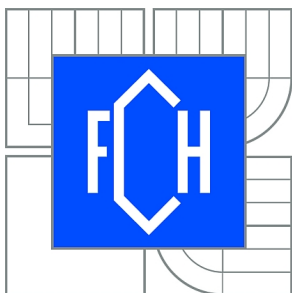


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

CHARAKTERIZACE KAROTENOGENNÍCH KVASINEK POMOCÍ MOLEKULÁRNÍCH TECHNIK

CHARACTERIZATION OF CAROTENOGENIC YEASTS USING MOLECULAR TECHNIQUES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. IVETA KOSTOVÁ

VEDOUcí PRÁCE
SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2013



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0745/2012	Akademický rok: 2012/2013
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Iveta Kostovová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Andrea Hároniková	

Název diplomové práce:

Charakterizace karotenogenních kvasinek pomocí molekulárních technik

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše - možnosti využití molekulárně biologických metod k charakterizaci kvasinek.
2. Optimalizace vybraných metod analýzy kvasinkové DNA.
3. Experimentální studie - využití optimalizovaných metod k bližší charakterizaci vybraných druhů karotenogenních kvasinek.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2013

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

Bc. Iveta Kostovová
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem předložené diplomové práce byla charakterizace karotenogenních kvasinek pomocí molekulárních technik. K tomuto účelu byly amplifikovány mezidruhově variabilní a přitom konzervované sekvence genomové DNA, a to konkrétně oblasti rDNA D1/D2 velké ribosomální podjednotky a úseky ITS1 a 5,8-ITS2 rDNA. Tyto sekvence byly podrobeny analýze metodou DGGE, která prokázala odlišnost kmene *S. roseus* ve všech analyzovaných úsecích rDNA od ostatních kmenů karotenogenních kvasinek. Ke karyotypové charakterizaci kvasinek byla optimalizována metoda PFGE, a to jak izolace intaktní DNA, tak parametry PFGE. Celkem bylo analyzováno devět kmenů karotenogenních kvasinek rodů *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cystofilobasidium* a *Phaffia*. Součástí diplomové práce byla také aplikace molekulárních metod k molekulární analýze úseků D1/D2 u mutantních kmenů karotenogenních kvasinek. Tyto kmeny byly adaptovány na odpadní substráty, jakými byly těstoviny a glycerol a v této práci byla ověřena stabilita jejich produkčních vlastností.

KLÍČOVÁ SLOVA

Karotenogenní kvasinka, DGGE, PFGE, PCR, molekulární charakterizace, karyotypová charakterizace

ABSTRACT

The aim of this master's thesis was focused on characterization of carotenogenic yeast using molecular techniques. For this usage, interspecific variables of strongly conserved sequences of genomic DNA, especially rDNA D1/D2 large ribosomal subunit and ITS1 and 5,8-ITS2 rDNA regions were amplified. These sequences were ~~subjected~~ analysed by DGGE method, which approved differences of *S. roseus* in all analyzed rDNA sequences compared to the other analyzed carotenogenic yeasts. Parameters of PFGE and isolation procedure of the intact DNA were optimized for caryotypic yeast characterization. At all, nine of carotenogenic yeast strains *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cystofilobasidium* a *Phaffia* were analyzed by this techniques. Further part of this thesis was focused to application of molecular methods to analysis of region D1/D2 of large ribosomal subunit in mutant carotenogenic yeast strains. Mutant strains were previously adapted to waste substrates - pasta and glycerol, and stability of their production properties was verified.

KEYWORDS

Carotenogenic yeast, DGGE, PFGE, PCR, Molecular technics, Karyotypic characterization

KOSTOVOVÁ, I. *Charakterizace karotenogenních kvasinek pomocí molekulárních technik*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 89s a 28 stran příloh. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma Charakterizace karotenogenních kvasinek pomocí molekulárních technik jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových, a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

.....
(podpis autora)

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc, za výběr tématu diplomové práce, za odborné vedení a nesmírnou ochotu při jejím řešení. Dále bych chtěla poděkovat také Ing. Andrei Háronikové za pomoc a trpělivost při řešení experimentální části, Jakubu Sadílkovi a všem, kteří jakýmkoliv způsobem přispěli ke vzniku této práce.

OBSAH

Obsah	9
1 Úvod	11
2 Teoretická část	12
2.1 Karotenogenní kvasinky	12
2.1.1 Vybrané druhy karotenogenních kvasinek	12
2.2 Metabolity karotenogenních kvasinek	14
2.2.1 Karotenoidy a jejich biosyntéza.....	15
2.2.2 Biosyntéza karotenoidů.....	17
2.3 Molekulární charakterizace kvasinek.....	20
2.3.1 Izolace genomové DNA.....	21
2.3.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	22
2.3.3 Denaturační gelová gradientová elektroforéza (DGGE)	25
2.3.4 Sekvenování.....	27
2.3.5 Pulzní gelová elektroforéza	27
3 Cíle práce	31
4 Experimentální část	32
4.1 Použité vybavení, pomůcky a chemikálie	32
4.1.1 Použité vybavení a pomůcky	32
4.1.2 Použité chemikálie	33
4.2 Metody	35
4.2.1 Kultivační metody.....	35
4.2.2 Molekulární metody.....	39

5	Výsledky a diskuze	47
5.1	Molekulární charakterizace standardních kmenů karotenogenních kvasinek	47
5.1.1	Nested PCR D1/D2 oblasti 26S rDNA	47
5.1.2	Optimalizace PCR ITS1 a ITS2-5,8 r DNA oblasti	48
5.1.3	DGGE D1/D2 oblasti 26S rDNA	49
5.1.4	Optimalizace DGGE ITS1 a ITS2-5,8 r DNA oblasti.....	50
5.1.5	Sekvenování	52
5.1.6	Karyotypová charakterizace kvasinkových kmenů pomocí PFGE	56
5.2	Analýza mutantních kmenů karotenogenních kvasinek	60
5.2.1	Pozorování morfologických změn mutantních kmenů kultivovaných na glycerolu	61
5.2.2	Sledování stability produkčních vlastností mutantních kmenů.....	64
6	Závěr	79
	Literatura	81
	Seznam použitých zkratk	87
	Seznam příloh	88

1 ÚVOD

Metody tradiční mikrobiologie rozlišují mikroorganismy na základě jejich morfologických, fyziologických a biochemických vlastností. Tyto vlastnosti, ale závisí na genové expresi a jsou do jisté míry ovlivněny podmínkami vnějšího prostředí. Standardní metody tedy vyžadují řadu kultivačních testů, jakými jsou hodnocení vzhledu a tvaru kolonií, sporulace a morfologie buněk, testy schopnosti asimilace zdrojů uhlíku a dusíku, požadavky na přítomnost vitamínů, schopnosti zkvašovat cukry a dále různé nároky mikroorganismů na teplotu prostředí, koncentraci cukrů a solí. Ve srovnání s molekulárními metodami se jedná o časově velmi náročné metody, které v řadě případů nemusí být průkazné.

Molekulární metody představují rychlou a přesnou analýzu jednotlivých druhů mikroorganismů i bez potřeby předchozí kultivace. Tyto metody jsou používány pro taxonomické, fylogenetické studie a v průmyslových aplikacích k rychlému stanovení kontaminujících mikroorganismů, či změny požadovaných vlastností produkčních kmenů vznikem mutací. K těmto účelům je nejčastěji používána metoda PCR ve spojení s metodou DGGE. Pomocí metody PCR jsou nejprve amplifikovány mezidruhově variabilní a přitom konzervované sekvence, pro přesné určení původu mikroorganismu. Těmito sekvencemi genomové DNA jsou oblasti D1/D2 rDNA jako součást genu kodující velkou ribosomální podjednotku, a dva variabilní nekodující úseky rDNA tzv. regiony ITS1 a 5.8 ITS2. Sekvence těchto oblastí jsou pak separovány v denaturačním gradientu metodou DGGE a v závislosti na jejich primární struktuře umožňují identifikaci i blízce příbuzných organismů.

Jinou metodou poskytující rozlišení i blízce příbuzných organismů je metoda PFGE. Tato metoda umožňuje sledování karyotypu kvasinek a obecně eukaryotických organismů, protože dokáže separovat molekuly DNA větší než 50 Kbp. Je tak účinnou metodou pro stanovení velikosti a počtu jednotlivých chromosomů.

Předložená diplomová práce se zabývá molekulární charakterizací karotenogenních kvasinek. K tomuto účelu byly použity výše uvedené metody. Analyzované kmeny karotenogenních kvasinek byly *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces roseus*, *Sporobolomyces shibatanus*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Cystofilobasidium capitatum* a *Phaffia rhododroma*.

Součástí předložené práce byla také aplikace molekulárních metod na stanovení odlišnosti mutantních kmenů karotenogenních kvasinek a stanovení odlišností produkce významných metabolitů od jejich původních produkčních vlastností.

2 TEORETICKÁ ČÁST

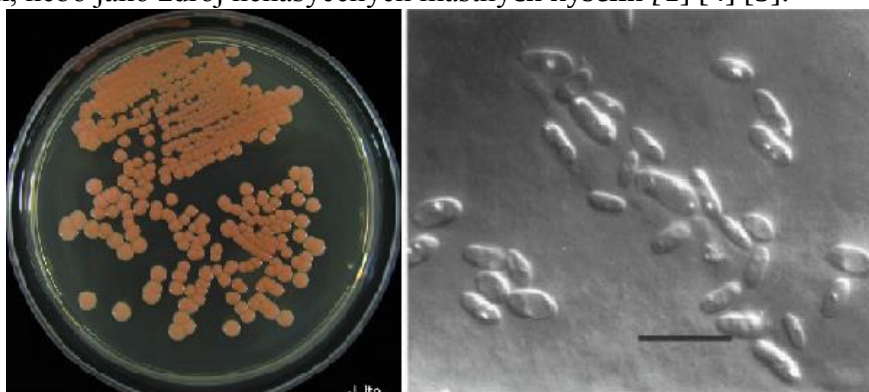
2.1 Karotenogenní kvasinky

Karotenogenní kvasinky jsou kvasinky schopné akumulovat v povrchových strukturách buňky karotenoidní pigmenty. Jsou to nepříbuzné organismy ve většině případů řazeny do třídy *Basidiomycetes*, protože se většina z nich vyznačuje tvorbou bazidiospor, produkcí ureázy a jejich buněčná stěna se skládá převážně z chitinu, mananu a je pigmentovaná. Dále jsou řazeny do pododdělení *Pucciniomycotina* a *Agaricomycotina*. Do oddělení *Pucciniomycotina* (synonymum *Urediniomycetes*) náleží kvasinky řádů *Sporidiobolales* a *Erythrobasidium*. Do oddělení *Agaricomycotina* (synonymum *Hymenomycetes*) náleží řád *Cystofilobasidiales* [1] [2] [3].

2.1.1 Vybrané druhy karotenogenních kvasinek

2.1.1.1 Rod *Rhodotorula*

Kvasinky mají kulovitý až vejcovitý tvar. Vegetativně se rozmnožují multilaterálním nebo polárním pučením. Mohou vytvářet pseudomycelia i pravá mycelia. Některé kmeny jsou schopny syntetizovat červené nebo žluté pigmenty na sladidinových agarech. Většina druhů postrádá schopnost asimilovat inositol. Druhy, které jsou naopak schopny asimilovat inositol, nejsou schopny asimilovat D-glukuronát. Nejsou schopny kvasit sacharidy. Vytvářejí koenzymy Q-10 a Q-9. Druhy schopné syntetizovat karotenoidy jsou *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Rhodotorula lactosa*, *Rhodotorula mucilaginosa* (*Rhodotorula rubra*), *Rhodotorula diffluens* a *Rhodotorula acuta*. Kvasinky druhu *Rhodospiridium toruloides* jsou schopny kumulovat lipidy, které tvoří až 20 % sušiny. Z toho důvodu jsou využívány jako zdroj triacylglycerolů, povrchově aktivních látek, nebo jako zdroj nenasycených mastných kyselin [1] [4] [5].



Obr. 1: Zleva *Rhodotorula mucilaginosa* a *Rhodotorula diffluens* [4] [6]

2.1.1.2 Rod *Sporobolomyces*

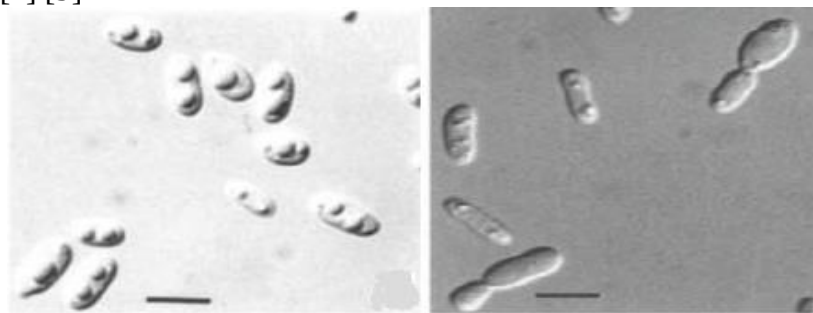
Kolonie jsou zbarveny lososově růžovou barvou, oranžově, červeně i žlutohnědě v důsledku tvorby karotenoidů. Tvar buněk je elipsoidní, vřetenovitý až cylindrický. Nedokáží zkvašovat cukry a obsahují ubiquinon. Kolonie jsou většinou silně zvrásněny. Vedle pučících buněk vytvářejí také bohaté mycelium. Vyskytují se často na listí stromů a na jiných rostlinách, odkud se dostávají do tekoucích i stojatých vod. Karotenogenní druhy jsou *Sporobolomyces roseus*, *Sporobolomyces ruber*, *Sporobolomyces salicinus*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Sporobolomyces sasicola*, *Sporobolomyces shibatanus*, *Sporobolomyces singularis*, *Sporobolomyces subbrunneus* a *Sporobolomyces xanthus* [1] [4] [7].



Obr. 2: Křížový roztěr kmene *Sporobolomyces roseus* [8]

2.1.1.3 Rod *Cystofilobasidium*

Díky přítomnosti karotenoidů tvoří oranžové, lososově až skořicově zbarvené kolonie. Tvar buněk je vejcovitě protáhlý. Nepohlavně se rozmnožují polárním nebo bipolárním pučením. Netvoří ballistokonidie. Některé druhy mohou vytvářet pseudohýfy. Při pohlavním rozmnožování vytvářejí pravá mycelia a tmavě pigmentované teliospory, které klíčí v přisedlé basidiospory. Vytvářejí koenzymy Q9 a Q10 a obsahují xylulósu. Jednotlivé druhy akumulující karotenoidy jsou *Cystofilobasidium bisporii*, *Cystofilobasidium capitatum* a *Cystofilobasidium infirmominiatum*. Tyto druhy nejsou schopny zkvašovat glukósu a mají přísně aerobní metabolismus. *Cystofilobasidium capitatum* je kultivováno pro jeho vysokou produktivitu koenzymu Q 10, β -karotenu, torulenu a torularhodinu [1] [4] [9]



Obr. 3: Zleva *Cystofilobasidium bisporii* a *Cystofilobasidium capitatum* [4]

2.1.1.4 Rod *Phaffia* (*Xanthophyllomonas*)

Vegetativně se tento rod rozmnožuje pučením. Kvasinky mají elipsoidní tvar a vyskytují se jednotlivě, ve dvojicích a občas mohou tvořit krátké řetězce. Syntetizují karotenogenní pigmenty, zejména astaxanthin a v menší míře β -karoten. Kolonie jsou červené až losově červené barvy. Nevytvářejí pravá mycelia, ale mohou vytvářet pseudomycelia. Mají schopnost zkvašovat cukry. Jako jiné zdroje uhlíku nejsou schopny asimilovat inositol. Produkují koenzym Q-10 a jejich buňky obsahují xylulósu. Nejvýznamnějším druhem produkujícím karotenoidy je *Phaffia rhodozyma*. V dnešní době jsou pro produkci astaxanthinu využívány mutantní kmeny *Phaffia rhodozyma*, protože divoké kmeny produkují astaxanthin v malé míře, a jsou proto ekonomicky nevýhodné [1] [4] [10].



Obr. 4: Křížový roztěr kmene *Phaffia rhodozyma* [8]

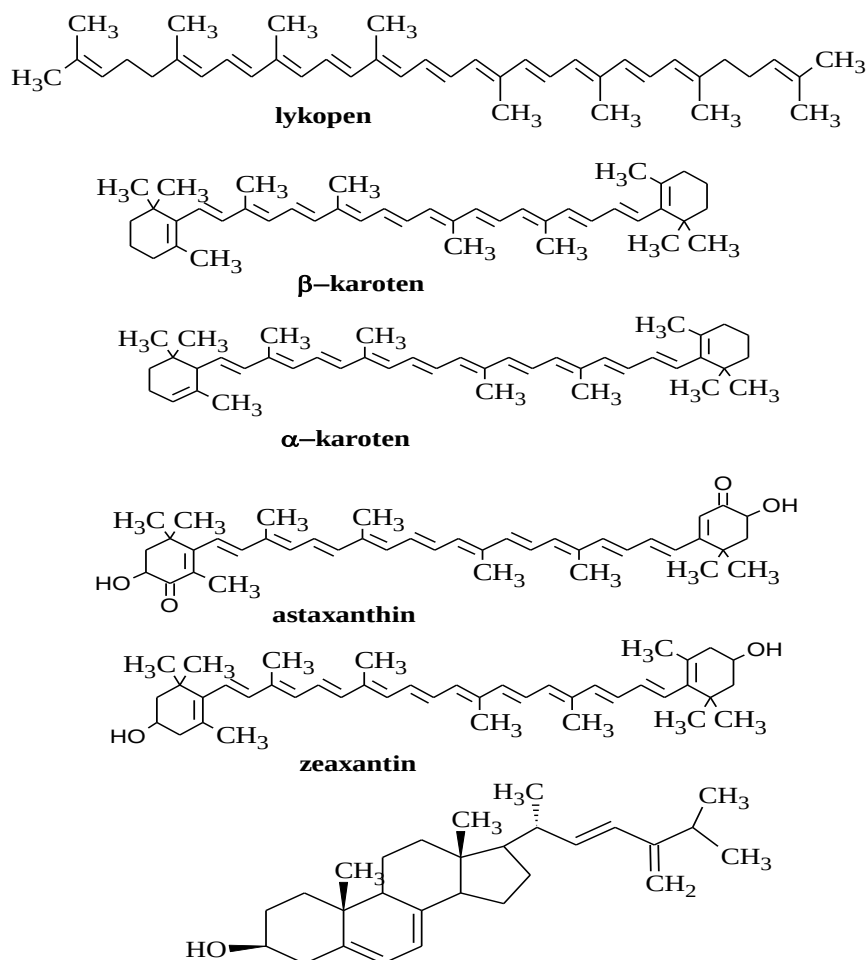
2.2 Metabolity karotenogenních kvasinek

Mezi hlavní metabolity karotenogenních kvasinek patří karotenoidy, jimiž jsou lycopon, α -karoten, β -karoten, astaxanthin a zeaxanthin. V buňkách kvasinek plní karotenoidy funkci fotoprotekce, která je realizována prostřednictvím zhášení singletového stavu kyslíku, inaktivací volných radikálů kyslíku a zhášení excitovaných tripletových stavů molekul. Kromě všech fyzikálních mechanismů zapojených do karotenoidní fotoprotekce, ovlivňují karotenoidní pigmenty lipidové membrány zejména, co se týče jejich strukturních a dynamických vlastností a také snižují jejich oxidační degradaci. Například, přítomnost polárních karotenoidů v tukové fázi má vliv na fyzikální vlastnosti membrány, moduluje membránovou fluiditu a ovlivňuje průnik malých molekul, včetně kyslíku povrchovou bariérou [3] [11].

Důležitými látkami obsaženými zejména v cytoplasmatické membráně kvasinek jsou lipidy. Lipidy tvoří chemicky rozmanitou skupinu triacylglycerolů, vosků, glykolipidů a fosfolipidů. Fosfolipidy jsou nezbytnou složkou buněčných membrán, která ovlivňuje jejich prostupnost a elasticitu. Obsah neutrálních triacylglycerolů a fosfolipi-

dů závisí na složení živného média a podmínkách kultivace. Kvasinky běžně obsahují 5 – 15 % tuku v sušině, ovšem karotenogenní kvasinky jsou schopny dosáhnout až několikanásobku (cca 60 % tuku v sušině). Standardní profil mastných kyselin, které jsou tyto kvasinky schopny akumulovat, zahrnuje kyselinu palmitovou, stearovou, olejovou a kyselinu linoleovou. Ideálním substrátem pro produkci lipidů je glycerol; v současné době je glycerol totiž odpadním produktem při výrobě bionafty, jedná se tedy i o ekonomicky výhodný substrát [3] [4] [12].

Významným metabolitem, který má ve spojení s fosfolipidy funkci při tvorbě biomembrán, je ergosterol. Ergosterol je provitaminem D₂. Působením UV záření dochází ke vzniku vitamínu D [4] [13].



Obr. 5: Metabolity karotenogenních kvasinek [13] [14] [15]

2.2.1 Karotenoidy a jejich biosyntéza

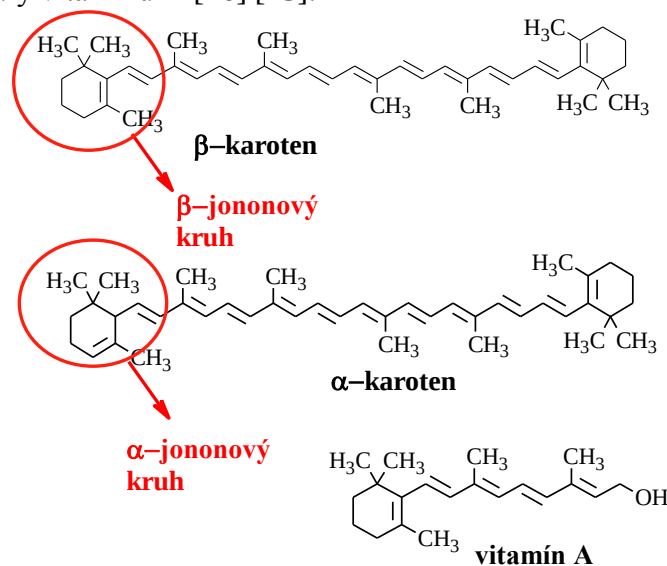
Karotenoidy jsou extrémně hydrofobní molekuly s malou nebo žádnou rozpustností ve vodě. Dalo by se tedy očekávat, že budou omezeny na hydrofobní oblasti v buňce, jako je hydrofobní jádro biomembrán, s výjimkou společného výskytu s proteiny, což

jím usnadňuje přístup k vodnímu prostředí. Polární funkční skupiny samozřejmě mohou změnit polaritu karotenoidů a umožňují jejich interakce s jinými molekulami [11]

Většina karotenoidních látek se řadí mezi tetraterpeny, tedy mezi terpenoidy formálně obsahující osm izoprenových jednotek. Jejich barevnost je způsobena řetězcem konjugovaných dvojných vazeb, který se vyskytuje v několika základních strukturách, a jejich kombinacích. Karotenoidy se dělí na dvě hlavní skupiny [16].

2.2.1.1 Karoteny

Nejjednodušším typem karotenů je acyklický polynenasycený uhlovodík fytoen. Acyklické karoteny se - s výjimkou lykopenu - nacházejí v potravinářských materiálech jen v malém množství. Doprovázejí zde alicyklické karoteny a xantofyly. Alicyklické karoteny vznikají enzymově katalyzovanou cyklizací na jednom nebo obou koncích acyklických ψ -karotenů, kdy se tvoří β -jononové struktury v β -karotenech a α -jononové struktury v ϵ -karotenech. α -karoten, β -karoten a γ -karoten jsou prekurzory retinolu, a řadí se proto mezi provitaminy A. Konverzí jedné molekuly β -karotenu vznikají dvě molekuly vitamínu A [16] [15].



Obr. 6: Strukturní vzorce vitamínu A, β -karotenu a α -karotenu

2.2.1.2 Xantofyly

Primárně vznikají jako produkty biochemické oxidace karotenů. V potravinách se v malém množství vyskytují xantofyly odvozené od acyklických karotenů, jako je např. 1,2-epoxylykopen, což je pigment přítomný v rajčatech. Kryptoxanthiny jsou monohydroxysubstituované deriváty alicyklických karotenů. Vyskytují se mnohem častěji než xanthofyly a nacházejí se např. v rostlinných pletivech (α -kryptoxanthin). Obecně jsou xanthofyly hlavními karotenoidy rostlin [16].

2.2.2 Biosyntéza karotenoidů

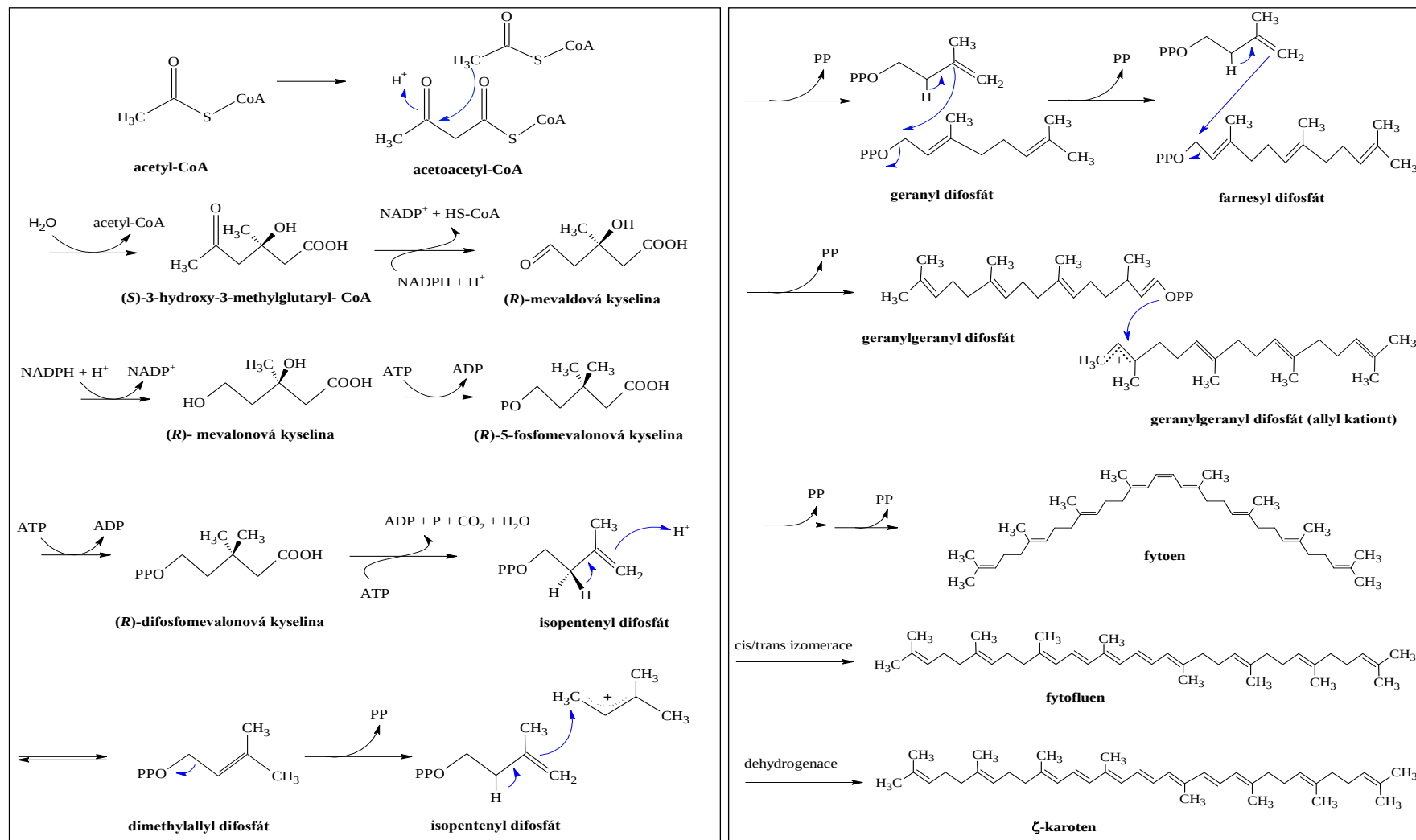
Biosyntéza karotenoidů probíhá obdobným způsobem jako syntéza látek terpenoidní povahy, tedy metabolickými drahami kyseliny mevalonové. Vstupní komponentou je acetylkoenzym A (AcCoA), který je meziproduktem aerobního odbourání sacharidů a β -oxidace mastných kyselin [3].

Kyselina mevalonová je vytvářena kondenzací tří molekul acetylkoenzymu A, kde první dvě molekuly acetyl-CoA jsou spojeny v acetoacetyl-CoA. Acetoacetyl-CoA reaguje s acetyl-CoA. Produktem této reakce je (S)-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA za účasti hydroxymethylglutaryl-CoA syntázy. Poté dochází k redukci na (R)-mevaldovou kyselinu za účasti hydroxymethylglutaryl-CoA reduktázy. (R)-mevaldová kyselina je u kvasinek redukována pomocí NADH-dependentní mevaldát reduktázy na kyselinu mevalonovou. Dvěma po sobě jdoucími reakcemi kyseliny mevalonové a ATP vzniká isopentenylidifosfát za současné eliminace oxidu uhličitého a vody. Isopentenylidofosfát podléhá vratné isomeraci, čímž vzniká dimethylallyldifosfát. Prodloužení řetězce isopentenylidifosfátu o řetězec dimethylallyldifosfátu za účasti dimethylallyl transferázy vzniká geranylidifosfát. Tato reakce uvolňuje allylový kationt, který následně podléhá adici na dvojnou vazbu isopentenylidifosfátu za uvolnění protonu. Obdobně reaguje geranylidifosfát s isopentenylidifosfátem za vzniku farnesyldifosfátu, který podobným způsobem reaguje s isopentenylidifosfátem, čímž vzniká geranylgeranylidifosfát [14] [15] [17].

Následnou kondenzací dvou molekul geranylgeranylidifosfátu vzniká molekula fytoenu. Této kondenzace se účastní enzym fytoen syntáza. Fytoen je přímým prekurzorem karotenoidů, je bezbarvý a podléhá řadě desaturačních a cyklizačních reakcí. Produktem těchto reakcí je u kvasinek neurosporen. Následně vzniká lykopen, který podléhá cyklizačním reakcím, kdy vznikají dva typy jononových struktur, a to β -jononové struktury a α -jononové struktury. Biosyntéza karotenoidů je uvedena v obrázku č.7 a obrázku č. 8 (vlevo) [17] [14].

2.2.2.1 Biosyntéza ergosterolu

Ergosterol náleží mezi terpenoidy, proto je jeho biosyntéza z počátku obdobná jako u karotenoidů, probíhá tedy metabolismem kyseliny mevalonové. Mezním produktem odlišnosti je farnesyldifosfát. Poté následují kondenzační reakce, které vedou squalen k lanosterolu. Konverzí lanosterolu vzniká zymosterol, který je transportován do mitochondrií, kde je methylován a vzniká fekosterol. Finální konverze fekosterolu na ergosterol probíhá v endoplasmatickém retikulu. Za anaerobních podmínek jej kvasinky nedokáží syntetizovat a nejsou schopny růst, pokud není ergosterol do média přidán. K této situaci dochází z toho důvodu, že pro cyklizaci squalenu je kyslík nezbytný. Biosyntéza ergosterolu je uvedena v obrázku č. 8 (vpravo), kde přerušované šipky vyjadřují několik reakčních kroků [14] [18] [17] [15].



Obr. 7: Biosyntéza karotenoidů – vlevo obecná část izoprenoidní dráhy, vpravo specifická větev biosyntézy karotenoidů [15] [3] [17] [14]

2.3 Molekulární charakterizace kvasinek

Metody molekulární biologie jsou v dnešní době používány pro rychlou identifikaci a taxonomické zařazení kvasinek. Metody tradiční mikrobiologie rozlišují mikroorganismy na základě jejich morfologických a fyziologických vlastností. Tyto vlastnosti ale závisí na genové expresi a jsou do jisté míry ovlivněny podmínkami vnějšího prostředí. Tyto standardní metody vyžadují řadu kultivačních testů, jakými jsou hodnocení vzhledu a tvaru kolonií, sporulace a morfologie buněk, testy schopnosti asimilace zdrojů uhlíku a dusíku, požadavky na přítomnost vitamínů, schopnosti zkvašovat cukry, dále různé nároky kvasinek na teplotu prostředí, koncentraci cukrů a solí. V porovnání s molekulárními technikami se jedná o časově velmi náročné metody [1] [3] [4] [19].

Výhodou některých molekulárních technik je, že nejsou ovlivněny podmínkami vnějšího prostředí a představují tak takzvané metody otisku prstu umožňující identifikaci a taxonomické zařazení kvasinek [19] [20]. K taxonomickému, fylogenetickému zařazení, identifikaci mutací a jejich povahy jsou z těchto technik nejčastěji používány metody Polymerázové řetězové reakce (PCR), Denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE), Pulzní gelové elektroforézy (PFGE) a jiné metody založené na analýze genomové DNA. V případě PCR a DGGE mohou být k tomuto účelu používány hypervariabilní a přitom z části vysoce konzervované sekvence genomové DNA nebo mitochondriální DNA [1] [19] [20].

Příkladem hypervariabilních sekvencí genomové DNA obsahující konzervované sekvence jsou ribosomální geny a ITS (Internal transcribe spacer) mezerníky (spacery), které se vyskytují mezi ribosomálními geny. Analýzou těchto genů lze dosáhnout rozlišení mezi jednotlivými kvasinkovými kmeny [1] [19] [20] [21].

V dnešní době jsou sekvence ribosomálních genů rutinně používány ke stanovení, identifikaci a diferenciaci kvasinkových kmenů. Sekvence domény D1/D2 velké ribosomální podjednotky LSU jsou přístupné na mezinárodních databázích pro kvasinky řazené mezi *Ascomycetes* i *Basidiomycetes*. Analýza těchto sekvencí je uskutečňována amplifikací těchto specifických úseků, jejich sekvencováním a následným porovnáním získaných sekvencí se sekvencemi kvasinek v mezinárodních databázích. Optimalizovaný postup trvá 24 - 48 hodin [1].

2.3.1 Izolace genomové DNA

Prvním a nezbytným krokem molekulární analýzy je izolace genomové DNA. Čistota a kvantita izolované DNA je rozhodující pro úspěšnost dalších postupů a jako taková je založena na rozdílných fyzikálně-chemických vlastnostech jednotlivých biologických makromolekul [22].

Buňky jsou chráněny před vnějším prostředím buněčnou stěnou, kterou je třeba rozrušit působením vhodných enzymů, chelatačních činidel a povrchově aktivních látek. Pro rozrušení bakteriální buněčné stěny je velmi účinný enzym lysozym spolu s detergenty a chelatačními činidly, jako je EDTA. EDTA vyvazuje hořčnaté a manganaté ionty a tím inaktivuje působení deoxyribonukleáz, které by degradovaly uvolněnou DNA [23]. Kvasinková buněčná stěna se svým chemickým složením a odolností liší od bakteriální buněčné stěny, je tedy třeba kombinovat metody mechanické dezintegrace buněk spolu s působením degradačních enzymů, nejčastěji glukuronidáza [22] [24].

Po úspěšném rozrušení buněčné stěny jsou uvolněny všechny komponenty buňky do vnějšího roztoku. Taková směs je nazývána jako hrubý lyzát. Lyzát obsahuje kromě DNA a RNA také nízkomolekulární uhlovodíky, polysacharidy, lipidy a bílkoviny. Z této směsi může být dále DNA izolována za použití enzymů. Pro odstranění RNA je používána ribonukleáza A a pro odstranění proteinů proteináza K. Odstranění proteinů je velmi důležitý krok; lyzát totiž obsahuje mnoho enzymů, které by mohly degradovat DNA [25].

Další standardně používanou metodou izolace DNA z hrubého lyzátu je fenol-chloroformová extrakce. Směs chloroformu a fenolu je totiž hydrofobní a odděluje se od vodné fáze. Po promíchání vrstev dochází k denaturaci proteinů, které se vysráží v organické fázi, zatímco DNA a RNA zůstávají ve vodné fázi. Důležitým kritériem tohoto kroku je pH fenolu. Při neutrálním nebo alkalickém pH zůstane DNA a RNA ve vodné fázi, při kyselém pH zůstane ve vodné fázi pouze RNA. Po fenol-chloroformové extrakci je třeba precipitovat extrahovanou DNA v ethanolu nebo isopropanolu za přítomnosti jednomocných iontů. Precipitací je odstraněn fenol a soli. Fenol je totiž denaturační činidlo a mohl by způsobit denaturaci enzymů, zejména Taq polymerázy při následné PCR. Po precipitaci následuje rozpuštění agregátů DNA ve vodném roztoku obsahujícím TRIS-HCl o rozmezí pH 7,5 - 8. Posledním krokem je zajištění, že DNA nebude degradována deoxyribonukleázami [22].

V současné době jsou hojně používány komerční kity, které zajišťují vysokou čistotu i koncentraci izolované DNA. Tyto kity obsahují předpřipravené roztoky. K lýze buněk používají roztok, který mimo jiné obsahuje SDS jako detergent, jenž odstraní lipidy. Tyto kity dále využívají kombinace mechanického a enzymatického působení na buněčnou stěnu buněk, roztoky obsahující soli pro navázání DNA na silikové membrány, dále roztoky obsahující ethanol pro přečištění DNA a roztoky o vhodném pH obsahující TRIS-HCl pufrý pro rozpuštění a uchovávání DNA [26].

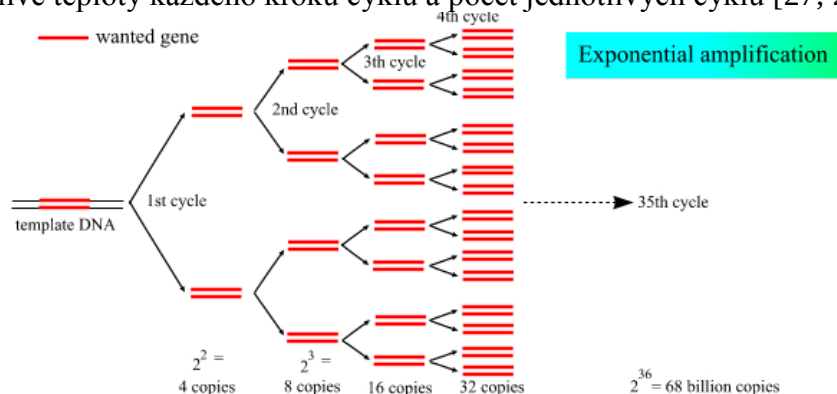
2.3.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce je průlomovou metodou molekulární biologie obdobně jako objev restrikčních endonukláz. Jedná se o metodu s velmi vysokou citlivostí, jež umožňuje běžně amplifikaci genu, který má pouze jedinou kopii v celém genomu, a jeho následnou vizualizaci na agarosovém gelu. V dnešní době je tato metoda používána k rychlé analýze požadovaných sekvencí díky automatizaci teplotních cyklů a snadné dostupnosti termostabilní polymerázy [27; 22] [28].

Princip polymerázové řetězové reakce (PCR) je založen na mechanismu cyklicky se opakující replikace nukleových kyselin. DNA je syntetizována ve směru 5'→3' prostřednictvím DNA polymerázy [22] [28].

Dvouvláknová DNA je nejprve denaturována působením teplot okolo 94 °C, poté na oba protilehlé řetězce DNA nasedají specifické primery tak, že jejich 3' konce směřují naproti sobě. Teploty nasedání primerů závisejí na teplotě tání daných primerů; obvykle se pohybují v rozmezí teplot 55 - 80 °C. V další fázi dochází k protisměrné syntéze vláken DNA na obou protilehlých matricových řetězcích. Teplota posledního kroku je v rozmezí teplot 65 - 72 °C a závisí na aktivitě polymerázy. Tyto tři kroky jsou cyklicky opakovány, dokud není dosaženo požadované koncentrace PCR produktu; ve většině případů se doporučuje 25 - 30 cyklů. Vyšší počet cyklů zvyšuje koncentraci nespecifických produktů. Reakce je nakonec ukončena zchlazením celé reakční směsi na 4 °C [22].

Každá nová aplikace PCR vyžaduje novou optimalizaci. Nejčastějšími problémy PCR je nízká koncentrace požadovaných produktů a vysoká koncentrace nespecifických produktů. Tyto produkty vznikají v důsledku nespecifického nasednutí primerů nebo jejich nesprávného prodloužení, tvorby dimerů primerů, které se pak stávají konkurenty pro požadované templáty. Dalšími možnými příčinami mohou být i vyskytující se mutace. Pro získání požadovaných PCR produktů je potřeba optimalizovat složení reakční směsi, jednotlivé teploty každého kroku cyklu a počet jednotlivých cyklů [27; 22].



Obr. 9: Princip PCR reakce

2.3.2.1 Primery

Obecné požadavky na primery zahrnují nejen jejich koncentraci v PCR směsi (optimální koncentrace je 0,1 - 0,5 μM), ale i jejich ideální délku a zastoupení jednotlivých bází. Optimální primer by měl mít délku od 18 do 28 nukleotidů a měl by obsahovat 50 až 60 % guaninových a cytosinových bází. Ideální teplota tání primerů - T_m by se měla pohybovat v rozmezí teplot 55 - 80 °C. Aby se zamezilo tvorbě dimerů primerů, neměly by primery být vůči sobě komplementární na 3'-koncích [27; 22].

2.3.2.2 Koncentrace hořčnatých iontů

Koncentrace hořčnatých iontů je stěžejní pro výsledek PCR reakce, protože může ovlivnit prodloužení primerů, disociační teplotu DNA vláken templátů i PCR produktů, specifitu reakce, formování dimerů primerů a zejména přesnost a enzymovou aktivitu polymerázy. Ideální koncentrace se pohybuje v rozmezí 0,5 do 2,5 mM nad koncentrací deoxynukleotidů. V potaz je potřeba brát i možnou přítomnost chelatačních činidel v roztoku templátové DNA, které na sebe váží hořčnaté ionty. V takovém případě může dojít k inaktivaci polymerázy, která vyžaduje k reakci přítomnost hořčnatých iontů [27; 22].

2.3.2.3 Polymeráza

Aktuálně je používána rekombinantní komerčně dostupná Taq polymeráza. Tato polymeráza byla izolována z termofilní bakterie *Thermus aquanticus*. Výhoda této polymerázy spočívá v její odolnosti vůči velmi vysokým teplotám, při kterých denaturuje DNA. Koncentrace tohoto enzymu v reakční směsi může rozhodnout o koncentraci požadovaného produktu i nespecifických produktů. Při vysokých koncentracích je vysoká i koncentrace nespecifických produktů. Doporučená koncentrace je mezi 1 až 2,5 U. Je třeba brát do úvahy také fakt, že aktivita každé polymerázy může být odlišná v závislosti na výrobci [27; 22].

2.3.2.4 Koncentrace deoxynukleotidů

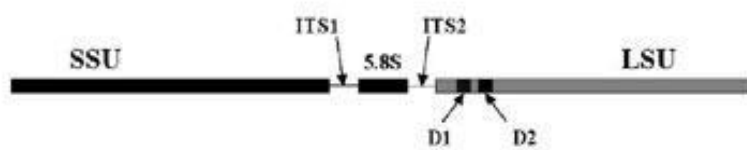
Koncentrace všech čtyř deoxynukleotidů by v jejich směsi měla být ekvivalentní, aby se zabránilo možnému špatnému začlenění nukleotidu. Roztok obsahující nukleotidy by měl mít neutrální pH. Ideální koncentrace se mohou pohybovat v rozmezí 20 až 200 μM v závislosti na velikosti PCR produktů a potřebném množství cyklů. Nižší koncentrace nukleotidů minimalizuje nesprávné zařazení nukleotidů. Koncentrace 20 μM každého nukleotidu ve 100 μl PCR směsi by teoreticky mělo odpovídat syntéze 2,6 μg DNA [27; 22].

2.3.2.5 PCR pufr

Doporučeným pufrům je TRIS-HCl pufr o koncentraci 10 – 50 mM a pH 7,8 – 6,8 během podmínek v termocykleru [27; 22].

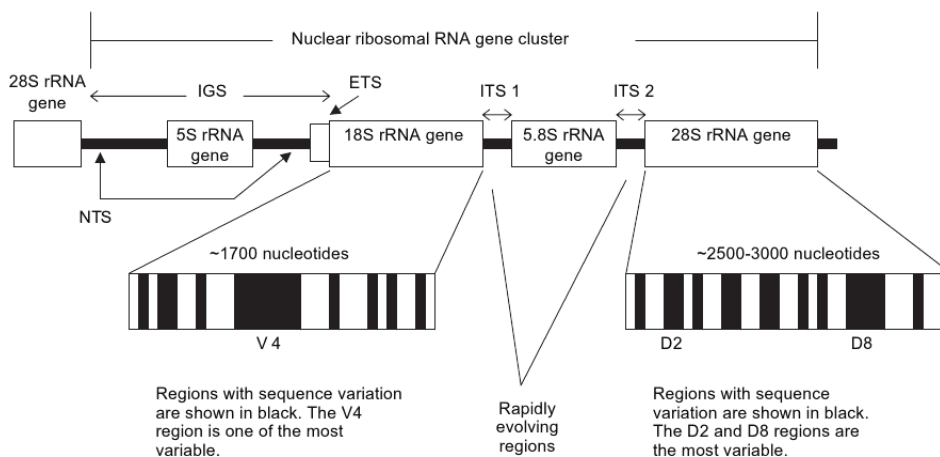
2.3.2.6 Nested PCR oblasti D1/D2 velké ribosomální jednotky (LSU) ITS1, ITS 2 fragmentů

Existuje mnoho typů metody PCR lišících se podle rozdílného použití. Nested PCR využívá vnějších a vnitřních primerů. Jedná se tedy o dvoukrokovou reakci, kdy v prvním kroku jsou použity vnější primery a v dalším kroku vnitřní primery. Tento typ PCR je nejčastěji používán kvůli vysoké citlivosti a specifitě [22]. Pro identifikaci a taxonomické zařazení kvasinek jsou pro nested PCR používány primery pro oblasti ITS1, ITS2 a oblast velké ribosomální jednotky (LSU) D1/D2. Tyto oblasti nesou hypervariabilní sekvence a konzervativní sekvence primerů, sekvence ostatních ribosomálních genů jsou více konzervativní a neposkytují vhodné rozlišení mezi velmi blízkými kvasninkovými druhy [1; 2; 20; 19].



Obr. 10: Oblasti ITS a D1/D2 oblasti

Pro amplifikaci ITS1 a ITS2 oblastí jsou v prvním kroku reakce standardně používány primery ITS1 a ITS4. V dalším reakčním kroku je tento úsek rozdělen primery ITS1 a ITS2 na ITS1 oblast, primery ITS3 a ITS4 tuto oblast rozděluje na ITS2 oblast (viz Obr. 10, Obr. 11).



Obr. 11: Uspořádání ribosomálních genů v genomové DNA [29]

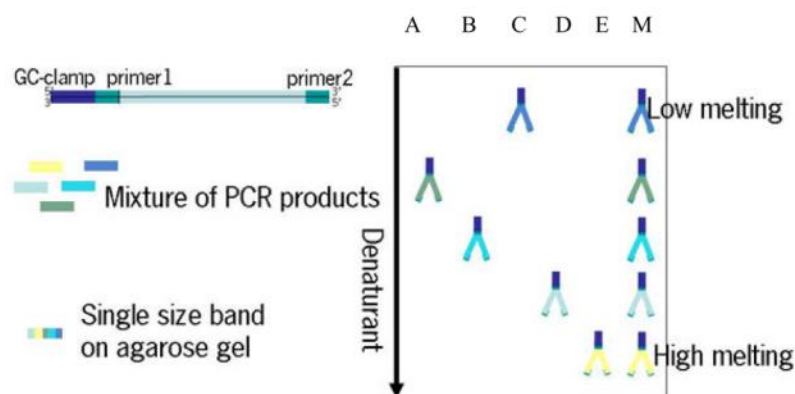
Pro amplifikaci oblasti D1/D2 jsou v prvním kroku používány primery NL1 a NL4. Další reakcí je tento úsek genu pro velkou ribosomální jednotku rozdělen na D1/D2 oblast pomocí primerů NL1 a LS2 [29] [30].

2.3.3 Denaturační gelová gradientová elektroforéza (DGGE)

Po úspěšné optimalizaci PCR nastává fáze, kdy je nutno analyzovat sekvence jednotlivých PCR produktů a určit tak rozdílnost jednotlivých kvasinkových kmenů. K tomuto účelu je možné použít metodu denaturační gradientové gelové elektroforézy, která umožňuje separaci molekul DNA, jež se od sebe liší i jedinou bází. Jedná se tedy o tzv. metodu otisku prstu, protože slouží k přesnému určení mikroorganismů, zejména ve spojení s PCR bakteriálních i kvasinkových ribosomálních genů [27; 22].

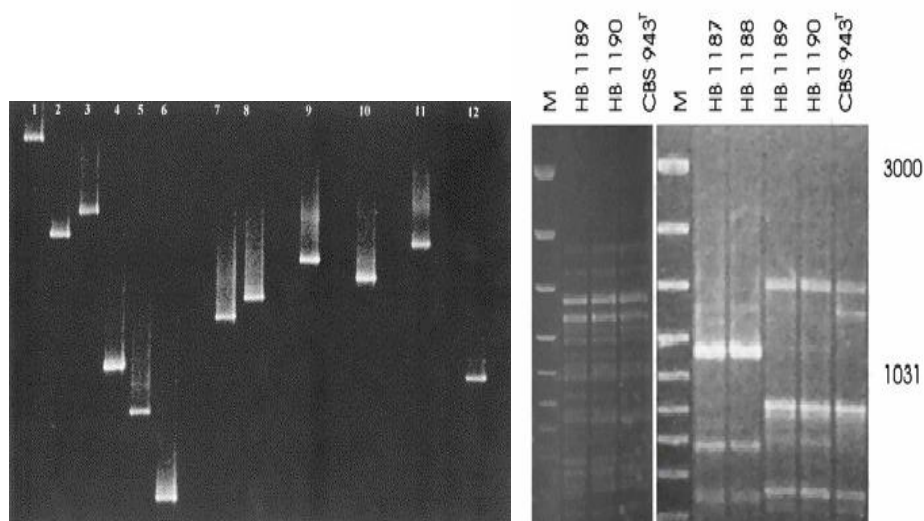
2.3.3.1 Princip denaturační gradientové gelové elektroforézy

Princip této metody spočívá v rozdílné elektroforetické mobilitě denaturované, tedy jednořetězcové DNA (ssDNA) a nedenaturované dvouřetězcové DNA (dsDNA) v polyakrylamidovém gelu se vzrůstajícím denaturačním gradientem. Denaturační gradient je zprostředkovaný vzrůstající teplotou nebo vzrůstající koncentrací denaturačních činidel. Jako denaturační činidla se používají formamid a močovina. Při pohybu molekul dsDNA v polyakrylamidovém gelu dochází k jejich denaturaci na základě tzv. teploty tání. Ta je dána zastoupením jednotlivých bází v molekule DNA. Molekuly DNA s vyšším zastoupením guaninových a cytosinových bází denaturují při vyšších teplotách nebo koncentraci denaturantů později než ty s nižším zastoupením těchto bází. Je tomu tak z toho důvodu, že guaninové a cytosinové báze jsou spojeny třemi vodíkovými můstky [22] [27] [31] [32].



Obr. 12: Princip denaturační gradientové gelové elektroforézy [32]

Existují dva základní typy DGGE, které se liší způsobem denaturace DNA produktů, např. TGGE (teplotní gradientová gelová elektroforéza). Nejpoužívanějším druhem pro stanovení polymorfismů kvasinkových kmenů je paralelní DGGE. Jednotlivé PCR produkty o stejné velikosti, ale rozdílné sekvenci jsou analyzovány ve vhodném denaturačním rozmezí. Polymorfismy jsou pak rozlišeny na základě množství jednotlivých fragmentů pro příslušný kmen na gelu nebo umístěním fragmentů v denaturačním gradientu. Pro lepší rozlišení jednotlivých fragmentů lze použít primerů prodloužených o GC-svorky [22] [27] [31] [32].



Obr. 13: Vlevo DGGE profil PCR produktů rDNA kvasinkových kmenů mléčného kvašení 1, *Candida pararugosa*; 2, *C. parapsilosis*; 3, *C. zeylanoides*; 4, *C. pseudointermedia*; 5, *C. catenulata*; 6, *C. rugosa*; 7, *Kluyveromyces marxianus*; lane 8, *K. lactis*; lane 9, *Trichosporon mucoides*; lane 10, *Pichia guilliermondii*; 11, *Cryptococcus curvatus*; 12, *Saccharomyces cerevisiae*, vpravo identifikace kmene *Cryptococcus luteus* pomocí PCR-DGGE [33] [34]

Jako každá metoda má i DGGE své limitace. Úspěšnost této metody totiž závisí na mnoha faktorech, jakými jsou přítomnost nespecifických PCR produktů, existence několika variant sledovaného genu v genomu a volba správného denaturačního rozmezí. Významnou roli hraje také správná velikost analyzovaných PCR produktů; metoda DGGE totiž dokáže rozlišit molekuly DNA do velikosti 500 bp [27] [31].

Kromě identifikačních a taxonomických aplikací má DGGE široké využití i v průmyslu, a to zejména pro určení druhu mikrobiální populace v potravinářských produktech, jakými jsou víno, pivo a mléčné výrobky [35] [36], při ekologickém zpracovávání odpadů, jakým je celulóza, která může být odbourána pomocí mikroorganismů produkujících β -glukosidázu, a likvidace odpadního perchloru pomocí enzymu perchlordismutázy, kterou produkují některé bakterie [37] [38].

2.3.4 Sekvenování

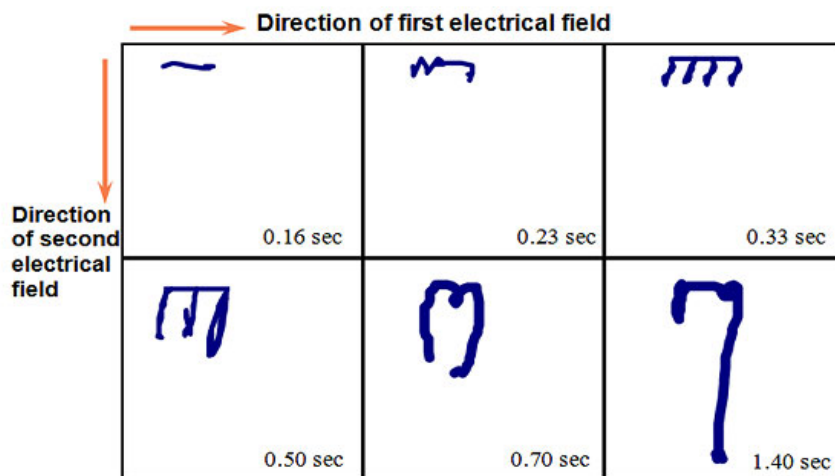
Sekvenování je metoda umožňující stanovení primární struktury DNA, tedy pořadí nukleotidů. Jestliže je totiž známa primární struktura molekul DNA, je možné lépe porozumět podstatě biologických procesů na základě rozpoznání funkce jednotlivých genů, jejich regulačních oblastí a stanovení jejich mutací. Tato metoda je také klíčovou pro stanovení odlišnosti mezi jednotlivými organismy. Existují dvě možné metody sekvenování. První metodou je chemická metoda Maxam-Gilbertova, založená na specifické degradaci nukleových kyselin pomocí chemických sloučenin. Druhou metodou je enzymatická metoda, neboli metoda Sangerova. Sangerova metoda využívá aktivity DNA polymerázy. Tato metoda je v dnešní době plně automatizována a masově využívána specializovanými pracovišti [22; 28] [33].

2.3.5 Pulzní gelová elektroforéza

Konvenční gelové elektroforézy molekul DNA jsou založeny na pohybu těchto záporně nabitých molekul v gelové matici umístěné ve stejnosměrném elektrickém poli. Pohybem záporně nabitých molekul DNA v tuhé matici ve směru od katody k anodě dochází k jejich separaci podle velikosti. Tento jev je způsoben zesítním matrice, většinou agarosového nebo polyakrylamidového gelu. Malé molekuly DNA se pohybují maticí rychleji, zatímco větší molekuly se pohybují pomaleji. Rychlost pohybu molekul DNA v gelu závisí na mnoha dalších parametrech, jakými jsou napětí ve stejnosměrném elektrickém poli, teplota, vodivostní vlastnosti pufru a druh a zesítnění tuhé matrice. Konvenční gelovou elektroforézou lze dělit tzv. molekuly DNA střední velikosti, tedy molekuly DNA do 50 Kbp [39] [40].

2.3.5.1 Princip pulzní gelové elektroforézy (PFGE)

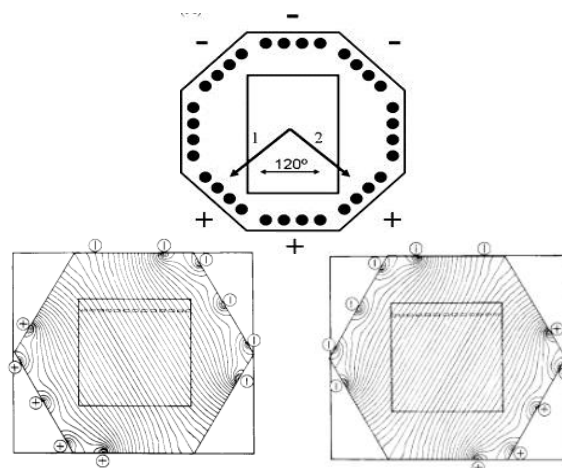
V případě sledování karyotypu kvasinek konvenční elektroforetické metody nestačí, protože velikost kvasinkových chromozomů překračuje 50 Kbp. K tomuto účelu se používá metoda pulzní gelové elektroforézy (PFGE). Tato metoda byla mimo jiné jako první použita k rozlišení chromozomů pučících kvasinek. Využívá způsobu pohybu molekul DNA v tuhé matici, kterou v tomto případě bývá agarosový gel. Molekuly DNA se v tuhé matici za působení elektrického pole pohybují způsobem tzv. reptace, což lze přiblížit způsobu pohybu hada; hlava molekuly nejprve vybere směr a zbytek ji následuje. Odstraníme-li působení elektrického pole, natažené molekuly DNA se vracejí zpět do relaxovaného stavu. Rychlost této relaxace je závislá na velikosti molekuly a zesítnění matrice. Čím větší je zesítnění matrice a velikost molekuly DNA, tím déle jí trvá, než se dostane do relaxovaného stavu. Metoda PFGE je založena na střídání směru působení elektrického pole. Při změně směru působení elektrického pole nastává fáze, kdy se musí molekuly DNA přeorientovat z jednoho do druhého směru působení elektrického pole. Reorientace je závislá na rychlosti relaxace molekuly v tuhé matici, a tedy na její velikosti. Doba, po kterou se molekula přeorientovává do jiného směru působení elektrického pole, se nazývá reorientační čas (Schematicky na Obr. 14) [39; 31].



Obr. 14: princip pohybu molekuly DNA v agarósovém gelu reptace

2.3.5.2 PFGE v homogenním elektrickém poli s HEX elektrodou (CHEF)

Existuje mnoho typů PFGE využívající jak nehomogenní, tak homogenní elektrické pole. Na separaci kvasinkových chromozomů je nejvhodnější separace v homogenním elektrickém poli, jaké poskytuje typ PFGE označované jako „Clamped homogenous electric field electrophoresis“ (CHEF). Výhodou CHEF je, že rozděljuje molekuly DNA v přímém směru podle jejich velikosti. Homogenní elektrické pole je vždy v určitém úhlu zprostředkováno hexagonální elektrodou, která obsahuje dvacet čtyři elektrod, mezi něž se rozděljuje vložené napětí [39; 31] [41]



Obr. 15: Funkce hexagonální elektrody pro CHEF-PFGE s reorientačním úh-

2.3.5.3 Parametry CHEF-PFGE

Pro dobré rozlišení chromozomální DNA je vždy potřeba experimentálně určit optimální parametry, jakými jsou reorientační úhel, pulzní čas, koncentrace pufru, vložené napětí a koncentrace agarosového gelu [39; 31].

Reorientační úhel

Úhel působení elektrického pole ovlivňuje tzv. reorientační úhel molekul DNA. Je to úhel, o který se musí molekula DNA přeorientovat z jednoho směru působení elektrického pole do druhého. Závisí na uspořádání jednotlivých elektrod v hexagonální elektrodě. Rozmezí reorientačního úhlu se pohybuje obvykle v rozmezí 90 - 120 ° podle požadovaného rozdělení různě velkých molekul DNA. Obecně platí, že čím je tento úhel větší, tím je rozlišení jednotlivých zón ostřejší [39].

Koncentrace pufru

Koncentrace pufru je dalším důležitým parametrem PFGE. Při vyšších koncentracích vzrůstá jeho vodivost, zvyšuje se elektrický proud a teplota systému, a tudíž rychlost migrace molekul DNA. Obvykle je používán TBE pufr složený z trishydroxyaminomethanu (TRIS), kyseliny borité a kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA). TBE pufr zprostředkovává vodivost systému, udržuje stálé pH a zároveň zabraňuje degradaci DNA působením deoxyribonukleáz díky přítomnosti chelatačního činidla, kterým je EDTA. Ideální teploty systému, umožňující použití vysokých napětí a dobrou reprodukovatelnost výsledků, jsou do 14 °C [23] [39] [42].

Pulzní čas

Pulzní čas ovlivňuje separaci molekul DNA na základě jejich velikosti. Malé molekuly totiž ke své reorientaci z jednoho směru působení elektrického pole do druhého nepotřebují tak dlouhý reorientační čas jako ty velké, a tudíž se agarosovým gelem pohybují rychleji. Při krátkých pulzních časech tak dochází k tomu, že malé molekuly DNA se pohybují v přímém směru maticí, zatímco velké molekuly takřka stojí na místě, protože se neustále reorientují. Pro rozdělení velkých molekul DNA je tedy zapotřebí dlouhých pulzních časů [43; 39] [42].

Vložené napětí

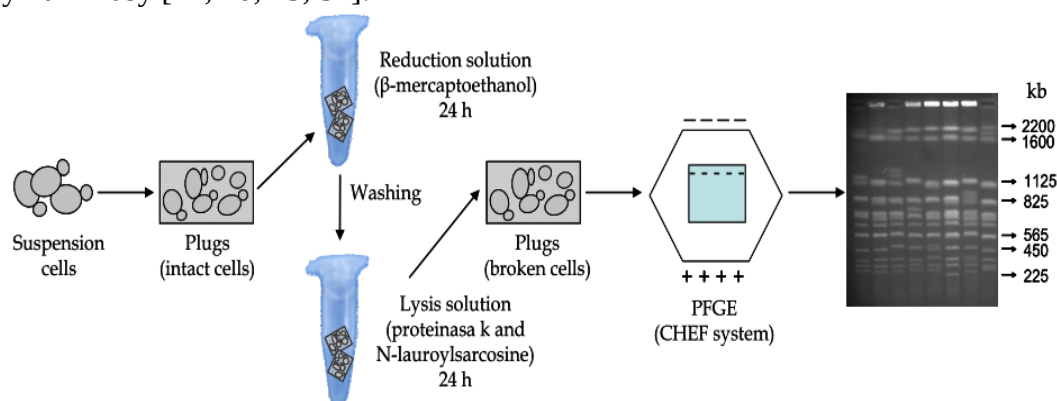
Vložené napětí ovlivňuje rozlišitelnost jednotlivých zón; volí se vhodné napětí v kombinaci s vhodným pulzním časem. Při vysokých napětích se zvyšuje elektroforetická mobilita molekul, která může u velkých molekul způsobovat rozmyté zóny. Pro velké molekuly jsou voleny kombinace nízkého napětí a dlouhých pulzních časů, zatímco pro ideální rozdělení malých chromozomů jsou ideální kombinace vyšších napětí a kratších pulzních časů [39] [42].

Koncentrace agarosového gelu

Koncentrace agarosového gelu ovlivňuje rychlost pohybu molekul v elektrickém poli. Při vyšších koncentracích je zesítení gelu hustější a více tak brzdí nabité molekuly. Koncentrace agarosového gelu je volena experimentálně na základě velikosti molekul a optimální rozlišitelnosti jednotlivých zón; při nízkých koncentracích totiž může docházet ke špatné čitelnosti výsledků [39] [42].

2.3.5.4 Příprava vzorků pro PFGE

Protože molekuly DNA větší než 50 kbp je téměř nemožné vyizolovat bez fragmentace způsobené pipetováním standardními postupy, je ideální nejprve imobilizovat kvasinkové buňky v agarosovém gelu ještě před odstraněním jejich buněčné stěny a proteinů. Buněčná stěna je v agarosovém gelu rozrušována enzymaticky, a to buď enzymem zymoliazou, nebo lytikázou, které hydrolyzují β -1,3 glukonové vazby a jsou komerčně dostupné. Poté jsou buňky inkubovány v EDTA a β -merkaptoethanolu, kvůli odstranění hořečnatých a manganatých iontů, inhibici nukleázové aktivity a rozpuštění jinak nerozpustných buněčných proteinů. Konečným krokem je pak odstranění celulárních proteinů, membrán a RNA pomocí proteinázy K, N-laurylsarkosinu a případně enzymu RNasy [41; 40; 23; 31].



Obr. 16: Schéma přípravy vzorků pro PFGE (28)

2.3.5.5 Využití PFGE

Využití metody PFGE má velké uplatnění v potravinářských aplikacích, jakými jsou příprava geneticky modifikovaných potravin, ke stanovení fytopatogenních mikroorganismů, charakterizaci a stanovení vlastností průmyslově využívaných mikroorganismů, jakými jsou vinné, pивní a pekařské kvasinky [44; 31] [45] [46]. PFGE je účinným nástrojem sloužícím k přesné identifikaci mikroorganismů mléčného kvašení pro průmyslovou výrobu mléčných výrobků. Průmyslové kmeny totiž často podléhají mutacím a ztrácejí tak požadované vlastnosti. Identifikace patogenních kmenů hraje velmi důležitou úlohu v hygieně potravin, zejména co se týče bakteriálních rodů, které běžně kontaminují potraviny, a jejich odolnosti vůči antibiotikům. Takovými kmeny jsou *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* a *Salmonella* [47] [48; 49].

3 CÍLE PRÁCE

Cílem předložené diplomové práce zaměřené na molekulární charakterizaci karotenogenních kvasinek je řešení následujících dílčích úloh:

1. Rešerše - možnosti využití molekulárně biologických metod k charakterizaci kvasinek.
2. Optimalizace vybraných metod analýzy kvasinkové DNA.
3. Experimentální studie - využití optimalizovaných metod k bližší charakterizaci vybraných druhů karotenogenních kvasinek.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité vybavení, pomůcky a chemikálie

4.1.1 Použité vybavení a pomůcky

4.1.1.1 Přístroje a pomůcky pro kultivaci kvasinek

Analytické váhy Boeco (SRN)	Lucia Image active 5.0, Laboratory
Centrifuga Sigma Laborzentrifugen (SRN)	Imaging spol. s r.o. (ČR)
GKB Color Digital CCD kamera (Taiwan)	Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)
Laminární box Aura Mini, Bio Air Instruments, (USA)	Spektrofotometr VIS, Helios δ, Unicam (UK)
	Třepačka IKA Yellow Line, (SRN)

4.1.1.2 Pomůcky pro izolaci a analýzu karotenoidů

Filtry pro HPLC, PRE-CUT, Alltech (GB)	Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR
Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)	Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR
Vodní lázeň EL-20, Merci a.s. (ČR)	Vyhodnocovací systém Xcalibur
Soustava na HPLC/PDA	Chromatografická kolona:
Soustava HPLC/MS (Thermo Fischer Scientific, USA)	Kolona Kinetex C18, 2,6 μm, 4,6 x 150 mm, Phenomenex
Termostat - LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)	

4.1.1.3 Pomůcky pro izolaci DNA kvasinek

Centrifuga, model Mikro 200, Hettich Zentrifugen (SRN)
Vortex, typ Heidolph, Vitrum (ČR)
Vortex Genie 2, Mo Bio Lab. (USA)
Vodní lázeň, model TW2, Julabo Labortechnik (SRN)

4.1.1.4 Chemikálie použité k izolaci DNA

Fenol, Lach-Ner s r.o. (ČR)	Lytikáza, Sigma-Aldrich (SRN)
Chloroform, Lach-Ner s r.o. (ČR)	Agaróza (low melting), Serva (SRN)
Chelaton 3 (EDTA) p. a, Lachema (ČR)	N-laurylsarcosine, Sigma-Aldrich (SRN)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), Penta (ČR)	Proteináza K, Sigma-Aldrich (SRN)
Beta-merkapt ethanol, Serva (SRN)	Ultra Clean Microbial DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Inc).
Izopropylalkohol, Lach-Ner s r.o. (ČR)	

4.1.1.5 Pomůcky pro PCR/DGGE

Kompaktní mikrocentrifuga HERMLE Z-100M, Labortechnik (SRN)
Termocykler Palm Cycler™, Corbett Research (Austrálie)
Vortex Experion™ Vortex Station, Bio-Rad (USA)
Detection System, Bio-Rad (USA)
Mikrovlnná trouba, model M1610N, Samsung (ČR)
DGGE aparatura DCode™ Universal Mutation Detection System, Bio-Rad (USA)²⁸

Horizontální elektroforetická vana Owl, model B2, Owl Separation Systems (USA)
NanoPhotometer™ UV/VIS, Implen (SRN)
DGGE aparatura DCode™ Universal Mutation Software Scion Image, Biotech (ČR)
Transluminátor Ultra Viewer, Ultra Lum (USA)
Zdroj napětí pro elektroforézu MP-300N, Major Science (USA)
Zdroj napětí pro elektroforézu SH-300, Shelton Scientific (USA)

4.1.2 Použité chemikálie

4.1.2.1 Kultivace karotenogenních kvasinek

D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner s r.o. (ČR)
Chlorid sodný p.a., Lachema (ČR)
Kvasničný autolyzát, Himedia (India)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema (ČR)
Síran amonný p.a., Lachema (ČR)

Síran hořečnatý p.a., Chemapol (ČR)
Agar bakteriologický, Scharlau Chemie S. A. (Spain)
Methylester kyseliny methansulfonové (MMS), Sigma-Aldrich (SRN)
Ethylester kyseliny methansulfonové (EMS), Sigma-Aldrich (SRN)

4.1.2.2 Chemikálie použité pro HPLC

Methanol pro HPLC Gradient Grade, Sigma – Aldrich (SRN)
Beta-karoten, Sigma – Aldrich (SRN)

Ergosterol, Sigma – Aldrich (SRN)
Koenzym Q, Sigma – Aldrich (SRN)

4.1.2.3 Komponenty použité PCR/DGGE

Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit, MO Bio Laboratories (USA)
PCR voda – voda pro injekce ČSL 4, Biotika (SR)

Syntetické priméry (NL1, NL4, LS2, ITS1, ITS4, ITS2, ITS3), Elisabeth Pharmacon (ČR)
KAPA2G™ Robust PCR Kit, Kapa Biosystems (USA)
Agaróza Premium, Serva (SRN)

Akrylamid 99%, Sigma (SRN)	Chelaton III dihydrát (EDTA) p.a., Lach-Ner (ČR)
Bromfenolová modrá – sodná sůl, Serva (SRN)	Kyselina octová 99,8% p.a., Lach-Ner (ČR)
DNA ladder RTU (Ready-to-Use) 100 bp, Nippon Genetics (SRN)	Močovina p.a., Penta (ČR)
Ethanol p.a., Lachema (ČR)	N,N'-methylenbisakrylamid, Serva (SRN)
Ethidium bromid, Serva (SRN)	N,N'-tetramethylethyldiamin (TEMED), Serva (SRN)
Formamid p.a., Penta (ČR)	Persíran amonný (APS), Serva (SRN)
Glycerol p.a., Lachema (ČR)	
Hydroxid sodný p.a., Lach-Ner (ČR)	

4.1.2.4 Komponenty pro elektromigrační metody

Chemikálie pro elektromigrační metody
Agaróza (Premium), Serva (SRN)
Ethidiumbromid, Serva (SRN)

4.1.2.5 Jiný materiál

Vaječné těstoviny, Ideal Slovakia,
Bratislava (SR)

4.1.2.6 Použité kvasinkové kmeny

Phaffia rhodozyma CCY 77-1-1
Rhodotorula glutinis CYY 20-2-33
Rhodotorula aurantiaca CYY 20-9-7
Rhodotorula mucilaginosa CYY 20-7-28
Sporobolomyces shibatanus CYY 19-20-3
Sporobolomyces roseus CYY 19-6-4
Sporobolomyces salmonicolor CYY 19-4-6
Cystofilobasidium capitatum CYY 10-1-1
Cystofilobasidium capitatum CYY 10-1-2

4.2 Metody

4.2.1 Kultivační metody

Karotenogenní kvasinky patří mezi mezofilní aerobní mikroorganismy, které mají ve většině případů podobné nároky. Kmeny kvasinek *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Sporobolomyces roseus*, *Sporobolomyces shibatanus* a *Phaffia rhododyma* byly kultivované v tekutém médiu při teplotě 28 °C a to za stálého osvětlení a třepání. Média byla sterilizována v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 30 minut. Kultivace těchto standardních kmenů probíhaly na glukosovém médiu. Kultivace mutantních kmenů probíhaly na odpadních substrátech, jakými byly těstoviny a glycerol.

4.2.1.1 Kultivace standardních kvasinkových kmenů

Pro každý kvasinkový kmen bylo připraveno glukosové inokulum I, inokulum II a produkční médium. Kultivace na inokulech probíhaly po dobu 24 hodin za stálého třepání a osvětlení. Kultivace na produkčním médiu probíhala 50, 75 a 80 hodin podle požadavků na molekulární metody nebo metody kultivační, kde byly tyto kmeny použity jako standardy pro srovnání případných nadprodukčních vlastností mutantních kmenů. Pro metodu PFGE byly kmeny kultivovány na produkčním médiu po dobu 50, 75 a 80 hodin za stálého třepání a osvětlení. Složení jednotlivých médií je uvedeno v Tab. 1.

Tab. 1: Složení jednotlivých médií

Složka	Množství jednotlivých komponent (g)	
	Inokulum I, II	Produkční médium
glukóza	40,0	30,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0	4,0
KH ₂ PO ₄	5,0	4,0
MgSO ₄	0,3	0,3
Kvasničný autolýzát	7,0	
Vodovodní voda	1000 (ml)	

4.2.1.2 Kultivace a ožiování mutantních kmenů

Mutantní kmeny karotenogenních kvasinek jsou připravovány zejména kvůli zvýšení produkce β -karotenu jako průmyslově významného karotenoidu. Při dlouhodobém uchovávání selektovaných mutantních kmenů, které jsou schopny nadprodukce karotenoidů a zejména β -karotenu, je potřeba sledovat zachování těchto nadprodukčních vlastností.

Ožiování mutantních kmenů

Aby bylo možné stanovit stabilitu nadprodukčních vlastností mutantních kmenů karotenogenních kvasinek, které byly připraveny v dřívějších experimentech [50], bylo potřeba tyto kmeny oživit. Tyto mutantní kmeny byly připraveny náhodnou mutagenezí za působení chemického mutagenu, jakým byl ethylester kyseliny metansulfonové (EMS). Za působení tohoto mutagenu byly kmeny adaptovány na odpadní produkty - těstoviny a glycerol.

Zásobní misky obsahující tuhé glycerolové a těstovinové médium s jednotlivými mutantními kmeny byly nejprve přeočkovány na tuhé médium obsahující jako zdroj uhlíku v poměru 50:50 glukósu a odpadní substrát a poté do tekutého média s obsahem glukósy i odpadního substrátu v poměru 50:50. Následně byly kmeny dvakrát přeočkovány na tuhý substrát s odpadním substrátem jako jediným zdrojem uhlíku. Mutantní kmeny tak byly tímto způsobem připraveny na následující kultivace.

Kultivace mutantních kmenů

K tomu, aby mutantní kmeny byly plně adaptovány, co se týče množství biomasy na kultivaci v odpadních substrátech, byly přeočkovány přes dvoukrokovou inokulaci. Inokulum I i II obsahovalo glukosu a odpadní substrát v poměru 50:50. Kultivace kultur v každém inokulu trvala 24 hodin. Produkční médium obsahovalo jako jediný zdroj uhlíku odpadní substrát a mutantní kmeny v něm byly kultivovány po dobu 80 hodin. Kultivace kmenů v prvním inokulu probíhala v objemu 50 ml, inokulum II i produkční médium měly objem 150 ml. Kultury byly vždy přeočkovávány z předchozích kultivačních kroků v poměru 1:5.

Protože byly mutantní kmeny v předchozích experimentech [50] adaptovány na jeden konkrétní druh odpadního substrátu, byly tyto kmeny kultivovány podle jejich adaptace. V první sérii byly kultivovány mutantní kmeny adaptované na glycerol a v druhé sérii mutantní kmeny adaptované na těstoviny jako odpadní substrát. Jako reference byly souběžně kultivovány mutantní kmeny i na glukosových médiích a standardní kmeny karotenogenních kvasinek jak na glukosových médiích (viz *Tab. 1* v kapitole 4.2.1.1), tak na médiích s odpadními substráty. Složení jednotlivých médií je uvedeno v *Tab. 2*.

Tab. 2: Složení médií v jednotlivých sériích

Série	Množství jednotlivých komponent (g)			
	1.		2.	
Složka	Inokulum I, II	Produkční médium	Inokulum I, II	Produkční médium
Glycerol	20,0	30,0		
Glukóza	20,0		20,0	
Vaječné těstoviny			20,0	30,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0	4,0	5,0	4,0
KH ₂ PO ₄	5,0	4,0	5,0	4,0
MgSO ₄	0,3	0,3	0,3	0,3
Kvasničný autolýzát	7,0		7,0	
Vodovodní voda	1000 (ml)			

4.2.1.3 Stanovení množství biomasy

Množství biomasy bylo stanoveno na základě kalibračních křivek, které vyjadřují závislost mezi množstvím sušiny a zákalu různě koncentrovaných suspenzí kvasinek. Jednotlivé kalibrační křivky byly sestaveny pro všechny použité kmeny kvasinek,

$$\text{Rhodotorula glutinis} : A = 0,1974Dc - 0,0234 \quad (1)$$

$$\text{Rhodotorula aurantiaca} : A = 0,1540Dc + 0,0098 \quad (2)$$

$$\text{Sporobolomyces roseus} : A = 0,2421Dc - 0,0488 \quad (3)$$

$$\text{Cystofilobasidium capitatum} : A = 0,1669Dc - 0,1884 \quad (4)$$

kde Dc je množství sušiny $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a A vyjadřuje naměřenou absorbanci.

1 cm^{-3} vzorku byl naředěn destilovanou vodou tak, aby nepřekročil rozsah spektrofotometru. Absorbance byla měřena při vlnové délce 630 nm. V případě kultivací kvasinek na těstovinách byly kultury filtrovány přes vícekrát složenou gázu, aby byly odstraněny zbytky těstovin. Jako blank bylo použito čisté těstovinové médium, naředěné s vodou ve stejném poměru jako jednotlivé vzorky.

4.2.1.4 Mikroskopické pozorování buněk

Pro posouzení morfologie buněk a pro případné vyloučení nežádoucí kontaminace kvasinek byly kultury pozorovány pod optickým mikroskopem. Kapka této suspenze byla přenesena na podložní sklíčko, překryta krycím sklíčkem a kvasinky byly následně pozorovány při zvětšení 640x. Výsledky byly zachyceny digitální kamerou a zpracovány pomocí počítačového softwaru Lucia Image.

4.2.1.5 Zpracování biomasy

Celý objem produkčního média byl zcentrifugovaný při 5000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Následně byly buňky promyty destilovanou vodou a opětovně stáčeny stejným způsobem. Na závěr byla biomasa rozsuspendována ve 30 cm^{-3} fyziologického roztoku a uložena při -18°C .

4.2.1.6 Izolace karotenoidů a ergosterolu

Součástí lipidické frakce kvasinkovitých buněk jsou jak karotenoidy, tak i ergosterol. Z tohoto důvodu je možné izolovat je mechanickou disrupcí a extrakcí acetonem, zmýdlením a posléze několikanásobnou extrakcí diethyletherem. Zmražené buňky byly potmě rozmrazeny a zcentrifugovány při 5000 rpm po dobu 10 minut. Po promytí destilovanou vodou byly kvasinky opět stejným způsobem odstředěné a izolovaný sediment kvasinkových buněk byl dezintegrován ve třecí misce v 50 cm^{-3} acetonu. Po kvantitativním převodu suspenze na odpařovací misku bylo přidáno 50 cm^{-3} 10% alkoholického roztoku KOH. Takto připravená suspenze byla zmýdlena ve vodní lázni při 90°C po dobu 30 minut.

4.2.1.7 Extrakce

Zmýdlená suspenze byla třikrát extrahovaná v diethyletheru. Spojené éterové frakce byly odpařené na vakuové odparce.

4.2.1.8 Úprava vzorků pro HPLC

Odparky vzorků získané po extrakci byly rozpuštěny ve 2 cm^{-3} etanolu pro HPLC, přefiltrovány přes jednorázový filtr ($0,45 \mu\text{m}$) a převedeny do mikrocentrifugační zkumavky. Následně byly vzorky odstředěny na mikrocentrifuze po dobu 15 minut při 15000 otáčkách.

4.2.1.9 Analýza karotenoidů pomocí HPLC

K chromatografické analýze karotenoidů, ergosterolu a koenzymu Q byla použita soustava RP-HPLC/PDA od firmy Thermo Fisher Scientific, USA. Analyzovaná data byla zpracována chromatografickým softwarem X-Calibur. Přefiltrované vzorky byly naneseny na chromatografickou kolonu Kinetex C18 s předkolonou. Jako mobilní fáze byl použit methanol pro HPLC s průtokem $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Samotná separace probíhala při 45°C s detekcí pomocí detektoru fotodiodového pole (PDA, „photo-diode array detector“). PDA detektor dokáže snímat celé spektrum vlnových délek najednou, proto bylo možné analyzovat čtyři metabolity za jediné měření při vlnových délkách 450 nm pro karotenoidy a 285 nm pro ergosterol a koenzym Q. β -karoten, ergosterol i koenzym Q byly kvantifikovány pomocí externí kalibrace příslušných standardů. Celkové karotenoidy, identifikované z maximálních spekter ostatních známých karotenoidů, byly vyhodnoceny pomocí kalibrační křivky β -karotenu

4.2.1.10 Identifikace a kvantifikace karotenoidů

Na základě chromatografické analýzy standardů karotenoidů a ergosterolu při již zmíněných vlnových délkách (viz předchozí) byla provedena identifikace a kvantifikace obsahu jednotlivých vzorků. Stanovení množství vybraných karotenoidů a ergosterolu bylo provedeno na základě kalibračních křivek:

$$\beta\text{-karoten} : S = 17\,480 \cdot c \quad (5)$$

$$\text{Ergosterol} : S = 76\,993 \cdot c \quad (6)$$

$$\text{Koenzym Q} : S = 33\,313 \cdot c \quad (7)$$

Ke kvantitativnímu vyhodnocení byla použita závislost plochy píku S jednotlivých standardů na koncentraci c .

4.2.2 Molekulární metody

4.2.2.1 Izolace kvasinkové DNA pomocí UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit

Pro izolaci kvasinkové DNA bylo odebráno $1,8 \text{ cm}^{-3}$ kvasinkové kultury z 80. hodiny kultivace (viz kapitola 4.2.1) rozsuspendované ve fyziologickém roztoku. Kultura byla následně centrifugována při 11 300 rpm po dobu 30 sekund. Po odstranění supernatantu byly usazené buňky rozsuspendovány ve 300 μl „MicroBeat“ roztoku a přeneseny do rozbíjecích mikrozkušavek obsahujících drobný písek pro mechanickou dezintegraci buněk, kam bylo přidáno 50 μl roztoku MD1. Tento roztok obsahuje kromě SDS činidla umožňující lýzu buněk. Následujících 10 minut byl obsah „rozbíjecí zkušavky“ inkubován při teplotě 65°C a poté vortexován na horizontálním vortexu po dobu 10 minut při maximálních otáčkách (adaptér k vortexu MO Bio Vortex Adapter®).

Takto lyzované buňky byly následně centrifugovány při 11 300 rpm po dobu 30 sekund. Supernatant obsahující DNA byl přesunut do čisté mikrozkušavky (typu Eppendorf), kam bylo přidáno 100 μl roztoku MD2. Směs byla vortexována po dobu 5 sekund, poté inkubována při 4°C kvůli vysrážení organických a anorganických solí a následně centrifugována. Supernatant byl opět přesunut do čisté mikrozkušavky (typu Eppendorf), smíchán s 900 μl roztoku MD3 a vortexován po dobu 5 sekund. Roztok MD3 obsahuje vysokou koncentraci solí umožňujících navázání DNA na silikovou membránu filtrační mikrozkušavky. Supernatant byl přesunut do filtrační mikrozkušavky a centrifugován. DNA navázaná na silikové membráně filtrační zkušavky byla následně promytá 300 μl roztoku MD4, obsahující ethanol. Promytý a vysušený filtr byl přesunut do čisté zkušavky a promyt 50 μl roztoku MD5 obsahující eluční pufr. Po následné centrifugaci byla eluována všechna DNA izolovaná na silikovém filtru. U izolované DNA byla spektrofotometricky stanovena koncentrace a čistota pomocí přístroje NanoPhotometer. DNA byla následně skladována při teplotě -20°C pro další použití.

4.2.2.2 Nested PCR genomové DNA oblastí D1/D2, ITS1 a 5,8-ITS2 oblastí

Pro nested PCR rDNA oblastí genomové DNA byla jako templát použita kvasinková DNA izolovaná v předchozím kroku pomocí komerčního kitu UltraClean[®] Microbial DNA Isolation Kit. Nested PCR se skládala ze dvou reakčních kroků jak pro oblasti D1/D2, tak pro oblasti ITS rDNA (viz Tab. 1). Pro PCR reakci byly použity universální eukaryotické primery dodávané firmou Elisabeth Pharmacon, s.r.o.. Pro následnou analýzu sekvencí těchto ribosomálních oblastí byly použity primery s GC-svorkami pro lepší rozlišení jednotlivých fragmentů v akrylamidovém gelu. Sekvence jednotlivých primerů udává Tab. 3.

Tab. 3: Primery použité pro jednotlivé amplifikační kroky nested PCR a jejich sekvence

D1/D2 26S rDNA oblast		
Amplifikační krok	Primer	Sekvence
1. krok reakce	NL1	5'-GCCATATCAATAAG-3'
	NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'
2. krok reakce D1/D2 26S rDNA	NL1- GC	5'- CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCCATA TCAATAAG-3'
	LS2	5'-ATTCCCAAACAACCTCGACTC-3
ITS1, ITS 2+5,8 rDNA		
Amplifikační krok	Primer	Sekvence
1. krok reakce	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
2. krok reakce ITS1 rDNA	ITS1-GC	5'CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGG TCCG- TAGGTGAACCTGCGG-3'
	ITS2	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'
2. krok reakce ITS2+5,8 rDNA	ITS3	5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC -3'
	ITS4-GC	5'CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGG TCCT- CCGCTTATTGATATGC-3'

Jednotlivé komponenty PCR směsi byly před použitím krátce zvortexovány a následně krátce zcentrifugovány. Směs PCR komponent, která zatím neobsahuje templátovou DNA, se nazývá Master mix. Master mix byl vždy připravován za sterilních podmínek, ve sterilním boxu a se sterilním vybavením, aby se zabránilo možným kontaminacím. K tzv. Mastermixu, který byl rozpipetovaný do jednotlivých mikrozku-

vek (typu Eppendorf), byla na závěr přidána templátová DNA. Při PCR reakci je třeba brát v potaz i skutečnost, že i jediná molekula DNA stačí k proběhnutí celé reakce a může tak způsobit vznik kontaminujících produktů. PCR rRNA kódujících oblastí probíhala ve dvou amplifikačních krocích, kde byly důležitější produkty druhého amplifikačního kroku. Proto první amplifikační krok probíhal v objemu 25 μ l a druhý amplifikační krok v objemu 50 μ l. Koncentrace jednotlivých komponent v PCR reakční směsi a objemy reakčních směsí jsou uvedeny v *Tab. 4*.

Tab. 4: Koncentrace komponent v PCR směsi

Komponenta	Koncentrace komponent v reakční směsi	Objemy komponent v objemu reakční směsi	
		25 μl	50 μl
Sterilní PCR H₂O	---	19,90 μ l	39,80 μ l
10$\times$ reakční pufr (konc.MgCl₂ 15mM)	1x	2,50 μ l	5,00 μ l
MgCl₂ (25mM)	2,0 mM	0,50 μ l	1,00 μ l
dNTP mix (10 mM každý)	0,2 mM	0,50 μ l	1,00 μ l
Přímý primer (100 μM)	0,5	0,13 μ l	0,26 μ l
Reverzní primer (100 μM)	0,5	0,13 μ l	0,26 μ l
Taq DNA polymeráza (5 U/μl)	0,5 U	0,10 μ l	0,20 μ l
Templátová DNA	Podle potřeby	1,00 μ l	2,00 μ l

Po úspěšné přípravě jednotlivých vzorků následovalo jejich převedení do termocykleru, kde za podmínek uvedených v *Tab.5* probíhaly jednotlivé reakční cykly. Pro ITS oblasti DNA kódující rRNA byly teploty annealingu (připojení primerů) optimalizovány v rozmezí teplot 56-61 °C. Optimalizovaná teplota annealingu byla stanovena na 60 °C. Pro standardní kvasinkové kmeny byly amplifikovány jak oblasti D1/D2, tak i ITS oblasti rDNA. U mutantních kvasinkových kmenů byly amplifikovány pouze oblasti D1/D2 26S rDNA.

Tab. 5: Podmínky jednotlivých cyklů PCR reakce

Teploty jednotlivých cyklů (°C)						Doba trvání cyklů (s)
	1. amplifikační krok		2. amplifikační krok			
Počet cyklů	36		30			
Primery	NL1/NL4	ITS1/ITS4	NL1-GC/LS2	ITS1-GC/ITS2	ITS3/ITS4-GC	
1. Denaturace	94	94	95	95	95	
2. Denaturace	94	94	95	95	95	
Annealing	52	60	55	60	60	
1. Elongace	72	72	72	72	72	
2. Elongace	72	72	72	72	72	

Elektroforetická detekce PCR produktů

Po skončení PCR reakce byly PCR produkty vizualizovány pomocí horizontální agarosové gelové elektroforézy. 1,8% agarosový gel byl připraven smícháním 100 cm⁻³ 1x TAE pufru (50x koncentrovaný o koncentraci 2 mol·dm⁻³ TAE pufr: 242 g Tris; 57,1 cm⁻³ ledové kyseliny octové; 100 cm⁻³ 0,5 mol·dm⁻³ EDTA o pH 8 na 1 dm³ redestilované vody) a 1,8 g agarosy. Směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě do dokonalého rozpuštění agarosy. Po mírném zchladnutí bylo do agarosového roztoku přidáno 25 µl roztoku etidymbromidu o koncentraci 10 mg·ml⁻¹. Po promíchání byl gel nalitý do formy pro gel, kde tuhl po dobu 20 minut. Připravený gel byl zalit elektroforetickým 1x TAE pufrem. Do jamek v gelu byly následně naneseny směsi vzorků a bromfenolové modři, obsahující 10 µl vzorku a 5µl bromfenolové modři (0,5 cm⁻³ 2% bromfenolové modři a 7 cm⁻³ glycerolu, naředěno na objem 10 cm⁻³ redestilovanou vodou). Jako standard byl použit DNA ladder RTU 100 bp o objemu 5 µl. Podmínky elektroforézy byly 98 V, 140 mA po dobu 2 hodin. Po skončení elektroforézy byl gel vizualizován pomocí transiluminátoru Ultralum, kde byly viditelné fluoreskující zóny DNA s interkalovaným barvivem ethidymbromidem. Gel byl následně zachycen a zpracován pomocí softweru ScionImage.

4.2.2.3 Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Po vizualizaci a ověření správnosti PCR produktů horizontální agarosovou gelovou elektroforézou byly vzorky dále analyzovány metodou DGGE.

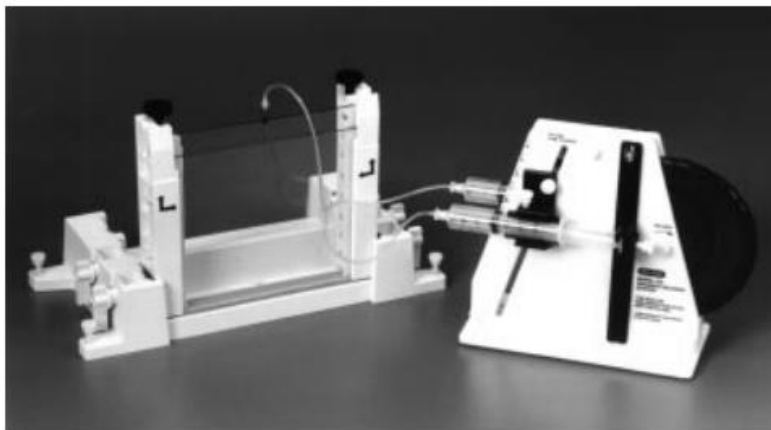
Příprava akrylamidového gelu s lineárním gradientem

Pro přípravu akrylamidového gelu s gradientem denaturačních činidel byl nejprve připraven zásobní roztok 40% AA/BIS v poměru 19:1, a to smícháním 38 g akrylamidu a 2 g bis-akrylamidu ve 100 cm^{-3} redestilované vody. Připravený roztok byl zfiltrovaný přes filtrační papír. Z tohoto roztoku byl připraven 8% akrylamidový gel s 0 %, 30 %, 45 % a 60 % denaturačních činidel podle Tab. 6.

Tab. 5: Složení akrylamidového gelu

Koncentrace denaturantů v 8% roztoku akrylamidu				
Jednotlivé komponenty akrylamidového gelu	0%	30%	45%	60%
40% AA/BIS (ml)	20,0			
50xTAE pufr (ml)	2,0			
Formamid (ml)	0,0	12,0	18,0	24,0
Močovina (g)	0,0	12,6	18,9	25,2
Celkový objem (ml)	100,0			

Akrylamidový gel byl připravován ve formě na gel (viz Obr. 17). K zalepení okrajů bylo použito 5 cm^{-3} polyakrylamidového gelu bez denaturačních činidel. Po zpolymerizování lepícího gelu byl do formy naléván gel s denaturačním gradientem. Gel s akrylamidovým denaturačním gradientem byl namíchán ze 12 cm^{-3} 30% roztoku a 12 cm^{-3} jednoho z koncentrovanějších roztoků uvedených v Tab. 5 podle požadovaného denaturačního rozmezí (30 % - 45 %, 30 % - 60 %). Jednotlivé gely byly přesunuty do plnicích stříkaček, které byly uchyceny do míchacího zařízení (viz Obr. 17). Pohybem otočného kola byly roztoky smíchány tak, aby byl gradient denaturačních činidel v horní části gelu 30% a ve spodní části 45 nebo 60%. Nakonec byla vrchní část gelu zalita 0% akrylamidovým gelem, do něhož byl umístěn hřebínek pro vytvoření jamek v gelu. Polymerizace akrylamidových gelů byla iniciována přidávkem $40\text{ }\mu\text{l}$ radikálového činidla, kterým byl amonium persulfát (složení $0,1\text{ g}$ v 1 cm^{-3} redestilované vody) a $8\text{ }\mu\text{l}$ TEMEDu (N,N'-tetramethylendiamin), těsně před nalitím jednotlivých akrylamidových roztoků do formy. Gel byl vždy připraven jeden den dopředu, aby bylo zajištěno dostatečné zpolymerizování akrylamidu.



Obr. 17: Aparatura pro přípravu akrylamidového gelu s denaturačním gradientem

Příprava vzorků pro DGGE, průběh a parametry DGGE

Jamky připraveného gelu byly propláchnuty 1x TAE kvůli odstranění zbytků akrylamidu a gel byl umístěn do elektroforetické vany obsahující 7 litrů 1x TAE pufru. Po vyhřátí elektroforetického pufru i gelu byly nanášeny vzorky PCR produktů.

Pro vizualizaci vzorků a jejich usazení do jamek gelu byla vždy namíchána směs 40 μl vzorku a 10 μl bromfenolové modři (0,5 cm^{-3} 2% bromfenolové modři a 7 cm^{-3} glycerolu na 10 cm^{-3} redestilované vody). Standardní objem nanášený na gel představoval 15 μl a mohl být změněn podle koncentrace jednotlivých PCR produktů odhadované z agarósového gelu.

Po nanesení vzorků následovala samotná separace jednotlivých PCR produktů v denaturačním gradientu DGGE. K tomu bylo použito vložené napětí 110 V, proud 140 mA; doba separace byla v případě ITS oblastí rDNA optimalizována doplňováním jednotlivých vzorků, a to celkem čtyřikrát po časových úsecích 90 minut. V případě oblasti D1/D2 rDNA trvala separace PCR produktů 6 hodin.

Vyhodnocení výsledků DGGE

Po proběhnutí denaturační gradientové gelové elektroforézy byl polyakrylamidový gel přemístěn z formy do barvicí lázně obsahující 250 cm^{-3} 1xTAE pufru a 50 μl etidiumbromidu o koncentraci 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Po 30 minutách byl gel vyňat a přesunut na odbarvení do lázně obsahující 250 cm^{-3} 1xTAE. Gel byl odbarvován po dobu 5 minut a poté byl přenesen na vizualizaci do vizualizační komory transiluminátoru UltraLum, zachycen a zpracován pomocí softwaru ScionImage.

4.2.2.4 Optimalizace pulzní gelové elektroforézy (PFGE)

Optimalizace PFGE byla provedena s kulturami karotenogenních kvasinek z 50, 75 a 80 hodiny kultivace. Pro separaci chromozomální DNA pomocí metody CHEF-PFGE byly vyzkoušeny různé podmínky: koncentrace agarosového gelu 1-1,1%, podmínky napětí 162 V a 130V, podmínky jednotlivých pulzních časů pro separaci jednotlivých chromozomů od 150 s až po 500 s. Jako velikostní standard byl použit Yeast chromosome PFGE marker.

Izolace intaktní kvasinkové genomové DNA

Intaktní kvasinková DNA byla vždy izolována z čerstvých buněk, které byly kultivovány na glukosovém médiu (viz kapitola 4.2.2). Pomocí metody počítání buněk v Bürkeově komůrce byla stanovena koncentrace buněk v médiu. Z kvasinkové kultury bylo odebráno takové množství, aby odpovídalo koncentraci $0,5 \cdot 10^{10}$ buněk. Odebrané množství kultury pak bylo centrifugováno po dobu 10 min při 5 000 rpm. Po odstranění média byly buňky třikrát promývány 10 cm^{-3} roztoku 50 mM EDTA o pH 7,5. Po slití roztoku EDTA byl k buňkám přidán roztok enzymu lytikázy. Pro jeden vzorek bylo použito 0,638 mg lytikázy rozpuštěné v 50 μl . Po přidání enzymu byly buňky jemně vortexovány a následně inkubovány při 40 °C po dobu 10 minut. Po inkubaci byly buňky smíchány s roztokem 2% „low melting“ agarosy, rozpuštěné v roztoku 125 mM EDTA o teplotě 40 °C, a inkubovány 30 minut při 38 °C. Po 30 minutách byla suspenze agarosy a buněk přesunuta do formiček. Následující půl hodiny byly vzorky skladovány při 4 °C do ztuhnutí agarosy. Připravené bločky byly po dobu 16 hodin inkubovány v LET pufru (18,61 g EDTA, $7,5 \text{ cm}^{-3}$ 7,5% β -meraptoethanolu a 0,122 g TRIS v 1 dm^3 redestilované vody o pH 7,5). Po inkubaci byl slit LET pufr, a bločky byly promyty 5 cm^{-3} NDS pufru (18,61 g EDTA, 0,122 g TRIS v 1 dm^3 redestilované vody o pH 7,5). Po promytí bylo k bločkům přidáno $4,5 \text{ cm}^{-3}$ NDS pufru a $0,5 \text{ cm}^{-3}$ roztoku proteinázy K a NDS pufru o koncentraci $2 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$. Po 24 hodinové inkubaci při 50 °C byl roztok proteinázy a NDS slit a bločky byly promyty 5 cm^{-3} NDS pufru. Po promytí bylo přidáno 5 cm^{-3} NDS pufru a následovala čtyřiašedesetihodinová inkubace při 50 °C. Po inkubaci byl NDS pufr opět slit a bločky byly inkubovány v 5 cm^{-3} vychlazeného 50 mM EDTA pufru po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Tímto způsobem byly bločky promyty celkem čtyřikrát a po promytí byly uskladněny v 5 cm^{-3} 50 mM EDTA pufru při teplotě 4 °C.

Příprava agarosového gelu

Ve 110 cm^{-3} TBE pufru (50 g Tris, 27,5 g H_3BO_3 , 3,72 g nebo 20 cm^{-3} $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ EDTA o pH 8, na 1 dm^3 redestilované vody) bylo rozpuštěno 1,1 g agarosy v případě 1% gelu; a v případě 1,1% gelu 1,21 g agarosy. Roztok agarosy byl vylit do formy a po 20 minutách ztuhnutí byly do gelu zavedeny bločky představující chromozomální DNA jednotlivých kvasinkových kmenů.

Pulzní gelová elektroforéza

Elektroforetická vana byla naplněna 2,5 dm³ 0,08 M TBE pufru a vychlazena na 11 °C. Po vychlazení byl do elektroforetické vany umístěn gel se vzorky a HEX elektroda. Po nastavení podmínek jednotlivých pulzních časů, doby separace na přístroji Gene Navigator a vloženého napětí a proudu na zdroji byla elektroforéza spuštěna.

Vizualizace výsledků PFGE

Po skončení PFGE byl gel přemístěn do barvicí lázně obsahující 250 cm⁻³ destilované vody a 50 µl etidiumbromidu o koncentraci 10 mg·ml⁻¹. Gel byl v lázni barven po dobu alespoň 2 hodin kvůli lepší vizualizaci všech fragmentů a odbarvován 5 minut ve 250 cm⁻³ destilované vody. Vizualizace byla provedena na transiluminátoru a zaznamenána pomocí software ScionImage.

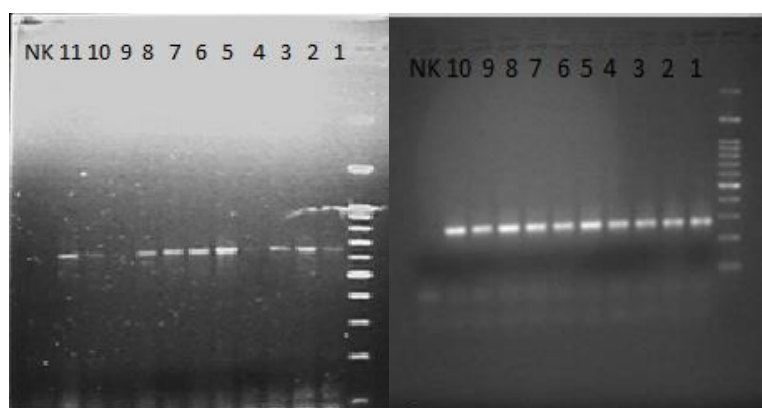
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Molekulární charakterizace standardních kmenů karotenogenních kvasinek

Molekulární charakterizace karotenogenních kvasinek byla provedena pomocí metod nested PCR v kombinaci s metodou DGGE. Byla provedena amplifikace vybraných úseků DNA kódujících velkou ribosomální podjednotku (26S rRNA), a to konkrétně oblastí 26S podjednotky D1/D2, oblastí ITS 1 a 5,8 rDNA spolu s úsekem ITS2. Celkem bylo analyzováno devět kmenů karotenogenních kvasinek, jakými byly *Rhodotorula glutinis*, *R. mucilaginosa*, *R. aurantiaca*, *Sporobolomyces roseus*, *S. salmonicolor*, *S. shibatanus* (*pararoseus*), *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 a 10-1-2 a kmene *Phaffia rhododyma*. Souběžně byla analyzována i srovnávací kvasinka *Sacharomyces cerevisiae*.

5.1.1 Nested PCR D1/D2 oblasti 26S rDNA

Nested PCR je dvoukrokovou reakcí využívající vnitřních a vnějších primerů a používá se kvůli velmi vysoké citlivosti. V prvním amplifikačním kroku byly použity primery NL1-NL4 a jako templát byla použita vyizolovaná kvasinková DNA každého kmene. V dalším amplifikačním kroku byl jako templát použit předchozí produkt PCR reakce, tedy PCR produkt s použitím NL1-NL4 primerů. Primery použité v druhém amplifikačním kroku byly NL1-GC a LS2. Primer NL1-GC obsahuje GC- svorky umožňující lepší rozlišení při následné analýze PCR produktů metodou DGGE. Tento pár primerů ohraničuje hypervariabilní oblast D1/D2 genu 26S pro velkou ribosomální podjednotku.



Obr. 18: Vlevo PCR produkty 1. amplifikačního kroku, vpravo PCR produkty 2. amplifikačního kroku. (popisky viz Tab. 6 níže)

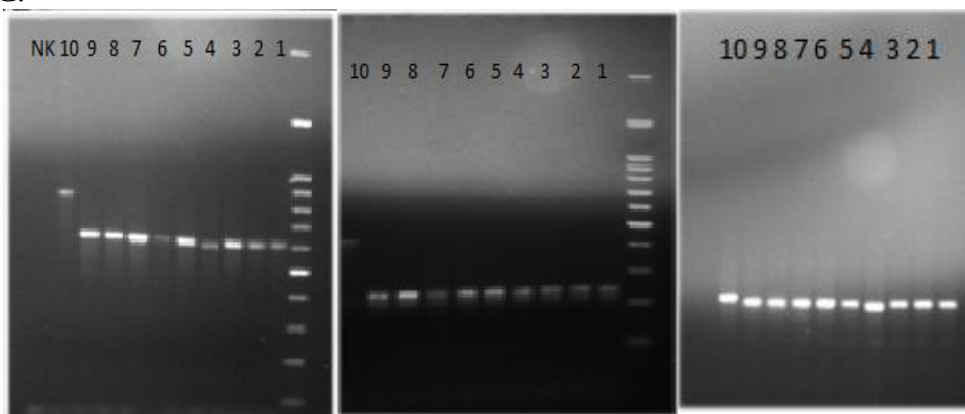
Tab. 6: Označení vzorků pro PCR

Kmen	číslo
R. glutinis	1
R. aurantiaca	2
R. mucilaginosa	3
S. roseus	4
S. salmonicolor	5
S. shibatanus	6
C. capitatum 10-1-1	7
C. capitatum 10-1-2	8
P. rhodzyma	9
Sach. cerevisiae	10

Po vizualizaci PCR produktů obou amplifikačních kroků (viz Obr. 18) je zřejmé, že všechny použité kvasinkové kmeny mají velmi podobnou velikost těchto úseků rDNA. V případě PCR produktů 1. amplifikačního kroku je velikost molekul DNA cca 650 bp. V případě D1/D2 úseku se jedná o velikost cca 280 bp.

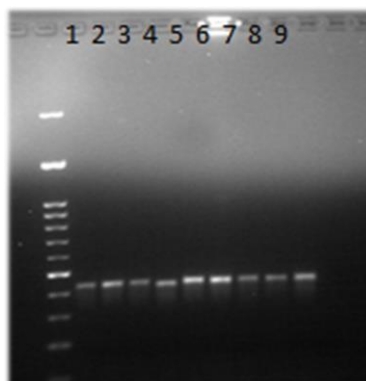
5.1.2 Optimalizace PCR ITS1 a ITS2-5,8 r DNA oblasti

Optimalizace nested PCR ITS1 a 5,8 rDNA ITS2 oblasti byla provedena na základě optimalizace annealingových teplot. Rozmezí annealingových teplot bylo stanoveno na základě vypočtených hodnot teplot tání jednotlivých primerů a bylo provedeno v rozmezí teplot 56 – 61°C, z čehož nejlepší výsledky byly dosaženy při teplotě annealingu 60 °C pro všechny kmeny u obou amplifikačních kroků. První amplifikační krok byl proveden s primery ITS1 a ITS4. Druhý amplifikační krok byl proveden s párem primerů ITS1-GC-ITS2 pro ITS1 oblast a pro 5,8 rDNA ITS2 oblast s primery ITS3-ITS4-GC.



Obr. 19: Vlevo 1. amplifikační krok (ITS1-ITS4), 2. amplifikační krok (ITS1-GC-ITS2), vpravo 2. amplifikační krok (ITS3-ITS4-GC) (popisky viz. Tab. 6)

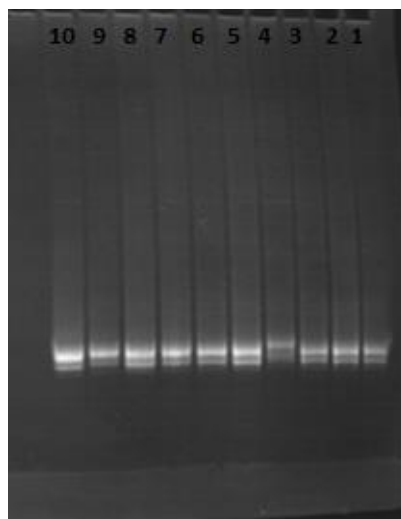
Z obrázku 20 je patrné, že produkty prvního amplifikačního kroku mají u všech kmenů karotenogenních kvasinek velikost cca 600 bp, zatímco u kmene *Sacharomycys cerevisiae* je velikost PCR produktu prvního amplifikačního kroku cca 900 bp (pozice 10). Obdobně je velikost PCR produktu druhého amplifikačního kroku pro ITS1 oblast rDNA větší pro kmen *Sacharomycys cerevisiae* (cca 450 bp), zatímco u karotenogenních kvasinek je velikost tohoto PCR produktu pouze 250 bp. Co se týče velikosti oblasti 5,8- ITS2 rDNA, je pro kmen *Sacharomycys cerevisiae* pouze mírně odlišná. Velikost této oblasti činí cca 450 bp (viz Obr. 20).



Obr. 20: 2. amplifikační krok oblasti 5,8-ITS2 rDNA oblasti pouze pro karotenogenní kvasinky (popis viz Tab. 6 výše)

5.1.3 DGGE D1/D2 oblasti 26S rDNA

Pro následnou analýzu PCR produktů oblasti D1/D2 26S rDNA byl zvolen polyakrylamidový gel o poměru AA/BIS 19:1 a denaturační rozmezí 30 - 45 % denaturačních činidel. Doba separace byla 6 hodin. Vzorky nanášené na gel byly obarvené bromfenolovou modří. Podobnost D1/D2 oblastí rDNA u jednotlivých kmenů je velmi vysoká. Rozdíly jsou zde patrné pouze pro kmen *Sporobolomyces roseus* a *Sacharomycys cerevisiae* (viz Obr. 21). Na gelu jsou také patrné dva fragmenty; z toho níže umístěný a o nižší koncentraci se zde může vyskytovat buď z důvodu existence dvou forem oblasti D1/D2, nebo v důsledku přítomností nespecifických PCR produktů, vzniklých patrně přítomností zbytků dimerů primerů. Další možností může být nespecifická annealingová teplota, kdy by mohly primery nasedat i na méně specifické oblasti, lišící se již dvěma nukleotidy. Přítomnost nespecifických PCR produktů v důsledku kontaminací byla pečlivě sledována jako negativní kontrola horizontální gelovou elektroforézou a shledána jako negativní. Výskyt kontaminujících PCR produktů je tedy vyloučen.



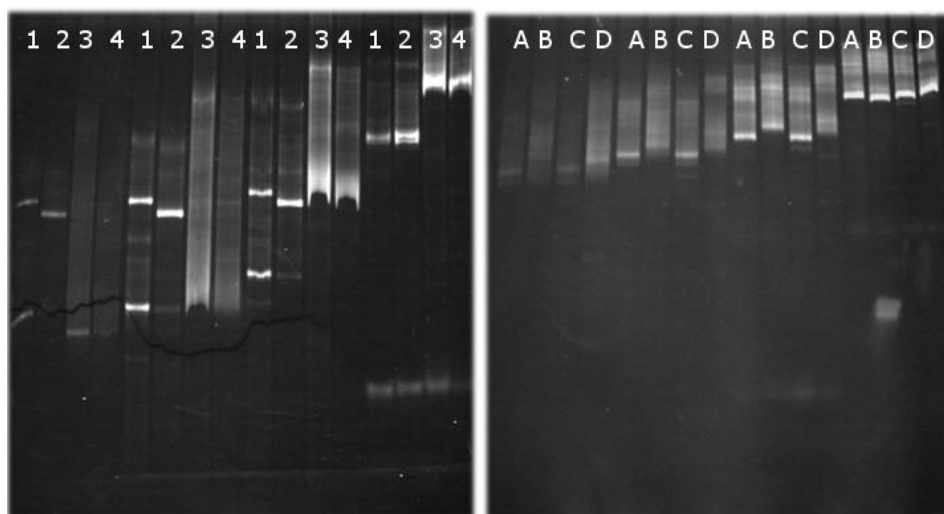
Obr. 21: DGGE PCR produktů D1/D2 oblastí kmenů karotenogenních kvasinek a kmene *Saccharomyces cerevisiae* (popis viz Tab. 6).

5.1.4 Optimalizace DGGE ITS1 a ITS2-5,8 r DNA oblasti

Pro optimalizaci podmínek denaturační gradientové gelové elektroforézy byl proveden, tzv. „Time travel“ experiment. Tento experiment spočívá v nanášení vzorků na polyakrylamidový gel v konstantních časových intervalech. Pro optimalizaci byl použit akrylamidový gel v poměru AA/BIS 19:1 o denaturačním rozmezí pro PCR produkty ITS1 i 5,8-ITS2 oblastí od 30 - 60%. Vzhledem k nízké koncentraci PCR produktů 5,8-ITS2 oblastí musel být pro tyto oblasti experiment zopakován, a to v denaturačním rozmezí od 30 - 80 %. Time travel experiment probíhal po dobu 6 hodin s tím, že každých 90 minut byly na gel nanášeny nové vzorky. Z výsledků tohoto experimentu je patrné, že optimální doba separace je 6 hodin a optimální denaturační rozmezí je 30 - 45 % denaturačních činidel (viz Obr. 22).

Tab. 7: Označení vzorků jednotlivých kmenů

Kmen	číslo
<i>R. glutinis</i>	1
<i>R. aurantiaca</i>	2
<i>R. mucilaginosa</i>	3
<i>S.roseus</i>	4
<i>S.salmonicolor</i>	5
<i>S. shibatanus</i>	6
<i>C. capitatum 10-1-1</i>	7
<i>C. capitatum 10-1-2</i>	8
<i>P. rhododyma</i>	9
<i>Sach. cerevisiae</i>	10
<i>Sach. Cerevisiae + C. capitatum 10-1-1</i>	11

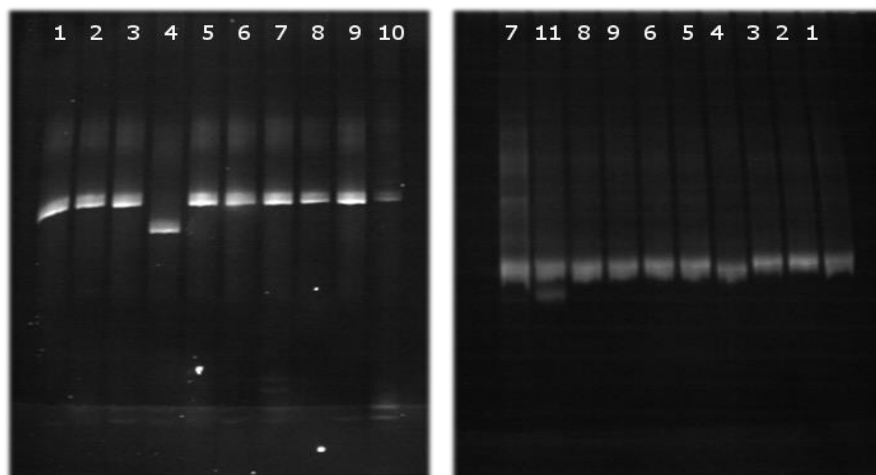


Obr. 22: Optimalizace podmínek DGGE vlevo pro oblast ITS1 + 5,8-ITS2 rDNA vpravo optimalizace podmínek pro 5,8-ITS2 rDNA oblast (označení viz Tab. 8).

Tab. 8: Označení vzorků pro time travel experiment (Obr. 22)

Optimalizace ITS1 + 5,8-ITS2			5,8-ITS2	
Označení vzorku	ITS1	5,8-ITS2	Označení vzorku	5,8-ITS2
1	<i>R. glutinis</i>	<i>Sach.cerevisiae</i>	A	<i>R. glutinis</i>
2	<i>S.roseus</i>		B	<i>Sach.cerevisiae</i>
3	<i>Sach.cerevisiae</i>	<i>R.glutinis</i>	C	<i>S.roseus</i>
4		<i>S.roseus</i>	D	<i>C. capitatum-1</i>

Po optimalizaci podmínek DGGE byly podrobeny analýze ITS1 a 5,8-ITS2 oblastí všechny standardní kvasinkové kmeny karotenogenních kvasinek a kmen *Sacharomyces cerevisiae*. Na Obr. 23 se nacházejí výsledky analýzy: vlevo pro ITS1 oblasti, vpravo pro 5,8-ITS2 oblasti. Na úrovni ITS1 oblastí se mezi kmeny karotenogenních kvasinek nenacházejí téměř žádné odlišnosti, s výjimkou kmene *Sporobolomyces roseus* a mírně se liší *Sacharomyces cerevisiae*. Tento výsledek je patrně způsoben velmi blízkou příbuzností těchto kmenů. Obdobně je tomu i v případě 5,8-ITS2 oblastí, kde je patrnější rozdíl u kmene *Sacharomyces cerevisiae* a kmene *Sporobolomyces roseus*. Použité kmeny karotenogenních kvasinek na úrovni těchto oblastí tedy není možné mezi sebou rozlišit, až na kmen *Sporobolomyces roseus*, a to z důvodu velmi vysoké podobnosti těchto sekvencí v genomu karotenogenních kvasinek (viz kapitola 4.3.1.5).



Obr. 23: Vlevo DGGE ITS1 oblastí, vpravo DGGE 5,8-ITS2 oblastí (viz Tab. 7)

5.1.5 Sekvenování

PCR produkty oblastí D1/D2 a ITS2 rDNA byly přečištěny pomocí komerčního kitu a ve směsi s primerem o koncentraci požadované pro sekvenování zaslány komečnímu subjektu [51]. Sekvenování těchto úseků bylo provedeno firmou SEQme s.r.o.. Získané výsledky byly zpracovány ve formátu FASTA (viz. Tab 9) a následně byly vyhodnoceny pomocí programu Blast databáze National Center for Biotechnology Information (NCBI). Úseky oblastí D1/D2 a ITS2 rDNA kmenů karotenogenních kvasinek a kmene *Sacharomyces cerevisiae* byly srovnány na úrovni primární struktury DNA mezi sebou a se sekvencemi stejných nebo podobných kmenů uvedených v databázi pro bližší identifikaci.

Pro porovnání podobnosti sekvencí karotenogenních kvasinek se využila jako vhodný parametr hodnota indexu Score program Blast [52]. Tato hodnota koreluje shodnost nalezené podobné sekvenční k celkové délce zdrojové sekvenční a délce sekvenční komparační, proto její hodnota získaná z porovnání dvou shodných sekvencí jediného vzorku byla využita jako referenční k hodnotě srovnání mezi neshodnými sekvencemi. Podílem hodnoty získaného porovnání a hodnoty referenční byla určena podobnost (uvedena v tabulce Tab. 11) jako hodnota v relativních jednotkách.

Tab. 9: Význam symbolů ve FASTA formátu

Popisek	Význam	Popis
A	A	Adenin
C	C	Cytisin
G	G	Guanin
T	T	Thymin
U	U	Uracil
R	A nebo G	purinové báze
Y	C, T a nebo U	pyrimidinové báze
K	G, T a nebo U	Báze obsahující keto- skupiny
M	A a nebo C	Báze obsahující aminno- skupiny
S	C a nebo G	Silná interakce
W	A, T a nebo U	Slabá inteakce
B	není A (i.e. C, G, T or U)	Není to Adenin
D	není C (i.e. A, G, T or U)	Není to Cytosin
H	není G (i.e., A, C, T or U)	Není to Guanin
V	ani T ani U (i.e. A, C or G)	Není to ani Thymin ani Uracil
N	A C G T U	Jakákoliv báze
X	vymaskován	vymaskován
-	mezera neznámé délky	mezera neznámé délky

Při srovnání jednotlivých kmenů mezi sebou na úrovni primární struktury DNA oblasti D1/D2 rDNA bylo potvrzeno, že všechny kmeny karotenogenních kvasinek se vyznačují značnou podobností, kromě kmenů *S. roseus* a *Sacharomyces cerevisiae*, u nichž byla tato shoda nižší (viz Tab. 11). Výsledky potvrzují informace získané pomocí metody DGGE, a to, že sekvence úseků rDNA D1/D2 oblasti jsou velmi podobné pro všechny kmeny analyzovaných karotenogenních kvasinek, vyjma kmene *S. roseus* a *Sacharomyces cerevisiae*. Při identifikaci jednotlivých sekvencí D1/D2 oblastí karotenogenních (kar.) kvasinek byla u všech kmenů karotenogenních kvasinek (kromě kmene *S. roseus*) identifikována sekvence nejvíce se shodující s kmenem *R. mucilaginosa (rubra)*. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 10.

Obdobným způsobem byly analyzovány také oblasti 5,8-ITS2 rDNA. Při sekvenování měly vzorky obsahující molekuly DNA s těmito sekvencemi nízkou koncentraci a tak jsou výsledky sekvenace těchto oblastí méně spolehlivé, než v případě oblastí D1/D2, protože obsahují slabé signály a chyby, které zvyšují variabilitu těchto sekvencí v porovnání mezi jednotlivými kmeny. Tento fakt je třeba brát v potaz při hodnocení výsledků uvedených v Tab. 11. Identifikace jednotlivých kvasinkových kmenů na základě 5,8-ITS2 sekvencí pomocí databáze NCBI příbuznost většiny analyzovaných kvasinek s kmenem *R. mucilaginosa*, kromě kmene *S.roseus* a *Sach.cerevisiae* (viz Tab.10).

Příklad srovnání 5,8-ITS2 oblastí použitých kmenů kar. kvasinek s kmenem *R. mucilaginosa* je uveden jako příloha A, stejné srovnání pro D1/D2 oblasti je uvedeno jako

příloha B. Srovnání 5,8-ITS2, resp. D1/D2 oblastí použitých kmenů kar. kvasinek s databází NCBI jsou uvedeny jako příloha C, respektive příloha D. Pro zajištění vyšší spolehlivosti daného experimentu bude třeba stanovení opakovat, což může být předmětem následujících prací.

Tab. 10: Výsledky identifikace sekvencí analyzovaných kmenů s databází NCBI

Porovnávaný organismus	5,8-ITS2	D1/D2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Phaffia rhododyma</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>Cystofilobasidium capitatum 10-1-1</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>Cystofilobasidium capitatum 10-1-2</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>Sporobolomyces shibatanus</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>Sporobolomyces roseus</i>	<i>Sporobolomyces roseus</i>	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>

Tab. 11: Tabulka podobností sekvencí jednotlivých kmenů karotenoidních kvasinek

Podobnost sekvencí oblasti D1/D2 rDNA jednotlivých kmenů na základě Bit skóre										
kmen	RG	RA	RR	SR	SSA	SSH	CC-1	CC-2	PR	SC
RG	100,00%	95,78%	99,21%	70,91%	97,43%	92,88%	95,50%	97,11%	96,14%	37,14%
RA	95,78%	100,00%	96,31%	69,09%	94,86%	93,40%	96,03%	95,28%	92,56%	38,18%
RR	99,21%	96,31%	100,00%	70,39%	97,43%	93,40%	96,56%	97,11%	95,04%	37,66%
SR	72,03%	70,18%	71,50%	100,00%	69,67%	67,81%	70,37%	71,13%	70,25%	37,66%
Ssa	100,00%	97,36%	90,24%	70,39%	100,00%	94,46%	96,56%	98,16%	96,14%	37,66%
SSH	92,88%	93,40%	93,40%	66,75%	92,03%	100,00%	94,18%	92,39%	92,01%	37,66%
CC-1	95,25%	95,78%	96,31%	69,09%	93,83%	93,93%	100,00%	95,80%	93,11%	37,66%
CC-2	97,63%	95,78%	97,63%	70,39%	96,14%	92,88%	96,56%	100,00%	95,59%	37,14%
PR	92,08%	88,65%	91,03%	66,23%	89,72%	88,13%	89,42%	91,08%	100,00%	35,84%
SC	37,73%	38,79%	38,26%	37,66%	37,28%	38,26%	38,36%	37,53%	38,02%	100,00%
Srovnání sekvencí oblasti 5,8-ITS2 rDNA mezi jednotlivými kmeny na základě Bit skóre										
kmen	RG	RA	RR	SR	SSA	SSH	CC-1	CC-2	PR	SC
RG	100,00%	62,54%	68,10%	22,24%	65,57%	53,88%	73,32%	62,26%	42,62%	16,36%
RA	65,08%	100,00%	54,38%	21,15%	70,42%	63,43%	68,29%	66,72%	40,46%	17,74%
RR	72,66%	55,76%	100,00%	23,17%	59,17%	54,37%	73,99%	58,83%	61,19%	16,97%
SR	25,22%	23,05%	24,63%	100,00%	22,32%	23,14%	23,15%	21,10%	35,99%	14,53%
Ssa	66,84%	68,98%	56,53%	20,06%	100,00%	75,73%	64,93%	79,25%	34,83%	17,74%
SSH	58,73%	66,44%	55,54%	22,24%	80,97%	100,00%	63,93%	80,62%	44,11%	16,36%
CC-1	77,07%	68,98%	72,89%	21,46%	66,96%	61,65%	100,00%	63,81%	45,61%	18,65%
CC-2	64,02%	65,93%	56,69%	19,13%	79,93%	76,05%	62,42%	100,00%	38,97%	15,29%
PR	45,33%	41,36%	60,99%	33,75%	36,33%	43,04%	46,14%	40,31%	100,00%	16,97%
SC	18,87%	19,66%	18,35%	14,77%	20,07%	17,31%	20,47%	17,15%	18,41%	100,00%

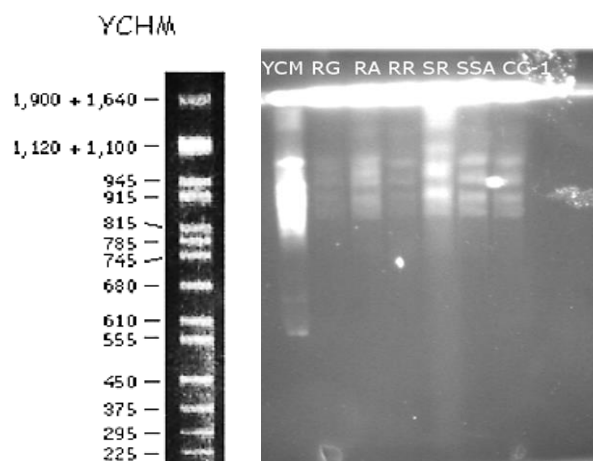
5.1.6 Karyotypová charakterizace kvasinkových kmenů pomocí PFGE

Ke správné karyotypové charakterizaci kvasinek je nejdůležitějším předpokladem správná příprava vzorků chromozomální DNA. DNA by ve vzorcích měla mít dostatečnou koncentraci a neměla by být jakkoliv degradovaná, či naštěpená. Z tohoto důvodu byla optimalizována příprava chromozomální DNA v agarósových bločcích, doba kultivace kvasinek a množství buněk pro přípravu bločků. Pro přípravu bločků byly použity buňky karotenogenních kvasinek z 50., 75. a 80. hodiny kultivace. Pro 50. hodinu kultivace bylo použito množství $0,5 \cdot 10^{10}$ buněk, pro 75. hodinu kultivace bylo toto množství dvojnásobné a pro 80. hodinu kultivace bylo použito trojnásobné množství buněk. Výchozím předpokladem byla vzrůstající odolnost buněčné stěny vůči lýtickým enzymům s rostoucí dobou kultivace. Buňky by se tedy neměly dostat do stacionární fáze, kdy je jejich buněčná stěna nejvíce odolná, ale měly by být zpracovány v exponenciální fázi růstu.

Jakmile je úspěšně izolována intaktní DNA, je důležité správné nastavení jednotlivých pulzních časů, vloženého napětí, doby separace, koncentrace agarósového gelu a elektroforetického pufru pro optimální rozlišení jednotlivých chromozomů. Pro optimální rozdělení chromozomální DNA byly použity pulzní časy 150 s, 200 s, 300 s a 500 s a vložené napětí 108, 130 a 162V. Byl použit 1% a 1,1% agarósový gel. Separace chromozomální DNA probíhala při 11 °C v 0,08% TBE pufru. Jako standard byl použit Yeast chromosome marker (viz Obr. 24).

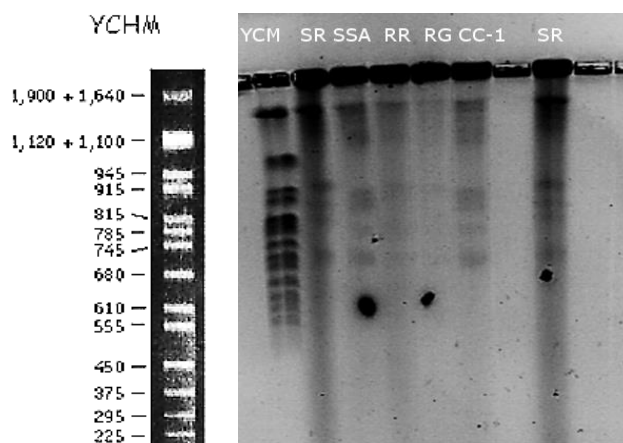
Tab. 12: Označení vzorků pro PFGE

Kmen	Popisek
<i>R. glutinis</i>	RG
<i>R. aurantiaca</i>	RA
<i>R. mucilaginosa</i>	RR
<i>S. roseus</i>	SR
<i>S. salmonicolor</i>	SSA
<i>S. shibatanus</i>	SSH
<i>C. capitatum 10-1-1</i>	CC-1
<i>Yeast chromosome marker</i>	YCHM



Obr. 24: 50. hod kultivace, doba separace 25 hod, parametry: 150s/5hod, 200 s/5hod, 300 s/5hod, 500 s/10 hod 25 hod; 1% agarosový gel; 162V (popisky viz Tab.12).

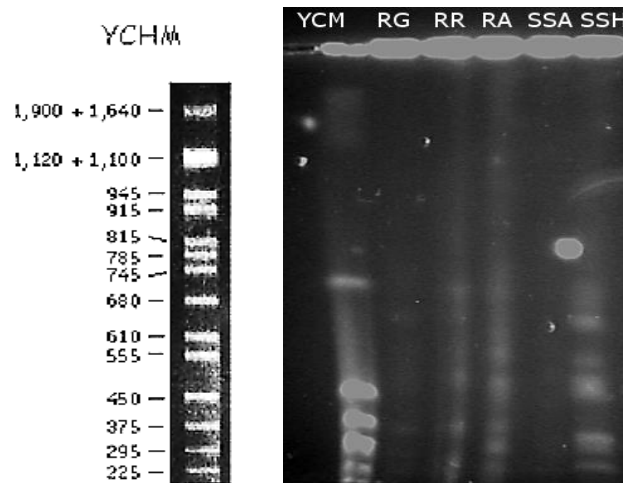
Separace chromozomální DNA izolované z kvasinek z 50. hodiny kultivace byla stanovena jako ověřovací z hlediska správné izolace itaktní DNA a volené pulzní časy byly nastaveny tak, aby se začaly separovat co největší chromozomy. Nicméně tyto podmínky nebyly ideální pro rozdělení standardu. Lze vidět, že od každého kmene karotenogenních kvasinek byly separovány minimálně čtyři frakce. U kmenů *R. aurantiaca*, *R. mucilaginosa* a *S. roseus* je patrných 5 frakcí (viz Obr. 24).



Obr. 25: 50. hod kultivace, doba separace 47 hod, parametry: 150s/15hod, 200 s/20hod, 250 s/20hod, 300 s/2 hod; 1,1% agarosový gel, 130 V (popisky viz Tab.12).

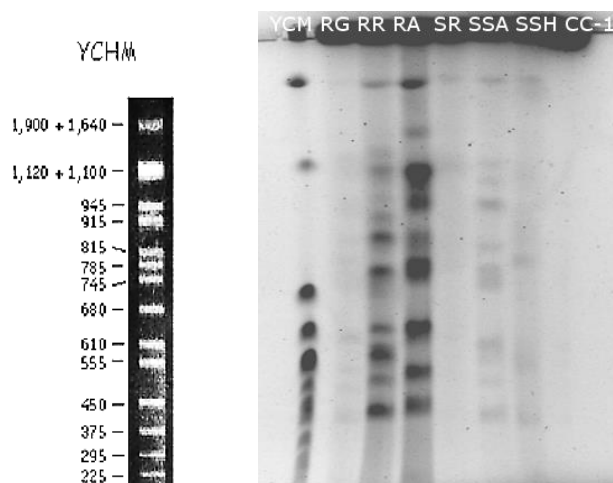
Podmínky separace na Obr. 25 byly nastaveny tak, aby byly rozděleny menší chromozomy karotenogenních kvasinek. K separaci byl použit 1.1% gel pro lepší rozlišení jednotlivých chromozomů. Všechny kmeny mají nejmenší chromozom o velikosti cca 650 Kbp, dále následují chromozomy o velikosti 610 Kbp, kromě kmene *Sporobolomyces roseus*, u kterého je tento chromozom větší (cca 815 kbp). Menší chromozomy

kmene *Sporobolomyces roseus* byly tedy rozděleny na celkem čtyři frakce o velikostech 610 Kbp, 815 kbp, 900 Kbp a 950 Kbp. Kmeny *Sporobolomyces salmonicolor*, *R. aurantiaca*, *R. glutinis* a *C. capitatum* (i když u *R. glutinis* byla DNA částečně degradována a výsledky nejsou příliš jasné) mají tyto čtyři chromozomy velikostně shodné, a to 610 Kbp, 680 kbp, 915 Kbp a 945 kbp. Větší chromozomy již nejsou za těchto podmínek separace čitelné.



Obr. 26: 80. hod kultivace, doba separace 65 hod, parametry: 150s/15hod, 200 s/20hod, 300 s/20hod, 500 s/10 hod; 1% agarosový gel, 162 V (popisky viz Tab.12).

Obr. 26 zobrazuje separaci kvasinkových chromozomů izolovaných z buněk z 80. hodiny kultivace. Podmínky separace byly nastaveny tak, aby došlo k rozdělení zejména velkých chromozomů a bylo tak možné stanovit, zda se v karyotypu karotenogenních kvasinek nevyskytují chromozomy větší než 1 900 Kbp. Nejzřetelnější jsou chromozomy kvasinky *S. shibatanus*, kde je velmi dobře vidět, že největší chromozomy této kvasinky mají přibližnou velikost 1 500 Kbp, 1 250 Kbp, 1 200 Kbp, 915 Kbp, 900 Kbp a 815 Kbp. U ostatních kvasinkových kmenů byla koncentrace chromozomální DNA velmi nízká, a navíc došlo k její degradaci, což znemožňuje vyhodnocení. Z koncentrací vzorků většiny kvasinek je patrné, že v 80. hodině kultivace je buněčná stěna nejspíše již dost rezistentní vůči lytickým enzymům.



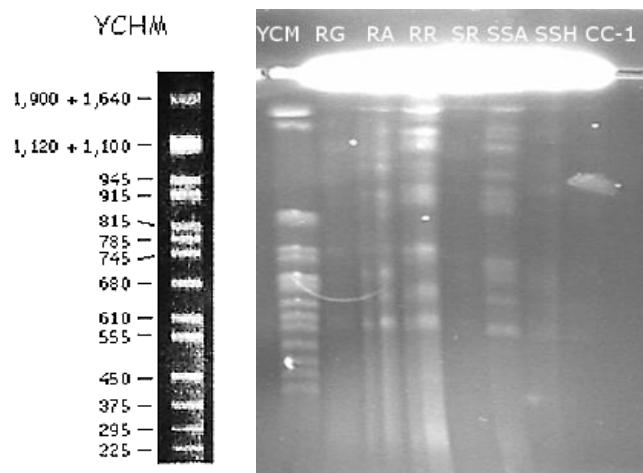
Obr. 27: 75. hod kultivace, doba separace 75 hod, parametry: 150s/15hod, 200 s/20hod, 250 s/20hod, 300 s/20 hod; 1% agarosový gel, 130 V (popisky viz Tab.12)

Vzhledem k podmínkám předchozí pulzní gelové elektroforézy bylo změněno napětí a celkové podmínky separace tak, aby byly viditelně rozděleny všechny kvasinkové chromozomy; bylo tedy sníženo napětí i nejvyšší pulzní časy. Napětí bylo sníženo kvůli dobré separaci velkých chromozomů a zároveň kvůli snížení elektroforetické pohyblivosti chromozomů o menších velikostech. Podmínky i výsledky separace jsou uvedeny na Obr. 27, kde je zjevné, že chromosomální DNA byla patrně degradována u kmenů *R.glutinis*, *S. roseus*, *S. shibatanus* a *C. capitatum*.

U kmene ***R. aurantiaca*** bylo celkem separováno dvanáct chromozomů přibližně o velikostech 650 Kbp, 760 Kbp, 850 Kbp, 900 Kbp, 915 Kbp, 950 Kbp, 970 Kbp, 980 Kbp, 1000 Kbp, 1 200 Kbp a pravděpodobně 1 630 Kbp. Chromosomální DNA kmene ***R. mucilaginosa*** byla separována na jedenáct fragmentů velikostně odlišných od kmene *R. aurantiaca*, a to v případě prvního a druhého nejmenšího chromozomu, dále *R. mucilaginosa* postrádá chromozomy o velikostech 850, 900, 980 a 1000 Kbp ve srovnání s *R. aurantiaca*. *R. mucilaginosa* se od kmene ***R. aurantiaca*** liší přítomností chromozomu o velikosti 1 350 Kbp.

Kmen ***S. salmonicolor*** se na první pohled liší velikostí svých deseti chromozomů od kmenů rodu *Rhodotorula*. Přibližné velikosti chromozomů kmene *S. salmonicolor* jsou následující: 610 Kbp, 760 Kbp, 815 Kbp, 900 Kbp, 945 Kbp, 960 Kbp, 980 Kbp, 990 Kbp 1000 Kbp a pravděpodobně 1 630 Kbp.

Některé chromozomy jsou patné i u částečně degradované DNA kmenů *R.glutinis* a *S.salmonicolor*; u kmene *R.glutinis* jsou rozpoznatelné chromozomy o velikosti 610, 745, 780, 900 a největší rozpoznatelný má přibližnou velikost 1 630 Kbp. U kmene *S. salmonicolor* jsou mírně patrné velikosti chromozomů 610, 745, 755 a 1 630 Kbp. Z výsledků vyplývá, že karyotypy karotenogenních kvasinek jsou odlišné, co se týče velikostí jednotlivých chromozomů. Lze je tedy na základě této metody navzájem odlišit.



Obr. 28: 75. hod kultivace, doba separace 75 hod, parametry: 150s/15hod, 200 s/20hod, 250 s/20hod, 300 s/20 hod; 1,1% agarosový gel, 130 V (popisky viz Tab.12)

Výsledky z Obr. 28 potvrzují, že použití 1,1% agarosového gelu přispívá k lepšímu rozlišení jednotlivých chromozomů. Koncentrovanější matrice, kterou chromozomy procházejí, ale také přispívá ke snížení jejich elektroforetické mobility; z tohoto důvodu není separace jednotlivých chromozomů tak dobrá jako v předchozím případě. Rozlišitelnými jsou chromozomy kmenů *R. mucilaginosa* a *S. salmonicolor*, jejichž DNA nebyla degradována. U kmene *R. mucilaginosa* lze identifikovat celkem deset chromozomů, nejsou však příliš dobře rozděleny a velikostně odpovídají předchozí separaci (viz Obr. 28). Chromozomy kmene *S. salmonicolor* jsou podstatně lépe čitelné a jejich velikosti potvrzují předchozí výsledek (viz Obr. 27).

Pulzní gelová elektroforéza je velmi přesnou metodou umožňující rozlišení karyotypu jednotlivých kvasinkových kmenů, a tak umožňuje jejich rozlišení i mezi blízce příbuznými kmeny. Výše uvedené výsledky potvrzují vliv doby kultivace a množství buněk na úspěšnost izolace intaktní chromozomální DNA. Nejlepší výsledky byly dosaženy pro dobu kultivace 75 hodin a pro množství buněk $1 \cdot 10^{10}$. Nejlepší podmínky separace chromozomální DNA odpovídaly následujícím parametrům: doba separace 75 hod, parametry: 150s/15hod, 200 s/20hod, 250 s/20hod, 300 s/20 hod; 1% agarosový gel, 130 V. Pro ostřejší rozlišení jednotlivých chromozomů byl shledán jako vhodnější 1,1% agarosový gel, nicméně podmínky pro separaci chromozomů v této koncentrovanější matrici je třeba dále optimalizovat.

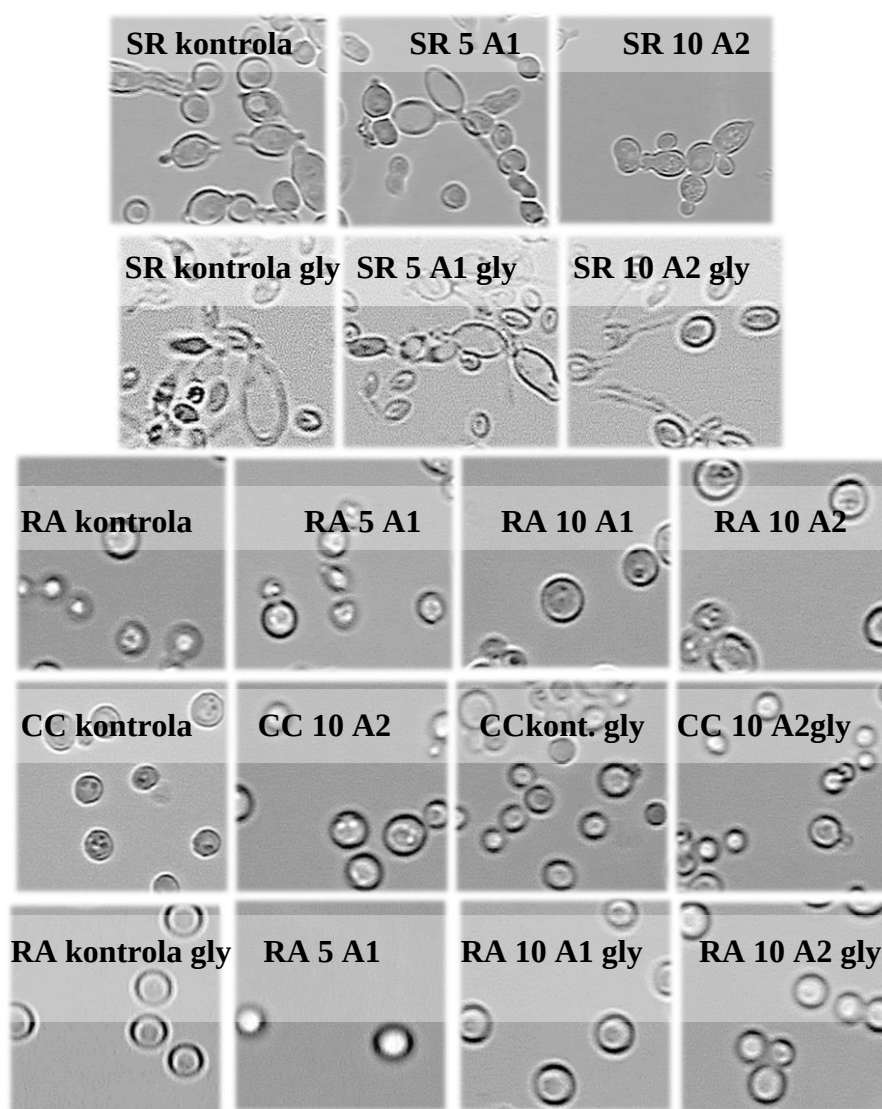
5.2 Analýza mutantních kmenů karotenogenních kvasinek

Mutantní kmeny, připravené v předchozích studiích [50], byly adaptované na odpadní substráty, jakými byly glycerol a těstoviny. Analyzovanými kmeny byly *S. roseus*, *R. aurantiaca*, *C. capitatum* a *R. glutinis* jak standardní, tak mutantní. Z mutantních kmenů byly vybrány ty s nejlepšími produkčními vlastnostmi prokázanými v předchozích experimentech, pro produkci karotenoidů a zejména β -karotenu. Mutant-

ní kmeny jsou popsány číslem, které vyjadřuje koncentraci mutagenu v médiu (5 mM, 10 mM), jež byla použita při mutacích, a označení A1 nebo A2 podle označení úspěšné kolonie při dřívější selekci kolonií.

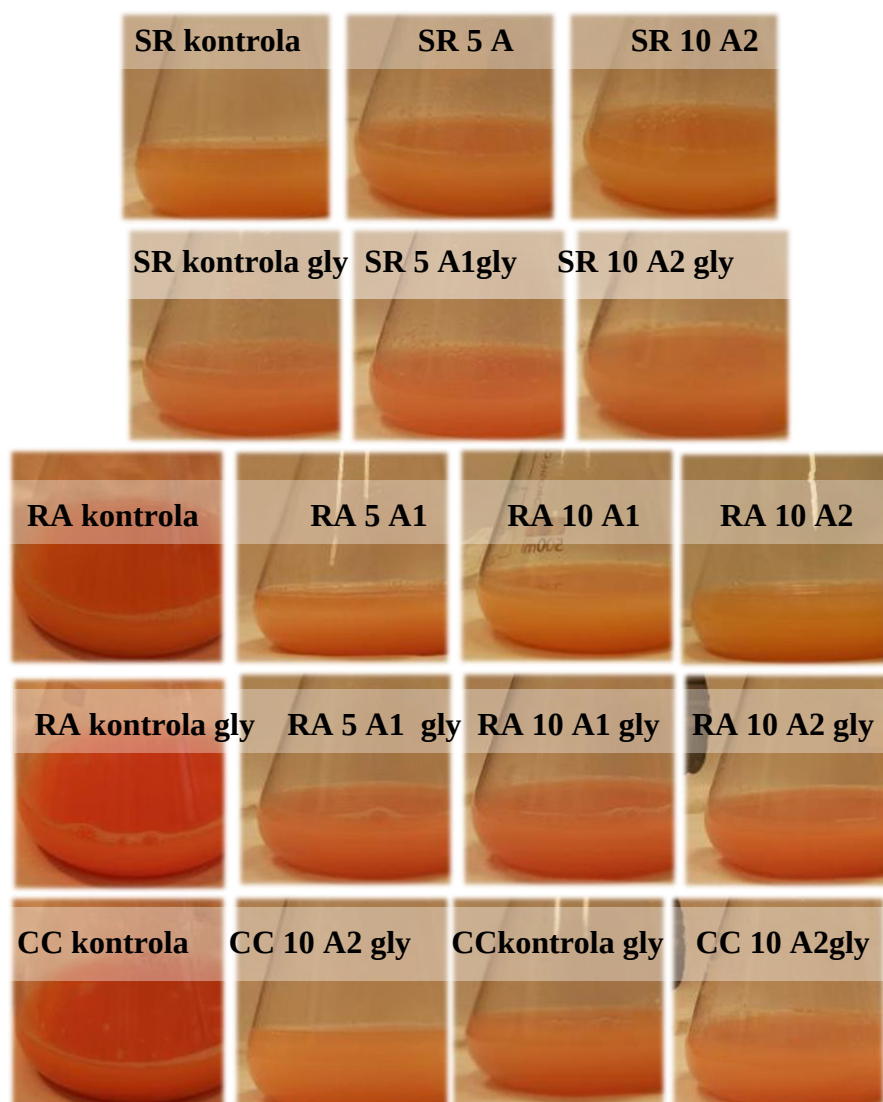
5.2.1 Pozorování morfologických změn mutantních kmenů kultivovaných na glycerolu

Z mutantních kmenů adaptovaných na glycerol byly vybrány mutantní kmeny SR 5 A1, SR 10 A2, RA 5 A1, RA 10 A1, RA 10 A2 a CC 10 A2. Vybrané kmeny byly kultivovány na glycerolovém médiu souběžně se standardními kmeny. Pro srovnání adaptace na glycerol byly všechny kmeny kultivovány také na glukosovém médiu. Kultivace všech kmenů probíhaly souběžně po dobu 80 hodin.



Obr. 29: Srovnání morfologie mutantních a standardních kmenů *S. roseus*, *R. aurantiaca* a *C. capitatum*

Morfologie mutantních kmenů se významným způsobem neliší od standardních kmenů. Ve většině případů dochází ke shlukování mutantních kmenů kultivovaných v glycerolovém médiu, které může působit jako stresový faktor. V případě kmene *S.roseus* docházelo k tomu, že pučící dceřinné buňky se často neoddělovaly od mateřských buněk, což je patrné zejména na glukosovém médiu u mutantních kmenů. V případě glycerolového média měly buňky spíše oválný tvar a silnější buněčnou stěnu. Mutantní kmeny *R. aurantiaca* se na glukosovém médiu vyznačovaly poněkud nerovnoměrnou distribucí velikosti buněk, a to zejména v případě RA 5 A1 a RA 10 A2. Při srovnání těchto kmenů v závislosti na použitém médiu je patrné, že glycerolové médium přispívá ke kulatějšímu tvaru buněk, a to jak u mutantních, tak u standardního kmene. Stejný trend lze pozorovat i u kmene *C. capitatum*, kde ale navíc přítomnost glycerolu v médiu patrně způsobuje menší velikost buněk. Přítomnost glycerolu v médiu nejspíše navozuje buňkám osmotický stres.

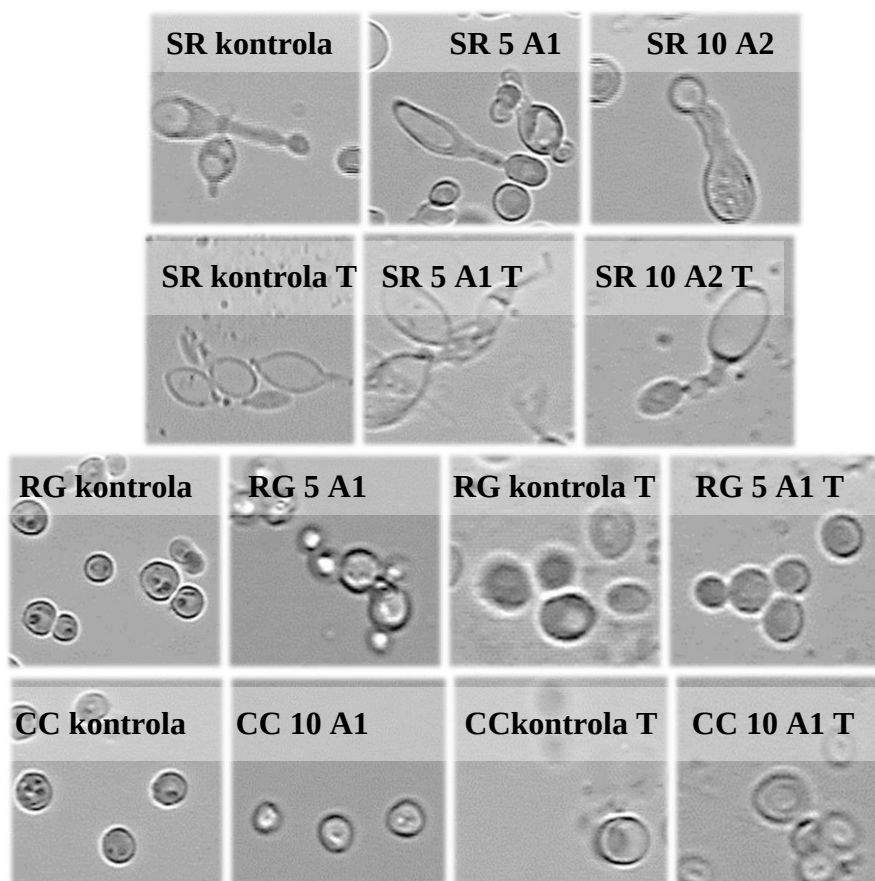


Obr. 30: Rozdílnost zabarvení produkčních médií mutantních a standardních kmenů

Na Obr. 30 jsou zachyceny kultury mutantních i standardních kmenů. Na první pohled je patrné, že se svým zabarvením příliš neliší až na zkrácení daná fotografií. Změna zabarvení jednotlivých kultur je však patrná, co se týče druhu produkčního média. Produkční glycerolová média způsobují více růžové zabarvení, zatímco glukozová produkční média způsobují spíše zabarvení kultur do oranžova. Tento jev je nejvíce zjevný u kmenů *R.aurantiaca* a *S.roseus*. Odlišné zbarvení kultur na glycerolovém médiu může být způsobeno s největší pravděpodobností rozdílným poměrem karotenoidů zastoupených v buňkách kvasinek.

5.2.1.1 Kultivace mutantních kmenů na těstovinách

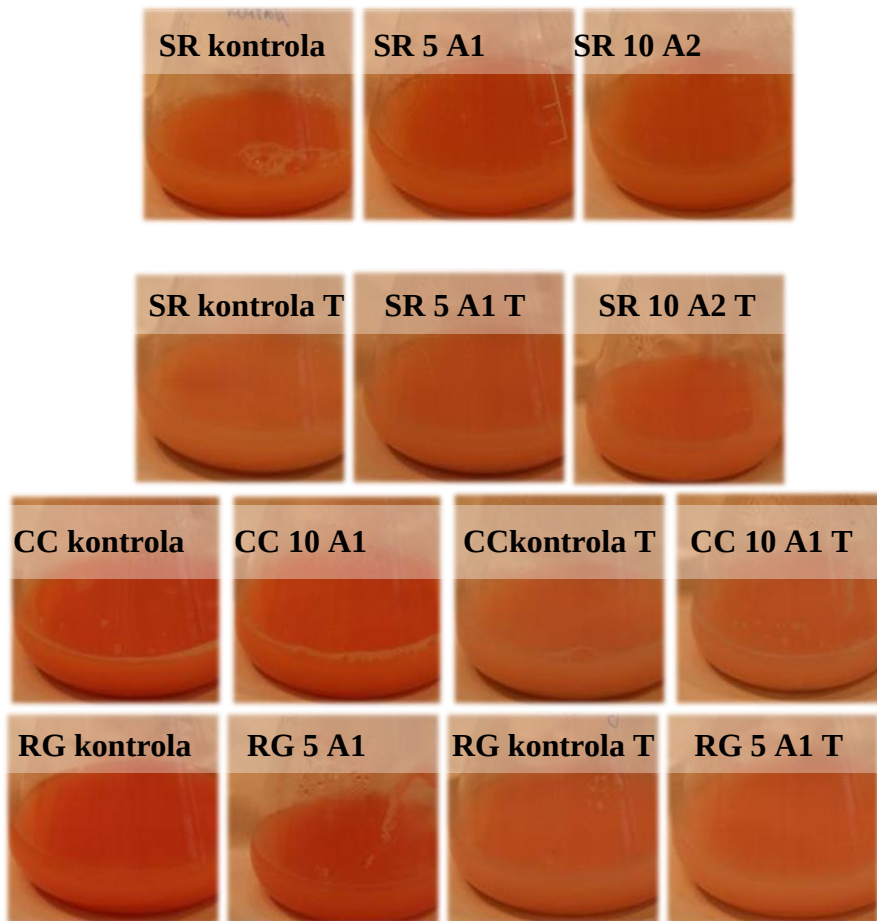
Obr. 31 zachycuje mutantní i standardní kmeny karotenogenních kvasinek kultivovaných jak na glukosovém produkčním médiu, tak na těstovinovém produkčním médiu.



Obr. 31: Morfologie mutantních a standardních kmenů karotenogenních kvasinek

Opět je zde patrné jisté shlukování buněk mutantních kmenů ve větší míře, než může být pozorováno u standardních kmenů. Tento trend byl sledovaný zejména u mutantních kmenů a je patrný u obou typů produkčních médií. Mutantní kmeny se od standardních kmenů liší silnější buněčnou stěnou a pravidelnějším tvarem, zejména při srovnání standardních a mutantních kmenů *R.aurantiaca* a *C. capitatum* na glukosovém

médiu. V případě média obsahujícího jako jediný zdroj uhlíku těstoviny bylo sledováno jisté zvětšení velikosti buněk jak standardních, tak i mutantních kmenů, u nichž je tento jev výraznější, jak lze vidět zejména u mutantních kmenů *S. roseus*.



Obr. 32: Rozdílnost zabarvení produkčních médií mutantních a standardních kmenů

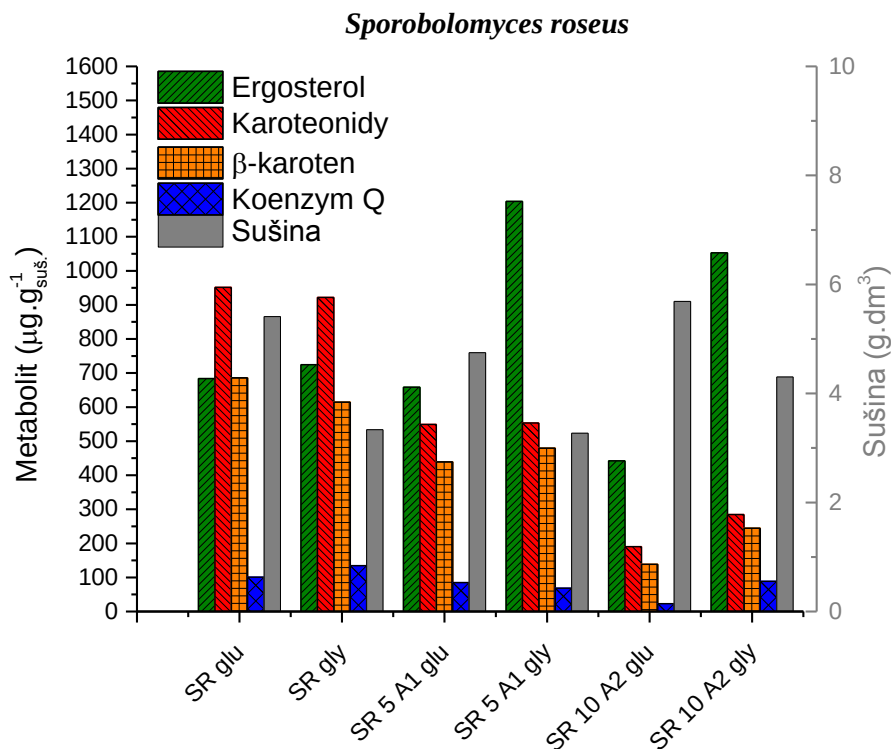
Zbarvení jednotlivých produkčních médií mutantních i standardních kmenů (Obr. 32) se výrazně neliší. Odlišnosti lze sledovat pouze ve zbarvení typů produkčních médií. Těstovinová média mají na rozdíl od glukosových světlejší zbarvení a jsou více zakalená, což je dáno rozkladem těstovin na škrobnaté produkty vlivem sterilace a působením extracelulárních enzymů kvasinek při kultivaci.

5.2.2 Sledování stability produkčních vlastností mutantních kmenů

Karotenogenní kvasinky dokáží produkovat celou řadu významných látek od esenciálních nenasycených mastných kyselin až po antioxidanty. Analyzované mutantní kmeny byly sledovány nejen z hlediska jejich schopnosti produkce karotenoidů a β -karotenu, ale také z hlediska schopnosti produkce ergosterolu jako provitaminu D a koenzymu Q jako významného antioxidantu. Zároveň byly aktuální produkční vlastnosti

mutantních kmenů porovnávány s jejich produkčními vlastnostmi ihned po jejich mutaci. Je třeba také podotknout, že mutantní kmeny byly skladovány při 4 °C po dobu téměř jednoho roku, přičemž byly několikrát přeočkovány pro udržení vitality a pak oživeny pro ověření jejich schopnosti si udržet své původní vlastnosti. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 13.

5.2.2.1 Produkce sledovaných metabolitů na glycerolovém médiu



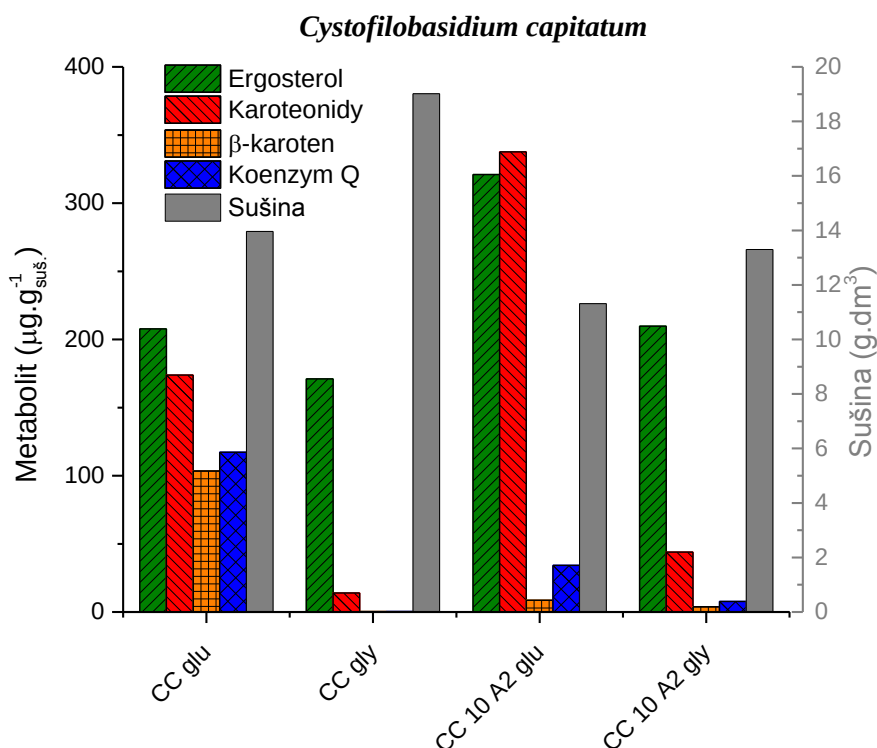
Obr. 33: Produkce významných metabolitů a biomasy pro referenční a mutantní kmeny *Sporobolomyces roseus*

Z hlediska produkce všech metabolitů byly úspěšnější všechny kmeny *Sporobolomyces roseus* kultivované na glycerolových médiích.

Produkce koenzymu Q je pro mutantní kmeny karotenogenních kvasinek shodná nebo nižší (přičemž nejvýznamnějším poklesem vykazuje kmen SR 10 A2 na glukózovém médiu) než v referenčních kmenech kultivovaných na glycerolu a glukóze. Produkce koenzymu Q referenčního kmenu SR pro kultivace na glycerolovém i glukózovém médiu se prakticky shodují.

Za nejvýznamnějšího producenta biomasy lze označit mutantní kmen SR 10 A2, který však zároveň disponuje nejnižší produkcí žádaných metabolitů. Nejnižší produkce biomasy byla zaznamenána pro mutantní kmen SR 5 A1 kultivovaný na glycerolovém médiu, který se naopak vyznačuje nejvyšší produkcí ergosterolu a nejvyšší produkcí žádaných metabolitů z mutantních kmenů SR karotenogenních kvasinek.

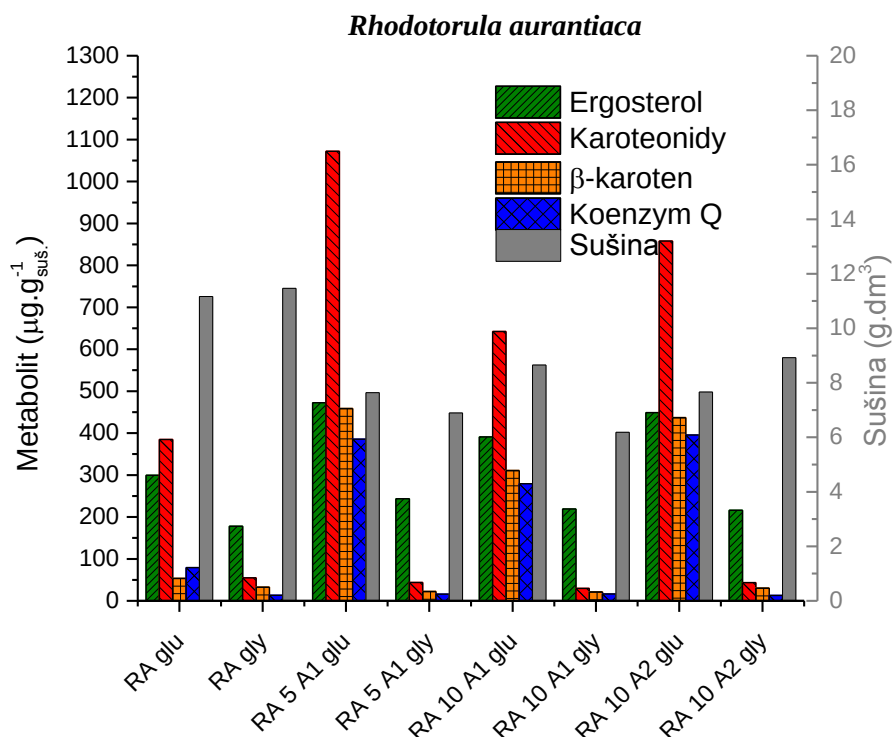
Celkově nejvyšší produkce sumárních karotenoidů byla zaznamenána pro referenční kmeny SR. Se zvyšujícím se obsahem mutagenního činidla použitého k mutaci kar. kvasinek kmene SR výrazně klesá produkce karotenoidů. Obdobný trend lze pozorovat i pro produkci β -karotenu. Mutantní kmeny *S.roseus* si tedy po dlouhodobém uchovávání neudržely schopnost nadprodukce karotenoidů. Zajímavá je vysoká produkce ergosterolu u mutantů *S.roseus* kultivovaných na glycerolových médiích, což by odpovídalo intenzivní reakci buněk na stresové podmínky pomocí změny produkce membránových sterolů a remodelingu membrán



Obr. 34: Produkce významných metabolitů a biomasy pro referenční a mutantní kmeny *Cystofilobasidium capitatum*

Produkce požadovaných metabolitů u kmene *C.capitatum* nebyla příliš vysoká. Nejvyšší produkce byla dosažena u mutantního kmene CC 10 A2 na glukosovém médiu, zatímco na glycerolovém médiu byla obecně produkce velmi nízká.

Nejvyšší obsah celkových karotenoidů a ergosterolu vyprodukoval mutantní kmen CC 10 A2 na glukosovém médiu a ve srovnání se standardním kmenem kultivovaným na glukosovém médiu měl druhou nejlepší produkci tohoto kmene. Nejvyšší nárůst biomasy byl dosažen u standardního kmene na glycerolovém médiu a velmi dobrých výtěžků bylo dosaženo i u mutantních kmenů, a to zejména na glycerolu. Lze konstatovat, že mutantní kmen CC 10A2 si i po dlouhodobém uchovávání zachoval některé nadprodukční vlastnosti, které se ale projevují spíše na glukózovém médiu.



Obr. 35: Produkce významných metabolitů a biomasy pro referenční a mutantní kmeny *Rhodotorula aurantiaca*

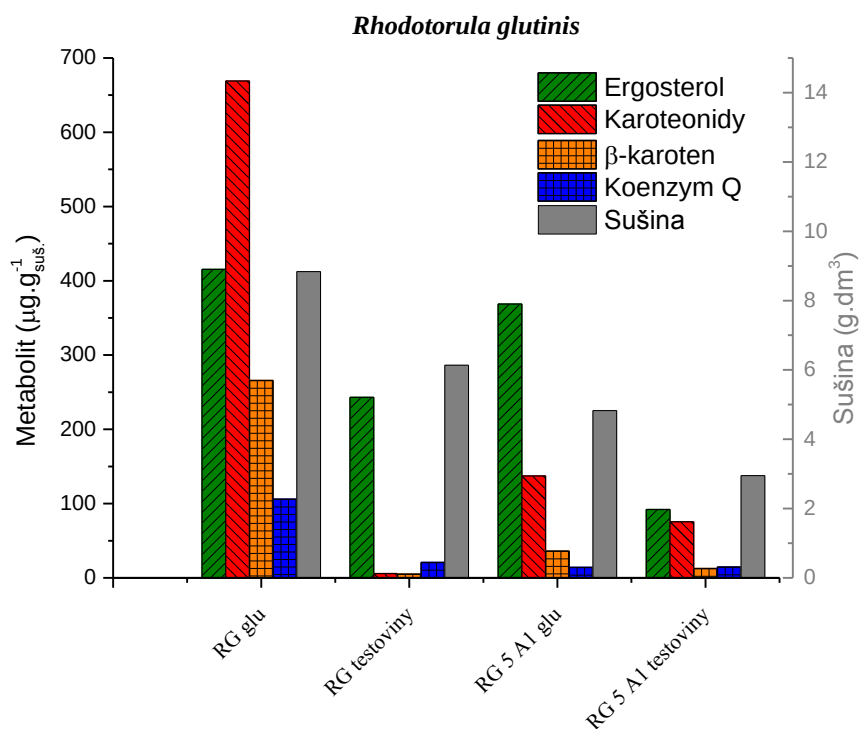
Z výsledků produkce metabolitů kmene *R. aurantiaca* (viz Obr. 35) je patrné, že mutantní kmeny měly zvýšenou produkci všech sledovaných metabolitů, a to zejména na glukosovém médiu.

Nejlepším producentem karotenoidů i β-karotenu byl kmen RA 5 A1 kultivovaný na glukosovém médiu, který měl více než dvojnásobnou produkci karotenoidů a β-karotenu než standardní kmen. Tento kmen byl obecně velmi dobrým producentem sledovaných metabolitů, protože jeho produkce ergosterolu i koenzymu Q byla také výrazně vyšší než u standardního kmene. Produkce všech sledovaných metabolitů byla velmi dobrá i u ostatních mutantních kmenů kultivovaných na glukosovém médiu.

Ve srovnání s produkcí na glukosovém médiu byla produkce sledovaných metabolitů na glycerolovém médiu nižší. Produkce biomasy u mutantních kmenů byla nejvyšší u kmene RA 10 A2 na glycerolovém médiu, nicméně nepřesáhla produkci standardního kmene na glycerolu, která byla nejvyšší pro tento kmen. Lze opět sledovat zvýšenou produkci metabolitů u mutantních kmenů, u kterých byla na mutaci použita nižší koncentrace mutagenu.

Celkově lze shrnout, že produkce analyzovaných metabolitů u mutantních kmenů adaptovaných na glycerol jako zdroj uhlíku byla velmi dobrá zejména u kmenů *R. aurantiaca* a *S. roseus* velmi dobrá. Nejlepšími mutantními producenty ergosterolu byly kmeny SR 5 A1 a SR 10 A2 kultivované na glycerolu ($601,8$ a $526,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny), dobrými producenty byly i kmeny *R. aurantiaca*, které dosahovaly téměř dvojnásobného množství než standardní kmeny. Selektované mutanty *R. aurantiaca* vynikají kromě produkce ergosterolu také nejlepší produkcí celkových karotenoidů, β -karotenu a koenzymu Q na glukosovém médiu a nejhorší producenti těchto metabolitů na glycerolu. Nejlepšími producenty β -karotenu a dobrými producenty karotenoidů byly mutantní kmeny *S. roseus*, které byly téměř srovnatelné s divokými kmeny. Z hlediska největší produkce biomasy byly nejlepšími mutantní kmeny *C. capitatum*.

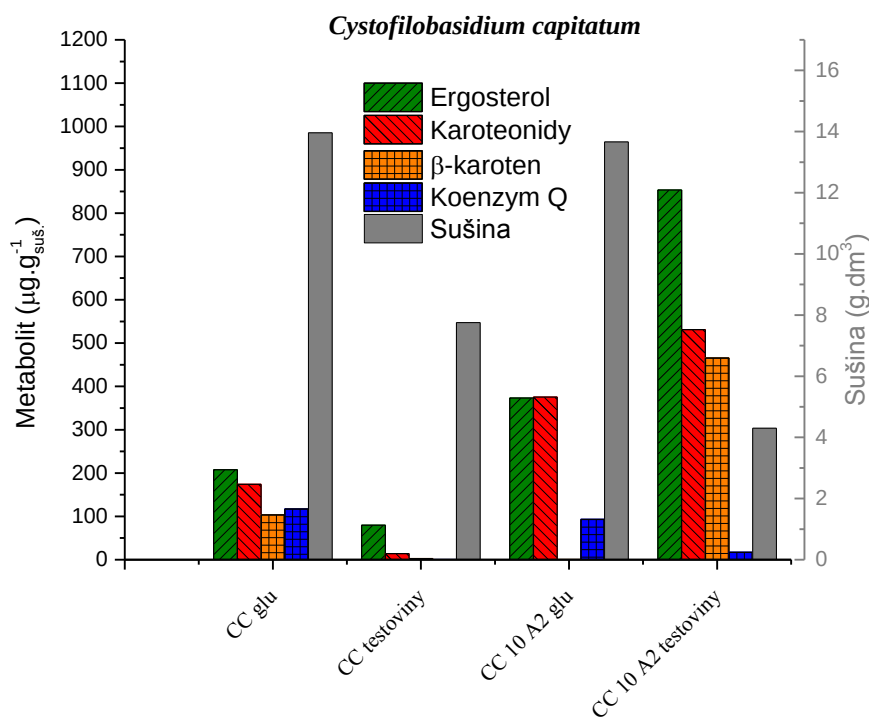
5.2.2.2 Produkce sledovaných metabolitů na těstovinovém médiu



Obr. 36: Produkce významných metabolitů a biomasy pro referenční a mutantní kmeny *Rhodotorula glutinis*

Standardní i mutantní kvasinky kmene *R. glutinis* vyprodukovaly vyšší množství metabolitů opět na glukosovém médiu, produkce metabolitů na těstovinách byla velmi nízká (viz Obr. 36). Nejnížší produkci karotenoidů i β -karotenu vykazoval kontrolní kmen kultivovaný na těstovinách, ve srovnání s tímto kmenem měl mutantní kmen RG5

A1 kultivovaný na těstovinách i více než desetkrát vyšší produkci karotenoidů. Tento kmen adaptovaný na těstovinové médium si tedy dlouhodobě zachoval vyšší produkční vlastnosti než kontrolní kmen. Z hlediska produkce koenzymu Q byl nejlepším producentem standardní kmen na glukozovém médiu. I v případě biomasy byla lepším substrátem glukosa než těstoviny jak u standardních, tak i mutantních kmenů.

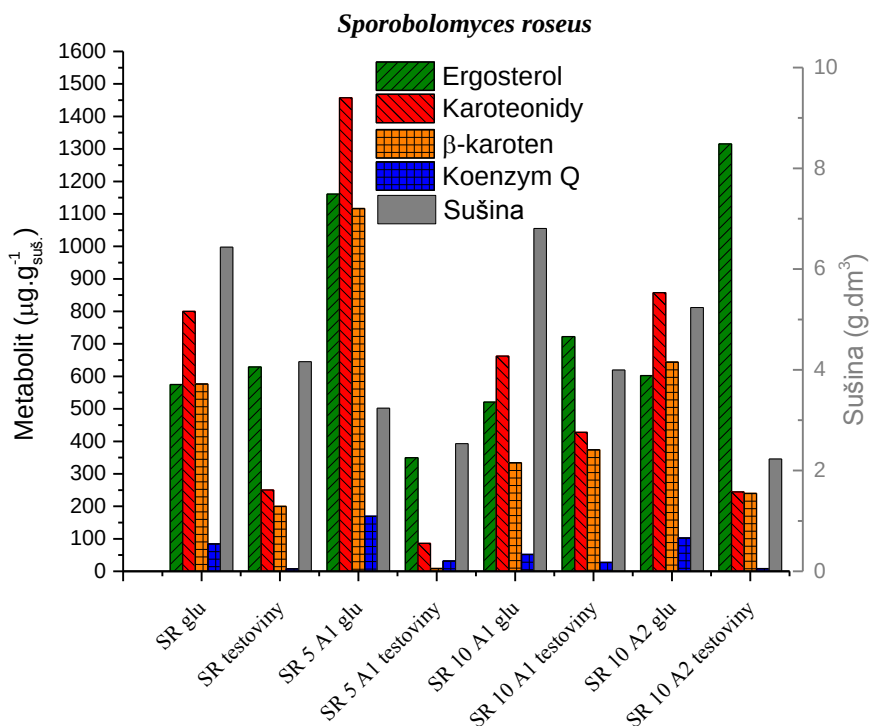


Obr. 37: Produkce významných metabolitů a biomasy pro referenční a mutantní kmeny *Cystofilobasidium capitatum*

Obr. 37 zobrazuje výsledky produkci jednotlivých metabolitů pro mutantní i referenční kmeny *C. capitatum*. Mutantní kmen *C. capitatum* vykazoal velmi dobrou produkci sledovaných metabolitů v případě obou typů substrátu. Nejlepším producentem je tedy mutantní kmen CC 10 A2 kultivovaný na těstovinách i na glukose. Tento kmen totiž vykazoal nejvyšší produkci ergosterolu, karotenoidů a zejména β-karotenu ve srovnání s kontrolním kmenem. V případě glukozového média poklesla výrazně produkce β-karotenu a vzrostla koncentrace koenzymu Q. V případě nárůstu biomasy bylo pro referenční i mutantní kmen výhodnější glukozové médium.

Sloupcový graf na Obr. 38 zobrazuje naměřená data pro produkci jednotlivých metabolitů mutantními i standardními kmeny *S. roseus*. Kultivace referenčních i mutantních kvasinek kmene *S. roseus* na glukozovém i těstovinovém médiu opět prokazuje vyšší produkce metabolitů na glukozovém médiu. Zajímavým jevem u mutantních kmenů je, že s rostoucí koncentrací mutagenu, s jakým byly dříve mutantní kmeny připraveny, klesá produkce karotenoidů a ergosterolu na glukozovém médiu.

Nejlepším producentem karotenoidů, ergosterolu i koenzymu Q je kmen SR 5 A1, který dokonce převyšuje svojí produkcí referenční kmen. Nadprodukční vlastnosti ergosterolu prokázal mutantní kmen SR 10 A2 kultivovaný na odpadním substrátu. Produkční vlastnosti mutantních kvasinek tohoto kmene byly velmi dobré jak na glukose, tak na těstovinách; jedinou výjimkou je mutantní kmen SR 5 A1 kultivovaný na těstovinách. Tento kmen vykazoval nejnižší produkce všech metabolitů. Zajímavým faktem je, že tento kmen na glukozovém médiu měl naopak nejlepší produkční vlastnosti z hlediska produkce všech sledovaných metabolitů.



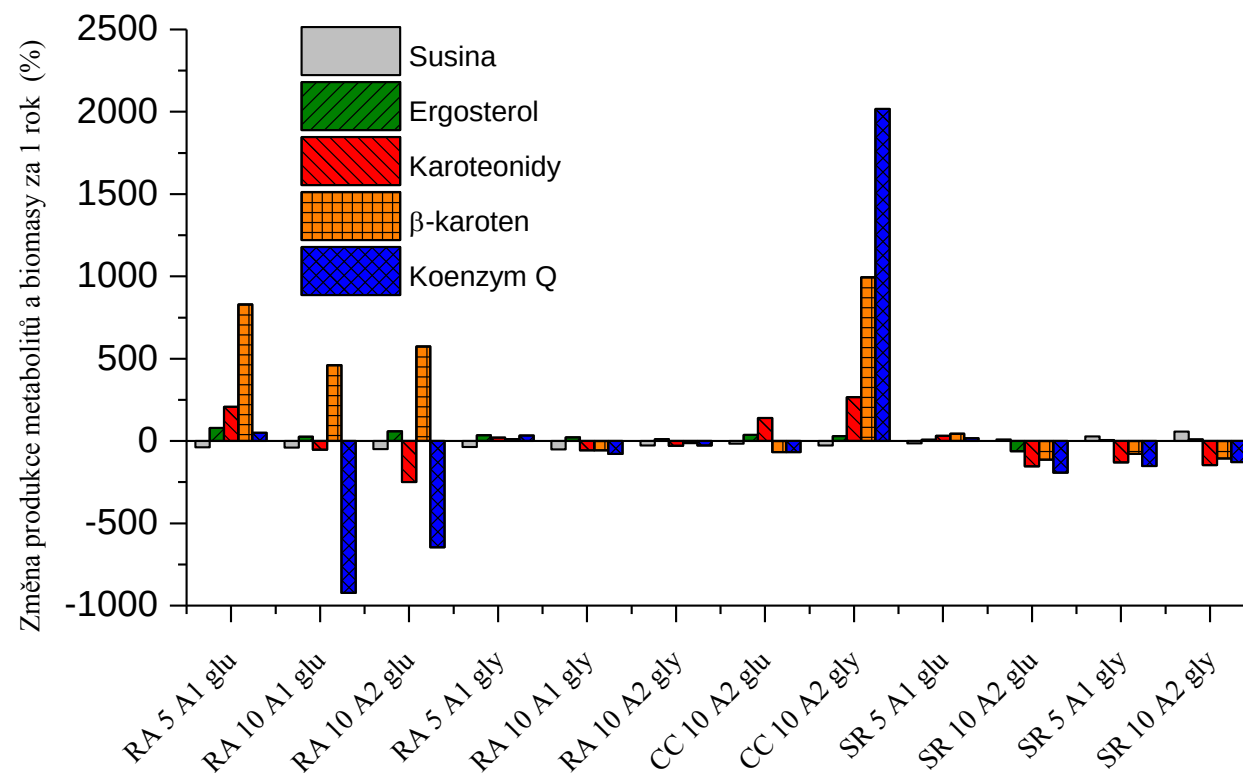
Obr. 38: Produkce významných metabolitů a biomasy pro referenční a mutantní kmeny *Sporobolomyces roseus*

Při celkovém vyhodnocení kultivace mutantních kmenů na těstovinovém médiu lze označit jako nejlepšího producenta ergosterolu, karotenoidů i β-karotenu mutantní kmeny *S. roseus* kultivované na glukose i na těstovinách. Velmi dobrým producentem ve srovnání s kontrolním nezmutovaným kmenem na těstovinovém i glukosovém médiu byl mutantní kmen *C.capitatum*; tento kmen je zároveň nejlepším producentem biomasy.

Srovnání s původními produkčními vlastnostmi

Vzhledem ke skutečnosti, že produkce metabolitů karotenogenními kvasinkami není konstantní mezi časově vzdálenými kultivacemi, byly původní data a nově získané výsledky srovnány následujícím způsobem. Data získána metodou RP-HPLC/PDA pro referenční kmeny (kontrola) byly uvažovány pro danou kultivaci jako 100% produkce daného metabolitu. Ostatní produkce (vždy příslušného kmene) byly k této hodnotě vztaženy a představovaly buď vyšší, nebo nižší produkci vyjádřenou v relativních jednotkách. Hodnoty byly vyhodnoceny jak pro aktuálně zpracovaná data (data získaná v průběhu této diplomové práce), tak pro data původní, získaná pro kultury před jedním rokem [50]. Hodnota získané nadprodukce, resp. podprodukce vůči referenci pro historická data byla pak odečtena od hodnot aktuálních. Tím byla získána informace o změně produkčních vlastností mutagenních kmenů za období jednoho roku, což je reprezentováno grafy na obrázcích *Obr. 39*, respektive *Obr. 40*.

Změna produkčních vlastností mutantních kmenů kultivovaných na glycerolu



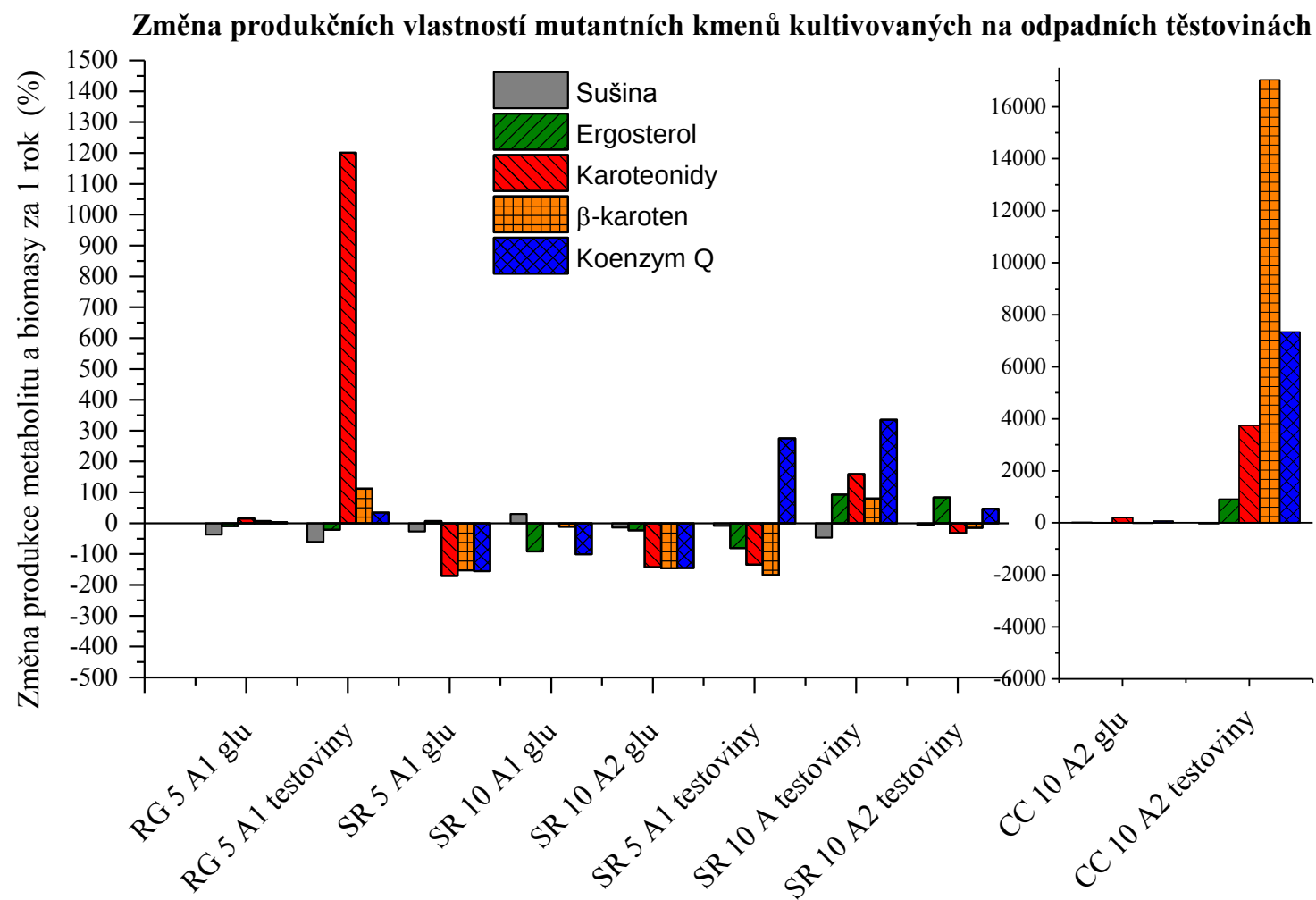
Obr. 39: Změna produkčních vlastností mutantních kmenů kultivovaných na glycerolu

Při srovnání aktuálních produkčních vlastností mutantních kmenů s jejich původními vlastnostmi, které tyto kmeny měly téměř ihned po mutaci pomocí EMS, je patrné, že v případě kultivace těchto kmenů na glycerolovém médiu nastaly největší změny v případě kmenů některých *R. aurantiaca* a *C. capitatum*. U těchto kmenů byla zaznamenána odlišná produkce zejména β -karotenu a koenzymu Q. V případě mutantních kmenů *R. aurantiaca* kultivovaných na glukose byla prokázána zvýšená produkce β -karotenu a snížená produkce koenzymu Q ve srovnání s předchozími vlastnostmi. Produkční vlastnosti mutantního kmene *C. capitatum* byly zvýšené pro produkci β -karotenu i koenzymu Q na glycerolovém médiu. Tyto hodnoty představují nejvyšší změnu v nadprodukčních vlastnostech ze všech kmenů ve srovnání s původními vlastnostmi. Nadprodukční mutantní formy z hlediska produkce β -karotenu jsou RA 5 A1, RA 10 A 1 a RA 10 A2 na glukosovém médiu a na glycerolovém médiu kmen CC 10 A2, který byl nadprodukční i pro celkové karotenoidy a koenzym Q. U mutantních kmenů *S. roseus* byly v menší míře zaznamenány nižší produkce všech analyzovaných metabolitů, a to konkrétně pro SR 10 A1 na glycerolovém médiu a pro SR 10 A2 na glukosovém i glycerolovém médiu. Data jsou vizualizována v grafu na Obr. 39.

Obr. 40 uvádí rozdílnost vlastností mutantních kmenů kultivovaných na těstovinách ve srovnání s jejich původními vlastnostmi. U těchto mutantních kmenů byly produkční vlastnosti velmi rozdílné ve srovnání s původními vlastnostmi. Největší změny produkčních vlastností byly prokázány u kmenů *R. glutinis* a *C. capitatum*. Mutantní kmen *R. glutinis* kultivovaný na těstovinách měl výraznou nadprodukcí celkových karotenoidů a mírnou nadprodukcí β -karotenu. V případě kmene *C. capitatum* byla výrazně zvýšená produkce β -karotenu, celkových karotenoidů, koenzymu Q i ergosterolu. Produkce všech sledovaných metabolitů u mutantního kmene *S. roseus* byla snížena vůči původní zejména na glukosových médiích u kmenů SR 5 A1 a SR 10 A2. V případě těstovinových médií byla u mutantních kmenů *S. roseus* zaznamenána zvýšená produkce koenzymu Q (kmeny SR 5 A1 a SR 10 A1).

Mutantní kmeny karotenogenních kvasinek kultivované na glycerolovém a těstovinovém médiu mají pozměněné produkční vlastnosti vůči jejich předchozím vlastnostem těsně po mutaci. Obecně si mutanty adaptované na těstovinové médium zachovaly nadprodukční vlastnosti ve větší míře než v případě glycerolu, dlouhodobá stabilita těchto mutantů byla rovněž vyšší.

Produkční vlastnosti kmenů, *R. aurantiaca*, *R. glutinis* a *C.capitatum* byly zaznamenány jako vyšší při porovnání s jejich původními vlastnostmi pro produkci zejména β -karotenu. Mutantní kmeny *S.roseus* měly v případě kultivace na glycerolu mírně sníženou produkci všech metabolitů a v případě kultivace na těstovinách byla u těchto kmenů zaznamenána zvýšená produkce koenzymu Q. Změny produkčních vlastností mutantních kmenů mohou být způsobeny dalšími samovolnými mutacemi. Jinou možností může být vliv vnějších faktorů, protože kvasinky byly dlouhodobě uchovávány při nízkých teplotách. Ověření původu změny těchto vlastností může být provedeno v navazujících pracích například pomocí molekulárních technik.



Obr. 40: Změna produkčních vlastností mutantních kmenů kultivovaných na těstovinách

Tab. 13: Tabulka produkce metabolitů a biomasy mutantními i standardními kmeny kvasinek

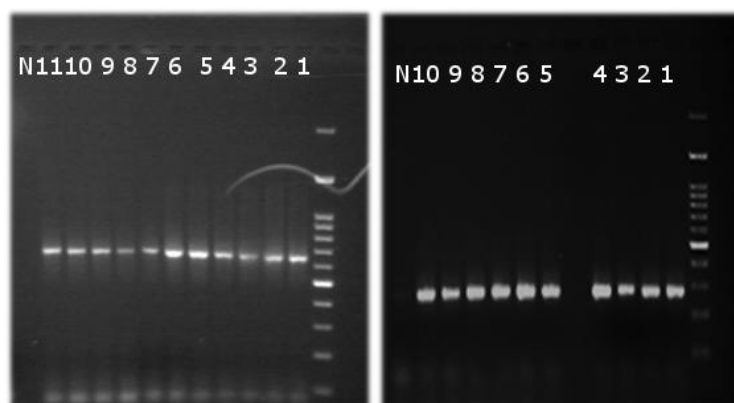
Médium	Kmen	Sušina g.dm ⁻³	Ergosterol μg.g ⁻¹ suš.	Karotenoidy μg.g ⁻¹ suš.	β-karoten μg.g ⁻¹ suš.	Koenzym Q μg.g ⁻¹ suš.
Glycerol	RA glu	11,17	299,65	384,89	53,61	79,13
	RA gly	11,47	177,93	54,82	32,86	13,44
	RA 5 A1 glu	7,64	472,48	1072,30	458,68	385,56
	RA 5 A1 gly	6,90	243,50	43,95	22,34	16,16
	RA 10 A1 glu	8,65	390,92	642,44	310,81	279,15
	RA 10 A1 gly	6,18	219,15	29,69	21,17	16,36
	RA 10 A2 glu	7,66	448,76	858,02	437,18	395,47
	RA 10 A2 gly	8,92	216,04	43,41	30,51	13,05
	CC glu	13,96	207,71	173,90	103,55	117,20
	CC gly	19,01	171,03	13,99	0,39	0,35
	CC 10 A2 glu	11,31	320,95	337,65	8,69	34,28
	CC 10 A2 gly	13,30	209,77	44,01	3,93	7,74
	SR glu	5,41	683,67	951,40	685,88	100,80
	SR gly	3,34	724,46	921,97	614,88	134,74
	SR 5 A1 glu	4,75	658,50	549,10	439,43	85,07
	SR 5 A1 gly	3,27	1203,60	553,50	479,64	68,32
	SR 10 A2 glu	5,69	442,02	190,33	138,69	22,89
	SR 10 A2 gly	4,30	1052,57	284,75	244,62	88,60
Těstoviny	RG glu	8,84	415,31	669,01	265,91	106,14
	RG těstoviny	6,13	243,07	5,86	5,22	20,80
	RG 5 A1 glu	4,83	368,77	137,25	36,15	14,10
	RG 5 A1 těstoviny	2,95	92,14	75,47	12,66	14,63
	CC glu	13,96	207,71	173,90	103,55	117,20
	CC těstoviny	7,75	79,57	14,01	2,73	0,23
	CC 10 A2 glu	13,66	373,22	375,54	0,51	93,25
	CC 10 A2 těstoviny	4,30	853,34	530,98	465,85	17,28
	SR glu	6,43	574,81	799,92	576,68	84,75
	SR těstoviny	4,16	629,10	250,06	200,09	7,97
	SR 5 A1 glu	3,24	1160,84	1457,46	1116,71	169,80
	SR 5 A1 těstoviny	2,53	349,53	86,24	8,68	31,77
	SR 10 A1 glu	6,81	520,81	662,12	334,27	51,98
	SR 10 A1 těstoviny	4,00	722,46	428,02	374,37	27,58
	SR 10 A2 glu	5,24	602,49	857,71	644,09	102,68
	SR 10 A2 testoviny	2,23	1315,28	244,32	239,73	8,57

5.2.2.3 Sledování molekulárních změn mutantních kmenů

K pozorování molekulárních změn u mutantních kmenů v oblasti D1/D2 genu kódující velkou ribosomální podjednotku 26S rDNA bylo použito spojení metod nested PCR a následná analýza PCR produktů pomocí metody DGGE. Analyzovány byly mutantní kmeny adaptované na glycerol i těstoviny.

5.2.2.4 Nested PCR D1/D2 rDNA oblasti

Metodou nested PCR byla amplifikována oblast D1/D2 rDNA. V prvním amplifikačním kroce byly použity primery NL1/NL4 a získaný PCR produkt byl následně použit jako templát pro druhý amplifikační krok s použitím primerů NL1-GC/LS2. Produkty byly kontrolovány pomocí agarosové gelové elektroforézy (viz Obr. 41).



Obr. 41: Vlevo PCR produkty 1. amplifikačního kroku, vpravo PCR produkty 2. amplifikačního kroku u mutantních kmenů (popisky viz Tab. 14)

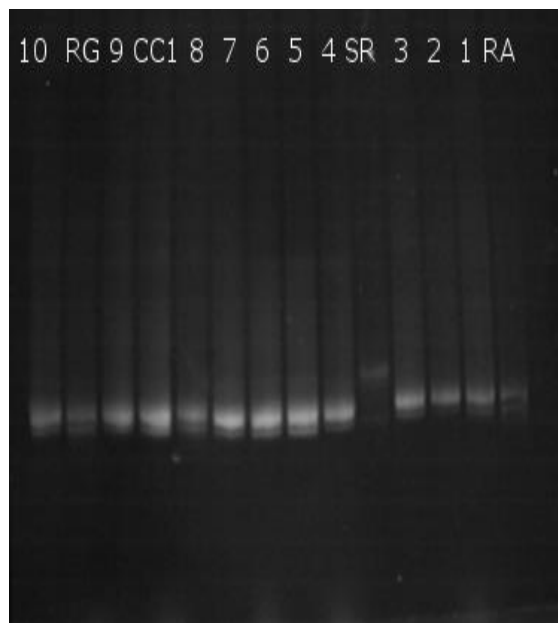
Velikost PCR produktů prvního amplifikačního kroku odpovídala přibližně velikosti 650 bp; PCR produkty druhého amplifikačního kroku odpovídají velikosti přibližně 280 bp (viz Obr. 41).

Tab. 14: Značení vzorků na obrázcích (Obr. 41 a Obr. 42)

Označení	Kmen	Označení	Kmen
1	RA 5 A2 gly	7	SR 10 A2 gly
2	RA 10 A1 gly	8	CC 10 A2 test.
3	RA 10 A2 gly	9	CC 10 A2 gly
4	SR 5 A1 test	10	RG 5 A1 test
5	SR 10 A2 test	11	SR
6	SR 5 A1 gly	N	Negativní kont.

5.2.2.5 DGGE D1/D2 rDNA oblasti

Pro analýzu mutantních kmenů byl zvolený akrylamidový gel o poměru AA/BIS 19:1 s denaturačním gradientem od 30-45 % denaturačních činidel. Separace v akrylamidovém gelu probíhala po dobu 6 hodin při vloženém napětí 110 V a 140 mA.



Obr. 42: Analýza oblasti D1/D2 rDNA mutantních kmenů pomocí DGGE (popisky viz Tab. 14.)

Výsledky analýzy DGGE zobrazené na Obr. 42 dokazují odlišnosti mutantních kmenů od standardních pouze v případě kmene *S. roseus*, u kterého mutace nejspíše ovlivnily sekvenci oblasti D1/D2. U ostatních kmenů však zůstaly tyto sekvence ve srovnání se standardními kmeny nezměněné.

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová byla zaměřena na charakterizaci karotenogenních kvasinek pomocí molekulárních technik. Použitými molekulárními technikami byly nested PCR, denaturační gradientová gelová elektroforéza a pulzní gelová elektroforéza. Těmito technikami byly analyzovány kmeny karotenogenních kvasinek *R. glutinis*, *R. mucilaginosa (rubra)*, *R. aurantiaca*, *S. roseus*, *S. salmonicolor*, *S. shibatanus* a *Phaffia rhododroma*. Spojení metod PCR a DGGE bylo použito pro analýzu konzervovaných úseků rDNA, kterými byly D1/D2 oblast velké ribosomální podjednotky 26S a regionů ITS1 a 5,8-ITS2. Pro analýzu ITS1 a 5,8-ITS2 oblasti rDNA byla provedena optimalizace teplot annealingu při PCR reakci, která byla experimentálně stanovena na 60 °C pro obě oblasti a kroky nested PCR. Dále byla optimalizována metoda DGGE pro rozlišení těchto oblastí v denaturačním gradientu. Jako optimální denaturační rozmezí bylo experimentálně stanoveno 30-45 % denaturačních činidel a optimální doba separace při napětí 110 V na 6 hodin pro ITS1 i pro 5,8-ITS2 oblast. Z výsledků DGGE pro veškeré analyzované oblasti rDNA vyplývá, že všechny analyzované kmeny karotenogenních kvasinek mají velmi podobnou sekvenci těchto oblastí. Výjimku tvoří pouze kmen *S.roseus*. Tyto závěry jsou podpořeny výsledky ze sekvenování oblastí D1/D2 a 5,8-ITS2 analyzovaných kvasinkových kmenů, které potvrzují vysokou podobnost karotenogenních kvasinek na úrovni genových sekvencí a odlišnost kmene *S.roseus*.

K určení karyotypu karotenogenních kvasinek metodou PFGE byla optimalizována izolace intaktní chromozomální DNA v závislosti na době kultivace a množství buněk. Nejlepších výsledků bylo dosaženo pro dobu kultivace karotenogenních kvasinek 75 hodin množství buněk $1 \cdot 10^{10}$. Pro separaci jednotlivých chromozomů byly dále optimalizovány pulzní časy, doba separace, vložené napětí a koncentrace agarosového gelu. Ideální podmínky separace byly experimentálně stanoveny (doba separace 75 hod, parametry: 150s/15hod, 200 s/20hod, 250 s/20hod, 300 s/20 hod; 1% agarosový gel, 130 V). Při těchto podmínkách bylo separováno dvanáct chromozomálních frakcí u kmene *R.aurantiaca*, jedenáct frakcí u *R.mucilaginosa* a deset chromozomálních frakcí u kmene *S.salmonicolor*. Z výsledků separace je patrné, že se od sebe tyto kmeny liší různou velikostí některých chromozomů a je tedy možné tyto kmeny na základě metody PFGE odlišit. Pro lepší rozdělení a analýzu karyotypů všech kmenů karotenogenních kvasinek by měla být v příštích experimentech dále optimalizována zejména izolace intaktní DNA.

Další část diplomové práce byla zaměřená na sledování změn produkčních vlastností mutantních kmenů karotenogenních kvasinek předem adaptovaných na odpadní substráty jakými byly těstoviny a glycerol. Mutantní kmeny byly připraveny v předchozích pracích. Při srovnávání aktuálních produkčních vlastností mutantních kmenů s jejich původními vlastnostmi si nadprodukční vlastnosti dlouhodobě udržely mutantní kmeny *R. aurantiaca*, *R. glutinis* a *C.capitatum* pro produkci zejména β -karotenu. Mutantní kmeny *S.roseus* měly v případě kultivace na glycerolu mírně sníženou produkci všech

metabolitů a v případě kultivace na těstovinách byla u těchto kmenů zaznamenána zvýšená produkce koenzymu Q. U mutantních kmenů byla provedena i analýza na molekulární úrovni, kde byly analyzovány sekvence oblastí D1/D2 rDNA pomocí metody DGGE. Z výsledků metody DGGE vyplývá, že u mutantních kmenů nastaly změny na úrovni sekvencí oblastí D1/D2 rDNA pouze u kmene *S.roseus*.

LITERATURA

- [1] KURTZMAN, Cletus. 2011. *The yeasts: a taxonomic study*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, xxii, 289, 48, 178 s. ISBN 978-012-3847-089.
- [2] GADANHO, M a J SAMPAIO. 2002. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus: sensu stricto and comb. nov. *FEMS Yeast Research* [online]. Roč. 2, č. 1, s. 47-58 [cit. 2013-04-22]. DOI 10.1016/S1567-1356(01)00062-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567135601000629>
- [3] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. 1990. *Taxonómia kvasinek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo Alfa, 699 s., [72] s. obr. príl. ISBN 80-050-0644-6.
- [4] KURTZMAN, C a Jack W FELL. c2000. *The yeasts: a taxonomic study*. 4th ed. New York: Elsevier, xviii, 1055 p. ISBN 04-448-1312-8.
- [5] AGEITOS, Jose Manuel, Juan Andres VALLEJO, Patricia VEIGA-CRESPO a Tomas G. VILLA. 2011. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. Roč. 9, č. 4, s. 1219-1227 [cit. 2013-04-22]. DOI 10.1007/s00253-011-3200-z. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-011-3200-z>
- [6] *Rhodotorula mucilaginosa* colony. *Medical Mycology Research Center* [online]. n. d. 2010. [cit. 2013-04-22]. Dostupné z: http://www.pf.chiba-u.ac.jp/gallery/fungi/r/Rhodotorula_mucilaginosa_colony.htm
- [7] YANG, Shi-Ping, Zao-He WU a Ji-Chang JIAN. 2011. Distribution of Marine Red Yeasts in Shrimps and the Environments of Shrimp Culture. *Current Microbiology* [online]. Roč. 6, č. 5, s. 1638-1642 [cit. 2013-04-22]. DOI 10.1007/s00284-011-9910-8. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-011-9910-8>
- [8] HÁRONIKOVÁ, Andrea. *Mikrobiální produkce karotenoidních pigmentů s využitím odpadních substrátů: Microbial production of carotenoid pigments using waste substrates*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010. 92 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta Chemická.
- [9] YURKOV, A. M., M. M. VUSTIN, B. V. TYAGLOV, I. A. MAKSIMOVA a S. P. SINEOKIY. 2008. Pigmented basidiomycetous yeasts are a promising source of carotenoids and ubiquinone Q10. *Microbiology* [online]. Roč. 7, č. 1, s. 1-6 [cit. 2013-04-22]. DOI 10.1134/S0026261708010013. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S0026261708010013>
- [10] MONTANTI, Justin, Nhuan P. NGHIEM a David B. JOHNSTON. 2011. Production of Astaxanthin from Cellulosic Biomass Sugars by Mutants of the Yeast *Phaffia rhodozyma*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. Roč. 16, č. 5, s. 655-665 [cit. 2013-04-22]. DOI 10.1007/s12010-011-9165-7. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12010-011-9165-7>

- [11] GONZALEZ-GARCIA, Yolanda, Rafael HERNANDEZ, Gouchang ZHANG, Froylan M.E. ESCALANTE, William HOLMES a W. Todd FRENCH. 2013. Lipids accumulation in *Rhodotorula glutinis* and *Cryptococcus curvatus* growing on distillery wastewater as culture medium. *Environmental Progress* [online]. Roč. 3, č. 1, s. 69-74 [cit. 2013-04-23]. DOI 10.1002/ep.10604. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ep.10604>
- [12] VELÍŠEK, Jan. 2009. *Chemie potravin II*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, xxii, 580 s. ISBN 978-80-86659-17-6
- [13] *Biopolymers*. 2001. Weinheim: Wiley-VCH, 425 s. ISBN 35-273-0221-2
- [14] SOLOMONS, T a Craig B FRYHLE. c2004. *Organic chemistry*. 8th ed. /. Hoboken, NJ: J. Wiley, 1 v. (various pagings). ISBN 04-714-1799-8.
- [15] BRITTON, GEORGE. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *tructure and properties of carotenoids in relation to function* [online]. - [cit. 2013-05-05]. ISSN 1551-1558. Dostupné z: <http://www.fasebj.org/content/9/15/1551.full.pdf+html>
- [16] VELÍŠEK, Jan. 2009. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, xx, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [17] VELÍŠEK, Jan a Karel CEJPEK. 2008. *Biosynthesis of food components*. 1st ed. Tábor: OSSIS, xii, 497 s. ISBN 978-80-86659-12-1.
- [18] Oxfojournals. 2009. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway: Genome database. *The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases* [online]. [cit. 2013-04-22]. Dostupné z: http://nar.oxfordjournals.org/content/38/suppl_1/D473.full.pdf+html
- [19] GREGORY M. MUELLER, Gregory M.Gerald F. 2004. *Biodiversity of fungi inventory and monitoring methods*. [Online-Ausg.]. Amsterdam: Elsevier Academic Press. ISBN 00-804-7026-2.
- [20] MARTIN, Kendall J.. 2007. Introduction to Molecular Analysis of Ectomycorrhizal Communities. *Soil Science Society of America Journal* [online]. Roč. 7, č. 2, s. 601- [cit. 2013-04-22]. DOI 10.2136/sssaj2006.0115. Dostupné z: <https://www.soils.org/publications/sssaj/abstracts/71/2/601>
- [21] GUZ, Nurper, Erhan KOCAK a Neset KILINCER. 2013. Molecular phylogeny of *Trissolcus* species (Hymenoptera: Scelionidae). *Biochemical Systematics and Ecology* [online]. Roč. 4, -, s. 85-91 [cit. 2013-04-13]. DOI 10.1016/j.bse.2012.12.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305197812002736>
- [22] ŠMARDA, Jan. 2010. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd., 2. dotisk. Brno: Masarykova univerzita, 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [23] BRODY, Jonathan R. a Scott E. KERN. 2004. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Analytical Biochemistry*

- [online]. Roč. 33, č. 1, s. 1-13 [cit. 2013-04-22]. DOI 10.1016/j.ab.2004.05.054. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269704004932>
- [24] TUIE, Alistair J.P. Mick a Alistair J.P. BROWN. 1999. *Yeast gene analysis*. [2nd printing]. San Diego: Academic. ISBN 978-012-1366-551.
- [25] LŔOKE, Marko. 2011. Extraction of genomic dna from yeasts for pcr-based applications. *Extraction of genomic dna from yeasts for pcr-based applications* [online]. s. - [cit. 2013-04-22]. DOI 10.2144/000113672.
- [26] MO BIO LABORATORIES, INC. 2000. *PowerMicrobial® DNA Isolation Kit: Instruction Manual*. 10 s.
- [27] INNIS, Michael A. c1990. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, xviii, 482 p. ISBN 01-237-2181-4.
- [28] BERNARD R. GLICK AND JACK J. PASTERNAK, Bernard R. Glick and Jack J. Cheryl L. 2010. *Molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA*. 4th ed. Washington, DC: ASM Press. ISBN 978-155-5816-124.
- [29] MITCHELL, Julian I. a Alga ZUCCARO. 2006. Sequences, the environment and fungi. *Mycologist* [online]. Roč. 2, č. 2 [cit. 2013-04-22]. DOI 10.1016/j.mycol.2005.11.004. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269915X05000042>
- [30] ERCOLINI, Danilo. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* [online]. Roč. 5, č. 3 [cit. 2013-04-22]. DOI 10.1016/j.mimet.2003.11.006. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016770120300321X>
- [31] *GEL ELECTROPHORESIS – ADVANCED TECHNIQUES*. 2012. 1. Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia: InTech. ISBN 978-953-51-0457-5. Dostupné z: www.intechopen.com
- [32] BIO-RAD. 2000. *THE DCODE™ UNIVERSAL MUTATION DETECTION SYSTEM* [online]. [cit. 22.04.2013].
- [33] MOLNÁR, Orsolya, Michael WUCZKOWSKI a Hansjörg PRILLINGER. 2008. Yeast biodiversity in the guts of several pests on maize; comparison of three methods: classical isolation, cloning and DGGE. *Mycological Progress* [online]. Roč. 7, č. 2, s. 111-123 [cit. 2013-04-23]. DOI 10.1007/s11557-008-0558-0. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11557-008-0558-0>
- [34] COCOLIN, Luca, Daniele AGGIO, Marisa MANZANO, Carlo CANTONI a Giuseppe COMI. 2002. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal* [online]. Roč. 1, č. 5, s. 407-411 [cit. 2013-04-23]. DOI 10.1016/S0958-6946(02)00023-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694602000237>
- [35] RANTSIOU, K., S. CAMPOLONGO, V. ALESSANDRIA, L. ROLLE, F. TORCHIO a L. COCOLIN. 2013. Yeast populations associated with grapes during withering and their fate during alcoholic fermentation of high-sugar must.

- Australian Journal of Grape and Wine Research* [online]. Roč. 1, č. 1, s. 40-46 [cit. 2013-04-23]. DOI 10.1111/ajgw.12000. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ajgw.12000>
- [36] COCOLIN, Luca, Daniele AGGIO, Marisa MANZANO, Carlo CANTONI a Giuseppe COMI. n. d. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. . DOI 10.1016/S0958-6946(02)00023-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694602000237>
- [37] LI, Hongtao, Xiuhong XU, Huihai CHEN, Ying ZHANG, Jie XU, Jing WANG a Xinying LU. 2013. Molecular analyses of the functional microbial community in composting by PCR-DGGE targeting the genes of the β -glucosidase. *Bioresource Technology*. Roč. 13, -, s. 51-58. DOI 10.1016/j.biortech.2013.01.077. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852413001004>
- [38] STRUCKHOFF, Garrett C.. 2013. DIVERSITY OF THE CHLORITE DISMUTASE GENE IN LOW AND HIGH ORGANIC CARBON RHIZOSPHERE SOIL COLONIZED BY PERCHLORATE-REDUCING BACTERIA. [online]. [cit. 2013-04-23]. DOI 10.1080/15226514.2012.760517. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/loi/bijp20>
- [39] BIRREN, Bruce W a Eric Hon Cheong LAI. c1993. *Pulsed field gel electrophoresis: a practical guide*. San Diego: Academic Press, xviii, 253 p. ISBN 01-210-1290-5.
- [40] BURMEISTER, Margit a Levy ULANOVSKY. c1992. *Pulsed-field gel electrophoresis*. Totowa, N.J.: Humana Press, xiii, 481 p. ISBN 08-960-3229-9.
- [41] XIAO, Edited by Wei. 2010. *Yeast protocols*. 2nd rev. ed. Totowa, NJ: Humana Press. ISBN 978-161-7375-699.
- [42] AMERSHAM BIOSCIECE. 1997. *Gene Navigator™ System: User manual* [online]. 60 s [cit. 22.04.2013]. ISBN 56-1089-80. Dostupné z: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc56108980_20110830173144.pdf
- [43] BASIM, Esin. 2001. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology* [online]. [cit. 2013-04-23]. Dostupné z: <http://journals.tubitak.gov.tr/biology/issues/biy-01-25-4/biy-25-4-6-0006-5.pdf>
- [44] SCHULLER, Dorit, Leonor PEREIRA, Hugo ALVES, Brigitte CAMBON, Sylvie DEQUIN a Margarida CASAL. 2007. Genetic characterization of commercial *Saccharomyces cerevisiae* isolates recovered from vineyard environments. *Yeast* [online]. Roč. 2, č. 8, s. 625-636 [cit. 2013-04-23]. DOI 10.1002/yea.1496. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/yea.1496>
- [45] VAN DER AA KÜHLE, Alis, Lene JESPEREN, Richard L.K. GLOVER, Bréhima DIAWARA a Mogens JAKOBSEN. 2011. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from West African

- sorghum beer. *Yeast* [online]. Roč. 1, č. 11, s. 1069-1079 [cit. 2013-04-23]. DOI 10.1002/yea.756. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/yea.756.abs>
- [46] RODRÍGUEZ, María Esther, Juan José INFANTE, Montse MOLINA, Laureana REBORDINOS a Jesús Manuel CANTORAL. 2011-01. Using RFLP-mtDNA for the rapid monitoring of the dominant inoculated yeast strain in industrial wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* [online]. Roč. 14, č. 1, s. 331-335 [cit. 2013-04-23]. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.035. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160510006665>
- [47] YANG, Baowei, Liping QIAO, Xiuli ZHANG, Yue CUI, Xiaodong XIA, Shenghui CUI, Xin WANG, Xiaofeng MENG, Wupeng GE, Xianming SHI, Dapeng WANG a Jianghong MENG. 2013. Serotyping, antimicrobial susceptibility, pulse field gel electrophoresis analysis of *Salmonella* isolates from retail foods in Henan Province, China. *Food Control* [online]. Roč. 3, č. 1, s. 228-235 [cit. 2013-04-23]. DOI 10.1016/j.foodcont.2012.11.022. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095671351200624X>
- [48] STRYDOM, Amy, Ingrid M. BESTER, Michelle CAMERON, Charles M.A.P. FRANZ a R. Corli WITTHUHN. 2013. Subtyping of *Listeria monocytogenes* isolated from a South African avocado processing facility using PCR-RFLP and PFGE. *Food Control* [online]. Roč. 3, č. 2, s. 274-279 [cit. 2013-04-23]. DOI 10.1016/j.foodcont.2012.10.029. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512005877?np=y>
- [49] WANG, Xiu-Mei, Xing-Feng Lǎ, Lu YIN, Hui-Fang LIU, Wan-Jiang ZHANG, Wei SI, Shen-Ye YU, Mei-Li SHAO a Si-Guo LIU. 2013. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from retail raw foods. *Food Control* [online]. Roč. 3, č. 1, s. 153-158 [cit. 2013-04-23]. DOI 10.1016/j.foodcont.2012.11.032. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512006342>
- [50] ČAČKOVÁ, Katarína. 2012. *Náhodná mutageneze a selekce kmenů karotenogenních kvasinek schopných využít vybrané odpadní substráty* [online]. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 81 l. [cit. 2013-05-05]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/studium/zaverecne-prace?zp_id=48998. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta Chemická.
- [51] SEQme s.r.o.. 2012. SEQme: Seq & qPCR Company. [cit. 2013-04-29]. Dostupné z: <https://www.seqme.eu/imprint.html>
- [52] NCBI. 2013. *NCBI/BLAST: blastn suite* [online]. [cit. 2013-05-02]. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome

- [53] Bio-Rad inc.. 2012. *Pulsed Field Gel Electrophoresis: Overview* [online]. [cit. 2013-04-23]. Dostupné z: http://www.bio-rad.com/evportal/en/CZ/evolutionPortal.portal?_nfpb=true&_pageLabel=SolutionLandingPage&catID=LUSORPDFX

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Zkratka	Popis
ATP	Adenosin trifosfát
CC-1	Cystofilobasidium capitatum 10-1-1
CC-2	Cystofilobasidium capitatum 10-1-1
CoA	Koenzym A
DGGE	Denaturační gradientová gelová elektroforéza
dsDNA	dvouvláknová DNA
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EMS	Ethylester kyseliny methansulfonové
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ITS	Internal transcription spacer
LSU	Velká ribozomální podjednotka
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDA	Fotodiodové pole
PFGE	Pulzní gelová elektroforéza
PR	Pffafia rosodyma
RA	Rhodotorula aurantiaca
rDNA	ribozomální deoxyrybonukleová kyselina
RG	Rhodotorula glutinis
RP	Obrácené fáze
RR	Rhodotorula mucilaginosa
SC	Sacharomyces cerevisiae
SR	Sporobolomyces roseus
Ssa	Sporobolomyces salmonicolor
ssDNA	jednovláknová DNA
SSH	Sporobolomyces shibatanus
TBE	trishydroxyaminomethanu (TRIS), kyseliny borité a kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA).
TEMED	N,N'-tetramethylendiamin
TGGE	Teplotní gradientová gelová elektroforéza
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha A – Porovnání ITS2 fragmentů	P1
Příloha B – Porovnání LS fragmentů	P6
Příloha C – Porovnání ITS2 fragmentů	P10
Příloha D – Porovnání LS fragmentů	P20