

# 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

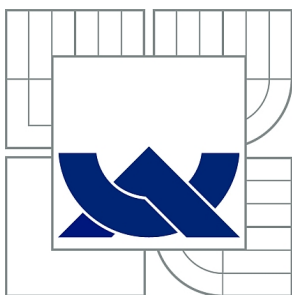
PRODUKCE VYBRANÝCH KVASINKOVÝCH METABOLITŮ  
VYUŽITELNÝCH DO POTRAVINOVÝCH DOPLŇKŮ

DIZERTAČNÍ PRÁCE  
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

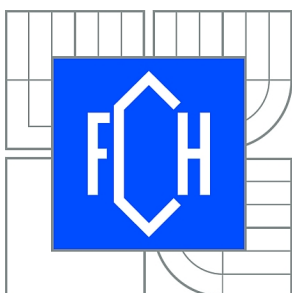
Ing. ANDREA HÁRONIKOVÁ

BRNO 2014



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 KVASINKOVÝCH METABOLITŮ VYUŽITELNÝCH DO POTRAVINOVÝCH DOPLŇKŮ

PRODUCTION OF SELECTED YEAST METABOLITES APPLICABLE TO FOOD SUPPLEMENTS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. ANDREA HÁRONIKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2014



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

## Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce:	<b>FCH-DIZ0100/2013</b>	Akademický rok: <b>2013/2014</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Ing. Andrea Hároniková</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (P2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901V021)	
Vedoucí práce	<b>doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.</b>	
Konzultanti:		

### Název dizertační práce:

Produkce vybraných kvasinkových metabolitů využitelných do potravinových doplňků

### Zadání dizertační práce:

Cílem práce bude regulovaná produkce vybraných mikrobiálních metabolitů využitelných při přípravě a zpracování některých typů potravinových doplňků.

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše zaměřená na přehled kvasinkových producentů lipidických látek a obohacené biomasy a možnosti regulace jejich produkce
- 2) optimalizace kultivace vybraných kmenů na odpadních substrátech včetně postupů úpravy substrátů
- 3) analýza produkce biomasy a vybraných metabolitů v průběhu kultivace na odpadech
- 4) využití náhodné mutageneze k selekci mutantů schopných využívat odpadní substráty
- 5) využití moderních instrumentálních metod ke sledování regulačních mechanismů v rámci metabolismu kvasinek
- 6) možnosti praktického využití výsledků.

### Termín odevzdání dizertační práce: 31.8.2014

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

-----  
Ing. Andrea Hároniková  
Student(ka)

-----  
doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.2.2014

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Karotenoidy sú prirodzene sa vyskytujúce pigmenty rastlín, ktoré sú tiež produkované mnohými baktériami a hubami. Predstavujú jednu z najviac rozšírených skupín prírodných antioxidantov s významnými biologickými účinkami a mnohými priemyselnými aplikáciami. V tomto smere je zvýšený záujem o karotenoidy ako prirodzené antioxidanty, ktoré majú mimo iné schopnosť znižovať prejavy chronických ochorení, patologických stavov u ľudí a celkovo spomaľujú proces stárnutia. Používajú sa prevažne v potravinárskom priemysle, ale hojne sú využívané aj v chemickom, farmaceutickom či kozmetickom priemysle. Jednou z možností získavania týchto látok je využívanie potenciálu červených kvasiniek, ktoré sú schopné prevádzať rôzne substráty v karoténové pigmenty.

V predloženej práci boli testované kvasinky patriace do rodov *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* a *Cystofilobasidium* z hľadiska využívania vybraných odpadových substrátov. Boli tiež podrobené náhodnej mutagenéze za účelom zvýšenia produkcie biomasy a špecifických metabolitov – karotenoidov a iných lipidických látok.

Ako alternatívne nutričné zdroje boli testované odpadové substráty z poľnohospodárskej a potravinárskej výroby (repka, ryža, pšeničné otruby, jablčná vláknina, cestoviny a lignocelulózoové materiály). V niektorých produkčných médiách boli odpadové materiály hydrolyzované extracelulárnymi hydrolytickými enzýmami alebo komerčnými enzýmami za cieľom rozloženia komplexných sacharidických substrátov na jednoduché cukry využiteľné kvasinkami. Všetky testované kvasinkové kmene boli schopné využívať tieto odpadové materiály ako jediný zdroj uhlíka a zároveň produkovať pigmenty a obohatenú biomasu.

V tejto práci bola študovaná charakterizácia karotenogénnych kvasiniek využitím molekulárnych techník. K tomuto účelu boli amplifikované medzidruhovú konzervované sekvencie genómovej DNA, špeciálne oblasti rDNA D1/D2 ribozomálnej podjednotky a úseky ITS1 a 5,8-ITS2 rDNA. Tieto sekvencie boli podrobené analýze pomocou metódy DGGE k porovnaniu odlišností medzi jednotlivými karotenogénnymi kvasinkami. Technika izolácie intaktnej DNA bola optimalizovaná pre karyotypovú charakterizáciu kvasiniek metódou pulznej elektroforézy (PFGE). Jednotlivé karyotypy testovaných kvasiniek obsahovali viditeľné odlišnosti medzi kvasinkovými druhmi a rodmi.

### KLÚČOVÉ SLOVÁ:

Karotenogénne kvasinky, karotenoidy, odpadové substráty, molekulárna charakterizácia

## **ABSTRACT**

Carotenoids are naturally occurring pigments of plants also produced in many bacteria, and fungi. They represent one of the widest group of natural antioxidants with significant biological effects and numerous of industrial applications. There is an increased interest in carotenoids as natural antioxidants for their ability to reduce chronic diseases, various pathological stages and aging. The area of their application concerns mainly food industry; however, they are used in chemical, pharmaceutical, and cosmetics industry as well. One possibility is study of potential of red yeasts that are able to convert various substrates into carotenoid pigments.

In presented thesis carotenogenic yeast belonging to the genus *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* and *Cystofilobasidium* were tested for ability to use of selected waste substrates and also random mutagenesis in order to increase the production of biomass and specific metabolites – carotenoids and other lipid-soluble substances.

As alternative nutrient sources derived from waste substrates from agricultural and food production (rapeseed substrate, rice, wheat, apple fiber, pasta and lignocellulosic materials) were tested. To selected production media extracellular hydrolytic enzymes or commercial enzymes degrading polysaccharide were added. All tested red yeast strains were able to utilize these substrates as the only carbon source and simultaneous produce carotenoid enriched biomass.

In this work, characterization of carotenogenic yeast using molecular techniques was studied. For this usage, interspecific variables of strongly conserved sequences of genomic DNA, especially rDNA D1/D2 large ribosomal subunit and ITS1 and 5,8-ITS2 rDNA regions were amplified. These sequences were subjected analysed by DGGE method to compare differences of carotenogenic yeasts. Isolation procedure of the intact DNA were optimized for caryotypic yeast characterization by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). The karyotype of tested yeasts contain visible differences between yeast species and genera.

## **KEYWORDS:**

Carotenogenic yeasts, carotenoids, waste substrates, molecular characterization

HÁRONIKOVÁ, A. *Produkce vybraných kvasinkových metabolitů využitelných do potravinových doplňků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 141 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

## PREHLÁSENIE

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

.....  
podpis študenta

### *Podakovanie:*

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

*Práca bola podporená z prostriedkov projektu " Centrum materiálového výskumu na FCH VUT v Brne" registrovaného pod číslom CZ.1.05/2.1.00/01.0012 ERFD a projektu "PhD Talent" statutárneho mesta Brna ako súčasť Regionálnej inovačnej stratégie.*

# OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Kvasinky a rast .....	10
2.1	Požiadavky kvasiniek .....	10
2.1.1	Nutričné požiadavky .....	10
2.1.2	Fyzikálne požiadavky na rast kvasiniek.....	10
2.1.3	Iné faktory prostredia .....	11
2.2	Kultivácia kvasiniek .....	11
2.3	Stresové prostredia .....	12
2.3.1	Teplotný stres .....	12
2.3.2	Oxidačný stres .....	13
2.3.3	Osmotický a solný stres .....	14
2.3.4	Nutričný stres, nutričné zdroje .....	15
3	Karotenogénne kvasinky .....	19
3.1	Všeobecná charakteristika karotenogénnych kvasiniek .....	19
3.1.1	Rod <i>Rhodotorula</i> .....	19
3.1.2	Rod <i>Sporobolomyces</i> .....	19
3.1.3	Rod <i>Cystofilobasidium</i> .....	20
3.2	Kvasinkový rast a metabolizmus.....	20
3.3	Cytologické metódy na sledovanie kvasiniek .....	21
3.3.1	Svetelná a fluorescenčná mikroskopia .....	21
3.3.2	Elektrónová mikroskopia .....	22
3.3.3	Prietoková cytometria .....	22
3.3.4	Meranie množstva bunecnej biomasy .....	23
3.3.5	Rýchla detekcia a identifikácia dôležitých molekúl v biologickom materiále – Ramanova spektroskopia.....	23
3.3.6	Izolácia kvasinkových organel, metabolitov .....	24
4	Karotenoidy – pigmenty červených kvasiniek .....	25
4.1	Chemická štruktúra a fyzikálne vlastnosti karotenoidov.....	25
4.2	Funkcie karotenoidov .....	25
4.3	Biosyntéza karotenoidov .....	26
4.4	Biosyntéza sterolov.....	27
4.5	Biosyntéza lipidov .....	28
4.6	Analýza karotenoidov a lipidických látok .....	29
5	Efekt nutričného a fyziologického stresu na produkciu biomasy a karotenoidov červených kvasiniek .....	31
6	Možnosti molekulárnych charakteristík kvasiniek.....	33
6.1	PCR v spojení s DGGE .....	34
6.2	PFGE – analýza karyotypu kvasiniek.....	35
6.3	Molekulárne charakteristiky a posúdenie vplyvu extémnych podmienok .....	35
6.3.1	Environmentálne stresové odpovede u kvasiniek .....	37
7	Ciele práce.....	41
8	Experimentálna časť .....	42
8.1	Použité chemikálie.....	42
8.1.2	Chemikálie .....	42
8.1.3	Enzýmy.....	43
8.1.4	Použité mikroorganizmy.....	43

8.1.5	Použitie prístroje a pomôcky .....	43
8.1.6	Materiál .....	44
8.2	Kultivácia karotenogénnych kmeňov .....	44
8.2.1	Zloženie kultivačných médií .....	45
8.2.2	Podmienky kultivácie .....	45
8.2.3	Úchova kvasinkových kmeňov .....	45
8.2.4	Kultivácia na rôznych odpadových substrátoch .....	45
8.2.5	Enzymatická hydrolýza odpadových materiálov .....	46
8.2.6	Kultivácie na odpadových materiáloch s prídavkom mutagénu .....	47
8.2.7	Hydrotermická hydrolýza lignocelulóзовých materiálov .....	48
8.3	Stanovenie sacharidov u hydrolyzovaných odpadových materiáloch a v kultivačných médiách .....	49
8.3.1	Stanovenie redukujúcich sacharidov metódou Somogyi-Nelsona .....	49
8.3.2	Stanovenie jednotlivých monosacharidov metódou HPLC/RI .....	50
8.4	Stanovenie celkového dusíku metódou Kjeldahla .....	50
8.5	Rastové charakteristiky .....	50
8.6	Mikroskopické pozorovanie morfológických zmien kvasiniek .....	51
8.7	Detekcia a identifikácia dôležitých molekúl Ramanovou mikrospektrometriou a fluorescenčnou mikroskopiou .....	51
8.8	Izolácia a analýza karotenoidov .....	52
8.9	Charakterizácia kvasiniek molekulárnymi technikami .....	53
8.9.1	Izolácia kvasinkovej DNA .....	53
8.9.2	PCR .....	54
8.9.3	Denaturačná gradientová gélová elektroforéza .....	56
8.9.4	Pulzná gélová elektroforéza .....	57
9	Výsledky a diskusia .....	58
9.1	Kultivácia karotenogénnych kvasiniek .....	58
9.1.1	Rastové charakteristiky .....	58
9.1.2	Produkčné vlastnosti karotenogénnych kvasiniek na rôznych odpadových substrátoch .....	60
9.1.3	Kultivácie na neupravených odpadových substrátoch .....	63
9.1.4	Kultivácia karotenogénnych kvasiniek na hydrolyzovaných odpadových substrátoch .....	65
9.1.5	Kultivácia karotenogénnych kvasiniek na odpadových substrátoch s prídavkom mutagénu .....	71
9.1.6	Kultivácia karotenogénnych kvasiniek na lignocelulóзовých odpadoch .....	85
9.2	Morfológia karotenogénnych kvasiniek .....	92
9.2.1	Morfológia kvasiniek kultivovaných na nehydrolyzovaných odpadových materiáloch .....	93
9.2.2	Morfológia kvasiniek kultivovaných na hydrolyzovaných odpadových materiáloch .....	93
9.2.3	Morfológia kvasiniek kultivovaných na hydrolyzovaných odpadových materiáloch v prítomnosti mutagénu .....	95
9.3	Vizuálne charakteristiky karotenoidovej produkcie u červených kvasiniek .....	98
9.3.1	Kultivácia kvasiniek na nehydrolyzovaných odpadových materiáloch .....	98
9.3.2	Kultivácie kvasiniek na hydrolyzovaných odpadových materiáloch .....	99
9.3.3	Kultivácie kvasiniek na odpadových materiáloch v prítomnosti mutagénu ..	100
9.4	Detekcia kvasinkových metabolitov pomocou Ramanovej mikro-spektrometrie a fluorescenčnej mikroskopie .....	101
9.5	Charakterizácia karotenogénnych kvasiniek molekulárnymi technikami .....	104

9.5.1	Využitie denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy.....	104
9.5.2	Karyotypová analýza karotenogénnych kvasiniek .....	115
9.6	Možnosti využitia karotenogénnych kvasiniek v praxi .....	118
10	Závery.....	124
11	Použitá literatúra .....	128
12	Zoznam skratiek a symbolov.....	137
13	Prílohy .....	138

# 1 ÚVOD

Kvasinky sú rýchlo rastúce jednobunečné eukaryotá, vyskytujúce sa v pôde, vode, na rastlinách a živočíchoch, a tiež v potravinách. Tieto prostredia predstavujú pre kvasinky zdroj živín a priestor pre ich rast a metabolizmus. Rovnako tak však sú bunky neustále vystavované meniacim sa vplyvom okolitého prostredia. Ich prežitie tak závisí na schopnosti odolávať týmto vplyvom a prispôbovať sa novým podmienkam napríklad využívaním rôznych alternatívnych zdrojov živín.

Kvasinky sú využívané v rôznych odvetiach biotechnologického priemyslu, hrajú hlavnú rolu prevažne v tradičných potravinárskych fermentáciách. Množstvo červených kvasinkových druhov je známych ako producenti karoténových pigmentov a ergosterolu, ubichinonu, či nenasýtených mastných kyselín. V súčasnej dobe sa používa množstvo biotechnologických stratégií na stimuláciu karoténovej biosyntézy u kvasiniek, pozornosť sa stále zameriava hlavne na selekciu nadprodukčných kmeňov cielenou modifikáciou kultivačných podmienok, využívaním náhodnej mutagenézy alebo pôsobením vhodných vonkajších faktorov. Celkový výťažok karotenoidov je priamo závislý na výťažku biomasy, preto je dôležité dosiahnuť optimálnych kultivačných podmienok, aby bola získaná maximálna produktivita pigmentov a iných sledovaných metabolitov. Kvasinky asimilujú množstvo uhlíkatých zdrojov ako je glukóza, xylóza, glycerol a iné. Ako lacné a zároveň ľahko dostupné substáty na kultiváciu môžu byť použité i rôzne odpadové materiály z agro-priemyselnej produkcie alebo rôzne modifikované lignocelulózoové materiály.

Životné prostredie je vysoko variabilné, v rôznych exogénnych stresových faktoroch neustále vplýva viac či menej na kvasinkové prežitie. Sledovanie stresových odpovedí u kvasiniek môže viesť k pochopeniu mechanizmov využívania stresových podmienok k zvýšenej akumulácii priemyslovo významných metabolitov. Použitie kvasinkovej biomasy s prirodzene vyšším obsahom aktívnych substrancií v krmnom priemysle môže mať pozitívny efekt nielen u zvierat, ale môže vplývať na zvýšenie nutričnú hodnotu a organoleptické vlastnosti konečných produktov použitých k výžive ľudí.

## **2 KVASINKY A RAST**

Kvasinky sú všadeprítomné mikroorganizmy. Vyskytujú sa v pôde, vzduchu, morskej vode, na rastlinách, sú obvykle prítomné na zvieratách, a tiež ich môžeme nájsť vo výrobkoch ako sú rôzne potraviny i v potravinárskych výrobných prevádzkach.

Životné prostredie predstavuje pre kvasinky zdroj nutričných látok a priestor pre ich rast a metabolizmus. Na druhej strane, kvasinky sú neustále vystavené nespočetným zmenám v podmienkach prostredia. Tieto podmienky ovplyvňujú metabolickú aktivitu, rast a samotné prežívanie kvasiniek. Základné vedomosti o vplyve faktorov prostredia sú dôležité v rámci pochopenia ekológie a biodiverzity kvasiniek, rovnako tak na kontrolu faktorov z prostredia, aby sa zlepšila využiteľnosť kvasiniek alebo naopak zastavila ich škodlivá aktivita (Waites et al 2001, Talaro and Talaro 2001).

### **2.1 Požiadavky kvasiniek**

Jednobunkové organizmy vyžadujú pre svoj rast a normálne fungovanie špecifické podmienky. Stav vo vnútri bunky je ovplyvnený chemickými, fyzikálnymi a biologickými faktormi z prostredia, kde rastú. Pochopenie týchto podmienok a požiadaviek kvasiniek je dôležitou súčasťou úspešnej kultivácie v laboratóriu alebo tiež v optimalizovaných priemyselných fermentačných procesoch (Walker 1998).

#### **2.1.1 Nutričné požiadavky**

Elementárne zloženie kvasinkových buniek poskytuje širokú nápovedu k nutričným požiadavkám kvasiniek. Kvasinky získavajú esenciálne prvky z ich rastového prostredia, napríklad z jednoduchých potravinárskych zdrojov, ktoré majú k dispozícii makronutrienty ako sú C, H, O, N, P, K, Mg a S alebo mikronutrienty, ako sú stopové prvky. Kvasinky sú chemoorganotrofné organizmy, ktoré využívajú organické komponenty ako zdroj uhlíka a energie (Walker 1998).

#### **2.1.2 Fyzikálne požiadavky na rast kvasiniek**

Mikroorganizmy všeobecne sú vystavené širokej škále faktorov z prostredia, okrem nutričných aj teplote, chladu, radiácii, kyselinám, tlaku, dokonca aj vplyvu iných mikroorganizmov (Walker 1998).

#### **Teplota**

Teplota je jedným z najdôležitejších fyzikálnych parametrov, ktoré ovplyvňujú kvasinkový rast. Každý mikroorganizmus vykazuje charakteristickú minimálnu, optimálnu a maximálnu teplotu pre rast. Podľa teplotných rastových oblastí, kvasinky delíme na psychrofilné, mezofilné a termofilné. Množstvo laboratórnych a priemyselných kvasiniek sú mezofily. Rastú približne v rozmedzí teplôt 20-30°C (Walker 1998).

## **Vodný potenciál**

Všetky životné procesy prebiehajú vo vode. Živé organizmy potrebujú vysokú koncentráciu vody pre svoj rast a metabolizmus. Rovnako tak ako v prípade teploty, kvasinky majú svoje hodnoty pre vodný potenciál ( minimálna, optimálna, maximálna). Mnoho mikroorganizmov existuje pod hypotonickými alebo isotonickými podmienkami. Halofily sa nazývajú mikroorganizmy, ktoré sa nachádzajú v prostrediach s vysokou koncentráciou rozpustených látok. Obligátne halofily žijú optimálne v 25% koncentrácii rozpustených solí, pre svoj rast však vyžadujú minimálne 9% koncentráciu solí. Fakultatívne halofily sú pozoruhodne rezistentné k soliam, aj keď nežijú v prostrediach s vysokými koncentraciami rozpustených látok. Mikroorganizmy, ktoré odolávajú vysokým osmotickým tlakom a zároveň dokážu v tomto prostredí rásť, sa nazývajú osmofily (Walker 1998).

## **pH prostredia**

Mnoho kvasiniek veľmi dobre rastie medzi hodnotami pH 4,5 až 6,5. Takmer všetky druhy sú však schopné rásť, hoci v menšej miere, i vo viac kyslom alebo alkalickom prostredí (Walker 1998, Talaro and Talaro 2001).

## **Kyslík**

S ohľadom na kyslíkové požiadavky delíme mikroorganizmy do niekoľkých kategórií. Aeróby využívajú kyslík v ich metabolizme. Organizmy, ktoré nemôžu rásť bez kyslíku, sa nazývajú obligátne aeróby. Fakultatívne anaeróby sú aeróby, ktoré sú schopné rásť bez kyslíku. Mikroaerofily nemôžu rásť v normálnom atmosférickom prostredí s kyslíkom, ale požadujú malé množstvo do ich metabolizmu. Anaeróby postrádajú metabolické enzýmové systémy na využitie kyslíka v respiračnom metabolizme. Pretože striktne alebo obligátne anaeróby tiež nemajú enzýmy na spracovanie toxického kyslíka, nemôžu tolerovať ani voľný kyslík v bezprostrednej blízkosti, a ak mu budú vystavené, zahynú. Aerotolerantné anaeróby nespracúvajú kyslík, ale prežijú a rastú v prostredí, kde je kyslík v limitovanom množstve (Talaro and Talaro 2001).

### **2.1.3 Iné faktory prostredia**

Rôzne formy elektromagnetického žiarenia (ultrafialové, infračervené, viditeľné svetlo) prúdia neustále zo slnka na Zem. Kvasinky bývajú často ničené toxickými produktami kyslíka produkovanými v kontakte so svetlom. Niektoré mikrobiálne druhy produkujú karotenoidné pigmenty ako ochranu proti deštruktívnemu efektu spôsobenému absorbovaním ultrafialového alebo ionizujúceho žiarenia vplyvom toxických foriem kyslíku (Walker 1998, Talaro and Talaro 2001).

## **2.2 Kultivácia kvasiniek**

Postupne sa vyvíjajú kultivačné techniky na rast mikroorganizmov v inom, než ich prirodzenom prostredí, ale v čistom prostredí v laboratóriu. Tieto techniky umožňujú detailné pozorovanie mikroorganizmov, ich morfológiu, fyziológiu a genetiku. Na to, aby bola

kultivácia mikroorganizmu úspešná, musíme prispôbiť všetky jeho nutričné požiadavky na rast i do umelého média (Walker 1998).

Požiadavky mikroorganizmov na nutrienty kolíšu od veľmi málo jednoduchých anorganických komponentov až po komplexný zoznam špecifických anorganických a organických zložiek. Táto obrovská rozmanitosť požiadaviek sa prejavuje aj v typoch médií, ktoré môžeme pripraviť. Je známych aspoň 500 odlišných typov médií, ktoré sa používajú pre kultivácie a identifikácie mikroorganizmov. Kultivačné médiá môžu byť pripravené do skúmaviek, baniek alebo Petriho misiek. Sú zaočkovávané mikroorganizmami pomocou rôznych nástrojov ako sú kľičky, ihly, pipety alebo tampóny. Médiá majú extrémne rozmanité nutričné zloženie a konzistenciu a môžu byť špeciálne pripravované za potrebným účelom. Pre správnu kontrolu experimentov je nutné používať sterilné techniky. To znamená, že samotná inokulácia musí začať do sterilného kultivačného média a musia byť použité sterilné kultivačné nástroje. Musí sa zabrániť vniknutiu nesterilného materiálu, prstov alebo nesterilného vzduchu z miestnosti priamo do kultúry (Walker 1998).

Médium po zaočkovaní mikrobiálnou kultúrou sa dá inkubovať. Inkubátor sa používa na správne nastavenie podmienok rastu mikroorganizmu. Nastavenie optimálnej teploty a vzdušného tlaku podporuje rýchlejšie množenie mikroorganizmov v periódach hodín, dní alebo týždňov (Walker 1998).

Kultivácia môže prebiehať rôznymi spôsobmi:

„Batch“ kultivácia – sú to najbežnejšie laboratórne kultivačné podmienky. Systém batch je uzavretý, to znamená, že obsahuje všetky nutričné látky a priestor na množenie. Nepoužíva sa žiaden mechanizmus na odstraňovanie odpadných produktov.

Fed-bach kultivácia – polonepretržitý proces

Chemostat/nepretržitá kultivácia – môže byť zabezpečený stály prísun nových nutričov a odčerpávanie použitého média so starými bunkami, čím sa stabilizujú rastové výťažky a množstvo buniek. Chemostat je veľmi jednoduchý priemyselný fermentor, má výhody v udržiavaní kultúry v biochemicky aktívnom stave a zabraňuje tak vstupu mikroorganizmov do rastovej fázy umierania (Walker 1998).

## **2.3 Stresové prostredia**

Jednobunkové organizmy žijúce vo voľnej prírode, ako napríklad kvasinky, čelia veľkým rozmanitostiam ich prírodných podmienok. Tieto podmienky, ktoré ohrozujú prežitie buniek, alebo aspoň zabraňujú tomu, aby bunky žili v optimálnom prostredí, sa nazývajú bunkový stres. Zmeny životného prostredia môžu byť fyzikálnej alebo chemickej povahy: teplota, radiácia, koncentrácia rozpustených látok a voda, prítomnosť určitých iónov, toxické chemické látky, pH a nutričná dostupnosť. V prírode sa často musia bunky vyrovnávať s výkyvmi niekoľkých rastových parametrov súčasne (Hohmann and Mager 2003).

V priemyselnom meradle má vplyv stresu na kvasinky niekoľko dôležitých aspektov. Napríklad v pivovarníctve, ak sú kvasinkové bunky vyhladované po dlhšom uskladnení, tak určité vlastnosti na povrchu buniek, ako sú flokulačné schopnosti, sú veľmi nežiadúco ovplyvnené (Walker 1998).

### **2.3.1 Teplotný stres**

Stres z vysokej teploty („heat shock“) alebo z nízkej teploty („cold shock“) je spôsobený vystavením buniek teplote, ktorá je vyššia alebo nižšia než teplota optimálna pre ich rast.

So zvyšovaním teploty zrástá i rotačná, vibračná a translačná kinetická energia všetkých bunkových molekúl. So stúpajúcou kinetickou energiou súvisia tri priame dôsledky, a to: zvýšenie membránovej fluidity, ktorá vedie k narušeniu membránovej štruktúry a strate jej funkcie, ďalej k zvýšeniu metabolizmu, všetkých biochemických reakcií a nakoniec tzv. prechody. Vyskytujú sa v množstve bunkových komponentov, ako je proteínová denaturácia, zmeny lipidových fáz a deštrukcia DNA (Lepock et al. 1997).

Denaturácia proteínov je jednou z najbežnejších prechodov. Teplotne denaturovaný proteín má dve charakteristiky: inaktiváciu rozhodujúcich bunkových funkcií – strata enzýmovej aktivity, a agregáciu – vďaka vystaveniu hydrofóbných molekulových zvyškov. Oboje charakteristiky vedú k postupnému zničeniu bunky (Lepock et al. 1997, Walker 1998).

Nízka teplota vedie k fázovému prechodu membránových mastných kyselín a sterolov z kvapalného do gélového stavu. Tým je membránová integrita ohrozená, pretože membrána začína prepúšťať a kvasinkové bunky sa rozvnomerne znižujú (Walker 1998).

### 2.3.2 Oxidačný stres

Oxidačný stres pochádza z toxických produktov z kyslíka odvodených reaktívnych druhov („oxygen-derived reactive species“ – ROS). K vyvolaniu oxidačného stresu u kvasiniek sa používa niekoľko komponentov.  $H_2O_2$  je vysoko difúzny a relatívne nereaktívny a dokáže voľne prenikať cez plazmatickú membránu do všetkých bunkových častí. Deriváty organických peroxidov ako terc-butyl-peroxid, kumén-peroxid, peroxid kyseliny linolenovej apod. sa využívajú u kvasiniek. Ich hydrofobicita zabezpečuje väčšiu reaktivnosť s membránovými časťami bunky. U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je toxická koncentrácia lipidových hydroperoxidov okolo 0,05 mM a pre organické peroxidy okolo 5 mM. Rozmedzie toxických koncentrácií však samozrejme závisí na jednotlivých kvasinkových druhoch. Redoxné cyklické chemikálie, ako napríklad menadion, paraquat a plumbagin, sa využívajú na generovanie  $O_2^-$  v aeróbne rastúcich bunkách. Menadion je toxický už v stomikromolárnych koncentráciách pre kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*. Iné zlúčeniny, ako diamid a diethymaleát, vyvolávajú oxidačný stres nepriamo. Tieto látky sú toxické už v milimolárnych koncentráciách (Hohman and Mager 2003, Ryter et al. 2007).

### Reaktívne kyslíkové druhy ROS

Voľný radikál je definovaný ako molekula s jedným alebo viac nespárovaných elektrónov vo vzdialenejších valenčných vrstvách. Do ROS patria z kyslíka odvodené voľné radikály – superoxid anión radikál  $O_2^-$  a hydroxylové radikály OH, i neradikálové deriváty z kyslíku ( $H_2O_2$ ).

Podľa pôvodu ROS sa rozoznávajú primárne ROS a sekundárne ROS, ktoré vznikajú z aktivity primárnych ROS. Do primárnych ROS zaradzujeme:

- Superoxid anión  $O_2^-$ , ktorý je generovaný únikom elektrónov z mitochondriálneho dýchacieho reťazca ako klasický následok respiračného cyklu. Superoxidový anión nie je silne reaktívny, ale môže priamo reagovať s niektorými proteínmi.
- Peroxid vodíku  $H_2O_2$ , ktorý vzniká počas detoxifikácie superoxidového aniónu katalyzovaného superoxididizmutázami u kvasiniek pri oxidácii mastných kyselín v peroxizomoch a tiež pri procesoch „folding“ (zbaľovania) proteínov v endoplazmatickom retikulu. Peroxid ľahko prechádza väčšinou biologických membrán, i keď je relatívne nereaktívny, jeho škodlivé účinky sa prejavujú až po premene na veľmi reaktívny hydroxylový radikál.

- Hydroxylový radikál OH., je najviac reaktívny primárny ROS, jeho reaktivita obmedzuje jeho difúziu v biologických systémoch. Akonáhle je radikál vytvorený, poškodzuje bunkové štruktúry. Hydroxylový radikál odoberá vodík z inej molekuly a vytvára nový radikál. Môže sa tiež pridať k molekulám, ktoré obsahujú aromatické kruhy (purínové a pyrimidínové báze) alebo ku kovu. Hydroxylový radikál môže previesť svoj voľný elektrón inej molekule a vytvoriť tak nový radikálový druh. Tieto chemické vlastnosti tak vedú k celej rade reakcií, tzv. reťazovej reakcii, v ktorých sa OH. zapojuje (Ryter at al. 2007).

### **Efekt oxidačného stresu**

Zvýšené nefyziologické koncentrácie ROS môžu spôsobiť postupné zmeny alebo degradácie bunkových makromolekúl zahrňujúc DNA, proteíny, lipidy a sacharidy.

Peroxidácia lipidov predstavuje priamy dôsledok oxidačného stresu buniek. Tvoria sa lipidové radikály a toxické hydroperoxydy. Oxidácia membránových fosfolipidov vedie k biofyzikálnym zmenám, ktoré narušujú funkcie membrán a organel. Voľné radikály môžu tiež spôsobovať zosietenie a fragmentáciu proteínov, čo vedie k zvýšenej proteolýze. Hydroxylové radikály spôsobujú oxidáciu aminokyselinových zvyškov, zvlášť aromatických. Narušenie aminokyselinového reťazca v proteíne vedie k jeho fragmentácii až konečnému rozkladu. ROS môžu poškodiť tiež nukleové kyseliny. Tie sú potom zapojené do procesu mutagenézy a karcinogenézy. Iba hydroxylový radikál s kyslíkom dokážu poškodiť DNA priamo. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> so superoxidovým aniónom poškodzuje nukleové kyseliny až pomocou generovania hydroxylových radikálov, teda nepriamo. V skutočnosti všetky ostatné radikály, ktoré su tvorené z lipidovej a proteínovej peroxidácie, môžu indukovať poškodenie DNA. Modifikácie DNA pomocou hydroxylového radikálu vznikajú jedno- a dvojbodovými zlomami, priamymi základnými modifikáciami, DNA cross-link väzieb a pod. Polovica modifikácií s hydroxylovým radikálom sa vyskytuje na bázach DNA (Hohman and Mager 2003, Ryter at al. 2007, Perrone et al. 2008).

### **2.3.3 Osmotický a soľný stres**

Osmotický stres je spôsobený zmenami koncentrácie rozpustených látok v médiu, čím dochádza k zmene dostupnosti vody pre bunku. Zvýšenie osmolarity vedie k zníženiu aktivity vody a vodnému potenciálu a naopak. Voda prechádza cez plazmatickú membránu smerom k vyššej koncentrácii rozpustených látok, to je k miestu s nižšou aktivitou vody alebo vyššou osmolaritou. Vzhľadom k tomu, že buncné membrány sú viac priepustné pre vodu než pre väčšinu roztokov, živé bunky sú tak ovplyvnené zmenami celkovej koncentrácie rozpustených látok v roztokoch. V dôsledku toho, zvýšenie vonkajšej osmolarity (hyperosmotický stres) bude vyberať vodu z bunky von, zatiaľčo zníženie vonkajšej osmolarity (hypoosmotický stres) spôsobuje nasávanie vody bunkou do jej vnútra. Mikroorganizmy si udržujú mierne zvýšený osmotický tlak vo vnútri bunky oproti vonkajšiemu prostrediu. Tieto tlakové odlišnosti sú zabezpečené rezistentnosťou bunkovej steny, nazývajú sa bunkový turgor (Walker 1998, Hohman and Mager 2003, Posas et al. 2000).

V laboratóriách sa osmotický tlak často vytvára pridaním NaCl alebo sorbitolu do rastového média. Kvasinkové bunky reagujú na NaCl nie len v osmotickom strese, ale tiež v spojení s Na<sup>+</sup> toxicitou nazývanou ako soľný stres (Hohman and Mager 2003, Posas et al. 2000).

Zmeny v dostupnosti vody vyvolávajú zmeny v bunečnej morfológii a štruktúre. Hyperosmotický šok spôsobuje rýchly odtok vody z buniek, sprevádzaný zmršťovaním bunky. Hypoosmotický šok naopak spôsobuje zvyšovanie koncentračného gradientu vody, čo vedie k rapidnému nárastu buniek a vnútorného turgoru. Bunková stena zabráňuje prasknutiu bunky v širokých medziach. Osmotický stres tiež rozrušuje cytoplazmatickú membránu do určitého stupňa jej štruktúry, priepustnosti a mechanických vlastností (Hohman and Mager 2003, Posas et al. 2000).

Na<sup>+</sup> ióny sú toxické pre bunku vďaka ich schopnosti inhibovať niektoré špecifické metabolické cesty. Bolo to dokázané v prípade kvasinkového Hal2 proteínu a niektorých RNA enzýmov. Osmotické zmeny sú veľmi dobre kontrolovateľné experimentálne pomocou mikroskopických techník (Hohman and Mager 2003, Posas et al. 2000).

### **2.3.4 Nutričný stres, nutričné zdroje**

Hladovanie je komplexný stres pre mikroorganizmy. Hlavné nutrienty, pre ktoré sa bunka dostáva do stavu hladovania, sú zdroje uhlíka a dusíka. Zdroje ostatných elementárnych prvkov ako fosforu, síry a stopových kovov patria medzi menej dôležité. Kvasinky využívajú široko rozmanité materiály ako nutričné zdroje. Zníženie dostupnosti jedného materiálu môže v mnohých prípadoch byť nahradené utilizáciou iného materiálu (Hohman and Mager 2003, Gash and Werner-Washburne 2002).

Keď sa jednoduché esenciálne nutrienty stanú limitujúce alebo eventuálne chýbajúce, bunkový proliferačný mechanizmus je zastavený a nastavuje sa program zabezpečujúci prežitie bunky. Pri absencii jedného z esenciálnych prvkov kvasinkové bunky vstúpia do špecifického neproliferačného stavu nazývaného ako stacionárna fáza. Jej hlavným cieľom je prežiť hladovacie obdobie. V prítomnosti chudobného zdroja uhlíka a nedostatku zdroja dusíka nastáva proces sporulácie. V prítomnosti dobrého zdroja uhlíka sa stimuluje rast (Hohman and Mager 2003, Gash and Werner-Washburne 2002).

Objektom súčasných štúdií sú možnosti konverzie nutričných zdrojov uhlíka do biomasy a metabolitov, a tiež optimalizácia rastových médií s čo najnižšími prevádzkovými nákladmi. Množstvo zdrojov zahrňujúcich pentózy a hexózy, rôzne disacharidy, glycerol, ethanol, methanol, oleje, n-alkány a široké množstvo odpadových substrátov pochádzajúcich z poľnohospodárskeho priemyslu môže byť využívaných ako potenciálny uhlíkatý zdroj pre biotechnologickú produkciu rôznych metabolitov, napríklad karotenoidov. Akumulácia karotenových pigmentov u červených kvasiniek začína v neskorej logaritmickej fáze a pokračuje v stacionárnej fáze, ktorá je typická pre produkciu sekundárnych metabolitov. Prítomnosť vhodného uhlíkatého zdroja je dôležitá na biosyntézu karotenoidov počas tejto nerastovej fáze. Kvasinky syntetizujú karotenoidy, keď sú kultivované v syntetickom médiu obsahujúcom rôzne jednoduché uhlíkaté zdroje, ako napríklad glukózu, xylózu, cellobiózu, sukrozu, glycerol alebo sorbitol (Hohman and Mager 2003, Gash and Werner-Washburne 2002, Walker 1998).

Tabuľka kategorizuje uhlíkaté zdroje tak, ako môžu byť asimilované rôznymi kvasinkami s odlišnou mierou účinnosti.

**Tab. 1:** uhlíkaté zdroje asimilované rôznymi kvasinkami (Walker 1998)

Uhlíkatý zdroj	Typický príklad	Komentár
Hexózové sacharidy	Glukóza, galaktóza, fruktóza, manóza	Glukóza je utilizovaná všetkými kvasinkami. Ak kvasinky nefermentujú glukózu, nefermentujú ani ostatné sacharidy. Ak ju fermentujú, tak fermentujú tiež fruktózu a manózu.
Pentózové sacharidy	Arabinóza, xylóza, xylulóza, ramnóza	Niektoré kvasinky využívajú pentózy lepšie než glukózu. <i>Sacch. cerevisiae</i> utilizuje xylulózu, ale nie xylózu.
Disacharidy	Maltóza, sacharóza, laktóza, trehalóza, melobióza, cellobióza,	Ak kvasinky fermentujú maltózu, nebudú spravidla fermentovať laktózu a naopak. Veľké množstvo kvasiniek utilizuje disacharidy.
Trisacharidy	Rafinóza, maltotrióza	Rafinóza je len čiastočne využívaná <i>Sacch. cerevisiae</i> , ale kompletne inými druhmi rodu <i>Saccharomyces</i> .
Oligosacharidy	Maltotetraóza, maltodextríny	Sú metabolizované amylolytickými kvasinkami, nie pивnými kmeňmi.
Polysacharidy	Škrob, inulín	Polysacharidy utilizujúce kvasinky sú vzácné. <i>Saccharomycopsis</i> rod a <i>S.diastaticus</i> môžu utilizovať rozpustený škrob a rod <i>Kluyveromyces</i> vlastní inulinázu.
Krátke alifatické alkoholy	Methanol, ethanol	Niekoľko methylotrofných kvasiniek má priemyselný potenciál.
Sacharidické alkoholy	Glycerol, glucitol	Môžu byť zdýchavané – aerobne metabolizované kvasinkami.
Organické kyseliny	Acetát, citrát, laktát, malát, pyruvát, sukcinát	Mnoho kvasiniek môže zdýchavať organické kyseliny, ale len časť z nich ich môže fermentovať.
Mastné kyseliny	Oleát, palmitát	Niekoľko druhov tukotvorných kvasiniek môže asimilovať mastné kyseliny ako zdroj uhlíka a energie.
Uhl'ovodíky	n-alkány	Mnoho druhov kvasiniek rastie dobre na C12-C18 n-alkánoch.
Aromatické zlúčeniny	Fenol, kresol, resorcinol, katechol, benzoát	Len malá časť kvasiniek môže utilizovať tieto komponenty. Kvasinky utilizujúce n-alkány využívajú fenol ako zdroj uhlíka cez beta-ketoacidovú dráhu.
Rôzne	Adenín, kyselina močová, butylamín, pentylamín,	Niekoľko kvasiniek, napríklad <i>Arxula adenivorans</i> a <i>A.terestre</i> , môže utilizovať tieto komponenty ako zdroj uhlíka a dusíka.

Súčasné biotechnologické štúdie sa však zameriavajú na využitie celého radu prírodných substrátov a odpadových produktov z poľnohospodárstva a potravinárskeho priemyslu ako vhodných zdrojov jednoduchých uhlíkatých nutrientov: hroznový džús, mušt, jablčné šupky, jablčný most, hydrolyzované horčičné odpadné izoláty, hemicelulózy hydrolyzáty,

hydrolyzovaná múka z mungo fazulí, šťava z cukrovej trstiny a melasa, kukuričný sirup, hydrolyzáty kukurice, mliečna syrovátka a iné. Suroviny a vedľajšie produkty poľnohospodársko-potravinárskeho pôvodu majú potenciál ako nízkonákladová alternatíva sacharidových zdrojov pre mikrobiálnu produkciu metabolitov, s výhľadom tiež minimalizácie problémov energetických a odstránenia odpadu zo životného prostredia (Hohman and Mager 2003, Gash and Werner-Washburne 2002, Walker 1998, Aksu 2005, Buzzini et al 2000, Frengová et al 2009)

V tabuľke je uvedených niekoľko typov komplexných agropriemyselných substrátov využívaných ako kultivačné médiá pri fermentácii kvasiniek v biotechnologickom odvetí:

**Tab. 2:** komplexné agropriemyselné substráty (Walker 1998)

Zložky	Melasa	Sladina	Hroznový mošt	Syrovátka
Zdroje uhlíka	Sacharóza, fruktóza, glukóza, rafinóza	Maltóza, sacharóza, fruktóza, glukóza, maltotrióza	Glukóza, fruktóza, sacharóza	Laktóza
Zdroje dusíka	Dusíkaté komponenty ako nevstrebateľné proteíny. Dusík musí byť suplementovaný.	Nízko molekulárny a-amino dusíkaté komponenty, amóniové ióny a množstvo aminokyselín.	Rôzne stupne zlúčenín dusíku, ktoré môžu byť limitované. Množstvo aminokyselín.	Nevstrebateľný globulín a albumín, nízky stupeň amóniového a močovínového dusíka.
Minerály	Zásoba P, K, S. Vysoký stupeň K+ môže mať až inhibičný efekt.	Zásoba P, K, S, Mg.	Zásoba P, K, Mg, S. Sú často prítomné vysoké množstvá síry.	Zásoba P, K, Mg, S.
Vitamíny	Málo, ale obecné adekvátny zdroj, biotínu je nedostatok v repnej melase.	Zdroj vitamínov je zvyčajne adekvátny. Vysoký prídavok cukrovej sladiny môže mať nedostatok biotínu.	Vitamínový zdroj obecné dostačujúci.	Prítomný široký rozsah rôznych vitamínov.
Stopové prvky	Prítomný rozsah stopových prvkov, hoci Mn <sup>2+</sup> môže byť limitujúci.	Všetky prvky prítomné, hoci Zn <sup>2+</sup> môže byť limitujúci.	Dostupné dostatočné množstvo.	Prítomné Fe, Zn, Mn, Ca, Cu.
Ostatné komponenty	Nefermentovateľné cukry (2-4%), organické kyseliny, vosky, pigmenty, silice, pesticídy, residuá, karamelizované komponenty, betain.	Nefermentovateľné maltodextríny, chmeľové komponenty.	Nefermentovateľné pentózy, vínna a jablčná kyselina, dekanová a oktánová kyselina môžu byť inhibičné. Môže byť nedostatok sterolov a nenasýtených	Lipidy, NaCl, mliečna a citrónová kyselina.

			mastných kyselín.	
--	--	--	-------------------	--

Niektoré priemyselné fermentačné médiá môžu obsahovať nízky stupeň určitých prítomných komponentov, ktoré majú toxický alebo inhibičný efekt na kvasinky. Niektoré z týchto komponentov môžu byť vytvárané počas tepelnej úpravy steriláciou alebo pasteráciou média. Napríklad pri nadmernom zahrievaní melasy môžu vznikáť nežiadúce karamelizačné produkty vychádzajúce z Maillardovej reakcie medzi sacharidmi a aminodusíkatými zložkami. Teplo môže tiež zničiť vitamíny a iné rastové faktory esenciálne potrebné na rast kvasiniek (Gash and Werner-Washburne 2002, Walker 1998, Buzzini 2000).

Chemická kompozícia a koncentrácia dusíkatého zdroja v kultivačnom médiu môže mať vplyv na fyziologickú kontrolu a reguláciu metabolizmu pigmentov v mikroorganizmoch. Niekoľko anorganických a organických dusíkatých zdrojov, ako sú extrakty z múky a proteínové hydrolyzáty, sú často študované pre zlepšenie produkcie karotenoidov. Avšak to znamená, že rôznorodosť v obsahu karotenoidov u kvasiniek s rôznym použitých dusíkatým zdrojom v kultivačnom médiu a rýchlosť produkcie pigmentov je ovplyvnená produktami katabolizmu dusíkatého zdroja viac, než sú výsledky priamej stimulácie vlastných dusíkatých zložiek v bunkách (Gash and Werner-Washburne 2002, Walker 1998).

### **Lignocelulózové materiály**

Lignocelulózové materiály predstavujú rastlinný materiál pozostávajúci hlavne z celulózy, hemicelulózy a ligninu. Tieto materiály sú v dnešnej dobe široko používané výskumníkmi pri biotechnologickej produkcii biopalív a bioenergie, alebo obohatenej mikrobiálnej biomasy využívajúcej tieto substráty. Lignocelulózová biomasa však obsahuje komplex makromolekúl, najmä mono- a oligosacharidov, furánov, alifatických kyselín a rôznych aromatických zlúčenín, ktoré nie sú priamo fermentovateľné. Na degradáciu zložitých komponent, ako sú uhlíkaté polyméry na jednoduché cukry, ktoré môžu byť fermentovateľné mikroorganizmami, je potreba radu účinných metód predúpravy materiálu (Sjörstrom 1993).

K priemyselnej fermentácii sa používa množstvo lignocelulózových surovín, ktoré sa odlišujú svojím pôvodom, zložením a štruktúrou. Tieto surové materiály môžu byť použité pre produkciu biopalív, napríklad lesné a poľnohospodárske zvyšky – slama, stonky, plevy, struky, kukuričné stebľa, obilné krmoviny, rôzne plodiny, a rôzne druhy odpadu – zelený odpad, odpad zo zeleniny a ovocia, výlisky, triedený komunálny odpad a iné (Clark et al. 2012, Bonin 2012).

Lesnícke materiály sa klasifikujú do dvoch tried – mäkké a tvrdé drevo. Mäkké drevo má typicky nízku hustotu a rastie rýchlo. Patria sem stále zelené druhy stromov ako borovica, smrek, jedľa, sekvoje. Medzi tvrdé drevo patria opadavé listnaté stromy (Hoadley 2000).

Do poľnohospodárskych zvyškov sa radia tzv. zvyšky z úrody plodín – ryžová slama, kukuričná siláž, pšeničná slama, cukrová trstina, a iné (Kamm 2004).

Hydrolyzáty lignocelulózových materiálov, špeciálne prúdom predupravené kvapaliny, obsahujú zvyčajne aj komponenty s inhibičným účinkom na fermentujúce mikroorganizmy. V týchto hydrolyzátoch môžeme nájsť viac než 100 inhibičných látok, avšak tri z nich sú najvýznamnejšie - kyselina octová, ktorá vzniká štiepením acetylových skupín z acetylovaných sacharidov zo xylanu, a ďalej furfural a 5-hydroxymethylfurfural, ktoré

vznikajú degradáciou pôvodných produktov počas predúpravy materiálu. Koncentrácia týchto inhibítorov závisí na surovom materiálu, metóde predúpravy a podmienkach predúpravy. Účinnosť fermentačného procesu býva čiastočne alebo kompletne zvýšená odstránením toxických zložiek detoxifikáciou, alebo použitím geneticky upravených tolerantných kvasinkových kmeňov adaptovaných predkultiváciou na hydrolyzátach (Gairola, Smirnova 2012, Chen et al. 2012, Almeida et al. 2011).

Pri použití lignocelulózového materiálu k fermentačným účelom je veľmi dôležité zvážiť obsah zmesi sacharidov. Celulóza po hydrolyze vedie len ku glukózovým jednotkám, zatiaľ čo hydrolyza hemicelulózy poskytuje niekoľko monosacharidov - hexózy (glukóza, galaktóza, manóza a ramnóza) aj pentózy (xylóza a arabinóza). Vyčistený a upravený odpadný materiál môže byť použitý ako lacný zdroj uhlíka ku kultiváciám napríklad karotenogénnych kvasiniek. Červené kvasinky sú schopné efektívne utilizovať upravený drewný substrát (xylóza, manóza, arabinóza) z hydrolyzátu, rovnako ako ostatné sacharidy s použitím enzymatického komplexu a produkovať významné metabolity prínosné ako súčasť krmív či potravinových doplnkov (Hon 1996).

### 3 KAROTENOGÉNNE KVASINKY

#### 3.1 Všeobecná charakteristika karotenogénnych kvasiniek

Niektoré kvasinkové druhy akumulujú karotenogénne pigmenty, ako sú  $\beta$ -karotén, torulén, torularhodin. Tieto pigmenty vytvárajú typické zafarbenie do červena, oranžova alebo žltá, a vďaka tomu sa kvasinky všeobecne nazývajú aj červenými kvasinkami. Karotenogénne kvasinky sa radia do taxonomickej skupiny: *Basidiomycetae* (Libkind et al. 2005).

##### 3.1.1 Rod *Rhodotorula*

Rod *Rhodotorula* obsahuje tri najbežnejšie druhy: *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* a *Rhodotorula minuta*.

Rod *Rhodotorula* nezkvasuje žiadne cukry a má silne vyvinutý pentózový cyklus využívania glukózy. Má malé guľaté bunky alebo bunky oválne, niekedy taktiež pretiahnuté, endospóry ani iné druhy spór nevytvárajú a taktiež netvorí pseudomycelium. Sú rôznych farieb, od žltej cez oranžovú do červenofialovej (Kocková-Kratochvílová 1990, Libkind et al. 2005).

*Rhodotorula glutinis* je kvasinka, ktorá sa nachádza bežne v prírode. Je známa charakteristickou produkciou torulénu, torularhodínu a  $\beta$ -karoténu. Dokáže akumulovať značné množstvo lipidov. Produkcia lipidov rodom *Rhodotorula* má význam z viacerých dôvodov, najmä však preto, že usmernením kultivácie by sa mohli získať lipidy s obsahom cenných mastných kyselín na výživu živočíchov, prípadne aj na vývoj biopalív 2. generácie (Kocková-Kratochvílová 1990, Libkind et al. 2005, Frengová 1994).

##### 3.1.2 Rod *Sporobolomyces*

Rod *Sporobolomyces* obsahuje približne 20 druhov červených kvasiniek. Najbežnejšie sú však druhy *Sporobolomyces roseus* a *Sporobolomyces salmonicolor*.

Patria do čelade *Basidiomycetes* a vytvárajú balistokonídie, ktoré bývajú väčšinou asymetrické. *Sporobolomyces* sú mikroorganizmy, ktoré sa vyskytujú vo fylosfére a v atmosfére, kde je častým zdrojom výživy dusíkom nitrát alebo redukované formy dusíkatých zlúčenín. Kultúry u *Sporobolomyces* sú drsné, ploché, často pomúčené a nemajú kvasné schopnosti. Vyznačujú

sa silnou karotenogenezou, jeho nátery sú tmavočervené hladké. Bunky sú guľovité, elipsoidné až pretiahnuté, s rozmermi 3 až 8 x 5 až 18 µm. *Sporobolomyces* môže rásť ako bunka, pseudohýfa, pravá hýfa alebo balistokonídia. Pseudohýfy a pravé hýfy sú často dobre vyvinuté. Balistokonídie sú jednobunkové a bývajú umiestnené prevažne na vajcovitých predĺžených vegetatívnych bunkách (Kocková-Kratochvílová 1990, Libkind et al. 2005).

### 3.1.3 Rod *Cystofilobasidium*

Medzi zástupcov tohto rodu patria druhy *Cystofilobasidium bisporidii*, *Cystofilobasidium capitatum* a *Cystofilobasidium infirmominiatum*. Tento rod sa odlišuje od rodu *Rhodotorula* typom basídia. Jeho charakter je jednobunkový, neseptovaný, tzv. holobasídium. Tvoria kolónie s hladkým lesklým povrchom, tvar buniek je guľatý až pretiahnutý (Kocková-Kratochvílová 1990, Sampaio et al. 2001).

Druh *Cystofilobasidium capitatum* s červeným až škoricovým zafarbením buniek je homotalický druh, ktorý vytvára jednojadrové mycélium. V hýfách produkuje endokonídie. Teliospóry po napučaní klíčia na metabazídiom, ktoré nemá priehradky. Sporídie sú jednotlivo alebo v pároch s jednou alebo dvoma bazídiospórami. Primárne sporídie nemusia pučať na bazídiospóry, ale na septované mycélium. Po vypučaní na bazídiospóry primárne sporídie degenerujú a zostávajú spojené s metabazídiom. Tento druh vytvára aj teliospóry, ktoré klíčia na metabazídiom s maximálnou dĺžkou 17 µm. Niekedy sa z bazídií vytvárajú drsné, suché kolónie, v ktorých prevládajú teliospóry. Kvasinková kultúra sa vyvinie až po niekoľkých týždňoch. Všetky generácie sa pokladajú za diploidné (Kocková-Kratochvílová 1990, Sampaio et al. 2001).

## 3.2 Kvasinkový rast a metabolizmus

Ak majú kvasinky dostatok nutričných látok a potrebných faktorov k rastu, stávajú sa metabolicky aktívne a rastú. Rast sa uskutočňuje v dvoch úrovniach. V prvej časti sa syntetizujú bunkové komponenty a narastá veľkosť buniek, v druhej časti sa zvyšuje množstvo buniek, teda populácia. Nárast počtu populácie buncným delením je veľmi dôležitý pre mikrobiálnu kontrolu, infekčné ochorenia aj biotechnológie (Talaro and Talaro 2001).

Uzavretú populáciu v čase, jej vývoj, reprezentuje tzv. rastová krivka. Kultúra prechádza cez viacero fáz. Úvodná fáza rastovej krivky sa nazýva lag fáza, po nej nasleduje exponenciálna fáza, v ktorej živé bunky zvyšujú svoj počet v logaritmickú postupnosť. Nepriaznivé podmienky, ktoré inhibujú rast buniek, čo môže byť spôsobené i limitáciou niektorých živín z média, spôsobujú, že sa bunky dostávajú do stacionárnej fázy rastovej krivky. V poslednej fáze odumierania, kde sú nutrienty vyčerpané a je nahromadený odpad, nastáva buncná smrť (Talaro and Talaro 2001).

Termín metabolizmus sa používa sumárne pre všetky chemické reakcie uskutočňujúce sa v živom organizme. Pretože tieto reakcie uvoľňujú alebo naopak vyžadujú energiu, sú uskutočňované podľa energeticko-balančného zákona. Metabolizmus je komplementárny proces pozostávajúci z katabolizmu – proces rozkladania organických zlúčenín na jednoduché zložky, kde je produkované viac energie, než sa spotrebuje, a z anabolizmu – z procesu enzymaticky regulovaných reakcií, kde z malých molekúl sa syntetizujú molekuly veľké. Príklad anabolizmu je syntéza proteínov z aminokyselín, nukleových kyselín z nukleotidov a iné. Celý metabolický proces je regulovaný na mnohých úrovniach. Povedomie o tejto

regulácii u kvasiniek je rozhodujúce pre využitie kvasinkových buniek v biotechnologickom priemysle (Talaro and Talaro 2001, Halienová et al 2007).

Keď mikroorganizmy vstúpia do stacionárnej fázy rastu, vďaka vyčerpaniu živín z média, aktivuje sa proces tzv. sekundárneho metabolizmu. Sekundárny metabolizmus zahŕňa procesy produkcie metabolitov, ktoré nie sú esenciálne pre rast a reprodukciu, ale sú to rozmanité, často druhovo špecifické konečné metabolity ako alkaloidy, antibiotiká, vitamíny, toxíny, pigmenty s komerčnou hodnotou (Talaro and Talaro 2001).

Tieto mikrobiálne metabolity sú produkované počas fermentácie a v ich priemyselnej nadprodukcii sa snažíme v prvom rade znížiť výrobný čas a priestor, a zároveň produkčné náklady. Nadprodukcia metabolitov závisí na špecifickom druhu daného mikroorganizmu a environmentálnych podmienkach, za ktorých sa fermentácia uskutočňuje. Ak sa chcú znížiť výrobné náklady, bývajú obvykle aplikované rôzne priemyselné prístupy, ako je optimalizácia kultivačných podmienok. Napríklad pri biosyntéze kyseliny citrónovej sa musí znížiť koncentrácia železa v produkčnom médiu, aby sa redukovala aktivita akonitázy v Krebsovom cykle. Tak sa zaručí nadprodukcia kyseliny citrónovej. Ďalšími prístupmi aplikovanými pre zvýšenie produkcie žiadaných metabolitov je genetické inžinierstvo. Geneticky vylepšené kmene produkujúce vyššie výťažky metabolitov sa získavajú buď mutačnými procesmi alebo technikami rekombinantnej DNA (Bhalla et al. electronic).

### **3.3 Cytologické metódy na sledovanie kvasiniek**

Kvasinková cytológia referuje o bunečnej morfológii, je to tzv. súpis štruktúrnych komponentov kvasiniek. Všeobecné bunečné charakteristiky kvasiniek zahŕňajú makromolekulárne zložky a morfologické odlišnosti. Cytologické metódy zahŕňajú bunečnú vizualizáciu a izoláciu bunečných organel. Je možné opísať ultraštruktúrne funkcie kvasiniek, a tak zistiť vzťah medzi rastom a metabolickými reakciami. Niekoľko kvasinkových organel a makromolekulárnych štruktúr hrá kľúčovú úlohu v kvasinkovej biotechnológii, v vzájomnej interakcii buniek a tiež úlohu v uhlíkatom metabolizme a v obrate intracelulárnych proteínov. Tieto procesy sa priamo vzťahujú k produkcii priemyselných metabolitov (Walker 1998).

Kvasinkové bunky vykazujú úžasnú diverzitu s ohľadom na veľkosť bunky, tvar a farbu. Samotné bunky z čistej kultúry jedného kmeňa môžu disponovať morfológickou a kolorimetrickou heterogenitou. Hoci určitá miera morfologickej rôznorodosti sa očakáva v rámci kvasinkovej kultúry, silné účinky v individuálnej morfológii danej bunky sú vyvolané chemickými a fyzikálnymi podmienkami (Walker 1998, Waites et al 2001).

#### **3.3.1 Svetelná a fluorescenčná mikroskopia**

V laboratóriách je používaných množstvo typov mikroskopov. Mikroskopy majú rôzne aplikácie a modifikácie, ktoré prispievajú k ich užitočnosti.

Veľmi obmedzené štruktúrne informácie môžu byť získané na neofarbených kvasinkových bunkách pomocou svetelnej mikroskopie. Pri 1000-násobnom zväčšení je možné vizualizovať kvasinkové vakuoly a niekoľko cytoplazmatických teliesok. Použitím mikroskopie s fázovým kontrastom a s farbiacimi technikami môže byť vizualizovaných množstvo bunečných štruktúr (Walker 1998, Waites et al. 2001).

Niekoľko fluorochromických farbív býva použitých pri fluorescenčnej mikroskopii k zvýrazneniu určitých prvkov u kvasiniek a ich povrchových štruktúr. Napríklad farbivá ako

izothiokyanát a rhodamín B pri spojení s monošpecifickými protilátkami proti štruktúrnym proteínom kvasiniek umožňujú vizualizáciu množstva bunčných štruktúr (Walker 1998).

**Tab. 3:** Najčastejšie používané fluorescenčné sondy a farbivá v prietokovej cytometrii (Walker 1998)

Fluorescenčná sonda, farbivo	Vizualizovaná štruktúra
Methylénová modrá	Celé bunky
ABT – aldehyde bisulphite toluidin blue	Bunčné steny
India ink	Kapsule
Neutral red, CMAC – 7-amino-4-chromomethyl kumarín	Vakuoly
Rhodamin 123, DAPI – (ružovo biela fluorescencia)	Mitochondrie
Janus Green	Mitochondrie
Lomofungin	Jadro
DiOC6 – 3,3-dihexyloxakarbocyanid jodid	Endoplazmatické retikulum a jadrové obaly
Sudanová čerň	Lipidové granule

### 3.3.2 Elektrónová mikroskopia

Pomocou elektrónovej mikroskopie môžu byť získané detailné informácie o organelových a makromolekulových ultraštruktúrach. Tieto skenovacie techniky sú užitočné pre štúdium bunčnej topológie. Transmisná elektrónová mikroskopia vizualizuje ultratenké štruktúry kvasiniek, je preto nepostrádateľná v štúdiu intrabunčných jemných štruktúr. Mikroskopia môže byť aplikovaná na neupravení nefixované bunky k sledovaniu bunčného povrchu kvasiniek alebo buniek pri odlišných rastových podmienkach pri nanometrovom rozlíšení (Walker 1998, Klang 2014).

### 3.3.3 Prietoková cytometria

Prietoková cytometria je jedna z úspešných techník využívaných na analýzu mnohopočetných parametrov individuálnych buniek v rámci heterogénnej populácie. Touto technikou sa študujú vlastnosti ako relatívna veľkosť častíc, granularita alebo vnútorná členitosť a fluorescenčná intenzita (BD Biosciences 2000, Brehm- Stecher 2014).

Častice sú zachycované v prúde kvapaliny pomocou lasera. Iba jedna bunka môže prejsť cez laserový lúč v danom momente. Všetky rozptýlené častice alebo bunky vo veľkosti od 0,2-150 mikrometrov sú vhodné k analýze. Keď bunka prejde cez laserový lúč, rozptýli sa laserové svetlo. Molekuly prítomné na časticiach fluoreskujú. Rozptylové a fluorescenčné svetlo je zbierané vhodne umiestnenými šošovkami. Kombináciou lúčových zväzkov a riadených rozptylov je fluorescenčné svetlo vedené do príslušného detektoru. Detektory produkujú elektrónové signály úmerné optickým signálom. Bunčné populácie môžu byť zobrazené v niekoľko odlišných formátoch: histogram, 2D zakreslenie, 3D zakreslenie (BD Biosciences 2000).

V štúdiu kvasinkovej cytologie má prietoková cytometria niekoľko aplikácií. Dave and Kell (1996) posudzovali fyziologický stav kvasiniek a využili technológiu triedenia buniek pre izoláciu kmeňov s vysokými výťažkami v biotechnologických aplikáciách. V štúdiách kvasinkového bunčného cyklu a vývoja organel má prietoková cytometria len čiastočné

využitie. Boli monitorované napríklad zmeny vo vývoji mitochondrií, napríklad rozlíšenie medzi respiračno-príslušnými a respiračno-nedostatočnými bunkami *Saccharomyces cerevisiae* ofarbenými Rhodamínom 123 pomocou prietokovej cytometrie (BD Biosciences 2000).

### 3.3.4 Meranie množstva bunečnej biomasy

Určenie množstva buniek alebo bunečnej koncentrácie hrá dôležitú úlohu v mikrobiologickej charakterizácii a experimentácii. Medzi klasické metódy určenia celkovej biomasy patria metódy založené na stanovení bunečnej hmotnosti alebo výpočte. Je tu množstvo priamych a nepriamych metód odhadu množstva biomasy. Využívajú sa napríklad fyzikálne a biochemické techniky (Talaro and Talaro 2001, Waites et al. 2001).

Medzi tradičné priame techniky patrí meranie suchej hmotnosti biomasy. V priemysle sa využíva množstvo odlišných metód meraní kvasničnej biomasy, napríklad rozdiel hmotnosti biomasy pred a po sušení, alebo iné nepriame techniky ako sú centrifugácia, turbidimetria, filtrácia a iné. Obsah rôznych bunečných komponent a metabolitov sa obvykle vzťahuje k suchej váhe za účelom uľahčenia porovnávania odlišných analýz (Talaro and Talaro 2001, Waites et al. 2001).

Medzi moderné citlivé techniky presného určenia množstva biomasy sa zahrňuje elektrónové počítanie, prietoková cytometria alebo mikroskopické počítanie buniek. Bunky môžu byť tiež stanovené pomocou nepriamej turbidimetrickej metódy (Talaro and Talaro 2001, Waites et al. 2001, Klang 2014).

### 3.3.5 Rýchla detekcia a identifikácia dôležitých molekúl v biologickom materiále – Ramanova spektroskopia

Na rýchlu identifikáciu sledovaných metabolitov u kvasiniek bez zložitej prípravy vzoriek sa využíva Ramanova spektroskopia, konkrétne mikrospektroskopia, teda v spojení s mikroskopom.

Metóda je založená na nepružných zrážkach fotónov s vibrujúcimi molekulami, pri ktorých molekula prechádza do nekvantového, excitovaného stavu. Ak bola molekula pôvodne v základnom elektrónovom a vibračnom stave, môže sa po vyžiarení energie získanej pri zrážke vrátiť do niektorého z vyšších vibračných stavov. Sledované emitované žiarenie má potom menšie vlnočty než žiarenie absorbované a môžeme sledovať Stokesové čiary Ramanovho spektra. Pre Ramanovú spektrometriu sa využívajú disperzné spektrometre, i spektrometre s Fourierovou transformáciou. Ako zdroje žiarenia sa využívajú rôzne typy laserov, ktoré pokrývajú viditeľnú oblasť (VIS), blízku infračervenú oblasť (NIR) alebo ultrafialovú oblasť (UV). Touto metódou je jednoduché merať kvapaliny či práškové vzorky v celkovom objeme len niekoľko mikrolitrov. Dá sa využiť k identifikácii látok a ku kvalitatívnej a štruktúrnej analýze. Ramanova spektrometria je obzvlášť účinná metóda k štúdiu anorganických a organických látok, i zložitých heterogénnych zmesí. Môže byť aplikovaná v rôznych oboroch potravinárskej chémie, či pri sledovaní rôznych komponentov buniek, tkanív a mikroorganizmov a ich zmien behom kultivácie (Li-Chan E.C.Y. 1996, Harz et al. 2005)

### **3.3.6 Izolácia kvasinkových organel, metabolitov**

Aby boli získané jednotlivé kvasinkové organely alebo sledované kvasinkové metabolity, je v prvom rade potrebné rozrušiť bunecnú stenu. Rozrušenie kvasinkovej bunecnej steny sa môže uskutočniť rôznymi fyzikálnymi, chemickými, enzymatickými a mechanickými metódami. Medzi mechanické metódy patrí homogenizácia so sklenenými guľôčkami a sonifikácia, homogenizácia vysokým tlakom, mikrofluidizácia. K ďalším metódam radíme fyzikálne rozrušovanie – osmotický šok, termolýza; chemické rozrušovanie pomocou chelačných činidiel, detergentov, rozpúšťadiel, hydroxidov; a enzymatická lýza – autolýza, lýza pomocou enzýmov (Middelberg 1995, Waites et al. 2001).

Pre rôzne účely sa používajú rôzne metódy. Kombináciou viacerých techník sa dosiahne vyššieho uvoľnenia žiadaného produktu, a tak je proces viac efektívny. Používajú sa väčšinou dve možnosti kombinovania metód: kombinácia chemicko-fyzikálno-enzymatických metód a predúprava s chemicko-fyzikálno-enzymatickými metódami, nasledovaná mechanickým rozrušením (Middelberg 1995, Waites et al. 2001, Heim 2007).

Medzi najčastejšie problémy súvisiace s rozrušovaním buniek patrí uvoľnenie DNA, teplotné zahrievanie a autolýza. Pri uvoľňovaní DNA sa môže zvyšovať viskozita suspenzie, čo má následný efekt na ďalšie procesy. Precipitácia nukleových kyselín alebo prídavok DNázy býva veľmi účinný krok zabraňujúci tomuto problému. Ak sa vytvára príliš veľa tepla, proteíny začnú denaturovať. Preto je potrebné počas izolácie chladiť celú suspenziu. Produkty uvoľnené z eukaryotických buniek bývajú často objektami degradácie hydrolytických enzýmov (proteáz, lipáz..) uvoľňovaných z rozrušených lyzozómov. Tieto poškodenia sa často redukujú prídavkom enzýmových inhibítorov, chladením celej sústavy bunecného extraktu a rýchlou manipuláciou (Middelberg 1995, Waites et al. 2001).

Procesy rozrušovania sú často kvantifikované monitorovaním zmien v absorbancii, veľkosťou častíc, celkovou koncentráciou proteínov alebo aktivitou špecifických intracelulárnych enzýmov uvoľnených z rozrušenej suspenzie buniek (Middelberg 1995, Waites et al. 2001).

### **Izolácia DNA**

Na izoláciu genomickej DNA je používaných množstvo odlišných metód a technológií. Vo všeobecnosti však všetky metódy zahŕňajú rozrušenie bunecnej membrány a lýzu, nasleduje odstránenie proteínov a iných kontaminantov a nakoniec sa vyzoluje purifikovaná DNA. Odstránenie proteínov sa obvykle dosahuje použitím proteínázy K, následným vysolením, organickou extrakciou alebo naviazaním DNA na pevnú fázu (aniónomenič alebo kremeňová technológia, či Silikagél). DNA sa zvyčajne vyvinie precipitáciou v ethanole alebo izopropanole. Výber metódy často závisí na mnohých faktoroch – potrebná kvantita a molekulová hmotnosť DNA (fenol-chloroformová extrakcia), potrebná čistota DNA (izolácia kitom s následným prečistením), ďalšie použitie vyzolovanej DNA, čas a náklady (Bilkova, Kralova 1998).

### **Izolácia metabolitov červených kvasiniek**

Červené kvasinky produkujú množstvo karoténových pigmentov, ktoré sú využívané v rôznych odvetviach priemyslu. Ďalšími užitočnými lipidovými metabolitmi červených kvasiniek sú ergosterol (provitamín D), ubichinón (antioxidant) a lipidy. Tradične sa na izoláciu pigmentov (spolu s ergosterolom a ubichinónom) používa rozrušenie buniek použitím mechanických techník, ako sú vysokotlaká homogenizácia alebo rozrušovanie buniek použitím guľôčok. Ďalšou možnosťou je i chemická extrakcia, ktorá relatívne rýchla

a nízkonákladová. Keďže sú karotenoidy rozpustné v tukoch, používa sa extrakcia organickými rozpúšťadlami ako je acetón, petroléter, benzén, hexán, dietyléter, chloroform, ethanol a methanol. Medzi najvýznamnejšie a najčastejšie používané extrakcie karotenoidov s vysokým výťažkom patria rozpúšťadlá acetón, DMSO a petroléter (Park et al. 2007).

Na rozrušenie pevných kvasinkových povrchových obalov sa môže použiť aj predúprava kyselinou. Nanešťastie, kyslá predúprava značne poškodzuje karoténové pigmenty. Izolácia týchto pigmentov je uskutočniteľná i na základe enzymatického rozrušovania bunecných membrán alebo extrakciou superkritickou kvapalinou - oxidom uhľičitým (Storebakken et al 2004).

## **4 KAROTENOIDY – PIGMENTY ČERVENÝCH KVASINIEK**

Karotenoidy reprezentujú jednu z najviac fascinujúcich, hojne sa vyskytujúcich tried prírodných pigmentov. Pretože majú dôležité funkcie v prírode, sú častým cieľom výskumu u chemikov a biológov. Karotenoidy sú častým predmetom rôznych publikácií vďaka svojmu všadeprítomnému výskytu, mnohým funkciám a vlastnostiam (Britton et al. 2008).

### **4.1 Chemická štruktúra a fyzikálne vlastnosti karotenoidov**

Wackenroder ako prvý zaviedol pojem karotény v 1831 opísaním pigmentu izolovaného z mrkvy. V roku 1837 Berzelius zaviedol pojem xantofyly k označeniu chemicky príbuzného žltého pigmentu extrahovaného zo starých listov. Cvet zaradil chemicky príbuzné komponenty známe ako karoteny a xantofyly do vytvorenej triedy karotenoidov v roku 1911. Dnes karotény sa používajú na označenie hydrouhlíkatých karotenoidov a xantofyly označujú karoténové deriváty s jednou alebo viacerou kyslíkovými funkčnými skupinami (Britton et al. 2008, Armstrong and Hearst 1996).

Karotenoidy obsahujú osem izoprenových jednotiek pripojených tak, že ich usporiadanie je obrátené do stredu molekuly. Dve centrálné metylové skupiny sú v 1,6-polohe a zostávajúce dve metylové skupiny sú v pozícii 1,5. Mnoho karotenoidov pozostáva zo 40-uhlíkatej kostry, ktorá má medzi 3 a 15 uhlíkom konjugované dvojité väzby. Tieto dvojité väzby určujú spektrálne vlastnosti karotenoidov, typicky absorbujú svetlo medzi 400 až 500 nm. Pozičné maximum sa zvyšuje vďaka pridaným dvojitým väzbám, a to od 7 do 35 nm. Prítomnosť iných funkčných skupín do hlavnej molekuly redukuje hlavnú štruktúru a intenzitu spektra (Britton et al. 2008, Armstrong and Hearst 1996).

### **4.2 Funkcie karotenoidov**

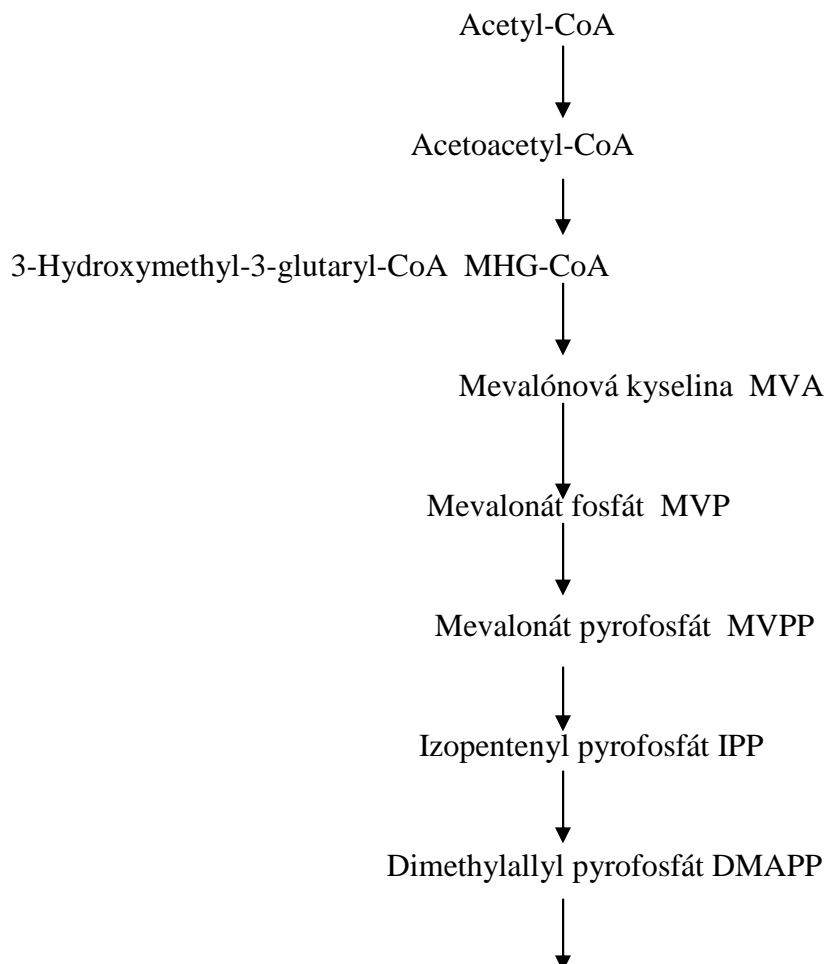
Okrem ich atraktívneho zfarbenia majú karotenoidy množstvo esenciálnych biologických funkcií. V prvom rade poskytujú fotosyntetizujúcim aj ostatným organizmom fotooxidatívnu ochranu proti účinku singletového kyslíka a radikálov vytváraných v prítomnosti svetla. U zvierat a ľudí sú tieto komponenty prekursorami vitamínu A, retinalu a retinovej kyseliny u cicavcov, čím majú esenciálnu úlohu vo výžive, v procese videnia a bunkovej diferenciácie. U ľudí karotenoidy prispievajú k prevencii a ochrane proti vážnym zdravotným poruchám ako sú rakovina, srdcovo-cievne ochorenia, a iné. U rastlín slúžia ako regulátory rastu a vývoja rastliny, ako pigmenty účastniace sa fotosyntézy, ďalej slúžia ako fotoprotektory, ako

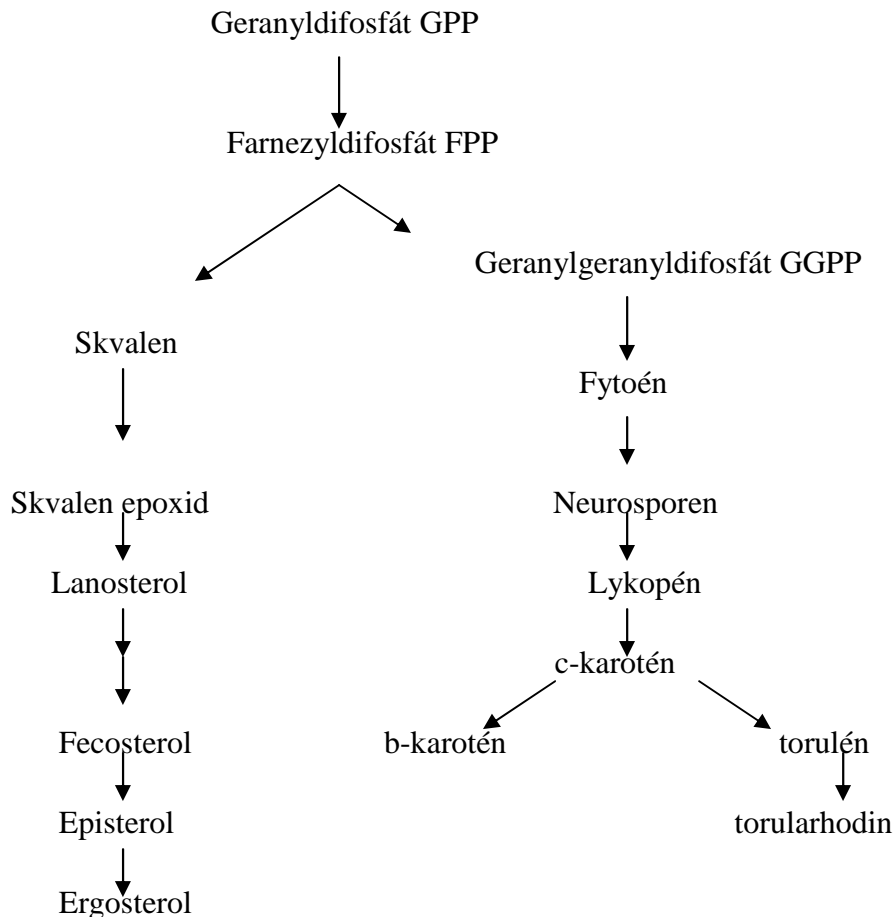
prekurzor pre hormóny ABA a strigolaktóny, ako atraktanty lákajúce iné organizmy (Bhosale 2003, Nelis and Leenheer 2008).

Okrem toho v priemysle sú karotenoidy používané ako nutričné suplementy, pre farmaceutické použitie, ako farbivá do potravín, a ako prídavok do krmiva pre zvieratá v krmivárskom priemysle. V dôsledku toho sú karotenoidy značne študované organickými a potravinárskymi chemikmi, biológami, fyziológmi, v nedávnej dobe ešte aj environmentalistami (Bhosale 2003, Nelis and Leenheer 2008).

### 4.3 Biosyntéza karotenoidov

Množstvo karotenidov v prírode obsahuje lineárnu C<sub>40</sub> uhlíkatú kostru so zahrnutými dvojitémi väzbami. Celá biosyntéza prebieha v rámci všeobecnej izoprenovej dráhy, a to v prvom kroku mevalónovou cestou. Vstupnou kľúčovou molekulou je acetylkoenzým A, ktorý je medzi produktom aerobného odbúravania sacharidov a  $\beta$ -oxidácie mastných kyselín. Po vzniku kyseliny mevalónovej pokračuje biosyntéza karotenoidov cez formáciu izopenetyl pyrofosfátu IPP, klasickou izoprenovou biosyntézou. Kritickým krokom je vznik prvého C<sub>40</sub> acyklického karotenoidu – fytoénu, ktorý vzniká kondenzáciou dvoch C<sub>20</sub> medzi produktov – geranylgeranylpyrofosfátu GGPP v treťom kroku, začiatku vlastnej biosyntézy karotenoidov. Sériou ďalších cyklizácií a desaturácií vzniká prvý cyklický karotén – lykopén a z neho ďalšie farebné karoteny a xantofyly (Goodwin 1993, Armstrong and Hearst 1996).





**Schéma 1:** Biosyntéza karotenoidov z acetylCoA do  $\beta$ -karoténu, torulénu a torularhodinu u rodu *Rhodotorula* a kompetitívna dráha syntézy ergosterolu odvodená z izoprenovej časti biosyntézy (Goodwin 1993, Frengova and Beshkova 2009).

#### 4.4 Biosyntéza sterolov

Biosyntetická dráha produkcie sterolových látok je jednou z paralelných vetví izoprenovej dráhy a od aktívneho izoprénu (prípadne od GGPP) prebieha súbežne s biosyntézou karotenoidov. Sterolová produkcia je výrazne ovplyvnená vonkajšími podmienkami. Vysoká koncentrácia využiteľných sacharidov podporuje produkciu ergosterolu, zatiaľčo médiá bohaté na dusíkaté zdroje znižujú biosyntézu sterolov. Na produkciu sterolových látok boli testované i necukerné uhlíkaté zdroje, prídavok acetátu do média so sacharózou alebo expozícia kvasiniek výparom ethanolu. Najdôležitejším faktorom pre biosyntézu sterolov je však kyslík. Steroly, ako aj nenasýtené mastné kyseliny, nemôžu byť syntetizované v neprítomnosti kyslíka za anaeróbných podmienok. Produkcia sterolov je lineárne úmerná dostupnosti kyslíka (Bard et al. 1993).

Biosyntéza ergosterolu je podobná produkcii karotenoidov, prebieha po kompetitívnej vetve oddelujúcej sa zo spoločnej izoprenoidnej dráhy. Medziprodukt, ktorý hrá hlavnú úlohu v syntéze ergosterolu je skvalén, ktorý je odvodený z farnesylpyrofosfátu.

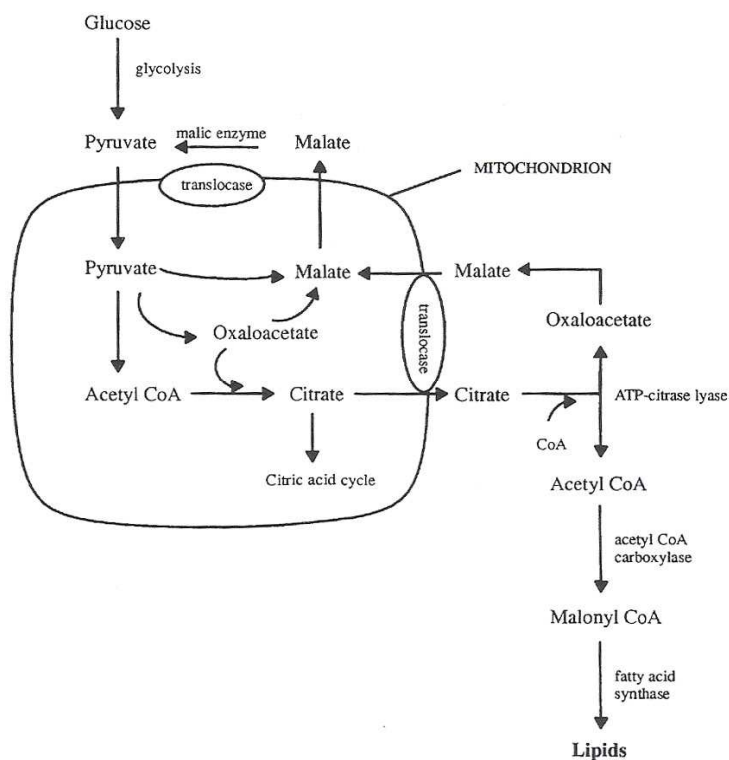
Ergosterol je sterol, ktorý sa bežne nachádza v hubách a je to dôležitá zložka ich bunčných membrán. Okrem toho sa podieľa na mnohých významných biologických funkciách ako je regulácia membránovej fluidity, aktivita a distribúcia integrálnych proteínov, kontrola

bunečného cyklu. Je biologický prekursor ergokalciferolu alebo vitamínu D2, ktorý vzniká pôsobení ultrafialového svetla na ergosterol (Bard et al. 1993, Rajakumar et al. 2007, Margalith 1989).

#### 4.5 Biosyntéza lipidov

Karotenogénne kvasinky, najmä z rodu *Rhodotorula*, patria medzi tzv. tukotvorné kvasinky. Syntéza mastných kyselín a lipidov z acetyl-CoA bola dôkladne študovaná v tukotvorných kvasinkách, ktoré majú schopnosť rásť na sacharidoch a akumulovať významné množstvo intracelulárnych lipidov (Perrier et al. 1995).

Acetyl-CoA je opäť kľúčovou vstupnou molekulou biosyntézy. Bolo zistené, že vyčerpaním dusíkatého zdroja sa znižuje aktivita enzýmov súvisiacich so zastavením akumulácie lipidov, hoci glukóza je ešte prítomná v kultivačnom médiu. Tvorba lipidov u tukotvorných kvasiniek je započatá bunečným odčerpávaním dusíka. Glukóza je asimilovaná rovnako ako je inhibovaná aktivita izocitrátdehydrogenázy (ICDH) v rámci mitochondrií. Toto vedie k akumulácii citrátu, ktorý je transportovaný do cytosolu a štiepený na acetyl-CoA ATP-citrát lyázou (Klein 1955, Perrier et al. 1995).



**Schéma 2:** Biosyntéza lipidov u tukotvorných kvasiniek (Davoli et al. 2004)

Tukotvorné kvasinky môžu akumulovať značné množstvo intracelulárnych lipidov, občas až také ako je 70% hmotnosti biomasy. Mikrokvapôčky lipidov, ktoré akumulujú tukotvorné kvasinky pozostávajú z triacylglycerolov s nasledovným relatívnym zastúpením mastných acylových skupín: olejová (18:1) – palmitová (16:0) - linolénová (18:2) - stearová (18:0).

Limitáciou nutričných substrátov, iných než uhlíkatých, podporuje u týchto kvasiniek intracelulárnu akumuláciu lipidov. Produkcia „single-cell“ mastných kyselín u kvasiniek je atraktívna najmä tým, že tukotvorné kvasinky rastú na lacných a ľahko dosiahnuteľných

fermentačných východzích substrátoch ako je napríklad srvátka, melasa alebo na ropných produktoch (Davoli et al. 2004).

Kvasinky kmeňa *Rhodosporidium toruloides* sú vynikajúcimi producentami lipidov. Preukázali vysokú toleranciu k lignocelulóзовým inhibítorm. U tejto kvasinky sa javí limitácia sírneho zdroja ako účinná metóda k regulácii akumulácie intracelulárnych lipidov. Vzhľadom ku kultivačným podmienkam dochádzalo k rôznym zmenám zloženia mastných kyselín u spomínanej kvasinky (Siguo Wu et al. 2011).

#### **4.6 Analýza karotenoidov a lipidických látok**

Vysokoučinná kvapalinová chromatografia je považovaná za preferovanú metódu k separácii, identifikácii a kvantifikácii karotenoidov a ostatných lipidických látok z nezmýdelniteľnej lipidickej frakcie. Často je využívaná normálna alebo reverzná fáza v izokratickom alebo gradientovom elučnom systéme s použitím C18 a C30 chromatografických kolón. Vo všeobecnosti, polymerické C30 stacionárne fázy poskytujú lepšie separácie geometrických izomérov karotenoidov než s použitím C18. Avšak C18 stacionárne fázy poskytujú lepšie separačné výsledky izomérov ako je  $\beta$ -karotén, luteín a zeaxantín. Sander et al. (1998) študoval vplyv silanolovej aktivity na selektivitu stacionárnej fázy pre separáciu karotenoidov ( $\alpha$ - a  $\beta$ -karotén, lykopen) a xantofylov (luteín a zeaxantín). Tieto karotenoidy boli separované použitím polymerických C18 stacionárnych fáz. Separácia troch uvedených nepolárnych karotenoidov bola len veľmi málo ovplyvnená limitáciami stacionárnej fázy. Bohužiaľ, komplexné zmesi týchto látok, ktoré väčšinou úzko súvisia štruktúrne, sa nedajú až tak jednoznačne identifikovať len podľa retenčného času a pevnej vlnovej dĺžky. Použitie detektora s diódovým poľom umožňuje kontinuálny zber spektrálnych dát počas celej HPLC analýzy. Predbežná analýza karotenoidov pomocou HPLC s detektorom diódového poľa vyžaduje sledovanie retenčného času komplexných absorbujúcich látok, aby sa dali porovnať s retenčnými časmi štandardov nameraných s UV/VIS detektorom (Breemen 1995, Breemen 1997).

V poslednej dobe je UHPLC nádejným nástrojom pre analýzu karotenoidov. Chauveau-Duriot et al. (2010) porovnal výkonnosť HPLC (použitím reverznej C18 fázy) a UHPLC systému. UHPLC poskytoval lepšie kvalitatívne výsledky. Pomocou HPLC bolo separovaných 12 chromatografických píkav karotenoidov a pomocou UHPLC až 23 píkav karotenoidov. Medzi hlavné odlišnosti týchto systémov patrí veľkosť stacionárnej fázy. Malé častice okolo 2  $\mu$ m redukujú význam protónov, čím sa stáva kolóna viac účinná, sledované látky sú separované rýchlejšie. Analýza karotenoidov s použitím UHPLC dosahuje excelentné separácie karoténov a xantofylov. Táto technika zároveň šetrí čas separácie, čím zabraňuje riziku degradácie, pretože tieto komponenty sú vysoko citlivé k fyzikálnym a chemickým faktorom (Breemen 1995, Breemen 1997, Rivera and Canela-Garayoa 2012).

Hmotnostná spektrometrická analýza poskytuje molekulovú hmotnosť a charakteristickú fragmentáciu jednotlivých látok, ktoré potom potvrdia typy jednotlivých karotenoidov alebo iných lipidických látok pri použití s retenčnými a spektrálnymi charakteristikami.

Pre analýzu týchto lipidických látok môže byť použitých niekoľko LC/MS techník:

- chemická ionizácia za atmosférického tlaku (APCI)

APCI prebieha za atmosférického tlaku a používa vyhrievaný rozprašovač na odparenie mobilnej fázy. Analyt je sprejovaný do kruhového výboju, ktorý tak produkuje reaktívne častice, ktoré ionizujú analyt spolu s iónmi plynu vzniknutých z mobilnej fázy.

Analýza karotenoidov pomocou APCI LC/MS ukázala rôzne neočakávané molekulárne nehomogenosti. Molekulárne ióny a protonizované molekuly boli zistené v pozitívnom móde APCI. Rôzne molekulárne ióny a deprotonizované molekuly boli detekované zasa v negatívnom móde APCI. Relatívny výskyt molekulárnych iónov a protonizovaných alebo neprotonizovaných molekúl sa líši podľa zloženia mobilnej fázy. Napríklad polárne rozpúšťadlá ako sú alkoholy, viedli k zvýšeniu nadbytku protonovaných karotenoidov, a menej polárne rozpúšťadlá, ako je napríklad methyl-tercbutyléter umožnili vznik nadbytku molekulárnych iónov. Medza detekcie, jednoduchosť použitia, kompatibilita rozpúšťadiel a prietoku sú pri automatickej a nesledovanej APCI analýze karotenoidov porovnateľné s elektrosprejom. Hlavnou výhodou APCI s elektrosprejom je vyššia linearita odozvy detektora. Medzi nevýhody APCI je mnohotvárnosť druhov molekulárnych iónov, ktoré môžu viesť k nejednoznačnosti určenia molekulovej hmotnosti a vysoká fragmentácia, ktorá sa snaží znížiť množstvo molekulárnych iónov (Breemen 1997, Rivera and Canela-Garayoa 2012).

#### - elektrosprej (ESI)

Elektrosprej je ionizačná technika a zároveň výkonný odstraňovač rozpúšťadla. Počas elektrosprejovania sa tvorí jemná hmla nabitých kvapôčiek z HPLC eluátu pri atmosférickom tlaku striekaním roztoku cez kapilárne elektródy s vysokým napätím (2000-7000 V). Nabité kvapôčky sú elektrostaticky priťahované k otvoru do hmotnostného spektrometra. Cestou narazia na prúd zohriateho plynu dusíka, ktorý vysušuje zvyšky rozpúšťadla a zabráňuje tak jeho vstupu do hmotnostného detektoru. Keď sa kvapôčky zmrstia na takú veľkosť, až elektrostatická odpudivosť medzi každou kvapkou presahuje kombináciu energie solvatacie a povrchového napätia iónov, tak sú vypudené z kvapôčky do plynnej fázy alebo sa rozpadajú, a tak uvoľňujú ióny analytu. Vzhľadom k tomuto kombinovanému spôsobu ionizácie a desolvatačného procesu je elektrosprej kompatibilný s HPLC prietokmi od niekoľkých  $\mu\text{l}/\text{min}$  až po  $1 \text{ ml}/\text{min}$  (Breemen 1995, Kaiser 2012).

V analýze karotenoidov v negatívnom móde ESI LC/MS sa môžu detekovať polárne xantofyly. Avšak pozitívny mód preukázal analýzu xantofylov aj karoténov. Hoci ióny produkované elektrosprejom sú obvykle prevádzané v roztokoch kyslých alebo zásaditých, karotenoidové ióny sú pravdepodobne tvorené mechanizmom desorpcie na povrchu kvapôčky. S cieľom zvýšiť tvorbu molekulárnych iónov, na lepšiu oxidáciu karotenoidov sa používajú rôzne halogenované prídavky do rozpúšťadiel (chloroform, 2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol, 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutánová kyselina, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol alebo trifluoroctová kyselina). Výsledkom je neobvyklá ionizácia, ktorá produkuje množstvo molekulárnych katiónov  $M^+$  s malými fragmentáciami a žiadnymi molekulárnymi aniónmi (Breemen 1995, Kaiser 2012).

Výhodami elektrospreju v analýze karotenoidov patria nižšie limity detekcie, bohaté molekulové ióny xantofylov a karoténov, podstatne ľahšia prevádzka a údržba. Jedným z možných obmedzení elektrospreju je relatívne nízky rozsah lineárnej odozvy, ktorá sa prejavuje v kvantifikácii karotenoidov (Breemen 1995, Kaiser 2012).

Hoci niektoré karotenoidy poskytujú rovnaké alebo veľmi podobné fragmentačné vzorce, v zmysle ich štruktúry, boli už zistené odlišnosti medzi intenzitami ich fragmentov. Tieto odlišnosti môžu byť použité k rozlíšeniu daných molekúl. A navyše môžu poskytovať náhľad na predominantné karotenoidy počas koelúcie. Navyše LC/MS je používaná nielen k charakterizácii karotenoidov, ale i k ich kvantifikácii. Je to možné vďaka nízkym detekčným limitom a širokému lineárnemu dynamickému rozsahu hodnôt vykazovaných hmotnostným detektorom (Kaiser et al. 2012).

## **5 EFEKT NUTRIČNÉHO A FYZIOLOGICKÉHO STRESU NA PRODUKCIU BIOMASY A KAROTENOIDOV ČERVENÝCH KVASINIEK**

Karotenoidné kvasinky využívajú rôzne druhy uhlíkatých zdrojov, ako je glukóza, xylóza, cellobióza, glycerol a iné. Rovnako tak môžu byť použité rôzne odpadové materiály ako lacné substráty na kultiváciu. Kvasinky akumulujú väčšie množstvá pigmentov pod stresovými podmienkami. Správne zloženie kultivačného média s prídavkami stresových faktorov je stále vo väčšom záujme biotechnológov. Využitie karoténmi obohatenej biomasy v krmnom priemysle má pozitívny efekt nielen na zvieratá kvôli vyššiemu obsahu aktívnych látok, ale i v konečnom dôsledku vo finálnych produktoch určených pre výživu ľudí (Frengova and Beshkova 2009, Latha et al. 2005, Gnaneshwar Goud 2013).

Tak, aby sa výťažok karoténových pigmentov zvyšoval a zároveň znižovali náklady na biotechnologický proces, testujú sa rôzne nastavenia a optimalizácie podmienok kultivácie zahrňujúcich nutričné a fyzikálne faktory. Faktory ako koncentrácia uhlíkového a dusíkového zdroja, minerály, vitamíny, pH, aerácia, teplota, svetlo a stres majú hlavný vplyv na bunecný rast a výťažky karotenoidov. Pretože sa biosyntéza karotenoidov riadi podľa úrovne a aktivity enzýmov regulujúcich procesy od celkového toku uhlíka až ku biosyntetickému systému karotenoidov, tak môže byť efektívna tvorba karotenoidov dosiahnutá aj pomocou nadprodukcčných kmeňov získaných mutagenézou a genetickým inžinierstvom (Márová et al. 2004, Bhosale and Gadre 2001, Meyer and Preez 1994).

Agro-priemyselné vedľajšie produkty a prebytky, ktoré sú súčasťou vysokej environmentálnej záťaže, by mohli byť využívané ako nízkonákladové sacharidické zdroje pre mikrobiálnu fermentáciu aj k získaniu karotenových pigmentov, využiteľných vo farmaceutickom, chemickom, či potravinárskom priemysle (Martin, Chun and Thakor 1994). V tomto smere už bolo otestovaných množstvo substrátov a mikroorganizmov so zvýšeným záujmom o nadprodukciiu mikrobiálnych karotenoidov ako alternatívu k syntetickým potravinárskym farbivám či antioxidantom. Najčastejšie používané surové materiály ako uhlíkaté sacharidové zdroje pre fermentáciu sú koncentrovaný vínný mošt (obsah 820 g/l celkových sacharidov), vínný mošt (183 g/l celkových sacharidov), glukózový sirup, repná melasa, extrakt zo sójovej múky, extrakt z kukuričnej múky (Buzzini 2000, Frengová 2009). Pri kultivácii karotenogénnych kvasiniek rodu *Rhodotorula* na uvedených substrátoch neboli pozorované žiadne významné rozdiely v produkcii biomasy a celkových karotenoidov. Napriek tomu však produkcie karotenoidov na extrakte zo sójovej múky a vínnom mošte, i koncentrovanom, vykazovali zvýšené hodnoty. Vínný mošt podporuje dobrú mikrobiálnu biosyntetickú aktivitu

v produkcii sledovaných metabolitov (Tinoi et al. 2005, Buzzini and Martini 2000, Aksu and Eren 2005, Buzzini Gobbetti and Rossi 1993, Ciegler Arnold and Anderson 1999).

Medzi ďalšie agro-priemyselné odpady využívané k fermentácii a produkcii karotenoidov patria aj ovsené vločky, pšenica, jačmeň, kukurica, ryža a iné (Márová et al 2010). V štúdiu (Aksu and Eren 2007) boli testované sacharidové materiály ako melasa so sacharózou a srvátka s laktózou v porovnaní s glukózou kvasinkami. Vo všeobecnosti, s nárastom koncentrácie sacharidov v médiu, sa zvyšovali aj výťažky biomasy a karotenoidov, s výnimkou srvátkového média s laktózou. Pri použitej koncentrácii 20 g sacharidov/l média bola produkcia celkových karotenoidov u glukózového média 13,8 mg/g sušiny, u melasového média až 28,4 mg/g sušiny. V médiu s obsahom 13,2 g laktózy na liter média bola produkcia celkových karotenoidov 35,5 g/g sušiny. Rovnako tak sa produkcia biomasy nezvyšovala ani pri kultiváciách na rôznych typoch srvátky (Márová et al. 2012), či už deproteizovanej alebo neupravenej lyofilizovanej. Produkcia karoténových pigmentov u kvasiniek rodu *Rhodotorula* však s použitím srvátkového média vzrástla 3,5-násobne oproti kontrolnému glukózovému médiu. Prídavok zemiakového extraktu do média rovnako tak viedol k zvýšeniu produkcie pigmentov, zatiaľčo výťažky biomasy ostávali nízke. Kvasinka *Sporobolomyces roseus* sa vyznačovala obrovskými zmenami v pomere biomasa:karotenoidy v závislosti na prídavku srvátky do média. Jej prídavok viedol až k 11-násobnému zvýšeniu b-karoténovej produkcie oproti kontrole (Márová et al. 2012).

Odlíšnosti v produkcii karotenoidov na rôznych testovaných odpadových materiáloch môžu byť spôsobené nielen kompozíciou samotného sacharidu, ale aj prítomnosťou aminokyselín, vitamínov, stopových prvkov a iných v obsahu kultivačných médií (Márová et al. 2012, Márová et al 2010).

Prídavok stresových faktorov do kultivačného média vedie k odlišným zmenám v raste v závislosti na kvasinkovom druhu, typu stresového faktoru, rastovej fáze. Prídavok peroxidu vodíka môže u viacerých kmeňov zvýšiť produkciu biomasy. Iné stresové faktory môžu zasa stimulovať produkciu karotenoidov. Karotenoidy sa akumulujú v kvasinkách v neskorej exponenciálnej fáze a pokračujú v stacionárnej fáze, kde je ich výťažok najvyšší (Márová et al. 2012).

Karotenogéza sa u kvasiniek reguluje prítomnosťou svetla. Avšak intenzita a potreba osvetlenia sa mení v závislosti na danom mikroorganizme. Kvasinka *Phaffia rhodozyma* produkovala viac astaxantínu v prítomnosti svetla s červenším odtieňom (Frengová, Beshková 2009).

Teplota je teda jeden z mnohých dôležitých faktorov vplývajúci na rast buniek a produkciu metabolitov. Efekt teploty závisí na druhovej špecifite daného mikroorganizmu. U karotenogénnych kvasiniek vplýva teplota na rôznorodosť syntézy pigmentov. Je všeobecne známe, že nízke teploty okolo 25°C vedú k syntéze prevažne  $\beta$ -karoténu a torulénu, zatiaľčo vyššie teploty okolo 35°C majú pozitívny vplyv na biosyntézu torulahodinu u kvasinky *Rhodotorula glutinis* (Frengova a Bershkova, 2009).

Produkcie karoténových pigmentov u červených kvasiniek v prítomnosti oxidačného stresu obvykle vedú k niekoľkonásobne zvýšeným výťažkom v porovnaní s optimálnymi podmienkami kultivácie. Kmeň *Rhodotorula glutinis* kultivovaný v prítomnosti peroxidu

vodíka mal produkcie karotenoidov 5-6-násobne vyššie (Frengova and Beshkova 2009, Davoli, Mierau, Weber 2004).

Karotenogéza červených kvasiniek je aeróbnym procesom. Vplyv aerácie neovplyvňuje len celkové množstvo produkcie pigmentov, ale aj kompozíciu individuálnych pigmentov z celkových karotenoidov. Pri vyššej aerácii sa zvyšuje množstvo produkcie karotenoidov oproti produkcii biomasy a mastných kyselín u kvasinky *Rhodotorula glutinis*. Ale kompozícia karotenoidov sa nemení, zostáva v najväčšom zastúpení torulén, nasleduje  $\beta$ -karotén,  $\gamma$ -karotén a nakoniec torularhodín. Naproti tomu kvasinka *Sporobolomyces roseus* reaguje na zvýšenú aeráciu vyššou produkciou  $\beta$ -karoténu, po ktorom nasleduje torulén a torularhodín (Davoli, Mierau, Weber 2004, Davoli and Weber 2002).

## 6 MOŽNOSTI MOLEKULÁRNYCH CHARAKTERISTÍK KVASINIEK

Červené kvasinky boli doteraz v dostupnej literatúre charakterizované predovšetkým pomocou morfológických, fyziologických a biochemických vlastností. Tradičná metodológia zahŕňa množstvo testov, proces identifikácie je zložitý a zároveň časovo náročný. Najväčším obmedzením tradičných prístupov je malá znalosť prirodzeného prostredia daného mikroorganizmu, rovnako tak je veľmi náročné izolovať z prírody čistú kultúru. V súčasnosti sa veda snaží zlepšiť identifikáciu kvasiniek na základe molekulárno-biologických techník s využitím ribozomálnej DNA, ktorá obsahuje množstvo konzervatívnych úsekov genómu s variabilnými sekvenciami. Sekvencie ribozomálnych génov sú už rutinne používané k stanoveniu odlišností medzi jednotlivými kvasinkovými druhmi a sú dostupné v medzinárodných databázach pre kvasinky radené medzi *Ascomycetes* a *Basidiomycetes*. Najlepšie popísaný genóm je u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. O karotenogénnych kvasinkách nájdeme v databázach popísaných len málo génov. Ich celkový karyotyp ešte nie je charakterizovaný, čo je spôsobené hlavne obtiažným získaním nedegradovanej nenaštepenej chromozomálnej DNA z buniek s extrémne rigidnou bunkovou stenou (Kurtzman 2011, Mueller, Gerald 2004).

Metódy molekulárnej biológie sú používané na rýchlu identifikáciu a taxonomické zaradenie kvasiniek. Ich výhodou je, že nie sú ovplyvnené podmienkami vonkajšieho prostredia. K taxonomickému, fylogenetickému zaradeniu sa najčastejšie používa technika polymerázovej reťazovej reakcie PCR, denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy DGGE a pulznej gélovej elektroforézy PFGE, ktoré sú založené na analýze genómovej DNA. V prípade PCR a DGGE bývajú ku charakterizácii červených kvasiniek používané vysokokonzervatívne úseky genómovej DNA alebo mitochondriálnej DNA. Príkladom takýchto sekvencií sú ribozomálne gény veľkej D1/D2 ribozomálnej podjednotky alebo tzv. ITS medzerníky, ktorých analýzou je možné dosiahnuť rodové a druhové rozlíšenie medzi jednotlivými kvasinkami. Doména D1/D2 veľkej podjednotky 26S rDNA sa skladá zhruba zo 600 nukleotidov a môže byť sekvenovaná pre prakticky všetky známe druhy kvasiniek. Táto oblasť býva rutinne používaná k identifikácii kvasiniek a fylogenetickému taxonómii. Porovnanie sekvencií môže byť použité i pre malú podjednotku 18S rDNA, avšak sekvenčné rozdiely nemusia byť tak dostatočne odlišné, aby sa dosiahlo odlíšenie príbuzných kmeňov (Daniel a Mayer 2003, Mueller, Gerald 2004).

Oblasti ITS rDNA vykazujú vyššiu mieru divergencie, a preto sa zdajú byť vhodnejšie na druhové odlíšenie. Tieto oblasti sú vďaka vyššiemu počtu kópií v genóme ľahko amplifikovateľné a v rámci príbuzných druhov vykazujú pomerne vysokú rozdielnosť.

Veľkosť ITS amplikónov sa líši podľa druhu. Preto môžu byť druhy odlišené viacmenej i podľa veľkosti polymorfizmov jednotlivých amplikónov. V porovnaní s oblasťou 18S rDNA, práve ITS rDNA oblasť vykazuje vyšší stupeň odlišenia (Boekhout a Robert 2003).

Sekvencie mitochondriálnych génov a génov, ktoré kódujú proteíny, sú tiež používané k stanoveniu fylogenetických vzťahov medzi jednotlivými druhmi kvasiniek (Daniel a Mayer 2003).

## 6.1 PCR v spojení s DGGE

PCR – DGGE je technika pôvodne vyvinutá k detekcii bodových mutácií v klinickej diagnostike, v súčasnosti je využívaná vo viacerých odvetviach mikrobiológie – identifikácia jednotlivých mikroorganizmov, vyhodnotenie mikrobiálneho zastúpenia vo fermentačných procesoch, monitoring rozvoja mikrobiálnej populácie a iné. Jej výhodou je možnosť extrakcie DNA z reálnych vzoriek, bez potreby kultivácie. Výsledkom je tzv. fingerprint – otláčok mikrobiálnej komunity z daného prostredia (Ercolini 2004, Cocolin, Bisson and Mills 2000, Prakitchaiwattana, Fleet and Heard 2004).

Prvým krokom metódy je izolácia DNA, z ktorej je následne amplifikovaný špecifický úsek vybraný použitím špecifických primerov. Výsledkom je zmes amplikónov s druhovo špecifickými rozdielmi o rovnakej veľkosti, z rovnakého alebo rôznych druhov mikroorganizmov prítomných vo vzorke. Amplikóny z rôznych druhov majú odlišné sekvencie, ktoré sú separované metódou denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy DGGE vďaka odlišnému denaturačnému profilu („melting“ profil). Teplota topenia  $T_m$  jednotlivých amplikónov je špecifická pre každú sekvenciu. Akonáhle sa dosiahne daná teplota daného úseku, fragment čiastočne denaturuje a vytvorí sa vetvená molekula. Po separácii je možné v DGGE géli pozorovať fragmenty DNA neurčitého pôvodu. Tie môžu byť z gélu vyizolované, ďalej sekvenované a porovnané so sekvenciami dostupnými v databázach. Pre identifikáciu mikrobiálneho spoločenstva z reálnych vzoriek je konečným produktom DGGE separácie fingerprint špecifický pre analyzovanú vzorku, tvorený niekoľkými fragmentami reprezentujúcimi zloženie jednotlivých druhov v študovanej vzorke (Rantsiou et al. 2013, Cocolin et al. 2002).

Alternatívou k sekvenovaniu jednotlivých frakcií za účelom identifikácie mikrobiálnych druhov v získanom DGGE profile je konštrukcia molekulárnych rebríčkov (referenčných markerov). Identifikačný marker je zostrojený ako zmes amplikónov rDNA reprezentatívnych druhov analyzovanej reálnej vzorky. PCR produkt DNA izolovanej priamo z matrice je na gél nanosený spoločne so zmesou amplikónov referenčných druhov ako rebríček alebo štandard. Porovnaním migračných vzdialeností amplikónov s referenčnými druhmi v identifikačnom rebríčku je možná identifikácia mikroorganizmov prítomných v analyzovanej vzorke (Innis 1990, Green, Leigh and Neufeld 2009).

Táto metóda PCR-DGGE býva aplikovaná na štúdium eukaryotických spoločenstiev, ktoré často zohrávajú dôležitú úlohu vo fermentačných procesoch potravín. Pre sledovanie kvasinkovej populácie bol vyvinutý prístup, ktorý separuje amplifikované produkty variabilných úsekov 26S rDNA z kvasinkovej DNA v priebehu komerčných (priemyselných) fermentačných procesov výroby vína. V každom stupni kvasného procesu je možné profilovať mikrobiálnu komunitu a identifikovať druhy kvasiniek patriace k rodom

*Metschnikowia*, *Candida* a *Pichia* na začiatku fermentácie, a *Saccharomyces cerevisiae* ako dominantný druh v posledných štádiách procesu (Mills, Johannsen and Cocolin 2002).

Metóda sa používa aj pre analýzu kvasinkových populácií v prostrediach ako sú: bobule vínnej révy, rôzne druhy cesta, kakaové bôby, fermentované klobásky a surové neupravené mlieko a iné (Green, Leigh and Neufeld 2009, Cocolin 2000).

Pomocou PCR-DGGE je možné analyzovať i mutačné varianty na špecifických úsekoch DNA, jednobodové zámény v nukleotidových sekvenciách, ktoré v bunkách vznikajú pod stresovými podmienkami ako sú teplotné šoky, pôsobenie peroxidu alebo alkylačných činidiel, nedostatku nutričných zdrojov a iných. Tieto stresy vyvolávajú v bunkách aktiváciu mechanizmov, ktoré pôsobia adaptačne na drastické vonkajšie zmeny. Stresový signál putuje do bunecného jadra, aktivuje genovú expresiu, ktorá vedie k fenotypovým zmenám v podobe syntézy množstva proteínov (Innis 1990, Kralova et al. 2001).

## 6.2 PFGE – analýza karyotypu kvasiniek

Jednou z novších metód používaných na analýzu DNA je pulzná gélová elektroforéza. Metóda sa používa k separácii veľkých molekúl DNA - celých chromozómov kvasiniek. Molekuly DNA sú vystavené elektrickému poľu, ktorého smer sa pod určitým uhlom periodicky mení v časových intervaloch. Molekuly sú tak delené podľa veľkosti v dôsledku reorientácie molekuly pôsobením daného smeru elektrického poľa. Čas potrebný k reorientácii molekuly nukleových kyselín rastie s dĺžkou ich reťazca. Kratšie molekuly putujú gélom rýchlejšie, než dlhšie, a tým sa dosiahne vyššia účinnosť delenia (Herschleb et al. 2007, Basim and Basim 2001, Tanskanen et al. 1990, Rapley and Walker 1998).

Pulzná gélová elektroforéza je hodne využívaná k charakterizácii kmeňov kvasiniek. Karyotypy červených karotenogénnych kvasiniek neboli doposiaľ významne popísané. Metóda je vhodná i na druhové odlíšenie kvasiniek z jedného rodu. Naumov et al 2001 odlíšili kvasinku *Saccharomyces cerevisiae* od kvasinky *Saccharomyces bayanus*. Tieto dva druhy majú veľmi podobné karyotypné vlastnosti. Líšia sa jediným chromozómom o veľkosti 1300 kbp u *S. bayanus*, kde *S. cerevisiae* obsahuje fragment o veľkosti 1600 kbp. Využitie PFGE má veľké uplatnenie aj v potravinárskych aplikáciách, ako je detekcia geneticky modifikovaných potravín, k stanoveniu fytopatogénnych mikroorganizmov, stanoveniu vlastností priemyslovo používaných mikroorganizmov, i k sledovaniu zmien na úrovni DNA v dôsledku stresových odpovedí na environmentálne pôsobenie nežiadúcich faktorov. Priemyslové kmene často podliehajú mutáciám a strácajú tak požadované vlastnosti. Na druhej strane je PFGE jedna z najobtiažnejších metód analýzy DNA ku karyotypovej charakterizácii, čo je spôsobené hlavne zložitým postupom izolácie DNA zo vzoriek a rovnako tak potrebnou zručnosťou pri samotnej analýze (Alaidan et al. 2009, Deák 2008, Deák 2002, Kurtzman and Robnett 2003, Naumov et al 2001, Naumov et al. 2000, Versavaud et al. 1995).

## 6.3 Molekulárne charakteristiky a posúdenie vplyvu extémnych podmienok

Molekulárne charakteristiky využívajúce rôzne techniky od PCR-DGGE, PFGE, analýzy DNA pomocou tzv. „microarray“ až po 2D elektroforézu analyzujúcu proteóm bunky sú stále častejšie používané aj na určenie vplyvu extrémnych environmentálnych podmienok na kvasinky. Tieto podmienky zahrňujú vplyv fyziologického, chemického alebo biologického

stresu. Porozumenie základným bunčným mechanizmom je hlavným cieľom mikrobiálnych technológov, ktorí sa snažia vybrať mikrobiálne kmene s vysokou viabilitou a vitalitou, i odolnosťou voči vonkajším stresovým faktorom, aby mohli byť ďalej využívané v priemyselných fermentáciách (Šmarda et al. 2008, Attfield 1997).

Funkčná analýza genómu a proteómu je dobrým nástrojom na porozumenie úlohy génovej expresie a jej produktov, ako sú bunky schopné prežiť v zložitých podmienkach, aký je ich rast, delenie a reakcie na vonkajšie zmeny (Walker 1998).

**Tab. 4:** *Stresové faktory využívané u kvasiniek (Walker 1998)*

Fyzikálny stress
Teplotný šok
Osmotický šok
Dehydratácia
Vysoký hydrostatický tlak
Radiácia
Chemický stres
Ethanolová toxicita
Nutričná limitácia
Oxidatívny stres
pH šok
Stres z kovov (toxicita, limitácia)
Chemická mutagenéza
Biologický stres
Bunčné stárnutie
Genotypové zmeny
Kompetícia z inými mikroorganizmami

V tabuľke sú uvedené príklady environmentálnych stresov, z ktorých niektoré boli bližšie popísané v úvodných kapitolách.

### **Chemická mutagenéza**

Niekoľko chemických činidiel je známych tým, že poškodzujú DNA. Mutácie mikrobiálnych kmeňov môžu viesť ku zlepšeniu niektorých vlastností pri súčasnom oslabení vlastností druhých. Mutácie sú spôsobené dedičnou zmenou sekvencie bází v DNA. Vznikajú zvyčajne pri chybných replikáciách, presunoch alebo opravách DNA a vyskytujú sa s frekvenciou jedna mutácia na  $10^6$  bunčných delení. Jedná sa o každú zmenu v géne, ktorá sa zachová aj počas jeho expresie, a to aj v prípade, že prestal pôsobiť mutagénny činiteľ. Frekvenciu mutácií zvyšuje celý rad faktorov vrátane vírusov, chemických činidiel, ultrafialového svetla či ionizačného žiarenia. Sú to zmeny trvalé a prenášané do nasledujúcich bunčných generácií toho istého organizmu. Je možné pripraviť mutanty a hybridy, ktoré sú z priemyselného hľadiska omnoho výhodnejšie ako pôvodné kmene. Vedľa génového inžinierstva použitého pri kvasnej výrobe aminokyselín je známa aj výroba antibiotík za použitia mutantných kmeňov. Všeobecne je pri mutáciách u mikroorganizmov dôležitá dĺžka jeho kontaktu s mutagénom. Najvýhodnejším spôsobom, ako zaviesť mutáciu do genómu, je použitie takého

mutagénu, pre ktorý je charakteristická nízka úmrtnosť mikroorganizmu a zároveň vysoká frekvencia mutácie (Park et al. 1998, Xiao 2006).

K najpoužívanejším mutagénom patrí ultrafialové svetlo o vlnovej dĺžke 265 nm, nakoľko je najviac absorbované DNA. Spolu so žiarením RTG a ionizačným patrí ku fyzikálnym faktorom spôsobujúcim mutácie DNA. Veľmi účinnými mutagénmi, ktoré sa používajú pre získavanie mikrobiálnych mutantov pre priemyselné účely sú alkylačné činidlá, napr. methylmethánsulfonát (MMS), ethylmethánsulfonát (EMS), ethylénoxid, diepoxybután a metylované nitrozlučieniny (Xiao 2006, Turňa et al. 1990)

Pomocou chemickej mutagenézy bolo vytvorených niekoľko mutantných kmeňov karotenogénnych kvasiniek s nadprodukčnými vlastnosťami. U UV mutantu *Rhodotorula gracilis* bola preukázaná 1,8-krát vyššia aktivita syntézy karotenoidov než u „wild-type“ kmeňa. Mutant 32 *Rhodotorula glutinis* získaný tiež UV mutagenézou produkoval 24-krát viac celkových karotenoidov a 120-krát viac  $\beta$ -karoténu (2,05mg/g sušiny) než pôvodná kultúra. Päťnásobné zvýšenie akumulácie  $\beta$ -karoténu bolo zistené u žltého mutantu *Phaffia rhodozyma* 2-171-1, ktorý bol získaný po EMS mutagenéze. UV mutant *Phaffia rhodozyma* PG104 produkoval 46-krát viac  $\beta$ -karoténu, čo bolo 92% z celkových karotenoidov, než pôvodná rodičovská kultúra (Bhatt et al. 2013, Meyer and Preez 1994).

### 6.3.1 Environmentálne stresové odpovede u kvasiniek

Všetky bunecné organizmy vyžadujú špecifické vnútorné podmienky pre optimálny rast a funkcie. Náhla zmena v podmienkach externého prostredia môže rušiť vnútornú rovnováhu a narušuje normálne procesy prebiehajúce v bunke. Preto bunka musí opraviť vnútorný systém napriek kolísaniu vo vonkajšom prostredí. Mechanizmy, ktoré kvasinky používajú k ochrane svojho vnútorného prostredia proti účinkom z vonkajšieho prostredia, sa nazývajú súhrnne ako environmentálna stresová odpoveď (ESR) (Hohmann and Mager 2003, Perrone et al. 2008).

Environmentálna stresová odpoveď má zásadný význam u všetkých živých organizmov, v rozmedzí od jednoduchých prokaryot až po mnohobunecné eukaryota. Profil odpovednej reakcie je závažne ovplyvňovaný druhom stresového účinku. Pri nízkych stresových účinkoch sa bunky adaptujú aktiváciou rôznych obranných funkcií. Vo vyšších dávkach stresu, časť buniek v populácii je usmrtených apoptózou, v extrémnych prípadoch nekrotou (Hohmann and Mager 2003, Jamieson 1998, Izawa et al. 1995).

#### Mechanizmy adaptácie

Bunky reagujú na nečakaný stres v odlišných fázach. V primárnej fáze sa vyskytujú bunecné zmeny ako dôsledok stresovej expozície. V sekundárnej fáze – je fáza stresovej odpovede, a je charakterizovaná cítením, signalizáciou a úpravou génovej a proteínovej expresie. Náhle bunecné zmeny sú detekované špecifickými senzormi, ktoré aktivujú špecializované signalizačné dráhy predávajúce bunecné signály do jadra. Aktivujú sa proteínové kinázy, tie aktivujú množstvo proteínov sprostredkujúce bunecnú odpoveď, ako je zastavenie bunecného cyklu, inhibícia translácie, zmeny v génovej a proteínovej expresii a enzymatické zmeny (Hohmann and Mager 2003).

Každá bunka je presne riadená tak, aby zabezpečila pomocou univerzálneho bunecného programu prežitie v nových environmentálnych podmienkach. Toto sa deje v tzv. adaptačnej

fáze. Stres indukuje bunkovú aktivitu, ktorá vedie k obnoveniu rastu a proliferáciu v nových podmienkach (Hohmann and Mager 2003).

### **Genomika kvasinkových odpovedí na stres**

Aspektom každej bunecnej odpovede na environmentálne zmeny je reorganizácia génovej expresie na prispôsobenie sa novým podmienkam. Zmeny v génovej expresii sú priamoúmerné veľkosti environmentálneho stresu. Niektoré expresné zmeny sú špecifické pre dané nové prostredie, iné sa vyskytujú v bežných odpovediach na stresové podmienky (Gasch et al. 2000).

Analýza génovej expresie u bežných odpovedí na environmentálny stres odhalila, že do expresie je zapojených zhruba 900 kvasinkových génov. Tie sa delia do dvoch skupín na základe ich expresného modelu. Prvá skupina sa skladá z potlačovaných – reprimovaných génov, ktorých transkripcia je potlačená v závislosti na podmienkach stresu. Patria sem gény zahrňujúce proteínovú syntézu, gény pre ribozomálnu syntézu, RNA polymerázu a iné. Bunka šetrí energiu zníženou transkripciou, zatiaľčo sa prispôsobuje podmienkam nového prostredia. Do druhej skupiny patria tzv. indukované gény, ktorých transkripcia je naopak zvýšená v stresových podmienkach. Tieto gény majú na starosti rôzne bunecné procesy, vrátane metabolizmu sacharidov, bielkovín, ochranu voči oxidačnému stresu, reorganizáciu vnútorného prostredia, opravu DNA a iné. Funkcie produktov týchto génov zabezpečujú rezistenciu kvasinky vystavenej stresu, tým sa stáva tolerantnejšou k ďalšej vlne nových stresových environmentálnych podmienok (Gasch et al. 2000, Pearce and Humphrey 2001).

Okrem bežných odpovedí na stresové prostredie sa v bunke môžu vyskytnúť i mechanizmy vyvolávané zmenami v génovej expresii na vyšších špecifických génoch. Sem patria napríklad odpovede na stesy vyvolané teplotným šokom, osmotickým alebo oxidatívnym stresom, alebo poškodenie až na úrovni DNA (Gasch et al. 2000).

### **Regulácia génovej expresie u kvasiniek**

Keď sa kvasinková bunka dostane do nového environmentálneho prostredia, receptory na povrchu bunky vyšlú signál, na ktorý bunka reaguje zmenou génovej expresie. Kontrola tejto expresie zabezpečuje v bunke syntézu takých produktov, ktoré práve potrebuje. Tým sa stáva bunka flexibilná v adaptácii na variabilné prostredia. Regulácia génovej expresie je špecifická v závislosti na podmienkach a zahrňuje množstvo regulačných mechanizmov, ktoré regulujú expresiu na mnohých stupňoch dráhy od DNA cez RNA až k syntéze proteínu (Gasch et al. 2000, Hohmann and Mager 2003).

Najštudovanejším regulačným krokom na stresové odpovede je regulácia transkripcie. RNA polymeráza sa naviaže na DNA v určitých miestach k zahájeniu transkripcie. Hlavným úsekom je tzv. TATA box. Transkripčné faktory môžu byť lokalizované na rôznych miestach od transkripčného štartu, a ich naviazaním na špecifické úseky DNA sa reguluje transkripcia posilnením alebo inhibovaním tvorby komplexných štruktúr, ktoré zahajujú transkripciu. Poznáme dva typy transkripčných faktorov, a to sú transkripčné faktory „všeobecného stresu“, ktoré sú aktivované vo všetkých prípadoch environmentálneho stresu indukciou stresových génov cez element známy ako stresový zodpovedný element STRE, a transkripčné faktory špecifické podľa podmienok, kontrolujú génovú expresiu v špecifických podmienkach (teplotný šok, osmotický šok, oxidačný stres a iné) (Gasch et al. 2000, Hohmann and Mager 2003, Gash and Werner-Washburne 2002, Estruch 2000).

## **Fenotypové dôsledky environmentálnych stresových odpovedí u kvasiniek**

Zmeny v génovej expresii vedú k iným produktom proteínovej syntézy. Proteomické štúdie identifikovali proteíny, ktoré boli syntetizované alebo naopak sa prestali syntetizovať v podmienkach stresu. Aj napriek celkovému poklesu proteínovej translácie v stresových podmienkách bunky boli stále schopné produkovať určité proteíny potrebné pre ich prežitie. Zmeny v génovej expresii pomáhajú bunke upraviť syntézu proteínov na rast a prežitie v nových podmienkach. Gény indukované v environmentálnych stresových odpovediach sú zodpovedné za množstvo procesov fyziologických fenotypových odpovedí. Napríklad ako ochranu voči osmotickému šoku bunka akumuluje glycerol a trehalózu, zvyšuje vychytávanie K<sup>+</sup> a výdaj Na<sup>+</sup>. Zvýšením syntézy polynenasýtených membránových lipidov sa bunka chráni voči teplotnému šoku, konkrétne chladu (Hohmann and Mager 2003, Walker 1998, Penninckx 2000).

## **DNA-mikročipy („microarrays“)**

Množstvo techník už bolo použitých na identifikáciu génov génovej expresie v bunkách zodpovedajúcim rôznym prostrediam. DNA mikročipy („microarrays“) sa používajú na identifikáciu génov a proteínov zapojených v oblasti stresových reakcií. Je to nástroj na vykonávanie tisícov hybridizácií v rovnakom čase s použitím malého množstva vzorky. Fragmenty DNA sú amplifikované pomocou PCR a hybridizujú sa s DNA čipu pod podmienkami schopnými hybridizácie. DNA vzoriek je označená fluorescenčným farbivom a laserovým skenom alebo fluorescenčným mikroskopom sa detekujú pozície hybridizácie. Výsledky sú vyjadrené kvantitatívne vo vzťahu ku kontrolnej skupine (Gash and Werner-Washburne 2002, Hirasawa et al. 2007).

DNA-microarrays sa používa na vyhodnotenie rôznych bunecných funkcií, vrátane transkripcie každého génu v bunke, prítomnosť a lokalizáciu DNA s väzbami na proteíny naviazané v celom genóme. Charakterizácia zmien v génovej expresii ponúka náhľad na charakter fyziologických odpovedí buniek ku zmenám v ich okolí (Hartl et al. 2009).

## **2D elektroforéza**

Ďalšou cestou v hodnotení vplyvu stresových faktorov na bunku je aj analýza proteómu. I malá zmena v expresii proteínov sa prejaví v zmene proteínového zloženia. Zmeny sú najlepšie pozorovateľné porovnávaním proteínového zloženia kontrolných vzoriek so vzorkami stresovanými z proteínových profilov získaných dvojdimenzionálnou polyakrylamidovou elektroforézou. Tá delí proteíny na základe ich izoelektrického bodu a molekulovej hmotnosti pomocou SDS elektroforézy. Spojenie týchto dvoch metód umožnilo analýzu proteínov v množstve stoviek až tisícov na jednom géli. Získa sa tak proteínova mapa, vďaka ktorej sa môže porovnávať komplexné proteínové zloženie vzorky za rôznych podmienok. Princípom metódy je rehydratácia IPG pásov, aplikácia vzoriek a následná izoelektrická fokusácia. Potom sú pásy ekvilibrované v SDS pufre, prenesené na SDS gél následne delené v druhej dimenzii. Po separácii a ofarbení môžu byť gély porovnávané pomocou obrazovej analýzy, databázových programov alebo online databáz. Výhodou metódy je, že jeden spot zodpovedá jednému proteínu. Jednotlivé spoty potom môžu byť z gélu extrahované, hydrolyzované trypsinom a môže byť identifikovaná sekvencia aminokyselín v peptidoch separovaných pomocou HPLC/MS/MS. Pomocou databáz sekvencie peptidov, potenciálnych prekryvov a s využitím databáz parciálnych či kompletných proteínových sekvencií sa dá viac či menej presne identifikovať zostava

proteínov, ktorých expresia sa významne mení behom stresu. Táto metóda je veľmi špecifická a ako jedna z mála prináša výsledky funkčnej aktivity bunky v zmenených podmienkach (Sóti and Ermely 2007, Kellner and Meyer 1999, Bouchal and Kučera 2003, Haliénová et al. 2007)

## 7 CIELE PRÁCE

Cieľom dizertačnej práce je štúdium regulácie biotechnologickej produkcie karotenoidov a vybraných lipidických látok pomocou červených kvasiniek rodov *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* a *Cystofilobasidium*. Ako zdroje uhlíka sú využívané rôzne odpadové materiály z agropriemyselných zdrojov.

V práci sú riešené nasledujúce dielčie ciele:

- Kultivačné experimenty karotenogénnych kvasiniek na rôznych odpadových materiáloch
- Kultivačné experimenty kvasiniek na hydrolyzovaných odpadových materiáloch
- Selekcia naprodukčných kmeňov na odpadových materiáloch využitím náhodnej mutagenézy
- Využitie lignocelulóзовého hydrolyzovaného materiálu k produkcii karotenoidov a sledovaných lipidických látok
- Sledovanie produkcie biomasy, karotenoidov, ergosterolu, prípadne koenzýmu Q v jednotlivých produkčných médiách
- Monitoring metabolických zmien v kvasinkových bunkách pomocou metódy PCR v spojení s DGGE
- Identifikácia a charakterizácia jednotlivých kvasinkových kmeňov metódami PCR-DGGE a PFGE
- Možnosti využitia kvasinkových metabolitov a charakterizácia obohatenej kvasinkovej biomasy

## 8 EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ

### 8.1 Použité chemikálie

#### 8.1.2 Chemikálie

Kvasničný autolyzát, Himedia (India)  
D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner s r.o. (ČR)  
Síran amonný p.a., Lachema (ČR)  
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema (ČR)  
Síran horečnatý heptahydrát p.a., Chemapol (ČR)  
Chlorid sodný p.a., Lachema (ČR)  
Acetón p.a., Lachema (ČR)  
Hydroxid draselný p.a., Lachema (ČR)  
Diethyléter p.a., Lachema (ČR)  
Ethanol pre UV-VIS, Lachema (ČR)  
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), Penta (ČR)  
Beta-merkaptóethanol, Serva (SRN)  
Izopropylalkohol, Lach-Ner s r.o. (ČR)  
Lytkáza, Sigma-Aldrich (SRN)  
Agaróza („low melting“), Serva (SRN)  
N-laurylsarcosine, Sigma-Aldrich (SRN)  
Proteináza K, Sigma-Aldrich (SRN)  
Ultra Clean Microbial DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Inc).  
PCR voda – voda pro injekce ČSL 4, Biotika (SR)  
Syntetické priméry (NL1, NL4, LS2, ITS1, ITS4, ITS2, ITS3 ), Elisabeth Pharmacon (ČR)  
KAPA2G™ Robust PCR Kit, Kapa Biosystems (USA)  
Agaróza Premium, Serva (SRN)  
Akrylamid 99%, Sigma (SRN)  
Bromfenolová modrá – sodná sůl, Serva (SRN)  
DNA ladder RTU (Ready-to-Use) 100 bp, Nippon Genetics (SRN)  
Ethidium bromid, Serva (SRN)  
Hydroxid sodný p.a., Lach-Ner (ČR)  
N,N'-methylenbisakrylamid, Serva (SRN)  
N,N'-tetramethylendiamin (TEMED), Serva (SRN)  
Persíran amonný (APS), Serva (SRN)  
Methylester kyseliny methánsulfónovej (MMS), Sigma-Aldrich (SRN)  
Ethylester kyseliny methánsulfónovej (EMS), Sigma-Aldrich (SRN)  
Methanol pre HPLC Gradient Grade, Sigma – Aldrich (SRN)  
Ethanol pre HPLC Gradient Grade, Sigma – Aldrich (SRN)  
Methanol pre LC-MS, Sigma – Aldrich (SRN)  
Beta, beta-karotén, Sigma (SRN)  
Koenzym Q, Sigma (SRN)  
Ergosterol, Sigma (SRN)

### 8.1.3 Enzymy

AMG - amyloglukosidáza Novo, exo-1,4- $\alpha$ -D-glukosidáza (glukoamyláza), vznik ze submerzní fermentace pomocí *Aspergillus niger*. Novozymes A/S (Dánsko)

Viscozyme - tekutý multienzymový komplex obsahující arabinázu, b-glukanázu, hemicelulázu, celulózu a xylanázu. Produkováný *Aspergillus acetuleatus* s aktivitou 100 FBG (fungálních b-glukanázových jednotek) na gram. Novozymes A/S (Dánsko)

Novozym - Novozym 188 - enzymový preparát obsahující cellobiázu. Novozymes A/S (Dánsko)

Celluclast – enzymový preparát obsahující celulózu; Novozymes A/S (Dánsko)

### 8.1.4 Použité mikroorganizmy

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

*Rhodotorula aurantiaca* CYY 20-9-7

*Rhodotorula mucilagliosa* CYY 20-7-28

*Cystofilobasidium capitatum* CCY 10-1-1

*Cystofilobasidium capitatum* CYY 10-1-2

*Sporobolomyces roseus* CCY 19-6-4

*Sporobolomyces shibatanus* CYY 19-20-3

*Sporobolomyces salmonicolor* CYY 19-4-6

*Phaffia rhodozyma* CCY 77-1-1

*Saccharomyces cerevisiae* CCM 8191

Enzymy na hydrolýzu odpadov boli pripravené z húb:

*Fusarium solani* (CCM F-552)

*Phanerochaete chrysosporium* (CCM 8074)

### 8.1.5 Použité prístroje a pomôcky

Spektrofotometer VIS, Helios  $\delta$ , Unicam (UK)

Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)

GKB Color Digital CCD kamera (Taiwan)

Lucia Image active 5.0, Laboratory Imaging spol. s r.o. (ČR)

Trepačka IKA Yellow Line, (SRN)

Centrifuga Sigma Laborzentrifugen (SRN)

Analytické váhy Boeco (SRN)

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

Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)

Vodná lázeň EL-20, Merci a.s. (ČR)

Zostava na HPLC/PDA/ESI-MS

Soustava HPLC/MS (Thermo Fischer Scientific, USA)

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

Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR

Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR

Hmotnostní spektrometr - LCQ Advantage MAX, Thermo Finnigan

Vyhodnocovací systém Xcalibur

Zostava HPLC/UV-VIS od firmy ECOM spol. s r.o. (ČR)  
Programátor gradientu GR 5  
Vysokotlaké čerpadlo typ P 4020  
Dávkovací ventil typ C  
Termostat kolóny typ LCO 101  
UV-VIS detektor procesorový, typ LCD 2084  
Software Clarity – chromatography SW, Data apex 2006

Chromatografické kolóny:

Kolóna Biospher, 4,6 x 150 mm, reverzná fáza PSI 200 C18, 7 µm, Labicom (ČR)  
Kolóna Nucleosil 100-C18, 4,6 x 150 mm, C18, 7 µm (ECOM)  
Kolóna Zorbax Eclipse Plus, XDB C18, 5 µm, 4,6 x 150 mm, (Agilent)  
Kolóna Kinetex C18, 2,6 µm, 4,6 x 150 mm, Phenomenex  
Držák předkolony - KJO - 4282, ECOM (ČR)  
Předkolony - C<sub>18</sub>, AJO - 4287, Phenomenex

Centrifuga, model Mikro 200, Hettich Zentrifugen (SRN)  
Vortex, typ Heidolph, Vitrum (ČR)  
Vortex Genie 2, Mo Bio Lab. (USA)  
Vodní lázeň, model TW2, Julabo Labortechnik (SRN)  
Kompaktní mikrocentrifuga HERMLE Z-100M, Labortechnik (SRN)  
Termocykler Palm Cycler™, Corbett Research (Austrálie)  
Vortex Experion™ Vortex Station, Bio- Rad (USA)  
Detection System, Bio-Rad (USA)  
DGGE aparatura DCode™ Universal Mutation Detection System, Bio-Rad (USA)28  
Horizontální elektroforetická vana Owl, model B2, Owl Separation Systems (USA)  
NanoPhotometer™ UV/VIS, Implen (SRN)  
Software Scion Image, Biotech (ČR)  
Transluminátor Ultra Viewer, Ultra Lum (USA)  
Zdroj napětí pro elektroforézu MP- 300N, Major Science (USA)  
Zdroj napětí pro elektroforézu SH-300, Shelton Scientific (USA)  
PFGE zostava (Gene Navigator, GN Controller a programovatelný zdroj (Pharmacia Biotech, Švédsko)

### **8.1.6 Materiál**

Jablčná vláknina, Provita, Frýdek-Místek (ČR)  
Vaječné cestoviny, Ideal Slovakia (SR)  
Otruby pšeničné (Evit, R; termizované, bez čistírenského prachu) (ČR)  
Ryža SOS long, SOS Corporación Alimetaria, S.A., Madrid, (ŠP)  
Lignocelulózový hydrolyzát z borovicového dřeva, SLU, Umeå, Mehrdad Arsadi, (Švédsko)  
Repkové výlisky s obsahem lipidů 2,55% a 9%, Agropodnik Jihlava, a.s

## **8.2 Kultivácia karotenogénnych kmeňov**

Všetky karotenogénne kvasinky boli kultivované na optimálnom (kontrolnom) glukózovom médiu a médiách s rôznym zdrojom uhlíka a dusíka pochádzajúcich z odpadových materiálov poľnohospodárskych, potravinárskych výrob alebo z lignocelulózových materiálov. Kvasinky

boli kultivované v sterilných médiách pri teplote 25°C za neustáleho trepania a osvetlenia pre produkciu karotenoidov.

### 8.2.1 Zloženie kultivačných médií

Kultivácia prebiehala dvojstupňovou inokuláciou s následným produkčným médiom. Pre každú sériu kultivácii sa súbežne prevádzala i kontrolná kultivácia na glukózovom produkčnom médiu, ktorého základné zloženie je uvedené v tabuľke, a ako zdroj uhlíka bola použitá glukóza v množstve 30 g/l. Zloženie inokulačných médií je uvedené v tabuľke 5.

**Tab. 5:** *Inokulačné médium*

Zložka	Množstvo (g/l vody)
Glukóza	40
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5
MgSO <sub>4</sub>	0,34
Kvasničný extrakt	7

**Tab. 6:** *Produkčné médium – základ*

Zložka	Množstvo (g/l vody)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4
MgSO <sub>4</sub>	0,34

### 8.2.2 Podmienky kultivácie

Kvasinkové kmene boli kultivované v optimálnych rastových podmienkach pri 25°C, za neustáleho trepania 90 rpm a osvetlenia. Kultivácia prebiehala svojstupňovou inokuláciou. Kmene boli sterilne zaočkované do inokula 1 a kultivované 24 hodín, následne preočkované do inokulačného média 2. Kultivácia prebiehala 24 hodín a bunky boli preočkované do produkčného média (Tab.6), kde boli kultivované 80 hodín. Každé preočkovanie bolo prevedené v objemovom pomere 1 : 5.

### 8.2.3 Úchova kvasinkových kmeňov

Každý kvasinkový kmeň bol uchovávaný pre možné použitie na agarových plotnách pri 4°C o zložení uvedenom v tabuľke 5.

### 8.2.4 Kultivácia na rôznych odpadových substrátoch

Testované karotenogénne kvasinky boli kultivované v optimálnych glukózových médiách a tiež v médiách s alternatívnym zdrojom uhlíka a dusíka, ktorý pochádzal z odpadových materiálov rôznych priemyselných odvetí (potravinársky, poľnohospodársky, lignocelulózový). Odpadový materiál bol pridávaný do produkčného média ako náhrada

zdroja uhlíka či dusíka. V niektorých prípadoch boli odpady pridávané i do inokulačných médií v určitom pomere v dôsledku lepšej adaptácie kvasiniek na daný substrát (Tab.7).

**Tab. 7:** Zloženie produkčných médií s nehydrolyzovaným substrátom

		Repkové výlisky 1 (2,55% obsah lipidov)	Repkové výlisky 2 (9% obsah lipidov)
INO I		Tab	
INO II		Tab	
PROD Základ uvedený v tab.	100 % Repka	Repkové výlisky 30 g/l	
	75 % Repka	Repkové výlisky 22,5 g/l + glukóza 7,5 g/l	
	50 % Repka	Repkové výlisky 15 g/l + glukóza 15 g/l	
	25 % Repka	Repkové výlisky 7,5 g/l + glukóza 22,5 g/l	
	0 % Repka (kontrola)	Glukóza 30 g/l	

Keďže odpadový materiál väčšinou obsahuje komplexné sacharidové zdroje, boli vybrané substráty hydrolyzované na jednoduché matrice pomocou komerčných enzýmov, enzýmov komplexných extracelulárnych izolovaných z húb, alebo hydrotermickou predúpravou s použitím oxidu siričitého a vysokej teploty.

### 8.2.5 Enzymatická hydrolyza odpadových materiálov

K lepšej využitiu odpadových materiálov kvasinkami boli tieto substráty hydrolyzované pomocou extracelulárnych enzýmových preparátov z plesní *Fusarium solani* (FS) a *Phanerochaete chrysosporium* (PCH). Tieto plesne boli kultivované na médiách s obsahom solí a komplexného kukuričného materiálu, ktorý vyvoláva produkciu enzýmov. Kultivácia prebiehala 72 hodín. Následne boli vyprodukované enzýmy oddelené od kultúry centrifugáciou, zmrazené a lyofilizované. Produkčné médiá s obsahom odpadových materiálov boli podrobené hydrolyze prídavkom daných komplexných enzýmových preparátov a hydrolyzované 24 hodín. Po hydrolyze boli médiá vysterilované a boli stanovené redukujúce sacharidy metódou podľa Somogyi- Nelsona, príp. jednotlivé sacharidy metódou HPLC-RI. Sacharidy boli stanovené aj v médiách s prídavkom komerčných enzýmových preparátov, kde hydrolyza prebiehala za rovnakých podmienok ako u extracelulárnych plesňových enzýmov. Takto upravené produkčné médiá boli pripravené ku kultivácii. Zloženie médií pre jednotlivé kultivácie je uvedené v tabuľkách 8-10.

**Tab. 8:** Zloženie produkčných médií s hydrolyzovaným odpadovým substrátom(1)

		Komerčný enzým AMG	Komerčný enzým Novozyme	Plesňový enzýmový preparát FS	Plesňový enzýmový preparát PCH
INO I		Tab			
INO II		Tab			
PROD Základ uvedený v tab.	Kontrola	Glukóza 30 g/l			
	Ryža	Ryža 30 g/l			
	Pšeničné otruby	Pšeničné otruby 30 g/l			
	Cestoviny	Cestoviny 30 g/l			
	Jablčná vláknina	Jablčná vláknina 30 g/l			

**Tab. 9:** Zloženie produkčných médií s hydrolyzovaným odpadovým substrátom(2)

				Plesňový enzýmový preparát FS	Plesňový enzýmový preparát PCH
INO I (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5 g/l, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 g/l, MgSO <sub>4</sub> 0,34 g/l, Kvasničný autolyzát 7 g/l)		Glukóza 20 g/l + glycerol 20 g/l	Glukóza 20 g/l + cestoviny 20 g/l	Glukóza 20 g/l + hydrolyzované cestoviny 20 g/l	Glukóza 20 g/l + hydrolyzované cestoviny 20 g/l
INO II (= INO I)		(= INO I)	(= INO I)	(= INO I)	(= INO I)
PROD Základ uvedený v tab	Kontrola	Glukóza 30 g/l	Glukóza 30 g/l	Glukóza 30 g/l	Glukóza 30 g/l
	Glycerol	Glycerol 30 g/l			
	Cestoviny		Cestoviny 30 g/l		
	Hydrolyzované cestoviny			Cestoviny 30 g/l	Cestoviny 30 g/l

**Tab. 10:** Zloženie produkčných médií s hydrolyzovaným odpadovým substrátom(3)

		Komerčný enzým AMG	Komerčný enzým Novozyme
INO I (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5 g/l, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 g/l, MgSO <sub>4</sub> 0,34 g/l, Kvasničný autolyzát 7 g/l)		Glukóza 20 g/l + hydrolyzované cestoviny 20 g/l	Glukóza 20 g/l + hydrolyzovaná ryža 20 g/l
INO II (= INO I)		(= INO I)	(= INO I)
PROD Základ uvedený v tab	Kontrola	Glukóza 30 g/l	Glukóza 30 g/l
	Hydrolyzované cestoviny	Cestoviny 30 g/l	Cestoviny 30 g/l
	Hydrolyzovaná ryža	Ryža 30 g/l	Ryža 30 g/l

### 8.2.6 Kultivácie na odpadových materiáloch s prídavkom mutagénu

Vybrané kvasinkové kmene boli podrobené náhodnej mutagenéze za pokusom vyselektovania nadprodukčných kmeňov. Kvasinky boli kultivované klasickou dvojkrokovou inokuláciou popísanou v kap. 8.2.2. Do produkčného média s obsahom odpadových materiálov bolo pridané alkylačné činidlo EMS o rôznych koncentráciách (5, 10 alebo 15 µl) a kultivácia prebiehala 80 hodín. Následne boli bunky preočkované desiatkovým riedením na Petriho misky s agarovým médiom o zložení rovnakom ako bolo produkčné médium a boli náhodne vyselektované tie kolónie, ktoré vizuálne naznačovali nadprodukciu karotenoidov. Po

niekoľkonásobnom preočkovaní boli vybrané kolónie použité k submerznej kultivácii v tekutom médiu o rovnakom zložení ako u nemutantných kmeňov uvedenom v tab. 9, 10.

### 8.2.7 Hydrotermická hydrolyza lignocelulóзовých materiálov

Surový borovicový materiál bol pred použitím v kultiváciách predupravený hydrotermickou hydrolyzou v reaktore. Borovicové drevo bolo impregnované oxidom siričitým v uzavretých plastových vreciach po dobu 20 minút. Následne bolo hydrolyzované v prúde pary pri 210°C po dobu 5 minút. Predupravený materiál bol uchovávaný pri 4°C. Suspenzia pozostávala z pevnej časti oddelenej filtráciou a tekutej frakcie - hydrolyzátu, ktorá bola následne použitá ku kultiváciám. Zloženie predupraveného materiálu je v tab.11, zloženie médií pre kultivácie v tab.12. Tekutého hydrolyzátu bolo použité vždy také množstvo v ml, koľko bolo potrebné množstvo celkových sacharidov ako uhlíkatého zdroja (30g/l) podľa požadovaných koncentrácií uvedených v tabuľke 11.

**Tab. 11:** Zloženie predupraveného borovicového materiálu

Obsah pevnej časti (% suchej váhy)		Obsah v tekutej časti - hydrolyzáte (g/l)	
Glukan	47	Glukóza	40
Manan	2,2	Manóza	22
Xylan	0	Xylóza	9
Lignin	53,9	Furfural	3,7
		HMF	4,2
		Kyselina octová	3,9

**Tab. 12:** Zloženie produkčných médií s hydrolyzátom z borovicového dreva

		Tekutý hydrolyzát z borovicového materiálu	
INO I		Tab	
INO II (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5 g/l, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 g/l, MgSO <sub>4</sub> 0,34 g/l, Kvasničný autolyzát 7 g/l)		Glukóza 40 g/l	Glukóza 20 g/l + hydrolyzát s obsahom 20 g/l celkových sacharidov
PROD Základ uvedený v tab	100 % HYDR	Hydrolyzát s obsahom 30 g/l celkových sacharidov	
	75 % HYDR	Hydrolyzát s obs. 22,5 g/l sacharidov + glukóza 7,5 g/l	
	50 % HYDR	Hydrolyzát s obs. 15 g/l sacharidov + glukóza 15 g/l	
	25 % HYDR	Hydrolyzát s obs. 7,5 g/l sacharidov + glukóza 22,5 g/l	
	0 % HYDR	Glukóza 30 g/l	

Ďalej boli stanovované rastové charakteristiky kvasiniek na jednotlivých sacharidoch obsiahnutých v hydrolyzáte a efekt inhibičných faktorov na rast buniek.

Glukóza, xylóza a manóza sú hlavnými sacharidami obsahnutými v kyslom hydrolyzáte z borovicového materiálu. Kvasinky boli kultivované na jednotlivých sacharidoch zvlášť a na zmesi sacharidov v tzv. umelom hydrolyzáte tak, aby zloženie uhlíkatého zdroja napodobnilo originálny hydrolyzát (tab. 13). Boli sledované rastové charakteristiky počas utilizácie jednotlivých cukrov kvasinkami. Následne boli do produkčných médií pridávané i jednotlivé inhibičné faktory, ktoré sa nachádzajú v originálnom hydrolyzáte (tab. 11) s cieľom zistiť,

ktorá látka najviac vplyva na rast buniek, spomaľuje ho, či dokonca zastavuje. Kultivácie prebiehali 53 hodín, aby sa zachytila dôležitá exponenciálna fáza rastu, s neustálym osvetlením a trepaním 90 rpm pri 25°C.

**Tab. 13:** Zloženie produkčných médií pre rastové charakteristiky

		Bez inhibítora	Kyselina octová 3,9 g/l	Furfural 3,7 g/l	5-hydroxymethyl-furfural 4,2 g/l
INO I		Tab			
INO II		Tab			
PROD	Glukóza	Glukóza 30 g/l			
Základ	Manóza	Manóza 30 g/l			
uvedený	Xylóza	Xylóza 30 g/l			
v tab	Umelý hydrolyzát	Glukóza 16,9 g/l + Manóza 9,3 g/l + Xylóza 3,8 g/l			

### 8.3 Stanovenie sacharidov u hydrolyzovaných odpadových materiáloch a v kultivačných médiách

Komplexné sacharidové zdroje obsahujú veľmi málo jednoduchých cukrov, ktoré môžu byť kvasinkami priamo utilizované. Preto boli odpadové materiály podrobené rôznym hydrolyzám za účelom naštepenia komplexných väzieb a tvorby dostatočného množstva monosacharidov. Ich obsah bol stanovený dvoma metódami – spektrofotometricky metódou Somogyi- Nelsona a metódou kvapalinovej chromatografie HPLC/RI, kde boli zistené konkrétne sacharidy. V médiách z rastových charakteristík bol sledovaný postupný úbytok konkrétnych sacharidov, aby sa zistila utilizácia jednotlivých monosacharidov obsahnutých v médiách. Toto bolo stanovené opäť metódou HPLC/RI.

#### 8.3.1 Stanovenie redukujúcich sacharidov metódou Somogyi-Nelsona

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

**Roztok I** pozostával z 24 g bezvodého  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 16 g  $\text{NaHCO}_3$ , 144 g bezvodého  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 12 g vinanu sodno-draselného a 800 ml destilovanej vody.

**Roztok II** pozostával zo 4 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 24 g bezvodého  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a 200 ml destilovanej vody.

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

a doplnilo sa destilovanou vodou na celkový objem 10 ml. Bola zmeraná absorbanca pri 720 nm.

### **8.3.2 Stanovenie jednotlivých monosacharidov metódou HPLC/RI**

Analýza vzoriek prebiehala metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s refraktometrickou detekciou. Separácia prebiehala na kolone Agilent Zorbax Eclipse C18-NH<sub>2</sub> (5 µm, 4,6 x 150 mm) s izokratickou elúciou. Ako mobilná fáza bola zvolená zmes acetonitrolu a destilovanej vody v pomere 75 : 25, prietok mobilnej fáze bol nastavený na 1,0 ml/min, teplota separácie 25°C a objem dávkovacej smyčky bol 20 µl. Detekcia bola prevedená pomocou refraktometrického detektoru, kvantitatívne vyhodnotenie pomocou externej kalibrácie s využitím príslušných štandardov rozpustených v mobilnej fáze a analyzovaných za rovnakých podmienok ako vzorky.

### **8.4 Stanovenie celkového dusíku metódou Kjeldahla**

Pri stanovení celkového dusíka sa jedná o mineralizáciu vzorky v koncentrovanej kyseline sírovej za prítomnosti katalyzátora Weinengerovho. Dusíkaté látky sú prevedené na síran amonný, z neho sa za prídavku hydroxydu sodného uvoľní amoniak. Vzniknutý amoniak sa predestiluje s vodnou parou do štandardizovaného roztoku kyseliny sírovej a jej prebytok sa stanoví alkalimetricky.

Pripravujú sa štandardizované roztoky 0,05 M kyseliny sírovej, 33% a 0,1 M roztok NaOH, 0,05 M roztok kyseliny šťavelovej. Do mineralizačnej trubice sa nasype navážka vzorky (1g) a k nej sa pridá 2 ml koncentrovanej kyseliny sírovej a 0,2 g Weinengerovho katalyzátora. Trubica je vložená do mineralizačného bloku a ponechaná mineralizovať 24 hodín. Mineralizácia je ukončená až je vzorka číra.

Mineralizát je kvantitatívne prevedený do destilačnej banky, kde sa pridá pár kvapiek fenolftaleínu. Banka je pripojená k destilačnému zariadeniu. Do banky sa pridáva 33% NaOH až do ružového zafarbenia roztoku. Uvoľnený amoniak sa predestiluje vodnou parou do predlohy s 25 ml štandardizovanej kyseliny sírovej. Po 25 minútach destilácie je koniec chladiča znížený tak, aby nezasahoval do roztoku. Po ďalších 5 minútach je destilácia ukončená. K destilátu sú pridané tri kvapky Tashirovho indikátoru a zmes je titrovaná štandardizovaným roztokom NaOH do prvého trvalého žltého zafarbenia. Obsah celkového dusíka je vypočítaný podľa spotreby štandardizovaného roztoku NaOH.

### **8.5 Rastové charakteristiky**

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

Sušina bola stanovená gravimetricky i turbidimetricky. 10 ml kultúry z rastovej krivky, ktoré boli určené pre stanovenie sušiny, bolo centrifugovaných pri 5000 otáčkach po dobu 10 minút. Bunky boli následne premyté destilovanou vodou a opäť stočené. Vzorka bola

rozsuspendovaná v 1 ml destilovanej vody, naliata do predom vysušenej a zväženej váženky a vysušená do konštantnej hmotnosti pri teplote 105°C. Po ochladení na laboratórnu teplotu v exikátore a zväžení na analytických váhach, bola z rozdielu hmotnosti prázdnej váženky a váženky s vysušenou vzorkou stanovená hmotnosť sušiny v každej vzorke. 1 ml kultúry bol po vhodnom nariadení stanovený spektrofotometricky pri 630 nm a hodnoty boli vzťahované do závislosti k hmotnostiam sušiny z gravimetrického stanovenia. Zo závislosti boli zostrojené regresné kalibrácie.

### **Stanovenie biomasy počas kultivácií a jej spracovanie**

Stanovenie množstva biomasy bolo prevedené turbidimetricky pomocou spektrofotometru pri vlnovej dĺžke 630 nm a vhodnom nariadení. Hodnoty absorbancie boli vzťahované na množstvo sušiny v g/l podľa nasledovných regresných rovníc zostrojených experimentálne pre jednotlivé kmene z rastových charakteristík:

$$\textit{Rhodotorula glutinis} \quad y = 0,1947x - 0,0234,$$

$$\textit{Rhodotorula aurantiaca} \quad y = 0,2047x - 0,0184,$$

$$\textit{Rhodotorula mucilaginosa (rubra)} \quad y = 0,229x,$$

$$\textit{Cystofilobasidium capitatum} \quad y = 0,1669x + 0,1884,$$

$$\textit{Sporobolomyces roseus} \quad y = 0,2421x - 0,0488,$$

$$\textit{Sporobolomyces shibatanus} \quad y = 0,2047x - 0,0184,$$

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

V prípade živných médií obsahujúcich prídavok odpadného substrátu sa ako blank používalo toto médium pripravené zároveň s médiami pre kultiváciu, aby sa dosiahlo čo najmenej nepresností. Všetky vzorky boli premerané dvakrát a výsledná hodnota je vždy priemer z týchto meraní.

Biomasa kultivovaná v produkčných médiách s obsahom odpadového substrátu bola pred centrifugáciou ešte prefiltrovaná cez niekoľkokrát zloženú gázu, aby sa bunky oddelili od pridaného nerozpusteného odpadu. 100 ml objem produkčného média bol scentrifugovaný pri 5000 otáčkach po dobu 10 minút, premytý vodou a opäť scentrifugovaný. Nakoniec boli bunky rozsuspendované vo fyziologickom roztoku a uschované pre ďalšie použitie v mrazničke.

### **8.6 Mikroskopické pozorovanie morfológických zmien kvasiniek**

Bunečná kultúra po vohnom nariadení bola prenesená na podložné sklíčko, prikryté krycím sklíčkom a pozorované mikroskopicky pri zväčšení 640x. Sledovali sa morfológické zmeny buniek v jednotlivých kultivačných médiách, aby mohli byť porovnané s bunkami v optimálnych rastových podmienkach. Obrázky z pozorovania boli vyfotografované a uložené pomocou fotografického softwaru Lucia Image.

### **8.7 Detekcia a identifikácia dôležitých molekúl Ramanovou mikrospektrometriou a fluorescenčnou mikroskopiou**

Ramanove mikrospektrometrické experimenty boli v ykonávané na prístroji vyrobenom na zakázku s inštalovaným mikroskopom. Aby sa minimalizovali autofluorescenčné emisie na pozadí spektier, zvolili sa prevádzkové vlnové dĺžky Ramanovej excitácie laserom v blízkej infračervenej oblasti spektra (785 nm). Sila Ramanovho laserového lúča sa dá upraviť dodaným softwarom (Win Spec) cez filter neutrálnej hustoty NDF1. Maximálny laserový

výkon na excitáciu vzorky je približne 60 mW. Ramanový lúč sa zameriava na vzorku pomocou optimalizovaného objektívu. Tento objektív má veľmi dobrú transmisiu v blízkej IR oblasti a dlhú pracovnú vzdialenosť, ktorá umožňuje pracovať až do 200  $\mu\text{m}$  hĺbky vzorky bez nejakého vplyvu na kvalitu spektroskopického merania.

Pre fluorescenčnú detekciu lipidov boli bunky zmiešané s roztokom Nílskej červene v acetóne a inkubované pri 37°C po dobu 5 minút. Následne boli bunky prenesené na podložné sklíčko a sledované pomocou fluorescenčného mikroskopu. Obrázky boli vyfotografované pomocou inštalovaného fotoaparátu Canon.

## 8.8 Izolácia a analýza karotenoidov

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

### Izolácia karotenoidov

Vzorky pripravené k analýze boli stočené pri 5000 otáčkach po dobu 10 minút. Sediment, ktorý obsahoval kvasinkové bunky, bol v tretej miske dezintegrován s 50 ml acetónu, kvantitatívne prevedený na odparovaciu misku a po prídavku 50 ml 10% alkoholického roztoku KOH bol zmydelňovaný na vodnej lázni pri 90°C po dobu 30 minút.

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

### Analýza karotenoidov metódou HPLC/PDA

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

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

Analýza karotenoidov a vybraných lipidických látok metódou HPLC prebiehala za izokratických podmienok pri prietoku mobilnej fázy 1,0 ml/min a teplote 45°C na nerezovej kolóne s predradenou predkolónou, s fotometrickou detekciou pri vlnovej dĺžke odpovedajúcej maximu absorbancie príslušnej analyzovanej látky (450 nm pre karotenoidy a 285 nm pre ergosterol a koenzým Q). Vzorka bola na kolónu dávkovaná ventilom s dávkovacou smyčkou o objeme 20  $\mu\text{l}$ . Ako mobilná fáza bol použitý methanol pre HPLC.

Analýza bola prevedená na základe chromatografickej analýzy štandardov  $\beta$ -karoténu, ergosterolu a ubiquinonu pri daných vlnových dĺžkach. Ďalej sa stanovoval obsah celkových karotenoidov, kam patrí okrem  $\beta$ -karoténu i torulen a torularhodin. Pre odhad produkcie celkových pigmentov bola použitá kalibračná krivka pre  $\beta$ -karotén vzhľadom k nedostupnosti všetkých štandardov, ale podobnosti daných štruktúr karoténov. Ku kvantitatívnemu vyhodnoteniu bola použitá závislosť plochy píkov jednotlivých štandardov na koncentrácii (Márová et al. 2010).

## 8.9 Charakterizácia kvasiniek molekulárnymi technikami

### 8.9.1 Izolácia kvasinkovej DNA

Izolácia kvasinkovej DNA bola uskutočnená pomocou špeciálneho izolačného kitu pre eukaryotické mikroorganizmy. Koncentrácia vyizolovanej DNA bola sledovaná spektrofotometricky.

#### Izolácia DNA pomocou izolačného kitu UltraClean Microbial DNA Isolation Kit

1,8 ml objem mikrobiálnej kultúry rozsuspendovanej vo fyziologickom roztoku bol napipetovaný do čistej mikroskúmavky a scentrifugovaný pri 11300 rpm otáčkach po dobu 30 sekúnd. Supernatant bol zliaty a k usadeným bunkám bolo pridaných 300  $\mu$ l „MicroBead“ roztoku obsahujúceho soli a pufor. Bunky boli zvortexované a roztok bol presunutý do ďalšej mikroskúmavky obsahujúcej drobný piesok. K roztoku bolo pridaných 50  $\mu$ l MD1m ktorý obsahuje SDS a iné činidlá k lýze bunky. Mikroskúmavky boli zahrievané vo vodnej lázni pri 65 °C po dobu 10 minút.

Následne boli mikroskúmavky presunuté na horizontálny vortex a vortexované pri maximálnej rýchlosti po dobu 10 minút. Potom boli mikroskúmavky scentrifugované pri 11300 rpm otáčkach po dobu 30 sekúnd. Supernatant obsahujúci DNA bol presunutý do novej mikroskúmavky a bolo k nemu pridaných 100  $\mu$ l MD2, ktorý zráža organické i anorganické nečistoty. Roztok bol vortexovaný asi 5 sekúnd a inkubovaný pri 4°C po dobu 5 minút. Potom bol opäť centrifugovaný pri 11300 rpm otáčkach 30 sekúnd.

Supernatant bol presunutý do novej mikroskúmavky a bolo k nemu pridaných 900  $\mu$ l MD3 obsahujúci vysoko koncentrovaný roztok soli potrebný na naviazanie DNA na filter.

Roztok bol presunutý do špeciálnej mikroskúmavky s filtrom a opäť centrifugovaný pri rovnakých podmienkach ako predchádzajúce centrifugácie. Tento postup bol opakovaný, kým nebol prefiltrovaný celý objem pôvodného roztoku. Kvapalina, ktorá prešla filtrom neobsahuje DNA, a tak mohla byť odstránená.

Filter bol ďalej prečistený 300  $\mu$ l MD4 obsahujúcim ethanol, ktorý je schopný rozpustiť prípadné kontaminanty DNA. Roztok bol centrifugovaný a filter presunutý do novej mikroskúmavky. Ku zrazenine DNA na filtri bolo pridaných 50  $\mu$ l MD5, ktorý obsahuje elučný pufor uvoľňujúci zrazeninu DNA z filtra. Po konečnej centrifugácii bol prázdny filter odstránený a roztok obsahujúci DNA uskladnený v mrazničke pri -20°C.

Koncentrácia a čistota vzoriek bola meraná spektrofotometricky pomocou prístroja NanoPhotometer.

#### Izolácia intaktnej genómovej kvasinkovej DNA

Izolácia genómovej DNA bola prevádzaná z čerstvých buniek kultivovaných na glukózovom či odpadnom médiu. Pomocou stanovenia počtu buniek metódou Bürkeovej komôrky bola stanovená koncentrácia buniek v médiu. Z kultúry bolo následne odobraté také množstvo, ktoré odpovedalo koncentrácii 0,5  $10^{10}$  buniek. Bunky boli scentrifugované pri 500 rpm po dobu 10 min a trikrát premyté roztokom 50 mM EDTA o pH 7,5. Následne bol k bunkám pridaný roztok enzemu lytikázy (0,638 mg lytikázy na 50  $\mu$ l) a boli inkubované 10 minút pri 40°C. Po inkubácii boli bunky zmiešané s roztokom 2% low melting agarózy rozpustenej v roztoku 125 mM EDTA a inkubované 30 minút pri 38°C. Suspenzia buniek bola presunutá do formičiek na agarózové bločky a inkubované pri 4°C asi 30 minút, do stuhnutia agarózy.

Po inkubácii boli bločky vyňaté z formičiek a inkubované 16 hodín v LET pufre (18,61 g EDTA, 7,5 ml 7,5%  $\beta$ -meraptoethanolu a 0,122 g TRIS v 10 ml redestilovanej vody o pH 7,5). LET pufor bol zliaty a bločky boli inkubované v 4,5 ml NDS pufre (18,61 g EDTA, 0,122 g TRIS v 10 ml redestilovanej vody o pH 7,5) s 0,5 ml roztokom proteínázy o koncentrácii 2 mg/ml. Inkubácia prebiehala 24 hodín pri 50°C, po ktorej bol roztok zliaty a bločky premývané už len v samotnom NDS pufre a znovu inkubované 24 hodín pri 50°C. Nakoniec sú bločky niekoľkokrát premyté v 50 mM EDTA pufre a v tomto roztoku sú uschované pri 4°C pre ďalšie použitie.

## 8.9.2 PCR

Kvasinková DNA vyizolovaná pomocou komerčne dodávaného kitu bola použitá ako templát pre polymerázovú reťazovú reakciu. Reakcia prebiehala v dvoch amplifikačných krokoch – tzv. nested PCR.

### Reakčná zmes pre nested PCR

Zložky reakčnej zmesi pre PCR boli pred použitím krátko zvortexované a sцентрифugované. PCR komponenty boli zmiešavané v danom poradí v sterilnom boxe. Zmes bola pripravená v príslušnom objeme podľa počtu vzoriek navýšených o jednu kvôli kompenzácii strát pri pipetovaní a následne rozpipetovaná do PCR mikroskúmaviiek. Nakoniec bola pridaná templátová DNA. Jedna PCR zmes obsahovala sterilnú PCR vodu, 10x PCR pufor, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTP mix, 100  $\mu$ M priamy primer, 100  $\mu$ M reverzný primer, Taq-DNA polymerázu 5 U/  $\mu$ l a templát DNA do celkového objemu 25  $\mu$ l pre prvý krok PCR a 50  $\mu$ l pre druhý krok PCR.

Pre amplifikáciu D1/D2 oblasti 26S rDNA, tak i pre ITS rDNA oblasť, boli použité univerzálne eukaryotické primery dodané firmou Elisabeth Pharmacon. Sekvencie primerov sú uvedené v tab. 14, 15

Pre overenie čistoty všetkých komponent bola do reakcie zaradená tiež negatívna kontrola. Mala rovnaké zloženie PCR zmesi, avšak namiesto templátovej DNA obsahovala sterilnú PCR vodu.

**Tab. 14:** Sekvencia primerov pre reakciu PCR (1)

Nested PCR pre oblasť D1/D2 26S r DNA		
	primer	sekvencia
1. amplifikačný krok	NL1	5'-GCCATATCAATAAG-3'
	NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'
2. amplifikačný krok	NL1-GC	5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGGC CATATCAATAAG-3'
	LS2	5'-ATTCCCAAACAACCTCGACTC-3'

**Tab. 15:** Sekvencia primerov pre reakciu PCR (2)

Nested PCR pre oblasť ITS1, 5,8-ITS2 rDNA		
	primer	sekvencia
1. amplifikačný krok	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
2. amplifikačný	ITS1-	5'CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGG

krok ITS1 rDNA	GC	TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
	ITS2	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'
2. amplifikačný krok 5,8-ITS2 rDNA	ITS3	5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC -3'
	ITS4- GC	5'CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGG TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Pripravená reakčná zmes pre PCR bola vložená do termocykléru a bol spustený nastavený PCR profil. Pre ITS oblasti rDNA boli teploty annealingu optimalizované na 60°C. Pre všetky použité kvasinkové kmene boli amplifikované oblasti D1/D2 i ITS oblasti rDNA, avšak u mutantných kmeňov prebiehala amplifikácia len v oblasti D1/D2 26S rDNA. Jednotlivé reakčné cykly sú uvedené v tab.16.

**Tab. 16:** Reakčné cykly reakcie PCR

	Teplota jednotlivých cyklov (°C)					Trvanie cyklu (sek)
	D1/D2 26S rDNA oblasť		ITS1, 5,8-ITS2 r DNA oblasť			
	1. amplif. krok	2. amplif. krok	1. amplif. krok	2. amplif. krok	2. amplif. krok	
primery	NL1/NL4	NL1-GC/ LS2	ITS1/ITS4	ITS1-GC/ ITS2	ITS3/ ITS4-GC	
Počiatočná denaturácia	94	95	94	95	95	300
Denaturácia	94	95	94	95	95	60
Anelácia	52	55	60	60	60	120
Elongácia	72	72	72	72	72	120
Záverečná elongácia	72	72	72	72	72	420
Počet cyklov	36	30	36	30	30	

### Elektroforetická kontrola PCR produktov

Úspešnosť oboch krokov amplifikácie bola overená pomocou horizontálnej elektroforézy v agarózovom géle. PCR produkty boli ofarbené signálnou farbičkou (pozostávajúcou z 0,025g brómfenolovej modrej a 4g sacharózy na 10 ml redestilovanej vody) a nanesené na gél. Ako veľkostný štandard bol použitý DNA ladder RTU 100 bp o objeme 5 µl.

Pre prípravu 1,8% agarózového gélu bolo príslušné množstvo agarózy rozpustené v 1x Tris-acetátovom (TAE) pufre (50x koncentrovaný 2 mol/l TAE pufr: 242 g Tris; 57,1 ml ľadovej kyseliny octovej; 100 ml 0,5 mol/l EDTA, pH 8 na 1 l redestilovanej vody). Agaróza bola rozpustená zahriatím v mikrovlnnej trúbe. Po ochladení bolo do roztoku pridaných 15 µl ethidium bromidu zo zásobného roztoku o koncentrácii 10 mg/ml, takže jeho konečná koncentrácia v géli bola 1,5 µg/ml. Po jemnom premiešaní bol gél naliaty do elektroforetickej vane, vložil sa hrebeň pre vytvorenie jamiek a gél bol ponechaný stuhnúť pri laboratórnej teplote asi po dobu 30 minút. Po stuhnutí boli do vzniknutých jamiek nanesené vzorky.

Elektroforetická vaňa so vzorkami bola zaliate 1x TAE pufrom po vyznačenú rysku. Aparatúra sa prikryla príslušným víkom a k elektródam bol pripojený zdroj jednosmerného prúdu. Spustila sa elektroforéza pri podmienkach: 80 V, 90 mA po dobu 3 hodín.

Po skončení elektroforézy bol gél prenesený do vizualizačnej komory systému Ultralum. Po osvetlení UV svetlom sa zviditeľnili bandy sledovaných PCR produktov odpovedajúce svojej veľkosti. Obrázok bol vyfotografovaný a spracovaný softwarom Scion Image.

### 8.9.3 Denaturačná gradientová gélová elektroforéza

Po elektroforetickej kontrole PCR produktov, boli tieto ďalej analyzované metódou denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy.

#### Príprava polyakrylamidového gélu s gradientom denaturantov

Pre denaturačnú gradientovú elektroforézu bol používaný 8% gél s koncentračným gradientom denaturantov – formamidom a močovinou. Najskôr bol pripravený roztok 40% AA/BIS v pomere 19 : 1 (38 g akrylamidu a 2 g bis-akrylamidu na 100 ml redestilovanej vody, prefiltrované cez filtračný papier). Podľa tab. 17 boli potom pripravené 0%, 30%, 45% a 60% zásobné roztoky denaturantov.

**Tab. 17:** Zloženie zásobných roztokov pre 8% polyakrylamidový gél

Zložka denaturačného roztoku	0% denaturantov	30% denaturantov	45% denaturantov	60% denaturantov
40% AA/BIS	20,0	20,0	20,0	20,0
50x TAE pufo	2,0	2,0	2,0	2,0
Formamid	-	12,0	18,0	24,0
Močovina	-	12,6	18,9	25,0
Redestilovaná voda	78,0	do 100,0	do 100,0	Do 100,0
Celkový objem	100,0	100,0	100,0	100,0

Do pripravených kadičiek bolo napipetovaných 15 ml 30% denaturačného roztoku, 15 ml jedného z koncentrovanejších denaturačných roztokov a 5 ml 0% denaturačného roztoku. Do každého z roztokov bolo pred použitím pridaných 7 µl TEMEDu (N,N'-tetrametyléndiamínu) a 40 µl APS (0,1 g persíranu amónneho v 1 ml redestilovanej vody). Polyakrylamidový gél bez denaturantov sa používal k počiatočnému utesneniu okrajov aparatury. Každý denaturačný roztok bol jemne premiešaný a nasatý do injekčnej striekačky, v ktorej boli následne vytesnené bubliny a upravený objem na 12 ml. Injekčné striekačky boli upevnené po stranách aparatury na prípravu gradientu a hadičkami pripojené k ihle, ktorá bola zavedená medzi sklenené dosky v nalievacom stojane. Pomalým otáčaním kolesa aparatury bol vytvorený lineárny gradient denaturantov v géli. Po napustení týchto dvoch roztokov bol nakoniec ešte pridaný opäť 0% roztok denaturantov a vložený hrebeň pre vytvorenie jamiek. Aparatúra s géлом bola prekrytá alobalom zabraňujúcim vysychaniu a nechaný cez noc v chladničke polymerizovať. Pred samotným prevedením elektroforézy bol vytiahnutý hrebeň a jamky boli prepláchnuté 1x TAE pufrom.

#### Príprava vzoriek a prevedenie DGGE

PCR produkty z druhého amplifikačného kroku nested PCR boli ofarbené signálnou farbičkou (pozostávajúcou z 0,5 ml 2% brómfenolovej modrej a 7 ml glycerolu na 10 ml redestilovanej vody) v pomere 1 : 1 a nanosené na gél.

Elektroforetická vaňa bola naplnená 7 litrami 1x TAE pufru a prikrytá vrchným krytom, pomocou ktorého bolo zapnuté ohrievanie pufru na 60°C a nepretržité premiešavanie.

Sklenené dosky s naliatým gélom boli presunuté na DGGE kazetu. Do vytvorených jamiek po hrebeni boli nanesené vzorky o objeme 40 µl. Zahrievanie pufru bolo prerušené a DGGE kazeta s gélom bola vložená do vane. Opätovne bolo zapnuté zahrievanie a premiešavanie pufru. Po dosiahnutí teploty 60°C bola aparátúra pripojená ku zdroju napätia. Elektroforéza prebiehala pri podmienkach: 120 V, 90 mA po dobu 6 hodín.

#### **8.9.4 Pulzná gélová elektroforéza**

Pre pulznú elektroforézu bol pripravený 1,1% agarózový gél v TBE pufru (50 g Tris, 27,5 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 3,72 g alebo 20 ml 0,5 M EDTA o pH 8, na 10 ml redistilovanej vody). Po stuhnutí boli do gélu zavedené bločky s chromozómalnou DNA jednotlivých kvasinkových kmeňov. Elektroforetická vaňa bola naplnená pripravených TBE pufrom a vychladená na 10°C. Následne bol do aparátúry umiestnený gél so vzorkami a hexagonálna elektroda. Po nastavení podmienok separácie (napätie a pulzný čas) bola elektroforéza spustená. Ako štandard veľkosti separovaných chromozómov slúžil Yeast chromosome PFG marker *Saccharomyces cerevisiae* YPH80 so 16 chromozómami vo veľkostiach 225 – 1900 kb.

#### **Farbenie a vizualizácia DGGE a PFGE gélu**

Vizualizácia gélu bola prevedené pomocou dvoch druhov farbenia: EtBr a striebrom. Bolo prevedené porovnanie, ktorá z metód farbenia je pre vizualizáciu kvasinkovej DNA výhodnejšia.

##### **Farbenie EtBr**

Po ukončení elektroforetickej separácie bol gél vyňatý z kazety a farbený v roztoku ethidium bromidu (do 250 ml 1x TAE pufru bolo pridaných 50 µl EtBr zo zásobného roztoku o koncentrácii 10 mg/ml). Gél bol v lázni ponechaný po dobu 20 minút za neustáleho trepania a následne opláchnutý destilovanou vodou. Nakoniec bol gél prenesený do vizualizačného systému Ultralum a získaný obrázok bol vyfotografovaný a spracovaný softwarom Scion Image.

##### **Farbenie striebrom**

Farbenie striebrom patrí medzi najcitlivejšie farbiace metódy. Nevýhodou tohto prístupu je niekoľkonásobná výmena roztokov a oplachovanie gélu, v niektorých prípadoch až nadmerná senzitivita farbenia.

Po skončení elektroforézy bol gél prepláchnutý studeným fixačným roztokom (10% ethanol a 0,5% kyselina octová, cca 10 °C) a farbený vo vlastnom farbiacom roztoku AgNO<sub>3</sub> (1,5 g AgNO<sub>3</sub> a 1,5 ml 37% formaldehydu na liter redistilovanej vody) 6 až 7 minút. Gél bol dvakrát prepláchnutý destilovanou vodou a ponechaný vo vyvíjacom roztoku (15 g NaOH a 2 ml formaldehydu na liter redistilovanej vody) po dobu asi 5 minút. Vyvíjanie obrazu bolo ukončené pridaním fixačného roztoku. Celý proces farbenia prebiehal v plastovej nádobe pri neustálom trepaní na trepačke. Po jeho ukončení bol gél opatrne prenesený medzi dve fólie, naskenovaný a uložený v počítači.

## 9 VÝSLEDKY A DISKUSIA

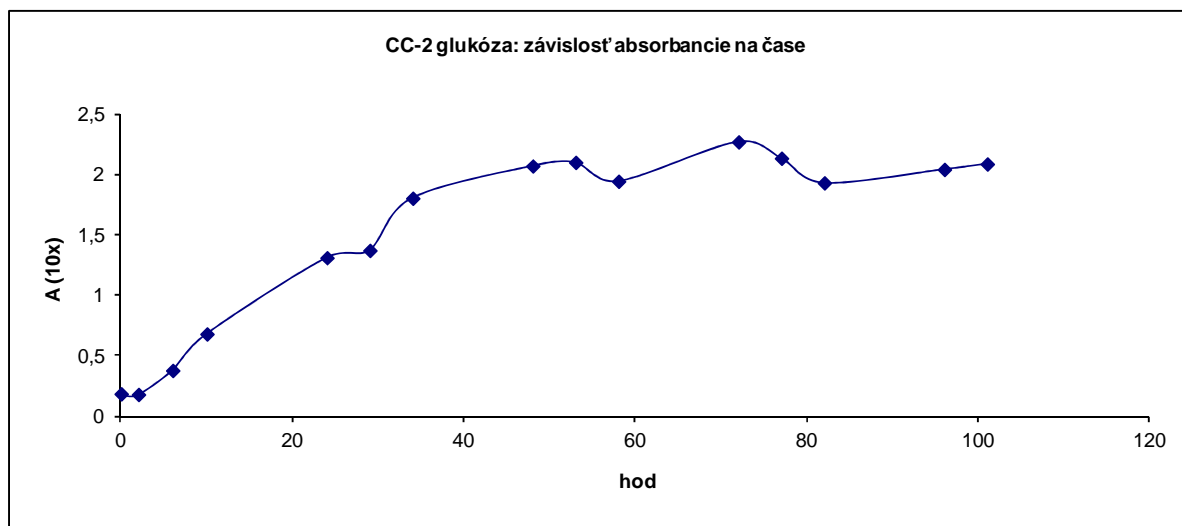
### 9.1 Kultivácia karotenogénnych kvasiniek

#### 9.1.1 Rastové charakteristiky

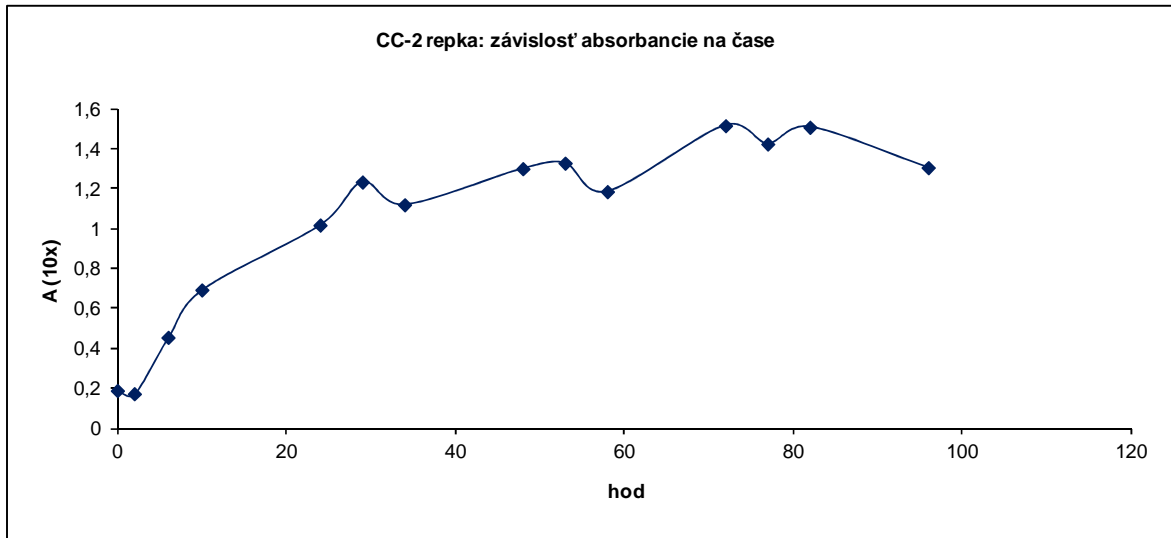
Karotenogénne kvasinky, ako všetky ostatné mikroorganizmy, potrebujú k úspešnej produkcii biomasy či nadprodukcii sledovaných metabolitov rásť v optimálnych kultivačných podmienkach. Tieto podmienky boli experimentálne testované v predchádzajúcich prácach (Márová et al. 2004, Márová et al. 2010, Márová et al. 2012). Ďalšie experimenty nadviazali na už optimalizované parametre ako sú: aerobná kultivácia pri teplote 25°C, kontrolná kultivácia na glukózovom médiu s prídavkom solí s vodovodou vodou na zabezpečenie ďalších minerálov, stále osvetlenie pre produkciu karotenoidov, stále trepanie pri 90 rpm. V predchádzajúcich prácach boli stanovené i rastové charakteristiky, kde sa zistilo, že rastové krivky karotenogénnych kvasiniek majú typický dvojstupňový nárast exponenciálnej fáze a predĺženú stacionárnu fázu, kde sa produkuje najviac karotenoidov, ako sekundárnych metabolitov. Z tohto dôvodu boli ďalšie kultivácie ukončované v 80. hodine kultivácie.

V predloženej práci bola prevedená rastová charakteristika na karotenogénnom kmeni kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2. Kvasinka bola kultivovaná na optimálnom glukózovom médiu (Obr.1)

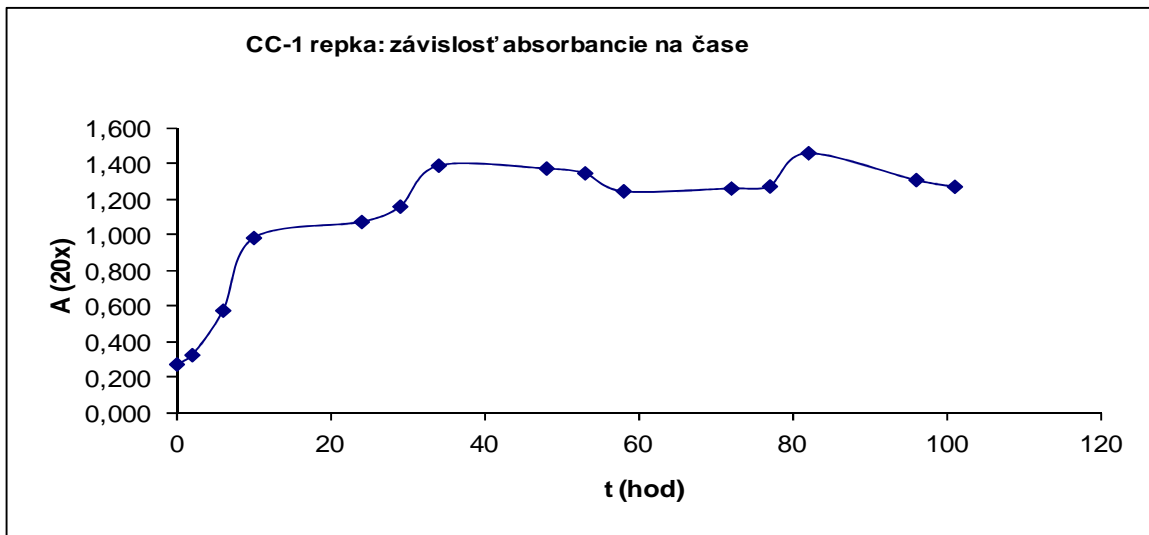
Pre porovnanie rastu kmeňov červených kvasiniek v optimálnom médiu a v médiu s odpadovým substrátom, boli prevedené rastové charakteristiky vybraných kvasinkových kmeňov z rodov *Rhodotorula*, *Cystofilobasidium* a *Sporobolomyces* na odpadovom substráte z repky. Rastové vlastnosti (produkcie biomasy) boli merané postupom uvedeným v kap. 8.2.9, výsledky uvedené v grafoch sú priemerom z dvoch experimentov.



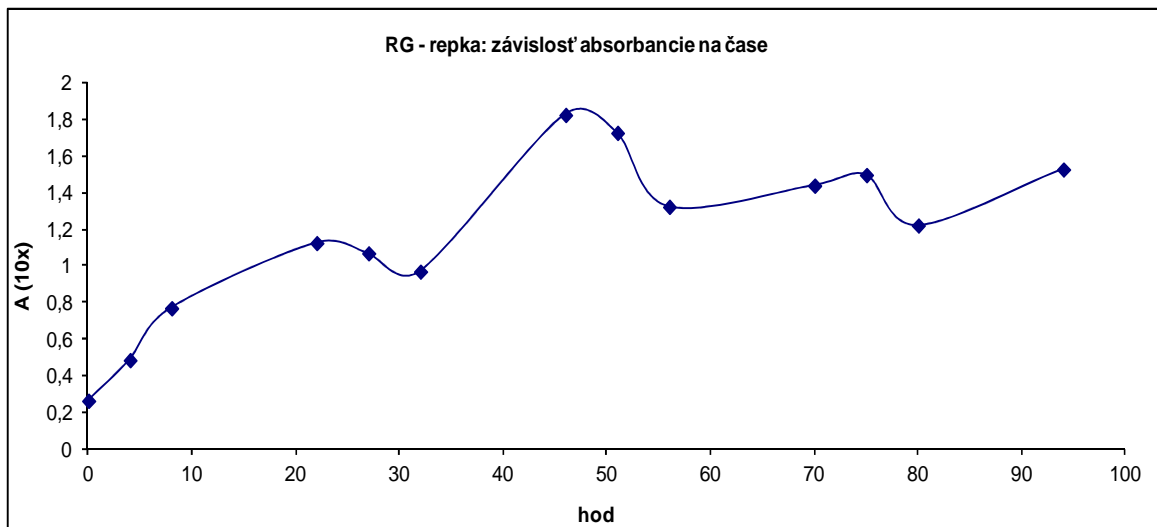
Obr. 1: Rastová krivka *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 na glukóze



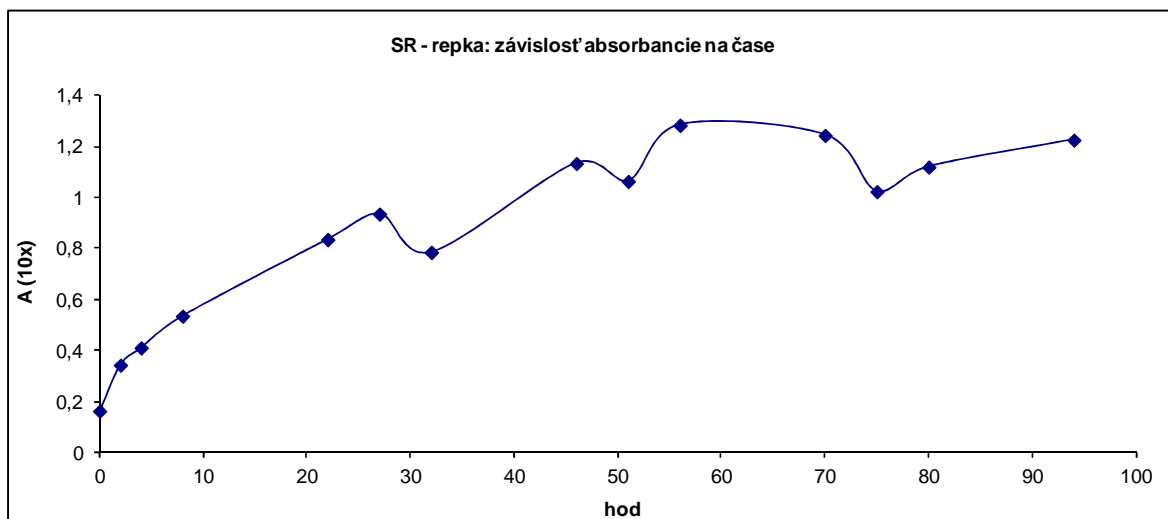
**Obr. 2:** Rastová krivka *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 na repkovom substráte



**Obr. 3:** Rastová krivka *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 na repkovom substráte



**Obr. 4:** Rastová krivka *Rhodotorula glutinis* na repkovom substráte



**Obr. 5:** Rastová krivka *Sporobolomyces roseus* na repkovom substráte

Z rastových kriviek karotenogénnych kvasiniek (obr. 2-5) je vidieť, že kmeň *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 rastúci na glukózovom optimálnom médiu prechádza do stacionárnej fáze rastu, kde produkuje najviac sledovaných metabolitov, okolo 70-80. hodiny (obr. 2). Podobne je tomu i v médiu s repkovým substrátom (obr. 3) Ostatné kvasinkové kmene kultivované na odpadovom materiáli prechádzali do stacionárnej fáze rastu už v približne 60. hodine (obr. 4, 5). Je možné, že menší obsah sacharidov v repkovom substráte spôsobuje zastavenie rastu buniek kvasiniek skôr, než je tomu v optimálnych rastových podmienkach.

### 9.1.2 Produkčné vlastnosti karotenogénnych kvasiniek na rôznych odpadových substrátoch

Kvasinky syntetizujúce karotenoidy bývajú obvykle kultivované v syntetických médiách s jednoduchými sacharidami ako zdrojmi uhlíka. V súčasnosti sa výskumníci snažia znížiť náklady na biotechnologickú produkciu týchto metabolitov využívaním rôznych odpadových materiálov ako lacný zdroj uhlíka, prípadne dusíka. Preto boli v predloženej práci testované odpadové materiály z potravinárskych výrobní, poľnohospodárstva alebo i lignocelulózové materiály hojne využívané pri biotechnologickej produkcii biopalív.

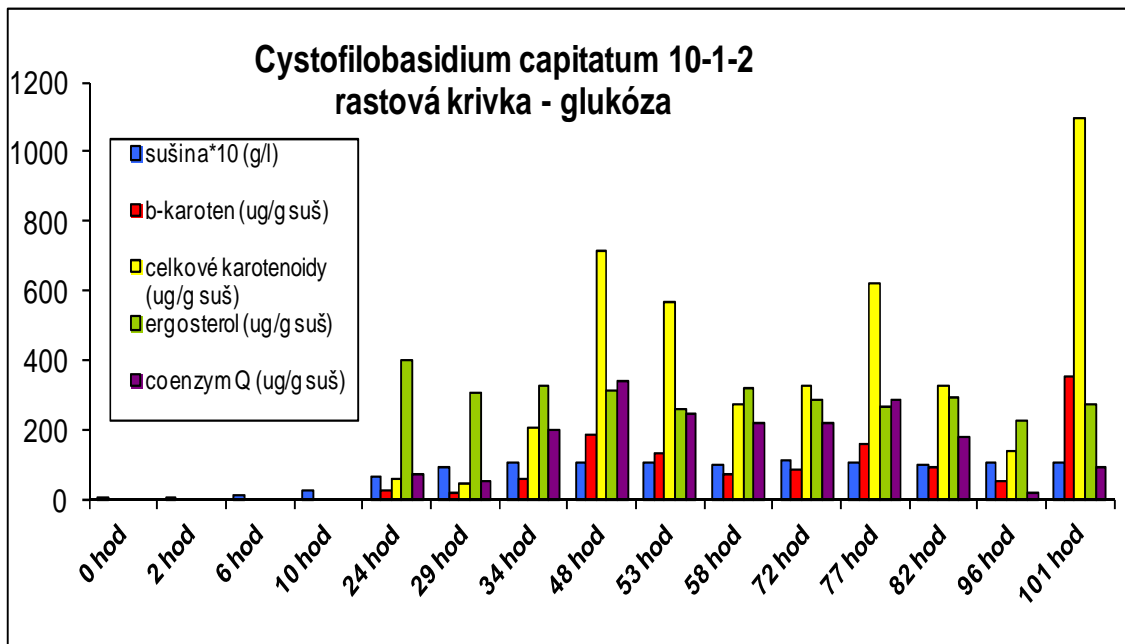
Ku každej sérii kultivačných experimentov bola vždy zaradená kontrolná kultivácia na glukózovom médiu, aby sa mohli sledovať zmeny rastu kultúry a produkcie metabolitov a teda využiteľnosť daného použitého odpadového materiálu.

#### Produkčné vlastnosti kvasiniek počas rastových charakteristík

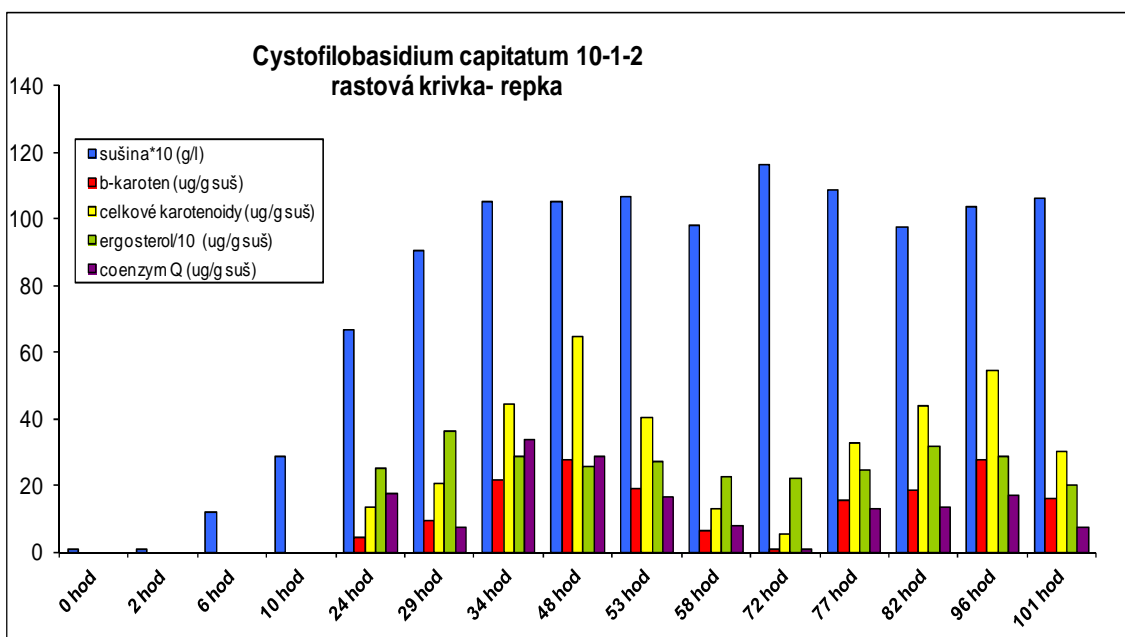
Počas rastových charakteristík kvasinkových kmeňov boli sledované aj produkčné vlastnosti vybraných metabolitov. Kvasinka v určitej fáze, prevažne stacionárnej, produkuje zvýšené množstvá sekundárnych metabolitov. V tejto dobe, pri najvyšších produkčných vlastnostiach je vhodné danú kultiváciu ukončiť. Získajú sa tak najvyššie výťažky metabolitov a zároveň sa nepredlžuje čas kultivácie, čím sa nezvyšujú prípadne náklady na prevádzku biotechnologického procesu.

V priebehu rastu boli sledované nasledujúce metabolity:  $\beta$ -karotén, ergosterol, celkové karotenoidy a koenzým Q. Analýza bola prevedená postupom uvedeným v kap. 8.8. Výsledky

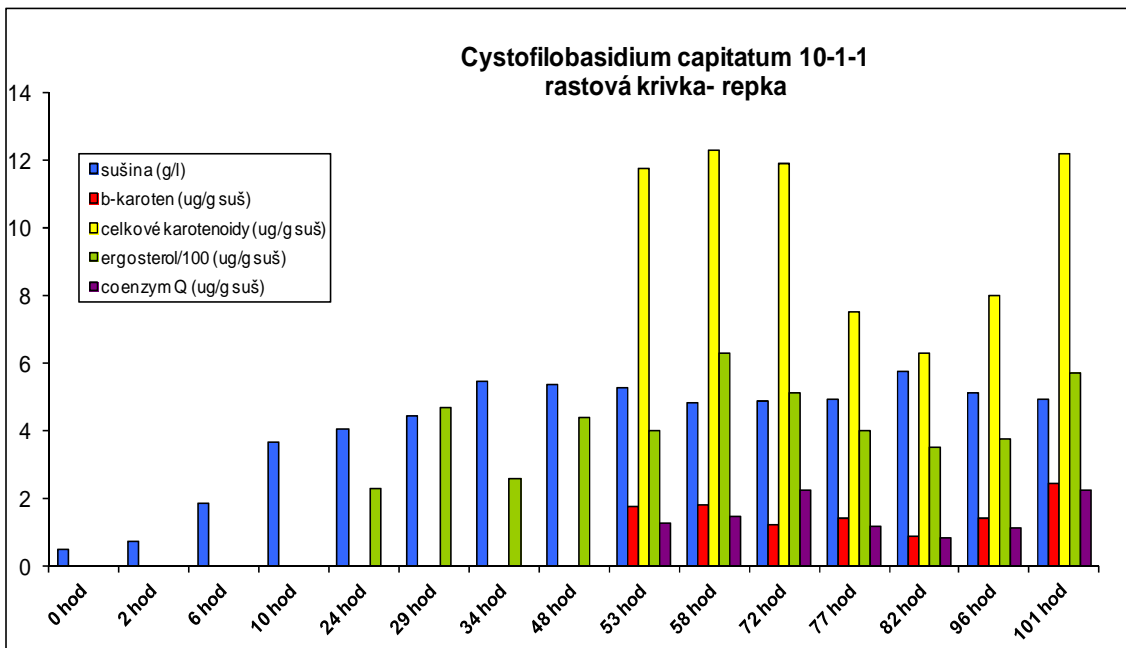
uvedené v nasledujúcich grafoch sú priemernými hodnotami z dvoch kultivačných experimentov.



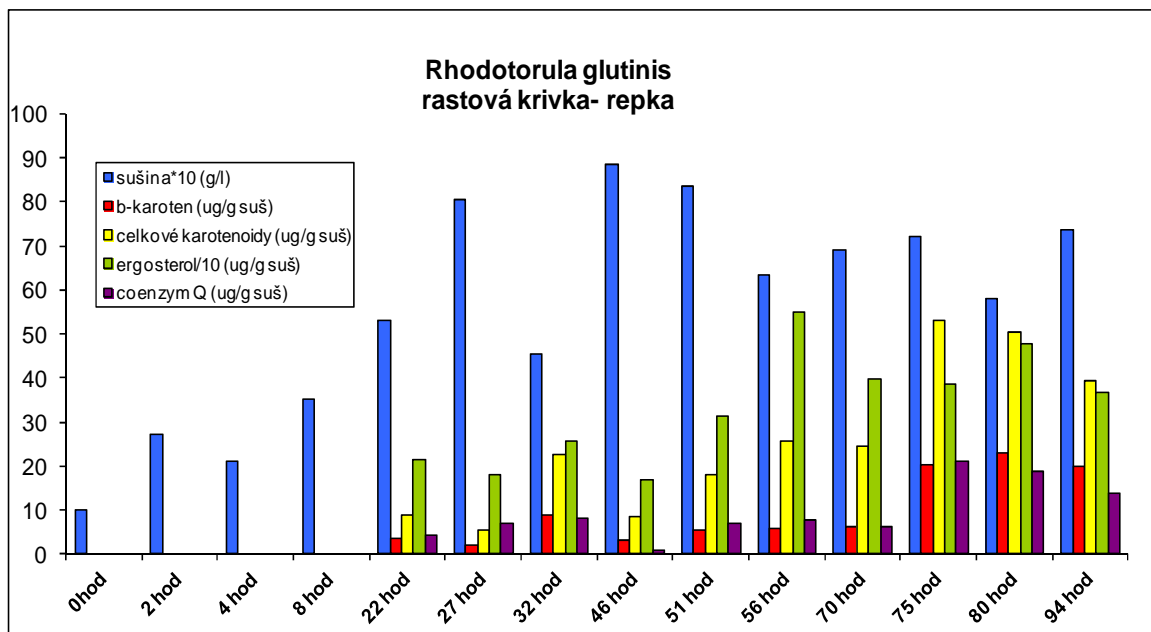
**Obr. 6:** Produkčné vlastnosti *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 počas rastovej charakteristiky na glukóze



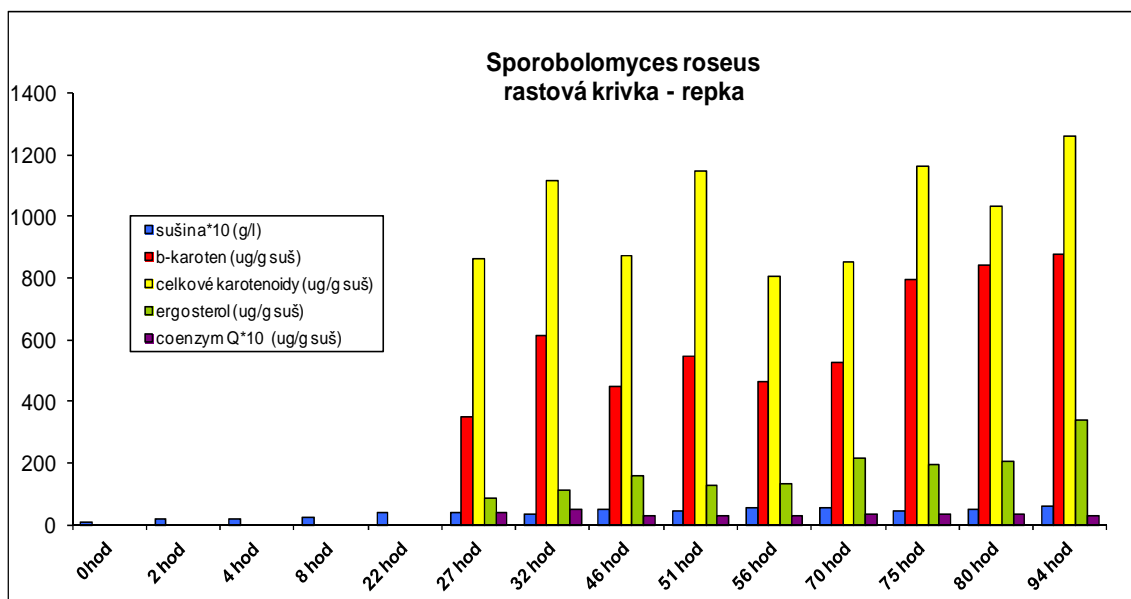
**Obr. 7:** Produkčné vlastnosti *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 počas rastovej charakteristiky na repkovom substráte



**Obr. 8:** Produkčné vlastnosti *Cystofilobasidium capitatum 10-1-1* počas rastovej charakteristiky na repkovom substráte



**Obr. 9:** Produkčné vlastnosti *Rhodotorula glutinis* počas rastovej charakteristiky na repkovom substráte



**Obr. 10:** Produkčné vlastnosti *Sporobolomyces roseus* počas rastovej charakteristiky na repkovom substráte

Z výsledkov produkčných charakteristík kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 na glukózovom médiu (obr. 6) a médiu s repkových substrátom (obr. 7) je vidieť mierne maximum produkcie karotenoidov okolo 77. hodiny kultivácie a najvyššie maximum v 100. hodine kultivácie na glukózom médiu, zatiaľčo na repkovom substráte kvasinka dosahuje maximum produkcie pigmentov v 96. hodine. Pri sledovaní produkcie ostatných kvasinkových kmeňoch na repkovom odpadovom substráte (obr. 8-10), vidíme rovnaký priebeh ako u *C. capitatum* 10-1-2, a to zvýšené produkcie karotenových pigmentov i lipidických látok ergosterolu a koenzýmu Q, okolo 80 – 90. hodiny kultivácie. Z tohto dôvodu bol čas ukončenia ďalších prevedených kultivácií stanovený na 80. hodinu.

### 9.1.3 Kultivácie na neupravených odpadových substrátoch

V predchádzajúcich prácach s karotenogénnymi kvasinkami boli využité rôzne odpadové materiály: jablčná vláknina, jablčné šupky, srvátka, pšeničné i kukričné otruby a ďalšie. Tieto materiály sa javili prevažne ako vhodná lacná náhrada zdroja uhlíka pri produkcii obohatenej biomasy v závislosti na kmeni i použítom substráte.

Preto prvé experimenty zahrňovali kultiváciu kvasiniek v médiách, kde zdroj uhlíka – glukóza, bol nahradený odpadovým substrátom kompletne alebo čiastočne. Boli sledované nasledujúce parametre:  $\beta$ -karotén, ergosterol, celkové karotenoidy a koenzým Q. Výsledky sú uvedené v tabuľkách 18, 19 ako priemerné hodnoty z dvoch kultivácií.

**Tab. 18:** Produkcia biomasy vybraných karotenogénnych kvasiniek na repkovom substráte

Sušina (g/l)	kontrol a	25 % repka 1	50 % repka 1	75 % repka 1	100 % repka1	25 % repka 2	50 % repka 2	75 % repka 2	100 % repka 2
RG	7,9	8,0	7,4	6,8	8,1	8,5	8,2	8,7	7,6
SR	5,1	6,1	5,9	4,6	3,0	6,4	6,2	8,3	2,9
CC1	9,8	10,4	8,4	8,3	9,4	9,5	12,0	8,9	5,7
CC2	12,4	9,4	10,0	10,3	7,2	10,9	10,6	11,0	7,5

**Tab. 19:** Produkcia sledovaných metabolitov karotenogénnych kvasiniek na repkovom substráte

<b>β -karotén (ug/g suš)</b>	<b>kontrola</b>	<b>25 % repka 1</b>	<b>50 % repka 1</b>	<b>75 % repka 1</b>	<b>100 % repka1</b>	<b>25 % repka 2</b>	<b>50 % repka 2</b>	<b>75 % repka 2</b>	<b>100 % repka 2</b>
RG	92,7	196,1	45,9	6,5	9,4	345,7	35,5	4,9	8,6
SR	835,0	719,7	1383,1	1364,3	671,7	1374,1	1694,8	954,2	422,6
CC1	74,6	89,9	35,5	4,5	5,5	126,7	34,5	3,7	6,6
CC2	419,7	407,9	101,7	52,1	8,5	816,6	115,1	69,9	11,7
<b>Celkové karotenoidy (ug/g suš)</b>	<b>kontrola</b>	<b>25 % repka 1</b>	<b>50 % repka 1</b>	<b>75 % repka 1</b>	<b>100 % repka1</b>	<b>25 % repka 2</b>	<b>50 % repka 2</b>	<b>75 % repka 2</b>	<b>100 % repka 2</b>
RG	213,4	836,2	221,2	14,3	20,6	1077,2	125,2	10,0	16,2
SR	1189,8	955,5	1655,6	1592,1	830,3	1915,3	1993,0	1075,6	548,1
CC1	171,7	166,7	76,3	16,2	12,3	270,5	81,4	16,3	16,9
CC2	1303,8	885,6	221,3	99,4	10,9	1523,3	210,5	123,7	26,0
<b>Ergosterol (ug/g suš)</b>	<b>kontrola</b>	<b>25 % repka 1</b>	<b>50 % repka 1</b>	<b>75 % repka 1</b>	<b>100 % repka1</b>	<b>25 % repka 2</b>	<b>50 % repka 2</b>	<b>75 % repka 2</b>	<b>100 % repka 2</b>
RG	390,4	462,8	452,0	407,7	312,3	386,4	397,6	346,4	299,6
SR	541,7	491,7	646,7	958,2	931,2	627,6	630,1	397,2	884,3
CC1	314,0	314,9	397,2	331,6	304,4	309,8	297,2	349,8	303,2
CC2	227,5	359,0	340,9	310,7	301,6	354,3	293,1	389,7	444,4
<b>Koenzým Q (ug/g suš)</b>	<b>kontrola</b>	<b>25 % repka 1</b>	<b>50 % repka 1</b>	<b>75 % repka 1</b>	<b>100 % repka1</b>	<b>25 % repka 2</b>	<b>50 % repka 2</b>	<b>75 % repka 2</b>	<b>100 % repka 2</b>
RG	47,5	102,4	34,8	1,6	0,4	95,2	14,4	31,4	3,8
SR	45,5	63,1	97,7	94,8	48,8	85,8	108,6	64,6	33,9
CC1	38,2	23,4	19,7	1,7	0,8	43,9	13,8	5,6	1,6
CC2	339,6	421,1	86,9	31,4	4,0	378,7	66,9	35,7	8,4

Ako jeden z významných odpadov bol testovaný odpad zo spracovania repky – repkové výlisky. Česká republika patrí k desiatim najväčším svetovým producentom repky a teda i repkových pokrutín. Akékoľvek biotechnologické využitie repkového odpadu je teda vítané, pretože krmné využitie je obmedzné hlavne kvôli obsahu antinutričných faktorov (katalog krmiv, electronic).

Kultivácie vybraných červených kvasiniek boli prevedené na odpadnom repkovom substráte. Boli využité dva typy repky – typ 1 s deklarovávaným obsahom lipidov 2,55% a typ 2 s obsahom lipidov 9%. Kvasinky rástli najskôr v inokulačných glukózových médiách s následnou produkciou, kde zdroj uhlíka bol čiastočne alebo kompletne nahradený repkovým substrátom. Pri čiastočnom nahradení uhlíka repkou, bol zbytok zdroja doplnený glukózou na celkovú koncentráciu 30 g/l.

Z hľadiska produkcie biomasy v daných kultiváciách, si môžeme dovoliť tvrdiť, že repkový substrát je vhodný ku kultiváciám do určitej miery. Prídavok repky do média zvyšuje produkciu biomasy oproti kontrolnému médiu, nie však výrazným spôsobom. Najvyššie produkcie boli v médiách s koncentráciou 25 a 50 % repky z celkových uhlíkatých zdrojov. Vyššie koncentrácie repkového substrátu majú už viacmenej negatívny vplyv na rast buniek (tab. 18). Čo sa týka produkcie sledovaných metabolitov, konkrétne β -karoténu, celkových karotenoidov a lipidických látok – ergosterolu a koenzýmu Q, najvyššie produkcie boli

dosiahnuté v podstate v médiách s rovnakou koncentráciou repkového substrátu ako u produkcie biomasy. U kvasinky *Rhodotorula glutinis* sa so zvyšujúcou koncentráciou repky produkcia sledovaných metabolitov pravidelne znižovala. Kvasinka *Sporobolomyces roseus* znášala i vyššie koncentrácie repkového substrátu, v niektorých prípadoch boli produkcie karotenoidov i dvojnásobné v porovnaní s kontrolným médiom. Pri zvyšujúcej sa koncentrácii repky boli produkcie stále vyššie než u kontrolného média, no zároveň už vykazovali klesajúci charakter (tab. 19).

Kultivácia na repkových substrátoch prebiehala i u kvasinky *Cystofilobasidium capitatum*, kde boli použité dva kmene tohto druhu, a to CCY 10-1-1 a CCY 10-1-2. Kvasinky mali podobný priebeh produkcie metabolitov ako kvasinka *Rhodotorula glutinis*. Najvyššie produkcie boli dosiahnuté v médiách s prídavkom odpadnej repky v koncentrácii 25% oproti kontrole, so zvyšujúcou koncentráciou sa produkcia pravidelne znižuje. Pri porovnaní produkčných vlastností oboch kmeňov druhu *Cystofilobasidium capitatum* sa zdá, že kvasinkový kmeň CCY 10-1-2 má omnoho vyššie produkcie biomasy i sledovaných metabolitov. Z výsledkov sa javí viac perspektívnejší pre biotechnologické využitie (odkaz tab. 18, 19).

Použitý typ repkového substrátu (rozdielny obsah lipidov) všeobecne nemá na kvasinkovú produkciu výrazný vplyv. Mierne odlišnosti sú patrné v médiách s najvyššími produkciami, kde sa typ repky 2 s vyšším obsahom lipidov zdá byť vhodnejším substrátom. Môžeme povedať, že malý prídavok odpadného repkového substrátu do produkčného média má vplyv na zvýšené produkcie karotenoidov a iných metabolitov pravdepodobne ako stresová odozva na adaptáciu sa novým kultivačným podmienkam. Zvyšujúca sa koncentrácia repky má už prevažne negatívny vplyv na produkcie, čo môže byť spôsobené i zvyšujúcimi sa koncentraciami inhibičných látok a antinutrientov v danom substráte.

#### **9.1.4 Kultivácia karotenogénnych kvasiniek na hydrolyzovaných odpadových substrátoch**

Rôzne substráty a vedľajšie produkty poľnohospodársko-potravinárskeho pôvodu ako nízkonákladové sacharidové zdroje pre biotechnologickú produkciu žiadaných metabolitov nemusia vždy mať dostatok jednoduchých sacharidov, a tak ich priama fermentácia nie je dostatočná. Preto ďalšie experimenty viedli k úprave daných odpadových substrátov hydrolýzami, aby sa získali z komplexných substrátov naštepené monojednotky sacharidov už lepšie využiteľné kvasinkovými kmeňmi.

K hydrolýze odpadových materiálov boli použité extracelulárne enzýmové preparáty z plesní *Fusarium solani* a *Phanerochaete chrysosporium*. Tieto enzýmy boli izolované z kultivačného média, lyofilizované a po rozpustení vo vhodnom pufrovacom roztoku použité k 24 hodinovej hydrolýze materiálu (kap. 8.2.5). Taktiež boli použité komerčné enzýmové preparáty s deklarovanými účinkami na rôzne typy materiálov, či už celulázy, amylázy, proteázy a iné. U všetkých enzýmových preparátov boli v prvom rade stanovené enzýmové aktivity na všetkých použitých odpadových substrátoch i obsah bielkovín. Následne boli vybraté preparáty s najväčšou aktivitou a použité k hydrolýze. V samotných odpadových materiáloch boli stanovené redukujúce sacharidy pred hydrolýzou i po hydrolýze enzýmami metódou Somogyi-Nelson indikujúcou jednoduché monosacharidy. Konkrétne sacharidy boli

následne stanovené metódou HPLC/RI (kap. 8.3.1 a 8.3.2). Takto sa získal prehľad o obsahu jednoduchých cukrov v každom odpadnom substráte a možnosti využitia kvasinkami.

K samotnej kultivácii kvasiniek boli použité nasledovné substráty hydrolyzované enzýmami: ryža, vaječné cestoviny, jablčná vláknina a pšeničné otruby. Tieto nehydrolyzované substráty boli v predchádzajúcich prácach využívané ku kultiváciám a ich úprava sa zdala byť vhodným cieľom ďalších štúdií. Výsledky zo stanovenia redukujúcich sacharidov v odpadných materiáloch i z jednotlivých kultivácií sú uvedené v tabuľkách (tab. 20-21). Výsledky sú priemernými hodnotami z dvoch kultivácií.

**Tab. 20:** Množstvo redukujúcich sacharidov v jednotlivých odpadových substrátoch

<b>Koncentrácia redukujúcich sacharidov (mg/ml) stanovená metódou Somogyi-Nelson</b>				
	Ryža	Cestoviny	Pšen. otruby	Jabl. vláknina
Pred hydrolyzou	0,03	0,83	0,26	0,57
Hydrolyza s FS	0,11	0,85	0,59	0,58
Hydrolyza s PCH	1,12	0,97	0,87	1,41
Hydrolyza s AMG	35,34	26,87	4,44	3,78
Hydrolyza s Novozym 188	22,59	17,97	5,55	3,31

**Tab. 21:** Produkčné vlastnosti kvasiniek na hydrolyzovaných odpadových materiáloch

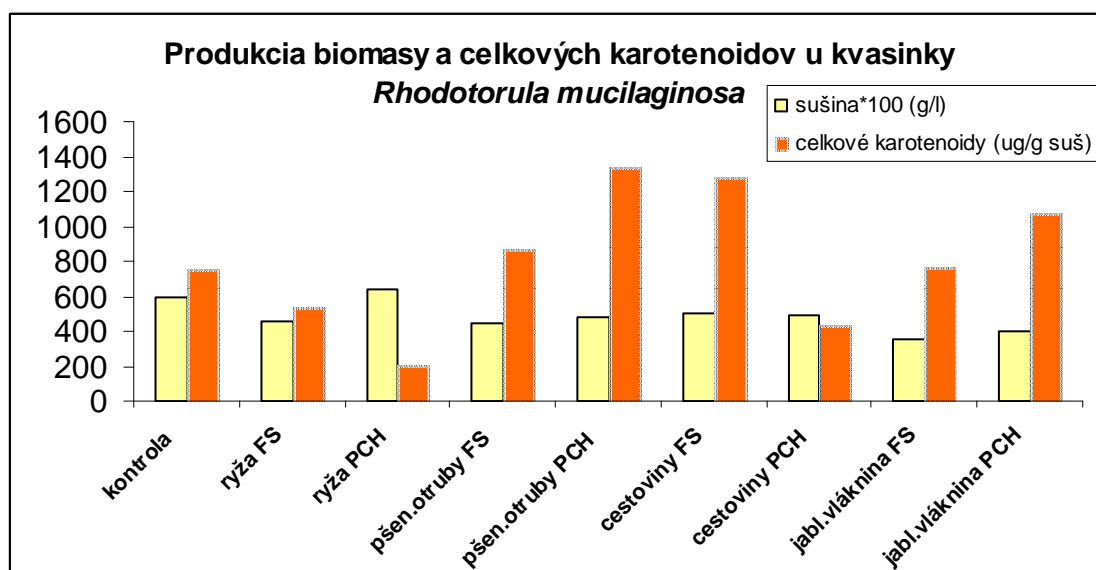
	Sušina (g/l)	$\beta$ -karotén (ug/g suš)	Celkové karotenoidy (ug/g suš)	Ergosterol (ug/g suš)
<b><i>Rhodotorula glutinis</i></b>				
kontrola	6,98	365,3	1908,1	2299,3
ryža FS	5,91	39,3	289,1	1427,0
ryža PCH	5,94	124,3	525,7	2700,5
pšen.otruby FS	6,77	52,8	656,6	1641,2
pšen.otruby PCH	6,66	68,6	622,4	3144,1
cestoviny FS	6,99	67,3	501,7	581,3
cestoviny PCH	6,98	35,4	532,7	2215,8
jabl.vláknina FS	5,44	17,3	585,2	1183,0
jabl.vláknina PCH	5,86	16,3	409,0	1788,0
<b><i>Rhodotorula mucilaginosa (rubra)</i></b>				
kontrola	5,89	173,5	753,7	2807,5
ryža FS	4,58	113,3	541,2	3280,5
ryža PCH	6,35	33,5	206,6	1249,4
pšen.otruby FS	4,42	85,4	868,3	2971,5
pšen.otruby PCH	4,78	249,1	1336,7	1576,5
cestoviny FS	5,02	58,8	1277,9	4158,7
cestoviny PCH	4,87	36,8	433,5	1223,7
jabl.vláknina FS	3,56	168,4	760,2	3108,9
jabl.vláknina PCH	4,04	346,7	1075,3	750,1
<b><i>Rhodotorula aurantiaca</i></b>				
kontrola	5,47	230,7	992,6	2154,1
ryža FS	4,98	435,3	1892,6	2099,7
ryža PCH	6,03	93,6	936,6	2206,1
pšen.otruby FS	5,96	31,6	623,3	1349,8

pšen.otruby PCH	5,84	55,4	627,9	1959,7
cestoviny FS	4,96	89,6	1230,7	2898,6
cestoviny PCH	5,90	37,4	696,6	2389,2
jabl.vláknina FS	3,53	36,6	1666,1	4475,4
jabl.vláknina PCH	3,26	53,6	982,0	4382,0
<b><i>Cystofilobasidium capitatum 10-1-1</i></b>				
kontrola	6,85	189,6	394,1	2670,9
ryža FS	4,60	5,6	105,3	1926,0
ryža PCH	5,36	235,8	1057,8	2745,6
pšen.otruby FS	8,40	32,8	513,0	1969,9
pšen.otruby PCH	7,88	33,8	246,3	1757,5
cestoviny FS	6,18	8,2	138,7	1743,5
cestoviny PCH	6,35	42,6	162,2	1587,4
jabl.vláknina FS	5,13	10,1	132,3	1275,8
jabl.vláknina PCH	3,93	30,4	444,0	1293,8

Nízky obsah jednoduchých sacharidov v škrobnatých substrátoch po hydrolýze extracelulárnymi enzýmami z plesní *Fusarium solani* a *Phanerochaete chrysosporium* pravdepodobne pôsobí negatívne na rast buniek, tak produkcia biomasy u študovaných kmeňov je oproti kontrole prevažne nižšia a na všetkých odpadných substrátoch podobná (tab. 21). Použité enzýmy nedokázali dané substráty efektívne naštiepiť, a preto bol rast buniek spomalený. Napriek tomu sú kvasinky schopné takto upravené substráty utilizovať.

Produkcia  $\beta$ -karoténu u kvasiniek kultivovaných na hydrolyzovaných škrobnatých substrátoch bola nižšia v porovnaní s kontrolou. U kvasinky *Rhodotorula glutinis* boli produkcie vždy 3-4 násobne nižšie než v kontrolnom médiu. Výnimku tvorilo rýžové médium hydrolyzované s enzýmami z plesne *Phanerochaete chrysosporium*, približne 120 ug/g sušiny. Čo sa však týka celkovej produkcie karoténových pigmentov, vo všetkých médiách s odpadovým substrátom boli výrazne nižšie než v kontrolnom médiu (tab.21).

I u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa (rubra)* boli zvýšené produkcie  $\beta$ -karoténu v médiách hydrolyzovaných s enzýmami z plesne *Phanerochaete chrysosporium*. Produkcie dosahovali 250 ug/g suš. v médiu s pšeničnými otrubami a približne 350 ug/g suš. v médiu s hydrolyzovanou jablčnou vlákninou. Táto kvasinka však produkovala na viacerých odpadných substrátoch vyššie množstvá celkových karotenoidov v porovnaní s kontrolou. I keď boli produkcie  $\beta$ -karoténu nízke, je vidieť, že kvasinka je schopná produkovať v týchto zhoršených podmienkach iné typy pigmentov, a to pravdepodobne torulén, torularhodin, prípadne iné deriváty (obr. 11).



**Obr. 11:** Produkcia biomasy a karotenoidov u *Rhodotorula mucilaginosa*

Priebeh produkcie  $\beta$ -karoténu a celkových karotenoidov u kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* je veľmi podobný ako u predchádzajúcej kvasinky *Rh. mucilaginosa*. V porovnaní s kontrolným médiom je zvýšená produkcia  $\beta$ -karoténu jedine na ryžovom médiu 435 ug/g suš, avšak produkcia celkových pigmentov je zvýšená vo viacerých médiách s odpadovým substrátom, na ryžovom substráte dvojnásobné zvýšenie, na jablčnej vláknine 1,7-násobné. Kvasinke vyhovovali viac odpadové substráty hydrolyzované enzýmami z plesne *Fusarium solani*. (tab. 21).

Produkcie  $\beta$ -karoténu v médiách s odpadovým substrátom u kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 boli mnohokrát nižšie než v kontrolnom médiu, v niektorých prípadoch viac než 20x. Najvyššia produkcia, veľmi blízka produkcii v kontrolnom médiu, bola s použitím hydrolyzovanej ryže enzýmami z plesne *Phanerochaete chrysosporium*. V tomto médiu bola aj najvyššia produkcia celkových pigmentov - 1057 ug/g suš. Dosiadnutá hodnota je asi 2,5-násobne vyššia než v kontrolnom médiu.

Produkcie ergosterolu boli vysoké u všetkých kvasiniek prevažne vo všetkých médiách s odpadovým substrátom (tab.21). *Rhodotorula glutinis* dosahovala najvyššiu produkciu v médiu s pšeničnými otrubami 3,1 mg/g suš, u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* v médiách hydrolyzovaných enzýmami z plesne *Fusarium solani* a to 3-4 mg/g suš, *Rhodotorula aurantiaca* mala zvýšené produkcie na jablčnej vláknine hydrolyzovanej oboma enzýmatickými preparátmi 4,5 mg/g suš a kvasinka *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 mala mierne zvýšenú produkciu ergosterolu skoro porovnateľnú s kontrolou jedine v médiu s hydrolyzovanou ryžou (2,7 mg/g suš.).

**Tab. 22:** Produkčné vlastnosti kvasiniek na hydrolyzovaných odpadových materiáloch

	Sušina (g/l)	$\beta$ -karotén (ug/g suš)	Celkové karotenoidy (ug/g suš)	Ergosterol (ug/g suš)
<b><i>Rhodotorula glutinis</i></b>				
kontrola	7,60	198,6	596,3	1517,7
ryža AMG	8,93	140,9	747,1	1491,0

ryža Novozym	5,37	46,7	224,5	517,4
pšen.otruby AMG	6,86	20,2	555,9	283,5
pšen.otruby Novozym	8,20	31,2	352,7	394,9
cestoviny AMG	8,72	205,0	655,9	970,2
cestoviny Novozym	7,39	49,1	228,9	736,2
jabl.vláknina AMG	7,37	26,6	448,9	550,8
jabl.vláknina Novozym	6,89	41,0	156,7	505,6
<b><i>Rhodotorula mucilaginosa (rubra)</i></b>				
kontrola	8,26	671,7	2275,2	1977,2
ryža AMG	8,16	325,5	1390,3	1352,5
ryža Novozym	8,15	110,3	303,4	495,5
pšen.otruby AMG	6,77	40,5	402,5	281,1
pšen.otruby Novozym	6,92	129,4	876,8	1373,7
cestoviny AMG	7,70	319,9	1251,8	2259,9
cestoviny Novozym	7,46	516,6	1842,7	2559,0
jabl.vláknina AMG	6,19	34,3	276,5	1155,6
jabl.vláknina Novozym	6,83	45,8	526,3	1166,6
<b><i>Rhodotorula aurantiaca</i></b>				
kontrola	9,40	113,0	525,9	8267,7
ryža AMG	7,12	37,4	247,3	2024,8
ryža Novozym	8,21	78,1	298,5	2182,3
pšen.otruby AMG	6,40	99,9	449,2	2539,7
pšen.otruby Novozym	6,93	41,8	152,7	1194,4
cestoviny AMG	10,37	89,2	253,6	991,9
cestoviny Novozym	6,86	123,4	414,6	1895,0
jabl.vláknina AMG	5,98	20,5	333,4	1047,2
jabl.vláknina Novozym	6,16	35,7	1030,4	1772,6
<b><i>Cystofilobasidium capitatum 10-1-1</i></b>				
kontrola	10,11	165,0	1014,8	3284,0
ryža AMG	9,94	157,3	958,2	1650,1
ryža Novozym	9,94	32,3	462,1	662,5
pšen.otruby AMG	6,20	9,2	472,0	338,7
pšen.otruby Novozym	6,21	25,6	382,4	279,9
cestoviny AMG	6,22	224,1	1582,1	1832,5
cestoviny Novozym	7,36	67,5	503,3	827,3
jabl.vláknina AMG	5,28	54,7	773,8	444,0
jabl.vláknina Novozym	5,92	4,1	242,4	1000,9

V ďalšej sérii kultivácii boli využité vybrané komerčné enzýmové preparáty AMG a Novozym 188. Enzým AMG je výrobcom deklarovaný ako amyloglukozidáza a Novozym

188 ako celobiáza. Pred samotným použitím enzýmov boli preparáty otestované nielen na výrobcu deklarovanú aktivitu, ale aj na iné enzýmové aktivity.

Obsah jednoduchých sacharidov vybraných škrobnatých substrátov po hydrolyze danými komerčnými enzýmovými preparátmi vykazoval vyššie hodnoty, najmä u ryže a cestovín. Všetky použité kvasinkové kmene boli schopné tieto substráty utilizovať. Produkcia biomasy bola vo viacerých prípadoch zrovnateľná s kontrolným médiom, vyskytli sa aj mierne nadrodkcie práve na cestovinových alebo ryžových substrátoch (tab. 22).

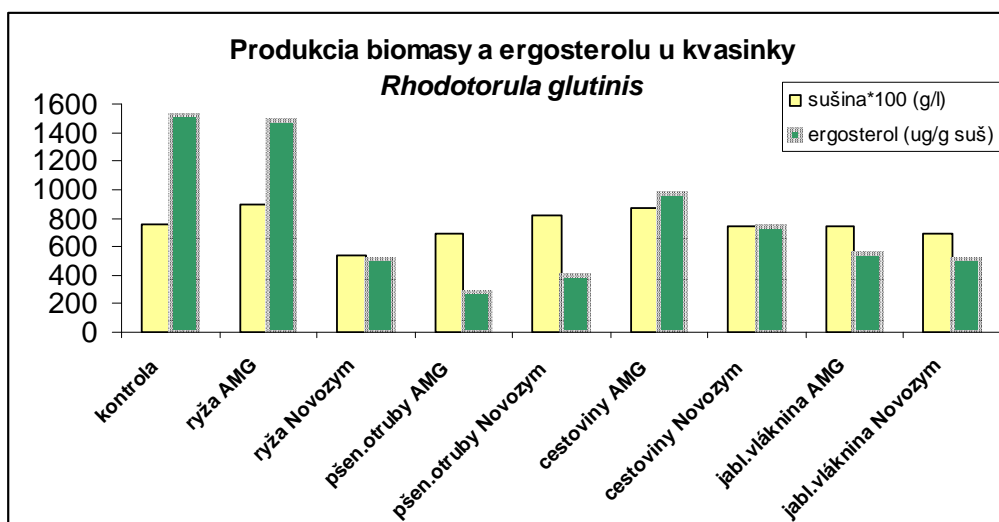
Produkcia  $\beta$ -karoténu u kvasinky *Rhodotorula glutinis* bola v porovnaní s kontrolným médiom 4-5-násobne nižšia. Približne rovnakú produkciu než na kontrole dosahovala v médiách s cestovinami a ryžou hydrolyzovanými s enzýmovým preparátom AMG 205 ug/g suš. V týchto médiách bola i produkcia celkových karotenoidov asi o 30% vyššia než na glukózovom médiu (tab. 22).

Kvasinka *Rhodotorula aurantiaca* mala produkcie  $\beta$ -karoténu 5-10-násobne nižšie než v kontrolnom médiu. Výnimku tvorilo cestovinové médium, kde produkcia dosahovala podobnú hodnotu ako na glukóze. Celkové karotenoidy boli rovnako tak u všetkých médií s hydrolyzovaným odpadovým materiálom nižšie, 2x vyššia produkcia bola v médiu s jablčnou vlákninou, približne 1 mg/g sušiny.

S produkciami  $\beta$ -karoténu i celkových karotenoidov to bolo podobne aj u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa (rubra)*. Všetky médiá s odpadovým substrátom vykazovali pokles produkcie pigmentov. Jedine v médiách cestovinových a ryžových bola produkcia niekoľkokrát vyššia než v ostatných médiách, no ani nikdy neprevýšila produkcie v kontrolnom glukózovom médiu.

U kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 sa cestovinové médium hydrolyzované s enzýmovým preparátom AMG vyznačovalo vyššími produkcia  $\beta$ -karoténu 224 ug/g suš a celkových pigmentov 1,5 mg/g suš než v samotnom kontrolnom médiu. Ryžové médium malo podobný vplyv na produkcie karotenoidov ako kontrolné médium. Ostatné využité odpadové materiály mali viacmenej negatívny vplyv na produkcie (obr. 12).

Produkcie ergosterolu boli prevažne nižšie 2-10x než v kontrolných médiách u všetkých študovaných kvasinkových kmeňov. Vyššie alebo len mierne zvýšené produkcie v porovnaní s glukózovým médiom sa vyskytovali len na ryžových alebo cestovinových médiách (tab. 22).



Obr. 12: Produkcia biomasy a ergosterolu u *Rhodotorula glutinis*

### 9.1.5 Kultivácia karotenogénnych kvasiniek na odpadových substrátoch s prídavkom mutagénu

Z predchádzajúcich experimentov sa použité škrobnaté substráty nejavia ako najvhodnejšia lacná náhrada pre priemyselnú biotechnologickú produkciu obohatenej kvasinkovej biomasy, či produkciu samotných pigmentov a vybraných lipidických látok. U týchto substrátov došlo k miernemu poklesu produkcie biomasy i sledovaných metabolitov. Avšak kvasinky dokázali tieto substráty utilizovať a v niektorých prípadoch i produkovali zrovnateľné množstvá karotenoidov i ergosterolu, a to najmä na ryžovom a cestovinovom médiu. Tieto zdroje okrem iného obsahujú i množstvo dusíkatých látok, ktoré podporujú karotenogézu u červených kvasiniek.

V prípade využitia týchto odpadových materiálov z poľnohospodárskych a potravinárskych výrob by mikrobiálna produkcia sledovaných metabolitov mohla byť ekonomickejšia. Preto boli ryžové a cestovinové substráty využité i v ďalších experimentoch mikrobiálnej produkcie obohatenej biomasy nielen za stresových nutričných podmienok, ale i s prídavkom mutagénu, k náhodnej mutagenéze a selekcii nadprodukčných kvasinkových kmeňov. K tomuto testovaniu boli použité vybrané hydrolyzované odpadné materiály z predchádzajúcich experimentov, taktiež nehydrolyzované vaječné cestoviny ako dobrý dusíkatý zdroj a glycerol, vedľajší produkt produkcie bionafty, ako potenciálny uhlíkatý zdroj.

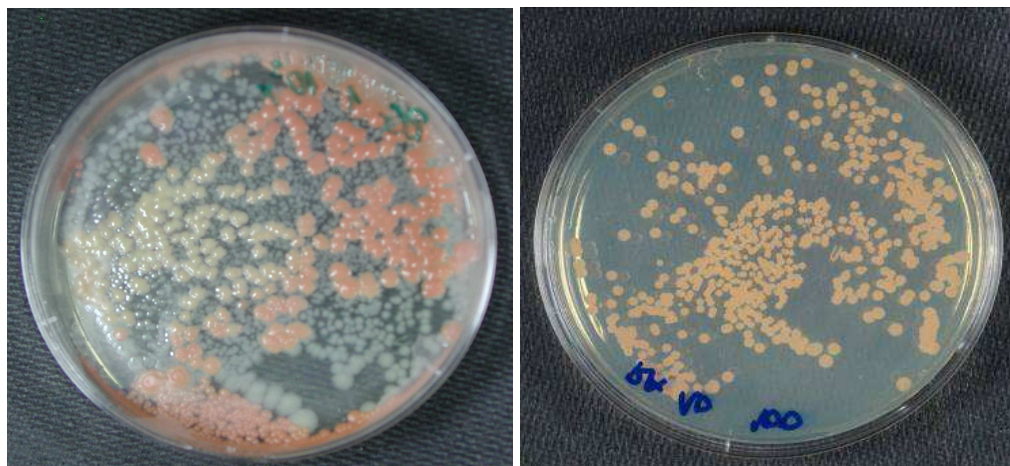
#### Optimalizácia podmienok mutácie

K selekcii nadprodukčných kmeňov získaných náhodnou mutagenézou boli testované dva rôzne mutagény: methylester kyseliny metánsulfónovej (MMS) a ethylester kyseliny metánsulfónovej (EMS). Ako prvý bol testovaný MMS mutagén o rôznych koncentráciách v rozmedzí 5-15  $\mu\text{l/ml}$  média (kap. 8.2.6). Po dávkovaní do produkčných médií s následným selektovaním na Petriho miskách bolo pozorované minimálne množstvo kolónií, pri väčších koncentráciách dokonca žiadne kolónie, ktoré by naznačovali prítomnosť živých buniek kvasiniek. Tento mutagén pravdepodobne spôsoboval čiastočnú alebo úplnú inhibíciu rastu buniek.



**Obr. 13:** Zafarbenie produkčného média po prídavku mutagénu MMS a 80. hodinovej kultivácie

Ďalej bol testovaný EMS mutagén. Najskôr boli použité rôzne koncentrácie, z ktorých následne boli vybrané tri používané koncentrácie, a to 5, 10 prípadne 15  $\mu\text{g/ml}$ . Zmutované bunky boli selektované na Petriho miskách s daným odpadovým substrátom, a potom vybrané náhodné kolónie s najintenzívnejším zafarbením, u ktorých sa podľa vizuálneho zhodnotenia predpokladali nadprodukčné vlastnosti.



**Obr. 14:** *Nárast mutantných kolónií na Petriho miskách na odpadných cestovinách a glycerole*

Z každej koncentrácie mutagénu na danom odpadnom materiále boli vybrané dve kvasinkové kolónie, ktoré boli označené A1 a A2. Bunky boli kultivované v kvapalných kultivačných produkčných médiách s odpadovým substrátom cez dvojkrokové inokulum s prídavkom rovnakého odpadového substrátu po dobu 80 hodín. Ku každej sérii kultivácie bola prevedená rovnaká kultivácia na odpadovom materiále s nemutantným kmeňom za účelom porovnania produkčných vlastností (kap. 8.2.6).

Výsledky z jednotlivých kultivácií sú uvedené v tabuľkách č. 23-29 ako priemer z dvoch paralelných kultivácií.

**Tab. 23:** *Produkčné vlastnosti mutantných kmeňov selektovaných na glycerolovom médiu*

		Sušina (g/l)	$\beta$ -karotén (ug/g suš)	Celkové karotenoidy (ug/g suš)	Ergosterol (ug/g suš)	Koenzým Q (ug/g suš)
RG	kontrola - glycerol	7,24	13,9	34,9	285,6	5,9
	kontrola	8,34	181,1	671,6	316,3	50,3
	10 A1 glukóza	9,28	81,9	260,5	206,4	38,1
	10 A1 glycerol	8,16	34,9	59,2	316,9	5,8
	10 A2 glukóza	8,94	41,0	130,8	220,3	19,3
	10 A2 glycerol	8,70	77,5	139,3	295,1	59,6
	5 A1 glukóza	9,80	297,0	637,4	270,4	275,0
	5 A1 glycerol	8,14	11,6	30,4	266,3	4,8
	5 A2 glukóza	8,88	35,2	93,0	256,5	60,1
	5 A2 glycerol	7,67	24,3	37,3	236,6	31,9
RA	kontrola - glycerol	9,04	35,7	81,0	231,7	22,4
	kontrola	9,13	267,3	296,7	226,7	28,6
	10 A1 glukóza	10,67	319,9	651,0	236,5	365,5
	10 A1 glycerol	9,57	43,0	90,4	235,3	44,8
	10 A2 glukóza	10,81	641,2	1400,1	206,5	328,3
	10 A2 glycerol	9,54	37,9	87,	257,2	28,0

	5 A1 glukóza	10,08	310,4	692,9	274,5	287,7
	5 A1 glycerol	8,72	75,3	168,9	286,2	57,8
	5 A2 glukóza	9,81	66,9	210,4	178,4	125,6
	5 A2 glycerol	9,22	20,0	48,5	237,0	19,4
RM (RR)	kontrola - glycerol	7,37	244,7	538,0	369,3	53,9
	kontrola	8,69	210,8	465,5	235,7	93,5
	10 A1 glukóza	9,57	516,8	1611,0	293,5	262,0
	10 A1 glycerol	9,39	29,8	49,0	185,2	9,6
	10 A2 glukóza	9,80	328,2	899,6	264,9	269,5
	10 A2 glycerol	9,47	39,3	91,3	199,0	11,1
	5 A1 glukóza	10,70	104,7	331,9	170,4	55,0
	5 A1 glycerol	9,74	243,3	522,2	210,4	41,7
	5 A2 glukóza	9,98	242,0	723,3	260,9	189,9
	5 A2 glycerol	10,06	62,3	148,4	196,3	22,5

**Legenda:** RG – *Rhodotorula glutinis*, RA – *Rhodotorula aurantiaca*, RM – *Rhodotorula mucilaginosa*, 5(10)- koncentrácia mutagénnu v médiu, A1(A2) – označenie náhodne vybranej kolónie kvasiniek

Použitím náhodnej mutagenézy s aplikáciou alkylačného činidla EMS šlo o selekciu nadprodukcčných kvasinkových kmeňov na rôznych odpadových substrátoch. U kvasiniek z rodu *Rhodotorula* sa nepodarilo vyselektovať také kmene, ktoré by boli na použitom odpadovom materiále, konkrétne glycerole výrazne nadprodučné oproti kontrolným nezmutovaným kmeňov. Zvýšené produkcie sa vyskytovali u kvasinky *Rhodotorula aurantiaca*, v médiách, kde bol do dvojkrokovej inokulácii pridaný glycerol, avšak produkčné médium už bolo glukózové. Kvasinka tu dosiahla najvyššie produkcie karotenoidov 1,4 mg/g suš, i koenzýmu Q 328 ug/g suš v danej sérii kultivácií (tab. 23). Podobné výsledky boli patrné aj u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa (rubra)* (tab.23).

**Tab. 24:** Produkčné vlastnosti mutantných kmeňov selektovaných na glycerolovom médiu

		Sušina (g/l)	$\beta$ -karotén (ug/g suš)	Celkové karotenoidy (ug/g suš)	Ergosterol (ug/g suš)	Koenzým Q (ug/g suš)
CC1	kontrola - glycerol	7,23	7,6	86,0	346,4	16,7
	kontrola	9,18	2,8	455,0	267,7	138,7
	10 A1 glukóza	7,40	14,3	144,1	306,4	53,0
	10 A1 glycerol	8,44	1,2	49,6	244,8	17,9
	10 A2 glukóza	8,88	2,1	245,5	312,6	133,7
	10 A2 glycerol	6,98	1,7	41,1	323,0	31,2
	5 A1 glukóza	7,69	1,6	23,7	242,0	13,1
	5 A1 glycerol	8,51	2,8	43,7	252,8	15,9
	5 A2 glukóza	7,58	6,4	194,7	338,2	98,9
	5 A2 glycerol	7,27	1,8	53,6	370,7	19,6
SR	kontrola - glycerol	5,80	377,7	497,3	488,5	64,3
	kontrola	5,72	376,9	505,0	349,7	28,4

	10 A1 glukóza	6,38	450,0	766,2	379,8	55,4
	10 A1 glycerol	4,43	493,8	713,5	624,7	98,9
	10 A2 glukóza	5,45	503,5	877,1	442,1	61,2
	10 A2 glycerol	4,17	550,4	879,7	661,8	124,7
	5 A1 glukóza	5,81	71,1	134,8	312,8	19,3
	5 A1 glycerol	4,08	588,7	948,5	781,3	130,6
	5 A2 glukóza	5,87	489,3	898,3	449,8	61,9
	5 A2 glycerol	4,38	555,4	859,3	760,5	113,2
SSh	kontrola - glycerol	9,17	28,1	53,3	244,8	10,2
	kontrola	8,64	413,1	939,6	314,3	130,5
	10 A1 glukóza	9,19	86,0	184,2	259,3	68,9
	10 A1 glycerol	10,11	45,7	129,1	307,4	34,0
	10 A2 glukóza	8,75	104,3	261,6	255,9	79,0
	10 A2 glycerol	9,91	107,9	308,1	287,3	67,1
	5 A1 glukóza	8,67	164,6	436,2	307,2	110,1
	5 A1 glycerol	9,97	34,8	78,9	283,7	24,2
	5 A2 glukóza	8,52	66,9	173,9	259,1	59,0
	5 A2 glycerol	9,74	24,0	61,8	248,6	17,6

**Legenda:** CC1 – *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1, SR – *Sporobolomyces roseus*, SSh – *Sporobolomyces shibatanus*, 5(10)- koncentrácia mutagénu v médiu, A1(A2) – označenie náhodne vybranej kolónie kvasiniek

Ani u kvasiniek *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 či *Sporobolomyces shibatanus* sa nepodarilo vyselektovať také kmene, ktoré by svojimi produkčnými vlastnosťami prevyšovali nemutantné tzv. „wild“ kmene. U kvasinky *Sporobolomyces roseus* síce nedošlo k výraznej nadprodukcii  $\beta$ -karoténu a celkových pigmentov oproti kontrole, avšak pri porovnaní substrátov sa glycerol javí ako vhodná náhrada glukózy, produkčné vlastnosti sú dokonca o niečo vyššie. Pri použití mutagénu v koncentrácii 5 ul/ml média do produkčného média s glycerolom dokonca kvasinka dosiahla navyššiu produkciu ergosterolu, i celkových karotenoidov cca 1mg/g suš v danej sérii kultivácie (tab. 24).

K ďalším experimentom patrila náhodná mutagenéza vybraných kvasinkových kmeňov na vaječných nehydrolyzovaných cestovinách. Tento substrát bol vybraný vďaka predchádzajúcim výsledkom, ktoré potvrdili, že cestovinový substrát dobre vplýva na produkciu karotenoidov. Najskôr bol otestovaný substrát samotný, bez akejkoľvek úpravy hydrolýzou.

**Tab. 25:** Produkčné vlastnosti mutantných kmeňov selektovaných na vaječných nehydrolyzovaných cestovinách

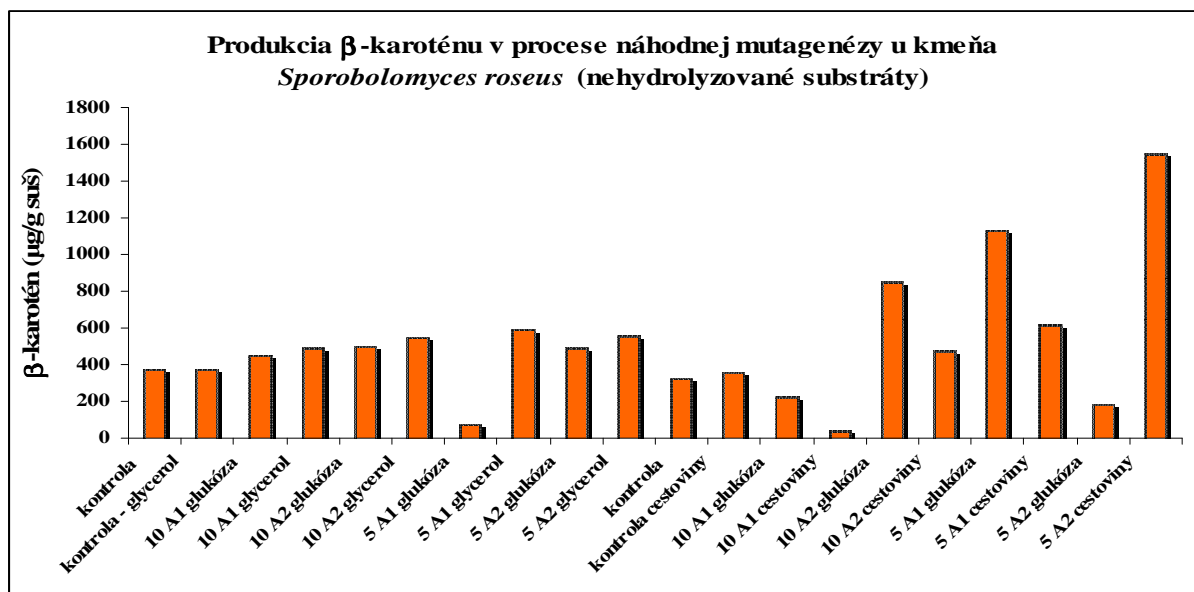
		Sušina (g/l)	$\beta$ -karotén (ug/g suš)	Celkové karotenoidy (ug/g suš)	Ergosterol (ug/g suš)	Koenzým Q (ug/g suš)
RG	kontrola	8,11	172,5	613,3	326,8	44,4
	kontrola cestoviny	6,08	2,5	9,8	328,8	1,2
	10 A1 glukóza	7,35	2,7	8,6	224,9	0,3
	10 A1 cestoviny	5,40	0,3	1,5	67,4	0,0
	10 A2 glukóza	6,58	37,6	103,9	356,8	23,2

	10 A2 cestoviny	5,45	1,4	5,4	245,0	1,0
	5 A1 glukóza	7,42	10,8	33,9	320,1	4,4
	5 A1 cestoviny	6,58	3,3	8,5	194,5	0,4
	5 A2 glukóza	5,76	4,3	7,1	234,8	0,7
	5 A2 cestoviny	6,39	3,0	6,0	112,9	1,1
<b>RM</b>						
(RR)	kontrola	8,36	213,6	422,3	239,9	75,7
	kontrola cestoviny	6,30	14,4	47,1	294,6	8,6
	10 A1 glukóza	6,47	314,3	754,8	411,1	300,3
	10 A1 cestoviny	6,32	22,1	46,8	291,9	11,2
	10 A2 glukóza	7,67	300,7	772,9	388,7	157,8
	10 A2 cestoviny	5,46	5,2	11,0	384,1	1,5
	5 A1 glukóza	9,44	387,1	1046,3	317,4	155,5
	5 A1 cestoviny	5,38	7,9	21,1	375,8	2,8
	5 A2 glukóza	9,44	379,9	1024,2	304,9	132,5
	5 A2 cestoviny	4,25	7,4	18,4	342,3	6,4
<b>CC1</b>						
	kontrola	8,35	2,6	175,1	221,2	159,3
	kontrola cestoviny	5,38	0,9	11,8	198,5	0,5
	10 A1 glukóza	6,29	5,2	27,0	356,8	7,2
	10 A1 cestoviny	3,69	1,1	3,3	196,4	1,0
	10 A2 glukóza	5,59	0,4	25,7	403,8	7,7
	10 A2 cestoviny	4,81	0,2	4,6	313,3	1,7
	5 A1 glukóza	5,21	1,5	23,7	326,6	9,0
	5 A1 cestoviny	4,98	0,3	0,6	171,4	0,3
	5 A2 glukóza	5,53	0,1	12,3	356,1	5,0
	5 A2 cestoviny	8,07	0,1	0,3	105,7	0,2
<b>SR</b>						
	kontrola	5,61	328,3	489,0	287,1	30,0
	kontrola cestoviny	3,86	355,9	546,9	683,6	12,0
	10 A1 glukóza	4,26	226,0	404,1	521,9	48,5
	10 A1 cestoviny	5,52	37,9	64,9	151,2	1,3
	10 A2 glukóza	5,32	847,6	1221,5	367,4	79,9
	10 A2 cestoviny	2,33	477,6	711,3	859,3	7,3
	5 A1 glukóza	4,31	1135,1	1727,0	559,0	106,8
	5 A1 cestoviny	2,69	615,0	921,0	931,3	14,8
	5 A2 glukóza	5,67	184,0	333,4	456,9	11,3
	5 A2 cestoviny	3,58	1552,5	2413,8	617,2	132,1

**Legenda:** RG – *Rhodotorula glutinis*, RM – *Rhodotorula mucilaginosa*, CC1 – *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1, SR – *Sporobolomyces roseus*, 5(10)- koncentrácia mutagénnu v médiu, A1(A2) – označenie náhodne vybranej kolónie kvasiniek

Z výsledkov uvedených v tab. 25 je patrné, že u vybraných mutantných kvasiniek nedošlo k výraznej nadprodukcii biomasy. Môže to byť zapríčinené aj nedostatkom jednoduchých sacharidov v odpadovom substráte. V produkcii  $\beta$ -karoténu a celkových karotenoidov sa kvasinky *Rhodotorula glutinis* a *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 nepreukázali ako nadprodukčné kmene. Dokonca aj sledované lipidické metabolity ako ergosterol a koenzým Q sú produkované v niekoľkonásobne nižších koncentráciách než v nemutantných kontrolných

kmeňov. U kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa (rubra)* boli zvýšené produkcie v médiách, kde boli cestoviny pridané i do inokulácií, avšak produkčné médium už bolo glukózové. Rovnaké produkčné vlastnosti po náhodnej mutagenéze sa u tejto kvasinky vyskytovali aj pri selekcii na glycerole. V prípade kvasinky *Sporobolomyces roseus* je z výsledkov vidieť, že náhodná mutácia alkylačným činidlom EMS o koncentrácii 5 ul/ml viedla k získaniu nadprodukčného kmeňa. Produkcia  $\beta$ -karoténu bola oproti kontrole v tomto prípade 5x vyššia (1,5 mg/g suš), produkcia celkových karotenoidov rovnako 5x vyššia, čo sa týka lipidických látok, tak produkcia ergosterolu je zrovnateľná s kontrolou, avšak produkcia koenzýmu Q bola asi 10x vyššia než u nemutantného kmeňa kultivovaného na cestovinovom substráte. V tejto sérií kultivácii sa vyskytujú ešte ďalšie kmene získané náhodou mutagenézou, ktoré majú zvýšené produkčné vlastnosti oproti nemutantnému kmeňu, avšak výťažky metabolitov boli aj tak nižšie v porovnaní s vyššie spomínaným mutantným kmeňom (tab. 25, obr. 15).



Obr. 15: Produkcia  $\beta$ -karoténu u kvasinky *Sporobolomyces roseus*

Kvasinky rodu *Rhodotorula* sa vyznačujú dobrými produkčnými vlastnosťami, či už vlastnej biomasy alebo metabolitov. Počas experimentov s náhodnou mutagenézou a selekciou nadprodukčných kmeňov sa však tento rod nepreukázal ako dobrý nadproducent. Príčina môže byť či už v samotnom výbere náhodných kolónií, alebo v nevhodnom odpadovom substráte, na ktorom bola selekcia vykonávaná. Z predchádzajúcich experimentov s hydrolyzou odpadových materiálov sa cestoviny zdali byť jedným z vhodných materiálov ku kultiváciám a produkcii žiadaných metabolitov. Ďalšie experimenty sa teda týkali otestovania hydrolyzovaných cestovín ako vhodného substrátu pre náhodnú mutagenézu s cieľom získať nadprodukčné kvasinkové kmene.

Tab. 26: Produkčné vlastnosti mutantných kmeňov selektovaných na hydrolyzovaných cestovinách s enzýmami z plesní *Fusarium solani* a *Phanerochaete chrysosporium*

	Sušina (g/l)	$\beta$ -karotén (ug/g suš)	Celkové karotenoidy (ug/g suš)	Ergosterol (ug/g suš)	Koenzým Q (ug/g suš)
RG kontrola	5,98	147,3	602,5	311,5	45,6

	kontrola cestoviny FS	7,06	14,9	31,3	305,0	1,3
	kontrola cestovinyPCH	6,10	7,6	23,7	381,2	2,5
	10 A1 glukóza FS	8,17	313,1	1237,3	317,3	81,5
	10 A1 cestoviny FS	5,71	11,4	41,0	428,5	3,6
	10 A2 glukóza FS	8,36	232,0	1080,7	309,0	78,7
	10 A2 cestoviny FS	5,48	2,3	17,7	368,3	2,8
	15 A1 glukóza FS	8,95	85,9	313,3	222,8	31,1
	15 A1 cestoviny FS	7,78	5,5	25,9	255,1	2,4
	15 A2 glukóza FS	8,97	195,3	697,9	319,9	70,4
	15 A2 cestoviny FS	7,56	6,5	16,0	344,7	1,3
	10 A1 glukóza PCH	8,21	259,3	869,4	264,3	83,9
	10 A1 cestoviny PCH	7,97	7,4	17,0	340,2	1,9
	10 A2 glukóza PCH	11,61	59,5	140,5	170,1	40,3
	10 A2 cestoviny PCH	6,75	10,4	30,6	431,1	2,1
	15 A1 glukóza PCH	8,86	103,7	673,2	282,8	45,3
	15 A1 cestoviny PCH	6,39	5,5	20,1	373,0	1,2
	15 A2 glukóza PCH	8,55	173,0	711,0	273,7	57,3
	15 A2 cestoviny PCH	6,40	10,3	36,7	365,6	1,7
RM (RR)	kontrola	8,46	218,1	567,5	2962,2	143,0
	kontrola cestoviny FS	6,33	5,4	13,3	288,3	2,1
	kontrola cestovinyPCH	6,59	34,0	62,1	388,0	8,9
	10 A1 glukóza FS	8,62	199,3	552,0	278,2	153,2
	10 A1 cestoviny FS	7,08	2,7	7,0	238,8	1,5
	10 A2 glukóza FS	5,86	239,9	944,8	358,0	213,4
	10 A2 cestoviny FS	5,44	4,1	11,7	337,6	1,4
	15 A1 glukóza FS	6,80	129,5	862,6	372,8	111,1
	15 A1 cestoviny FS	6,26	7,2	22,6	362,3	7,3
	15 A2 glukóza FS	6,47	177,9	1483,0	380,6	154,7
	15 A2 cestoviny FS	6,04	3,4	13,8	301,9	1,7
	10 A1 glukóza PCH	7,29	76,9	209,1	283,4	56,3
	10 A1 cestoviny PCH	9,18	17,7	37,3	232,5	2,5
	10 A2 glukóza PCH	7,97	75,8	506,6	318,8	61,2
	10 A2 cestoviny PCH	7,10	66,1	108,5	282,5	29,3
	15 A1 glukóza PCH	8,23	118,2	719,9	291,6	36,5
	15 A1 cestoviny PCH	6,24	4,9	19,7	387,6	1,4
	15 A2 glukóza PCH	8,44	139,0	333,6	275,1	97,1
	15 A2 cestoviny PCH	6,63	30,3	56,2	338,6	5,9

Legenda: RG – *Rhodotorula glutinis*, RM – *Rhodotorula mucilaginosa*, FS – *Fusarium solani*, PCH – *Phanerochaete chrysosporium*, 15(10)- koncentrácia mutagénnu v médiu, A1(A2) – označenie náhodne vybranej kolónie kvasiniek

Z výsledkov uvedených v tab. 26 je patrné, že mierny nárast biomasy,  $\beta$ -karoténu i koenzýmu Q sa vyskytoval u oboch kvasiniek rodu *Rhodotorula* pri mutagenéze na hydrolyzovaných cestovinách, kde však produkčné médiá obsahovali glukózu. Tento efekt mutantných

kvasiniek tohto rodu sa vyskytuje zatiaľ u všetkých testovaných odpadných materiálov. V médiách, kde cestoviny boli hydrolyzované enzymatickým preparátom z plesne *Fusarium solani* došlo prevažne k väčšej produkcii metabolitov ako to bolo v médiách hydrolyzovaných s enzýmami z plesne *Phanerochaete chrysosporium*. Napriek tomu však najvyššia produkcia biomasy 11,6 g/l bola u kvasinky *Rhodotorula glutinis* a 9,18 g/l u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa (rubra)* v médiách s hydrolyzou cestovín enzymovým preparátom PCH.

**Tab. 27:** Produkčné vlastnosti mutantných kmeňov selektovaných na hydrolyzovaných cestovinách s enzýmami z plesní *Fusarium solani* a *Phanerochaete chrysosporium*

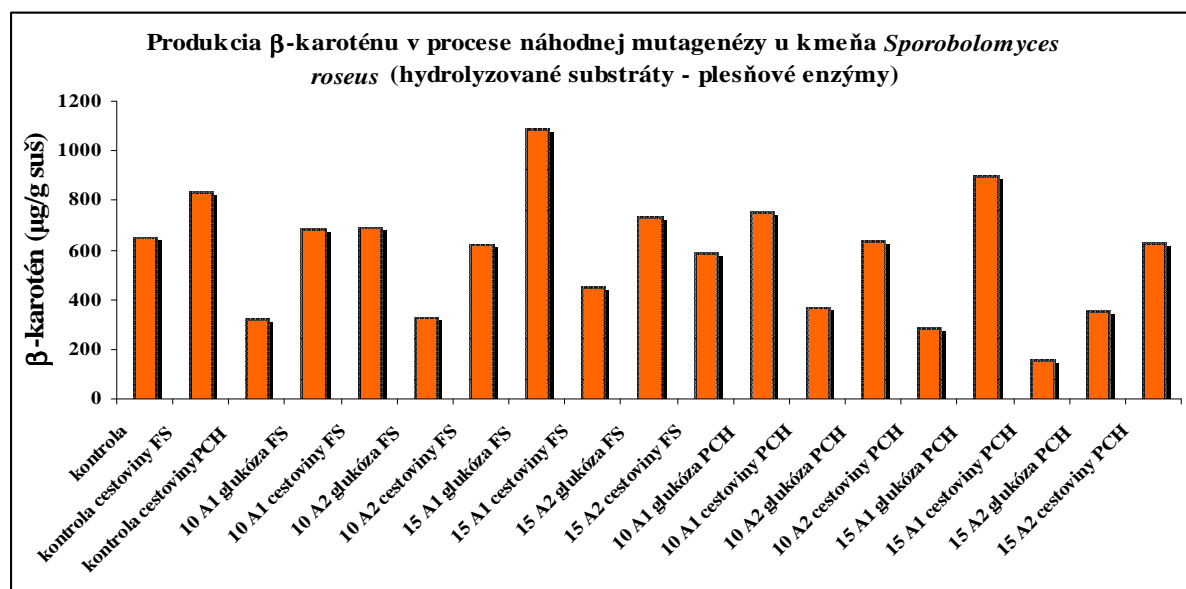
		Sušina (g/l)	β- karotén (ug/g suš)	Celkové karotenoidy (ug/g suš)	Ergosterol (ug/g suš)	Koenzým Q (ug/g suš)
CC1	kontrola	8,51	6,7	319,2	303,5	65,5
	kontrola cestoviny FS	5,91	2,2	62,5	206,3	9,6
	kontrola cestovinyPCH	5,04	16,4	81,6	348,2	3,4
	10 A1 glukóza FS	9,10	4,1	460,7	234,3	86,0
	10 A1 cestoviny FS	6,18	1,0	26,4	315,6	5,5
	10 A2 glukóza FS	8,45	8,7	341,2	252,2	59,6
	10 A2 cestoviny FS	5,56	12,4	43,3	221,1	3,8
	15 A1 glukóza FS	8,72	1,3	315,1	287,4	61,6
	15 A1 cestoviny FS	6,28	1,2	25,7	371,1	5,1
	15 A2 glukóza FS	8,25	0,8	317,9	315,2	46,0
	15 A2 cestoviny FS	5,41	0,5	31,7	451,9	5,7
	10 A1 glukóza PCH	6,30	6,6	423,3	309,5	98,0
	10 A1 cestoviny PCH	8,22	9,1	26,0	280,9	3,9
	10 A2 glukóza PCH	5,39	11,8	488,2	338,4	129,3
	10 A2 cestoviny PCH	3,15	16,4	471,4	455,0	157,4
	15 A1 glukóza PCH	10,22	2,5	172,7	219,7	33,7
	15 A1 cestoviny PCH	4,76	0,4	2,7	395,0	2,6
15 A2 glukóza PCH	7,91	6,	197,5	273,2	40,7	
15 A2 cestoviny PCH	5,66	0,2	93,8	345,6	3,9	
SR	kontrola	5,15	649,5	1057,6	541,5	36,5
	kontrola cestoviny FS	2,78	839,6	1173,5	996,0	9,4
	kontrola cestovinyPCH	4,11	323,0	479,7	667,0	11,6
	10 A1 glukóza FS	4,36	683,1	1002,1	601,8	47,4
	10 A1 cestoviny FS	2,88	691,8	1013,5	913,3	10,3
	10 A2 glukóza FS	4,30	328,5	576,1	494,4	23,3
	10 A2 cestoviny FS	2,62	626,6	861,4	1130,3	13,0
	15 A1 glukóza FS	5,28	1086,9	1888,5	623,9	60,1
	15 A1 cestoviny FS	3,78	455,6	628,0	728,3	8,6
	15 A2 glukóza FS	3,83	732,4	1238,2	725,7	50,7
	15 A2 cestoviny FS	2,47	592,2	862,6	1052,0	9,2
	10 A1 glukóza PCH	4,09	753,3	1164,9	708,1	110,9

10 A1 cestoviny PCH	4,57	369,3	551,3	573,2	12,8
10 A2 glukóza PCH	5,21	639,3	1049,4	502,4	74,7
10 A2 cestoviny PCH	3,68	289,5	450,6	660,1	6,8
15 A1 glukóza PCH	5,39	897,8	1462,7	502,0	100,4
15 A1 cestoviny PCH	3,90	159,2	245,6	604,7	4,6
15 A2 glukóza PCH	5,15	355,5	586,8	439,8	56,0
15 A2 cestoviny PCH	3,48	628,3	874,7	824,6	14,1

**Legenda:** CC1 – *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1, SR – *Sporobolomyces roseus*, FS – *Fusarium solani*, PCH – *Phanerochaete chrysosporium*, 15(10)- koncentrácia mutagénnu v médiu, A1(A2) – označenie náhodne vybranej kolónie kvasiniek

V porovnaní produkcie  $\beta$ -karoténu u selektovaných kmeňov kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 vidieť výrazný pokles (tab. 27). U daných mutantných kmeňov môžeme nájsť však vyššie produkcie celkových karotenoidov. Zvýšené produkcie karoteinov, i lipidových látok sa nachádzajú u mutantného kmeňa na cestovinovom médiu hydrolyzovanom s enzýmovým preparátom z plesne *Phanerochaete chrysosporium*.

Hydrolyzované cestoviny boli najlepšie využívané opäť kvasinkovým kmeňom *Sporobolomyces roseus* (tab. 27, obr. 16). U tohto kmeňa došlo k získaniu nadprodukčného mutanta, u ktorého boli dosiahnuté najvyššie produkcie  $\beta$ -karoténu (1,1 mg/g suš), ergosterolu (1,1 mg/g sušiny), karotenoidov (1,9 mg/g sušiny) a koenzýmu Q (111  $\mu$ g/g sušiny). Vyššiu produkciu vykazovali mutantné kmene predovšetkým v produkčných médiách s obsahom glukózy, ale taktiež u cestovinových médií došlo k nárastu množstva metabolitov s prídavkom oboch enzymatických preparátov.



**Obr. 16:** Produkcia  $\beta$ -karoténu u kvasinky *Sporobolomyces roseus*

Všeobecne možno konštatovať, že po hydrolyze cestovín ako odpadového substrátu do kultivačných médií došlo ku zvýšenej produkcii jednotlivých metabolitov kvasiniek i samotnej biomasy, než v prítomnosti nehydrolyzovaných cestovín z predchádzajúcich sérií experimentov. Týmto môžeme potvrdiť fakt, že hydrolytické enzýmy v jednotlivých médiách

rozkladajú polysacharidy z komplexných substrátov, a tým sa tieto materiály stávajú lepšie využiteľné kvasinkovým bunkám.

Pre ďalšie testovanie selekcie mutantných nadprodukčných kmeňov boli využité odpadové substráty cestoviny a ryža (tab. 21, 22), ktoré sa v predchádzajúcich experimentoch s hydrolyzou javili ako potenciálne vhodné a zároveň lacné substráty pre mikrobiálnu produkciu karotenoidov. Vybrané substráty boli hydrolyzované komerčnými enzymatickými preparátmi AMG a Novozyme 188, ktoré poskytovali najlepšiu hydrolyzu komplexných sacharidov na jednoduché monosacharidy. Výsledky z dvoch paralelných kultivácií mutantných kmeňov selektovaných na odpadných substrátoch hydrolyzovaných komerčnými enzýmami sú uvedené nižšie v tabuľkách (odkaz tab. 28, 29).

**Tab. 28:** Produkčné vlastnosti mutantných kmeňov selektovaných na hydrolyzovaných cestovinách s komerčnými enzýmami AMG a Novozyme 188

		Sušina (g/l)	$\beta$ - karotén (ug/g suš)	Celkové karotenoidy (ug/g suš)	Ergosterol (ug/g suš)	Koenzým Q (ug/g suš)
RG	kontrola	5,59	105,6	544,5	350,0	47,6
	kontrola cestoviny AMG	3,11	16,5	70,5	359,4	20,6
	kontrola cestovinyNovo	4,15	121,0	412,8	548,4	52,9
	10 A1 glukóza AMG	3,92	19,6	168,3	464,0	78,7
	10 A1 cestoviny AMG	2,23	57,0	467,6	883,6	141,2
	10 A2 glukóza AMG	4,51	14,0	116,6	402,8	51,5
	10 A2 cestoviny AMG	1,16	6,8	98,3	119,1	63,3
	5 A1 glukóza AMG	8,70	144,6	442,8	233,7	64,4
	5 A1 cestoviny AMG	3,48	34,2	92,8	444,6	42,3
	5 A2 glukóza AMG	5,33	52,7	348,8	368,0	22,3
	5 A2 cestoviny AMG	1,65	59,6	206,3	1011,3	56,5
	10 A1 glukóza Novo	7,41	207,0	468,5	319,1	199,9
	10 A1 cestoviny Novo	7,12	136,2	267,1	269,9	138,7
	10 A2 glukóza Novo	5,45	39,6	419,4	361,2	56,2
	10 A2 cestoviny Novo	5,10	13,7	155,4	361,9	45,8
	5 A1 glukóza Novo	3,08	302,5	875,0	620,2	76,9
	5 A1 cestoviny Novo	5,45	484,5	636,7	257,6	34,7
	5 A2 glukóza Novo	7,77	119,1	336,5	237,1	26,3
5 A2 cestoviny Novo	4,33	79,9	160,2	411,4	25,2	
CC1	kontrola	7,24	2,9	66,4	210,0	31,1
	kontrola cestoviny AMG	5,49	3,0	93,3	286,5	46,3
	kontrola cestovinyNovo	8,09	15,2	68,7	234,8	13,7
	10 A1 glukóza AMG	7,85	3,4	169,4	235,1	42,8
	10 A1 cestoviny AMG	2,18	0,7	74,4	533,0	31,4
	10 A2 glukóza AMG	5,96	5,7	98,7	255,1	40,3

	10 A2 cestoviny AMG	1,97	4,6	98,8	519,3	40,6
	5 A1 glukóza AMG	6,79	2,5	108,9	223,0	42,3
	5 A1 cestoviny AMG	2,69	5,7	121,2	535,8	44,4
	5 A2 glukóza AMG	5,43	107,6	246,6	310,9	105,5
	5 A2 cestoviny AMG	5,47	36,5	154,7	293,6	22,4
	10 A1 glukóza Novo	9,11	4,9	255,4	220,6	88,0
	10 A1 cestoviny Novo	2,25	12,0	146,2	643,7	34,9
	10 A2 glukóza Novo	9,01	3,4	181,7	178,2	47,0
	10 A2 cestoviny Novo	3,33	2,3	109,1	480,3	27,4
	5 A1 glukóza Novo	9,25	2,3	138,3	167,7	38,7
	5 A1 cestoviny Novo	7,44	1,8	22,1	213,7	13,5
	5 A2 glukóza Novo	9,53	2,3	126,8	185,4	29,7
	5 A2 cestoviny Novo	7,37	2,2	31,2	163,2	8,4
SR	kontrola	3,97	325,3	533,5	442,1	19,0
	kontrola cestoviny AMG	5,43	677,5	1015,2	372,7	47,6
	kontrola cestoviny Novo	6,49	335,1	474,3	316,8	16,1
	10 A1 glukóza AMG	7,30	399,7	523,1	278,7	34,8
	10 A1 cestoviny AMG	4,29	512,6	560,6	340,8	52,1
	10 A2 glukóza AMG	7,87	377,9	587,0	292,0	38,3
	10 A2 cestoviny AMG	5,99	394,4	549,2	265,0	60,8
	5 A1 glukóza AMG	7,42	380,1	522,0	245,7	59,5
	5 A1 cestoviny AMG	6,37	377,6	565,8	312,5	33,9
	5 A2 glukóza AMG	5,85	231,2	334,3	247,0	19,9
	5 A2 cestoviny AMG	6,60	594,2	828,0	329,6	41,4
	10 A1 glukóza Novo	4,67	806,9	1266,2	418,5	152,9
	10 A1 cestoviny Novo	8,71	391,7	607,2	196,3	79,0
	10 A2 glukóza Novo	7,49	515,1	703,5	236,6	77,1
	10 A2 cestoviny Novo	7,25	413,3	610,8	242,1	54,1
	5 A1 glukóza Novo	6,59	483,8	693,3	339,1	60,8
	5 A1 cestoviny Novo	6,75	413,3	565,9	316,3	26,0
	5 A2 glukóza Novo	6,04	514,6	796,5	305,0	57,9
	5 A2 cestoviny Novo	7,19	208,1	335,1	208,9	34,4

Legenda: RG- *Rhodotorula glutinis*, CC1 – *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1, SR – *Sporobolomyces roseus*, AMG – komerčný enzým AMG, Novo – komerčný enzým Novozym 188, 5(10)- koncentrácia mutagénnu v médiu, A1(A2) – označenie náhodne vybranej kolónie kvasiniek

Podobne ako tomu bolo v predchádzajúcich kultiváciách pri sledovaní vplyvu mutagénnu a následnej selekcii mutantov, u kvasinky *Rhodotorula glutinis* sa jednotlivé mutantné kmene líšia od kontrolných kultivácií (tab. 28). Jednoznačne nadproducent žiadaných metabolitov sa nezískal ani v tejto sérii kultivácii. Mierne zvýšené produkcie  $\beta$ -karoténu, celkových karotenoidov i lipidických látok nájdeme však na hydrolyzovaných médiách s komerčným enzýmovým preparátom Novozym 188.

Produkcie biomasy u mutantných kvasiniek kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 výrazne kolísala, v niektorých prípadoch bol pokles až o 70% v porovnaní s kontrolným

kmeňom. Čo sa týka produkcie  $\beta$ -karoténu a celkových pigmentov, mutantný kmeň selektovaný prídavkom 5ul/ml EMS do cestovinového média hydrolyzovaného s AMG preparátom, vykazoval zvýšené produkcie v porovnaní s ostatnými kmeňmi. Z pomeru produkcie  $\beta$ -karoténu a celkových karotenoidov je vidieť, že u danej kvasinky sú produkované prevažne iné typy pigmentov, a to hlavne torulén a torularhodín.

U mutantných kvasiniek kmeňa *Sporobolomyces roseus* bol prvýkrát sledovaný častý nárast biomasy oproti kontrolným médiám. Množstvá vyprodukovaného  $\beta$ -karoténu i celkových karotenoidov boli zvýšené hlavne v médiách s cestovinovým substrátom hydrolyzovaným komerčným preparátom Novozym 188. Hodnoty v niektorých prípadoch boli až trojnásobne vyššie, pri produkcii ergosterolu a koenzýmu Q nájdeme až takmer 10- násobné zvýšenie produkcie oproti kontrolám.

**Tab. 29:** Produkčné vlastnosti mutantných kmeňov selektovaných na hydrolyzovanej rýži s komerčnými enzýmami AMG a Novozym 188

		Sušina (g/l)	$\beta$ - karotén (ug/g suš)	Celkové karotenoidy (ug/g suš)	Ergosterol (ug/g suš)	Koenzým Q (ug/g suš)
RG	kontrola	10,05	108,9	349,4	215,0	43,8
	kontrola ryža AMG	7,49	11,3	25,9	113,9	11,1
	kontrola ryža Novo	8,83	58,9	179,5	275,9	24,9
	10 A1 glukóza AMG	7,24	194,1	756,7	275,8	80,4
	10 A1 ryža AMG	7,80	65,1	206,1	213,9	45,3
	10 A2 glukóza AMG	8,18	130,0	427,6	225,5	57,3
	10 A2 ryža AMG	9,14	58,5	164,7	194,9	27,5
	5 A1 glukóza AMG	9,02	155,1	392,8	186,8	53,3
	5 A1 ryža AMG	9,61	86,0	224,3	200,9	28,4
	5 A2 glukóza AMG	8,48	148,7	547,7	233,6	58,7
	5 A2 ryža AMG	7,95	37,9	110,8	189,1	16,5
	10 A1 glukóza Novo	8,11	151,7	407,4	206,6	64,7
	10 A1 ryža Novo	11,78	22,9	57,4	169,0	9,9
	10 A2 glukóza Novo	12,07	58,7	226,4	142,3	15,8
	10 A2 ryža Novo	8,68	107,0	316,1	225,3	30,5
	5 A1 glukóza Novo	14,51	77,0	180,9	119,9	17,0
	5 A1 rža Novo	8,96	177,9	417,6	281,7	40,5
5 A2 glukóza Novo	8,68	208,1	741,7	272,7	88,4	
5 A2 ryža Novo	8,64	84,6	261,7	234,0	31,5	
CC1	kontrola	6,80	4,8	135,4	249,1	33,0
	kontrola ryža AMG	7,62	1,1	186,2	265,0	50,8
	kontrola ryža Novo	6,21	9,0	131,9	227,7	27,2
	10 A1 glukóza AMG	7,62	10,9	117,3	195,3	34,8
	10 A1 ryža AMG	5,20	3,9	216,4	228,0	25,0
	10 A2 glukóza AMG	8,74	3,8	251,1	185,8	32,1
	10 A2 ryža AMG	7,89	1,1	82,9	176,1	25,0
	5 A1 glukóza AMG	9,12	15,6	260,2	206,0	65,3
	5 A1 ryža AMG	8,29	22,4	139,2	194,5	26,0
	5 A2 glukóza AMG	6,42	5,9	115,1	229,6	29,4

	5 A2 ryža AMG	7,40	7,5	206,6	252,8	44,8
	10 A1 glukóza Novo	7,27	0,6	45,9	141,3	11,8
	10 A1 ryža Novo	5,61	1,6	25,2	74,1	4,8
	10 A2 glukóza Novo	9,82	5,7	74,3	150,0	34,3
	10 A2 ryža Novo	7,67	7,2	182,6	220,7	53,7
	5 A1 glukóza Novo	8,05	4,8	96,4	202,5	34,6
	5 A1 ryža Novo	6,45	2,4	32,7	108,5	8,6
	5 A2 glukóza Novo	8,06	0,6	9,2	141,9	14,4
	5 A2 ryža Novo	7,93	3,2	104,4	206,8	35,3
SR	kontrola	3,47	589,7	869,4	552,0	53,4
	kontrola ryža AMG	5,09	188,6	283,7	267,5	30,9
	kontrola ryža Novo	4,91	539,3	812,3	383,2	81,7
	10 A1 glukóza AMG	4,50	648,5	963,5	384,7	63,6
	10 A1 ryža AMG	4,44	345,4	575,7	351,0	59,0
	10 A2 glukóza AMG	4,53	210,5	382,4	358,6	26,0
	10 A2 ryža AMG	5,72	249,0	536,0	347,6	35,0
	5 A1 glukóza AMG	7,43	440,4	717,7	307,0	29,5
	5 A1 ryža AMG	5,65	246,3	413,8	281,0	43,1
	5 A2 glukóza AMG	6,57	440,0	723,9	257,4	59,2
	5 A2 ryža AMG	5,61	323,4	525,8	318,3	47,1
	10 A1 glukóza Novo	6,24	553,5	999,9	269,5	67,1
	10 A1 ryža Novo	4,77	281,9	448,1	313,5	56,3
	10 A2 glukóza Novo	5,36	462,3	727,5	350,8	60,3
	10 A2 ryža Novo	5,22	460,7	737,3	295,1	62,6
	5 A1 glukóza Novo	7,69	254,9	461,5	225,3	21,4
	5 A1 ryža Novo	5,14	255,3	388,8	340,6	36,8
	5 A2 glukóza Novo	4,96	134,3	259,7	405,8	28,7
	5 A2 ryža Novo	6,28	179,4	321,6	362,8	43,1

Legenda: RG- *Rhodotorula glutinis*, CC1 – *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1, SR – *Sporobolomyces roseus*, AMG – komerčný enzým AMG, Novo – komerčný enzým Novozym 188, 5(10)- koncentrácia mutagénnu v médiu, A1(A2) – označenie náhodne vybranej kolónie kvasiniek

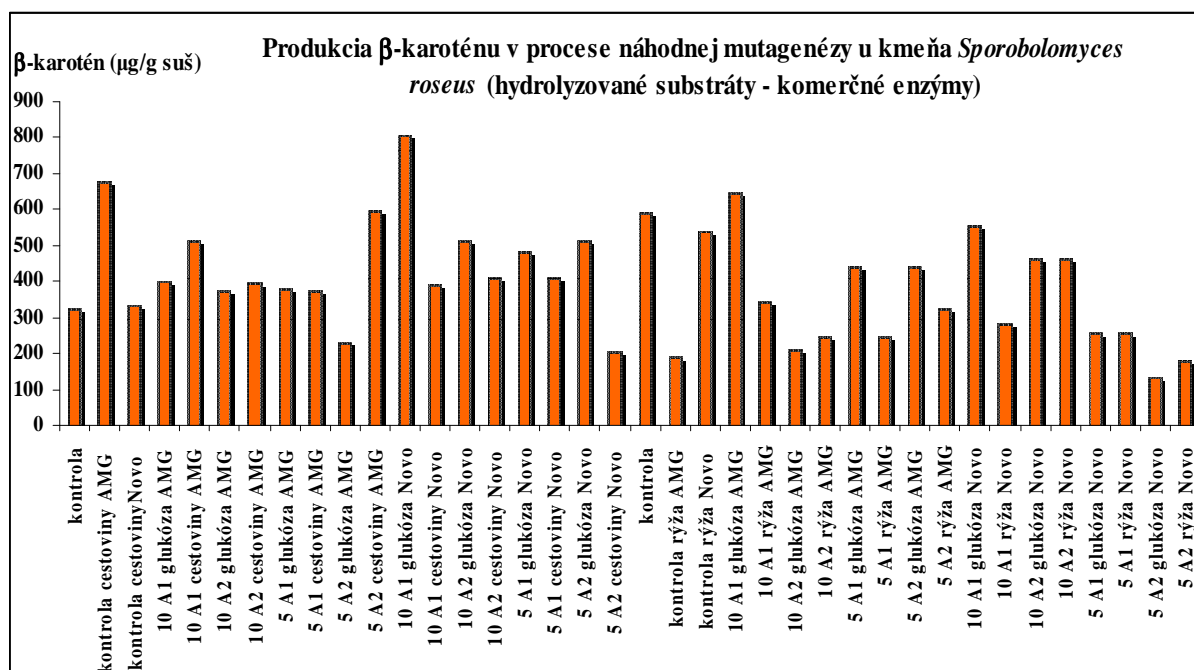
Produkcia biomasy mutantných kmeňov selektovaných na ryžovom odpadovom materiále bola u všetkých využitých kvasinkových rodov pomerne vyrovnaná s kontrolnými kultiváciami, v niekoľkých prípadoch dokonca bola produkcia zvýšená (tab. 29). Výber komerčného enzýmového preparátu k hydrolýze rýže a následnej produkcii biomasy nemal veľký vplyv.

V produkcii  $\beta$ -karoténu a celkových karotenoidov mali mutantné kvasinky kmeňa *Rhodotorula glutinis* často nadprodukcijné schopnosti v porovnaní s kontrolnými kultiváciami. Kvasinkový mutant na rýži hydrolyzovanej AMG preparátom zvýšil produkciu  $\beta$ -karoténu až 8-násobne v porovnaní s kontrolou na rýži. V produkcii ergosterolu a koenzýmu Q nepozorujeme výrazné nadprodukcie, produkcie sú viacmenej porovnateľné, v niektorých prípadoch mierne zvýšené v porovnaní s kontrolnými kultiváciami.

Kvasinka *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 v porovnaní s ostatnými kvasinkovými kmeňmi produkuje najnižšie množstvá  $\beta$ -karoténu. Táto kvasinka je však schopná kvalitných produkcií ostatných karotenových pigmentov, ku ktorým napríklad patrí torulén, torularhodín,

či lykopen (Herz et al. 2007). Najvyššie pozorovateľné množstvá celkových karotenoidov boli vyprodukované u mutantných kmeňov v prítomnosti rýžového substrátu hydrolyzovaného enzýmovým preparátom AMG. Produkcie boli niekoľkokrát vyššie než u nemutantného kmeňa. Produkcie ergosterolu obvykle neprevyšovali kontrolné kultivácie.

Kvasinka *Sporobolomyces roseus* vykazuje najvyššie produkcie  $\beta$ -karoténu a celkových karotenoidov spomedzi všetkých testovaných kmeňov (tab. 29, obr. 17). Zvýšené produkcie pigmentov sa vyskytli u viacerých mutantných kmeňov selektovaných na rýžových substrátoch, ale výrazný nadproducent v tejto sérii kultivácií sa nenachádza. Čo sa týka produkcie vybraných lipidických látok – ergosterolu a koenzýmu Q, najvyššie produkcie vykazujú kultivácie nemutantného kmeňa. Zdá sa, že u selektovaných mutantných kmeňov, má alkylačné činidlo EMS viacmenej účinok na indukciu  $\beta$ -karoténu a celkových karotenoidov, než na vyššie produkcie sledovaných lipidických látok, či samotnej biomasy.



**Obr. 17:** Produkcia  $\beta$ -karoténu u kvasinky *Sporobolomyces roseus*

Zo získaných výsledkov náhodnej mutagenézy kvasinkových kmeňov na rôznych typoch odpadových materiálov bolo zistené, že najlepšie produkčné vlastnosti dosahovali mutantné kmene kvasinky *Sporobolomyces roseus*. Klasický nemutantný kmeň má už sám o sebe obvykle vysoké produkčné vlastnosti, avšak produkcia biomasy je v porovnaní s ostatnými kmeňmi červených kvasiniek vždy niekoľkokrát nižšia. V mutačných experimentoch boli získané nové kmene s ešte vyššími produkciami  $\beta$ -karoténu, celkových karotenoidov i sledovaných lipidických látok. V niektorých prípadoch sa dosiahla aj zvýšená produkcia biomasy i u kmeňa *Sporobolomyces roseus*.

Využitie náhodnej mutagenézy v správnej kombinácii odpadových materiálov, prípadne nejakým spôsobom modifikovaných odpadových materiálov a vhodných kvasinkových kmeňov, môže v budúcnosti viesť k tvorbe takých mutantných kmeňov, ktoré budú mať vysoké nadprodukčné schopnosti využívané v priemyselnej výrobe. Mutagenéza je však proces, umožňujúci vývoj a selekciu nových kmeňov, ktorý je rozsahom práce a časovo

náročný. Vzhľadom k tomuto faktu, už ďalšie experimenty v rámci predloženej práce už nemohli byť zaradené.

### 9.1.6 Kultivácia karotenogénnych kvasiniek na lignocelulóзовých odpadoch

Množstvo prác, včetně tejto práce, sa zaoberá štúdiom produkcie karotenoidov s využitím lacných priemyselných medziproduktov, či odpadných materiálov ako nutričných zdrojov ku kultiváciám (Frengová 2009, Buzzini 2000, Márová et al. 2010). Cieľom ďalšej časti predloženej práce je štúdium lignocelulóзовých materiálov, ktoré sú hydrotermicky hydrolyzované, ako alternatívneho zdroja uhlíka k produkcii karotenoidov a sledovaných lipidických látok. Lignocelulóзовé materiály sú v súčasnosti hodne využívaným materiálom hlavne k produkcii biopalív (bioetanolu) či bioenergie. Experimenty, ktoré boli uskutočnené počas zahraničnej stáže na Univerzite v Lunde Švédsku, sa pokúsili o iné, nové využitie týchto materiálov, a to k produkcii karotenoidov, či obohatenej kvasinkovej biomasy.

Lignocelulóзовé materiály obsahujú prevažne celulózu, hemicelulózu a lignín. Tieto súčasti nie sú priamo fermentovateľné mikroorganizmami, a preto bola pred kultiváciou zavedená hydrolyza materiálu s využitím vysokej teploty a tlaku. Počas tohto kroku predúpravy materiálu sa však formujú rôzne inhibičné látky, ktoré vplývajú na metabolizmus mikroorganizmov. Medzi hlavné inhibítory patrí furfural, 5-hydroxymetylfurfural a kyselina octová (Almeida 2007). Tieto látky majú veľký vplyv na rast kvasiniek, tým pádom zabraňujú nami študovaným kmeňom dosiahnuť stacionárnu fázu, kde sú vo vysokej miere produkované žiadané metabolity. V uskutočnenom testovaní boli prevedené aj rastové charakteristiky na samotných cukroch, ktoré sa vyskytujú v originálnom hydrolyzáte, rovnako ako na umelom hydrolyzáte, ktorý bol vytvorený podľa zloženia originálu. Ďalej boli testované hlavné inhibítory pridaním do kultivačného média za účelom zistenia, ktorá látka má najväčší vplyv na rast kvasiniek. Po jej prípadnom odstránení z hydrolyzátu by sa využitie lignocelulóзовých materiálov mohlo rozšíriť aj na mikrobiálnu produkciu významných metabolitov s nízkymi priemyselnými nákladmi na prevádzku.

Ako lignocelulóзовý materiál bolo použité borovicové odpadné drevo. Drevo bolo naštiepené na malé kúsky, ktoré boli upravené hydrotermickou úpravou (Palmqvist 1996). Vznikol materiál pozostávajúci z dvoch častí – z nerozpustnej frakcie a tekutej frakcie, tzv. hydrolyzátu. Zloženie jednotlivých frakcií je uvedené v tabuľke. Ku kultiváciám karotenogénnych kvasiniek sa využívala tekutá frakcia – hydrolyzát.

**Tab. 30:** Zloženie borovicového materiálu po hydrotermickej úprave

Obsah v pevnej frakcii (% sušiny)		Obsah tekutej frakcie (g/l)	
Glukan	47	Glukóza	40
Manan	2,2	Manóza	22
Xylan	0	Xylóza	9
Lignín	53,9	Furfural	3,7
		5-HMF	4,2
		Kyselina octová	3,9

## Kultivácia na borovicovom hydrolyzáte

Cieľom experimentov bolo zistiť možnosti využitia borovicového materiálu ako zdroja uhlíka pre produkciu karotenoidov či obohatenej kvasinkovej biomasy. Kultivačné médiá obsahovali rôzny pomer tekutej frakcie – hydrolyzátu a glukózy. Kultivácie boli prevedené v dvoch sériách, kde séria A prebiehala cez klasickú dvojkrovú inokuláciu s glukózovým médiom s obsahom kvasničného autolyzátu a séria B bola tzv. adaptačná séria na hydrolyzát. V druhom inokulačnom médiu bola časť glukózy nahradená hydrolyzátom. Kultivácie prebiehali 80 hodín s kvasinkovými kmeňmi *Rhodotorula aurantiaca* a *Sporobolomyces shibatanus* (kap. 8.2.7). Výsledky sú uvedené v tabuľke 31 ako priemerná hodnota z dvoch paralelných kultivácií.

**Tab. 31:** Produkcia biomasy a sledovaných metabolitov na borovicovom hydrolyzáte

	Sušina (g/l)	$\beta$ -karotén (ug/g suš)	Celkové karotenoidy (ug/g suš)	Ergosterol (ug/g suš)
RA kontrola A	7,46	231,2	711,1	606,2
RA kontrola B	8,02	206,5	761,0	458,1
RA 100 % H A	3,77	182,5	684,8	778,6
RA 100 % H B	3,20	103,9	391,9	815,7
RA 75 % H A	5,05	317,7	1778,9	691,9
RA 75 % H B	4,81	168,9	1096,2	624,4
RA 50 % H A	6,18	251,5	992,5	534,6
RA 50 % H B	5,59	127,8	600,7	533,1
RA 25 % H A	7,70	196,2	790,7	497,0
RA 25 % H B	7,06	138,9	420,3	487,6
SSh kontrola A	6,04	87,9	402,3	498,6
SSh kontrola B	6,46	13,8	370,9	537,7
SSh 100 % H A	2,77	39,9	132,0	952,7
SSh 100 % H B	2,51	37,8	130,9	734,7
SSh 75 % H A	3,32	32,0	176,9	743,2
SSh 75 % H B	3,41	55,4	195,6	812,7
SSh 50 % H A	3,83	73,8	318,4	840,8
SSh 50 % H B	4,10	52,5	292,3	723,5
SSh 25 % H A	5,47	146,1	402,0	508,9
SSh 25 % H B	4,73	168,3	890,0	780,9

Legenda: RA – *Rhodotorula aurantiaca*, SSh – *Sporobolomyces shibatanus*, A- seria kultivačných médií A, B – séria kultivačných médií B, H – hydrolyzát

V porovnaní s kontrolným médiom, produkcia biomasy bola nižšia u oboch kvasinkových kmeňov po prídavku hydrolyzátu do kultivačného média. Hydrolyzát pravdepodobne obsahuje také inhibičné látky, ktoré majú negatívny vplyv na rast buniek. V médiách, kde bol uhlíkatý zdroj plne nahradený hydrolyzátom, bola produkcia biomasy o 50% nižšia než v kontrolnom médiu. Adaptačný krok série B viedol k nižšej produkcii biomasy než v sérii A. Výnimkami sú kontrolné médiá série B, kde prídavok hydrolyzátu do inokulačných médií viedol k zvýšeniu množstva biomasy. U kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* v médiu s 25% obsahom hydrolyzátu bola produkcia biomasy porovnateľná s kontrolným médiom. Produkcia

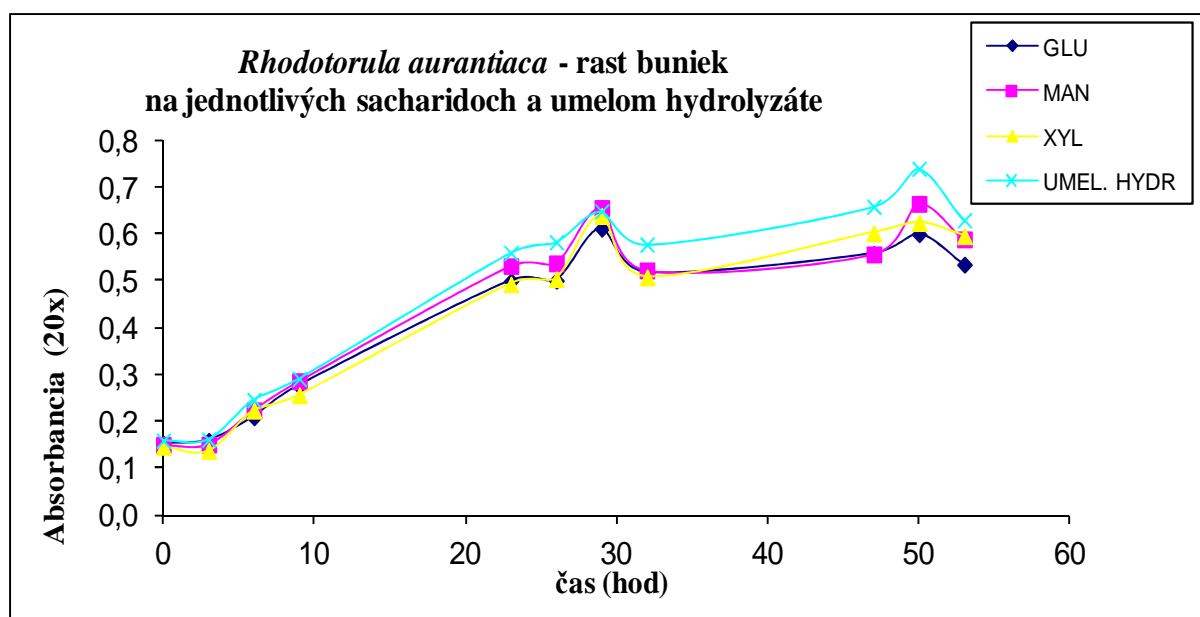
biomasy u *Sporobolomyces shibatanus* bola omnoho nižšia, čo dokazuje lepšiu adaptabilitu *Rhodotorula aurantiaca* k nežiadúcim látkam obsiahnutých v kultivačnom médiu tab. 31 .

Prídavok hydrolyzátu do kultivačného média nemá len negatívny vplyv na rast biomasy, ale určité koncentrácie hydrolyzátu môžu pozitívne vplyvať na karotenogézu u červených kvasiniek. U kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* zvyšujúci sa obsah hydrolyzátu do média viedol k vyšším produkciám  $\beta$ -karoténu a celkových karotenoidov. V médiu s obsahom 75% hydrolyzátu bola produkcia pigmentov 2,5-násobne vyššia než v kontrolnom médiu. V médiách, kde bol uhlíkatý zdroj plne nahradený hydrolyzátom, vplývali inhibítory na rast buniek už tak, že kvasinka nedosiahla stacionárnu fázu rastu a produkcia pigmentov bola omnoho nižšia než na kontrolnom médiu. Výsledky u kvasinky *Sporobolomyces shibatanus* sú odlišné. So zvyšujúcou sa koncentráciou hydrolyzátu do produkčného média, produkcia  $\beta$ -karoténu a ostatných pigmentov sa znižovala. Médium s 25% hydrolyzátom ako jediné malo dobrý vplyv na produkcie metabolitov, kvasinka dosiahla produkcie karotenoidov 2,4-násobne vyššie než v kontrolnom médiu tab. 31.

Produkcia ergosterolu bola veľmi zaujímavá. Najvyššie množstvá boli nájdené u kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* rastúcej v médiu so 100% hydrolyzátom. Toto môže byť spôsobené zmenou metabolizmu syntézy sterolov v biomembránach, ako ochrana voči nežiadúcim podmienkam v prítomnosti inhibítorov. Produkcia ergosterolu u kvasinky *Sporobolomyces shibatanus* mala podobný priebeh. So zvyšujúcim sa obsahom hydrolyzátu v médiu sa zvyšovala produkcia ergosterolu (cca 1 mg/g suš) oproti kontrole (cca 0,5 mg/g suš) tab. 31.

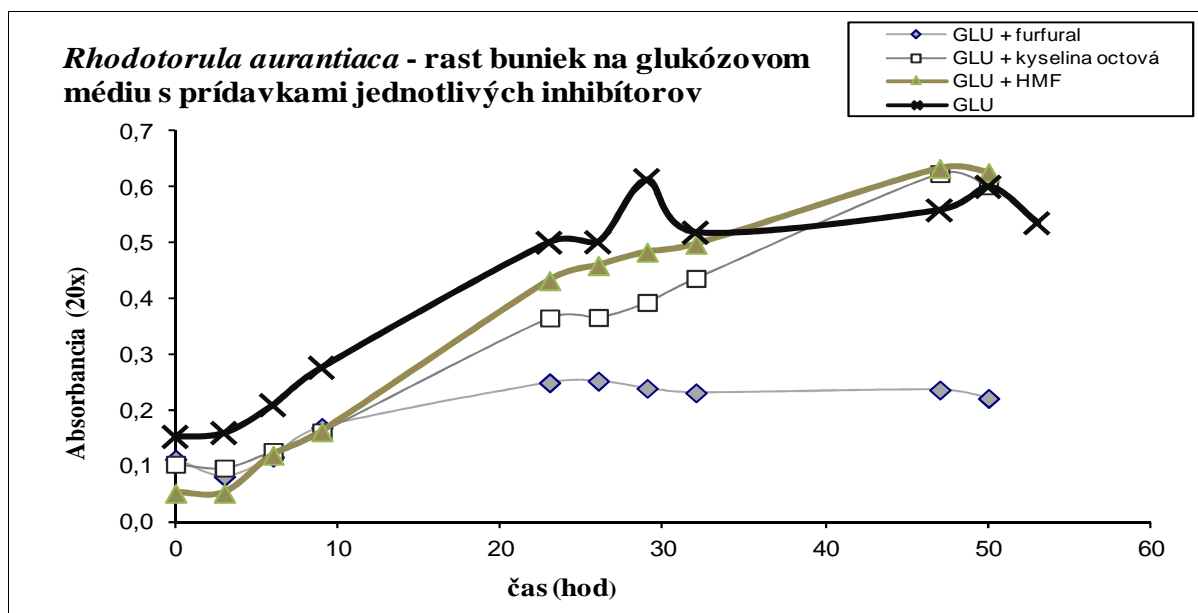
### Efekt inhibičných faktorov z hydrolyzátu na rast kvasinkových buniek

Tri hlavné inhibítory z borovicového hydrolyzátu boli testované pre svoj efekt na rast buniek kvasiniek *Rhodotorula aurantiaca* a *Sporobolomyces shibatanus*. Kvasinkové kmene boli kultivované na jednotlivých sacharidov individuálne (glukóza, xylóza, manóza), na umelom hydrolyzáte (zloženie sacharidov napodobovalo originálny hydrolyzát) a na cukroch i umelom hydrolyzáte s prídavkami inhibítorov v koncentrácii rovnakej, ako dané látky obsahuje originálny hydrolyzát. Kultivácie prebiehali 50 hodín, aby sa zachytila hlavne rastová exponenciálna fáza (kap. 8.2.7).



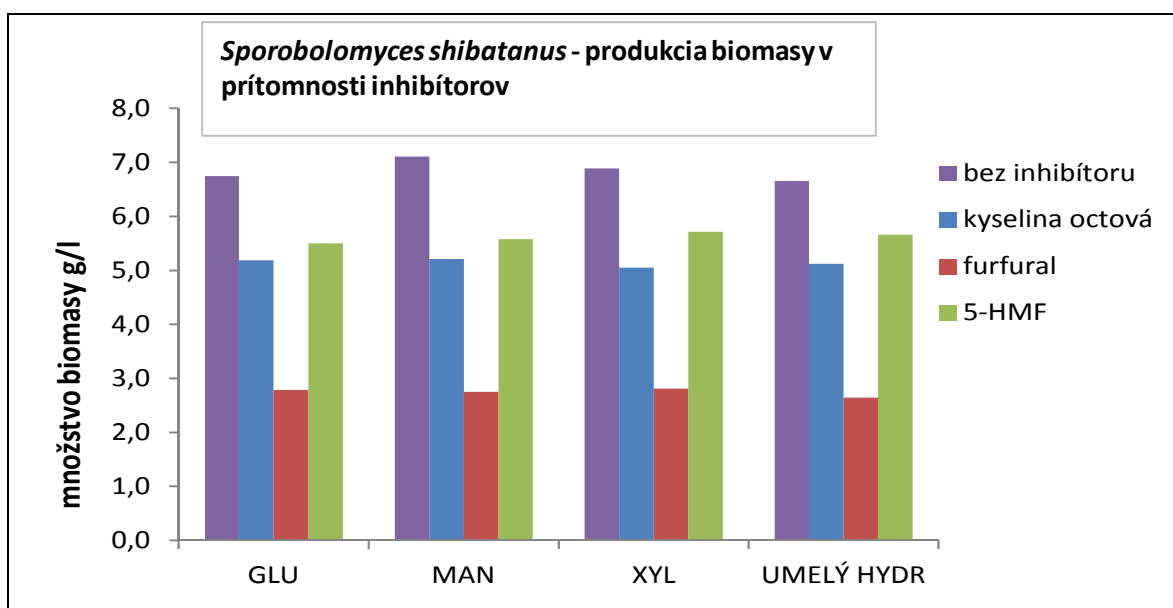
**Obr. 18:** Produkcia biomasy na jednotlivých sacharidoch u *Rhodotorula aurantiaca*

Výsledky kultivácie oboch kvasinkových kmeňov na jednotlivých sacharidoch a umelom hydrolyzáte sú rovnaké. Obe kvasinky mali podobný nárast biomasy na všetkých sacharidických zdrojoch, hodnoty koncentrácie buniek sa od seba líšili minimálne (obr. 18).



**Obr. 19:** Produkcia biomasy *R.aurantiaca* na glukózovom médiu s prídavkom inhibítorov

Rozdiely v produkcii biomasy nastali počas kultivácií na jednotlivých sacharidoch a umelom hydrolyzáte až po prídavku inhibičných látok. Na obrázku 19 sú uvedené výsledky nárastu biomasy kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* na glukózovom médiu po pridaní furfuralu, 5-HMF a kyseliny octovej v porovnaní s kontrolnou kultiváciou na čistej glukóze. Výsledky naznačujú, že *Rhodotorula aurantiaca* rovnako ako *Sporobolomyces shibatanus* sú schopné rásť na sacharidoch v prítomnosti inhibítorov, avšak sa zdá furfural je kritická látka z tektého hydrolyzátu, ktorá má silný inhibičný efekt na rast buniek. Obrázok 20 ukazuje nárast biomasy v prítomnosti inhibítorov u kvasinky *Sporobolomyces shibatanus*.



**Obr. 20:** *Produkcia biomasy u kvasinky Sporobolomyces shibatanus*

Rastové charakteristiky kvasinkových kmeňov v prítomnosti inhibítorov boli prevedené na všetkých sacharidových zdrojoch i umelom hydrolyzáte. Výsledky kinetiky nárastu biomasy boli spracované typickým logaritmickým modelom.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{net} X \quad (1),$$

kde  $X$  predstavuje hmotnosť biomasy (g/l),  $\mu_{net}$  je špecifická rýchlosť rastu ( $h^{-1}$ ). Za predpokladu, že v čase  $t=t_0$ , je  $X=X_0$ , môže byť daná rovnica integrovaná nasledovnými rovnicami (2, 3):

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_{net} (t - t_0) \quad (2),$$

$$Td = \ln \frac{2}{\mu_{net}} \quad (3).$$

Hodnoty množstva biomasy z rastových kriviek boli použité k výpočtu špecifickej rýchlosti rastu a doby zdvojenia biomasy. Pre výpočty boli použité prvé štyri hodnoty z každého experimentu. Prvá hodnota množstva biomasy sa označovala ako  $X_0$  v čase  $t_0$ . Získali sa kalibračné krivky v tvare  $y = ax \pm b$ , kde hodnota  $a$  prislúchala špecifickej rýchlosti rastu. Čím je špecifická rýchlosť rastu menšia a zároveň doba zdvojenia väčšia, tým dané kultivačné médium obsahuje látku alebo viac látok, ktoré negatívne vplyvajú na rast buniek. Podľa vyššie uvedenej rovnice (3) sa ďalej získala doba zdvojenia biomasy. Výsledky špecifických rýchlostí rastu, dôb zdvojenia i korelačných koeficientov sú uvedené v tabuľke pre všetky sacharidové zdroje a inhibičné látky.

**Tab. 32:** *Vplyv hlavných inhibítorov z hydrolyzáta borovice na špecifickú rýchlosť rastu biomasy u kvasiniek Rhodotorula aurantiaca a Sporobolomyces shibatanus rastúcich na čistých sacharidoch, umelom hydrolyzáte a originálnom hydrolyzáte v pomere s glukózou*

	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>		<i>Sporobolomyces shibatanus</i>	
	$\mu_{net}$ ( $h^{-1}$ )	$R^2$	$\mu_{net}$ ( $h^{-1}$ )	$R^2$
Glukóza	0,1065	0,9936	0,1719	0,9718
Xylóza	0,1260	0,9912	0,1476	0,9999
Manóza	0,1410	0,9812	0,1150	0,9885
Umelý hydrolyzát	0,1350	0,9845	0,1283	0,9943
Glu + kyselina octová	0,1025	0,9726	0,1251	0,9843
Xyl + kyselina octová	0,1090	0,9840	0,0740	0,9872
Man + kyselina octová	0,1085	0,9888	0,0643	0,9995
Ume.hydrolyzát + kyselina octová	0,1033	0,9805	0,1220	0,9986
Glu + furfural	0,0973	0,9902	0,1471	0,9936
Xyl + Furfural	0,1036	0,9995	0,1143	0,9996
Man + Furfural	0,1103	0,9858	0,0383	0,9951
Ume.hydrolyzát + Furfural	0,0952	0,9916	0,1319	0,9982

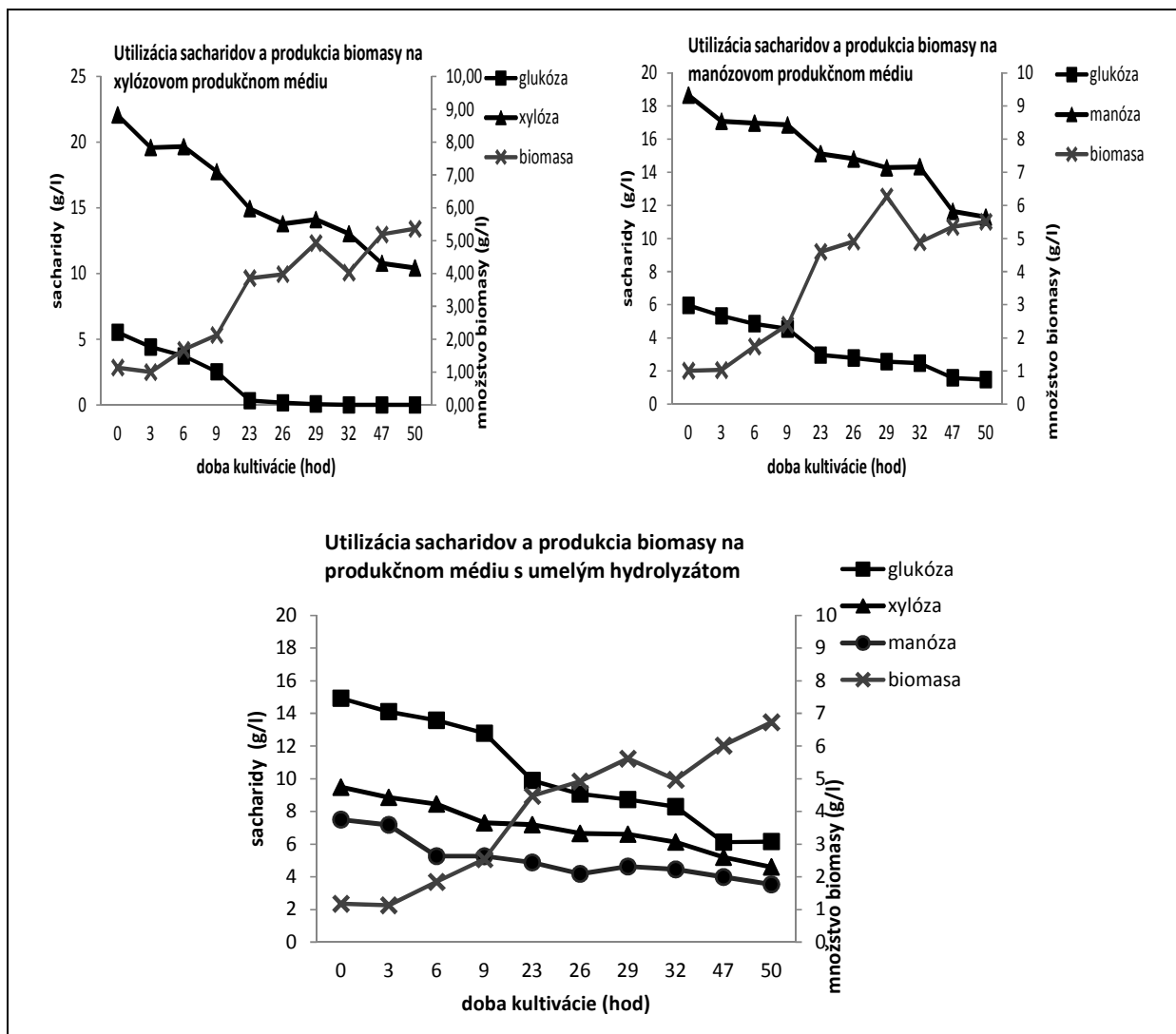
Glu + HMF	0,0744	0,9923	0,0656	0,9944
Xyl + HMF	0,0902	0,9931	0,0634	0,9949
Man + HMF	0,0644	0,9759	0,0542	0,9826
Ume.hydrolyzát + HMF	0,0761	0,9981	0,0590	0,9792
100% Hydrolyzát	0,0122	0,9913	0,0167	0,9752
75% Hydrolyzát	0,0165	0,9945	0,0188	0,9876
50% Hydrolyzát	0,0451	0,9941	0,0205	0,9166
25% Hydrolyzát	0,0649	0,9961	0,0530	0,9914

Legenda: GLU – glukóza, MAN – manóza, XYL – xylóza,  $\mu_{\text{net}}$  – špecifická rýchlosť rastu,  $R^2$  – regresná konštanta

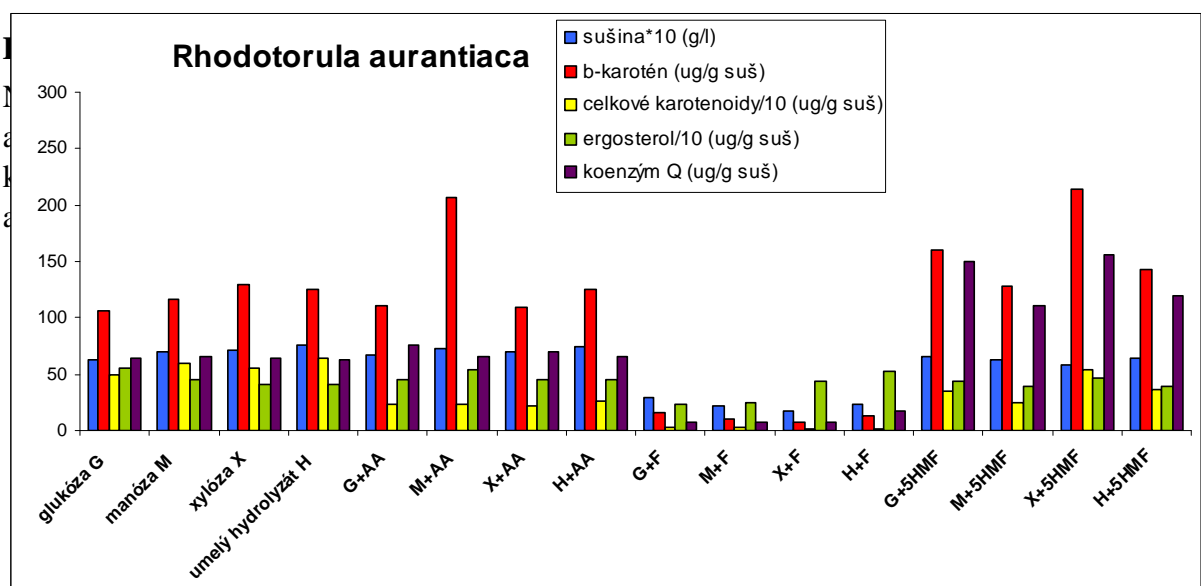
Z tabuľky tab. 32 vidieť, že najvyššie špecifické rýchlosti rastu sú u kvasiniek, kde kultivačné médium obsahovalo ako zdroj uhlíka manózu v porovnaní s ostatnými kultiváciami na iných sacharidových zdrojoch. Kombinácia sacharidov v umelom hydrolyzáte sa zdá byť veľmi vhodnou variantou kultivačného média pre produkciu biomasy študovaných kvasiniek. Podľa tabuľky 32 je vidieť, že i prítomnosť inhibítorov najmenej ovplyvnila rast buniek práve v prítomnosti manózy ako sacharidického zdroja. Tým pádom súčasť manózy ako jedného zo sacharidov prítomných v hydrolyzáte zvyšuje odolnosť buniek voči inhibičným faktorom. Opačný efekt bol pozorovaný u kvasinky *Sporobolomyces shibatanus*. V prítomnosti manózy a inhibítorov bola dosiahnutá najnižšia špecifická rýchlosť rastu, bunky boli najviac ovplyvnené inhibítormi zo všetkých sledovaných médií. Z výsledkov je vidieť, že bunky sú najviac odolné voči inhibičným faktorom práve v médiu obsahujúcom čistú glukózu, či na hydrolyzáte.

Počas testovania rastových charakteristík boli v určitých časoch odoberané vzorky z kultivačných médií pre stanovenie koncentrácie sacharidov v médiu za cieľom zistenia využitia daných zdrojov uhlíka. Nakoľko kultivácie prebiehali dvojkrokovou inokuláciou, kde bola ako zdroj uhlíka glukóza, v produkčných médiách s jednotlivými sacharidickými zdrojmi sa na začiatku vždy vyskytovala určitá nízka koncentrácia glukózy obr. 21.

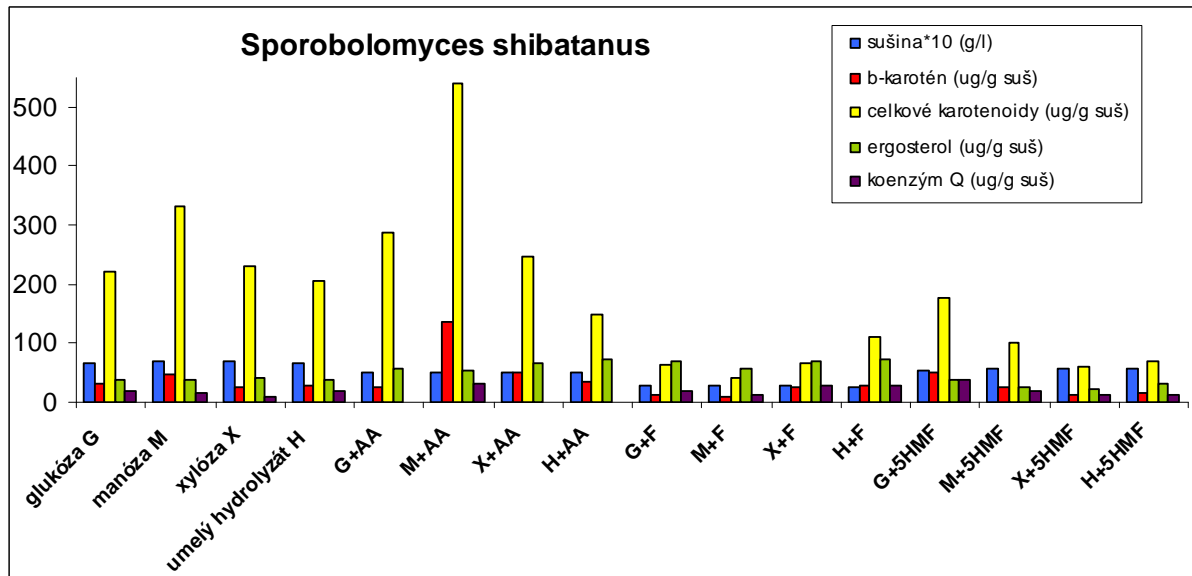
Z výsledkov stanovenia sacharidov z kultivačných médií metódou HPLC/RI sa zistilo, že kvasinky v produkčnom médiu s čistou xylózou najskôr úplne vyčerpajú zdroj glukózy pochádzajúci z inokulačného média s veľmi slabou využiteľnosťou i xylózy, a nakoniec konzumujú už len xylózu. V produkčnom médiu s čistou manózou bunky konzumujú zvyškovú glukózu súčasne s prítomnou manózou po celý čas kultivácie. Na obrázku 21 je uvedený priebeh využitia jednotlivých sacharidov v kultivačných médiách u kvasinky *Rhodotorula aurantiaca*.



**Obr. 21:** Utilizácia jednotlivých sacharidov v rôznych produkčných médiách u *Rhodotorula aurantiaca*



**Obr. 22:** Produkcia sledovaných metabolitov u kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* na médiách s prídavkami inhibítorov (AA-kyselina octová, F – furfural, 5HMF- 5-hydroxymetylfurfural)



**Obr. 23:** Produkcia sledovaných metabolitov u kvasinky *Sporobolomyces shibatanus* na médiách s prídavkami inhibítorov (AA-kyselina octová, F – furfural, 5HMF- 5-hydroxymetylfurfural)

Z daných výsledkov vyplýva, že karotenogénne kvasinkové kmene sú schopné využívať aj upravené lignocelulóзовé borovicové substráty ako zdroj uhlíka pre produkciu biomasy a sledovaných metabolitov. U testovaných kmeňov bola zaznamenaná zvýšená produkcia karotenoidov a lipidických látok v určitých podmienkach kultivácie, čo umožňuje využitie týchto substrátov ako lacných zdrojov. Z inhibičných látok prítomných v upravenom hydrolyzáte sa zdá byť furfural tým kritickým komponentom, ktorý inhibuje rast buniek. V súčasnosti existuje niekoľko metód na detoxikáciu daných odpadových materiálov. Tieto mechanizmy môžu čiastočne znížiť inhibičné účinky na rast kvasiniek a produkciu žiadaných metabolitov tak, že lignocelulóзовé materiály by mohli byť nádejným substrátom pre biotechnologické aplikácie v komerčnej výrobe pigmentov, sterolov, či už samotnej obohatenej kvasinkovej biomasy.

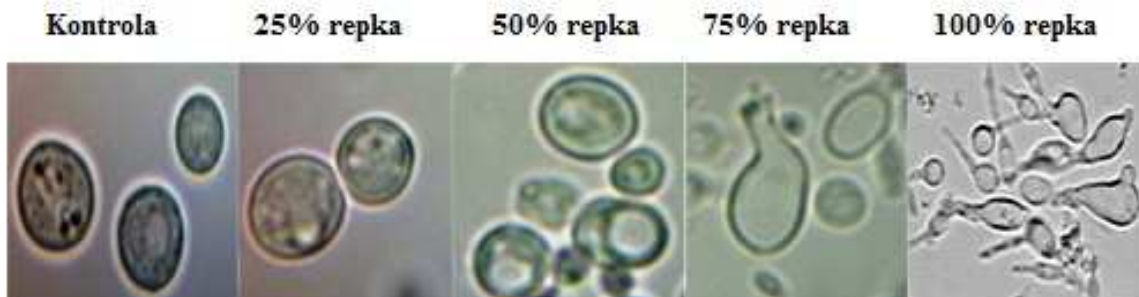
## 9.2 Morfológia karotenogénnych kvasiniek

Morfologické zmeny sú indikátormi mikrobiálnej adaptácie daného organizmu v určitom prostredí. Pozorovanie zmien v morfológii buniek môže rýchle odhaliť toxicitu prostredia. Z pozorovania je možné sa dozvedieť, ako reaguje bunka na rôzne stresové situácie. Najrýchlejšom možnosťou odhalenia týchto zmien v kultivačných podmienkach je pozorovanie pomocou svetelného mikroskopu.

Kvasinky kultivované za podmienok uvedených vyššie boli sledované mikroskopicky, aby sa zistila adaptabilita buniek vystavených stresovým prostrediam.

### 9.2.1 Morfológia kvasiniek kultivovaných na nehydrolyzovaných odpadových materiáloch

Na uvedených mikroskopických snímkoch 24-25 sú zobrazené príklady morfológických zmien kvasinkových buniek kultivovaných na nehydrolyzovaných odpadových materiáloch v porovnaní s kontrolnou kultiváciou na glukózovom médiu.



Obr. 24: Kultivácia *Sporobolomyces roseus* na repkovom substráte



Obr. 25: Kultivácia *Rhodotorula glutinis* na repkovom substráte

Podľa mikroskopického pozorovania buniek kmeňa *Sporobolomyces roseus* je vidieť zmeny, ktoré nastali v jednotlivých produkčných médiách. Bunky kontrolného média su okrúhle, plné, bez značných známok stresu. Avšak bunky produkčných médií s odpadovým repkovým substrátom sa od kontrolného média značne líšia. So vzrastajúcou koncentráciou repkového substrátu do média sú bunky viac pretiahnuté, obsah bunky tvorí vychlípeniny von z oválnej štruktúry. Je vidieť množstvo deformácií spôsobených odolávaním bunky stresovému prostrediu.

U kvasinky *Rhodotorula glutinis* bunky z kontrolného média obsahujú drobné vakuoly, ktoré signalizujú už staršie bunky v stacionárnej fáze rastu. Bunky z médií obsahujúcich odpadný repkový substrát tiež obsahujú množstvo vakuol, ktoré sa zväčšujú a prehlbujú so zvyšujúcou sa koncentráciou odpadného substrátu. Bunka takto pravdepodobne reagovala na postupné hladovanie, čiže vyčerpanie dostupného uhlíkatého zdroja v kultivačnom médiu.

### 9.2.2 Morfológia kvasiniek kultivovaných na hydrolyzovaných odpadových materiáloch

Na uvedených mikroskopických snímkoch 26-29 sú zobrazené príklady morfológických zmien buniek kultivovaných na hydrolyzovaných odpadových materiáloch ako sú cestoviny, ryža, pšeničné otruby a jablčná vláknina v porovnaní s kontrolnou kultiváciou na glukózovom médiu.



**Obr. 26:** Kultivácia *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 na hydrolyzovaných cestovinách s enzýmami z plesní *Fusarium solani* a *Phanerochaete chrysosporium* a komerčnými enzýmami

Na obrázkoch 26 si môžeme všimnúť, že bunky *Cystofilobasidium capitatum* sú v produkčných médiách s odpadovým substrátom hydrolyzovaným enzymatickými preparátmi z plesní stresované zrejme nedostatkom nutrientov (sacharidov). Bunky sú tu malé a tiež je ich v porovnaní s kontrolou menej. V médiách s cestovinami hydrolyzovanými komerčnými enzýmami sú bunky väčšie, avšak sa často zhľukujú. I tu je vidieť, že na bunky pôsobí istý druh stresového prostredia.



**Obr. 27:** Kultivácia *Rhodotorula glutinis* na hydrolyzovanej ryži s enzýmami z plesní *Fusarium solani* a *Phanerochaete chrysosporium* a komerčnými enzýmami

Kvasinka *Rhodotorula glutinis* je najznámejší zástupca karotenogénnych kvasiniek. Pri kultivácii na ryžových odpadových materiáloch nie je vidieť veľký rozdiel medzi jednotlivými médiami. Bunky sú pravidelné, okrúhle, plné a je vidieť i množstvo pučiacych buniek. Kvasinka *Rhodotorula glutinis* sa zdá byť odolnejšia voči zmenám prostredia, či zmenám v zdroje uhlíka, dokáže ľahko utilizovať aj odpadové materiály s dostatkom jednoduchých sacharidov (obr. 27).



**Obr. 28:** Kultivácia *Rhodotorula aurantiaca* na hydrolyzovaných pšeničných otrubách s enzýmami z plesní *Fusarium solani* a *Phanerochaete chrysosporium* a komerčnými enzýmami

Bunky kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* rastúce na médiu s obsahom hydrolyzovaných pšeničných otrúb sú pravidelného guľovitého tvaru, bez väčších deformácií. Silnejšie bunečné

stény sú však viditeľné na odpadovom substráte hydrolyzovanom komerčnými enzýmami. Bunky si pravdepodobne v dôsledku stresového prostredia akumulovali viac metabolitov (karotenoidov, lipidov, polysacharidov) v stenách buniek (obr. 28).

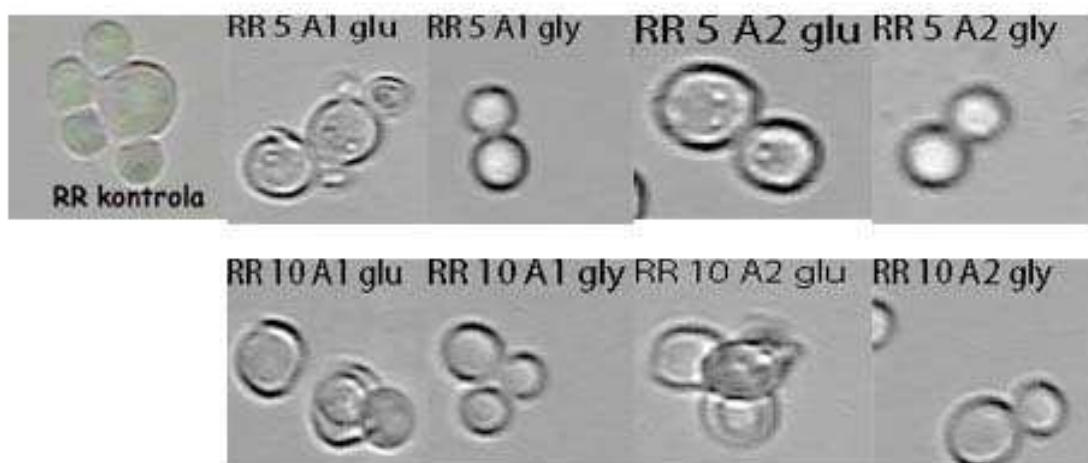


**Obr. 29:** Kultivácia *Rhodotorula mucilaginosa* (*rubra*) na hydrolyzovanej jablčnej vláknine s enzýmami z plesní *Fusarium solani* a *Phanerochaete chrysosporium* a komerčnými enzýmami

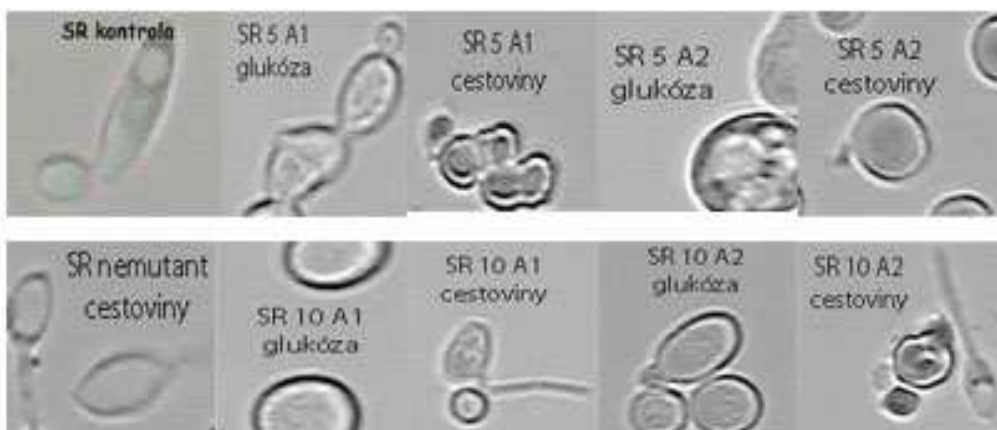
*Rhodotorula mucilaginosa* (*rubra*) rástla na odpadovom materiále jablčnej vláknine hydrolyzovanej či už plesňovými alebo komerčnými enzýmami viacmenej podobne. V oboch prípadoch sú bunky plné, prevažne guľaté a v porovnaní s kontrolou i väčšie. Kvasinky sa v médiách rozmnožujú pučaním, takže je vidieť, že metabolická aktivita buniek ostala zachovaná, bunky sa dokázali vyrovať stresovému prostrediu zo zmeny zroja uhlíka (obr. 29).

### 9.2.3 Morfológia kvasiniek kultivovaných na hydrolyzovaných odpadových materiáloch v prítomnosti mutagénu

Na uvedených mikroskopických snímkoch 30-34 sú zobrazené príklady morfológických zmien buniek selektovaných náhodou mutagenézou a kultivovaných na hydrolyzovaných i nehydrolyzovaných odpadových materiáloch ako sú glycerol, cestoviny a ryža v porovnaní s kontrolnou kultiváciou na glukózovom médiu.

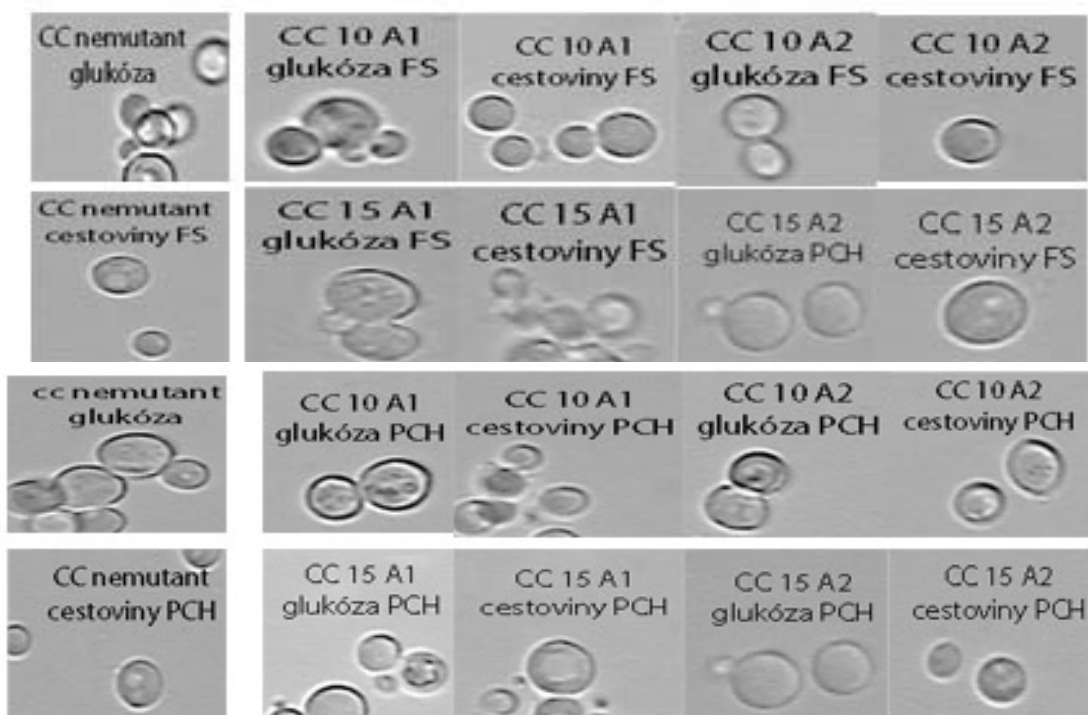


**Obr. 30:** Kultivácia mutantných kmeňov *Rhodotorula mucilaginosa* (*rubra*) na glycerole



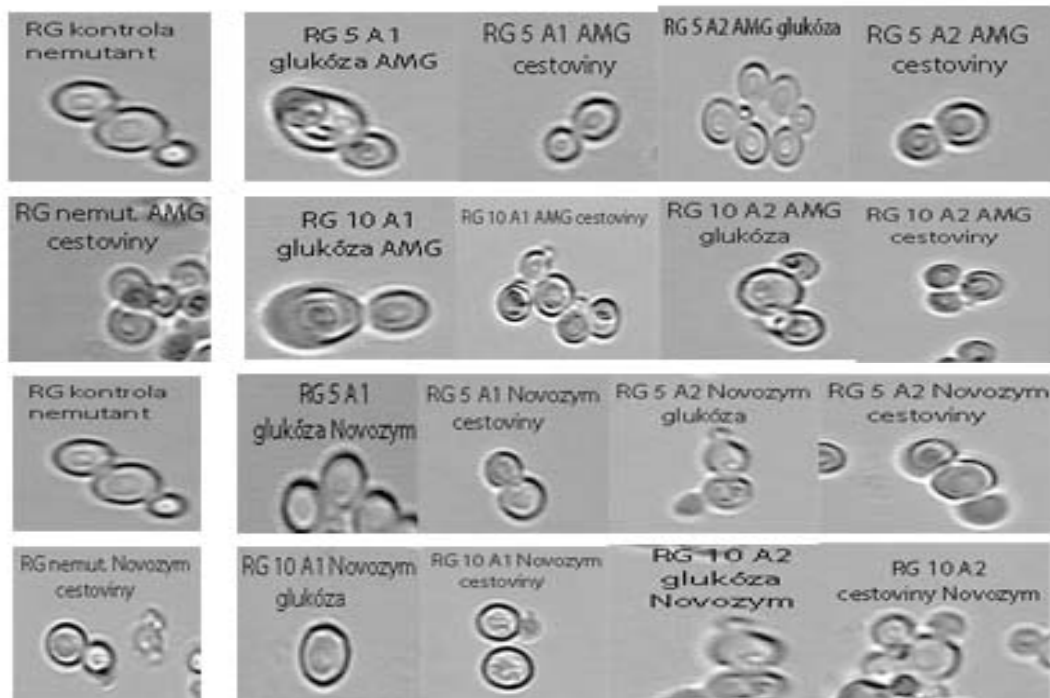
**Obr. 31:** Kultivácia mutantných kmeňov *Sporobolomyces roseus* na nehydrolyzovaných cestovinách

Kultivácia mutantných kmeňov kvasiniek na nehydrolyzovaných odpadových materiáloch ako je glycerol či vaječné cestoviny zahŕňa množstvo morfológických zmien v tvare buniek proti kontrolným médiám nemutantných kmeňov (obr. 30-31). V kontrolných glukózových médiách sú bunky guľaté v prípade *Rhodotorula mucilaginosa (rubra)*, či pretiahnuté v prípade *Sporobolomyces roseus*, avšak v oboch prípadoch nie je vidieť u buniek výrazný stres. Čo sa týka už médií mutantných kmeňov na odpadových materiáloch, je vidieť rôzne deformácie, zvrásnenia buniek, hrubé bunečné steny, veľké vakuoly či vychlípeniny. Zvrásnením, vakuolami či vychlípeninami bunky pravdepodobne reagovali na nedostatok zdroja uhlíka v médiu. V prípade zhrubnutých bunečných stien sa bunky bránili voči stresovému prostrediu produkciou metabolitov, ukladaním do bunečnej steny, alebo ukladaním látok okolo samotnej bunky, čím zabráňovali prestupu látok dovnútra bunky.



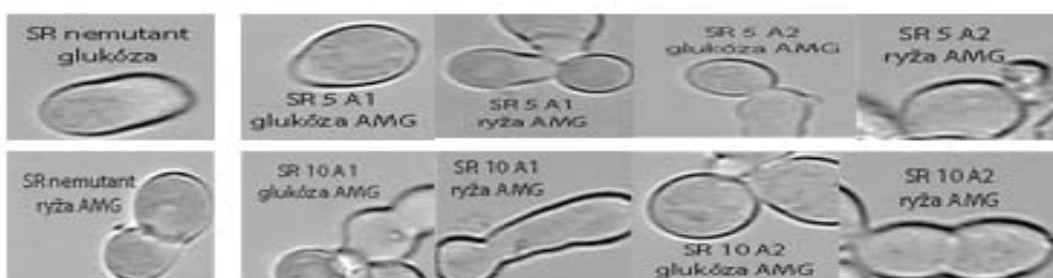
**Obr. 32:** Kultivácia mutantných kmeňov *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 na hydrolyzovaných cestovinách (AMG – komerčný enzým AMG, Novo – komerčný enzým

*Novozym 188*, 5(10)- koncentrácia mutagénnu v médiu, A1(A2) – označenie náhodne vybranej kolónie kvasiniek)



**Obr. 33:** Kultivácia mutantných kmeňov *Rhodotorula glutinis* na hydrolyzovaných cestovinách (AMG – komerčný enzým AMG, Novo – komerčný enzým *Novozym 188*, 5(10)-koncentrácia mutagénnu v médiu, A1(A2) – označenie náhodne vybranej kolónie kvasiniek)

Na základe mikroskopického pozorovania buniek mutantných kmeňov *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 (obr. 32) a *Rhodotorula glutinis* (obr. 33) je vidieť morfológické zmeny buniek vzhľadom ku kontrolným médiám nemutantných kmeňov. Kvasinky nemutantné kultivované na glukóze majú typický guľatý tvar. Na mikroskopických záberoch, ktoré zachycujú mutantné kmene kvasiniek kultivovaných na zhydrolyzovaných cestovinách (obr. 32 a 33), môžeme vidieť výrazne zhrubnuté bunkové steny. Silnejšie bunkové steny sú jednou z foriem ochrany proti vplyvom stresu, dochádza aj k zvýšenej tvorbe karotenoidov a akumulácii lipidov. Zoskupovanie buniek do zhľukov, zvrásnený povrch buniek u mutovaných kmeňoch s alternatívnym zdrojom uhlíka je tiež typickým javom ochrany voči intenzívnemu stresovému prostrediu. Kvasinky napriek kultivácii v tomto prostredí nestratili schopnosť rozmnožovania, čo svedčí o ich metabolickej aktivite a schopnosti produkovať pigmenty.





**Obr. 34:** Kultivácia mutantných kmeňov *Sporobolomyces roseus* na hydrolyzovanej ryži (AMG – komerčný enzým AMG, Novo – komerčný enzým Novozym 188, 5(10)-koncentrácia mutagénnu v médiu, A1(A2) – označenie náhodne vybranej kolónie kvasiniek)

Napriek tomu, že bunky kvasinky *Sporobolomyces roseus* sú zo všetkých študovaných kmeňov najcitlivejšie na vplyv stresového prostredia, ako je to vidieť u predchádzajúcich obrázkoch z morfológického pozorovania obr. 34, mikroskopické snímky mutantných buniek kultivovaných na zhydrolyzovanej ryži nevykazujú veľké zásadné zmeny v tvaroch buniek, či deformácie bunkových stien obr. 34. V porovnaní s kontrolným médiom s nemutantným kmeňom, sú mutantné bunky väčšie. Zdá sa, množstvo sacharidov uvoľnených po hydrolyze rýže enzýmatickými preparátmi je pre rast a metabolizmus buniek dostatočné. Bunky sa v tomto prípade rýchlejšie adaptovali na nové prostredie.

### 9.3 Vizuálne charakteristiky karotenoidovej produkcie u červených kvasiniek

Na základe vizuálneho pozorovania zafarbenia kultúry kultivačných médií je možné nahrubo odhadnúť produkciu karotenoidov danej kvasinky. Typy karotenoidov i ich množstvo je závislé na daných kultivačných podmienkach a kvasinkovom kmeni. Zmeny zafarbenia médií s odpadovým substrátom je možné veľmi ľahko porovnávať vzhľadom na kontrolné médiá, a tak sledovať produkciu pigmentov už počas kultivácií.

#### 9.3.1 Kultivácia kvasiniek na nehydrolyzovaných odpadových materiáloch

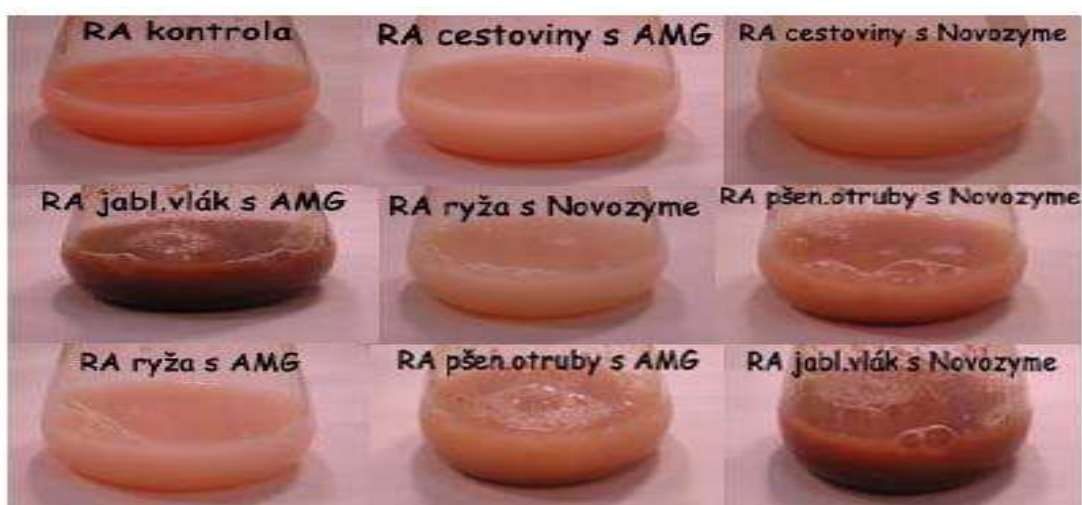
V zafarbení médií u kvasinkového kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 sú vidieť odlišnosti medzi kontrolným a odpadnými médiami. Repkové substráty mali vplyv na tvorbu pigmentov s naružovelým zafarbením. Zo sýtosti farieb produkčných médií s odpadovým substrátom sa dá očakávať, že produkcia pigmentov bude pravdepodobne najvyššia v médiu s koncentráciou repky a glukózy 50/50.



**Obr. 35:** Zafarbenie médií u kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 na repkovom substráte

### 9.3.2 Kultivácie kvasiniek na hydrolyzovaných odpadových materiáloch

U kvasiniek rodu *Rhodotorula* kultivovaných na škrobnaných substrátoch (obr. 36-37) hydrolyzovaných enzýmovými preparátmi je vidieť škálu farieb líšiacu sa od kontrolného média s typickým oranžovým zafarbením. Média s jablčnou vlákninou majú hnedé zafarbenie spôsobené práve prítomnosťou daného odpadového materiálu, preto sa produkcia pigmentov v tomto médiu odhaduje ťažko. Zo zafarbenia ostatných médií, ktoré je viacmenej bledoružové, ružové až lososové, sa dá usudzovať vplyv jednotlivých substrátov na zastúpenie a obsah pigmentov. Tmavšie zafarbenie médií s pšeničnými otrubami môže signalizovať produkciu prevažne ostatných pigmentov, než  $\beta$ -karoténu, a to torulénu či torularhodínu. V porovnaní s kontrolným médiom je však možné tvrdiť, že produkcia celkových karotenoidov bude na odpadových substrátoch nižšia.



**Obr. 36:** Zafarbenie kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* na hydrolyzovaných škrobnaných substrátoch pomocou komerčných enzýmových preparátov



**Obr. 37:** Zafarbenie kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* (*rubra*) na hydrolyzovaných škrobnaných substrátoch pomocou enzymatických preparátov z plesní

### 9.3.3 Kultivácie kvasiniek na odpadových materiáloch v prítomnosti mutagénnu

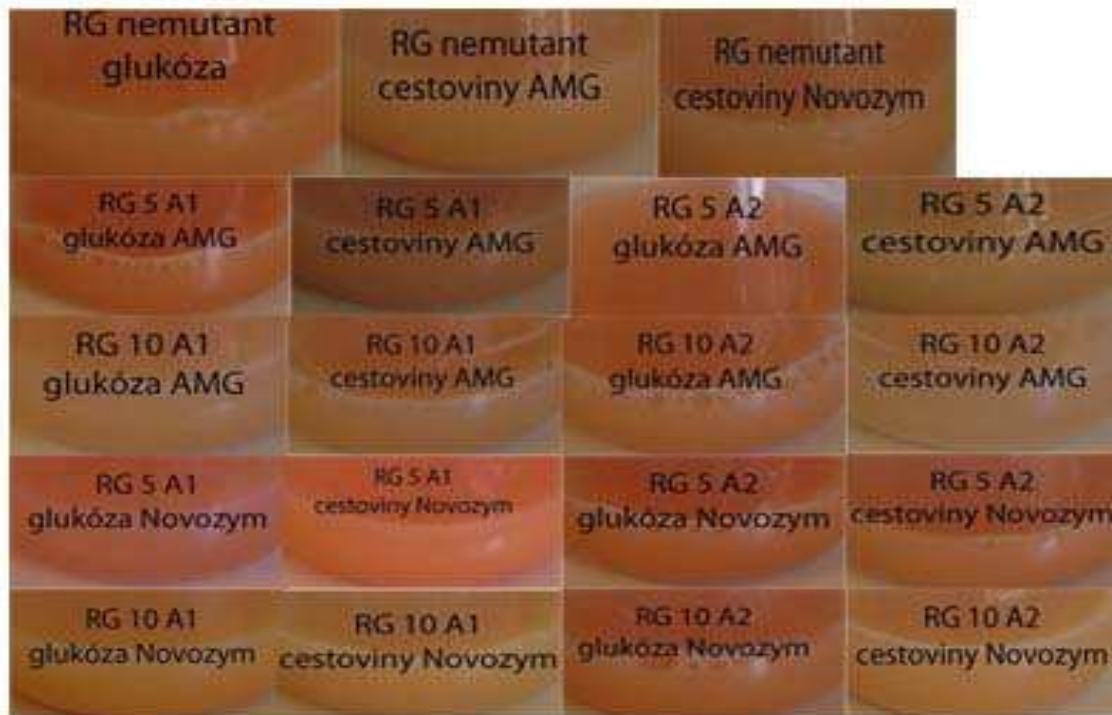
Vplyv odpadného substrátu na zafarbenie média, teda vizuálne posúdenie produkcie pigmentov je dobre badateľné u mutantných kmeňov na cestovinovom médiu (obr. 38). Média sa líšia od kontrolného oranžovo zafarbeného média rôznymi odtieňmi ružovej až oranžovo-červenej farby. Tieto zmeny môžu svedčiť o odlišných množstvách alebo kvalite karotenových pigmentov.



**Obr. 38:** Zafarbenie mutantných kmeňov kvasinky *Rhodotorula glutinis* na cestovinových médiách

V sérii kultivácií mutantných kmeňov na hydrolyzovaných odpadoch je vidieť prevahu výrazného červeného zafarbenia médií (obr. 39), v niektorých prípadoch tmavšieho než je kontrolná kultivácia. V médiách s výraznou lososovo-červenou farbou, kde je odpadový

substrát hydrolyzovaný komerčným enzýmom Novozym 188, by sa dali predpokladať zvýšené produkčné vlastnosti daného kmeňa. Tieto produkcie boli následne potvrdené analýzou pigmentov metódou HPLC.

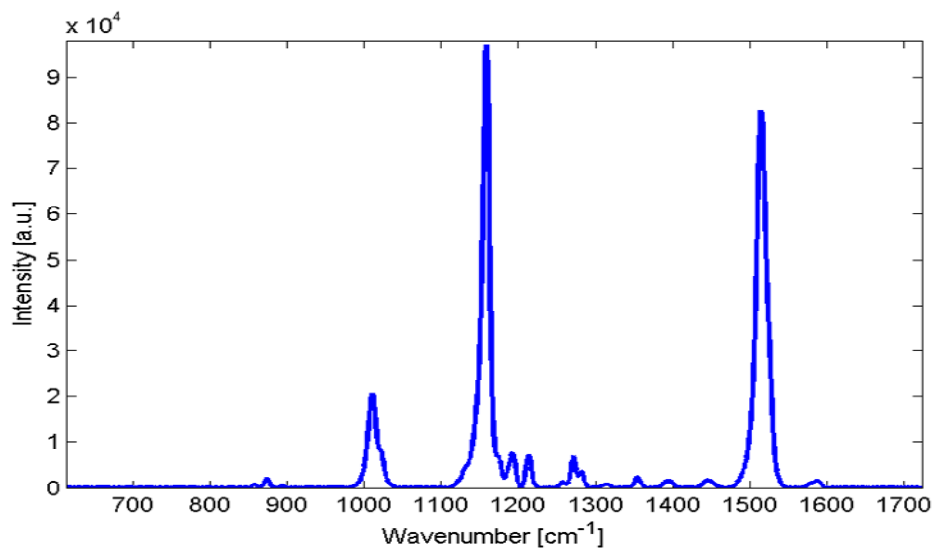


**Obr. 39:** Zafarbenie mutantných kmeňov kvasinky *Rhodotorula glutinis* na hydrolyzovaných cestovinových médiách

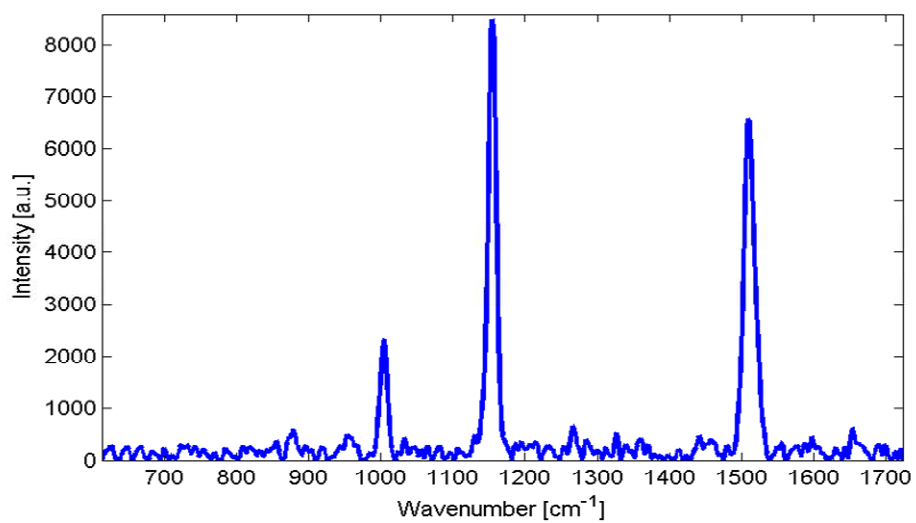
#### 9.4 Detekcia kvasinkových metabolitov pomocou Ramanovej mikrospektrometrie a fluorescenčnej mikroskopie

V rámci rozvoja ďalších techník na sledovanie bunčných metabolitov karotenogénnych kvasiniek bola na záver experimentov do dizertačnej práce prevedená kontrola produkcie biomasy a sledovaných karotenových pigmentov, či lipidických látok metódou Ramanovej mikrospektrometrie na Ústave prístrojovej techniky Akadémie vied Českej republiky.

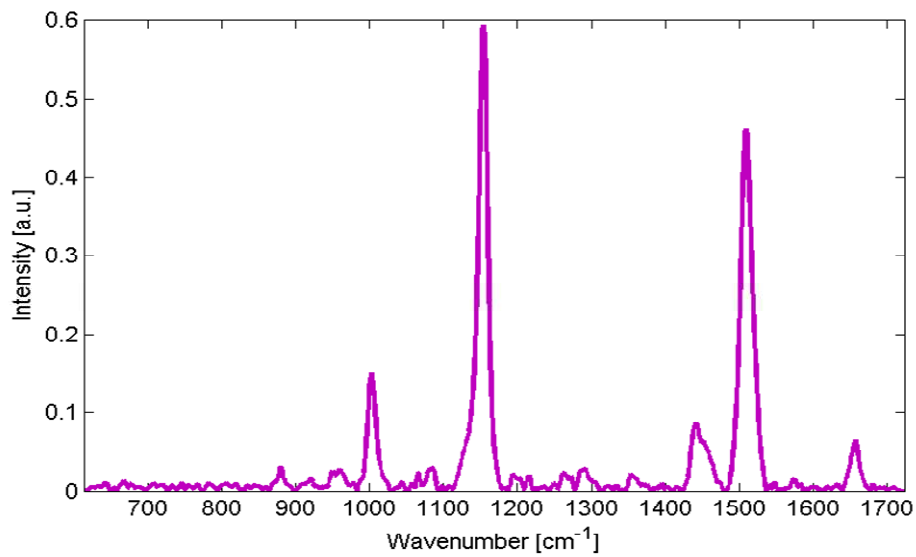
Kvasinky boli kultivované na médiách s rôznym pomerom C/N, aby sa okrem karotenoidov zabezpečila i vyššia produkcia lipidických látok. Lipidová produkcia bola detekovaná fluorescenčnou mikroskopiou farbením pomocou Nílskej červene, zatiaľčo produkcia karotenoidov bola potvrdená analýzou HPLC. Zároveň boli produkcie lipidov a karotenoidov sledované Ramanovou mikrospektrometriou, ktorá poskytuje rýchly a presný odhad na základe pomeru intenzity špecifických pík v Ramanovom spektre. Špecifické píky pre  $\beta$ -karotén C–C sa nachádzajú na  $1,157\text{ cm}^{-1}$ ,  $\beta$ -karotén C=C na  $1,525\text{ cm}^{-1}$ , lipidy nasýtené CH<sub>2</sub> na  $1,445\text{ cm}^{-1}$ , lipid nenasýtené C=C na  $1,656\text{ cm}^{-1}$  Ramanovského spektra (obr. 40-42)



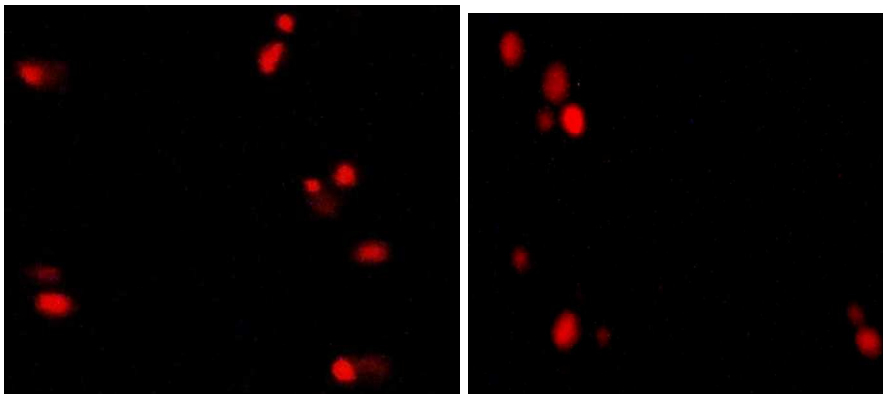
**Obr. 40:** Ramanovské spektrum  $\beta$ -karoténu štandardu



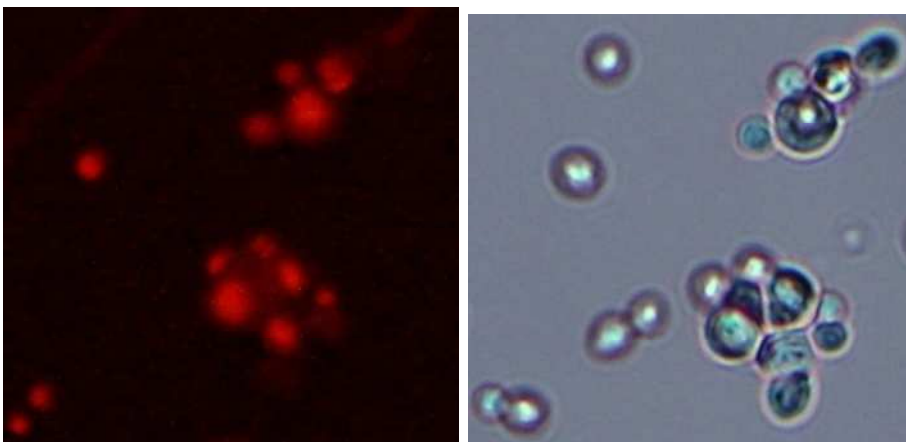
**Obr. 41:** *Rhodotorula glutinis* kultivovaná na optimálnom glukózovom médiu



**Obr. 42:** *Rhodotorula glutinis* kultivovaná na médiu vplývajúcom na zvýšenú produkciu lipidov



**Obr. 43:** Produkcia lipidov pomocou fluorescenčnej mikroskopie: *Rhodotorula glutinis* vľavo na glukózovom médiu, vpravo na médiu pre produkciu lipidov



**Obr. 44:** *Sporobolomyces shibatanus* na médiu pre produkciu lipidov (vľavo snímok z fluorescenčného mikroskopu, vpravo zo svetelného mikroskopu)

Produkcia lipidov bola sledovaná pomocou flouorescenčnej mikroskopie. Suspenzie buniek v acetónovom roztoku a po inkubácii vykazovali červené zafarbenie v miestach lipidových granúl (obr. 43-44). Takto bolo možné odlíšiť produkcie lipidov v jednotlivých kultivačných médiách. Intenzity špecifických pík v Ramanových spektrách korešpondujú s nasýtenými či nenasýtenými väzbami medzi uhlíkami v lipidových molekulách. Takto sa dá jednoducho odhadnúť stupeň nenasýtenosti lipidov, tzv. jódové číslo. Ramanova spektrometria má značné využitie pri selekcii kmeňov kvasiniek pre produkciu lipidov na výrobu vyššej generácie biopalív a tiež rôznych potravinových doplnkov.

## **9.5 Charakterizácia karotenogénnych kvasiniek molekulárnymi technikami**

Červené kvasinky sú známe svojou neobvykle pevnou bunečnou stenou, takže bunečná dezintegrácia a izolácia bunečných komponent je nesmierne náročná. Z tohto dôvodu je charakterizácia génu červených kvasiniek a identifikácia jednotlivých kmeňov pomocou molekulárných techník komplikovaná.

V tejto práci boli použité dve molekulárne techniky – DGGE a PFGE k identifikácii karotenogénnych kvasiniek.

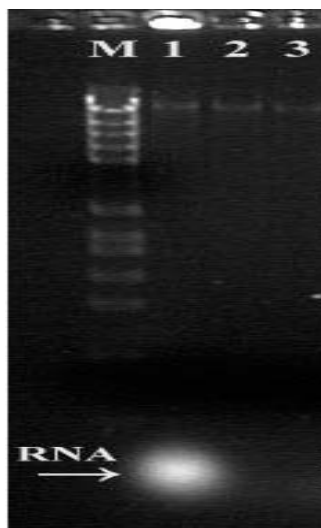
### **9.5.1 Využitie denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy**

Denaturačná gradientová gélová elektroforéza je metóda založená na separácii špecifických PCR fragmentov vo vertikálnom polyakrylamidovom géle s denaturačným gradientom močoviny a formamidu. K úspešnej realizácii identifikácii jednotlivých kmeňov je potrebné získať neporušenú kvasinkovú DNA, ktorá by bola následne amplifikovaná metódou PCR.

V práci bola najskôr optimalizovaná izolácia DNA dvoma metódami: fenol-chloroformovou extrakciou a izolácia pomocou izolačnej súpravy (microbial DNA isolation kit). Sledoval sa výťažok a čistota vyizolovanej DNA vhodnej pre PCR reakciu (kap. 8.9.1).

Extrakcia pomocou fenol-chloroformom patrí medzi časovo náročné metódy, výťažok DNA bol v mnohých prípadoch znečistený RNA, čo potvrdila i kontrolná elektroforetická separácia na horizontálnom géle rovnako ako spektrofotometrická detekcia. Po aplikácii RNázy na odstránenie nežiadúcej RNA, bola samotná DNA znečistená ešte proteínmi.

Pre izoláciu DNA vhodnú k reakcii PCR bola nakoniec zvolená izolačná sada Microbial DNA Isolation Kit. Táto súprava umožňuje rýchlu a jednoduchú izoláciu DNA o vysokej čistote, síce s nižším výťažkom, ktorý je často nedetekovateľný elektroforeticky, avšak pre reakciu PCR je koncentrácia dostatočujúca (obr. 45).



**Obr. 45:** Vzorky DNA po fenol-chloroformovej extrakcii delené v 1% agarózovom géle: M-marker (DNA štandard), 1 – kvasinková DNA bez aplikácie RNázy, 2,3- kvasinková DNA po aplikácii RNázy

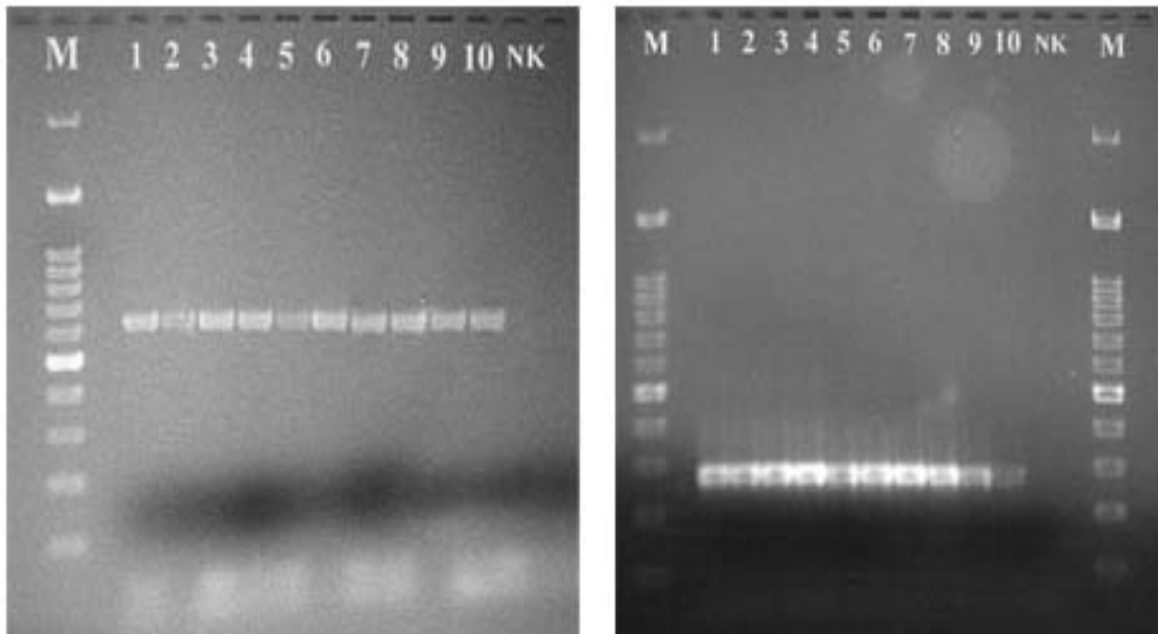
### Amplifikácia vybraných úsekov DNA

Po úspešnej izolácii DNA bola prevedená amplifikácia vybraných úsekov DNA kódujúcich veľkú ribozomálnu podjednotku 26S rDNA, oblasti D1/D2 a oblasti ITS. Celkovo bolo analyzovaných 9 karotenogénnych kvasinkových kmeňov a referenčný kmeň *Saccharomyces cerevisiae*. K amplifikácii bola využitá Nested PCR, čiže dvojkroková reakcia, ktorá využíva vnútorné a vonkajšie primery a má veľmi vysokú citlivosť (kap. 8.9.2).

V prvej amplifikačnej reakcii boli využívané vonkajšie primery a DNA vyizolovaná izolačným kitom. PCR produkty boli následne skontrolované elektroforeticky a slúžili ako templát DNA po vhodnom nariadení, ktoré bolo zistené optimalizáciou, k ďalšej amplifikačnej reakcii. V druhom amplifikačnom kroku boli využité vnútorné primery a PCR produkty opäť kontrolované horizontálnou gélovou elektroforézou. Primery v tomto kroku obsahujú tzv. GC-svorky, ktoré umožňujú lepšie rozlíšenie pri následnej analýze PCR produktov metódou DGGE, pretože zabraňujú úplnej disociácii dsDNA na jednoret'azcové formy (Green 2009).

Optimalizácia Nested PCR prebiehala testovaním vhodnej koncentrácie jednotlivých zložiek v PCR zmesi a tiež annealingových teplôt. Rozmedzie teplôt bolo najskôr stanovené výpočtom hodnôt teplôt topenia daných primerov a aplikované na všetky kvasinkové kmene. K amplifikácii 26S rDNA D1/D2 podjednotky boli použité primery NL1 a NL4 pre prvý amplifikačný krok, NL1-GC a LS2 pre druhý amplifikačný krok.

Rovnaké metódy boli použité i pri PCR reakcii ITS oblastí. Prvý amplifikačný krok bol spoločný a prevedený pomocou primerov ITS1 a ITS4. Druhý krok bol prevedený pre ITS1 oblasť s primermi ITS1-GC a ITS2, pre oblasť 5,8 rDNA ITS 2 s primermi ITS3 a ITS4-GC.

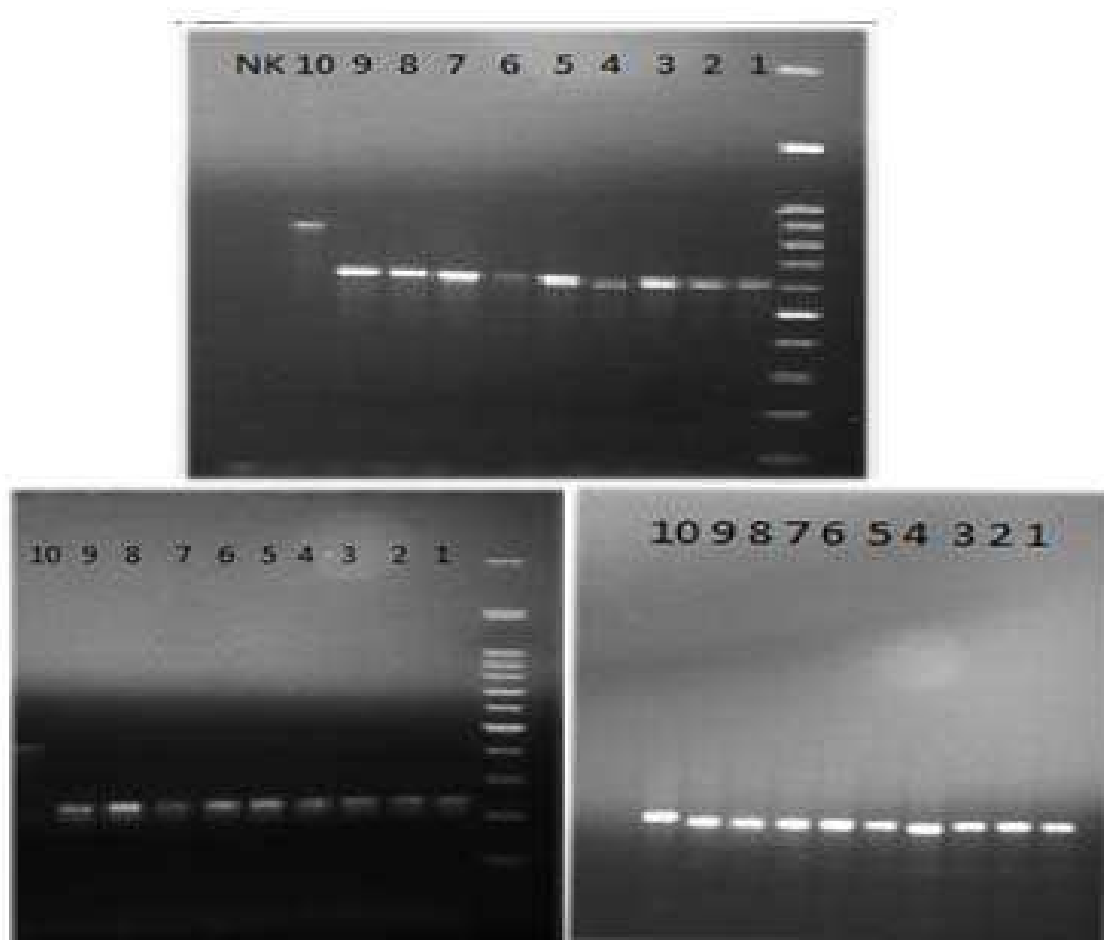


**Obr. 46:** Amplikóny po prvej a druhej PCR reakcii D1/D2 oblasti 26S rDNA: (1-10 vzorky DNA karotenogénnych kvasiniek, M – marker DNA štandard, NK – negatívna kontrola)

Po elektroforetickej kontrole PCR produktov oboch amplifikačných krokov je vidieť rovnakú veľkosť úsekov rDNA u použitých kvasinkových kmeňov. V prípade produktov 1. amplifikácie je veľkosť molekúl DNA približne 650 bp. V prípade 2. amplifikácie je veľkosť približne 280 bp.

**Tab. 33:** Označenie vzoriek pre PRC reakcie 26S D1/D2 oblasti rDNA

Označenie	Kvasinkový kmeň
1	<i>Sporobolomyces roseus</i>
2	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>
3	<i>Sporobolomyces shibatanus</i>
4	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>
5	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
6	<i>Cystofilobasidium capitatum 10-1-1</i>
7	<i>Cystofilobasidium capitatum 10-1-2</i>
8	<i>Phaffia rhodozyma</i>
9	<i>Rhodotorula glutinis</i>
10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>



**Obr. 47:** Amplikóny po prvej a druhej PCR reakcii ITS oblasti rDNA: (1-9 vzorky DNA karotenogénnych kvasiniek, 10 – DNA referenčnej kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, NK – negatívna kontrola)

Z obrázku 1. amplifikačného kroku je vidieť, že všetky karotenogénne kvasinky majú veľkosť molekuly DNA približne 600 bp, zatiaľčo kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* okolo 900 bp. V 2. amplifikačnom kroku pre oblasť ITS1 veľkosť molekúl rDNA pre referenčný kmeň *Saccharomyces cerevisiae* väčší: 450 bp, pre karotenogénne kvasinky okolo 250 bp. Pre oblasť 5,8-ITS2 rDNA sú pre všetky kvasinky veľkosti molekúl podobné, približne 450 bp.

**Tab. 34:** Označenie vzoriek pre PRC reakcie ITS oblastí rDNA

Označenie	Kvasinkový kmeň
1	<i>Rhodotorula glutinis</i>
2	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>
3	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
4	<i>Sporobolomyces roseus</i>
5	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>
6	<i>Sporobolomyces shibatanus</i>
7	<i>Cystofilobasidium capitatum 10-1-1</i>
8	<i>Cystofilobasidium capitatum 10-1-2</i>
9	<i>Phaffia rhodozyma</i>
10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

### Optimalizácia denaturačného gradientu

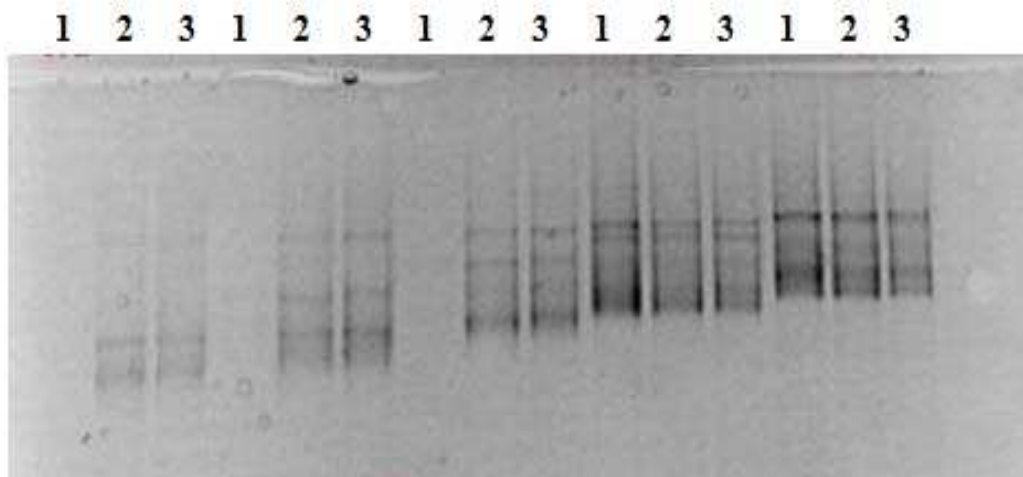
Zo štúdií aplikácie DGGE na kvasinkové a plesňové spoločenstvá iných autorov (Cocolin 2000, Cocolin 2002, Deák 2002), bol zvolený počiatočný denaturačný gradient v rozsahu 30-60%. Základný polyakrylamidový gél bol pripravený zo zásobného roztoku AA/BIS = 37,5/1. Vzorky boli aplikované na gél a spustená elektroforéza (kap. 8.9.3). V získanom DGGE profile bola vidieť neuspokojivá separácia fragmentov DNA, ktoré sa zastavili blízko čela gélu.

Ako ďalší krok optimalizácie bol použitý zásobný roztok AA/BIS = 19/1. Tento roztok obsahuje vyšší podiel zaostrovacieho činidla bisakrylamidu a menšie póry. Po separácii fragmentov DGGE boli získané lepšie výsledky, preto pre ďalšie experimenty sa používal polyakrylamidový gél s týmto pomerom AA/BIS = 19/1 a rozsahom gradientu denaturačných činidiel 30-45% pre kvasinky, prípadne 30-50% pre iné referenčné kmene.

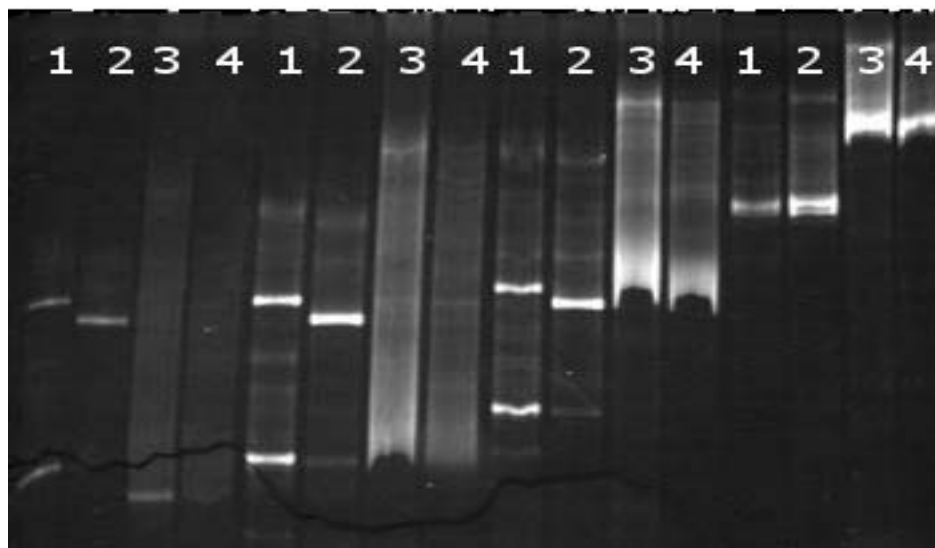
### Time-travel experiment

Pre určenie optimálnej doby separácie bol uskutočnený tzv. time-travel experiment. Vzorky DNA z Nested PCR (dva kvasinkové kmene + ich zmes) boli aplikované na gél vždy v určitých rovnakých časových intervaloch. Čas separácie pre jednotlivé série aplikovaných vzoriek sa pohyboval v rozmedzí od 3 – 7 hodín.

Z výsledkov tohto experimentu je patrné, že ideálna doba separácie úsekov DNA z D1/D2 26S rDNA oblasti sú 4 hodiny, pre úseky DNA z ITS oblasti je to 6 hodín (obr. 48-49).



**Obr. 48:** Time-travel experiment pre úseky DNA z D1/D2 26S rDNA oblasti: 1- *Rhodotorula glutinis*, 2- *Saccharomyces cerevisiae*, 3- mix

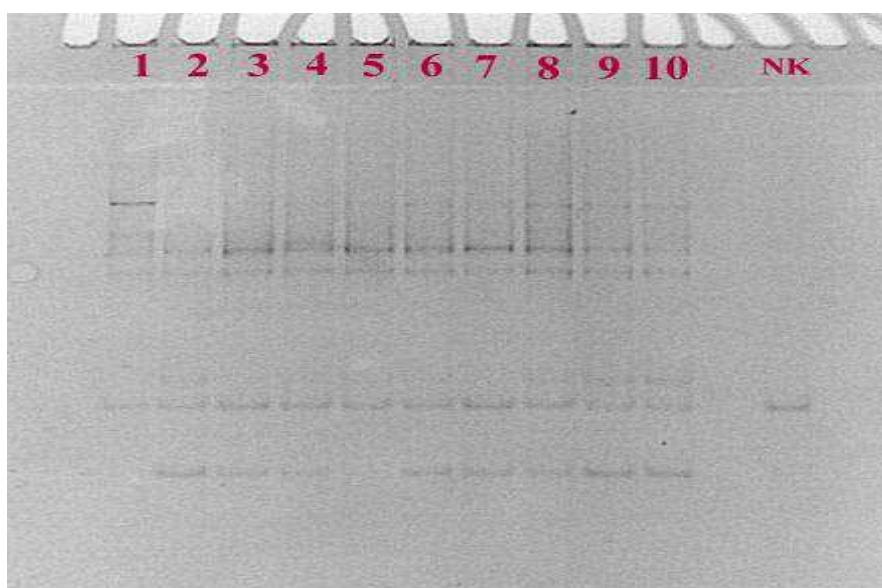


**Obr. 49:** Time-travel experiment pre úseky DNA z ITS rDNA oblasti: ITS1 oblast': 1- *Rhodotorula glutinis*, 2- *Sporobolomyces roseus*, 3- *Saccharomyces cerevisiae*, 5,8-ITS2 oblast': 1- *Saccharomyces cerevisiae*, 3- *Rhodotorula glutinis*, 4- *Sporobolomyces roseus*

## **Analýza karotenogénnych kvasiniek úseku DNA ribozomálnej podjednotky 26S rDNA oblasti D1/D2**

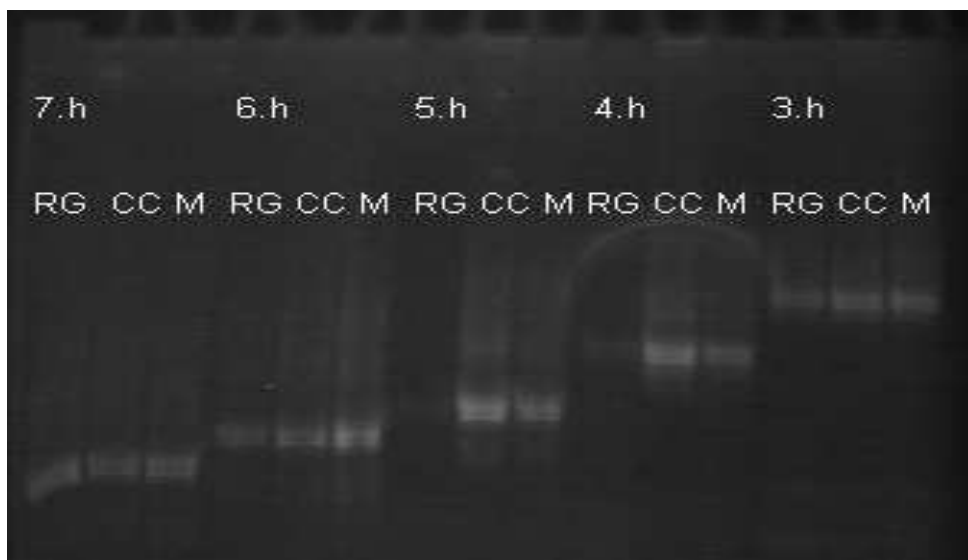
Po optimalizácii podmienok separácie DNA fragmentov metódou DGGE bola prevedená vlastná analýza karotenogénnych kvasiniek všetkých troch sledovaných DNA oblastí.

V prvých pokusoch o odlišenie jednotlivých druhov kvasinkových kmeňov bolo na získanom profile možné pozorovať vždy niekoľko fragmentov pre jeden kmeň kvasinky. Dôvodom mohla byť vzájomná kontaminácia zdrojového DNA materiálu pri príprave reakčnej PCR zmesi, avšak práca bola prevedená za sterilných podmienok a pri odporúčaných postupoch práce na zamedzenie kontaminácie.

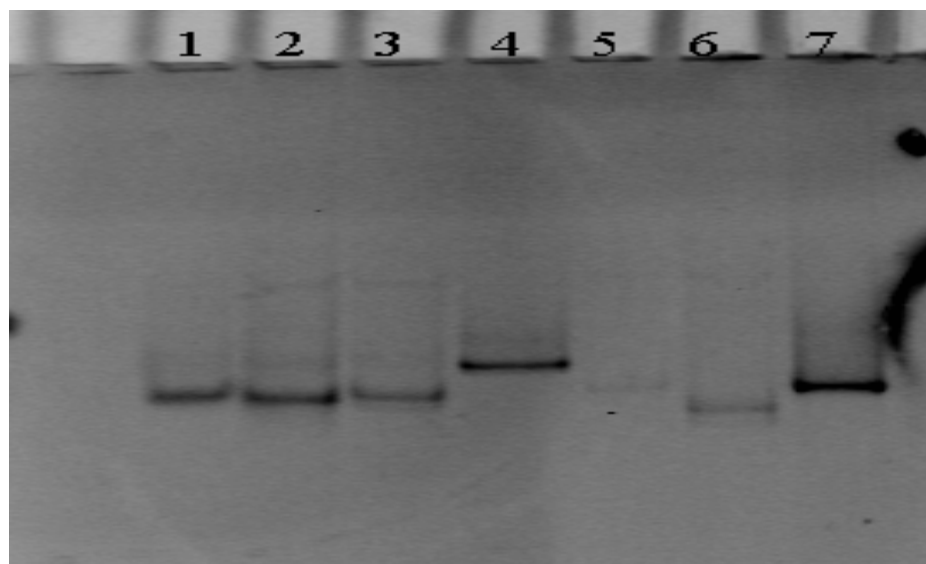


**Obr. 50:** DGGE profil analýzy karotenogénnych kvasiniek

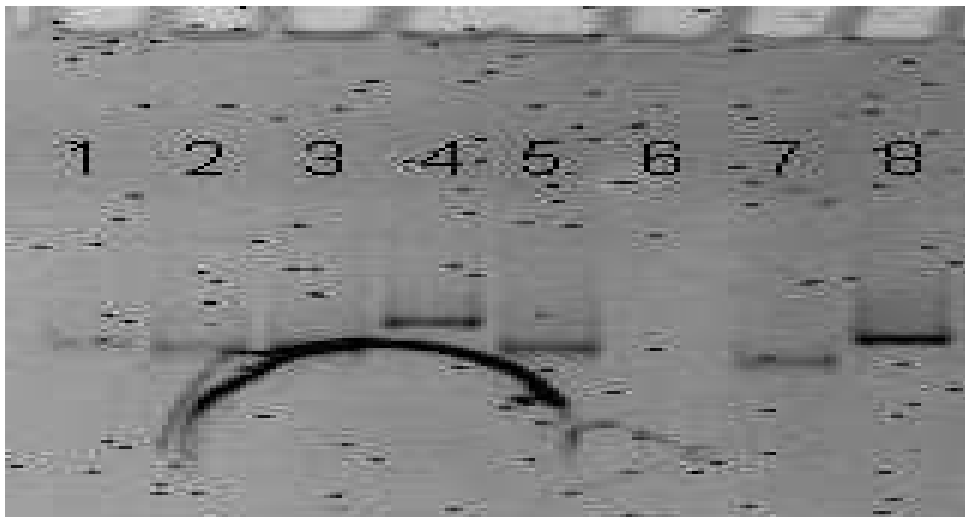
V ďalšom optimalizačnom kroku bol primer NL1 s GC smyčkou upravený na bezsmyčkový a použitý do prvej amplifikačnej reakcie. Druhá amplifikácia prebiehala rovnako ako je uvedené vyššie (kap. 8.9.3). Rovnako tak bol prevedený nový time-travel experiment, ktorého výsledkom bola optimálna doba separácie opäť 4 hodiny (obr. 51) Zo získaného DGGE profilu bolo možné už pozorovať vždy jeden fragment pre jeden daný kvasinkový druh (obr. 52).



**Obr. 51:** DGGE Time-travel experiment: RG – *Rhodotorula glutinis*, CC – *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1, M – mix RG + CC



**Obr. 52:** DGGE profil DNA úsekov z D1/D2 26S rDNA: 1- *Cystofilobasidium capitatum*, 2- *Rhodotorula aurantiaca*, 3- *Rhodotorula glutinis*, 4- *Sporobolomyces roseus*, 5- *Sporobolomyces shibatanus*, 6- *Saccharomyces cerevisiae*, 7- *Aureobasidium pullulans*

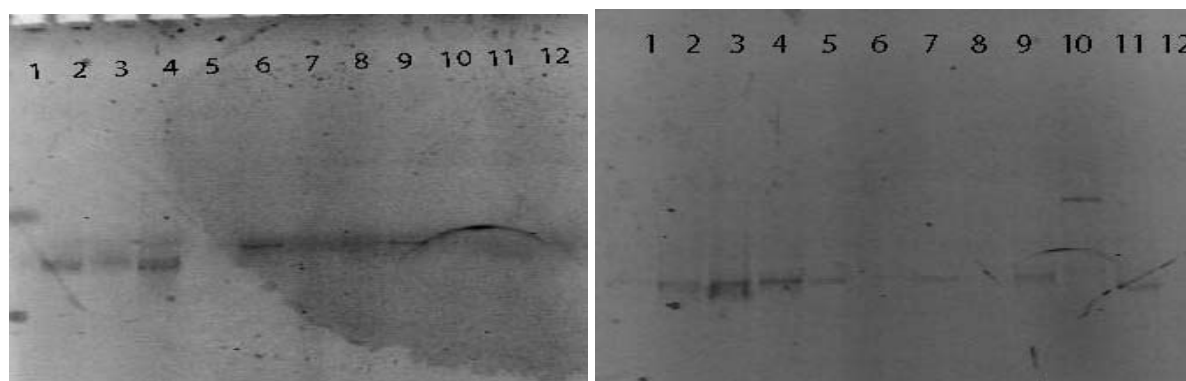


**Obr. 53:** DGGE profil DNA úsekov z D1/D2 26S rDNA: 1- *C.capitatum* 10-1-1, 2- *P.rhodozyma*, 3- *R.mucilaginosa* (*rubra*), 4- *S.roseus*, 5- *S.shibatanus*, 6- *R.glutinis*, 7- *S.cerevisiae*, 8- *A.pullulans*

Vo výslednom DGGE profile študovaných kvasinkových druhov je vidieť, že kvasinkové kmene rodov *Rhodotorula* a *Cystofilobasidium* sa od seba neodlišujú (obr. 52-53). Ako uvádzajú niektoré štúdie, rozlíšenie medzi jednotlivými druhmi rovnakého kvasinkového rodu metódou DGGE nemusí byť v niektorých prípadoch realizovateľné (Cocolin 2002). Kvasinky rodu *Sporobolomyces* majú odlišné pozície v porovnaní s ostatnými kmeňmi rovnako ako *Saccharomyces cerevisiae*. Štúdium kvasinkovitého mikroorganizmu *Aureobasidium pullulans* ukázalo, že jeho pozícia leží medzi rodmi *Rhodotorula* a *Sporobolomyces*. Pri zmenšení rozmedzia gradientu, by mohlo byť vidieť väčšie odlišnosti v pozíciách jednotlivých fragmentoch.

#### Posúdenie vplyvu extrémnych podmienok

Po selekcii a kultivácii mutantných kmeňov bola prevedená analýza úsekov DNA metódou DGGE. Cieľom bolo overiť, či malo pôsobenie mutagénny vplyv na štruktúru vysokokonzervovaných úsekov DNA 26S ribozomálnej podjednotky.



**Obr. 54:** DGGE profil DNA úsekov z D1/D2 26S rDNA:

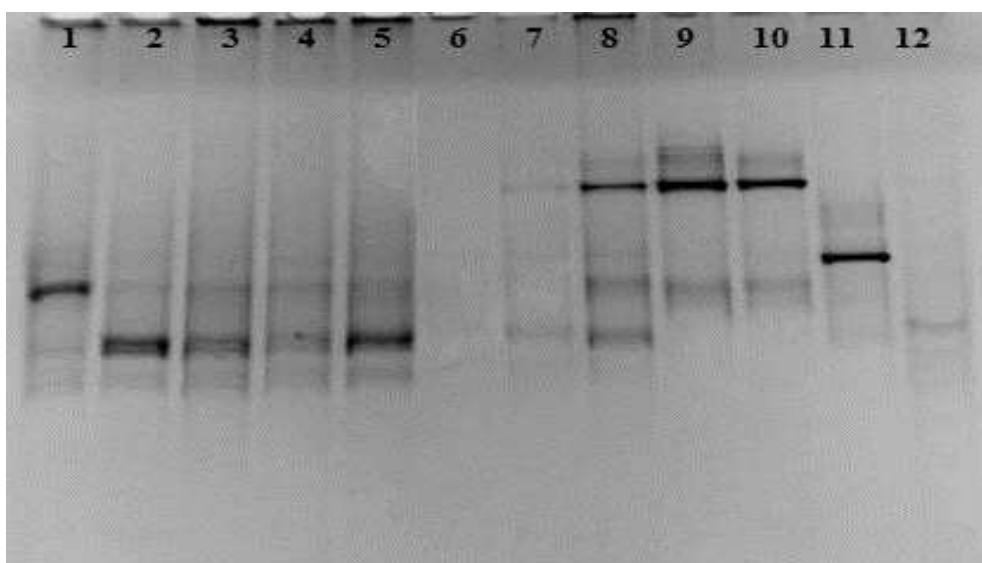
**Vľavo:** 1- *Sporobolomyces roseus* (SR), 2- SR-mutant 5 A1, 3- SR-mutant 5 A2, 4- SR-mutant 10 A1, 5- SR-mutant 10 A2, 6- *Rhodotorula mucilaginosa* (RM), 7- RM-mutant 5 A2, 8- RM-mutant 10 A2, 9- *Rhodotorula glutinis* (RG), 10- RG-mutant 5 A1, 11- RG-mutant 5 A2, 12- RG-mutant 10 A2

**Vpravo:** 1- *Rhodotorula glutinis* (RG), 2- RG-mutant 5 A1 AMG, 3- RG-mutant 10 A1 AMG, 4- RG-mutant 5 A1 Novo, 5- *Cystofilobasidium capitatum* (CC), 6- CC-mutant 5 A1 AMG, 7- CC-mutant 10 A1 AMG, 8- CC-mutant 5 A1 Novo, 9- CC-mutant 10 A1 Novo, 10- *Sporobolomyces roseus* (SR), 11- SR-mutant 5 A1 AMG, 12- SR-mutant 10 A1 AMG

Na obrázku 54 je vidieť DGGE profil kvasinkových kmeňov nemutantných a kmeňov podrobených náhodnej mutagenéze alkylačným činidlom EMS. V prípade vzoriek izolovaných z rodov *Rhodotorula* či *Cystofilobasidium* nepozorovať žiadne odchýlky v polohe fragmentov. Veľmi výraznú odchýlku v polohe fragmentov pozorujeme pri porovnaní štandardu kvasinky *Sporobolomyces roseus* s mutovanými kmeňmi (dráhy 1 až 4 vľavo, 10 až 12 vpravo). Náhodná mutagenéza pravdepodobne zasiahla do analyzovanej oblasti 26S rRNA a vyvolala zmenu sekvencie príslušného úseku DNA.

### Analýza reálnych vzoriek potravín

Pre kontrolu optimalizácie metodiky PCR/DGGE boli analyzované vybrané víne mušty, u ktorých sa dala predpokladať prítomnosť niektorých zástupcov karotenogénnych kvasiniek. Získané amplikóny reálnych vzoriek boli na DGGE gél nanosené spoločne s amplikónmi referenčných druhov. Z vínnych muštov boli analyzované vzorky muštov bieleho vína, ktoré v porovnaní s červenými poskytli menšie množstvo biomasy (hodnotené vizuálne). Táto skutočnosť znamenala, že fragmenty DNA na DGGE profile mali menej výrazný charakter. V DGGE profile vínnych muštov z červených vín sú prítomné výrazné fragmenty, ktoré nekorešpondujú so žiadnym z referenčných kmeňov (obr. 55). Ich pôvod tak môžeme prisúdiť nesacharomycétnym kvasinkám, ktoré sú bežne prítomné v prvých fázach kvasného procesu (najmä rody *Kloeckera* a *Candida*). Tento záver je v súlade s výsledkami štúdií, ktoré rovnakou metódou potvrdzujú prítomnosť rodu *Candida* po celú dobu fermentácie muštu, a to i po tom, čo procesu dominuje *Saccharomyces cerevisiae* (Cocolin 2000, Rantsiou 2013).

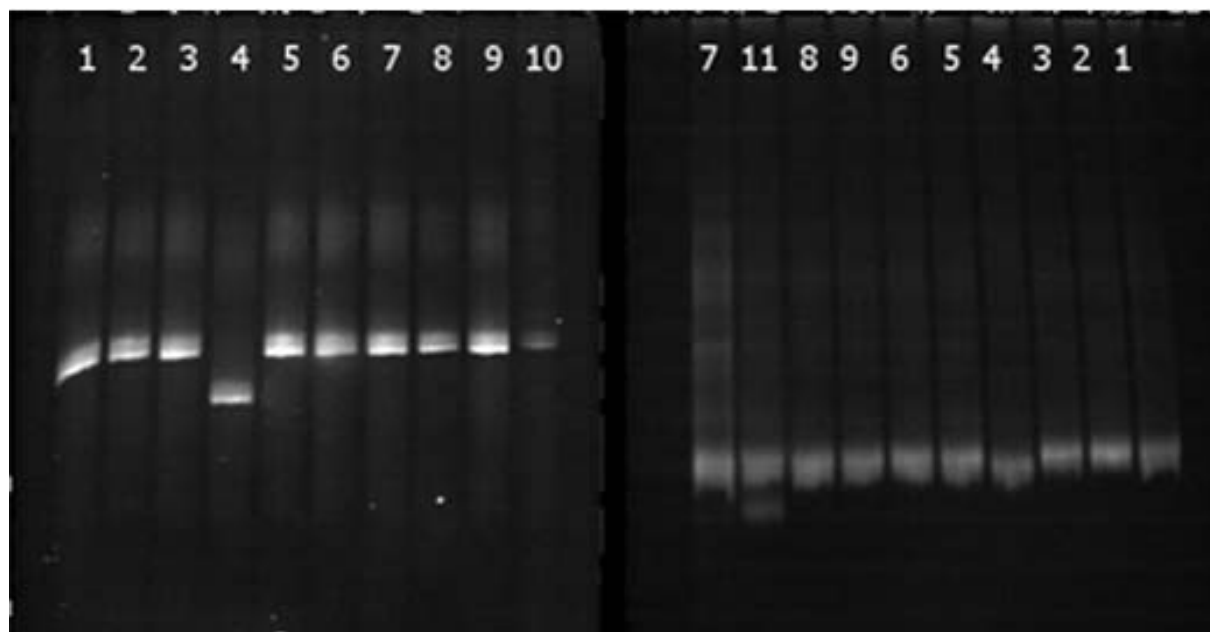


**Obr. 55:** DGGE profil referenčných kmeňov kvasiniek a vzoriek z vínnych muštov: 1- *S. roseus*, 2- *S. salmonicolor*, 3- *S. shibatanus*, 4- *R. aurantiaca*, 5- *C. capitatum* 10-1-2, 6-

*Rizling vlašský*, 7- *Dunaj*, 8- *Svätovavrinecké*, 9- *Rulandské modré*, 10- *Modrý Portugal*, 11- *Aureobasidium pullulans*, 12- *Fusarium solani*

### **Analýza karotenogénnych kvasiniek úseku DNA ribozomálnej podjednotky 26S rDNA oblasti ITS1 a 5,8-ITS2**

Po optimalizácii podmienok DGGE pre oblasť 26S D1/D2 ribozomálnej podjednotky rDNA boli podrobené analýze aj úseky ITS1 a 5,8-ITS2 oblasti všetkých karotenogénnych kvasinkových kmeňov a kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Z obrázku 56 DDGE profilu je vidieť, že na úrovni ITS1 oblasti sa medzi karotenogénnymi kmeňmi kvasiniek nenachádzajú skoro žiadne odlišnosti, až na kvasinku *Sporobolomyces roseus* a *Saccharomyces cerevisiae*. Podobne je tomu i na úrovni 5,8-ITS2 oblasti, keď je väčší rozdiel u kmeňa *Saccharomyces cerevisiae* oproti ostatným kvasinkám a kvasinke *Sporobolomyces roseus*. Výsledky pravdepodobne dokazujú veľmi blízku príbuznosť kmeňov rodu *Rhodotorula* a *Cystofilobasidium*. Použité kmene karotenogénnych kvasiniek na úrovni týchto oblastí ribozomálnej DNA tak pravdepodobne nie je možné rozlíšiť.



**Obr. 56:** DGGE profil úsekov DNA vpravo ITS1 oblasti, vľavo 5,8-ITS2 oblasti

**Tab. 35:** Označenie jednotlivých kmeňov kvasiniek v DGGE analýze

Označenie	Kvasinkový kmeň
1	<i>Rhodotorula glutinis</i>
2	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>
3	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
4	<i>Sporobolomyces roseus</i>
5	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>
6	<i>Sporobolomyces shibatanus</i>
7	<i>Cystofilobasidium capitatum 10-1-1</i>
8	<i>Cystofilobasidium capitatum 10-1-2</i>
9	<i>Phaffia rhodozyma</i>
10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> + <i>Cystofilobasidium capitatum 10-1-1</i>

### 9.5.2 Karyotypová analýza karotenogénnych kvasiniek

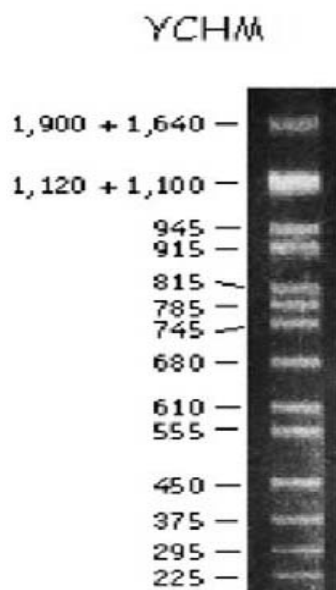
Príslušnosť mikroorganizmov k jednotlivým rodom a druhom je možné previesť pomocou molekulárnej identifikácie s využitím metódy pulznej elektroforézy. Pulzná elektroforéza je technika separácie veľkých fragmentov DNA a chromozómov uskutočnených v špeciálnom hexagonálnej aparatúre s riadenými pulzami.

Táto časť práce sa snaží o charakterizáciu karotenogénnych kvasiniek na základe ich genómu. K úspešnej analýze je však potrebná správna príprava vzoriek chromozomálnej DNA, bez akýchkoľvek porušení, degradácie či naštepenia.

V prvom kroku analýzy bola optimalizovaná príprava chromozomálnej DNA v agarózových bločkoch. Kvasinkové bunky pre prípravu bločkov boli použité z exponenciálnej fáze rastu, pretože sa predpokladá, že už i tak odolná bunčená stena postupne ešte viac silnie, takže DNA z buniek v stacionárnej fáze rastu môže byť častokrát porušená samotnou dezintegráciou bunečnej steny.

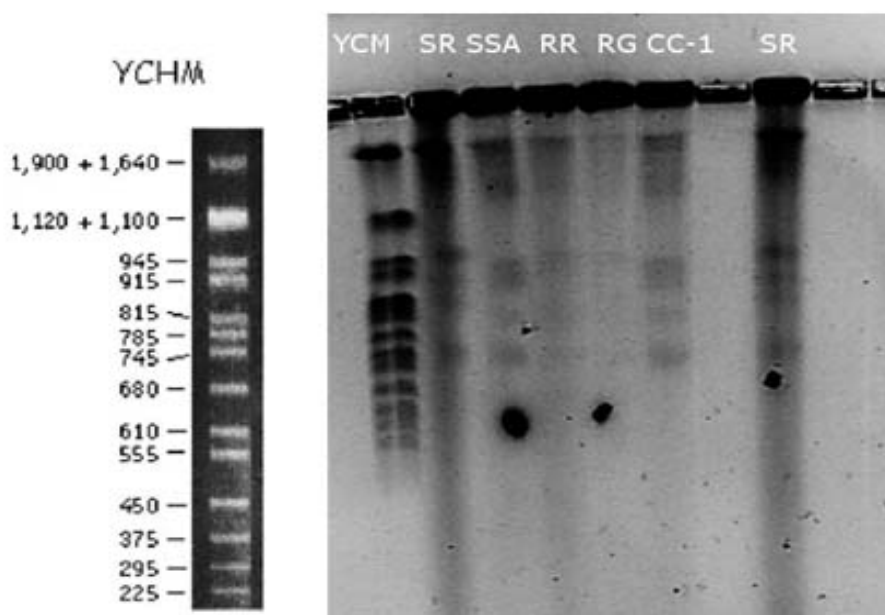
Pri izolácii chromozomálnej DNA pomocou agarózových bločkov dochádza k ochrane intracelulárnych častí buniek, čím sa zvyšuje možnosť vyizolovania nepoškodenej DNA.

Po izolácii intaktnej DNA je dôležité dbať i na nastavenie jednotlivých parametrov pulznej elektroforézy. Vhodná doba pulzných časov, vloženého napätie i doby separácie pre najoptimálnejšie rozlíšenie jednotlivých chromozómov bola optimalizovaná. Ako štandard chromozomálnej kvasinkovej DNA slúžil DNA Marker Yeast chromosome marker (YCM) kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kmeňa YPH80 s veľkosťami chromozómov určenými pre pulznú elektroforézu 225 – 1900 kb (kap.8.9.4). Výsledky z analýzy DNA karotenogénnych kvasiniek pulznou elektroforézou sú uvedené na obrázkoch 58-60.



**Obr. 57:** PFGE štandardu *S. cerevisiae*

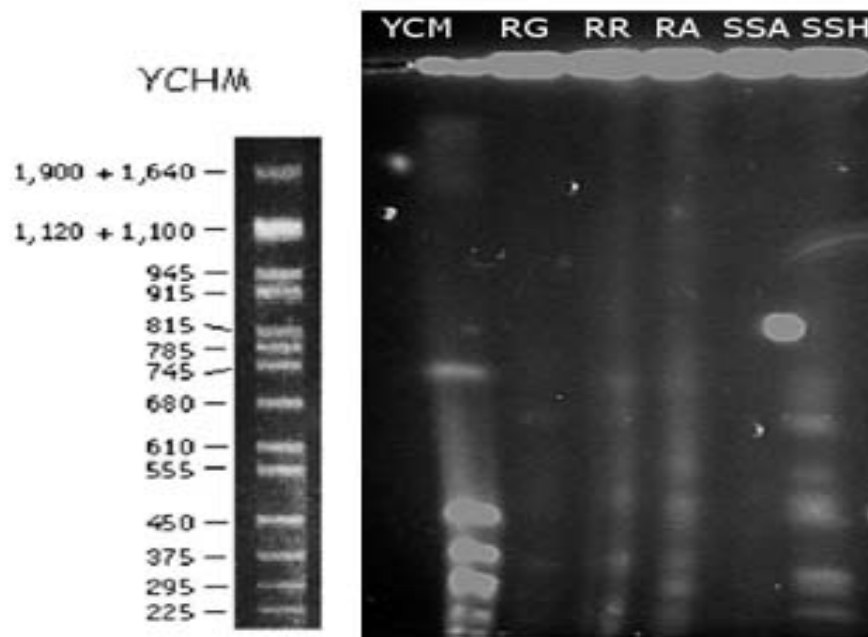
Podmienky separácie: 1.2% gel, 0.08M TBE, 162 V, 70s/15h, 100s/10h, 120s/10h, 150s/15h, 200s/15h.



**Obr. 58:** PFGE karotenogénnych kvasiniek, optimalizácia separácie menších kvasinkových chromozómov

Podmienky separácie: 1,1% géľ, 150s/15hod, 200s/20hod, 250 s/20hod, 300 s/2 hod; 130V

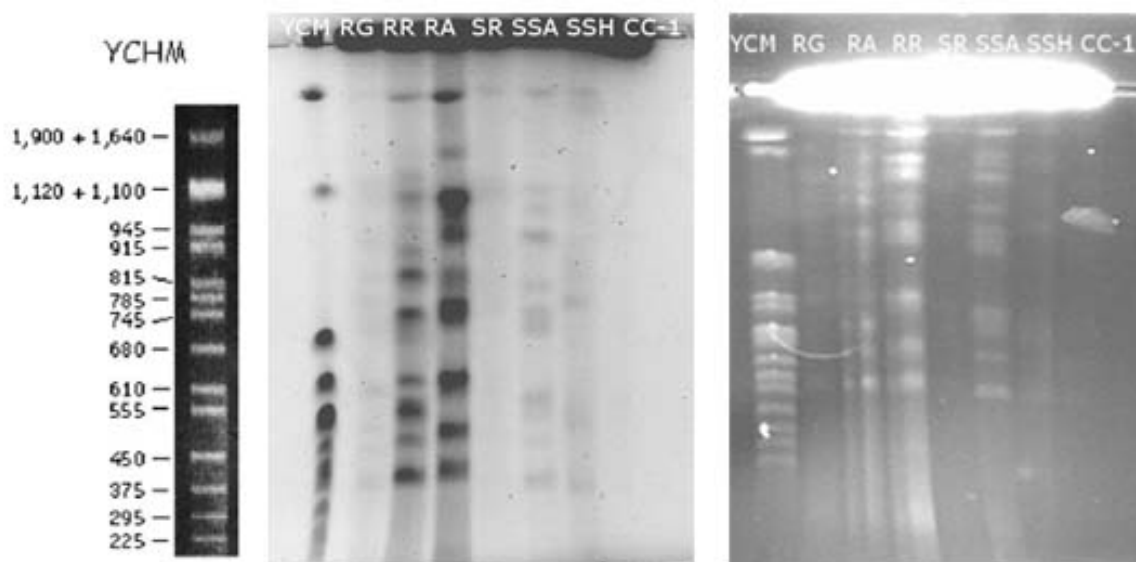
Vzorky: YCM – Yeast chromosome marker, SR – *Sporobolomyces roseus*, SSa – *Sporobolomyces salmonicolor*, RR – *Rhodotorula mucilaginosa* (rubra), RG - *Rhodotorula glutinis*, CC1- *Cystofilobasidium capiatatum* 10-1-1



**Obr.59:** PFGE karotenogénnych kvasiniek, optimalizácia separácie väčších kvasinkových chromozómov

Podmienky separácie: 1% géľ, 150s/15hod, 200 s/20hod, 300 s/20hod, 500 s/10 hod, 162 V

Vzorky: YCM – Yeast chromosome marker, RG - Rhodotorula glutinis, RR – Rhodotorula mucilaginosa (rubra), RA – Rhodotorula aurantiaca, SSA – Sporobolomyces salmonicolor, SSH – Sporobolomyces shibatanus



**Obr. 60:** PFGE karotenogénnych kvasiniek, optimalizácia separácie väčších kvasinkových chromozómov

Podmienky separácie: 1% géľ (vľavo), 1,1% géľ (vpravo), 150s/15hod, 200 s/20hod, 250 s/20hod, 300 s/20 hod, 130 V

Vzorky: YCM – Yeast chromosome marker, RG - Rhodotorula glutinis, RR – Rhodotorula mucilaginosa (rubra), RA – Rhodotorula aurantiaca, SR – Sporobolomyces roseus, SSA – Sporobolomyces salmonicolor, SSH – Sporobolomyces shibatanus, CC1 – Cystofilobasidium capitatum 10-1-1

Po úspešnej izolácii intaktnej kvasinkovej DNA bola prevedená analýza karyotypov metódou pulznej elektroforézy. V rámci testovania boli optimalizované podmienky ako koncentrácia

gélu, doby pulzných časov, veľkosť napätia. Podmienky každej separácie sú uvedené pod obrázkom.

Z výsledkov analýz vyplýva, že k lepšej separácii chromozómov dochádza pri 1,1% koncentrácii agarózového gélu. Zníženie celkového napätia znížilo celkovú pohyblivosť menších chromozómov a zároveň dobre separovalo väčšie chromozómy (obr. 60). Výsledky ukazujú, že kvasinky rodu *Rhodotorula* majú s rodom *Cystofilobasidium* veľkostne zhodné prvé štyri najmenšie chromozómy od približne 610 do 945 kbp. Zo separácie väčších chromozómov sú najlepšie vidieť výsledky kvasinky *Sporobolomyces shibatanus*. Jej veľké chromozómy majú veľkosti približne od 815 do 1500 kbp (obr. 60). DNA ostatných kvasinkových kmeňov bola viacmenej degradovaná, takže znemožnila detailné vyhodnotenie. Z výsledku pri podmienkach zníženého napätia je vidieť, že u kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* je separovaných 12 chromozómov o veľkosti 650 až pravdepodobne 1630 kbp, kvasinka *Rhodotorula mucilaginosa* bola separovaná na 11 chromozómov o podobnom veľkostnom rozmedzí ako má *Rhodotorula aurantiaca*, ale jednotlivé chromozómy sa líšia svojimi veľkosťami (obr. 60). Kmeň *Sporobolomyces salmonicolor* mal svoju DNA separovanú na 10 chromozómov od 610 až 1630 kbp a už na prvý pohľad sa líši od kmeňov rodu *Rhodotorula*. U kvasinky *Rhodotorula glutinis* bola DNA čiastočne degradovaná, počet chromozómov teda nie je možné detailne rozpoznať, avšak rozmedzie veľkostí je približne od 610 do 1630 kbp.

Záverom sa dá povedať, že jednotlivé karyotypy karotenogénnych kvasiniek sú odlišné. Líšia sa hlavne v počte a veľkosti jednotlivých chromozómov. Touto technikou je teda možné jednotlivé kvasinky identifikovať na základe ich druhovej a rodovej príbuznosti.

## 9.6 Možnosti využitia karotenogénnych kvasiniek v praxi

V predloženej práci boli študované rastové a produkčné charakteristiky karotenogénnych kvasiniek niekoľkých rodov. Ide o kvasinky, ktoré nepatria k tzv. konvenčným druhom, ako je *Saccharomyces cerevisiae* a ich praktické využitie nie je doteraz významne rozšírené. Avšak ide o intenzívne študované rody a druhy v rámci výskumu, pretože produkujú množstvo vzácných a fyziologicky aktívnych metabolitov. Študované rody *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* a *Cystofilobasidium* produkujú pomerne vysoké množstvo biomasy podľa typu kultivácie (10-45 g/l) (Márová et al. 2012), obsahujú vysokú koncentráciu proteínov (30-37 mg/1% sušiny), lipidov (11-22% sušiny) a významných lipofilných metabolitov – hlavne karotenoidov (provitamín A: 40-70 mg/l podľa typu kultivácie 1-2 mg/g sušiny), ergosterolu (provitamín D2: 2-8 mg/g sušiny) a ubiquinonu (antioxidant: 0,2-1 mg/g sušiny). Všetky uvedené vzácne lipofilné metabolity majú významné fyziologické účinky a sú produkované v paralelných vetviach všeobecnej izoprenoidnej dráhy. U karotenogénnych kmeňov je regulácia produkcie týchto metabolitov výhodná, indukcia produkcie karotenoidov súbežne vedie k indukcii produkcie ergosterolu, takže pôsobením vhodných externých faktorov je možné modulovať súbežne obsah oboch týchto provitamínov v biomase (Márová et al. 2010, Márová et al. 2012).

Význam biotechnologickej produkcie karotenoidných pigmentov stále nabýva na význame, hlavne vďaka legislatívnym obmedzeniam týkajúcim sa využívania syntetických derivátov v potravinách a doplnkoch. Doteraz najčastejšie využívanými prírodnými zdrojmi karotenoidov sú rastliny, ktoré však potrebujú pomerne dlhý čas na rast. Riasové systémy sú výhodnejšie,

avšak okrem potreby priameho osvetlenia sa vyznačujú pomerne nízkou produkciou biomasy (cca 10 g/l). Karotenogénne kvasinky by mohli byť konkurenciou práve riasám, majú podobné nároky na kultiváciu, ale rastú niekoľkonásobne rýchlejšie, za optimálnu produkčnú dobu produkujú minimálne 5x vyššie množstvo biomasy obsahujúcej sľubné množstvo karoténov (až okolo 70 mg/l). Produkciu pigmentov je možné významne ovplyvniť externým stresom, pretože sa vlastne jedná o obranné stresové metabolity kvasiniek. Ako substrát je možné využívať lacné odpady. Vývoj stratégií pre mikrobiálnu produkciu karotenoidov je teda vysoko aktuálny.

V tab. 36 sú uvedené pre zrovnanie vybrané dáta týkajúce sa produkcie karotenoidov v rôznych odpadových substrátoch (hydrolyzovaných plesňovými enzýmami) včetně intenzity ovplyvnenia produkcie. Kvasinky nielenže využívajú množstvo odpadových látok, ale sú schopné pozitívne reagovať na prítomnosť indukčných faktorov a produkovať vyššie množstvá niektorých metabolitov (Buzzini 2000, Márová et al. 2012).

Pokiaľ sa karotenogénne kvasinky využívajú ako zdroj jednotlivých metabolitov, po kultivácii nasleduje pomerne komplikovaný proces („down-stream“) izolácie karotenoidov, prípadne ďalších metabolitov, a to v maximálnom dosažitelnom množstve a s minimálnou stratou fyziologickej aktivity. Bunky kvasiniek môžu byť v niektorých prípadoch ťažko degradovateľné, pretože bunečná stena obsahuje lipoproteínové komplexy. Riešením je množnosť využitia komplexnej kvasinkovej biomasy, ktorá obsahuje aktívne metabolity v prirodzenej forme, pridodane stabilizované a okrem špeciálnych metabolitov obsahuje ešte významné množstvo proteínov a niektorých nenasýtených mastných kyselín (Boekhout 2003). Pokiaľ by takáto biomasa bola produkovaná na odpadových materiáloch, môžu niektoré z nich významne prispieť i k finálnej kvalite biomasy, ako príklad je možné uviesť srvátku (tab. 37). Pre túto stratégiu je zásadný výber vhodných produkčných kmeňov a podrobné overenie ich vlastností.

**Tab. 36:** Porovnanie produkcie karotenoidov na rôznych odpadových substrátoch

kmeň	Zdroj C	enzým	biomasa (g/l)	$\beta$ -karotén (mg/g suš)	Celkové karotenoidy (mg/g suš)	Priemerný násobok – zvýšenie produkcie karoténov
<i>R. glutinis</i>	kontrola	-	8,12	0,20	0,42	-
<i>R. glutinis</i>	cestoviny	FS	11,68	3,60	4,10	<b>10 x</b>
<i>R. glutinis</i>	jablčná vláknina	-	9,80	0,67	3,25	<b>5,6 x</b>
<i>R. glutinis</i>	pšeničná kaša	AA	6,20	0,31	0,72	<b>1,2 x</b>
<i>R. glutinis</i>	srvátka		6,8	0,40	0,53	<b>2 x</b>
<i>S. roseus</i>	kontrola	-	3,34	1,97	3,70	-
<i>S. roseus</i>	jablčná vláknina	-	5,20	2,98	6,50	<b>2 x</b>
<i>S. roseus</i>	cestoviny	-	3,70	4,77	7,23	<b>2 x</b>
<i>S. roseus</i>	srvátka	-	2,42	2,70	4,54	<b>2 x</b>
<i>S. roseus</i>	jablčné šupky	-	2,60	5,10	7,25	<b>3 x</b>
<i>S. roseus</i>	jablčná vláknina	PCH	3,36	3,43	4,89	<b>1.8 x</b>
<i>S. roseus</i>	cestoviny	PCH	3,80	4,31	6,45	<b>2 x</b>

<i>S. roseus</i>	cestoviny	AP	3,82	2,99	6,14	<b>1,7 x</b>
<i>S. roseus</i>	pšeničná kaša	AP	3,97	3,74	5,60	<b>2 x</b>
<i>S. roseus</i>	cestoviny	FS	5,30	3,60	4,20	<b>1.3 x</b>
<i>S. roseus</i>	jablčná vláknina	AP	4,02	2,54	3,90	<b>1.2 x</b>
<i>S. roseus</i>	pšeničná kaša	PCH	4,46	2,10	2,95	<b>1.1 x</b>
<i>S. roseus</i>	jablčná vláknina	AA	4,50	3,21	7,70	<b>2.2 x</b>
<i>C. capitatum</i>	kontrola	-	5,50	0,13	0,48	-
<i>C. capitatum</i>	pšeničná kaša	FS	4,62	0,18	0,77	<b>1,6 x</b>
<i>C. capitatum</i>	cestoviny	PCH	3,50	0,67	1,05	<b>2,2 x</b>

Legenda: FS- *Fusarium solani*, PCH – *Phanerochaete chrysosporium*, AA- *Alternaria alternata*, AP – *Aureobasidium pullulans*

Z doterajších výsledkov získaných v predloženej práci i v predchádzajúcich štúdiách je patrné, že všetky študované „red“ kmene využívajú alternatívne zdroje živín vrátane lignocelulózy, glycerolu, vlákniny a pod. Na odpadoch je produkcia biomasy nižšia alebo rovnaká (10-45 g/l) ako v optimálnych podmienkach (glukóza), produkcia metabolitov môže byť až niekoľkonásobne vyššia. Karotenogénne kvasinky patria k lipidotvorným druhom, produkujú v závislosti na druhu 15 – 23% lipidov v sušine a toto množstvo je možné ďalej indukovať zložením kultivačného média. Zloženie mastných kyselín karotenogénnych kvasiniek bolo rovnako podrobne študované (Čertík 2013).

**Tab. 37:** Produkcia karotenoidov niektorými kmeňmi kvasiniek – porovnanie výsledkov niektorých autorov

kmeň	Zdroj uhlíka	Typ kultivácie	Sušina (g/l)	Karotenoidy (mg/g)	Karotenoidy (mg/l)	Reference
<i>R. glutinis</i>	Glukóza	Batch	37,2	0,5	17,9	Marova, 2012
<i>R. glutinis</i>	Srvátka	Batch	44,6	1,6	66,3	Marova, 2012
<i>R. glutinis</i>	Cereálie	Batch	34,1	1,4	45,7	Marova, 2012
<i>R. mucilaginosa</i>	Zemiaky	Batch	30,1	1,7	55,9	Marova, 2012
<i>R. glutinis 32</i>	Glukóza	Batch	23,9	5,4	129,0	Bhosale, 2005
<i>R. glutinis 32</i>	Melasa	Fed-batch	78,0	2,4	183,0	Bhosale, 2005
<i>R. glutinis</i>	Glycerol	Batch	29,9	1,7	48,2	Petrik, 2013
<i>S. roseus</i>	Hydrolyzát slamy	Batch	4,2	1,5		Petrik, 2013
<i>S. roseus</i>	Hydrolyzát kávy	Fed-batch	41,2	0,8	30,5	Petrik, 2013
<i>S. shibatanus</i>	Lignocelulóza ihličie	Batch	5,4	0,5		
<i>C. capitatum</i>	Repkový odpad	Batch	8,7	0,9		

Kvasinková biomasa sa využíva celosvetovo už dlhú dobu ako komplexný zdroj živín a špecifických metabolitov. Bolo popísané množstvo priemyslových aplikácií. Svetová produkcia kvasinkovej biomasy dosahuje cca 0,4 mil. ton, pričom najmenšie predstavuje biomasa *S. cerevisiae*. Na trhu sú k dispozícii fortifikované doplnky na báze *S. cerevisiae* obohatené o rôzne vitamíny a minerály (Fe, Se, Zn), antioxidanty, tiež karotény, koenzým Q atď. Tieto preparáty sa bežne používajú pre humánne aplikácie.

Jedným z hlavných využití kvasinkovej biomasy je využitie ako zdroj bielkovín („single cell protein“ SCP). *S. cerevisiae* obsahuje 45 - 53% proteínov v sušine a je tak komplexným

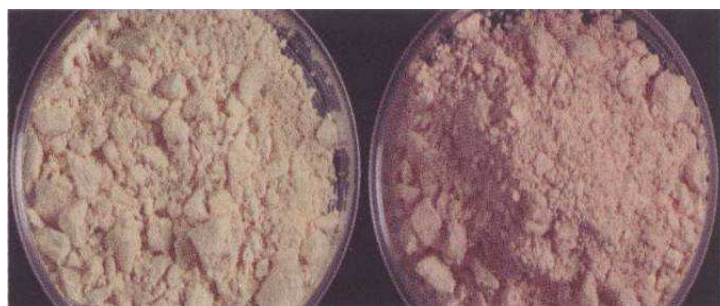
zdrojom všetkých exenciálnych aminokyselín. Ďalej obsahuje biomasa vysoké množstvo ergosterolu, k jeho produkcii sa i využíva. Obsahuje však minimum ďalších špecifických látok. Výhodou je potvrdená nepatogenita voči ľudskému a živočíšnému organizmu (Boekhout 2003).

Predložená práca sa zaoberá tiež možnosťou potenciálneho posúdenia využitia biomasy menej obvyklých rodov, hlavne *Rhodotorula*, *Cystofilobasidium* k produkcii obohatenej biomasy. Boli prevedené niektoré analýzy obsahu aktívnych látok, ktoré sú zhrnuté v tab. 38. (kultivácia bola prevedená v Erlenmeyerových bankách).

Obsah proteínov v karotenogénnych kvasinkách sa pohybuje okolo 30-38% proteínov/suš. Je to síce nižšia hodnota než u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, ale biomasa karotenogénnych kvasiniek ďalej obsahuje 15-23% lipidov/suš. („single cell oil“ SCO). Mastné kyseliny obsiahnuté v neutrálnych lipidoch týchto kvasiniek sú zastúpené hlavne kyselinou palmitovou, olejovou, linolovou a arachidónovou (Čertík 2013) v pomere cca 25-45% SFA a 50-55% UFA. Ďalej biomasa karotenogénnych kvasiniek obsahuje niekoľkokrát spomínané prirodzene stabilizované aktívne látky – najmenej 0,4 – 1,5 mg karoténov/g sušiny, 1 mg ergosterolu/g sušiny a 0,1 -0,8 mg ubichinonu/g sušiny. Výhodou je vysoká produkcia biomasy a krátka generačná doba (tab. 38).

**Tab. 38:** Charakterizácia kvasinkovej biomasy karotenogénnych kvasiniek

parameter	<i>R. glutinis</i>		<i>C. capitatum</i>	
	živé	mrtvé	živé	mrtvé
Obsah proteínov v suš. (% suš)	30,5	31,7	34,5	37,5
Obsah lipidov v suš. (%)	15,5		22,5	
Antioxidačná aktivita (mg TAEC/g suš)	5,38	7,08	3,57	4,99
$\beta$ -karotén (mg/g suš)	0,23	0,38	0,90	0,62
Celkové karotenoidy (mg/g suš)	0,31	0,78	1,07	0,85
Ubichinon (mg/g suš)	0,09	0,11	0,80	0,55
Ergosterol (mg/g suš)	1,02	1,02	1,18	1,05



**Obr. 58:** biomasa karotenogénnych kvasiniek

Obohatená biomasa kvasinky *Rhodotorula glutinis* sa už využíva pre krmivárske účely ako prísada. Problémom širšieho využitia obohatenej biomasy karotenogénnych kvasiniek pre humánne účely však zostáva potenciálna patogenita niektorých druhov. Cez to všetko však sú karotenogénne kvasinky všeobecne uvádzané jako nepatogénne pre človeka, existujú niektoré

štúdie popisujúce infekciu týmito kmeňmi u imunosuprimovaných jedincov (Papadogeorgakis 1999) Riešením je použitie šetrne inaktivovanej biomasy, čo je možné previesť zahriatím na 85°C po dobu 20 min. Bolo overené, že tento zákrok bunky neprežijú, ale obsah aktívnych látok i celková antioxidačná aktívia buniek zostáva i po inaktivácii zachovaná. Parametre charakterizujúce inaktivovanú biomasu sú uvedené v tabuľke 38.

Z uvedených údajov je jasné, že karotenogénne kvasinky môžu byť vhodným zdrojom pre biotechnologickú produkciu jednotlivých karotenogénnych pigmentov i celej skupiny lipidov, ergosterolu a ubichinonu. Perspektívne je tiež potenciálne využitie obohatenej kvasinkovej biomasy, ktoré však bude vyžadovať ešte ďalšie testy za účelom overenia bezpečného použitia.

## 10 ZÁVERY

- ❖ Cieľom dizertačnej práce bolo štúdium regulácie biotechnologickej produkcie karotenoidov a vybraných lipidických látok pomocou červených kvasiniek rodov *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* a *Cystofilobasidium*. Aby sa zvýšil výťažok karoténových pigmentov a zároveň sa znížila cena biotechnologického procesu, práce boli zamerané na optimalizáciu podmienok kultivácie. Boli študované efekty takých faktorov, ako koncentrácia nutričných zdrojov, minerály, vitamíny, teplota, svetlo, stres vplývajúce na bunecný rast a výťažky sledovaných metabolitov. Zmeny produkcie biomasy a zmeny prebiehajúce v bunkách kvasiniek boli sledované pomocou rastových charakteristík a morfológických znakov, predovšetkých na metabolickej úrovni. Bol sledovaný vplyv podmienok na množstvo produkovaných karotenoidov, ergosterolu prípadne ubichinonu.
- ❖ Ako potenciálne zdroje uhlíka a dusíka bolo testovaných množstvo zdrojov z agropriemyselných odpadových materiálov, ktoré boli tiež modifikované pomocou extracelulárnych enzymatických preparátov či komerčných enzýmov. Po použití enzýmovej hydrolýzy sa do produkčných médií uvoľnilo viac monosacharidov využiteľných kvasinkami z komplexných sacharidových zdrojov. Tiež boli študované možnosti využitia lignocelulóзовých odpadov a posúdené efekty potenciálnych toxických zložiek odpadov na rast, metabolickú aktivitu a výťažky. V médiách boli monitorované zmeny koncentrácie substrátu pomocou spektrofotometrických techník a zmeny zloženia komplexných sacharidových cereálnych substrátov pomocou kvapalinovej chromatografie s refraktometrickou detekciou (RP-NH2/HPLC/RI).
- ❖ V práci boli prevedené kultivačné experimenty na nehydrolyzovaných odpadových materiáloch s dvoma typmi repkového substrátu líšiacimi sa obsahom lipidov. Najskôr boli stanovené rastové charakteristiky. Zistilo sa, že krivky majú prevažne dvojfázový charakter rastu, čo odpovedá postupnej konzumácii endogenných substrátov v neskoršej stacionárnej fáze rastu. Množstvo biomasy i metabolitov je nižšie než u glukózových médií, avšak priebeh produkcie viacmenej kopíruje priebeh produkčných vlastností na glukóze. V samotných kultivačných experimentoch sa do produkčných médií pridával repkový substrát s glukózou v rôznych pomeroch. Sledoval sa vplyv odpadového substrátu na produkčné vlastnosti kvasinkových kmeňov. Tieto vlastnosti sa od seba líšili druhovo. Zatiaľčo kvasinka *Rhodotorula glutinis* mala najvyššie produkcie metabolitov i biomasy v médiách s prídavkom repkového substrátu o koncentrácii 25% z celkových uhlíkatých zdrojov, u kvasinky *Sporobolomyces roseus* to bolo v médiu s 50% koncentraciou repky. V tomto médiu boli produkcie karotenoidov dvojnásobné v porovnaní s glukózovým kontrolným médiom. Zvyšujúce sa koncentrácie repkového substrátu majú skôr inhibičný efekt na rast i samotnú produkciu metabolitov pravdepodobne kvôli obsahu antinutričných látok.

- ❖ Ďalšie experimenty boli zamerané na kultiváciu karotenogénnych kvasiniek na hydrolyzovaných odpadových materiáloch. Odpadové materiály boli hydrolyzované použitím komerčných enzýmových preparátov a extracelulárnych enzýmov izolovaných z plesní *Fusarium solani* a *Phanerochaete chrysosporium*. Produkcia biomasy bola na odpadových substrátoch hydrolyzovaných s komerčnými enzýmami prevažne nižšia než v kontrolných médiách. Kmene však preferovali určitý typ použitého substrátu. Kvasinka *Cystofilobasidium capitatum* a *Rhodotorula glutinis* lepšie využívali cestovinové a ryžové substráty hydrolyzované preparátom AMG, zatiaľčo *Rhodotorula mucilaginosa* a *Rhodotorula aurantiaca* cestoviny a ryžu hydrolyzovanú preparátom Novozym 188. V týchto médiách boli dosiahnuté najvyššie produkcie karotenoidov i majoritného pigmentu  $\beta$ -karoténu (516 ug/g suš. u kvasinky *Rh. mucilaginosa*). V médiách s odpadovými substrátmi hydrolyzovanými extracelulárnymi enzýmami z plesní bola produkcia biomasy nízka pravdepodobne z dôvodu nízkej koncentrácie uvoľnených jednoduchých sacharidov z komplexných substrátov. I tu kvasinky preferovali určitý substrát hydrolyzovaný určitými enzýmami. Kvasinky *C. capitatum*, *Rh. aurantiaca* a *Rh. mucilaginosa* dosiahli najvyššie produkcie pigmentov v médiách s pšeničnými otrubami hydrolyzovanými enzýmami z plesne *Phanerochaete chrysosporium*. Väčšina kvasinkových kmeňov tiež dobre využívala ryžový substrát, kde boli dosiahnuté zvýšené produkcie karotenoidov i lipidických látok. Vo viacerých médiách boli zvýšené produkcie celkových karotenoidov, avšak produkcia  $\beta$ -karoténu bola nízka, čo svedčí o zmene metabolizmu syntézy pigmentov v závislosti od typu nutričného zdroja.
- ❖ K získaniu nadprodukčných kmeňov boli testované aj adaptačné procesy a mutačné experimenty na kvasinkách. K príprave mutantov bola využitá náhodná mutagenéza pomocou alkylačných činidiel. Vybrané neupravené aj hydrolyzované odpadové materiály boli testované k selekcii nadprodukčných kvasinkových kmeňov (glycerol, vaječné nehydrolyzované cestoviny, hydrolyzované cestoviny a hydrolyzovaná ryža). U všetkých odpadových substrátov všeobecne nebol pozorovaný výrazný nárast biomasy oproti kontrolným médiám s nemutantnými kmeňmi kvasiniek. Mierne zvýšené produkcie boli sledované hlavne u odpadových substrátov ako je glycerol a hydrolyzované cestoviny či ryža. Mutanti kvasinky *Sporobolomyces roseus* sa prejavili ako najlepší producenti karotenoidov cca 2,5 mg/g suš. i  $\beta$ -karoténu cca 1,5 mg/g suš. Tento kmeň bol najlepším producentom i lipidických látok – ergosterolu a koenzýmu Q. U mutantných kvasinkových kmeňov rodu *Rhodotorula* a *Cystofilobasidium* selektovaných na hydrolyzovaných cestovinách dochádzalo k nadprodukcii pigmentov prevažne v médiách, kde hlavným zdrojom uhlíka bola glukóza. Rovnako to bolo aj v produkcii koenzýmu Q, kde na produkčnom médiu s obsahom glukózy mutantný kmeň *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 dosiahol až 40-krát vyššiu produkciu v porovnaní s kontrolným médiom.
- ❖ V ďalšej časti kultivačných experimentov bol testovaný hydrolyzovaný lignocelulóзовý materiál využívaný prevažne na výrobu biopalív i k produkcii karotenových pigmentov. Lignocelulóзовé materiály sú lacné odpadové substráty, ktoré po hydrolyze obsahujú množstvo inhibičných látok vplývajúcich na rast kvasiniek. Z výsledkov však vyplýva, že červené kvasinky sú schopné využívať i tento materiál

a produkovať dokonca zvýšené množstvá sledovaných metabolitov v závislosti na koncentrácii použitého materiálu. Z testovania vplyvu hlavných inhibítorov obsiahnutých v hydrolyzáte sa zdá byť furfural kritickou látkou inhibujúcou samotný rast buniek. Využitím vhodnej detoxikačnej metódy na odstránenie tejto látky z hydrolyzátu môžu byť kvasinky jedným zo sľubných mikroorganizmov využívaných ku komerčnej produkcii pigmentov, sterolov či obohatenej biomasy pomocou lignocelulózového borovicového materiálu ako lacného zdroja uhlíka.

- ❖ V ďalšej časti práce boli na monitoring komplexných metabolických zmien v kvasinkových bunkách využité techniky ako PCR - polymerázová reťazová reakcia, DGGE - denaturačná gradientová gelová elektroforéza a PFGE - pulzná gelová elektroforéza. Analýza špecifických konzervovaných úsekov rDNA, konkrétne D1/D2 oblasť ribozomálnej 26S podjednotky a ITS regionu, bola prevádzaná v spojení PCR s DGGE. Analýzy celkových karyotypov karotenogénnych kvasiniek boli realizované pomocou PFGE. Najskôr boli optimalizované PCR reakcie a metóda DGGE. Ako optimálne denaturačné rozmedzie bolo stanovené 30-45% gradient denaturačných činidiel, doba separácie 6 hodín. Z výsledkov DGGE profilov pre analyzované oblasti rDNA vyplýva, že všetky karotenogénne kvasinkové kmene majú v týchto úsekoch veľmi podobné sekvencie. Výnimku tvorí kmeň *Sporobolomyces roseus*. Pri sledovaní DGGE profilov mutantných kmeňov bolo zistené, že náhodná mutagenéza nezasiahla sledované úseky rDNA okrem mutantného nadproduktného kmeňa *Sporobolomyces roseus*, kde iná pozícia fragmentu DNA naznačovala zmenu v sekvencii daného úseku.
- ❖ K určeniu karyotypov karotenogénnych kvasiniek bola optimalizovaná izolácia intaktnej chromozomálnej DNA, k separácii samotných chromozómov pulzné časy, doba separácie, veľkosť napätia. Ideálne podmienky boli stanovené na celkovú dobu separácie 75 hodín, s parametrami 150s/15hod, 200 s/20hod, 250 s/20hod, 300 s/20 hod; 1% agarózový gél a napätie 130 V. Pri týchto podmienkach bolo separovaných 12 chromozómov kvasinky *Rhodotorula aurantiaca*, 11 chromozómov u kvasinky *Rh. mucilaginoso*, 10 chromozómov u kvasinky *S. salmonicolor*. Z výsledkov je zrejmé, že jednotlivé karotenogénne kvasinky sa od seba odlišujú rôznou veľkosťou i počtom chromozómov. Na základe tejto techniky je teda možné jednotlivé kmene od seba odlíšiť.
- ❖ V rámci práce bolo otestované využitie Ramanovej spektrometrie a fluorescenčnej mikroskopie k rýchlej detekcii sledovaných metabolitov a významných lipidov počas kultivácií karotenogénnych kvasiniek. Detekcia lipidov prebiehala farbením Nílskou červeňou a sledovaním pod fluorescenčným mikroskopom, ďalej bola potvrdená i použitím Ramanovej mikrospektrometrie spolu s detekciou  $\beta$ -karoténu na základe pomeru špecifických pík v Ramanovom spektre. Ramanova spektrometria má značné využitie pri selekcii kmeňov kvasiniek pre produkciu lipidov na výrobu vyššej generácie biopalív a rôznych potravinových doplnkov.
- ❖ Aplikované výstupy z tejto práce môžu byť výhodné ekonomicky i ekologicky. Použitie lacných odpadových substrátov a jednoduchých modifikácií na jednotlivé komponenty média jednak zníži zaťaženie životného prostredia odpadmi, a zároveň zníži náklady na priemyselnú biotechnologickú produkciu vybraných metabolitov.

Biotechnologické využitie týchto špecifických karotenogénnych kvasinkových kmeňov má svoje výhody aj v použití obohatenej kvasinkovej biomasy v krmivárskom priemysle, samotné pigmenty, provitamíny a vitamíny sú využívané vo farmaceutickom a potravinárskom priemysle.

## 11 POUŽITÁ LITERATÚRA

A. CIEGLER, M. ARNOLD, R. F. ANDERSON: *Microbiological production of carotenoids. IV. Effect of various grains on production of beta-carotene by mated strains of Blakeslea trispora*. Applied Microbiology 1999. 7: p. 94-98

A. HALIENOVA, I. MAROVA, M. CARNECKA, H. KONECNA, V. HANUSOVA, and V. HEZINOVA: *Proteome and metabolome changes in red yeasts grown under exogenous stress*. Journal of Biotechnology, 2007. 131(2, Supplement 1): p. S202-S202. ISSN 0168-1656

A. HEIM, U. KAMIONOWSKA, M. SOLECKI: *The effect of microorganism concentration on yeast cell disruption in a bead mill*. Journal of Food Engineering 2007; 83: 121-128

A. K. PEARCE and T. C. HUMPHREY: *Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint pathways*. Trends in Cell Biology, 2001. 11(10): p. 426-433. ISSN 0962-8924

A. M. MARTIN, L. CHUN, R. P. THAKOR: *Growth parameters for the yeast Rhodotorula rubra grown in peat extract*. Journal Fermentation Bioengineering, 1994. 76: p. 321-325

A. P. GASCH, P. T. SPELLMAN, C. M. KAO, O. CARMEL-HAREL, M. B. EISEN, G. STORZ, D. BOTSTEIN, and P. O. BROWN: *Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes*. Molecular Biology of the Cell, 2000. 11(12): p. 4241-4257. ISSN 1059-1524

A. P. GASCH and M. WERNER-WASHBURNE: *The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation*. Functional & Integrative Genomics, 2002. 2(4-5): p. 181-192. ISSN 1438-793X

A. P. J. MIDDELBERG: *Process-scale disruption of microorganisms*. Biotechnology Advances, 1995. 13(3): p. 491-551. ISSN 0734-9750

AKSU A, TUGBA EREN A: *Carotenoids production by the yeast Rhodotorula mucilaginosa: Use of agricultural 5 wastes as a carbon source*. Process Biochem 2005; 40: 2985-2991, doi:10.1016/j.procbio.2005.01.011

AL Aidan, Alwaleed, et al. *Rapid PFGE method for fingerprinting of Serratia marcescens isolates*. Journal of Microbiological Methods. 2009, 78, s. 238-241

ALMEIDA J, MODIG T, PETERSSON A, HAHN-HÄGERDAL B, LIDÉN G, GORWA-GRAUSLUND M-F. *Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae*, J. Chem. Technol.&Biotechnol.2007; 82: 340-349.

ALMEIDA J. R. M., RUNQUIST D., SANCHÉZ NOGUÉV., LIDEN G., GORWA-GRAUSLUND M. F.: *Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast Saccharomyces cerevisiae*, Biotechnology Journal, 2011, 6 (3): p. 286-299

ATTFIELD, P.V.: *Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast*. Nature Biotechnology, 1997. 15(13),s. 1351-1357

B. F. BREHM-STECHER: *Flow cytometry*. Encyclopedia of Food Microbiology. 2014; 943-953

B. V. LATHA, K. JEEVARATNAM, H. S. MURALI, and K. S. MANJA: *Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of Rhodotorula glutinis DFR-PDY from natural source*. Indian Journal of Biotechnology, 2005. 4: p. 353-357. ISSN 0972-5849

BARD, M., LEES, N.D., TURI, T., CRAFT, D., COFRIN, L., BARBUCH, R.: *Sterol synthesis and viability of erg11 (cytochrome P450 lanosterol demethylase) mutations in Saccharomyces cerevisiae and Candida albicans*. Lipids, 1993; vol. 28: p. 963–7

BASIM, Esin; BASIM, Huseyin. *Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology*. Turkish Journal of Biology 2001, 25, s. 405-418

BD BIOSCIENCES: *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide*. 2000.; San Jose, California.

BHALLA T. CH., SHARMA N. N. and SHARMA M.: *Production of metabolites, Industrial enzymes, Amino acid, Organic acids, Antibiotics, Vitamins and Single cell proteins*. Food and Industrial Microbiology, (electronic, dostupné na: <http://www.scribd.com/doc/35081543/Enzymes-in-Food-Tech-Good>)

BÍLKOVÁ, K.; KRÁLOVÁ, B.: *Izolace biomakromolekul*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Praha 1998. 206 s. ISBN 80-7080-288X

BOEKHOUT, T.; ROBERT, V.: *Yeasts in food*. Cambridge England: Woodhead Publishing Ltd, 2003. 487 s. ISBN 0-8493-1926-9.

BONIN C., LAL R.: *Bioethanol potentials and Life-cycle assessments of biofuel feedstocks*. Critical reviews in Plant Sciences, 2012. 31: p. 271-289

BOUCHAL P., KUČERA I.: *Dvourozměrná elektroforéza v proteomice: principy a aplikace*. Chemické listy, 2003. 97: s. 29-36

BUZZINI P, MARTINI A. *Production of carotenoids by strains of Rhodotorula glutinis cultured in raw materials of agro-industrial origin*. Bioresour Technol 2000; 71: 41–44.

CLARK J. H., LUGUE R., MATHARU A. S.: *Green chemistry, Biofuels and Biorefinery*, in: Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 2012, Vol. 3, p. 183-207

COCOLIN L., AGGIO D., MANZANO M., CANTONI C., COMI G.: 2002. *An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk*. International Dairy Journal [online]. Roč. 1, č. 5, s. 407-411

COCOLIN L., BISSON L. F., MILLS D. A.: *Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations*. FEMS Microbiology Letters, 2000, Vol. 189, Issue 1, pp. 81-87

ČERTIK M., ADAMECHOVA Z., GUOTHOVA L.: *Simultaneous enrichment of cereals with polyunsaturated fatty acids and pigments by fungal solid state fermentations*. Journal of Biotechnology 2013; 168: 130-134

D. J. JAMIESON: *Oxidative stress responses of the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1998. **14**(16): p. 1511-1527. ISSN 0749-503X

DANIEL, H.M.; MAYER, W.: *Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts*. International Journal of Food Microbiology, 2003. V. 86. s. 61 – 78.

DEÁK, T.: *Application of molecular techniques in wine microbiology*. A review. Acta Alimentaria, 2002. Vol. 31 (1), s. 37 – 44.

DEÁK, T.: *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. 2nd ed. CRC Press, New York. 2008. 325 s. ISBN 1-4200-4493-1.

ERCOLINI D.: *PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food*. Journal of Microbiological Methods, 2004, Vol. 56, Issue 3, pp. 297-314.

F. ESTRUCH: *Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast*. FEMS Microbiology Reviews, 2000. **24**(4): p. 469-486. ISSN 0168-6445

F. POSAS, J. R. CHAMBERS, J. A. HEYMAN, J. P. HOEFFLER, E. NADAL, and J. ARINO: *The transcriptional response of yeast to saline stress*. The Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(23): p. 17249-17255. ISSN 0021-9258

FRENGOVA G, SIMOVA E, PAVLOVA K, BESHKOVA B, GRIGOROVA D. *Formation of carotenoids by Rhodotorula glutinis in whey ultrafiltrate*. Biotechnol Bioeng 1994; 44: 888–894.

FRENGOVA GI, BESHKOVA D.M.: *Carotenoids from Rhodotorula and Phaffia: Yeasts of biotechnological importance*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 2009; 36: 163–180.

G. A. ARMSTRONG and J. E. HEARST: *Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis*. The FASEB Journal, 1996. **10**(2): p. 228-237. ISSN 0892-6638

G. BRITTON, S. LIAAEN-JENSEN, and H. PFANDER: *Carotenoids, Volume 4: Natural Functions*. 2008, Basel – Boston - Berlin: Birkhäuser Verlag. 370 p. ISBN

978-3-7643-7498-3

G. G. PERRONE, S. X. TAN, and I. W. DAWES: *Reactive oxygen species and yeast apoptosis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2008. **1783**(7): p. 1354-1368. ISSN 0167-4889

G. I. FRENGOVA and D. M. BESHKOVA: *Carotenoids from Rhodotorula and Phaffia: yeasts of biotechnological importance*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009. **36**(2): p. 163-180. ISSN 1367-5435

G. M. WALKER: *Yeast Physiology and Biotechnology*. 1998, West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd. 362 p. ISBN 0-471-964468

GAIROLA K., SMIRNOVA I.: *Hydrothermal pentose to furfural conversion and simultaneous extraction with SC-CO<sub>2</sub> – Kinetics and application to biomass hydrolysates*. Bioresources Technology, 2012. 123 (0): p. 592-598

GREEN, S.J., M.B. LEIGH a J.D. NEUFELD.: (2009): *Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis*. In: Timmis K. N. (ed.), Microbiology of Hydrocarbons, Oils, Lipids, and Derived Compounds, 4137 4158. Springer, Heidelberg

GREGORY M. MUELLER, Gregory M. Gerald F. 2004. *Biodiversity of fungi inventory and monitoring methods*. [Online-Ausg.]. Amsterdam: Elsevier Academic Press. ISBN 00-804-7026-2.

H. J. NELIS and A. P. DE LEENHEER: *Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds*. Journal of Applied Microbiology, 2008. **70**(3): p. 181 - 191. ISSN 1364-5072

HARTL, DANIEL L A ELIZABETH W JONES. *Genetics: analysis of genes and genomes*. 7th ed. Sudbury, Mass.: Jones and Bartlett, c2009. ISBN 978-076-3758-684

HARZ, M.; ROSCH, P.; PESCHKE, K.D.; RONNEBERGER, O.; BURKHARDT, H.; POPP, J. *Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus Staphylococcus and dependence on their cultivation conditions*. Analyst 2005, 130, 1543-1550.

HERZ S., WEBER R. W. S., ANKE H., MUCCI A., DAVOLI P.: *Intermediates in the oxidative pathway from torulene to torularhodin in the red yeasts Cystofilobasidium infirmominatum and C. capitatum (Heterobasidiomycetes, Fungi)* Phytochemistry 2007; 68: 2503-2511

HIRASAWA T., YOSHIKAWA K., NAKAKURA Y., NAGAHISA K., FURUSAWA CH., KATAKURA Y., SHIMIZU H. and SHIOYA S.: *Identification of target genes conferring ethanol etrss tolerance to Saccharomyces cerevisiae based od DNA microarray data analysis*. Journal of Biotechnology, 2007. 131: p. 34-44

HOADLEY R. B.: *Understanding wood: a craftsman's guide to wood technology*. 2nd edition ed, 2000

HON D. N. S.: *Chemical modification of Lignocellulosic materials*. Marcel Dekker 1996

HERSCHLEB, Jill; ANANIEV, Gene; SCHWARTZ, David C. *Pulsed-field gel electrophoresis*. Nature Protocols. 2007, vol. 2, no. 3, s. 677-684

CHAUVEAU-DURIOT B, DOREAU M., NOZIERE P., GRAULET B.: *Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: validation of a novel UPLC method*. Anal Bioanal Chem 2010; 397: 777-790

CHEN X., SHEKIRO J., FRANDEN M. A., WANG W., ZHANG M., KUHN E., JOHNSON D. K., TUCKER M. P.: *The impact of deacetylation prior to dilute acid pretreatment on the bioethanol process*. Biotechnological Biofuels, 2012. 5: p.8

I. MAROVA, E. BREIEROVA, R. KOCI, Z. FRIEDL, B. SLOVAK, and J. POKORNA: *Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of carotenogenic yeasts*. Annals of Microbiology, 2004. **54**(1): p. 73-85. ISSN 1590-4261

INNIS, Michael A. c1990. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, xviii, 482 p. ISBN 01-237-2181-4.

J. TINOI, N. RAKARIYATHAM, and R. L. DEMING: *Simplex optimization of carotenoid production by Rhodotorula glutinis using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate*. Process Biochemistry, 2005. **40**(7): p. 2551-2557. ISSN 0032-9592

K. GNANESHWAR GOUD, et al.: *Enhanced production of beta-D-fructofuranosidase by Saccharomyces cerevisiae using agro-industrial wastes as substrates*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.08.001>

KAMM J.: *A new class of plants for a biofuel feedstocks energy crop*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2004. 113 (1-3): p. 55-70

KELLNER R., L.F., MEYER H.E.: *Microcharacterization of Proteins* 2nd WILEY VCH . 1999. 325 s. ISBN 3-527-30084-8.

KLEIN, H.P.: *Synthesis of lipids in resting cells of Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology, 1955, vol. 69: p. 620-627

KRÁLOVÁ, B.; FUKAL, L.; RAUCH, P.; RUML, T.: *Bioanalytické metody*. Praha 2001. s. 254. ISBN 80-7080-449-1.

KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ A.: *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*, Alfa Bratislava, 1990, p. 528, ISBN 3-527-26162-1

KURTZMAN, Cletus. 2011. *The yeasts: a taxonomic study*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, xxii, 289, 48, 178 s. ISBN 978-012-3847-089.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J.: *Phylogenetic relationships among yeasts of the Saccharomyces complex determined from multigene sequence analyses*. *FEMS Yeasts Research*, 2003b. Vol. 3, s. 417 – 432.

LI-CHAN E.C.Y.: *The applications of Raman spectroscopy in food science*, *Trends in Food Science and Technology* 7, 1996, 361 – 370.

M. J. WAITES, N. L. MORGAN, J. S. ROCKEY, and G. HIGTON: *Industrial Microbiology: An Introduction*. 2001, Oxford: Wiley-Blackwellp. ISBN 978-0-632-05307-0

M. PENNINCKX: *A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses*. *Enzyme and Microbial technology* 2000. 26: p. 737-742

MARGALITH, P.: Vitamin D: The biotechnology of ergosterol. In: *Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors, chapter 5*, Elsevier Science Publisher LTD, 1989, Ed. Vandamme, E.J., England, 1989, p.81-94

MAROVA I., ČARNECKA M., HALIENOVA A., ČERTIK M., DVOŘÁKOVÁ T., HÁRONIKOVÁ A.: *Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production*. *Journal of Environmental management* 2012, 95: p. 338-342

MAROVA I, CARNECKA M, HALIENOVA A, KOCI R, BREIEROVA E. *Production of carotenoid/ergosterol-supplemented biomass by red yeast Rhodotorula glutinis under external stress*. *Food Technol Biotechnol* 2010; 48: 56-61.

MILLS D. A., JOHANNSEN E. A., COCOLIN L.: *Yeast diversity and persistence in Botrytis-affected wine fermentations*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, Vol. 68, No. 10, pp. 4884-4893.

NAUMOV, G.I.; JAMES, S.A.; NAUMOVA, E.S.; LOIS, E.J.; ROBERTS, I.N.: Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mitakae*. *International Journal of Systematic Evolution Microbiology*, 2000. Vol. 50, s. 1931 – 1942.

NAUMOV, G.I.; NGUYEN, H.-V.; NAUMOVA, E.S.; MICHEL, A.; AIGLE, M.; GAILLARDIN, C.: Genetics identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* a cider-fermenting yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 2001. Vol. 65, s. 163 – 171.

P. BHOSALE: *Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003. 63(4): p. 351-361. ISSN 0175-7598

P. BHOSALE and R. V. GADRE: *Production of  $\beta$ -carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis**. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001. **55**(4): p. 423- 427. ISSN 0175-7598

P. BUZZINI and A. MARTINI: *Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin*. Bioresource Technology, 2000. **71**(1): p. 41-44. ISSN 0960-8524

P. BUZZINI, M. GOBBETTI, J. ROSSI: *Utilization of grape must and concentrated rectified grape must to produce gluconic acid by *Aspergillus niger* in batch fermentation*. Biotechnological Letters. 1993. 15: p. 151-156

P. DAVOLI and R. W. S. WEBER: *Carotenoid pigments from the red mirror yeast, *Sporobolomyces roseus**. Mycologist, 2002. **16**(3): p. 102-108. ISSN 0269-915X

P. DAVOLI, V. MIERAU, and R. W. S. WEBER: *Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis**. Applied Biochemistry and Microbiology, 2004. **40**(4): p. 392-397. ISSN 0003-6838

P. CH. BHATT, M. AHMAD, B. PANDA: *Enhanced bioaccumulation of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma* by utilising low-cost agro products as fermentation substrate*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2013. 2: p. 58-63

P. K. PARK, E. Y. KIM, K. H. CHU: *Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments*. Separation and Purification Technology, 2007. 53: p. 148-152

P. KAISER, R. GEYER, P. SURMANN, H. FUHRMANN: *LC-MS method for screening unknown microbial carotenoids and isoprenoid quinones*. Journal of Microbiological Methods, 2012. 88: p. 28-34

P. S. MEYER, J. C. Du PREEZ: *Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice*. World Journal Microbiology Biotechnology, 1994. 10: p. 178-183

PALMQVIST E, HAHN-HAGERDAL H, GALBE M, LARSSON M, STENBERG K, SZENGYEL Z, ET AL. *Design and operation of a bench-scale process development unit for the production of ethanol from lignocellulosics*. Bioresour Technol 1996;58:171-9.

PAPADOGEORGAKIS H., FRANGOULIS E., PAPAEFSTATHIOU C., KATSAMBAS A.: **Rhodotorula rubra* fungaemia in an immunosuppressed patient*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology 1999; 12: 169-170

PARK, CHEON SEOK, YOUNG-SUN SOHN, CAROLINE CRISPINO, CHING CHUAN CHANG A DEWEY D.Y. RYU. *Isolation of oversecreting mutant strains of the yeast *Yarrowia lipolytica**. Journal of fermentation and bioengineering. 1998, roč. 85, č. 2, s. 180-184.

PRAKITCHAIWATTANA J., FLEET G. H., HEARD G. M.: *Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes*. FEMS Yeast Research, 2004, Vol. 4, Issue 8, pp. 865-877.

R. B. VAN BREEMEN: *Electrospray liquid chromatography-mass spectrometry of carotenoids*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(13): p. 2004-2009. ISSN 0003-2700 (print), 1520-6882 (electronic)

R. B. VAN BREEMEN: *Liquid chromatography/mass spectrometry of carotenoids*. Pure and Applied Chemistry, 1997. **69**(10): p. 2061-2066. ISSN 0033-4545 (print), 1365-3075 (electronic)

RAJAKUMAR, K., GREENSPAN, S.L., THOMAS, S.B., HOLICK, M.F.: Solar ultraviolet radiation and vitamin D: a historical perspective. *American Journal of Public Health*, 2007, vol. 97, no. 10: p. 1746-54

RAPLEY, R.; WALKER, J.M.: *Molecular Biomethods Handbook*. Humana Press. Totowa, New Jersey. 1998. s. 725. ISBN 0-89603-501-8.

RANTSIOU, K., S. CAMPOLONGO, V. ALESSANDRIA, L. ROLLE, F. TORCHIO a L. COCOLIN. 2013. *Yeast populations associated with grapes during withering and their fate during alcoholic fermentation of high-sugar must*. Australian Journal of Grape and Wine Research [online]. Roč. 1, č. 1, s. 40-46 [cit. 2013-04-23]. DOI 10.1111/ajgw.12000.

S. HOHMANN and W. H. MAGER: *Yeast Stress Responses*. 2003, Berlin: Springer-Verlag. 389 p. ISBN 3-540-43926-9

S. IZAWA, Y. INOUE, A. KIMURA: *Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in Saccharomyces cerevisiae*. 1995. FEBS Letters 368: p. 73-76

S. M. RIVERA, R. CANELA-GARAYOA: *Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials*. Journal of Chromatography A, 2012. 1224: p. 1-10

S. W. RYTER, H. P. KIM, A. HOETZEL, J. W. PARK, K. NAKAHIRA, X. WANG, and A. M. K. CHOI: *Mechanisms of cell death in oxidative stress*. Antioxidants & Redox Signaling, 2007. **9**(1): p. 49-89. ISSN 1523-0864

SAMPAIO J. P., GADANHO M. BAUER R.: *Taxonomic studies on the genus Cystofilobasidium: description of C. ferigula sp. nov. and clarification of the status of C. lari-marini*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, p. 221-229

SIGUO WU, XIN ZHAO, HONGWEI SHEN, QIAN WANG, ZONGBAO ZHAO: *Microbial lipid production by Rhodosporidium toruloides under sulfate-limited conditions*, Bioresource Technology 2011, p. 1803-1807, ISSN: 0960-8524

SJÖRSTRÖM E.: *Wood chemistry: Fundamentals and applications*. Academic press Inc., San Diego, CA. USA, 1993

SÓTI, C., ERMELY, P.: *Protein stress and stress proteins: implications in aging and disease*. Journal of Biosciences, 2007. 32(3),s. 511-515

STOREBAKKEN T., SORENSEN M., BJERKENG B., HIU S.: *Utilization of astaxanthin from red yeasts, Xanthophyllomyces dendrorhous, in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss: effects of wenzymatic cell wall distruption and feed extrusion tepmerature*. *Aquaculture* 2004, 236 (1-4): p. 391-403

ŠMARDA, J.; DOŠKAŘ, J.; PANTŮČEK, R.; RŮŽIČKOVÁ, V.; KOPTÍKOVÁ, J.: *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita. Brno 2008. 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.

T. W. GOODWIN: *Biosynthesis of carotenoids: an overview*. *Methods in Enzymology*, 1993. 214: p. 330-340. ISSN 0076-6879

TALARO A. and TALARO K. P.: *Foundations in Microbiology*. 2001, Pasadena: McGraw-Hill. p. 889, ISBN 0-07-248864-6

TANSKANEN I., Eva , et al. *Pulsed-field gel electrophoresis of SmaI Digests of Lactococcal Genomic DNA : a Novel Method of Strain Identification*. *Applied and Environmental Microbiology*. Oct. 1990, vol. 56, no. 90, s. 3105-3111

TURŇA, Ján, et al. *Rekombinantné DNA /desoxyribonuclein acid/ a biotechnológia /*. 1. vyd. Bratislava : Alfa, 1990. 689 s. ISBN 80-05-00079-0.

V. KLANG, N. B. MATSKO: *Chapter 3 - Electron Microscopy od Pharmaceutical Systems*. *Advances in Imaging and Electron Physics*. 2014; 181: 125-208

V. PERRIER, E. DUBREUCQ, and P. GALZY: *Fatty acid and carotenoid composition of Rhodotorula strains*. *Archives of Microbiology*, 1995. 164(3): p. 173-179. ISSN 0302-8933 (print), 1432-072X (electronic)

VERSAVAUD, A.; COURCOUX, P.; ROULLAND, C.: *Genetic diversity and geographical distribution of wild Saccharomyces cerevisiae strains from the wine-producing area of Charentes, France*. *Applied Microiology and Biotechnology*, 1995. Vol. 61, s. 3521 – 3529.

XIAO, Ed. by Wei. *Yeast protocols*. 2nd ed. Totowa, N.J: Humana Press, 2006. ISSN 1-59259-958-3.

Z. AKSU and A. T. EREN: *Carotenoids production by the yeast Rhodotorula mucilaginosa: Use of agricultural wastes as a carbon source*. *Process Biochemistry*, 2005. 40(9): p. 2985-2991. ISSN 1359-5113

Oficiálna stránka Ústavu výživy zvierat a pícničarství: (electronic, dostupné na: [http://web2.mendelu.cz/af\\_222\\_multitext/krmiva/page.php?lang=cze&id=29](http://web2.mendelu.cz/af_222_multitext/krmiva/page.php?lang=cze&id=29))

## 12 ZOZNAM SKRATIEK A SYMBOLOV

UV	Ultra-violet = ultrafialové svetlo
MS	Hmotnostná spektrometria
PDA	„Photo-diode array“ (detektor diodového poľa)
RI	refraktometrický detektor
APCI	Chemická ionizácia v atmosférickom tlaku
ESI	Ionizácia elektrosprejom
LC	Kvapalinová chromatografia
HPLC	Vysoko-účinná kvapalinová chromatografia
UPLC	Ultra vysoko-tlaká kvapalinová chromatografia
HMG-CoA	$\beta$ -hydroxy-methylglutaryl-CoA
RG	<i>Rhodotorula glutinis</i>
CC	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>
SR	<i>Sporobolomyces roseus</i>
RA	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>
RM	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
SSh	<i>Sporobolomyces shibatanus</i>
SSa	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>
SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
AA	<i>Alternaria alternata</i>
FS	<i>Fusarium solani</i>
AP	<i>Aureobasidium pullulans</i>
PCH	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
AMG	komerčný enzým AMG
Novo	komerčný enzým Novozym 188
H	tekutý hydrolyzát z borovicového materiálu
A1	náhodne vyselektovaná kolónia mutantného kmeňa
DGGE	denaturačná gradientová elektroforéza
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PFGE	pulzná elektroforéza
YCM	yeast chromosome marker (štandard pre PFGE)

## 13 PRÍLOHY

### ŽIVOTOPIS

Meno a priezvisko: Andrea Hároniková  
Datum narodenia: 20.09.1985  
Adresa: Rozkvet 2031/60, 01701 Považská Bystrica

#### Vzdelanie

1992 - 2001 III. Základná škola v Považskej Bystrici  
2001 - 2005 Gymnázium Považská Bystrica  
2005 - 2008 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická  
bakalárske štúdium zakončené štátnou skúškou, titul Bc., téma bakalárskej práce:  
Regulace produkce obohacené biomasy a lipidických láték u karotenogenních kvasinek  
2008 - 2010 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická  
magisterské štúdium zakončené štátnou skúškou, titul Ing., téma diplomovej práce:  
Mikrobiální produkce karotenoidních pigmentů s využitím odpadních substrátů  
2010 - doteraz Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická  
doktorské štúdium

#### Zahraničná stáž

Miesto: Lund University, Department of Chemical Engineering, Sweden  
Doba: 5.3.2013 – 18.6.2013  
Projekt: Produkcia karotenoidov na odpadných lignocelulóзовých hydrolyzátoch  
s kvasinkami kmeňov *Rhodotorula* a *Sporobolomyces*. Rastové štúdie na predupravených  
materiáloch a analýza tvorby požadovaných produktov.

#### Získané projekty:

FRVŠ – úspešne obhájené:  
FRVŠ-G4-2011: Sledování průběhu biotechnologického procesu pomocí instrumentálních  
technik  
FRVŠ-G4-2012: Izolace, purifikace a charakterizace vybraných  
JCMM – PhD Talent: Biotechnologická produkcia karotenoidov a ergosterolu vybranými  
kvasinkami s použitím odpadových substrátov  
CMV - Centrum materiálového výzkumu, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně  
(člen řešitelského týmu)

## PREHĽAD VEŠKEREJ PUBLIKAČNEJ ČINNOSTI

### 1) Časopisecké publikácie – medzinárodné impaktované časopisy:

Haronikova A., Liden G., Marova I.: **Monitoring of growth and production characteristic of red yeasts cultivated on hydrothermally pretreated lignocellulosic pine material**, *Process Biochemistry* – v recenznom riadení

Petrik S., Marova I., Haronikova A., Kostovova I., Breierova E.: **Production of biomass, carotenoids and other lipid metabolites by several red yeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production - a comparative screening study**. *Annals Microbiol*, accepted 1.2.2013. DOI: 10.1007/s13213-013-0617-x IG 0,679 ISSN 1590-4261

Obruča S., Márová I., Matoušková P., Hároniková A., Lichnová A.: **Production of lignocellulose-degrading enzymes employing *Fusarium solani* F-552**. *Folia Microbiologica* 2012, Volume: 57 Issue: 3 Pages: 221-227 DOI: 10.1007/s12223-012-0098-5

Márová I., Čarnecká M., Haliénová A., Dvořáková T., Hároniková A.: **Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production**. *Journal of Environmental Management*. 2012, Volume: 95 Pages: S338-S342. DOI 10.1016/j.jenvman.2011.06.018.

Marova I., Haronikova A., Dvorakova T., Kubackova M., Jankeje K., Breierova E.: **Identification and characterization of red yeast strains using some molecular techniques**. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2011, vol. 58, Suppl.1. p.183-184. ISSN 1217-8950. 16<sup>th</sup> International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, July 20-22, 2011, Budapest.

### 2) Publikácie v recenzovaných časopisoch:

Lavová B., Hároniková A., Márová I., Urminská D.: **Production of ergosterol by *Saccharomyces cerevisiae***. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* Vol.2, 2013, p.1934-1940. **ISSN 1338-5178**

Márová I., Hároniková A., Petrik S., Dvořáková T., Breierová E.: **Production of enriched biomass by red yeasts of *Sporobolomyces* sp. grown on waste substrates**. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* Vol.1 (4), 2012, p.534-551. **ISSN 1338-5178**

### 3) Konferencie - medzinárodné:

- Márová I., Hároniková A., Petrik S., Kostovová I., Rapta M.: **Cystofilobasidium capitatum – red yeast for potential biotechnological application?** In 1<sup>st</sup> International Conference on Chemical Technology ICCT 2013, Sborník příspěvku. Mikulov 2013. s 1-4. ISBN: 978-80-86238-37-1.
- Matoušková P., Hároniková A., Petrik S., Kostovová I., Márová I.: **Growth and production properties of red yeasts cultivated on lignocellulose waste substrates**. Book of Abstracts- V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology – BioMicroWorld 2013 Madrid. S 339-339
- Hároniková A., Benešová P., Kostovová I., Petrik S., Márová I.: **The possibilities of using carotenoid-rich yeast biomass cultivated on whey substrates**. In Hygiena a

technologie potravin, XLIII. Lenfeldovy a Hoklovy dny. Sborník přednášek a posteru. Brno 2013. s. 136-139. ISBN: 978-80-7305-664-3.

- Márová I., Hároniková A., Petrik S.: **Biotechnological potential of red yeasts cultivated on selected agro-industrial waste substrates.** In Proceedings 9<sup>th</sup> International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 1. Bratislava: ISBAB, 2013, s 90-91, ISBN: 978-80-970896-6-5.
- Marova I., Matoušková P., Patočková K., Hároniková A., Obruča S.: **Preparation and characterization of organic micro- and nanoparticles with encapsulated caffeine.** 7th CRF (International Conference on Chemical reaction in Foods), November 14-16, 2012, Praha. Book of abstracts, p.152. ISBN 978-80-7080-836-8.
- Siniša Petrik, Andrea Hároniková, Zsófia Kádár, Ivana Márová : **Analysis of specific metabolites formed in red yeast cells cultivated on pretreated beat straw materials.** Proceedings, CECE 2012 (9th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis), pp.176-182. ISBN: 978-80-904959-1-3
- Petrik S., Márová I., Kádár Z., Anders T., Hároniková A., Ejbye S.J.: **The possibility to utilizing wheat straw hydrolyzate for the production, of carotene-enriched biomass by several red yeasts strains.** 40th Annual Conference on Yeasts, May 8-11, 2012, Smolenice, SR. Book of abstracts, p.61. ISSN 1336-4839.
- Hároniková A., Márová I., Čačková K., Petrik S., Breierová E.: **Selection of overproducing red yeast strains using random chemical mutagenesis.** 40th Annual Conference on Yeasts, May 8-11, 2012, Smolenice, SR. Book of abstracts, p.72. ISSN 1336-4839
- Marova I., Haronikova A., Benesova P., Bokrova J., Vyskocilova T., Matouskova P., Mikulkova R.: **Evaluation of some beneficial effects of consumption of Czech beer on human health.** Lecture. 12th INDC Conference, Praha, August 27-30, 2012. Book of Proceedings, p.58.
- Matouskova P., Marova I., Patočkova K., Haronikova A., Obruba S.: **Encapsulation of caffeine into organic micro- and nanoparticles.** Lecture. 12th INDC Conference, Praha, August 27-30, 2012. Book of Proceedings, p.69.
- Haronikova A., Marova I., Matouskova P., Janhuba F., Obruba S.: **Encapsulation of antimicrobial agents nisin and lysozyme into organic micro- and nanoparticles.** 12th INDC Conference, Praha, August 27-30, 2012. Book of Proceedings, p.146.
- **Petrik, S., Márová, I., Hároniková, A., Kostovová, I., Dvořáková, T.: Production of carotene-enriched biomass by red yeast strains cultivated on waste glycerol and lipids.** 39th Annual Conference on Yeasts, May 3-6, 2011, Smolenice, SR. Book of abstracts, p.37. ISSN 1336-4839.
- Hároniková A., Dvořáková T., Kubáčková M., Jankeje K., Breierová E., Márová I.: **Use of DGGE and PFGE to identification of red yeast strains.** 39th Annual Conference on Yeasts, May 3-6, 2011, Smolenice, SR. Book of abstracts, p.82. ISSN 1336-4839.
- Márová I., Matoušková P., Hároniková A., Pospíšilová A., Čertík M., Obruča S., Lichnová A., Duroňová K.: **Use of *A.pullulans* exoenzyme complex to waste substrate processing for carotenoid production by red yeasts.** 39th Annual Conference on Yeasts, May 3-6, 2011, Smolenice, SR. Book of abstracts, p.83. ISSN 1336-4839.
- Márová I., Hároniková A., Petrik S., Kostovová I., Dvořáková T.: **Production of single cell oil and carotene-enriched biomass by red yeasts cultivated on waste glycerol.** European Biotechnology Congress, 38.9.-1.10. 2011, Istanbul, Turecko. *Current Opinion in Biotechnology* 22, 2011, p.S98. ISSN 0958-1669.

- Hároniková A., Petrik S., Dvořáková T., Pospíšilová A., Márová I., Čertík M.: **Carotenoids-enriched biomass production by red yeasts cultivated on various waste substrates hydrolyzed by microbial hydrolases.** *Chemické Listy* 105, 2011, p.1013. ISSN 0009-2770.
- Terezie Dvořáková, Andrea Hároniková, Kristína Jankeje, Martina Kubáčková, Ivana Márová: **Tracking changes in the genome of carotenogenic yeasts analyzed by two different gel electrophoresis techniques – PFGE and DGGE.** 5th Chemistry and Life, 14-16.9.2011, Brno. *Chemické Listy* 105, 2011, p.1010 -1011. ISSN 0009-2770.
- Petrik S., Márová I., Hároniková A., Kostovová I.: **Growth and production properties of red yeasts using waste glycerol and lipids as carbon source.** 5th Chemistry and Life, 14-16.9.2011, Brno. *Chemické Listy* 105, 2011, p.1027. ISSN 0009-2770.
- Marova I., Haronikova A., Petrik S., Certik M., Breierova E.: **Production of functionalized red yeast biomass enriched with carotenoids, ergosterol and other lipid compounds.** International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods ISNFF 2011, 14-17.11. 2011, Sapporo, Japan; invited lecture. Proceedings, p.94.
- Petrik, S.; Hároniková, A.; Starečková, T.; Márová, I. **Analysis of carotenoids produced by red yeasts in physiological and nutrition stress.** In *Sborník příspěvků*. Brno: Masarykova Universita, 2010. s. 72-73. ISBN: 978-80-210-5164- 5.
- Starečková, T.; Márová, I.; Petrik, S.; Hároniková, A.; Čarnecká, M. **Carotenoids production by yeasts cultivated on waste substrates.** In *Sborník - Studentská odborná konference, FCH VUT Brno, 2010*. 2010. s. 121-124. ISBN: 978-80-214-4212- 2.
- Márová, I.; Petrik, S.; Starečková, T.; Hároniková, A.; Gojkovic, Ž.; Čáčková, K. **Production of carotenoid- rich yeast biomass using selected waste substrates.** *Vitamins 2011 - 10th International Nutrition and Diagnostics Conference, Praha 2010*, 4.-7.9. Pardubice: University Pardubice, 2010. s. 85-86. ISBN: 978-80-7395-257- 0.
- Petrik, S.; Hároniková, A.; Dvořáková, T.; Márová, I. **Analysis of carotenoids produced by several red yeast strains using different types of waste substrates.** *Chemické listy*, 2010, roč. 104, č. 6, s. 576-577. ISSN: 0009- 2770.
- Lichnová, A.; Vondráčková, H.; Obruča, S.; Matoušková, P.; Hároniková, A.; Márová, I. **Comparison of Hydrolytic Effect of Some Yeast and Fungal Extracellular Enzymes to Cereal Waste Substrates: A Preliminary Study.** In *38th Annual Conference on Yeasts. 34th Annual Conference on Yeasts, Book of abstracts*. Bratislava: 2010. s. 92 ( s.)ISSN: 1336- 4839.