

EWA KULCZYK-MAŁYSA, ELŻBIETA BOGUSŁAWSKA-WĄS

OPTIMALIZACJA WARUNKÓW BIOSYNTETY WYBRANYCH KAROTENOIDÓW PRZEZ DROŻDŻE Z RODZAJU *RHODOTORULA*

Streszczenie

Wprowadzenie. Karotenoidy to zróżnicowana grupa pigmentowych związków izoprenoidowych. Obecnie komercyjnie pozyskiwane są głównie z roślin lub na drodze syntezy chemicznej, z której uzyskiwanych jest 80 ÷ 90 % związków. Jednakże syntetyczne karotenoidy, w dużych dawkach, mogą być szkodliwe dla zdrowia ludzkiego, a odpady powstające w procesie ich produkcji stanowią zagrożenie dla środowiska. Alternatywą dla odpowiedników syntezy chemicznej jest wykorzystanie produkcji mikrobiologicznej w celu pozyskania karotenoidów o wysokiej aktywności biologicznej, które mogą stanowić naturalny i funkcjonalny dodatek w różnych gałęziach przemysłu. W związku z tym celem badań była optymalizacja warunków hodowli i biosyntezy wybranych frakcji karotenoidów przez szczepy *Rhodotorula*. Hodowlę drożdży prowadzono w kolbach 100 cm³ w których przygotowywano 50 cm³ podłoża YPG ze stałym wytrząsaniem i dostępem światła. W regulacji biosyntezy karotenoidów uwzględniono wpływ takich czynników, jak: temperatura, pH oraz stosunek węgla do azotu. W celu ilościowego i jakościowego oznaczenia frakcji karotenoidów wykorzystano metodę spektrofotometryczną.

Wyniki i wnioski: Wykazano wpływ temperatury, stosunku C/N oraz pH na ilości pozyskanej biomasy. Zmiana warunków pH determinowała istotne różnice w oznaczanych frakcjach karotenoidowych niezależnie od szczepu. Ponadto zastosowanie skrajnych wartości pH nie wpłynęło na zahamowanie wzrostu oraz syntezy karotenoidów, wskazując na adaptację *Rhodotorula* sp. do stresogennych warunków środowiska. W zależności od warunków hodowli oznaczano zmienny przyrost biomasy badanych szczepów, co warunkowało wpływ na przebieg krzywej logarytmicznego wzrostu drożdży. Analiza wpływu czynników fizykochemicznych umożliwiła wyznaczenie warunków hodowli sprzyjających produkcji karotenoidów.

Słowa kluczowe: naturalne barwniki, karotenoidy, drożdże, *Rhodotorula* sp.

Wprowadzenie

Karotenoidy to zróżnicowana grupa pigmentowych związków izoprenoidowych o szerokim zakresie aktywności biologicznej. Najczęściej stosowany podział karoteno-

mgr inż. E. Kulczyk-Małysa ORCID: 0009-0005-8762-889X, prof. ZUT E. Bogusławska-Wąs ORCID: 0000-0002-8526-9273; Katedra Mikrobiologii Stosowanej i Fizjologii Żywnienia Człowieka, Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Papieża Pawła VI 3, 71-459 Szczecin. Kontakt e-mail: ke47373@zut.edu.pl

idów oparty jest na budowie chemicznej. Podstawowe kryterium tego podziału stanowi występowanie w strukturze atomów węgla i wodoru lub węgla, wodoru oraz tlenu. Ogólny podział wskazuje na karoteny będące węglowodorami oraz ksantofile zawierające polarne grupy [8]. Prowadzone badania umożliwiły odkrycie ponad tysiąca naturalnych karotenoidów pochodzących z roślin, mikroalg, grzybów i bakterii [19, 30]. Coraz większe zapotrzebowanie na karotenoidy w różnych działach przemysłu wymusiło poszukiwanie alternatywnych źródeł, które poza efektywnością produkcji zapewnią będą bezpieczeństwo ich pozyskiwania i stosowania [16].

Komercyjne pozyskiwanie karotenoidów oparte jest przede wszystkim na syntezie chemicznej, co stanowi ponad 73 % zapotrzebowania rynku. Pozyskiwanie ich z naturalnych źródeł – roślin, zwierząt i bakterii jest ciągle ograniczone, aczkolwiek obserwuje się stały wzrost zapotrzebowania na karotenoidy niesyntetyczne, co zapewne wynika ze stałego zainteresowania konsumentów produktami naturalnymi. Biotechnologiczne rozwiązania ukierunkowane na produkcję naturalnych karotenoidów, w tym ze źródeł mikrobiologicznych, przyczyniły się do opracowania technologii bezpiecznej dla środowiska, a uzyskane produkty charakteryzują się przede wszystkim stabilnością, lepszymi właściwościami biologicznymi oraz niższym potencjałem toksycznym. Cechy te przyczyniły się do coraz powszechniejszego wykorzystywania tych związków jako funkcjonalnych dodatków w różnych gałęziach przemysłu, m.in. w przetwórstwie żywności. Ponadto synteza karotenoidów przez mikroorganizmy charakteryzuje się wysoką wydajnością, co związane jest m.in. z ich zdolnościami adaptacji do panujących warunków środowiska [17].

Rhodotorula sp. jest przedstawicielem tzw. oleistych drożdży wykazujących zdolność do produkcji lipidów, egzopolisacharydów oraz karotenoidów. Główną korzyścią wykorzystania izolatów z tego rodzaju jest szybkość przystosowania się do warunków środowiska, co wiąże się z dostosowaniem aparatu enzymatycznego i wykorzystaniem dostępnych składników odżywczych [31]. Ponadto produkowane frakcje karotenoidów wykazują działanie bioaktywne, wpływając na eliminację stresu oksydacyjnego [7]. Około 70 % karotenoidów produkowanych przez gatunki z rodzaju *Rhodotorula* sp. stanowi β -karoten. Jest to związek o pomarańczowo-żółtej barwie posiadający 9 sprzężonych wiązań w łańcuchu polienowy i 2 w pierścieniach β -jonowych, co powoduje jego podatność na utlenienie [8]. Neutralizacja wolnych rodników przez te pigmenty chroni organizmy żywe przed ich szkodliwym działaniem, często prowadzącym do mutagenyzy. Kolejnym metabolitem wtórnym wytwarzanym przez drożdże jest γ -karoten, który stanowi izomer β -karotenu. Bioaktywne właściwości tej frakcji karotenoidów wynikają z obecności grupy retinylowej, jednakże są one niższe niż β -karotenu [23]. Oprócz wspomnianych karotenoidów przedstawiciele rodzaju *Rhodotorula* syntetyzują również torulen, który jest syntetyzowany z γ -karotenu. Torulen stanowi prowitaminę witaminy A, jednocześnie wykazując wyższą aktywność antyok-

sydacyjną niż β -karoten. Zdolność wiązania cząsteczek tlenu przez frakcje karotenoidów umożliwia ich zastosowanie jako naturalnych dodatków do żywności ograniczających procesy utleniania. Ponadto badania wykazały ich działanie przeciwdrobnoustrojowe, co może mieć wpływ na proliferację drobnoustrojów patogennych w żywności [15, 26].

W związku z tym celem badań była optymalizacja warunków hodowli oraz biosyntezy wybranych frakcji karotenoidów przez szczepy *Rhodotorula*, jako potencjalnych dodatków do żywności. Analizie poddano wpływ czynników fizykochemicznych na intensywność produkcji biomasy, procentowy udział frakcji oraz całkowite stężenie karotenoidów.

Materiały i metody badań

Pochodzenie szczepów

W badaniach wykorzystano szczepy drożdży karotenoidalnych pochodzące ze środowiska przemysłowego jednej z mleczarni w Polsce. Szczepy izolowano z produktu gotowego mozzarella (szczep M-66) oraz z wody technologicznej (szczep M-78).

Metody izolacji szczepów

Produkt gotowy w postaci kulki mozzarella poddano analizie zgodnie z PN-EN ISO 6611:2007 [24] przy zastosowaniu podłoża Sabouard (pepton mikrobiologiczny 1,0 %, glukoza 4,0 %, agar 1,5 %; Oxoid, Wielka Brytania). Inkubację prowadzono w 25 °C przez 5 dni.

Analizę prób wody technologicznej wykonano metodą filtracji membranowej przy użyciu filtrów celulozowych o wielkości porów 0,45 μm (Merck, Niemcy). Inkubację prowadzono na podłożu OGA (ekstrakt drożdżowy 0,5 %, glukoza 2,0 %, oksytetracyklina 0,01 %, agar bakteriologiczny 1,5 %; Biokar, Francja) w temperaturze 25 °C przez 5 dni.

Selekcja i identyfikacja wyizolowanych szczepów drożdży

Wstępnej selekcji szczepów dokonywano na podstawie barwy kolonii wyrosłych na podłożach hodowlanych. Z wyrosłych kolonii na podłożu YM Agar (ekstrakt drożdżowy 0,3 %, ekstrakt słodowy 0,3 %, pepton bakteriologiczny 0,5 %, dekstroza 1,0 %, agar 2,0 %; Difco, USA) wykonywano preparaty mikroskopowe barwione metodą Loefflera. Charakterystyka morfologiczna komórek drożdży, tj. kształt, sposób pączkowania, występowanie pseudostrzępek, były uzupełnieniem do identyfikacji biochemicznej, w której wykorzystano testy API ID 32C (bioMérieux, Francja). Testy przeprowadzono zgodnie z procedurą wskazaną przez producenta a uzyskane wyniki odczytywano za pomocą automatycznego systemu komputerowego VITEK ATB (bioMérieux, Francja).

Ocena wpływu wybranych czynników na syntezę karotenoidów

W celu przeprowadzenia wszystkich doświadczeń wykorzystano wyselekcjonowane szczepy drożdży o stałym inokulum $OD_{600} = 0,02 \pm 0,01$. Pomiaru OD dokonywano w BioPhotometer (Eppendorf, Niemcy). Hodowle prowadzono w kolbach 100 cm^3 , w których przygotowywano 50 cm^3 podłoża YPG (glukoza 2 %, pepton 1 %, ekstrakt drożdżowy 1 %) ze stałym wytrząsaniem 120 obr./min. i dostępem światła [5]. Hodowle inkubowano przez 5 dni przy zachowaniu różnych warunków temperaturowych: 20 °C, 25 °C i 30 °C oraz pH 3,0; 5,0; 7,0; 9,0.

W przypadku oceny wpływu stosunku węgla do azotu (C/N) w kolbach 100 cm^3 przygotowywano 50 cm^3 podłoża w Basal Medium - BM ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05 %, ekstrakt drożdżowy – 0,1 %, KH_2PO_4 – 0,64 %; K_2HPO_4 – 0,64 %). Do pożywki BM dodawano różne stężenia glukozy, tak aby uzyskać stosunek C/N, odpowiednio: 1,0; 2,5; 10 i 20. Hodowle prowadzono w wyżej opisanych warunkach, wykorzystując optymalną temperaturę i pH dla produkcji karotenoidów.

We wszystkich wariantach badawczych prowadzono kontrole przyrostu biomasy poprzez pomiar spektrofotometryczny OD wykonywany przy długości fali 600 nm. W tym celu wykorzystano BioPhotometer (Eppendorf, Niemcy).

Proces ekstrakcji karotenoidów

W celu wyekstrahowania karotenoidów syntetyzowanych przez szczepy drożdży postępowano zgodnie z metodą Kot i wsp. [15] (Metoda I) z wykorzystaniem roztworu NaCl w końcowej fazie ekstrakcji. Zastosowano również modyfikację własną, nie uwzględniając dodatku NaCl, co umożliwiło eliminację fałszywie dodatnich wyników (Metoda II).

Z każdego wariantu badawczego do falkonów pobierano 10 ml hodowli, a następnie odwirowywano (8000 obr./min. przez 15 min). Supernatant umieszczono w osobnym falkonie w celu oceny ewentualnych pozostałości karotenoidów. Pelet przemywano dwukrotnie wodą destylowaną, uwzględniając wskazane wyżej parametry procesu wirowania. Osad zawieszono w 1 ml DMSO (dimetylosulfotlenek; Oxoid, Wielka Brytania), który wcześniej ogrzewano przez 2 h w temperaturze 55 °C [12]. Po dodaniu kulek szklanych (Sigma, USA) powtarzano etap wirowania (8 000 obr./min. przez 10 min). Następnie dodano 2 ml mieszaniny acetonu (Stanlab, Polska) i 96 % alkoholu etanolowego (ChemLand, Polska) i wytrząsano przez 5 min. Próbki pozostawiono na 10 min w celu sedymentacji biomasy. Proces ekstrakcji prowadzono do momentu uzyskania białego/szarego koloru biomasy [15].

Oznaczenie frakcji karotenoidów

W celu ilościowego i jakościowego oznaczenia frakcji karotenoidów mierzono absorbancję uzyskanych ekstraktów za pomocą spektrofotometru BioSpectrometer

basic (Eppendorf, Niemcy). Całkowitą zawartość karotenoidów (VC) wyrażoną w mg/dm^3 cieczy hodowlanej wyliczono zgodnie z metodą Chena i wsp. (2006) [4]. W zależności od oznaczanej frakcji karotenoidów zastosowano różne długości fali oraz obliczono odpowiednie molowe współczynniki ekstynkcji na podstawie kalkulatora molowego współczynnika ekstynkcji [3]. W badaniach oznaczono frakcje należące do karotenów, tj. torulen, γ -karoten, β -karoten oraz należącą do ksantofili astaksantynę. Ponadto oznaczono całkowitą zawartość ksantofili. Następnie wyznaczono całkowitą zawartość karotenoidów (TF) wyrażoną w $\mu\text{g}/\text{g}$ suchej masy komórek drożdży zgodnie z metodą Rodríguez i wsp. (2023) [25].

Oznaczanie zawartości suchej masy

Suchą masę oznaczano w falkonach, które uprzednio suszono przez 2 dni w temperaturze $50\text{ }^\circ\text{C}$. Po zważeniu falkonów wprowadzono 10 ml każdej z hodowli i wirovano 8 000 obr/min przez 10 min. Supernatant zlewano, a biomasę w falkonach suszono w temperaturze $50\text{ }^\circ\text{C}$. Falkony ważono co 2 dni do momentu nieistotnych różnic w wadze. Wyniki przedstawiono w gramach suchej masy na litr pożywki (g/dm^3) [24].

Pomiar barwy

Barwa kolonii drożdży oraz uzyskanego peletu po hodowli była ustalana na podstawie tablic barw Munsella (1972) [11].

Analiza statystyczna

Wszystkie doświadczenia powtórzono trzykrotnie, a dane wyrażono jako wartość średnią \pm odchylenie standardowe (SD). Istotność statystyczną wyznaczano za pomocą analizy wariancji (jedno- i dwuczynnikowa ANOVA), a następnie testu Tukeya. Wszystkie analizy przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica w wersji 13.03 (StatSoft Polska, Polska). Porównane wartości uznano za znacząco różne przy $p < 0,05$. Korelacje między zmiennymi oceniono za pomocą współczynnika korelacji Pearsona (r) na poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Wyniki

Wyzolowane szczepy różniły się pod względem morfologicznym. Kolonie szczepu M-78 posiadały nieregularny kształt, rozlewając się po płytce w przeciwieństwie do szczepu M-66, którego kolonie były okrągłe i mniejsze. Barwę kolonii przyporządkowano do oznaczenia 5.0R 7/8 (szczep M-78) oraz 5.0R 7/6 (szczep M-66). Z próbek sera mozzarella jak i wody technologicznej wyizolowano szczepy *Rhodotorula glutinis*. Identyfikacja biochemiczna wykazała zbliżone zdolności asymilacji zwią-

ków chemicznych. Jednakże *Rhodotorula* M-66 wykazywała zdolność rozkładu galaktozy, DL-kwasu mlekowego oraz sorbitolu w przeciwieństwie do *Rhodotorula* M-78.

Proces ekstrakcji karotenoidów

Zastosowanie różnych metod ekstrakcji wykazało istotne statystycznie różnice przy $p < 0,05$ w oznaczanej absorbancji. Niezależnie od temperatury wyniki pomiaru absorbancji ekstraktu uzyskanego metodą I były wyższe niż przy zastosowaniu metody II. Największe istotne statystycznie różnice oznaczono w 25 °C w obu badanych szczepach (tabela 1).

Tabela 1. Porównanie pomiarów absorbancji w zależności od zastosowanej metody ekstrakcji oraz warunków inkubacji

Table 1. Comparison of absorbance measurements depending on the extraction method used and incubation conditions

| Absorbancja / Absorbance $\lambda_{500\text{ nm}}$ | Szczepy <i>Rhodotorula</i> / <i>Rhodotorula</i> strains | |
|---|---|----------------------------|
| | M-78 | M-66 |
| Metoda / Method | 20 °C | |
| I | 0,127 ^b ± 0,005 | 0,253 ^b ± 0,030 |
| II | 0,025 ^a ± 0,001 | 0,088 ^a ± 0,012 |
| | 25 °C | |
| I | 1,385 ^b ± 0,013 | 2,712 ^b ± 0,008 |
| II | 0,065 ^a ± 0,003 | 0,021 ^a ± 0,001 |
| | 30 °C | |
| I | 0,579 ^b ± 0,006 | 0,223 ^b ± 0,003 |
| II | 0,033 ^a ± 0,001 | 0,015 ^a ± 0,002 |

Objaśnienia: / Explanatory notes:

wartości są średnimi ± odchylenie standardowe z trzech powtórzonych oznaczeń; ^{a,b} – średnie z różnymi małymi literami w tej samej kolumnie różnią się istotnie przy $p < 0,05$; wszystkie dane zostały wyrażone jako średnia ± odchylenie standardowe (SD) / values are mean ± standard deviation of three repeated determinations; ^{a,b} – means with different lowercase letters in the same column are significantly different at $p < 0.05$. All data was expressed as mean ± standard deviation (SD).

Ocena wpływu wybranych czynników na syntezę karotenoidów

Najwyższe ilości biomasy oznaczono w temperaturze 20 °C, a najniższe w 25 °C w obu badanych szczepach. Nie wykazano korelacji między wzrostem temperatury oraz biomasa a oznaczanym TF. Izolowane frakcje karotenoidowe różniły się istotnie statystycznie w zależności od zastosowanej temperatury (tabela 2). Dominującą frakcją u szczepu M-78 była astaksantyna, która stanowiła 21,93 % oznaczanych karotenoidów. Wraz ze wzrostem stężenia karotenoidów oznaczano wyższy parametr VC.

Tabela 2. Wpływ temperatury hodowli na wytwarzaną biomasę i karotenoidy

Table 2. Effect of culture temperature on biomass and carotenoids produced

| Wzrost i produkcja karotenoidów / Growth and production of carotenoids | Szczepy <i>Rhodotorula</i> / <i>Rhodotorula</i> strains | | | | | |
|--|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | M-66 | | | M-78 | | |
| | 20 °C | 25 °C | 30 °C | 20 °C | 25 °C | 30 °C |
| CBC [g/dm ³] | 4,61 | 1,13 | 1,45 | 4,32 | 0,46 | 1,96 |
| Barwa peletu (Munsell) / Pellet color | 10.0R 6/10 | 10.0R 7/8 | 7.5YR 8/6 | 10.0R 7/6 | 10.0R 7/6 | 7.5YR 7/4 |
| VC [mg/dm ³] | 0,66 | 0,16 | 0,11 | 0,06 | 0,25 | 0,08 |
| TF [µg/g s.m.] | 143,20 | 139,40 | 77,60 | 14,50 | 353,30 | 42,10 |
| Frakcje karotenoidowe [%] / Carotenoid fractions [%] | | | | | | |
| Torulen | 18,45 | 17,64 | 17,6 | 11,29 | 19,27 | 13,90 |
| Astaksantyna / Astaxanthin | 18,35 | 19,00 | 20,3 | 11,40 | 21,93 | 20,20 |
| Ksantofile ogółem / Total xanthophylls | 18,05 | 19,37 | 18,1 | 10,84 | 19,37 | 20,00 |
| γ-karoten / carotene | 17,34 | 18,60 | 18,6 | 6,70 | 18,60 | 22,60 |
| β-karoten / carotene | 13,88 | 19,09 | 16,5 | 5,34 | 19,09 | 22,60 |

Objaśnienia: / Explanatory notes:

CBC – zawartość suchej masy komórek drożdży [g/dm³]; VC – całkowita zawartość karotenoidów w cieczy hodowlanej [µg/dm³]; TF – całkowitą zawartość karotenoidów [µg/g s.m.] / CBC – yeast cell dry weight content [g/dm³]; VC – total carotenoid content in the culture liquid [µg/dm³]; TF – total carotenoid content [µg/g DM].

Nie wykazano korelacji pomiędzy wzrostem pH a ilością biomasy i stężeniem ekstrahowanych karotenoidów. Najwyższe ilości karotenoidów oznaczono w odmiennych warunkach hodowlanych tj. przy pH 5,0 dla szczepu M-66 oraz pH 7,0 dla szczepu M-78. Odczyn pH podłoża hodowlanego miał istotnie statystycznie wpływ na uzyskane frakcje karotenoidów ($p < 0,05$). Ponadto w hodowli szczepu M-78 o pH 5,0 obserwowano dominację β-karotenu, który stanowił 22,18 % izolowanych karotenoidów (tabela 3). W przypadku szczepu M-78 wzrost pH wpływał na zmianę barwy peletu w kierunku żółci. Barwa peletu szczepu M-66 utrzymywała się w paletce barw różowo-czerwonych.

Monitoring zmian pH w hodowli po czasie inkubacji wykazał istotne statystycznie różnice ($p < 0,05$) pomiędzy szczepami we wszystkich badanych wariantach (tabela 4). Ponadto wykazano znaczny spadek pH w hodowli o startowym pH 9,0 niezależnie od badanego szczepu. Natomiast przy pH 5,0 i pH 7,0 obserwowano wzrost pH hodowli po inkubacji dla szczepu M-78, odwrotnie niż dla szczepu M-66. Najmniejsze różnice pH (po 96 h inkubacji) oznaczono przy pH 3,0.

Tabela 3. Wpływ pH hodowli na wytwarzaną biomasę i karotenoidy

Table 3. Effect of culture pH on biomass and carotenoids produced

| Wzrost i produkcja karotenoidów / Growth and carotenoid production | Szczepy <i>Rhodotorula</i> / <i>Rhodotorula</i> strains | | | | | | | |
|--|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | M-66 | | | | M-78 | | | |
| | 3,0 | 5,0 | 7,0 | 9,0 | 3,0 | 5,0 | 7,0 | 9,0 |
| CBC [g/dm ³] | 1,14 | 1,89 | 4,32 | 4,25 | 2,18 | 1,59 | 1,42 | 1,81 |
| Barwa peletu (Munsell) / Pellet color | 5.0R 6/10 | 10.0R 7/8 | 10.0R 7/6 | 10.0R 6/8 | 10.0R 7/6 | 7.5YR 8/6 | 7.5YR 8/6 | 7.5YR 8/6 |
| VC [mg/dm ³] | 0,36 | 1,01 | 1,03 | 0,77 | 0,71 | 0,28 | 0,49 | 0,49 |
| TF [µg/g s.m.] | 315,80 | 531,70 | 237,80 | 180,00 | 326,80 | 174,50 | 343,30 | 269,30 |
| Fracje karotenoidowe [%] / Carotenoid fractions [%] | | | | | | | | |
| Torulen | 18,01 | 17,91 | 18,16 | 16,43 | 18,39 | 15,26 | 13,84 | 17,92 |
| Astaksantyna / Astaxanthin | 19,00 | 18,29 | 18,59 | 17,14 | 19,40 | 17,46 | 16,08 | 19,88 |
| Ksantofile ogółem / Total xanthophylls | 18,16 | 18,07 | 18,38 | 16,33 | 18,96 | 17,27 | 16,39 | 20,26 |
| γ-karoten / carotene | 17,05 | 16,94 | 17,93 | 14,23 | 18,21 | 17,60 | 16,31 | 20,04 |
| β-karoten / carotene | 14,32 | 14,53 | 16,30 | 11,04 | 16,48 | 22,18 | 13,80 | 20,56 |

Objaśnienia: / Explanatory notes:

CBC – zawartość suchej masy komórek drożdży [g/dm³]; VC – całkowita zawartość karotenoidów w cieczy hodowlanej [µg/dm³]; TF – całkowitą zawartość karotenoidów [µg/g s.m.] / CBC – yeast cell dry weight content [g/dm³]; VC – total carotenoid content in the culture liquid [µg/dm³]; TF – total carotenoid content [µg/g DM].

Tabela 4. Zmiana pH podłoża hodowlanego po inkubacji

Table 4. Change in pH of the culture medium after incubation

| Wyjściowe pH podłoża / Initial substrate pH (0 h) | 3,0 | 5,0 | 7,0 | 9,0 |
|---|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Szczep / Strains | pH po 96 h / pH after 96 h | | | |
| M-78 | 3,03 ^a ± 0,02 | 6,90 ^b ± 0,01 | 7,72 ^b ± 0,00 | 7,81 ^b ± 0,02 |
| M-66 | 3,14 ^b ± 0,03 | 4,64 ^a ± 0,02 | 5,55 ^a ± 0,01 | 6,98 ^a ± 0,01 |

Objaśnienia: / Explanatory notes:

Wartości są średnimi ± odchylenie standardowe z trzech powtórzonych oznaczeń; ^{a,b} – średnie z różnymi małymi literami w tej samej kolumnie różnią się istotnie przy $p < 0,05$; wszystkie dane zostały wyrażone jako średnia ± odchylenie standardowe (SD) / Values are mean ± standard deviation of three repeated determinations; ^{a,b} – means with different lowercase letters in the same column are significantly different at $p < 0.05$. All data was expressed as mean ± standard deviation (SD).

Wzrost stosunku C/N korelował ze wzrostem stężenia biomasy w przypadku szczepu M-66. W hodowli szczepu M-78 nie wykazano ww. zależności, a najwyższą biomasę oznaczono przy C/N 10. Najwyższe stężenie TF dla szczepu M-66 oznaczono przy C/N 2,5. W przypadku *Rhodotorula* M-78 wzrost stosunku C/N korelował ze wzrostem TF. Niezależnie od wariantu hodowli wykazano najniższą procentową zawartość β -karotenu dla szczepu M-66. Zmiana warunków hodowli nie wpłynęła istotnie na barwę peletu uzyskanego w hodowli *Rhodotorula* M-78 (tabela 5).

Tabela 5. Wpływ stosunku C/N na wytwarzaną biomasę i karotenoidy

Table 5. Effect of C/N ratio on biomass and carotenoids produced

| Wzrost i produkcja karotenoidów / Growth and production of carotenoids | Szczepy <i>Rhodotorula</i> / <i>Rhodotorula</i> strains | | | | | |
|--|---|---------|------------|---------|---------|---------|
| | M-66 | | | M-78 | | |
| | 2,5 | 10 | 20 | 2,5 | 10 | 20 |
| CBC [g/dm ³] | 2,98 | 4,25 | 5,72 | 1,63 | 2,64 | 2,01 |
| Barwa peletu (Munsell) / Pellet colour | 5.0R 6/10 | 10R 7/8 | 5.0YR 5/10 | 10R 7/4 | 10R 7/6 | 10R 7/6 |
| VC [mg/dm ³] | 0,76 | 0,37 | 0,55 | 0,16 | 0,37 | 0,57 |
| TF [μg/g s.m.] | 254,20 | 86,50 | 95,70 | 96,60 | 139,20 | 283,60 |
| Frakcje karotenoidowe [%] / Carotenoid fractions [%] | | | | | | |
| Torulen | 16,77 | 16,92 | 18,13 | 21,01 | 19,81 | 19,27 |
| Astaksantyna / Astaxanthin | 15,99 | 15,90 | 16,92 | 21,72 | 20,17 | 20,50 |
| Ksantofile ogółem / Total xanthophylls | 14,57 | 13,04 | 15,39 | 20,29 | 19,76 | 20,13 |
| γ -karoten / carotene | 13,08 | 9,87 | 13,76 | 18,60 | 19,36 | 19,58 |
| β -karoten / carotene | 8,50 | 8,57 | 8,11 | 18,18 | 17,53 | 20,09 |

Objaśnienia: / Explanatory notes:

CBC – zawartość suchej masy komórek drożdży [g/dm³]; VC – całkowita zawartość karotenoidów w cieczy hodowlanej [μg/dm³]; TF – całkowitą zawartość karotenoidów [μg/g s.m.] / CBC – yeast cell dry weight content [g/dm³]; VC – total carotenoid content in the culture liquid [μg/dm³]; TF – total carotenoid content [μg/g DM].

Analiza przyrostu biomasy w poszczególnych temperaturach wykazała istotne statystycznie różnice przy $p < 0,05$ w obu badanych szczepach. Dopiero po 48 h oznaczono istotne statystycznie różnice przyrostu biomasy szczepu M-66 w każdym wariantie temperaturowym hodowli (tabela 6). Niezależnie od stosunku C/N *Rhodotorula* M-66 po 96 h hodowli znajdowała się w fazie logarytmicznego wzrostu, a gęstość optyczna nie różniła się istotnie statystycznie pomiędzy stosunkiem C/N 10 i 20.

Szczep M-78 wykazywał istotne statystycznie różnice przyrostu biomasy w zależności od temperatury po 48 h (tabela 7). Wraz z upływem czasu hodowli przy pH

9,0 obserwowano spadek przyrostu biomasy dla szczepu M-78 (tabela 7). Natomiast dla szczepu M-66 w pH 9,0 oznaczono najwyższe OD (tabela 6). Niezależnie od stosunku C/N po 96 h hodowli szczep M-78 wykazywał istotne statystycznie różnice przyrostu biomasy (tabela 7).

Tabela 6. Wpływ czynników na przyrost biomasy u *Rhodotorula* M-66

Table 6. Influence of factors on biomass growth in *Rhodotorula* M-66

| Absorbancja/ Absorbance $\lambda_{600\text{ nm}}$ | 0 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
|---|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Temperatura/ Temperature [°C] | | | | | |
| 20 | 0,011 ^{aA} ± 0,001 | 1,658 ^{aB} ± 0,004 | 9,683 ^{cC} ± 0,032 | 12,407 ^{cD} ± 0,032 | 14,750 ^{eE} ± 0,017 |
| 25 | 0,017 ^{aA} ± 0,006 | 1,540 ^{aB} ± 0,007 | 5,597 ^{aC} ± 0,007 | 7,377 ^{bD} ± 0,025 | 8,610 ^{bD} ± 0,069 |
| 30 | 0,013 ^{aA} ± 0,002 | 2,167 ^{bB} ± 0,012 | 6,680 ^{bD} ± 0,026 | 5,763 ^{aE} ± 0,188 | 2,422 ^{aC} ± 0,016 |
| pH | | | | | |
| 3,0 | 0,011 ^{aA} ± 0,001 | 0,068 ^{aA} ± 0,004 | 1,963 ^{aB} ± 0,009 | 3,820 ^{aC} ± 0,026 | 5,580 ^{aD} ± 0,072 |
| 5,0 | 0,010 ^{aA} ± 0,001 | 0,506 ^{cB} ± 0,004 | 2,887 ^{bC} ± 0,025 | 12,713 ^{cD} ± 0,031 | 14,993 ^{dE} ± 0,087 |
| 7,0 | 0,010 ^{aA} ± 0,002 | 0,895 ^{dB} ± 0,005 | 13,057 ^{dC} ± 0,068 | 15,240 ^{dE} ± 0,017 | 14,750 ^{cD} ± 0,070 |
| 9,0 | 0,016 ^{aA} ± 0,002 | 0,241 ^{bB} ± 0,002 | 5,637 ^{cC} ± 0,023 | 8,670 ^{bE} ± 0,070 | 7,790 ^{bD} ± 0,066 |
| C/N | | | | | |
| 2,5 | 0,036 ^{aA} ± 0,001 | 0,798 ^{aA} ± 0,002 | 9,958 ^{bB} ± 0,015 | 10,773 ^{bC} ± 1,201 | 12,877 ^{bD} ± 0,051 |
| 10 | 0,023 ^{aA} ± 0,001 | 0,520 ^{aA} ± 0,007 | 9,287 ^{bB} ± 0,032 | 10,917 ^{cC} ± 0,015 | 11,483 ^{aC} ± 0,065 |
| 20 | 0,038 ^{aA} ± 0,002 | 0,305 ^{aA} ± 0,001 | 6,943 ^{aB} ± 0,012 | 8,730 ^{aC} ± 0,052 | 11,400 ^{aD} ± 0,072 |

Objaśnienia: / Explanatory notes:

Wartości są średnią ± odchylenie standardowe z trzech powtórzonych oznaczeń; ^{a,b,c,d} – średnie z różnymi małymi literami w tej samej kolumnie różnią się istotnie przy $p < 0,05$; ^{A,B,C,E} – średnie z różnymi wielkimi literami w tym samym wierszu różnią się istotnie przy $p < 0,05$ / Values are mean ± standard deviation of three repeated determinations; ^{a,b,c,d} – means with different lowercase letters in the same column are significantly different at $p < 0.05$. ^{A,B,C,E} – means with different uppercase letters in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

Dyskusja

Rhodotorula jest jednym z najczęściej izolowanych rodzajów drożdży ze środowiska mleczarni. Istotny wpływ na taki stan mają sprzyjające warunki związane z bogatym źródłem składników odżywczych w surowcach mleczarskich. Geronikou i wsp. [9] izolowali *Rhodotorula* sp. z resztek twarogu, natomiast Yadav i wsp. [30] – z jogurtu, mleka w puszcze oraz powietrza, co wskazuje na rozprzestrzenianie się tego rodzaju w środowisku okołoprodukcyjnym. Powyższe obserwacje potwierdzają

Tabela 7. Wpływ czynników na przyrost biomasy u *Rhodotorula* M-78Table 7. Influence of factors on biomass growth in *Rhodotorula* M-78

| Absorbancja/ Absorbance $\lambda_{600\text{ nm}}$ | 0 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Temperatura/ Temperature [°C] | | | | | |
| 20 | 0,010 ^{aA} ± 0,002 | 1,790 ^{bB} ± 0,010 | 9,677 ^{cC} ± 0,040 | 12,010 ^{cD} ± 0,026 | 13,253 ^{bE} ± 0,012 |
| 25 | 0,025 ^{aA} ± 0,002 | 1,192 ^{aB} ± 0,013 | 5,523 ^{aD} ± 0,032 | 8,627 ^{bE} ± 0,084 | 5,027 ^{aC} ± 0,031 |
| 30 | 0,060 ^{aA} ± 0,005 | 2,500 ^{cB} ± 0,010 | 5,900 ^{bD} ± 0,010 | 7,903 ^{aE} ± 0,071 | 5,057 ^{aC} ± 0,025 |
| pH | | | | | |
| 3,0 | 0,013 ^{aA} ± 0,002 | 1,647 ^{bB} ± 0,005 | 7,530 ^{cC} ± 0,036 | 9,867 ^{dD} ± 0,080 | 11,073 ^{dE} ± 0,038 |
| 5,0 | 0,025 ^{aA} ± 0,001 | 1,627 ^{bB} ± 0,003 | 7,923 ^{dD} ± 0,081 | 9,183 ^{cE} ± 0,067 | 7,167 ^{cC} ± 0,142 |
| 7,0 | 0,027 ^{aA} ± 0,002 | 2,207 ^{cB} ± 0,038 | 2,648 ^{aC} ± 0,019 | 4,240 ^{bE} ± 0,072 | 3,510 ^{bD} ± 0,312 |
| 9,0 | 0,017 ^{aA} ± 0,002 | 0,908 ^{aC} ± 0,002 | 3,390 ^{bD} ± 0,036 | 3,533 ^{aD} ± 0,061 | 0,511 ^{aB} ± 0,003 |
| C/N | | | | | |
| 2,5 | 0,032 ^{aA} ± 0,002 | 0,781 ^{bB} ± 0,005 | 5,987 ^{cD} ± 0,031 | 6,490 ^{bE} ± 0,017 | 5,037 ^{bC} ± 0,006 |
| 10 | 0,022 ^{aA} ± 0,003 | 0,514 ^{aB} ± 0,060 | 5,447 ^{bC} ± 0,025 | 6,567 ^{bE} ± 0,049 | 6,110 ^{cD} ± 0,053 |
| 20 | 0,027 ^{aA} ± 0,001 | 0,444 ^{aB} ± 0,003 | 3,560 ^{aC} ± 0,052 | 5,230 ^{aE} ± 0,036 | 4,403 ^{aD} ± 0,042 |

Objaśnienia: / Explanatory notes:

Wartości są średnią ± odchylenie standardowe z trzech powtórzonych oznaczeń; ^{a, b, c, d} – średnie z różnymi małymi literami w tej samej kolumnie różnią się istotnie przy $p < 0,05$; ^{A, B, C, E} – średnie z różnymi wielkimi literami w tym samym wierszu różnią się istotnie przy $p < 0,05$ / Values are mean ± standard deviation of three repeated determinations; ^{a, b, c, d} – means with different lowercase letters in the same column are significantly different at $p < 0.05$; ^{A, B, C, E} – means with different uppercase letters in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

również wyniki uzyskane w niniejszych badaniach. Izolowane szczepy różniły się istotnie fenotypowo, co może wskazywać na duże zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe *R. glutinis*. Nie można wykluczyć obecności szczepów wewnątrzgatunkowych, które charakteryzowały się połyskującymi koloniami i w zależności od szczepu różniły się strukturą – od śluzowatej do lekko zwartej. Podobnie jak w badaniach Šovljanski i wsp. [28], kolonie *Rhodotorula* M-66 również były zwarte i błyszczące.

Profil enzymatyczny jest uzależniony od szczepu drożdży oraz źródła jego pochodzenia. Šovljanski i wsp. [28] wykazali zdolność *R. glutinis* do asymilacji sacharozy, maltozy oraz rafinozy, a brak rozkładu inozytolu podobnie jak u badanych szczepów. Inozytol korzystnie wpływa na wydajność fermentacji, przyrost biomasy oraz adaptację do warunków hodowli. Takiej cechy nie potwierdzono dla szczepów wykorzystanych w niniejszym badaniu, podobnie jak dla izolatów analizowanych przez Allahkarami i wsp. [1]. Jednakże dla badanych szczepów głównym źródłem węgla

były: D-glukoza, D-sacharoza i D-rafinoza podobnie jak szczepy izolowane przez Šovljanski i wsp. [28].

Niektóre mikroorganizmy, w tym drożdże, wykazują zdolność do wytwarzania polimerów zewnątrzkomórkowych określanych jako EPS (egzopolisacharydy). Biorą one udział w tworzeniu biofilmów jednocześnie pełniąc funkcje ochronne przed czynnikami stresogennymi środowiska [10]. Egzopolimery drożdży tworzą roztwory koloidalne, które mogły przyczynić się do braku sedimentacji cząsteczek roztworu NaCl, wpływając na wzrost gęstości optycznej zawiesiny. Ma to istotne znaczenie dla metody wykorzystywanej w ekstrakcji karotenoidów. W końcowym etapie procesu ekstrakcji wykorzystywano 20-procentowy roztwór NaCl, który według źródeł literaturowych ułatwiał sedimentację pozostałości biomasy (Metoda I) [17]. W przypadku izolowanych szczepów nie obserwowano tego zjawiska. Po wprowadzeniu modyfikacji własnej, eliminującej m.in. zastosowanie roztworu NaCl (Metoda II), obserwowano istotne statystycznie różnice (przy $p < 0,05$) w absorbancji ekstraktów niezależnie od szczepu i warunków inkubacji (tabela 1), co wskazuje na możliwą obecność egzopolisacharydów. Zastosowana modyfikacja umożliwiła wyeliminowanie fałszywie dodatnich wyników.

Ocena wpływu wybranych czynników na syntezę karotenoidów

Wpływ temperatury na syntezę karotenoidów zależy od mikroorganizmu i zastosowanego substratu [8]. Wzrost temperatury inkubacji obniżał wydajność biosyntezy stężenia karotenoidów wewnątrzkomórkowych (TF) przez *Rhodotorula* M-66, co mogło być spowodowane stworzeniem stresogennych warunków (tabela 2). W przypadku *Rhodotorula* M-78 temperaturę 25 °C wyznaczono jako optymalną do syntezy TF. Jednakże Zhao i wsp. [32] najwyższe stężenie TF oznaczali w temperaturze 28 °C, natomiast najniższe w 20 °C. Malisorn i Suntornsuk [18] po zoptymalizowaniu wpływu temperatury na produkcję karotenoidów u *R. glutinis* najwyższe TF uzyskali w temperaturach 29 °C i 30 °C.

Podobnie jak w badaniach, które prowadzili Amr i wsp. [2], nie wykazano korelacji pomiędzy wzrostem biomasy szczepów wykorzystywanych w badaniach a syntezą karotenoidów. Najwyższy przyrost biomasy obserwowano w 20 °C i wynosił 4,61 oraz 4,32 g/dm³ odpowiednio dla szczepu M-66 i M-78. Tkáčová i wsp. [29] uzyskali dwukrotnie wyższe wartości w temperaturze 25 °C. Temperatura wpływa na ekspresję syntetazy β -karotenu i torulenu, co wiąże się z regulacją aktywności szlaków produkcji karotenoidów. Wiele badań wskazuje na wzrost zawartości torulenu oraz β -karotenu w niskich temperaturach (5 ÷ 20 °C). W przypadku szczepu M-66 potwierdzono wspomnianą zależność, w przeciwieństwie do szczepu M-78. Wskazuje to na duże zróżnicowanie metaboliczne pomiędzy szczepami rodzaju *Rhodotorula*. Podobnie jak wskazywali Amr i wsp. [2], także w niniejszych badaniach wykazano wpływ tempera-

tury hodowli na zmianę koloru peletu. Ustalono, że w 30 °C pelet miał kolor z palety żółci, który jest charakterystyczny dla frakcji karotenów, co odzwierciedla najwyższy procentowy udział frakcji γ - i β - karotenu (tabela 2). Odcień peletu szczepu M-78, niezależnie od pH, przyporządkowano do barwy różowo-pomarańczowej. Wyższa procentowa zawartość torulenu może wyjaśniać uzyskaną barwę (tabela 3).

Po osiągnięciu fazy stacjonarnej dochodzi do ekspresji enzymów uczestniczących we wtórnym metabolizmie, w tym odpowiedzialnych za syntezę karotenoidów. Korzystne warunki środowiska nie zaburzają ich aktywności, umożliwiając wydajną produkcję związków karotenoidowych. Środowisko o pH 7,0 dla większości drobnoustrojów stanowi optymalny czynnik do rozwoju. Badania wskazują, że wartość pH 7,0 jest optymalna zarówno do wzrostu jak i produkcji karotenoidów. Jednakże dla *Rhodotorula* M-66 największą biomasa uzyskano w hodowli przy pH 7,0, natomiast w pH 5,0 uzyskano najwyższe ilości karotenoidów – 531,70 $\mu\text{g/g}$ s.m. (tabela 3), co stanowi trzykrotnie wyższe wartości niż oznaczone przez Allahkarami i wsp. [1]. Alkaliczacja środowiska może wpływać na szlaki metaboliczne drożdży oraz ekspresje genów kodujących enzymy rozkładające m.in. glukozę. Wówczas może dochodzić do nadmiernej syntezy polisacharydów, zmniejszającej produkcję karotenoidów [27], co obserwowano w przypadku szczepu M-78. Najniższe ilości karotenoidów dla szczepu M-66 uzyskano w hodowli prowadzonej przy pH 9,0. Jednakże w tych samych warunkach hodowli dla szczepu M-78 oznaczono dwukrotnie wyższe ilości karotenoidów niż w przypadku szczepu M-66, co świadczy o adaptacji szczepu M-78 do warunków alkalicznych i braku wpływu na biosyntezę metabolitów wtórnych. Niskie pH nie inhibowało wzrostu biomasy oraz produkcji karotenoidów. W pH 3,0 suchą masę oznaczono na poziomie 1,14 oraz 2,18 g/dm^3 odpowiednio dla szczepów M-66 i M-78 (tabela 3). Co więcej, niektóre badania wskazują, że szczepy *Rhodotorula* mają zdolność produkcji biomasy o stężeniu 5,89 g/dm^3 w środowisku kwasowym [5].

W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano zdolność badanych szczepów do samoregulacji pH. Ustalono szczepozależne obniżenie wyjściowego pH pożywki z 9,0 do 6,98 (szczep M-66) i 7,81 (szczep M-78). Miało to wpływ na neutralizację stresogennych warunków, tym samym zapobiegając m.in. destabilizacji ściany komórkowej oraz szlaków metabolicznych. Naturalna zdolność drożdży do regulacji pH środowiska następuje poprzez aktywne uwalnianie protonów (H^+) za pośrednictwem ATPazy błony komórkowej. Alkaliczacja środowiska zaburza pracę ATPazy, jednakże w niektórych szczepach wykazano stabilizację tych kompleksów, a nawet wzrost ich aktywności [6]. W przypadku szczepu M-78 przy pH 5,0 oraz 7,0 obserwuje się jego wzrost po inkubacji w przeciwieństwie do szczepu M-66 (tabela 4). Utrzymanie homeostazy pH cytozolu umożliwia również obecność transporterów kationów alkalicznych takich jak Na^+ oraz K^+ . Taki mechanizm reakcji można rozważać w przypadku szczepu M-66, który prowadził do utrzymania odpowiedniej dynamiki przestrzennej

komórki oraz aktywności szlaków metabolicznych [20]. Obecność kationów w podłożu hodowlanym może determinować warunki stymulujące biosyntezę karotenoidów. Kot i wsp. [14] obserwowali wzrost całkowitej zawartości karotenoidów wraz ze wzrostem koncentracji jonów glinu. W hodowli *Rhodotorula* M-66 o wyjściowym pH 7,0 odnotowano jego spadek (tabela 4). Jednakże w opisanych powyżej warunkach uzyskano najwyższe ilości biomasy (tabela 3), co wiąże się ze wzrostem stężenia CO₂ uwalnianego w trakcie procesu fermentacji. W pH 7,0 CO₂ reaguje z wodą tworząc HCO₃⁻, co może powodować obniżenie pH [21].

Stosunek C/N stanowi kolejny czynnik regulacji biosyntezy karotenoidów przez drożdże. Podobnie jak u Amr i wsp. [2] zaobserwowano wzrost suchej masy wraz ze wzrostem stosunku C/N w szczepie M-66. W przypadku szczepu M-78 nie zaobserwowano takiej zależności, a najwyższe ilości biomasy oznaczono przy C/N 10 (tabela 5). Wzrost stosunku C/N, a tym samym zawartości glukozy stanowiącej główne źródło węgla w hodowli, może wskazywać na występowanie efektu Crabtree w przypadku szczepu M-66. U przedstawicieli rodzaju *Rhodotorula* zazwyczaj nie obserwuje się wspomnianego zjawiska, jednakże występują szczepy, które wytwarzają alkohol etylowy wpływający na obniżenie wydajności syntezy karotenoidów [1].

Kontrola gęstości optycznej (OD) wykazała istotny wpływ warunków hodowli na tempo namnażania się drożdży w obu badanych szczepach *Rhodotorula*. Najintensywniejsze tempo przyrostu biomasy obserwowano w temperaturze 30 °C, co zaobserwowali również Zhao i wsp. [32]. Różnice w przebiegu przyrostu biomasy między badanymi szczepami w różnych temperaturach mogą być związane ze zmianą czasu jednej generacji komórek drożdży oraz długości trwania fazy logarytmicznego wzrostu. Ponadto temperatura istotnie wpływa na zmianę tempa zachodzących procesów metabolicznych, co umożliwiła regulację przebiegu krzywej logarytmicznego wzrostu [20, 22]. Regulacja pH hodowli w obu badanych szczepach umożliwiła wyodrębnienie warunków sprzyjających wzrostowi biomasy komórek drożdży. W przypadku szczepu M-66 było to środowisko obojętne (pH 7,0). Zakwaszenie środowiska stanowiło czynnik stymulujący wzrost szczepu M-78, co wykazały istotne statystycznie różnice w przyroście biomasy niezależnie od czasu i pH hodowli (tabela 7) w przeciwieństwie do alkaliczacji środowiska. Wraz z upływem czasu hodowli szczepu M-78 przy pH 9,0 obserwowano spadek przyrostu biomasy, co może być związane z reakcją na stresogenne warunki hodowli i istotnym wpływem na cykl komórkowy drożdży. Na przebieg krzywej logarytmicznego wzrostu mają wpływ również kationy, co wykazali Kieliszek i wsp. [13] prowadząc hodowlę *R. mucilaginosa* z suplementacją kationów selenu. Szczep M-78 wykazywał wolniejszy przyrost biomasy i osiągał fazę zamierania po 96 h inkubacji niezależnie od stosunku C/N w przeciwieństwie do szczepu M-66 (tabela 6 i 7). Wysoka zawartość węgla w pożywce mogła stanowić czynnik ograniczający przyrost biomasy, skracając fazę logarytmicznego wzrostu. Osiągnięcie fazy zamiera-

nia przez mikroorganizmy związane jest z fragmentacją ściany komórkowej, a tym samym uwolnieniem wewnątrzkomórkowych metabolitów, w tym karotenoidów. W przypadku szczepu M-78, najniższe OD oznaczono przy stosunku C/N 20, co korelowało z najwyższym stężeniem zewnątrzkomórkowych karotenoidów (VC), które mogły zostać uwolnione podczas fragmentacji ściany komórkowej drożdży.

Wnioski

1. W badaniach wykazano wpływ temperatur (20 °C, 25 °C i 30 °C) na ilości pozyskanej biomasy szczepów. Nie wykazano natomiast korelacji pomiędzy wzrostem biomasy a stężeniem pozyskiwanych karotenoidów. Wraz ze wzrostem temperatury inkubacji obserwowano zmianę koloru peletu w kierunku żółci.
2. Zmiana warunków pH determinowała istotne różnice w oznaczanych frakcjach karotenoidowych niezależnie od szczepu. Jednakże badane szczepy nie wykazywały inhibicji biosyntezy karotenoidów w skrajnych wartościach pH tj. pH 3,0 oraz pH 9,0, co wskazuje na ich zdolność adaptacji do warunków środowiska. Ponadto zasadowe środowisko hodowli stymulowało namnażanie biomasy szczepu M-66, uzyskując 4,25 g/dm³.
3. Zmiana stosunku węgla do azotu w szczepie M-78 wpłynęła na procentowy udział poziomu β -karotenu oraz biomasy w obu badanych szczepach. Jednakże maksymalną biomasę uzyskano przy odmiennym stosunku C/N niż najwyższe stężenie karotenoidów. W zależności od warunków hodowli oznaczano zmienny przyrost biomasy badanych szczepów, co warunkowało wpływ na przebieg krzywej logarytmicznego wzrostu drożdży.
4. Badanie wpływu czynników fizykochemicznych umożliwiło wyodrębnienie optymalnych warunków do syntezy karotenoidów. Najwyższy poziom karotenoidów uzyskano w temperaturze 20 °C, pH 5,0 i C/N 1,0 dla *Rhodotorula* M-66 (531,70 μ g/g s.m.), natomiast dla *Rhodotorula* M-78 w warunkach 25°C, pH 6,0 oraz C/N 1,0 (353,30 μ g/g s.m.). Ponadto dla szczepu M-78 oznaczono dominację astaksantyny wśród badanych frakcji karotenoidów. Badane szczepy *Rhodotorula* stanowią wydajne źródło karotenoidów, które w przyszłości mogą być wykorzystywane jako naturalne i bioaktywne dodatki w różnych gałęziach przemysłu.

Literatura

- [1] Allahkarami S., Sepahi A.A., Hosseini H., Razavi M.R.: Isolation and identification of carotenoid-producing *Rhodotorula* sp. from Pinaceae forest ecosystems and optimization of in vitro carotenoid production. *Biotech. Rep.*, 2021, 32, #00687.
- [2] Amr A, E. B., Abd, A. M., Ahmed R, E. M.: Some factors affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. *Food Nutr. Sci.*, 2012, 3, 1, 64-71.

- [3] Calculator Academy Team 2023, <https://calculator.academy/extinction-coefficient-calculator/>
- [4] Chen D., Han Y., Gu Z.: Application of statistical methodology to the optimization of fermentative medium for carotenoids production by *Rhodobacter sphaeroides*. Proc. Biochem., 2006, 41(8), 1773-1778.
- [5] Cheng Y.-T., Yang C.-F.: Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. J. Taiwan Inst. Chem. Engin., 2016, 61, 270-275.
- [6] Diakov T.T., Kane P.M.: Regulation of vacuolar proton-translocating ATPase activity and assembly by extracellular pH. J. Biol. Chem., 2010, 285(31), 23771-23778.
- [7] Du C., Li Y., Guo Y., Han M., Zhang W., Qian H.: The suppression of torulene and torularhodin treatment on the growth of PC-3 xenograft prostate tumors. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2016, 469, 1146-1152.
- [8] Frengova G.I., Beshkova D.M.: Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2009, 36(2), #163.
- [9] Geronikou A., Larsen N., Lillevang S.K., Jespersen L.: Occurrence and identification of yeasts in production of white-brined cheese. Microorganisms, 2022, 10(6), #1079.
- [10] Gientka I., Błażej S., Stasiak-Róžańska L., Chlebowska-Śmigiel A.: Exopolysaccharides from yeast: insight into optimal conditions for biosynthesis, chemical composition and functional properties? review. Acta Sci. Polon. Technol. Aliment., 2015, 14(4), 283-292.
- [11] Kallmorgen Corporation, "Munsell Colour Charts for Plant Tissues," Munsell Color Division, Maryland, 1972.
- [12] Kanzy H.M., Nasr N.F., El-Shazly H.A., Barakat O.S.: Optimization of carotenoids production by yeast strains of *Rhodotorula* using salted cheese whey. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., 2015, 4(1), 456-469.
- [13] Kieliszek M., Kot A.M., Kolotyło V.: Bioaccumulation of selenium and production of carotenoids by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. Biocatal. Agric. Biotechnol., 2023, 53, #102903.
- [14] Kot A.M., Błażej S., Brzezińska R., Sęk W., Kieliszek M.: Effect of selected cations and b vitamins on the biosynthesis of carotenoids by *Rhodotorula mucilaginosa* yeast in the media with agro-industrial wastes. Appl. Sci., 2021, 11(24), #11886.
- [15] Kot A.M., Sęk W., Kieliszek M., Błażej S., Pobiega K., Brzezińska R.: Diversity of red yeasts in various regions and environments of Poland and biotechnological potential of the isolated strains. Appl. Biochem. Biotech., 2023, 1-43.
- [16] Li C., Swofford C.A., Sinskey A.J.: Modular engineering for microbial production of carotenoids. Metab. Eng. Commun., 2020, 10, #00118.
- [17] Libkind D., Brizzio S., Van Broock M.: *Rhodotorula mucilaginosa*, a carotenoid producing yeast strain from a Patagonian high-altitude lake. Folia Microbiol., 2004, 49, 19-25.
- [18] Malisorn C., Suntornsuk W.: Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. Biores. Technol., 2008, 99(7), 2281-2287.
- [19] Meruvu H., Dos Santos J.C. Colors of life: A review on fungal pigments. Crit. Rev. Biotechnol., 41(8), 2021, 1153-1177.
- [20] Molon M., Zadrąg-Tecza R.: Effect of temperature on replicative aging of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biogerontol., 2016, 17, 347-357.
- [21] Orić R., Brul S., Smits G.J.: Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subjects, 2011, 1810(10), 933-944.
- [22] Peña A., Sánchez N.S., Álvarez H., Calahorra M., Ramírez J.: Effects of high medium pH on growth, metabolism and transport in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res., 2015, 15(2), #fou005.

- [23] Perrier V, Dubreucq E, Galzy P.: Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. Arch. Microbiol., 1995, 164: 173-179.
- [24] PN-EN ISO 6611:2007 Mleko i przetwory mleczne. Oznaczanie liczby jednostek tworzących kolonie drożdży i/lub pleśni. Metoda płytkowa w temperaturze 25°C.
- [25] Rodríguez N.A.T., Quiñones-Cerna C.E., Castillo H.M.R., Cruz-Monzon J.A., Butrón F.J.H., Soto J.C. R.: Optimization of Total Carotenoid Production by *Rhodotorula mucilaginosa* from Artichoke Agroindustrial Waste Using Response Surface Methodology. Envir. Res. Eng. Manage., 2023, 79(2), 111-121.
- [26] Saha N., Samanta A.K., Chaudhuri S., Dutta D.: Characterization and antioxidant potential of a carotenoid from a newly isolated yeast. Food Sci. Biotechnol., 2015, 24, 117-124.
- [27] Serra-Cardona A., Canadell D., Ariño J.: Coordinate responses to alkaline pH stress in budding yeast. Microbial Cell, 2015, 2(6), #182.
- [28] Šovljanski O., Saveljić A., Tomić A., Šeregelj V., Lončar B., Cvetković D., Čanadanović-Brunet J.: Carotenoid-producing yeasts: Selection of the best-performing strain and the total carotenoid extraction procedure. Processes, 2022, 10(9), #1699.
- [29] Tkáčová J., Furdíková K., Klemková T., Ďurčanská K., Čertík M.: Screening of carotenoid-producing strains isolated from natural sources. Acta Chimica Slovaca, 2015, 8(1), 34-38.
- [30] Yadav S., Manjunatha K.H., Ramachandra B., Suchitra N., Prabha R.: Characterization of pigment producing *Rhodotorula* from dairy environmental samples. Asian J. Dair. Foods Res., 2014, 33(1), 1-4.
- [31] Zhao D., Li C.: Multi-omics profiling reveals potential mechanisms of culture temperature modulating biosynthesis of carotenoids, lipids, and exopolysaccharides in oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis*. ZHK. LWT-Food Sci. Technol., 2022, 171, #114103.
- [32] Zhao Y., Guo L., Xia Y., Zhuang X., Chu W.: Isolation, identification of carotenoid-producing *Rhodotorula* sp. from marine environment and optimization for carotenoid production. Marine drugs, 2019, 17(3), #161.

OPTIMIZATION OF BIOSYNTESIS CONDITIONS OF SELECTED CAROTENOIDS BY *RHODOTORULA* YEASTS

S u m m a r y

Introduction: Carotenoids are a diverse group of pigmented isoprenoid compounds. They are now commercially extracted mainly from plants or by a chemical synthesis, from which 80-90 % of compounds are obtained. However, synthetic carotenoids, if provided in huge amounts, can be harmful to human health, whereas waste generated in their production process poses an environmental risk. An alternative to the equivalent of a chemical synthesis is to use microbial production to obtain carotenoids with a high biological activity, which could be a natural and functional additive in various industries. Therefore, the aim of the study was to optimize the culture conditions and biosynthesis of selected carotenoid fractions by *Rhodotorula* strains. Yeast culture was developed in 100 cm³ flasks in which 50 cm³ of YPG medium was prepared with constant shaking and access to light. The regulation of carotenoid biosynthesis took into account the influence of the following factors: temperature, pH and a carbon/nitrogen ratio. A spectrophotometric method was used to determine the fraction of carotenoids in terms of quantity and quality.

Results and conclusions: The effects of temperature, C/N ratio and pH on the amount of biomass obtained were demonstrated. Changing pH conditions determined significant differences in the determined

carotenoid fractions regardless of a strain. Moreover, the application of extreme pH values did not inhibit the growth or synthesis of carotenoids, pointing to the adaptation of *Rhodotorula* sp. to stressful environmental conditions. A variable increase in biomass of the strains tested was found depending on the culture conditions, which affected the logarithmic growth curve of the yeast. An analysis of the influence of physicochemical factors allowed for the identification of culture conditions favorable for carotenoid production.

Key words: natural pigments, carotenoids, yeast, *Rhodotorula* sp. ☒