celosvětově velmi vysoká a způsobuje produkci velkého množství kávové sedliny (logru), která zatím není ve větším množství využívána. Množství odpadní kávové sedliny se ročně odhaduje až na 6 miliónů tun. Hlavními producenty jsou podniky vyrábějící instantní kávu.

Tabulka 4 - Složení vysušené kávové sedliny (hm %) [14]

celulóza	hemicelulóza	bílkoviny	oleje	lignin	polyfenoly	kofein
8,6-13,3	30-40	6,7-13,6	10-20	25-33	2,5	0,02

Tabulka 5 - Složení kávové sedliny po extrakci olejů a enzymové hydrolyze ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) [14]

popel ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	PO_4^{3-} ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	dusík (hm%)	proteiny (hm%)	polyfenoly ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	sacharidy ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	glukóza ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	manóza ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
27,6	0,32	0,162	1,02	0,69	67,3	8,7	28,1

Z kávové sedliny byly extrahovány oleje a poté byla kávová sedlina nejprve chemicky a poté enzymaticky hydrolyzována komerčními celulázami. Na médiu s takto hydrolyzovanou kávovou sedlinou byly kultivovány čtyři druhy kvasinek: *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces roseus* a *Cystofilobasidium capitatum*. Nejlépe dokázala toto médium využít kvasinka *S. roseus*, a to jak na růst biomasy, tak i na produkci karotenoidů. Celková produkce karotenoidů tedy u tohoto druhu dosáhla $4,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a z toho podíl β -karotenu představoval $1,38 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [15].

Syrovátka

Syrovátka vzniká při výrobě mléčných výrobků vysrážením mléčné bílkoviny, ta se oddělí a zůstává žlutozelená čirá kapalina - syrovátka. Sladká syrovátka vzniká při výrobě sýrů, kyselá při výrobě tvarohu.

Tabulka 6 - Složení syrovátky (g/l) [16]

složka	sladká	kyselá
sušina	63-70	63-70
laktóza	46-52	44-46
bílkoviny	6-10	6-8
vápník	0,4-0,6	1,2-1,6
fosforečnany	1,0-3,0	2,0-4,5

laktát	2,0	6,4
chloridy	1,1	1,1
pH	6,1	4,6

Kvasinky byly kultivovány na sladké syrovátce, kvůli vyššímu obsahu laktózy. U této syrovátky byla ještě upravena hodnota pH na hodnotu 4,6 a byly tepelně vysráženy bílkoviny. Kultivace probíhaly jak na neupravené, tak na upravené syrovátce a produkce karotenoidů byla sledována u čtyř kmenů kvasinek. Nejlepší výtěžnost β -karotenu byla zjištěna u *S. roseus*, a to $6,52 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ u upravené a $11,81 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ u neupravené syrovátky. Výtěžky *R. glutinis* byly o poznání nižší, a to $2,59 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ u upravené a $0,48 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ u neupravené syrovátky. *C. capitatum* mělo výnosy nejnižší a to $0,211 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ u upravené a $0,844 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ u neupravené syrovátky [16].

Tabulka 7 - Přehled výtěžků β -karotenu na výše zmíněných odpadních substrátech [16]

kvasinka	odpadní substrát	β-karoten
SP	GKR	$396 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
RG	voda z pivovaru	$310 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
SR	kávová sedlina	$1,38 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
SR	syrovátka	$11,82 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
SR	upravená syrovátka	$6,52 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$

SP... *Sporidiobolus pararoseus*; RG...*Rhodotorula glutinis*; SR...*Sporobolomyces roseus*;
GKR...surový glycerol, kukuřičný výluh, rýžový vývar

2.5.2 Odpady z vinařství

Při zpracování hroznů révy vinné při výrobě vína je nutné oddělit ty části plodu, které by měly na kvalitu vína nežádoucí vliv. Mezi tyto části patří zejména třapiny (hovorově stopky) a slupky spolu se semínky. Třapiny se od bobulí oddělují jako první, a to dnes už nejčastěji na plně automatických odstopkovačích. Bobule pak putují dále na lis, kde se z hroznů získá mošt a jako odpad zůstávají slupky spolu se semínky.

Slupky

Slupky představují zhruba 10 % z celkové hmotnosti hroznu. Jejich složení je závislé zejména na dané odrůdě révy vinné. Obsahují hlavně sacharidy, kyseliny, třísloviny, barviva a aromatické látky, v menší míře pak vosky, dusíkaté a minerální látky. Slupky bílých odrůd (mezi které patří i odrůda Chardonnay) obsahují zejména flavonová barviva a chlorofyl.

Třapiny

Třapina tvoří 3-5 % hmotnosti hroznu. Stejně jako u slupek závisí její složení na pěstované odrůdě, dále pak také na oblasti pěstování a stáří hroznu. Třapiny podle stáří obsahují 35-90 % vody. Dalšími látkami obsaženými v třapinách jsou sacharidy (zejména celulóza), kyselina vinná a jablečná, třísloviny a barviva [17, 18].

2.6 Karotenoidy

2.6.1 Výskyt

Karotenoidy jsou všeobecně považovány za rostlinné pigmenty způsobující typické žluté, oranžové až červené zbarvení různých částí rostlin. Nacházejí se však také

v mikroorganismech a v tělech živočichů (raků, humrů, lososů) a jejich úloha v tělech rostlin, živočichů i mikroorganismů se neomezuje pouze na jejich zbarvení, ale je daleko širší. Hrají podstatnou roli v procesu fotosyntézy, v těle živočichů fungují jako prekurzory vitamínu A či antioxidanty. Z nedávných výzkumů je zajímavým poznatkem také jejich schopnost podílet se na prevenci závažných onemocnění, jako je rakovina či kardiovaskulární choroby [19, 20].

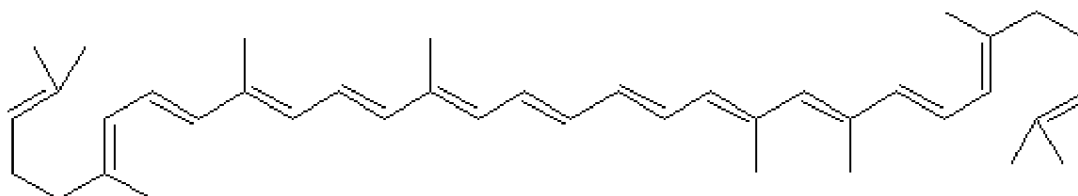
Živočichové nejsou schopni sami syntetizovat tyto molekuly, proto je nezbytné přijímat karotenoidy ve stravě. Přestože lze karotenoidy syntetizovat uměle, trendem zejména západní společnosti je přijímat v potravinách nebo potravinových doplňcích látky syntetizované přírodní cestou - biosyntézou [21, 10].

2.6.2 Struktura

Funkce karotenoidů v organismu, jejich reaktivita a další vlastnosti jsou úzce spojeny s jejich strukturou. Chemicky je řadíme mezi látky zvané izoprenoidy - oligomeru izoprenu. Izopreny se dále dělí na další podskupiny, a právě karotenoidy patří do podskupiny terpenů, přesněji tetraterpenů obsahujících osm izoprenových jednotek. Celkem je tedy skelet většiny karotenoidů tvořen 40 uhlíkovými atomy [20,3].

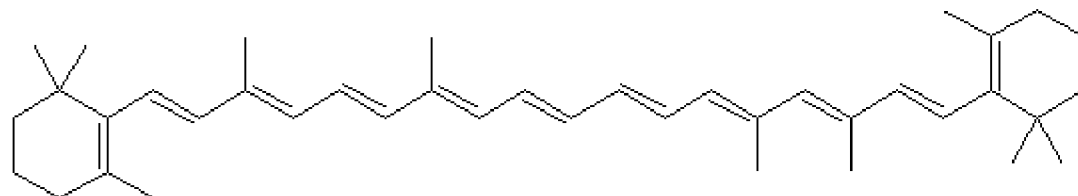
Typickým strukturálním rysem karotenoidů je konjugovaný systém dvojných vazeb, který je zodpovědný za jejich fotochemické vlastnosti. Řetězec může být alifatický nebo zakončený na jedné nebo obou stranách molekuly zacyklením. Podle přítomnosti a nepřítomnosti substituentů je dělíme do dvou skupin. První skupinou jsou karoteny skládající se pouze z uhlíkatého řetězce nazývané také uhlovodíky-karoteny a druhou skupinu odvozenou od karotenů představují xanthofyly, které ve svém řetězci nesou kyslíkaté funkční skupiny [20, 22].

Základní strukturu karotenoidů demonstruje lykopen (Obrázek 2) [19]



Obrázek 4 - Struktura lykopenu [19]

Zacyklením obou konců lykopenu v jononový systém získáme strukturu β,β -karotenu.



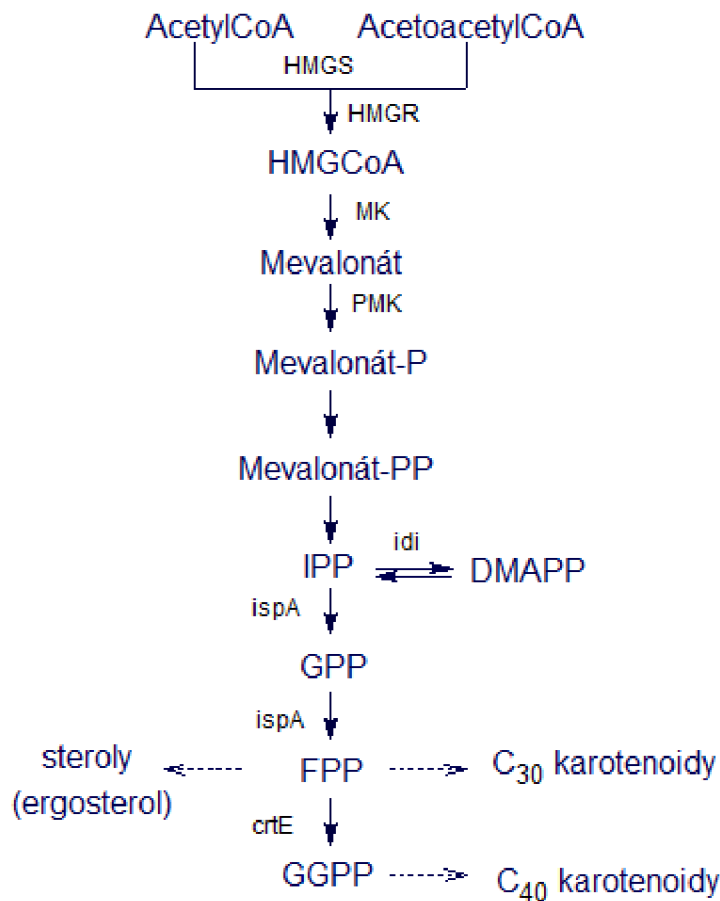
Obrázek 5 - Struktura β,β -karotenu [19]

2.6.3 Biosyntéza karotenoidů kvasinkami

Všechny karotenoidy jsou vytvářeny z produktů metabolické dráhy izoprenoidů. Existují dvě dráhy vedoucí k první izoprenové jednotce - izopentenyl pyrofosfátu (IPP). Těmito drahami

jsou non-mevalonátová a mevalonátová. Non-mevalonátová dráha je typická pro bakterie, zatímco mevalonátová pro archaea, houby, rostliny i živočichy.

IPP je syntetizován z prekursoru acetylCoA, který kondenzuje s acetoacetylCoA za přítomnosti enzymu HMG-CoA syntázy (HMGS). Vzniká 3-hydroxy-3-methyl glutarylCoA, který je následně za přítomnosti enzymu HMG-CoA reduktázy (HMGR) přeměněn na mevalonát (MVA). Mevalonát je sérií reakcí zahrnujících fosforylaci a následně dekarboxylaci přeměněn na izopentyldifosfát (IPP). Dalším krokem k terpenoidům je elongace řetězce zahrnující postupné „head-to-tail“ kondenzace dimethylallyldifosfátu (DMAPP) a izopentyldifosfátu. Dimethylallyldifosfát vzniká izomerací izopentyldifosfátu za účasti izomerázy (idi). Postupně je kondenzacemi DMAPP a IPP syntetizován geranyldifosfát (GPP, C10), farnesyldifosfát (FPP, C15) a geranylgeranyldifosfát (GGPP, C20). Toto jsou prekuzory mono, di a triterpenů. FPP (C15) a GGPP (C20) jsou přímé prekuzory C30 a C40 karotenů [23, 24].



Obrázek 6 - Dráha biosyntézy geranylgeranyldifosfátu (GGPP) [24]

3 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je řešení následujících dílčích úloh:

1. Rešerše zaměřená na charakterizaci karotenogenních kvasinek a možnosti jejich kultivace na odpadech.
2. Zavedení a optimalizace metod - kultivace mikroorganismů, růstové a metabolické charakteristiky.
3. Experimentální studie - kultivace vybraných druhů kvasinek na odpadních substrátech, srovnání růstu a produkce pigmentů.
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a chemikálie

Aceton p.a., Lach-Ner s.r.o (ČR)
D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Diethylether p.a., Lach-Ner s.r.o (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner s.r.o (ČR)
Dusičnan sodný p.a. Lach-Ner s.r.o (ČR)
Ethanol (98%), Lach-Ner s.r.o (ČR)
Ethanol pro UV-VIS, Lach-Ner s.r.o (ČR)
Hydrogenarseničnan sodný heptahydrát p.a., Lach-Ner s.r.o (ČR)
Hydrogenuhlíčan sodný p.a., Lach-Ner s.r.o (ČR)
Hydroxid draselný p.a., Lach-Ner s.r.o (ČR)
Chlorid draselný, Lach-Ner s.r.o (ČR)
Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lach-Ner s.r.o (ČR)
Kyselina chlorovodíková, Lach-Ner s.r.o (ČR)
Kyselina sírová koncentrovaná, Lach-Ner s.r.o (ČR)
Metanol pro HPLC Gradient Grade, Sigma - Aldrich (SRN)
Molybdenan amonný p.a., Lach-Ner s.r.o (ČR)
Síran amonný p.a., Lach-Ner s.r.o (ČR)
Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner s.r.o (ČR)
Síran měďnatý pentahydrát p. a., Lach-Ner s.r.o (ČR)
Síran sodný bezvodý p.a., Lach-Ner s.r.o (ČR)
Síran železitý p.a. Lach-Ner s.r.o (ČR)
Uhlíčan sodný bezvodý p.a. , Lach-Ner s.r.o (ČR)
Vinan sodno-draselný p.a., Lach-Ner s.r.o (ČR)
Yeast extract, Himedia (India)

4.2 Přístroje a pomůcky

Třepačka IKA Yellow line, (SRN)
Očkovací box BioAir, Aura mini
Spektrofotometr Helios δ , Unicam (UK)
Mikroskop L II ooA, Intraco, Micro (SRN)
GKB Color Digital CCD kamera (Taiwan)
Centrifuga SIGMA Laborzentrifugen (SRN)
Centrifuga SIGMA, Sartorius (SRN)
Analytické váhy Boeco (SRN)
Vodní lázeň EL-20, Merci a.s. (ČR)
Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)
Sestava pro HPLC Thermo Fischer Scientific (USA)
Termostat LCO 101, Column Oven, ECOM (ČR)
Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR
Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR
Chromatografická kolona Kinetex 5u, C18, 100A, 4,6 x 150 mm

4.3 Použité mikroorganismy

Rhodotorula glutinis CCY 20-2-33

Cystofilobasidium capitatum CCY 10-1-2

Sporobolomyces roseus CCY 19-6-4

Sporobolomyces shibatanus CCY 19-20-3

Phanerochaete chrysosporium CCM 8074

Penicillium lilacinum CCM F-552

4.4 Odpadní substráty

Třapiny a slupky révy vinné odrůda Chardonnay (Zlomek & Vávra z Boršic u Blatnice)

Kukuřičné otruby, NATURAL (ČR)

4.5 Kultivace kvasinek

Kvasinky byly kultivovány v tekutých médiích v Erlenmeyerových baňkách při teplotě okolo 26 °C za neustálého třepání, osvětlení a přístupu kyslíku. Kultivační média byla sterilována v tlakovém hrnci po dobu 45 minut. Zaočkování všech médií probíhalo asepticky v očkovacím boxu.

4.5.1 Inokulum I

Inokulační médium I bylo připraveno pro každý kmen kvasinek v objemu 50 ml o složení uvedeném v tabulce 8. Všechna inokula byla vysterilována a poté zaočkována třemi plnými kličkami požadované kultury kvasinek. Kultury k zaočkování inokula I byly kultivovány na Petriho miskách a skladovány v chladničce. Kultivace inokula I probíhala za výše uvedených podmínek 24 hodin.

Tabulka 8 - Složení inokula I

složka	množství
glukóza	40 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
KH ₂ PO ₄	5 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,696 g
kvasničný autolyzát	7 g
vodovodní voda	1000 ml

4.5.2 Inokulum II

Pro každou kulturu kultivovanou v inokulu I byly připraveny kultivační média inokula II o objemu 125 ml se stejným složením jako inokulum I. Inokulum II bylo zaočkováno v poměru 1:5, tedy k zaočkování inokula II bylo odměřeno 25 ml inokula I. Kultivace probíhala za stejných podmínek jako kultivace inokula I po dobu 24 h.

4.5.3 Produkční média

Pro každé inokulum II bylo připraveno jedno produkční médium kontrolní, jedno odpadní s třapinami a jedno odpadní se slupkami. Pro každou kulturu tedy byly připraveny celkem tři

produkční média, každé o objemu 125 ml. Zaočkováno bylo v poměru inokulum II: produkční médium = 1 : 5. Kultivace probíhala za stejných podmínek jako předchozí kultivace, ale po dobu 80 hodin. Po ukončení kultivace byla produkční média zfiltrována přes gázu, aby se odstranily zbytky odpadního substrátu a připravena k dalšímu zpracování.

Tabulka 9 - Složení produkčních médií

složka	médium kontrolní	médium odpadní	
		třapiny	slupky
glukóza	30 g	-	-
třapiny	-	30 g	-
slupky	-	-	30 g
(NH ₄) ₂ SO ₄		4 g	
KH ₂ PO ₄		4 g	
MgSO ₄ ·7 H ₂ O		0,696 g	
vodovodní voda		1000 ml	

4.5.4 Chemická hydrolýza odpadů

K odváženému množství odpadního substrátu bylo přidáno 50 ml 50% roztoku metanolu a 30 ml 1,2 M kyseliny chlorovodíkové. Hydrolýza odpadů probíhala v Erlenmeyerových baňkách na vodní lázni při 100 °C po dobu dvou hodin. Po hydrolýze byl změřen objem médií a doplněn vodou na 125 ml, pH médií bylo upraveno pevným hydrogenuhličitanem sodným na hodnotu 5. Do médií bylo doplněno požadované množství solí a nakonec byla média sterilována.

4.5.5 Hydrolýza extracelulárními enzymy plísní

K produkčnímu médiu obsahující odpadní substrát i soli bylo přidáno 4,5 ml enzymového preparátu (příprava preparátu viz kapitola 4.5.1). Enzymová hydrolýza probíhala po dobu 24 h za stálého třepání při teplotě 25 °C. Poté bylo médium sterilováno a enzymy tak inaktivovány.

4.6 Kultivace plísní

Plísně byly kultivovány v tekutém médiu v Erlenmeyerových baňkách. Vysterilovaná média byla zaočkována třemi plnými kličkami požadované kultury plísně. Plísně pro zaočkování byly uchovávány na Petriho miskách v chladničce. Kultivace probíhala po dobu 96 hodin za neustálého třepání a přístupu vzduchu při teplotě 39°C pro *Phanerochaete chrysosporium* a 37°C pro *Penicillium lilacinum*.

Tabulka 10 - Složení kultivačního média pro plíseň *Phanerochaete chrysosporium*

složka	množství
glukóza	10 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0,5 g
CaCl ₂	0,1 g
kukuřičné slupky	20 g
destilovaná voda	1 000 ml

Tabulka 11 - Složení kultivačního média pro plíseň *Penicillium lilacinum*

složka	množství
glukóza	5 g
NaNO ₃	2 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
KCl	0,5 g
kukuřičné slupky	25 g
destilovaná voda	1 000 ml

4.6.1 Izolace a lyofilizace enzymů

Po ukončení kultivace byla z povrchu kultivačního média odstraněna kolonie plísně. Médium bylo zfiltrováno přes gázu a následně stočeno při 5 000 otáčkách po dobu 10 minut. Enzymy obsažené v supernatantu byly lyofilizovány a poté rozpuštěny v citrátovém pufru. V preparátech byly následně stanoveny enzymové aktivity.

4.7 Izolace a stanovení biomasy kvasinek

4.7.1 Stanovení zákalu turbidimetry

Po zfiltrování produkčního média byl odebrán vzorek o objemu 0,2 ml a ve zkumavce byl doplněn 3,8 ml destilované vody. U takto dvacetinásobně naředěného vzorku byla změřena absorbance při vlnové délce 630 nm. Pokud naměřená absorbance přesahovala hodnotu 1, byl vzorek dále naředěn, dokud nebylo dosaženo absorbance nižší než 1. Při měření absorbance kontrolních médií byla jako blank použita destilovaná voda, u produkčních odpadních médií byla absorbance měřena proti tomuto médiu.

4.7.2 Izolace biomasy

Zfiltrovaná produkční i kontrolní média byla zcentrifugována při 5 000 otáčkách po dobu 10 minut. Supernatant byl slit, buňky byly promyty destilovanou vodou a opět zcentrifugovány. Opět byl slit supernatant, buňky byly suspendovány ve fyziologickém roztoku (0,9% roztok NaCl) a uchovány v mrazničce.

4.8 Izolace a analýza karotenoidů

Karotenoidy, ergosterol i koenzym Q řadíme mezi lipofilní látky, izolace je tedy možná za použití nepolárních rozpouštědel. Celý proces izolace probíhal za co nejmenšího přístupu světla.

4.8.1 Izolace karotenoidů

Vzorky biomasy kvasinek z kultivací byly rozmrazeny ve studené vodě a následně stočeny při 5 000 otáčkách po dobu 10 minut. Supernatant byl slit, sediment buněk byl suspendován v 50 ml acetonu a následně rozetřen misce. K suspenzi buněk s acetonem byl přidán 10%

alkoholický roztok KOH. Suspenze byla umístěna na vodní lázeň s teplotou 90 °C po dobu 30 minut pro zmýdelnění tuků.

Po vychladnutí zmýdelněného vzorku byly pomocí diethyletheru extrahovány lipidové frakce. Extrakce probíhala ve třech stupních a spojené etherové frakce byly odpařeny do sucha na vakuové odparce při teplotě do 40 °C. Po vychladnutí byl vysušený extrakt rozpuštěn v 1 ml ethanolu pro UV/VIS a přes filtr převeden do plastové mikrozkušavky.

4.8.2 Analýza karotenoidů pomocí RP-HPLC/PDA

Vzorky v plastových mikrozkušavkách byly před samotnou aplikací na HPLC ještě stočeny při 5 000 otáčkách po dobu 5 minut. Samotná analýza karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q probíhala na chromatografické koloně naplněné reverzní fází C18 s izokratickou elucí při teplotě 45 °C. Mobilní fází byl methanol pro HPLC s průtokem 1 000 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Vzorek byl na kolonu aplikován dávkovací smyčkou s objemem 20 μl .

Kvantifikace karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q byla provedena na základě chromatografické analýzy standardních látek při daných vlnových délkách (β -karoten 450 nm, ergosterol a koenzym Q 285 nm). Ke kvantitativnímu vyhodnocení množství sledovaných karotenoidů a lipidických látek byly použity závislosti plochy píků daných standardů na koncentraci. K odhadu produkce celkových pigmentů (β -karoten, lykopen, torulen, torularhodin) byla použita kalibrační závislost pro β -karoten.

4.9 Stanovení obsahu redukuujících sacharidů v médiích metodou Somogyi-Nelsona

Po sterilaci před zaočkováním každého produkčního média byl z tohoto média asepticky odebrán vzorek o objemu 1 ml na stanovení sacharidů. Po proběhnuté kultivaci a stočení médií byl ze supernatantu opět odebrán vzorek o objemu 1 ml na stanovení sacharidů. Takto byla sledována utilizace dostupných sacharidů kvasinkami z vybraných odpadních materiálů, jakožto vhodnost daného substrátu pro případnou biotechnologickou produkci karotenoidů a lipidických látek.

Princip metody stanovení sacharidů podle Somogyi-Nelsona spočívá ve schopnosti redukuujících sacharidů v alkalickém prostředí při zvýšené teplotě (100°C) redukovat měďnatou sůl. Vzniklá měďná sůl reaguje s Nelsonovým činidlem za vzniku barevného komplexu, jehož koncentrace se stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 720 nm proti slepému vzorku.

Somogyiho roztok I

Roztok byl připraven rozpuštěním 24 g bezvodého uhličitanu sodného, 16 g hydrogenuhličitanu sodného, 144 g bezvodého síranu sodného a 12 g vinanu sodno-draselného v 800 ml destilované vody.

Somogyiho roztok II

Roztok byl připraven rozpuštěním 4 g pentahydrátu síranu měďnatého a 24 g bezvodého síranu sodného ve 200 ml destilované vody.

Nelsonovo činidlo

Roztok byl připraven rozpuštěním 25 g molybdenanu amonného ve 450 ml destilované vody, přidáno bylo 21 ml koncentrované kyseliny sírové a 3 g heptahydrátu hydrogenarseničnanu

sodného rozpuštěného ve 25 ml destilované vody. Před použitím byl roztok na 48 h umístěn do termostatu při teplotě 37 °C.

Postup stanovení

Bylo smícháno 0,5 ml vhodně naředěného vzorku, 0,25 ml Somogyiho roztoku I a 0,25 ml Somogyiho roztoku II. Zkumavky s takto připravenými vzorky byly umístěny na 10 minut do vroucí vodní lázně. Po vyjmutí vzorků z vodní lázně a jejich zchladnutí bylo přidáno 0,25 ml Nelsonova roztoku a zkumavka byla doplněna destilovanou vodou na objem 5 ml. Obsah zkumavek byl promíchán a byla změřena absorbance proti slepému vzorku při vlnové délce 720 nm.

4.10 Stanovení enzymových aktivit

Ve vzorcích enzymových preparátů byly stanoveny enzymové aktivity amyláz, celuláz, xylanáz, manáz a proteáz. Aktivity enzymů byly stanoveny spektrofotometricky na přístroji ELISA reader.

4.10.1 Stanovení aktivity celuláz, amyláz a xylanáz

Spektrofotometrickým měřením nárůstu absorbance, který je úměrný nárůstu koncentrace redukujících sacharidů podle Somogyi-Nelsona byla stanovena enzymová aktivita celuláz, amyláz a xylanáz. Pro stanovení celuláz byl jako substrát použit 1% roztok karboxymethylcelulózy, pro amylázy 1% roztok škrobu a pro xylanázy 1% roztok xylanu. Vzorky enzymových preparátů byly inkubovány po dobu při teplotě 40 °C po dobu 60 minut. K 1 ml preparátu bylo přidáno po 0,5 ml Somogyiho roztoku I a II a poté byly takto připravené vzorky ponořeny na 10 minut do vroucí vodní lázně. Po ochlazení zkumavek bylo přidáno 0,5 ml Nelsonova roztoku a zkumavka byla doplněna na objem 10 ml. Následně byla změřena absorbance při 720 nm proti blanku. Jednotka aktivity byla stanovena jako množství enzymu, které katalyzuje rozklad substrátu charakterizovaný nárůstem absorbance za čas.

4.10.2 Stanovení aktivity manáz

Jako substrát byl použit roztok derivátu galaktomananu. Na každých 30 jednotek polymeru galaktomananu připadá jedna molekula barviva Remazolbrilliant Blue R. Roztok byl připraven rozpuštěním 2 g v horké destilované vodě, po ochlazení bylo přidáno 10 ml acetátového pufru (2 mol/dm^3) a objem byl doplněn destilovanou vodou na 100 ml. Enzymová hydrolýza probíhala při 40 °C po dobu 10 minut. Množství uvolněného barviva bylo detekováno spektrofotometricky při vlnové délce 560 nm. Jednotka aktivity byla definována pomocí kalibrační křivky, pro jejíž sestavení byl použit enzym β -1,4 manáza se známou aktivitou.

4.10.3 Stanovení aktivity proteáz

Jako substrát byl použit azokasein o koncentraci 5 mg/ml. Enzymovou hydrolýzou kaseinu jsou uvolňovány barevné peptidy, jejichž nárůst koncentrace je detekován spektrofotometricky při vlnové délce 440 nm. Enzymová hydrolýza probíhala při 50 °C po dobu 60 minut. Jednotka aktivity je definována jako množství enzymu katalyzující přeměnu substrátu doprovázenou přírůstkem absorbance o 0,001 za minutu.

5 VÝSLEDKY

5.1 Charakteristika odpadního materiálu

Jako zdroj uhlíku pro kultivace byl použit odpadní materiál produkovaný při zpracování hroznů révy vinné. Následující tabulka shrnuje složení odpadních slupek a třapin [25].

Tabulka 12 - Složení odpadních slupek a třapin [25]

	slupky	třapiny
olej	9,8 %	-
celulóza	-	17,2 %
redukující sacharidy	4,08 g/l	3,04 g/l
polyfenoly	2,23 mg/ml	1,97 mg/ml
flavonoidy	0,82 mg/ml	0,57 mg/ml

5.1.1 Obsah redukujících sacharidů v produkčních médiích

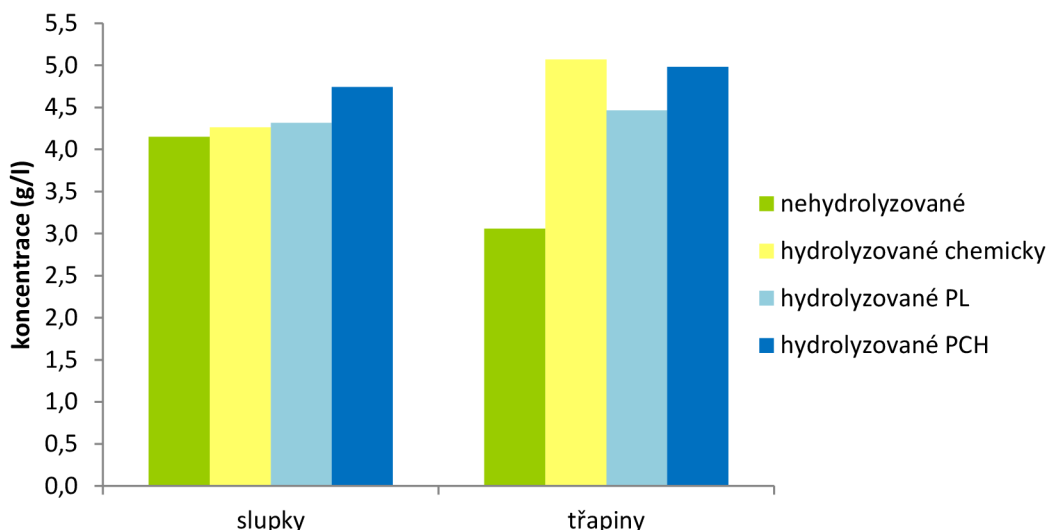
Před zaočkováním médií byl odebrán vzorek pro stanovení redukujících sacharidů metodou Somogyi-Nelsona. Obsah redukujících cukrů v jednotlivých médiích nehydrolyzovaných i hydrolyzovaných různými způsoby shrnuje tabulka 13. Nehydrolyzované slupky obsahují více redukujících sacharidů než třapiny. Naopak hydrolyzou jak chemickou, tak enzymovou se vždy uvolnilo více redukujících sacharidů z třapin. Nejvyššího uvolnění redukujících cukrů ve slupkách bylo dosaženo enzymovou hydrolyzou pomocí plísně *Phanerochaete chrysosporium*, ve třapinách pak došlo k nejvyššímu uvolnění redukujících sacharidů při chemické hydrolyze.

Obsah redukujících sacharidů (glukózy) v kontrolních produkčních médiích byl vždy stejný - 30 g/l.

Tabulka 13 - Obsah redukujících cukrů v produkčních médiích (g/l)

	kontrola	slupky	třapiny
nehydrolyzované	30	4,15	3,06
hydrolyzované chemicky	30	4,26	5,07
hydrolyzované PL	30	4,31	4,47
hydrolyzované PCH	30	4,74	4,98

Pozn. Redukující sacharidy u nehydrolyzovaného produkčního média stejně jako u ostatních produkčních médií byly stanoveny až po sterilaci média. Sterilací došlo k uvolnění malé části redukujících sacharidů z polysacharidů, proto je jejich obsah o něco vyšší než ten uvedený v tabulce 12.



Graf 1 - Obsah redukujících sacharidů v médiích s odpadními substráty

Obsah dostupných cukrů i po chemické či enzymové hydrolýze není ve srovnání s obsahem cukrů v kontrolních médiích nijak vysoký. Vhodnost takového odpadního substrátu jako zdroje živin pro produkci karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q byla sledována ve čtyřech sériích kultivací, vždy s jiným typem úprav daného odpadního substrátu. Zároveň byla sledována spotřeba cukrů jednotlivými kmeny kvasinek.

5.2 Stanovení aktivity enzymů

Ve vzorcích preparátů použitých k hydrolýze odpadních substrátů byly stanoveny enzymové aktivity. Enzymové preparáty obou plísní nevykazují manázovou aktivitu a proteázová aktivita je u nich velmi nízká. Použité enzymové preparáty obou plísní vykazují zejména hydrolytickou aktivitu vůči polysacharidům, z nichž nejvyšší je aktivita amyláz. Pro studované účely je nejdůležitější celulózová aktivita, jejíž hodnota byla u preparátu plísně *P. chrysosporium* téměř dvojnásobně vyšší oproti preparátu *P. lilacium*, což koresponduje i s následně vyšším naměřeným obsahem redukujících sacharidů v médiu hydrolyzovaném tímto preparátem.

Tabulka 14 - Naměřené hodnoty vybraných aktivit u použitých enzymových preparátů

	manázy $\Delta A \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1}$	proteázy $\mu mol \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1}$	amylázy $nmol \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1}$	celulózy $nmol \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1}$	xylanázy $nmol \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1}$
PCH	0	3,7	62,0	36,0	34,4
PL	0	10,9	117,6	18,7	48,0

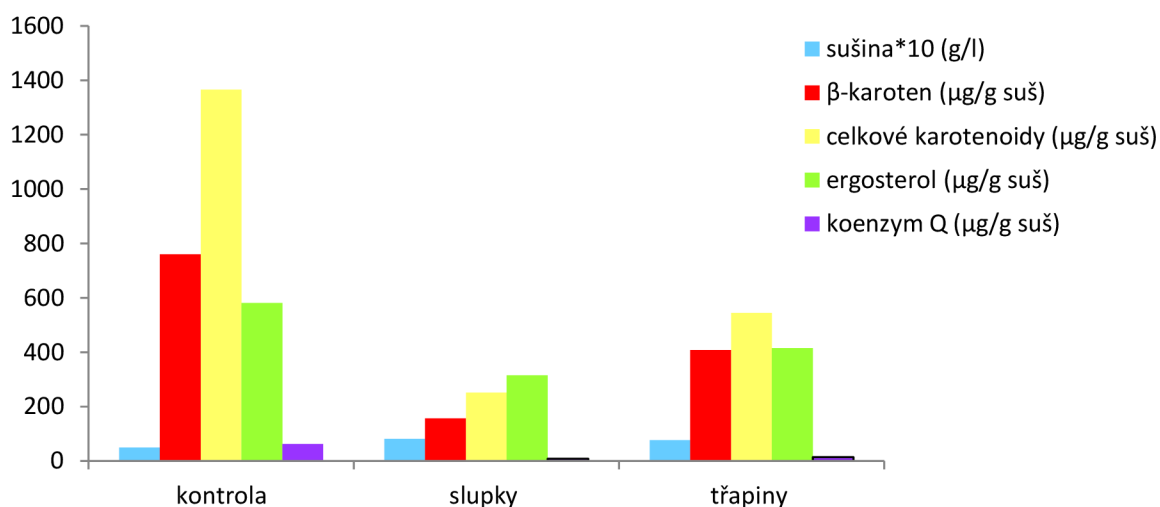
5.3 Kultivace na nehydrolyzovaném hroznovém odpadu

První série kultivací byla uskutečněna na nehydrolyzovaných hroznových odpadních slupkách a třapinách. Výsledky produkce sledovaných metabolitů pro tuto sérii kultivací jsou shrnuty v tabulce 15. Souhrnné výsledky pro všechny kmeny pak znázorňuje graf 6. Grafy 2-6 znázorňují dílčí výsledky pro jednotlivé užité kmeny kvasinek. Analogicky jsou zobrazeny v následujících kapitolách i výsledky dalších sérií kultivací.

Tabulka 15 - Výsledky kultivací na nehydrolyzovaném odpadním substrátu

		sušina (g/l)	β -karoten ($\mu\text{g/g}$ suš)	celkové karotenoidy ($\mu\text{g/g}$ suš)	ergosterol ($\mu\text{g/g}$ suš)	koenzym Q ($\mu\text{g/g}$ suš)
SR	kontrola	4,894	759,9	1365,9	580,6	62,2
	slupky	8,033	155,9	251,2	315,4	7,6
	třapiny	7,612	407,7	544,4	415,5	14,4
RG	kontrola	8,386	295,8	1624,0	388,5	59,6
	slupky	9,825	34,2	66,2	261,2	4,3
	třapiny	10,453	50,1	71,8	236,3	2,5
SSh	kontrola	7,809	80,2	270,1	303,6	22,6
	slupky	9,401	69,6	100,1	278,6	6,8
	třapiny	9,616	16,8	36,9	221,7	3,6
CC	kontrola	9,731	318,2	865,6	254,8	329,3
	slupky	12,381	42,8	93,6	146,0	4,1
	třapiny	10,526	130,2	179,1	278,0	24,5

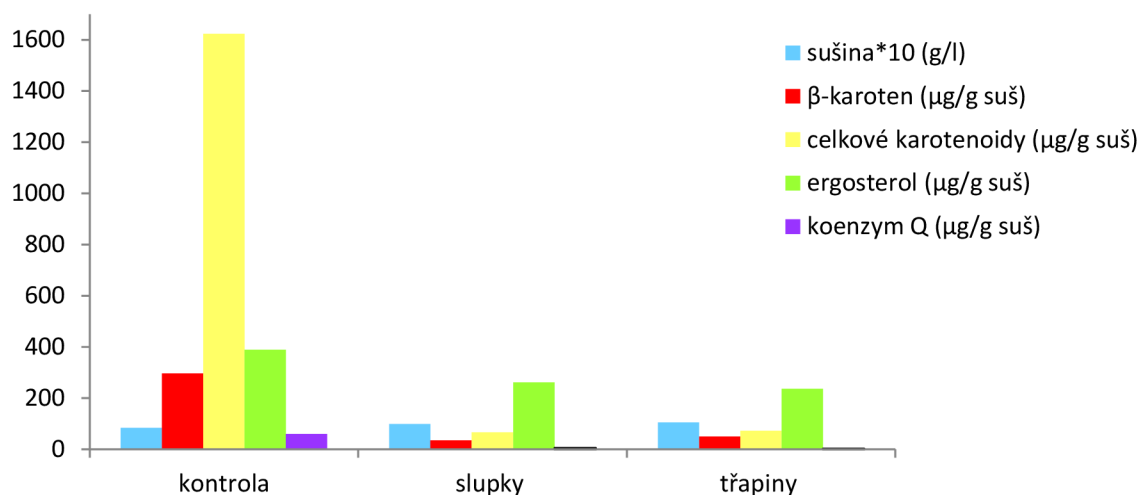
Sporobolomyces roseus



Graf 2 - Produkce metabolitů na nehydrolyzovaném odpadu kvasinkou *S. roseus*

Kultivace na nehydrolyzovaných odpadních slupkách a třapinách s kvasinkou *S. roseus* nepřinesla žádný nárůst produkce sledovaných metabolitů oproti médiu kontrolnímu. Zvýšila se pouze produkce biomasy, a to více u slupek (8,033g/l) než u třapin (7,612 g/l). Při srovnání odpadních substrátů jsou pro produkci sledovaných metabolitů pro tuto kvasinku vhodnější třapiny. Nárůst produkce ergosterolu na třapinách je třetinový, koenzymu Q téměř dvojnásobný, celkové karotenoidy a β -karoten pak dosahují více než dvojnásobných hodnot oproti slupkám.

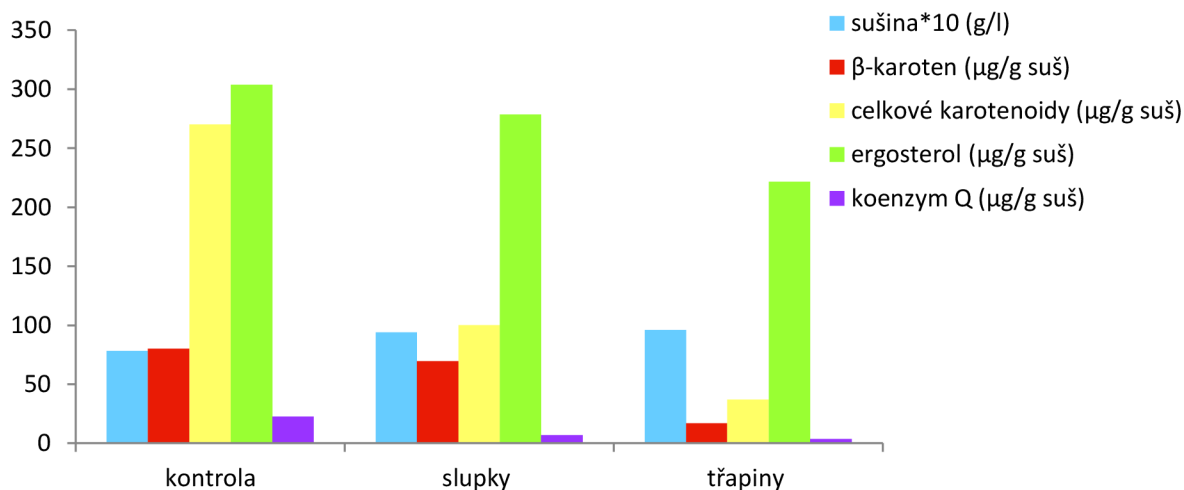
Rhodotorula glutinis



Graf 3 - Produkce metabolitů na nehydrolyzovaném odpadu kvasinkou *R. glutinis*

U kvasinky *R. glutinis* na odpadních substrátech je pozorována snížená produkce sledovaných metabolitů oproti médiu kontrolnímu, a to zejména v produkci karotenoidů a β-karotenu. Zvýšená je jen produkce biomasy a to více na třapinách (104,529 g/l) než na slupkách (98,247 g/l). Z hlediska produkce karotenoidů a β-karotenu se zdají být výhodnější třapiny, pro produkci ergosterolu a koenzymu Q pak slupky.

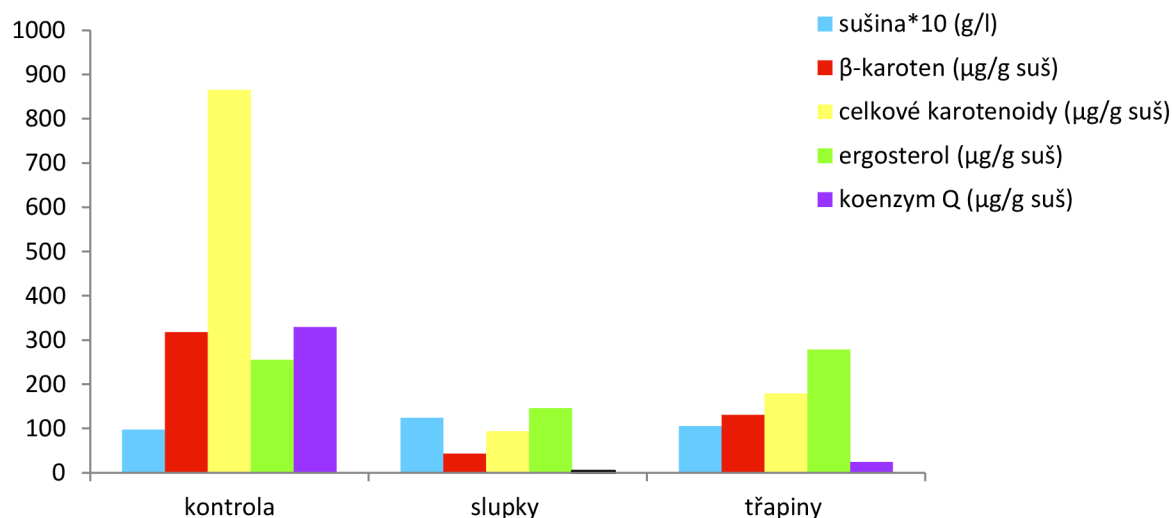
Sporobolomyces shibatanus



Graf 4 - Produkce metabolitů na nehydrolyzovaném odpadu kvasinkou *S. shibatanus*

S. Shibatanus kultivovaná na nehydrolyzovaném odpadním substrátu rovněž vykazuje nižší hodnoty produkce metabolitů a vyšší produkci biomasy než na kontrolním médiu. Tato kvasinka však nevykazuje vysoké výtěžky ani na produkčním médiu, rozdíly v produkci na odpadním substrátu tak oproti kontrole nejsou tolik výrazné jako u předchozích kmenů. Pro produkci všech sledovaných metabolitů se ukazují být výhodnější spíše slupky než třapiny. Produkce ergosterolu je na slupkách srovnatelná s produkcí na kontrolním médiu.

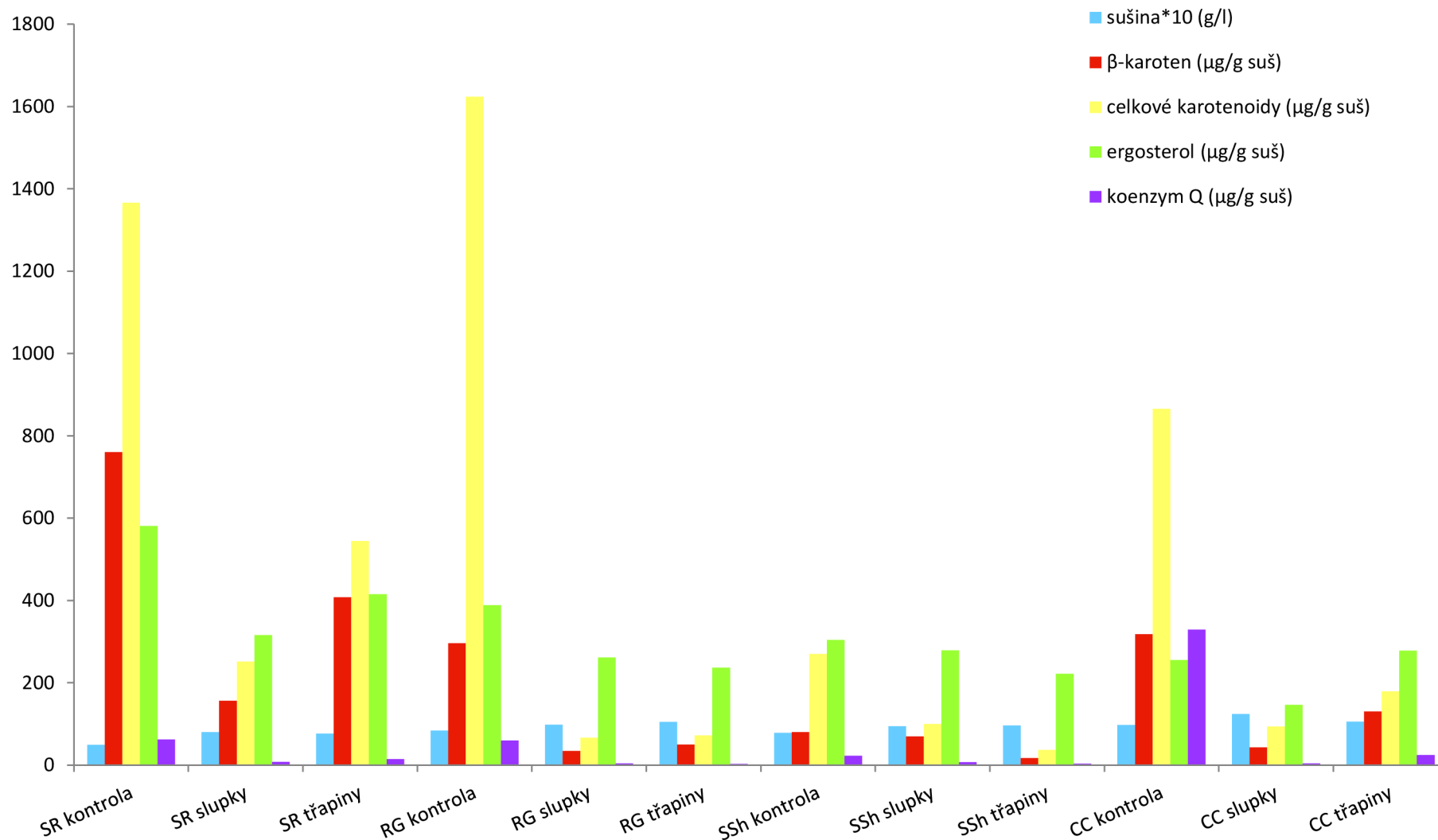
Cystofilobasidium capitatum



Graf 5 - Produkce metabolitů na nehydrolyzovaném odpadu kvasinkou *C. capitatum*

C. capitatum vykazuje vyšší výtěžek jednoho ze sledovaných metabolitů na odpadním substrátu než na kontrolním médiu, a to ergosterolu ($278,0 \mu\text{g/g suš}$). Ostatní metabolity dosahují na odpadních substrátech hodnot nižších. Produkce biomasy je ale opět vyšší na odpadních substrátech. Porovnáním produkce sledovaných metabolitů je vidět, že výhodnějším substrátem pro jejich produkci jsou u *C. capitatum* třapiny.

Produkce biomasy na nehydrolyzovaných odpadních substrátech byla u všech sledovaných kmenů kvasinek vždy vyšší než na médiu kontrolním. V produkci sledovaných metabolitů byly výtěžky vždy nižší než na kontrolních médiích. Nejvyšší produkce β -karotenu ($407,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), celkových karotenoidů ($544,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) i ergosterolu ($415,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) na nehydrolyzovaném odpadním substrátu dosáhla *S. roseus* kultivovaná na třapinách. Nejvyšší produkce koenzymu Q ($24,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) pak dosáhla *C. capitatum* rovněž kultivovaná na třapinách. S výjimkou *S. roseus* kultivovanou na třapinách bylo ze sledovaných metabolitů vždy nejvyšších výsledků dosaženo v produkci ergosterolu.



Graf 6 - Shrnutí produkce vybraných metabolitů jednotlivými kmeny kvasinek na nehydrolyzovaném substrátu

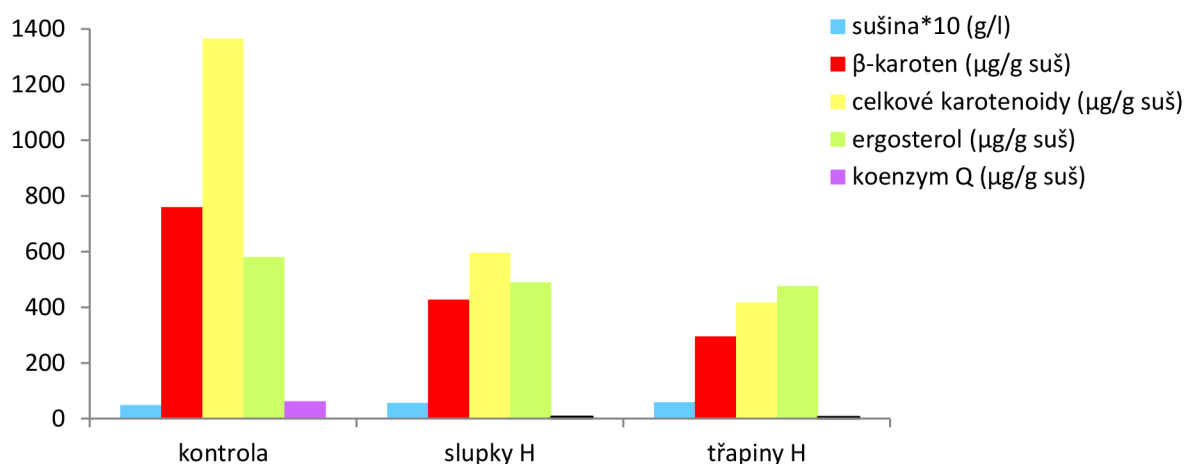
5.4 Kultivace na chemicky hydrolyzovaném hroznovém odpadu

Vzhledem k obecně nízkým výtěžkům sledovaných metabolitů na neupraveném hroznovém odpadu, způsobeném pravděpodobně nízkým obsahem utilizovatelných cukrů v médiu, byl tento odpadní substrát podroben chemické hydrolyze. Výsledky obsahu redukujících sacharidů jsou uvedeny v kapitole 5.1. Chemickou hydrolyzou slupek nedošlo k výraznému uvolnění redukujících sacharidů, protože slupky oproti třapinám mají nižší obsah polysacharidů, které by se mohly štěpit. U slupek se po chemické hydrolyze uvolnilo 0,11 g/l redukujících sacharidů, u třapin došlo k uvolnění 2,01 g/l.

Tabulka 16 - Výsledky kultivací na chemicky hydrolyzovaném odpadním substrátu

		sušina (g/l)	β-karoten (μg/g suš)	celkové karotenoidy (μg/g suš)	ergosterol (μg/g suš)	koenzym Q (μg/g suš)
SR	kontrola	4,894	759,9	1365,9	580,6	62,2
	slupky	5,679	427,8	595,6	489,8	7,2
	třapiny	5,893	295,5	417,2	477,0	5,7
RG	kontrola	8,386	295,8	1624,0	388,5	59,6
	slupky	7,950	67,7	110,3	315,6	6,3
	třapiny	8,477	74,8	105,3	299,8	5,2
SSh	kontrola	7,809	80,2	270,1	303,6	22,6
	slupky	9,772	45,9	76,4	255,4	3,1
	třapiny	8,952	200,8	269,1	279,5	4,0
CC	kontrola	9,731	318,2	865,6	254,8	329,3
	slupky	10,139	50,8	75,8	207,8	0,9
	třapiny	8,737	100,7	154,4	238,7	27,4

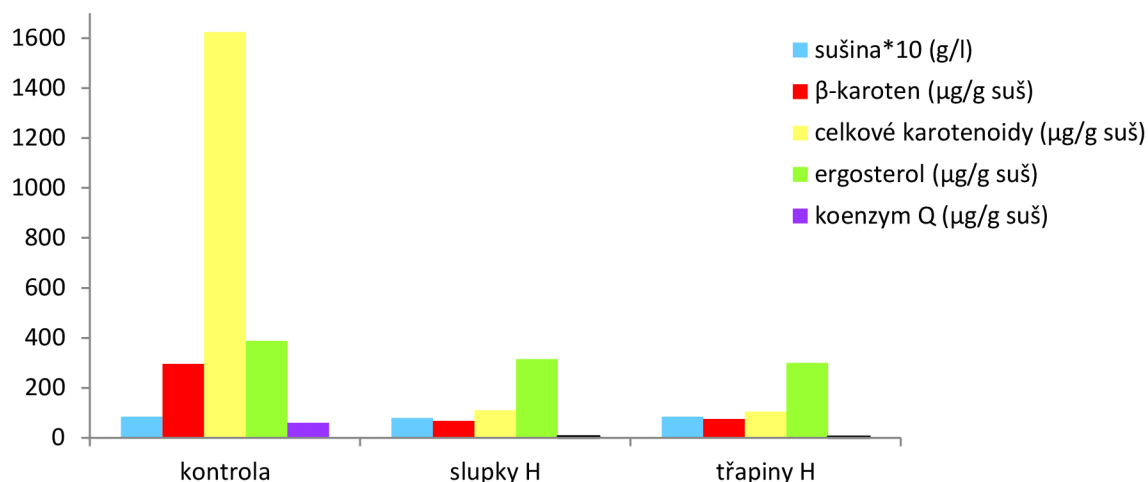
Sporobolomyces roseus



Graf 7 - Produkce metabolitů na chemicky hydrolyzovaném odpadu kvasinkou *S. roseus*

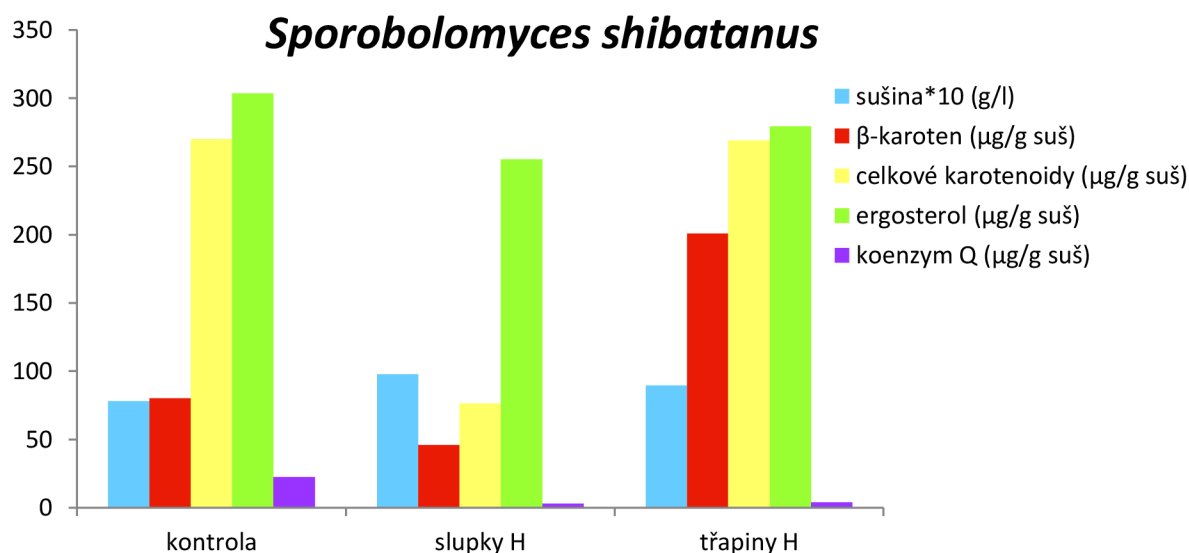
Vyšší produkce biomasy na odpadních substrátech je opět doprovázena nižší produkcí sledovaných metabolitů. Z hlediska produkce metabolitů jsou lepším substrátem chemicky hydrolyzované slupky. Nejblíže kontrolnímu médiu je opět produkce ergosterolu, a to jak na slupkách, tak na třapínách.

Rhodotorula glutinis



Graf 8 - Produkce metabolitů na chemicky hydrolyzovaném odpadu kvasinkou *R. glutinis*

Produkce biomasy *R. glutinis* je na odpadních médiích je srovnatelná s médiem kontrolním. Produkce metabolitů na slupkách a třapínách se výrazně neliší. Nejlepší produkce je opět sledována u ergosterolu, a to $315,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ na slupkách a $299,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ na třapínách.

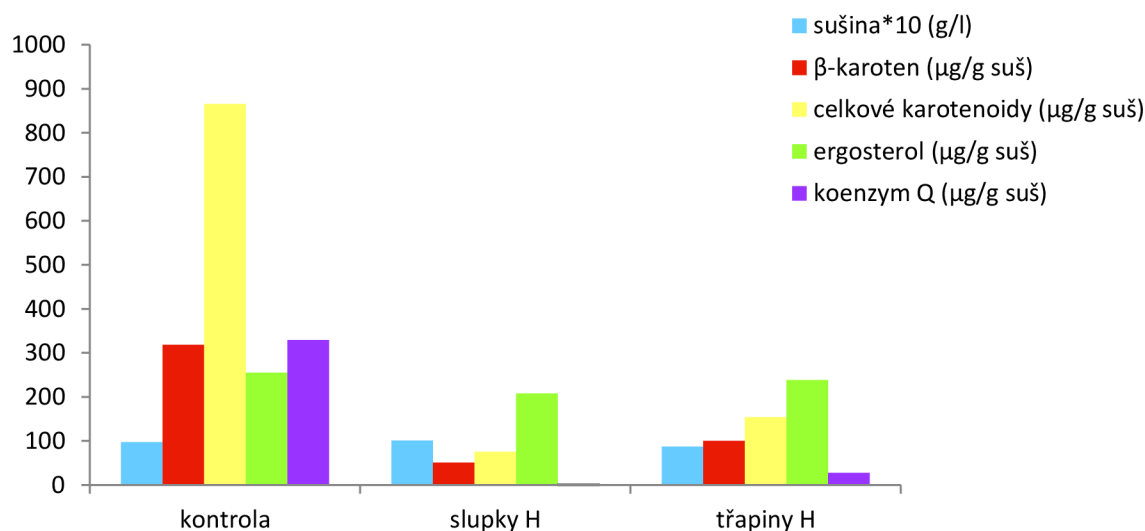


Graf 9 - Produkce metabolitů na chemicky hydrolyzovaném odpadu kvasinkou *S. shibatanus*

Uvolnění redukujících sacharidů z odpadních substrátů po chemické hydrolyze mělo pozitivní vliv na produkci biomasy kvasinky *S. shibatanus*. Biomasa je na slupkách i třapínách vyšší než na kontrolním médiu. Produkce ergosterolu na slupkách i třapínách se blíží produkci na médiu kontrolním a produkce β-karotenu na třapínách ($200,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) je více než dvojnásobná oproti kontrole ($80,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Srovnatelná s kontrolním médiem je i produkce celkových

karotenoidů na třapínách. Pro produkci všech sledovaných metabolitů u *S. shibatanus* jsou výhodnější chemicky hydrolyzované třapiny než slupky - rozdíl mezi těmito dvěma substráty je výrazný zejména v produkci β -karotenu a celkových karotenoidů.

Cystofilobasidium capitatum

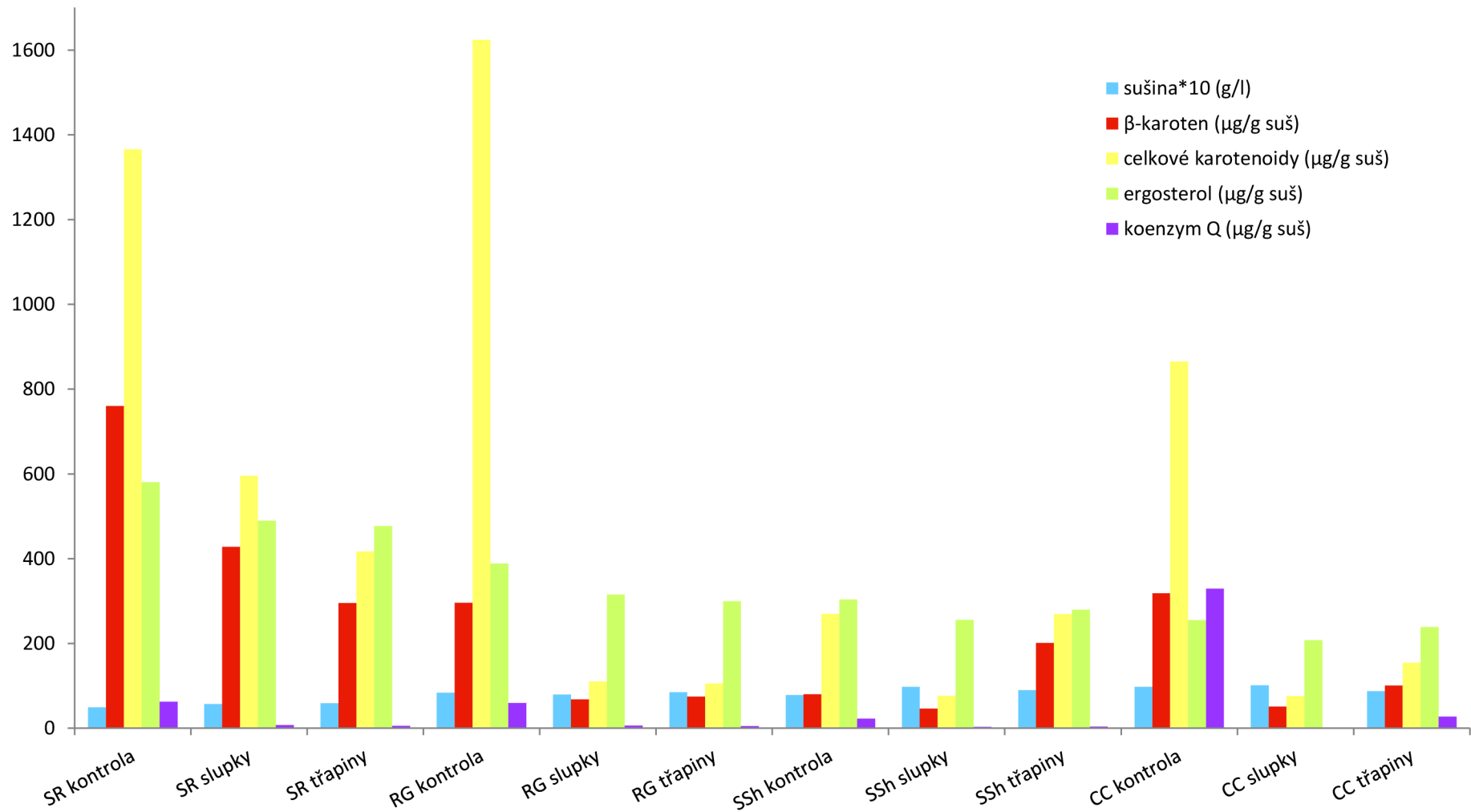


Graf 10 - Produkce metabolitů na chemicky hydrolyzovaném odpadu kvasinkou *C. capitatum*

C. capitatum má vyšší produkci biomasy pouze na slupkách. Produkci sledovaných metabolitů má na odpadních substrátech nižší než na kontrolním médiu. Pro *C. capitatum* se jako vhodnější substrát jeví třapiny, produkce koenzymu Q je zde oproti slupkám až třicetinasobná, produkce β -karotenu a celkových karotenoidů dvojnásobná. V produkci ergosterolu tak velké rozdíly nejsou.

Všechny čtyři sledované kmeny kvasinek (vyjma *R. glutinis* na slupkách) produkovaly na chemicky hydrolyzovaných odpadních médiích více biomasy než na kontrolních médiích. Z hlediska produkce celkových karotenoidů ($595,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), β -karotenu ($427,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) i ergosterolu ($489,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) byla zaznamenána nejvyšší produkce u *S. roseus* na slupkách. *S. roseus* vykazovala nejvyšší produkce těchto metabolitů také na nehydrolyzovaných třapínách. Při kultivaci na hydrolyzovaných slupkách bylo ale dosaženo vyšších hodnot. Produkce koenzymu Q byla nejvyšší u *C. capitatum* ($27,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) na hydrolyzovaných třapínách, zároveň byla tato produkce také vyšší než u nehydrolyzovaných třapin.

Srovnáním výsledků produkcí metabolitů na nehydrolyzovaném a hydrolyzovaném odpadním substrátu vidíme, že chemická hydrolýza měla své opodstatnění. Téměř u všech kmenů došlo ke zvýšení produkce žádaných metabolitů, způsobené pravděpodobně zejména vyšším obsahem utilizovatelných – též využitelných cukrů v médiu.



Graf 11 - Shrnutí produkce vybraných metabolitů jednotlivými kmeny kvasinek na chemicky hydrolyzovaném substrátu

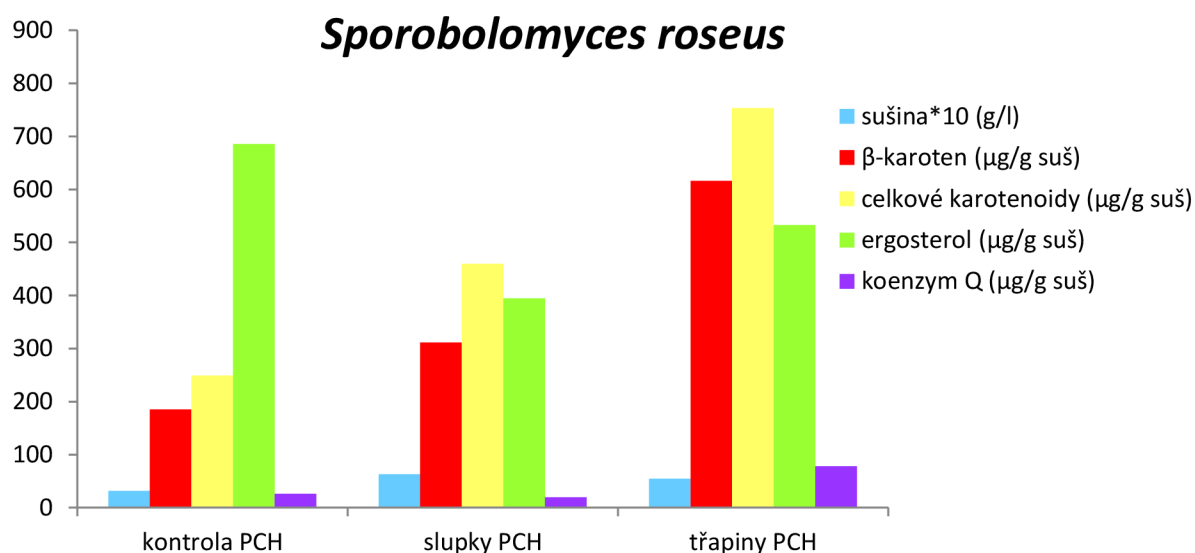
5.5 Kultivace na enzymově hydrolyzovaném hroznovém odpadu (PCH)

Na základě pozitivních výsledků ze stanovení redukujících sacharidů po chemické hydrolyze byl v další sérii kultivací odpadní materiál hydrolyzován enzymy. K produkci enzymů byla vybrána plíseň *Phanerochaete chrysosporium*. Tato plíseň patří mezi tzv. lignolytické houby. Lignin je velice odolný vůči degradaci. Rozkládat ho je schopno jenom několik typů mikroorganismů s dobrým enzymatickým aparátem. Ligninolytické enzymy těchto hub jsou schopny rozrušovat i celulózové či hemicelulózové polysacharidy na nižší jednotky a využívat je jako zdroj uhlíku. Plíseň *P. chrysosporium* je využívána biotechnologicky k různým degradacím průmyslových odpadů.

Enzymovou hydrolyzou slupek extracelulárními enzymy produkovány plísní *P. chrysosporium* bylo docíleno vyššího uvolnění redukujících sacharidů než při chemické hydrolyze, u třapin se redukujících sacharidů uvolnilo ve srovnání s chemickou hydrolyzou o něco méně. Ze slupek se enzymovou hydrolyzou uvolnilo navíc 0,59 g/l redukujících sacharidů, z třapin pak 1,92 g/l.

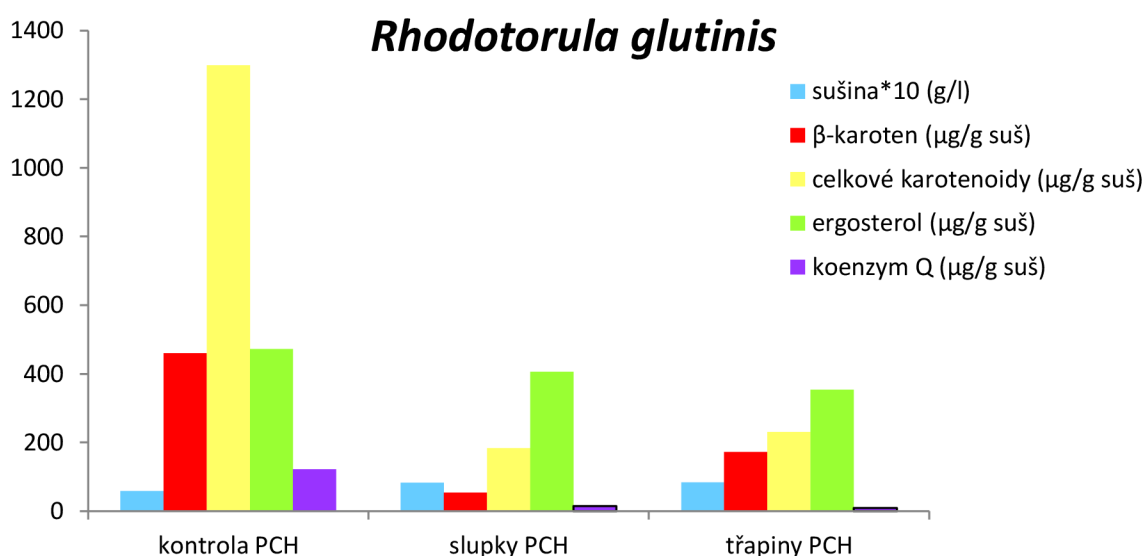
Tabulka 17 - Výsledky kultivací na odpadním substrátu hydrolyzovaném enzymy plísně *Phanerochaete chrysosporium*

		sušina (g/l)	β -karoten ($\mu\text{g/g}$ suš)	celkové karotenoidy ($\mu\text{g/g}$ suš)	ergosterol ($\mu\text{g/g}$ suš)	koenzym Q ($\mu\text{g/g}$ suš)
SR	kontrola	3,184	185,5	249,2	685,7	26,4
	slupky	6,282	311,6	460,1	394,7	19,4
	třapiny	5,431	616,1	753,6	533,1	77,9
RG	kontrola	5,843	460,2	1298,6	472,0	122,5
	slupky	8,325	54,0	183,6	406,5	14,5
	třapiny	8,376	172,7	231,1	354,4	8,9
SSh	kontrola	6,939	20,6	44,5	163,1	24,0
	slupky	8,131	36,0	719,5	365,7	7,0
	třapiny	7,173	1,6	7,3	20,4	1,6
CC	kontrola	8,394	574,2	101,7	370,5	514,7
	slupky	9,333	47,6	83,2	230,4	12,7
	třapiny	7,897	360,0	553,9	345,7	57,8



Graf 12 - Produkce metabolitů na enzymaticky hydrolyzovaném odpadu (PCH) kvasinkou *S. roseus*

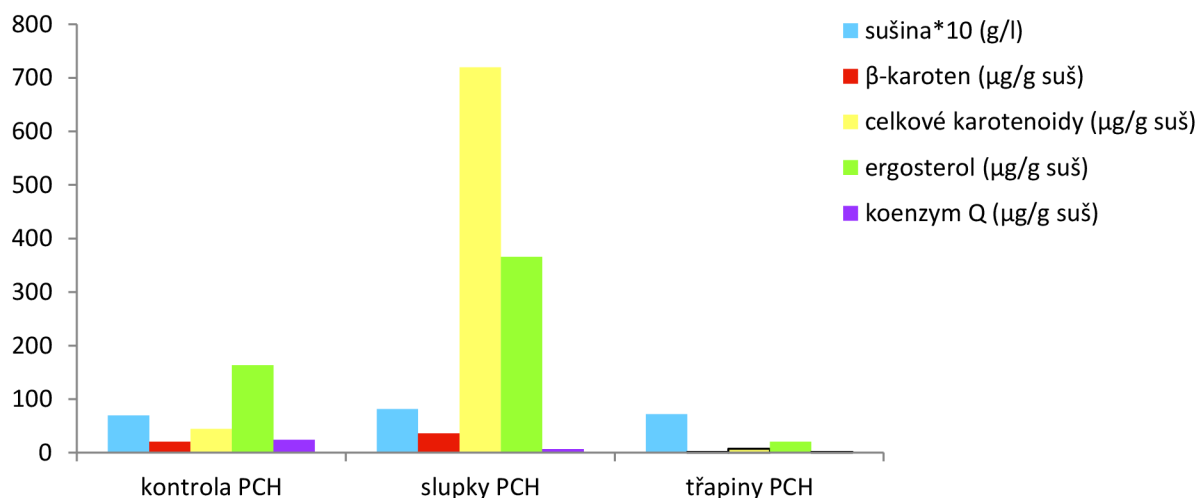
S. roseus kultivovaná na enzymově hydrolyzovaných slupkách i třapinách vykazuje v produkci biomasy vyšší výtěžky než na kontrolním médiu. Taktéž produkce celkových karotenoidů a β-karotenu je na obou odpadních substrátech vyšší. Pozoruhodná je zejména produkce β-karotenu ($616,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), celkových karotenoidů ($753,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) i koenzymu Q ($77,93 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) na třapinách, která je oproti produkci na kontrolním médiu trojnásobně vyšší.



Graf 13 - Produkce metabolitů na enzymaticky hydrolyzovaném odpadu (PCH) kvasinkou *R. glutinis*

U *R. glutinis* nedošlo na odpadním substrátu k nárůstu produkce sledovaných metabolitů. Vyšší byla pouze produkce biomasy, a to jak na slupkách, tak na třapinách. Kromě ergosterolu, jehož produkce je vyšší na slupkách, jsou pro produkci metabolitů na takto upraveném substrátu lepší třapiny.

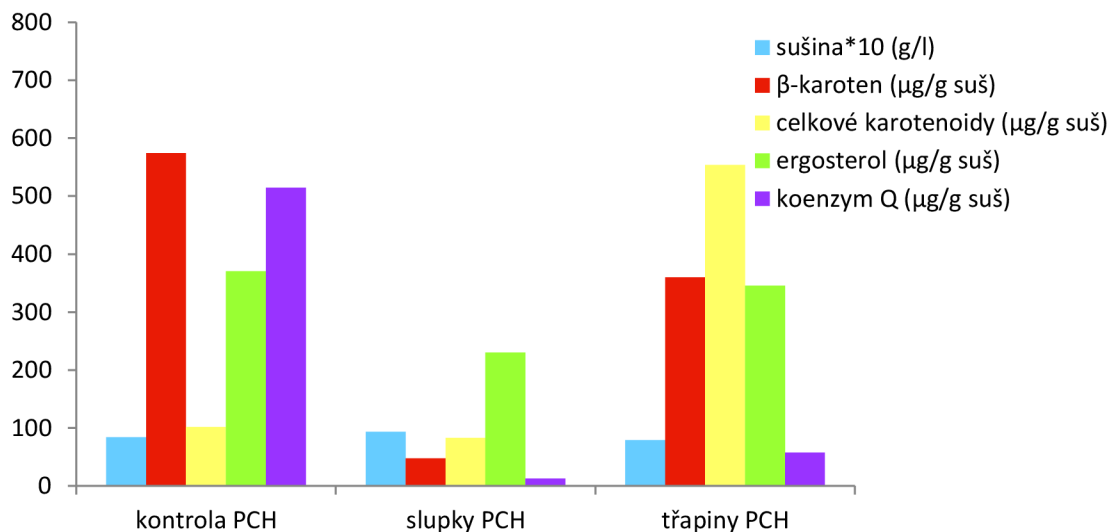
Sporobolomyces shibatanus



Graf 14 - Produkce metabolitů na enzymaticky hydrolyzovaném odpadu (PCH) kvasinkou *S. shibatanus*

Kvasinka *S. shibatanus* má na slupkách oproti kontrole i třapinám překvapivě vysokou produkci celkových karotenoidů ($719,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a ergosterolu ($365,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Produkce β -karotenu je na slupkách také vyšší, ale obecně v porovnání s kontrolním médiem nízká.

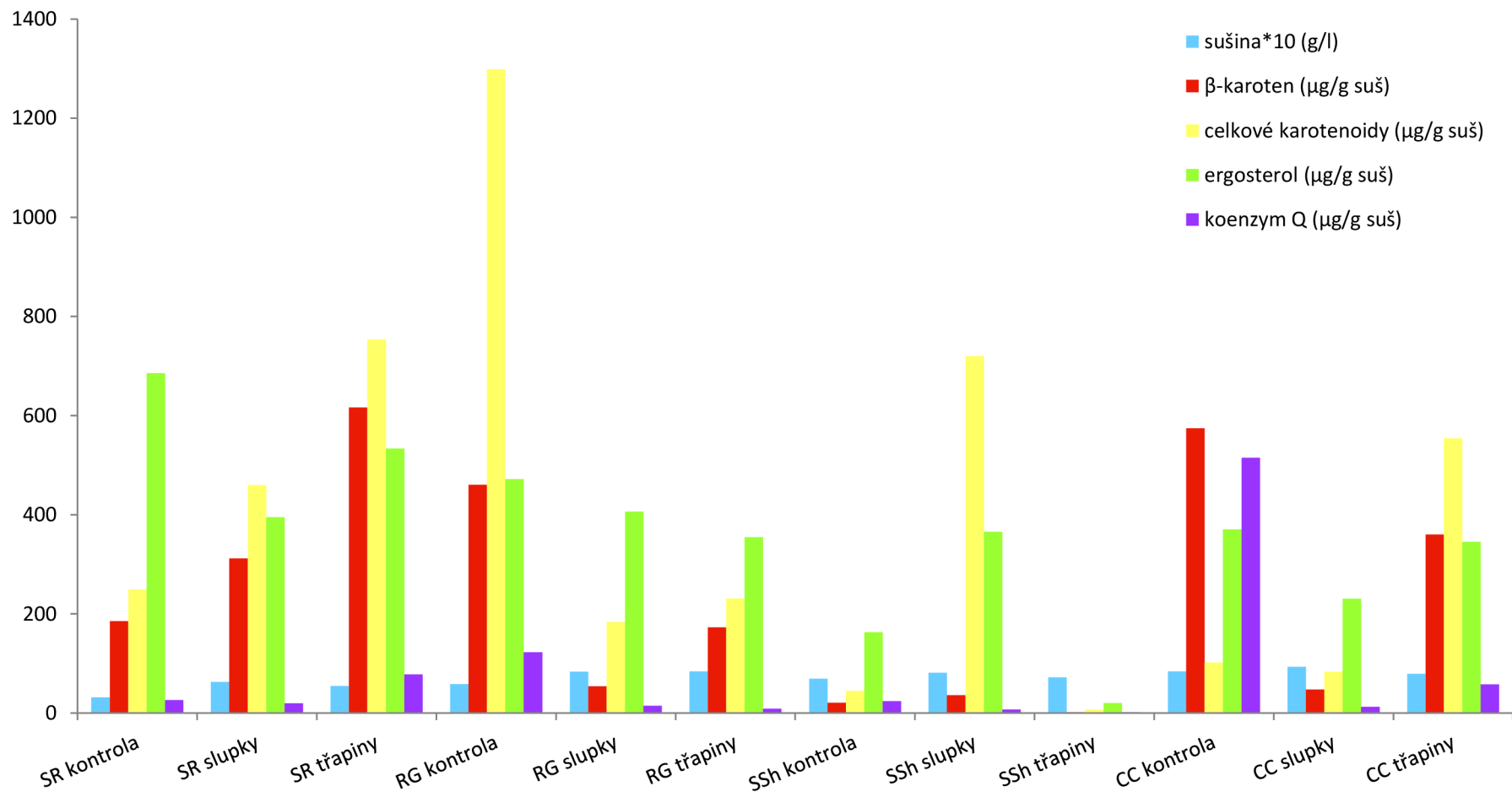
Cystofilobasidium capitatum



Graf 15 - Produkce metabolitů na enzymaticky hydrolyzovaném odpadu (PCH) kvasinkou *C. capitatum*

Produkce biomasy na odpadních substrátech u *C. capitatum* je srovnatelná s produkcí na kontrolním médiu. Výrazně vyšší produkce je pozorována na třapinách u celkových karotenoidů ($553,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), což je pětikrát vyšší hodnota než u kontrolního média. Třapiny jsou oproti slupkám pro *C. capitatum* výhodnějším substrátem i pro produkci ostatních metabolitů.

Nejvyšší dosažené produkce jednotlivých metabolitů byly vyšší než u kultivací s chemicky hydrolyzovaným odpadním substrátem. Úprava substrátu hydrolýzou pomocí enzymů produkovaných plísní *Phanerochaete chrysosporium* měla za následek další zvýšení produkce sledovaných metabolitů. Produkce biomasy byla na odpadních substrátech vždy vyšší než na kontrolních médiích (vyjma *C. capitatum* kultivovaného na třapínách). Pro β -karoten, celkové karotenoidy, ergosterol i koenzym Q bylo nejvyšších produkcí dosaženo u kvasinky *S. roseus* kultivované na třapínách. Tyto produkce činily pro β -karoten $616,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, celkové karotenoidy $753,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, ergosterol $533,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a pro koenzym Q $77,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Produkce koenzymu Q byla více než dvojnásobná oproti nejvyšší dosažené produkci na chemicky hydrolyzovaném substrátu.



Graf 16 - Shrnutí produkce vybraných metabolitů jednotlivými kmeny kvasinek na substrátu hydrolyzovaném enzymy produkovanými plísní *Phanerochaete chrysosporium*

5.6 Kultivace na enzymově hydrolyzovaném hroznovém odpadu (PL)

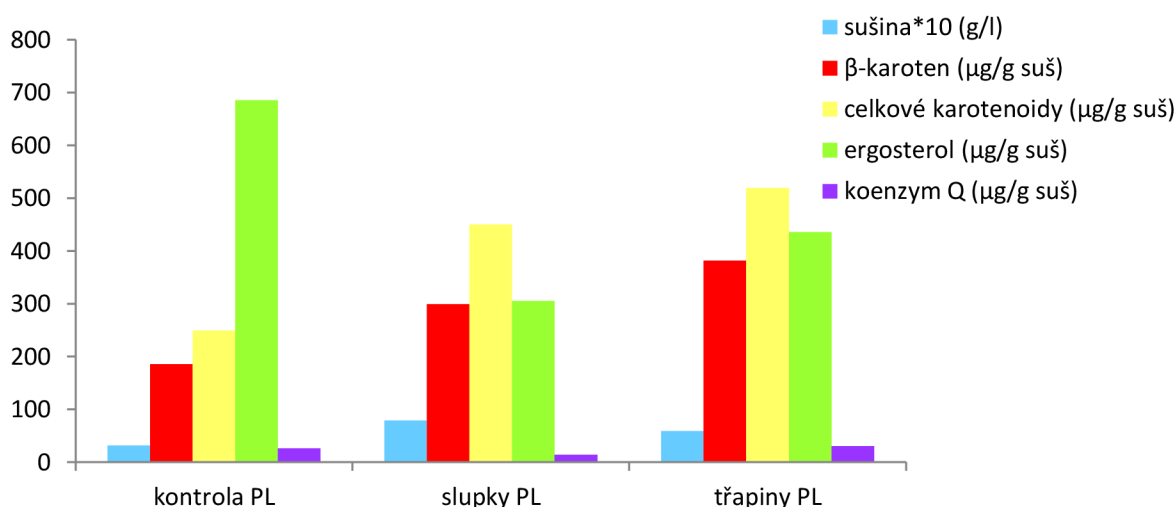
Enzymová hydrolyza slupek a třápin byla provedena i ve čtvrté sérii kultivací s použitím extracelulárních enzymů produkovaných plísní *Penicillium lilacinum*. Tato plíseň mimo jiné produkuje i enzymy na degradaci dextranu v cukernatých šťávách.

U slupek bylo touto enzymovou hydrolyzou uvolněno 0,16 g/l redukujících sacharidů, což je téměř stejná hodnota jako u chemické hydrolyzy, avšak méně než při hydrolyze enzymy plísně *P. chrysosporium*. Při hydrolyze třápin se uvolnilo 1,41 g/l redukujících sacharidů, což je méně než při chemické i předešlé enzymové hydrolyze.

Tabulka 18 - Výsledky kultivací na odpadním substrátu hydrolyzovaném enzymy plísně *Penicillium lilacinum*

		sušina (g/l)	β-karoten (μg/g suš)	celkové karotenoidy (μg/g suš)	ergosterol (μg/g suš)	koenzym Q (μg/g suš)
SR	kontrola	3,184	185,5	249,2	685,7	26,4
	slupky	7,884	299,7	450,6	305,7	14,1
	třápiny	5,893	381,8	519,6	435,7	30,6
RG	kontrola	6,572	70,6	345,7	334,4	9,8
	slupky	5,539	22,5	167,6	285,3	11,0
	třápiny	9,126	310,0	377,5	367,4	17,7
SSh	kontrola	8,395	10,0	33,5	265,7	15,5
	slupky	8,717	67,4	109,0	335,2	10,1
	třápiny	6,001	415,5	615,0	441,9	28,9
CC	kontrola	7,301	50,1	140,6	319,3	96,4
	slupky	8,648	160,0	243,4	306,3	60,0
	třápiny	10,018	190,4	263,5	255,3	48,5

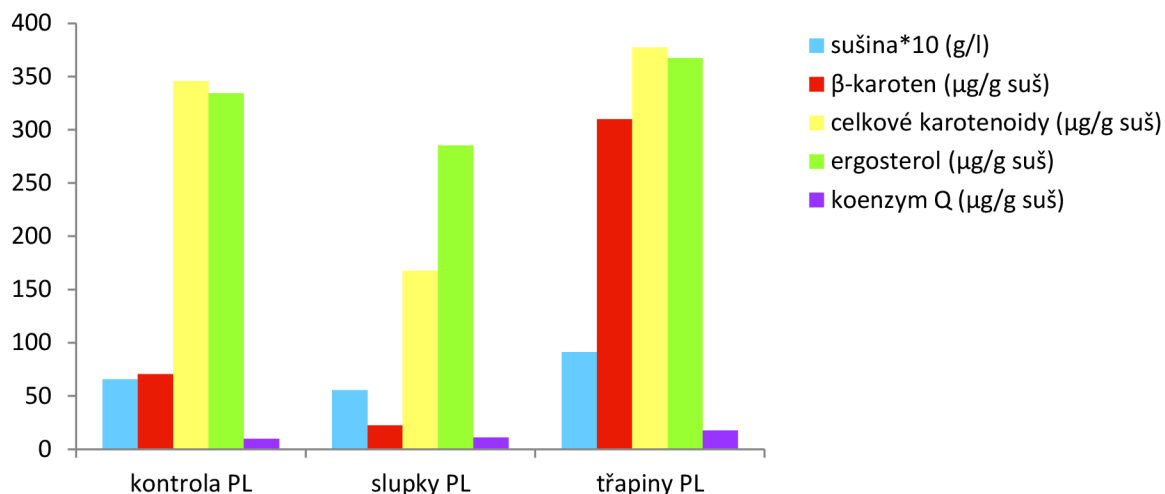
Sporobolomyces roseus



Graf 17 - Produkce metabolitů na enzymaticky hydrolyzovaném odpadu (PL) kvasinkou *S. roseus*

Produkce biomasy, karotenoidů i β -karotenu je na odpadních hydrolyzovaných médiích vyšší než na kontrolním glukozovém médiu. V případě třapin je zde i vyšší produkce koenzymu Q. Porovnáním produkce sledovaných metabolitů na odpadních substrátech je pro *S. roseus* výhodnější kultivace na třapinách (produkce β -karotenu je zde dvojnásobná oproti kontrole).

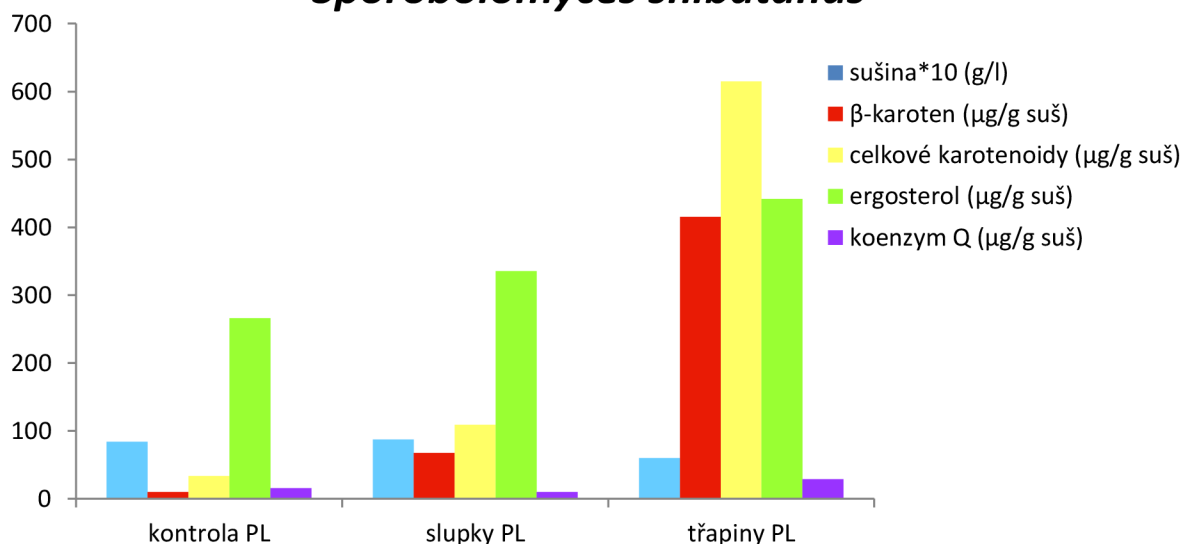
Rhodotorula glutinis



Graf 18 - Produkce metabolitů na enzymaticky hydrolyzovaném odpadu (PL) kvasinkou *R. glutinis*

Produkce všech sledovaných metabolitů je na třapinách vyšší než na kontrolním médiu. Vyšší produkce na třapinách je zřetelná zejména u produkce β -karotenu, která je oproti kontrole čtyřnásobná - $310,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Slupky nejsou pro *R. glutinis* co do produkce sledovaných metabolitů tolik výhodné jako třapiny.

Sporobolomyces shibatanus

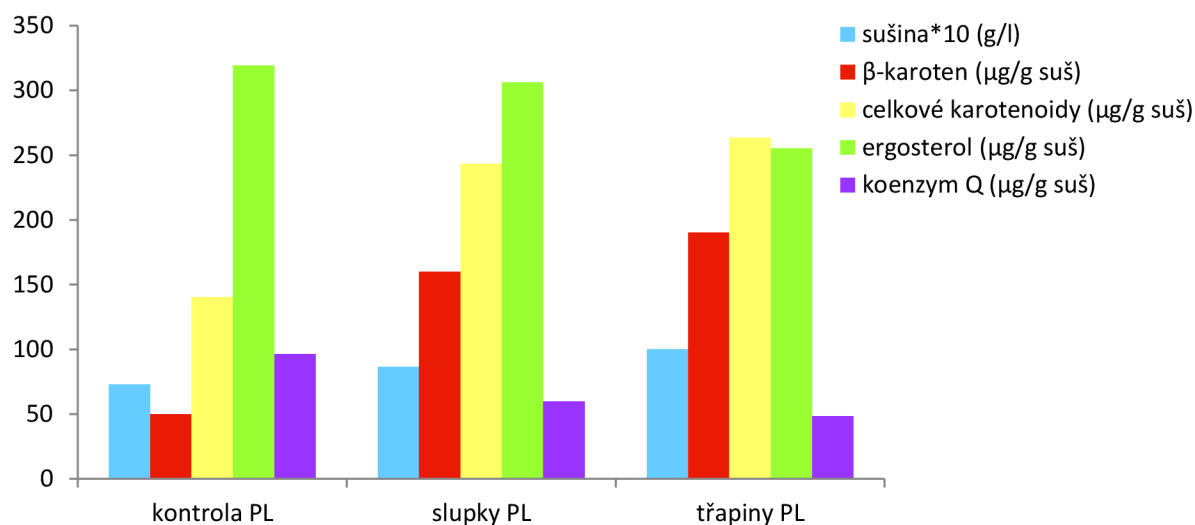


Graf 19 - Produkce metabolitů na enzymaticky hydrolyzovaném odpadu (PL) kvasinkou *S. shibatanus*

S. shibatanus podobně jako *R. glutinis* vykazuje oproti kontrole několikanásobně vyšší produkci β -karotenu ($415,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) na třapinách. I ostatní sledované metabolity jsou na

třapinách produkovány ve větším množství než na kontrole i na slupkách. Enzymově hydrolyzované třapiny se tak opět jeví jako výhodnější zdroj živin.

Cystofilobasidium capitatum

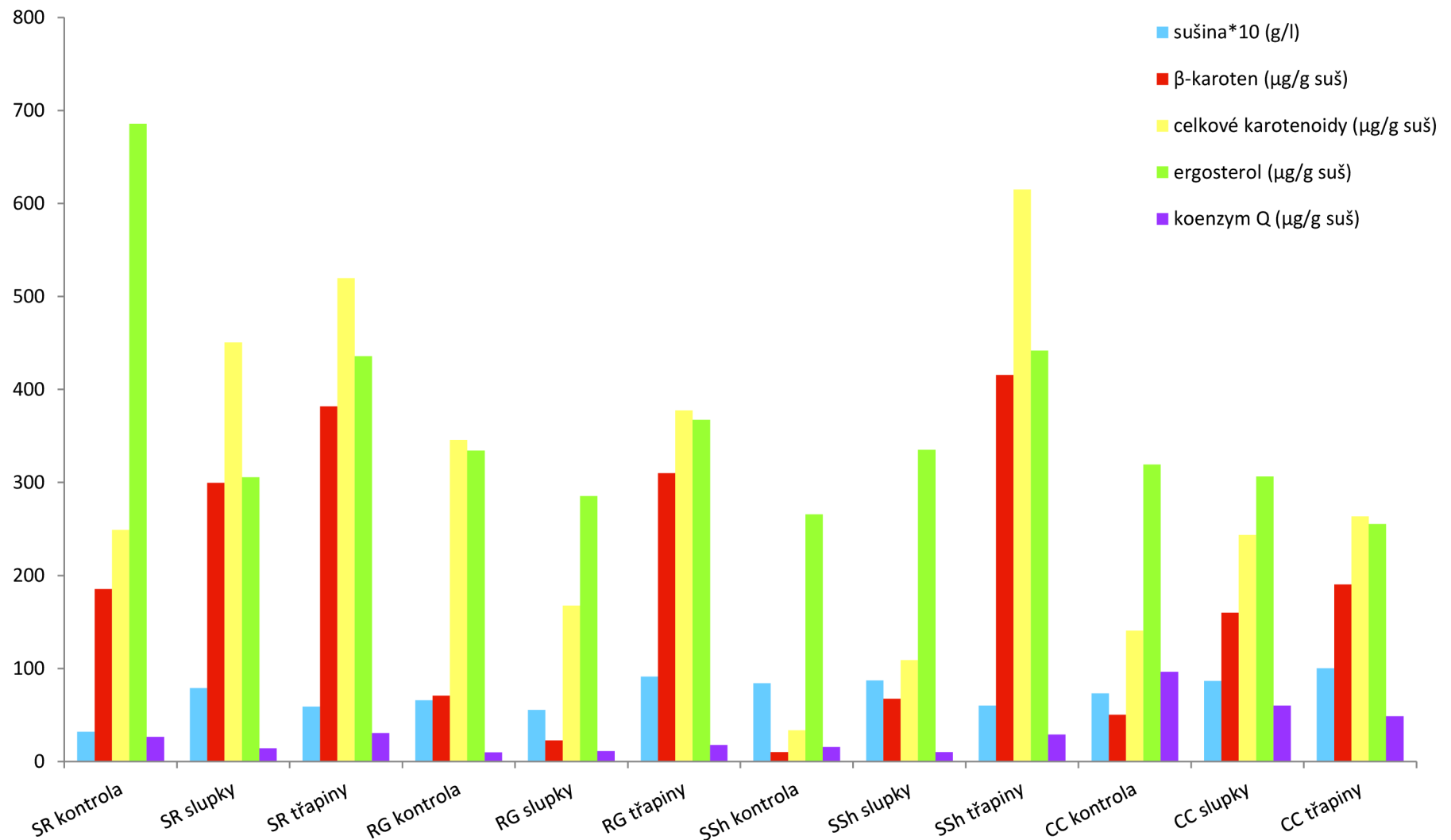


Graf 20 - Produkce metabolitů na enzymaticky hydrolyzovaném odpadu (PL) kvasinkou *C. Capitatum*

Produkována biomasa, β-karoten i celkové karotenoidy jsou vyšší na obou odpadních substrátech než na kontrolním médiu. Nižší produkce na odpadních substrátech je zaznamenána u ergosterolu a koenzymu Q. Při porovnání odpadních substrátů jsou u *C. capitatum* pro tvorbu karotenoidů výhodnější třapiny.

Produkce biomasy na enzymově hydrolyzovaných třapinách byla kromě *S. shibatanus* vyšší než na kontrolních médiích, na slupkách byla produkce biomasy oproti kontrole nižší jen u *R. glutinis*. Nejvyšších hodnot sledovaných metabolitů bylo dosaženo pro celkové karotenoidy, β-karoten a ergosterol u *S. shibatanus*, a to konkrétně celkové karotenoidy $615,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, β-karoten $415,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a ergosterol $441,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Koenzym Q byl v největším množství $60,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ produkován u *C. capitatum*. V produkci β-karotenu a ergosterolu je tato série ve srovnání s předchozími na druhém místě za nehydrolyzovaným substrátem. Co se týče produkce celkových karotenoidů a koenzymu Q, tak vyšších výsledků bylo dosaženo jen na enzymově hydrolyzovaném odpadu (PCH).

Při celkovém pohledu na kultivace na enzymově hydrolyzovaných odpadech pozorujeme vyšší výnosy sledovaných metabolitů na třapinách, podobně tomu bylo i u prvních dvou sérií kultivací. Výsledky tak indikují možný obsah antinutričních látek v odpadních slupkových výliscích.



Graf 21 - Shrnutí produkce vybraných metabolitů jednotlivými kmeny kvasinek na substrátu hydrolyzovaném enzymy produkovanými plísní *Penicillium lilacinum*

5.7 Stanovení výtěžnostních koeficientů

Výtěžnostní koeficienty byly stanoveny jako množství biomasy nebo β -karotenu vyprodukované na jednotkové množství substrátu - redukujících sacharidů.

Výtěžnostní koeficient biomasy ze substrátu byl vypočítán jako podíl rozdílu biomasy na konci kultivace a na počátku kultivace a rozdílu obsahu redukujících cukrů v médiu na začátku a na konci kultivace.

$$Y(X / S) = \frac{dX}{dS} = \frac{X_{80} - X_0}{S_0 - S_{80}},$$

kde X_{80} a X_0 je koncentrace biomasy v čase 80 h a na počátku kultivace v jednotkách g/l, obdobně pro S_{80} a S_0 také v jednotkách g/l.

Výtěžnostní koeficient β -karotenu ze substrátu byl vypočítán analogicky jako předchozí koeficient podle následující rovnice. Koncentrace β -karotenu byla vyjádřena v jednotkách $\mu\text{g/l}$ a koncentrace substrátu v g/l.

$$Y(X / S) = \frac{dX}{dS} = \frac{P_{80} - P_0}{S_0 - S_{80}}$$

Průměrně nejvyšších výtěžnostních koeficientů biomasy ze substrátu bylo dosaženo na nehydrolyzovaných substrátech, přičemž nejvyšší hodnota - 4,51 byla získána u *C. capitatum* kultivovaného na slupkách. Výtěžnostní koeficienty β -karotenu ze substrátu již nebyly jednoznačně vyšší u některého typu substrátu. Nejvyšší hodnota - 1 191,6 byla dosažena u kvasinky *S. roseus* kultivované na nehydrolyzovaných třapínách a druhý nejvyšší koeficient 936,6 má *S. shibatanus* kultivovaný na třapínách hydrolyzovaných enzymaticky plísní *P. lilacinum*. Naopak jedny z nejnižších koeficientů výtěžnosti, a to jak biomasy, tak i β -karotenu, nacházíme na kontrolním glukózovém médiu.

Tabulka 19 - Výtěžnostní koeficienty biomasy ze substrátu

Y(X/S)	kontrola				slupky				třapiny			
	CC	RG	SR	SH	CC	RG	SR	SH	CC	RG	SR	SH
nehydrolyzované	0,33	0,28	0,16	0,26	4,51	3,87	3,87	2,98	4,10	4,33	2,92	3,66
chemicky	0,33	0,28	0,16	0,26	2,72	2,06	1,42	3,86	1,90	1,88	1,34	1,92
PL	0,25	0,22	0,11	0,28	2,95	1,59	2,01	2,32	2,53	2,36	1,49	2,25
PCH	0,28	0,20	0,11	0,23	2,02	1,91	1,47	1,89	1,78	1,94	1,26	1,69

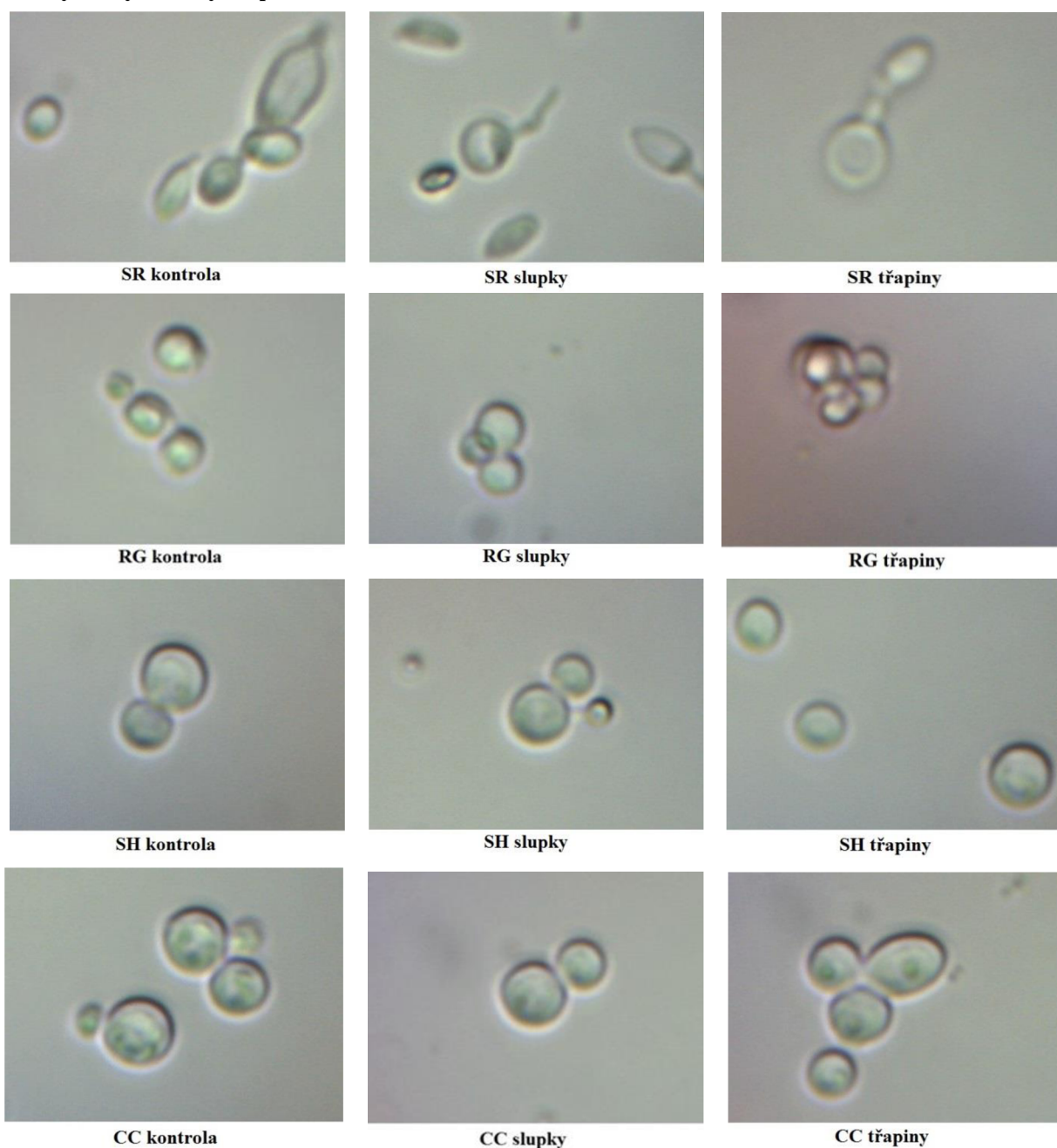
Tabulka 20 - Výtěžnostní koeficient β -karotenu ze substrátu

Y(P/S)	kontrola				slupky				třapiny			
	CC	RG	SR	SH	CC	RG	SR	SH	CC	RG	SR	SH
nehydrolyzované	104,8	83,5	125,3	21,1	193,2	132,2	603,6	207,4	534,1	216,8	1191,6	61,6
chemicky	103,7	83,4	125,3	21,0	138,2	139,2	606,8	177,0	190,8	141,0	395,9	386,0
PL	12,4	15,7	20,0	2,8	472,6	35,8	602,2	156,7	481,0	731,3	567,6	936,6
PCH	162,2	90,3	19,9	4,8	96,0	103,0	458,2	68,0	640,6	335,8	778,0	2,7

5.8 Morfologické změny kvasinek

Kultivace za působení stresových faktorů má různý vliv na morfologii buňky. Změny morfologie jednotlivých kmenů kvasinek kultivovaných na upravených odpadních substrátech byly pozorovány pod mikroskopem a jejich mikroskopické snímky níže dokumentují reakce buněk na kultivační médium.

Nehydrolyzovaný odpadní substrát

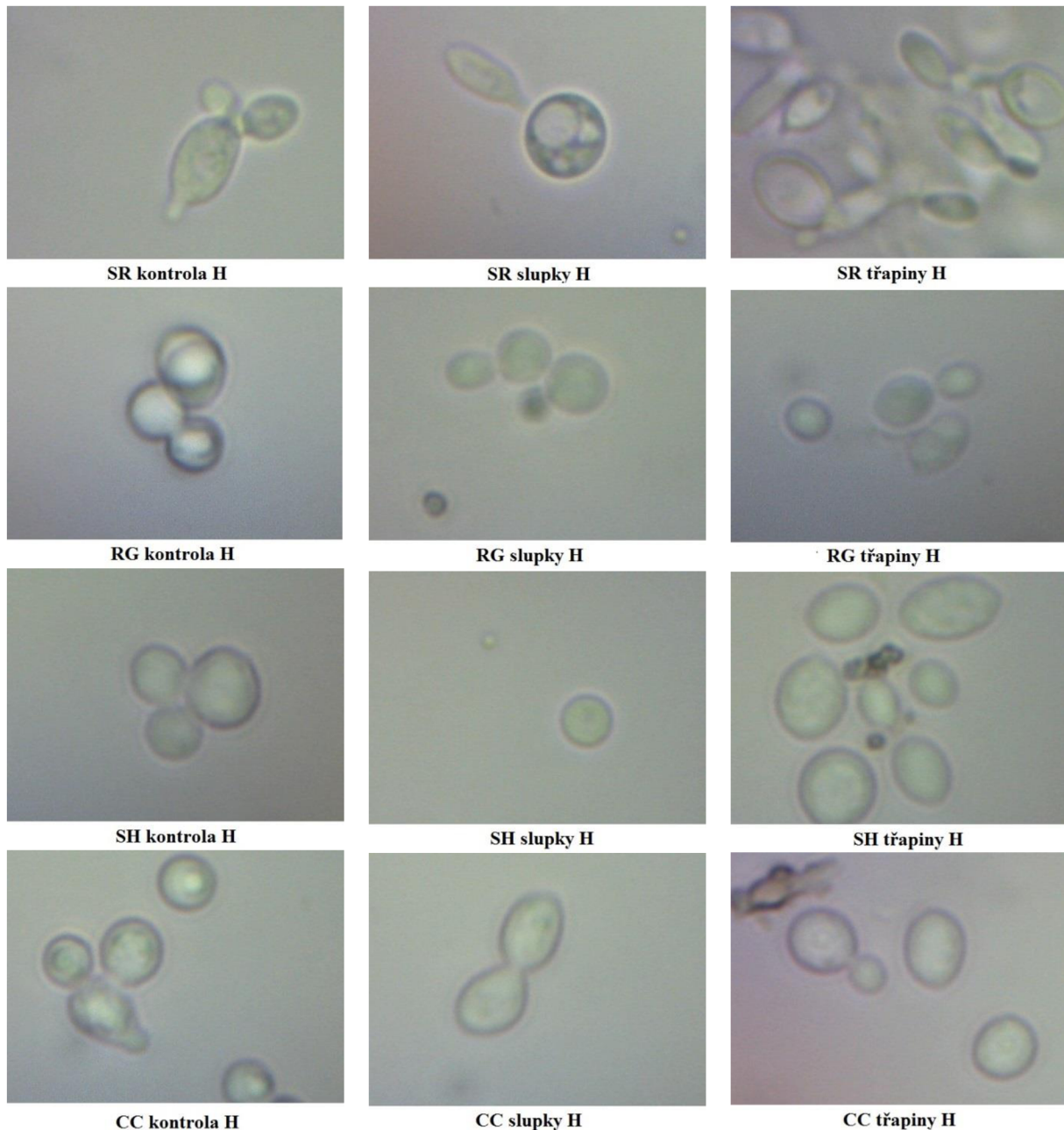


Obrázek 7 - Mikroskopické snímky kvasinek kultivovaných na nehydrolyzovaném odpadním substrátu

Jednotlivé kmeny kvasinek kultivované na kontrolních médiích vykazují pro ně typický tvar buněk bez zakřivení buněčné stěny či jiných viditelných odlišností. U kvasinky *S. roseus*

kultivované na slupkách pozorujeme různé odchylky od obvyklého tvaru buňky, v buňce *S. roseus* kultivované na třápinách zase pozorujeme velkou vakuolu indikující reakci buňky na nízký obsah živin v médiu. *R. glutinis* tvoří na slupkách i třápinách shluky buněk typické pro kultivaci za působení stresových faktorů. Buňky *S. shibatanus* nevykazují velké odchylky od obvyklého tvaru na rozdíl od *C. capitatum* kultivovaného na třápinách, kde můžeme pozorovat prakticky všechny hlavní znaky kultivace pod stresem - shluky buněk, velké vakuoly uvnitř buněk a různé odchylky od obvyklého tvaru buněk.

Chemicky hydrolyzovaný odpadní substrát

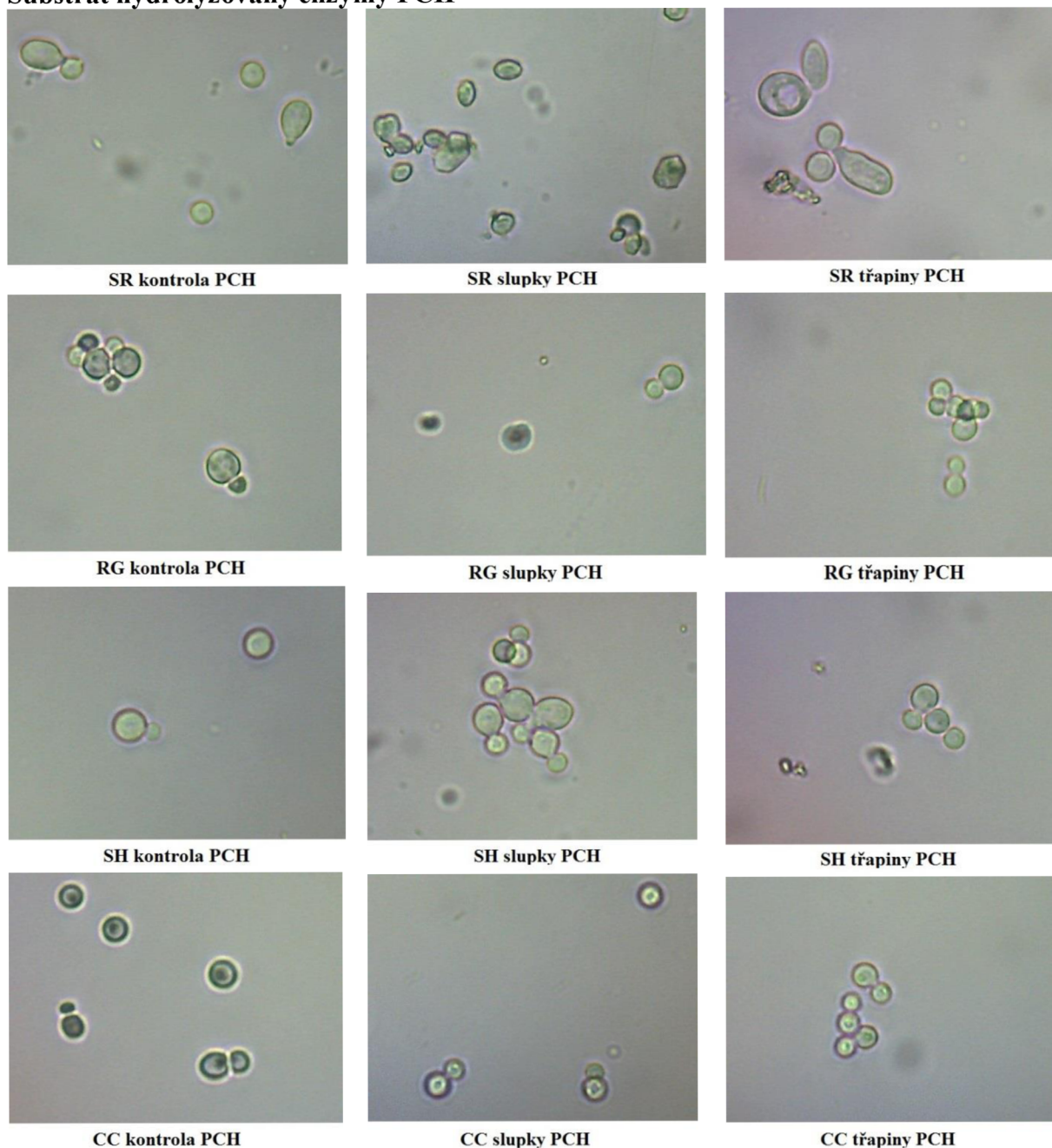


Obrázek 8 - Mikroskopické snímky kvasinek kultivovaných na chemicky hydrolyzovaném odpadním substrátu

S. roseus kultivovaná na chemicky hydrolyzovaných slupkách vykazuje odchýlení od obvyklého oválného tvaru a také je zde dobře pozorovatelná velká vakuola. Při kultivaci na

třapinách se buňky jako reakci na stresové prostředí shlukují. *R. glutinis* kultivovaná na obou odpadních médiích vytváří o poznání menší buňky rozličných tvarů než na kontrolním médiu. Buňky *S. shibatanus* kultivované na slupkách nevykazují oproti kontrole významné změny morfologie, naopak na třapinách vidíme, že jsou buňky více tvarově i velikostně rozmanité a shlukují se. *C. capitatum* nevykazuje žádné velké změny, zdá se, že stresové faktory neměly na morfologii významný vliv.

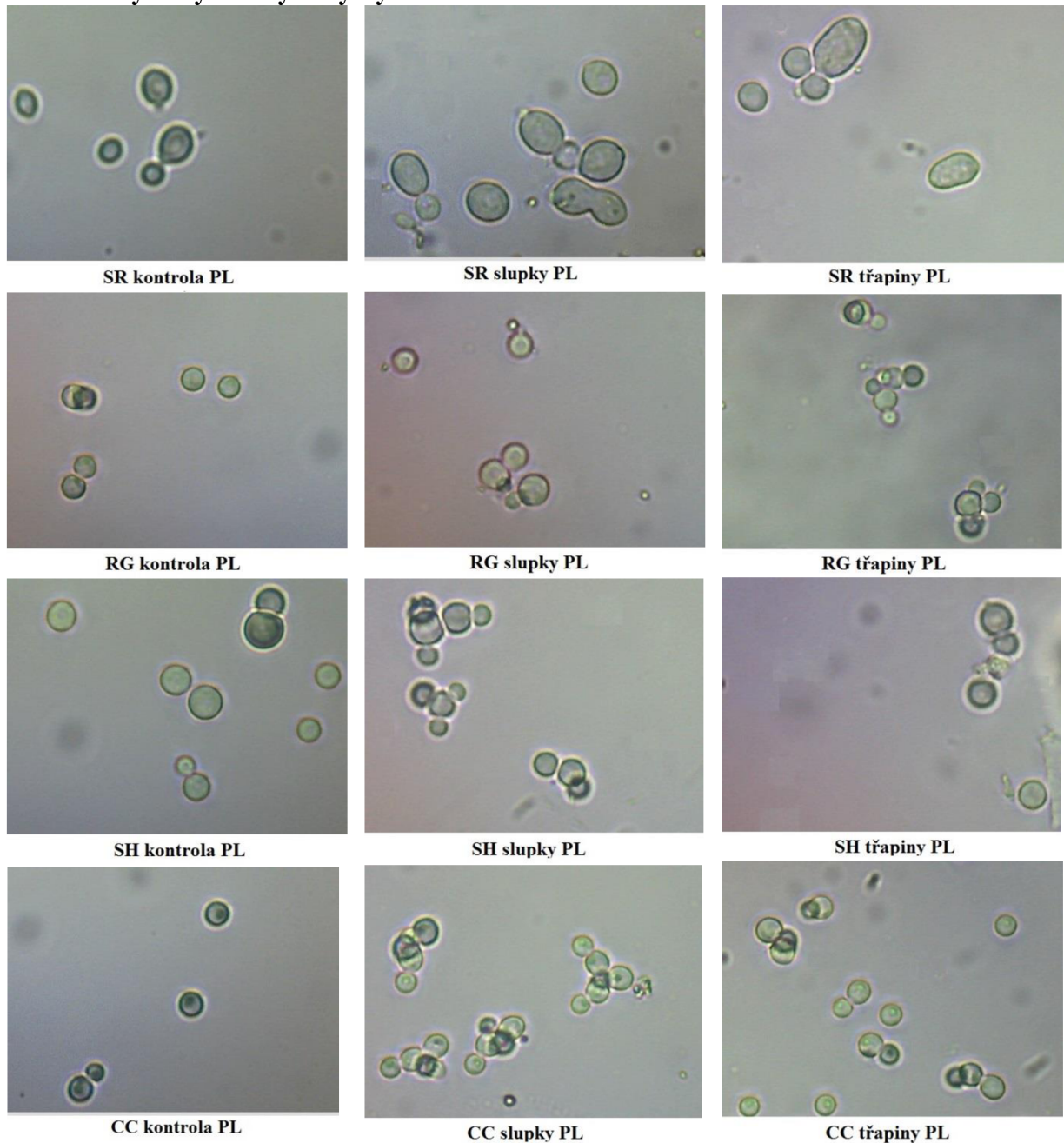
Substrát hydrolyzovaný enzymy PCH



Obrázek 9 - Mikroskopické snímky kvasinek kultivovaných na enzymově hydrolyzovaném substrátu (PCH)

S. roseus kultivovaná na slupkách i třapinách má značně deformované tvary buněk o různé velikosti. Tady jsou však buňky poněkud větší, rozměrem bližší buňkám v kontrolním médiu. Na třapinách je vidět i vyvinutá vakuola. U *R. glutinis* vyjma poněkud menšího tvaru buněk nejsou pozorovatelné výrazné morfologické odlišnosti, na třapinách pak jsou opět vytvářeny početné shluky buněk. Velký shluk buněk různé velikosti i tvaru vytváří *S. shibatanus* kultivovaná na slupkách. *C. capitatum* vytváří na kontrolním médiu pravidelné kulaté buňky přibližně stejné velikosti, na odpadních médiích jsou buňky menší a na třapinách vytváří shluky.

Substrát hydrolyzovaný enzymy PL



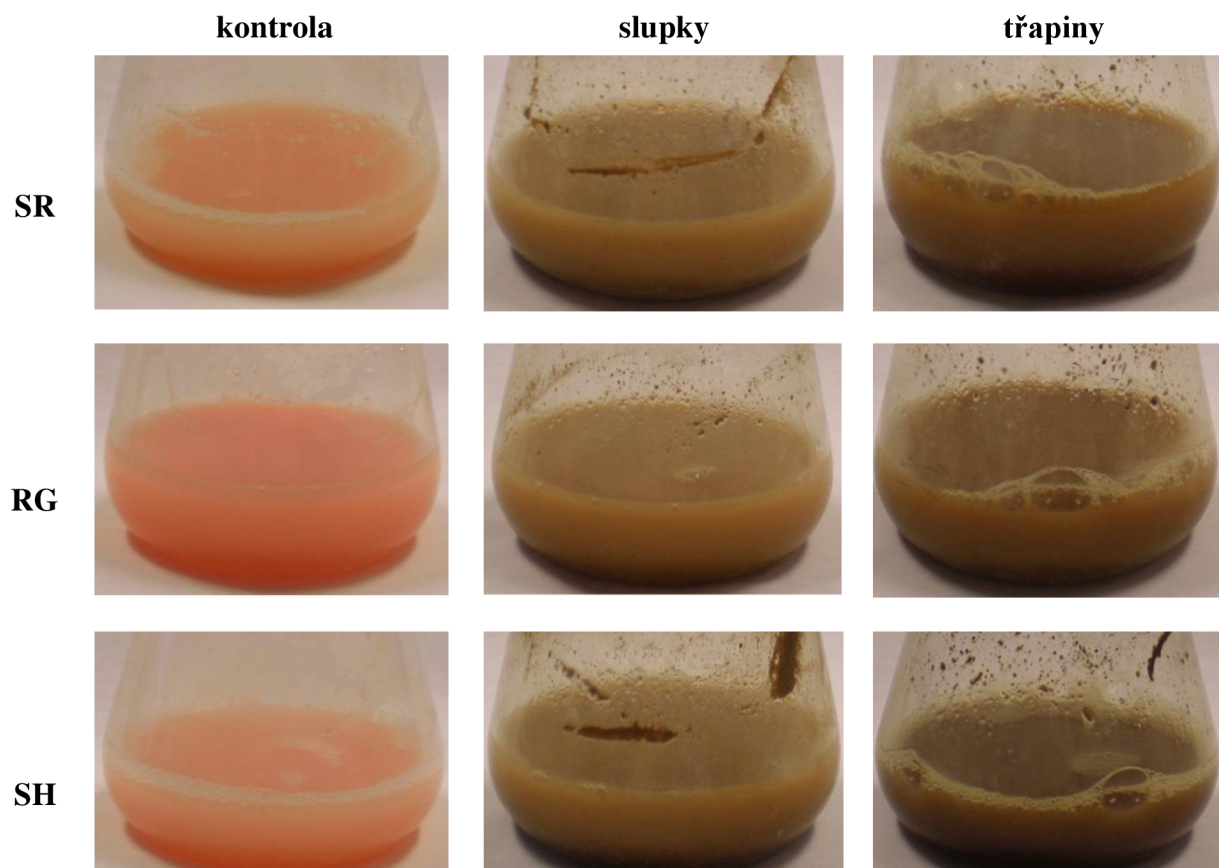
Obrázek 10 - Mikroskopické snímky kvasinek kultivovaných na enzymově hydrolyzovaném substrátu (PL)

Buňky kvasinek kultivovaných na kontrolních médiích si zachovávají svůj charakteristický tvar, kromě *S. roseus*, jejíž buňky jsou oproti obvyklému tvaru o něco kulatější. Buňky kvasinek všech kmenů kultivovaných na odpadních substrátech vytváří pod stresovým prostředím shluky. Největší počet shluků tvořený velkým počtem nestejnorodě tvarovaných buněk pozorujeme u *C. capitatum* kultivovaného na slupkách. *S. roseus* vytváří na odpadních substrátech větší buňky, jejich tvar je ale různý a liší se od obvyklého.

5.9 Vizuální odhad produkce

Pro ukázkou vizuálního odhadu produkce ze zabarvení kultivačních médií byla vybrána kultivace na nehydrolyzovaném odpadním substrátu. Na základě pozorování zabarvení dané kultury je možno zhruba odhadnout produkci pigmentů daného kmene. Typy karotenových pigmentů (β -karoten, torulen, atd.) jsou produkovány v závislosti na kultivačních podmínkách a kvasinkovém druhu. Změny zabarvení je možné porovnávat s kontrolním médiem už během samotné kultivace.

Na třapinách i na slupkách má nejsytější zabarvení *S. roseus*. Nejsvětlejší médium indikující nízkou produkci karotenoidů pak vidíme u *C. Capitatum*, a to jak na slupkách, tak i na třapinách. Médium s třapinami je vždy tmavší, neboť i samotný substrát suspendovaný ve vodě má oproti slupkám sytější barvu. Vizuální porovnání produkce karotenoidů mezi těmito dvěma typy odpadních substrátů tak není směrodatné.



CC



Obrázek 11 - Fotodokumentace kultivací na nehydrolyzovaném substrátu

Z fotek následujících kultivací bylo velmi obtížné odhadovat produkce karotenoidů a srovnávat je mezi sebou, protože média jsou zabarvena odpadními substráty. Z tohoto důvodu je zobrazena a okomentována jen první série kultivací, kde bylo překrytí zabarvení substrátem nejméně rušící.

5.10 Závěrečné shrnutí výsledků kultivací

Celkově nejvyšší dosažené produkce biomasy i sledovaných metabolitů na jednotlivých typech médií shrnuje tabulka 21. Nejvyšších produkcí sledovaných metabolitů bylo dosaženo na třapinách hydrolyzovaných plísní *P. chrysosporium* kvasinkou *S. roseus*. Nejvyšší produkce biomasy dosáhla *C. capitatum* na nehydrolyzovaných slupkách.

Tabulka 21 - Nejvyšší produkce biomasy (g/l) a sledovaných metabolitů na odpadech (μg/g sušiny)

	nehydrolyzované		chemicky hydrolyzované		enzymově hydrolyzované (PCH)		enzymově hydrolyzované (PL)	
sušina	12,381	CC slupky	10,139	CC slupky	9,333	CC slupky	10,018	CC třapiny
celkové karotenoidy	544,4	SR třapiny	595,6	SR slupky	753,6	SR třapiny	615,0	SH třapiny
β-karoten	407,7	SR třapiny	427,8	SR slupky	616,1	SR třapiny	415,5	SH třapiny
ergosterol	415,5	SR třapiny	489,9	SR slupky	533,1	SR třapiny	441,9	SH třapiny
koenzym Q	24,5	CC třapiny	27,4	CC třapiny	77,9	SR třapiny	60,0	CC slupky

Tabulka 22 - Nejvyšší výtěžnostní koeficienty biomasy a β-karotenu ze substrátu

	nehydrolyzované		chemicky hydrolyzované		enzymově hydrolyzované (PCH)		enzymově hydrolyzované (PL)	
Y (X/S)	4,51	CC slupky	3,86	SH slupky	1,94	RG třapiny	2,95	CC slupky
Y (P/S)	1 191,6	SR třapiny	606,8	SR slupky	778,0	SR třapiny	936,6	SH třapiny

6 ZÁVĚR

Cílem práce bylo sledování produkce metabolitů jednotlivých kmenů karotenogenních kvasinek kultivovaných na odpadním substrátu z vinařství. Kvasinky byly nejprve kultivovány na nehydrolyzovaných odpadech, poté byly kultivační podmínky optimalizovány a odpady hydrolyzovány dvěma různými způsoby. Hydrolyzou odpadů došlo k vyššímu uvolnění redukujících sacharidů a kvasinky tak měly pro svůj růst a tvorbu metabolitů k dispozici energeticky bohatší substrát. Ve všech médiích před kultivací a po kultivaci byl stanoven obsah redukujících sacharidů a v produkčních médiích analyzována koncentrace sledovaných metabolitů - celkových karotenoidů, β -karotenu, ergosterolu a koenzymu Q. Z těchto hodnot byly následně vypočítány také výtěžnostní koeficienty biomasy a β -karotenu. V použitých enzymových preparátech byly stanoveny aktivity vybraných hydrolytických enzymů.

Převážná většina nejvyšších produkcí sledovaných metabolitů byla dosažena na třapínách, jenom malá část vysokých výtěžků na slupkách. Kmenem s nejlepšími produkčními vlastnostmi byla kvasinka *S. roseus* a médiem s nejvyššími produkcemi metabolitů byly třapiny hydrolyzované enzymy plísně *P. chrysosporium*. Celkově nejvyšších produkcí sledovaných metabolitů bylo dosaženo kultivací kvasinky *S. roseus* na třapínách hydrolyzovaných plísní *P. chrysosporium*.

Srovnáním výtěžnostních koeficientů biomasy je patrné, že *S. roseus* je kvasinkou, která nejlépe dokázala využívat poskytnuté zdroje energie k produkci β -karotenu. Kvasinka *C. capitatum* zase vykazovala nejlepší poměr mezi spotřebou cukrů a tvorbou biomasy. Přestože absolutní výtěžky biomasy i sledovaných metabolitů byly na nehydrolyzovaných odpadech nižší než v ostatních sériích kultivací, výtěžnostní koeficienty jsou zde nejvyšší. Kvasinky tedy dokázaly i přes velmi omezený obsah živin produkovat biomasu i β -karoten v nezanedbatelném množství.

V kontrolních glukózových médiích není produkce sledovaných látek tak vysoká, jak by odpovídalo množství poskytnutých využitelných sacharidů. S ohledem na obsah utilizovatelných cukrů v médiích s odpadním substrátem je naopak produkce sledovaných látek velmi uspokojivá. Kombinací enzymové hydrolyzy a následné kultivace karotenogenních kvasinek na takto upraveném odpadním substrátu je možno dosáhnout zvýšené produkce biomasy i karotenogenních pigmentů. Důvodem výše uvedeného rozporu může být aktivace stresových mechanismů spojená se zvýšenou produkcí pigmentů i se zvýšeným transportem substrátů do buněk.

7 ZDROJE

- [1] NĚMEC, Miroslav a Dana HORÁKOVÁ. *Základy mikrobiologie pro učitelské studium*. 2. vyd. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 1993, 233 s. ISBN 80-210-0817-2.
- [2] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008, 363 s. ISBN 978-802-0017-031.
- [3] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 2002, Přer. str. ISBN 80-200-0600-1.
- [4] The Libra Centre Library: Yeast as a model organism. *The Libra Centre Article Database* [online]. 1999, 2014 [cit. 2014-12-22]. Dostupné z: <http://www.libracentre.co.uk/library/ex36yeast.html>
- [5] WALKER, Graeme M. *Yeast Physiology and Biotechnology*. Chichester: John Wiley and Sons Ltd., 1998, 350 s. ISBN 04-719-6446-8.
- [6] ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Překlad Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek, Pavel Hozák. Ústí nad Labem: Espero, c1998, 1 sv. (různé stránkování). ISBN 80-902-9062-0.
- [7] Microbial growth. *Midlands technical college* [online]. 2004 [cit. 2015-03-27]. Dostupné z: <http://classes.midlandstech.edu/carterp/courses/bio225/chap06/Microbial%20Growth%20ss1.htm>
- [8] Biochemie sekundárních metabolitů. 2014, 34 s. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/kch/download/sylaby/biochemiesekmet.pdf>
- [9] *The yeasts: a taxonomic study*. 5th ed. Editor C Kurtzman, Jack W Fell, Teunis Boekhout. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 2011, xxii, 289, 48, 178 s. ISBN 978-012-3847-089.
- [10] VALDUGA, Eunice, RIBEIRO, Karine CENCE, Rosicler COLET, Lídia TIGGEMANN, Jamile ZENI a Geciane TONIAZZO. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2014, Volume 3, Issue 2, s. 207-213. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187881811300114X>
- [11] US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *Assessment Plan for Corn Steep Liquor*. 2006, 10 s. Dostupné z: <http://www.epa.gov/hpv/pubs/summaries/cornstlq/c16469tp.pdf>
- [12] GLYCONA. *Produktový list: Surový glycerol*. 2015. Dostupné z: <http://www.glycona.cz/file.php?nid=8100&oid=1542311>
- [13] T. Schneider, S. Graeff-Hönninger, W.T. French, R. Hernandez, N. Merkt, W. Claupein, M. Hetrick, P. Pham, Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents, *Energy*, Volume 61, 1 November 2013, Pages 34-43, ISSN 0360-5442, <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2012.12.026>
- [14] OBRUCA, S. et al., Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids, *New Biotechnol.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2015.02.008>
- [15] Siniša Petrik, Stanislav Obruča, Pavla Benešová, Ivana Márová, Bioconversion of spent coffee grounds into carotenoids and other valuable metabolites by selected red yeast strains,

Biochemical Engineering Journal, Volume 90, 15 September 2014, Pages 307-315, ISSN 1369-703X, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.06.025>.

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X14001910>)

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

[17] Hrozen jako surovina. Vinařství [online]. 2015 [cit. 2015-04-26]. Dostupné z: <http://www.wine.cz/revai/>

[18] Vinařství: Výroba bílého vína. Kiwi [online]. 2014 [cit. 2015-04-26]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=1190

[19] BRITTON, George. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal* [online]. 1995, vol. 9, issue 15, s. 1551-1558 [cit. 2014-12-11]. Dostupné z: <http://www.fasebj.org/content/9/15/1551.full.pdf+html?sid=a6650586-15d3-4efa-8be5-f1dfb34cfa37>

[20] DOUŠA, Michal. Vlastnosti karotenoidů. *News from HPLC analysis* [online]. 2004 [cit. 2014-12-11]. Dostupné z: http://hplc1.sweb.cz/Carotenoids/ch_karotenoids.htm

[21] FRENGOVA, Ginka I. a Dora M. BESHKOVA. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology* [online]. 2009, vol. 36, issue 2, s. 163-180 [cit. 2014-12-11]. DOI: 10.1007/s10295-008-0492-9. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-008-0492-9>

[22] JAGANNADHAM, M.V. The structure of carotenoids [3]. *Trends in Ecology and Evolution* [online]. 1990, vol. 14, issue 6, s. 236 [cit. 2014-12-18]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0169534799016249>

[23] BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004-1-1, vol. 63, issue 4, s. 351-361. DOI: 10.1007/s00253-003-1441-1. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-003-1441-1>

[24] LEE, P.C. a C. SCHMIDT-DANNERT. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2003, vol. 60, 1-2, s. 1-11 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1007/s00253-002-1101-x. Dostupné z: <http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/884616461/fulltextPDF/D290E2C83E364D6APQ/2?accountid=17115>

[25] VÝMOLOVÁ, M. Využití odpadů z výroby vína pro potravinářské a kosmetické účely. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CC	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>
RG	<i>Rhodotorula glutinis</i>
SR	<i>Sporobolomyces roseus</i>
SH	<i>Sporobolomyces shibatanus</i>
PCH	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
PL	<i>Penicillium lilacinum</i>