

Mladi za napredek Maribora 2016

33. srečanje

VPLIV UVA IN UVB SEVANJA NA PROIZVODNJO
KAROTENOIDOV PRI GLIVI *Rhodotorula mucilaginosa*

BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

Avtor: AJDA MLAKAR, KAJA GRIL ROGINA

Mentor: KATJA HOLNTHANER ZOREC, ROK TKAVC

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Maribor, februar 2016

Mladi za napredek Maribora 2016

33. srečanje

VPLIV UVA IN UVB SEVANJA NA PROIZVODNJO
KAROTENOIDOV PRI GLIVI *Rhodotorula mucilaginosa*

BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO



Maribor, februar 2016

Kazalo

POVZETEK	7
ZAHVALA	8
1. UVOD	9
1.1 Teoretični uvod	11
1.1.1 UV sevanje.....	11
1.1.2 Gliva <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	14
1.1.2.1 Uvrstitev glive <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> v sistem.....	15
1.1.2.2 Morfološke značilnosti glive <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	15
1.1.2.3 Optimalni pogoji.....	16
1.1.2.4 Patogenost.....	16
1.1.3 Karotenoidi.....	16
1.1.3.1 β -karoten.....	19
1.1.3.2 Torulen.....	19
1.1.3.3 Torularodin.....	20
1.2 Namen naloge	21
1.3 Raziskovalni vprašanja	21
1.4 Hipoteze	21
1.5 Definiranje spremenljivk	22
2. METODOLOGIJA	23
2.1 Pripomočki in metoda dela	24
2.1.1 Priprava gojišča YEPD in priprava kulture.....	24
2.1.2 Izvedba eksperimenta in obsevanje z UVA in UVB svetlobo.....	25
2.1.3 Merjenje optične gostote in absorbance ekstrakta karotenoidov.....	26
2.1.3.1 Redčitvena vrsta.....	27
2.1.3.2 Ekstrakcija karotenoidov.....	28
2.1.3.3 Merjenje absorbance ekstrakta karotenoidov.....	29
2.1.3.4 Meritev optične gostote glivne kulture.....	29
2.1.4 Tankoplastna kromatografija pigmentnega ekstrakta glivne kulture.....	30
2.1.5 Statistična obdelava podatkov.....	32
3. REZULTATI IN ANALIZA	33
3.1 Rezultati redčitvene vrste	34
3.2 Rezultati tankoplastne kromatografije in Rf faktorji ekstrahiranih karotenoidov	34
3.3 Rezultati meritev vzorcev ekstrahiranih karotenoidov	35

4. DISKUSIJA	40
5. VREDNOTENJE UPORABLJENIH METOD	43
5.1 Izboljšave gojišča in kulture	43
5.2 Izboljšave obsevanja	43
5.3 Izboljšave ekstrakcije	44
5.4 Izboljšave TLC metode	44
5.5 Izboljšave izbrane metode	45
6. ZAKLJUČEK	46
7. DRUŽBENA ODGOVORNOST	48
8. PRILOGE	49
9. VIRI IN LITERATURA	53
9.1 Knjižni naslovi in naslovi člankov	53
9.2 Spletni naslovi	54
9.3 Slikovni viri	56

Kazalo slik

Slika 1: Svetlobni spekter (vir: Inis).....	11
Slika 2: Zgradba glivne celice (vir: Biocourseware).....	14
Slika 3: Sev <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (lastni vir)	15
Slika 4: Pomembne kemijske, biološke in fizikalne lastnosti karotenoidov (vir: Kushwaha)	18
Slika 5: Strukturna formula β -karotena (vir: Chemistry StackExchange).....	19
Slika 6: Strukturna formula torulena (vir: Kegg)	19
Slika 7: Strukturna formula torularodina (vir: Guidechem)	20
Slika 8: Hodogram poteka dela (lastni vir).....	23
Slika 9: Pripomočki v laminariju pred začetkom obsevanja (lastni vir).....	26
Slika 10: Kolonije na plošči agarja (lastni vir).....	28
Slika 11: Vsebina centrifugirke po prvem centrifugiranju (lastni vir)	29
Slika 12: Tekoče gojišče z glivo <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (lastni vir)	30
Slika 13: Aluminijska ploščica z nanešenimi karotenoidi v komori za kromatografijo (lastni vir).....	31
Slika 14: Absorpcijski spekter ekstrakta karotenoidov v glivi <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (lastni vir). 33	
Slika 15: Aluminijska ploščica po opravljeni TLC metodi (lastni vir)	34
Slika 16: Skica poteka eksperimenta, str. 1 (lastni vir)	49
Slika 17: Skica poteka eksperimenta, str. 2 (lastni vir)	50
Slika 18: Skica poteka eksperimenta, str. 3 (lastni vir)	51
Slika 19: Skica poteka eksperimenta, str. 4 (lastni vir)	52

Kazalo preglednic

Preglednica 1: Razdelitev ultravijolične svetlobe z valovno dolžino med 100 nm in 400 nm. (Lucas, 2015).....	12
Preglednica 2: Primerjava med izračunanimi vrednostmi R_f faktorjev in standardiziranimi R_f faktorji karotenoidov, ekstrahiranih iz glive <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	35
Preglednica 3: Absorbance ekstrahiranih karotenoidov kulture glive <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , obsevane z UVA in UVB svetlobo.....	35
Preglednica 4: Optična gostota (OD(449,2)) kulture glive <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , obsevane z UVA in UVB svetlobo.....	38

Kazalo grafov

Graf 1: Povprečne vrednosti absorbance ekstrahiranih karotenoidov, ki so bili izpostavljeni 10, 20 in 30 min obsevanju z UVA, in neobsevanih vzorcev (+/- 1 SD).	36
Graf 2: Povprečne vrednosti absorbance ekstrahiranih karotenoidov, ki so bili izpostavljeni 10, 20 in 30 min obsevanju z UVB, in neobsevanih vzorcev (+/- 1 SD).	37
Graf 3: Povprečne vrednosti absorbance ekstrahiranih karotenoidov, ki so bili izpostavljeni 10, 20 in 30 min obsevanju z UVA in UVB, in neobsevanih vzorcev (+/- 1 SD).	37
Graf 4: Povprečne vrednosti optične gostote vzorcev, ki so bili izpostavljeni 10, 20 in 30 min obsevanju z UVA in z UVB, ter neobsevanih vzorcev (+/- 1 SD).	39

POVZETEK

Karotenoidi so hidrofobni terpeni, ki lahko ob fotosintetski funkciji tudi ščitijo celico pred poškodbami zaradi UV sevanja. Tvorijo jih lahko tako rastline kot tudi mikroorganizmi, med njimi nekatere glive. V raziskovalni nalogi smo ugotavljali vpliv UVA in UVB sevanja na proizvodnjo karotenoidov pri enocelični glivi *Rhodotorula mucilaginosa*, zaradi vsebnosti karotenoidov imenovani tudi rdeča kvasovka. Tekočo kulturo glive smo za različna časovna obdobja izpostavljali UVA in UVB svetlobi in po obsevanju s pomočjo spektrofotometra izmerili optično gostoto. Iz obsevane glivne kulture smo pripravili metanolne ekstrakte karotenoidov in jim izmerili absorbanco pri 449,2 nm. Izvedli smo tudi tankoplastno kromatografijo, ki je pokazala prisotnost β -karotena, torulena in torularodina. Meritve absorbanca in optične gostote so pokazale, da tako UVA kot UVB sevanje spodbuja nastanek karotenoidov, kar kaže na potencialno možnost uporabe te glive za namene komercialne industrije.

KLJUČNE BESEDE: gliva *Rhodotorula mucilaginosa*, karotenoidi, β -karoten, torulen in torularodin, eksperiment, UVA sevanje, UVB sevanje, ekstrakti karotenoidov, spektrofotometer, optična gostota, absorbanca.

ZAHVALA

Najprej bi se radi zahvalili mentorici za vso pomoč, opremo, čas in svetovanje, ki nama ga je nudila. Najlepša hvala zunanjim svetovalcem za strokovno pomoč, kemijskemu aktivu za laboratorij, informatiku za tehnično pomoč in lektorju za slovnične in stilske popravke. Brez naštetih oseb bi najina raziskovalna naloga ostala nedokončana.

1. UVOD

V zadnjih desetletjih se globalna industrija v skladu z mišljenjem ljudi počasi obrača k zeleni proizvodnji zaradi jasnih posledic človeške aktivnosti v naravi. Spremembe so večje in hitrejšje, kot smo pričakovali, in potrebe po prilagoditvah zahtev družbe in gospodarstva ter iskanju inovativnih rešitev so očitne. Zaradi velikosti in kompleksnosti problema je sodelovanje številnih strok nujno; omogočiti je potrebno prost pretok informacij, izsledkov in podatkov iz velikega števila verodostojnih virov za doseg skupnega cilja.

Eden večjih problemov globalne industrije je visoka količina človeku ter naravi strupenih in nevarnih odpadkov oziroma stranskih produktov reakcij, v katerih se za potrebe gospodarstva umetno sintetizirajo snovi. (Mata - Gómez idr., 2014)

Karotenoidi so izredno pomembna skupina pigmentov, ki jih uporabljajo številne industrije, kot so prehranska, kozmetična, medicinska, biotehnoška in druge. Zaradi visoke raznolikosti, številnih možnosti uporabe in pozitivnih zdravstvenih vplivov so bili leta 2007 na globalnem trgu vredni \$766 mio, leta 2015 pa je vrednost skočila na \$919 mio. Samo vrednost β -karotena je leta 2007 znašala \$240 mio, leta 2015 pa \$280 mio. (Kirti idr., 2014)

Trenutno sta na trgu karotenoidov naravnega izvora zgolj 2% celotne produkcije omenjenih pigmentov. Naravni karotenoidi se običajno pridobivajo z ekstrakcijo iz rastlinskih celic. Pri uporabi rastlin kot naravnega vira karotenoidov so največji problemi stroški ekstrakcije in nizka produkcija pigmentov na celico. Preostalih 98% proizvedenih karotenoidov nastane z umetno kemično sintezo. Umetno izdelani karotenoidi imajo nekoliko drugačno molekularno strukturo kot naravni in so zato v večjih količinah človeku nevarni. Naravno sintetizirani karotenoidi višajo koncentracijo hemoglobina in vitamina A v krvi, ki izboljšuje imunski sistem, izboljšuje vid, preprečuje kardiovaskularne bolezni in zmanjšuje pojavnost bolezni, povezanih s starostjo. Do sedaj opravljene raziskave govorijo v prid uporabi mikroorganizmov, ki proizvajajo karotenoide, v komercialni industriji zaradi številnih pozitivnih posledic za ljudi in okolje. (Prav tam)

Idealen mikroorganizem za proizvodnjo pigmentov ima široko strpnostno območje za pH, temperaturo in prisotne minerale. Količina proizvedenih pigmentov na celico mora biti relativno visoka, ekstrakcija pigmentov ne sme biti dolgotrajna ali zahtevati veliko denarja. (Arulselvi idr., 2013)

Izsledki raziskav prikazujejo podatke o optimalnih pogojih za maksimalno količino proizvedenih karotenoidov na celico za posamezne vrste organizmov. Kot viri snovi, ki jih mikroorganizem potrebuje za biosintezo karotenoidov, se lahko uporabljajo odpadni stranski produkti prehranske industrije, kot so čisti glicerol, slad, ekstrakt šote in podobno. Faktorji velike količine proizvedenih karotenoidov so vrsta organizma, izbran vir ogljika in dušika, temperatura, pH, dostopnost kisika, prisotnost kovinskih ionov in soli, metode genske modifikacije ter jakost in vrsta svetlobe. Dokazan je spodbujevalni učinek UV svetlobe, neraziskane pa so posledice obsevanja na dedni material mikroorganizmov in na strukturo proizvedenih karotenoidov. (Mata - Gomez, 2014)

Uporaba mikroorganizmov v proizvodnji karotenoidov ima veliko prednosti, vendar je pred vpeljavo omenjenih mikroorganizmov potrebno podrobneje raziskati vplive raznih okoljskih dejavnikov na povečanje proizvodnje pigmentov, optimalne pogoje in vrste organizmov, ki bi ustrezali pogojem za uporabo v komercialni proizvodnji.

1.1 Teoretični uvod

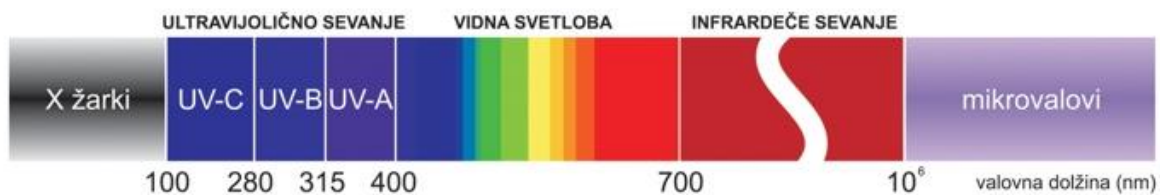
1.1.1 UV sevanje

Sevanje je definirano kot pojav, pri katerem se energija iz nekega vira širi v obliki delcev ali valovanja. Je torej oddajanje in razširjanje valovanja (delcev) in s tem energije v prostor. Od energije valovanja je odvisno, kakšen učinek bo imelo sevanje na snov, ki jo le-to zadane oz. gre skozi. (Kralj idr., 2003)

Sevanja lahko v grobem razdelimo v 3 skupine:

- sevanja, pri katerem vir oddaja mehansko valovanje,
- sevanja, pri katerem vir oddaja elektromagnetno valovanje,
- sevanja, pri katerem vir oddaja delce. (Prav tam)

V nalogi se bomo osredotočili na UV sevanje, ki spada med elektromagnetno valovanje.



Slika 1: Svetlobni spekter (vir: Inis)

UV sevanje s krajšimi valovnimi dolžinami, rentgenske žarke in gama sevanje prištevamo k ionizirajočemu sevanju; to pomeni, da sevanje pri prehodu skozi snov iz atomov izbija elektrone. Če je živo bitje izpostavljeno ionizirajočemu sevanju, se tudi v njegovi medceličnici in v celicah pojavijo ioni in prosti radikali, kar lahko ima škodljive učinke. (Kralj idr., 2003; Lucas, 2015)

Ultravijolično sevanje je sevanje z valovnimi dolžinami, ki se raztezajo od 400 nm do 100 nm. Oddajajo ga telesa pri zelo visokih temperaturah, nastane pa tudi ob razelektritvah v plinih. Človeško oko ga ne zazna, saj nima za to ustreznih vidnih pigmentov. Človek nekaj UV sevanja sicer potrebuje, saj pod njegovim vplivom v koži nastaja vitamin D, ki je potreben za tvorbo kalcija v kosteh. Večje količine sevanja pa so za kožo lahko nevarne,

povzročajo opekline in celo povečajo možnost za nastanek kožnega raka. (Kralj idr., 2003; Health effects, 2016)

Preglednica 1: Razdelitev ultravijolične svetlobe z valovno dolžino med 100 nm in 400 nm.
(Lucas, 2015)

IME	KRATICA	VALOVNA DOLŽINA [nm]
Ultravijolična svetloba A	UVA	315 – 400
Ultravijolična svetloba B	UVB	280 – 315
Ultravijolična svetloba C	UVC	100 – 280

Na splošno je potrebno veliko manj UVB sevanja kot UVA sevanja za nastanek trenutnih vplivov na koži, kot so npr. opekline ali zapoznela pigmentacija in poškodbe DNA. Tako UVB kot UVA sevanje pa zmanjšujeta imunski odziv v koži. UVC sevanje naj bi ozonska plast popolnoma vsrkala, zato le-to nima vplivov na naravo. Lahko pa povzroči akutno vnetje roženice in veznice. (Kralj idr., 2003)

Biološki odziv organizmov na izpostavljenost sevanju je odvisen od količine in vrste sevanja. Celice se namreč na nizke doze ionizirajočega sevanja odzovejo drugače kot na visoke. Pri nizkih dozah sevanja se v času 1 ure sproži prilagoditveni odgovor na stres. Aktivira se skupina genov (nekaj več kot 100, odvisno od organizma), ki uravnavajo popravilo membran, kromosomov in beljakovin v celici. Tudi pri velikih dozah sevanja se v celici aktivira veliko genov, vendar drugačnih, kar kaže na to, da so celice specializirane in ne gre le za bolj ali manj intenziven odziv celic. Aktivacija genov za odziv na nizke doze ščiti celico pred morebitnimi nadaljnjimi učinki visokih doz. Če je bila celica pred obsevanjem z visoko dozo že obsevana z manjšo, je bilo ugotovljeno 20 – 50 % zmanjšanje poškodb DNA v celici. (Raopis, 2006)

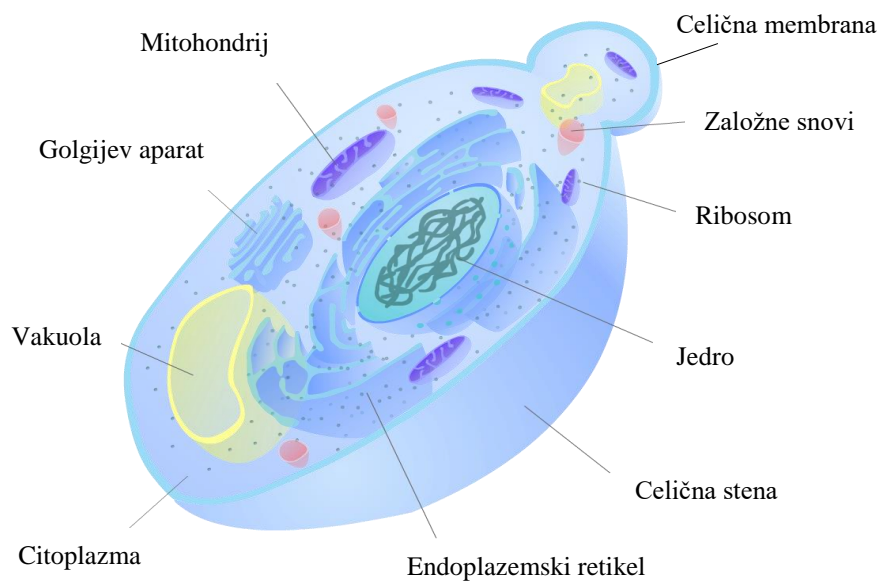
Sevanje ima na organizem 2 različni vrsti učinkov. Deterministični učinki, tisti, ki se zgodijo zagotovo in so sorazmerni s količino sevanja, se pojavijo, ko telo prejme visoko dozo sevanja. Pojavijo se takoj ali v nekaj dneh po obsevanju. Stohastični učinki se ne zgodijo vedno in tudi niso sorazmerni s količino sevanja. Pojavijo se šele po daljšem času in so posledica majhnih poškodb v genih, povzročijo pa lahko razvoj rakavega obolenja. (Prav tam)

Na molekularnem nivoju lahko sevanje iz drugih atomov in molekul izbije elektron, pri čemer nastanejo ioni. Ionizacija molekul je fizikalna sprememba, ki pa lahko v celici povzroči številne kemične in biološke spremembe. V celici ob obsevanju nastajajo tudi prosti radikali, ki težijo k temu, da bi zapolnili svojo zunanjo orbitalo in si pridobili manjkajoči elektron. Ko si radikal iz druge molekule pridobi elektron, le-to molekulo kemično spremeni. Prosti radikali najpogosteje napadejo dvojne vezi v molekulah, jih spremenijo in zato te ne morejo več opravljati svoje naloge v celici. Za poškodbe so najbolj občutljive molekule DNA in maščobe v celičnih membranah. (Raopis, 2006; Lucas 2015)

Radikali povzročajo direktne poškodbe peptidnih vezi, poškodbe DNA, kot so cepitve vezi ali mutacije, poškodbe membrane z lipidno oksidacijo, posredne poškodbe proteinov z radikalno aktiviranimi lipidi in sladkorji ter spremembe sekundarne ali terciarne strukture, kar pomeni izgubo katalitične ali strukturne funkcije. (Danevič in Mandić-Mulec, 2007)

1.1.2 Gliva *Rhodotorula mucilaginosa*

Glive so heterotrofni eno- ali večcelični evkarionti, ki sprejemajo hranilne snovi z vsrkavanjem organskih molekul iz okolja, ki jih razgradijo s pomočjo encimov; v nasprotju z živalmi hrano prebavljajo zunaj telesa. Glede na način prehranjevanja delimo glive na saprofite, simbionte in parazite. Posebnost glivnih celic je celična stena iz hitina, ki je polimer β -glukoze z vezanim dušikom; zaradi prisotnosti celične stene so glive negibljive. (Vihar idr., 2011)



Slika 2: Zgradba glivne celice (vir: Biocourseware)

1.1.2.1 Uvrstitev glive *Rhodotorula mucilaginosa* v sistem

Kraljestvo: Glive (*Fungi*)
Deblo: *Basidiomycota*
Razred: *Urediniomycetes*
Red: *Sporidiales*
Družina: *incertae sedis*
Rod: *Rhodotorula*
Vrsta: *Rhodotorula mucilaginosa*



(Vir: Rhodotorula, 2016).

Slika 3: Sev *Rhodotorula mucilaginosa* (lastni vir)

Rhodotorula je rod enoceličnih pigmentiranih saprofitskih gliv, ki vključuje sedemintrideset posameznih vrst. Pogosta je v zraku, prsti, jezerih, oceanih; izolirana je bila celo v ekosistemih z ekstremnimi pogoji za življenje, kot na primer na dnu Baltskega morja, na Antarktiki in v Mrtvem morju. *Rhodotorula mucilaginosa* je ena izmed treh patogenih vrst znotraj rodu *Rhodotorula*, v urbanem okolju pa je najpogosteje prisotna v sadnih sokovih, siru, oreščkih in morskih sadežih. (Goldani in Wirth, 2012)

1.1.2.2 Morfološke značilnosti glive *Rhodotorula mucilaginosa*

Rhodotorula tvori rožnate, koralne, oranžne do rdeče kolonije; barva je odvisna od prisotnosti določenih karotenoidov znotraj posamezne vrste. Ta posebna oranžno-rdeča barva je posledica pigmentov, ki jih kvasovka tvori zato, da lahko se zaščiti pred določenimi valovnimi dolžinami svetlobe, ki bi sicer škodovale celicam. Morfološko gledano so kolonije točkaste (okrogle do ovalne), mehke, neprosojne, gladke, konveksne in vlažne, robovi so ravni. V primerjavi z rodом *Candida* ne tvorijo hif. (Ramos, 2014)

1.1.2.3 Optimalni pogoji

Največji vpliv na celično rast in proizvodnjo karotenoidov je zabeležen ob prisotnosti peptona in glukoze. Optimalni pogoji za rast na gojišču so 3,23% ekstrakt kvasovk, 2,84% sladu ali glicerola (ti dve snovi sta zabeleženi kot najboljši vir ogljika za produkcijo karotenoidov), 6,99% peptona in 6,86% glukoze. Preostali optimalni pogoji so pH okrog 5,0 in temperatura okrog 25 – 30 °C. (Entomological Research, 2009)

1.1.2.4 Patogenost

Na ljudeh je *Rhodotorula* prisotna na površini kože, v izločalih, dihalih in v prebavnem traktu. Znotraj svojega rodu je *Rhodotorula mucilaginosa* najpogostejši krivec za obolenja pri ljudeh, k temu po vsej verjetnosti pripomore sposobnost tvorbe biofilma. Infekcije so bolj pogoste v tropskih predelih; simptomi se pojavijo pri ljudeh z obstoječim obolenjem, kot je AIDS ali ostale avtoimunske bolezni. (Ramos, 2014)

1.1.3 **Karotenoidi**

Karotenoidi so organski pigmenti, ki se nahajajo v kloroplastih in kromoplastih rastlin, v nekaterih živalih, glivah in bakterijah. (Zoz idr., 2015)

Spadajo pod terpene, ki so najpogostejše sestavine eteričnih olj in smol. Zgrajeni so iz izoprena (C_5H_8); splošna formula terpenov je $(C_5H_8)_n$, pri čemer n pomeni število izoprenskih enot. (Prav tam)

Obstaja več kot 600 vrst karotenoidov, delijo se na dve večji skupini; karotene, ki so neoksidirani, in na oksidirane ksantofile. Karotenoidi so sestavljeni iz verige 8 izoprenov in vsebujejo 40 ogljikovih atomov. Karotenoide klasificiramo glede na strukturne variacije cikličnih ogljikovih obročev in pozicijo dvojne vezi. (Entomological Research, 2009)

So topni v nepolarnih topilih in netopni v polarnih. V organizmih, ki izvajajo fotosintezo, absorbirajo svetlobo, absorbirana energija se nato prenese na klorofil. V celici so prisotni tudi kot zaščita pred oksidativnimi poškodbami in prostimi radikali. Največ karotenoidov tvorijo bakterije rodu *Flavobacterium* in *Micrococcus*, alge *Dunaliella* in *Haematococcus* ter kvasovke rodu *Phaffia*, *Rhodotorula* in *Sporobolomyces*. (Zoz idr., 2015)

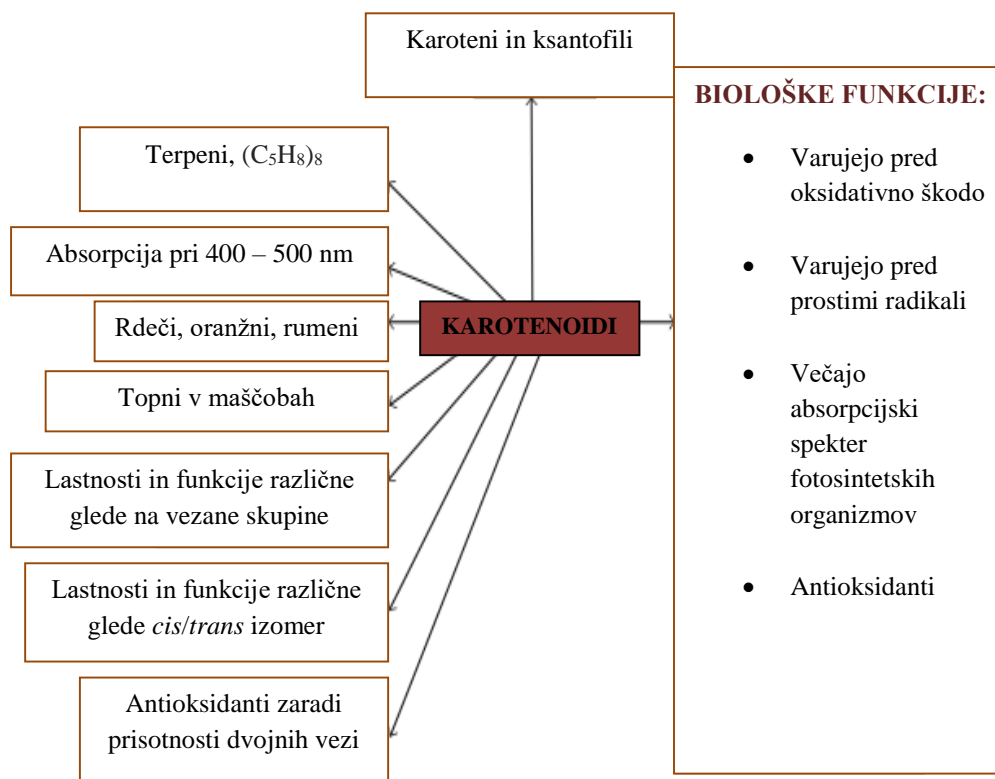
Večina karotenoidov absorbira svetlobo med 400 do 550 nm, zaradi česar so pigmenti obarvani rumeno, rdeče, oranžno ali rožnato. (Entomological Research, 2009)

V industrijski proizvodnji se uporabljajo kot naravna prehranska barvila. Komerzialna proizvodnja karotenoidov s pomočjo gliv je visoko učinkovita zaradi nezahtevnosti organizmov in nizkih stroškov pridelave. Trenutno na trgu prevladujejo sintetična barvila, vendar tržne zahteve po naravnih barvilih rastejo. (Prav tam)

Biomasa karotenoidov se lahko ekstrahira s topili kot so heksan, metanol ali petrol eter – aceton, pri določenih postopkih tudi brez potrebe po razbitju celic. Ekstenzivna purifikacija prav tako ni potrebna v primeru uporabe karotenoidov kot prehranskih ali kozmetičnih barvil. (Prav tam)

Vpliv večine karotenoidov, z izjemo najpogostejših (β -karoten, likopen, ...), na človeka ni podrobno raziskan, razen antioksidativne aktivnosti. Antioksidanti so molekule, ki lahko upočasnijo ali celo preprečijo oksidacijo oz. prenos elektrona iz ene molekule na drugo. Pri oksidacijskih reakcijah kot stranski produkt nastanejo prosti radikali, ki v telesu kasneje povzročijo verižne radikalske reakcije, katerih posledice so poškodbe celic. Antioksidanti ob vnosu v telo reagirajo s prostimi radikali in jih tako nevtralizirajo ter preprečijo oksidacijo drugih molekul. (Paiva in Russell, 1999)

Oksidacijske reakcije v telesu so ključne za življenje, lahko pa so tudi usodne. Ob pomanjkanju antioksidantov, se v telesu pojavi prevelika koncentracija prostih radikalov, kar privede do oksidativnega stresa; posledica le-tega so poškodbe ali smrt celic. (Prav tam)



Slika 4: Pomembne kemijske, biološke in fizikalne lastnosti karotenoidov (vir: Kushwaha)

Rhodotorula mucilaginosa je sposobna opravljati biosintezo karotenoidov. V procesu karotenogeneze najpogosteje sintetizira:

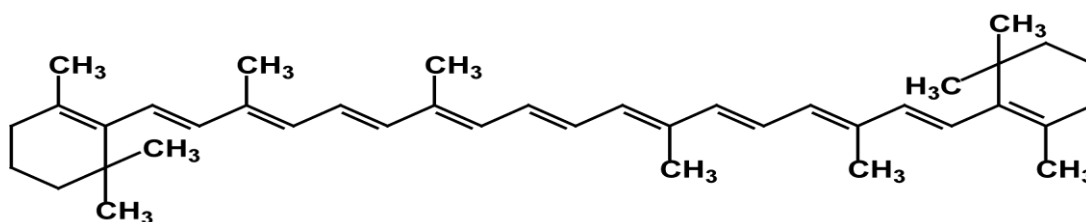
- β -karoten (25% – 43% prisotnih karotenoidov),
- torulen (28% – 30% prisotnih karotenoidov),
- torularodin (15 – 30% prisotnih karotenoidov).

Deleži posameznih karotenoidov so odvisni od vrste organizma in okoljskih pogojev. (Paiva in Russell, 1999)

1.1.3.1 β -karoten

β -karoten je eden izmed najpogostejših in najbolj raziskanih karotenov, ki ima na obeh straneh ogljikove verige vezana ogljikova obroča. V gospodarstvu se ga večinoma proizvaja sintetično in uporablja v prehranski ter kozmetični industriji. (Manowattana idr., 2015)

Vpliv β -karotena na človeka je dobro raziskan. Najpogosteje se omenja aktivnost β -karotena kot provitamina A. V telesu se provitamin A spremeni v vitamin A, ki vpliva na rast in razvoj, delovanje imunskega sistema in vid. (Prav tam)

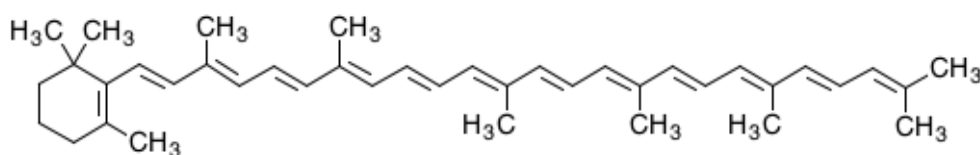


Slika 5: Strukturna formula β -karotena (vir: Chemistry StackExchange)

1.1.3.2 Torulen

Torulen je pogost karoten v mikroorganizmih s podobno kemijsko zgradbo kot β -karoten, le da ima v nasprotju z β -karotenom na ogljikovo verigo vezan en beta-jononski obroč, na drugem koncu verige pa dve metilni skupini. (Zoz idr., 2015)

Kot pigment bi torulen lahko v industriji uporabili na podoben način kot se že uporabljata β -karoten in likopen, torej kot barvilo oz. aditiv. Je uspešnejši antioksidant kot β -karoten. (Prav tam)



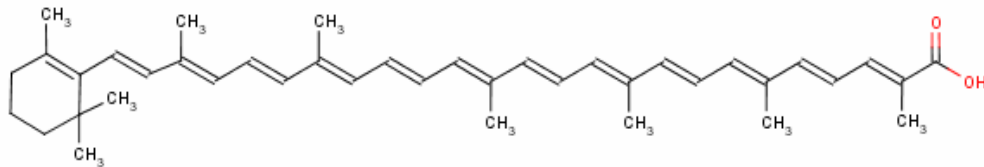
C08613

Slika 6: Strukturna formula torulena (vir: Kegg)

1.1.3.3 Torularodin

Torularodin je pogost karotenoid v mikroorganizmih z nižjim pH zaradi -COOH skupine na koncu ogljikove verige. Karboksilna skupina bi lahko v določenih spojinah za torularodin predstavljala prednost zaradi večje topnosti v vodi ali vodnih raztopinah. (Zoz idr., 2015)

V industrijski proizvodnji bi se ga lahko uporabljalo na podoben način kot se trenutno uporabljata biksin (rumenkast karotenoid) ali norbiksin (oranžen karotenoid); kot barvilo za mlečne produkte in mesne izdelke. V primeru, da je potreba po torularodinu velika, se lahko z nižjo temperaturo zagotovi večja proizvodnja omenjenega karotenoida. (Prav tam)



Slika 7: Strukturna formula torularodina (vir: Guidechem)

1.2 Namen naloge

Namen naloge je ugotoviti vpliv UVA, UVB sevanja in odsotnosti svetlobe na proizvodnjo karotenoidov v glivi *Rhodotorula mucilaginosa*.

Količino proizvedenih karotenoidov smo ugotavljali spektrofotometrično. Predpostavljamo, da višje vrednosti absorbance pomenijo višjo količinsko vsebnost karotenoidov in obratno.

1.3 Raziskovalni vprašanji

Kateri karotenoidi so prisotni v glivi *Rhodotorula mucilaginosa*?

Kako vpliva UVA in UVB svetloba na količino proizvedenih karotenoidov v glivi *Rhodotorula mucilaginosa*?

1.4 Hipoteze

Hipoteza št. 1: V celicah glive *Rhodotorula mucilaginosa* so prisotni karotenoidi β -karoten, torulen in torularodin.

Prisotnost naštetih karotenoidov se predvideva na podlagi številnih do sedaj opravljenih raziskav, s katerimi so dokazane prisotnosti β -karotena, torulena in torularodina (Paiva in Russell, 1999; Van Broock, M. idr., 2010; Entomological Research, 2009), zato pričakujemo podobne rezultate.

Hipoteza št. 2: Tako UVA kot UVB svetloba spodbujevalno vplivata na biosintezo karotenoidov v glivi *Rhodotorula mucilaginosa*.

Spodbujevalen vpliv UVA in UVB svetlobe dokazujejo rezultati mnogih raziskav (Diéguez, M. idr., 2009; Entomological Research, 2009), zato predvidevamo, da bodo naši rezultati podobni.

Hipoteza št. 3: *Rhodotorula mucilaginosa* po izpostavljenosti UVB svetlobi proizvede večjo količino karotenoidov kot po izpostavljenosti UVA svetlobi v istih časovnih intervalih obsevanja.

Določene raziskave (Diéguez, M. idr., 2009; Entomological Research, 2009; Ehling - Schulz idr., 1999) so pokazale večji vpliv UVB svetlobe na količinsko proizvodnjo karotenoidov v primerjavi z vplivi UVA svetlobe.

Hipoteza št. 4: 30 minutno obsevanje z UVA in UVB svetlobo deluje zaviralno na proizvodnjo karotenoidov v glivi *Rhodotorula mucilaginosa*.

Dolžina obsevanja z UVA in UVB svetlobo, ki na proizvodnjo karotenoidov v glivah rodu *Rhodotorula* deluje zaviralno, se od članka do članka razlikuje (Ehling - Schulz idr., 1999; Moeller idr., 2004; Götz idr., 1999). Glede na moč uporabljenih žarnic in število celic v posameznem vzorcu smo sklepali na zaviralen vpliv 30 minutnega obsevanja z UV svetlobo.

1.5 Definiranje spremenljivk

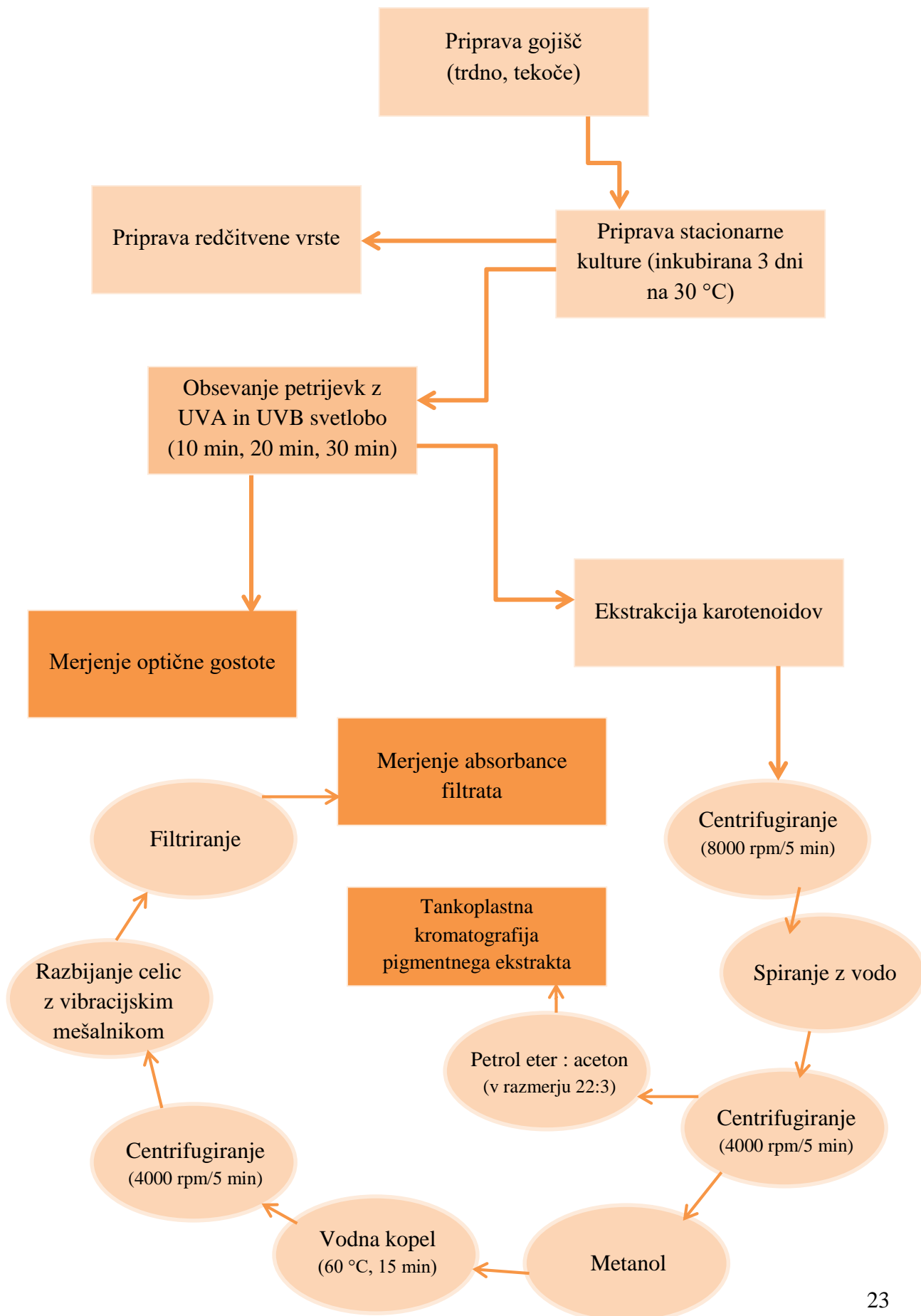
Neodvisni spremenljivki: čas obsevanja [s], valovna dolžina (UVA, UVB) [nm]

Odvisni spremenljivki: optična gostota ($OD_{449,2}$), absorbanca ekstrahiranih karotenoidov (A)

Kontrolirane spremenljivke: jakost naravne svetlobe [lux], temperatura [°C], tlak [kPa], količina hranila, distanca izvira UV sevanja [m]

Nekontrolirana spremenljivka: genski material mikroorganizma

2. METODOLOGIJA



Slika 8: Hodogram poteka dela (lastni vir)

2.1 Pripomočki in metoda dela

2.1.1 Priprava gojišča YEPD in priprava kulture

- Sestavine za pripravo trdnega gojišča (Atlas, 1993 povzeto po Pohar, 2006)
 - Kvasni ekstrakt (Fluka Analytical)
 - Glukoza (Fluka Analytical)
 - Pepton (Difco)
 - Agar (Fluka Analytical)
 - Destilirana voda
- Sestavine za pripravo tekočega gojišča (Atlas, 1993 povzeto po Pohar, 2006)
 - Kvasni ekstrakt (Fluka Analytical)
 - Glukoza (Fluka Analytical)
 - Pepton (Difco)
 - Destilirana voda
- Elektronska tehtnica (Kern, z natančnostjo 0,001g)
- Merilni valj (250 mL)
- Čaša (1000 mL)
- Steklena palčka
- Kuhalnik (CTC Clatronic)
- Avtoklav (CertoClav CLEV 12LGS (LGA, Nurnberg))
- Mikrobiološka zaščitna komora - laminarij (MC-NC, Iskra PIO)
- Čista kultura glive *Rhodotorula mucilaginosa* (sev MD II 73 EXP-1630)
- 3 erlenmajerice (500 mL)
- Črni lepilni trak (Tesa; širina 5 cm, debelina 0,02 mm)
- Sterilne plastične mikrobiološke zanke (Mikro+Polo)
- Inkubator (Binder)

Tekoče gojišče YEPD (Atlas, 1993, povzeto po Pohar, 2006) smo pripravili tako, da smo s tehtnico stehali 15 g peptona, 7,5 g ekstrakta kvasovk in 15 g glukoze (preračunano na 750 mL gojišča), jih prenesli v čašo in dodali 750 mL destilirane vode. Nato smo gojišče na kuhalniku med mešanjem segrevali, dokler se sestavine niso raztopile. Gojišče smo nato razdelili v tri erlenmajerice, pokrili s folijo in sterilizirali v avtoklavu (15 minut pri 121 °C in tlaku 1,1 bar). Na enak način smo pripravili tudi trdno gojišče YEPD, le da smo sestavinam preračunanim na 20 mL (0,4 g peptona, 0,2 g ekstrakta kvasovk in 0,4 g glukoze) dodali še 0,4 g agarja.

S sterilnimi mikrobiološkimi zankami smo v vsako erlenmajerico iz čiste kulture na trdnem gojišču prenesli po eno kolonijo glive *Rhodotorula mucilaginosa* in dobro premešali. Erlenmajerice smo oblepili s črnim lepilnim trakom in tako preprečili, da bi svetloba prišla do kulture. Kulture smo inkubirali 3 dni pri 30 °C, vsak dan smo jih premešali.

2.1.2 Izvedba eksperimenta in obsevanje z UVA in UVB svetlobo

- 21 plastičnih petrijev (premer 9 cm)
- Mikrobiološka zaščitna komora - laminarij (MC-NC, Iskra PIO)
- Stojala za žarnice
- UVA žarnica (Philips PL-L 36W/01/4P uv-b)
- UVB žarnica (Philips Actinic PL-L 36W-10 uv-a 2G11)
- ALU folija
- Kartonaste škatle

Pred izvedbo poskusa smo vse petrijevke ustrezno označili, kartonaste škatle za zatemnitev petrijev sva oblepili z aluminijasto folijo.

Erlenmajerice s kulturo smo dobro premešali in v vsako izmed petrijev nalili po 22 mL glivne kulture in petrijevke pokrili s škatlami (zatemnili). Nad petrijevke smo v oddaljenosti 45 cm namestili UVA žarnico in odkrili prvih devet petrijev z glivno kulturo. Po desetih minutah obsevanja smo pokrili prvo skupino treh petrijev, po dvajsetih minutah drugo skupino in po tridesetih minutah zadnjo skupino treh petrijev. Na tak način je bila glivna kultura izpostavljena UVA svetlobi 10, 20 in 30 minut. Enak postopek smo ponovili z UVB

svetlobo. Tri petrijevke so ostale v temi; niso bile obsevane z UV svetlobo in so predstavljale kontrolo. Petrijevke z glivno kulturo so v temi ostale v laminariju 4 dni.



Slika 9: Pripomočki v laminariju pred začetkom obsevanja (lastni vir)

2.1.3 Merjenje optične gostote in absorbance ekstrakta karotenoidov

- Stojala za epruvete
- 6 epruvet (16x100 mm)
- 6 zamaškov za epruvete
- Elektronska tehtnica (Kern, z natančnostjo 0,001g)
- NaCl
- Destilirana voda
- Čaša (100 mL)
- Steklena palčka
- Pipeta (1 – 10 mL)
- Gorilnik (Campingaz)
- Spatula drigalski
- Avtomatska pipeta (LLG Micropipette, 100 – 1000 μ L)
- Avtomatska pipeta (LLG Micropipette, 1 – 10 mL)

- Avtomatska pipeta (Thermo Scientific, 1 – 10 mL)
- Sterilni nastavki za avtomatske pipete (1 – 10 mL, 100 – 1000 μ L)
- Stojalo za avtomatske pipete
- Črni lepilni trak (Tesa; širina 5 cm, debelina 0,02 mm)
- 42 steklenih centrifugirk (16x110 mm, volumen 11 mL)
- Parafilm (Parafilm »M«, Pechiney Plastic Packaging)
- Škarje
- Centrifuga (LC – 321; Tehnica Železniki)
- Kapalka
- 99,8 % metanol (Fluka)
- Stresalnik za epruvete - vortex (RS-VA10, Phoenix Instrument)
- Stiroponska posoda za vodno kopel
- Elektronski termometer (Chectemp 1 by Hanna)
- Filtrirni papir (Macherey-Nagel, MN 615, premera 125 mm)
- Lijak
- 2 čaši (250 mL)
- Kivete (Semi-mikro, Ratiolab)
- Spektrofotometer (Vernier)
- Prenosni računalnik z računalniškim programom LoggerPro

2.1.3.1 Redčitvena vrsta

Fiziološko raztopino (60 mL) smo pripravili tako, da smo z elektronsko tehtnico stehtali NaCl (5,4 g), ga prenesli v čašo in s stekleno palčko dobro premešali, ter pripravljeno fiziološko raztopino sterilizirali v avtoklavu.

Pripravili smo serijo 6 epruvet in v vsako izmed njih odpipetirali 9 mL sterilne fiziološke raztopine. Epruvete sva označili od 10^{-1} do 10^{-6} . Nato smo z avtomatsko pipeto (100 – 1000 μ L) aseptično ob gorilniku iz dobro premešane kulture odpipetirali 1 mL le-te in jo prenesli v prvo epruveto. Tako smo dobili 10-krat manjšo koncentracijo (10^{-1}). Epruveto smo pretresli z vibracijskim mešalnikom, odpipetirali 1 mL tekočine iz te epruvete in jo prenesli v naslednjo. Postopek smo ponavljali tako dolgo, da smo dosegli stopnjo redčitve 10^{-6} ; koncentracija v tej epruveti je bila milijon krat manjša od koncentracije v prvotni kulturi. 100

μ L zadnje redčitve smo s spatulo drigalski razmazali po površini trdnega gojišča YEPD. Agar ploščo smo inkubirali 3 dni in nato prešteli kolonije.



Slika 10: Kolonije na plošči agarja (lastni vir)

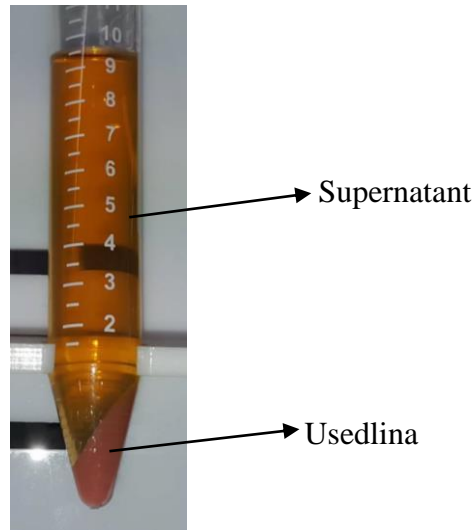
2.1.3.2 Ekstrakcija karotenoidov

(Povzeto po Arurselvi idr., 2014)

Suspenzijo celic smo z avtomatsko pipeto prenesli v centrifugirke, ki smo jih prej oblepili s črnim lepilnim trakom (ta naj bi preprečil razpadanje karotenoidov na svetlobi) in ustrezno označili; zašiljen del centrifugirke je ostal neoblepljen. Gojišče ene petrijevke smo razdelili v dve centrifugirki po 9 mL gojišča.

Najprej smo centrifugirali 5 min pri 8000 rpm. Supernatant smo ločili s pomočjo avtomatske pipete in usedlini dodali 3 mL destilirane vode (spiranje). Sledilo je centrifugiranje pri 4000 rpm za 5 minut. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant. Usedlinam smo dodali 1,5 mL metanola in jih premešali s stresalnikom za epruvete, tako da se je usedlina odlepila od dna centrifugirke in nekoliko razbila. Ekstrakt smo inkubirali v vodni kopeli 15 min pri 60 °C in nato centrifugirali 5 min pri 4000 rpm.

Vsebinsko smo ponovno premešali, da smo razbili usedlino in jo prefiltrirali skozi filtrirni papir v kiveto.



Slika 11: Vsebina centrifugirke po prvem centrifugiranju (lastni vir)

2.1.3.3 Merjenje absorbance ekstrakta karotenoidov

Spektrofotometer smo povezali z računalnikom s programom LoggerPro, kalibracijo spektrofotometra smo izvedli z metanolom. Najprej smo izmerili celoten absorpcijski spekter ekstrakta, določili absorpcijski maksimum (449,2 nm), pri tej valovni dolžini smo nato izmerili absorbanco vseh ekstraktov.

2.1.3.4 Meritev optične gostote glivne kulture

Po štirih dneh inkubacije na sobni temperaturi smo z avtomatsko pipeto prenesli v kiveto 1 mL glivne kulture.

Spektrofotometer, povezan z računalnikom in programom LoggerPro, smo kalibrirali z YEPD gojiščem in nato izmerili optično gostoto gojišča pri 449,2 nm ($OD_{449,2}$). V spektrofotometer sva vstavili kiveto in kliknili na *Collect*.



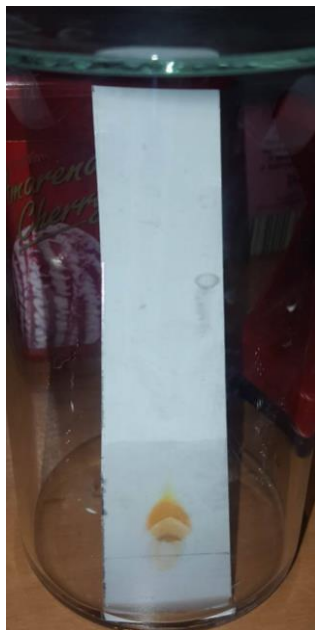
Slika 12: Tekoče gojišče z glivo *Rhodotorula mucilaginosa* (lastni vir)

2.1.4 Tankoplastna kromatografija pigmentnega ekstrakta glivne kulture

- Čaša (50 mL)
- Bučka (50 mL)
- Zamašek za bučko
- 99,5 % aceton (Sigma – Aldrich)
- 90 % petrol eter (Sigma – Aldrich)
- Komora za kromatografijo
- Silika gel plošča za kromatografijo (ALUGRAM SIL G)

Za metodo tankoplastne kromatografije smo iz celic ekstrahirali karotenoide. Gojišče s kulturo *Rhodotorula mucilaginosa* smo prenesli v 5 centrifugirk (10 mL). Centrifugirali smo jih 5 min pri 8000 rpm. Celice smo sprali z destilirano vodo in ponovno centrifugirali pri 4000 rpm za 5 min. Vsaki izmed centrifugirk smo dodali 3 mL ekstraktnega topila petrol eter - acetona v razmerju 22:3. (Identification of Plant Pigments, 2016) Vsebino centrifugirk smo z vibracijskim mešalnikom dobro premešali in vse skupaj prenesli v eno centrifugirko, ki smo jo še enkrat centrifugirali 5 min pri 4000 rpm. Odpipetirali smo supernatant in ga v vodni kopeli izparevali, tako da smo dosegli maksimalno koncentracijo v topilu raztopljenih karotenoidov.

Na plošči iz aluminijeve folije, premazani s tanko plastjo absorpcijskega materiala oz. silikatnega gela, smo 1 cm od spodnjega roba označili začetek oz. start in tja nanесли vzorec nasičenih karotenoidov. Za mobilno fazo smo uporabili topilo petrol eter – aceton v razmerju 100:11. (Identification of Plant Pigments, 2016) Po nanosu vzorca smo ploščico položili v komoro, ki je bila napolnjena s petrol etrom - acetonom do višine 0,5 cm za 20 minut, da se je topilo pomaknilo na vrh ploščice.



Slika 13: Aluminijeva ploščica z nanešenimi karotenoidi v komori za kromatografijo (lastni vir)

Topilo se po plošči navzgor pomika s pomočjo kapilarnega gibanja in ko pride v stik z vzorcem, ga raztopi. To povzroči pomikanje vzorca po ploščici navzgor, zaradi česar TLC metodo (ang. *Thin Layer Chromatography*) uporabljamo za ločevanje zmesi in mešanic, predvsem barvil. (University of Colorado, 2016)

Po 20 min smo na aluminijevi ploščici označili fronto tj. višino, do koder je pripotovalo topilo in središča pigmentnih točk. Na podlagi dobljenih razdalj od središč pigmentnih točk do starta in dolžine prepotovane poti topila smo izračunali retencijski faktor R_f ; konstanto, na podlagi katere smo s pomočjo literature določili različne karotenoide v glivi *Rhodotorula mucilaginosa*. (Judge, 2016)

IZRAČUN R_f FAKTORJA

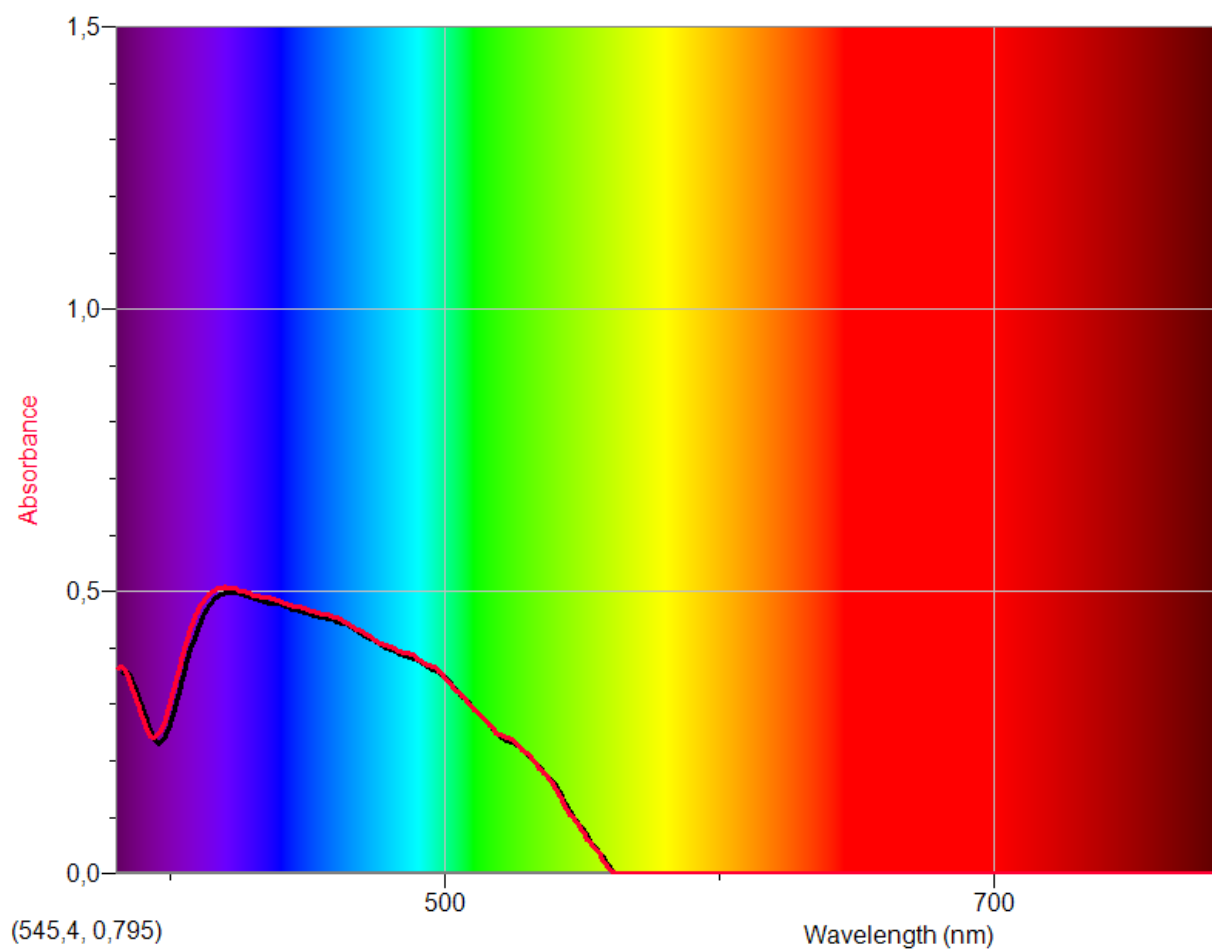
$$R_f = \frac{\text{Dolžina prepotovane poti pigmenta}}{\text{Dolžina prepotovane poti topila}}$$

2.1.5 Statistična obdelava podatkov

Podatki so bili obdelani s programom Microsoft Office Excel 2010 (izračuni povprečnih vrednosti, standardne deviacije), s tem programom smo izdelali tudi grafe.

3. REZULTATI IN ANALIZA

3. 12. 2015 smo pripravili 750 mL tekočega in 20 mL trdnega gojišča, 8.12. 2015 smo v gojišča nanesti glivo in opravili redčitveno vrsto. 17. 12. 2015 smo opravili obsevanje glive *Rhodotorula mucilaginosa* z UVA in UVB svetlobo. 23. 12. 2015 smo opravili meritve optične gostote kulture glive *Rhodotorula mucilaginosa*, ekstrakcijo in meritve absorbance ekstrahiranih karotenoidov. 1. 2. 2016 smo ponovno ekstrahirali karotenoide in opravili tankoplastno kromatografijo.



Slika 14: Absorpcijski spekter ekstrakta karotenoidov v glivi *Rhodotorula mucilaginosa* (lastni vir)

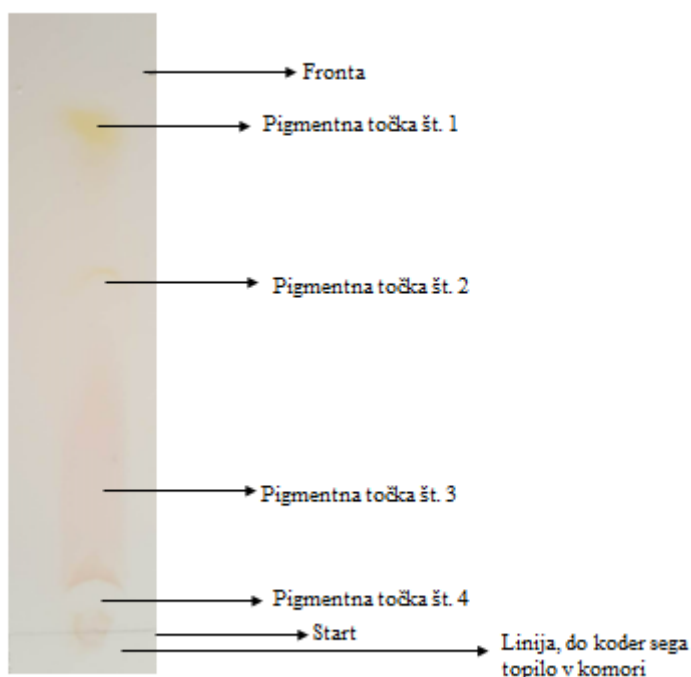
3.1 Rezultati redčitvene vrste

Po nanosu suspenzije, redčene na 10^{-6} , na agarjevo ploščo, smo počakali 3 dni. Po treh dneh smo našli zgolj 4 kolonije, zaradi česar je bil vzorec nešteven. Na podlagi rezultatov redčitvene vrste, ki so kazali na majhno gostoto glivnih celic v kulturi, smo se odločili počakati 6 dni in poskus prestavili, da bi se količina organizmov v gojišču povečala.

3.2 Rezultati tankoplastne kromatografije in Rf faktorji ekstrahiranih karotenoidov

Na razvitem kromatogramu so se pojavile štiri barvne lise živo rumenih, oranžnih in oranžno-rdečih odtenkov.

Slika kromatograma:



Slika 15: Aluminijeva ploščica po opravljeni TLC metodi (lastni vir)

Preglednica 2: Primerjava med izračunanimi vrednostmi R_f faktorjev in standardiziranimi R_f faktorji karotenoidov, ekstrahiranih iz glive *Rhodotorula mucilaginosa*

VRSTA KAROTENOIDA	STANDARDIZIRAN R_f FAKTOR (Jeevaratnam in Latha, 2010)	R_f faktor karotenoidov, ekstrahiranih iz glivne kulture
β – karoten	0,92	0,91
Torulen	0,78	0,83
Lutein	0,25	0,33
Torularodin	0,20	0,14

3.3 Rezultati meritev vzorcev ekstrahiranih karotenoidov

Preglednica 3: Absorbance ekstrahiranih karotenoidov kulture glive *Rhodotorula mucilaginosa*, obsevane z UVA in UVB svetlobo.

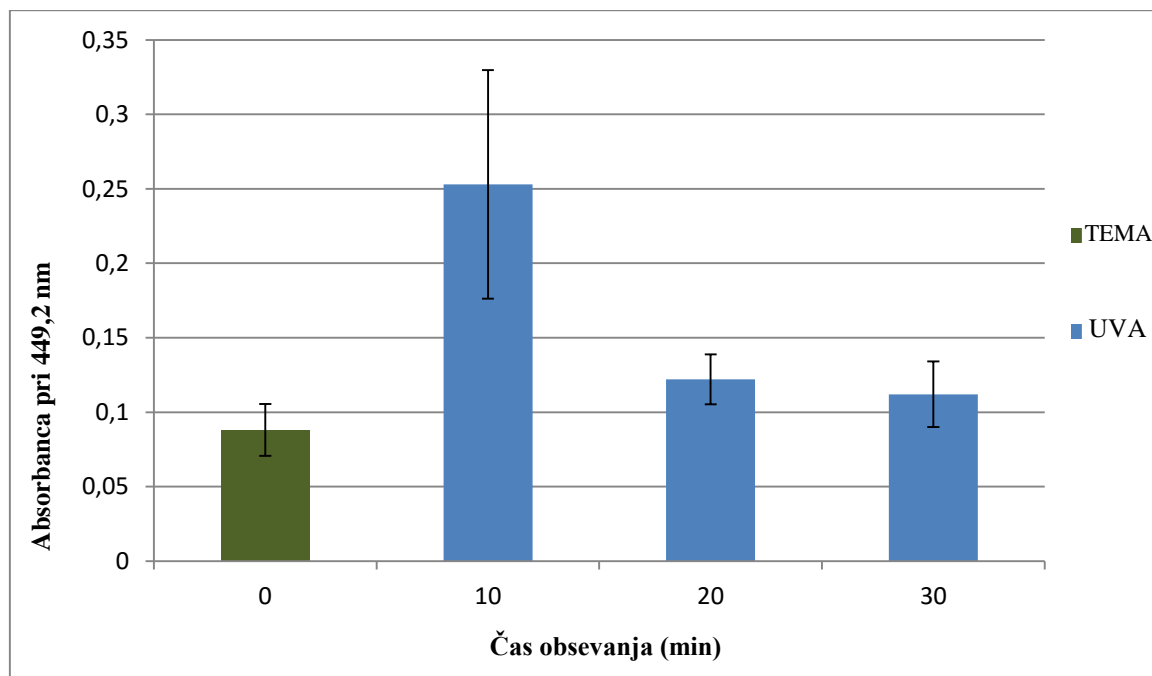
Vrsta svetlobe	Čas obsevanja [min]	Zap. št. petrijevke	Absorbanca	Povprečna absorbanca	Standardna deviacija
TEMA	0	1	0,075	0,088	0,017
		2	0,082		
		3	0,108		
UVA	10	1	0,180	0,253	0,077
		2	0,333		
		3	0,245		
	20	1	0,132	0,122	0,017
		2	0,132		
		3	0,103		
30	1	0,090	0,112	0,022	
	2	0,134			
	3	0,112			
UVB	10	1	0,252	0,334	0,191
		2	0,198		
		3	0,552		
	20	1	0,105	0,115	0,021
		2	0,101		
		3	0,140		
	30	1	0,479	0,416	0,249
		2	0,627		
		3	0,142		

Pri treh petrijevkah, ki niso bile obsevane in so zato v eksperimentu predstavljale kontrolo, povprečna vrednost absorbance ekstrahiranih karotenoidov znaša 0,088. Pri petrijevkah, ki so bile 10 min obsevane z UVA svetlobo znaša povprečna vrednost absorbance 0,253. Pri naslednji seriji petrijev, ki je bila obsevana 20 min, znaša povprečna absorbanca 0,122, pri seriji, ki pa je bila obsevana 30 min, je povprečna vrednost absorbance 0,112.

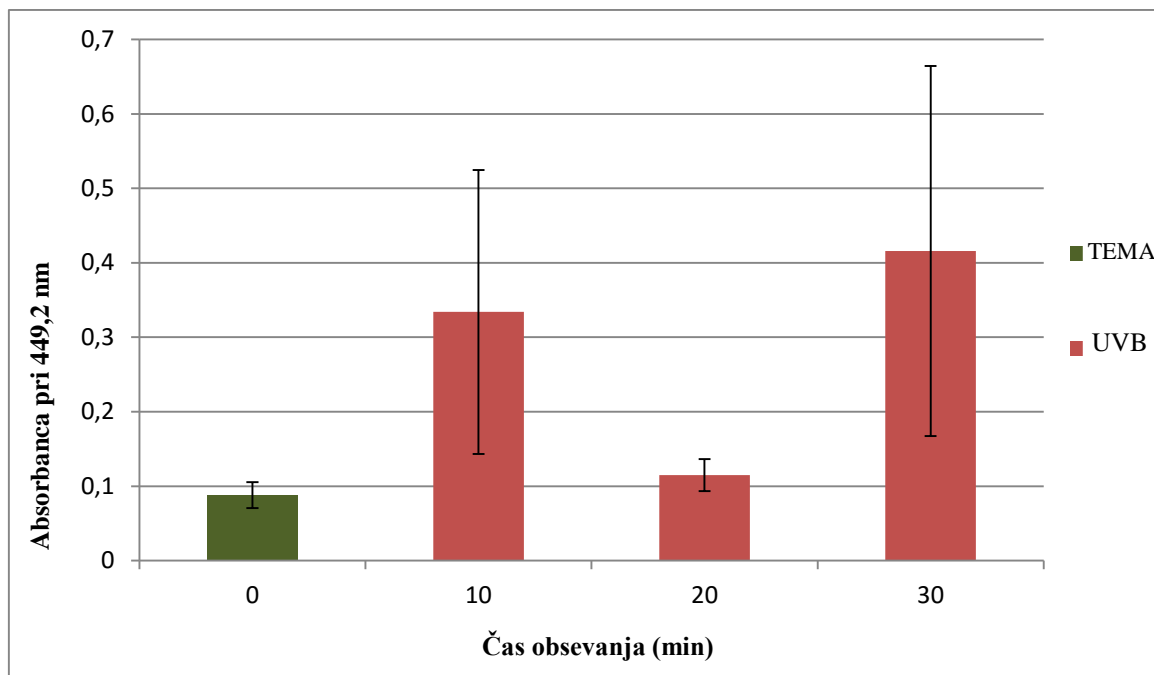
Pri petrijevkah, ki so bile 10 min obsevane z UVB svetlobo povprečna vrednost absorbance znaša 0,334; pri petrijevkah, ki so bile obsevane 10 min dlje, znaša 0,115, in pri petrijevkah, ki so bile obsevane 30 min, znaša 0,416.

Povprečne vrednosti absorbance pri petrijevkah obsevanih tako z UVA kot z UVB svetlobo, so višje kot povprečna vrednost absorbance petrijev, ki niso bile obsevane.

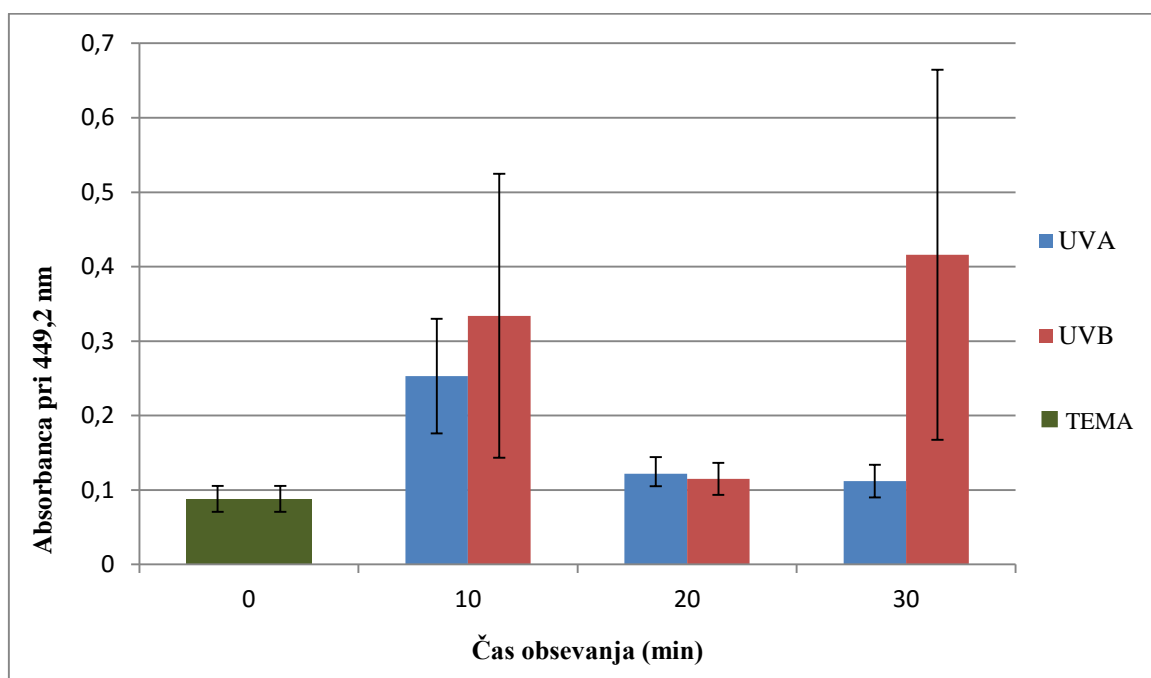
Vrednosti povprečnih absorbanc pri serijah petrijev obsevanih z UVB svetlobo so višje, izstopa samo povprečna vrednost absorbance pri seriji obsevani 20 min, le-ta je nižja od povprečnih vrednosti pri petrijevkah obsevanih z UVA svetlobo.



Graf 1: Povprečne vrednosti absorbance ekstrahiranih karotenoidov, ki so bili izpostavljeni 10, 20 in 30 min obsevanju z UVA, in neobsevanih vzorcev (+/- 1 SD).



Graf 2: Povprečne vrednosti absorbance ekstrahiranih karotenoidov, ki so bili izpostavljeni 10, 20 in 30 min obsevanju z UVB, in neobsevanih vzorcev (+/- 1 SD).



Graf 3: Povprečne vrednosti absorbance ekstrahiranih karotenoidov, ki so bili izpostavljeni 10, 20 in 30 min obsevanju z UVA in UVB, in neobsevanih vzorcev (+/- 1 SD).

3.4 Rezultati meritev vzorcev pred ekstrakcijo

Preglednica 4: Optična gostota (OD(449,2)) kulture glive *Rhodotorula mucilaginosa*, obsevane z UVA in UVB svetlobo.

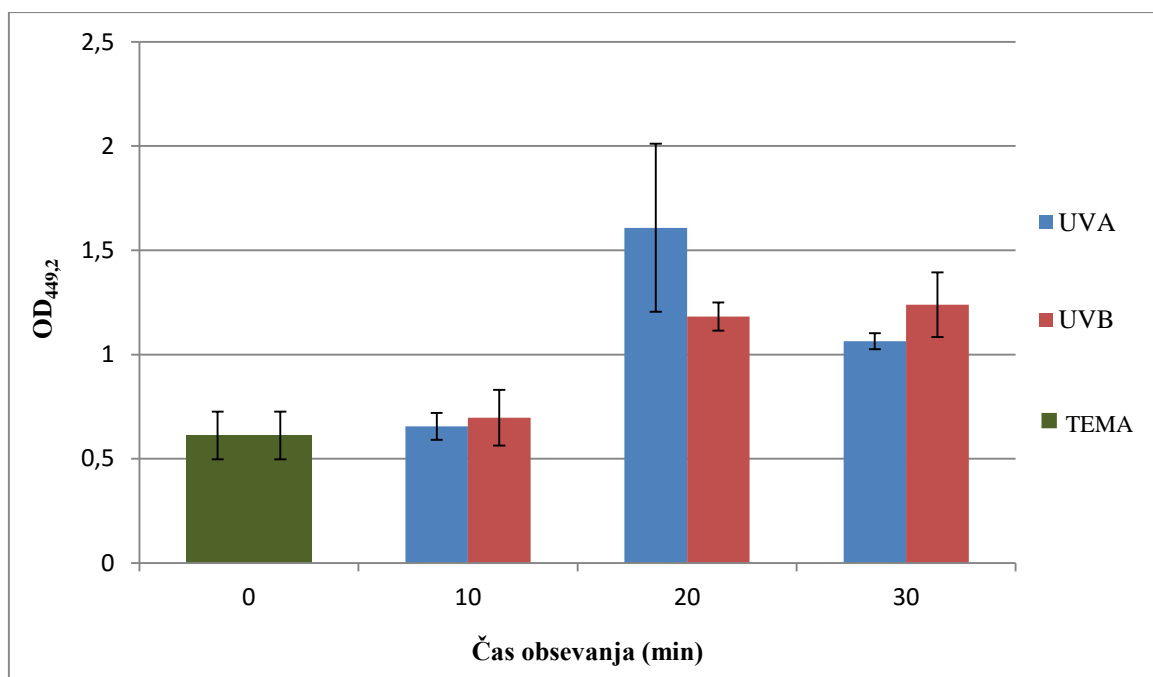
Vrsta svetlobe	Čas obsevanja [min]	Zap. Št. petrijevke	Optična gostota (OD _{449,2})	Povprečna optična gostota	Standardna deviacija
TEMA	0	1	0,741	0,612	0,115
		2	0,523		
		3	0,571		
UVA	10	1	0,670	0,655	0,065
		2	0,711		
		3	0,584		
	20	1	2,043	1,608	0,403
		2	1,533		
		3	1,247		
	30	1	1,056	1,064	0,038
		2	1,106		
		3	1,031		
UVB	10	1	0,783	0,697	0,134
		2	0,765		
		3	0,543		
	20	1	1,255	1,182	0,068
		2	1,168		
		3	1,122		
	30	1	1,333	1,239	0,155
		2	1,325		
		3	1,060		

Pri treh neobsevanih petrijevkah, ki so v eksperimentu predstavljale kontrolo, povprečna vrednost optične gostote pred ekstrakcijo znaša 0,612. Pri petrijevkah, ki so bile 10 min obsevane z UVA svetlobo, znaša povprečna vrednost optične gostote 0,655; pri petrijevkah obsevanih 10 min dlje znaša 1,608, pri petrijevkah, ki so bile obsevane 30 min pa 1,064.

Pri seriji petrijev, ki je bila 10 min obsevana z UVB svetlobo, znaša povprečna vrednost optične gostote 0,697; pri petrijevkah obsevanih 20 min znaša 1,182; pri treh petrijevkah, ki so bile obsevane 30 min pa 1,239.

Povprečne vrednosti optične gostote pri petrijevkah, obsevanih tako z UVA kot z UVB svetlobo, so višje kot povprečna vrednost optične gostote pri petrijevkah, ki niso bile obsevane.

Povprečne vrednosti optičnih gostot petrijevk obsevanih z UVA in UVB svetlobo se drastično ne razlikujejo. Izstopata vrednosti pri petrijevkah, ki so bile obsevane 10 min (tako z UVA kot z UVB svetlobo), saj sta le nekoliko višji od povprečne vrednosti optične gostote pri neobsevanih petrijevkah.



Graf 4: Povprečne vrednosti optične gostote vzorcev, ki so bili izpostavljeni 10, 20 in 30 min obsevanju z UVA in z UVB, ter neobsevanih vzorcev (+/- 1 SD).

4. DISKUSIJA

Z metodo tankoplastne kromatografije smo v glivi *Rhodotorula mucilaginosa* dokazovali prisotnost β -karotena, torulena in torularodina kot treh karotenoidov, ki so v glivi prisotni v največjih količinah. (Paiva in Russell, 1999; Van Broock, M. idr., 2010)

Na kromatogramu so se na ploščici ločile 4 barvne lise. Izračunane R_f faktorje smo primerjali z navedenimi podatki v literaturi in ugotovili, da se vrednosti le-teh razlikujejo za največ 0,07 v primerjavi z navedenimi podatki konstant. V mobilni fazi s petrol eter - acetonom je R_f faktor β -karotena 0,92, R_f faktor torulena 0,78 in R_f faktor torularodina 0,20. (Jeevaratnam in Latha, 2010)

S pomočjo enačbe smo po opravljeni TLC metodi izračunali R_f faktorje. R_f faktor rumeno obarvane pigmentne točke je 0,91; predpostavljamo, da je ta pigment β -karoten. Razlika med izračunanim R_f faktorjem in faktorjem, navedenim v literaturi, znaša 0,01.

R_f faktor oranžno obarvane pigmentne točke znaša 0,83; predpostavljamo, da je omenjen pigment torulen. Razlika med izračunanim R_f faktorjem in tistim, ki je za torulen naveden v literaturi, znaša 0,05.

R_f faktor rdeče obarvane pigmentne točke je 0,14; predpostavljamo, da je ta pigment torularodin. Razlika med izračunanim R_f faktorjem in faktorjem, ki je naveden v literaturi, znaša 0,07.

Na podlagi barvil, vidnih na ploščici, in izračunanih R_f faktorjih lahko hipotezo št. 1 potrdimo; v glivi *Rhodotorula mucilaginosa* so prisotni vsi trije zgoraj naštetih karotenoidi. Prisotnost β -karotena, torulena in torularodina potrjujejo tudi ostali avtorji. (Paiva in Russell, 1999)

Na aluminijevi ploščici smo zasledili tudi četrto, svetlo rumeno pigmentno točko. Izračunan R_f faktor za ta pigment znaša 0,33. Standarden R_f faktor, ki je najbližje izračunanemu, je R_f

faktor luteina in znaša 0,25; razlika med vrednostima je 0,07. Prisotnost luteina je verjetna, saj je eden izmed bolj zastopanih karotenoidov v glivi *Rhodotorula mucilaginosa*.

Tako UVA kot UVB svetloba sta spodbujevalno vplivali na biosintezo karotenoidov v glivi *Rhodotorula mucilaginosa*, saj so povprečne vrednosti absorbance ekstrahiranih karotenoidov po obsevanju pri vseh serijah (10 min, 20 min, 30 min) višje kot povprečna vrednost absorbance pri neobsevanih vzorcih. Spodbujevalno lastnost UVA in UVB svetlobe na biosintezo karotenoidov v celici potrjujejo tudi ostali avtorji. (Diéguez, M. idr., 2009; Entomological Research, 2009)

Količina karotenoidov je v obsevanih vzorcih večja zaradi posledic, ki jih na celicah pusti UV sevanje. Ultravijolično sevanje ionizira molekule in atome, ob čemer nastanejo radikali, ki težijo k zapolnitvi zunanje lupine, kar poškoduje celične molekule. Karotenoidi so zato v celicah prisotni kot zaščita pred oksidativno škodo oz. pred reakcijami prostih radikalov, ki se najpogosteje vežejo na mesto v molekuli, kjer se nahaja dvojna vez. (Kushwaha, K. idr., 2014; Raopis, 2006; Lucas 2015)

Kemijska struktura karotenoidov je povezana z njihovo sposobnostjo nevtralizacije radikalov; v izoprenski verigi se izmenjujejo enojne in dvojne vezi, zaradi česar so karotenoidi zelo primerne molekule za vezavo radikalov in preprečevanje oksidativne škode. (Paiva in Russell, 1999; Kushwaha, K. idr., 2014)

Neobsevane vzorce smo pred vplivi sevanja zaščitili tako, da smo jih prekrili s kartonasto škatlo, ki smo jo oblepili z aluminijasto folijo. Zaradi omenjene zaščite je biosinteza karotenoidov v celicah potekala brez spodbujevalnih okoljskih vplivov; presežek karotenoidov zato ni opazen.

Določene raziskave potrjujejo večji spodbujevalni vpliv UVB svetlobe v primerjavi z UVA svetlobo na proizvodnjo karotenoidov v celici. (Diéguez, M. idr., 2009; Entomological Research, 2009)

Pri vrednostih absorbance pigmentnih ekstraktov pri 10 min in 30 min obsevanju lahko opazimo trend večjega stimulativnega delovanja pri obsevanju z UVB svetlobo v primerjavi z UVA svetlobo. Od pričakovanih rezultatov, na katere smo se opirali (Diéguez, M. idr., 2009; Entomological Research, 2009; Ehling - Schulz idr., 1999), odstopa serija, ki je bila

obsevana 20 min, kjer je UVA delovala bolj stimulatивно; razlika med 20 min obsevanimi vzorci z UVA in UVB je minimalna.

Zaradi velike variabilnosti podatkov in majhnega števila ponovitev ne moremo z gotovostjo potrditi ali ovreči hipoteze.

Dokazovali smo zaviralno sposobnost 30 min časovnega intervala obsevanja z UVA in UVB svetlobe na proizvodnjo karotenoidov v glivi *Rhodotorula mucilaginosa*.

Povprečne vrednosti absorbance ekstrahiranih karotenoidov, obsevanih z UVA svetlobo, so najvišje pri serijah, ki so bile obsevane 10 min in nižje pri serijah, obsevanih 20 min in 30 min. Povprečne vrednosti optične gostote glive *Rhodotorula mucilaginosa*, obsevane z UVA svetlobo, so najnižje pri serijah, obsevanih 10 min, nekoliko višje pri serijah, obsevanih 30 min in najvišje pri serijah, obsevanih 20 min.

Povprečne vrednosti absorbance ekstrahiranih karotenoidov, ki so bili obsevani z UVB svetlobo, so najvišje pri 30 min obsevanih vzorcih, kar kaže na višjo vsebnost karotenoidov, nekoliko nižje pri 10 min obsevanih vzorcih in najnižje pri 20 min obsevanih vzorcih. Povprečne vrednosti optične gostote glive *Rhodotorula mucilaginosa*, obsevane z UVB svetlobo, so najvišje pri 30 min obsevanih vzorcih, nekoliko nižje pri 20 min obsevanih vzorcih in najnižje pri 10 min obsevanih vzorcih. Glede na to, da so bile vrednosti optične gostote z UVA in UVB svetlobo obsevanih kultur višje kot pri neobsevani kulturi, lahko sklepamo, da tako kratka obdobja obsevanja z UV svetlobo niso popolnoma zavrla razmnoževanja glive oziroma niso delovala fungicidno.

Različni avtorji so glede zaviralnega časovnega intervala obsevanja deljenih mnenj (Ehling - Schulz idr., 1999; Moeller idr., 2004; Götz idr., 1999; Johnson L. M. idr., 2003); od petnajst minutnih intervalov do štiriindvajset urnega obsevanja z UV svetlobo. Na podlagi rezultatov absorbance in optične gostote, ki so si precej nasprotujoči, končnih zaključkov ni mogoče oblikovati. Zaradi premajhnega števila ponovitev in velike variabilnosti podatkov, rezultati niso zanesljivi in se nanje pri ugotavljanju zaviralnega in spodbujevalnega učinka UVA in UVB svetlobe pri različnih časovnih intervalih ne moremo zanašati.. Hipoteze ni mogoče ne ovreči in ne potrditi.

5. VREDNOTENJE UPORABLJENIH METOD

Med opravljanjem eksperimenta in pisanjem naloge smo opazili določene pomanjkljivosti in možnosti za izboljšave, ki bi zagotovili večjo zanesljivost podatkov.

5.1 Izboljšave gojišča in kulture

Čeprav smo vso količino uporabljenega gojišča pripravili naenkrat in se pri vseh treh erlenmajericah, v katere smo gojišče prelili, trudili zagotavljati iste pogoje, bi večjo verodostojnost podatkov dosegli tako, da gojišča ne bi prelivali v tri različne erlenmajerice, temveč bi kulturo prenesli samo v eno.

V gojišču glivi *Rhodotorula mucilaginosa* nismo zagotovili snovi, ki pospešuje potek karotenogeneze, tj. vir ogljika. Gojišču bi morali dodati 2,84 % sladku ali čistega glicerola, ki sta se izkazala kot snovi, pri katerih *Rhodotorula mucilaginosa* proizvede največjo količino karotenoidov. (Entomological Research, 2009)

Prav tako bi bilo potrebno prilagoditi deleže dodanih snovi v gojišču glede na specifične zahteve glive *Rhodotorula mucilaginosa*, da bi se zagotovila maksimalna proizvodnja karotenoidov ob maksimalni celični rasti in dejavnosti.

Na specifične zahteve glive *Rhodotorula mucilaginosa* bi bilo potrebno prilagoditi tudi pH in temperaturo gojišča ter okolice. (Entomological Research, 2009)

Ker je proces karotenogeneze aeroben, bi morali zagotoviti tudi večjo zračnost gojišča, kar bi lahko dosegli z uporabo elektromagnetnega mešala; tako bi bila količina proizvedenih karotenoidov večja. (Paiva in Russell, 1999)

5.2 Izboljšave obsevanja

Izvesti bi bilo potrebno več serij obsevanja v večih različnih časovnih intervalih, tako bi bil vpliv UV sevanja na proizvodnjo karotenoidov bolj očiten in natančen. Z intervali, med katerimi ne bi bilo tako velikih časovnih razlik, bi lahko zagotovili lažjo določitev optimalne rasti ter zaviralnega in spodbujevalnega vpliva UV svetlobe.

Izvesti bi bilo potrebno večdnevni poskus, znotraj katerega bi vzorce vsakodnevno izpostavljali UV svetlobi. Znotraj vsake serije (10 min, 20 min, 30 min) bi bilo potrebno obsevati več petrijevk, da bi se zagotovilo večje število rezultatov in večja verodostojnost podatkov.

Za enakomeren dostop UVA in UVB svetlobe do celic v posameznih vzorcih bi bilo potrebno uporabiti bolj plitve posodice. Prav tako bi plast tekočega medija morala biti tanjša, saj UV žarki sicer ne prodrejo na dno, kamor se celice usedajo.

Izvesti bi bilo potrebno tudi obsevanje s svetilom, ki seva naravno svetlobo. Tako bi dobili vrednosti, ki bi najbolj spominjale na dejansko količino karotenoidov, ki jih v naravnem okolju proizvedejo prosto živeče glive *Rhodotorula mucilaginosa* in opravili natančnejšo primerjavo dobljenih rezultatov.

5.3 Izboljšave ekstrakcije

Kot topilo smo uporabili visoko koncentriran metanol (99,8 %). Vrednosti absorbance bi bile morda višje, če bi namesto metanola uporabili drugačno topilo kot na primer heksanol ali petrol eter-aceton. (Identification of Plant Pigments, 2016)

Prav tako bi bilo potrebno vzdrževati stalno temperaturo v vodni kopeli. Temperatura je z dodajanjem in odvzemanjem vode naraščala in padala za 5°C. Večji nadzor nad temperaturo v vodni kopeli bi omogočil natančnejše vrednosti podatkov in posledično tudi večjo verodostojnost. (Entomological Research, 2009)

5.4 Izboljšave TLC metode

Ker vrednosti R_f faktorjev neenakomerno odstopajo od standardiziranih vrednosti, bi bilo potrebno kromatografijo izvesti večkrat in R_f faktorje izračunati na podlagi povprečnih vrednosti prepotovanih poti pigmentov. Vrednost prepotovane poti topila bi pri vseh ponovitvah ostala enaka.

5.5 Izboljšave izbrane metode

Dokazovanja zaviralnega učinka UVA in UVB sevanja smo se lotili z merjenjem absorbance in optične gostote. K meritvah OD prispevajo tudi mrtve celice, zato bi bilo bolje, če bi za vse obsevane kulture izvedli metodo štetja kolonij na ploščah (tako na začetku kot na koncu poskusa), kjer zrastejo samo živi in vitalni mikroorganizmi. S tem bi natančneje ovrednotili zaviralni učinek UVA in UVB sevanja.

6. ZAKLJUČEK

Cilj naloge je bil ugotoviti vpliv UVA in UVB svetlobe ter odsotnosti sevanja na proizvodnjo karotenoidov v glivi *Rhodotorula mucilaginosa*. Ugotavljali smo prisotnost posameznih karotenoidov, spodbujevalne in zaviralne vplive različnih dolžin obsevanj z UVA in UVB svetlobo.

S pomočjo metode tankoplastne kromatografije smo izračunali R_f faktorje pigmentnih točk na kromatografski ploščici in dokazali prisotnost treh najpogostejših karotenoidov v glivi *Rhodotorula mucilaginosa*; β -karoten, torulen in torularodin. V glivi smo zaznali tudi prisotnost četrtega pigmenta, ki smo ga klasificirali kot lutein.

Serije petrijevok smo postavili v temo ali obsevali z UVA oz. UVB svetlobo 10, 20 in 30 min. Po obsevanju smo izmerili optično gostoto glivnih celic *Rhodotorula mucilaginosa*. Ekstrahirali smo karotenoide in izmerili absorbanco vzorcev.

Podobno kot so to storile številne raziskave (Diéguez, M. idr., 2009; Entomological Research, 2009) smo potrdili spodbujevalni učinek UVA in UVB svetlobe na proizvodnjo karotenoidov v celicah glive *Rhodotorula mucilaginosa*. V primerjavi z neobsevanimi vzorci so bile vrednosti absorbance in optične gostote obsevanih vzorcev višje, kar dokazuje večjo količino karotenoidov.

Pojavili so se trendi, ki nakazujejo na večji vpliv UVB svetlobe na proizvodnjo karotenoidov v primerjavi z vplivom UVA svetlobe, vendar je bila količina zbranih podatkov premajhna in vrednosti standardne deviacije previsoke za končne rezultate.

Z zbranimi rezultati ni bilo mogoče interpretirati zaviralne dolžine obsevanja z UVA in UVB svetlobo. Količina podatkov je bila prenizka in število različnih časov obsevanj premajhno. Rezultati se niso skladali z zbrano literaturo, ki je glede zaviralne dolžine obsevanja z ultravijolično svetlobo precej nasprotujoča. Dokazana je bila prisotnost omenjenih karotenoidov in spodbujevalen učinek UVA in UVB svetlobo na proizvodnjo le – teh v procesu karotenogeneze.

Nadaljnje raziskave se morajo usmeriti v raziskovanje zaviralne dolžine obsevanja z ultravijolično svetlobo, posledice obsevanja z UVA in UVB ter možne biotehnološke aplikacije glive *Rhodotorula mucilaginosa* v komercialni industriji.

Zanimivo bi bilo raziskati vpliv UVC svetlobe na proizvodnjo karotenoidov v celicah gliv. Hkrati bi bilo zanimivo raziskati količino karotenoidov, ki jo celice glive *Rhodotorula mucilaginosa* tvorijo v naravnih pogojih brez spodbujevalnih učinkov tolikšne jakosti UV svetlobe.

Zanimivo bi se bilo osredotočili ne le na eno vrsto glive in s tem na specifične karotenoide, temveč na več tipov karotenoidov in posledično na večje število organizmov. Morda bi bilo potrebno primerjati proizvodnjo karotenoidov v rastlinah, glivah, bakterijah in algah, saj bi tako dobili celotno sliko o pojavnosti in pomenu karotenoidov v primarnih proizvajalcih.

Zagotovo je potrebno podrobneje raziskati vpliv UV sevanja kot spodbujevalnega dejavnika na dedni material celice in zgradbo karotenoidov, pozitivne in negativne učinke večih vrst karotenoidov na človeško telo ter možnosti uporabe mikroorganizmov, ki sintetizirajo karotenoide, v globalni komercialni industriji.

7. DRUŽBENA ODGOVORNOST

Pri izbiri teme raziskovalne naloge in eksperimentalno pridobljenih rezultatih smo upoštevali osnovna načela družbene odgovornosti.

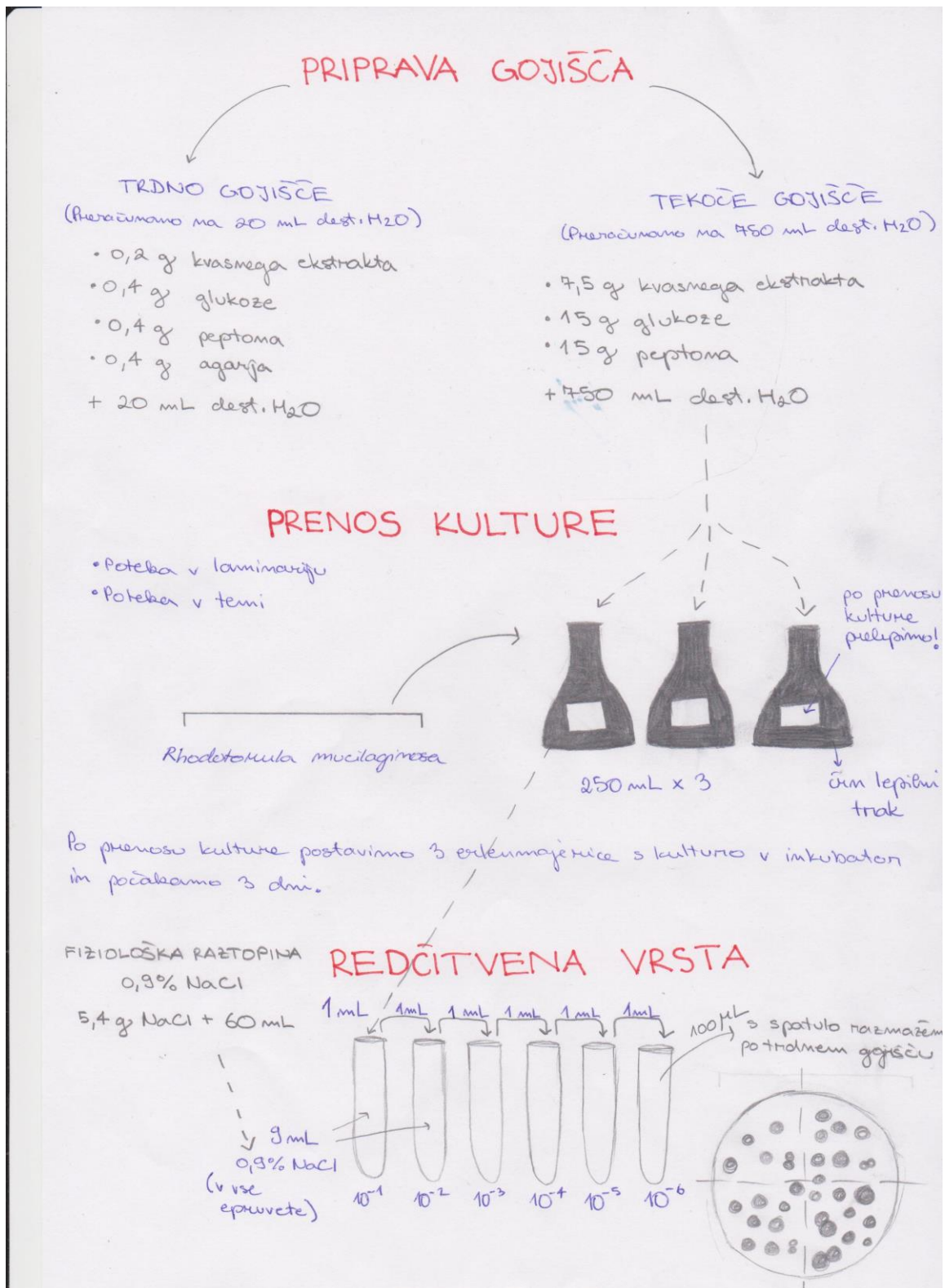
Naloge smo se lotili z upoštevanjem vse večjega obračanja globalne industrije k biotehnološkim praksam, predvsem zaradi rastoče okoljske ozaveščenosti, vedno bolj opaznih vplivov človeka na okolje in želje po iskanju rešitev, ki niso v sporu z naravnimi procesi. Želeli smo prispevati k do sedaj opravljenim znanstvenim raziskavam karotenoidov in njihovi potencialni uporabi v gospodarstvu, predvsem v živilski in kozmetični industriji. Industrijsko pridobljeni naravno sintetizirani karotenoidi bi na trgu nadomestili sintetične pigmente, ki so večinoma v uporabi še danes in tako rešili problem velike količine anorganskih, za okolje škodljivih stranskih produktov.

Biosinteza karotenoidov na eno celico je za komercialno produkcijo premajhna, zato se pojavljajo ideje o vpeljavi določenih spodbujevalnih okoljskih dejavnikov, ki bi povečali bioprodukcijo karotenoidov v izbranih organizmih. Pri optimalnih pogojih je zabeležena največja produkcija karotenoidov in določene raziskave potrjujejo spodbujevalni učinek obsevanja celic z UV svetlobo na količino proizvedenih karotenoidov. Ekstrakcija pigmenta ne zahteva večjih finančnih vložkov in specifične laboratorijske opreme, okoljske zahteve organizmov rodu *Rhodotorula* pa niso prevelike.

Potencialna aplikacija naravne proizvodnje omenjenih pigmentov v globalni industriji je velika, vendar bi bilo potrebno pred uveljavljanjem le-te opraviti nadaljnje raziskave v povezavi s vplivom UV sevanja na morebitne poškodbe DNA, poškodbe karotenoidov samih in na ljudi, ki bi opravljali delo v takšnem okolju.

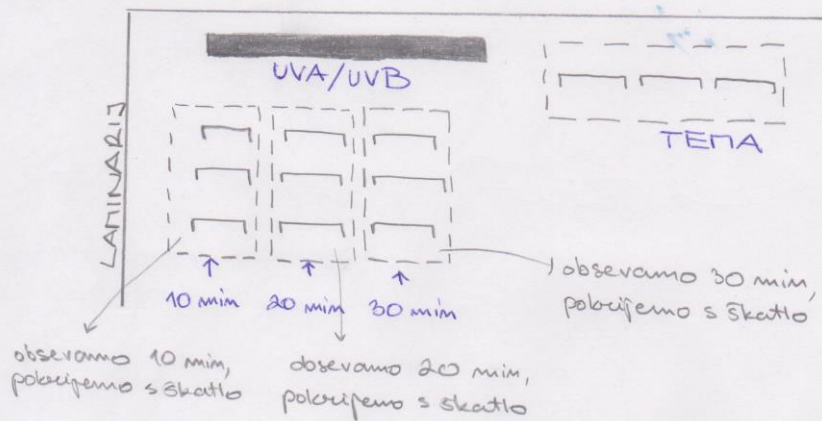
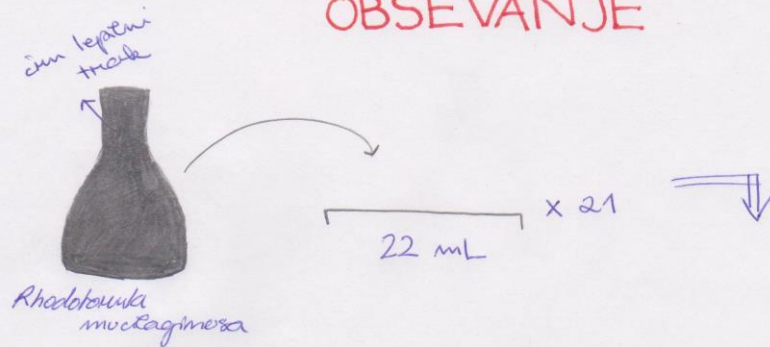
8. PRILOGE

8.1 Skica poteka eksperimenta

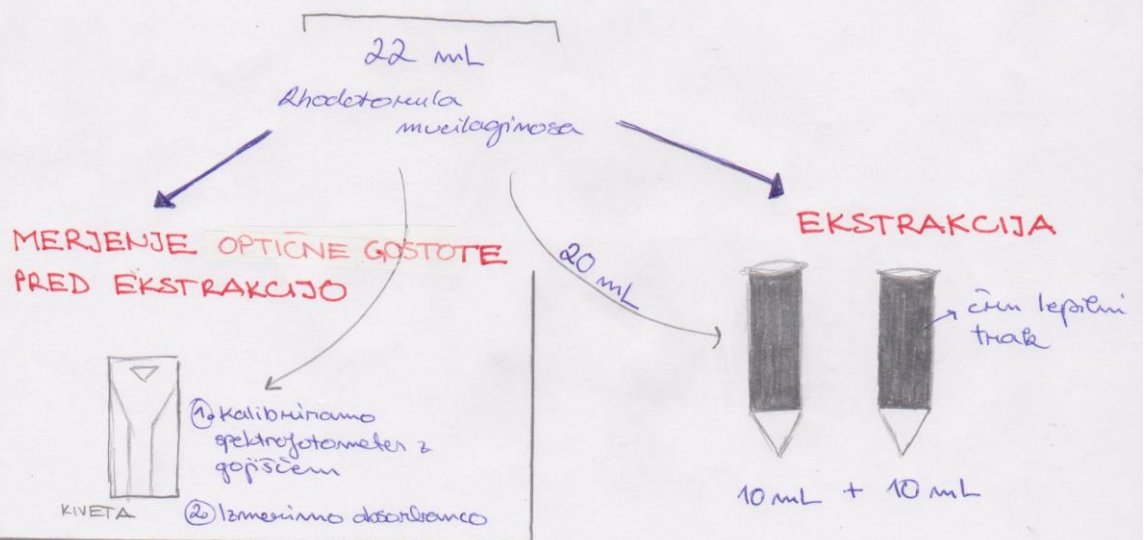


Slika 16: Skica poteka eksperimenta, str. 1 (lastni vir)

OBSEVANJE



Po obsevanju počakamo 4 dni, petrijevke pustimo v temi!



Slika 17: Skica poteka eksperimenta, str. 2 (lastni vir)

• CENTRIFUGIRANJE, 8.000 rpm, 5 min

a)



z avtomatsko pipeto
odstranimo
zgornjo suspenzijo
od usedline

b)



usedelimo speremo
z 5ml
destilirane H₂O

• CENTRIFUGIRANJE, 4.000 rpm, 5 min

a)



z avtomatsko pipeto
odstranimo
destilirano H₂O

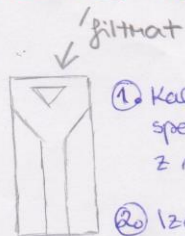
b)



dodamo
1,5 ml
metanola

- STRESALNIK ZA EPRUVETE
- VODNA KOPEL, 60°C, 15 min
- CENTRIFUGIRANJE, 4.000 rpm, 5 min
- STRESALNIK ZA EPRUVETE
- FILTRIRANJE VZORCA

MERJENJE ABSORBANCE EKSTRAHIRANEGA GITOSOLA



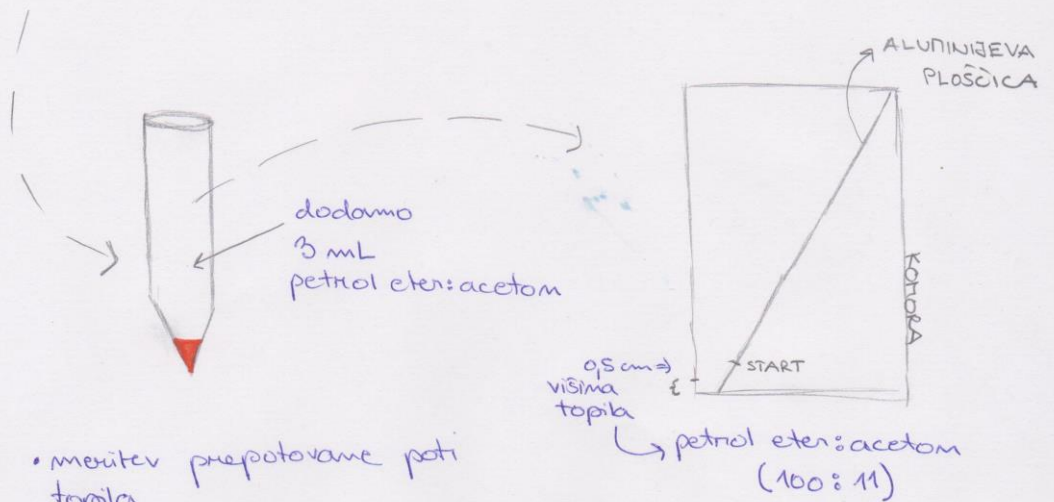
① Kalibriramo
spektrofotometer
z metanolom

② Izmerimo
absorbance

Slika 18: Skica poteka eksperimenta, str. 3 (lastni vir)

TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA

EKSTRAKCIJA \Rightarrow namesto metanola kot topilo uporabimo
petrol eter : acetom (22:3)



- mešitev prepotovane poti topila
- mešitev prepotovane poti pigmentov
- izračun R_f

Slika 19: Skica poteka eksperimenta, str. 4 (lastni vir)

9. VIRI IN LITERATURA

9.1 Knjižni naslovi in naslovi člankov

Arulsevi, I. idr. (2014). *Screening of Yellow Pigment Producing Bacterial Isolates from Various Eco - climatic Areas and Analysis of the Carotenoid Produced by the Isolates*. Objavljeno v Food/Processing & Technology.

Danevič, T., Mandić-Mulec, I. (2007). *Praktikum iz fiziologije mikroorganizmov: za študente mikrobiologije*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.

Dragaš, A. Z. (2010). *Mikrobiologija z epidemiologijo*. Ljubljana: DZS

Ehling-Schulz, M., Scherer, S. (1999). *UV protection in cyanobacteria*. Objavljeno v European Journal of Phycology.

Gómez Mata, C. L. idr. (2014). *Biotechnological production of carotenoids by yeasts*. Objavljeno v Microbial Cell Factories.

Götz, T. idr. (1999). *Protection of Photosynthesis against Ultraviolet-B Radiation by Carotenoids in Transformants of the Cyanobacterium Synechococcus*. Objavljeno v Plant Physiology, stran 599 - 604

Kralj, M., Mele, I., Železnik, N. (2003). *Oh, to sevanje!*. Presek, letnik 30, številka 5, stran 261-266.

Kushwaha, K. idr. (2014). *Colorful world of Microbes: Carotenoids and Their Applications, Advances in Biology*. Objavljeno v Volume 2014.

Moeller, R. idr. (2004). *Role of pigmentation in protecting Bacillus sp. endospores against environmental UV radiation*. Objavljeno v German Collection of Microorganism and Cell Cultures.

Vilhar, B. idr. (2011). *Evolucija, biotska pestrost in ekologija. Evolucija: biologija v gimnaziji*. Ljubljana: DZS

Vse o sevanju, kar ne veste, pa bi želeli. (2006). Raopis, časopis Agencije za radioaktivne odpadke. Številka 14, stran 18-21

Zoz, L. idr. (2015). *Torularhodin and Torulene: Bioproduction, Properties and Prospective Applications in Food and Cosmetics*. Objavljeno v *Brazilian Archives of Biology and Technology*, letnik 58, številka 2, stran 278-288.

9.2 Spletni naslovi

Diéguez, M. idr. (2009). *Photoprotective role of carotenoids in yeast: Response to UV-B of pigmented and naturally-occurring albino strains*. [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu

https://www.researchgate.net/profile/Martin_Moline2/publication/24253821_Photoprotective_role_of_carotenoids_in_yeasts_Response_to_UV-B_of_pigmented_and_naturally-occurring_albino_strains/links/0f317533d8e63c2711000000.pdf (1. 2. 2016)

Identification of Plant Pigments (Carotenoids) by Thin Layer Chromatography. [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu

https://www.google.si/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwiEle2PxtnKAhWHhiwKHTfZBUwQFggjMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.kau.edu.sa%2FGetFile.aspx%3Fid%3D137653%26fn%3Didentification_of_plant_pigments_%28carotenoids%29_by_thin_laye.pdf&usg=AFQjCNEMCgdARCqKQ7bzI_uWQI9FJVAkvQ&sig2=YmBfbcASmkrIrhLkeebSBQ&cad=rja (2. 2. 2016)

Johnson L. M. idr. (2003) *Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis**. [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu <http://www.int-res.com/articles/dao2004/57/d057p255.pdf> (5. 2. 2016)

Judge, M. (2016). *Factores que afectan los valores rf en la cromatografía en capa delgada*. [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu http://www.ehowenespanol.com/factores-afectan-valores-rf-cromatografia-cap-a-delgada-info_140571/ (2. 1. 2016)

Manowattana, A. idr. (2015) β -Carotene Production by *Sporobolomyces parroseus* TISTR5213 Using Crude Glycerol as the Sole Carbon Source. Dostopno na URL naslovu <http://epg.science.cmu.ac.th/ejournal/> (26. 1. 2016)

Paiva, S., Russell, R. (1999). *Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants*. PubMed. [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10511324> (18. 1. 2016)

Ramos, A. (2014). *Rhodotorula species*. Antimicrobe. [Elektronski vir] Dostopno na URL naslovu <http://www.antimicrobe.org/f16.asp> (24. 1. 2016)

Rhodotorula – Wikipedia. [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu <https://en.wikipedia.org/wiki/Rhodotorula> (18. 1. 2016)

University of Colorado at Boulder, Department of Chemistry and Biochemistry. *Thin Layer Chromatography (TLC)*. (2016). [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu <http://orgchem.colorado.edu/Technique/Procedures/TLC/TLC.html> (1. 2. 2016)

Van Broock, M. idr. (2010). *Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast Rhodotorula mucilaginosa: The role of torularhodin*. [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu https://www.researchgate.net/publication/44696049_Photoprotection_by_carotenoid_pigments_in_the_yeast_Rhodotorula_mucilaginosa_The_role_of_torularhodin (1. 2. 2016)

Wiley Online Library: General Life Sciences: Entomological Research: *Characterization of optimal growth conditions and carotenoid production of strain Rhodotorula mucilaginosa HP*

isolated from larvae of Pieris rapae (2009). [Elektronski vir] Dostopno na URL naslovu <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5967.2009.00250.x/abstract> (24. 1. 2016)

Wirth, F., Goldani Z., L. (2012). *Epidemiology of Rhodotorula: An Emerging Pathogen*. Interdisciplinary Perspectives on Infection Diseases. [Elektronski vir] Dostopno na URL naslovu <http://www.hindawi.com/journals/ipid/2012/465717//> (18. 1. 2016)

9.3 Slikovni viri

Slika št. 1: Svetlobni spekter

Optična sevanja. [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu http://www.inis.si/index.php?id=277#.VrdYS_nhDIU (5. 2. 2016)

Slika št. 2: Zgradba glivne celice

Yeast Cell Structure. [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu http://www.biocourseware.com/iphone/cell/index_pad.htm (5. 2. 2016)

Slika št. 3: Sev *Rhodotorula mucilaginosa* (lastni vir)

Slika št. 4: Pomembne kemijske, biološke in fizikalne lastnosti karotenoidov

Kushwaha, K. idr. (2014). *Colorful World of Microbes: Carotenoids and Their Applications, Advances in Biology*. Objavljeno v Hindawi: Advances in Biology. [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu <http://www.hindawi.com/journals/ab/2014/837891/> (28. 1. 2016)

Slika št. 5: Strukturna formula β -karotena

β -karoten (Chemistry StackExchange). [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu <http://chemistry.stackexchange.com/questions/13866/how-does-neutralization-of-free-radicals-by-beta-carotene-work> (19. 1. 2016)

Slika št. 6: Strukturna formula torulena

Torulen (Kegg). [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?C08613 (19. 1. 2016)

Slika št. 7: Strukturna formula torularodina

Torularodin (Guidechem). [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu <http://www.guidechem.com/cas-514/514-92-1.html> (18. 1. 2016)

Slika št. 8: Hodogram poteka dela (lastni vir)

Slika št. 9: Pripomočki v laminariju pred začetkom obsevanja (lastni vir)

Slika št. 10: Kolonije na plošči agarja po treh dneh (lastni vir)

Slika št. 11: Vsebina centrifugirke po prvem centrifugiranju (lastni vir)

Slika št. 12: Tekoče gojišče z glivo *Rhodotorula mucilaginosa* (lastni vir)

Slika št. 13: Aluminijska ploščica z nanešenimi karotenoidi v komori za kromatografijo (lastni vir)

Slika št. 14: Aluminijska ploščica po opravljeni TLC metodi (lastni vir)

Slika št. 15: Absorpcijski spekter ekstrakta karotenoidov v glivi *Rhodotorula mucilaginosa* (lastni vir)

Slika št. 16: Skica poteka eksperimenta, str. 1 (lastni vir)

Slika št. 17: Skica poteka eksperimenta, str. 2 (lastni vir)

Slika št. 18: Skica poteka eksperimenta, str. 3 (lastni vir)

Slika št. 19: Skica poteka eksperimenta, str. 4 (lastni vir)